(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108114276 A
(43)申请公布日 2018.06.05

(21)申请号 201511036366.5

(22)申请日 2008.08.01

(30)优先权数据
07290979.9 2007.08.03 EP
07290980.7 2007.08.03 EP
07291251.2 2007.10.12 EP
08156405.6 2008.05.16 EP

(62)分案原申请数据
200880110278.7 2008.08.01

(83)生物保藏信息
CNCM I-3842 2007.10.10
CNCM I-4056 2008.07.31
CNCM I-3843 2007.10.10
CNCM I-4058 2008.07.31
CNCM I-4055 2008.07.31
CNCM I-4057 2008.07.31
CNCM I-4059 1999.10.11
CNCM I-2330 1999.10.11
CNCM I-2328 1999.10.11
CNCM I-3841 2007.10.10
CNCM I-3840 2007.10.10
CNCM I-3076 2003.08.27

(71)申请人 巴斯德研究院
地址 法国巴黎
申请人 国立科学研究中心
泰拉韦克蒂斯公司

(72)发明人 P·沙尔诺 A-S·贝尼翁
F·P·库唐 K·库贝雷泰

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
代理人 王健

(51)Int.Cl.
A61K 39/21(2006.01)
A61K 39/12(2006.01)
A61P 31/18(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)
A61P 31/12(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)
A61P 33/00(2006.01)
C12N 15/867(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C07K 14/145(2006.01)
C12N 15/47(2006.01)
C12N 15/49(2006.01)

权利要求书8页 说明书65页
序列表98页 附图100页

(54)发明名称

慢病毒基因转移载体及其医学应用

(57)摘要

本发明涉及基因转移载体的设计，特别提供了适于一次或者重复给予宿主的慢病毒基因转移载体，以及其药物学应用(如特别适于在人宿主中使用的免疫缺陷病毒的免疫接种)。基因转移载体依赖于其使用目的是整合型或非整合型(N1)载体。本发明涉及基因转移载体在一次或多次在体内给予需要其的宿主的应用。本发明的应用领域特别涉及动物治疗或者人体治疗(例如预防性或者治疗性或者对症或者治愈性治疗)，基因治疗或者体内免疫接种。这些载体可用于引起免疫应答以预防或治疗病理状态，包括病毒感染(例如治疗或者预防免疫缺陷病毒，特别是AIDS)、寄生虫和细菌感染或者癌症，优选用于引起保护性长期免疫应答。

CN 108114276 A

1.相继给予哺乳动物宿主以引起针对免疫缺陷病毒感染的保护性特异性细胞免疫应答的化合物组合，其包含至少：

(i)慢病毒载体颗粒，其用第一种确定的一或多个异源病毒包膜蛋白假型包装；

(ii)慢病毒载体颗粒，其用与所述第一种确定的包膜蛋白不同的第二种确定的一或多个异源病毒包膜蛋白假型包装；

其中所述(i)和(ii)的慢病毒载体颗粒在其基因组中包含编码一个或若干多肽的重组多核苷酸，所述多肽包含至少一种衍生自免疫缺陷病毒的GAG抗原的抗原；

其中所述第一种和第二种病毒包膜蛋白不彼此血清中和，且适于哺乳动物细胞体内转导。

2.权利要求1的化合物组合，其进一步包含：

(iii)慢病毒载体颗粒，其用第三种确定的一或多个异源病毒包膜蛋白假型包装，其中所述第三种病毒包膜蛋白与所述第一种和第二种病毒包膜蛋白不彼此血清中和。

3.权利要求1或2的化合物组合，其中载体颗粒的基因组的重组多核苷酸不编码生物学活性的POL多蛋白。

4.权利要求1-3任一项的化合物组合，其中所述第一种和第二种以及可能存在的所述第三种病毒包膜蛋白源自人病毒。

5.权利要求1-4任一项的化合物组合，其中所述第一种和第二种以及可能存在的所述第三种病毒包膜蛋白源自RNA病毒。

6.权利要求1-5任一项的化合物组合，其中所述第一种和第二种以及可能存在的所述第三种病毒包膜蛋白源自选自如下一个或若干病毒目order或病毒科的病毒：弹状病毒科(Rhabdoviridae)、沙粒病毒科(Arenaviridae)、黄病毒科(Flaviriridae)、披膜病毒科(Togaviridae)、冠状病毒科(Coronaviridae)、正粘病毒科(Orthomyxoviridae)、逆转录病毒科(Retroviridae)、单股负链病毒目(Mononegavirales)包括副粘病毒科(Paramyxoviridae)，或者丝状病毒科(Filoviridae)。

7.权利要求2的化合物组合，其中所述第一种和第二种以及第三种(如果有的话)病毒包膜蛋白源自RNA病毒，尤其源自副粘病毒科，或者源自弹状病毒科，尤其源自水泡性病毒属，包括水泡性口炎病毒(VSV)或者麻疹病毒(MV)，或者呼吸道合胞病毒(RSV)或者源自非人逆转录病毒，尤其源自鼠逆转录病毒，或者源自正粘病毒科如流感病毒。

8.权利要求1-4任一项的化合物组合，其中所述第一种和第二种以及第三种(如果有的话)包膜蛋白源自相同病毒科的病毒。

9.权利要求5的化合物组合，其中所述第一种和第二种以及第三种(如果有的话)包膜蛋白源自不同属的病毒。

10.权利要求5的化合物组合，其中所述第一种和第二种以及第三种(如果有的话)包膜蛋白源自不同血清型的病毒，且特别选自由以下质粒表达的包膜，所述质粒保藏在CNCM，保藏号为pThV-VSV.G(IND-CO)CNCM I-3842，或者是另一种形式pThV-VSV.G(IND-CO)CNCM I-4056，pThV-VSV.G(NJ-CO)CNCM I-3843，或者是另一种形式pThV-VSV.G(NJ-CO)CNCM I-4058，或者pThV-VSV.G(COCAL-CO)CNCM I-4055，pThV-VSV.G(ISFA-CO)CNCM I-4057，以及pThV-VSV.G(SVCV-CO)CNCM I-4059。

11.权利要求5的化合物组合，其中所述第一种和第二种以及第三种(如果有的话)包膜

蛋白源自相同属或者源自相同血清型但是不同毒株。

12.权利要求1-8任一项的化合物组合，其中至少一种所述第一种和第二种以及第三种(如果有的话)病毒包膜蛋白作为单体或者多聚体蛋白质产生。

13.权利要求1-8任一项的化合物组合，其中至少一种所述第一种和第二种以及第三种(如果有的话)病毒包膜蛋白能由树突细胞摄取。

14.权利要求1-9任一项的化合物组合，其中所述第一种和第二种以及第三种(如果有的话)病毒包膜蛋白是VSV病毒的跨膜糖基化(G)蛋白，所述G蛋白具有不同的VSV型特异性。

15.权利要求1-11任一项的化合物组合，其中所述第一种和第二种病毒包膜蛋白分别是Indiana VSV-G毒株和New Jersey VSV-G毒株，或者反之亦然。

16.权利要求4-15任一项的化合物组合，其中一个或若干慢病毒载体用包膜蛋白假型包装，所述包膜蛋白相对于参照的确定的天然病毒包膜蛋白而被修饰。

17.权利要求16的化合物组合，其中一个或若干慢病毒载体用重组包膜蛋白假型包装，所述重组包膜蛋白包含源自不同病毒特别是源自水泡病毒的不同属或者VSV的不同种的不同包膜蛋白的结构域或片段。

18.权利要求17的化合物组合，其中所述第一种和第二种包膜蛋白的至少一种是VSV重组包膜蛋白，且所述重组包膜蛋白包含Indiana血清型毒株的VSV-G的输出决定簇YTDIE。

19.权利要求18的化合物组合，其中所述第三种和/或进一步的包膜蛋白是VSV的重组包膜蛋白，且所述重组包膜蛋白包含Indiana血清型毒株的VSV-G的输出决定簇YTDIE。

20.权利要求7或18的化合物组合，其中所述重组包膜蛋白包含Indiana血清型毒株的VSV-G的胞质尾区。

21.权利要求17-20任一项的化合物组合，其中一个或若干慢病毒载体是用包含IndianaVSV的跨膜结构域以及不同VSV血清型毒株的胞外结构域的重组包膜蛋白假型包装的。

22.权利要求20或21的化合物组合，其包含IndianaVSV的跨膜结构域和胞质结构域以及New JerseyVSV的胞外结构域。

23.权利要求13-19任一项的化合物组合，其中一个或若干慢病毒载体用包膜蛋白假型包装，所述包膜蛋白与确定的天然病毒包膜蛋白相比是突变的，特别是通过取代、添加或者缺失一个或若干氨基酸残基突变。

24.权利要求23的化合物组合，其中突变的包膜蛋白是突变的VSV-G蛋白，所述突变影响VSV-G的跨膜结构域的一个或若干氨基酸残基。

25.权利要求13-24任一项的化合物组合，其中一个或若干慢病毒载体用修饰的包膜蛋白假型包装以增加其糖基化或者增加其表达能力或者其由慢病毒颗粒摄取的能力。

26.权利要求1-25的化合物组合，其中包膜蛋白假型包装载体颗粒是在生产载体颗粒的生产细胞中由于密码子优化的核酸分子的表达结果而获得。

27.权利要求12-26任一项的化合物组合，其中所述第一种和第二种以及第三种(如果有的话)G蛋白的至少一种相对于天然G蛋白是修饰的。

28.权利要求1-27任一项的化合物组合，其中所述第一种和第二种包膜蛋白是不同的，由包含于保藏号1-3842的质粒pThV-VSV-G(IND-co)或者保藏号1-4056的其变体或者保藏号1-3843的质粒pThV-VSV-G(NJ-co)或者保藏号1-4058的其变体中的核酸分子编码。

29.权利要求1-27任一项的化合物组合，其中第一种或者第二种包膜蛋白由包含图6、7或19的序列的核酸分子编码。

30.权利要求1-27任一项的化合物组合，其中第一种或者第二种包膜蛋白是不同的，且具有图6、7或19所示那些选择的氨基酸序列。

31.权利要求1-28任一项的化合物组合，其中第三种或进一步的包膜蛋白选自由核酸分子编码的或者具有图6-13或者14-18所示氨基酸序列的蛋白质。

32.权利要求1-31任一项的化合物组合，其中所述假型包装的慢病毒载体是基于人慢病毒的载体。

33.权利要求32的化合物组合，其中假型包装的慢病毒载体颗粒是基于HIV的载体，特别是基于HIV-1或HIV-2的载体。

34.权利要求32或33的化合物组合，其中假型包装的慢病毒载体颗粒是不能复制的慢病毒载体。

35.权利要求26-28任一项的化合物组合，其中假型包装的慢病毒载体颗粒是不能整合的慢病毒载体，尤其是由于整合酶蛋白中突变的结果，由此当所述载体作为颗粒在宿主细胞中产生时或者所述慢病毒载体已经给予患者时，所述整合酶在慢病毒载体中不被表达或者不被功能性表达。

36.权利要求1-35任一项的化合物组合，其中慢病毒载体基因组包含功能性慢病毒DNA活瓣，尤其是HIV-1的DNA活瓣。

37.权利要求32-36任一项的化合物组合，其中慢病毒载体基因组的3'LTR序列缺乏至少U3区域的激活物(增强子)。

38.权利要求36的化合物组合，其中3'LTR缺乏U3区域或者具有部分U3区域缺失。

39.权利要求1-34任一项的化合物组合，其中慢病毒载体基因组具有图2(A)、23、24、25所示序列特征。

40.权利要求32-38任一项的化合物组合，其中LTR5'的U3区域由非慢病毒U3或者由适于驱动tat非依赖性初级转录的启动子代替。

41.权利要求1-35任一项的化合物组合，其中所述慢病毒载体颗粒的慢病毒基因组-载体衍生自在1999年10月11日保藏在CNCM的保藏号为I-2330的质粒pTRIPΔU3.CMV-GFP，或者衍生自在2007年10月10日保藏在CNCM的保藏号为I-3841的质粒pTRIPΔUS.CMV-SIV-GAGco-WPRE，或者衍生自在2007年10月10日保藏在CNCM的保藏号为I-3840的质粒pTRIPΔU3CMV-SIV-GAG-WPRE，特别是通过用HIV-GAG衍生的抗原置换GFP或者SIV-GAG编码序列而衍生自这些质粒之一。

42.权利要求1-41任一项的化合物组合，其中所述多核苷酸编码衍生自人免疫缺陷病毒(HIV)抗原的多肽。

43.权利要求1-42任一项的化合物组合，其中所述多核苷酸编码衍生自HIV、尤其是HIV-1或HIV-2以及SIV、尤其是SIV_{MAC}或者FIV的GAG抗原的抗原。

44.权利要求1-41任一项的化合物组合，其中所述多核苷酸编码衍生自免疫缺陷病毒的GAG且具有天然GAG抗原、特别是GAG多蛋白或者基质蛋白或者衣壳蛋白蛋白或者核衣壳蛋白的氨基酸序列的抗原，或者是这种多蛋白或这种蛋白质的片段，或者是与天然GAG抗原相比修饰的GAG抗原，特别是通过突变包括通过在氨基酸序列中缺失、取代或者添加一个或

若干氨基酸残基进行修饰，或者通过翻译后修饰进行修饰，选择的修饰的GAG抗原是生物学功能性或者生物学非功能性抗原。

45.权利要求1-41任一项的化合物组合，其中所述重组多核苷酸编码衍生自HIV或SIV或FIV的GAG抗原的生物学无功能多肽，其中所述多肽不能使GAG假型颗粒或者GAG-POL假型颗粒从慢病毒载体转导的细胞中形成。

46.权利要求1-42任一项的化合物组合，其中GAG衍生的抗原是缺乏十四烷基化的GAGΔmyr蛋白质。

47.权利要求1-43任一项的化合物组合，其中GAG衍生的抗原具有图21、26或38所示氨基酸序列。

48.权利要求1-44任一项的化合物组合，其中编码GAG多蛋白的多核苷酸或者从中衍生的多肽由密码子优化的核苷酸序列表达，以与天然基因的核苷酸序列相比改良在哺乳动物细胞、特别是人细胞中的翻译。

49.权利要求1-45任一项的化合物组合，其中所述重组多核苷酸进一步编码选自衍生自NEF抗原、TAT抗原、免疫缺陷病毒的REV抗原、免疫缺陷病毒的POL抗原或者其组合的多肽。

50.权利要求1-49任一项的化合物组合，其中所述重组多核苷酸编码融合蛋白，所述融合蛋白包含具有图21所示序列的GAG衍生的抗原、包含或具有图21所示氨基酸序列的POL衍生的抗原，以及包含或具有图21所示氨基酸序列的NEF衍生的抗原，其中所述融合蛋白具有如下之一的序列：5' GAG POL NEF 3'，或者5' POL NEF GAG 3'或5' POL GAG NEF 3'，或者5' NEF GAG POL 3'或5' NEF POL GAG 3'或5' GAG NEF POL 3'。

51.权利要求1-50任一项的化合物组合，其中所述慢病毒载体(i)和/或(ii)配制成缺乏免疫应答佐剂的组合物。

52.权利要求1-51任一项的化合物组合，其进一步包含免疫调节剂。

53.权利要求1-52任一项的化合物组合，其中所述慢病毒载体配制成适于注射给宿主、尤其适于皮下注射的组合物。

54.权利要求1-53任一项的化合物组合用于包含激发(priming)免疫应答及随后加强哺乳动物宿主中免疫应答的给药方案中，其中所述(i)用所述第一种病毒包膜蛋白假型包装的慢病毒载体与所述(ii)用所述第二种病毒包膜蛋白假型包装的慢病毒载体以及如果有的话所述(iii)用第三种病毒包膜蛋白假型包装的慢病毒载体在不同时间单独给予，给予每种所述慢病毒载体(i)和(ii)以及如果有的话(iii)是用以激发或者加强免疫应答。

55.权利要求15-54任一项的化合物组合，其中所述用Indiana毒株的VSV-G蛋白假型包装的慢病毒载体用于激发，用New Jersey毒株的VSV-G蛋白假型包装的慢病毒载体用于加强。

56.权利要求12-51任一项的一组化合物，其中用New Jersey毒株的VSV-G蛋白假型包装的慢病毒载体用于激发，用Indiana毒株的VSV-G蛋白假型包装的慢病毒载体用于加强。

57.权利要求1-56任一项的化合物组合用于治疗性治疗感染人免疫缺陷病毒(HIV)、特别是HIV-1或HIV-2的人宿主。

58.权利要求1-54任一项的化合物组合用于预防性治疗感染人免疫缺陷病毒、特别是HIV-1或HIV-2的人宿主。

59.权利要求1-58任一项的慢病毒载体颗粒，其适于制备引起或者加强抗免疫缺陷病毒感染的保护性特异性细胞免疫应答的组合物。

60.权利要求1-59任一项的慢病毒载体，在其基因组中包含重组多核苷酸，所述重组多核苷酸具有编码衍生自人免疫缺陷病毒(HIV)的GAG抗原的抗原的人密码子优化的序列。

61.权利要求60的慢病毒载体，其中重组多核苷酸编码衍生自HIV-1共有B毒株的GAG抗原的抗原，其是非十四烷基化GAG抗原。

62.权利要求60或61任一项的慢病毒载体，其中重组多核苷酸具有在人细胞中密码子优化表达的核苷酸序列，且编码衍生自GAG多蛋白及HIV的NEF抗原表位簇以及任选HIV的POL多蛋白表位簇的抗原，特别是具有图21所示序列的GAG衍生的抗原、包含或具有图21所示氨基酸序列的POL衍生的抗原，包含或者具有图21所示氨基酸序列的NEF衍生的抗原之间的融合蛋白，其中融合蛋白具有如下之一的结构：5' GAG POL NEF 3'，或者5' POL NEF GAG 3'，或者5' POL GAG NEF 3'，或者5' NEF GAG POL 3'，或者5' NEF POL GAG 3'，或者5' GAG NEF POL 3'。

63.权利要求56-58任一项的慢病毒载体，其用权利要求27-30所述的包膜蛋白或者包膜蛋白VSV-G假型包装。

64.权利要求1-59任一项的的化合物组合或者权利要求58-62任一项的慢病毒载体用于治疗方案中，所述治疗方案还包含给予阻止逆转录病毒复制的抗逆转录病毒化学药物。

65.权利要求64的化合物组合或慢病毒载体，其中抗逆转录病毒药物选自逆转录病毒逆转录酶(RT)的抑制剂与逆转录病毒蛋白酶的抑制剂。

66.权利要求65的化合物组合或慢病毒载体，其中给予逆转录病毒逆转录酶的一或几种抑制剂以及逆转录病毒蛋白酶的一或几种抑制剂。

67.权利要求64-66任一项的化合物组合或慢病毒载体，与抗逆转录病毒药物同时使用。

68.权利要求64-67任一项的化合物组合或慢病毒载体，其中在给予抗逆转录病毒药物结束后延长时间给予所述化合物。

69.权利要求64-67任一项的化合物组合或慢病毒载体，其中在给予所述化合物期间在确定的时间中断几次给予抗逆转录病毒药物。

70.适于制备慢病毒载体的质粒载体组合物，其包含

a.慢病毒载体质粒，包含

i.含有慢病毒基因组的顺式作用序列的多核苷酸，其包含5' LTR或者其中启动子被置换的修饰的5' LTR，包壳信号(Ψ)，RRE序列，DNA活瓣以及3' LTR序列，其中所述3'-LTR序列至少缺失U3区域的增强子和病毒启动子及任选完整的U3区域，所述载体质粒进一步含有

ii.编码包含至少一种衍生自人免疫缺陷病毒的GAG抗原的抗原的一个或若干多肽的多核苷酸，其中所述多核苷酸在适于人宿主在体内使用的内部启动子控制下，

b.包装质粒，其含有(i)适于在人宿主体内使用的内部启动子及(ii)编码慢病毒的GAG、POL及任选TAT和REV蛋白的慢病毒多核苷酸，所述包装质粒缺乏慢病毒Ψ包壳信号，具有末端poly A尾部；

c.包膜质粒，其含有(i)适于在人宿主体内使用的内部启动子及(ii)编码一或多个异源病毒包膜蛋白的多核苷酸，所述病毒包膜蛋白选自VSV-G包膜蛋白或者衍生自其中的蛋

白质以及poly A尾部，特别是由选自如下的质粒表达的包膜蛋白或者衍生自其中的蛋白质，所述质粒是在CNCM保藏的pThV-VSV.G(IND-CO)CNCM I-3842，或者另一种形式pThV-VSV.G(IND-CO，CNCM I-4056，pThV-VSV.G(NJ-CO)CNCM I-3843，或者另一种形式pThV-VSV G(NJ-CO)CNCM I-4058，或者pThV-VSV.G(COCAL-CO)CNCM I-4055，pThV-VSV G(ISFA-CO)CNCM I-4057，以及pThV-VSV.G(SVCV-CO)CNCM I-4059。

71.权利要求70的质粒载体组合物，其中提供多核苷酸的慢病毒是人免疫缺陷病毒，特别是HIV-1或HIV-2。

72.权利要求70或71的质粒载体组合物，其中至少一个质粒优选所有质粒具有在人细胞中密码子优化表达的编码多核苷酸。

73.权利要求70-72的质粒载体组合物，其中至少一个优选所有质粒的内部启动子不具有增强子活性。

74.权利要求70-73任一项的质粒载体组合物，其中内部启动子选自如下基因启动子：EF1α、人PGK、PPI(前胰岛素原)、thiodextrin、HLA DR不变链(P33)、HLA DRα链、铁蛋白L链或铁蛋白H链、β2微球蛋白、凝乳酶β4、凝乳酶β10，或者Cystatin核糖体蛋白L41。

75.权利要求70-74任一项的质粒载体组合物，其中编码POL蛋白的包壳质粒编码缺陷的整合酶，防止载体基因组的编码多核苷酸在细胞基因组中整合。

76.权利要求70-74任一项的质粒载体组合物，其中编码衍生自GAG抗原的抗原的多核苷酸是权利要求43-50任一项的多核苷酸。

77.权利要求70-76任一项的质粒载体组合物，其中所述假型包装的包膜蛋白是权利要求28-30任一项的包膜蛋白。

78.权利要求70-77任一项的质粒载体之一。

79.是权利要求70-77任一项的质粒载体组合物的表达产物的慢病毒载体颗粒，其适于制备引起或加强针对免疫缺陷病毒感染的保护性特异性细胞免疫应答的组合物。

80.嵌合的HIV-1衍生的抗原，其是包含或者由具有图21所示序列的GAG衍生的抗原与衍生自HIV-1毒株的NEF、POL、TAT或REV的抗原的组合或者与这种抗原的组合组成的融合蛋白。

81.权利要求80的嵌合的HIV-1衍生的抗原，其中POL衍生的抗原包含或具有图21所示氨基酸序列。

82.权利要求80或81的嵌合的HIV-1衍生的抗原，其中NEF衍生的抗原包含或具有图21所示氨基酸序列。

83.VSV-G包膜蛋白，其具有选自图14-20所示序列的氨基酸序列，或者由如下质粒表达，所述质粒选自在CNCM保藏的pThV-VSV.G(IND-CO)CNCM I-3842，或者另一种形式pThV-VSV.G(IND-CO)，CNCM I-4056，pThV-VSV.G(NJ-CO)CNCM I-3843，或者另一种形式pThV-VSV.G(NJ-CO)CNCM I-4058，或者pThV-VSV.G(COCAL-CO)CNCM I-4055，pThV-VSV.G(ISFA-CO)CNCM I-4057以及pThV-VSV.G(SVCV-CO)CNCM I-4059。

84.编码具有选自图14-20所示序列的氨基酸序列的VSV-G包膜蛋白之一的核酸分子，其中所述核酸分子被密码子优化用于在人细胞中表达，或者其是编码由如下质粒表达的包膜的插入序列，所述质粒选自在CNCM保藏的pThV-VSV.G(IND-CO)CNCM I-3842，或者另一种形式pThV-VSV.G(IND-CO，CNCM I-4056，pThV-VSV.G(NJ-CO)CNCM I-3843，或者另一种形式

pThV-VSV G(NJ-CO)CNCM I-4058,,或者pThV-VSV.G(COCAL-CO)CNCM I-4055,pThV-VSV.G(ISFA-CO)CNCM I-4057以及pThV-VSV.G(SVCV-CO)CNCM I-4059,或者其具有选自图6-12所示核酸序列的序列。

85.包含于权利要求28或41任一项的质粒中的核酸分子,其中所述核酸分子编码至少一种衍生自GAG抗原的抗原,或者所述核酸分子在严格条件下与所述核酸分子杂交且能编码HIV-1或HIV-2 GAG抗原或者其片段。

86.适于抑制哺乳动物宿主体内HIV-1或HIV-2感染或者SIV或FIV感染的免疫原性组合物,其包含权利要求1-58任一项的慢病毒颗粒。

87.在包括在哺乳动物宿主中激发免疫应答及随后加强免疫应答的给予方案中权利要求1-86任一项的化合物组合,

-在暴露于或者感染逆转录病毒、特别是HIV之后控制宿主病毒血症,及特别限制或降低宿主病毒负荷;和/或

-诱导宿主体内抗逆转录病毒、特别是HIV的保护性细胞免疫;和/或

-在暴露于或者感染HIV逆转录病毒之后抗病毒复制的保护作用;和/或

-在逆转录病毒、特别是HIV感染急性期抗中枢记忆性CD4+T细胞应答耗竭的保护作用;和/或

-在逆转录病毒、特别是HIV感染慢性期保持中枢记忆性CD4+细胞应答;和/或

-在逆转录病毒、特别是HIV原发感染期间天然和中枢记忆性CD8+T细胞应答的更早和/或更高反弹;和/或

-抗病毒逃逸免疫压力的保护作用,从而使得可以长期控制逆转录病毒、特别是HIV感染。

88.包含缺陷的整合酶蛋白及进一步包含编码至少一个抗原性多肽的多核苷酸的慢病毒载体在生产免疫原性组合物中的应用,所述免疫原性组合物用于引起给予所述免疫原性组合物的宿主中针对所述至少一个多肽的免疫应答。

89.权利要求88的慢病毒载体的应用,其中所述免疫应答是体液免疫应答,尤其是保护性体液免疫应答。

90.权利要求88或89的慢病毒载体,其中所述免疫应答是细胞免疫应答,如CD8-介导的细胞免疫应答或者CD4-介导的细胞免疫应答。

91.权利要求88-90任一项的慢病毒载体,其中所述慢病毒基因组缺乏gag、pol和/或env慢病毒基因,优选缺乏功能性gag、pol和/或env慢病毒基因。

92.权利要求88-91任一项的慢病毒载体的应用,其中所述慢病毒基因组缺乏所有内源编码慢病毒序列.

93.权利要求88-92任一项的慢病毒载体的应用,其中所述至少一个多肽由源自病毒基因组、特别是逆转录病毒、慢病毒、黄病毒或冠状病毒、细菌或寄生虫的序列编码。

94.权利要求93的慢病毒载体的应用,其中所述至少一个多肽衍生自AIDS病毒包括HIV-1或HIV-2的包膜、衍生自HIV的衣壳或者衍生自黄热病毒、西尼罗河病毒、登革热病毒(DV)、日本脑炎病毒(JEV)或者SARS-相关冠状病毒的包膜。

95.权利要求88-92任一项的慢病毒载体的应用,其中所述至少一个多肽包含肿瘤表位或者抗原。

96.权利要求88-95任一项的慢病毒载体的应用，其中所述慢病毒载体用VSV-G蛋白假型包装。

97.权利要求88-96任一项的慢病毒载体的应用，其中所述免疫应答是早期免疫应答。

98.权利要求88-97任一项的慢病毒载体的应用，其中所述免疫应答是长期免疫应答。

99.权利要求88-98任一项的慢病毒载体的应用，其中所述宿主中的所述免疫应答通过一次给予实现。

100.权利要求88-99任一项的慢病毒载体在治疗病原体如病毒、细菌或寄生虫所致感染或者不利后果中的应用。

101.权利要求88-99任一项的慢病毒载体在治疗恶性状态中的应用。

102.权利要求88-99任一项的慢病毒载体在预防宿主的病原体如病毒、细菌或寄生虫感染中的应用。

103.权利要求88-99任一项的慢病毒载体在预防恶性状态中的应用。

慢病毒基因转移载体及其医学应用

[0001] 本申请是2010年4月2日提交的题为“肺癌生物标记及其用途”的中国专利申请200880110278.7的分案申请。

[0002] 本发明涉及基因转移载体的设计，特别提供了适于单独一次(unique)给予或者重复给予宿主的慢病毒基因转移载体，以及其医学应用。

[0003] 在特异的实施方案中，本发明特别依赖于在同源模型中用慢病毒基因转移载体进行的超过5个月的临床前试验中获得的结果，用以设计免疫缺陷病毒的疫苗候选物，特别适于用于人宿主中。

[0004] 本发明特别涉及基因转移载体在体内一次或多次给予需要其的宿主的应用。本发明的应用领域涉及特定的动物治疗或者人体治疗(例如预防性或者治疗性或者对症或者治愈性治疗)。

[0005] 本发明的慢病毒载体的组合特别适用于基因治疗领域或者体内免疫接种。然而，其也更常用于需要在体内一次或者多次注射载体的任何药物学治疗。

[0006] 本发明特别提供了适于重复给予慢病毒载体用于预防或治疗哺乳动物宿主、特别是人类疾病的方式与方法。这些载体的特异应用是引起免疫应答，用于预防或治疗病理状态，包括病毒感染、寄生虫和细菌感染或者癌症，优选用于引起保护性长期免疫应答。根据本发明的特异实施方案，设计的载体特别感兴趣用于免疫缺陷病毒、特别是AIDS的治疗或预防领域。

[0007] 本发明另一方面是基因转移载体是整合型或者非整合型(NI)载体。载体形式的选择应依赖于其使用目的。

[0008] 病毒、特别是RNA病毒且尤其是慢病毒在过去已经用于设计基因转移载体，因为慢病毒具有实现有丝分裂非依赖性核输入的能力，使得其在未分裂的靶细胞中可以有效复制。因此，基于慢病毒的载体已经用于包括预防或者治疗性免疫接种等各种应用中，或者使用这些载体作为基因治疗的工具。

[0009] 然而当在体内检测慢病毒载体时，观测到体内注射的次数受到宿主针对用于假型包装载体颗粒的包膜蛋白引起的体液应答的限制。

[0010] 在宿主体内针对假型包装的载体颗粒的包膜引起的应答因此是当需要在体内多次给予时有效使用这种载体的障碍。

[0011] 本发明提供了当在预防或治疗情况中给予宿主几次假型包装的载体颗粒时用于至少部分补救由于针对包膜产生的免疫应答引起的障碍。

[0012] 本发明因此涉及适用于需要其的宿主中的慢病毒载体的不同结构，也特别涉及其在化合物组合(也称作化合物试剂盒)中的关联，可以一次或重复给予所述慢病毒载体。

[0013] 特别地，本发明相继使用不同的慢病毒载体以在宿主体内输送转基因。

[0014] 本发明的慢病毒载体、特别是其组合特别适用于药物学治疗领域，其中由内源表达的抗原引起的免疫应答包括细胞免疫应答是有益的或必需的；因此本发明提供了设计用于需要对于胞内病原性生物体包括病毒、特别是逆转录病毒或者更一般性针对病理状态进行预防性或者治愈性治疗的宿主的免疫接种方案的工具，包括进行体内基因治疗。本发明

特别适于需要在体内多次注射载体的任何药物学治疗。

[0015] 本发明人特别提供了这样的迹象，即本发明所述慢病毒载体特别是在组合使用时适于在非人灵长类动物模型中引起细胞免疫应答，当所述慢病毒载体表达所述病毒抗原时可以防止病毒攻击。

[0016] 在本发明的特异的实施方案中，本发明人特别揭示在用猿猴免疫缺陷病毒攻击非人灵长类动物模型中已经获得细胞保护性免疫应答。本发明人特别揭示在初免(prime)-加强(boost)策略中使用来自两个非交叉反应性VSV 血清型的糖蛋白G假型包装的慢病毒载体，这些载体引起针对载体编码的抗原的强力和广泛的细胞免疫应答。这个结果在由cynomolgus猕猴 (cynomolgus macaque)组成的模型中已经揭示，并因此设计特别适合载体编码的抗原的载体，以提供特别适用于人宿主的载体。

[0017] 鉴于这些结果，本发明人设计了当给予宿主时特别是在预防或者治疗病毒感染以及特别在人宿主中的情况中适于引起有效且优选保护性免疫应答的工具，以提供针对这种病毒、特别是逆转录病毒如慢病毒感染的免疫应答，包括针对人免疫缺陷病毒的免疫应答，且可以防止与感染相关的疾病发生。

[0018] 因此，本发明的慢病毒载体的组合特别提供了用于重复给药的有效初免-加强系统，成功地使得在宿主中初免及加强免疫应答，特别是在注射进需要其的宿主中之后。“重复”是指由于本发明揭示的慢病毒载体给予结果而将有效成分即包含于本发明慢病毒载体中的异源多核苷酸给予宿主两或多次，特别是给予三次。

[0019] 本发明因此涉及化合物组合，其包含至少：

[0020] (i)慢病毒载体颗粒(也称作慢病毒载体)，其用第一种确定的一个或多个异源病毒包膜蛋白假型包装；

[0021] (ii)慢病毒载体颗粒(也称作慢病毒载体)，其用与所述第一种确定的包膜蛋白不同的第二种确定的一个或多个异源病毒包膜蛋白假型包装；

[0022] 其中所述(i)和(ii)慢病毒载体颗粒编码(即含有)异源确定的多核苷酸，其特别是编码一或几种多肽的重组多核苷酸(或者转基因)；

[0023] 其中所述第一种和第二种病毒包膜蛋白彼此不发生血清中和反应，且适于哺乳动物细胞的体内转导。

[0024] 由慢病毒载体编码(含有)的多核苷酸被称为“异源”，是因为其作为插入体进入载体基因组构建体中。在特异的实施方案中，所述基因组载体和多核苷酸可源自相同组的抗病毒(Antiviruses)，甚至源自相同类型的抗病毒。

[0025] 在本发明的特异的实施方案中，所述异源确定的多核苷酸编码一或几种多肽，所述多肽包含衍生自免疫缺陷病毒的GAG抗原的至少一种抗原。特别地，所述抗原是或者包含一或多个免疫原性表位。衍生自GAG的抗原在本申请中定义且在实施例中例证。其特别包含GAG的片段。根据用于测定抗SIV感染的保护作用的模型设计，实施例中例证的GAG抗原源自SIV。当用于设计适于人宿主的载体时，GAG抗原衍生自人免疫缺陷病毒、特别是HIV-1或HIV-2的GAG多蛋白。

[0026] 在本发明的特异的实施方案中，是编码一或几种多肽的重组多核苷酸 (或者转基因)的所述异源确定的多核苷酸不编码免疫缺陷病毒的生物学活性的POL抗原。

[0027] 在特异的实施方案中，衍生自GAG的编码的抗原、特别是衍生自GAG 的免疫原性表

位，不是生物学功能性GAG抗原，且不包含这种生物学功能性GAG；换句话说，所述抗原是生物学非功能性GAG。

[0028] 本发明中定义的慢病毒载体是由携带(特定多蛋白包膜的)包膜蛋白的载体颗粒(因此也称作“慢病毒载体颗粒”)组成的假型包装的慢病毒载体，其中所述包膜蛋白源自与提供慢病毒载体基因组的特定慢病毒不同的病毒。因此，所述包膜蛋白是所谓的“异源一个或多个病毒包膜蛋白”。在下文中，提及的“包膜蛋白”包含适于实施本发明的任何类型包膜蛋白。

[0029] 本发明的慢病毒载体是置换载体，是指使编码慢病毒蛋白的原始慢病毒序列基本缺失载体基因组，或者当存在时是修饰的，且特别防止生物学活性的POL抗原以及任选进一步的慢病毒的结构和/或辅助和/或调节蛋白的表达。

[0030] 载体颗粒的“载体基因组”也包含感兴趣的多核苷酸或者转基因。在特异的实施方案中，所述转基因也缺乏编码生物学活性的POL抗原的多核苷酸。因此，所述载体基因组不能恢复生物学活性的POL抗原。生物学活性的POL抗原包含通过GAG-POL多蛋白裂解产生的病毒酶蛋白酶(RT)、逆转录酶(RT和RNase H)以及整合酶(IN)。当至少一种这些酶的生物学活性未被激活时，POL抗原不是生物学活性的。这些酶的生物学活性在Fields (Virology-Vol 2 Chapter 60,pages 1889-1893 Edition 1996)中描述。

[0031] 在特定的实施方案中，载体基因组中的多核苷酸或转基因缺乏功能性 pol基因，特别是不含有完整pol基因。

[0032] 本文定义的载体基因组除了置于适当调节序列控制下的在治疗方面感兴趣的所谓异源多核苷酸之外，还含有是所述基因组非编码区且是提供 DNA或RNA合成和加工的识别信号必需的慢病毒基因组序列。这些序列是顺式作用序列。用于制备本发明的慢病毒载体的载体基因组的结构和组成是基于现有技术中的原理。这种慢病毒载体的例子披露于(Zennou et al, 2000;Firat H.et al,2002;VandenDriessche T.et al)。特别地，可以从载体基因组制备最小慢病毒基因输送载体，其置于适当调节序列控制下的在治疗方面感兴趣的所谓异源多核苷酸之外，仅含有是所述基因组非编码区的提供 DNA或RNA合成和加工的识别信号必需的慢病毒基因组序列。

[0033] 因此，载体基因组可以是置换载体，其中2个长末端重复(LTR)之间的病毒蛋白编码序列被感兴趣多核苷酸置换。

[0034] 除非另有说明，或除非技术上不相关，本申请中公开的特征，对于慢病毒载体的结构或应用的各种特征、实施方案或实施例，特别是关于它们的包膜蛋白或异源多核苷酸，可以根据任何可能的组合而组合。

[0035] 术语“化合物组合”或“化合物试剂盒”是指组成试剂盒或组合的活性成分的慢病毒载体在所述试剂盒或组合中以独立的化合物提供，并且目的在于独立给予宿主，特别是在时间上独立给予。因此，本发明使得能在需要的宿主中进行初免-加强给予，其中第一次给予步骤引起免疫、特别是细胞免疫应答，后面的给予步骤加强所述免疫反应。

[0036] 因此试剂盒的各化合物独立提供给需要的宿主，特别是哺乳动物宿主，特别是人类患者。

[0037] 因此，所述慢病毒载体抗原以独立包装提供，或者可以存在于一个包装中用于独立使用。

[0038] 因此，包装中包括的记载使用指导的说明书可以指示用独立的包膜蛋白假型包装的所述慢病毒载体颗粒用于在时间上独立给予，特别是用于在宿主中初免和随后加强免疫反应。

[0039] 根据本发明，提供了用第一种确定的一或多个异源病毒包膜蛋白假型包装的慢病毒载体颗粒，以及用第二种确定的一或多个异源病毒包膜蛋白假型包装的慢病毒载体颗粒。因此，所述第一种和第二种异源病毒包膜蛋白是不同的，特别是源自不同的病毒毒株。因此，本发明的化合物试剂盒的慢病毒载体颗粒是独立的，至少是用于假型包装载体颗粒的特定包膜蛋白所致。

[0040] 在本发明的特定实施方案中，化合物组合包含第三种或进一步类型的慢病毒载体颗粒，其中第三种慢病毒载体的包膜蛋白不同于所述第一种和第二种包膜蛋白，特别是源自不同的病毒毒株。

[0041] 除了它们的假型包装包膜蛋白之外，本发明的慢病毒载体可以是相同的，特别是可以具有相同的载体基因组。

[0042] 或者，它们的载体基因组可以不同，条件是它们携带相同的异源的确定的多核苷酸(也称作转基因)，特别是具有治疗兴趣的相同多核苷酸。

[0043] 在本发明另一个实施方案中，慢病毒载体的载体基因组通过具有不同的多核苷酸而不同，条件是所述不同的多核苷酸编码具有共同抗原决定簇或共同表位的多肽。因此，所述不同的多核苷酸可以是彼此的变体。

[0044] 如上所述，术语“载体基因组”是指核酸，即慢病毒起源的核酸，其组成慢病毒载体颗粒的基因组。因此，该术语涉及任何合适的核酸，即DNA 或RNA，双链或单链，包括含有DNA活瓣的形式，作为三链体序列。核酸(DNA、RNA)的性质及其组构依赖于颗粒周期的阶段，包括载体质粒- 用于与包壳质粒和包膜质粒共转染细胞-用于表达颗粒，或者颗粒的RNA 基因组，当形成时，或者这一基因组的核酸在被给予颗粒的宿主的转导细胞中的各种形式(包括基因组mRNA转录物、线性未整合DNA逆转录物、或未整合的一或两个LTR DNA环状形式或整合的前病毒)(见Fields Virology)，包括载体整合前复合物。

[0045] 作为将颗粒给予宿主的结果，异源多核苷酸允许其编码的多肽在用慢病毒载体转导的宿主细胞中的内源表达。

[0046] 所述第一种和第二种及如果有的所述第三种和可能的进一步的包膜蛋白根据它们不彼此血清中和(即不交叉反应)的能力选择。因此，用于假型包装组合中的载体颗粒的所述第一种和第二种及如果有的所述第三种和可能的进一步的包膜蛋白的每一种不与所述第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的包膜蛋白的另一个反应，特别是不被抗其的抗体识别。因此，所述第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的病毒包膜蛋白的每一个，当在慢病毒载体内被给予时，不引起识别其它病毒包膜蛋白的抗体产生，其中所述抗包膜抗体的这种产生(所谓的抗载体免疫)将导致不能引起抗从所述多核苷酸表达的产物的免疫应答。

[0047] 在特定实施方案中，在化合物试剂盒中，所述第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的包膜蛋白源自人类病毒，DNA或者RNA病毒。

[0048] 在本发明的化合物试剂盒的特定实施方案中，所述第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的包膜蛋白源自同一病毒科的病毒。

[0049] 根据本发明的特定实施方案，所述第一种和第二种包膜蛋白源自相同病毒的不同毒株类型，或源自相同病毒的非交叉反应性血清型。

[0050] 在所述化合物试剂盒的另一个实施方案中，所述第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的包膜蛋白源自不同属的病毒。

[0051] 在所述化合物试剂盒的另一个实施方案中，所述第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的包膜蛋白源自相同属或者源自相同血清型但不同毒株类型，或源自病毒的非交叉反应血清型。

[0052] 本发明特别涉及化合物试剂盒，其中在所述化合物试剂盒的另一个实施方案中，所述第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的包膜蛋白源自弹状病毒科(Rhabdoviridae)(包括狂犬病)，特别是源自水泡性病毒属 (Vesiculovirus)，包括水泡性口炎病毒(VSV)，源自副粘病毒科 (Paramyxoviridae)，特别是麻疹病毒(MV)，呼吸道合胞病毒(RSV)，或者源自非人类逆转录病毒或者源自正粘病毒科(Orthomyxoviridae)，如流感病毒。

[0053] 上述病毒是RNA病毒，能感染哺乳动物宿主，特别是人类宿主。它们中的一些，特别是单股负链病毒目(Mononegavirales)，特别是弹状病毒科，特别是水泡性病毒属，特别是VSV已被提议提供包膜蛋白，也称为表面蛋白，以假型包装病毒载体，特别是慢病毒载体颗粒。

[0054] 水泡性口炎病毒的糖蛋白(VSV-G)是跨膜蛋白，作为野生型病毒颗粒的表面外壳。它也是用于工程化慢病毒载体的共同外壳蛋白。目前，9个病毒物种被确定分类为VSV类别，19个弹状病毒被临时分类为这一类别(见下述)，全部显示各种程度的交叉中和。当被测序时，蛋白G基因显示序列相似性。VSV-G蛋白存在N-末端胞外域、跨膜区和C末端胞质尾区。其经过高尔基体外侧网络(内质网和高尔基体)输出到细胞表面。

[0055] VSV毒株包括几种血清型，可提供用于制备慢病毒载体的包膜蛋白：VSV-G糖蛋白可特别选自分类于水泡性病毒属的物种：Carajas病毒(CJSV)，Chandipura病毒(CHPV)，Cocal病毒(COCV)，Isfahan病毒(ISFV)，Maraba 病毒(MARAV)，Piry病毒(PIRYV)，水泡性口炎Alagoas病毒(VSAV)，水泡性口炎Indiana病毒(VSIV)和水泡性口炎New Jersey病毒(VSNJV)和/或临时分类于水泡性病毒属的毒株，如Grass carp弹状病毒，BeAn 157575病毒(BeAn 157575)，Boteke病毒(BTKV)，Calchaqui病毒(CQIV)，Eel病毒 American(EVA)，Gray Lodge病毒(GLOV)，Jurona病毒(JURV)，Klamath病毒(KLAV)，Kwatta病毒(KWAV)，La Joya病毒(LJV)，Malpais Spring病毒 (MSPV)，Mount Elgon蝙蝠病毒(MEBV)，Perinet病毒(PERV)，Pike fry弹状病毒(PFRV)，Porton病毒(PORV)，Radi病毒(RADIV)，鲤鱼病毒Spring病毒血症(SVCV)，Tupaia病毒(TUPV)，溃疡病弹状病毒(UDRV)，Yug Bogdanovac病毒(YBV)。

[0056] 水泡性口炎Indiana病毒(VSIV)和水泡性口炎New Jersey病毒(VSNJV) 是优选用于假型包装本发明慢病毒载体或设计用于假型包装慢病毒载体的重组包膜蛋白的毒株。但是，Isfahan和SVCV包膜也提供用于制备假型包装的颗粒的良好候选者。Cocal也是感兴趣的，当其不用于第一个给予的颗粒中时，特别是对于初免-加强方案中的晚期或最后给予是优选的。当具有不同的假型包装包膜的颗粒依次被给予时，对于所述包膜下述给予顺序可以是优选的，Indiana；New Jersey；Isfahan；SVCV/Cocal。引物Cocal假型包装的慢病毒载体血清中和几种其它包膜，优选的是在疫苗时间表 (chronology)中，当Cocal包膜用于制

备颗粒时，它们在最后被给予。

[0057] Indiana和New Jersey血清型的VSV毒株特别有兴趣用于本发明的慢病毒载体。它们的VSV-G蛋白披露于Genebank，其提供了几种毒株。对于 VSV-G New Jersey毒株，特别参照具有登录号V01214的序列。

[0058] 在VSV中，Chandipura病毒(CHPV)，Cocal病毒(COCV)，Perinet病毒 (PERV)，Piry病毒(PIRYV)，SVCV或Isfahan病毒可能是良好的候选物用于设计替代的包膜蛋白，特别是设计第三种包膜蛋白，或多个第三种包膜蛋白，或进一步的包膜蛋白。但是，实施例中示出当比较用不同包膜制备的颗粒获得的载体效价时，Chandipura病毒(CHPV)和Piry病毒(PIRYV)提供了具有低假型包装能力的包膜蛋白。因此，在第一个途径中这些包膜可被排除了包膜选择之外以制备具有有效转导能力的颗粒。

[0059] 根据另一个实施方案，病毒包膜蛋白源自其它RNA病毒，例如非人类逆转录病毒，如鼠逆转录病毒或源自流感病毒。

[0060] 适合慢病毒假型包装的包膜蛋白的其它例子在后面说明书给出，特别是参考它们的宿主中的靶细胞。

[0061] 根据特定的实施方案，本发明的化合物试剂盒利用第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的病毒包膜蛋白，其源自弹状病毒科，特别是VSV，或源自副粘病毒科，其中所述第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的病毒包膜蛋白源自不同属的病毒，或者源自相同血清组特别是水泡性口炎血清组的不同病毒毒株，或者源自相同属的不同血清型。

[0062] 在本发明的特定实施方案中，适合用于设计化合物试剂盒的假型包装的慢病毒载体的蛋白质或糖蛋白特别作为单体或多聚体蛋白产生。

[0063] 在本发明的特定实施方案中，所述第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的病毒包膜蛋白能够被抗原呈递细胞摄取，特别是被树突细胞摄取，通过融合和/或胞吞方式摄取。在特定实施方案中，摄取效率可以用作选择用于假型包装的VSV包膜的特征。在这个方面转导的相对效价(效价DC/其它转导细胞例如293T细胞的效价)可以被考虑，具有与DC融合的相对较好能力的包膜是优选的。转导的相对效价在实施例中示出。

[0064] 抗原呈递细胞(APC)及特别是树突细胞(DC)是假型包装的慢病毒载体的合适的靶细胞，其被用作疫苗组合物，用于预防或治疗目的。

[0065] 用于假型包装慢病毒载体颗粒的包膜蛋白可因此根据宿主中的靶细胞选择。

[0066] 编码VSV包膜蛋白(VSV-G)的多核苷酸也靶向脾细胞，特别是抗原呈递细胞(APC)或树突细胞(DC)，或肝脏细胞，包括肝细胞或非实质细胞。

[0067] 编码适合靶向确定的细胞并用于假型包装本发明的慢病毒载体的包膜蛋白的多核苷酸在以下举例示出：编码VSV(VSV-G)、LCMV(淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒)或RRV(Ross River病毒)的包膜蛋白的多核苷酸可用于制备适合靶向肝脏细胞的载体(Park 2003)(Kang et al,2002)。

[0068] Ebola或Marburg病毒的包膜蛋白可以用于靶向apical表面气道表皮 (Kobinger et al,2001)。

[0069] 弹状病毒科(包括狂犬病或狂犬病相关病毒如Mokola病毒)或VSV科的病毒的包膜蛋白可提供嗜神经组织的慢病毒载体。

[0070] 沙粒病毒如淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)的包膜糖蛋白可用于转导成纤维细胞、上皮细胞、造血细胞、神经母细胞瘤和胶质瘤细胞系。

[0071] α病毒包膜蛋白乳RRV或SFV(Semliki Forest病毒)的蛋白可以靶向抗原呈递细胞(APC)、神经元或肌肉细胞。

[0072] 其它包膜蛋白可用于假型包装本发明的慢病毒载体,如HA蛋白(流感血凝素)、RD114蛋白、披膜病毒科的包膜病毒或正粘病毒科(如流感病毒)、冠状病毒科、黄病毒科、丝状病毒科的包膜蛋白。

[0073] 包膜病毒,在特定病毒中有时也称作表面蛋白,被称为"源自"不同生物,特别是源自不同的RNA病毒毒株,是指在所述蛋白质中,在确定的 RNA病毒中表达的相应蛋白质的关键特征被保持。所述关键特征涉及结构或者涉及蛋白质的功能并且是特别能使获得的蛋白质在载体颗粒表面表达用于假型包装所述载体。包膜蛋白然后当存在于载体颗粒上时能够被识别并在宿主细胞中内化。

[0074] 在特定实施方案中,适用于设计化合物试剂盒的假型包装的慢病毒载体的蛋白质或糖蛋白用作多聚体蛋白质,如三聚VSV-G。

[0075] 包膜蛋白从含有所述蛋白质的编码序列的多核苷酸表达,所述多核苷酸插入在用于制备本发明的慢病毒载体的质粒(包膜表达质粒或假型包装 env质粒)中。编码包膜蛋白的多核苷酸在转录和/或表达编码序列(包壳任选地如来自Invitrogen的WPRE序列的多核苷酸)的调节序列的控制下。

[0076] 本发明因此涉及核酸构建体,其包含适合体内用于哺乳动物特别是人细胞的内部启动子及在所述启动子控制下的编码包膜蛋白的核酸。本发明还涉及含有这个构建体的质粒。启动子可以特别选择其性质如组成型启动子、组织特异性启动子或诱导型启动子。合适的启动子的例子包括下述基因的启动子:EF1α、人PGK、PPI(前胰岛素原)、thiodextrin、HLA DR不变链(P33)、HLA DRα链、铁蛋白L链或铁蛋白H链、β2微球蛋白、凝乳酶β4、凝乳酶β10或Cystatin核糖体蛋白L41。

[0077] 用于表达假型包装慢病毒载体颗粒所需的包膜蛋白的核苷酸序列还可以针对编码用作参照的天然包膜蛋白的核酸被修饰。可以进行修饰以改良在用于制备载体颗粒的细胞中和/或在宿主的转导细胞中的密码子使用(密码子优化)。其可以被修饰以表达不同于天然蛋白质的蛋白质,特别是具有改良的假型包装能力、改良的生产水平的能力或改良的防止与化合物试剂盒中使用的其它包膜蛋白的血清中和的能力的蛋白质。

[0078] 这种包膜蛋白的修饰可影响并特别改良它们在细胞宿主细胞中的生产水平或者它们假型包装载体颗粒的能力,可能是通过改良与假病毒粒相关的包膜蛋白的密度导致。这种修饰可以衍生自在所述蛋白质的氨基酸序列中的突变,例如通过添加、缺失或取代一个或若干核苷酸或核苷酸片段所致突变,或者可以涉及翻译后修饰,特别是所述包膜蛋白的糖基化状态。

[0079] 用于假型包装本发明的慢病毒载体的包膜蛋白事实上特别是糖蛋白。

[0080] 已经显示用水泡性口炎病毒糖蛋白(VSV-G)假型包装病毒载体使得能转导来自不同物种的大范围细胞类型。这种VSV-G糖蛋白除了其广谱嗜性外,当用于载体假型包装时还具有令人感兴趣的稳定性。因此,VSV-G已用作评估其它假型的效率的标准(Cronin J.et al,2005)。因此,VSV-G是用于假型包装本发明的慢病毒载体的合适候选物。

[0081] 本发明特别涉及如本申请定义的化合物试剂盒，其中所述第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的病毒包膜蛋白是VSV病毒的跨膜糖基化(G)蛋白，所述G蛋白在试剂盒的慢病毒载体中具有不同的VSV类型特异性。

[0082] 特别地，所述第一种G蛋白源自VSV-Indiana血清型，所述第二种G 蛋白源自VSV-New-Jersey血清型，或者反之。

[0083] 在下述实施例中已经显示和报道在试剂盒中具有对假型包装的病毒颗粒的recourse使得引发和加强免疫学反应，其中包膜蛋白分别是 VSV-Indiana血清型和VSV-New Jersey血清型的G蛋白，当用所述G蛋白的任一种假型包装的慢病毒载体被依次使用以引起它们被给予的宿主中的反应时。在这种情况中，已经示出当用第二种不同的包膜蛋白假型包装的所述慢病毒载体被给予时，所述慢病毒载体没有产生抗所使用的第一种包膜蛋白的体液应答(无交叉反应体液应答)或产生很低的体液应答(低交叉反应体液应答)，所述体液应答会破坏在宿主引起的抗多核苷酸的表达产物的应答。这是通过这样的事实实现，所述不同的包膜蛋白彼此不交叉中和或不显著交叉反应，因此不产生抗载体免疫应答。

[0084] 在特定的实施方案中，本发明涉及源自VSV的G蛋白，其针对天然形式被修饰，和/或由针对天然核酸分子被修饰的核酸分子编码，以改良假型包装。其可以是慢病毒颗粒摄取包膜蛋白的改善，其允许慢病毒载体颗粒转导被给予其的宿主细胞的改善。

[0085] 特定的化合物试剂盒包含慢病毒载体，其中它们中的一个、两个或多个用重组包膜蛋白假型包装，所述重组包膜蛋白包含源自不同病毒的不同包膜蛋白的结构域或片段，特别是不同属不同物种的VSV。

[0086] 在本发明的特定实施方案中，至少一个所述第一种、第二种及如果有的第三种或进一步的包膜蛋白是包含Indiana毒株的VSV-G的输出决定簇的重组包膜蛋白。

[0087] Indiana毒株的VSV-G的输出决定簇是由包膜的开放读框的胞质片段编码的多肽。

[0088] Indiana毒株的VSV-G的输出决定簇是包含或具有胞质尾区中的氨基酸序列YTDIE的多肽(Nishimua N.et al.2002)。

[0089] 所述重组包膜蛋白可包含Indiana毒株的VSV-G的胞质尾区，其是由疏水性跨膜结构域限定的VSV-G的胞内部分。

[0090] 特定的化合物试剂盒包含慢病毒载体，其中它们中的一个、两个或多个用重组包膜蛋白假型包装，所述重组包膜蛋白包含Indiana VSV的胞质结构域和一不同VSV血清型毒株的胞外结构域。跨膜结构域也抗原是Indiana VSV-G的跨膜结构域。

[0091] 特定的化合物试剂盒包含慢病毒载体，其中它们中的一个或两个用重组包膜蛋白假型包装，所述重组包膜蛋白包含Indiana VSV的跨膜结构域和胞质结构域和New Jersey VSV的胞外结构域。

[0092] 合适的其它修饰包含改良假型包装的突变，特别是点突变。这种VSV-G 蛋白的突变可以在跨膜结构域通过取代或缺失一个或若干氨基酸残基进行。合适突变的其它例子见Fredericksen B.L.et al(1995)或Nishimua N.et al. (2003)。

[0093] 本说明书中的“片段”是指具有至少或长于6个核苷酸的核苷酸序列的多核苷酸，具有至少或长于2个氨基酸残基的氨基酸序列的多肽。

[0094] 还特别可能的是修饰VSV-G的糖基化状态，以改良用这些VSV-G蛋白假型包装的慢病毒状态给予宿主时的转导效率。

[0095] 来自各种VSV毒株的VSV-G蛋白在附图中公开，它们的序列也可衍生自数据库，特别是Genebank。

[0096] 考虑到VSV的New-Jersey和Indiana毒株的糖蛋白，已经提议在两个天冬酰胺残基(N180和N336)的糖基化有利于慢病毒载体的有效假型包装。这个特征可以应用于本发明慢病毒载体的制备。

[0097] 本发明特别涉及编码VSV-G衍生的包膜蛋白的下述构建体，以及它们在制备本发明的慢病毒载体颗粒的组合中的应用。本发明还涉及由所述构建体编码的包膜蛋白：

[0098] 密码子优化的VSV-G Indiana基因在图6中公开并且是本发明的一部分。本发明还涉及含有VSV-G Indiana包膜基因的包壳质粒。一特定包壳质粒是pThV-VSV.G(IND-CO)，2007年10月10日保藏在CNCM(Paris，France)，保藏号I-3842，或者以质粒构建体的另一版本在2008年7月31 日保藏，保藏号I-4056。可以从这个特定质粒衍生其它构建体，特别是通过用本申请所列的那些启动子取代启动子。

[0099] 密码子优化的VSV-G New-Jersey基因在图7中公开并且是本发明的一部分。本发明还涉及含有VSV-G New Jersey包膜基因的包壳质粒。一特定包壳质粒是pThV-VSV.G(NJ-CO)，2007年10月10日保藏在CNCM(Paris，France)，保藏号I-3843，或者以质粒构建体的另一版本在2008年7月31 日保藏，保藏号I-4058。可以从这个特定质粒衍生其它构建体，特别是通过用本申请所列的那些启动子取代启动子。本发明涉及这些质粒及它们所含的编码VSV-G包膜蛋白的插入序列。

[0100] 适合进行本发明的具有密码子优化序列的其它包膜基因示于图6-12及 14-19并特别包含VSV-G Chandipura基因及其表达产物，VSV-G Cocal基因及其表达产物，VSV-G Piry基因及其表达产物，VSV-G Isfahan基因及其表达产物，VSV-G Spring病毒血症鲤鱼病毒基因及其表达产物。含有VSV-G Cocal的包膜基因的一特定包壳质粒是pThV-VSV.G(COCAL-CO)，2008年 7月31日保藏在CNCM(Paris，France)，保藏号I-4055。含有VSV-G Isfahan 的包膜基因的另一特定包壳质粒是pThV-VSV.G(ISFA-CO)，2008年7月31 日保藏在CNCM(Paris，France)，保藏号I-4057。含有VSV-G Spring病毒血症鲤鱼病毒的包膜基因的另一特定包壳质粒是pThV-VSV.G(SVCV-CO)， 2008年7月31日保藏在CNCM(Paris，France)，保藏号I-4059。本发明涉及这些质粒及它们所含的编码VSV-G包膜蛋白的插入序列。

[0101] 本发明还涉及融合包膜蛋白，特别是涉及不同病毒的VSV-G蛋白的几个不同片段的融合蛋白以及编码这种蛋白质的核酸构建体。一特定的融合包膜是New-Jersey包膜蛋白的胞外结构域和Indiana包膜蛋白的跨膜结构域和胞质结构域之间的融合，如附图所示。

[0102] 本发明的另一个融合包膜蛋白是选自VSV-G Chandipura、VSV-G Cocal、VSV-G Piry、VSV-G Isfahan或VSV-G SVCV的一种VSV-G蛋白的胞外结构域和VSV-G Indiana的跨膜及胞质结构域。本发明还涉及编码附图所示的所示融合蛋白的核酸分子，特别是编码附图所述的融合蛋白的密码子优化的核酸。

[0103] 本发明还涉及表达载体，特别是含有编码融合蛋白的核酸构建体的质粒。

[0104] 以上描述了用于构建本发明的假型包装的慢病毒载体颗粒的载体基因组的基本关键特征。制备合适载体基因组(也称为转移载体)的额外特征在以下揭示，包括在实施例和附图中。

[0105] 在本发明特定实施方案中，假型包装的慢病毒载体是基于人类慢病毒的载体。因此它们的基因组衍生自人类慢病毒，特别是HIV慢病毒。特别地，假型包装的慢病毒载体是基于HIV的载体，如基于HIV-1或HIV-2的载体，特别是衍生自HIV-1M，例如来自BRU或LAI分离株。

[0106] 在另一个实施方案中，假型包装的慢病毒载体是基于灵长类或猫科慢病毒载体。

[0107] 如上所述，当考虑其与其最终所含的转基因分离时，载体基因组是置换载体，其中在原始慢病毒基因组中的2个长末端重复(LTR)之间的核酸已被限制为用于DNA或RNA合成和加工的顺式作用序列，或者至少被缺失或突变使得表达慢病毒结构蛋白，包括生物学功能GAG多蛋白和可能的POL和ENV蛋白的关键核酸节段。

[0108] 在特定实施方案中，载体基因组是生物学功能Gag表达缺陷的，有利的是生物学功能POL和ENV蛋白缺陷的。

[0109] 慢病毒的5′LTR和3′LTR序列用于载体基因组中，但是3′-LTR至少针对原始慢病毒的3′LTR至少在U3区域被修饰。5′LTR也可被修饰，特别是其启动子区。

[0110] 在特定实施方案中，载体基因组因此缺少Vif-，Vpr，Vpu-和Nef辅助基因的编码序列(对于HIV-1慢病毒载体)，或者缺少它们的完整或功能基因。

[0111] 在优选的实施方案中，慢病毒载体颗粒的载体基因组包含作为插入的顺式作用片段的至少一个组成DNA活瓣或含有这种DNA活瓣的多核苷酸。在特定实施方案中，DNA活瓣插入到感兴趣多核苷酸的上游，有利但非必须位于载体基因组大约中心位置。适合本发明的DNA活瓣可以得自逆转录病毒，特别是慢病毒，特别是人类慢病毒，或者得自逆转录病毒样生物如反转录转座子。其可以得自CAEV(山羊关节炎脑炎病毒)病毒，EIAV(马传染性贫血病毒)病毒，VISNA病毒，SIV(猿免疫缺陷病毒)病毒或FIV(猫免疫缺陷病毒)病毒。DNA活瓣可以合成制备(化学合成)或如用聚合酶链反应 (PCR)扩增来自上述合适来源的提供DNA活瓣的DNA制备。在更优选实施方案中，DNA活瓣得自HIV逆转录病毒，如HIV-1或HIV-2，包括这两个类型的然后分离株。

[0112] DNA活瓣(定义于Zennou V.et al，2000，Cell vol 101，173-185或 WO99/55892及WO01/27304)，是位于一些慢病毒特别是HIV的基因组的中心的结构，其产生3链DNA结构，在特别是HIV逆转录期间正常合成并且作为HIV基因组核输入的顺式决定簇。DNA活瓣使得在逆转录期间发生由中心多嘌呤序列段(cPPT)和中心终止序列(CTS)顺式控制的中心链置换事件。当插入到慢病毒衍生的载体中时，使得DNA活瓣在逆转录期间产生的多核苷酸刺激基因转移效率并互补核输入水平至野生型水平(Zennou et al, Cell，2000)。

[0113] DNA活瓣的序列已在现有技术中披露，特别是上述专利申请中。这些序列还公布于附图中作为SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:7。它们优选作为可能具有额外侧翼序列的片段插入载体基因组中，位于所述载体基因组中心附近。或者它们可以插入控制本发明多核苷酸表达的启动子的立即上样。插入到载体基因组中的所述包含DNA活瓣的片段可以具有大约80至大约 200bp的序列，取决于其来源和制备。

[0114] 根据特定实施方案，DNA活瓣具有大约90至大约140个核苷酸的核苷酸序列。

[0115] 在HIV-1中，DNA活瓣是稳定的99个核苷酸长加上链重叠。当用于本发明的慢病毒载体的基因组载体中时，其可以作为更长序列插入，特别是当其制备为PCR片段时。包含提供DNA活瓣的结构的特别合适的多核苷酸是178个碱基对聚合酶链反应(PCR)片段，包含

HIV-1 DNA的cPPT和 CTS区域(Zennou et al 2000)。

[0116] 这个PCR片段可特别衍生自HIV-1 LAI的感染性DNA克隆,特别是 HIV1的pLAI3,作为相应于核苷酸4793-4971的序列的片段。如果合适,向获得的片段的一端或两端加入限制位点用于克隆。例如,Nar I限制位点可加入用于进行PCR反应的引物的5′末端。

[0117] 因此,在本发明中使用DNA活瓣,其缺少pol基因的非必需的5′和3 部分,并与不同来源的序列重组。DNA活瓣可以合成制备(化学合成)或如用聚合酶链反应(PCR)扩增来自上述合适来源的提供DNA活瓣的DNA制备。在更优选实施方案中,DNA活瓣得自HIV逆转录病毒,如HIV-1或 HIV-2,包括这两个类型的然后分离株。

[0118] 规定用于基因组载体中的DNA活瓣和编码GAG和POL多蛋白的包壳质粒的多核苷酸应源自相同慢病毒亚科或源自相同逆转录病毒样生物。

[0119] 优选地,基因组载体的其它顺式活化序列也源自相同慢病毒或逆转录病毒样生物,与提供DNA活瓣的一样。

[0120] 载体基因组可进一步包含一个或几个独特限制位点用于克隆感兴趣多核苷酸。

[0121] 根据本发明,假型包装的慢病毒载体是不能复制的慢病毒载体,其是 gag和pol功能基因被绝对反式提供及因此不存在于载体基因组上这一事实的结果。在这种情况中,当慢病毒载体被给予宿主时,其不能在宿主细胞中复制。因此,其提供治疗感兴趣的多核苷酸进入宿主细胞用于表达但不形成进一步的慢病毒载体颗粒。慢病毒载体的这种不能复制状态特别是当慢病毒gag、pol、env基因不被提供在载体基因组中或不被提供为功能基因时实现。"功能"是指基因被正确转录,和/或正确表达。因此,这个实施方案中的本发明的慢病毒载体基因组含有不转录或不完整转录的gag、pol 和env基因的至少一个;术语"不完整转录"是指转录物gag、gag-pro或 gag-pro-pol中的改变,这些之一或这些中的几个不转录。参与慢病毒复制的其它序列也可以在载体基因组中被突变以实现这种状态。

[0122] 在优选的实施方案中,在所述载体基因组中,慢病毒载体基因组的 3′LTR序列缺少至少激活物(增强子)及可能的U3区域的启动子。在另一个特定实施方案中,3′LTR区缺少U3区域(delta U3)。在这个方面,参考 WO01/27300及WO01/27304。

[0123] 在特定实施方案中,在载体基因组中,LTR 5′的U3区域被非慢病毒 U3或适合驱动tat不依赖性初级转录的启动子置换。在这种情况中,载体不依赖于tat反式激活物。

[0124] 载体基因组还包含psi(Ψ)包装信号。所述包装信号衍生自gag ORF的 N-末端片段。在特定实施方案中,其序列可以被移码突变修饰以防止gag 肽的可能的转录/翻译干扰转基因的转录/翻译。

[0125] 载体基因组可任选含有选自剪接供体位点(SD)、剪接受体位点(SA)和/ 或Rev响应元件(RRE)的元件。

[0126] 根据特定实施方案,载体质粒(或加入的基因组载体)包含下列顺式作用序列用于转基因表达盒:

[0127] 1.LTR序列(长末端重复),逆转录、病毒DNA整合及转录所需的。3′LTR在U3区域中被缺失,不干扰基因转移所需的功能,因为两个主要原因:首先,一旦DNA整合进基因组中,为避免宿主基因的反式激活,第二,允许在逆转录后病毒顺式序列的自身失活。任选地,驱动基因组转录的来自5′-LTR的tat 依赖性U3序列被启动子序列置换。因此,在靶细胞中仅来自内部启动子的序列被转录(转基因)(图23和图24)。

[0128] 2.Ψ区域,病毒RNA包壳所需的。

[0129] 3.RRE序列(REV响应元件),在结合Rev蛋白后允许病毒信使RNA从核输出到细胞溶胶。

[0130] 4.DNA活瓣序列(cPPT/CTS,正常包含于Pol中),促进核输出。

[0131] 5.任选地,WPRE顺式活性序列(土拨鼠乙型肝炎病毒后响应元件)也被加入以优化mRNA的稳定性(Zufferey et al., 1999)。WPRE不被翻译。

[0132] 在特定实施方案中,除了可衍生自慢病毒编码区的治疗感兴趣多核苷酸之外,根据上述顺式作用序列披露的载体质粒缺少其它慢病毒核苷酸序列。

[0133] 本发明的慢病毒载体是非复制型的,即载体及慢病毒载体基因组不能形成从感染的宿主细胞芽生的新颗粒。这可以通过慢病毒基因组中不存在 gag、pol或env基因而实现,如上段所述;这也可以通过缺失颗粒形成所需的其它病毒编码序列和/或顺式作用遗传元件而实现。慢病毒载体复制的不存在应该与慢病毒基因组的复制区分开。事实上,如前所述,慢病毒基因组可含有复制起点保证慢病毒载体基因组的复制而非必须保证载体(或颗粒)的复制。

[0134] 在进一步的实施方案中,特别是当编码至少一种抗原多肽的多核苷酸源自慢病毒时,所述的慢病毒载体基因组不包含完整的慢病毒gag、pol或 env编码多核苷酸,是指所述慢病毒载体基因组包含比慢病毒gag、pol或 env基因短的多核苷酸。因此,gag编码序列对于HIV-1或HIV-2短于1500bp; pol编码序列对于HIV-1短于3000bp,对于HIV-2短于3300bp; env编码序列对于HIV-1短于2700bp,对于HIV-2短于2500bp。这个大小是指在天然慢病毒基因组中发现的最长的连续核苷酸序列。但是,在另一个特定实施方案中,慢病毒基因组缺失全部内源编码慢病毒序列。

[0135] 为了获得本发明的慢病毒载体,载体基因组(作为载体质粒)必须被包壳为颗粒或假颗粒。因此,慢病毒蛋白质,除了包膜蛋白之外,必须在生产系统中特别是生产细胞中被反式提供给载体基因组,与载体基因组一起,求助于(recourse)至少一种携带gag和pol慢病毒基因或整合不相容pol基因的包壳质粒,优选缺少Vif-、Vpr、Vpu和Nef辅助基因的编码序列(对于HIV-1 慢病毒载体)。

[0136] 使用另一个质粒,其携带编码选自用于假型包装每个慢病毒载体的包膜蛋白的多核苷酸。

[0137] 在优选的实施方案中,包装质粒编码仅病毒颗粒合成必需的慢病毒蛋白。存在于质粒中可导致安全性关注的辅助基因因此被除去。反式带来的病毒蛋白以HIV-1举例分别为:

[0138] 1.Gag蛋白,用于构建基质(MA,具有表观分子量p17),衣壳(CA,p24)及核衣壳(NC,p6)。

[0139] 2.Pol编码的酶:整合酶、蛋白酶和逆转录酶。

[0140] 3.Tat和Rev编码调节蛋白,Tat是起始LTR介导的转录所需的;其可以被省略,如果5′LTR的U3区被驱动tat不依赖性转录的启动子取代。

[0141] 为了避免产生自包装质粒所含基因的mRNA包装在病毒颗粒中,从包装质粒中除去Ψ区域。将异源启动子插入到质粒中以避免重组问题,将 polyA尾加入到编码蛋白质的序列的3′。

[0142] 包膜质粒编码用于假型包装的包膜蛋白，其如本文披露，在内部启动子的控制下。

[0143] 用于制备本发明的慢病毒载体颗粒的任何或全部所述质粒可以在编码蛋白质的节段被密码子优化(CO)。根据本发明的密码子优化优选被进行以改良质粒所包含的编码序列在哺乳动物细胞特别是人类细胞中的翻译。根据本发明，密码子优化特别适合直接或间接改良载体颗粒的制备或改良它们被给予的宿主细胞的摄取，或者改良感兴趣的多核苷酸(转基因)转移进宿主的转导细胞的基因组中的效率。优化密码子的方法是本领域熟知的，密码子优化特别使用可利用的程序进行。密码子优化针对所述pTRIP质粒和附图例证的本发明的pThV质粒中所包含的编码序列而例证。

[0144] 在本发明的特定实施方案中，假型包装的慢病毒载体还是或者是不能整合的。在这种情况中，载体基因组及因此治疗感兴趣的异源多核苷酸不整合进转导细胞的基因组中或其被给予的宿主的细胞中。

[0145] 本发明涉及慢病毒载体的应用，其中表达的整合酶蛋白是缺陷的并且其进一步包含特别编码至少一种抗原多肽的多核苷酸，以产生适合在需要的宿主中引起抗所述至少一种多肽的免疫应答的免疫原性组合物。所述多核苷酸是具有本文披露的特征的多核苷酸。

[0146] 所述多核苷酸(或慢病毒载体基因组)包含核输入及编码至少一种抗原多肽的多核苷酸的正确表达所需的全部元件。可被插入本发明的慢病毒载体的慢病毒基因组中的元件的例子是至少一个(优选两个)长末端重复 (LTR)，如LTR5′和LTR3′，参与慢病毒基因组包壳的psi序列和任选地至少一种包含cPPT和CTS结构域的DNA活瓣。慢病毒载体基因组还可包含选自剪接供体位点(SD)、剪接受体位点(SA)和/或Rev响应元件(RRE)的元件。

[0147] 在特定实施方案中，所述慢病毒载体用如本文所述的VSV-G蛋白假型包装。

[0148] “缺陷”是指整合酶、优选慢病毒来源的整合酶，缺少将慢病毒基因组整合进宿主细胞的能力，即整合酶蛋白被突变以特异地改变其整合酶活性。

[0149] 不能整合的慢病毒载体通过修饰编码整合酶的pol基因获得，产生编码整合缺陷的整合酶的突变的pol基因，所述修饰的pol基因包含在包壳质粒中。这种不能整合的慢病毒载体已在WO2006/010834中描述。因此蛋白质的整合酶能力被改变，而GAG、PRO和POL蛋白从包壳质粒的正确表达和/或衣壳及因此载体颗粒的形成，以及在整合步骤之前或之后的病毒周期的其它步骤如逆转录，核输入，保持完整。当其应实现的整合被改变从而与含有相应野生型整合酶的慢病毒相比整合步骤发生低于1/1000，优选低于1/10000时，整合酶被称为是缺陷的。

[0150] 在本发明的特定实施方案中，缺陷的整合酶来自1类突变，优选氨基酸取代(单氨基酸取代)或短缺失，满足缺陷的整合酶表达的需要。突变在 pol基因内进行。这些载体可携带在酶的催化结构域具有突变D64V的缺陷整合酶，其特异性阻断整合步骤中的DNA裂解和结合反应。D64V突变降低假型包装的HIV-1的整合达野生型的1/10000，但是保持它们转导非分裂细胞的能力，允许有效的转基因表达。

[0151] 适合影响HIV-1整合酶的整合酶能力的pol基因中的其它突变如下：H12N，H12C，H16C，H16V，S81R，D41A，K42A，H51A，Q53C，D55V，D64E， D64V，E69A，K71A，E85A，E87A，D116N，D116I，D116A，N120G，N120I， N120E，E152G，E152A，D-35-E，K156E，K156A，E157A，K159E，K159A， K160A，R166A，D167A，E170A，H171A，K173A，K186Q，K186T，K188T， E198A，R199C，R199T，R199A，D202A，K211A，Q214L，Q216L，Q221L， W235F，W235E，K236S，K236A，K246A，

G247W,D253A,R262A,R263A及 K264H。

[0152] 在特定实施方案中,pol基因中的突变在下述位置D64,D116或E152 的任一中进行,或者在这些位置的几个中进行,它们是在蛋白质的催化位点中。这些位置的任何取代均是合适的,包括上述那些。

[0153] 另一种推荐的取代是由氨基酸残基AAH置换氨基酸残基RRK(位置 262-264)。

[0154] 在本发明的特定实施方案中,当慢病毒载体是不能整合的时,慢病毒基因组进一步包含复制起点(ori),其序列依赖于慢病毒基因组被表达的细胞的性质。所述复制起点可来自真核来源,优选哺乳动物来源,最优选人来源。其可以是病毒来源,特别是来自DNA环状episomic病毒,如SV40或 RPS。本发明的有利的实施方案是使复制起点插入本发明的慢病毒载体的慢病毒基因组中。事实上,由于慢病毒基因组不整合进细胞宿主基因组(由于缺陷整合酶),所以慢病毒基因组在经历频繁细胞分裂的细胞中丢失;这在免疫细胞如B或T细胞中尤其如此。复制起点的存在保证了至少一个慢病毒基因组存在于每个细胞中,甚至在细胞分裂后,使得免疫应答效率最大化。

[0155] 在本发明的特定实施方案中,慢病毒载体基因组是基于HIV的基因组并具有图2或23-25显示的序列特征,其中所述感兴趣的序列根据其治疗兴趣选择,使得其表达的内部启动子(附图中由CMV启动子代表)有利地被选择以示于在人类中给予。

[0156] 转基因或者载体基因组的表达盒中包含的内部启动子可以选自下述基因的启动子:EF1α、人PGK、PPI(前胰岛素原)、thiodextrin、HLA DR不变链(P33)、HLA DRα链、铁蛋白L链或铁蛋白H链、β2微球蛋白、凝乳酶β4、凝乳酶β10或Cystatin核糖体蛋白L41。

[0157] 本发明所述慢病毒载体的慢病毒载体基因组可特别衍生自HIV-1质粒 pTRIP ΔU3.CMV-GFP,其1999年10月11日保藏于CNCM(Paris,France),保藏号I-2330。该质粒包含的各种序列的结构及限制位点示于图2D。pTRIP ΔU3.CMV-GFP的序列示于图6。

[0158] 在本发明的特定实施方案中,慢病毒载体基因组可衍生自HIV-1质粒 pTRIP[delta]U3EF 1[alpha]-GFP,其1999年10月11日保藏于CNCM,保藏号I-2328。该质粒的组成序列的描述见图2E,各种序列的限制位点被示出。

[0159] 当载体基因组衍生自这些特定质粒时,本申请公开的异源多核苷酸序列被插入其中,除了GFP编码片段之外或置换该片段。GFP编码序列还可用不同的标记取代。CMV启动子也可以由另一个启动子取代,特别是上述启动子之一,特别是与转基因表达相关的启动子。

[0160] 适于进行本发明的其它慢病毒载体基因组是以下所列的保藏材料中包含的那些,或者衍生自这些保藏质粒,特别是通过用不同的感兴趣多核苷酸和/或不同的内部启动子取代转基因。特定保藏的pTRIP载体中包含的 WPRE序列也可以被缺失。

[0161] 本发明因此涉及由质粒pTRIPDeltaU3-CMV-SIV-GAGco-WPRE提供的慢病毒载体基因组,该质粒2007年10月10日保藏于CNCM(Paris,France),保藏号I-3841。质粒的组成在附图中公开,其序列被提供。这个质粒表达 SIV的GAG蛋白为非十四烷基化蛋白。所述转基因的ORF已被密码子优化用于在人类细胞中表达。

[0162] 本发明还涉及由质粒pTRIPDeltaU3-CMV-SIV-GAG-WPRE提供的慢病毒载体基因组,该质粒2007年10月10日保藏于CNCM(Paris,France),保藏号I-3840。质粒的组成在附图中公开,其序列被提供。这个质粒表达 SIV的GAG蛋白为非十四烷基化蛋白。所述转基因的ORF未被密码子优化。

[0163] 载体颗粒可在所述质粒转染合适细胞如293T细胞后产生，或通过其它方法产生。在用于表达慢病毒颗粒的细胞中，所有或一些质粒可用于稳定表达它们的编码多核苷酸，或瞬时或半稳定表达它们的编码多核苷酸。

[0164] 产生的颗粒浓度可以通过测量细胞上清的P24(HIV-1的衣壳蛋白)含量而确定。

[0165] 本发明的慢病毒载体，一旦被给予宿主，即感染宿主细胞，可能是特殊细胞，这取决于其被假型包装的包膜蛋白。感染导致释放慢病毒基因组进入宿主细胞的细胞质，在此发生逆转录。一旦呈三链体形式(经DNA活瓣)，慢病毒基因组被输入核中，在此感兴趣的多核苷酸经细胞机制表达。当非分裂细胞被转导时(如DC)，表达可以是稳定的。当分裂细胞被转导时，如B细胞，表达在慢病毒基因组不存在复制起点条件下是暂时的，因为核酸稀释和细胞分裂。表达可以通过提供复制起点保证慢病毒基因组在细胞分裂后扩散至子代细胞中而更长。稳定性和/或表达也可以通过插入 MAR(基质相关区)或SAR(支架相关区)元件而增加。

[0166] 事实上，这些SAR或MAR区是富含AT序列，使得将慢病毒基因组锚定细胞染色体的基质，由此调节编码至少一种抗原多肽的多核苷酸的转录，特别是刺激转基因的基因表达及改良染色质可及性(accessibility)。

[0167] 如果慢病毒基因组是非整合的，其不整合进宿主细胞基因组。然而，由转基因编码的至少一种多肽被足够表达和足够长以被加工，与MHC分子结合及最终导向细胞表面。根据感兴趣多核苷酸的性质，与MHC分子结合的所述至少一种多肽表位触发体液或细胞免疫应答。不能整合的慢病毒载体的制备在本文公开：用于反式互补载体基因组的包壳质粒在整合酶蛋白区域被突变，从而在慢病毒载体被给予患者后，当所述载体在细胞宿主中作为假型包装颗粒产生时，所述整合酶在慢病毒载体中不表达或不功能性表达。

[0168] 术语“免疫原性组合物”是指包含至少本发明的慢病毒载体作为活性成分的组合物，所述组合物适合给予宿主。当用于系统或局部给予时，这个组合物可包含进一步的药物学合适赋形剂或载体和/或运载体。“药物学可接受载体”是指任何常规类型的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包囊材料或配制辅料。“药物学可接受载体”在采用的剂量和浓度对于受体是无毒的，并与配方中的其它成分相容。合适的载体包括但非限于磷酸盐缓冲盐溶液，蒸馏水，乳液如油/水乳液，各种类型的湿润剂无菌溶液等，右旋糖，甘油，盐水，乙醇，及其组合。

[0169] 本发明的免疫原性组合物尽管不存在转基因整合进宿主细胞基因组也具有引起免疫应答的能力，即宿主免疫系统抗所述至少一种多肽(由所述转基因编码)的任何反应。

[0170] 免疫应答可以是体液应答，即产生由所述组合物引起的抗所述至少一种慢病毒载体的多肽的抗体。在特定实施方案中，所述体液应答是保护性体液应答。保护性体液应答主要导致成熟的抗体，具有对其抗原的高亲和性，如IgG。在特定方面，保护性体液应答是T细胞依赖性的。在特定实施方案中，保护性体液应答诱导产生中和抗体。

[0171] 免疫应答可以是细胞免疫应答(T细胞免疫应答)，特别是CD8介导的细胞免疫应答或CD4介导的细胞免疫应答，即由携带CD8或CD4受体的活化细胞介导的免疫应答，优选细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。

[0172] 在本发明的特定实施方案中，本发明的慢病毒载体尽管整合酶缺陷仍能引起早期免疫应答。术语“早期免疫应答”是指保护性免疫应答(抗携带所述至少一种多肽的病原体

或肿瘤细胞的保护)在给予组合物后大约1周内被赋予。

[0173] 在另一个实施方案中,由本发明组合物赋予的免疫应答是持久免疫应答,即所述免疫应答在给予组合物后至少2个月、优选至少3个月、最优选至少6个月仍可以检测到。当免疫应答是体液免疫应答时,持久应答可以通过任何合适方法检测特异抗体而显示,所述方法如ELISA,免疫荧光 (IFA),转化灶降低中和测试(focus reduction neutralization test,FRNT),免疫沉淀或Western印迹。

[0174] 在另一个独立于上述实施方案的实施方案中,本发明的组合物赋予的免疫应答的强度取决于慢病毒载体的注射剂量;剂量越高,免疫应答强度越高。

[0175] 令人感兴趣地,所述免疫应答,体液或细胞免疫应答,早期免疫应答和/或持久免疫应答,在单次给予本发明组合物后由非整合基因转移载体引起。

[0176] 考虑到使用慢病毒载体颗粒特别是化合物试剂盒设计医学治疗方案,本发明的慢病毒载体在其载体基因组中携带具有治疗兴趣的异源多核苷酸 (或转基因)。术语"异源多核苷酸"是指载体基因组,与源自慢病毒基因组的及载体活性所需或有用的载体基因组中的顺式作用序列无关,包含至少一种多核苷酸,其不是载体活性所需或有用的,但是其适合获得生物学作用,特别是医学作用,当其在宿主特别是人类宿主中表达时。在优选的实施方案中,感兴趣的多核苷酸编码多肽并优选包括在表达盒中。

[0177] 本发明的异源多核苷酸编码一个多肽或几个多肽,其适合在宿主中引起免疫应答,所述免疫应答是细胞免疫应答和可能是体液免疫应答。编码的多肽(即抗原)包含一个或几个抗原表位或由抗原表位组成。在特定实施方案中,其可以是多表位。其可以在宿主细胞中被加工用于经宿主的APC特别是DC呈递以产生免疫应答,或者其可以直接引起免疫应答。因此,感兴趣多核苷酸包含一个或若干抗原的B表位和/或T表位序列或由其组成,包括两类表位的结合,产生嵌合(即非天然)多肽。

[0178] 表位可以依赖于特异性三维抗原构象(构象表位),或者可以相应于简单的一级序列区域(线性表位)。多肽的大小从至少9个氨基酸直至500个氨基酸,并优选小于200个氨基酸。

[0179] 在特定实施方案中,所述异源多核苷酸编码病原体或致病因子或化合物的一个抗原或几个抗原或其片段,包括表位(B和/或T表位),所述病原体如病毒,特别是逆转录病毒、慢病毒、黄病毒或冠状病毒,细菌或寄生虫。其可以编码病原体的抗原或重组抗原,程度是当慢病毒载体被给予时其不能表达病原体。

[0180] 异源多核苷酸可以在宿主细胞中表达为内源抗原,特别是在所述多核苷酸转移进宿主细胞基因组之后,并且在所述细胞中被加工以与MHC分子结合呈递。

[0181] 感兴趣的多核苷酸可以被选择从而用载体引起的免疫应答可能在被 APC呈递后可以特别包含引起T淋巴细胞应答,包括T辅助细胞或CTL细胞(细胞毒性的)。宿主中的抗所述多核苷酸的加工表达产物的$CD8^+$T细胞应答是特别感兴趣的。

[0182] $CD4^+$T细胞应答也可以被表达(诱导或引起)。

[0183] 由整合或非整合形式的本发明慢病毒载体靶向的特定细胞是参与免疫应答的细胞,如抗原呈递细胞(APC)、树突细胞(DC)包括常规DC(cDC)或浆细胞样(pDC)、T细胞包括$CD4^+$或$CD8^+$、B细胞、单核细胞、巨噬细胞、天然杀伤细胞、天然杀伤T细胞、内皮细胞和上皮细胞。令人感兴趣地,B 细胞最近已显示与循环成熟DC相互作用,由此激活这些B细胞,其进而

有效呈递抗原至原初T细胞(成熟APC群的扩增);因此,这指出B细胞在初免参与细胞免疫应答中的细胞特别是原初CD8+T细胞中的关键作用 (Diaz de Durana;2006)。

[0184] 感兴趣的多核苷酸可以被选择以便本发明的慢病毒载体还可以或者另外被用于在宿主中引起抗所述多核苷酸的表达产物的体液免疫应答,特别是中和性体液免疫应答。

[0185] 在本发明的特定实施方案中,其中慢病毒载体颗粒意在防止或治疗非慢病毒感染,具有生物学或治疗兴趣的异源多核苷酸与组成载体基因组的多核苷酸具有不同的来源。特别地,其源自与提供载体基因组序列的慢病毒不同的生物体。

[0186] 在特定实施方案中,当需要防止或治疗慢病毒感染时,所述异源多核苷酸可以源自提供载体的慢病毒同一科或相同血清型,特别是当慢病毒载体颗粒是基于HIV的慢病毒载体时。

[0187] 在特定实施方案中,所述异源多核苷酸编码衍生自慢病毒蛋白的抗原或其抗原片段或这种抗原的组合。在这种情况中,所述慢病毒蛋白抗原或其抗原片段用于防止天然或能复制慢病毒载体颗粒形成的情况中。

[0188] 在特定实施方案中,其用于还防止慢病毒假颗粒如GAG或GAG-POL 假颗粒形成的情况中。这些抗原可以衍生自与用于设计慢病毒载体相同的慢病毒,特别是HIV,特别是HIV-1。

[0189] 因此,所述多核苷酸可以是一个或若干HIV多肽或多表位的编码序列,特别是HIV-1多肽或多表位的编码序列,其适合在宿主中引起细胞、特别是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答及可能的T辅助细胞应答。

[0190] 在本发明的优选实施方案中,慢病毒载体在其基因组中包含编码一个或若干多肽的重组多核苷酸,所述多肽包含至少一种衍生自免疫缺陷病毒特别是HIV、SIV或FIV的GAG抗原或多蛋白的抗原。

[0191] GAG多蛋白包含基质蛋白(MA)、衣壳蛋白(CA)及核衣壳蛋白(NP)。其还可包含p7蛋白。

[0192] 上述定义的GAG衍生的抗原包含衍生自每种这些蛋白质的多肽,包括其片段或突变版本(经缺失、取代或添加)。其还包含衍生自每种这些蛋白质的这种多肽的组合。

[0193] 在特定的实施方案中,衍生自免疫缺陷病毒的GAG的抗原具有天然 GAG抗原的氨基酸序列,特别是GAG多蛋白或基质蛋白或衣壳蛋白或核衣壳蛋白的氨基酸序列,或者是相对于天然GAG抗原被修饰的GAG抗原,特别是经突变修饰包括在氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或若干氨基酸残基,或者经翻译后修饰而修饰。修饰的GAG抗原经选择为生物学有功能的或生物学无功能的。

[0194] 在特定的实施方案中,编码包含衍生自免疫缺陷病毒的GAG多蛋白的至少一种抗原的一个或若干多肽的重组多核苷酸编码这样的多肽,其是 SIV特别是SIV_{MAC}或FIV或HIV特别是HIV-1或HIV-2的生物学无功能的 GAG多肽(包括GAG的抗原片段),并且在用慢病毒载体转导的细胞内不能形成生物学有功能的衣壳,特别是不诱导从这些细胞分泌能形成GAG假颗粒或GAG-POL假颗粒的衣壳蛋白。

[0195] 在特定的实施方案中,包括编码衍生自GAG的抗原的核酸的多核苷酸不能表达POL生物学活性多肽(也称作前体的多蛋白),因此不包含pol天然基因或等价功能基因。

[0196] 在特定实施方案中,编码包含衍生自免疫缺陷病毒的GAG抗原的至少一种抗原的

一个或若干多肽的重组多核苷酸还编码衍生自免疫缺陷病毒的 NEF、TAT或REV抗原和/或任选地免疫缺陷病毒的POL抗原的多肽，或其组合。这些多肽特别是所述抗原的抗原片段。

[0197] 编码衍生自(HIV-1的)GAG的重组多核苷酸及编码融合蛋白中的其它 HIV-1抗原的进一步的核苷酸片段的例子是编码图21所示GAG蛋白的多核苷酸，POL片段或/和NEF片段或这种POL和NEF片段的融合体也在图 21中示出。这些片段可以融合在GAG抗原的5′和/或3′，可以彼此连续和/ 或与GAG抗原连续，或者可以由肽如来自小RNA病毒的2A肽分隔开。这种构建体在附图中示出。2A肽的序列如下：APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP。融合蛋白的结构的一种特定组构是如下之一：5′GAG POL NEF 3′，或5′POL NEF GAG 3′或5′POL GAG NEF 3′，或5′NEF GAG POL 3′或5′NEF POL GAG 3′或5′GAG NEF POL 3′。

[0198] 在优选的方案中，衍生自GAG和/或NEF和/或POL抗原的抗原衍生自人免疫缺陷病毒(HIV)，特别是HIV-1或HIV-2。

[0199] 在特定的实施方案中，衍生自GAG抗原的多肽是GAG Δmyr蛋白，其与天然GAG相反不是十四烷基化的。

[0200] 非十四烷基化的HIV-1 GAG可以得自突变密码子2的GAG编码序列以将Gly残基[GGA]改变为Ala残基[GCA]，或者缺失所示密码子2。

[0201] 本发明其它感兴趣的GAG衍生抗原是由GAG的基质、衣壳和核衣壳蛋白中的至少一个的片段形成的抗原，特别是由每种所述蛋白的片段的融合体形成。

[0202] 观测到编码的衍生抗原可以衍生自HIV-1、特别是HIV-1亚型B或 HIV-1组O的GAG抗原(图21)，并可用于化合物组合中以引起抗各种HIV 组包括不同的HIV-1亚型、HIV-1和可能的HIV-2的免疫应答。

[0203] 本发明还涉及本文定义的慢病毒载体，其在其基因组中包含重组多核苷酸，所述多核苷酸具有密码子优化的序列，编码衍生自人免疫缺陷病毒 (HIV)的GAG多蛋白的抗原，或者编码融合抗原，包括衍生自GAG的抗原及本文公开的NEF、TAT、REV或POL的至少一个抗原片段。

[0204] 本发明的嵌合HIV-1衍生抗原在特定的实施方案中是一种融合蛋白，其包含或由具有图21的序列的GAG衍生抗原与衍生自HIV-1毒株的NEF、POL、TAT或REV的抗原或与这些抗原的组合的组合组成。

[0205] 上述特定融合蛋白是其中POL衍生抗原包含或具有图21的氨基酸序列的融合蛋白。

[0206] 上述特定融合蛋白是其中NEF衍生抗原包含或具有图21的氨基酸序列的融合蛋白。

[0207] 由载体基因组的多核苷酸编码的抗原、特别是GAG衍生抗原，可以是天然的、合成的或重组来源的，因此由任何常规方法表达。

[0208] 本发明还涉及编码这种融合抗原的核苷酸构建体，包括它们的密码子优化版本用于在哺乳动物特别是人类细胞中表达。

[0209] 根据特定的实施方案，重组多核苷酸编码衍生自HIV-1共有B毒株的 GAG多蛋白的抗原。

[0210] 在另一个特定实施方案中，重组多核苷酸编码衍生自GAG多蛋白的抗原及HIV的NEF抗原的表位簇及任选地HIV的POL多蛋白的表位簇。

[0211] 本发明涉及编码本文公开的抗原的核酸分子。其特别涉及插入到保藏在CNCM的质粒中的核酸分子，特别是保藏在CNCM的质粒pTRIPDelta U3-CMV-SIV-GAG-WPRE或pTRIPDelta U3-CMV-SIV-GAG co-WPRE，或者保藏在CNCM的质粒pThV-VSV-G(IND-co)，pThV-VSV-G(NJ-co)，pThV-VSV-G(COCAL-co)，pThV-VSV-G(ISFA-co)或 pThV-VSV-G(SVCV-co)，或者涉及在严格条件下与这些核酸分子杂交的序列，特别是具有相同长度或较短。特定的核酸编码至少GAG抗原或其片段，特别是编码HIV-1或HIV-2 GAG抗原或其片段。

[0212] 当比较用表达编码HIV抗原或其衍生抗原的异源多核苷酸的慢病毒载体颗粒获得的应答与用不表达所述抗原的颗粒获得的应答时，测量细胞应答的特异性。观察到给予能表达所述HIV可以或HIV衍生抗原的颗粒引起 T细胞免疫应答，其用不表达所述抗原的颗粒不能引起。

[0213] 这在实施例中用表达SIV衍生抗原的颗粒例证。

[0214] 所述应答有利的是保护性的，其意味着其能实现在用免疫缺陷病毒感染的宿主的血浆中测得的病毒负荷的降低或者控制病毒负荷，所述宿主接受至少一次初免及一或几次加强给予化合物或化合物组合以预防或治疗性用于抗免疫缺陷病毒感染，特别是人类宿主中HIV感染或非人灵长类宿主中SIV_{MAC}感染。

[0215] 换句话说，当用于预防或治疗性治疗免疫缺陷病毒特别是HIV感染时，给予的化合物组合使得从身体中消除病毒或控制病毒负荷，长时间持续(超过6个月)，并且优选能保护抗体内AIDS病。发明人特别示出当被给予感染免疫缺陷病毒的宿主时，本发明的化合物组合能在感染急性期保持中枢记忆CD4+T细胞应答，其是与抗逆转录病毒病理发生的保护有价值的相关性，即抗AIDS在人类宿主中的发展(Letvin,N.L.et al,2006)。

[0216] 化合物组合提供工具在人类宿主中引起保护性特异性细胞免疫应答的能力衍生自实验结果，所述实验结果是在猕猴/SIVmac非人灵长类模型中在基本上模拟在人/HIV-1情况中观察到的条件下获得。

[0217] 因此，本发明涉及化合物组合在制备药品中的应用，所述药品用于依次给予哺乳动物宿主以引起抗免疫缺陷病毒特别是HIV的保护性特异性细胞免疫应答。

[0218] 根据本发明已设计了特定的慢病毒载体，以引起特异性细胞免疫应答，其示出对于病毒攻击是保护性的。尽管因众所周知原因，这一证实尚未在人类中进行，但是在非人灵长类中公开的结果高度倾向于人类中的相似预期。

[0219] 所获得的特定慢病毒载体提供了特别感兴趣的候选者，用于抗AIDS 的治疗性免疫接种或预防性免疫接种。

[0220] 在本发明的一个特定方面，编码源自病原生物的B表位和/或T表位的多核苷酸是编码West Nile病毒(WNV)的包膜E-糖蛋白(E_{WNV})或Yellow Fever病毒或登革热病毒(DV)、日本脑炎病毒(JEV)或SARS相关冠状病毒的包膜的多核苷酸。其它感兴趣的病毒多肽来自HIV的衣壳。

[0221] 在特定实施方案中，至少一种多肽由慢病毒来源的多核苷酸编码(例如来自上述gag或pol，或来自例如env)。在特定实施方案中，所述编码多核苷酸不是完整的gag或pol基因或者不是完整env基因，或者不是这些基因的功能形式，即编码功能蛋白的基因。例如，它们具有从30到1000、优选从30到500bp、优选30-300bp、更优选30-100bp的大小，或其可溶形式或编码其表位。插入WNV的可溶性E糖蛋白(sE_{WNV})的编码序列可以通过 Reimann et al.

(J.Virol.;2005)的公开,使用Hel et al.(J.Immunol.;2006)所述的sE_{WNV}实现。

[0222] 根据本发明另一特定方面,异源多核苷酸编码多肽,所述多肽是肿瘤相关抗原(TAA)或其片段。

[0223] TAA的非限制性已知例子特别是:

[0224] -在黑素瘤中发现的突变肽如β-catetin,MART-2或者在白血病中发现的突变肽如brc-abl,

[0225] -组织特异性蛋白如在黑素瘤中发现的gp100,MART-1,酪氨酸酶,或者在前列腺癌中发现的PSA,PAP,PSM,PSMA,

[0226] -睾丸癌抗原如MAGE,

[0227] -与肿瘤发生相关的分子如Survivin,hTERT,在各种癌症中发现,

[0228] -粘蛋白如在乳腺癌、子宫癌或胰腺癌中发现的MUC-1,

[0229] -转化正常细胞为肿瘤细胞的病毒(肿瘤病毒)的病毒蛋白,包括HPV(人乳头状瘤病毒)特别是HPV16或HPV18的病毒蛋白,包括HPV16-E7抗原(发现在宫颈癌中表达),导致淋巴瘤的 EBV(Epstein-Barr病毒)包括EBV-EBMA蛋白(在淋巴瘤中), HBV(乙型肝炎病毒),HCV(丙型肝炎病毒),HHV(人疱疹病毒) 如HHV8或HTLV(人T白血病病毒)如HTLV-1,如HTLV-1 tax 蛋白(在急性T白血病中)。

[0230] 更一般地,这些多肽可以衍生自名称为Cancer Immunity的肽数据库中公开的肽序列。多核苷酸可特别选自共享的肿瘤特异性抗原、分化抗原、在肿瘤中过表达的抗原或者产生自突变的肿瘤抗原。这些多肽(或其部分) 可以以野生型或突变形式源自细胞(自身肽)。

[0231] 在特定实施方案中,感兴趣的多核苷酸编码人抗原。

[0232] 在本发明另一个实施方案中,感兴趣的多核苷酸可编码多肽,其表达或功能性表达在由所考虑的病理学影响的宿主中被破坏。在特定实施方案中,本发明的慢病毒载体用于输送多核苷酸至宿主中的靶细胞,以在基因治疗的医学治疗中寻求例如导致血清蛋白缺陷的遗传病的基因校正,或用于抗癌症、感染性疾病、病毒性疾病或自身免疫疾病的遗传免疫接种策略。在另一个实施方案中,可以用本发明的化合物试剂盒治疗其它病理学如糖尿病。

[0233] 最后,所述至少一种多肽可以是人工(非天然)多肽,优选是多表位多肽。这种多表位多肽编码至少两种表位,源自病原生物包括病毒和/或肿瘤来源。在特定实施方案中,所述至少两种表位源自相同病毒或源自相同肿瘤细胞;在该情况中,所述至少两种表位可以选择其不同CMH(HLA)限制。在另一个实施方案中,所述至少两种表位源自不同病毒,或者源自不同肿瘤细胞。所述表位可以连续排列,即表位的3′末端直接与第二个表位的5′末端(以此类推),相应于编码仅由连续表位组成的肽序列的多核苷酸。本发明的所述至少两种表位或者可以由单氨基酸间隔基或肽间隔基分隔开,即不同的多核苷酸单位由编码一个或若干氨基酸的一个或若干密码子分隔开。作为改良多个表位的加工的间隔基,优选的是由在C末端位置的精氨酸(R)和其它位置的亲水性残基(A、K、D和/或T)组成的4氨基酸肽。特别地,可使用在C末端具有带正电残基或酸性残基的4氨基酸肽,依赖于或不依赖于在其它位置的亲水性残基(A、K、D和/或T)。在特定实施方案中,所述间隔基是内部加工序列如内体或溶酶体加工序列,使得更好加工多个表位并避免加工由重叠切割产生的新肽。间隔基的这种分隔

可用于分隔所有或部分表位。

[0234] 异源多核苷酸被插入载体基因组中，在转录和表达调节序列包括启动子和可能的增强子的控制下。在特定实施方案中，调节序列不是慢病毒来源的。合适的启动子包括CMV，也称为CMVie启动子，或EF1α启动子，CGA启动子，CD11c启动子和管家基因启动子如PGK启动子，遍在蛋白启动子，肌动蛋白启动子，组蛋白启动子，α微管蛋白启动子，β-微管蛋白启动子，过氧化物岐化酶1(SOD-1)启动子，二氢叶酸还原酶(DHFR)启动子，次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)启动子，腺苷酸脱氨酶启动子，胸苷酸合成酶启动子，二氢叶酸还原酶P1启动子，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶启动子或 nucleolin启动子。其它合适启动子包括下述基因的启动子：EF1α、人PGK、PPI(前胰岛素原)、thiodextrin、HLA DR不变链(P33)、HLA DRα链、铁蛋白L链或铁蛋白H链、β2微球蛋白、凝乳酶β4、凝乳酶β10或Cystatin核糖体蛋白L41。

[0235] 本发明的化合物试剂盒特别适用于医学治疗，其中用所述第一种病毒包膜蛋白假型包装的所述慢病毒载体与用所述第二种病毒包膜蛋白假型包装的所述慢病毒载体在时间上分开给予，并且如果合适所述初免和第一次加强晚些时候后接一个或若干加强步骤。

[0236] 因此，本发明的化合物试剂盒特别适于重复给予活性成分，特别是在初免-加强型反应中，可能包括几个加强步骤。

[0237] 特别地，试剂盒的化合物是这样的，用所述第一种病毒包膜蛋白或者用所述第二种病毒包膜蛋白假型包装的所述慢病毒载体分别用于引发免疫原性反应或者用于在需要的宿主中加强所述免疫原性反应。免疫反应可以进一步用具有本文所述第三种包膜蛋白的慢病毒载体及任选的具有进一步的不与所述其它慢病毒载体之一血清中和的包膜蛋白的额外加强步骤加强。

[0238] 在特定实施方案中，用Indiana毒株的VSV-G假型包装的慢病毒载体被首先给予，以引发免疫学反应，用New Jersey毒株的VSV-G或用本文公开的重组或修饰的VSV-G假型包装的慢病毒载体被第二个给予，以加强所述免疫学反应。

[0239] 在另一个特定实施方案中，用New Jersey毒株的VSV-G或用本文公开的重组或修饰的VSV-G假型包装的慢病毒载体被首先给予，以引发免疫学反应，用Indiana毒株的VSV-G假型包装的慢病毒载体被第二个给予，以加强所述免疫学反应。

[0240] 本发明特别涉及相应于这样的给予方案，用试剂盒的两种化合物一轮给予可足以引起强应答。

[0241] 为了可能地改良应答强度或范围或持续时间，可进行进一步的给予步骤。特别地，可以使用如本文所述的用选自VSV-G，Cocal，Perinet，SVCV 或Isfahan病毒的包膜或包含这些包膜之一的结构域的重组包膜假型包装的慢病毒载体。

[0242] 本发明的化合物试剂盒适用于抗病毒疾病或抗感染性或肿瘤疾病的预防性治疗或治疗性包括治愈性治疗，其中所述慢病毒载体包含编码适合引起免疫应答的一个或若干抗原或其片段的多核苷酸。

[0243] 除了适合制备化合物组合用于治疗性治疗免疫缺陷病毒感染的哺乳动物宿主特别是HIV感染的人类宿主或SIV_{MAC}感染的非人灵长类宿主或FIV 感染的动物之外，本文公开的慢病毒载体还提供了设计化合物组合的工具，用于抗免疫缺陷病毒感染、特别是人类宿主中HIV感染或非人灵长类宿主中SIV_{MAC}感染或动物中FIV感染的预防用途。

[0244] 本文公开的化合物组合可特别用于治疗性治疗HIV-1或HIV-2感染的人类宿主。

[0245] 本文公开的化合物组合可特别用于预防性治疗人类宿主抗HIV-1或 HIV-2感染。

[0246] 以下实验部分提供的数据提供了设计的慢病毒载体转化为人类医学应用的相关性的有力证据。在实施例中描述的非人灵长类模型上实现的保护水平比用其它疫苗候选物的文献中报道结果更强，并且值得注意的是其是在用特别高剂量的感染性SIVmac病毒的病毒攻击情况下获得的。

[0247] 从获得的实验数据，甚至观测到用于引起抗免疫缺陷病毒的保护性特异性细胞免疫应答的化合物组合可以无需添加免疫应答佐剂而制备。

[0248] 然而，本领域技术人员可决定在所述化合物组合中包括与所有或部分慢病毒载体结合的免疫调节剂和/或作为另外的单独的化合物的免疫调节剂。例如，细胞因子如IL12可以包括在组合中。

[0249] 本发明特别提供了化合物组合，其中所述慢病毒载体被配制成适于注射宿主、特别是用于皮下注射的组合物。在另一个实施方案中，本发明化合物的给予可以有利地经肌肉内途径进行，特别是注射。发明人在实验性小鼠模型中已示出当包括表达SIV GAG抗原的基因转移载体颗粒的化合物经肌肉内途径被给予时，所引起的免疫应答高于当它们经皮下注射被给予相同模型时。

[0250] 所述化合物组合因此特别用于涉及注射宿主的给予方案中，并包括在哺乳动物宿主中引发免疫应答及随后加强免疫应答，其中所述(i)用所述第一种病毒包膜假型包装的慢病毒载体与所述(ii)用所述第二种病毒包膜假型包装的慢病毒载体在时间上分开给予，及如果有的话与所述(iii)用所述第三种病毒包膜假型包装的慢病毒载体在时间上分开给予，所述慢病毒载体(i)、(ii)和如果有的(iii)的每种被给予用于初免或用于加强免疫应答。

[0251] 给予方案的选择可以由本领域技术人员进行适应，考虑用选择的剂量获得的应答的强度和范围及进行的加强步骤的数量。

[0252] 在特定实施方案中，本发明涉及化合物组合，用于依次给予人类宿主，引起抗HIV的保护性特异性细胞免疫应答，给予方案包括给予相同剂量的慢病毒载体用于初免和加强步骤。

[0253] 根据另一方案，化合物试剂盒适用于体内基因治疗。可用本发明的试剂盒的化合物治疗的疾病的例子对于体内基因治疗是神经变性疾病如帕金森氏症、肌萎缩侧索硬化(ALS)、脊柱肌肉萎缩(SMA)，它们是运动神经元疾病。可用本发明的化合物试剂盒治疗的疾病的另一个例子是脊髓损伤。

[0254] 本发明的化合物试剂盒还适于治疗癌症，其中慢病毒载体的重复给予可能是必需的。

[0255] 本发明还涉及免疫原性组合物，其包含本申请限定的慢病毒颗粒，适用于体内抑制HIV-1或HIV-2感染或哺乳动物宿主中的SIV或FIV感染。

[0256] 本发明还涉及治疗需要治疗的宿主或患者的方法，包括相继给予宿主：

[0257] (i)慢病毒载体，其用第一种确定的一或多个异源病毒包膜蛋白假型包装；

[0258] 接着

[0259] (ii)慢病毒载体，其用不同于所述第一种确定的包膜蛋白的第二种确定的一或多个异源病毒包膜蛋白假型包装；

[0260] 其中(i)和(ii)的所述慢病毒载体编码具有治疗兴趣的异源多核苷酸。

[0261] 在特定实施方案中，进行第三个将用本文所述第三种包膜蛋白假型包装的慢病毒载体给予宿主的步骤。

[0262] 根据本发明的特定实施方案，进行额外的给予步骤以进一步加强免疫反应。

[0263] 两个第一次给予步骤之间的时间可以是3-12周或更长，取决于对初免的应答。第一次加强和最后一次加强步骤之间的时间可以是几周，特别是 12周以上，例如6个月，甚至可以一或几年。

[0264] 根据另一个实施方案，本发明的基因转移载体可用作单一活性成分，即用于单次给予宿主。

[0265] 因此，本发明实施方案、基因转移载体的特征或其性质的描述适用于作为唯一给予的化合物(与组合相反)的载体，特别是它们的非整合形式。

[0266] 本发明的治疗或医学治疗目的在于改善需要的患者特别是人类的临床条件，其已被诊断为被病原体感染(甚至在原发感染阶段)或者患有病理状态，或者这种治疗目的在于消除疾病的致病因子或生物体，或者降低所述因子或生物体。在病毒感染情况中，治疗可导致宿主血浆中病毒负荷显著降低，可能地，病毒负荷低于当测量时可被检测的水平，或者降低肿瘤大小或发生，如果有的话。

[0267] 当指诊断具有病理状态的患者时，医学治疗包括改善所述患者的临床状态，在优选实施方案中，恢复健康。

[0268] 其还包括在需要的宿主中预防性治疗，特别是免疫接种以防止宿主中发生病理状态。

[0269] 发明人获得的实验结果能够限定本申请中公开的化合物组合、试剂盒、方法和一般的治疗或预防应用的特异用途，特别是与免疫缺陷病毒特别是 HIV、特别是HIV-1或HIV-2相关的医学应用领域的用途。

[0270] 本发明的这些特异用途包括，彼此独立或组合的下述适应症，其可能与免疫缺陷病毒特别是HIV感染的不同阶段相关，或者在所述感染之前或者在暴露于逆转录病毒之前：

[0271] -在暴露于及特别是在由逆转录病毒感染后控制病毒血症，特别是限制或降低宿主中的病毒负荷；

[0272] -诱导宿主中抗逆转录病毒、特别是人类中抗HIV的保护性细胞免疫；

[0273] -在暴露于及特别是在由逆转录病毒特别是HIV逆转录病毒感染后抗病毒复制的保护；

[0274] -保护抗中枢记忆CD4+T细胞应答的耗竭，特别是在逆转录病毒特别是HIV感染的急性期；

[0275] -保持中枢记忆CD4+T细胞应答，特别是在逆转录病毒特别是HIV感染的慢性期；

[0276] -在逆转录病毒特别是HIV原发感染期间引起更早和/或更强的原初和中枢记忆CD8+T细胞应答的反弹；

[0277] -防止病毒逃逸免疫压力，由此允许长期控制逆转录病毒特别是HIV的感染。

[0278] 这些特异用途对于在免疫缺陷病毒感染领域开发预防或治疗应用的有效免疫应答是有利的。它们还允许将本发明应用于各类宿主，这取决于其临床谱，与逆转录病毒感染阶段(包括感染前或暴露于逆转录病毒之前)或病理发生相关，因为它们影响免疫系统的各

个区室，根据感染阶段而参与免疫应答的不同阶段。

[0279] 尽管在给予表达SIV或HIV抗原的慢病毒载体时看起来不需要，但是在其它应用中可以决定当用于系统性或局部给予时在化合物组合中进一步包括佐剂和/或运载体，或者可以缺少这些成分。

[0280] 在任何情况中均可以加入用于配制医学组合物的赋形剂。

[0281] 上述组合物可以经不同途径注射进宿主中：皮下(s.c.)、皮内(i.d.)、肌肉内(i.m.)或静脉内(i.v.)注射，口服给予及粘膜给予，特别是鼻内给予或吸入。被给予的数量(剂量)取决于待治疗的对象，包括考虑患者状况、个体免疫系统状态、给予途径及宿主大小。合适的剂量范围参照等价的状态颗粒的p24抗原(对于HIV-1慢病毒状态)的含量表示，并可以被确定。

[0282] 当用于单次给予时，本发明的载体可以以范围为从1到100μg、优选 1-50μg、最优选1-10μg的剂量给予，并且可以根据情况由本领域技术人员修改。当配制为用于皮下注射时，本发明的免疫原性组合物优选包含 1-100μg慢病毒载体/宿主体重，更优选从1到30μg/剂，特别是10μg/ 剂，单次注射。

[0283] 本发明的其它实施例和特征在实施例和附图中变得明了。

[0284] 图1：衍生自不同病毒的DNA活瓣序列的各种例子。

[0285] 图2：(A)用于本发明目的的载体基因组构建体组构，基于典型的HIV-1 基因组序列；(B)TRIP/sEwnv载体的示意图；(C)TRIP/Es(WNV)的示意图； (D)质粒pTRIPΔU3.CMV-GFP的示意图；(E)质粒pTRIPΔU3EF1α-GFP的示意图。

[0286] 使用下述缩写：U3、R和U5代表LTR的结构域；ΔU3：缺失U3结构域；RRE：Rev响应元件；Ψ：包壳信号；cPPT和CTS代表DNA活瓣； CMVie：巨细胞病毒立即早期启动子。

[0287] 构建体及特别是DNA活瓣及其插入基于HIV-1的基因组的细节见 (Zennou et al 2000)。

[0288] 图3：(A)来自水泡性病毒属中VSV物种已知的各种血清型的VSV-G 蛋白质序列的对比：Indiana(NCBI登录号J02428)，Chandipura(J04350)，Piry (D26175)，New Jersey，Cocal(AF045556)，Isfahan(AJ810084)及鲤鱼病毒的 Spring病毒血症(SVCV)(AY527273)。Indiana蛋白和New Jersey蛋白是用于实施例中。(B)来自水泡性病毒属中VSV物种已知的各种血清型的VSV-G 蛋白质序列：Indiana，Chandipura，Piry，New Jersey，Cocal，Isfahan及鲤鱼病毒的Spring病毒血症(SVCV)。

[0289] 图4：TRIPsEwnv载体的核苷酸序列。cPPT/CTS区域下划线。在这个区域中，cPPT和CTS结构域以小写字母出现。sEwnv序列以粗体表示，是 BsiWi-BssHII DNA插入序列。这一载体在2003年8月27日保藏在CNCM (Paris，France)，保藏号I-3076。

[0290] 图5：TRIP GFP载体的核苷酸序列。cPPT/CTS区域下划线。在这个区域中，cPPT和CTS结构域以小写字母出现。GFP序列位于核苷酸2816-3573。这个载体已于1999年10月11日保藏在CNCM，保藏号 I-2330(pTRIP[deltaU3]CMV GFP)。

[0291] 图6-12：各种VSV毒株的VSV-G蛋白序列(跨膜结构域下划线)(A)及编码密码子优化的核酸(B)。包含每个密码子优化序列的包膜质粒被描述 (C)。质粒衍生自pThv质粒并包含

[0292] -可由另一启动子取代的CMV启动子；

[0293] -编码VSV-G的密码子优化的多核苷酸；

[0294] -WPRE(ΔATG)序列，其是任选的；

[0295] -polyA序列

[0296] -kanR(卡那霉素抗性基因)，其可以被取代或缺失

[0297] -复制起点(pUC ORI)

[0298] 代表的VSV-G包膜分别是：

[0299] 图6：Indiana VSV-G。这个包膜已插入质粒pThV-VSV-G(IND-CO)，以I-3842保藏。

[0300] 图7：New Jersey VSV-G。这个包膜已插入质粒pThV-VSV-G(NJ-CO)，以I-3843保藏。保藏质粒是在大肠杆菌细胞中。它们的合适生长培养基是 LB卡那霉素10μg/ml，保温温度是37℃。为了储存，它们可以悬浮于具有 50%LB和50%甘油的液体中。

[0301] 图8：Chandipura VSV-G

[0302] 图9：Cocal VSV-G

[0303] 图10：Piry VSV-G

[0304] 图11：Isfahan VSV-G

[0305] 图12：SVCV-VSV-G

[0306] 图13：代表VSV-G New Jersey和VSV-G Indiana基因之间的融合基因。跨膜结构域粗体下划线。披露了用于制备融合基因的PCR策略。描述了用作引物的寡核苷酸。

[0307] 图14-19公开了通过重组各种VSV-G蛋白的不同结构域获得的融合蛋白。对于每个蛋白，提供了密码子优化的(用于在人细胞中表达)核酸(A)，及包含所述核酸的质粒(B)。

[0308] 图14：VSV-G Chandipura/Indiana的融合蛋白

[0309] 图15：VSV-G Cocal/Indiana的融合蛋白

[0310] 图16：VSV-G Piry/Indiana的融合蛋白

[0311] 图17：VSV-G Isfahan/Indiana的融合蛋白

[0312] 图18：VSV-G SVCV/Indiana的融合蛋白

[0313] 图19：VSV-G New Jersey/Indiana的融合蛋白

[0314] 图20：显示了密码子优化对用New Jersey VSV-G糖蛋白假型包装的慢病毒载体的作用。VSV-G基因(NJ血清型)的人密码子优化刺激基因转移100 倍。

[0315] 图21：示出了用于本发明的感兴趣抗原的序列。编码这些抗原的核酸、特别是以用于人细胞的密码子优化版本可以插入载体基因组的异源多核苷酸中。示出的抗原是：

[0316] HIV-1 LAI分离株(亚型B)的天然GAG抗原(D)及相应核酸序列(E)；

[0317] 修饰的HIV-1 GAG，其是delta Myr-GAG抗原，抑制十四烷基化，衍生自B亚型的共有序列(A)；

[0318] 衍生自HIV-1 POL的抗原，其是POL多蛋白的片段(B)；

[0319] 衍生自HIV-1 NEF的抗原，其是NEF蛋白的片段(C)。

[0320] 这些抗原可以组合用于融合蛋白中。POL和/或NEF片段可以插入GAG 衍生抗原的5'或3'。

[0321] 它们可以是彼此连续的并插入GAG衍生的抗原的5'或3'。

[0322] 它们可以是分离的并一个插入在GAG衍生的抗原的5'，另一个插入3'。

[0323] POL、NEF和GAG衍生的抗原可以被一个肽特别是使得自裂解的肽分离，或者不分

离。合适的分离肽是2A肽，来自细小RNA病毒，具有序列：APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP。

[0324] 图22示出根据图21的各种抗原构建体，用于设计抗AIDS免疫接种的人HIV-1抗原。

[0325] 图23-27：TRIP慢病毒载体产生原理及制备表达衍生自SIVmac239 GAG多蛋白的慢病毒载体的应用。相同原理适用于其它抗原。这些基本上描述下述特征：

[0326] 图23：TRIP慢病毒载体产生的原理。

[0327] HIV-1基因组(A)分裂成载体质粒(B)，含有顺式作用序列(LTR、包壳信号、RRE、DNA活瓣)和在异源启动子(CMV)或另一启动子控制下的感兴趣的基因(用于免疫接种的抗原)，包装质粒(C)，其含有包壳(在载体颗粒产生期间)和病毒复制循环的早期步骤(在转导细胞中)的基因gag、pol、tat和rev，及包膜质粒(D)，其含有来自VSV的糖蛋白的Indiana血清型。包装质粒和包膜质粒具有来自CMV的异源转录调节元件并缺失包壳序列，cPPT和 CTS。

[0328] 图24：U3′缺失的慢病毒载体的原理

[0329] 在病毒单链RNA的逆转录期间，有U3′和U5′序列的复制，其允许随后形成双链病毒DNA中的5′LTR和3′LTR。病毒DNA的转录在细胞中从 LTR5′开始。如果U3′区在载体质粒中缺失(ΔU3)，病毒RNA也是ΔU3，结果是，在逆转录后，病毒DNA在5′LTR中缺少U3序列，没有从病毒LTR 启动子开始的转录。结果是，转录仅由转基因的内部启动子介导。

[0330] 图25：用于TRIP载体产生的2个载体质粒的示意图

[0331] A：TRIP-SIVmac239 Gag，这个载体质粒含有编码抗原SIVmac239 gag 的序列，缺失十四烷基化序列。这使得仅在L1，P1生物安全性水平工作，因为其废除了在转染细胞和转导细胞中的蛋白质分泌。

[0332] B：TRIP-GFP，这个载体质粒含有无关抗原绿色荧光蛋白(GFP)。

[0333] 两个载体质粒均含有上游CMV启动子用于抗原表达及下游WPRE序列以改善抗原表达。它们还含有载体颗粒形成及在转导细胞中病毒复制早期步骤所需的病毒序列：长末端重复(LTR)、DNA活瓣(cPPt，CTS)、RRE、包壳信号Ψ。

[0334] C.载体基因组的pTRIP DeltaU3-CMV-SIVGag-WPRE限制图谱(C1)及其核酸序列(C2)。载体构建体保藏在CNCM，保藏号I-3840。

[0335] D.载体基因组的pTRIP DeltaU3-CMV-SIVGag co-WPRE限制图谱(D1) 及其核酸序列(D2)。载体构建体保藏在CNCM，保藏号I-3841。

[0336] 保藏质粒导入大肠杆菌细胞。细胞的培养基是LB Ampi 100μg/ml，保温是在37℃。储存是在具有50%LB 50%甘油的悬浮液中。

[0337] 图26：分成15mer长肽的SIVmac239GAG蛋白的示意图

[0338] SIV mac239 GAG蛋白长度为511个氨基酸。这个蛋白质分成125个肽。这些肽长度为15个氨基酸；依次肽之间有11个氨基酸重叠。

[0339] 肽分配于11个集合，命名为从M到W，含有5-12个肽。

[0340] 图27：(A)用于载体滴定的引物和探针序列及qPCR程序；(B)用于创建 Q-PCR载体滴定中的标准曲线的标准化质粒，具有探针和引物退火位点的位置。

[0341] 图28(1)：基于初免/加强慢病毒载体的免疫接种策略诱导强细胞免疫。

[0342] 在各个时间点初免后、加强后及攻击后的SIVmac239 GAG特异性T细胞应答的长期跟踪通过在用包含SIVmac239GAG p55的重叠肽集合再刺激全部PBMC后进行IFN-γ ELISPOT测定而进行。显示了用TRIP-SIVmac239 GAG注射的所有6个免疫接种的动物(低剂

量:20022,20089;中剂量:20293, 20056;高剂量,20195和20158,图28a)、用无关抗原(TRIP-GFP)在高p24 剂量(21544和20456,图28b)免疫接种的2个对照动物及未接种动物(15661, 14184,15885和14468,图28c)的个体GAG特异性累积应答。

[0343] 简而言之,0.2 10^6PBMC/孔用11个集合的5-12个重叠15聚体肽(2μ g/ml每种肽)体外重刺激40小时。每百万个PBMC的IFN-γ斑点形成细胞 (SFC)平均数从3个重复孔计算,减去对照孔(无肽)的数。显示的累积应答相应于用每个肽集合获得的每百万个PBMC的IFN-γ SFC之和。符合+表示累积应答的低估,是由于对于至少一个肽集合的饱和ELISPOT孔所致(见图29(2))。攻击后2周,不能定量对照孔中的斑点数,因此计算动物20022的累积应答(记为++)(nd,未确定)。

[0344] 图28(2):皮下注射慢病毒载体不导致系统性炎症。

[0345] 通过ELISA测量皮下注射稍后血浆中IFN-α(PBL Biomedical Laboratories)(图28(2)a)、IL-6(U-Cytech Bioscience)(图28(2)b)和 TNF-α(U-Cytech Bioscience)(图28(2)c)的存在。它们水平中的显著(IFN-α和 TNF-α)或主要(IL-6)增加的缺乏提示不存在体内给予慢病毒载体颗粒诱导的系统性炎症,即使在高剂量也如此(2.5 10^8TU/动物)。这些数据不排除可能由固有PAMP触发的局部炎症(Brown B,D et al,2007;Pichlmair A et al, 2007;Georgel P.et al,2007)。

[0346] 图29(1):免疫接种的猕猴于未接种和对照动物相比具有改善的病毒血症的控制。

[0347] 血浆病毒负荷在攻击后跟踪5个月,在前3周每周2次,然后在接下来的3周每周1次,最后一个月1次。未免疫接种的(图29a 15661;14184;15885;14468品系,标记为□;◇;△;▽),对照(图29a 21544,标记为x)和免疫接种动物(图29b)的病毒血症以及首次实验和对照组(黑色)相对于免疫接种组(灰色)(图29a、29b和29c)的平均值被示出。在所测试的所有时间点免疫接种组的病毒复制水平的平均值均较低(图29c)。P值<0.05被注意到*。在原发感染峰值观测到病毒血症平均降低2 log10倍(图29e)。免疫接种动物的平均病毒血症(灰色)还与橙色的进展者动物(14184-21544-20456) 的平均病毒血症进行了比较并与浅蓝色的非进展者动物 (15661-15885-14468)的平均病毒血症进行了比较(图29d)。免疫接种动物中急性期后病毒血症比进展者动物低。P值<0.05被注意到*。在感染后前154 天期间病毒复制的测量通过积分第0天和第154天之间的病毒负荷(曲线下面积,AUC)比较免疫接种动物和首次实验对照动物而确定(图29f)。

[0348] 简而言之,病毒RNA从血浆(200μl)中用TRI Reagent BD(Molecular Research Center)分离。RNA拷贝数在定量一步RT-PCR中使用Taqman EZ RT-PCR(Applied Biosystem)和Mastercycler ep realplex(Eppendorf)确定。引物分别在SIVmac251 GAG mRNA基因组的位置389和456(正向, TGTCCACCTGCCATTAAGCCCGA;反向,GCAGAGGAGGAAATTACCCAGTAC)。选择Taqman定量法,使用内部探针,其在5′和3′分别含有Fam和Tamra荧光团 (TGTCCACCTGCCATTAAGCCCGA)。病毒拷贝数量通过外推阈值荧光到内部标准曲线上而评估,所述标准曲线从RNA在dH_2O中的系列稀释液制备,所述RNA通过用MAXIscript试剂盒(Ambion)体外转录SpeI线性化 pGEM-5Zf(+)GAG质粒而获得。检测阈值是375个RNA拷贝/ml(2.57 log10 RNA拷贝/ml)。

[0349] 图29(2):ELISPOT测得的饱和

[0350] 用PBMC的系列稀释液进行IFN-γ ELISPOT以确定ELISPOT分析仪的饱和曲线(280

个斑点/孔，相应于1400个斑点/百万PBMC，因为200000个细胞被应用)图29(2)a.当特异性T细胞频率高且斑点重叠时(获得)，IFN-γ SFC/百万的数目因此在减去背景之前被低估为1400(分析)。给出了来自动物20056的PBMC的例子，所述动物用覆盖SIVmac339 GAG:385-443和 SIVmac339 GAG:443-491的肽集合在攻击后2周再刺激(图29(2)b)。

[0351] 图30(1)：中枢记忆$CD4^+$T细胞区室在免疫接种猕猴中被很好保持。

[0352] 外周血中中枢记忆(CM)$CD4^+$T细胞数目中的变化与进展强相关，在攻击后被跟踪5个月。其它细胞区室的动力学(总$CD4^+$、原初$CD4^+$、总CD8、原初$CD8^+$、CM $CD8^+$及效应记忆(EM)$CD8^+$T细胞)见图32(2)。

[0353] 原初动物(图30a 15661-14184-15885-14468)、对照动物(图30a 21544-20456，标记为○或x)和免疫接种动物(图30b，除了用◆标记之外所有品系)的基线CM $CD4^+$T细胞的%，以及首次实验和对照组(用▲标记，黑色)相对于免疫接种组(用◆标记，灰色)的平均值被示出(图30a、30b、30c)。免疫接种动物显示在原发感染期间完全保留它们的CM $CD4^+$T细胞区室，在慢性期中无逐渐耗竭，与首次实验和对照动物(图30c)及与标记为▲的进展者动物(14184-21544-20456)(图30d)相反(p值<0.05被注意到*)。在原发感染(primo-infection)峰值比较了所有动物的CM $CD4^+$T细胞(图30e)。

[0354] 绝对淋巴细胞计数、$CD3^+CD4^+$T细胞比例及原初、EM和CM T细胞的比例(定义为$CD28^+CD95^-$，$CD28^+CD95^+$及$CD28^-CD95^+$细胞)先前被描述 (Karlsson et al 2007)。

[0355] 图30(2)：疫苗诱导的T细胞应答是广泛的，它们识别衍生自AT2灭活的SIV的抗原

[0356] GAG编码的蛋白质(基质MA、衣壳CA、核衣壳NC和p6)的多样性及对疫苗诱导的、病毒诱导的和病毒回忆的GAG特异性T细胞应答的相对贡献经IFN-γ ELISPOT测定在初始应答峰值(初免后2周，图30(2)a)、加强后 1周(图30(2)b)及感染急性期期间(攻击后3周，图30(2)c)研究。还使用AT-2 灭活的SIVmac251(5μg/ml总病毒蛋白)以在完全PBMC IFN-γ ELISPOT测定中在加强后2周再刺激GAG特异性$CD4^+$和$CD8^+$T细胞(图30(2)d)。用对照微泡共培养后的背景被减去。饱和应答表示为+。AT-2灭活的SIVmac 251及其对照微泡通过EU Program EVA Centralized Facility for AIDS Reagents(NIBSC,Potters Bar,UK)得自JD Lifson(Frederick,MA)。

[0357] 图31(1)：保护的免疫相关

[0358] 原发感染峰值的血浆病毒负荷的控制被测试与GAG特异性T细胞应答的相关性(Spearman's rank)。在初免注射后(图31a)，加强注射(图31b)及攻击后(图31c)IFN-γ分泌T细胞的高频率与原发感染峰值病毒血症的更好的控制相关。由于ELISPOT孔偶然的饱和导致相关性的显著性被低估。急性期中枢记忆$CD4^+$T细胞(CM)的保留也与原发感染峰值的病毒负荷的降低强相关(图31d)。

[0359] 图31(2)：注射的动物产生针对用于假型包装载体颗粒的来自VSV的糖蛋白G的体液应答

[0360] 抗用于假型包装的包膜的中和抗体的存在用体外转导测定测量。P4细胞(HeLa衍生的)在编码GFP的慢病毒载体存在下培养，所述慢病毒载体用 VSV-G Indiana(图31(2)a)或VSV-G New Jersey(图31(2)b)假型包装，与在各个时间点收集的免疫动物的1:20稀释的血浆预保温。转导效率用流式细胞术评估。在不存在血浆和在所用载体剂量，用经VSV-G Indiana和New Jersey 假型包装的编码GFP的慢病毒载体转导后分别有61%和23%的P4细

胞是 GFP^+。

[0361] 图32：在接种者中总、原初及记忆$CD4^+$和$CD8^+$T细胞的动力学在感染后与未免疫接种的和对照猕猴中的不同

[0362] 跟踪了基线$CD4^+$T细胞(图32a)、原初$CD4^+$T细胞(图32b)、总$CD8^+$T 细胞(图32c)、原初$CD8^+$T细胞(图32d)、中枢记忆(CM)$CD8^+$T细胞(图32e) 和效应子记忆(EM)$CD8^+$T细胞(图32f)的%。首次实验和对照组(黑色三角形)相对于免疫接种组(灰色菱形)的平均值被示出。注意到P值<0.05*。

[0363] 图33：密码子优化关键性改善由基于TRIP.NI LV的疫苗诱导的CTL 应答。经四聚体染色(A)或IFN-γ ELISPOT(B)评估抗免疫显性gag CD8+T 细胞表位的Gag特异性细胞免疫应答。SFC，斑点形成细胞。(C) IFN-γ ELISPOT测定应答gag的CD8+T细胞优势免疫表位和CD4+T细胞表位。小鼠用100ng TRIP.N gag Δmyr LV或TRIP.NI gag Δmyr CO LV腹膜内初免。10天后，来自免疫小鼠的脾细胞用相应的肽刺激并经ELISPOT测定分析。在绘图前减去背景频率。误差杆代表每组3个小鼠的SD。(D)由TRIP.NI gag Δmyr LV和TRIP.NI gag Δmyr CO LV免疫诱导的gag特异性裂解活性的比较。在免疫后10天用20小时体内CTL测定测量CTL活性，如材料和方法中所述，平均值+/-SD三个小鼠被示出。

[0364] 图34：用TRIP.NI GAG Δmyr CO颗粒单次免疫接种诱导强的可持续的细胞免疫应答。在注射后8周来自用或未用TRIP.NI GAG Δmyr CO或 TRIPI GAG Δmyr野生型颗粒免疫的小鼠的脾细胞(A)或骨髓细胞(B)上进行的ELISPOT测定。

[0365] 图35：小鼠用VSV-G Indiana假型包装的TRIP.NI GAG Δmyr CO或TRIP.I GAG野生型颗粒免疫接种，13周后分别用VSV-G New Jersey假型包装的TRIP.NI GAG Δmyr CO或TRIP.I GAG野生型颗粒加强。初免-加强方案的对照组包括仅用VSV-G Indiana假型包装的TRIP颗粒(灰色图)或 VSV-G New Jersey假型包装的TRIP颗粒(蓝色图)注射一次的小鼠。所有小鼠在免疫接种后10天牺牲，抗GAG的细胞免疫应答经IFN-γ ELISPOT(A) 或四聚体染色(B)评估。

[0366] 图36：用编码SIVmac239 Gag Δ Myr WPRE的慢病毒载体免疫接种小鼠。2-5个129小鼠一组的每个小鼠用1.10^7TU免疫接种一次。单次给予后 10天，经体内细胞毒性测定分析特异性免疫应答，所述测定利用同基因 (congenic)原初脾细胞作为靶细胞，所述细胞用CFSE染色并用15聚体肽 (SIVmac239 Gag(73-87)和SIVmac239 Gag(309-323)，含有亚优势或优势免疫CTL表位)脉冲。i.d.，皮内；i.p.，腹膜内；s.c.，皮下。

[0367] 图37：用编码SIVmac239 Gag Δ Myr WPRE的慢病毒载体免疫接种小鼠。2-3个129小鼠组每个小鼠用300ng p24免疫接种一次。单次给予后10 天，经体内细胞毒性测定分析特异性免疫应答，所述测定利用同基因原初脾细胞作为靶细胞，所述细胞用CFSE染色并用15聚体肽(SIVmac239 Gag(73-87)和SIVmac239 Gag(309-323)，含有亚优势或优势免疫CTL表位) 脉冲。t.c.i，透皮，i.d.，皮内；i.p.，腹膜内。

[0368] 图38：用编码SIVmac239 Gag Δ Myr WPRE的慢病毒载体免疫接种小鼠。5-6个C57BL/6j小鼠一组的每个小鼠用1.10^7TU免疫接种一次。单次给予后10天，经体内细胞毒性测定分析特异性免疫应答，所述测定利用同基因(congenic)原初脾细胞作为靶细胞，所述细胞用CFSE染色并用15聚体肽(SIVmac239 Gag(73-87)和SIVmac239 Gag(309-323)，含有亚优势或优势免疫CTL表位)脉冲。i.m.，肌肉内；i.p.，腹膜内；s.c.，皮下。

[0369] 图39：用编码SIVmac239 Gag Δ Myr WPRE的慢病毒载体免疫接种小鼠。6个C57BL/6j小鼠一组的每个小鼠用2.10^6TU免疫接种一次。单次给予后12天，经IFNgamma ELISPOT测定分析特异性免疫应答，所述测定用 15聚体肽(SIVmac239 Gag(73-87)和SIVmac239 Gag(309-323)，含有亚优势或优势免疫CTL表位)刺激细胞。i.p.，腹膜内；i.m.，肌肉内。"*"表示由于饱和的ELISPOT孔所致的应答的低估。

[0370] 图40：体外中和用经Indiana VSV-G或New Jersey VSV-G假型包装的慢病毒载体对细胞的转导，其中细胞是来自首次实验小鼠或来自先前用经 Indiana VSV-G假型包装的慢病毒载体免疫接种的小鼠。

[0371] 图41：抗含有优势免疫-CD8表位的肽(A)或抗含有亚优势CD8表位的肽(B)的体内特异性裂解。初免或初免-加强反应在个体小鼠上进行，在初免和加强反应中用具有相同VSV-G包膜的慢病毒载体或用具有不同VSV-G 包膜的慢病毒载体。

[0372] 图42：用于确定抗含有优势免疫-CD8表位的肽(A)或抗含有亚优势CD8 表位的肽(B)或抗含有CD4的肽(C)的CTL活性的IFN-gamma Elispot测试。初免或初免-加强反应在个体小鼠上进行，在初免和加强反应中用具有相同 VSV-G包膜的慢病毒载体或用具有不同VSV-G包膜的慢病毒载体。

[0373] 图43：用整合缺陷的LV有效转5BFC非分裂细胞。用蚜栖菌素处理的HeLa细胞用梯度剂量(每ml培养基从1到100ng p24抗原)的eGFP整合性LV(eGFP-ILV)或eGFP非整合性LV(eGFP-NILV)转导。转导后48小时，经流式细胞术分析eGFP表达。上组示出GFP阳性细胞百分比，下组示出 GFP阳性细胞的MFI(平均荧光强度)。

[0374] 图44：慢病毒载体导致在常规树突细胞(cDC)和浆细胞样DC(pDC)中的有效抗原表达。(A)用eGFP整合性LV(eGFP-ILV)或eGFP非整合性 LV(eGFP-NILV)或用300ng/ml热灭活(HI)eGFP-ILV或eGFP-NILV进行的剂量-应答转导实验(从0到300ng/ml)。在第6天，FL-DC暴露于载体颗粒48 小时，CD11c阳性细胞的转导通过用流式细胞术测量eGFP表达而评估。数字代表表达eGFP的CD11c细胞的百分比。(B)用LV转导pDC和cDC。cDC($CD11c^+B220^-$)和pDC($CD11c^+B220^+$)对eGFP的表达被示出。细线，对照细胞(Ctl)；填充的谱(profiles)，用300ng/ml载体颗粒转导的FL-DC。

[0375] 图45：单剂$_{s}$Ewny-NILV引起强的特异性抗体应答。成年小鼠各组用梯度剂量的$_{s}$Ewny-NILV(从1到100ng p24抗原)(A、B)或$_{s}$Ewny-ILV(B)腹膜内免疫接种。对照小鼠用热灭活的$_{s}$Ewny-LV NI(A、B)或I(B)(HI 100)注射。21天后，评估集合的血清(每组6个小鼠)的WNV特异性抗体。

[0376] 图46：由sEwnv-NILV免疫接种赋予的抗WNY感染的快速保护。6 个小鼠/组用100ng sEwnv-NILV或100ng sEwnv-ILV免疫接种。对照组小鼠用磷酸缓冲盐水(PBS)接种。免疫接种后1周，小鼠用1000i.p.LD_{50}s的WNV 毒株IS-98-ST1攻击。记录21天存活。

[0377] 图47：sE_{WNV}-NILV导致的抗WNV感染的有效长期保护。用梯度剂量 sE_{WNV}-NILV(1-100ng p24抗原)(A,B)或sE_{WNV}-ILV(B)免疫接种后2个月，小鼠用1000i.p.LD_{50}s的WNV毒株IS-98-ST1接种。记录21天存活。

[0378] 图48：密码子优化对gag Δ myr表达水平的影响。293T细胞用含有gag Δ myr的野生型序列(左侧组)或密码子优化序列(右侧组)的TRIP载体质粒、包壳质粒p8.7D64V和VSV-G表达质粒共转染。

[0379] 图49：各组小鼠(n＝5)用经VSV-G Indiana假型包装的TRIP.NI GAGΔ myr CO(100ng)或TRIP.I GAG野生型颗粒(100ng)免疫接种或未接种(首次实验组)，13周后，分别用经VSV-G New Jersey假型包装的TRIP.NI GAGΔ myr CO(100ng)或TRIP.I GAG野生型颗粒(100ng)加强。所有小鼠在免疫接种后10天牺牲，抗GAG的细胞免疫应答经IFN-γ ELISPOT(A)或四聚体染色(B)评估。

[0380] 图50：当可利用时，用各种VSV-G血清型密码子优化(CO)或野生型(WT) 假型包装的慢病毒载体颗粒的滴定。

[0381] 图51：用于定量血清中和活性的体外测定。从动物收集小鼠血清，所述动物以2个月间隔用每次300ng P24慢病毒载体颗粒注射2次，所述载体颗粒用不同血清型的VSV.G蛋白假型包装。编码萤光素酶的载体颗粒同样用各种血清型的VSV.G蛋白假型包装，在各种稀释度血清存在下于37℃保温1小时。保温后，编码萤光素酶的慢病毒载体颗粒用于转导96孔板中的 293T细胞，每孔1ng P24。保温48小时后，用发光检测试剂盒根据厂商指导测量萤光素酶活性(Boehringer)。结果以无血清保温后的发光活性百分比表示。

[0382] 图52：慢病毒载体颗粒与不同小鼠血清的交叉中和作用：用不同VSV.G 蛋白假型包装的病毒颗粒在各种小鼠血清存在下在转导实验中测试。A：转导被完全抑制(++)、部分抑制(+或+/-)或未被(-)抑制。B：这些实验的细节。

[0383] 图53：Indiana假型包装颗粒在各种猴血清存在下的活性。A：来自免疫前猴的血清，B：来自用各种剂量的Indiana假型包装颗粒注射的猴的血清(初免)，C：用New Jersey假型包装颗粒注射后的猴血清(加强)。

[0384] 图54：New Jersey假型包装颗粒在各种猴血清存在下的活性。A：来自免疫前猴的血清，B：来自用各种剂量的Indiana假型包装颗粒注射的猴的血清(初免)，C：用New Jersey假型包装颗粒注射后的猴血清(加强)。

[0385] 图55：Cocal假型包装颗粒在各种猴血清存在下的活性。A：来自免疫前猴的血清，B：来自用各种剂量的Indiana假型包装的慢病毒载体颗粒注射的猴的血清(初免)，C：用New Jersey假型包装的慢病毒载体颗粒注射后的猴血清(加强)。

[0386] 图56：Isfahan假型包装颗粒在各种猴血清存在下的活性。A：来自免疫前猴的血清，B：来自用各种剂量的Indiana假型包装颗粒注射的猴的血清(初免)，C：用New Jersey假型包装颗粒注射后的猴血清(加强)。

[0387] 图57：SVCV假型包装颗粒在各种猴血清存在下的活性。A：来自免疫前猴的血清，B：来自用各种剂量的Indiana假型包装颗粒注射的猴的血清(初免)，C：用New Jersey假型包装颗粒注射后的猴血清(加强)。

[0388] 图58：人血清中抗VSV.G蛋白抗体的流行(prevalence)。抗VSV-G蛋白的中和抗体的存在在加热或未加热的各种人血清的存在下用颗粒的转导测定确定，所述颗粒用A：VSV-G Indiana，B：VSV-G New Jersey，C：VSV-G Cocal，D：VSV-G SVCV和E：VSV-G Isfahan假型包装。

[0389] 图59：人血清中抗Cocal VSV.G蛋白抗体的流行。96个人血清(加热和未加热)在存在病毒颗粒的条件下在转导实验中(以1/2稀释度)测试，所述病毒颗粒用A：Indiana，B：New Jersey，C：Cocal，D：Isfahan，E：SVCV VSV.G 蛋白假型包装。这些实验在每种条件下进行两次。

[0390] 图60:患者的人血清中和VSV-G蛋白的分析。经转导测定研究血清中存在抗VSV-G蛋白的中和活性的患者(A:Indiana,B:New Jersey,C:SVCV, D:Cocal,E:Isfahan颗粒,系列稀释)。

[0391] 图61:用不同VSV-G包膜假型包装的载体颗粒与mDCh融合或不融合的能力。人单核细胞衍生的DC(mDC)用GFP载体颗粒转导,所述载体颗粒用Indiana、New Jersey、Isfahan、SVCV、Cocal和Chandipura的VSV-G包膜假型包装。转导后5天,经流式细胞术分析mDC以确定效价。相对效价表示为在mDC上确定的效价与在293T细胞中确定的效价之间的比率。

[0392] 在抗SIV感染免疫接种策略中应用TRIP慢病毒载体作为模型例证抗HIV感染免疫接种

[0393] I.TRIP载体在小鼠模型中诱导抗SIV特异性T细胞应答的潜力

[0394] 为确定携带源自VSV病毒的包膜蛋白的慢病毒载体是否能被修饰以允许加强免疫应答,我们开发了新的载体策略,其基于表达来自预期不交叉反应的不同VSV血清型的糖蛋白的慢病毒载体。

[0395] 水泡性口炎病毒(VSV)分离株是有包膜的、非分节段的、负链RNA病毒,属于弹状病毒科水泡性病毒属。VSV感染家畜如牛、猪和马,导致在舌、口腔组织、乳房和蹄中疱疹损害。

[0396] VSV基因组被输送到宿主细胞细胞质,在此发生复制,经病毒颗粒的受体介导的胞吞及随后pH诱导的病毒包膜与内体膜融合进行。VSV G蛋白是唯一的病毒表面糖蛋白,是附着和融合所需的。VSV有两种主要血清型,Indiana和New Jersey,它们通过抗G糖蛋白的中和抗体区分。除了它们的抗原结构之外,Indiana和New Jersey糖蛋白也在氨基酸数目(分别为 511和517)和组成(仅50%相同性)、在翻译后修饰及在折叠方面不同。相应地,Indiana和New Jersey毒株对于VSV致病性不是同等重要的。相比于由 Indiana毒株导致的爆发,由New Jersey毒株导致的爆发是更经常的和更严重的。

[0397] 材料和方法

[0398] 小鼠.雌性C57BL/6小鼠(élevage Janvier,France)在巴斯德研究所设施中培育。

[0399] 细胞培养物.HeLa(人宫颈腺癌,得自ECACC)和人胚肾293T细胞(得自ATCC)用于慢病毒载体产生,在补加10%热失活胎牛血清(FCS)和抗生素 (青霉素-氯霉素)的Dulbecco修饰的Eagle培养基(DMEM)Glutamax(GIBCO) 中生长。

[0400] 载体构建和产生

[0401] 载体质粒pTRIP.ΔU3.CMV.SIVmac239gagΔmyr含有非十四烷基化形式的SIVmac239 gag序列,其在巨细胞病毒立即早期启动子(CMVie)控制下。

[0402] 载体颗粒通过用载体质粒、包壳质粒(p8.7)和VSV-G包膜表达质粒, Indiana血清型(pHCMV-G)(10)Vs New Jersey血清型(pcDNA3.1(-)NJ-G)(衍生自得自Invitrogen的市售pcDNA3.1质粒)经瞬时磷酸钙共转染293T细胞而产生。蛋白质序列见图3。

[0403] 克隆策略包含下述步骤:

[0404] 使用含有来自New Jersey VSV血清型的糖蛋白的基因的质粒(pBS VSV-G NJ)。

[0405] 其在XhoI/NotI消化后被克隆进pcDNA3.1(-)载体(Invitrogen)。由此方法衍生的质粒命名为pcDNA3.1(-)VSV-G NJ.

[0406] WPRE序列(旱獭肝炎病毒调控后元件)(11)是已知显著增加基因表达的转录后调节元件。其被克隆进**TOPO®**克隆载体(Invitrogen)。

[0407] WPRE序列在EcoRI消化及去磷酸化之后克隆进pcDNA3.1(-)VSV-G NJ中。以此方法衍生的质粒命名为pcDNA3.1(-)VSV-G NJ WPRE。

[0408] 浓缩载体颗粒的p24抗原含量的WPRE定量用商业HIV-1 p24 ELISA 试剂盒(Perkin-Elmer Life Sciences)进行。对于载体原液滴定,293T细胞用不同载体浓度转导72小时并裂解。裂解液用Rnase和蛋白酶K处理,然后用作定量PCR(Lightcycler)。

[0409] 体外转导抑制测定.HeLa细胞以每个96孔平板10000个细胞铺板。1 天后,与1:6稀释的去补体化小鼠血清预保温30分钟后,细胞用编码 eGFP(增强的GFP)并用来自VSV Indiana或New Jersey血清型的糖蛋白假型包装的慢病毒载体转导细胞。小鼠是首次实验小鼠或用0.25 10^7转导单位 (TU)的编码非十四烷基化形式的SIVmac239 Gag并用来自VSV Indiana血清型的糖蛋白假型包装的慢病毒载体免疫一次的小鼠。在72小时后,转导经流式细胞术测定。计算转导中和百分比,与不存在血清时的转导相比。

[0410] 小鼠免疫接种.所有动物实验均根据巴斯德研究所Office Laboratory of Animal Care的指导进行。9周龄小鼠用在0.2ml Dulbeccos's PBS中的0.25 107转录单位(TU)的pTRIP.ΔU3.CMV.SIVmac239gagΔmyr载体颗粒腹膜内 (i.p.)接种两次,分别在第0天和第21天。小鼠在第14天放血。免疫应答在第28天分析。

[0411] 对于初免,编码非十四烷基化形式的SIVmac239 Gag并用来自VSV Indiana血清型的糖蛋白假型包装的慢病毒载体被给予,而对于加强,用来自VSV New Jersey血清型的糖蛋白假型包装的相同载体被注射。

[0412] 使用两次随后注射用来自VSV Indiana血清型的糖蛋白假型包装的慢病毒载体用同源初免/加强策略进行比较。作为对照,在单次注射用来自VSV Indiana血清型的糖蛋白假型包装的慢病毒载体后鉴定初始(第7天)和记忆 (第28天)应答。还测定了用来自VSV New Jersey血清型的糖蛋白假型包装的慢病毒载体仅免疫一次的小鼠的初始(第7天)应答。

[0413] IFN-γ Elispot测定

[0414] 硝基纤维素微滴板(MAHA S4510,Millipore)用捕获抗体(小鼠IFN-γ Elispot pair,BD Pharmingen)包被过夜并用完全培养基封闭,所述培养基由补加10%FCS、抗生素、hepes、非必需氨基酸、b-巯基乙醇和丙酮酸钠的 RPMI1640 Glutamax组成。来自载体免疫小鼠的脾细胞以一式三份以 $0.25x10^6$细胞/孔加入平板中,并用SIVmac239 gag肽(NIH AIDS Research and Reference Reagent Program)、伴刀豆球蛋白A(1μg/ml)刺激。40小时后,用生物素缀合抗体(小鼠IFN-γ Elispot pair,BD Pharmingen)随后链霉抗生物素蛋白-AP(Roche)和BCIP/NBT底物溶液(Promega)揭示斑点。斑点用 Bioreader 2000(Biosys,Karben,Germany)计数,结果表示为IFN-g斑点形成细胞(SFC)/百万脾细胞。

[0415] 体内细胞毒性测定

[0416] 为靶细胞制备,将来自首次实验小鼠的脾细胞用各种浓度(高,5μM;中,1μM;低,0.2μM)的CFSE(carbosyfluorescein-diacetate succinimydel ester, Vybrant CFDA-SE cell-tracer kit,Molecular Probes)标记。脾细胞然后用 5μg/ml的肽脉冲。每个小鼠经眶后静脉接受含有来自每一级分相等数目细胞的混合物的10^7CFSE标记的细胞。15-18小时后,来自脾的单细胞悬浮液经流式细胞术分析(Becton Dickinson,CellQuest software)。肽脉冲细胞的消失通过比较免疫的小鼠和首次实验小鼠的脉冲的(高/中CFSE荧光强度)与

未脉冲(低CFSE荧光强度)群体的比率而确定。特异杀伤百分比经下列计算建立:[1-[(CFSE低首次实验的/CFSE高/中首次实验的)/(CFSE低免疫的/CFSE 高/中免疫的)]]*100。

[0417] 结果(图40-42)

[0418] 我们首先显示用低剂量(0.25 10e7 TU/小鼠,相应于对于这一批次 650ng p24)经来自VSV Indiana血清型的糖蛋白进行包装的慢病毒载体仅免疫接种1次的小鼠确实产生强体液应答,其中和用经相同包膜假型包装的慢病毒载体对细胞的体外转导。相反,仅有经用来自VSV New Jersey血清型的糖蛋白假型包装的载体的转导的低血清中和可检测到。

[0419] 使用编码非十四烷基化形式的SIVmac239 Gag并用来自VSV Indiana 血清型的糖蛋白假型包装的慢病毒载体进行的初步剂量应答实验使得我们鉴定了免疫应答并鉴别了含有免疫显性CD8表位的肽(SIVmac239 gag:309-323(QTDAAVKNWMTQTLL)以及含有亚显性CD8表位的肽(SIVmac239 gag:73-97(ENLKSLYNTVCVIWC)(数据未示出)。低至0.45 10^7TU/小鼠的剂量就足以达到100%稳态响应小鼠,具有对于含有免疫显性 CD8表位的肽的几乎100%的特异性裂解。相反,在含有亚显性CD8表位肽情况中,即使高剂量(高至23 10^7TU/小鼠)也不足以刺激100%的体内细胞裂解活性。

[0420] 平行地,最近公布的论文使用编码相同抗原的腺病毒载体,鉴别了含有CD4表位的肽(SIVmac239 gag:297-311(YVDRFYKSLRAEQTD))。

[0421] 因此,我们选择监测抗这3个肽的免疫并且用亚最佳剂量载体(0.25 10^7TU/小鼠)以便能够检测在响应小鼠数目和应答幅度方面的加强作用。

[0422] II-在非人灵长类模型中抗SIVMAC的保护应答

[0423] 介绍

[0424] 1.HIV感染和AIDS

[0425] 1.1 HIV及其影响

[0426] 1.1.1流行病学

[0427] 自从第一例获得性免疫缺陷综合症(AIDS)在1981年被报道,人免疫缺陷病毒(HIV)的全球传播已经达到全球流行比例,现在代表了全球发展和公共健康威胁(Girard et al.,2006)。事实上,全世界携带HIV生存的人数现在已39.5百万,并仍然指数增长,在去年有4.3百万人被感染,预计每天有 14000人被感染(http//www.unaids.org)。

[0428] 1.1.2 HIV生物学

[0429] 感染的生理病理学直接与HIV的特征相关。这个病毒属于逆转录病毒科,慢病毒属。其是有包膜病毒,直径大约110-120nm。gp120糖蛋白负责病毒嗜性;事实上其允许固定于细胞受体CD4和共同受体CCR5或CXCR4,因此使得$CD4^+$淋巴细胞是其主要靶细胞。一旦病毒附着于$CD4^+$淋巴细胞,病毒周期分为2个主要步骤:早期和晚期步骤。在细胞质中,病毒RNA被逆转录成双链DNA,位于病毒衣壳内并主动输出至核,在此其可以整合进细胞基因组中(Arhel et al.,2007)。病毒DNA的转录和病毒mRNA的翻译允许形成新的病毒颗粒。

[0430] 大多数AIDS病理学研究是在具有HIV猴等价物SIV的非人灵长类中进行。事实上,SIV病毒结构和生物学与HIV密切相关。

[0431] 1.1.3 HIV感染的生理病理学

[0432] 疾病进展由组合测量血浆HIV-1 RNA和$CD4^+$淋巴细胞而精确定义。天然HIV感染可以分成3个主要阶段:原发感染或急性感染,特征是病毒负荷峰值(大约10^6拷贝RNA/ml血

液)以及快速但瞬时的循环T $CD4^+$降低 (Weber,2001)。另外,在这个感染早期阶段,HIV特异性$CD4^+$T细胞是病毒的主要靶并在不存在任何治疗情况下被优先摧毁(Rosenberg et al.,2000)。但是,病毒负荷的这一增加通常被特异性免疫应答主要是细胞免疫应答良好控制。事实上,有证据表明HIV特异性$CD8^+$T细胞的出现和原始病毒血症的下降之间的时间相关性(Koup et al.,1994)。结果是,T $CD4^+$数目回到较高水平(低于感染前水平)及病毒血症稳定化(在10^3和10^6RNA拷贝/ml之间):达到调定点(set-point);其水平经常与疾病进化相关(Mellors,1996)。感染个体然后进入无症状期,其可以持续几个月至几年。这一时期特征是循环$CD4^+$数目缓慢线性降低,这是由于免疫系统和HIV复制之间的平衡所致。在缺乏治疗时,这一无症状期随后是AIDS。在这个时间,病毒血症进行性回到高水平,观测到$CD4^+$T细胞耗竭斜率拐折(inflection)(CD4计数低于200个细胞/mm^3血液)。最终,免疫系统崩溃,通常可以完全控制或容易清除的致病因子变得潜在致死的。

[0433] 2.医学治疗

[0434] 2.1从单一疗法到HAART

[0435] 为了减缓疾病进展到AIDS,新的治疗法在1986年上市。它们被称为抗逆转录病毒药,它们的目的是防止HIV复制因此延迟$CD4^+$T细胞耗竭。这些药物中最注明的当然是AZT (Zidovudine),病毒逆转录酶(RT)的抑制剂。但是,这个单一治疗途径最终发现有效性有限,因为HIV是具有快速产生对任何抗逆转录治疗的抗性(通过突变)的潜力的病毒。1996年,RT的新抑制剂被商品化;它们与AZT样抑制剂在化学上不同。最终,新的一类HIV 治疗出现于1995年,蛋白酶抑制剂(PI)。所述组合目前是抗HIV治疗的“标准”,称为高活性抗逆转录病毒疗法(HAART),其由3类抗逆转录病毒治疗的结合组成,通常是2种不同的RT抑制剂和1种PI。HAART允许强有力的持久的病毒负荷降低(图5B),对于大多数患者,血液中的病毒拷贝甚至变得不可检测(Gulick et al.,2000)。结果是,CD4计数增加,免疫系统部分恢复并且可以再次驱逐机会病原体(Autran et al.,1997)。对于接触治疗的患者,HAART允许令人印象深刻的AIDS相关发病率的降低(Palella et al., 1998)。

[0436] 2.2 HAART限制

[0437] 尽管HAART成功是毋庸置疑的,但是其存在一些限制,考虑到其长期应用可产生问题。首先,HAART治疗非常昂贵,对于发展中国家仍不可及。然后,这些治疗的毒性相对高,它们经常触发主要副作用(糖尿病、脂肪营养不良、腹泻、头痛...)。另外,已经表明HIV能产生抗HAART治疗抗性。突变经常出现于由治疗限制的HIV的区域。HAART治疗还限制了HIV抗原的产生,显然到达低于刺激HIV特异性效应T细胞或扩增HIV特异性原初T细胞所需的阈值。但是,对HIV的免疫记忆仍然持续,如当治疗中断后免疫系统重新暴露于病毒时针对HIV的CD4和CD8免疫应答的瞬时恢复所示(Autran et al.,2004)。

[0438] 2.3 HIV免疫接种

[0439] 2.3.1预防性/治疗性疫苗

[0440] 因为药物的功效仍然有限及因为HAART应该是终生治疗,在大多数第三世界环境中太贵且难以给药,需发现其它策略以持久防止AIDS发生。HIV疫苗的开发可代表降低全球性流行的唯一办法。两种不同免疫接种策略被测试。一方面,预防疫苗应能够诱导无菌免疫(sterilizing immunity),并防止感染及其并发症。这种疫苗应该能够在病毒进入及在感染非常早期在病毒传播至淋巴器官之前起作用。另一方面,治疗性疫苗被设计用于在

HAART治疗下的慢性感染患者(Autran et al.,2004)。其包括首先用HAART 治疗患者以恢复免疫能力,然后免疫接种他们以在中断治疗之前加强他们的静止的对HIV的免疫应答。最终,如果病毒的免疫控制能被增强,疾病进展会被减弱,允许治疗中断,结果限制HAART的应用,因此使它们的毒性和成本最小化。

[0441] 2.3.2目前AIDS疫苗研究的状态

[0442] 不管选择何种策略,疫苗开发正面临巨大科学挑战,如病毒的高遗传可变性,缺少保护的免疫相关性及现有动物模型的限制。直至目前,50种以上疫苗候选物已在I/II期临床试验中被测试(www.iavi.org)。目前已测试多种免疫接种策略(Tonks, 2007)。最初,传统的活减毒疫苗被测试,因为它们过去针对天花、脑灰质炎或麻疹的成功。在Nef基因中具有缺失的活减毒病毒(SIV-Δnef)在SIV/ 猕猴模型中是最有效的疫苗。但是,其应用是受限的因为疫苗病毒以低水平一直持续存在于免疫接种的猕猴中,对于新生儿是致病性的。另外,HIV- Δnef免疫接种几年后可在成年动物中导致疾病。无论如何,这些活的减毒疫苗提供了HIV疫苗开发可行性的关键原理验证并允许鉴定保护免疫的性质(Koff et al., 2006)。另一种传统疫苗策略是诱导广泛的和持久的中和抗体以使病毒不能进入并防止感染。为此,开发了亚单位疫苗。它们由HIV蛋白或肽组成,经常是重组的。我们可以在次引述VaxGen试验,在美国II 期中评估,疫苗基于单体gp120,在明矾中给予。但是,这些亚单位疫苗试验无一显示被接种者中HIV感染的统计学显著降低。因为引起体液应答的疫苗未能给出令人鼓舞的结果,研究人员已转向细胞介导的装备。事实上,先前已示出$CD8^+$细胞毒性效应T细胞能够清除在它们的I类MHC分子上展示病毒肽的感染细胞。另外,$CD8^+$T细胞已知在控制SIV和HIV感染中是重要的,因为(i)在猴中慢性SIV感染期间$CD8^+$T细胞的耗竭增加了病毒负荷(Jin et al.,1999),(ii)在I类HLA基因座杂合的HIV阳性患者具有更慢的疾病进展速率(Carrington et al.,1999)及(iii)病毒在$CD8^+$T细胞表位中积累突变(Goulder and Watkins,2004)。刺激T细胞应答的疫苗不以传统方式防止感染但是可以至少抑制其足够长时间以防止AIDS发生。在T细胞疫苗中发现DNA疫苗,目前在I期试验,使用由质粒编码的分离的HIV基因,但是其面临免疫原性问题。引起T细胞应答的最常用策略是重组载体。其包括使用病毒载体(衍生自痘病毒、痘苗病毒或腺病毒)以转运分离的HIV 基因进入人类细胞。

[0443] 最后,还值得一提的是基于树突细胞的免疫接种技术,其抗SIV攻击的结果非常令人鼓舞。其包括用自体树突细胞(DC)免疫接种猕猴,DC用化学灭活的SIV(用aldrithiol-2, AT-2)脉冲。灭活病毒不能逆转录但是病毒颗粒保留它们的结构完整和大部分全部融合能力。这一技术在慢性感染的未治疗的人类中甚至被测试成功,自体DC用灭活的自体HIV脉冲(Andrieu and Lu,2007)。尽管其有效性,但是这一技术相当昂贵和耗时。

[0444] 2.3.3现有技术疫苗策略遇到的问题

[0445] 虽然许多类型的疫苗已经且正在被测试,它们迄今无一完全成功。事实上,用DNA疫苗从未观测到对病毒负荷的长期作用,即使CTL特异性应答被刺激。引起体液应答的疫苗的病毒有巨大可变性,即使产生抗体,它们也从未足够通用而对付HIV遗传多样性。甚至用中和单克隆抗体被动免疫接种HIV感染个体也失败了,说明体液免疫在控制HIV-1感染中的限制(Trkola et al.,2006)。痘病毒载体成功引起特异性CD4+和CD8+T细胞应答,但是在许多周HAART中断后不能更好控制病毒负荷。结果,需要测试其它免疫接种策略。我们在此推

荐测试一种新的HIV-1疫苗策略，基于应用衍生自HIV-1的慢病毒载体(LV)作为候选疫苗。

[0446] 3.慢病毒载体作为HIV免疫接种候选物

[0447] 3.1慢病毒载体技术

[0448] 20年前LV首次被描述(Poznansky et al.,1991)。作为重组载体，LV 能整合转基因(直至8-10kb)进入宿主细胞DNA。HIV-1衍生载体及全部LV 的独特性是它们能转导非分裂细胞。事实上，LV像慢病毒一样能够独立于细胞有丝分裂而整合。这一能力来自病毒DNA(或载体DNA)主动核输出通过宿主细胞核膜。这种主动核输出的一个解释是形成独特的三链DNA，称为DNA活瓣或Triplex，其通过pol序列中的两个顺式活性序列形成：实验室发现的cPPT(central Polypurine Tract)和CTS(Central Termination Sequence)(Zennou et al.,2000)。

[0449] 我们的免疫接种计划利用HIV-1衍生的LV，通常称为TRIP(因为其含有中心DNA活瓣/Triplex结构)。这个载体属于第三代LV，已在设计、生产、转导效率和生物安全性参数方面被优化(Delenda,2004)。

[0450] 用HIV-1作为基因转移载体的一个主要兴趣是逆转录病毒与RNA正或 DNA病毒不同，是不直接感染性的。事实上RNA正基因组需要逆转录和许多辅助蛋白以开始病毒复制和体内病理发生。但是，为了用作基因转移载体，HIV-1基因组已被降低到转基因表达和包装所需的最小病毒序列(图 8)。转基因表达盒所需的顺式作用序列是下述这些：

[0451] LTR序列(长末端重复)是逆转录、病毒DNA整合和转录所需的。3' LTR 已在U3区域中缺失，不干扰基因转移所需的功能，这为了两个主要原因：首先，为避免一旦DNA整合进基因组宿主基因的反式激活，第二，允许病毒顺式序列在逆转录后的自身失活。因此，在靶细胞中仅来自内部启动子的序列被转录(转基因)(图9)。

[0452] Ψ区域是病毒RNA包壳所需的。

[0453] RRE序列(REV应答元件)在结合Rev蛋白后允许病毒信使RNA从核输出至细胞溶胶。

[0454] DNA活瓣序列(cPPT/CTS，正常含于Pol中)促进核输入。

[0455] WPRE顺式活性序列(旱獭乙型肝炎病毒响应后元件)也被加入以优化 mRNA的稳定性(Zufferey et al.,1999)。WPRE不翻译。

[0456] 感兴趣的基因(即编码抗原)插入到转移载体质粒中在强且通常遍在的启动子控制下。

[0457] 为了产生病毒颗粒(RNA、衣壳和包膜)，一些HIV-1辅助包装蛋白需要被同时带进生产者细胞。它们由两个额外质粒编码，称为包装或包壳质粒和包膜表达质粒。包装质粒仅编码病毒颗粒合成必需的病毒蛋白。其存在于质粒中会引起安全考虑的辅助基因被除去。反式带进来的病毒蛋白分别是：

[0458] Gag蛋白，用于构建基质(MA、p17)、衣壳(CA、p24)和核衣壳(NC、p6)。

[0459] Pol编码的酶：整合酶、蛋白酶和逆转录酶。

[0460] Tat和Rev编码调节蛋白，Tat是LTR介导的转录的起始所需的。

[0461] 为了编码这些产生的mRNA包装在病毒颗粒中，Ψ区域被除去。选择异源启动子以避免重组问题。

[0462] 包膜表达质粒不编码HIV-1天然env蛋白(gp120,gp41)。事实上，这些蛋白质太不稳定不能允许有效生产和经载体颗粒的超离心的浓缩。另外，HIV-1的env蛋白具有有限的

嗜性(CD4,CCR5,CXCR4)。为面对这些问题,LV产生利用一种称为假型包装的过程。其包括用异源包膜糖蛋白产生病毒颗粒。在第一个和更广泛用于假型包装LV的糖蛋白是来自Indiana血清型的水泡性口炎病毒糖蛋白(VSV-G)。用VSV-G假型包装的LV提供了显著优点,VSV-G与细胞上的遍在细胞受体相互作用,使载体具有广谱宿主细胞范围。另外,VSV-G赋予高载体颗粒稳定性,允许病毒颗粒的下游加工:主要经超离心浓缩。

[0463] 3.2.为什么慢病毒是抗HIV-1免疫接种的有前景的候选物?

[0464] 3.2.1 DC的转导

[0465] LV最初用于基因治疗,它们作为基因转移系统的独特能力在今天是不可否认的。

[0466] 首先并且与腺病毒和痘苗病毒衍生的载体相反,在人类中没有抗慢病毒的预先存在的免疫。自从它们出现,LV已成功在许多治疗重要的细胞和组织中在基因治疗方案范畴体外测试,包括肝脏、脑和树突细胞(DC)。

[0467] DC是抗原呈递细胞(APC)的异质组,其在先天免疫以及在起始适应性免疫应答中起关键作用。DC通过连续捕获外周组织中的抗原而作为免疫系统的岗哨。一旦由微生物产物或炎性信号激活,它们经历成熟,迁移进引流淋巴组织,在此它们随后加工和呈递在MHC I和II环境中的捕获的抗原到$CD8^+$和$CD4^+$T细胞。令人感兴趣地,在能有效被LV转导的细胞类型中,发现了有丝分裂活性低的人$CD34^+$衍生的和单核细胞衍生的DC以及小鼠骨髓衍生的DC。在体外,由LV的转导不影响它们的存活性。最终,DC 的稳定转导允许在细胞的整个寿命期间内源呈递抗原。因此,其使得LV成为良好的候选疫苗。

[0468] 3.2.2 LV用于免疫接种目的的历史

[0469] 除了有效表达转基因蛋白之外,体外用LV转导的DC显示有效加工和呈递从所述蛋白质衍生的肽。事实上,人和鼠的慢病毒转导的DC能够体外再次刺激特异性T细胞系或克隆。更重要地,几个小组报道了当使用人DC 时体外引发原初T细胞抗相关抗原。

[0470] 许多小组然后评估了慢病毒转导的DC作为体内免疫治疗剂的用途,主要在小鼠模型中,但是最近也在灵长类模型中。其包壳用离体慢病毒转导的DC免疫动物,体外分析产生的$CD8^+$T细胞应答。当可能时,保护能力也在攻击情况中体内测试。大部分这些研究使用肿瘤抗原作为模型并测试诱导的CTL应答消除肿瘤细胞的能力。非常少研究团队证实离体慢病毒转导的DC抗病毒感染的持久性。Zarei et al,例如证实了在小鼠中抗LCMV 攻击的保护能力,所述小鼠用DC免疫接种,所述DC用编码病毒糖蛋白的 LV转导(Zarei et al.,2004)。

[0471] 但是,这个技术看起来难以在人类免疫接种方案中应用,结果LV经直接体内给予而快速测试。许多小组证实在小鼠中体内注射LV以引起转基因特异性免疫应答的功效。再一次,主要应用肿瘤抗原。例如,实验室示出在HLA-A*0201转基因小鼠中直接体内接种黑素瘤多表位编码慢病毒可引起强CTL应答,抗大多数编码的黑素瘤表位(Firat et al.,1999)。已经证实注射LV优于离体转导的DC注射,在CTL应答的幅度和长久性方面均如此(Esslinger et al.,2003)。另外,功能性$CD8^+$T细胞记忆应答可以在用TRIP 载体直接体内免疫接种后产生,即使在$CD4^+$T细胞不存在下也是如此,这是针对HIV免疫接种的不可否认的优点(Iglesias et al.,2007)。许多研究团队现在正在研究可有助于LV作为免疫接种工具的高潜力的错综复杂的机制。持续的抗原表达,特别是在DC中,以及先天免疫的激活可能起关键作用 (Breckpot et al.,2003)。

[0472] 4.在猕猴中的疫苗试验

[0473] 4.1实验室先前工作，计划的早期日子

[0474] 在实验室中，免疫原性研究证实抗SIV特异性T细胞应答在近交小鼠中的潜力，所述小鼠用TRIP载体免疫接种，所述TRIP载体编码非十四烷基化形式的SIVmac239 Gag(上述)。这些小鼠模型允许描述TRIP载体作为抗HIV免疫接种候选物的潜力。但是，它们不允许测试在病毒攻击环境中 TRIP载体免疫接种的保护能力。

[0475] 4.2猕猴模型

[0476] 为此目的，非人灵长类模型被选择用于保护功效研究，更特别是猕猴。人/HIV-1模型被翻译为猕猴/SIVmac非人灵长类模型。猕猴对SIVmac感染高度易感并进行性发生免疫缺陷综合征，其模拟人类AIDS。令人感兴趣地，在初始和慢性感染期间的血浆病毒负荷与在人类中观测到的平行，如在 HIV-1感染的人中，非进展者(non-progressor)以及快速进展者可以被观测到。如在用HIV-1感染的人中，在初始和长期感染期间对SIVmac的细胞免疫应答显著不同，免疫逃避的证据容易记录。如在HIV-1感染个体中，肠道相关淋巴组织是病毒复制和$CD4^+$T细胞耗竭的主要部位。

[0477] 目前，AIDS疫苗/攻击数据主要在3种主要猕猴物种中产生：主要是印度起源的猕猴(rhesus macaque)，中国起源的猕猴及Cynomolgus猕猴。每种物种模型具有研究对病毒感染的应答的优缺点。Cynomolgus猕猴被用于我们的研究因为它们在欧洲比猕猴更易获得。Reinman et al.显示SIV的病原性在Cynomolgus猕猴中相比于印度猕猴减弱(更低的血浆病毒血症、$CD4^+$T 相比数保持，增加的存活时间)。这种减弱的病原性与比rhesus物种中更早及更强的对GAG和ENV的INF-γ ELISPOT应答相关。这些观测因此支持了早期T细胞免疫应答的作用。最终，尽管血浆病毒负荷较低，但是攻击后病毒血症可以显著用作Cynomolgus猕猴中的实验终点，假定用于攻击的病毒剂量足够高，以及首次实验组足够大，能够限制自发对照者(controller) 的统计学显著性。令人感兴趣地，Cynomolgus猕猴展示更类似于人类感染中见到的病毒负荷(Reimann et al.,2005)。

[0478] 4.3.抗原的选择

[0479] 在非人灵长类中的疫苗试验中，抗原选择的问题被提出。GAG SIVmac239非十四烷基化蛋白被选作抗原。先前结果和观测以及关于HIV-1 感染和病毒结构的数据可以证明选择这一蛋白质作为潜在有效抗原是正确的。首先，HIV-1毒株中的重要可变性限制我们选择蛋白质在不同HIV-1/SIV 毒株中很好地保守。仅GAG、POL和NEF可满足这个标准。但是，已经显示CTL主要识别位于gag和nef上的表位(Addo et al.,2003)。最近，证实靶向的HIV-1蛋白，仅GAG特异性应答与降低病毒血症相关并且独立于特定HLA-类型(Kiepiela et al.,2007)。另外，GAG特异性应答越多样，血浆病毒血症越低。另外，因为其包含病毒基质，GAG是第一个被MHC I类加工和呈递的蛋白质(Sacha et al.,2007)，因为进入/捕获是足够的并且无需病毒复制。GAG还是HIV-1蛋白中最表现的(1000-1500CA)(Briggs et al.,2004)。所有这些数据表明选择这个蛋白质作为相关抗原用于我们首次疫苗试验是正确的。另外，这个试验设计给出TRIP载体作为免疫接种工具的效率的概念证明。为此，简单抗原被自愿选择以说明由载体本身所起的保护作用(基因转移功效)。另外，用简单的GAG蛋白作为抗原可以与先前疫苗研究进行比较。

[0480] 4.4.免疫接种方案

[0481] 选择初免-加强策略以增强初始应答。第二次注射预期增加响应者数目、抗原特异性T细胞的频率及亲合力以及T细胞应答的强度。其还应改善应答的多样性及T细胞功能如杀伤或迁移至外周。

[0482] 对于初免，各2个猕猴的3组用3种不同剂量的用Indiana血清型VSV-G 假型包装的LV载体TRIP-SIVmac239 Gag免疫接种。2个动物接受作为无关载体的用Indiana血清型VSV-G假型包装的TRIP-GFP载体。对于加强，在初免后3个月，所有免疫接种动物均接受类似剂量的用Indiana非交叉反应血清型VSV-G假型包装的TRIP-SIVmac239Gag或TRIP-GFP。

[0483] 为了测试由这种基于TRIP载体的疫苗触发的保护能力，加强后2个月 8个动物用500动物感染剂量50(AID50)的SIVmac251直肠内攻击。接种途径和用于攻击的非常高剂量病毒通过群组大小证明是正确的，事实上通过增加感染剂量，我们希望限制在仅有4只猕猴组成的研究的原初动物装备中的自发对照者数目。

[0484] 在初免、加强及攻击后的细胞免疫应答的长期跟踪通过在PBMC上进行IFN-γ ELISPOT而进行。

[0485] 材料和方法

[0486] 1.材料

[0487] 1.1抗原

[0488] SIVmac239 GAGΔmyr蛋白被选作抗原。其是511个氨基酸的蛋白质。蛋白质十四烷基化结构域被缺失以允许在生物安全性水平L1实验室中操作，以及促进APC的I类呈递。来自SIV mac239的GAG多蛋白的完整序列可通过蛋白质ID:AAA47632发现。GFP蛋白选作无关抗原。

[0489] 1.2.质粒

[0490] 用于转染的所有质粒均在菌株JM109 E.coli K12细菌(F′traD36 proA$^+$B$^+$ lacI^q Δ(lacZ)M15/Δ(lac-proAB)glnV44 e14$^-$ gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17)，在补加氨苄青霉素的LB培养基中生长，用来自 Macherey-Nagel(Hoerdt,France)的Maxi-prep Nucleobound试剂盒提取。

[0491] 用三个质粒构建体产生TRIP-ΔU3-CMV-Gag ΔmyR-WPRE(在此称为 TRIP-SIVmac239 Gag,图25A)或TRIP-ΔU3-CMV-eGFP-WPRE(在此称为 TRIP-GFP,图25B)的颗粒。含有HIV-1顺式活性基因(LTR,在3'的ΔU3,包壳信号Ψ,RRE和DNA活瓣即cPPT/CTS)和编码SIVmac239 GAGΔmyr 蛋白或GFP蛋白的转基因的载体质粒，在异源转录调节元件:巨细胞病毒启动子的控制下。加入WPRE(旱獭肝炎病毒调控后元件)(Donella J.E.et al, 1998)序列以增加转基因表达。

[0492] 包装质粒(包壳质粒)，含有在生产细胞系中构建病毒颗粒所需的HIV-1 基因gag、pol、tat和rev，可以如Zufferey et al,1998中p.8.7.1设计。

[0493] 包膜质粒(包膜表达质粒)，编码来自水泡性口炎病毒(VSV-G)血清型 Indiana的糖蛋白G(VSV-G)(phCMV VSV-G)CYee J.et al,1994,Genebank AJ318514)或Indiana非交叉反应血清型如血清型New Jersey (pcDNA3.1(-)NJ-G WPRE)。pcDNA3.1(-)NJG衍生自得自Invitrogen的 pcDNA3.1质粒。特别地，为构建pcDNA3.1(-)NJ-G WPRE，用XhoI和NotI 消化pBS-NJG(Genebank V01214)[17]并克隆进pcDNA3.1(-)载体(Invitrogen)。为增加表达，通过EcoRI消化加入WPRE(旱獭转录后调节元件)序列，该序列经PCR预扩增并克隆进TOPO TA

克隆载体中。

[0494] 包装和包膜质粒具有异源转录元件(CMV启动子,和聚腺苷酸化信号)。所有质粒均含有氨苄青霉素抗性基因以易于在细菌中生长选择。

[0495] 1.3细胞培养

[0496] 人胚肾细胞系(人293T)用于TRIP载体产生。为抑制转导测得,使用 P4细胞系,一种HeLa衍生细胞系。

[0497] 这些细胞在由含有谷氨酰胺的Dulbecco修改的Eagle培养基(DMEM, GlutaMAX-1 Supplement,GIBCO)组成的完全培养基中生长,所述培养基补加10%热灭活胎牛血清(FCS)(PAA Laboratories GmbH,Pasching,Austria)和青霉素、链霉素(100单位/ml青霉素G(钠盐)和100U/ml硫酸链霉素,GIBCO, Invitrogen)。猕猴原代细胞在RPMI GlutaMAX-1完全培养基(10%FCS和抗生素,类似于DMEM中的浓度)中培养。

[0498] 1.4非人灵长类

[0499] 来自印度洋毛里求斯岛的12个雄性成年Cynomolgus猕猴(Macaca fascicularis)包括在免疫接种试验中。在包括在研究中之前它们对于SIV、疱疹病毒B、线状病毒、STLV-1、SRV-1、SRV-2、麻疹、肝炎B-HbsAg及肝炎B-HBcAb是阴性的。免疫、攻击及采血根据使用非人灵长类实验的EU 指导进行。

[0500] 1.5用于攻击的SIV病毒

[0501] SIVmac251毒株(完整前病毒基因组及侧翼序列:登录号:M19499)用于攻击。

[0502] 1.6 SIVmac239 GAG和SIVmac251 NEF肽集合

[0503] ELISPOT中的PBMC体外再刺激用SIVmac239 GAG或SIVmac251 NEF肽集合进行,所述肽集合分别含有125个肽或64个肽(NIH AIDS Research and Reference Reagent Program)。肽长度为15个氨基酸,在依次各肽之间有11个氨基酸的重叠。GAG肽分布在11个集合中,所述集合含有 5-12个连续和重叠的肽,从字母M到W命名并覆盖SIVmac239 GAG蛋白 (图26)。NEF肽分成12个集合,各8个肽,覆盖NEF SIV mac251蛋白并以字母a至h命名。大多数肽80%以上纯。它们以每个1mg冻干输送。收到时,将它们重悬为2mg/ml于5%DMSO(针对GAG肽)及1mg/ml于纯 DMSO(针对NEF肽),这基于肽含量百分比和HPLC纯度。

[0504] 2.方法

[0505] 2.1载体产生

[0506] 载体颗粒通过293T细胞的瞬时磷酸钙转染产生($CaCl_2$ 0.125mM,1X HEPES缓冲盐水pH7.10,70mM NaCl,0.75mM Na_2HPO_4 $2H_2O$,25mM HEPES)。10μg编码GAGΔmyr或GFP的质粒需要5-10μg编码VSV-G 糖蛋白包膜的质粒,以及10μg Zennou et al 2000先前描述的包装质粒 (Zennou et al.,2000)。在转染前24小时,细胞以于完全培养基中6.10^6接种于$10cm^2$聚苯乙烯处理的组织培养Petri皿(Falcon),培养基在转染前更换。细胞至少80%铺满。转染后24小时,不含FCS的完全培养基以较小体积加入细胞以浓缩颗粒。转染后48小时,从Petri皿收集上清,离心沉淀漂浮细胞(2500rpm,5分钟),在37℃用DNAse 1(Roche Boehringer,20U)和 $MgCl_2$(Sigma,1mM)处理15分钟以消除残余质粒DNA。载体在上清超离心后收集(22000rpm;1小时)并重悬于冷PBS中。载体以小体积等份保存在-80 ℃。

[0507] 2.2.测量p24 GAG抗原产生

[0508] 载体HIV-1 p24 GAG抗原含量用酶联免疫法确定(Perkin-Elmer Life Sciences,

Paris,France)。p24浓度以ng/ml载体给出。

[0509] 2.3载体滴定

[0510] 用3种不同体积的载体转导293T细胞(在转导前24小时以5.10^5细胞/ 孔接种于6孔Petri皿)进行滴定。细胞还用相同量的预先在70℃热灭活的载体转导。转导后72小时,用含有无DNase的RNAse(Roche Boehringer,50 μg/ml最终)的裂解缓冲液1X(Tris 20mM pH=8.8;NP40 0.1%;Tween 0.1%最终)裂解细胞。通过加入蛋白酶K(蛋白酶K稳定于100μg/ml最终,Eurobio) 降解细胞蛋白。

[0511] 通过用Light Cycler仪器(Roche Diagnostics,Meylan France)在细胞裂解物上进行实时PCR而评估载体效价。总HIV-1 DNA拷贝数通过检测位于 LTR U5区的病毒DNA序列而确定(引物AASM反向及M667正向)。每个 PCR使用2个杂交探针,一个探针用荧光素(FL)标记作为3' 末端供体,另一个用LightCycler Red 640(FC)标记作为5' 接受体。细胞数的标准化通过用引物CD3于3' 和CD3于5' 及探针FL和FC检测CD3序列(管家基因)而进行。为进行PCR,在15μL PCR-混合物(Jumpstart taq readmix for Q-PCR, Sigma 1X,$MgCl_2$ 1.9mM,1.5U Taq聚合酶(Invitrogen),1.5μM正向和反向引物及0.2μM荧光杂交探针)中,针对每种条件以双份测试5μL裂解物。拷贝数参照标准曲线确定,标准曲线通过用匹配序列(U5R和CD3)扩增在小鼠细胞裂解物(3T3)中稀释的10^2至10^8克隆的质粒而制备(图27)。

[0512]

PCR	寡聚物	序列 5'→3'
U5R 正向引物	M667	GGCTAACTAGGGAACCCACTG
U5R 反向引物	AASM	GCTAGAGATTTTCCACACTGACTAA
U5R3'末端供体探针	LTR FL	CACAACAGACGGGCACACACTACTTGA-FL
U5R5'末端供体探针	LTR LC	LC-CACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGGC
CD3 正向引物	CD3 于 5'	GGCTATCATTCTTCTTCAAGGTA
CD3 反向引物	CD3 于 3'	CCTCTCTTCAGCCATTTAAGTA
CD3 3'末端供体探针	CD3 FL	GGCTGAAGGTTAGGGATACCAATATTCCTGTCTC-FL
CD3 5'末端供体探针	CD3 LC	LC-CTAGTGATGGGCTCTTCCCTTGAGCCCTTC

[0513]

循环步骤及数目		温度	时间
1 个循环	1: 变性	95℃	3 分钟
40 个循环	2: 变性	95℃	5 秒
	3: 退火	57℃	10 秒
	4: 延伸	72℃	8 秒

[0514] 2.4猕猴免疫接种

[0515] 猕猴分成4组,各2个动物(表A),在2个位点皮下注射用VSV-G包膜血清型Indiana假型包装的TRIP-SIVmac239 Gag,分别为3个不同剂量(高剂量$2.5.10^8$转导单位(TU),6863ng p24;中剂量1.10^8TU,2745ng p24或低剂量$2.5\ 10^7$TU,686ng p24),或以相同于TRIP-SIVmac239 Gag的高剂量 (6863ng p24)的p24剂量注射TRIP-GFP。

[0516] 对于在初免后87天进行的第二次免疫接种,动物在4个位点皮下注射用Indiana非

交叉反应VSV-G糖蛋白血清型(VSV-G血清型New Jersey)假型包装的载体。当用GAGdeltamyr抗原初免时,猕猴接受1.10^8TU TRIP-SIVmac239 Gag,60185ng p24或者当用GFP抗原初免时,接受60185ng TRIP-GFP载体的p24。

[0517]

Cynomolgus 猕猴 tatoo 数	在初免时接受的载体	分类
20022	TRIP-SIVmac239 Gag 2.5 10^7TU	低剂量
20089	TRIP-SIVmac239 Gag 2.5 10^7TU	
20293	TRIP-SIVmac239 Gag 1 10^8TU	中剂量
20056	TRIP-SIVmac239 Gag 1 10^8TU	
20195	TRIP-SIVmac239 Gag 2.5 10^8TU	高剂量
20158	TRIP-SIVmac239 Gag 2.5 10^8TU	
21544	TRIP-GFP 6862ng p24	对照
20456	TRIP-GFP 6862ng p24	
15661	无	未接种的
14184	无	
15885	无	
14468	无	

[0518] 表A:TRIP免疫接种试验中使用的Cynomolgus猕猴的重新分配

[0519] 动物根据tatto数及在初免时接受的TRIP载体的性质/剂量分配

[0520] 2.5 SIVmac251攻击

[0521] 免疫接种的及首次实验的猕猴(总共12个猕猴)在加强后57天(即初免后136天)用单剂量在1ml中的500AID50(足以感染50%动物的动物感染剂量)的病原性SIVmac251(原液来自A.M.AUBERTIN,Universite Louis Pasteur, Strasbourg,France,由ANRS经销,或得自NIH的等价原液)直肠内攻击。动物用10-20mg/kg氯胺酮(Imalgen,Rhone-Merieux)麻醉,整个程序根据EU regulations and guidelines of Animal Care and Use进行。接种后猕猴单独饲养,预防措施符合Level 3生物安全性动物房。

[0522] 2.6 IFN-γ ELISPOT

[0523] 动物用10-20mg/kg氯胺酮(Imalgen,Rhone-Merieux)麻醉采血。每个猕猴收集8ml

血液于具有柠檬酸钠的细胞制备试管(BD Vacutainer ™CPT™) 中,用于PBMC和柠檬酸血浆收集,及3ml于血清分离试管(**Vacuette®**)中,用于血清收集。离心后(**Vacuette®**试管为10分钟,2500rpm,CPT™为30 分钟,3000rpm,无刹车),用3-5ml 1X裂解缓冲液(**Iotest®**10X裂解缓冲液, Beckman-Coulter)裂解红细胞,经10分钟1600rpm离心沉淀PBMC,然后在Kova's chamber**Hycor®**中计数,分配于96孔ELISPOT平板中,一式三份,2.10^5细胞/孔,如果可获得足够细胞。

[0524] 具有**Immobilon®**-P(Polyvinylidene Fluoride,PVFD)膜(MultiScreen HTS Assay System,MSIP;Millipore)的96孔板预湿润(乙醇35%)并用捕获抗体(小鼠IgG1抗人-猴-IFN-γ单克隆抗体GZ-4纯化的(Mabtech),10μg/ml最终于 PBS中;50μL每孔)在4℃包被过夜。平板在Dulbecco's PBS 1X中洗涤4 次,用完全RPMI封闭。

[0525] 细胞通过加入一个集合的肽(2μg/ml每种肽)、AT-2灭活的 SIVmac251(5μg/ml总病毒蛋白)或作为阳性对照的PMA-iono(0.1μM PMA 和1μM ionomycin)而刺激(4000细胞/孔),或用DMSO/RPMI模拟刺激。

[0526] 40小时后,斑点如下揭示:应用生物素缀合抗体(小鼠IgG1抗人-猴 -IFN-γ单克隆抗体7-B6-1纯化的(Mabtech);1μg/ml最终于PBS 0.5%FCS 中;100μL每孔,37℃2小时),随后链霉抗生物素蛋白-AP(1h,1/5000于 PBS 0.5%FCS,100μL每孔,1h,37℃)和BCIP/NBT底物溶液(Ready to use mixture,60μL每孔;15分钟,RT,黑暗中)。斑点用Bioreader 2000(Biosys, Karben,Germany)计数。结果表达为每1百万个PBMC中IFN-γ斑点形成细胞(SFC)数。产生自5%DMSO/RPMI刺激的IFN-γ SFC/百万个PBMC作为背景信号从结果中减去。

[0527] 2.7 ELISA

[0528] 用商业试剂盒(来自U-Cytech Bioscience(Utrech,Netherlands)的猴IL-6 和TNF-a ELISA试剂盒,来自PBL Biomedial Laboratories(New Jersey,United States)的人INF-α试剂盒)经ELISA进行先天细胞因子(IL6;TNF-α和 IFN-α)的定量。初免注射前40天、初免注射后1小时、6小时、24小时和 7天测试每个动物的血浆。

[0529] 2.8.体外血清中和测定

[0530] P4细胞在转导前24小时以1.10^5/孔接种于96孔平板的完全培养基中。转染当天,用与不同稀释度的血浆预保温的TRIP-GFP(用Indiana血清型 VSV-G或用Indiana非交叉反应VSV-G如New Jersey VSV-G假型包装)培养细胞。细胞用相同体积的完全培养基模拟转导。转导后72小时,转导效率通过用FACScalibur(BD)经流式细胞术分析GFP荧光而评估。

[0531] 2.9病毒负荷确定

[0532] 简而言之,病毒RNA用Roche的高纯病毒RNA试剂盒分离自柠檬酸- 血浆(总共200μL)。在50μL洗脱缓冲液(无核酸酶,无菌,双蒸水)中进行洗脱。分离自血浆的SIV-RNA数用来自Invitrogen的Platinium qRT-PCR在定量单步骤RT-PCR中确定。反应一式二份在来自Abgene(AB1100)的96孔板中在Mastercycler ep realplex(Eppendorf)中进行,终体积为25μL(10μL RNA提取物和15μL Mix)。选择Taqman定量法,使用含有分别位于5'和 3'的Fam和Tamra荧光团的内部探针(500nM最终)。引物(450nM最终)分别在SIVmac251 GAG mRNA基因组的位置389和456(表B)。

[0533] 最初存在的病毒RNA拷贝的数量通过外推阈值荧光到内部标准曲线上而评估,所述标准曲线从先前通过"分支DNA"技术滴定的病毒原液 SIVmac251的在dH_2O中的系列稀释

液制备。作为PCR的阳性对照，使用 TRIP-SIVmac239Gag载体质粒(10^4拷贝/μL)。

[0534]

名称	序列 5'→3'	大小
引物正向：SIVmac389F	GCAGAGGAGGAAATTACCCAGTAC	24bp
引物反向：SIVmac456R	CAATTTTACCCAGGCATTTAATGTT	25bp
Taqman 探针：SIVmac TM	Fam-TGTCCACCTGCCATTAAGCCCGA-Tamra	23bp

[0535]

循环步骤及数目		温度	时间
1 个循环	1：逆转录(1 个循环)	46℃	30 分钟
	2：酶活化	95℃	4 分钟
50 个循环	3：步骤 1, PCR 变性	95℃	15 秒

[0536]

	3：步骤 2，PCR 退火及延伸	60℃	1 分钟
1 个循环	4：冷却	20℃	保持

[0537] 表B：用于血浆病毒负荷确定的引物和探针序列及Taqman RT-PCR程序

[0538] 结果：慢病毒载体初免-加强免疫在猕猴中赋予抗大量SIVmac 251攻击的强保护作用

[0539] 许多研究表明了$CD8^+$T细胞在控制HIV感染中所起的关键作用，并提示有效疫苗应该诱导强力的广泛的持久的$CD8^+$T细胞应答。但是，显示引起特异性SIV CD8+T细胞应答的几种病毒载体随后未能控制SIV/猕猴模型中的病毒血症(Schoenly,K.A.&Weiner,2007)。因为我们和其它人证实慢病毒载体非常强力诱导细胞免疫(综述见He,Y.&Falo,L.D.,2007,Breckpot,K, Aerts,J.L.&Thielemans,K.,2007)，我们评估了它们是否能赋予抗SIV感染和猴AIDS的保护性细胞免疫。我们选择了猕猴的SIVmac251感染模型，其显示类似于人类中HIV-1感染所见的病毒载荷水平和各种进展速率 (Karlsson,I.et al,2007 and Reimann,K.A.,et al,2005)。

[0540] 6只猕猴皮下注射HIV-1衍生的慢病毒载体2次而免疫，所述载体编码天然序列的非分泌型SIVmae239 GAG蛋白(TRIP-SIVmac239 GAG)。这一单个和非优化抗原被选择用于显示用于免疫的慢病毒载体系统的潜力。为了克服中和性抗载体抗体的存在，及因此允许有效的加强作用，设计了包膜交换策略。事实上在小鼠中的准备实验已经显示用来自两个非交叉反应性血清型Indiana随后New Jersey的VSV-G假型包装的TRIP-SIVmac239 GAG颗粒的初免-加强方案比同源初免-加强更有效。免疫组和实验设计总结在表1中。

[0541] 单次注射慢病毒载体在每个免疫动物中足以诱导强细胞免疫，无论接受的剂量如何(图28a)并且不刺激系统性炎症(图28(2))。SIVmac239 GAG 特异性T细胞应答在初免后16天达到峰值，达到IFN-γ分泌细胞的高频率 (直至3000个IFN-γ SFC/百万个PBMC)，在免疫后2个月回到免疫前水平(图28(1)a和28(1)b)。除了强初始免疫之外，还发现它们是广泛的，覆盖几个肽集合(图32(2)a和表2a)。在我们的远交群组中，我们观测到SIVmae239 GAG特异性IFN-γ应答优势抗GAG的C末端区域内覆盖p27CA和p9 NC 部分的两个集合。所有6个疫苗均引起抗集合SIVmac239 GAG:337-395的强应答，6个中有4个抗集合SIVmac239 GAG:385-443。

[0542] 动物还产生了抗VSV血清型Indiana的中和性体液应答(图31(2)a),但是重要地,来自免疫动物的血清不中和用VSV-G New Jersey体外假型包装的载体(图31(2)b)。因此猕猴随后在初免后11周用中剂量的用VSV-G New Jersey假型包装的TRIP-SIVmac239 GAG颗粒注射。SIVmac239GAG(15-mers)Peptides-Complete Set通过AIDS Research and Reference Reagent Program,Division of AIDS,NIAID,NIH获得。

[0543] SIVmac239 GAG特异性T细胞应答有效地由第二次注射再刺激(图28(1)a)。应答幅度增加,具有次级应答典型的动力学,即更快的发生及更长的持续。IFN-γ分泌细胞早在第二次免疫后1周即检测到并直至2个月或更长。细胞应答的宽度未改善(图30(2)b或表2b)。为更紧密模拟发生在感染细胞中用于抗原呈递的但是被肽脉冲绕过的加工和运输步骤,AT-2灭活的SIVmac251也用作抗原。弱的(猕猴20089)至强的(猕猴20022、20195和 20056)应答被观测到(图30(2)d)。加强后10周进行的细胞内染色表明CD4+ 和CD8+T细胞均对应答肽集合的IFN-γ产生有贡献(数据未示出)。

[0544] 鉴于疫苗诱导的强和广泛的细胞免疫应答,我们测试了其抗SIV感染的保护功效。猕猴在加强后11周用直肠内接种高剂量 SIVmac251(500AID_{50})(表1)而攻击。在攻击稍后(1周内)在免疫动物的外周血中观测到大量回忆性SIV GAG特异性应答,与未免疫和对照动物相反。这些应答更早达到峰值且更强烈(大于4000 SIV GAG特异性INF-γ SFC/百万PBMC)(图28)。与未免疫和对照(TRIP GFP)动物相比,在免疫动物中在原发感染期间也记录了总的原初和中枢记忆$CD8^+$T细胞的更早和更高的反弹(图32(2))。免疫后定位的GAG区被攻击回忆,新的免疫原性区域也在感染后检测到。GAG特异性应答的多样性在免疫和未免疫或对照动物之间相当(图30(2)c和表2c)。

[0545] 尽管病毒攻击导致所有动物感染,但是免疫赋予抗病毒复制的强保护作用及在急性期中枢记忆$CD4^+$T细胞的耗竭。TRIP GFP注射的对照动物具有与未免疫猕猴非常相当的感染进程,因此作为单组集合。在这些首次实验对照动物中,病毒复制峰值很高,平均为1.02 10^7RNA拷贝/ml。病毒负荷然后在所有6个未接种和对照动物中下降到低至中度调定点(set-point)血浆病毒RNA水(第70-154天),平均为3.44 10^5RNA拷贝/ml(图29(1)a和 29(1)c)。相反,在所有6个免疫动物原发感染的高峰的病毒血症低于首次实验和对照动物至少两个数量级幅度,平均为9.25 10^4RNA拷贝/ml(图29(1)b和29(1)c)。从6个免疫的猕猴,4个抑制病毒血症高峰大于2 log10 倍(20022,20293,20158),2个抑制大于3 log10倍(20293和20158),1个抑制大于4 log10倍(20195)(图29(1)e)。分辨病毒血症高峰后,病毒负荷下降并持久保持在低于未免疫和对照动物的大约10倍,在感染后第49天统计学更低(图29(1)c)。当比较感染头154天期间的累积复制(表示为作为时间函数的病毒负荷曲线下面积)时,免疫提供的益处是统计学显著的(图29(1)f)。

[0546] 我们还监测了$CD4^+$T细胞在感染进程期间在外周血中的进化,更特别是中枢记忆(CM)$CD4^+$T细胞,因为它们的耗竭与血浆病毒负荷相关 (Karlsson,I.et al,2007),它们在急性和慢性SIV感染期间的保持预测免疫猴的长期存活,好于调定点病毒负荷水平(Mattapallil,J.J.et al,2006and Letvin, N.L.,et al,2006)。

[0547] 在急性感染期间,在未免疫和对照动物的外周血中的CM $CD4^+$T细胞快速极度下降(图30a)。CM $CD4^+$T细胞计数保持很低,它们中的3个有逐渐耗竭的迹象(21544,14184和20456),而对于其它3个耗竭是瞬时的随后回到基线(15661,15885和14468)。这两个亚组相

应地进一步证实中等和低急性期后病毒血症并因此被分类为进展者14184-21544-20456)和非进展者动物(15661-15885-14468)。

[0548] 相反,免疫接种动物显示在病毒血症高峰完全保持或仅低耗竭它们的 CM $CD4^+$T细胞并且全部快速恢复它们的CM $CD4^+$T淋巴细胞,除了猕猴 20089(图30(1)b和30(1)c)。

[0549] 所有首次实验和对照动物均经历在原发感染高峰时的极度CM $CD4^+$T 细胞丧失及高病毒血症,但是其中半数快速恢复它们的CM $CD4^+$T细胞区室,相反其余半数显示缓慢的CM $CD4^+$T细胞数下降。这两个亚组相应地证实低和中等急性期后病毒血症并因此被分类为非进展者 (15661-15885-14468)和进展者动物(14184-21544-20456)。重要地,晚期时间点的免疫接种动物的病毒血症当与进展者未免疫接种动物相比时降低大约 2 log10倍,而急性期后病毒血症和CM $CD4^+$T细胞计数在疫苗和非进展者未免疫接种动物之间是相似的(图29d和30d)。

[0550] 尽管由于一些ELISPOT孔的饱和导致细胞应答评估过低,但是发现了疫苗诱导的免疫应答和病毒负荷之间的相关性(图29(2))。重要地,在高峰病毒血症水平与在初免后2周、加强后1周和根据后1周测量的GAG特异性IFN-应答之间有倒相关(图32a、32b和32c)。这些发现与显示HIV61 GAG 特异性CD8+T细胞与低病毒负荷及缓慢疾病进程之间的相关的大群组 HIV-1感染患者中的研究(Kiepiela,P.et al,2007)非常符合。我们还观测到急性感染期间CM $CD4^+$T细胞保持和病毒负荷之间的强相关(图32d)。

[0551] 总之,这个研究提供了证据表明基于慢病毒载体的初免/加强免疫方案在猕猴中引起强的广泛的细胞免疫并通过降低病毒血症和完全防止在原发感染高峰时CD4+T细胞和CM CD4+T细胞的丧失而赋予抗大量SIVmac251 感染的有效保护。

[0552] 长期跟踪会告诉在这一猕猴群组中是否会发生病毒逃避免疫压力。在5 个月跟踪后,$CD4^+$T细胞数的稳定性及在免疫接种动物中病毒负荷降低倾向赞成长期控制。在尽管有限的猕猴群组中的这一第一次临床前试验是非常令人鼓舞的,因为保护仅依赖于抗非优化GAG抗原的应答。我们预期通过增加抗原表达控制复制及通过密码子优化控制免疫原性(Deml,L.et al, 2001 and zur Megede,J.et al,2000),及通过融合其它SIV抗原及GAG增加细胞应答多样性(Wilson,N.A.et al,2006 and Hel,Z.et al,2006)。在这一方面,本文后面提供一些在小鼠模型上的结果,完全实现功效和安全性需要的这一免疫策略的优化版本之后会进入人类治疗性免疫临床试验。

[0553]

表 1：免疫组及实验设计

组	疫苗	亚组	动物#	初免 用 VSV-G Indiana 假型包装的颗粒 第 0 天	加强 用 VSV-G New Jersey 假型包装的颗粒 初免后第 79 天	攻击 加强后第 76 天
接种的 n=6	TRIP-SIVmac239 GAG	低剂量 中剂量 高剂量	20022，20089 20293，20056 20195，20158	2.5 107TU 1 108TU 2.5 108TU	 1.2 108TU	500 AID50 SIVmac251
对照 n=2	TRIP-GFP		21544，20456	6863ng p24	6018ng p24	500 AID50 SIVmac251
未接种的 n=4	无		15661，14184 15885，14468	无	无	500 AID50 SIVmac251

[0554] 表2疫苗诱导的T细胞应答是广泛的

来自印度洋毛里求斯岛的 12 个远交雄性成年猕猴(*Macaca fascicularis*)包括在临床前试验中。在包括在研究中之前它们对于 SIV、疱疹病毒 B、线状病毒、STLV-1、SRV-1、SRV-2、麻疹、肝炎 B-HbsAg 及肝炎 B-HBcAb 是阴性的。免疫、采血及攻击根据使用非人灵长类实验的 EU 指导(decret No 2001-486)进行。在第 0 天和第 79 天皮下注射用 2 种不同包膜假型包装的慢病毒颗粒进行免疫，2 种包膜是来自 2 种非交叉反应 VSV 血清型 Indiana 和 New Jersey 的糖蛋白 G。慢病毒载体颗粒剂量表示为转导单位(TU)/动物及 ng p24/动物。6 个动物用 3 剂编码非分泌型 SIVmac239 GAG 的慢病毒载体(十四烷基化缺陷的)免疫。因为在首次注射后缺乏剂量应答，所有 6 只接种动物接受第二次注射相同中等剂量的载体。2 个对照动物用编码无关抗原 GFP 的慢病毒载体在高剂量相关亚组相同 p24 剂量免疫。接种的、对照及未接种的猕猴在加强后 76 天用高剂量致病性 SIVmac251(A-M Aubertin，Universite Louis Pasteur, Strasbourg, France)经直肠内攻击，SIVmac251 表达与疫苗密切匹配的 GAG 蛋白(同源攻击)。选择高剂量病毒(500 AID_{50}，疫苗保护功效研究中通常使用 20-50 AID_{50})以限制自发对照者(controller)数目[5]。

		p17 MA 1-132			p27 CA 133-380					p9 NC and p6 381-511			
		GAG	GAG 49-	GAG	GAG:14	GAG 19	GAG:24	GAG:28	GAG 33	GAG: 38	GAG	GAG 481	
低剂量	20012	140	113	90	160	17	100	65	743	613	1190	23	3/11
中剂量	20049	158	133	[illegible]	138	0	0	1	433	185	70	68	1/11
高剂量	20293	28	542	27	180	0	10	45	388	265	37	62	2/11
	20056	100	35	102	405	77	60	15	1280	843	325	0	3/11
	20195	255	1060	32	245	28	203	95	690	543	31	24	3/11
	20058	92	150	165	297	55	47	218	900	503	128	8	2/11
		0/6	2/6	0/6	[illegible]	0/6	0/6	0/6	6/6	4/6	1/6	0/6	

Table 2b

		p17 MA 1-132			p27 CA 133-380					p9 NC and p6 381-511			
		[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	
低剂量	20012	173	153	207	132	93	123	85	623	402	1347	65	3/11
中剂量	20049	321	291	150	198	59	176	49	449	434	135	72	2/11
高剂量	20293	167	41	0	3	49	0	27	140	302	45	79	0/11
	20056	168	82	88	160	222	125	109	1275	1150	308	62	2/11
	20195	84	430	2	21	11	4	9	432	432	432	432	5/11
	20058	197	70	24	134	279	30	88	1029	909	177	46	2/11
		0/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	5/6	5/6	2/6	1/6	

Table 2c

		p17 MA 1-132			p27 CA 133-380					p9 NC and p6 381-511			
		[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	
低剂量	2002	190	85	78	82	182	103	55	850	873	1197	92	3/11
中剂量	2004	735	161	93	52	523	322	106	513	550	187	110	4/11
高剂量	2009	0	495	40	12	0	40	240	510	520	40	128	3/11
	2005	60	0	4	270	0	117	33	602	788	530	9	3/11
	2019	99	34	0	16	0	3	172	58	14	60	62	0/11
	2025	142	135	4	447	65	58	192	586	658	633	178	4/11
对照	2154	147	178	142	647	70	118	147	513	807	198	192	3/11
	3049	13	252	18	205	105	119	272	217	152	123	59	0/11
原初	15861	288	911	408	228	0	513	161	906	893	503	102	6/11
	14184	170	173	78	268	33	88	403	312	288	137	292	1/11
	15885	148	136	159	251	188	598	326	491	331	229	12	2/11
	14468	0	46	122	72	29	0	153	37	320	1033	92	1/11
		1/12	2/12	1/12	2/12	1/12	2/12	1/12	8/12	7/12	5/12	0/12	

[0555]

[0556]　由GAG编码的蛋白质(基质MA、衣壳CA、核衣壳NC和p6)的多样性及对疫苗诱导的、病毒诱导的和病毒回忆的GAG特异性细胞应答的贡献经IFN-γ ELISPOT测定研究，测定在初始应答高峰(初免后2周，补充表1a)，加强后1周(补充表1b)和感染急性期期间(攻击后3周，补充表1c)进行，使用表的第2行所示的11个肽集合。头2列示出动物标识符。数字相应于IFN-γ SFC/百万个PBMC。下划线表示饱和的ELISPOT孔。浅灰色方框相应于阳性应答(>375 IFN-g SFC/百万个PBMC)，深灰色方框代表在个体动物中的最强应答。最右栏显示由每种动物识别的肽集合数，而最底一行代表产生抗每个肽集合的应答的群组动物数。

[0557]　在用编码GAG抗原或所述抗原的密码子优化形式的慢病毒载体免疫的小鼠中获得的免疫应答的比较

[0558]　1.编码抗原的多核苷酸的密码子优化改善CTL应答

[0559]　首次实验小鼠(n=3/组)用各种剂量的TRIP.NI gag delta myr或编码密码子优化形式的gag delta myr的TRIP.NI LV(TRIP.NI gag Δmyr CO)经腹膜内单次注射免疫。免疫后10天，经四聚体染色(A)或IFN-γ ELISPOT(B)评估抗免疫显性gag CD8+T细胞表位的gag特异性细胞免疫应答(图33)。SFC 斑点形成细胞(C)IFN-γ ELISPOT测定应答CD8+T细胞优势免疫表位和gag 的CD4+T细胞表位。小鼠用100ng TRIP.N gag Δmyr LV或TRIP.NI gag Δ myr CO LV腹膜内初免。10天后，来自免疫小鼠的脾细胞用相应的肽刺激并经ELISPOT测定分析。在绘图前减去背景频率。误差杆代表每组3个小鼠的SD。(D)由TRIP.NI gag Δmyr LV和TRIP.NI gag Δmyr CO LV免疫诱导的gag特异性裂解活性的比较。在免疫后10天用20小时体内CTRL测定测量CTL活性，如材料和方法中所述，平均值+/-SD三个小鼠被示出。

[0560]　所获得的结果显示密码子优化关键性改善了由基于TRIP.NI LV的疫苗诱导的CTL应答。

[0561] 2.编码优化抗原的慢病毒载体颗粒甚至在单次注射后也诱导强的可持续的细胞免疫应答

[0562] 获得的结果显示密码子优化关键地改善了由基于TRIP.NI LV的疫苗诱导的CTL应答。

[0563] 在单次注射TRIP.NI gag Δmyr或TRIP.NI gag Δmyr CO颗粒后，在小鼠中测定由非整合慢病毒载体诱导的记忆T细胞应答。图34显示编码密码子优化抗原的慢病毒载体颗粒甚至在单次注射后也诱导强的可持续的细胞免疫应答。

[0564] 3.基于用来自非交叉反应性VSV血清型的糖蛋白G假型包装的 TRIP.NI gag Δmyr CO颗粒的初免-加强策略增强细胞免疫应答

[0565] 用VSV-G Indiana假型包装的TRIP.NI GAG Δmyr CO或TRIP.I GAG 野生型颗粒免疫小鼠，13周后分别用VSV-G New Jersey假型包装的TRIP.NI GAG Δmyr CO或TRIP.I GAG 野生型颗粒加强。初免-加强方案的对照组包括用VSV-G Indiana假型包装的TRIP颗粒(灰色图)或用VSV-G New Jersey 假型包装的TRIP颗粒(蓝色图)注射1次。所有小鼠在免疫后10天牺牲，用IFN-γ ELISPOT(A)或四聚体染色(B)评估抗GAG细胞免疫应答(图35)。获得的结果显示基于慢病毒的颗粒的密码子优化增强初免-增强疫苗方案。

[0566] 在小鼠上获得的数据显示慢病毒载体颗粒中编码抗原的多核苷酸的密码子优化提供了在单次注射后或初免-增强注射后细胞免疫应答水平特别是宿主中CTL应答的改善。另外，获得的应答是强的和可持续的。

[0567] 在通过不同途径免疫小鼠中获得的免疫应答的比较

[0568] 几组两种不同类型小鼠用编码SIVmac239Gag Δ的慢病毒载体颗粒免疫。在单次注射颗粒后10天在每组中分析引起的免疫应答，所述单次注射肌肉内(i.m.)、皮内(i.d.)、腹膜内(i.p.)、皮下(s.c.)或透皮(t.c.i.)进行。

[0569] 特别地所述应答在体内细胞毒性测定(图36-38)或IFNgamma ELISPOT 中分析。

[0570] 在肌肉内途径进行的注射的小鼠组(C57BI/6j)中，引起比其它途径注射更强的应答。

[0571] 用于当在疫苗方案中保护给予时引起免疫应答的非整合慢病毒载体

[0572] 材料和方法

[0573] 细胞培养及病毒制备

[0574] HeLa细胞(ATCC CCL-2)、人293T细胞和非洲绿猴肾Vero细胞(ATCC CCL-81)在补加10%(HeLa细胞、293T细胞)或5%(Vero细胞)热灭活胎牛血清(FCS)、青霉素、氯霉素和Glutamax的Dulbecco修饰的Eagle培养基 (DMEM)(GIBCO)中培养。西尼罗病毒(WNV)毒株IS-98-ST 1(GenBank登录号AF 481 864)，其是NY99毒株[10]的一种密切相关变体，在蚊子Aedes pseudoscutellaris AP61细胞单层中增殖。在蔗糖梯度中纯化及用抗WNV超免疫小鼠腹水(HMAF)经转化灶免疫检测测定(FIA)在AP61细胞(Aedes pseudoscutellaris细胞)上进行病毒滴定如前所述进行。感染性效价以转化灶形成单位(FFU)表示。

[0575] 慢病毒载体产生

[0576] 如先前所述构建$TRIP_{sEWNV}$(图12)和$TRIP_{GFP}$载体质粒(Iglesias et al.J. Gene Med.2006 Mar;8(3):265-74)。这两个载体的寡核苷酸序列分别在图4 和图5显示。载体颗粒通过用载体质粒$pTRIP_{sEWNV}$或$pTRIP_{GFP}$、一种VSV-G 包膜表达质粒(pHCMV-G)和包壳质粒

(p8.74或pD64V,分别用于产生整合 proficient或整合缺陷载体)如前所述瞬时磷酸钙共转染293T细胞而产生。浓缩载体颗粒的p24抗原含量的定量用市售HIV-1 p24酶联免疫吸附测定 (ELISA)试剂盒(Perkin Elemer Life Sciences)进行。TRIP.I和TRIP.NI颗粒的载体效价通过转导用蚜栖菌素处理的HeLa细胞并如Iglesias et al.(J.Gene Med.2006 Mar;8(3):265-74)所述进行定量PCR而确定。整合和非整合慢病毒载体的效价根据p24含量及在生长停滞细胞中测量的定量PCR是相似的。

[0577] 骨髓衍生DC的制备

[0578] 骨髓细胞通过用补加10%FCS的RPMI冲洗小鼠股骨和胫骨而分离。细胞然后通过45μm细胞过滤器,离心及重悬于**IOTest®**3裂解溶液(红细胞裂解溶液,氯化铵、碳酸氢钾和乙二胺四乙酸(EDTA)的混合物;Beckman Coulter)中,在4℃保温5分钟以裂解红细胞。离心细胞,在培养基中以$1x10^6$细胞/ml培养8天,所述培养基由具有10%FCS、L-谷氨酰胺、青霉素、氯霉素、1mM丙酮酸钠、10mM HEPES和50μM 2-巯基乙醇的RPMI并补加100ng/ml重组小鼠FLT3配体(R&D Systems)组成。

[0579] 转导实验及流式细胞术分析

[0580] 为在非分裂细胞上进行转导实验,将HeLa细胞在8μM蚜栖菌素 (Sigma)存在下以40000个细胞/孔接种在48孔板中。在蚜栖菌素阻断后24 小时,细胞用浓度范围为1-100ng/ml的慢病毒载体转导,蚜栖菌素在转导时补充在培养基中。转导后2天,收获细胞,经流式细胞术分析eGFP表达。

[0581] 对于DC转导实验,在分化第6天,将500000个FLT3L产生的骨髓衍生的DC(FL-DC)用浓度范围为50-300ng/ml的慢病毒载体转导。转导后2 天,收获FL-DC并重悬于具有2%FCS及0.01%叠氮化钠的PBS(染色缓冲液)中。细胞用APC(allophycocyanine)缀合的抗CD11c抗体和 PerCP(Peridinin叶绿素蛋白)缀合的抗B220抗体染色,洗涤2次,在 FACSCalibur(BD Biosciences,Franklin Lakes,NJ)上经流式细胞术分析。

[0582] 小鼠免疫

[0583] 所有动物实验均符合巴斯德研究所Office Laboratory of Animal Care的指导。6周龄C57/BI6小鼠用在0.1ml补加缓冲的0.2%牛血清白蛋白的 Dulbecco磷酸盐缓冲液盐水(DPBS;pH7.5)(DPBS/0.2%BSA,Sigma)中的各种剂量的TRIP/sE WNV载体颗粒(从1到100ng/ml)腹膜内(i.p.)接种。

[0584] 测量血清抗体应答

[0585] 小鼠经眶骨膜途径放血,血清样品在56℃热灭活30分钟。经ELISA 检测抗WNV抗体,使用用蔗糖纯化的WNV IS-98-ST1包被的微滴定板。过氧化物酶山羊抗小鼠免疫球蛋白(H+L)(Jackson Immuno Research)以 1:4000稀释度用作第二抗体。终点效价计算为引起来自非免疫小鼠的血清的光密度(OD)的两倍的最后稀释度的倒数。

[0586] WNV攻击

[0587] 在慢病毒载体免疫后一周或两个月,如前所述通过i.p.接种神经毒性WNV毒株IS-98-ST1(i.p.LD50=10FFU)进行WNV攻击。攻击的小鼠每日监测发病率或死亡率迹象,直至WNV毒株接种后21天。

[0588] 结果

[0589] 用整合缺陷的TRIP载体转导非分裂细胞导致高转基因表达水平

[0590] 为了测试整合缺陷性LV(TRIP.NI载体)可以是输送抗原(Ag)至非分裂 APC如DC的有效工具的假设,我们最初评估了它们转导生长停滞细胞的效率。为此目的,用细胞周期特异性抑制剂蚜栖菌素处理的HeLa细胞被暴露于梯度剂量的编码eGFP的TRIP.NI或TRIP.I颗粒。转导效率然后经流式细胞术确定。如图43(上组)所示,TRIP.NI载体以高效率和剂量依赖方式转导非分裂细胞。另外,eGFP阳性细胞百分比分析揭示TRIP.NI载体与 TRIP.I载体相比转导能力的边际差异。用TRIP.NI颗粒转导也产生高水平转基因表达(图43,下组),尽管比TRIP.I转导的细胞显著低2倍。

[0591] TRIP非整合慢病毒载体转导导致在常规和浆细胞样树突细胞中的有效抗原表达

[0592] 我们接下来研究了TRIP.NI载体转导DC的能力。DC被分类为常规 (cDC)($CD11c^+B220^-$)和浆细胞样(pDC)($CD11c^+B220^+$),这两个DC亚型均能刺激Ag特异性免疫应答。我们然后研究了在Flt3L存在下分化的骨髓衍生 DC(FL-DC)的转导,其允许产生大量pDC和cDC。FL-DC暴露于梯度剂量的$TRIP.NI_{GFP}$或$TRIP.I_{GFP}$颗粒。如图44A所示,TRIP.I及TRIP.NI载体均能够诱导转导FL-DC,最大转导效率分别为60%及56%。令人感兴趣地,我们观测到用TRIP.I颗粒转导导致小比例表达高水平eGFP的DC,而用 TRIP.NI进行的转导实验不这样(见斑点印迹右上角中的斑点的存在,在细胞已用本发明慢病毒载体转导的实验中,与HI载体相比)。为了排除由污染载体原液的残余eGFP蛋白赋予的假转导的可能性,我们还评估了在暴露于热处理前提供的颗粒后转导的DC的百分比,热处理已表明废除了LV 在不同细胞类型上的转导能力。如预期,热处理显著降低了eGFP阳性细胞百分比(图2A)。

[0593] 我们接下来在$CD11c^+B220^+$树突细胞和$CD11c^+B220^-$树突细胞上门控 (gated)以评估LV转导每种DC亚集的能力。如图44B所示,不仅FL衍生的cDC而且FL-衍生的pDC也能有效用LV转导,无论它们整合如何。

[0594] 用TRIP.NI颗粒的转导效率是剂量依赖性的,比用TRIP.I颗粒获得的效率稍低但不显著低。令人感兴趣地,我们观测到用TRIP.I载体转导导致小比例表达高水平转基因的DC,而暴露DC于TRIP.NI载体不这样(图 44A)。这一细胞群仅在用TRIP.I载体进行的转导实验中观测到,可能是多载体整合或者载体整合进这个基因组的活性转录区的结果。

[0595] TRIP非整合慢病毒载体诱导产生Ag特异性抗体

[0596] 考虑TRIP.NI能有效输送外来基因至DC,我们进行了探索了它们引起特异性免疫应答的能力。在最近的研究中,我们设计了编码分泌形式的 WNY包膜(TRIP.I E_{WNY})的TRIP.I载体,所述包膜具有中和表位,我们证实了TRIP.I E_{WNY}在WNV感染小鼠模型中可以刺激基于抗体的保护免疫。为研究TRIP.NI载体引起B细胞应答的能力,用各种剂量的TRIP.NI E_{WNY}颗粒免疫动物,所述剂量范围为每个小鼠1-100ng p24抗原。作为对照,小鼠用100ng加热灭活(HI)除去转导能力的TRIP.NI E_{WNY}颗粒接种。免疫后3 周,小鼠眶骨膜放血,个体或合并的血清经ELISA测试抗WNY总抗体。如预期,用热灭活TRIP.NI E_{WNY}载体免疫未产生抗体(图45A)。相比之下,用低至10ng剂量的TRIP.NI E_{WNY}载体免疫的小鼠也显示可检测水平的抗 WNY抗体,用100ng sE-NILV免疫诱导了大量抗WNY Ig的分泌,平均效价达到$8x10^4$。

[0597] 我们接下来比较了由TRIP.NI E_{WNY}和TRIP.I E_{WNY}载体引起的免疫应答的强度。如图45B所示,用低至3ng颗粒的剂量的TRIP.I E_{WNY}免疫产生非常高的抗WNY抗体的分泌,效价在3-100ng免疫剂量范围相对恒定,没有明显剂量应答。相比之下并且与所有预期相反,来自用TRIP.NI E_{WNY}载体免疫的小鼠的血清中的效价与注射的颗粒剂量成比例。尽管在低于

30ng的剂量TRIP.I载体比TRIP.NI载体引起更高的免疫应答，但是用100ng每种载体免疫导致等价应答。

[0598] 总之，这些结果证实用TRIP.NI载体单次免疫足以引起体液特异性免疫应答，强度与用TRIP.I载体获得的相当，高于颗粒阈值剂量。令人感兴趣地及令人惊奇地，使用非整合载体能够获得强度依赖于注射的慢病毒载体的剂量的免疫应答。

[0599] 用单剂TRIP.NisEwnv免疫小鼠给出下列抗体效价：

[0600]

剂量	WNV特异性抗体效价(O.D.)
HI NI 100	0
NI 1	0
NI 3	0
NI 10	152
NI 30	569
NI 100	83000

[0601] 如图45A所示，获得了特异性WNV抗体的强分泌，在100ng p24抗原剂量平均效价达到$8x10^4$。在这个剂量，用TRIP.NI免疫导致用TRIP.I 获得的等价的应答。但是剂量-应答实验揭示与TRIP.NI颗粒相比用TRIP.I 颗粒诱导B细胞应答所需的最小剂量更低。这个结果的一个可能解释可能与TRIP.I载体产生Ag高表达DC的能力相关，因为理论上Ag在DC中的高表达水平可以有利于抗原肽的更长久的呈递，因此可以解释为什么低剂量TRIP.I颗粒足以引起特异性免疫应答。这个假设也可解释在用TRIP.I载体进行的剂量-应答免疫实验中观测到的WNV抗体产生的非线性(图45B)。事实上，在DC上进行的体外剂量应答实验揭示了Ag高表达DC的出现看起来不与TRIP.I颗粒的剂量相关(图44A)。因此，产生Ag高表达DC的能力可帮助解释用低剂量注射颗粒在TRIP.I和TRIP.NI之间观测到的差异。另一个可能性是与如下实施相关，VSV-G假型包装的LV具有大的细胞嗜性，因此可在注射部位转导非DC的其它细胞类型，包括分裂细胞。这可导致在用TRIP.I颗粒进行的免疫实验中更持久的Ag表达。在体内注射LV 后哪些细胞类型被转导及它们参与TRIP.I和TRIP.NI载体引起的免疫应答的幅度的程度是正在进行的研究的课题。

[0602] 用TRIP.NI E_{WNV}载体免疫赋予抗WNV攻击的早期保护

[0603] 我们先前显示TRIP.I E_{WNV}赋予抗WNY攻击的保护免疫。为确定由 TRIP.NI载体引起的免疫应答是否也可以导致快速保护，小鼠用100ng TRIP.NI E_{WNV}颗粒免疫并在7天后用10000FFU的高毒力WNY毒株IS-98-ST1(杀死50%感染动物所需剂量的1000倍)攻击。我们在这个攻击实验中还包括一组用100ng TRIP.I E_{WNV}免疫的小鼠作为保护的阳性对照及另一组用D-PBS接种的小鼠用作阴性对照。如预期，接受D-PBS的所有小鼠均在攻击后12天内死亡(图46)。相反，用单剂TRIP.NI E_{WNV}免疫的小鼠被保护免受攻击，与用TRIP.I E_{WNV}免疫的小鼠一样。

[0604] 被保护免于WNY攻击的小鼠在3周攻击后观察期不出现临床疾病迹象。这些结果证实用单次给予整合缺陷的TRIP.E_{WNV}实现了抗WNY的早期保护免疫。

[0605] TRIP.NI E_{WNV}诱导持久保护

[0606] 如早些时候证实，用TRIP.I E_{WNV}免疫小鼠导致建立抗WNV攻击的长期保护免疫。为

评估由TRIP.I E_{WNV}引起的保护免疫的持续时间，以及诱导长期保护所需的颗粒最小剂量，用不同量的颗粒免疫小鼠(1、3、10、30和 100ng p24抗原)并在免疫后2个月等待期之后攻击。如图47A所示，在给予的TRIP.I E_{WNV}颗粒剂量与保护程度之间有剂量依赖关系，在100ng注射疫苗颗粒剂量实现完全保护。

[0607] 因此，TRIP.I E_{WNV}载体诱导抗WNV感染的持久免疫。

[0608] 讨论

[0609] 本实验的重要结果是证实用TRIP.NI颗粒接种可以提供有效的强免疫应答，其是早期及长期持续的免疫应答，并且是进一步抗原剂量依赖性的，即使不存在给予的慢病毒基因组的整合。因此，证实了抗致死剂量WNV 攻击的完全保护。

[0610] 如所预期，记忆保护免疫直接与由TRIP.NI颗粒诱导的抗WNV抗体效价相关(图45和图47)。事实上，熟知体液免疫是建立抗WNV完全保护免疫的关键成分，因为特异性抗体限制感染的传播。令人感兴趣地，热灭活的TRIP.NI颗粒及HI-TRIP.I颗粒能够赋予抗WNV攻击的部分保护 (30%)(数据未示出)，尽管在注射HI-TRIP颗粒3周后动物血清中未检测到WNV抗体(图45A,B)。这提示细胞免疫也可以在建立抗WNV保护中起部分作用。与这一假设相符，缺乏$CD8^+$细胞的小鼠在WNV感染后死亡率增加(Shoresta and Diamonds，未公开数据)。另外，细胞毒性T细胞表位已在几种黄病毒包膜的结构域III中被限定。需要另外的工作以澄清CTL应答对由TRIP.NI及TRIP.I疫苗赋予的长期保护的相对贡献。另外，还需要进一步研究以限定允许HI-TRIP颗粒进入DC的分子学机制，因为热处理变性VSV-G包膜并已示出废除了LV在不同细胞系中的转导能力。但是尝试推测，关于DC的优异的内化能力，一部分HI TRIP颗粒可以通过VSV-G 不依赖性机制掺入DC中，使得低的但足够的Ag表达，从而接受由HI-TRIP 颗粒赋予的部分保护。

[0611] 对接种小鼠的动力学攻击实验揭示TRIP.NI疫苗不仅赋予长期保护免疫而且早在单次注射颗粒后一周就引起保护。尽管这一早期保护涉及的精确机制不完全了解，但是在用TRIP.NI和TRIP.I颗粒免疫后一周我们检测了特异性WNV抗体。我们先前示出这一早期抗体波仅由特异性IgM组成，衍生自注射后4天的小鼠，完全保护小鼠抗WNV感染。

[0612] 在我们的研究中，基于直接注射单剂TRIP.NI颗粒的免疫方案引起强的、快速的长期特异性免疫应答，实现抗WNV的完全保护。因此，基于 TRIP.NI的疫苗策略代表了安全有效平台，用于开发抗病原体如黄病毒的需要B细胞免疫的疫苗。

[0613] 密码子优化使得改善非整合载体的细胞免疫应答，进一步改善用初免-加强方案获得

[0614] 材料和方法

[0615] gag p27的细胞内染色.293T细胞用含有gag Δmyr的野生型序列或密码子优化序列的TRIP载体和包壳质粒p8.7 D64V及VSV-G Indiana表达质粒共转染。48小时后，洗涤细胞并在Cytofix-Cytoperm溶液(BD Pharmingen) 中透化20分钟。用Perm Wash缓冲液(BD Pharmingen)洗涤2次后，透化细胞与在Perm Wash缓冲液中1∶3稀释的抗gagSIV p27抗体(55-2F12，AIDS Research and Reference Reagent Program)在4℃保温30分钟。洗涤细胞2次，并与在PermWash缓冲液中1∶30稀释的FITC缀合的大鼠IgG2b kappa单克隆抗体(553988，BD Biosciences)4℃保温30分钟。2次洗涤后，细胞经流式细胞术分析。

[0616] 小鼠免疫.对于初免实验，各组小鼠腹膜内接种各种剂量的用来自 VSV Indiana

血清型的糖蛋白假型包装的TRIP.NI gag Δmyr野生型或密码子优化(CO)颗粒。对于初免-加强实验，各种小鼠腹膜内接种100ng的TRIP.NI gag Δmyr密码子优化(CO)的p24或100ng的用来自VSV Indiana血清型的糖蛋白假型包装的TRIP.I gag Δmyr颗粒的p24。13周后，用TRIP.NI gag Δmyr CO颗粒初免的小鼠用100ng的用来自VSV New Jersey血清型的糖蛋白假型包装的TRIP.NI gag Δmyr CO颗粒的p24加强。平行地，用TRIP.I gag Δmyr 颗粒初免的小鼠用100ng的用来自VSV New Jersey血清型的糖蛋白假型包装的TRIP.I gag Δmyr颗粒的p24加强。

[0617] Elispot测定.硝基纤维素微滴板(MAHA S4510,Millipore)用捕获抗体 (Mouse IFNg Elispot pair,BD Pharmingen)包被并用由RPMI 1640 Glutamax 组成的完全培养基封闭，该培养基补加10%FCS、抗生素、Hepes、非必需氨基酸、b-巯基乙醇和丙酮酸钠。来自载体免疫的小鼠的脾细胞以三份重复加入平板中，$0.25x10^6$细胞/孔，并用SIVmac 293 gag肽(NIH AIDS Research and Reference Reagent Program)刺激。40小时后，用生物素缀合抗体(Mouse IFNg Elispot pair,BD Pharmingen)随后链霉抗生物素蛋白 -AP(Roche)和BCIP/NB底物溶液(Promega)揭示斑点。斑点用Bioreader 2000(Biosys,Karben,Germany)计数，结果表达为每1百万个脾细胞中IFNg 斑点形成细胞(SFC)数。

[0618] 体内细胞毒性测定.对于靶细胞制备，将来自首次实验小鼠的脾细胞用各种浓度(高，5μM；低，1μM)的CFSE(carbosyfluorescein-diacetate succinimydel ester,Vybrant CFDA-SE cell-tracer kit,Molecular Probes)标记。用高浓度CFSE标记的脾细胞用5μg/ml的肽脉冲。用低剂量CFSE染色的对照群体在无肽培养基中保温。每个小鼠经眶后静脉接受含有来自每一级分相等数目细胞的混合物的10^7CFSE标记的细胞。15-18小时后，来自脾的单细胞悬浮液经流式细胞术分析(Becton Dickinson,CellQuest software)。肽脉冲细胞的消失通过比较免疫的小鼠和首次实验小鼠的脉冲的(高CFSE 荧光强度)与未脉冲(低CFSE荧光强度)群体的比率而确定。特异杀伤百分比经下列计算建立：(1-((CFSE$_{低}$首次实验的/CFSE$_{高}$首次实验的)/(CFSE$_{低}$免疫的/CFSE$_{高}$免疫的)))*100。

[0619] 四聚体染色.来自免疫小鼠的$2x10^6$脾细胞用抗CD3-FITC(Becton Dickinson)、抗CD8-APC(Becton Dickinson)和特异于GAG$_{SIV}$免疫显性肽的PE-四聚体在室温染色5分钟。用FACSCalibur收集数据并用CellQuest分析。

[0620] 结论

[0621] 本发明提供了改善由非整合慢病毒载体诱导的细胞免疫应答的解决方案，其使用：

[0622] 1.编码抗原的转基因的密码子优化形式和/或

[0623] 2.初免-加强方案。

[0624] 1.我们证实编码gagdmyr$_{SIV}$野生型抗原的非整合慢病毒载体在诱导特异性T细胞应答方面比编码相同抗原的整合慢病毒载体强度差很多。更重要地，我们证实这一差免疫原性可以通过使用编码Gagdmyr$_{SIV}$的转基因的密码子优化形式克服。非整合慢病毒载体绝对需要密码子优化抗原诱导强T 细胞应答不能预见。这个结果是出乎意料的，因为我们证实非整合载体能有效转导非分化细胞特别是最有效的抗原呈递细胞树突细胞，整合慢病毒载体也是一样。但是，非密码子优化的转基因的表达在用非整合慢病毒载体转导的细胞中比用整合慢病毒载体转导的细胞低2倍。这个结果提示在体内，由非整合慢病毒载体诱导的

应答与由整合慢病毒载体诱导的应答相比可以低2倍，可以预见注射两次更多的非整合慢病毒载体可以给出与整合慢病毒载体获得的类似应答。这绝对不是这样，因为由非整合慢病毒载体引起的特异性T细胞应答比用整合慢病毒载体观测的低5-10倍。另外，用非整合慢病毒载体诱导特异性T细胞应答仅可以通过用高剂量注射颗粒实现(用非整合慢病毒载体诱导可定量T细胞应答所需的最小剂量比用整合慢病毒载体所需的最小剂量至少高10倍)。密码子优化(CO)克服了这一不良免疫原性。因此，在100ng剂量，携带密码子优化形式的gagdmyr$_{SIV}$的非整合慢病毒载体诱导针对抗原的记忆T细胞应答，而携带野生型形式的载体不诱导。但是，由TRIP.NI gagdmyr$_{SIV}$CO引起的应答仍然比由TRIP.I gagdmyr$_{SIV}$野生型引起的低2倍。

[0625] 2.基于TRIP.NI gagdmyr$_{SIV}$ CO的初免-加强方案引起在强度方面与基于TRIP.I gagdmyr$_{SIV}$野生型的初免-加强方案类似的应答。在初免-加强实验中，小鼠用100ng TRIP.NI gagdmyr$_{SIV}$ CO或100ng TRIP.I gagdmyr$_{SIV}$野生型免疫。慢病毒载体用VSV-G Indiana包膜假型包装。13周后，用TRIP.NI 颗粒免疫的小鼠用100ng用非交叉反应性VSV-G New Jersey包膜假型包装的TRIP.NI gagdmyr$_{SIV}$CO颗粒加强。平行地，用TRIP.I颗粒初免的小鼠用 100ng用VSV-G New Jersey包膜假型包装的TRIP.I gagdmyr$_{SIV}$野生型加强。在来自免疫小鼠的脾细胞上进行的Gagdmyr$_{SIV}$特异性免疫应答的分析(IFNg ELISPOT，四聚体染色)揭示基于TRIP.NI gagdmyr$_{SIV}$ CO的初免-加强方案引起在幅度方面与基于TRIP.I gagdmyr$_{SIV}$野生型颗粒的初免-加强方案类似的应答。这个结果未被公开，不能预见，因为用TRIP.NI gagdmyr$_{SIV}$CO 颗粒单次注射引起比用TRIP.I gagdmyr$_{SIV}$野生型单次注射低的应答。

[0626] 不同血清型VSV-G包膜蛋白用于假型包装慢病毒载体颗粒的用途

[0627] Indiana血清型的水泡性口炎病毒G糖蛋白(VSV-G)是通常用作外壳蛋白工程化慢病毒载体的跨膜蛋白。

[0628] 目前，有9个病毒物种确定分类在VSV类别，19个弹状病毒被临时分类在这个类别，所有均显示不同程度的交叉中和作用。当被测序时，蛋白 G基因显示序列相似性。VSV-G蛋白具有N-末端胞外域、跨膜区和C末端胞质尾区。其经过高尔基体外侧网络(内质网和高尔基体)输出到细胞表面。

[0629] 已产生密码子优化基因并克隆在pThV载体的BamH1和EcoR1位点之间，产生pThV-VSV.G(IND-CO)(图6)。密码子优化用于在人细胞中表达 VSV-G蛋白可以刺激基因转移效率100倍，如在New Jersey血清型中所示 (图20)。我们进一步显示在假型慢病毒载体颗粒的特殊环境中的几种血清型的VSV-G蛋白在体内注射后不诱导交叉中和抗体。

[0630] 当需要进一步的VSV-G血清型以设计合适组合用于包括至少一个加强注射的疫苗测定中时，已测试其它VSV-G血清型的颗粒包被。第一个使用的是VSV-G$_{NewJersey}$血清型。合成密码子优化的基因，并克隆在pThV质粒的BamH1和EcoR1位点之间，产生pThV-VSV.G(NJ-CO)载体(图7)。

[0631] 目前，5个其它VSV-G基因被测序(鲤鱼病毒的Chandipura，Cocal，Piry， Isfahan和spring病毒血症，图3)，并制备为密码子优化版本。

[0632] 材料和方法

[0633] 1.材料

[0634] 1.1质粒

[0635] 针对5个鉴定的VSV-G血清型由Gene Art AG(Germany)产生密码子优化的基因。这些基因克隆在pThV质粒的BamH1和EcoR1位点之间,产生下列载体:pThV-VSV.G(CHANDI-CO;图8),pThV-VSV.G(COCAL-CO;图9),pThV-VSV.G(PIRY-CO;图10),pThV-VSV.G(ISFA-CO;图11),pThV-VSV.G(SVCV-CO;图12)。

[0636] 2.方法

[0637] 2.1交叉中和作用测定

[0638] C57BI/6小鼠(单元型H2b,12-23周龄之间)用经VSV-G血清型假型包装的慢病毒载体颗粒腹膜内注射(Indiana、New Jersey、Isfahan、Cocal和 SVCV,每组6个小鼠,450μl/小鼠)。4周后,小鼠用相同颗粒加强(500μl/ 小鼠)。在加强后15天进行第一次眶后采血(于Capiject试管中),在加强后 21天进行第二次。血液在3500rpm离心6分钟,收集血清并在-20℃保持。转导测定在存在各种稀释度的这些血清存在下进行。

[0639] 2.2人单核细胞衍生DC的产生

[0640] 从法国血库(EFS-Rungis)获得血沉棕黄层,所有对象知情同意并符合伦理指导。经Ficoll密度离心分离PBMC。单核细胞通过粘附在组织培养物处理的平板上富集。粘附步骤后,在含有10%FCS、青链霉素(Peni strptomycine)、丙酮酸0.1mM+Hepes 1mM并补加粒细胞-巨噬细胞 rhGM-CSF(50ng/ml,R&D systems)和rIL-4(20ng/ml,R&D systems)的RPMI培养基中培养细胞。4天后这一培养基用含有rhGM-CSF(50ng/ml)和 rIL-4(20ng/ml)的新鲜培养基置换。在第7天,细胞表型分型并用慢病毒载体转导。转导后2小时加入含有rhGM-CSF和rIL-4的RPMI(INVITROGEN) 培养基。在转导后5天收集细胞并用LSR II流式细胞术(Becton Dickinson) 分析。DC表达的GFP在荧光素异硫氰酸酯通道经流式细胞术直接检查。

[0641] 2.3人单核细胞衍生DC的表型分析

[0642] 为进行表型分析,DC($1x10^6$细胞于100μl中)在室温与浓度为0.1μg/μl 的用FITC或PE标记的抗CD14、CD86、CD1a和HLA-dr抗体(Becton Dickinson)保温5分钟。染色细胞用LSR II流式细胞术分析(Becton Dickinson)。

[0643] 结果

[0644] 1.不同VSV-G血清型的假型包装能力的评估

[0645] 针对5种鉴定的VSV-G血清型已经产生人密码子优化基因并克隆在 pThV质粒中,产生了下述载体:pThV-VSV.G(CHANDI-CO), pThV-VSV.G(COCAL-CO),pThV-VSV.G(PIRY-CO),pThV-VSV.G(ISFA-CO) 和pThV-VSV.G(SVCV-CO),(图8-12)。这些包膜质粒用于慢病毒载体颗粒产生,它们的假型包装能力通过确定载体效价(TU/ml)而评估。如图50所述,除了VSV-G Indiana和New Jersey之外,5种VSV-G蛋白中仅3种能有效假型包装我们的载体颗粒:Cocal、Isfahan和SVCV血清型。最佳效价用Indiana血清型观测到(野生型和密码子优化蛋白之间未能观测到显著差异)。其它血清型给出Indiana效价的54%(New Jersey)、25%(Cocal)、22%(SVCV)和7%(Isfahan)。

[0646] Chandipura和Piry VSV-G血清型均给出仅Indiana效价的0.07%。看起来它们非常低的融合活性阻止它们有效用于假型包装我们的慢病毒载体颗粒,因为它们不能转导足够的靶细胞。Chandipura VSV-G蛋白的低效率可以解释报道的其在VSV-G假型包装的复制

缺陷性人免疫缺陷病毒颗粒环境中缺乏加强免疫应答的能力(Baliga CS,et al,Molecular Therapy,2006)。

[0647] 2.交叉中和作用测定

[0648] 鉴定我们的VSV-G蛋白产生中和抗体的能力及检查这些抗体是否潜在中和异源VSV-G血清型可能有助于确定假型包装的载体在接种试验中注射的优选顺序。

[0649] 用有效的VSV-G蛋白(Indiana,New Jersey,Cocal,Isfahan和SVCV) 假型包装的慢病毒载体颗粒注射C57BI/6小鼠2次,注射之间间隔4周。第二次注射后15天,从小鼠收集血液,测试其中和用各种VSV-G蛋白假型包装的慢病毒载体颗粒的能力。如图51和52所示,VSV-G Indiana、New Jersey、SVCV和Isfahan假型不诱导可检测的抗任何其它VSV-G蛋白的抗体。因此,它们可以以任何顺序用于第一次注射。相反,抗Cocal抗体强烈抑制Indiana和SVCV假型包装颗粒。因此,如果使用,则Cocal假型包装颗粒应用于最后注射,以避免任何中和反应抑制接种效果。总之,当各种被测试VSV-G蛋白相继用于初免-加强方案中时,假型包装颗粒的组合应特别考虑如下事实,即VSV-G假型包装颗粒应以如下顺序注射:Indiana-New Jersey-Isfahan-SVCV/Cocal。

[0650] 3.猴和人血清中的抗体优势

[0651] 人血清中能中和VSV-G蛋白的抗体的存在应在使用它们假型包装我们的载体颗粒之前确定。为了评估可用人血清获得的中和应答的强度,我们首先决定测试在各种猴血清存在下用选择的VSV-G蛋白假型包装的我们的颗粒,猴血清得自我们的试验中使用的动物。因此我们从4只猴采集血清(一只未接种,三只用各种剂量的用VSV-G Indiana假型包装的颗粒接种-低、中和高剂量-并用独特剂量的VSV-G New Jersey假型包装颗粒加强),在各种时间采集(注射前、初免后及加强后)。这些猴血清中和用选择的VSV-G 蛋白(Indiana、New Jersey、Cocal、Isfahan和SVCV)假型包装的颗粒的能力随后被测试,结果分别示于图53-57。如预期的,在来自用Indiana假型包装颗粒(图53)接种的猴的血清中发现剂量依赖方式的抗VSV-G Indiana的强中和活性,在来自用New Jersey假型包装颗粒加强的猴的血清中还发现抗 New Jersey颗粒(图54)。因此,我们可以看出同源中和活性特征在于IC50 大约1/1024血清稀释度(50%总活性用1/1024血清稀释度获得)。在图55中,我们可以看出抗VSV-G Cocal血清型的中和活性由接受高剂量Indiana颗粒的猴特异发生(这一应答用低剂量Indiana颗粒未观测到)。然而,在来自免疫前或接种的猴的血清中未发现特异的抗Isfahan或SVCV血清型的中和活性(图56和57)。

[0652] 在人血清中能中和VSV-G蛋白的抗体的存在在随机选择的96个人血清中确定。用所选择的VSV-G蛋白假型包装的慢病毒载体颗粒进行的转导实验在人血清(加热及未加热的)存在下进行。图58总结的结果(实验细节在图59中示出)显示一些患者的血清表明抗VSV-G蛋白的强中和活性(2个患者抗Indiana,4个患者抗New Jersey,3个患者抗Cocal)。为了确定这种中和活性是同源的或者是非特异性的,进一步研究这些患者,在这些血清的系列稀释液存在下进行用不同VSV-G假型包装的颗粒的转导测定。如图60 所示,在他们的血清的2倍稀释液存在下显示抗VSV-G Indiana的中和活性的患者(患者#39、47、54、83、94和99)在进一步稀释倍数下不再显示这一中和活性。相同观测在先前显示抗New Jersey VSV-G蛋白的中和活性的患者(患者#7、9、63、70、84和88)、抗SVCV VSV-G蛋白的中和活性的患者(患者#10、78、94、39、84和98)、抗Isfahan VSV-G蛋白的中和活性的患者(患者#10、79、9、

94、70、84和98)中可见。相反,在显示抗Cocal VSV-G 蛋白的中和活性的患者(患者#9、57、67、80、88、88、54、62、69、83和 93)中,2个患者在高血清稀释度下仍显示中和活性(患者#67和69),IC50 在大约1/512血清稀释度。这些结果表明如果Cocal血清型用于假型包装我们的慢病毒载体颗粒则可能需要确定患者中抗Cocal优势。

[0653] 4.用经不同VSV-G包膜假型包装的载体颗粒转导人单核细胞衍生树突细胞

[0654] 在本发明推荐的接种方案中,用Indiana VSV-G假型包装的慢病毒载体首先被注射以引发免疫学反应。为了加强该免疫学反应,用一种先前描述的VSV-G血清型假型包装的慢病毒载体用于慢病毒载体颗粒的第二次注射。树突细胞在先天及继承性免疫中起中心作用。因此,我们鉴定了用不同VSV-G蛋白假型包装的载体颗粒与人DC融合的能力。因此,人单核细胞衍生的树突细胞(mDC)用经各种VSV-G蛋白(New Jersey,Isfahan,SVCV, Cocal或Chandipura)假型包装的慢病毒载体转导,导致确定对不同颗粒的效价(TU/mL),其与每种VSV-G的融合性(fusogenicity)直接相关。

[0655] 另外,在293T细胞上经典进行的载体颗粒的效价也被鉴定以建立转导的相关效价(效价DC/效价293T)。实验证实所有测试的VSV-G包膜均显示与mDC融合的相对能力,显著的例外是VSV-G的Chandipura血清型(图 61)。VSV-G Indiana看起来与其它测试的相比是最融合的包膜。然而,VSV-G New Jersey、Isfahan、SVCV和Cocal也显示与mDC融合的良好能力。考虑不同的包膜,2个不同实验提供的数据(图61)显示相同模式的融合性,而无论相对效价值(DC效价/293 T效价)如何。这是由于在转导时使用的mDC 的生理状态的差异所致。

[0656] 参考文献

[0657] Addo,M.M.,Yu,X.G.,Rathod,A.,Cohen,D.,Eldridge,R.L.,Strick,D.,Johnston, M.N.,Corcoran,C.,Wurcel,A.G.,Fitzpatrick,C.A.,et al.(2003).Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1(HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses,but no correlation to viral load.J Virol 77,2081-2092.

[0658] Andrieu,J.M.,and Lu,W.(2007).A dendritic cell-based vaccine for treating HIV infection:background and preliminary results.J Intern Med 261,123-131.

[0659] Arhel,N.J.,Souquere-Besse,S.,Munier,S.,Souque,P.,Guadagnini,S.,Rutherford,S.,Prevost,M.C.,Allen,T.D.,and Charneau,P.(2007).HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore.Embo J 26,3025-3037.

[0660] Autran,R.,Carcelain,G.,Combadiere,B.,and Debre,P.(2004).Therapeutic vaccines for chronic infections.Science 305,205-208.

[0661] Autran,B.,Carcelain,G.,Li,T.S.,Blanc,C.,Mathez,D.,Tubiana,R.,Katlama,C., Debre,P.,and Leibowitch,J.(1997).Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease.Science 277,112-116.

[0662] Andreas Bergthaler,Nicolas U.Gerber,Doron Merkler,Edit Horvath,Juan

Carlos de la Torre,Daniel D.Pinschewer,3-PIoS Pathogens Vol.2,No.6,e51, Envelope Exchange for the Generation of Live-Attenuated Arenavirus Vaccines Betts,M.R.,Nason,M.C.,West,S.M.,De Rosa,S.C.,Migueles,S.A.,Abraham, J., Lederman,M.M.,Benito,J.M.,Goepfert,P.A.,Connors,M.,et al.(2006).HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. Blood 107,4781-4789.

[0663] Breckpot,K.,Dullaers,M.,Bonehill,A.,van Meirvenne,S.,Heirman,C.,de Greef,C., van der Bruggen,P.,and Thielemans,K.(2003).Lentivirally transduced dendritic cells as a tool for cancer immunotherapy.J Gene Med 5,654-667.

[0664] (3)Breckpot,K.,Aerts,J.L.&Thlelemans,K.Lentlviral vectors for cancer Immunotherapy:transforming infectious particles into therapeutics.Gene Ther 14,847-62(2007).

[0665] Brenchley,J.M.,Price,D.A.,Schacker,T.W.,Asher,T.E.,Silvestri,G.,Rao, S., Kazzaz,Z.,Bornstein,E.,Lambotte,O.,Altmann,D.,et al.(2006).Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection.Nat Med 12,1365-1371.

[0666] Briggs,J.A.,Simon,M.N.,Gross,I.,Krausslich,H.G.,Fuller,S.D.,Vogt, V.M.,and Johnson,M.C.(2004).The stoichiometry of Gag protein in HIV-1.Nat Struct Mol Biol 11,672-675.

[0667] Brown,B.D.et al.In vivo administration of lentiviral vectors triggers a type I interferon response that restricts hepatocyte gene transfer and promotes vector clearance.Blood 109,2797-805(2007).

[0668] Carrington,M.,Nelson,G.W.,Martin,M.P.,Kissner,T.,Vlahov,D.,Goedert, J.J., Kaslow,R.,Buchbinder,S.,Hoots,K.,and O'Brien,S.J.(1999).HLA and HIV-1: heterozygote advantage and **B*35-Cw*04** disadvantage.Science 283,1748-1752. Cronin J.et al,Curr Gene Ther.2005,August;5(4):387-398 Altering the Tropism of Lentiviral Vectors through Pseudotyping

[0669] Day,C.L.,Kaufmann,D.E.,Kiepiela,P.,Brown,J.A.,Moodley,E.S.,Reddy,S., Mackey,E.W.,Miller,J.D.,Leslie,A.J.,DePierres,C.,et al.(2006).PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression.Nature 443,350-354.

[0670] Delenda,C.(2004).Lentiviral vectors:optimization of packaging, transduction and gene expression.J Gene Med 6 Suppl 1,S125-138.

[0671] (9)Deml,L.et al.Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein.J Virol 75,10991-1001(2001).

[0672] Despres P.et al.Infect Dis.2005;191:207-214

[0673] Donello J.E.et al,J.Virol.1998,June;72(6):5085-92

[0674] Dullaers,M.,and Thielemans,K.(2006).From pathogen to medicine:HIV-1-

derived lentiviral vectors as vehicles for dendritic cell based cancer immunotherapy.J Gene Med 8,3-17.

[0675] Esslinger,C.,Chapatte,L.,Finke,D.,Miconnet,I.,Guillaume,P.,Levy,F., and MacDonald,H.R.(2003).In vivo administration of a lentiviral vaccine targets DCs and induces efficient CD8(+)T cell responses.J Clin Invest 111, 1673-1681.

[0676] Firat,H.,Garcia-Pons,F.,Tourdot,S.,Pascolo,S.,Scardino,A.,Garcia,Z., Michel, M.L.,Jack,R.W.,Jung,G.,Kosmatopoulos,K.,et al.(1999).H-2 class I knockout, HLA-A2.1-transgenic mice:a versatile animal model for preclinical evaluation of antitumor immunotherapeutic strategies.Eur J Immunol 29,3112-3121.

[0677] Firat H.et al.The Journal of Gene Medicine 2002;4:38-45

[0678] Frank,I.,Santos,J.J.,Mehlhop,E.,Villamide-Herrera,L.,Santisteban,C., Gettie,A., Ignatius,R.,Lifson,J.D.,and Pope,M.(2003).Presentation of exogenous whole inactivated simian immunodeficiency virus by mature dendritic cells Induces CD4+ and CD8+T-cell responses.J Acquir Immune Defic Syndr 34,7-19.

[0679] Fredericksen B.L.et al.J.Virol.(1995)69:1435-1443

[0680] Gauduin,M.C.,Yu,Y.,Barabasz,A.,Carville,A.,Piatak,M.,Llfson,J.D., Desrosiers,R.C.,and Johnson,R.P.(2006).Induction of a virus-specific effector- memory CD4+ T cell response by attenuated SIV infection.J Exp Med 203,2661- 2672.

[0681] Girard,M.P.,Osmanov,S.K.,and Kieny,M.P.(2006).A review of vaccine research and development:the human immunodeficiency virus(HIV).Vaccine 24, 4062-4081.

[0682] Goulder,P.J.,and Watkins,D.I.(2004).HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design.Nat Rev Immunol 4,630-640.

[0683] Gulick,R.M.,Mellors,J.W.,Havlir,D.,Eron,J.J.,Meibohm,A.,Condra,J.H., Valentine,F.T.,McMahon,D.,Gonzalez,C.,Jonas,L.,et al.(2000).3-year suppression of HIV viremia with indinavir,zidovudine,and lamivudine.Ann Intern Med 133,35-39.

[0684] Hacein-Bey-Abina,S.,Von Kalle,C.,Schmidt,M.,McCormack,M.P.,Wulffraat, N., Leboulch,P.,Lim,A.,Osborne,C.S.,Pawliuk,R.,Morillon,E.,et al.(2003).LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. Science 302,415-419.

[0685] He,Y.&Falo,L.D.,Jr.Lentivirus as a potent and mechanlstically distinct vector for genetic Immunization.Curr Opin Mol Ther 9,439-46(2007).

[0686] Hel,Z.et al.improved vaccine protection from simian AIDS by the addition of nonstructural simian immunodeficiency virus genes.J Immunol 176,

85-96 (2006).

[0687] Iglesias,M.C.,Mollier,K.,Beignon,A.S.,Souque,P.,Adotevi,O.,Lemonnier, F., and Charneau,P.(2007).Lentiviral vectors encoding HIV-1 polyepitopes induce broad CTL responses in vivo.Mol Ther 15,1203-1210.

[0688] Iglesias,M.C.et al.A single immunization with a minute dose of a lentiviral vector- based vaccine is highly effective at eliciting protective humoral immunity against West Nlle virus.J Gene Med 8,265-74(2006).

[0689] Jin,X.,Bauer,D.E.,Tuttleton,S.E.,Lewin,S.,Gettie,A.,Blanchard,J., Irwin,C.E.,Safrit,J.T.,Mittler,J.,Welnberger,L.,et al.(1999).Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+)T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques.J Exp Med 189,991-998.

[0690] Karlsson,I.et al.Dynamics of T-cell responses and memory T cells during primary simian immunodeficiency virus infection in cynomolgus macaques.J Virol Si, 13456-68(2007).

[0691] Kiepiela,P.,Ngumbela,K.,Thobakgale,C.,Ramduth,D.,Honeyborne,I., Moodley, E.,Reddy,S.,de Pierres,C.,Mncube,Z.,Mkhwanazi,N.,et al.(2007).CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load.Nat Med 13,46-53.

[0692] Koff,W.C.,Johnson,P.R.,Watklns,D.I.,Burton,D.R.,Lifson,J.D., Hasenkrug,K. J.,McDermott,A.B.,Schultz,A.,Zamb,T.J.,Boyle,R.,and Desrosiers, R.C. (2006).HIV vaccine design:insights from live attenuated SIV vaccines.Nat Immunol 7,19-23.

[0693] Koup,R.A.,Safrit,J.T.,Cao,Y.,Andrews,C.A.,McLeod,G.,Borkowsky,W., Farthing,C.,and Ho,D.D.(1994).Temporal association of cellular immune responses with the Initial control of viremla In primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome.J Virol 68,4650-4655.

[0694] Gallione,C.J.and Rose,J.K.-J.Virol.46(1),162-169.

[0695] Georgel,P.et al.Vesicular stomatitis virus glycoprotein G activates a specific antiviral Toil-like receptor 4-dependent pathway.Virology 362,304-13 (2007).

[0696] Iglesias,M.C.et al.Lentiviral vectors encoding HIV-1 polyepitopes induce broad CTL responses in vivo.Mol Ther 15,1203-10(2007).

[0697] Iglesias MC,et al,A single immunization with a minute dose of a lentiviral vector- based vaccine is highly effective protective humoral immunity against West Nile virus. J.Gene Med.2006 Mar;8(3):265-274.

[0698] Iglesias MC et al,Polyepitopes Induce Broad CTL Responses In Vivo.Mol Ther. 2007 Jun,15(6):1203-10.

[0699] Isidoro Martinez and Gail W.Wertz,The Journal of Virology,Mar.2005, p.3578- 3585 Vol.79,No.6,Biological Differences between Vesicular Stomatitis

Virus Indiana and New Jersey Serotype Glycoproteins:Identification of.Amino acid Residues Modulating pH-Dependent Infectivity

[0700] Kiepiela,P.et al.CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load.NatMed 13,46-53(2007).

[0701] Letvin,N.L.et al.Preserved CD4+central memory T cells and survival in vaccinated SIV-challenged monkeys.Science 312,1530-3(2006).

[0702] Mattapallil,J.J.et al.Vaccination preserves CD4 memory T cells during acute simian immunodeficiency virus challenge.J Exp Med 203,1533-41(2006).

[0703] zur Megede,J.et al.Increased expression and immunogenicity of sequence- modified human immunodeficlency virus type 1 gag gene.J Virol 74, 2628-35 (2000).

[0704] Mellors,J.W.(1996).Closing in on human immunodeficiency virus-1.Nat Med 2, 274-275.

[0705] Montini,E.,Cesana,D.,Schmidt,M.,Sanvito,F.,Ponzoni,M.,Bartholomae,C., Sergi Sergi,L.,Benedicenti,F.,Ambrosi,A.,Di Serio,C.,et al.(2006) .Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxlcity of lentiviral vector Integration.Nat Biotechnol 24,687-696.

[0706] Palella,F.J.,Jr.,Delaney,K.M.,Moorman,A.C.,Loveless,M.O.,Fuhrer,J., Satten,G.A.,Aschman,D.J.,and Holmberg,S.D.(1998).Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators.N Engl J Med 338,853-860.

[0707] Pichlmair,A.et al.Tubulovesicular structures within vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped lentiviral vector preparations carry DNA and stimulate antiviral responses via Toll-Uke receptor 9.J Virol 81,539-47(2007).

[0708] Poznansky,M.,Lever,A.,Bergeron,L.,Haseltine,W.,and Sodroski,J.(1991) .Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector.J Virol 65,532-536.

[0709] Reimann,K.A.,Parker,R.A.,Seaman,M.S.,Beaudry,K.,Beddall,M.,Peterson, L., Williams,K.C.,Veazey,R.S.,Montefiori,D.C.,Mascola,J.R.,et al.(2005). Pathogenicity of simian-human immunodeficiency virus SHIV-89.6P and SIVmac is attenuated In cynomolgus macaques and associated with early T-lymphocyte responses.J Virol 79,8878-8885.

[0710] Rose,N.F,et al.An effective AIDS vaccine based on live attenuated vesicular stomatitis virus recombinants.Cell 106,539-49(2001).

[0711] Nina F.Rose,Anjeanette Roberts,Linda Buonocore,and John K.Rose,The Journal of Virology,Dec.2000,p.10903-10910 Vol.74,No.23,Glycoprotein Exchange Vectors based on Vesicular Stomatitis Virus Allow Effective Boosting and Generation of Neutralizing Antibodies to a Primary Isolate of Human

Immunodeficiency Virus Type 1

[0712] Nina F.Rose,Preston A.Marx,Amara Luckay,Douglas F.Nixon,Walter J.Moretto, Sean M.Donahoe,David Montefiorl,Anjeanette Roberts,Linda Buonocore,and John K.Rose,Cell,Vol.106,539-549,September 7,2001,An Effective AIDS Vaccine Based on Live Attenuated Vesicular Stomatitis Virus Recombinants Nishimura N.et al(PNAS(2002)99:6755-6760

[0713] Rosenberg,E.S.,Altfeld,M.,Poon,S.H.,Phillips,M.N.,Wilkes,B.M., Eldridge,R. L.,Robbins,G.K.,D'Aquila,R.T.,Goulder,P.J.,and Walker,B.D.(2000) .Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection.Nature 407, 523-526.

[0714] Saag,M.S.(1997).Use of virologic markers in clinical practice.J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 16 Suppl 1,S3-13.

[0715] Sacha,J.B.,Chung,C.,Rakasz,E.G.,Spencer,S.P.,Jonas,A.K.,Bean,A.T., Lee,W.,Burwitz,B.J.,Stephany,J.J.,Loffredo,J.T.,et al.(2007).Gag-specific CD8 + T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression.J Immunol 178,2746-2754.

[0716] Schoenly,K.A.&Weiner,D.B.HIV-1 Vaccine Development:Recent Advances in the CTL Platform"Spotty Business".J Viral(2007).

[0717] Steven AC.And Spear PG,Viral Glycoproteins and an Evolutionary Conundrum. Tonks,A.(2007).Quest for the AIDS vaccine.Bmj 334,1346-1348.

[0718] Trkola,A.,Kuster,H.,Rusert,P.,Joos,B.,Fischer,M.,Leemann,C.,Manrique, A., Huber,M.,Rehr,M.,Oxenlus,A.,et al.(2005).Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies.Nat Med 11,615-622.

[0719] VandenDriessche T.et al.Blood,1 August 2002-vol.100,n°3,p.813-822

[0720] Vargas,J.,Jr.,Gusella,G.L.,Najfeld,V.,Klotman,M.E.,and Cara,A.(2004) .Novel integrase-defective lentiviral episomal vectors for gene transfer.Hum Gene Ther 15, 361-372.

[0721] Weber,J.(2001).The pathogenesis of HIV-1 infection.Br Med Bull 58,61-72.

[0722] Wei,X.,Ghosh,S.K.,Taylor,M.E.,Johnson,V.A.,Emini,E.A.,Deutsch,P., Lifson. J.D.,Bonhoeffer,S.,Nowak,M.A.,Hahn,B.H.,and et al.(1995).Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection.Nature 373,117-122.

[0723] Wilson,N.A.et al.Vaccine-induced cellular immune responses reduce plasma viral concentrations after repeated low-dose challenge with pathogenic simian immunodeficiency virus SIVmac239.J Virol 80,5875-85(2006).

[0724] Wiseman,R.W.,Wojcechowskyj,J.A.,Greene,J.M.,Blasky,A.J.,Gopon,T., Soma,T.,Friedrich,T.C.,O'Connor,S.L.,and O'Connor,D.H.(2007).Simian immunodeficiency virus SIVmac239 Infection of major histocompatibility

complex- identical cynomolgus macaques from Mauritius.J Virol 81,349-361.

[0725] Yee J.et al,1994,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91,9564-9568.

[0726] Zarei,S.,Abraham,S.,Arrighi,J.F.,Haller,O.,Calzascla,T.,Walker,P.R.,Kundig, T.M.,Hauser,C.,and Piguet,V.(2004).Lentiviral transduction of dendritic cells confers protective antiviral immunity in vivo.J Virol 78,7843-7845.

[0727] Zennou,V.,Petit,C.,Guetard,D.,Nerhbass,U.,Montagnier,L.,and Charneau,P. (2000).HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap.Cell 101, 173-185.

[0728] Zufferey,R.,Donello,J.E.,Trono,D.,and Hope,T.J.(1999).Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors.J Virol 73,2886-2892.

[0729] Zufferey,R.,Dull,T.,Mandel,R.J.,Bukovsky,A.,Quiroz,D.,Naldini,L.,and Trono, D.(1998).Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery.J Virol 72,9873-9880.

<110> 巴斯德研究院
国立科学研究中心
赛拉韦克蒂斯公司

<120> 慢病毒基因转移载体及其医学应用

<130> B07146A -AD/CAL

<140> PCT/IB2008/002930
<141> 2008-08-01

<150> EP 07290979.9
<151> 2007-08-03

<150> EP 07291251.2
<151> 2007-10-12

<150> EP 08156405.6
<151> 2008-05-16

<150> EP 07290980.7
<151> 2007-08-03

<160> 84

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 200
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA FLAP of CAEV

<400> 1
[0001] gttccagcca caatttgtcg ctgtagaatc agccatagca gcagccctag tcgccataaa 60
tataaaaaga aagggtgggc tggggacaag ccctatggat atttttatat ataataaaga 120
acagaaaaga ataaataata aatataataa aaattctcaa aaaattcaat tctgttatta 180
cagaataagg aaaagaggac 200

<210> 2
<211> 200
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA FLAP of EIAV

<400> 2
cttgtaacaa agggagggaa agtatgggag gacagacacc atgggaagta tttatcacta 60
atcaagcaca agtaatacat gagaaacttt tactacagca agcacaatcc tccaaaaaat 120
tttgttttta caaaatccct ggtgaacatg attggaaggg acctactagg gtgctgtgga 180
agggtgatgg tgcagtagta 200

<210> 3
<211> 200
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA FLAP of VISNA

<400> 3
ggaccctcat tactctaaat ataaaaagaa agggtgggct agggacaagc cctatggata 60
tatttatatt taataaggaa caacaaagaa tacagcaaca aagtaaatca aaacaagaaa 120

aaattcgatt ttgttattac agaacaagaa aaagagggca tccaggagag tggcaaggac 180

caacacaggt actttggggc 200

<210> 4
<211> 200
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA FLAP of SIVAGM

<400> 4
tactgatggc ttgcatactt cacaatttta aaagaaaggg aggaataggg ggacagactt 60

cagcagagag actaattaat ataataacaa cacaattaga aatacaacat ttacaaacca 120

aaattcaaaa aattttaaat tttagagtct actacagaga agggagagac cctgtgtgga 180

aaggaccggc acaattaatc 200

<210> 5
<211> 200
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA FLAP of HIV-2 ROD

<400> 5
tgcatgaatt ttaaaagaag ggggggaata ggggatatga ctccatcaga aagattaatc 60

aatatgatca ccacagaaca agagatacaa ttcctccaag ccaaaaattc aaaattaaaa 120

gattttcggg tctatttcag agaaggcaga gatcagttgt ggaaaggacc tggggaacta 180

[0002] ctgtggaaag gagaaggagc 200

<210> 6
<211> 200
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA FLAP of HIV-1 LAI

<400> 6
cagtattcat ccacaatttt aaaagaaaag gggggattgg ggggtacagt gcaggggaaa 60

gaatagtaga cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaaa caaattacaa 120

aaattcaaaa ttttcgggtt tattacaggg acagcagaga tccactttgg aaaggaccag 180

caaagctcct ctggaaaggt 200

<210> 7
<211> 119
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA FLAP of HIV-1

<400> 7
ttttaaaaga aaagggggga ttgggggtta cagtgcaggg gaaagaatag tagacataat 60

agcaacagac atacaaacta aagaattaca aaaacaaatt acaaaaattc aaaattttc 119

<210> 8
<211> 24
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> 2A peptide

<400> 8

Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly
1 5 10 15

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Forward primer

<400> 9
tgtccacctg ccattaagcc cga 23

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Backward primer

<400> 10
gcagaggagg aaattaccca gtac 24

[0003]

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Internal probe

<400> 11
tgtccacctg ccattaagcc cga 23

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> Simian immunodeficiency virus

<400> 12

Gln Thr Asp Ala Ala Val Lys Asn Trp Met Thr Gln Thr Leu Leu
1 5 10 15

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> Simian immunodeficiency virus

<400> 13

Glu Asn Leu Lys Ser Leu Tyr Asn Thr Val Cys Val Ile Trp Cys
1 5 10 15

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Simian immunodeficiency virus

<400> 14

Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Ser Leu Arg Ala Glu Gln Thr Asp
1 5 10 15

<210> 15
<211> 527
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 15

Met Thr Ser Ser Val Thr Ile Ser Val Val Leu Leu Ile Ser Phe Ile
1 5 10 15

Thr Pro Leu Tyr Ser Tyr Leu Ser Ile Ala Phe Pro Glu Asn Thr Lys
20 25 30

Leu Asp Trp Lys Pro Val Thr Lys Asn Thr Arg Tyr Cys Pro Met Gly
35 40 45

Gly Glu Trp Phe Leu Glu Pro Gly Leu Gln Glu Glu Ser Phe Leu Ser
50 55 60

Ser Thr Pro Ile Gly Ala Thr Pro Ser Lys Ser Asp Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80

His Ala Ala Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro
85 90 95

[0004] Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile His Asn Ile Lys Pro Thr Arg Ser Asp
100 105 110

Cys Asp Thr Ala Leu Ala Ser Tyr Lys Ser Gly Thr Leu Val Ser Leu
115 120 125

Gly Phe Pro Pro Glu Ser Cys Gly Tyr Ala Ser Val Thr Asp Ser Glu
130 135 140

Phe Leu Val Ile Met Ile Thr Pro His His Val Gly Val Asp Asp Tyr
145 150 155 160

Arg Gly His Trp Val Asp Pro Leu Phe Val Gly Gly Glu Cys Asp Gln
165 170 175

Ser Tyr Cys Asp Thr Ile His Asn Ser Ser Val Trp Ile Pro Ala Asp
180 185 190

Gln Thr Lys Lys Asn Ile Cys Gly Gln Ser Phe Thr Pro Leu Thr Val
195 200 205

Thr Val Ala Tyr Asp Lys Thr Lys Glu Ile Ala Ala Gly Gly Ile Val
210 215 220

Phe Lys Ser Lys Tyr His Ser His Met Glu Gly Ala Arg Thr Cys Arg
225 230 235 240

Leu Ser Tyr Cys Gly Arg Asn Gly Ile Lys Phe Pro Asn Gly Glu Trp
245 250 255

Val Ser Leu Met Leu Lys Leu Arg Ser Lys Arg Asn Leu Tyr Phe Pro
260 265 270

Cys Leu Lys Met Cys Pro Thr Gly Ile Arg Gly Glu Ile Tyr Pro Ser
275 280 285

Ile Arg Trp Ala Gln Val Leu Thr Ser Glu Ile Gln Arg Ile Leu Asp
290 295 300

Tyr Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp Asp Lys Val Glu Arg Lys Glu Pro
305 310 315 320

Leu Ser Pro Leu Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Ser Pro Gly Lys
325 330 335

Gly Leu Ala Tyr Thr Val Ile Asn Gly Thr Leu Ser Phe Ala His Thr
340 345 350

Arg Tyr Val Arg Met Trp Ile Asp Gly Pro Val Leu Lys Glu Pro Lys
355 360 365

Gly Lys Arg Glu Ser Pro Ser Gly Ile Ser Ser Asp Ile Trp Thr Gln
370 375 380

Trp Phe Lys Tyr Gly Asp Met Glu Ile Gly Pro Asn Gly Leu Leu Lys
385 390 395 400

Thr Ala Gly Gly Tyr Lys Phe Pro Trp His Leu Ile Gly Met Gly Ile
405 410 415

[0005]

Val Asp Asn Glu Leu His Glu Leu Ser Glu Ala Asn Pro Leu Asp His
420 425 430

Pro Gln Leu Pro His Ala Gln Ser Ile Ala Asp Asp Ser Glu Glu Ile
435 440 445

Phe Phe Gly Cys His Pro Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Val Glu
450 455 460

Leu Val Thr Gly Trp Phe Thr Ser Trp Lys Glu Ser Leu Ala Ala Gly
465 470 475 480

Ser Cys Pro Asp Leu Arg Cys Pro Pro Leu Phe Pro Gly Ile Val Tyr
485 490 495

Tyr Leu Gln Lys Ala Gln Met Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Asp Ser
500 505 510

Phe Glu Met Arg Ile Phe Lys Pro Asn Asn Met Arg Ala Arg Val
515 520 525

<210> 16
<211> 512
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 16

Met Asn Phe Leu Leu Leu Thr Phe Ile Val Leu Pro Leu Cys Ser His

1 5 10 15

Ala Lys Phe Ser Ile Val Phe Pro Gln Ser Gln Lys Gly Asn Trp Lys
20 25 30

Asn Val Pro Ser Ser Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Gln Asn
35 40 45

Trp His Asn Asp Leu Leu Gly Ile Thr Met Lys Val Lys Met Pro Lys
50 55 60

Thr His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ala Lys
65 70 75 80

Trp Ile Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr
85 90 95

His Ser Ile His Ser Ile Gln Pro Thr Ser Glu Gln Cys Lys Glu Ser
100 105 110

Ile Lys Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Met Ser Pro Gly Phe Pro Pro
115 120 125

Gln Asn Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ser Val Ala Val Val Val
130 135 140

Gln Ala Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp
145 150 155 160

[0006]

Ile Asp Ser Gln Phe Pro Asn Gly Lys Cys Glu Thr Glu Glu Cys Glu
165 170 175

Thr Val His Asn Ser Thr Val Trp Tyr Ser Asp Tyr Lys Val Thr Gly
180 185 190

Leu Cys Asp Ala Thr Leu Val Asp Thr Glu Ile Thr Phe Phe Ser Glu
195 200 205

Asp Gly Lys Lys Glu Ser Ile Gly Lys Pro Asn Thr Gly Tyr Arg Ser
210 215 220

Asn Tyr Phe Ala Tyr Glu Lys Gly Asp Lys Val Cys Lys Met Asn Tyr
225 230 235 240

Cys Lys His Ala Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Phe
245 250 255

Val Asp Gln Asp Val Tyr Ala Ala Ala Lys Leu Pro Glu Cys Pro Val
260 265 270

Gly Ala Thr Ile Ser Ala Pro Thr Gln Thr Ser Val Asp Val Ser Leu
275 280 285

Ile Leu Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr
290 295 300

Trp Ser Lys Ile Arg Ser Lys Gln Pro Val Ser Pro Val Asp Leu Ser
305 310 315 320

Tyr Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile
325 330 335

Asn Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Ile Asp Ile
340 345 350

Asp Asn Pro Ile Ile Ser Lys Met Val Gly Lys Ile Ser Gly Ser Gln
355 360 365

Thr Glu Arg Glu Leu Trp Thr Glu Trp Phe Pro Tyr Glu Gly Val Glu
370 375 380

Ile Gly Pro Asn Gly Ile Leu Lys Thr Pro Thr Gly Tyr Lys Phe Pro
385 390 395 400

Leu Phe Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Lys Thr
405 410 415

Ser Gln Ala Glu Val Phe Glu His Pro His Leu Ala Glu Ala Pro Lys
420 425 430

Gln Leu Pro Glu Glu Glu Thr Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Ile Ser
435 440 445

Lys Asn Pro Val Glu Leu Ile Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser
450 455 460

[0007] Thr Val Val Thr Phe Phe Phe Ala Ile Gly Val Phe Ile Leu Leu Tyr
465 470 475 480

Val Val Ala Arg Ile Val Ile Ala Val Arg Tyr Arg Tyr Gln Gly Ser
485 490 495

Asn Asn Lys Arg Ile Tyr Asn Asp Ile Glu Met Ser Arg Phe Arg Lys
500 505 510

<210> 17
<211> 511
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 17

Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys
1 5 10 15

Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn
20 25 30

Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Leu Asn Trp
35 40 45

His Asn Asp Leu Val Gly Thr Ala Leu Gln Val Lys Met Pro Lys Ser
50 55 60

His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ser Lys Trp
65 70 75 80

Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His
85 90 95

Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro Ser Val Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile
100 105 110

Glu Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Leu Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln
115 120 125

Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala Ala Ile Val Gln
130 135 140

Val Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Val
145 150 155 160

Asp Ser Gln Phe Ile Asn Gly Lys Cys Ser Asn Tyr Ile Cys Pro Thr
165 170 175

Val His Asn Ser Thr Thr Trp His Ser Asp Tyr Lys Val Lys Gly Leu
180 185 190

Cys Asp Ser Asn Leu Ile Ser Met Asp Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp
195 200 205

Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly Lys Lys Gly Thr Gly Phe Arg Ser Asn
210 215 220

Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Asp Lys Ala Cys Lys Met Gln Tyr Cys
225 230 235 240

[0008]

Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Met Ala
245 250 255

Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Ala Arg Phe Pro Glu Cys Pro Glu Gly
260 265 270

Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Asp Val Ser Leu Ile
275 280 285

Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr Trp
290 295 300

Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr
305 310 315 320

Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Val Phe Thr Ile Ile Asn
325 330 335

Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Val Asp Ile Ala
340 345 350

Ala Pro Ile Leu Ser Arg Met Val Gly Met Ile Ser Gly Thr Thr Thr
355 360 365

Glu Arg Val Leu Trp Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile
370 375 380

Gly Pro Asn Gly Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu

385 390 395 400

Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu Ser Ser
405 410 415

Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln
420 425 430

Leu Pro Asp Asp Glu Thr Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys
435 440 445

Asn Pro Ile Glu Phe Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Ser
450 455 460

Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu
465 470 475 480

Val Leu Arg Val Gly Ile Tyr Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys
485 490 495

Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
500 505 510

<210> 18
<211> 517
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 18

[0009] Met Leu Ser Tyr Leu Ile Leu Ala Ile Val Val Ser Pro Ile Leu Gly
1 5 10 15

Lys Ile Glu Ile Val Phe Pro Gln His Thr Thr Gly Asp Trp Lys Arg
20 25 30

Val Pro His Glu Tyr Asn Tyr Cys Pro Thr Ser Ala Asp Lys Asn Ser
35 40 45

His Gly Thr Gln Thr Gly Ile Pro Ile Glu Leu Thr Met Pro Lys Gly
50 55 60

Leu Thr Thr His Gln Val Asp Gly Phe Met Cys His Ser Ala Leu Trp
65 70 75 80

Met Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His
85 90 95

Ser Ile His Asn Glu Glu Pro Thr Asp Tyr Gln Cys Leu Glu Ala Ile
100 105 110

Lys Ala Tyr Lys Asp Gly Val Ser Phe Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln
115 120 125

Ser Cys Gly Tyr Gly Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala His Ile Ile Thr
130 135 140

Val Thr Pro His Ser Val Lys Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Ile
145 150 155 160

Asp Pro His Phe Ile Gly Gly Arg Cys Lys Gly Gln Ile Cys Glu Thr
165 170 175

Val His Asn Ser Thr Lys Trp Phe Thr Ser Ser Asp Gly Glu Ser Val
180 185 190

Cys Ser Gln Leu Phe Thr Leu Val Gly Gly Thr Phe Phe Ser Asp Ser
195 200 205

Glu Glu Ile Thr Ser Met Gly Leu Pro Glu Thr Gly Ile Arg Ser Asn
210 215 220

Tyr Phe Pro Tyr Ile Ser Thr Glu Gly Ile Cys Lys Met Pro Phe Cys
225 230 235 240

Arg Lys Pro Gly Tyr Lys Leu Lys Asn Asp Leu Trp Phe Gln Ile Thr
245 250 255

Asp Pro Asp Leu Asp Lys Thr Val Arg Asp Leu Pro His Ile Lys Asp
260 265 270

Cys Asp Leu Ser Ser Ser Ile Ile Thr Pro Gly Glu His Ala Thr Asp
275 280 285

Ile Ser Leu Ile Ser Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys
290 295 300

[0010] Gln Asn Thr Trp Ser Lys Ile Glu Ala Gly Glu Pro Ile Thr Pro Val
305 310 315 320

Asp Leu Ser Tyr Leu Gly Pro Lys Asn Pro Gly Val Gly Pro Val Phe
325 330 335

Thr Ile Ile Asn Gly Ser Leu His Tyr Phe Thr Ser Lys Tyr Leu Arg
340 345 350

Val Glu Leu Glu Asn Pro Val Ile Pro Arg Met Glu Gly Arg Val Ala
355 360 365

Gly Thr Arg Ile Val Arg Gln Leu Trp Asp Gln Trp Phe Pro Phe Gly
370 375 380

Glu Ala Glu Ile Gly Pro Asn Gly Val Leu Lys Thr Lys Gln Gly Tyr
385 390 395 400

Lys Phe Pro Leu His Ile Ile Gly Thr Gly Glu Val Asp Ser Asp Ile
405 410 415

Lys Met Glu Arg Val Val Lys His Trp Glu His Pro His Ile Glu Ala
420 425 430

Ala Gln Thr Phe Leu Lys Lys Asp Asp Thr Gly Glu Val Leu Tyr Tyr
435 440 445

Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Val Glu Leu Val Glu Gly Trp
450 455 460

Phe Ser Gly Trp Arg Ser Ser Ile Met Gly Val Leu Ala Val Ile Ile
465 470 475 480

Gly Phe Val Ile Leu Ile Phe Leu Ile Arg Leu Ile Gly Val Leu Ser
485 490 495

Ser Leu Phe Arg Pro Lys Arg Arg Pro Ile Tyr Lys Ser Asp Val Glu
500 505 510

Met Ala His Phe Arg
515

<210> 19
<211> 523
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 19

Met Thr Ser Val Leu Phe Met Val Gly Val Leu Leu Gly Ala Phe Gly
1 5 10 15

Ser Thr His Cys Ser Ile Gln Ile Val Phe Pro Ser Glu Thr Lys Leu
20 25 30

Val Trp Lys Pro Val Leu Lys Gly Thr Arg Tyr Cys Pro Gln Ser Ala
35 40 45

Glu Leu Asn Leu Glu Pro Asp Leu Lys Thr Met Ala Phe Asp Ser Lys
50 55 60

[0011]

Val Pro Ile Gly Ile Thr Pro Ser Asn Ser Asp Gly Tyr Leu Cys His
65 70 75 80

Ala Ala Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys
85 90 95

Tyr Ile Thr His Ser Val His Ser Leu Arg Pro Thr Val Ser Asp Cys
100 105 110

Lys Ala Ala Val Glu Ala Tyr Asn Ala Gly Thr Leu Met Tyr Pro Gly
115 120 125

Phe Pro Pro Glu Ser Cys Gly Tyr Ala Ser Ile Thr Asp Ser Glu Phe
130 135 140

Tyr Val Met Leu Val Thr Pro His Pro Val Gly Val Asp Asp Tyr Arg
145 150 155 160

Gly His Trp Val Asp Pro Leu Phe Pro Thr Ser Glu Cys Asn Ser Asn
165 170 175

Phe Cys Glu Thr Val His Asn Ala Thr Met Trp Ile Pro Lys Asp Leu
180 185 190

Lys Thr His Asp Val Cys Ser Gln Asp Phe Gln Thr Ile Arg Val Ser
195 200 205

Val Met Tyr Pro Gln Thr Lys Pro Thr Lys Gly Ala Asp Leu Thr Leu
210 215 220

Lys Ser Lys Phe His Ala His Met Lys Gly Asp Arg Val Cys Lys Met
225 230 235 240

Lys Phe Cys Asn Lys Asn Gly Leu Arg Leu Gly Asn Gly Glu Trp Ile
245 250 255

Glu Val Gly Asp Glu Val Met Leu Asp Asn Ser Lys Leu Leu Ser Leu
260 265 270

Phe Pro Asp Cys Leu Val Gly Ser Val Val Lys Ser Thr Leu Leu Ser
275 280 285

Glu Gly Val Gln Thr Ala Leu Trp Glu Thr Asp Arg Leu Leu Asp Tyr
290 295 300

Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp Glu Lys Ile Asp Arg Lys Glu Pro Leu
305 310 315 320

Ser Ala Val Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Pro Arg Ser Pro Gly Lys Gly
325 330 335

Met Ala Tyr Ile Val Ala Asn Gly Ser Leu Met Ser Ala Pro Ala Arg
340 345 350

Tyr Ile Arg Val Trp Ile Asp Ser Pro Ile Leu Lys Glu Ile Lys Gly
355 360 365

[0012] Lys Lys Glu Ser Ala Ser Gly Ile Asp Thr Val Leu Trp Glu Gln Trp
370 375 380

Leu Pro Phe Asn Gly Met Glu Leu Gly Pro Asn Gly Leu Ile Lys Thr
385 390 395 400

Lys Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu Tyr Leu Leu Gly Met Gly Ile Val
405 410 415

Asp Gln Asp Leu Gln Glu Leu Ser Ser Val Asn Pro Val Asp His Pro
420 425 430

His Val Pro Ile Ala Gln Ala Phe Val Ser Glu Gly Glu Glu Val Phe
435 440 445

Phe Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Ile Glu Leu Ile Ser Gly
450 455 460

Trp Phe Ser Asp Trp Lys Glu Thr Ala Ala Ala Leu Gly Phe Ala Ala
465 470 475 480

Ile Ser Val Ile Leu Ile Ile Gly Leu Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu
485 490 495

Cys Arg Arg Arg Lys Gln Lys Lys Val Ile Tyr Lys Asp Val Glu Leu
500 505 510

Asn Ser Phe Asp Pro Arg Gln Ala Phe His Arg
515 520

<210> 20
<211> 518
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 20

Met Thr Asp Thr Val Leu Gly Lys Phe Gln Ile Val Phe Pro Asp Gln
1 5 10 15

Asn Glu Leu Glu Trp Thr Pro Val Val Gly Asp Ser Arg His Cys Pro
20 25 30

Gln Ser Ser Glu Met Gln Phe Asp Gly Ser Arg Ser Gln Thr Ile Leu
35 40 45

Thr Gly Lys Ala Pro Val Gly Ile Thr Pro Ser Lys Ser Asp Gly Phe
50 55 60

Ile Cys His Ala Ala Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr
65 70 75 80

Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile His His Leu Arg Pro Thr Thr
85 90 95

Ser Asp Cys Glu Thr Ala Leu Gln Arg Tyr Lys Asp Gly Ser Leu Ile
100 105 110

Asn Leu Gly Phe Pro Pro Glu Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp
115 120 125

[0013]

Ser Glu Ala Met Leu Val Gln Val Thr Pro His His Val Gly Val Asp
130 135 140

Asp Tyr Arg Gly His Trp Ile Asp Pro Leu Phe Pro Gly Gly Glu Cys
145 150 155 160

Ser Thr Asn Phe Cys Asp Thr Val His Asn Ser Ser Val Trp Ile Pro
165 170 175

Lys Ser Gln Lys Thr Asp Ile Cys Ala Gln Ser Phe Lys Asn Ile Lys
180 185 190

Met Thr Ala Ser Tyr Pro Ser Glu Gly Ala Leu Val Ser Asp Arg Phe
195 200 205

Ala Phe His Ser Ala Tyr His Pro Asn Met Pro Gly Ser Thr Val Cys
210 215 220

Ile Met Asp Phe Cys Glu Gln Lys Gly Leu Arg Phe Thr Asn Gly Glu
225 230 235 240

Trp Met Gly Leu Asn Val Glu Gln Ser Ile Arg Glu Lys Lys Ile Ser
245 250 255

Ala Ile Phe Pro Asn Cys Val Ala Gly Thr Glu Ile Arg Ala Thr Leu
260 265 270

Glu Ser Glu Gly Ala Arg Thr Leu Thr Trp Glu Thr Gln Arg Met Leu

275 280 285

Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp Asp Lys Val Ser Arg Lys Glu
290 295 300

Pro Leu Ser Pro Leu Asp Leu Ser Tyr Leu Ser Pro Arg Ala Pro Gly
305 310 315 320

Lys Gly Met Ala Tyr Thr Val Ile Asn Gly Thr Leu His Ser Ala His
325 330 335

Ala Lys Tyr Ile Arg Thr Trp Ile Asp Tyr Gly Glu Met Lys Glu Ile
340 345 350

Lys Gly Gly Arg Gly Glu Tyr Ser Lys Ala Pro Glu Leu Leu Trp Ser
355 360 365

Gln Trp Phe Asp Phe Gly Pro Phe Lys Ile Gly Pro Asn Gly Leu Leu
370 375 380

His Thr Gly Lys Thr Phe Lys Phe Pro Leu Tyr Leu Ile Gly Ala Gly
385 390 395 400

Ile Ile Asp Glu Asp Leu His Glu Leu Asp Glu Ala Ala Pro Ile Asp
405 410 415

His Pro Gln Met Pro Asp Ala Lys Ser Val Leu Pro Glu Asp Glu Glu
420 425 430

[0014]

Ile Phe Phe Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Ile Glu Leu Ile
435 440 445

Gln Gly Trp Phe Ser Asn Trp Arg Glu Ser Val Met Ala Ile Val Gly
450 455 460

Ile Val Leu Leu Ile Val Val Thr Phe Leu Ala Ile Lys Thr Val Arg
465 470 475 480

Val Leu Asn Cys Leu Trp Arg Pro Arg Lys Lys Arg Ile Val Arg Gln
485 490 495

Glu Val Asp Val Glu Ser Arg Leu Asn His Phe Glu Met Arg Gly Phe
500 505 510

Pro Glu Tyr Val Lys Arg
515

<210> 21
<211> 509
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 21

Met Ser Ile Ile Ser Tyr Ile Ala Phe Leu Leu Leu Ile Asp Ser Thr
1 5 10 15

Leu Gly Ile Pro Ile Phe Val Pro Ser Gly Gln Asn Ile Ser Trp Gln
20 25 30

Pro Val Ile Gln Pro Phe Asp Tyr Gln Cys Pro Ile His Gly Asn Leu
35 40 45

Pro Asn Thr Met Gly Leu Ser Ala Thr Lys Leu Thr Ile Lys Ser Pro
50 55 60

Ser Val Phe Ser Thr Asp Lys Val Ser Gly Trp Ile Cys His Ala Ala
65 70 75 80

Glu Trp Lys Thr Thr Cys Asp Tyr Arg Trp Tyr Gly Pro Gln Tyr Ile
85 90 95

Thr His Ser Ile His Pro Ile Ser Pro Thr Ile Asp Glu Cys Lys Arg
100 105 110

Ile Ile Ser Arg Ile Ala Ser Gly Thr Asp Glu Asp Leu Gly Phe Pro
115 120 125

Pro Gln Ser Cys Gly Trp Ala Ser Val Thr Thr Val Ser Asn Thr Asn
130 135 140

Tyr Lys Val Val Pro His Ser Val His Leu Glu Pro Tyr Gly Gly His
145 150 155 160

Trp Ile Asp His Asp Phe Asn Gly Gly Glu Cys Arg Glu Lys Val Cys
165 170 175

[0015] Glu Met Lys Gly Asn His Ser Ile Trp Ile Thr Asp Glu Thr Val Gln
180 185 190

His Glu Cys Glu Lys His Ile Glu Glu Val Glu Gly Ile Met Tyr Gly
195 200 205

Asn Ala Pro Arg Gly Asp Ala Ile Tyr Ile Asn Asn Phe Ile Ile Asp
210 215 220

Lys His His Arg Val Tyr Arg Phe Gly Gly Ser Cys Arg Met Lys Phe
225 230 235 240

Cys Asn Lys Asp Gly Ile Lys Phe Thr Arg Gly Asp Trp Val Glu Lys
245 250 255

Thr Ala Gly Thr Leu Thr Asn Ile Tyr Glu Asn Ile Pro Glu Cys Ala
260 265 270

Asp Gly Thr Leu Val Ser Gly His Arg Pro Gly Leu Asp Leu Ile Asp
275 280 285

Thr Val Phe Asn Leu Glu Asn Val Val Glu Tyr Thr Leu Cys Glu Gly
290 295 300

Thr Lys Arg Lys Ile Asn Lys Gln Glu Lys Leu Thr Ser Val Asp Leu
305 310 315 320

Ser Tyr Leu Ala Pro Arg Ile Gly Gly Phe Gly Ser Val Phe Arg Val
325 330 335

Arg Asn Gly Thr Leu Glu Arg Gly Ser Thr Thr Tyr Ile Arg Ile Glu
340 345 350

Val Glu Gly Pro Val Val Asp Ser Leu Asn Gly Ile Asp Pro Arg Thr
355 360 365

Asn Ala Ser Arg Val Phe Trp Asp Asp Trp Glu Leu Asp Gly Asn Ile
370 375 380

Tyr Gln Gly Phe Asn Gly Val Tyr Lys Gly Lys Asp Gly Lys Ile His
385 390 395 400

Ile Pro Leu Asn Met Ile Glu Ser Gly Ile Ile Asp Asp Glu Leu Gln
405 410 415

His Ala Phe Gln Ala Asp Ile Ile Pro His Pro His Tyr Asp Asp Asp
420 425 430

Glu Ile Arg Glu Asp Asp Ile Phe Phe Asp Asn Thr Gly Glu Asn Gly
435 440 445

Asn Pro Val Asp Ala Val Val Glu Trp Val Ser Gly Trp Gly Thr Ser
450 455 460

Leu Lys Phe Phe Gly Met Thr Leu Val Ala Leu Ile Leu Ile Phe Leu
465 470 475 480

Leu Ile Arg Cys Cys Val Ala Cys Thr Tyr Leu Met Lys Lys Ser Lys
485 490 495

[0016]

Arg Pro Ala Thr Glu Ser His Glu Met Arg Ser Leu Val
500 505

<210> 22
<211> 511
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 22

Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys
1 5 10 15

Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn
20 25 30

Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Leu Asn Trp
35 40 45

His Asn Asp Leu Ile Gly Thr Ala Ile Gln Val Lys Met Pro Lys Ser
50 55 60

His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ser Lys Trp
65 70 75 80

Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr Gln
85 90 95

Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro Ser Val Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile
100 105 110

Glu Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Leu Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln
115 120 125

Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala Val Ile Val Gln
130 135 140

Val Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Val
145 150 155 160

Asp Ser Gln Phe Ile Asn Gly Lys Cys Ser Asn Tyr Ile Cys Pro Thr
165 170 175

Val His Asn Ser Thr Thr Trp His Ser Asp Tyr Lys Val Lys Gly Leu
180 185 190

Cys Asp Ser Asn Leu Ile Ser Met Asp Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp
195 200 205

Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly Lys Glu Gly Thr Gly Phe Arg Ser Asn
210 215 220

Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Gly Lys Ala Cys Lys Met Gln Tyr Cys
225 230 235 240

Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Met Ala
245 250 255

[0017] Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Ala Arg Phe Pro Glu Cys Pro Glu Gly
260 265 270

Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Asp Val Ser Leu Ile
275 280 285

Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr Trp
290 295 300

Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr
305 310 315 320

Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn
325 330 335

Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Val Asp Ile Ala
340 345 350

Ala Pro Ile Leu Ser Arg Met Val Gly Met Ile Ser Gly Thr Thr Thr
355 360 365

Glu Arg Glu Leu Trp Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile
370 375 380

Gly Pro Asn Gly Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu
385 390 395 400

Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu Ser Ser
405 410 415

Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln
420 425 430

Leu Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys
435 440 445

Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Ser
450 455 460

Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu
465 470 475 480

Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys
485 490 495

Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
500 505 510

<210> 23
<211> 524
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 23

Met Thr Ser Ser Val Thr Ile Ser Val Val Leu Leu Ile Ser Phe Ile
1 5 10 15

Thr Pro Leu Tyr Ser Tyr Leu Ser Ile Ala Phe Pro Glu Asn Thr Lys
20 25 30

[0018]

Leu Asp Trp Lys Pro Val Thr Lys Asn Thr Arg Tyr Cys Pro Met Gly
35 40 45

Gly Glu Trp Phe Leu Glu Pro Gly Leu Gln Glu Glu Ser Phe Leu Ser
50 55 60

Ser Thr Pro Ile Gly Ala Thr Pro Ser Lys Ser Asp Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80

His Ala Ala Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro
85 90 95

Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile His Asn Ile Lys Pro Thr Arg Ser Asp
100 105 110

Cys Asp Thr Ala Leu Ala Ser Tyr Lys Ser Gly Thr Leu Val Ser Leu
115 120 125

Gly Phe Pro Pro Glu Ser Cys Gly Tyr Ala Ser Val Thr Asp Ser Glu
130 135 140

Phe Leu Val Ile Met Ile Thr Pro His His Val Gly Val Asp Asp Tyr
145 150 155 160

Arg Gly His Trp Val Asp Pro Leu Phe Val Gly Gly Glu Cys Asp Gln
165 170 175

Ser Tyr Cys Asp Thr Ile His Asn Ser Ser Val Trp Ile Pro Ala Asp

180 185 190

Gln Thr Lys Lys Asn Ile Cys Gly Gln Ser Phe Thr Pro Leu Thr Val
195 200 205

Thr Val Ala Tyr Asp Lys Thr Lys Glu Ile Ala Ala Gly Gly Ile Val
210 215 220

Phe Lys Ser Lys Tyr His Ser His Met Glu Gly Ala Arg Thr Cys Arg
225 230 235 240

Leu Ser Tyr Cys Gly Arg Asn Gly Ile Lys Phe Pro Asn Gly Glu Trp
245 250 255

Val Ser Leu Met Leu Lys Leu Arg Ser Lys Arg Asn Leu Tyr Phe Pro
260 265 270

Cys Leu Lys Met Cys Pro Thr Gly Ile Arg Gly Glu Ile Tyr Pro Ser
275 280 285

Ile Arg Trp Ala Gln Val Leu Thr Ser Glu Ile Gln Arg Ile Leu Asp
290 295 300

Tyr Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp Asp Lys Val Glu Arg Lys Glu Pro
305 310 315 320

Leu Ser Pro Leu Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Ser Pro Gly Lys
325 330 335

[0019] Gly Leu Ala Tyr Thr Val Ile Asn Gly Thr Leu Ser Phe Ala His Thr
340 345 350

Arg Tyr Val Arg Met Trp Ile Asp Gly Pro Val Leu Lys Glu Pro Lys
355 360 365

Gly Lys Arg Glu Ser Pro Ser Gly Ile Ser Ser Asp Ile Trp Thr Gln
370 375 380

Trp Phe Lys Tyr Gly Asp Met Glu Ile Gly Pro Asn Gly Leu Leu Lys
385 390 395 400

Thr Ala Gly Gly Tyr Lys Phe Pro Trp His Leu Ile Gly Met Gly Ile
405 410 415

Val Asp Asn Glu Leu His Glu Leu Ser Glu Ala Asn Pro Leu Asp His
420 425 430

Pro Gln Leu Pro His Ala Gln Ser Ile Ala Asp Asp Ser Glu Glu Ile
435 440 445

Phe Phe Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Val Glu Leu Val Thr
450 455 460

Gly Trp Phe Thr Ser Trp Lys Glu Ser Leu Ala Ala Gly Ser Cys Pro
465 470 475 480

Asp Leu Arg Cys Pro Pro Leu Phe Pro Gly Ile Val Tyr Tyr Leu Gln
485 490 495

Lys Ala Gln Met Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Asp Ser Phe Glu Met
500 505 510

Arg Ile Phe Lys Pro Asn Asn Met Arg Ala Arg Val
515 520

<210> 24
<211> 529
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 24

Met Asp Leu Phe Pro Ile Leu Val Val Val Leu Met Thr Asp Thr Val
1 5 10 15

Leu Gly Lys Phe Gln Ile Val Phe Pro Asp Gln Asn Glu Leu Glu Trp
20 25 30

Arg Pro Val Val Gly Asp Ser Arg His Cys Pro Gln Ser Ser Glu Met
35 40 45

Gln Phe Asp Gly Ser Arg Ser Gln Thr Ile Leu Thr Gly Lys Ala Pro
50 55 60

Val Gly Ile Thr Pro Ser Lys Ser Asp Gly Phe Ile Cys His Ala Ala
65 70 75 80

[0020] Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile
85 90 95

Thr His Ser Ile His His Leu Arg Pro Thr Thr Ser Asp Cys Glu Thr
100 105 110

Ala Leu Gln Arg Tyr Lys Asp Gly Ser Leu Ile Asn Leu Gly Phe Pro
115 120 125

Pro Glu Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ser Glu Ala Met Leu
130 135 140

Val Gln Val Thr Pro His His Val Gly Val Asp Asp Tyr Arg Gly His
145 150 155 160

Trp Ile Asp Pro Leu Phe Pro Gly Gly Glu Cys Ser Thr Asn Phe Cys
165 170 175

Asp Thr Val His Asn Ser Ser Val Trp Ile Pro Lys Ser Gln Lys Thr
180 185 190

Asp Ile Cys Ala Gln Ser Phe Lys Asn Ile Lys Met Thr Ala Ser Tyr
195 200 205

Pro Ser Glu Gly Ala Leu Val Ser Asp Arg Phe Ala Phe His Ser Ala
210 215 220

Tyr His Pro Asn Met Pro Gly Ser Thr Val Cys Ile Met Asp Phe Cys
225 230 235 240

Glu Gln Lys Gly Leu Arg Phe Thr Asn Gly Glu Trp Met Gly Leu Asn
245 250 255

Val Glu Gln Ser Ile Arg Glu Lys Lys Ile Ser Ala Ile Phe Pro Asn
260 265 270

Cys Val Ala Gly Thr Glu Ile Arg Ala Thr Leu Glu Ser Glu Gly Ala
275 280 285

Arg Thr Leu Thr Trp Glu Thr Gln Arg Met Leu Asp Tyr Ser Leu Cys
290 295 300

Gln Asn Thr Trp Asp Lys Val Ser Arg Lys Glu Pro Leu Ser Pro Leu
305 310 315 320

Asp Leu Ser Tyr Leu Ser Pro Arg Ala Pro Gly Lys Gly Met Ala Tyr
325 330 335

Thr Val Ile Asn Gly Thr Leu His Ser Ala His Ala Lys Tyr Ile Arg
340 345 350

Thr Trp Ile Asp Tyr Gly Glu Met Lys Glu Ile Lys Gly Gly Arg Gly
355 360 365

Glu Tyr Ser Lys Ala Pro Glu Leu Leu Trp Ser Gln Trp Phe Asp Phe
370 375 380

Gly Pro Phe Lys Ile Gly Pro Asn Gly Leu Leu His Thr Gly Lys Thr
385 390 395 400

[0021]

Phe Lys Phe Pro Leu Tyr Leu Ile Gly Ala Gly Ile Ile Asp Glu Asp
405 410 415

Leu His Glu Leu Asp Glu Ala Ala Pro Ile Asp His Pro Gln Met Pro
420 425 430

Asp Ala Lys Ser Val Leu Pro Glu Asp Glu Glu Ile Phe Phe Gly Asp
435 440 445

Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Ile Glu Leu Ile Gln Gly Trp Phe Ser
450 455 460

Asn Trp Arg Glu Ser Val Met Ala Ile Val Gly Ile Val Leu Leu Ile
465 470 475 480

Val Val Thr Phe Leu Ala Ile Lys Thr Val Arg Val Leu Asn Cys Leu
485 490 495

Trp Arg Pro Arg Lys Lys Arg Ile Val Arg Gln Glu Val Asp Val Glu
500 505 510

Ser Arg Leu Asn His Phe Glu Met Arg Gly Phe Pro Glu Tyr Val Lys
515 520 525

Arg

<210> 25

<211> 517
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 25

Met Leu Ser Tyr Leu Ile Phe Ala Leu Ala Val Ser Pro Ile Leu Gly
1 5 10 15

Lys Ile Glu Ile Val Phe Pro Gln His Thr Thr Gly Asp Trp Lys Arg
20 25 30

Val Pro His Glu Tyr Asn Tyr Cys Pro Thr Ser Ala Asp Lys Asn Ser
35 40 45

His Gly Thr Gln Thr Gly Ile Pro Val Glu Leu Thr Met Pro Lys Gly
50 55 60

Leu Thr Thr His Gln Val Glu Gly Phe Met Cys His Ser Ala Leu Trp
65 70 75 80

Met Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His
85 90 95

Ser Ile His Asn Glu Glu Pro Thr Asp Tyr Gln Cys Leu Glu Ala Ile
100 105 110

Lys Ser Tyr Lys Asp Gly Val Ser Phe Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln
115 120 125

[0022] Ser Cys Gly Tyr Gly Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala His Ile Val Thr
130 135 140

Val Thr Pro His Ser Val Lys Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Ile
145 150 155 160

Asp Pro His Phe Ile Gly Gly Arg Cys Lys Gly Gln Ile Cys Glu Thr
165 170 175

Val His Asn Ser Thr Lys Trp Phe Thr Ser Ser Asp Gly Glu Ser Val
180 185 190

Cys Ser Gln Leu Phe Thr Leu Val Gly Gly Ile Phe Phe Ser Asp Ser
195 200 205

Glu Glu Ile Thr Ser Met Gly Leu Pro Glu Thr Gly Ile Arg Ser Asn
210 215 220

Tyr Phe Pro Tyr Ile Ser Thr Glu Gly Ile Cys Lys Met Pro Phe Cys
225 230 235 240

Arg Lys Gln Gly Tyr Lys Leu Lys Asn Asp Leu Trp Phe Gln Ile Met
245 250 255

Asp Pro Asp Leu Asp Lys Thr Val Arg Asp Leu Pro His Ile Lys Asp
260 265 270

Cys Asp Leu Ser Ser Ser Ile Ile Thr Pro Gly Glu His Ala Thr Asp
275 280 285

Ile Ser Leu Ile Ser Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ala Leu Cys
290 295 300

Gln Asn Thr Trp Ser Lys Ile Glu Ser Gly Glu Pro Ile Thr Pro Val
305 310 315 320

Asp Leu Ser Tyr Leu Gly Pro Lys Asn Pro Gly Val Gly Pro Val Phe
325 330 335

Thr Ile Ile Asn Gly Ser Leu His Tyr Phe Thr Ser Lys Tyr Leu Arg
340 345 350

Val Glu Leu Glu Ser Pro Val Ile Pro Arg Met Glu Gly Lys Val Ala
355 360 365

Gly Thr Arg Ile Val Arg Gln Leu Trp Asp Gln Trp Phe Pro Phe Gly
370 375 380

Glu Val Glu Ile Gly Pro Asn Gly Val Leu Lys Thr Lys Gln Gly Tyr
385 390 395 400

Lys Phe Pro Leu His Ile Ile Gly Thr Gly Glu Val Asp Ser Asp Ile
405 410 415

Lys Met Glu Arg Val Val Lys His Trp Glu His Pro His Ile Glu Ala
420 425 430

Ala Gln Thr Phe Leu Lys Lys Asp Asp Thr Gly Glu Val Leu Tyr Tyr
435 440 445

[0023]

Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Val Glu Leu Val Glu Gly Trp
450 455 460

Phe Ser Gly Trp Arg Ser Ser Leu Met Gly Val Leu Ala Val Ile Ile
465 470 475 480

Gly Phe Val Ile Leu Met Phe Leu Ile Lys Leu Ile Gly Val Leu Ser
485 490 495

Ser Leu Phe Arg Pro Lys Arg Arg Pro Ile Tyr Lys Ser Asp Val Glu
500 505 510

Met Ala His Phe Arg
515

<210> 26
<211> 512
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 26

Met Asn Phe Leu Leu Leu Thr Phe Ile Val Leu Pro Leu Cys Ser His
1 5 10 15

Ala Lys Phe Ser Ile Val Phe Pro Gln Ser Gln Lys Gly Asn Trp Lys
20 25 30

Asn Val Pro Ser Ser Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Gln Asn

35 40 45

Trp His Asn Asp Leu Leu Gly Ile Thr Met Lys Val Lys Met Pro Lys
50 55 60

Thr His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ala Lys
65 70 75 80

Trp Ile Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr
85 90 95

His Ser Ile His Ser Ile Gln Pro Thr Ser Glu Gln Cys Lys Glu Ser
100 105 110

Ile Lys Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Met Ser Pro Gly Phe Pro Pro
115 120 125

Gln Asn Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ser Val Ala Val Val Val
130 135 140

Gln Ala Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp
145 150 155 160

Ile Asp Ser Gln Phe Pro Asn Gly Lys Cys Glu Thr Glu Glu Cys Glu
165 170 175

Thr Val His Asn Ser Thr Val Trp Tyr Ser Asp Tyr Lys Val Thr Gly
180 185 190

[0024]

Leu Cys Asp Ala Thr Leu Val Asp Thr Glu Ile Thr Phe Phe Ser Glu
195 200 205

Asp Gly Lys Lys Glu Ser Ile Gly Lys Pro Asn Thr Gly Tyr Arg Ser
210 215 220

Asn Tyr Phe Ala Tyr Glu Lys Gly Asp Lys Val Cys Lys Met Asn Tyr
225 230 235 240

Cys Lys His Ala Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Phe
245 250 255

Val Asp Gln Asp Val Tyr Ala Ala Ala Lys Leu Pro Glu Cys Pro Val
260 265 270

Gly Ala Thr Ile Ser Ala Pro Thr Gln Thr Ser Val Asp Val Ser Leu
275 280 285

Ile Leu Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr
290 295 300

Trp Ser Lys Ile Arg Ser Lys Gln Pro Val Ser Pro Val Asp Leu Ser
305 310 315 320

Tyr Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile
325 330 335

Asn Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Ile Asp Ile
340 345 350

Asp Asn Pro Ile Ile Ser Lys Met Val Gly Lys Ile Ser Gly Ser Gln
355 360 365

Thr Glu Arg Glu Leu Trp Thr Glu Trp Phe Pro Tyr Glu Gly Val Glu
370 375 380

Ile Gly Pro Asn Gly Ile Leu Lys Thr Pro Thr Gly Tyr Lys Phe Pro
385 390 395 400

Leu Phe Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Lys Thr
405 410 415

Ser Gln Ala Glu Val Phe Glu His Pro His Leu Ala Glu Ala Pro Lys
420 425 430

Gln Leu Pro Glu Glu Glu Thr Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Ile Ser
435 440 445

Lys Asn Pro Val Glu Leu Ile Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser
450 455 460

Thr Val Val Thr Phe Phe Phe Ala Ile Gly Val Phe Ile Leu Leu Tyr
465 470 475 480

Val Val Ala Arg Ile Val Ile Ala Val Arg Tyr Arg Tyr Gln Gly Ser
485 490 495

[0025] Asn Asn Lys Arg Ile Tyr Asn Asp Ile Glu Met Ser Arg Phe Arg Lys
500 505 510

<210> 27
<211> 523
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 27

Met Thr Ser Val Leu Phe Met Val Gly Val Leu Leu Gly Ala Phe Gly
1 5 10 15

Ser Thr His Cys Ser Ile Gln Ile Val Phe Pro Ser Glu Thr Lys Leu
20 25 30

Val Trp Lys Pro Val Leu Lys Gly Thr Arg Tyr Cys Pro Gln Ser Ala
35 40 45

Glu Leu Asn Leu Glu Pro Asp Leu Lys Thr Met Ala Phe Asp Ser Lys
50 55 60

Val Pro Ile Gly Ile Thr Pro Ser Asn Ser Asp Gly Tyr Leu Cys His
65 70 75 80

Ala Ala Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys
85 90 95

Tyr Ile Thr His Ser Val His Ser Leu Arg Pro Thr Val Ser Asp Cys
100 105 110

Lys Ala Ala Val Glu Ala Tyr Asn Ala Gly Thr Leu Met Tyr Pro Gly
115 120 125

Phe Pro Pro Glu Ser Cys Gly Tyr Ala Ser Ile Thr Asp Ser Glu Phe
130 135 140

Tyr Val Met Leu Val Thr Pro His Pro Val Gly Val Asp Asp Tyr Arg
145 150 155 160

Gly His Trp Val Asp Pro Leu Phe Pro Thr Ser Glu Cys Asn Ser Asn
165 170 175

Phe Cys Glu Thr Val His Asn Ala Thr Met Trp Ile Pro Lys Asp Leu
180 185 190

Lys Thr His Asp Val Cys Ser Gln Asp Phe Gln Thr Ile Arg Val Ser
195 200 205

Val Met Tyr Pro Gln Thr Lys Pro Thr Lys Gly Ala Asp Leu Thr Leu
210 215 220

Lys Ser Lys Phe His Ala His Met Lys Gly Asp Arg Val Cys Lys Met
225 230 235 240

Lys Phe Cys Asn Lys Asn Gly Leu Arg Leu Gly Asn Gly Glu Trp Ile
245 250 255

Glu Val Gly Asp Glu Val Met Leu Asp Asn Ser Lys Leu Leu Ser Leu
260 265 270

[0026]

Phe Pro Asp Cys Leu Val Gly Ser Val Val Lys Ser Thr Leu Leu Ser
275 280 285

Glu Gly Val Gln Thr Ala Leu Trp Glu Thr Asp Arg Leu Leu Asp Tyr
290 295 300

Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp Glu Lys Ile Asp Arg Lys Glu Pro Leu
305 310 315 320

Ser Ala Val Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Pro Arg Ser Pro Gly Lys Gly
325 330 335

Met Ala Tyr Ile Val Ala Asn Gly Ser Leu Met Ser Ala Pro Ala Arg
340 345 350

Tyr Ile Arg Val Trp Ile Asp Ser Pro Ile Leu Lys Glu Ile Lys Gly
355 360 365

Lys Lys Glu Ser Ala Ser Gly Ile Asp Thr Val Leu Trp Glu Gln Trp
370 375 380

Leu Pro Phe Asn Gly Met Glu Leu Gly Pro Asn Gly Leu Ile Lys Thr
385 390 395 400

Lys Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu Tyr Leu Leu Gly Met Gly Ile Val
405 410 415

Asp Gln Asp Leu Gln Glu Leu Ser Ser Val Asn Pro Val Asp His Pro

420 425 430

His Val Pro Ile Ala Gln Ala Phe Val Ser Glu Gly Glu Glu Val Phe
435 440 445

Phe Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Ile Glu Leu Ile Ser Gly
450 455 460

Trp Phe Ser Asp Trp Lys Glu Thr Ala Ala Ala Leu Gly Phe Ala Ala
465 470 475 480

Ile Ser Val Ile Leu Ile Ile Gly Leu Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu
485 490 495

Cys Arg Arg Arg Lys Gln Lys Lys Val Ile Tyr Lys Asp Val Glu Leu
500 505 510

Asn Ser Phe Asp Pro Arg Gln Ala Phe His Arg
515 520

<210> 28
<211> 509
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 28

Met Ser Ile Ile Ser Tyr Ile Ala Phe Leu Leu Leu Ile Asp Ser Thr
1 5 10 15

[0027] Phe Gly Ile Pro Ile Phe Val Pro Ser Gly Gln Asn Ile Ser Trp Gln
20 25 30

Pro Val Ile Gln Pro Phe Asp Tyr Gln Cys Pro Ile His Gly Asn Leu
35 40 45

Pro Asn Thr Met Gly Leu Ser Ala Thr Lys Leu Thr Ile Lys Ser Pro
50 55 60

Ser Val Phe Ser Thr Asp Lys Val Ser Gly Trp Ile Cys His Ala Ala
65 70 75 80

Glu Trp Lys Thr Thr Cys Asp Tyr Arg Trp Tyr Gly Pro Gln Tyr Ile
85 90 95

Thr His Ser Ile His Pro Ile Ser Pro Thr Ile Asp Glu Cys Lys Arg
100 105 110

Ile Ile Ser Arg Ile Ala Ser Gly Thr Asp Glu Asp Leu Gly Phe Pro
115 120 125

Pro Gln Ser Cys Gly Trp Ala Ser Val Thr Thr Val Ser Asn Thr Asn
130 135 140

Tyr Lys Val Val Pro His Ser Val His Leu Glu Pro Tyr Gly Gly His
145 150 155 160

Trp Ile Asp His Glu Phe Asn Gly Gly Glu Cys Arg Glu Lys Val Cys
165 170 175

Glu Met Lys Gly Asn His Ser Ile Trp Ile Thr Asp Glu Thr Val Gln
180 185 190

His Glu Cys Glu Lys His Ile Glu Glu Val Glu Gly Ile Met Tyr Gly
195 200 205

Asn Ala Pro Arg Gly Asp Ala Ile Tyr Ile Asn Asn Phe Ile Ile Asp
210 215 220

Lys His His Arg Val Tyr Arg Phe Gly Gly Ser Cys Arg Met Lys Phe
225 230 235 240

Cys Asn Lys Asp Gly Ile Lys Phe Thr Arg Gly Asp Trp Val Glu Lys
245 250 255

Thr Ala Glu Thr Leu Thr Asn Ile Tyr Ala Asn Ile Pro Glu Cys Ala
260 265 270

Asp Gly Thr Leu Val Ser Gly His Arg Pro Gly Leu Asp Leu Ile Asp
275 280 285

Thr Val Phe Asn Leu Glu Asn Val Val Glu Tyr Thr Leu Cys Glu Gly
290 295 300

Thr Lys Arg Lys Ile Asn Asn Gln Glu Lys Leu Thr Ser Val Asp Leu
305 310 315 320

[0028] Ser Tyr Leu Ala Pro Arg Ile Gly Gly Phe Gly Ser Val Phe Arg Val
325 330 335

Arg Asn Gly Thr Leu Glu Arg Gly Ser Thr Thr Tyr Ile Lys Ile Glu
340 345 350

Val Glu Gly Pro Ile Val Asp Ser Leu Asn Gly Thr Asp Pro Arg Thr
355 360 365

Asn Ala Ser Arg Val Phe Trp Asp Asp Trp Glu Leu Asp Gly Asn Ile
370 375 380

Tyr Gln Gly Phe Asn Gly Val Tyr Lys Gly Lys Asp Gly Lys Ile His
385 390 395 400

Ile Pro Leu Asn Met Ile Glu Ser Gly Ile Ile Asp Asp Glu Leu Gln
405 410 415

His Ala Phe Gln Ala Asp Ile Ile Pro His Pro His Tyr Asp Asp Asp
420 425 430

Glu Ile Arg Glu Asp Asp Ile Phe Phe Asp Asn Thr Gly Glu Asn Gly
435 440 445

Asn Pro Val Asp Ala Val Val Glu Trp Val Ser Gly Trp Gly Thr Ser
450 455 460

Leu Lys Phe Phe Gly Thr Thr Leu Val Ala Leu Ile Leu Ile Phe Leu
465 470 475 480

Leu Ile Arg Cys Cys Val Ala Cys Thr Tyr Leu Met Lys Lys Ser Lys
485 490 495

Arg Pro Ala Thr Glu Ser His Glu Met Arg Ser Phe Val
500 505

<210> 29
<211> 4555
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Trip sEwnv vector

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4555)
<223> Trip sEwnv vector

<400> 29

[0029]

tggaagggct aattcactcc caacgaagac aagatatcct tgatctgtgg atctaccaca 60
cacaaggcta cttccctgat tagcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac 120
tgacctttgg atggtgctac aagctagtac cagttgagcc agagaagtta gaagaagcca 180
acaaaggaga gaacaccagc ttgttacaac ctgtgagcct gcatgggatg gatgacccgg 240
agagagaagt gttagagtgg aggtttgaca gccgcctagc atttcatcac ggtggcccga 300
gagctgcatc cggagtactt caagaactgc tgatatcgag cttgctacaa gggactttcc 360
gctgggggac tttccaggga ggcgtggcct gggcgggact ggggagtggc gagccctcag 420
atcctgcata taagcagctg ctttttgcct gtactgggtc tctctggtta gaccagatct 480
gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct taagcctcaa taaagcttgc 540
cttgagtgct tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga ctctggtaac tagagatccc 600
tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagtgg cgcccgaaca gggacttgaa 660
agcgaaaggg aaaccagagg agctctctcg acgcaggact cggcttgctg aagcgcggaa 720
ttccgcgcca cggcaagagg cgaggggcgg cgactggtga gtacgccaaa aattttgact 780
agcggaggct agaaggagag agatgggtgc gagagcgtca gtattaagcg ggggagaatt 840
agatcgcgat gggaaaaaat tcggttaagg ccagggggaa agaaaaaata taaattaaaa 900
catatagtat gggcaagcag ggagctagaa cgattcgcag ttaatcctgg cctgttagaa 960
acatcagaag gctgtagaca aatactggga cagctacaac catcccttca gacaggatca 1020
gaagaactta gatcattata taatacagta gcaaccctct attgtgtgca tcaaaggata 1080
gagataaaag acaccaagga agctttagac aagatagagg aagagcaaaa caaaagtaag 1140
accaccgcac agcaagcggc cgctgatctt cagacctgga ggaggagata tgagggacaa 1200
ttggagaagt gaattatata aatataaagt agtaaaaatt gaaccattag gagtagcacc 1260
caccaaggca aagagaagag tggtgcagag agaaaaaaga gcagtgggaa taggagcttt 1320
gttccttggg ttcttgggag cagcaggaag cactatgggc gcagcgtcaa tgacgctgac 1380
ggtacaggcc agacaattat tgtctggtat agtgcagcag cagaacaatt tgctgagggc 1440
tattgaggcg caacagcatc tgttgcaact cacagtctgg ggcatcaagc agctccaggc 1500
aagaatcctg gctgtggaaa gatacctaaa ggatcaacag ctcctgggga tttggggttg 1560
ctctggaaaa ctcatttgca ccactgctgt gccttggaat gctagttgga gtaataaatc 1620

tctggaacag atttggaatc acacgacctg gatggagtgg gacagagaaa ttaacaatta 1680
cacaagctta atacactcct taattgaaga atcgcaaaac cagcaagaaa agaatgaaca 1740
agaattattg gaattagata aatgggcaag tttgtggaat tggtttaaca taacaaattg 1800
gctgtggtat ataaaattat tcataatgat agtaggaggc ttggtaggtt taagaatagt 1860
ttttgctgta ctttctatag tgaatagagt taggcaggga tattcaccat tatcgtttca 1920
gacccacctc ccaaccccga ggggacccga caggcccgaa ggaatagaag aagaaggtgg 1980
agagagagac agagacagat ccattcgatt agtgaacgga tctcgacggt atcgccgaat 2040
tcacaaatgg cagtattcat ccacaatttt aaaagaaaag gggggattgg gggtacagt 2100
gcaggggaaa gaatagtaga cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaaa 2160
caaattacaa aaattcaaaa ttttcgggtt tattacaggg acagcagaga tccactttgg 2220
ggcgataagc ttgggagttc cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac 2280
cgcccaacga cccccgccca ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa 2340
tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag 2400
tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc 2460
ccgcctggca ttatgcccag tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct 2520
acgtattagt catcgctatt accatggtga tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg 2580
gatagcggtt tgactcacgg ggatttccaa gtctccaccc cattgacgtc aatgggagtt 2640
tgttttggca ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg taacaactcc gccccattga 2700
cgcaaatggg cggtaggcgt gtacggtggg aggtctatat aagcagagct cgtttagtga 2760
[0030] accgtcagat cgcctggaga cgccatccac gctgttttga cctccataga agacaccgac 2820
tctagaggac gtacgatgag agttgtgttt gtcgtgctat tgcttttggt ggccccagct 2880
tacagcttca actgccttgg aatgagcaac agagacttct tggaaggagt gtctggagca 2940
acatgggtgg atttggttct cgaaggcgac agctgcgtga ctatcatgtc taaggacaag 3000
cctaccatcg atgtgaagat gatgaatatg gaggcggtca acctggcaga ggtccgcagt 3060
tattgctatt tggctaccgt cagcgatctc tccaccaaag ctgcgtgccc gaccatggga 3120
gaagctcaca atgacaaacg tgctgaccca gcttttgtgt gcagacaagg agtggtggac 3180
aggggctggg gcaacggctg cggattattt ggcaaaggaa gcattgacac atgcgccaaa 3240
tttgcctgct ctaccaaggc aataggaaga accatcttga aagagaatat caagtacgaa 3300
gtggccattt ttgtccatgg accaactact gtggagtcgc acggaaacta ctccacacag 3360
gttggagcca ctcaggcagg gagattcagc atcactcctg cggcgccttc atacacacta 3420
aagcttggag aatatggaga ggtgacagtg gactgtgaac cacggtcagg gattgacacc 3480
aatgcatact acgtgatgac tgttggaaca aagacgttct tggtccatcg tgagtggttc 3540
atggacctca acctcccttg gagcagtgct ggaagtactg tgtggaggaa cagagagacg 3600
ttaatggagt ttgaggaacc acacgccacg aagcagtctg tgatagcatt gggctcacaa 3660
gagggagctc tgcatcaagc tttggctgga gccattcctg tggaattttc aagcaacact 3720
gtcaagttga cgtcgggtca tttgaagtgt agagtgaaga tggaaaaatt gcagttgaag 3780
ggaacaacct atggcgtctg ttcaaaggct ttcaagtttc ttgggactcc cgcagacaca 3840
ggtcacggca ctgtggtgtt ggaattgcag tacactggca cggatggacc ttgcaaagtt 3900
cctatctcgt cagtggcttc attgaacgac ctaacgccag tgggcagatt ggtcactgtc 3960

aaccctttg tttcagtggc cacggccaac gctaaggtcc tgattgaatt ggaaccaccc 4020
tttggagact catacatagt ggtgggcaga ggagaacaac agatcaatca ccattggcac 4080
aagtctggaa gcagcattgg caaagccttt acaaccaccc tcaaaggagc gcagagacta 4140
gccgctctag gagacacagc ttgggacttt ggatcagttg gaggggtgtt cacctcagtt 4200
gggaaggctg tctaatgcgc gcggtacctt taagaccaat gacttacaag gcagctgtag 4260
atcttagcca ctttttaaaa gaaaaggggg gactggaagg gctaattcac tcccaacgaa 4320
gacaagatcg tcgagagatg ctgcatataa gcagctgctt tttgcttgta ctgggtctct 4380
ctggttagac cagatctgag cctgggagct ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa 4440
gcctcaataa agcttgcctt gagtgcttca agtagtgtgt gcccgtctgt tgtgtgactc 4500
tggtaactag agatccctca gaccctttta gtcagtgtgg aaaatctcta gcagt 4555

<210> 30
<211> 4023
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Trip GFP

<400> 30
tggaagggct aattcactcc caacgaagac aagatatcct tgatctgtgg atctaccaca 60
cacaaggcta ctccctgat tagcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac 120
tgacctttgg atggtgctac aagctagtac cagttgagcc agagaagtta gaagaagcca 180
acaaaggaga gaacaccagc ttgttacaac ctgtgagcct gcatgggatg gatgacccgg 240
[0031] agagagaagt gttagagtgg aggtttgaca gccgcctagc atttcatcac ggtggcccga 300
gagctgcatc cggagtactt caagaactgc tgatatcgag cttgctacaa gggactttcc 360
gctgggggac tttccaggga ggcgtggcct gggcgggact ggggagtggc gagccctcag 420
atcctgcata taagcagctg ctttttgcct gtactgggtc tctctggtta gaccagatct 480
gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct taagcctcaa taaagcttgc 540
cttgagtgct tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga ctctggtaac tagagatccc 600
tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagtgg cgcccgaaca gggacttgaa 660
agcgaaaggg aaaccagagg agctctctcg acgcaggact cggcttgctg aagcgcgcac 720
ggcaagaggc gaggggcggc gactggtgag tacgccaaaa attttgacta gcggaggcta 780
gaaggagaga gatgggtgcg agagcgtcag tattaagcgg gggagaatta gatcgcgatg 840
ggaaaaaatt cggttaaggc caggggaaa gaaaaaatat aaattaaaac atatagtatg 900
ggcaagcagg gagctagaac gattcgcagt taatcctggc ctgttagaaa catcagaagg 960
ctgtagacaa atactgggac agctacaacc atcccttcag acaggatcag aagaacttag 1020
atcattatat aatacagtag caaccctcta ttgtgtgcat caaaggatag agataaaaga 1080
caccaaggaa gctttagaca agatagagga agagcaaaac aaaagtaaga ccaccgcaca 1140
gcaagcggcc gctgatcttc agacctggag gaggagatat gagggacaat tggagaagtg 1200
aattatataa atataaagta gtaaaaattg aaccattagg agtagcaccc accaaggcaa 1260
agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat aggagctttg ttccttgggt 1320
tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcgtcaat gacgctgacg gtacaggcca 1380

gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt gctgagggct attgaggcgc 1440
aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca gctccaggca agaatcctgg 1500
ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctggggat ttggggttgc tctggaaaac 1560
tcatttgcac cactgctgtg ccttggaatg ctagttggag taataaatct ctggaacaga 1620
tttggaatca cacgacctgg atggagtggg acagagaaat taacaattac acaagcttaa 1680
tacactcctt aattgaagaa tcgcaaaacc agcaagaaaa gaatgaacaa gaattattgg 1740
aattagataa atgggcaagt ttgtggaatt ggtttaacat aacaaattgg ctgtggtata 1800
taaaattatt cataatgata gtaggaggct tggtaggttt aagaatagtt tttgctgtac 1860
tttctatagt gaatagagtt aggcagggat attcaccatt atcgtttcag acccacctcc 1920
caaccccgag gggacccgac aggcccgaag gaatagaaga agaaggtgga gagagagaca 1980
gagacagatc cattcgatta gtgaacggat ctcgacggta tcgccgaatt cacaaatggc 2040
agtattcatc cacaatttta aaagaaaagg ggggattggg gggtacagtg caggggaaag 2100
aatagtagac ataatagcaa cagacataca aactaaagaa ttacaaaaac aaattacaaa 2160
aattcaaaat tttcgggttt attacaggga cagcagagat ccactttggg gcgataagct 2220
tgggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac 2280
ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc 2340
cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg 2400
tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat 2460
tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc 2520
[0032] atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt 2580
gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac 2640
caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg ccccattgac gcaaatgggc 2700
ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc 2760
gcctggagac gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa gacaccgact ctagaggatc 2820
cccaccggtc gccaccatgg tgagcaaggg cgaggagctg ttcaccgggg tggtgcccat 2880
cctggtcgag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga 2940
gggcgatgcc acctacggca agctgaccct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc 3000
cgtgccctgg cccaccctcg tgaccaccct gacctacggc gtgcagtgct tcagccgcta 3060
ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca 3120
ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt 3180
cgagggcgac accctggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg 3240
caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc 3300
cgacaagcag aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg 3360
cagcgtgcag ctcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgct 3420
gctgcccgac aaccactacc tgagcaccca gtccgccctg agcaaagacc ccaacgagaa 3480
gcgcgatcac atggtcctgc tggagttcgt gaccgccgcc gggatcactc tcggcatgga 3540
cgagctgtac aagtaaagcg gccggactct agctcgagac ctagaaaaac atggagcaat 3600
cacaagtagc aatacagcag ctaccaatgc tgattgtgcc tggctagaag cacaagagga 3660
ggaggaggtg ggttttccag tcacacctca ggtaccttta agaccaatga cttacaaggc 3720

agctgtagat cttagccact ttttaaaaga aaagggggga ctggaagggc taattcactc 3780

ccaacgaaga caagatcgtc gagagatgct gcatataagc agctgctttt tgcttgtact 3840

gggtctctct ggttagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaaccca 3900

ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgcttcaag tagtgtgtgc ccgtctgttg 3960

tgtgactctg gtaactagag atccctcaga ccctttttagt cagtgtggaa aatctctagc 4020

agt 4023

<210> 31
<211> 1536
<212> DNA
<213> Vesicular stomatitis virus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1536)

<400> 31
atg aaa tgc ctg ctc tat ctg gcc ttc ctc ttt atc ggc gtg aac tgt 48
Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys
1 5 10 15

aag ttc acg atc gtg ttt ccc cac aat cag aag gga aac tgg aag aac 96
Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn
20 25 30

gtc ccg agc aac tac cac tac tgc cct agc tca agc gac ctg aac tgg 144
Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Leu Asn Trp
35 40 45

[0033] cac aac gac ctg atc ggc acc gct atc cag gtg aag atg cca aag agc 192
His Asn Asp Leu Ile Gly Thr Ala Ile Gln Val Lys Met Pro Lys Ser
50 55 60

cac aag gcc atc caa gcc gac ggc tgg atg tgt cac gcc agc aaa tgg 240
His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ser Lys Trp
65 70 75 80

gtg acg acg tgc gat ttt cgc tgg tat ggc ccc aag tac atc acc caa 288
Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr Gln
85 90 95

tca atc cgc tca ttt aca ccc agc gtg gag caa tgt aag gag agc atc 336
Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro Ser Val Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile
100 105 110

gag cag acc aag cag ggg acc tgg ctc aac ccc ggc ttc cca ccg caa 384
Glu Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Leu Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln
115 120 125

agc tgc gga tac gcc acc gtg acc gac gct gag gcc gtc atc gtg cag 432
Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala Val Ile Val Gln
130 135 140

gtg acc ccg cac cac gtg ctg gtg gac gag tac acc ggc gag tgg gtg 480
Val Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Val
145 150 155 160

gat tca cag ttt atc aac gga aag tgt agc aat tac atc tgc ccc acc 528
Asp Ser Gln Phe Ile Asn Gly Lys Cys Ser Asn Tyr Ile Cys Pro Thr
165 170 175

gtg cac aac agc acc acc tgg cac tca gac tat aag gtg aag ggc ctc 576
Val His Asn Ser Thr Thr Trp His Ser Asp Tyr Lys Val Lys Gly Leu
180 185 190

tgc gac agc aat ctg atc tca atg gac atc acc ttc ttt agc gaa gac 624
Cys Asp Ser Asn Leu Ile Ser Met Asp Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp
195 200 205

ggc gaa ctc tca agc ctc ggg aag gaa ggc acc ggg ttc cgc agc aat 672
Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly Lys Glu Gly Thr Gly Phe Arg Ser Asn
210 215 220

tac ttt gct tac gaa acc ggc ggc aag gcc tgc aag atg caa tac tgc 720
Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Gly Lys Ala Cys Lys Met Gln Tyr Cys
225 230 235 240

aag cac tgg ggc gtg cgc ctg cca agc ggc gtg tgg ttt gag atg gct 768
Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Met Ala
245 250 255

gat aag gac ctg ttc gcc gct gcc cgc ttc ccg gaa tgc ccc gag ggg 816
Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Ala Arg Phe Pro Glu Cys Pro Glu Gly
260 265 270

agc agc atc agc gcc ccc agc cag aca tca gtg gac gtg agc ctg atc 864
Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Asp Val Ser Leu Ile
275 280 285

cag gat gtg gaa cgc atc ctg gac tac agc ctg tgt cag gaa acg tgg 912
Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr Trp
290 295 300

agc aag atc cgc gcc gga ctg cct atc agc ccc gtg gat ctc agc tac 960
Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr
305 310 315 320

ctg gcc cca aag aac cca ggc acc gga ccc gcc ttt aca atc atc aac 1008
Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn
325 330 335

ggc acc ctg aag tac ttt gaa aca cgc tac atc cgc gtc gac atc gcc 1056
Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Val Asp Ile Ala
340 345 350

[0034] gct ccc atc ctc tca cgc atg gtg ggc atg atc tca ggg acg acc acg 1104
Ala Pro Ile Leu Ser Arg Met Val Gly Met Ile Ser Gly Thr Thr Thr
355 360 365

gag cgc gag ctg tgg gat gac tgg gcc ccg tat gaa gat gtg gag atc 1152
Glu Arg Glu Leu Trp Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile
370 375 380

gga cct aac ggc gtg ctg cgc aca tca agc ggg tac aag ttc ccg ctg 1200
Gly Pro Asn Gly Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu
385 390 395 400

tac atg atc ggc cac ggc atg ctg gac agc gac ctg cac ctc agc tca 1248
Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu Ser Ser
405 410 415

aag gcc cag gtc ttt gag cac cca cac atc cag gac gct gcc agc cag 1296
Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln
420 425 430

ctc ccc gac gac gaa agc ctg ttc ttt gga gat aca ggg ctc agc aag 1344
Leu Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys
435 440 445

aac ccc atc gag ctg gtc gag ggc tgg ttc tca agc tgg aag agc agc 1392
Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Ser
450 455 460

atc gct tca ttt ttt ttc atc atc ggc ctc atc atc ggg ctg ttt ctg 1440
Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu
465 470 475 480

gtg ctg cgc gtc ggc atc cac ctg tgc atc aag ctg aag cac acc aag 1488
Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys
485 490 495

aag cgc cag atc tat acc gac atc gag atg aat cgc ctg ggg aag taa 1536
Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
500 505 510

<210> 32
<211> 511
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 32

Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys
1 5 10 15

Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn
20 25 30

Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Leu Asn Trp
35 40 45

His Asn Asp Leu Ile Gly Thr Ala Ile Gln Val Lys Met Pro Lys Ser
50 55 60

His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ser Lys Trp
65 70 75 80

Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr Gln
85 90 95

Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro Ser Val Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile
100 105 110

Glu Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Leu Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln
115 120 125

[0035]

Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala Val Ile Val Gln
130 135 140

Val Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Val
145 150 155 160

Asp Ser Gln Phe Ile Asn Gly Lys Cys Ser Asn Tyr Ile Cys Pro Thr
165 170 175

Val His Asn Ser Thr Thr Trp His Ser Asp Tyr Lys Val Lys Gly Leu
180 185 190

Cys Asp Ser Asn Leu Ile Ser Met Asp Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp
195 200 205

Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly Lys Glu Gly Thr Gly Phe Arg Ser Asn
210 215 220

Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Gly Lys Ala Cys Lys Met Gln Tyr Cys
225 230 235 240

Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Met Ala
245 250 255

Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Ala Arg Phe Pro Glu Cys Pro Glu Gly
260 265 270

Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Asp Val Ser Leu Ile
275 280 285

Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr Trp
290 295 300

Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr
305 310 315 320

Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn
325 330 335

Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Val Asp Ile Ala
340 345 350

Ala Pro Ile Leu Ser Arg Met Val Gly Met Ile Ser Gly Thr Thr Thr
355 360 365

Glu Arg Glu Leu Trp Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile
370 375 380

Gly Pro Asn Gly Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu
385 390 395 400

Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu Ser Ser
405 410 415

Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln
420 425 430

[0036] Leu Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys
435 440 445

Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Ser
450 455 460

Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu
465 470 475 480

Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys
485 490 495

Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
500 505 510

<210> 33
<211> 1554
<212> DNA
<213> Vesicular stomatitis virus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1554)

<400> 33
atg ctg tca tat ctg atc ttt gcc ctg gct gtg agc cca atc ctc gga 48
Met Leu Ser Tyr Leu Ile Phe Ala Leu Ala Val Ser Pro Ile Leu Gly
1 5 10 15

aag atc gaa atc gtg ttc cca caa cac acc aca ggg gac tgg aag cgc 96
Lys Ile Glu Ile Val Phe Pro Gln His Thr Thr Gly Asp Trp Lys Arg
20 25 30

gtg ccc cac gag tac aac tac tgc ccg acc tca gcc gac aag aat agc 144
Val Pro His Glu Tyr Asn Tyr Cys Pro Thr Ser Ala Asp Lys Asn Ser
35 40 45

cac ggc acg cag acc ggc atc cct gtg gag ctg acc atg ccc aag ggg 192
His Gly Thr Gln Thr Gly Ile Pro Val Glu Leu Thr Met Pro Lys Gly
50 55 60

ctc aca acg cac caa gtc gaa ggc ttc atg tgc cac agc gct ctc tgg 240
Leu Thr Thr His Gln Val Glu Gly Phe Met Cys His Ser Ala Leu Trp
65 70 75 80

atg aca acc tgc gat ttt cgc tgg tat ggc ccc aag tac atc acg cac 288
Met Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His
85 90 95

agc atc cac aat gag gaa cca acc gac tac cag tgc ctc gaa gcc atc 336
Ser Ile His Asn Glu Glu Pro Thr Asp Tyr Gln Cys Leu Glu Ala Ile
100 105 110

aag tca tac aag gat ggg gtg agc ttc aac ccc ggc ttc ccg ccc caa 384
Lys Ser Tyr Lys Asp Gly Val Ser Phe Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln
115 120 125

tca tgt ggc tac ggc acc gtg acc gac gcc gag gcc cac atc gtg acc 432
Ser Cys Gly Tyr Gly Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala His Ile Val Thr
130 135 140

gtg aca ccc cac tca gtc aag gtg gac gag tac aca ggc gaa tgg atc 480
Val Thr Pro His Ser Val Lys Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Ile
145 150 155 160

gac ccc cac ttc atc ggg ggc cgc tgt aag ggc caa atc tgc gag acc 528
Asp Pro His Phe Ile Gly Gly Arg Cys Lys Gly Gln Ile Cys Glu Thr
165 170 175

gtg cac aac agc acc aag tgg ttt acg tca tca gac ggc gaa agc gtg 576
Val His Asn Ser Thr Lys Trp Phe Thr Ser Ser Asp Gly Glu Ser Val
[0037] 180 185 190

tgc agc caa ctg ttt acg ctc gtg ggc ggc atc ttc ttt agc gac agc 624
Cys Ser Gln Leu Phe Thr Leu Val Gly Gly Ile Phe Phe Ser Asp Ser
195 200 205

gag gag atc acc agc atg ggc ctc ccg gag aca gga atc cgc agc aac 672
Glu Glu Ile Thr Ser Met Gly Leu Pro Glu Thr Gly Ile Arg Ser Asn
210 215 220

tac ttt ccg tac atc agc acc gag gga atc tgt aag atg cct ttt tgc 720
Tyr Phe Pro Tyr Ile Ser Thr Glu Gly Ile Cys Lys Met Pro Phe Cys
225 230 235 240

cgc aag cag gga tat aag ctg aag aat gac ctg tgg ttc cag atc atg 768
Arg Lys Gln Gly Tyr Lys Leu Lys Asn Asp Leu Trp Phe Gln Ile Met
245 250 255

gac ccg gac ctg gac aag acc gtc cgc gat ctg ccc cac atc aag gac 816
Asp Pro Asp Leu Asp Lys Thr Val Arg Asp Leu Pro His Ile Lys Asp
260 265 270

tgt gat ctg tca tca agc atc atc acc ccc gga gaa cac gcc acg gac 864
Cys Asp Leu Ser Ser Ser Ile Ile Thr Pro Gly Glu His Ala Thr Asp
275 280 285

atc agc ctc atc agc gat gtg gag cgc atc ctc gac tac gct ctc tgc 912
Ile Ser Leu Ile Ser Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ala Leu Cys
290 295 300

cag aac aca tgg agc aag atc gaa agc ggc gaa ccc atc acc cca gtg 960
Gln Asn Thr Trp Ser Lys Ile Glu Ser Gly Glu Pro Ile Thr Pro Val
305 310 315 320

gac ctg agc tat ctc ggc cca aag aac ccc ggc gtg ggg ccc gtg ttc 1008
Asp Leu Ser Tyr Leu Gly Pro Lys Asn Pro Gly Val Gly Pro Val Phe
325 330 335

acc atc atc aac ggg agc ctg cac tac ttt aca agc aag tat ctg cgc 1056

Thr Ile Ile Asn Gly Ser Leu His Tyr Phe Thr Ser Lys Tyr Leu Arg
340 345 350

gtg gag ctc gaa agc cca gtc atc ccc cgc atg gag ggg aag gtg gcc 1104
Val Glu Leu Glu Ser Pro Val Ile Pro Arg Met Glu Gly Lys Val Ala
355 360 365

ggg acc cgc atc gtg cgc cag ctg tgg gac cag tgg ttc cct ttt ggc 1152
Gly Thr Arg Ile Val Arg Gln Leu Trp Asp Gln Trp Phe Pro Phe Gly
370 375 380

gag gtg gaa atc ggc ccc aac ggc gtg ctg aag acc aag caa gga tat 1200
Glu Val Glu Ile Gly Pro Asn Gly Val Leu Lys Thr Lys Gln Gly Tyr
385 390 395 400

aag ttc ccg ctg cac atc atc ggg acg ggc gaa gtg gac agc gat atc 1248
Lys Phe Pro Leu His Ile Ile Gly Thr Gly Glu Val Asp Ser Asp Ile
405 410 415

aag atg gag cgc gtg gtc aag cac tgg gag cac cca cac atc gag gct 1296
Lys Met Glu Arg Val Val Lys His Trp Glu His Pro His Ile Glu Ala
420 425 430

gct cag acc ttt ctc aag aag gac gat acc ggc gaa gtc ctg tat tac 1344
Ala Gln Thr Phe Leu Lys Lys Asp Asp Thr Gly Glu Val Leu Tyr Tyr
435 440 445

ggg gat acg gga gtg agc aag aac cct gtg gag ctg gtg gaa ggc tgg 1392
Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Val Glu Leu Val Glu Gly Trp
450 455 460

ttc agc gga tgg cgc tca agc ctg atg ggc gtg ctg gcc gtc atc atc 1440
Phe Ser Gly Trp Arg Ser Ser Leu Met Gly Val Leu Ala Val Ile Ile
465 470 475 480

gga ttt gtg atc ctg atg ttc ctc atc aag ctg atc ggc gtg ctg tca 1488
Gly Phe Val Ile Leu Met Phe Leu Ile Lys Leu Ile Gly Val Leu Ser
485 490 495

[0038]

agc ctg ttc cgc cct aag cgc cgc cca atc tac aag agc gac gtc gag 1536
Ser Leu Phe Arg Pro Lys Arg Arg Pro Ile Tyr Lys Ser Asp Val Glu
500 505 510

atg gcc cac ttt cgc taa 1554
Met Ala His Phe Arg
515

<210> 34
<211> 517
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 34

Met Leu Ser Tyr Leu Ile Phe Ala Leu Ala Val Ser Pro Ile Leu Gly
1 5 10 15

Lys Ile Glu Ile Val Phe Pro Gln His Thr Thr Gly Asp Trp Lys Arg
20 25 30

Val Pro His Glu Tyr Asn Tyr Cys Pro Thr Ser Ala Asp Lys Asn Ser
35 40 45

His Gly Thr Gln Thr Gly Ile Pro Val Glu Leu Thr Met Pro Lys Gly
50 55 60

Leu Thr Thr His Gln Val Glu Gly Phe Met Cys His Ser Ala Leu Trp
65 70 75 80

Met Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His
85 90 95

Ser Ile His Asn Glu Glu Pro Thr Asp Tyr Gln Cys Leu Glu Ala Ile
100 105 110

Lys Ser Tyr Lys Asp Gly Val Ser Phe Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln
115 120 125

Ser Cys Gly Tyr Gly Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala His Ile Val Thr
130 135 140

Val Thr Pro His Ser Val Lys Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Ile
145 150 155 160

Asp Pro His Phe Ile Gly Gly Arg Cys Lys Gly Gln Ile Cys Glu Thr
165 170 175

Val His Asn Ser Thr Lys Trp Phe Thr Ser Ser Asp Gly Glu Ser Val
180 185 190

Cys Ser Gln Leu Phe Thr Leu Val Gly Gly Ile Phe Phe Ser Asp Ser
195 200 205

Glu Glu Ile Thr Ser Met Gly Leu Pro Glu Thr Gly Ile Arg Ser Asn
210 215 220

Tyr Phe Pro Tyr Ile Ser Thr Glu Gly Ile Cys Lys Met Pro Phe Cys
225 230 235 240

[0039] Arg Lys Gln Gly Tyr Lys Leu Lys Asn Asp Leu Trp Phe Gln Ile Met
245 250 255

Asp Pro Asp Leu Asp Lys Thr Val Arg Asp Leu Pro His Ile Lys Asp
260 265 270

Cys Asp Leu Ser Ser Ser Ile Ile Thr Pro Gly Glu His Ala Thr Asp
275 280 285

Ile Ser Leu Ile Ser Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ala Leu Cys
290 295 300

Gln Asn Thr Trp Ser Lys Ile Glu Ser Gly Glu Pro Ile Thr Pro Val
305 310 315 320

Asp Leu Ser Tyr Leu Gly Pro Lys Asn Pro Gly Val Gly Pro Val Phe
325 330 335

Thr Ile Ile Asn Gly Ser Leu His Tyr Phe Thr Ser Lys Tyr Leu Arg
340 345 350

Val Glu Leu Glu Ser Pro Val Ile Pro Arg Met Glu Gly Lys Val Ala
355 360 365

Gly Thr Arg Ile Val Arg Gln Leu Trp Asp Gln Trp Phe Pro Phe Gly
370 375 380

Glu Val Glu Ile Gly Pro Asn Gly Val Leu Lys Thr Lys Gln Gly Tyr
385 390 395 400

Lys Phe Pro Leu His Ile Ile Gly Thr Gly Glu Val Asp Ser Asp Ile
405 410 415

Lys Met Glu Arg Val Val Lys His Trp Glu His Pro His Ile Glu Ala
420 425 430

Ala Gln Thr Phe Leu Lys Lys Asp Asp Thr Gly Glu Val Leu Tyr Tyr
435 440 445

Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Val Glu Leu Val Glu Gly Trp
450 455 460

Phe Ser Gly Trp Arg Ser Ser Leu Met Gly Val Leu Ala Val Ile Ile
465 470 475 480

Gly Phe Val Ile Leu Met Phe Leu Ile Lys Leu Ile Gly Val Leu Ser
485 490 495

Ser Leu Phe Arg Pro Lys Arg Arg Pro Ile Tyr Lys Ser Asp Val Glu
500 505 510

Met Ala His Phe Arg
515

<210> 35
<211> 1618
<212> DNA
<213> Vesicular stomatitis virus

[0040] <220>
<221> CDS
<222> (27)..(1598)

<400> 35
ggcgcgccgg atcctgatca gccacc atg acc agc agc gtg acc atc agc gtg 53
Met Thr Ser Ser Val Thr Ile Ser Val
1 5

gtg ctg ctg atc agc ttc atc acc ccc ctg tac agc tac ctg agc att 101
Val Leu Leu Ile Ser Phe Ile Thr Pro Leu Tyr Ser Tyr Leu Ser Ile
10 15 20 25

gcc ttc ccc gag aac acc aag ctg gac tgg aag ccc gtg acc aag aac 149
Ala Phe Pro Glu Asn Thr Lys Leu Asp Trp Lys Pro Val Thr Lys Asn
30 35 40

acc cgg tac tgc ccc atg ggc ggc gag tgg ttt ctg gaa ccc ggc ctg 197
Thr Arg Tyr Cys Pro Met Gly Gly Glu Trp Phe Leu Glu Pro Gly Leu
45 50 55

cag gaa gag agc ttc ctg agc agc acc ccc atc ggc gcc acc ccc agc 245
Gln Glu Glu Ser Phe Leu Ser Ser Thr Pro Ile Gly Ala Thr Pro Ser
60 65 70

aag agc gac ggc ttc ctg tgc cac gcc gcc aag tgg gtg acc acc tgc 293
Lys Ser Asp Gly Phe Leu Cys His Ala Ala Lys Trp Val Thr Thr Cys
75 80 85

gac ttc cgg tgg tac ggc ccc aag tac atc acc cac agc atc cac aac 341
Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile His Asn
90 95 100 105

atc aag ccc acc aga agc gac tgc gac aca gcc ctg gcc tct tac aag 389
Ile Lys Pro Thr Arg Ser Asp Cys Asp Thr Ala Leu Ala Ser Tyr Lys
110 115 120

agc ggc acc ctg gtg tcc ctg ggc ttc cct ccc gag agc tgc ggc tac 437

Ser Gly Thr Leu Val Ser Leu Gly Phe Pro Pro Glu Ser Cys Gly Tyr
125 130 135

gcc agc gtg acc gac agc gag ttc ctg gtg att atg att acc ccc cac 485
Ala Ser Val Thr Asp Ser Glu Phe Leu Val Ile Met Ile Thr Pro His
140 145 150

cac gtg ggc gtg gac gac tac cgg ggc cac tgg gtg gac cct ctg ttc 533
His Val Gly Val Asp Asp Tyr Arg Gly His Trp Val Asp Pro Leu Phe
155 160 165

gtg gga ggg gaa tgc gac cag agc tac tgc gat acc atc cac aac tcc 581
Val Gly Gly Glu Cys Asp Gln Ser Tyr Cys Asp Thr Ile His Asn Ser
170 175 180 185

agc gtg tgg att ccc gcc gac cag acc aag aag aac atc tgc ggc cag 629
Ser Val Trp Ile Pro Ala Asp Gln Thr Lys Lys Asn Ile Cys Gly Gln
190 195 200

agc ttc acc cct ctg acc gtg acc gtg gcc tac gac aag acc aaa gag 677
Ser Phe Thr Pro Leu Thr Val Thr Val Ala Tyr Asp Lys Thr Lys Glu
205 210 215

att gcc gcc gga ggg atc gtg ttc aag agc aag tac cac agc cac atg 725
Ile Ala Ala Gly Gly Ile Val Phe Lys Ser Lys Tyr His Ser His Met
220 225 230

gaa ggc gcc agg acc tgc aga ctg tcc tac tgc ggc cgg aac ggc atc 773
Glu Gly Ala Arg Thr Cys Arg Leu Ser Tyr Cys Gly Arg Asn Gly Ile
235 240 245

aag ttc ccc aac ggc gag tgg gtg tcc ctg atg ctg aag ctg cgg agc 821
Lys Phe Pro Asn Gly Glu Trp Val Ser Leu Met Leu Lys Leu Arg Ser
250 255 260 265

aag cgg aac ctg tac ttc ccc tgc ctg aag atg tgc ccc acc ggc atc 869
Lys Arg Asn Leu Tyr Phe Pro Cys Leu Lys Met Cys Pro Thr Gly Ile
270 275 280

[0041]

cgg ggc gag atc tac ccc agc atc aga tgg gcc cag gtg ctg acc agc 917
Arg Gly Glu Ile Tyr Pro Ser Ile Arg Trp Ala Gln Val Leu Thr Ser
285 290 295

gag atc cag aga atc ctg gac tac agc ctg tgc cag aac acc tgg gac 965
Glu Ile Gln Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp Asp
300 305 310

aag gtg gag cgg aaa gag ccc ctg agc ccc ctg gac ctg agc tac ctg 1013
Lys Val Glu Arg Lys Glu Pro Leu Ser Pro Leu Asp Leu Ser Tyr Leu
315 320 325

gcc agc aag tcc ccc ggc aag ggc ctg gcc tac acc gtg atc aac ggc 1061
Ala Ser Lys Ser Pro Gly Lys Gly Leu Ala Tyr Thr Val Ile Asn Gly
330 335 340 345

acc ctg agc ttc gcc cac acc aga tac gtg cgg atg tgg atc gac ggc 1109
Thr Leu Ser Phe Ala His Thr Arg Tyr Val Arg Met Trp Ile Asp Gly
350 355 360

ccc gtg ctg aaa gag ccc aag ggc aag aga gag agc ccc agc ggc atc 1157
Pro Val Leu Lys Glu Pro Lys Gly Lys Arg Glu Ser Pro Ser Gly Ile
365 370 375

agc agc gac atc tgg acc cag tgg ttc aag tac ggc gac atg gaa atc 1205
Ser Ser Asp Ile Trp Thr Gln Trp Phe Lys Tyr Gly Asp Met Glu Ile
380 385 390

ggc ccc aac ggc ctg ctg aaa aca gcc ggc gga tac aag ttt cct tgg 1253
Gly Pro Asn Gly Leu Leu Lys Thr Ala Gly Gly Tyr Lys Phe Pro Trp
395 400 405

cac ctg atc ggc atg ggc atc gtg gac aac gag ctg cac gag ctg tcc 1301
His Leu Ile Gly Met Gly Ile Val Asp Asn Glu Leu His Glu Leu Ser
410 415 420 425

gag gcc aac ccc ctg gat cac ccc cag ctg ccc cac gcc cag agc att 1349
Glu Ala Asn Pro Leu Asp His Pro Gln Leu Pro His Ala Gln Ser Ile

430 435 440

gcc gac gac agc gag gaa atc ttc ttc ggc gac acc ggc gtg agc aag 1397
Ala Asp Asp Ser Glu Glu Ile Phe Phe Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys
445 450 455

aac ccc gtg gaa ctg gtg aca ggc tgg ttc acc agc tgg aaa gag agc 1445
Asn Pro Val Glu Leu Val Thr Gly Trp Phe Thr Ser Trp Lys Glu Ser
460 465 470

ctg gcc gcc gga tct tgc ccc gac ctg cgg tgc ccc cct ctg ttc ccc 1493
Leu Ala Ala Gly Ser Cys Pro Asp Leu Arg Cys Pro Pro Leu Phe Pro
475 480 485

ggc atc gtg tac tac ctg cag aaa gcc cag atg gaa gag cgg ggc gag 1541
Gly Ile Val Tyr Tyr Leu Gln Lys Ala Gln Met Glu Glu Arg Gly Glu
490 495 500 505

cgg agc gac agc ttc gag atg cgg atc ttc aag ccc aac aac atg cgg 1589
Arg Ser Asp Ser Phe Glu Met Arg Ile Phe Lys Pro Asn Asn Met Arg
510 515 520

gcc aga gtg tgatgagaat tcttaattaa 1618
Ala Arg Val

<210> 36
<211> 524
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 36

Met Thr Ser Ser Val Thr Ile Ser Val Val Leu Leu Ile Ser Phe Ile
1 5 10 15

[0042] Thr Pro Leu Tyr Ser Tyr Leu Ser Ile Ala Phe Pro Glu Asn Thr Lys
20 25 30

Leu Asp Trp Lys Pro Val Thr Lys Asn Thr Arg Tyr Cys Pro Met Gly
35 40 45

Gly Glu Trp Phe Leu Glu Pro Gly Leu Gln Glu Glu Ser Phe Leu Ser
50 55 60

Ser Thr Pro Ile Gly Ala Thr Pro Ser Lys Ser Asp Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80

His Ala Ala Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro
85 90 95

Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile His Asn Ile Lys Pro Thr Arg Ser Asp
100 105 110

Cys Asp Thr Ala Leu Ala Ser Tyr Lys Ser Gly Thr Leu Val Ser Leu
115 120 125

Gly Phe Pro Pro Glu Ser Cys Gly Tyr Ala Ser Val Thr Asp Ser Glu
130 135 140

Phe Leu Val Ile Met Ile Thr Pro His His Val Gly Val Asp Asp Tyr
145 150 155 160

Arg Gly His Trp Val Asp Pro Leu Phe Val Gly Gly Glu Cys Asp Gln
165 170 175

Ser Tyr Cys Asp Thr Ile His Asn Ser Ser Val Trp Ile Pro Ala Asp
180 185 190

Gln Thr Lys Lys Asn Ile Cys Gly Gln Ser Phe Thr Pro Leu Thr Val
195 200 205

Thr Val Ala Tyr Asp Lys Thr Lys Glu Ile Ala Ala Gly Gly Ile Val
210 215 220

Phe Lys Ser Lys Tyr His Ser His Met Glu Gly Ala Arg Thr Cys Arg
225 230 235 240

Leu Ser Tyr Cys Gly Arg Asn Gly Ile Lys Phe Pro Asn Gly Glu Trp
245 250 255

Val Ser Leu Met Leu Lys Leu Arg Ser Lys Arg Asn Leu Tyr Phe Pro
260 265 270

Cys Leu Lys Met Cys Pro Thr Gly Ile Arg Gly Glu Ile Tyr Pro Ser
275 280 285

Ile Arg Trp Ala Gln Val Leu Thr Ser Glu Ile Gln Arg Ile Leu Asp
290 295 300

Tyr Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp Asp Lys Val Glu Arg Lys Glu Pro
305 310 315 320

[0043] Leu Ser Pro Leu Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Ser Pro Gly Lys
325 330 335

Gly Leu Ala Tyr Thr Val Ile Asn Gly Thr Leu Ser Phe Ala His Thr
340 345 350

Arg Tyr Val Arg Met Trp Ile Asp Gly Pro Val Leu Lys Glu Pro Lys
355 360 365

Gly Lys Arg Glu Ser Pro Ser Gly Ile Ser Ser Asp Ile Trp Thr Gln
370 375 380

Trp Phe Lys Tyr Gly Asp Met Glu Ile Gly Pro Asn Gly Leu Leu Lys
385 390 395 400

Thr Ala Gly Gly Tyr Lys Phe Pro Trp His Leu Ile Gly Met Gly Ile
405 410 415

Val Asp Asn Glu Leu His Glu Leu Ser Glu Ala Asn Pro Leu Asp His
420 425 430

Pro Gln Leu Pro His Ala Gln Ser Ile Ala Asp Asp Ser Glu Glu Ile
435 440 445

Phe Phe Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Val Glu Leu Val Thr
450 455 460

Gly Trp Phe Thr Ser Trp Lys Glu Ser Leu Ala Ala Gly Ser Cys Pro
465 470 475 480

Asp Leu Arg Cys Pro Pro Leu Phe Pro Gly Ile Val Tyr Tyr Leu Gln
485 490 495

Lys Ala Gln Met Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Asp Ser Phe Glu Met
500 505 510

Arg Ile Phe Lys Pro Asn Asn Met Arg Ala Arg Val
515 520

<210> 37
<211> 1582
<212> DNA
<213> Vesicular stomatitis virus

<220>
<221> CDS
<222> (27)..(1568)

<400> 37
ggcgcgccgg atcctgatca gccacc atg aac ttt ctg ctg ctg aca ttc atc 53
Met Asn Phe Leu Leu Leu Thr Phe Ile
1 5

gtg ctg cct ctg tgc agc cac gcc aag ttc agc atc gtg ttc ccc cag 101
Val Leu Pro Leu Cys Ser His Ala Lys Phe Ser Ile Val Phe Pro Gln
10 15 20 25

agc cag aag ggc aac tgg aag aac gtg ccc agc agc tac cac tac tgc 149
Ser Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn Val Pro Ser Ser Tyr His Tyr Cys
30 35 40

ccc agc agc agc gac cag aac tgg cac aac gac ctg ctg ggc atc acc 197
Pro Ser Ser Ser Asp Gln Asn Trp His Asn Asp Leu Leu Gly Ile Thr
45 50 55

[0044]

atg aag gtg aaa atg ccc aag acc cac aag gcc att cag gct gac ggc 245
Met Lys Val Lys Met Pro Lys Thr His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly
60 65 70

tgg atg tgc cac gcc gcc aag tgg atc acc acc tgc gac ttc cgg tgg 293
Trp Met Cys His Ala Ala Lys Trp Ile Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp
75 80 85

tac ggc ccc aag tac atc acc cac agc atc cac tcc atc cag ccc acc 341
Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile His Ser Ile Gln Pro Thr
90 95 100 105

tcc gag cag tgc aaa gag agc atc aag cag acc aag cag ggc acc tgg 389
Ser Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile Lys Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp
110 115 120

atg agc ccc ggc ttc cca ccc cag aac tgc ggc tac gcc acc gtg acc 437
Met Ser Pro Gly Phe Pro Pro Gln Asn Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr
125 130 135

gac agc gtg gcc gtg gtg gtg cag gcc acc ccc cac cac gtg ctg gtc 485
Asp Ser Val Ala Val Val Val Gln Ala Thr Pro His His Val Leu Val
140 145 150

gac gag tac acc ggc gag tgg atc gac agc cag ttc ccc aac ggc aag 533
Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Ile Asp Ser Gln Phe Pro Asn Gly Lys
155 160 165

tgc gag aca gag gaa tgc gag aca gtg cac aac agc acc gtg tgg tac 581
Cys Glu Thr Glu Glu Cys Glu Thr Val His Asn Ser Thr Val Trp Tyr
170 175 180 185

agc gac tac aag gtg acc ggc ctg tgc gac gcc acc ctg gtg gac acc 629
Ser Asp Tyr Lys Val Thr Gly Leu Cys Asp Ala Thr Leu Val Asp Thr
190 195 200

gag atc acc ttt ttc agc gag gac ggc aag aaa gag tcc atc ggc aag 677
Glu Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp Gly Lys Lys Glu Ser Ile Gly Lys

205 210 215

ccc aac acc ggc tac aga agc aac tac ttc gcc tac gag aag ggc gac 725
Pro Asn Thr Gly Tyr Arg Ser Asn Tyr Phe Ala Tyr Glu Lys Gly Asp
220 225 230

aaa gtg tgc aag atg aac tac tgc aag cat gcc gga gtg agg ctg cct 773
Lys Val Cys Lys Met Asn Tyr Cys Lys His Ala Gly Val Arg Leu Pro
235 240 245

agc ggc gtg tgg ttc gag ttc gtg gac cag gac gtg tac gcc gcc gcc 821
Ser Gly Val Trp Phe Glu Phe Val Asp Gln Asp Val Tyr Ala Ala Ala
250 255 260 265

aag ctg ccc gag tgc ccc gtg ggc gcc acc atc agc gcc ccc acc cag 869
Lys Leu Pro Glu Cys Pro Val Gly Ala Thr Ile Ser Ala Pro Thr Gln
270 275 280

acc agc gtg gac gtg agc ctg atc ctg gac gtg gag aga atc ctg gac 917
Thr Ser Val Asp Val Ser Leu Ile Leu Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp
285 290 295

tac tct ctg tgt cag gaa acc tgg tcc aag atc aga tcc aag cag ccc 965
Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr Trp Ser Lys Ile Arg Ser Lys Gln Pro
300 305 310

gtg agc cct gtg gac ctg agc tac ctg gcc cct aag aac ccc ggc acc 1013
Val Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr
315 320 325

ggc cct gcc ttc acc atc atc aac ggc acc ctg aag tac ttc gag aca 1061
Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr
330 335 340 345

cgg tac atc cgg atc gac atc gac aac ccc atc atc agc aag atg gtg 1109
Arg Tyr Ile Arg Ile Asp Ile Asp Asn Pro Ile Ile Ser Lys Met Val
350 355 360

[0045] ggc aag atc agc ggc agc cag acc gag cgg gag ctg tgg acc gag tgg 1157
Gly Lys Ile Ser Gly Ser Gln Thr Glu Arg Glu Leu Trp Thr Glu Trp
365 370 375

ttc ccc tac gag ggc gtg gag atc ggc ccc aat ggc atc ctg aaa acc 1205
Phe Pro Tyr Glu Gly Val Glu Ile Gly Pro Asn Gly Ile Leu Lys Thr
380 385 390

cct acc ggc tac aag ttc ccc ctg ttc atg atc ggc cac ggc atg ctg 1253
Pro Thr Gly Tyr Lys Phe Pro Leu Phe Met Ile Gly His Gly Met Leu
395 400 405

gac agc gac ctg cac aag acc tcc cag gcc gag gtg ttc gag cac ccc 1301
Asp Ser Asp Leu His Lys Thr Ser Gln Ala Glu Val Phe Glu His Pro
410 415 420 425

cac ctg gcc gag gcc ccc aag cag ctg ccc gaa gag gaa acc ctg ttc 1349
His Leu Ala Glu Ala Pro Lys Gln Leu Pro Glu Glu Glu Thr Leu Phe
430 435 440

ttc ggc gac acc ggc atc tcc aag aac cct gtg gag ctg atc gag ggc 1397
Phe Gly Asp Thr Gly Ile Ser Lys Asn Pro Val Glu Leu Ile Glu Gly
445 450 455

tgg ttc agc agc tgg aag agc acc gtg gtg acc ttt ttc ttc gcc atc 1445
Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Thr Val Val Thr Phe Phe Phe Ala Ile
460 465 470

ggc gtg ttc atc ctg ctg tac gtg gtg gcc cgg atc gtg atc gcc gtg 1493
Gly Val Phe Ile Leu Leu Tyr Val Val Ala Arg Ile Val Ile Ala Val
475 480 485

cgg tac aga tac cag ggc agc aac aac aag cgg atc tac aac gac atc 1541
Arg Tyr Arg Tyr Gln Gly Ser Asn Asn Lys Arg Ile Tyr Asn Asp Ile
490 495 500 505

gag atg agc cgg ttc cgg aag tga tga gaattcttaa ttaa 1582
Glu Met Ser Arg Phe Arg Lys
510

<210> 38
<211> 512
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 38

Met Asn Phe Leu Leu Leu Thr Phe Ile Val Leu Pro Leu Cys Ser His
1 5 10 15

Ala Lys Phe Ser Ile Val Phe Pro Gln Ser Gln Lys Gly Asn Trp Lys
20 25 30

Asn Val Pro Ser Ser Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Gln Asn
35 40 45

Trp His Asn Asp Leu Leu Gly Ile Thr Met Lys Val Lys Met Pro Lys
50 55 60

Thr His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ala Lys
65 70 75 80

Trp Ile Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr
85 90 95

His Ser Ile His Ser Ile Gln Pro Thr Ser Glu Gln Cys Lys Glu Ser
100 105 110

[0046] Ile Lys Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Met Ser Pro Gly Phe Pro Pro
115 120 125

Gln Asn Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ser Val Ala Val Val Val
130 135 140

Gln Ala Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp
145 150 155 160

Ile Asp Ser Gln Phe Pro Asn Gly Lys Cys Glu Thr Glu Glu Cys Glu
165 170 175

Thr Val His Asn Ser Thr Val Trp Tyr Ser Asp Tyr Lys Val Thr Gly
180 185 190

Leu Cys Asp Ala Thr Leu Val Asp Thr Glu Ile Thr Phe Phe Ser Glu
195 200 205

Asp Gly Lys Lys Glu Ser Ile Gly Lys Pro Asn Thr Gly Tyr Arg Ser
210 215 220

Asn Tyr Phe Ala Tyr Glu Lys Gly Asp Lys Val Cys Lys Met Asn Tyr
225 230 235 240

Cys Lys His Ala Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Phe
245 250 255

Val Asp Gln Asp Val Tyr Ala Ala Ala Lys Leu Pro Glu Cys Pro Val
260 265 270

Gly Ala Thr Ile Ser Ala Pro Thr Gln Thr Ser Val Asp Val Ser Leu
275 280 285

Ile Leu Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr
290 295 300

Trp Ser Lys Ile Arg Ser Lys Gln Pro Val Ser Pro Val Asp Leu Ser
305 310 315 320

Tyr Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile
325 330 335

Asn Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Ile Asp Ile
340 345 350

Asp Asn Pro Ile Ile Ser Lys Met Val Gly Lys Ile Ser Gly Ser Gln
355 360 365

Thr Glu Arg Glu Leu Trp Thr Glu Trp Phe Pro Tyr Glu Gly Val Glu
370 375 380

Ile Gly Pro Asn Gly Ile Leu Lys Thr Pro Thr Gly Tyr Lys Phe Pro
385 390 395 400

Leu Phe Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Lys Thr
405 410 415

Ser Gln Ala Glu Val Phe Glu His Pro His Leu Ala Glu Ala Pro Lys
420 425 430

[0047]

Gln Leu Pro Glu Glu Glu Thr Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Ile Ser
435 440 445

Lys Asn Pro Val Glu Leu Ile Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser
450 455 460

Thr Val Val Thr Phe Phe Phe Ala Ile Gly Val Phe Ile Leu Leu Tyr
465 470 475 480

Val Val Ala Arg Ile Val Ile Ala Val Arg Tyr Arg Tyr Gln Gly Ser
485 490 495

Asn Asn Lys Arg Ile Tyr Asn Asp Ile Glu Met Ser Arg Phe Arg Lys
500 505 510

<210> 39
<211> 1600
<212> DNA
<213> Vesicular stomatitis virus

<220>
<221> CDS
<222> (27)..(1586)

<400> 39
ggcgcgccgg atcctgatca gccacc atg acc gat aca gtg ctg ggc aag ttc 53
Met Thr Asp Thr Val Leu Gly Lys Phe
1 5

cag atc gtg ttc ccc gac cag aac gag ctg gaa tgg acc ccc gtc gtg 101
Gln Ile Val Phe Pro Asp Gln Asn Glu Leu Glu Trp Thr Pro Val Val

10 15 20 25

ggc gac agc cgg cat tgc cct cag tcc agc gag atg cag ttc gac ggc 149
Gly Asp Ser Arg His Cys Pro Gln Ser Ser Glu Met Gln Phe Asp Gly
30 35 40

agc aga agc cag acc atc ctg acc ggc aag gcc ccc gtg ggc atc aca 197
Ser Arg Ser Gln Thr Ile Leu Thr Gly Lys Ala Pro Val Gly Ile Thr
45 50 55

ccc agc aag agc gac ggc ttc atc tgc cac gcc gcc aag tgg gtg acc 245
Pro Ser Lys Ser Asp Gly Phe Ile Cys His Ala Ala Lys Trp Val Thr
60 65 70

acc tgc gac ttc cgg tgg tac ggc ccc aag tac atc acc cac agc atc 293
Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile
75 80 85

cac cac ctg cgg ccc acc acc tcc gac tgc gag aca gcc ctg cag cgg 341
His His Leu Arg Pro Thr Thr Ser Asp Cys Glu Thr Ala Leu Gln Arg
90 95 100 105

tac aag gac ggc agc ctg atc aac ctg ggc ttc cct ccc gag agc tgc 389
Tyr Lys Asp Gly Ser Leu Ile Asn Leu Gly Phe Pro Pro Glu Ser Cys
110 115 120

ggc tac gcc acc gtg aca gac agc gag gcc atg ctg gtg cag gtg acc 437
Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ser Glu Ala Met Leu Val Gln Val Thr
125 130 135

ccc cac cac gtg ggc gtg gac gac tac cgg ggc cac tgg atc gac ccc 485
Pro His His Val Gly Val Asp Asp Tyr Arg Gly His Trp Ile Asp Pro
140 145 150

ctg ttc cct ggc ggc gag tgc agc acc aat ttc tgc gat acc gtg cac 533
Leu Phe Pro Gly Gly Glu Cys Ser Thr Asn Phe Cys Asp Thr Val His
155 160 165

[0048] aac agc agc gtg tgg att ccc aag agc cag aaa acc gac atc tgc gcc 581
Asn Ser Ser Val Trp Ile Pro Lys Ser Gln Lys Thr Asp Ile Cys Ala
170 175 180 185

cag agc ttc aag aac atc aag atg acc gcc agc tac ccc agc gag gga 629
Gln Ser Phe Lys Asn Ile Lys Met Thr Ala Ser Tyr Pro Ser Glu Gly
190 195 200

gcc ctg gtg tcc gac cgg ttc gcc ttc cac agc gcc tac cac ccc aac 677
Ala Leu Val Ser Asp Arg Phe Ala Phe His Ser Ala Tyr His Pro Asn
205 210 215

atg ccc ggc agc acc gtg tgc atc atg gat ttc tgc gag cag aag ggc 725
Met Pro Gly Ser Thr Val Cys Ile Met Asp Phe Cys Glu Gln Lys Gly
220 225 230

ctg cgg ttc acc aac ggc gag tgg atg ggc ctg aac gtg gag cag agc 773
Leu Arg Phe Thr Asn Gly Glu Trp Met Gly Leu Asn Val Glu Gln Ser
235 240 245

atc cgg gag aag aag atc agc gcc atc ttc ccc aac tgc gtg gcc ggc 821
Ile Arg Glu Lys Lys Ile Ser Ala Ile Phe Pro Asn Cys Val Ala Gly
250 255 260 265

acc gag atc cgg gcc acc ctg gaa tcc gag ggc gcc agg acc ctg acc 869
Thr Glu Ile Arg Ala Thr Leu Glu Ser Glu Gly Ala Arg Thr Leu Thr
270 275 280

tgg gag aca cag cgg atg ctg gac tac agc ctg tgc cag aac acc tgg 917
Trp Glu Thr Gln Arg Met Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp
285 290 295

gac aag gtg tcc cgg aaa gag cct ctg tcc ccc ctg gac ctg agc tac 965
Asp Lys Val Ser Arg Lys Glu Pro Leu Ser Pro Leu Asp Leu Ser Tyr
300 305 310

ctg agc cct aga gcc cct ggc aag ggc atg gcc tac acc gtg atc aac 1013
Leu Ser Pro Arg Ala Pro Gly Lys Gly Met Ala Tyr Thr Val Ile Asn
315 320 325

ggc acc ctg cac agc gcc cac gcc aag tat atc cgg acc tgg atc gac 1061
Gly Thr Leu His Ser Ala His Ala Lys Tyr Ile Arg Thr Trp Ile Asp
330 335 340 345

tac ggc gag atg aaa gag atc aag ggc ggc agg ggc gag tac agc aag 1109
Tyr Gly Glu Met Lys Glu Ile Lys Gly Gly Arg Gly Glu Tyr Ser Lys
350 355 360

gcc cct gag ctg ctg tgg agc cag tgg ttc gac ttc ggc ccc ttc aag 1157
Ala Pro Glu Leu Leu Trp Ser Gln Trp Phe Asp Phe Gly Pro Phe Lys
365 370 375

atc ggc ccc aac ggc ctg ctg cac acc ggc aag acc ttc aag ttc cct 1205
Ile Gly Pro Asn Gly Leu Leu His Thr Gly Lys Thr Phe Lys Phe Pro
380 385 390

ctg tat ctg atc gga gcc ggc atc atc gac gag gac ctg cac gag ctg 1253
Leu Tyr Leu Ile Gly Ala Gly Ile Ile Asp Glu Asp Leu His Glu Leu
395 400 405

gac gaa gcc gcc cct atc gac cac ccc cag atg ccc gac gcc aag agc 1301
Asp Glu Ala Ala Pro Ile Asp His Pro Gln Met Pro Asp Ala Lys Ser
410 415 420 425

gtg ctg ccc gag gac gag gaa atc ttc ttc ggc gac acc ggc gtg agc 1349
Val Leu Pro Glu Asp Glu Glu Ile Phe Phe Gly Asp Thr Gly Val Ser
430 435 440

aag aac ccc atc gag ctg atc cag ggc tgg ttc agc aac tgg cgg gag 1397
Lys Asn Pro Ile Glu Leu Ile Gln Gly Trp Phe Ser Asn Trp Arg Glu
445 450 455

agc gtg atg gcc atc gtg ggc atc gtg ctg ctg atc gtg gtg acc ttc 1445
Ser Val Met Ala Ile Val Gly Ile Val Leu Leu Ile Val Val Thr Phe
460 465 470

ctg gcc atc aag acc gtg cgg gtg ctg aac tgc ctg tgg cgg ccc agg 1493
[0049] Leu Ala Ile Lys Thr Val Arg Val Leu Asn Cys Leu Trp Arg Pro Arg
475 480 485

aag aaa cgg atc gtc cgg cag gaa gtg gac gtc gag agc cgg ctg aac 1541
Lys Lys Arg Ile Val Arg Gln Glu Val Asp Val Glu Ser Arg Leu Asn
490 495 500 505

cac ttc gag atg aga ggc ttc ccc gag tac gtg aag cgg tga tga 1586
His Phe Glu Met Arg Gly Phe Pro Glu Tyr Val Lys Arg
510 515

gaattcttaa ttaa 1600

<210> 40
<211> 518
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 40

Met Thr Asp Thr Val Leu Gly Lys Phe Gln Ile Val Phe Pro Asp Gln
1 5 10 15

Asn Glu Leu Glu Trp Thr Pro Val Val Gly Asp Ser Arg His Cys Pro
20 25 30

Gln Ser Ser Glu Met Gln Phe Asp Gly Ser Arg Ser Gln Thr Ile Leu
35 40 45

Thr Gly Lys Ala Pro Val Gly Ile Thr Pro Ser Lys Ser Asp Gly Phe
50 55 60

Ile Cys His Ala Ala Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr
65 70 75 80

Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile His His Leu Arg Pro Thr Thr
85 90 95

Ser Asp Cys Glu Thr Ala Leu Gln Arg Tyr Lys Asp Gly Ser Leu Ile
100 105 110

Asn Leu Gly Phe Pro Pro Glu Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp
115 120 125

Ser Glu Ala Met Leu Val Gln Val Thr Pro His His Val Gly Val Asp
130 135 140

Asp Tyr Arg Gly His Trp Ile Asp Pro Leu Phe Pro Gly Gly Glu Cys
145 150 155 160

Ser Thr Asn Phe Cys Asp Thr Val His Asn Ser Ser Val Trp Ile Pro
165 170 175

Lys Ser Gln Lys Thr Asp Ile Cys Ala Gln Ser Phe Lys Asn Ile Lys
180 185 190

Met Thr Ala Ser Tyr Pro Ser Glu Gly Ala Leu Val Ser Asp Arg Phe
195 200 205

Ala Phe His Ser Ala Tyr His Pro Asn Met Pro Gly Ser Thr Val Cys
210 215 220

[0050] Ile Met Asp Phe Cys Glu Gln Lys Gly Leu Arg Phe Thr Asn Gly Glu
225 230 235 240

Trp Met Gly Leu Asn Val Glu Gln Ser Ile Arg Glu Lys Lys Ile Ser
245 250 255

Ala Ile Phe Pro Asn Cys Val Ala Gly Thr Glu Ile Arg Ala Thr Leu
260 265 270

Glu Ser Glu Gly Ala Arg Thr Leu Thr Trp Glu Thr Gln Arg Met Leu
275 280 285

Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp Asp Lys Val Ser Arg Lys Glu
290 295 300

Pro Leu Ser Pro Leu Asp Leu Ser Tyr Leu Ser Pro Arg Ala Pro Gly
305 310 315 320

Lys Gly Met Ala Tyr Thr Val Ile Asn Gly Thr Leu His Ser Ala His
325 330 335

Ala Lys Tyr Ile Arg Thr Trp Ile Asp Tyr Gly Glu Met Lys Glu Ile
340 345 350

Lys Gly Gly Arg Gly Glu Tyr Ser Lys Ala Pro Glu Leu Leu Trp Ser
355 360 365

Gln Trp Phe Asp Phe Gly Pro Phe Lys Ile Gly Pro Asn Gly Leu Leu
370 375 380

His Thr Gly Lys Thr Phe Lys Phe Pro Leu Tyr Leu Ile Gly Ala Gly
385 390 395 400

Ile Ile Asp Glu Asp Leu His Glu Leu Asp Glu Ala Ala Pro Ile Asp
405 410 415

His Pro Gln Met Pro Asp Ala Lys Ser Val Leu Pro Glu Asp Glu Glu
420 425 430

Ile Phe Phe Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Ile Glu Leu Ile
435 440 445

Gln Gly Trp Phe Ser Asn Trp Arg Glu Ser Val Met Ala Ile Val Gly
450 455 460

Ile Val Leu Leu Ile Val Val Thr Phe Leu Ala Ile Lys Thr Val Arg
465 470 475 480

Val Leu Asn Cys Leu Trp Arg Pro Arg Lys Lys Arg Ile Val Arg Gln
485 490 495

Glu Val Asp Val Glu Ser Arg Leu Asn His Phe Glu Met Arg Gly Phe
500 505 510

Pro Glu Tyr Val Lys Arg
515

[0051]
<210> 41
<211> 1600
<212> DNA
<213> Vesicular stomatitis virus

<220>
<221> CDS
<222> (27)..(1586)

<400> 41
ggcgcgccgg atcctgatca gccacc atg acc gat aca gtg ctg ggc aag ttc 53
Met Thr Asp Thr Val Leu Gly Lys Phe
1 5

cag atc gtg ttc ccc gac cag aac gag ctg gaa tgg acc ccc gtc gtg 101
Gln Ile Val Phe Pro Asp Gln Asn Glu Leu Glu Trp Thr Pro Val Val
10 15 20 25

ggc gac agc cgg cat tgc cct cag tcc agc gag atg cag ttc gac ggc 149
Gly Asp Ser Arg His Cys Pro Gln Ser Ser Glu Met Gln Phe Asp Gly
30 35 40

agc aga agc cag acc atc ctg acc ggc aag gcc ccc gtg ggc atc aca 197
Ser Arg Ser Gln Thr Ile Leu Thr Gly Lys Ala Pro Val Gly Ile Thr
45 50 55

ccc agc aag agc gac ggc ttc atc tgc cac gcc gcc aag tgg gtg acc 245
Pro Ser Lys Ser Asp Gly Phe Ile Cys His Ala Ala Lys Trp Val Thr
60 65 70

acc tgc gac ttc cgg tgg tac ggc ccc aag tac atc acc cac agc atc 293
Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile
75 80 85

cac cac ctg cgg ccc acc acc tcc gac tgc gag aca gcc ctg cag cgg 341
His His Leu Arg Pro Thr Thr Ser Asp Cys Glu Thr Ala Leu Gln Arg
90 95 100 105

tac aag gac ggc agc ctg atc aac ctg ggc ttc cct ccc gag agc tgc 389

Tyr Lys Asp Gly Ser Leu Ile Asn Leu Gly Phe Pro Pro Glu Ser Cys
110 115 120

ggc tac gcc acc gtg aca gac agc gag gcc atg ctg gtg cag gtg acc 437
Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ser Glu Ala Met Leu Val Gln Val Thr
125 130 135

ccc cac cac gtg ggc gtg gac gac tac cgg ggc cac tgg atc gac ccc 485
Pro His His Val Gly Val Asp Asp Tyr Arg Gly His Trp Ile Asp Pro
140 145 150

ctg ttc cct ggc ggc gag tgc agc acc aat ttc tgc gat acc gtg cac 533
Leu Phe Pro Gly Gly Glu Cys Ser Thr Asn Phe Cys Asp Thr Val His
155 160 165

aac agc agc gtg tgg att ccc aag agc cag aaa acc gac atc tgc gcc 581
Asn Ser Ser Val Trp Ile Pro Lys Ser Gln Lys Thr Asp Ile Cys Ala
170 175 180 185

cag agc ttc aag aac atc aag atg acc gcc agc tac ccc agc gag gga 629
Gln Ser Phe Lys Asn Ile Lys Met Thr Ala Ser Tyr Pro Ser Glu Gly
190 195 200

gcc ctg gtg tcc gac cgg ttc gcc ttc cac agc gcc tac cac ccc aac 677
Ala Leu Val Ser Asp Arg Phe Ala Phe His Ser Ala Tyr His Pro Asn
205 210 215

atg ccc ggc agc acc gtg tgc atc atg gat ttc tgc gag cag aag ggc 725
Met Pro Gly Ser Thr Val Cys Ile Met Asp Phe Cys Glu Gln Lys Gly
220 225 230

ctg cgg ttc acc aac ggc gag tgg atg ggc ctg aac gtg gag cag agc 773
Leu Arg Phe Thr Asn Gly Glu Trp Met Gly Leu Asn Val Glu Gln Ser
235 240 245

atc cgg gag aag aag atc agc gcc atc ttc ccc aac tgc gtg gcc ggc 821
Ile Arg Glu Lys Lys Ile Ser Ala Ile Phe Pro Asn Cys Val Ala Gly
250 255 260 265

[0052]

acc gag atc cgg gcc acc ctg gaa tcc gag ggc gcc agg acc ctg acc 869
Thr Glu Ile Arg Ala Thr Leu Glu Ser Glu Gly Ala Arg Thr Leu Thr
270 275 280

tgg gag aca cag cgg atg ctg gac tac agc ctg tgc cag aac acc tgg 917
Trp Glu Thr Gln Arg Met Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp
285 290 295

gac aag gtg tcc cgg aaa gag cct ctg tcc ccc ctg gac ctg agc tac 965
Asp Lys Val Ser Arg Lys Glu Pro Leu Ser Pro Leu Asp Leu Ser Tyr
300 305 310

ctg agc cct aga gcc cct ggc aag ggc atg gcc tac acc gtg atc aac 1013
Leu Ser Pro Arg Ala Pro Gly Lys Gly Met Ala Tyr Thr Val Ile Asn
315 320 325

ggc acc ctg cac agc gcc cac gcc aag tat atc cgg acc tgg atc gac 1061
Gly Thr Leu His Ser Ala His Ala Lys Tyr Ile Arg Thr Trp Ile Asp
330 335 340 345

tac ggc gag atg aaa gag atc aag ggc ggc agg ggc gag tac agc aag 1109
Tyr Gly Glu Met Lys Glu Ile Lys Gly Gly Arg Gly Glu Tyr Ser Lys
350 355 360

gcc cct gag ctg ctg tgg agc cag tgg ttc gac ttc ggc ccc ttc aag 1157
Ala Pro Glu Leu Leu Trp Ser Gln Trp Phe Asp Phe Gly Pro Phe Lys
365 370 375

atc ggc ccc aac ggc ctg ctg cac acc ggc aag acc ttc aag ttc cct 1205
Ile Gly Pro Asn Gly Leu Leu His Thr Gly Lys Thr Phe Lys Phe Pro
380 385 390

ctg tat ctg atc gga gcc ggc atc atc gac gag gac ctg cac gag ctg 1253
Leu Tyr Leu Ile Gly Ala Gly Ile Ile Asp Glu Asp Leu His Glu Leu
395 400 405

gac gaa gcc gcc cct atc gac cac ccc cag atg ccc gac gcc aag agc 1301
Asp Glu Ala Ala Pro Ile Asp His Pro Gln Met Pro Asp Ala Lys Ser

410 415 420 425

gtg ctg ccc gag gac gag gaa atc ttc ttc ggc gac acc ggc gtg agc 1349
Val Leu Pro Glu Asp Glu Glu Ile Phe Phe Gly Asp Thr Gly Val Ser
430 435 440

aag aac ccc atc gag ctg atc cag ggc tgg ttc agc aac tgg cgg gag 1397
Lys Asn Pro Ile Glu Leu Ile Gln Gly Trp Phe Ser Asn Trp Arg Glu
445 450 455

agc gtg atg gcc atc gtg ggc atc gtg ctg ctg atc gtg gtg acc ttc 1445
Ser Val Met Ala Ile Val Gly Ile Val Leu Leu Ile Val Val Thr Phe
460 465 470

ctg gcc atc aag acc gtg cgg gtg ctg aac tgc ctg tgg cgg ccc agg 1493
Leu Ala Ile Lys Thr Val Arg Val Leu Asn Cys Leu Trp Arg Pro Arg
475 480 485

aag aaa cgg atc gtc cgg cag gaa gtg gac gtc gag agc cgg ctg aac 1541
Lys Lys Arg Ile Val Arg Gln Glu Val Asp Val Glu Ser Arg Leu Asn
490 495 500 505

cac ttc gag atg aga ggc ttc ccc gag tac gtg aag cgg tga tga 1586
His Phe Glu Met Arg Gly Phe Pro Glu Tyr Val Lys Arg
510 515

gaattcttaa ttaa 1600

<210> 42
<211> 518
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 42

Met Thr Asp Thr Val Leu Gly Lys Phe Gln Ile Val Phe Pro Asp Gln
1 5 10 15

[0053]

Asn Glu Leu Glu Trp Thr Pro Val Val Gly Asp Ser Arg His Cys Pro
20 25 30

Gln Ser Ser Glu Met Gln Phe Asp Gly Ser Arg Ser Gln Thr Ile Leu
35 40 45

Thr Gly Lys Ala Pro Val Gly Ile Thr Pro Ser Lys Ser Asp Gly Phe
50 55 60

Ile Cys His Ala Ala Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr
65 70 75 80

Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile His His Leu Arg Pro Thr Thr
85 90 95

Ser Asp Cys Glu Thr Ala Leu Gln Arg Tyr Lys Asp Gly Ser Leu Ile
100 105 110

Asn Leu Gly Phe Pro Pro Glu Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp
115 120 125

Ser Glu Ala Met Leu Val Gln Val Thr Pro His His Val Gly Val Asp
130 135 140

Asp Tyr Arg Gly His Trp Ile Asp Pro Leu Phe Pro Gly Gly Glu Cys
145 150 155 160

Ser Thr Asn Phe Cys Asp Thr Val His Asn Ser Ser Val Trp Ile Pro

165 170 175

Lys Ser Gln Lys Thr Asp Ile Cys Ala Gln Ser Phe Lys Asn Ile Lys
180 185 190

Met Thr Ala Ser Tyr Pro Ser Glu Gly Ala Leu Val Ser Asp Arg Phe
195 200 205

Ala Phe His Ser Ala Tyr His Pro Asn Met Pro Gly Ser Thr Val Cys
210 215 220

Ile Met Asp Phe Cys Glu Gln Lys Gly Leu Arg Phe Thr Asn Gly Glu
225 230 235 240

Trp Met Gly Leu Asn Val Glu Gln Ser Ile Arg Glu Lys Lys Ile Ser
245 250 255

Ala Ile Phe Pro Asn Cys Val Ala Gly Thr Glu Ile Arg Ala Thr Leu
260 265 270

Glu Ser Glu Gly Ala Arg Thr Leu Thr Trp Glu Thr Gln Arg Met Leu
275 280 285

Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp Asp Lys Val Ser Arg Lys Glu
290 295 300

Pro Leu Ser Pro Leu Asp Leu Ser Tyr Leu Ser Pro Arg Ala Pro Gly
305 310 315 320

[0054]

Lys Gly Met Ala Tyr Thr Val Ile Asn Gly Thr Leu His Ser Ala His
325 330 335

Ala Lys Tyr Ile Arg Thr Trp Ile Asp Tyr Gly Glu Met Lys Glu Ile
340 345 350

Lys Gly Gly Arg Gly Glu Tyr Ser Lys Ala Pro Glu Leu Leu Trp Ser
355 360 365

Gln Trp Phe Asp Phe Gly Pro Phe Lys Ile Gly Pro Asn Gly Leu Leu
370 375 380

His Thr Gly Lys Thr Phe Lys Phe Pro Leu Tyr Leu Ile Gly Ala Gly
385 390 395 400

Ile Ile Asp Glu Asp Leu His Glu Leu Asp Glu Ala Ala Pro Ile Asp
405 410 415

His Pro Gln Met Pro Asp Ala Lys Ser Val Leu Pro Glu Asp Glu Glu
420 425 430

Ile Phe Phe Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Ile Glu Leu Ile
435 440 445

Gln Gly Trp Phe Ser Asn Trp Arg Glu Ser Val Met Ala Ile Val Gly
450 455 460

Ile Val Leu Leu Ile Val Val Thr Phe Leu Ala Ile Lys Thr Val Arg
465 470 475 480

Val Leu Asn Cys Leu Trp Arg Pro Arg Lys Lys Arg Ile Val Arg Gln
485 490 495

Glu Val Asp Val Glu Ser Arg Leu Asn His Phe Glu Met Arg Gly Phe
500 505 510

Pro Glu Tyr Val Lys Arg
515

<210> 43
<211> 1573
<212> DNA
<213> Vesicular stomatitis virus

<220>
<221> CDS
<222> (27)..(1559)

<400> 43
ggcgcgccgg atcctgatca gccacc atg agc atc atc agc tat atc gcc ttt 53
Met Ser Ile Ile Ser Tyr Ile Ala Phe
1 5

ctg ctg ctg atc gac agc acc ctg ggc atc ccc atc ttc gtg ccc agc 101
Leu Leu Leu Ile Asp Ser Thr Leu Gly Ile Pro Ile Phe Val Pro Ser
10 15 20 25

ggc cag aac atc agc tgg cag ccc gtg atc cag ccc ttc gac tac cag 149
Gly Gln Asn Ile Ser Trp Gln Pro Val Ile Gln Pro Phe Asp Tyr Gln
30 35 40

[0055] tgc ccc atc cac ggc aac ctg ccc aac acc atg ggc ctg agc gcc acc 197
Cys Pro Ile His Gly Asn Leu Pro Asn Thr Met Gly Leu Ser Ala Thr
45 50 55

aag ctg acc atc aag agc ccc agc gtg ttc agc acc gac aag gtg tcc 245
Lys Leu Thr Ile Lys Ser Pro Ser Val Phe Ser Thr Asp Lys Val Ser
60 65 70

ggc tgg atc tgc cac gcc gcc gag tgg aaa acc acc tgc gac tac cgg 293
Gly Trp Ile Cys His Ala Ala Glu Trp Lys Thr Thr Cys Asp Tyr Arg
75 80 85

tgg tac ggc ccc cag tac atc acc cac agc atc cac ccc atc agc ccc 341
Trp Tyr Gly Pro Gln Tyr Ile Thr His Ser Ile His Pro Ile Ser Pro
90 95 100 105

acc atc gac gag tgc aag cgg atc atc agc cgg atc gcc agc ggc acc 389
Thr Ile Asp Glu Cys Lys Arg Ile Ile Ser Arg Ile Ala Ser Gly Thr
110 115 120

gac gag gac ctg ggc ttc cca ccc cag agc tgc ggc tgg gcc agc gtg 437
Asp Glu Asp Leu Gly Phe Pro Pro Gln Ser Cys Gly Trp Ala Ser Val
125 130 135

acc acc gtg agc aac acc aac tac aag gtg gtg ccc cac agc gtg cac 485
Thr Thr Val Ser Asn Thr Asn Tyr Lys Val Val Pro His Ser Val His
140 145 150

ctg gaa ccc tac ggc ggc cac tgg atc gac cac gac ttc aac ggc ggc 533
Leu Glu Pro Tyr Gly Gly His Trp Ile Asp His Asp Phe Asn Gly Gly
155 160 165

gag tgc cgg gag aaa gtg tgc gag atg aag ggc aac cac agc atc tgg 581
Glu Cys Arg Glu Lys Val Cys Glu Met Lys Gly Asn His Ser Ile Trp
170 175 180 185

atc acc gac gag aca gtg cag cac gag tgc gag aag cac atc gag gaa 629
Ile Thr Asp Glu Thr Val Gln His Glu Cys Glu Lys His Ile Glu Glu
190 195 200

gtg gag ggc atc atg tac ggc aac gcc ccc agg ggc gac gcc atc tac 677
Val Glu Gly Ile Met Tyr Gly Asn Ala Pro Arg Gly Asp Ala Ile Tyr
205 210 215

atc aac aac ttc atc atc gac aag cac cac cgg gtg tac cgg ttc ggc 725
Ile Asn Asn Phe Ile Ile Asp Lys His His Arg Val Tyr Arg Phe Gly
220 225 230

ggc tcc tgc cgg atg aag ttc tgc aac aag gac ggc atc aag ttc acc 773
Gly Ser Cys Arg Met Lys Phe Cys Asn Lys Asp Gly Ile Lys Phe Thr
235 240 245

aga ggc gac tgg gtg gag aaa acc gcc ggc acc ctg acc aac atc tac 821
Arg Gly Asp Trp Val Glu Lys Thr Ala Gly Thr Leu Thr Asn Ile Tyr
250 255 260 265

gag aac atc ccc gag tgc gcc gac ggc aca ctg gtg tcc ggc cac aga 869
Glu Asn Ile Pro Glu Cys Ala Asp Gly Thr Leu Val Ser Gly His Arg
270 275 280

ccc ggc ctg gac ctg atc gac acc gtg ttc aac ctg gaa aac gtg gtg 917
Pro Gly Leu Asp Leu Ile Asp Thr Val Phe Asn Leu Glu Asn Val Val
285 290 295

gag tac acc ctg tgc gag ggc acc aag cgg aag atc aac aag cag gaa 965
Glu Tyr Thr Leu Cys Glu Gly Thr Lys Arg Lys Ile Asn Lys Gln Glu
300 305 310

aag ctg acc agc gtc gac ctg agc tac ctg gcc ccc agg atc ggc ggc 1013
Lys Leu Thr Ser Val Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Pro Arg Ile Gly Gly
315 320 325

ttc ggc agc gtg ttc cgc gtg cgg aat ggg acc ctg gaa aga gga agc 1061
Phe Gly Ser Val Phe Arg Val Arg Asn Gly Thr Leu Glu Arg Gly Ser
330 335 340 345

aca aca tac att cgg atc gaa gtg gaa ggc ccc gtg gtg gac agc ctg 1109
Thr Thr Tyr Ile Arg Ile Glu Val Glu Gly Pro Val Val Asp Ser Leu
[0056] 350 355 360

aac ggc atc gac ccc cgg acc aac gcc agc cgg gtg ttc tgg gac gac 1157
Asn Gly Ile Asp Pro Arg Thr Asn Ala Ser Arg Val Phe Trp Asp Asp
365 370 375

tgg gag ctg gac ggc aac atc tac cag ggc ttc aat ggc gtg tac aag 1205
Trp Glu Leu Asp Gly Asn Ile Tyr Gln Gly Phe Asn Gly Val Tyr Lys
380 385 390

ggc aag gat ggc aag atc cac atc ccc ctg aac atg atc gag agc ggc 1253
Gly Lys Asp Gly Lys Ile His Ile Pro Leu Asn Met Ile Glu Ser Gly
395 400 405

atc atc gac gac gag ctg cag cac gcc ttc cag gcc gac atc atc ccc 1301
Ile Ile Asp Asp Glu Leu Gln His Ala Phe Gln Ala Asp Ile Ile Pro
410 415 420 425

cac ccc cac tac gac gac gac gag atc cgg gag gac gac atc ttc ttc 1349
His Pro His Tyr Asp Asp Asp Glu Ile Arg Glu Asp Asp Ile Phe Phe
430 435 440

gac aac acc ggc gag aac ggc aac ccc gtg gac gcc gtg gtg gaa tgg 1397
Asp Asn Thr Gly Glu Asn Gly Asn Pro Val Asp Ala Val Val Glu Trp
445 450 455

gtg tcc gga tgg ggc acc agc ctg aag ttc ttc ggc atg acc ctg gtg 1445
Val Ser Gly Trp Gly Thr Ser Leu Lys Phe Phe Gly Met Thr Leu Val
460 465 470

gcc ctg atc ctg atc ttc ctg ctg atc cgg tgc tgc gtg gcc tgc acc 1493
Ala Leu Ile Leu Ile Phe Leu Leu Ile Arg Cys Cys Val Ala Cys Thr
475 480 485

tac ctg atg aag aag agc aag agg ccc gcc acc gag agc cac gag atg 1541
Tyr Leu Met Lys Lys Ser Lys Arg Pro Ala Thr Glu Ser His Glu Met
490 495 500 505

cgg agc ctg gtg tga tga gaattcttaa ttaa 1573

Arg Ser Leu Val

<210> 44
<211> 509
<212> PRT
<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 44

Met Ser Ile Ile Ser Tyr Ile Ala Phe Leu Leu Leu Ile Asp Ser Thr
1 5 10 15

Leu Gly Ile Pro Ile Phe Val Pro Ser Gly Gln Asn Ile Ser Trp Gln
20 25 30

Pro Val Ile Gln Pro Phe Asp Tyr Gln Cys Pro Ile His Gly Asn Leu
35 40 45

Pro Asn Thr Met Gly Leu Ser Ala Thr Lys Leu Thr Ile Lys Ser Pro
50 55 60

Ser Val Phe Ser Thr Asp Lys Val Ser Gly Trp Ile Cys His Ala Ala
65 70 75 80

Glu Trp Lys Thr Thr Cys Asp Tyr Arg Trp Tyr Gly Pro Gln Tyr Ile
85 90 95

Thr His Ser Ile His Pro Ile Ser Pro Thr Ile Asp Glu Cys Lys Arg
100 105 110

[0057]

Ile Ile Ser Arg Ile Ala Ser Gly Thr Asp Glu Asp Leu Gly Phe Pro
115 120 125

Pro Gln Ser Cys Gly Trp Ala Ser Val Thr Thr Val Ser Asn Thr Asn
130 135 140

Tyr Lys Val Val Pro His Ser Val His Leu Glu Pro Tyr Gly Gly His
145 150 155 160

Trp Ile Asp His Asp Phe Asn Gly Gly Glu Cys Arg Glu Lys Val Cys
165 170 175

Glu Met Lys Gly Asn His Ser Ile Trp Ile Thr Asp Glu Thr Val Gln
180 185 190

His Glu Cys Glu Lys His Ile Glu Glu Val Glu Gly Ile Met Tyr Gly
195 200 205

Asn Ala Pro Arg Gly Asp Ala Ile Tyr Ile Asn Asn Phe Ile Ile Asp
210 215 220

Lys His His Arg Val Tyr Arg Phe Gly Gly Ser Cys Arg Met Lys Phe
225 230 235 240

Cys Asn Lys Asp Gly Ile Lys Phe Thr Arg Gly Asp Trp Val Glu Lys
245 250 255

Thr Ala Gly Thr Leu Thr Asn Ile Tyr Glu Asn Ile Pro Glu Cys Ala
260 265 270

Asp Gly Thr Leu Val Ser Gly His Arg Pro Gly Leu Asp Leu Ile Asp
275 280 285

Thr Val Phe Asn Leu Glu Asn Val Val Glu Tyr Thr Leu Cys Glu Gly
290 295 300

Thr Lys Arg Lys Ile Asn Lys Gln Glu Lys Leu Thr Ser Val Asp Leu
305 310 315 320

Ser Tyr Leu Ala Pro Arg Ile Gly Gly Phe Gly Ser Val Phe Arg Val
325 330 335

Arg Asn Gly Thr Leu Glu Arg Gly Ser Thr Thr Tyr Ile Arg Ile Glu
340 345 350

Val Glu Gly Pro Val Val Asp Ser Leu Asn Gly Ile Asp Pro Arg Thr
355 360 365

Asn Ala Ser Arg Val Phe Trp Asp Asp Trp Glu Leu Asp Gly Asn Ile
370 375 380

Tyr Gln Gly Phe Asn Gly Val Tyr Lys Gly Lys Asp Gly Lys Ile His
385 390 395 400

Ile Pro Leu Asn Met Ile Glu Ser Gly Ile Ile Asp Asp Glu Leu Gln
405 410 415

[0058] His Ala Phe Gln Ala Asp Ile Ile Pro His Pro His Tyr Asp Asp Asp
420 425 430

Glu Ile Arg Glu Asp Asp Ile Phe Phe Asp Asn Thr Gly Glu Asn Gly
435 440 445

Asn Pro Val Asp Ala Val Val Glu Trp Val Ser Gly Trp Gly Thr Ser
450 455 460

Leu Lys Phe Phe Gly Met Thr Leu Val Ala Leu Ile Leu Ile Phe Leu
465 470 475 480

Leu Ile Arg Cys Cys Val Ala Cys Thr Tyr Leu Met Lys Lys Ser Lys
485 490 495

Arg Pro Ala Thr Glu Ser His Glu Met Arg Ser Leu Val
500 505

<210> 45
<211> 1578
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> VSV-G Indiana optimized

<400> 45
ctcggatcct gatcagccac catgaaatgc ctgctctatc tggccttcct ctttatcggc 60

gtgaactgta agttcacgat cgtgtttccc cacaatcaga agggaaactg gaagaacgtc 120

ccgagcaact accactactg ccctagctca agcgacctga actggcacaa cgacctgatc 180

ggcaccgcta tccaggtgaa gatgccaaag agccacaagg ccatccaagc cgacggctgg 240
atgtgtcacg ccagcaaatg ggtgacgacg tgcgattttc gctggtatgg ccccaagtac 300
atcacccaat caatccgctc atttacaccc agcgtggagc aatgtaagga gagcatcgag 360
cagaccaagc aggggacctg gctcaacccc ggcttcccac cgcaaagctg cggatacgcc 420
accgtgaccg acgctgaggc cgtcatcgtg caggtgaccc cgcaccacgt gctggtggac 480
gagtacaccg gcgagtgggt ggattcacag tttatcaacg gaaagtgtag caattacatc 540
tgccccaccg tgcacaacag caccacctgg cactcagact ataaggtgaa gggcctctgc 600
gacagcaatc tgatctcaat ggacatcacc ttctttagcg aagacggcga actctcaagc 660
ctcgggaagg aaggcaccgg gttccgcagc aattactttg cttacgaaac cggcggcaag 720
gcctgcaaga tgcaatactg caagcactgg ggcgtgcgcc tgccaagcgg cgtgtggttt 780
gagatggctg ataaggacct gttcgccgct gcccgcttcc cggaatgccc cgaggggagc 840
agcatcagcg cccccagcca gacatcagtg gacgtgagcc tgatccagga tgtggaacgc 900
atcctggact acagcctgtg tcaggaaacg tggagcaaga tccgcgccgg actgcctatc 960
agccccgtgg atctcagcta cctggcccca aagaacccag gcaccggacc cgcctttaca 1020
atcatcaacg gcaccctgaa gtactttgaa acacgctaca tccgcgtcga catcgccgct 1080
cccatcctct cacgcatggt gggcatgatc tcagggacga ccacggagcg cgagctgtgg 1140
gatgactggg ccccgtatga agatgtggag atcggaccta acggcgtgct gcgcacatca 1200
agcgggtaca agttcccgct gtacatgatc ggccacggca tgctggacag cgacctgcac 1260
ctcagctcaa aggcccaggt ctttgagcac ccacacatcc aggacgctgc cagccagctc 1320
[0059] cccgacgacg aaagcctgtt ctttggagat acagggctca gcaagaaccc catcgagctg 1380
gtcgagggct ggttctcaag ctggaagagc agcatcgctt catttttttt catcatcggc 1440
ctcatcatcg ggctgtttct ggtgctgcgc gtcggcatcc acctgtgcat caagctgaag 1500
cacaccaaga agcgccagat ctataccgac atcgagatga atcgcctggg gaagtaagaa 1560
ttctgcagat atccagca 1578

<210> 46
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Indiana oligonucleotide

<400> 46
agcagcatcg cttcattttt tttcatcatc gg 32

<210> 47
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Indiana oligonucleotide

<400> 47
gctggatatc tgcagaattc ttacttcccc aggcg 35

<210> 48
<211> 160
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR fragment

<400> 48
agcagcatcg cttcattttt tttcatcatc ggcctcatca tcgggctgtt tctggtgctg 60

cgcgtcggca tccacctgtg catcaagctg aagcacacca agaagcgcca gatctatacc 120

gacatcgaga tgaatcgcct ggggaagtaa gaattctgca 160

<210> 49
<211> 1597
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> VSV-G New Jersey optimized

<400> 49
taccgagctc ggatcctgat cagccaccat gctgtcatat ctgatctttg ccctggctgt 60

gagcccaatc ctcggaaaga tcgaaatcgt gttcccacaa cacaccacag gggactggaa 120

gcgcgtgccc cacgagtaca actactgccc gacctcagcc gacaagaata gccacggcac 180

gcagaccggc atccctgtgg agctgaccat gcccaagggg ctcacaacgc accaagtcga 240

aggcttcatg tgccacagcg ctctctggat gacaacctgc gattttcgct ggtatggccc 300

caagtacatc acgcacagca tccacaatga ggaaccaacc gactaccagt gcctcgaagc 360

catcaagtca tacaaggatg gggtgagctt caaccccggc ttcccgcccc aatcatgtgg 420

ctacggcacc gtgaccgacg ccgaggccca catcgtgacc gtgacacccc actcagtcaa 480

ggtggacgag tacacaggcg aatggatcga cccccacttc atcgggggcc gctgtaaggg 540

[0060] ccaaatctgc gagaccgtgc acaacagcac caagtggttt acgtcatcag acggcgaaag 600

cgtgtgcagc caactgttta cgctcgtggg cggcatcttc tttagcgaca gcgaggagat 660

caccagcatg ggcctcccgg agacaggaat ccgcagcaac tactttccgt acatcagcac 720

cgagggaatc tgtaagatgc ctttttgccg caagcaggga tataagctga agaatgacct 780

gtggttccag atcatggacc cggacctgga caagaccgtc cgcgatctgc cccacatcaa 840

ggactgtgat ctgtcatcaa gcatcatcac ccccggagaa cacgccacgg acatcagcct 900

catcagcgat gtggagcgca tcctcgacta cgctctctgc cagaacacat ggagcaagat 960

cgaaagcggc gaacccatca ccccagtgga cctgagctat ctcggcccaa agaaccccgg 1020

cgtggggccc gtgttcacca tcatcaacgg gagcctgcac tactttacaa gcaagtatct 1080

gcgcgtggag ctcgaaagcc cagtcatccc ccgcatggag gggaaggtgg ccgggacccg 1140

catcgtgcgc cagctgtggg accagtggtt ccctttggc gaggtggaaa tcggccccaa 1200

cggcgtgctg aagaccaagc aaggatataa gttcccgctg cacatcatcg ggacgggcga 1260

agtggacagc gatatcaaga tggagcgcgt ggtcaagcac tgggagcacc cacacatcga 1320

ggctgctcag acctttctca agaaggacga taccggcgaa gtcctgtatt acggggatac 1380

gggagtgagc aagaaccctg tggagctggt ggaaggctgg ttcagcggat ggcgctcaag 1440

cctgatgggc gtgctggccg tcatcatcgg atttgtgatc ctgatgttcc tcatcaagct 1500

gatcggcgtg ctgtcaagcc tgttccgccc taagcgccgc ccaatctaca agagcgacgt 1560

cgagatggcc cactttcgct aagaattctg cagatat 1597

<210> 50

<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> New Jersey oligonucleotide

<400> 50
cgagctcgga tcctgatcag ccaccatgct gtc 33

<210> 51
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> New Jersey oligonucleotide

<400> 51
gaaaaaaaat gaagcgatgc tgctgcgcca tccgctgaac cagccttcca c 51

<210> 52
<211> 1456
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR product

<400> 52
cgagctcgga tcctgatcag ccaccatgct gtcatatctg atctttgccc tggctgtgag 60

cccaatcctc ggaaagatcg aaatcgtgtt cccacaacac accacagggg actggaagcg 120

cgtgccccac gagtacaact actgcccgac ctcagccgac aagaatagcc acggcacgca 180

[0061] gaccggcatc cctgtggagc tgaccatgcc caaggggctc acaacgcacc aagtcgaagg 240

cttcatgtgc cacagcgctc tctggatgac aacctgcgat tttcgctggt atggccccaa 300

gtacatcacg cacagcatcc acaatgagga accaaccgac taccagtgcc tcgaagccat 360

caagtcatac aaggatgggg tgagcttcaa ccccggcttc ccgccccaat catgtggcta 420

cggcaccgtg accgacgccg aggcccacat cgtgaccgtg acaccccact cagtcaaggt 480

ggacgagtac acaggcgaat ggatcgaccc ccacttcatc gggggccgct gtaagggcca 540

aatctgcgag accgtgcaca acagcaccaa gtggtttacg tcatcagacg gcgaaagcgt 600

gtgcagccaa ctgtttacgc tcgtgggcgg catcttcttt agcgacagcg aggagatcac 660

cagcatgggc ctcccggaga caggaatccg cagcaactac tttccgtaca tcagcaccga 720

gggaatctgt aagatgcctt tttgccgcaa gcagggatat aagctgaaga atgacctgtg 780

gttccagatc atggacccgg acctggacaa gaccgtccgc gatctgcccc acatcaagga 840

ctgtgatctg tcatcaagca tcatcacccc cggagaacac gccacggaca tcagcctcat 900

cagcgatgtg gagcgcatcc tcgactacgc tctctgccag aacacatgga gcaagatcga 960

aagcggcgaa cccatcaccc cagtggacct gagctatctc ggcccaaaga accccggcgt 1020

ggggcccgtg ttcaccatca tcaacgggag cctgcactac tttacaagca agtatctgcg 1080

cgtggagctc gaaagcccag tcatcccccg catggagggg aaggtggccg ggacccgcat 1140

cgtgcgccag ctgtgggacc agtggttccc ttttggcgag gtggaaatcg gccccaacgg 1200

cgtgctgaag accaagcaag gatataagtt cccgctgcac atcatcggga cgggcgaagt 1260

ggacagcgat atcaagatgg agcgcgtggt caagcactgg gagcacccac acatcgaggc 1320

tgctcagacc tttctcaaga aggacgatac cggcgaagtc ctgtattacg gggatacggg 1380

agtgagcaag aaccctgtgg agctggtgga aggctggttc agcggatggc gcagcagcat 1440

cgcttcattt tttttc 1456

<210> 53
<211> 1615
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR product

<400> 53
gagctcggat cctgatcagc caccatgctg tcatatctga tctttgccct ggctgtgagc 60

ccaatcctcg gaaagatcga aatcgtgttc ccacaacaca ccacagggga ctggaagcgc 120

gtgccccacg agtacaacta ctgcccgacc tcagccgaca agaatagcca cggcacgcag 180

accggcatcc ctgtggagct gaccatgccc aaggggctca caacgcacca agtcgaaggc 240

ttcatgtgcc acagcgctct ctggatgaca acctgcgatt ttcgctggta tggccccaag 300

tacatcacgc acagcatcca caatgaggaa ccaaccgact accagtgcct cgaagccatc 360

aagtcataca aggatggggt gagcttcaac cccggcttcc cgccccaatc atgtggctac 420

ggcaccgtga ccgacgccga ggcccacatc gtgaccgtga caccccactc agtcaaggtg 480

gacgagtaca caggcgaatg gatcgacccc cacttcatcg ggggccgctg taagggccaa 540

atctgcgaga ccgtgcacaa cagcaccaag tggtttacgt catcagacgg cgaaagcgtg 600

tgcagccaac tgtttacgct cgtgggcggc atcttcttta gcgacagcga ggagatcacc 660

agcatgggcc tcccggagac aggaatccgc agcaactact ttccgtacat cagcaccgag 720

[0062] ggaatctgta agatgccttt ttgccgcaag cagggatata agctgaagaa tgacctgtgg 780

ttccagatca tggacccgga cctggacaag accgtccgcg atctgcccca catcaaggac 840

tgtgatctgt catcaagcat catcaccccc ggagaacacg ccacggacat cagcctcatc 900

agcgatgtgg agcgcatcct cgactacgct ctctgccaga acacatggag caagatcgaa 960

agcggcgaac ccatcacccc agtggacctg agctatctcg gcccaaagaa ccccggcgtg 1020

gggcccgtgt tcaccatcat caacgggagc ctgcactact ttacaagcaa gtatctgcgc 1080

gtggagctcg aaagcccagt catcccccgc atggagggga aggtggccgg gacccgcatc 1140

gtgcgccagc tgtgggacca gtggttccct tttggcgagg tggaaatcgg ccccaacggc 1200

gtgctgaaga ccaagcaagg atataagttc ccgctgcaca tcatcgggac gggcgaagtg 1260

gacagcgata tcaagatgga gcgcgtggtc aagcactggg agcacccaca catcgaggct 1320

gctcagacct ttctcaagaa ggacgatacc ggcgaagtcc tgtattacgg ggatacggga 1380

gtgagcaaga accctgtgga gctggtggaa ggctggttca gcggatggcg cagcagcatc 1440

gcttcatttt ttttcagcag catcgcttca tttttttca tcatcggcct catcatcggg 1500

ctgtttctgg tgctgcgcgt cggcatccac ctgtgcatca agctgaagca caccaagaag 1560

cgccagatct ataccgacat cgagatgaat cgcctgggga agtaagaatt ctgca 1615

<210> 54
<211> 1563
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> fusion VSV-G Chandipura / Indiana

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1563)

<400> 54
atg acc agc agc gtg acc atc agc gtg gtg ctg ctg atc agc ttc atc 48
Met Thr Ser Ser Val Thr Ile Ser Val Val Leu Leu Ile Ser Phe Ile
1 5 10 15

acc ccc ctg tac agc tac ctg agc att gcc ttc ccc gag aac acc aag 96
Thr Pro Leu Tyr Ser Tyr Leu Ser Ile Ala Phe Pro Glu Asn Thr Lys
20 25 30

ctg gac tgg aag ccc gtg acc aag aac acc cgg tac tgc ccc atg ggc 144
Leu Asp Trp Lys Pro Val Thr Lys Asn Thr Arg Tyr Cys Pro Met Gly
35 40 45

ggc gag tgg ttt ctg gaa ccc ggc ctg cag gaa gag agc ttc ctg agc 192
Gly Glu Trp Phe Leu Glu Pro Gly Leu Gln Glu Glu Ser Phe Leu Ser
50 55 60

agc acc ccc atc ggc gcc acc ccc agc aag agc gac ggc ttc ctg tgc 240
Ser Thr Pro Ile Gly Ala Thr Pro Ser Lys Ser Asp Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80

cac gcc gcc aag tgg gtg acc acc tgc gac ttc cgg tgg tac ggc ccc 288
His Ala Ala Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro
85 90 95

aag tac atc acc cac agc atc cac aac atc aag ccc acc aga agc gac 336
Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile His Asn Ile Lys Pro Thr Arg Ser Asp
100 105 110

tgc gac aca gcc ctg gcc tct tac aag agc ggc acc ctg gtg tcc ctg 384
Cys Asp Thr Ala Leu Ala Ser Tyr Lys Ser Gly Thr Leu Val Ser Leu
115 120 125

[0063] ggc ttc cct ccc gag agc tgc ggc tac gcc agc gtg acc gac agc gag 432
Gly Phe Pro Pro Glu Ser Cys Gly Tyr Ala Ser Val Thr Asp Ser Glu
130 135 140

ttc ctg gtg att atg att acc ccc cac cac gtg ggc gtg gac gac tac 480
Phe Leu Val Ile Met Ile Thr Pro His His Val Gly Val Asp Asp Tyr
145 150 155 160

cgg ggc cac tgg gtg gac cct ctg ttc gtg gga ggg gaa tgc gac cag 528
Arg Gly His Trp Val Asp Pro Leu Phe Val Gly Gly Glu Cys Asp Gln
165 170 175

agc tac tgc gat acc atc cac aac tcc agc gtg tgg att ccc gcc gac 576
Ser Tyr Cys Asp Thr Ile His Asn Ser Ser Val Trp Ile Pro Ala Asp
180 185 190

cag acc aag aag aac atc tgc ggc cag agc ttc acc cct ctg acc gtg 624
Gln Thr Lys Lys Asn Ile Cys Gly Gln Ser Phe Thr Pro Leu Thr Val
195 200 205

acc gtg gcc tac gac aag acc aaa gag att gcc gcc gga ggg atc gtg 672
Thr Val Ala Tyr Asp Lys Thr Lys Glu Ile Ala Ala Gly Gly Ile Val
210 215 220

ttc aag agc aag tac cac agc cac atg gaa ggc gcc agg acc tgc aga 720
Phe Lys Ser Lys Tyr His Ser His Met Glu Gly Ala Arg Thr Cys Arg
225 230 235 240

ctg tcc tac tgc ggc cgg aac ggc atc aag ttc ccc aac ggc gag tgg 768
Leu Ser Tyr Cys Gly Arg Asn Gly Ile Lys Phe Pro Asn Gly Glu Trp
245 250 255

gtg tcc ctg atg ctg aag ctg cgg agc aag cgg aac ctg tac ttc ccc 816
Val Ser Leu Met Leu Lys Leu Arg Ser Lys Arg Asn Leu Tyr Phe Pro
260 265 270

tgc ctg aag atg tgc ccc acc ggc atc cgg ggc gag atc tac ccc agc 864
Cys Leu Lys Met Cys Pro Thr Gly Ile Arg Gly Glu Ile Tyr Pro Ser

275 280 285

atc aga tgg gcc cag gtg ctg acc agc gag atc cag aga atc ctg gac 912
Ile Arg Trp Ala Gln Val Leu Thr Ser Glu Ile Gln Arg Ile Leu Asp
290 295 300

tac agc ctg tgc cag aac acc tgg gac aag gtg gag cgg aaa gag ccc 960
Tyr Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp Asp Lys Val Glu Arg Lys Glu Pro
305 310 315 320

ctg agc ccc ctg gac ctg agc tac ctg gcc agc aag tcc ccc ggc aag 1008
Leu Ser Pro Leu Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Ser Pro Gly Lys
325 330 335

ggc ctg gcc tac acc gtg atc aac ggc acc ctg agc ttc gcc cac acc 1056
Gly Leu Ala Tyr Thr Val Ile Asn Gly Thr Leu Ser Phe Ala His Thr
340 345 350

aga tac gtg cgg atg tgg atc gac ggc ccc gtg ctg aaa gag ccc aag 1104
Arg Tyr Val Arg Met Trp Ile Asp Gly Pro Val Leu Lys Glu Pro Lys
355 360 365

ggc aag aga gag agc ccc agc ggc atc agc agc gac atc tgg acc cag 1152
Gly Lys Arg Glu Ser Pro Ser Gly Ile Ser Ser Asp Ile Trp Thr Gln
370 375 380

tgg ttc aag tac ggc gac atg gaa atc ggc ccc aac ggc ctg ctg aaa 1200
Trp Phe Lys Tyr Gly Asp Met Glu Ile Gly Pro Asn Gly Leu Leu Lys
385 390 395 400

aca gcc ggc gga tac aag ttt cct tgg cac ctg atc ggc atg ggc atc 1248
Thr Ala Gly Gly Tyr Lys Phe Pro Trp His Leu Ile Gly Met Gly Ile
405 410 415

gtg gac aac gag ctg cac gag ctg tcc gag gcc aac ccc ctg gat cac 1296
Val Asp Asn Glu Leu His Glu Leu Ser Glu Ala Asn Pro Leu Asp His
420 425 430

[0064]

ccc cag ctg ccc cac gcc cag agc att gcc gac gac agc gag gaa atc 1344
Pro Gln Leu Pro His Ala Gln Ser Ile Ala Asp Asp Ser Glu Glu Ile
435 440 445

ttc ttc ggc gac acc ggc gtg agc aag aac ccc gtg gaa ctg gtg aca 1392
Phe Phe Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Val Glu Leu Val Thr
450 455 460

ggc tgg ttc acc agc tgg aaa agc agc atc gct tca ttt ttt ttc atc 1440
Gly Trp Phe Thr Ser Trp Lys Ser Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile
465 470 475 480

atc ggc ctc atc atc ggg ctg ttt ctg gtg ctg cgc gtc ggc atc cac 1488
Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu Val Leu Arg Val Gly Ile His
485 490 495

ctg tgc atc aag ctg aag cac acc aag aag cgc cag atc tat acc gac 1536
Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp
500 505 510

atc gag atg aat cgc ctg ggg aag taa 1563
Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
515 520

<210> 55
<211> 520
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 55

Met Thr Ser Ser Val Thr Ile Ser Val Val Leu Leu Ile Ser Phe Ile
1 5 10 15

Thr Pro Leu Tyr Ser Tyr Leu Ser Ile Ala Phe Pro Glu Asn Thr Lys
20 25 30

Leu Asp Trp Lys Pro Val Thr Lys Asn Thr Arg Tyr Cys Pro Met Gly
35 40 45

Gly Glu Trp Phe Leu Glu Pro Gly Leu Gln Glu Glu Ser Phe Leu Ser
50 55 60

Ser Thr Pro Ile Gly Ala Thr Pro Ser Lys Ser Asp Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80

His Ala Ala Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro
85 90 95

Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile His Asn Ile Lys Pro Thr Arg Ser Asp
100 105 110

Cys Asp Thr Ala Leu Ala Ser Tyr Lys Ser Gly Thr Leu Val Ser Leu
115 120 125

Gly Phe Pro Pro Glu Ser Cys Gly Tyr Ala Ser Val Thr Asp Ser Glu
130 135 140

Phe Leu Val Ile Met Ile Thr Pro His His Val Gly Val Asp Asp Tyr
145 150 155 160

Arg Gly His Trp Val Asp Pro Leu Phe Val Gly Gly Glu Cys Asp Gln
165 170 175

[0065]

Ser Tyr Cys Asp Thr Ile His Asn Ser Ser Val Trp Ile Pro Ala Asp
180 185 190

Gln Thr Lys Lys Asn Ile Cys Gly Gln Ser Phe Thr Pro Leu Thr Val
195 200 205

Thr Val Ala Tyr Asp Lys Thr Lys Glu Ile Ala Ala Gly Gly Ile Val
210 215 220

Phe Lys Ser Lys Tyr His Ser His Met Glu Gly Ala Arg Thr Cys Arg
225 230 235 240

Leu Ser Tyr Cys Gly Arg Asn Gly Ile Lys Phe Pro Asn Gly Glu Trp
245 250 255

Val Ser Leu Met Leu Lys Leu Arg Ser Lys Arg Asn Leu Tyr Phe Pro
260 265 270

Cys Leu Lys Met Cys Pro Thr Gly Ile Arg Gly Glu Ile Tyr Pro Ser
275 280 285

Ile Arg Trp Ala Gln Val Leu Thr Ser Glu Ile Gln Arg Ile Leu Asp
290 295 300

Tyr Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp Asp Lys Val Glu Arg Lys Glu Pro
305 310 315 320

Leu Ser Pro Leu Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Ser Pro Gly Lys

325 330 335

Gly Leu Ala Tyr Thr Val Ile Asn Gly Thr Leu Ser Phe Ala His Thr
340 345 350

Arg Tyr Val Arg Met Trp Ile Asp Gly Pro Val Leu Lys Glu Pro Lys
355 360 365

Gly Lys Arg Glu Ser Pro Ser Gly Ile Ser Ser Asp Ile Trp Thr Gln
370 375 380

Trp Phe Lys Tyr Gly Asp Met Glu Ile Gly Pro Asn Gly Leu Leu Lys
385 390 395 400

Thr Ala Gly Gly Tyr Lys Phe Pro Trp His Leu Ile Gly Met Gly Ile
405 410 415

Val Asp Asn Glu Leu His Glu Leu Ser Glu Ala Asn Pro Leu Asp His
420 425 430

Pro Gln Leu Pro His Ala Gln Ser Ile Ala Asp Asp Ser Glu Glu Ile
435 440 445

Phe Phe Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Val Glu Leu Val Thr
450 455 460

Gly Trp Phe Thr Ser Trp Lys Ser Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile
465 470 475 480

[0066]

Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu Val Leu Arg Val Gly Ile His
485 490 495

Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp
500 505 510

Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
515 520

<210> 56
<211> 1539
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> fusion VSV-G Cocal / Indiana

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1539)

<400> 56
atg aac ttt ctg ctg ctg aca ttc atc gtg ctg cct ctg tgc agc cac 48
Met Asn Phe Leu Leu Leu Thr Phe Ile Val Leu Pro Leu Cys Ser His
1 5 10 15

gcc aag ttc agc atc gtg ttc ccc cag agc cag aag ggc aac tgg aag 96
Ala Lys Phe Ser Ile Val Phe Pro Gln Ser Gln Lys Gly Asn Trp Lys
20 25 30

aac gtg ccc agc agc tac cac tac tgc ccc agc agc agc gac cag aac 144
Asn Val Pro Ser Ser Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Gln Asn
35 40 45

tgg cac aac gac ctg ctg ggc atc acc atg aag gtg aaa atg ccc aag 192
Trp His Asn Asp Leu Leu Gly Ile Thr Met Lys Val Lys Met Pro Lys
50 55 60

acc cac aag gcc att cag gct gac ggc tgg atg tgc cac gcc gcc aag 240
Thr His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ala Lys
65 70 75 80

tgg atc acc acc tgc gac ttc cgg tgg tac ggc ccc aag tac atc acc 288
Trp Ile Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr
85 90 95

cac agc atc cac tcc atc cag ccc acc tcc gag cag tgc aaa gag agc 336
His Ser Ile His Ser Ile Gln Pro Thr Ser Glu Gln Cys Lys Glu Ser
100 105 110

atc aag cag acc aag cag ggc acc tgg atg agc ccc ggc ttc cca ccc 384
Ile Lys Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Met Ser Pro Gly Phe Pro Pro
115 120 125

cag aac tgc ggc tac gcc acc gtg acc gac agc gtg gcc gtg gtg gtg 432
Gln Asn Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ser Val Ala Val Val Val
130 135 140

cag gcc acc ccc cac cac gtg ctg gtc gac gag tac acc ggc gag tgg 480
Gln Ala Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp
145 150 155 160

atc gac agc cag ttc ccc aac ggc aag tgc gag aca gag gaa tgc gag 528
Ile Asp Ser Gln Phe Pro Asn Gly Lys Cys Glu Thr Glu Glu Cys Glu
165 170 175

aca gtg cac aac agc acc gtg tgg tac agc gac tac aag gtg acc ggc 576
Thr Val His Asn Ser Thr Val Trp Tyr Ser Asp Tyr Lys Val Thr Gly
180 185 190

ctg tgc gac gcc acc ctg gtg gac acc gag atc acc ttt ttc agc gag 624
Leu Cys Asp Ala Thr Leu Val Asp Thr Glu Ile Thr Phe Phe Ser Glu
[0067] 195 200 205

gac ggc aag aaa gag tcc atc ggc aag ccc aac acc ggc tac aga agc 672
Asp Gly Lys Lys Glu Ser Ile Gly Lys Pro Asn Thr Gly Tyr Arg Ser
210 215 220

aac tac ttc gcc tac gag aag ggc gac aaa gtg tgc aag atg aac tac 720
Asn Tyr Phe Ala Tyr Glu Lys Gly Asp Lys Val Cys Lys Met Asn Tyr
225 230 235 240

tgc aag cat gcc gga gtg agg ctg cct agc ggc gtg tgg ttc gag ttc 768
Cys Lys His Ala Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Phe
245 250 255

gtg gac cag gac gtg tac gcc gcc gcc aag ctg ccc gag tgc ccc gtg 816
Val Asp Gln Asp Val Tyr Ala Ala Ala Lys Leu Pro Glu Cys Pro Val
260 265 270

ggc gcc acc atc agc gcc ccc acc cag acc agc gtg gac gtg agc ctg 864
Gly Ala Thr Ile Ser Ala Pro Thr Gln Thr Ser Val Asp Val Ser Leu
275 280 285

atc ctg gac gtg gag aga atc ctg gac tac tct ctg tgt cag gaa acc 912
Ile Leu Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr
290 295 300

tgg tcc aag atc aga tcc aag cag ccc gtg agc cct gtg gac ctg agc 960
Trp Ser Lys Ile Arg Ser Lys Gln Pro Val Ser Pro Val Asp Leu Ser
305 310 315 320

tac ctg gcc cct aag aac ccc ggc acc ggc cct gcc ttc acc atc atc 1008
Tyr Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile
325 330 335

aac ggc acc ctg aag tac ttc gag aca cgg tac atc cgg atc gac atc 1056
Asn Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Ile Asp Ile
340 345 350

gac aac ccc atc atc agc aag atg gtg ggc aag atc agc ggc agc cag 1104

Asp Asn Pro Ile Ile Ser Lys Met Val Gly Lys Ile Ser Gly Ser Gln
355 360 365

acc gag cgg gag ctg tgg acc gag tgg ttc ccc tac gag ggc gtg gag 1152
Thr Glu Arg Glu Leu Trp Thr Glu Trp Phe Pro Tyr Glu Gly Val Glu
370 375 380

atc ggc ccc aat ggc atc ctg aaa acc cct acc ggc tac aag ttc ccc 1200
Ile Gly Pro Asn Gly Ile Leu Lys Thr Pro Thr Gly Tyr Lys Phe Pro
385 390 395 400

ctg ttc atg atc ggc cac ggc atg ctg gac agc gac ctg cac aag acc 1248
Leu Phe Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Lys Thr
405 410 415

tcc cag gcc gag gtg ttc gag cac ccc cac ctg gcc gag gcc ccc aag 1296
Ser Gln Ala Glu Val Phe Glu His Pro His Leu Ala Glu Ala Pro Lys
420 425 430

cag ctg ccc gaa gag gaa acc ctg ttc ttc ggc gac acc ggc atc tcc 1344
Gln Leu Pro Glu Glu Glu Thr Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Ile Ser
435 440 445

aag aac cct gtg gag ctg atc gag ggc tgg ttc agc agc tgg aag agc 1392
Lys Asn Pro Val Glu Leu Ile Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser
450 455 460

agc atc gct tca ttt ttt ttc atc atc ggc ctc atc atc ggg ctg ttt 1440
Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe
465 470 475 480

ctg gtg ctg cgc gtc ggc atc cac ctg tgc atc aag ctg aag cac acc 1488
Leu Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr
485 490 495

aag aag cgc cag atc tat acc gac atc gag atg aat cgc ctg ggg aag 1536
Lys Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
500 505 510

[0068]

taa 1539

<210> 57
<211> 512
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 57

Met Asn Phe Leu Leu Leu Thr Phe Ile Val Leu Pro Leu Cys Ser His
1 5 10 15

Ala Lys Phe Ser Ile Val Phe Pro Gln Ser Gln Lys Gly Asn Trp Lys
20 25 30

Asn Val Pro Ser Ser Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Gln Asn
35 40 45

Trp His Asn Asp Leu Leu Gly Ile Thr Met Lys Val Lys Met Pro Lys
50 55 60

Thr His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ala Lys
65 70 75 80

Trp Ile Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr
85 90 95

His Ser Ile His Ser Ile Gln Pro Thr Ser Glu Gln Cys Lys Glu Ser

100 105 110

Ile Lys Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Met Ser Pro Gly Phe Pro Pro
115 120 125

Gln Asn Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ser Val Ala Val Val Val
130 135 140

Gln Ala Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp
145 150 155 160

Ile Asp Ser Gln Phe Pro Asn Gly Lys Cys Glu Thr Glu Glu Cys Glu
165 170 175

Thr Val His Asn Ser Thr Val Trp Tyr Ser Asp Tyr Lys Val Thr Gly
180 185 190

Leu Cys Asp Ala Thr Leu Val Asp Thr Glu Ile Thr Phe Phe Ser Glu
195 200 205

Asp Gly Lys Lys Glu Ser Ile Gly Lys Pro Asn Thr Gly Tyr Arg Ser
210 215 220

Asn Tyr Phe Ala Tyr Glu Lys Gly Asp Lys Val Cys Lys Met Asn Tyr
225 230 235 240

Cys Lys His Ala Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Phe
245 250 255

[0069]

Val Asp Gln Asp Val Tyr Ala Ala Ala Lys Leu Pro Glu Cys Pro Val
260 265 270

Gly Ala Thr Ile Ser Ala Pro Thr Gln Thr Ser Val Asp Val Ser Leu
275 280 285

Ile Leu Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr
290 295 300

Trp Ser Lys Ile Arg Ser Lys Gln Pro Val Ser Pro Val Asp Leu Ser
305 310 315 320

Tyr Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile
325 330 335

Asn Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Ile Asp Ile
340 345 350

Asp Asn Pro Ile Ile Ser Lys Met Val Gly Lys Ile Ser Gly Ser Gln
355 360 365

Thr Glu Arg Glu Leu Trp Thr Glu Trp Phe Pro Tyr Glu Gly Val Glu
370 375 380

Ile Gly Pro Asn Gly Ile Leu Lys Thr Pro Thr Gly Tyr Lys Phe Pro
385 390 395 400

Leu Phe Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Lys Thr
405 410 415

Ser Gln Ala Glu Val Phe Glu His Pro His Leu Ala Glu Ala Pro Lys
420 425 430

Gln Leu Pro Glu Glu Glu Thr Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Ile Ser
435 440 445

Lys Asn Pro Val Glu Leu Ile Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser
450 455 460

Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe
465 470 475 480

Leu Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr
485 490 495

Lys Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
500 505 510

<210> 58
<211> 1518
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Fusion VSV-G Piry / Indiana

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1518)

[0070] <400> 58
atg acc gat aca gtg ctg ggc aag ttc cag atc gtg ttc ccc gac cag 48
Met Thr Asp Thr Val Leu Gly Lys Phe Gln Ile Val Phe Pro Asp Gln
1 5 10 15

aac gag ctg gaa tgg acc ccc gtc gtg ggc gac agc cgg cat tgc cct 96
Asn Glu Leu Glu Trp Thr Pro Val Val Gly Asp Ser Arg His Cys Pro
20 25 30

cag tcc agc gag atg cag ttc gac ggc agc aga agc cag acc atc ctg 144
Gln Ser Ser Glu Met Gln Phe Asp Gly Ser Arg Ser Gln Thr Ile Leu
35 40 45

acc ggc aag gcc ccc gtg ggc atc aca ccc agc aag agc gac ggc ttc 192
Thr Gly Lys Ala Pro Val Gly Ile Thr Pro Ser Lys Ser Asp Gly Phe
50 55 60

atc tgc cac gcc gcc aag tgg gtg acc acc tgc gac ttc cgg tgg tac 240
Ile Cys His Ala Ala Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr
65 70 75 80

ggc ccc aag tac atc acc cac agc atc cac cac ctg cgg ccc acc acc 288
Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile His His Leu Arg Pro Thr Thr
85 90 95

tcc gac tgc gag aca gcc ctg cag cgg tac aag gac ggc agc ctg atc 336
Ser Asp Cys Glu Thr Ala Leu Gln Arg Tyr Lys Asp Gly Ser Leu Ile
100 105 110

aac ctg ggc ttc cct ccc gag agc tgc ggc tac gcc acc gtg aca gac 384
Asn Leu Gly Phe Pro Pro Glu Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp
115 120 125

agc gag gcc atg ctg gtg cag gtg acc ccc cac cac gtg ggc gtg gac 432
Ser Glu Ala Met Leu Val Gln Val Thr Pro His His Val Gly Val Asp
130 135 140

gac tac cgg ggc cac tgg atc gac ccc ctg ttc cct ggc ggc gag tgc 480

Asp Tyr Arg Gly His Trp Ile Asp Pro Leu Phe Pro Gly Gly Glu Cys
145 150 155 160

agc acc aat ttc tgc gat acc gtg cac aac agc agc gtg tgg att ccc 528
Ser Thr Asn Phe Cys Asp Thr Val His Asn Ser Ser Val Trp Ile Pro
165 170 175

aag agc cag aaa acc gac atc tgc gcc cag agc ttc aag aac atc aag 576
Lys Ser Gln Lys Thr Asp Ile Cys Ala Gln Ser Phe Lys Asn Ile Lys
180 185 190

atg acc gcc agc tac ccc agc gag gga gcc ctg gtg tcc gac cgg ttc 624
Met Thr Ala Ser Tyr Pro Ser Glu Gly Ala Leu Val Ser Asp Arg Phe
195 200 205

gcc ttc cac agc gcc tac cac ccc aac atg ccc ggc agc acc gtg tgc 672
Ala Phe His Ser Ala Tyr His Pro Asn Met Pro Gly Ser Thr Val Cys
210 215 220

atc atg gat ttc tgc gag cag aag ggc ctg cgg ttc acc aac ggc gag 720
Ile Met Asp Phe Cys Glu Gln Lys Gly Leu Arg Phe Thr Asn Gly Glu
225 230 235 240

tgg atg ggc ctg aac gtg gag cag agc atc cgg gag aag aag atc agc 768
Trp Met Gly Leu Asn Val Glu Gln Ser Ile Arg Glu Lys Lys Ile Ser
245 250 255

gcc atc ttc ccc aac tgc gtg gcc ggc acc gag atc cgg gcc acc ctg 816
Ala Ile Phe Pro Asn Cys Val Ala Gly Thr Glu Ile Arg Ala Thr Leu
260 265 270

gaa tcc gag ggc gcc agg acc ctg acc tgg gag aca cag cgg atg ctg 864
Glu Ser Glu Gly Ala Arg Thr Leu Thr Trp Glu Thr Gln Arg Met Leu
275 280 285

gac tac agc ctg tgc cag aac acc tgg gac aag gtg tcc cgg aaa gag 912
Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp Asp Lys Val Ser Arg Lys Glu
290 295 300

[0071]

cct ctg tcc ccc ctg gac ctg agc tac ctg agc cct aga gcc cct ggc 960
Pro Leu Ser Pro Leu Asp Leu Ser Tyr Leu Ser Pro Arg Ala Pro Gly
305 310 315 320

aag ggc atg gcc tac acc gtg atc aac ggc acc ctg cac agc gcc cac 1008
Lys Gly Met Ala Tyr Thr Val Ile Asn Gly Thr Leu His Ser Ala His
325 330 335

gcc aag tat atc cgg acc tgg atc gac tac ggc gag atg aaa gag atc 1056
Ala Lys Tyr Ile Arg Thr Trp Ile Asp Tyr Gly Glu Met Lys Glu Ile
340 345 350

aag ggc ggc agg ggc gag tac agc aag gcc cct gag ctg ctg tgg agc 1104
Lys Gly Gly Arg Gly Glu Tyr Ser Lys Ala Pro Glu Leu Leu Trp Ser
355 360 365

cag tgg ttc gac ttc ggc ccc ttc aag atc ggc ccc aac ggc ctg ctg 1152
Gln Trp Phe Asp Phe Gly Pro Phe Lys Ile Gly Pro Asn Gly Leu Leu
370 375 380

cac acc ggc aag acc ttc aag ttc cct ctg tat ctg atc gga gcc ggc 1200
His Thr Gly Lys Thr Phe Lys Phe Pro Leu Tyr Leu Ile Gly Ala Gly
385 390 395 400

atc atc gac gag gac ctg cac gag ctg gac gaa gcc gcc cct atc gac 1248
Ile Ile Asp Glu Asp Leu His Glu Leu Asp Glu Ala Ala Pro Ile Asp
405 410 415

cac ccc cag atg ccc gac gcc aag agc gtg ctg ccc gag gac gag gaa 1296
His Pro Gln Met Pro Asp Ala Lys Ser Val Leu Pro Glu Asp Glu Glu
420 425 430

atc ttc ttc ggc gac acc ggc gtg agc aag aac ccc atc gag ctg atc 1344
Ile Phe Phe Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Ile Glu Leu Ile
435 440 445

cag ggc tgg ttc agc aac tgg cgg agc agc atc gct tca ttt ttt ttc 1392
Gln Gly Trp Phe Ser Asn Trp Arg Ser Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe

450 455 460

atc atc ggc ctc atc atc ggg ctg ttt ctg gtg ctg cgc gtc ggc atc 1440
Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu Val Leu Arg Val Gly Ile
465 470 475 480

cac ctg tgc atc aag ctg aag cac acc aag aag cgc cag atc tat acc 1488
His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys Lys Arg Gln Ile Tyr Thr
485 490 495

gac atc gag atg aat cgc ctg ggg aag taa 1518
Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
500 505

<210> 59
<211> 505
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 59

Met Thr Asp Thr Val Leu Gly Lys Phe Gln Ile Val Phe Pro Asp Gln
1 5 10 15

Asn Glu Leu Glu Trp Thr Pro Val Val Gly Asp Ser Arg His Cys Pro
20 25 30

Gln Ser Ser Glu Met Gln Phe Asp Gly Ser Arg Ser Gln Thr Ile Leu
35 40 45

[0072] Thr Gly Lys Ala Pro Val Gly Ile Thr Pro Ser Lys Ser Asp Gly Phe
50 55 60

Ile Cys His Ala Ala Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr
65 70 75 80

Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile His His Leu Arg Pro Thr Thr
85 90 95

Ser Asp Cys Glu Thr Ala Leu Gln Arg Tyr Lys Asp Gly Ser Leu Ile
100 105 110

Asn Leu Gly Phe Pro Pro Glu Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp
115 120 125

Ser Glu Ala Met Leu Val Gln Val Thr Pro His His Val Gly Val Asp
130 135 140

Asp Tyr Arg Gly His Trp Ile Asp Pro Leu Phe Pro Gly Gly Glu Cys
145 150 155 160

Ser Thr Asn Phe Cys Asp Thr Val His Asn Ser Ser Val Trp Ile Pro
165 170 175

Lys Ser Gln Lys Thr Asp Ile Cys Ala Gln Ser Phe Lys Asn Ile Lys
180 185 190

Met Thr Ala Ser Tyr Pro Ser Glu Gly Ala Leu Val Ser Asp Arg Phe
195 200 205

Ala Phe His Ser Ala Tyr His Pro Asn Met Pro Gly Ser Thr Val Cys
210 215 220

Ile Met Asp Phe Cys Glu Gln Lys Gly Leu Arg Phe Thr Asn Gly Glu
225 230 235 240

Trp Met Gly Leu Asn Val Glu Gln Ser Ile Arg Glu Lys Lys Ile Ser
245 250 255

Ala Ile Phe Pro Asn Cys Val Ala Gly Thr Glu Ile Arg Ala Thr Leu
260 265 270

Glu Ser Glu Gly Ala Arg Thr Leu Thr Trp Glu Thr Gln Arg Met Leu
275 280 285

Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp Asp Lys Val Ser Arg Lys Glu
290 295 300

Pro Leu Ser Pro Leu Asp Leu Ser Tyr Leu Ser Pro Arg Ala Pro Gly
305 310 315 320

Lys Gly Met Ala Tyr Thr Val Ile Asn Gly Thr Leu His Ser Ala His
325 330 335

Ala Lys Tyr Ile Arg Thr Trp Ile Asp Tyr Gly Glu Met Lys Glu Ile
340 345 350

Lys Gly Gly Arg Gly Glu Tyr Ser Lys Ala Pro Glu Leu Leu Trp Ser
355 360 365

[0073]

Gln Trp Phe Asp Phe Gly Pro Phe Lys Ile Gly Pro Asn Gly Leu Leu
370 375 380

His Thr Gly Lys Thr Phe Lys Phe Pro Leu Tyr Leu Ile Gly Ala Gly
385 390 395 400

Ile Ile Asp Glu Asp Leu His Glu Leu Asp Glu Ala Ala Pro Ile Asp
405 410 415

His Pro Gln Met Pro Asp Ala Lys Ser Val Leu Pro Glu Asp Glu Glu
420 425 430

Ile Phe Phe Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Ile Glu Leu Ile
435 440 445

Gln Gly Trp Phe Ser Asn Trp Arg Ser Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe
450 455 460

Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu Val Leu Arg Val Gly Ile
465 470 475 480

His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys Lys Arg Gln Ile Tyr Thr
485 490 495

Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
500 505

<210> 60

<211> 1560
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Fusion VSV-G Isfahan / Indiana

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1560)

<400> 60
atg aca tcc gtg ctg ttt atg gtg ggc gtg ctg ctc gga gct ttc gga 48
Met Thr Ser Val Leu Phe Met Val Gly Val Leu Leu Gly Ala Phe Gly
1 5 10 15

tct acc cac tgc agc atc cag atc gtg ttc ccc agc gag aca aag ctg 96
Ser Thr His Cys Ser Ile Gln Ile Val Phe Pro Ser Glu Thr Lys Leu
20 25 30

gtg tgg aag ccc gtg ctg aag ggc acc cgg tac tgc ccc cag agc gcc 144
Val Trp Lys Pro Val Leu Lys Gly Thr Arg Tyr Cys Pro Gln Ser Ala
35 40 45

gag ctg aac ctg gaa ccc gac ctg aaa acc atg gcc ttc gac agc aag 192
Glu Leu Asn Leu Glu Pro Asp Leu Lys Thr Met Ala Phe Asp Ser Lys
50 55 60

gtg ccc atc ggc atc acc ccc agc aac agc gac ggc tac ctg tgc cac 240
Val Pro Ile Gly Ile Thr Pro Ser Asn Ser Asp Gly Tyr Leu Cys His
65 70 75 80

gcc gcc aag tgg gtg acc acc tgc gac ttc cgg tgg tac ggc ccc aag 288
Ala Ala Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys
85 90 95

[0074] tac atc acc cac agc gtg cac agc ctg cgg ccc acc gtg agc gac tgc 336
Tyr Ile Thr His Ser Val His Ser Leu Arg Pro Thr Val Ser Asp Cys
100 105 110

aag gcc gcc gtg gaa gct tac aac gct ggc acc ctg atg tac ccc ggc 384
Lys Ala Ala Val Glu Ala Tyr Asn Ala Gly Thr Leu Met Tyr Pro Gly
115 120 125

ttc ccc ccc gag agc tgc ggc tac gcc agc atc acc gac agc gag ttc 432
Phe Pro Pro Glu Ser Cys Gly Tyr Ala Ser Ile Thr Asp Ser Glu Phe
130 135 140

tac gtg atg ctg gtg acc ccc cac ccc gtg gga gtg gac gac tac cgg 480
Tyr Val Met Leu Val Thr Pro His Pro Val Gly Val Asp Asp Tyr Arg
145 150 155 160

ggc cac tgg gtg gac cct ctg ttc ccc acc tcc gag tgc aac agc aac 528
Gly His Trp Val Asp Pro Leu Phe Pro Thr Ser Glu Cys Asn Ser Asn
165 170 175

ttc tgc gag aca gtg cac aac gcc acc atg tgg att ccc aag gat ctg 576
Phe Cys Glu Thr Val His Asn Ala Thr Met Trp Ile Pro Lys Asp Leu
180 185 190

aaa acc cac gac gtg tgc agc cag gac ttc cag acc atc aga gtg agc 624
Lys Thr His Asp Val Cys Ser Gln Asp Phe Gln Thr Ile Arg Val Ser
195 200 205

gtg atg tac cct cag acc aag ccc acc aag gga gct gac ctg aca ctg 672
Val Met Tyr Pro Gln Thr Lys Pro Thr Lys Gly Ala Asp Leu Thr Leu
210 215 220

aag agc aag ttc cac gcc cac atg aag ggc gac aga gtg tgc aag atg 720
Lys Ser Lys Phe His Ala His Met Lys Gly Asp Arg Val Cys Lys Met
225 230 235 240

aag ttc tgc aac aag aac ggc ctg cgg ctg ggc aac ggc gag tgg atc 768
Lys Phe Cys Asn Lys Asn Gly Leu Arg Leu Gly Asn Gly Glu Trp Ile
245 250 255

gaa gtg ggc gac gag gtg atg ctg gac aac agc aag ctg ctg tcc ctg 816
Glu Val Gly Asp Glu Val Met Leu Asp Asn Ser Lys Leu Leu Ser Leu
260 265 270

ttc ccc gac tgc ctg gtg ggc agc gtg gtg aag agc acc ctg ctg tcc 864
Phe Pro Asp Cys Leu Val Gly Ser Val Val Lys Ser Thr Leu Leu Ser
275 280 285

gag ggc gtg cag acc gcc ctg tgg gag aca gac cgg ctg ctg gac tac 912
Glu Gly Val Gln Thr Ala Leu Trp Glu Thr Asp Arg Leu Leu Asp Tyr
290 295 300

agc ctg tgc cag aac acc tgg gag aag atc gac cgg aaa gag ccc ctg 960
Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp Glu Lys Ile Asp Arg Lys Glu Pro Leu
305 310 315 320

agc gcc gtc gac ctg agc tac ctg gcc cct aga agc ccc ggc aag ggc 1008
Ser Ala Val Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Pro Arg Ser Pro Gly Lys Gly
325 330 335

atg gcc tac atc gtg gcc aac ggc agc ctg atg agc gcc cct gcc cgg 1056
Met Ala Tyr Ile Val Ala Asn Gly Ser Leu Met Ser Ala Pro Ala Arg
340 345 350

tac atc aga gtg tgg atc gac agc ccc atc ctg aaa gag atc aag ggc 1104
Tyr Ile Arg Val Trp Ile Asp Ser Pro Ile Leu Lys Glu Ile Lys Gly
355 360 365

aag aaa gag agc gcc agc ggc atc gac acc gtg ctg tgg gag cag tgg 1152
Lys Lys Glu Ser Ala Ser Gly Ile Asp Thr Val Leu Trp Glu Gln Trp
370 375 380

ctg ccc ttc aac ggc atg gaa ctg ggc ccc aac ggc ctg atc aag acc 1200
Leu Pro Phe Asn Gly Met Glu Leu Gly Pro Asn Gly Leu Ile Lys Thr
385 390 395 400

aag agc ggc tac aag ttc ccc ctg tac ctg ctg ggc atg ggc atc gtg 1248
[0075] Lys Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu Tyr Leu Leu Gly Met Gly Ile Val
405 410 415

gac cag gac ctg cag gaa ctg agc agc gtc aac ccc gtg gac cac ccc 1296
Asp Gln Asp Leu Gln Glu Leu Ser Ser Val Asn Pro Val Asp His Pro
420 425 430

cac gtg cct atc gcc cag gcc ttc gtg agc gag ggc gag gaa gtg ttc 1344
His Val Pro Ile Ala Gln Ala Phe Val Ser Glu Gly Glu Glu Val Phe
435 440 445

ttc ggc gac acc ggc gtg agc aag aac ccc atc gag ctg atc agc ggc 1392
Phe Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Ile Glu Leu Ile Ser Gly
450 455 460

tgg ttc agc gac tgg aaa agc agc atc gct tca ttt ttt ttc atc atc 1440
Trp Phe Ser Asp Trp Lys Ser Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile
465 470 475 480

ggc ctc atc atc ggg ctg ttt ctg gtg ctg cgc gtc ggc atc cac ctg 1488
Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu
485 490 495

tgc atc aag ctg aag cac acc aag aag cgc cag atc tat acc gac atc 1536
Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile
500 505 510

gag atg aat cgc ctg ggg aag taa 1560
Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
515

<210> 61
<211> 519
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 61

Met Thr Ser Val Leu Phe Met Val Gly Val Leu Leu Gly Ala Phe Gly
1 5 10 15

Ser Thr His Cys Ser Ile Gln Ile Val Phe Pro Ser Glu Thr Lys Leu
20 25 30

Val Trp Lys Pro Val Leu Lys Gly Thr Arg Tyr Cys Pro Gln Ser Ala
35 40 45

Glu Leu Asn Leu Glu Pro Asp Leu Lys Thr Met Ala Phe Asp Ser Lys
50 55 60

Val Pro Ile Gly Ile Thr Pro Ser Asn Ser Asp Gly Tyr Leu Cys His
65 70 75 80

Ala Ala Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys
85 90 95

Tyr Ile Thr His Ser Val His Ser Leu Arg Pro Thr Val Ser Asp Cys
100 105 110

Lys Ala Ala Val Glu Ala Tyr Asn Ala Gly Thr Leu Met Tyr Pro Gly
115 120 125

Phe Pro Pro Glu Ser Cys Gly Tyr Ala Ser Ile Thr Asp Ser Glu Phe
130 135 140

[0076] Tyr Val Met Leu Val Thr Pro His Pro Val Gly Val Asp Asp Tyr Arg
145 150 155 160

Gly His Trp Val Asp Pro Leu Phe Pro Thr Ser Glu Cys Asn Ser Asn
165 170 175

Phe Cys Glu Thr Val His Asn Ala Thr Met Trp Ile Pro Lys Asp Leu
180 185 190

Lys Thr His Asp Val Cys Ser Gln Asp Phe Gln Thr Ile Arg Val Ser
195 200 205

Val Met Tyr Pro Gln Thr Lys Pro Thr Lys Gly Ala Asp Leu Thr Leu
210 215 220

Lys Ser Lys Phe His Ala His Met Lys Gly Asp Arg Val Cys Lys Met
225 230 235 240

Lys Phe Cys Asn Lys Asn Gly Leu Arg Leu Gly Asn Gly Glu Trp Ile
245 250 255

Glu Val Gly Asp Glu Val Met Leu Asp Asn Ser Lys Leu Leu Ser Leu
260 265 270

Phe Pro Asp Cys Leu Val Gly Ser Val Val Lys Ser Thr Leu Leu Ser
275 280 285

Glu Gly Val Gln Thr Ala Leu Trp Glu Thr Asp Arg Leu Leu Asp Tyr
290 295 300

Ser Leu Cys Gln Asn Thr Trp Glu Lys Ile Asp Arg Lys Glu Pro Leu
305 310 315 320

Ser Ala Val Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Pro Arg Ser Pro Gly Lys Gly
325 330 335

Met Ala Tyr Ile Val Ala Asn Gly Ser Leu Met Ser Ala Pro Ala Arg
340 345 350

Tyr Ile Arg Val Trp Ile Asp Ser Pro Ile Leu Lys Glu Ile Lys Gly
355 360 365

Lys Lys Glu Ser Ala Ser Gly Ile Asp Thr Val Leu Trp Glu Gln Trp
370 375 380

Leu Pro Phe Asn Gly Met Glu Leu Gly Pro Asn Gly Leu Ile Lys Thr
385 390 395 400

Lys Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu Tyr Leu Leu Gly Met Gly Ile Val
405 410 415

Asp Gln Asp Leu Gln Glu Leu Ser Ser Val Asn Pro Val Asp His Pro
420 425 430

His Val Pro Ile Ala Gln Ala Phe Val Ser Glu Gly Glu Glu Val Phe
435 440 445

Phe Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Ile Glu Leu Ile Ser Gly
450 455 460

[0077]

Trp Phe Ser Asp Trp Lys Ser Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile
465 470 475 480

Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu
485 490 495

Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile
500 505 510

Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
515

<210> 62
<211> 1536
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Fusion VSV-G New Jersey / Indiana

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1536)

<400> 62
atg agc atc atc agc tat atc gcc ttt ctg ctg ctg atc gac agc acc 48
Met Ser Ile Ile Ser Tyr Ile Ala Phe Leu Leu Leu Ile Asp Ser Thr
1 5 10 15

ctg ggc atc ccc atc ttc gtg ccc agc ggc cag aac atc agc tgg cag 96
Leu Gly Ile Pro Ile Phe Val Pro Ser Gly Gln Asn Ile Ser Trp Gln

```
                20                  25                  30

ccc gtg atc cag ccc ttc gac tac cag tgc ccc atc cac ggc aac ctg      144
Pro Val Ile Gln Pro Phe Asp Tyr Gln Cys Pro Ile His Gly Asn Leu
        35                  40                  45

ccc aac acc atg ggc ctg agc gcc acc aag ctg acc atc aag agc ccc      192
Pro Asn Thr Met Gly Leu Ser Ala Thr Lys Leu Thr Ile Lys Ser Pro
    50                  55                  60

agc gtg ttc agc acc gac aag gtg tcc ggc tgg atc tgc cac gcc gcc      240
Ser Val Phe Ser Thr Asp Lys Val Ser Gly Trp Ile Cys His Ala Ala
65                  70                  75                  80

gag tgg aaa acc acc tgc gac tac cgg tgg tac ggc ccc cag tac atc      288
Glu Trp Lys Thr Thr Cys Asp Tyr Arg Trp Tyr Gly Pro Gln Tyr Ile
                85                  90                  95

acc cac agc atc cac ccc atc agc ccc acc atc gac gag tgc aag cgg      336
Thr His Ser Ile His Pro Ile Ser Pro Thr Ile Asp Glu Cys Lys Arg
            100                 105                 110

atc atc agc cgg atc gcc agc ggc acc gac gag gac ctg ggc ttc cca      384
Ile Ile Ser Arg Ile Ala Ser Gly Thr Asp Glu Asp Leu Gly Phe Pro
        115                 120                 125

ccc cag agc tgc ggc tgg gcc agc gtg acc acc gtg agc aac acc aac      432
Pro Gln Ser Cys Gly Trp Ala Ser Val Thr Thr Val Ser Asn Thr Asn
    130                 135                 140

tac aag gtg gtg ccc cac agc gtg cac ctg gaa ccc tac ggc ggc cac      480
Tyr Lys Val Val Pro His Ser Val His Leu Glu Pro Tyr Gly Gly His
145                 150                 155                 160

tgg atc gac cac gac ttc aac ggc ggc gag tgc cgg gag aaa gtg tgc      528
Trp Ile Asp His Asp Phe Asn Gly Gly Glu Cys Arg Glu Lys Val Cys
                165                 170                 175

gag atg aag ggc aac cac agc atc tgg atc acc gac gag aca gtg cag      576
Glu Met Lys Gly Asn His Ser Ile Trp Ile Thr Asp Glu Thr Val Gln
            180                 185                 190

cac gag tgc gag aag cac atc gag gaa gtg gag ggc atc atg tac ggc      624
His Glu Cys Glu Lys His Ile Glu Glu Val Glu Gly Ile Met Tyr Gly
        195                 200                 205

aac gcc ccc agg ggc gac gcc atc tac atc aac aac ttc atc atc gac      672
Asn Ala Pro Arg Gly Asp Ala Ile Tyr Ile Asn Asn Phe Ile Ile Asp
    210                 215                 220

aag cac cac cgg gtg tac cgg ttc ggc ggc tcc tgc cgg atg aag ttc      720
Lys His His Arg Val Tyr Arg Phe Gly Gly Ser Cys Arg Met Lys Phe
225                 230                 235                 240

tgc aac aag gac ggc atc aag ttc acc aga ggc gac tgg gtg gag aaa      768
Cys Asn Lys Asp Gly Ile Lys Phe Thr Arg Gly Asp Trp Val Glu Lys
                245                 250                 255

acc gcc ggc acc ctg acc aac atc tac gag aac atc ccc gag tgc gcc      816
Thr Ala Gly Thr Leu Thr Asn Ile Tyr Glu Asn Ile Pro Glu Cys Ala
            260                 265                 270

gac ggc aca ctg gtg tcc ggc cac aga ccc ggc ctg gac ctg atc gac      864
Asp Gly Thr Leu Val Ser Gly His Arg Pro Gly Leu Asp Leu Ile Asp
        275                 280                 285

acc gtg ttc aac ctg gaa aac gtg gtg gag tac acc ctg tgc gag ggc      912
Thr Val Phe Asn Leu Glu Asn Val Val Glu Tyr Thr Leu Cys Glu Gly
    290                 295                 300

acc aag cgg aag atc aac aag cag gaa aag ctg acc agc gtc gac ctg      960
Thr Lys Arg Lys Ile Asn Lys Gln Glu Lys Leu Thr Ser Val Asp Leu
305                 310                 315                 320

agc tac ctg gcc ccc agg atc ggc ggc ttc ggc agc gtg ttc cgc gtg     1008
Ser Tyr Leu Ala Pro Arg Ile Gly Gly Phe Gly Ser Val Phe Arg Val
                325                 330                 335
```

[0078]

cgg aat ggg acc ctg gaa aga gga agc aca aca tac att cgg atc gaa 1056
Arg Asn Gly Thr Leu Glu Arg Gly Ser Thr Thr Tyr Ile Arg Ile Glu
340 345 350

gtg gaa ggc ccc gtg gtg gac agc ctg aac ggc atc gac ccc cgg acc 1104
Val Glu Gly Pro Val Val Asp Ser Leu Asn Gly Ile Asp Pro Arg Thr
355 360 365

aac gcc agc cgg gtg ttc tgg gac gac tgg gag ctg gac ggc aac atc 1152
Asn Ala Ser Arg Val Phe Trp Asp Asp Trp Glu Leu Asp Gly Asn Ile
370 375 380

tac cag ggc ttc aat ggc gtg tac aag ggc aag gat ggc aag atc cac 1200
Tyr Gln Gly Phe Asn Gly Val Tyr Lys Gly Lys Asp Gly Lys Ile His
385 390 395 400

atc ccc ctg aac atg atc gag agc ggc atc atc gac gac gag ctg cag 1248
Ile Pro Leu Asn Met Ile Glu Ser Gly Ile Ile Asp Asp Glu Leu Gln
405 410 415

cac gcc ttc cag gcc gac atc atc ccc cac ccc cac tac gac gac gac 1296
His Ala Phe Gln Ala Asp Ile Ile Pro His Pro His Tyr Asp Asp Asp
420 425 430

gag atc cgg gag gac gac atc ttc ttc gac aac acc ggc gag aac ggc 1344
Glu Ile Arg Glu Asp Asp Ile Phe Phe Asp Asn Thr Gly Glu Asn Gly
435 440 445

aac ccc gtg gac gcc gtg gtg gaa tgg gtg tcc gga tgg ggc agc agc 1392
Asn Pro Val Asp Ala Val Val Glu Trp Val Ser Gly Trp Gly Ser Ser
450 455 460

atc gct tca ttt ttt ttc atc atc ggc ctc atc atc ggg ctg ttt ctg 1440
Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu
465 470 475 480

gtg ctg cgc gtc ggc atc cac ctg tgc atc aag ctg aag cac acc aag 1488
Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys
[0079] 485 490 495

aag cgc cag atc tat acc gac atc gag atg aat cgc ctg ggg aag taa 1536
Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
500 505 510

<210> 63
<211> 511
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 63

Met Ser Ile Ile Ser Tyr Ile Ala Phe Leu Leu Leu Ile Asp Ser Thr
1 5 10 15

Leu Gly Ile Pro Ile Phe Val Pro Ser Gly Gln Asn Ile Ser Trp Gln
20 25 30

Pro Val Ile Gln Pro Phe Asp Tyr Gln Cys Pro Ile His Gly Asn Leu
35 40 45

Pro Asn Thr Met Gly Leu Ser Ala Thr Lys Leu Thr Ile Lys Ser Pro
50 55 60

Ser Val Phe Ser Thr Asp Lys Val Ser Gly Trp Ile Cys His Ala Ala
65 70 75 80

Glu Trp Lys Thr Thr Cys Asp Tyr Arg Trp Tyr Gly Pro Gln Tyr Ile

85 90 95

Thr His Ser Ile His Pro Ile Ser Pro Thr Ile Asp Glu Cys Lys Arg
100 105 110

Ile Ile Ser Arg Ile Ala Ser Gly Thr Asp Glu Asp Leu Gly Phe Pro
115 120 125

Pro Gln Ser Cys Gly Trp Ala Ser Val Thr Thr Val Ser Asn Thr Asn
130 135 140

Tyr Lys Val Val Pro His Ser Val His Leu Glu Pro Tyr Gly Gly His
145 150 155 160

Trp Ile Asp His Asp Phe Asn Gly Gly Glu Cys Arg Glu Lys Val Cys
165 170 175

Glu Met Lys Gly Asn His Ser Ile Trp Ile Thr Asp Glu Thr Val Gln
180 185 190

His Glu Cys Glu Lys His Ile Glu Glu Val Glu Gly Ile Met Tyr Gly
195 200 205

Asn Ala Pro Arg Gly Asp Ala Ile Tyr Ile Asn Asn Phe Ile Ile Asp
210 215 220

Lys His His Arg Val Tyr Arg Phe Gly Gly Ser Cys Arg Met Lys Phe
225 230 235 240

[0080]

Cys Asn Lys Asp Gly Ile Lys Phe Thr Arg Gly Asp Trp Val Glu Lys
245 250 255

Thr Ala Gly Thr Leu Thr Asn Ile Tyr Glu Asn Ile Pro Glu Cys Ala
260 265 270

Asp Gly Thr Leu Val Ser Gly His Arg Pro Gly Leu Asp Leu Ile Asp
275 280 285

Thr Val Phe Asn Leu Glu Asn Val Val Glu Tyr Thr Leu Cys Glu Gly
290 295 300

Thr Lys Arg Lys Ile Asn Lys Gln Glu Lys Leu Thr Ser Val Asp Leu
305 310 315 320

Ser Tyr Leu Ala Pro Arg Ile Gly Gly Phe Gly Ser Val Phe Arg Val
325 330 335

Arg Asn Gly Thr Leu Glu Arg Gly Ser Thr Thr Tyr Ile Arg Ile Glu
340 345 350

Val Glu Gly Pro Val Val Asp Ser Leu Asn Gly Ile Asp Pro Arg Thr
355 360 365

Asn Ala Ser Arg Val Phe Trp Asp Asp Trp Glu Leu Asp Gly Asn Ile
370 375 380

Tyr Gln Gly Phe Asn Gly Val Tyr Lys Gly Lys Asp Gly Lys Ile His
385 390 395 400

Ile Pro Leu Asn Met Ile Glu Ser Gly Ile Ile Asp Asp Glu Leu Gln
405 410 415

His Ala Phe Gln Ala Asp Ile Ile Pro His Pro His Tyr Asp Asp Asp
420 425 430

Glu Ile Arg Glu Asp Asp Ile Phe Phe Asp Asn Thr Gly Glu Asn Gly
435 440 445

Asn Pro Val Asp Ala Val Val Glu Trp Val Ser Gly Trp Gly Ser Ser
450 455 460

Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu
465 470 475 480

Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys
485 490 495

Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
500 505 510

<210> 64
<211> 1557
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Fusion VSV-G New Jersey / Indiana

[0081] <220>
<221> CDS
<222> (1)..(1557)

<400> 64
atg ctg tca tat ctg atc ttt gcc ctg gct gtg agc cca atc ctc gga 48
Met Leu Ser Tyr Leu Ile Phe Ala Leu Ala Val Ser Pro Ile Leu Gly
1 5 10 15

aag atc gaa atc gtg ttc cca caa cac acc aca ggg gac tgg aag cgc 96
Lys Ile Glu Ile Val Phe Pro Gln His Thr Thr Gly Asp Trp Lys Arg
20 25 30

gtg ccc cac gag tac aac tac tgc ccg acc tca gcc gac aag aat agc 144
Val Pro His Glu Tyr Asn Tyr Cys Pro Thr Ser Ala Asp Lys Asn Ser
35 40 45

cac ggc acg cag acc ggc atc cct gtg gag ctg acc atg ccc aag ggg 192
His Gly Thr Gln Thr Gly Ile Pro Val Glu Leu Thr Met Pro Lys Gly
50 55 60

ctc aca acg cac caa gtc gaa ggc ttc atg tgc cac agc gct ctc tgg 240
Leu Thr Thr His Gln Val Glu Gly Phe Met Cys His Ser Ala Leu Trp
65 70 75 80

atg aca acc tgc gat ttt cgc tgg tat ggc ccc aag tac atc acg cac 288
Met Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His
85 90 95

agc atc cac aat gag gaa cca acc gac tac cag tgc ctc gaa gcc atc 336
Ser Ile His Asn Glu Glu Pro Thr Asp Tyr Gln Cys Leu Glu Ala Ile
100 105 110

aag tca tac aag gat ggg gtg agc ttc aac ccc ggc ttc ccg ccc caa 384
Lys Ser Tyr Lys Asp Gly Val Ser Phe Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln
115 120 125

tca tgt ggc tac ggc acc gtg acc gac gcc gag gcc cac atc gtg acc 432

Ser Cys Gly Tyr Gly Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala His Ile Val Thr
130 135 140

gtg aca ccc cac tca gtc aag gtg gac gag tac aca ggc gaa tgg atc 480
Val Thr Pro His Ser Val Lys Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Ile
145 150 155 160

gac ccc cac ttc atc ggg ggc cgc tgt aag ggc caa atc tgc gag acc 528
Asp Pro His Phe Ile Gly Gly Arg Cys Lys Gly Gln Ile Cys Glu Thr
165 170 175

gtg cac aac agc acc aag tgg ttt acg tca tca gac ggc gaa agc gtg 576
Val His Asn Ser Thr Lys Trp Phe Thr Ser Ser Asp Gly Glu Ser Val
180 185 190

tgc agc caa ctg ttt acg ctc gtg ggc ggc atc ttc ttt agc gac agc 624
Cys Ser Gln Leu Phe Thr Leu Val Gly Gly Ile Phe Phe Ser Asp Ser
195 200 205

gag gag atc acc agc atg ggc ctc ccg gag aca gga atc cgc agc aac 672
Glu Glu Ile Thr Ser Met Gly Leu Pro Glu Thr Gly Ile Arg Ser Asn
210 215 220

tac ttt ccg tac atc agc acc gag gga atc tgt aag atg cct ttt tgc 720
Tyr Phe Pro Tyr Ile Ser Thr Glu Gly Ile Cys Lys Met Pro Phe Cys
225 230 235 240

cgc aag cag gga tat aag ctg aag aat gac ctg tgg ttc cag atc atg 768
Arg Lys Gln Gly Tyr Lys Leu Lys Asn Asp Leu Trp Phe Gln Ile Met
245 250 255

gac ccg gac ctg gac aag acc gtc cgc gat ctg ccc cac atc aag gac 816
Asp Pro Asp Leu Asp Lys Thr Val Arg Asp Leu Pro His Ile Lys Asp
260 265 270

tgt gat ctg tca tca agc atc atc acc ccc gga gaa cac gcc acg gac 864
Cys Asp Leu Ser Ser Ser Ile Ile Thr Pro Gly Glu His Ala Thr Asp
275 280 285

[0082]

atc agc ctc atc agc gat gtg gag cgc atc ctc gac tac gct ctc tgc 912
Ile Ser Leu Ile Ser Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ala Leu Cys
290 295 300

cag aac aca tgg agc aag atc gaa agc ggc gaa ccc atc acc cca gtg 960
Gln Asn Thr Trp Ser Lys Ile Glu Ser Gly Glu Pro Ile Thr Pro Val
305 310 315 320

gac ctg agc tat ctc ggc cca aag aac ccc ggc gtg ggg ccc gtg ttc 1008
Asp Leu Ser Tyr Leu Gly Pro Lys Asn Pro Gly Val Gly Pro Val Phe
325 330 335

acc atc atc aac ggg agc ctg cac tac ttt aca agc aag tat ctg cgc 1056
Thr Ile Ile Asn Gly Ser Leu His Tyr Phe Thr Ser Lys Tyr Leu Arg
340 345 350

gtg gag ctc gaa agc cca gtc atc ccc cgc atg gag ggg aag gtg gcc 1104
Val Glu Leu Glu Ser Pro Val Ile Pro Arg Met Glu Gly Lys Val Ala
355 360 365

ggg acc cgc atc gtg cgc cag ctg tgg gac cag tgg ttc cct ttt ggc 1152
Gly Thr Arg Ile Val Arg Gln Leu Trp Asp Gln Trp Phe Pro Phe Gly
370 375 380

gag gtg gaa atc ggc ccc aac ggc gtg ctg aag acc aag caa gga tat 1200
Glu Val Glu Ile Gly Pro Asn Gly Val Leu Lys Thr Lys Gln Gly Tyr
385 390 395 400

aag ttc ccg ctg cac atc atc ggg acg ggc gaa gtg gac agc gat atc 1248
Lys Phe Pro Leu His Ile Ile Gly Thr Gly Glu Val Asp Ser Asp Ile
405 410 415

aag atg gag cgc gtg gtc aag cac tgg gag cac cca cac atc gag gct 1296
Lys Met Glu Arg Val Val Lys His Trp Glu His Pro His Ile Glu Ala
420 425 430

gct cag acc ttt ctc aag aag gac gat acc ggc gaa gtc ctg tat tac 1344
Ala Gln Thr Phe Leu Lys Lys Asp Asp Thr Gly Glu Val Leu Tyr Tyr

435 440 445

ggg gat acg gga gtg agc aag aac cct gtg gag ctg gtg gaa ggc tgg 1392
Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Val Glu Leu Val Glu Gly Trp
450 455 460

ttc agc gga tgg cgc agc agc atc gct tca ttt ttt ttc atc atc ggc 1440
Phe Ser Gly Trp Arg Ser Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly
465 470 475 480

ctc atc atc ggg ctg ttt ctg gtg ctg cgc gtc ggc atc cac ctg tgc 1488
Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys
485 490 495

atc aag ctg aag cac acc aag aag cgc cag atc tat acc gac atc gag 1536
Ile Lys Leu Lys His Thr Lys Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu
500 505 510

atg aat cgc ctg ggg aag taa 1557
Met Asn Arg Leu Gly Lys
515

<210> 65
<211> 518
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 65

Met Leu Ser Tyr Leu Ile Phe Ala Leu Ala Val Ser Pro Ile Leu Gly
1 5 10 15

[0083] Lys Ile Glu Ile Val Phe Pro Gln His Thr Thr Gly Asp Trp Lys Arg
20 25 30

Val Pro His Glu Tyr Asn Tyr Cys Pro Thr Ser Ala Asp Lys Asn Ser
35 40 45

His Gly Thr Gln Thr Gly Ile Pro Val Glu Leu Thr Met Pro Lys Gly
50 55 60

Leu Thr Thr His Gln Val Glu Gly Phe Met Cys His Ser Ala Leu Trp
65 70 75 80

Met Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His
85 90 95

Ser Ile His Asn Glu Glu Pro Thr Asp Tyr Gln Cys Leu Glu Ala Ile
100 105 110

Lys Ser Tyr Lys Asp Gly Val Ser Phe Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln
115 120 125

Ser Cys Gly Tyr Gly Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala His Ile Val Thr
130 135 140

Val Thr Pro His Ser Val Lys Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Ile
145 150 155 160

Asp Pro His Phe Ile Gly Gly Arg Cys Lys Gly Gln Ile Cys Glu Thr
165 170 175

Val His Asn Ser Thr Lys Trp Phe Thr Ser Ser Asp Gly Glu Ser Val
180 185 190

Cys Ser Gln Leu Phe Thr Leu Val Gly Gly Ile Phe Phe Ser Asp Ser
195 200 205

Glu Glu Ile Thr Ser Met Gly Leu Pro Glu Thr Gly Ile Arg Ser Asn
210 215 220

Tyr Phe Pro Tyr Ile Ser Thr Glu Gly Ile Cys Lys Met Pro Phe Cys
225 230 235 240

Arg Lys Gln Gly Tyr Lys Leu Lys Asn Asp Leu Trp Phe Gln Ile Met
245 250 255

Asp Pro Asp Leu Asp Lys Thr Val Arg Asp Leu Pro His Ile Lys Asp
260 265 270

Cys Asp Leu Ser Ser Ser Ile Ile Thr Pro Gly Glu His Ala Thr Asp
275 280 285

Ile Ser Leu Ile Ser Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ala Leu Cys
290 295 300

Gln Asn Thr Trp Ser Lys Ile Glu Ser Gly Glu Pro Ile Thr Pro Val
305 310 315 320

Asp Leu Ser Tyr Leu Gly Pro Lys Asn Pro Gly Val Gly Pro Val Phe
325 330 335

[0084]

Thr Ile Ile Asn Gly Ser Leu His Tyr Phe Thr Ser Lys Tyr Leu Arg
340 345 350

Val Glu Leu Glu Ser Pro Val Ile Pro Arg Met Glu Gly Lys Val Ala
355 360 365

Gly Thr Arg Ile Val Arg Gln Leu Trp Asp Gln Trp Phe Pro Phe Gly
370 375 380

Glu Val Glu Ile Gly Pro Asn Gly Val Leu Lys Thr Lys Gln Gly Tyr
385 390 395 400

Lys Phe Pro Leu His Ile Ile Gly Thr Gly Glu Val Asp Ser Asp Ile
405 410 415

Lys Met Glu Arg Val Val Lys His Trp Glu His Pro His Ile Glu Ala
420 425 430

Ala Gln Thr Phe Leu Lys Lys Asp Asp Thr Gly Glu Val Leu Tyr Tyr
435 440 445

Gly Asp Thr Gly Val Ser Lys Asn Pro Val Glu Leu Val Glu Gly Trp
450 455 460

Phe Ser Gly Trp Arg Ser Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly
465 470 475 480

Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys

485 490 495

Ile Lys Leu Lys His Thr Lys Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu
500 505 510

Met Asn Arg Leu Gly Lys
515

<210> 66
<211> 493
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> delta myr-GAG antigen

<400> 66

Met Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp Glu Lys Ile
1 5 10 15

Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys His Ile Val
20 25 30

Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro Gly Leu Leu
35 40 45

Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu Gln Pro Ser
50 55 60

[0085] Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala
65 70 75 80

Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Val Lys Asp Thr Lys Glu
85 90 95

Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys Lys Lys Ala
100 105 110

Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Asn His Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn
115 120 125

Tyr Pro Ile Val Gln Asn Leu Gln Gly Gln Met Val His Gln Ala Ile
130 135 140

Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu Glu Lys Ala
145 150 155 160

Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu Gly Ala
165 170 175

Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln
180 185 190

Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu
195 200 205

Trp Asp Arg Leu His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro Gly Gln
210 215 220

Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu
225 230 235 240

Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile Pro Val Gly
245 250 255

Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg
260 265 270

Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu
275 280 285

Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu
290 295 300

Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val
305 310 315 320

Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro
325 330 335

Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly
340 345 350

Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser Gln Val Thr
355 360 365

Asn Ser Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg Asn Gln Arg
370 375 380

[0086]

Lys Thr Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His Ile Ala Lys
385 390 395 400

Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys Gly Lys Glu
405 410 415

Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn Phe Leu Gly
420 425 430

Lys Ile Trp Pro Ser His Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe Leu Gln Ser
435 440 445

Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu Ser Phe Arg Phe Gly Glu
450 455 460

Glu Thr Thr Thr Pro Ser Gln Lys Gln Glu Pro Ile Asp Lys Glu Leu
465 470 475 480

Tyr Pro Leu Ala Ser Leu Arg Ser Leu Phe Gly Asn Asp
485 490

<210> 67
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Pol-derived antigen

<400> 67

Lys Lys Ser Val Thr Val Leu Asp Val Gly Asp Ala Tyr Phe Ser Val
1 5 10 15

Pro Leu Asp Lys Asp Phe Arg Lys Tyr Thr Ala Phe Thr Ile Pro Ser
20 25 30

Ile Asn Asn Glu Thr Pro Gly Ile Arg Tyr Gln Tyr Asn Val Leu Pro
35 40 45

Gln Gly Trp Lys Gly Ser Pro Ala Ile Phe Gln Ser Ser Met Thr Lys
50 55 60

Ile Leu Glu Pro Phe Arg Lys Gln Asn Pro Asp Ile Val Ile Tyr Gln
65 70 75 80

Tyr Met Asp Asp Leu Tyr Val Gly Ser Asp Leu Glu Ile Gly Gln His
85 90 95

Arg Thr Glu Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val Tyr
100 105

<210> 68
<211> 136
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> NEF-derived antigen

<400> 68

[0087] Val Gly Phe Pro Val Arg Pro Gln Val Pro Leu Arg Pro Met Thr Tyr
1 5 10 15

Lys Ala Ala Val Asp Leu Ser His Phe Leu Lys Glu Lys Gly Gly Leu
20 25 30

Glu Gly Leu Ile Tyr Ser Gln Lys Arg Gln Asp Ile Leu Asp Leu Trp
35 40 45

Val Tyr His Thr Gln Gly Tyr Phe Pro Asp Trp Gln Asn Tyr Thr Pro
50 55 60

Gly Pro Gly Ile Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Phe Lys Leu
65 70 75 80

Val Pro Val Asp Pro Glu Lys Glu Val Leu Val Trp Lys Phe Asp Ser
85 90 95

Arg Leu Ala Phe His His Met Ala Arg Glu Leu His Pro Glu Tyr Tyr
100 105 110

Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly
115 120 125

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
130 135

<210> 69
<211> 512

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> GAG antigen

<400> 69

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp
1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys
20 25 30

His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro
35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu
50 55 60

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn
65 70 75 80

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp
85 90 95

Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
100 105 110

Lys Lys Ala Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly His Ser Ser Gln Val
115 120 125

[0088]

Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His
130 135 140

Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu
145 150 155 160

Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser
165 170 175

Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly
180 185 190

Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu
195 200 205

Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala
210 215 220

Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr
225 230 235 240

Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile
245 250 255

Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys
260 265 270

Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly

275 280 285

Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu
290 295 300

Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr
305 310 315 320

Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala
325 330 335

Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly
340 345 350

Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser
355 360 365

Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg
370 375 380

Asn Gln Arg Lys Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
385 390 395 400

Ile Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
405 410 415

Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn
420 425 430

[0089]

Phe Leu Gly Lys Ile Trp Pro Ser Tyr Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe
435 440 445

Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Phe Leu Gln Ser Arg
450 455 460

Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu Ser Phe Arg Ser Gly Val Glu
465 470 475 480

Thr Thr Thr Pro Ser Gln Lys Gln Glu Pro Ile Asp Lys Glu Leu Tyr
485 490 495

Pro Leu Thr Ser Leu Arg Ser Leu Phe Gly Asn Asp Pro Ser Ser Gln
500 505 510

<210> 70
<211> 1539
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> coding sequence of GAG antigen

<400> 70
atgggtgcga gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgatggga aaaaattcgg 60

ttaaggccag ggggaaagaa aaaatataaa ttaaaacata tagtatgggc aagcagggag 120

ctagaacgat tcgcagttaa tcctggcctg ttagaaacat cagaaggctg tagacaaata 180

ctgggacagc tacaaccatc ccttcagaca ggatcagaag aacttagatc attatataat 240

acagtagcaa ccctctattg tgtgcatcaa aggatagaga taaaagacac caaggaagct 300

ttagacaaga tagaggaaga gcaaaacaaa agtaagaaaa aagcacagca agcagcagct 360
gacacaggac acagcagcca ggtcagccaa aattacccta tagtgcagaa catccagggg 420
caaatggtac atcaggccat atcacctaga actttaaatg catgggtaaa agtagtagaa 480
gagaaggctt tcagcccaga agtgataccc atgttttcag cattatcaga aggagccacc 540
ccacaagatt taaacaccat gctaaacaca gtgggggggac atcaagcagc catgcaaatg 600
ttaaaagaga ccatcaatga ggaagctgca gaatgggata gagtgcatcc agtgcatgca 660
gggcctattg caccaggcca gatgagagaa ccaaggggaa gtgacatagc aggaactact 720
agtacccttc aggaacaaat aggatggatg acaaataatc cacctatccc agtaggagaa 780
atttataaaa gatggataat cctgggatta aataaaatag taagaatgta tagccctacc 840
agcattctgg acataagaca aggaccaaaa gaacccttta gagactatgt agaccggttc 900
tataaaactc taagagccga gcaagcttca caggaggtaa aaaattggat gacagaaacc 960
ttgttggtcc aaaatgcgaa cccagattgt aagactattt taaaagcatt gggaccagca 1020
gctacactag aagaaatgat gacagcatgt cagggagtgg gaggacccgg ccataaggca 1080
agagttttgg ctgaagcaat gagccaagta acaaattcag ctaccataat gatgcaaaga 1140
ggcaatttta ggaaccaaag aaagattgtt aagtgtttca attgtggcaa agaagggcac 1200
atagccagaa attgcagggc ccctaggaaa aagggctgtt ggaaatgtgg aaaggaagga 1260
caccaaatga aagattgtac tgagagacag gctaattttt tagggaagat ctggccttcc 1320
tacaagggaa ggccagggaa ttttcttcag agcagaccag agccaacagc cccaccattt 1380
cttcagagca gaccagagcc aacagcccca ccagaagaga gcttcaggtc tggggtagag 1440
[0090] acaacaactc cctctcagaa gcaggagccg atagacaagg aactgtatcc tttaacttcc 1500
ctcagatcac tctttggcaa cgacccctcg tcacaataa 1539

<210> 71
<211> 5322
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Plasmid

<400> 71
tggaagggct aattcactcc caacgaagac aagatatcct tgatctgtgg atctaccaca 60
cacaaggcta cttccctgat tagcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac 120
tgacctttgg atggtgctac aagctagtac cagttgagcc agagaagtta gaagaagcca 180
acaaaggaga gaacaccagc ttgttacaac ctgtgagcct gcatgggatg gatgacccgg 240
agagagaagt gttagagtgg aggtttgaca gccgcctagc atttcatcac ggtggcccga 300
gagctgcatc cggagtactt caagaactgc tgatatcgag cttgctacaa gggactttcc 360
gctgggggac tttccaggga ggcgtggcct gggcgggact ggggagtggc gagccctcag 420
atcctgcata taagcagctg ctttttgcct gtactgggtc tctctggtta gaccagatct 480
gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct taagcctcaa taaagcttgc 540
cttgagtgct tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga ctctggtaac tagagatccc 600
tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagtgg cgcccgaaca gggacttgaa 660
agcgaaaggg aaaccagagg agctctctcg acgcaggact cggcttgctg aagcgcgcac 720

ggcaagaggc gaggggcggc gactggtgag tacgccaaaa attttgacta gcggaggcta 780
gaaggagaga gatgggtgcg agagcgtcag tattaagcgg gggagaatta gatcgcgatg 840
ggaaaaaatt cggttaaggc caggggggaaa gaaaaaatat aaattaaaac atatagtatg 900
ggcaagcagg gagctagaac gattcgcagt taatcctggc ctgttagaaa catcagaagg 960
ctgtagacaa atactgggac agctacaacc atcccttcag acaggatcag aagaacttag 1020
atcattatat aatacagtag caaccctcta ttgtgtgcat caaaggatag agataaaaga 1080
caccaaggaa gctttagaca agatagagga agagcaaaac aaaagtaaga ccaccgcaca 1140
gcaagcggcc gctgatcttc agacctggag gaggagatat gagggacaat tggagaagtg 1200
aattatataa atataaagta gtaaaaattg aaccattagg agtagcaccc accaaggcaa 1260
agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat aggagctttg ttccttgggt 1320
tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcgtcaat gacgctgacg gtacaggcca 1380
gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt gctgagggct attgaggcgc 1440
aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca gctccaggca agaatcctgg 1500
ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctggggat ttggggttgc tctggaaaac 1560
tcatttgcac cactgctgtg ccttggaatg ctagttggag taataaatct ctggaacaga 1620
tttggaatca cacgacctgg atggagtggg acagagaaat taacaattac acaagcttaa 1680
tacactcctt aattgaagaa tcgcaaaacc agcaagaaaa gaatgaacaa gaattattgg 1740
aattagataa atgggcaagt ttgtggaatt ggtttaacat aacaaattgg ctgtggtata 1800
taaaattatt cataatgata gtaggaggct tggtaggttt aagaatagtt tttgctgtac 1860
[0091] tttctatagt gaatagagtt aggcagggat attcaccatt atcgtttcag acccacctcc 1920
caaccccgag gggacccgac aggcccgaag gaatagaaga agaaggtgga gagagagaca 1980
gagacagatc cattcgatta gtgaacggat ctcgacggta tcgccgaatt cacaaatggc 2040
agtattcatc cacaatttta aaagaaaagg ggggattggg gggtacagtg caggggaaag 2100
aatagtagac ataatagcaa cagacataca aactaaagaa ttacaaaaac aaattacaaa 2160
aattcaaaat tttcgggttt attacaggga cagcagagat ccactttggg gcgataagct 2220
tgggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac 2280
ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc 2340
cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg 2400
tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat 2460
tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc 2520
atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt 2580
gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac 2640
caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg ccccattgac gcaaatgggc 2700
ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc 2760
gcctggagac gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa gacaccgact ctagaggatc 2820
tgccaccatg gtgagaaact ccgtcttgtc agggaagaaa gcagatgaat tagaaaaaat 2880
taggctacga cccaacggaa agaaaaagta catgttgaag catgtagtat gggcagcaaa 2940
tgaattagat agatttggat tagcagaaag cctgttggag aacaaagaag gatgtcaaaa 3000
aatactttcg gtcttagctc cattagtgcc aacaggctca gaaaatttaa aaagccttta 3060

taatactgtc tgcgtcatct ggtgcattca cgcagaagag aaagtgaaac acactgagga 3120
agcaaaacag atagtgcaga gacacctagt ggtggaaaca ggaacaacag aaactatgcc 3180
aaaaacaagt agaccaacag caccatctag cggcagagga ggaaattacc cagtacaaca 3240
aataggtggt aactatgtcc acctgccatt aagcccgaga acattaaatg cctgggtaaa 3300
attgatagag gaaaagaaat ttggagcaga agtagtgcca ggatttcagg cactgtcaga 3360
aggttgcacc ccctatgaca ttaatcagat gttaaattgt gtgggagacc atcaagcggc 3420
tatgcagatt atcagagata ttataaacga ggaggctgca gattgggact tgcagcaccc 3480
acaaccagct ccacaacaag gacaacttag ggagccgtca ggatcagata ttgcaggaac 3540
aactagttca gtagatgaac aaatccagtg gatgtacaga caacagaacc ccataccagt 3600
aggcaacatt tacaggagat ggatccaact ggggttgcaa aaatgtgtca gaatgtataa 3660
cccaacaaac attctagatg taaaacaagg gccaaaagag ccatttcaga gctatgtaga 3720
caggttctac aaaagtttaa gagcagaaca gacagatgca gcagtaaaga attggatgac 3780
tcaaacactg ctgattcaaa atgctaaccc agattgcaag ctagtgctga aggggctggg 3840
tgtgaatccc accctagaag aaatgctgac ggcttgtcaa ggagtagggg ggccgggaca 3900
gaaggctaga ttaatggcag aagccctgaa agaggccctc gcaccagtgc caatcccttt 3960
tgcagcagcc caacagaggg gaccaagaaa gccaattaag tgttggaatt gtgggaaaga 4020
gggacactct gcaaggcaat gcagagcccc aagaagacag ggatgctgga aatgtggaaa 4080
aatggaccat gttatggcca aatgcccaga cagacaggcg ggtttttag gccttggtcc 4140
atggggaaag aagccccgca atttccccat ggctcaagtg catcaggggc tgatgccaac 4200
[0092] tgctccccca gaggacccag ctgtggatct gctaaagaac tacatgcagt tgggcaagca 4260
gcagagagaa aagcagagag aaagcagaga gaagccttac aaggaggtga cagaggattt 4320
gctgcacctc aattctctct ttggaggaga ccagtagctc gagctcaagc ttcgaattcc 4380
cgataatcaa cctctggatt acaaaatttg tgaaagattg actggtattc ttaactatgt 4440
tgctcctttt acgctatgtg gatacgctgc tttaatgcct ttgtatcatg ctattgcttc 4500
ccgtatggct ttcattttct cctccttgta taaatcctgg ttgctgtctc tttatgagga 4560
gttgtggccc gttgtcaggc aacgtggcgt ggtgtgcact gtgtttgctg acgcaacccc 4620
cactggttgg ggcattgcca ccacctgtca gctcctttcc gggactttcg ctttcccccct 4680
ccctattgcc acggcggaac tcatcgccgc ctgccttgcc cgctgctgga caggggctcg 4740
gctgttgggc actgacaatt ccgtggtgtt gtcggggaag ctgacgtcct ttccatggct 4800
gctcgcctgt gttgccacct ggattctgcg cgggacgtcc ttctgctacg tcccttcggc 4860
cctcaatcca gcggaccttc cttcccgcgg cctgctgccg gctctgcggc ctcttccgcg 4920
tcttcgcctt cgccctcaga cgagtcggat ctccctttgg gccgcctccc cgcgtcgacg 4980
cgtgaattcg gtacctttaa gaccaatgac ttacaaggca gctgtagatc ttagccactt 5040
tttaaaagaa aagggggac tggaagggct aattcactcc caacgaagac aagatcgtcg 5100
agagatgctg catataagca gctgcttttt gcttgtactg ggtctctctg gttagaccag 5160
atctgagcct gggagctctc tggctaacta gggaacccac tgcttaagcc tcaataaagc 5220
ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt gtgactctgg taactagaga 5280
tccctcagac ccttttagtc agtgtggaaa atctctagca gt 5322

<210> 72
<211> 5335
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Plasmid

<400> 72

[0093]

tggaagggct aattcactcc caacgaagac aagatatcct tgatctgtgg atctaccaca 60
cacaaggcta cttccctgat tagcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac 120
tgacctttgg atggtgctac aagctagtac cagttgagcc agagaagtta gaagaagcca 180
acaaaggaga gaacaccagc ttgttacaac ctgtgagcct gcatgggatg gatgacccgg 240
agagagaagt gttagagtgg aggtttgaca gccgcctagc atttcatcac ggtggcccga 300
gagctgcatc cggagtactt caagaactgc tgatatcgag cttgctacaa gggactttcc 360
gctgggggac tttccaggga ggcgtggcct gggcgggact ggggagtggc gagccctcag 420
atcctgcata taagcagctg ctttttgcct gtactgggtc tctctggtta gaccagatct 480
gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct taagcctcaa taaagcttgc 540
cttgagtgct tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga ctctggtaac tagagatccc 600
tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagtgg cgcccgaaca gggacttgaa 660
agcgaaaggg aaaccagagg agctctctcg acgcaggact cggcttgctg aagcgcgcac 720
ggcaagaggc gaggggcggc gactggtgag tacgccaaaa attttgacta gcggaggcta 780
gaaggagaga gatgggtgcg agagcgtcag tattaagcgg gggagaatta gatcgcgatg 840
ggaaaaaatt cggttaaggc caggggggaaa gaaaaaatat aaattaaaac atatagtatg 900
ggcaagcagg gagctagaac gattcgcagt taatcctggc ctgttagaaa catcagaagg 960
ctgtagacaa atactgggac agctacaacc atcccttcag acaggatcag aagaacttag 1020
atcattatat aatacagtag caaccctcta ttgtgtgcat caaaggatag agataaaaga 1080
caccaaggaa gctttagaca agatagagga agagcaaaac aaaagtaaga ccaccgcaca 1140
gcaagcggcc gctgatcttc agacctggag gaggagatat gagggacaat tggagaagtg 1200
aattatataa atataaagta gtaaaaattg aaccattagg agtagcaccc accaaggcaa 1260
agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat aggagctttg ttccttgggt 1320
tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcgtcaat gacgctgacg gtacaggcca 1380
gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt gctgagggct attgaggcgc 1440
aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca gctccaggca agaatcctgg 1500
ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctggggat ttggggttgc tctggaaaac 1560
tcatttgcac cactgctgtg ccttggaatg ctagttggag taataaatct ctggaacaga 1620
tttggaatca cacgacctgg atggagtggg acagagaaat taacaattac acaagcttaa 1680
tacactcctt aattgaagaa tcgcaaaacc agcaagaaaa gaatgaacaa gaattattgg 1740
aattagataa atgggcaagt ttgtggaatt ggtttaacat aacaaattgg ctgtggtata 1800
taaaattatt cataatgata gtaggaggct tggtaggttt aagaatagtt tttgctgtac 1860
tttctatagt gaatagagtt aggcagggat attcaccatt atcgtttcag acccacctcc 1920
caaccccgag gggacccgac aggcccgaag gaatagaaga agaaggtgga gagagagaca 1980
gagacagatc cattcgatta gtgaacggat ctcgacggta tcgccgaatt cacaaatggc 2040

agtattcatc cacaatttta aaagaaaagg ggggattggg gggtacagtg caggggaaag 2100
aatagtagac ataatagcaa cagacataca aactaaagaa ttacaaaaac aaattacaaa 2160
aattcaaaat tttcgggttt attacaggga cagcagagat ccactttggg gcgataagct 2220
tgggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac 2280
ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc 2340
cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg 2400
tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat 2460
tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc 2520
atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt 2580
gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac 2640
caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg ccccattgac gcaaatgggc 2700
ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc 2760
gcctggagac gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa gacaccgact ctagaggatc 2820
tcgatcggcc accatgggcg tgcgcaacag cgtgctgagc ggcaagaagg ccgacgagct 2880
ggagaagatc cgcctgcgcc ccaacggcaa gaagaagtac atgctgaagc acgtggtgtg 2940
ggccgctaac gagctggacc ggttcggcct ggccgagagc ctgctggaga acaaggaggg 3000
ctgccagaag atcctgagcg tgctggcccc tctggtgccc accggcagcg agaacctgaa 3060
gagcctgtac aacaccgtgt gcgtgatctg gtgcatccac gccgaggaga aggtgaagca 3120
caccgaggag gccaagcaga tcgtgcagcg ccacctggtg gtggagaccg gcaccaccga 3180
[0094] gaccatgccc aagaccagca ggcccaccgc ccctagcagc ggcagaggcg ggaactaccc 3240
cgtgcagcag atcggcggca actacgtgca cctgcccctg agccccagga ccctgaacgc 3300
ctgggtgaag ctgatcgagg agaagaagtt cggcgctgag gtggtgcccg gcttccaggc 3360
cctgagcgag ggctgcaccc cctacgacat caaccagatg ctgaactgcg tgggcgacca 3420
ccaggccgcc atgcagatca tccgcgacat catcaacgag gaagccgccg actgggacct 3480
gcagcacccc cagcctgccc cccagcaggg ccagctgcgc gagcccagcg gctccgacat 3540
cgccggcacc accagcagcg tcgacgagca gatccagtgg atgtaccgcc agcagaaccc 3600
catccccgtg ggcaacatct accgccgctg gatccagctg ggcctgcaga agtgcgtgcg 3660
catgtacaac cccaccaaca tcctggacgt gaagcagggc cccaaggagc ccttccagag 3720
ctacgtggac cgcttctaca agagcctgag ggccgagcag accgatgccg ccgtgaagaa 3780
ctggatgacc cagaccctgc tgatccagaa cgccaacccc gactgcaagc tggtgctgaa 3840
gggcctgggc gtgaacccca ccctggagga gatgctgacc gcctgccagg gcgtgggagg 3900
acctggccag aaggccaggc tgatggccga agccctgaag gaggccctgg cccctgtgcc 3960
catccccttc gccgctgccc agcagagggg ccctcgcaag cccatcaagt gttggaactg 4020
cggcaaggag ggccacagcg ccaggcagtg ccgcgctccc cgcaggcagg gctgctggaa 4080
gtgtgggaag atggaccacg tgatggccaa gtgccccgac cgccaggccg gcttcctggg 4140
cctgggcccc tgggggaaga agccccgcaa cttccctatg gcgcaggtgc accagggcct 4200
catgcctacc gcccctcccg aggaccctgc cgtggacctg ctgaagaact acatgcagct 4260
gggcaagcag cagcgcgaga agcagcgcga gagccgcgag aagccctaca aggaggtgac 4320

cgaggacctg ctgcacctga acagcctgtt cggcggagac cagtaatgaa ctcgagctca 4380
agcttcgaat tcccgataat caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga ttgactggta 4440
ttcttaacta tgttgctcct tttacgctat gtggatacgc tgctttaatg cctttgtatc 4500
atgctattgc ttcccgtatg gctttcattt tctcctcctt gtataaatcc tggttgctgt 4560
ctctttatga ggagttgtgg cccgttgtca ggcaacgtgg cgtggtgtgc actgtgtttg 4620
ctgacgcaac ccccactggt tggggcattg ccaccacctg tcagctcctt tccgggactt 4680
tcgctttccc cctccctatt gccacggcgg aactcatcgc cgcctgcctt gcccgctgct 4740
ggacaggggc tcggctgttg ggcactgaca attccgtggt gttgtcgggg aagctgacgt 4800
cctttccatg gctgctcgcc tgtgttgcca cctggattct gcgcgggacg tccttctgct 4860
acgtcccttc ggccctcaat ccagcggacc ttccttcccg cggcctgctg ccggctctgc 4920
ggcctcttcc gcgtcttcgc cttcgccctc agacgagtcg gatctccctt tgggccgcct 4980
ccccgcgtcg acgcgtgaat tcggtacctt taagaccaat gacttacaag gcagctgtag 5040
atcttagcca ctttttaaaa gaaaaggggg gactggaagg gctaattcac tcccaacgaa 5100
gacaagatcg tcgagagatg ctgcatataa gcagctgctt tttgcttgta ctgggtctct 5160
ctggttagac cagatctgag cctgggagct ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa 5220
gcctcaataa agcttgcctt gagtgcttca agtagtgtgt gcccgtctgt tgtgtgactc 5280
tggtaactag agatccctca gaccctttta gtcagtgtgg aaaatctcta gcagt 5335

[0095]
<210> 73
<211> 510
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> SIVmac 239 GAG protein

<400> 73

Met Gly Val Arg Asn Ser Val Leu Ser Gly Lys Lys Ala Asp Glu Leu
1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Asn Gly Lys Lys Lys Tyr Met Leu Lys
20 25 30

His Val Val Trp Ala Ala Asn Glu Leu Asp Arg Phe Gly Leu Ala Glu
35 40 45

Ser Leu Leu Glu Asn Lys Glu Gly Cys Gln Lys Ile Leu Ser Val Leu
50 55 60

Ala Pro Leu Val Pro Thr Gly Ser Glu Asn Leu Lys Ser Leu Tyr Asn
65 70 75 80

Thr Val Cys Val Ile Trp Cys Ile His Ala Glu Glu Lys Val Lys His
85 90 95

Thr Glu Glu Ala Lys Gln Ile Val Gln Arg His Leu Val Val Glu Thr
100 105 110

Gly Thr Thr Glu Thr Met Pro Lys Thr Ser Arg Pro Thr Ala Pro Ser
115 120 125

Ser Gly Arg Gly Gly Asn Tyr Pro Val Gln Gln Ile Gly Gly Asn Tyr
130 135 140

Val His Leu Pro Leu Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Leu
145 150 155 160

Ile Glu Glu Lys Lys Phe Gly Ala Glu Val Val Pro Gly Phe Gln Ala
165 170 175

Leu Ser Glu Gly Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met Leu Asn Cys
180 185 190

Val Gly Asp His Gln Ala Ala Met Gln Ile Ile Arg Asp Ile Ile Asn
195 200 205

Glu Glu Ala Ala Asp Trp Asp Leu Gln His Pro Gln Pro Ala Pro Gln
210 215 220

Gln Gly Gln Leu Arg Glu Pro Ser Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr
225 230 235 240

Ser Ser Val Asp Glu Gln Ile Gln Trp Met Tyr Arg Gln Gln Asn Pro
245 250 255

Ile Pro Val Gly Asn Ile Tyr Arg Arg Trp Ile Gln Leu Gly Leu Gln
260 265 270

Lys Cys Val Arg Met Tyr Asn Pro Thr Asn Ile Leu Asp Val Lys Gln
275 280 285

[0096]

Gly Pro Lys Glu Pro Phe Gln Ser Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Ser
290 295 300

Leu Arg Ala Glu Gln Thr Asp Ala Ala Val Lys Asn Trp Met Thr Gln
305 310 315 320

Thr Leu Leu Ile Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Leu Val Leu Lys
325 330 335

Gly Leu Gly Val Asn Pro Thr Leu Glu Glu Met Leu Thr Ala Cys Gln
340 345 350

Gly Val Gly Gly Pro Gly Gln Lys Ala Arg Leu Met Ala Glu Ala Leu
355 360 365

Lys Glu Ala Leu Ala Pro Val Pro Ile Pro Phe Ala Ala Ala Gln Gln
370 375 380

Arg Gly Pro Arg Lys Pro Ile Lys Cys Trp Asn Cys Gly Lys Glu Gly
385 390 395 400

His Ser Ala Arg Gln Cys Arg Ala Pro Arg Arg Gln Gly Cys Trp Lys
405 410 415

Cys Gly Lys Met Asp His Val Met Ala Lys Cys Pro Asp Arg Gln Ala
420 425 430

Gly Phe Leu Gly Leu Gly Pro Trp Gly Lys Lys Pro Arg Asn Phe Pro

435 440 445

Met Ala Gln Val His Gln Gly Leu Met Pro Thr Ala Pro Pro Glu Asp
450 455 460

Pro Ala Val Asp Leu Leu Lys Asn Tyr Met Gln Leu Gly Lys Gln Gln
465 470 475 480

Arg Glu Lys Gln Arg Glu Ser Arg Glu Lys Pro Tyr Lys Glu Val Thr
485 490 495

Glu Asp Leu Leu His Leu Asn Ser Leu Phe Gly Gly Asp Gln
500 505 510

<210> 74
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 74
ggctaactag ggaacccact g 21

<210> 75
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

[0097]

<400> 75
gctagagatt ttccacactg actaa 25

<210> 76
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Probe

<400> 76
cacaacagac gggcacacac tacttga 27

<210> 77
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Probe

<400> 77
cactcaaggc aagctttatt gaggc 25

<210> 78
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 78
ggctatcatt cttcttcaag gta 23

<210> 79
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 79
cctctcttca gccatttaag ta 22

<210> 80
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> probe

<400> 80
ggctgaaggt tagggatacc aatattcctg tctc 34

<210> 81
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> probe

<400> 81
ctagtgatgg gctcttccct tgagcccttc 30

[0098]

<210> 82
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 82
gcagaggagg aaattaccca gtac 24

<210> 83
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 83
caattttacc caggcattta atgtt 25

<210> 84
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 84
tgtccacctg ccattaagcc cga 23

CAEV

GTTCCAGCCACAATTTGTCGCTGTAGAATCAGCCATAGCAGCAGCCCTAGTCGC
CATAAATATAAAAAGAAAGGGTGGGCTGGGGACAAGCCCTATGGATATTTTTAT
ATATAATAAAGAACAGAAAAGAATAAATAATAAATATAATAAAAATTCTCAAAA
AATTCAATTCTGTTATTACAGAATAAGGAAAAGAGGAC **(SEQ ID NO:1)**

EIAV

CTTGTAACAAAGGGAGGGAAAGTATGGGAGGACAGACACCATGGGAAGTATTTA
TCACTAATCAAGCACAAGTAATACATGAGAAACTTTTACTACAGCAAGCACAAT
CCTCCAAAAAATTTTGTTTTTACAAAATCCCTGGTGAACATGATTGGAAGGGAC
CTACTAGGGTGCTGTGGAAGGGTGATGGTGCAGTAGTA **(SEQ ID NO:2)**

VISNA

GGACCCTCATTACTCTAAATATAAAAAGAAAGGGTGGGCTAGGGACAAGCCCTA
TGGATATATTTATATTTAATAAGGAACAACAAAGAATACAGCAACAAAGTAAAT
CAAAACAAGAAAAAATTCGATTTTGTTATTACAGAACAAGAAAAAGAGGGCATC
CAGGAGAGTGGCAAGGACCAACACAGGTACTTTGGGGC **(SEQ ID NO:3)**

SIV_{AGM}

TACTGATGGCTTGCATACTTCACAATTTTAAAAGAAAGGGAGGAATAGGGGGAC
AGACTTCAGCAGAGAGACTAATTAATATAATAACAACACAATTAGAAATACAAC
ATTTACAAACCAAAATTCAAAAAATTTTAAATTTTAGAGTCTACTACAGAGAAG
GGAGAGACCCTGTGTGGAAAGGACCGGCACAATTAATC **(SEQ ID NO:4)**

HIV-2 ROD

TGCATGAATTTTAAAAGAAGGGGGGGAATAGGGGATATGACTCCATCAGAAAGA
TTAATCAATATGATCACCACAGAACAAGAGATACAATTCCTCCAAGCCAAAAAT
TCAAAATTAAAAGATTTTCGGGTCTATTTCAGAGAAGGCAGAGATCAGTTGTGG
AAAGGACCTGGGGAACTACTGTGGAAAGGAGAAGGAGC **(SEQ ID NO:5)**

HIV-1 LAI

CAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAG
GGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAA
AACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATC
CACTTTGGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGT **(SEQ ID NO:6)**

HIV1

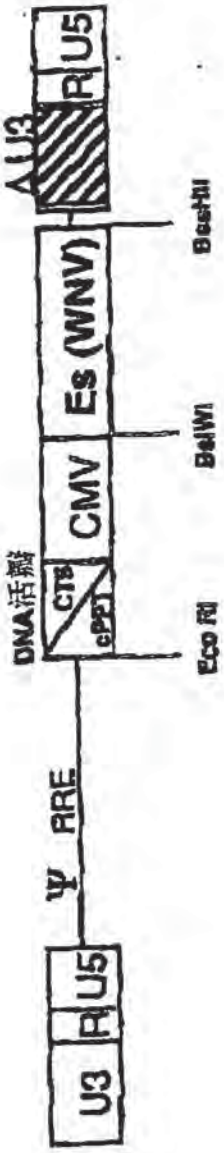
TTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGA
CATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAAT
TCAAAATTTTC **(SEQ ID NO:7)**

图1

A.
U3
R
U5
LTR
Ψ
RRE
DNA 活酶
CTS
cPPT
启动子
目的序列
ΔU3
R
U5
LTR

U3
R
U5
Ψ
RRE
DNA活瓣
CTS
cPPT
CMVie
sE
ΔU3
R
U5
BamHI (2830)
BamHI (4217)

B.


U3
R
U5
Ψ
RRE
DNA活瓣
CTS
cPPT
CMV
Es (WNV)
ΔU3
R
U5
Eco RI
BalWI
BamHI

C.

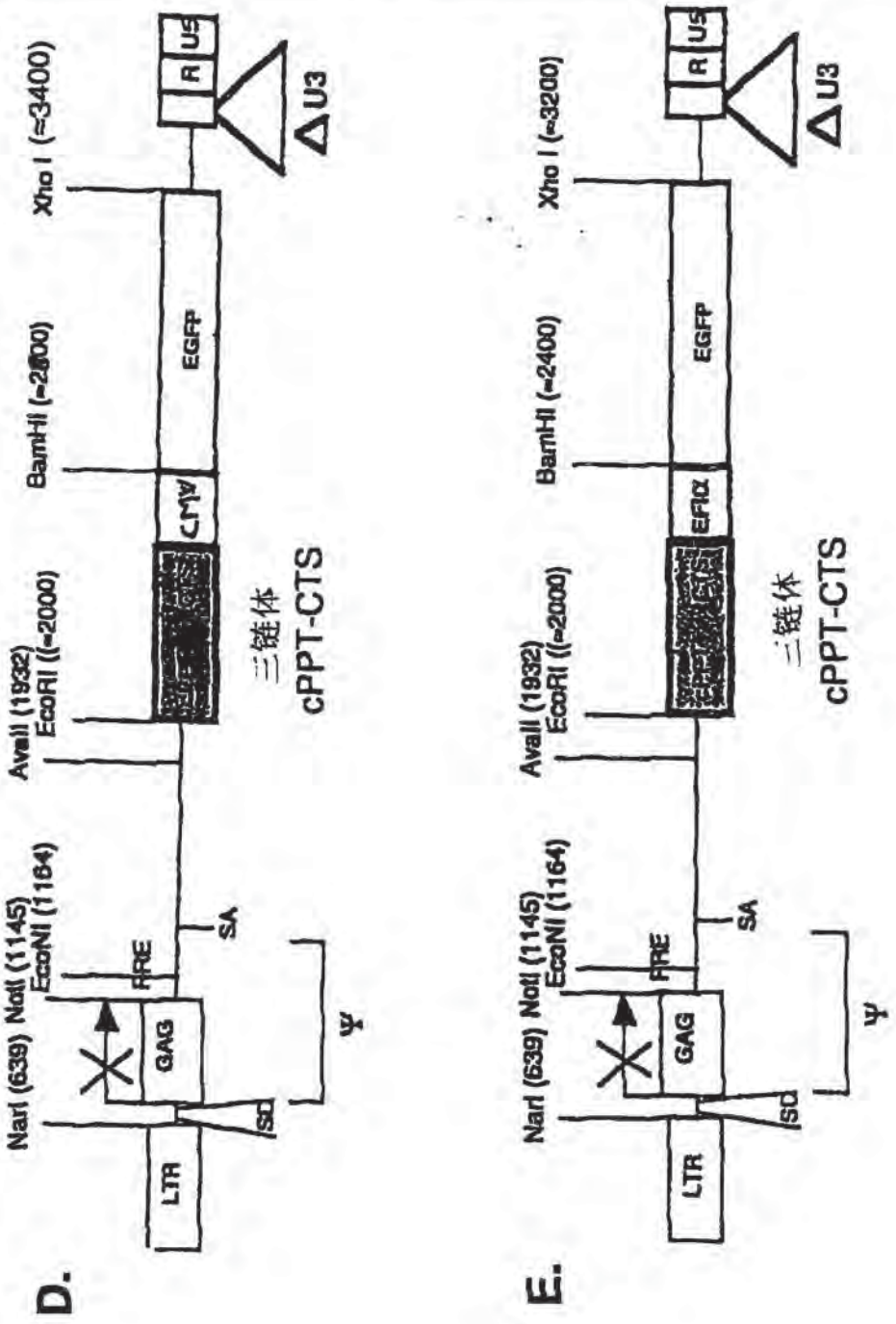

D.
NarI (639)
NotI (1145)
EcoNI (1164)
AvaII (1932)
EcoRI ((≈2000)
BamHI (≈2400)
XhoI (≈3400)
LTR
GAG
ARE
SD
SA
Ψ
CMV
EGFP
三链体
cPPT-CTS
R
U5
ΔU3
E.
NarI (639)
NotI (1145)
EcoNI (1164)
AvaII (1932)
EcoRI ((≈2000)
BamHI (≈2400)
XhoI (≈3200)
LTR
GAG
ARE
SD
SA
Ψ
EFIα
EGFP
三链体
cPPT-CTS
R
U5
ΔU3

图2

```
CHP     MTSSVTISVVLLISFITPLYSYLSIAFPENTKLDWKPVTKNTRYCPMGGEWFLEPGLQEESFLSSTPIGATPSKSD
COCAL       MNFLLLTFIVLPLCSHAKFSIVFPQSQKGNWKNVPSSYHYCPSSSDQNWHNDLLGITMKVKMPKTHKAIQAD
IND          MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLVGTALQVKMPKSHKAIQAD
NJ           MLSYLILAIVVSPILGKIEIVFPQHTTGDWKRVPHEYNYCPTSADKNSHGTQTGIPIELTMPKGLTTHQVD
ISFA    MTSVLFMVGVLLGAFGSTHCSIQIVFPSETKLVWKPVLKGTRYCPQSAELNLEPDLKTMAFDSKVPIGITPSNSD
PIRY                    MTDTVLGKFQIVFPDQNELEWTPVVGDSRHCPQSSEMQFDGSRSQTILTGKAPVGITPSKSD
SVCV     MSIISYIAFLLLIDSTLGIPIFVPSGQNISWQPVIQPFDYQCPIHGNLPNTMGLSATKLTIKSPSVFSTDKVS

CHP     GFLCHAAKWVTTCDFRWYGPKYITHSIHNIKPTRSDCDTALASYKSGTLVSLGFPPESCGYASVTDSEFLVIMITP
COCAL   GWMCHAASKWVTTCDFRWYGPKYITHSIHSIQPTSEQCKESIKQTKQGTWMSPGFPPQNCGYATVTDSVAVVVQATP
IND     GWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTWLNPGFPPQSCGYATVTDAEAAIVQVTP
NJ      GFMCHSALWMTTCDFRWYGPKYITHSIHNEEPTDYQCLEAIKAYKDGVSFNPGFPPQSCGYGTVTDAEAHIITVTP
ISFA    GYLCHAAKWVTTCDFRWYGPKYITHSVHSLRPTVSDCKAAVEAYNAGTLMYPGFPPESCGYASITDSEFYVMLVTP
PIRY    GFICHAAKWVTTCDFRWYGPKYITHSIHHLRPTTSDCETALQRYKDGSLINLGFPPESCGYATVTDSEAMLVQVTP
SVCV    GWICHAAEWKTTCDYRWYGPQYITHSIHPISPTIDECKRIISRIASGTDEDLGFPPQSCGWASVTTVSNTNYKVVP

CHP     HHVGVDDYRGHWVDPLFVGGECDQSYCDTIHNSSVWIPADQTKKNICGQSFTPLTVIVAYDKTK--EIAAGGIVFK
COCAL   HHVLVDEYTGEWIDSQFPNGKCETEECETVHNSTVWYSDYKV-TGLCDATLVDTEITFFSEDGKKESIGKPNTGYR
IND     HHVLVDEYTGEWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTTWHSDYKV-KGLCDSNLISMDITFFSEDGELSSLGKKGTGFR
NJ      HSVKVDEYTGEWIDPHFIGGRCKGQICETVHNSTKWFTSSDG-ESVCSQLFTLVGGTFFSDSEEITSMGLPETGIR
ISFA    HPVGVDDYRGHWVDPLFPTSECNSNFCETVHNATMWIPKDLKTHDVCSQDFQTIRVSVMYPQTK--PTKGADLTLK
PIRY    HHVGVDDYRGHWIDPLFPGGECSTNFCDTVHNSSVWIPKSQK-TDICAQSFKNIKMTASYPSEG--ALVSDRFAFH
SVCV    HSVHLEPYGGHWIDHDFNGGECREKVCEMKGNHSIWITDETV-QHECEKHIEEVEGIMYGNAPR-GDAIYINNFII

CHP     SKYHSHMEGARTCRLSYCGRNGIKFPNGEWVSLMLKLRSKRNLYFPCLKMCPTGIRGEIYPSIRWAQVLTSEIQRI
COCAL   SNYFAYEKGDKVCKQNYCKHAGVRLPSGVWFEFVDQDVYAAAK----LPECPVGATISAPTQTSVDVSLILDVERI
IND     SNYFAYETGDKACKMQYCKHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAAR----FPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERI
NJ      SNYFPYISTEGICKMPFCRKPGYKLKNDLWFQITDPDLDKTVRDLPHIKDCDLSSSIITPGEHATDISLISDVERI
ISFA    SKFHAHMKGDRVCKMKFCNKNGLRLGNGEWIEVGDEVMLDNSKLLSLFPDCLVGSVVKSTLLSEGVQTALWETDRL
PIRY    SAYHPNMPGSTVCIMDFCEQKGLRFTNGEWMGLNVEQSIREKKISAIFPNCVAGTEIRATLESEGARTLTWETQRM
SVCV    DKHHRVYRFGGSCRMKFCNKDGIKFTRGDWVEKTAGTLTNIYEN---IPECADGTLVSGHRPGLDLIDTVFNLENV

CHP     LDYSLCQNTWDKVERKEPLSPLDLSYLASKSPGKGLAYTVINGTLSFAHTRYVRMWIDGPVLKEPKGKRESPSGIS
COCAL   LDYSLCQETWSKIRSKQPVSPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRIDIDNPIISKMVGKISG-SQTE
IND     LDYSLCQETWSKIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPVFTIINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVGMISG-TTTE
NJ      LDYSLCQNTWSKIEAGEPITPVDLSYLGPKNPGVGPVFTIINGSLHYFTSKYLRVELENPVIPRMEGRVAG-TRIV
ISFA    LDYSLCQNTWEKIDRKEPLSAVDLSYLAPRSPGKGMAYIVANGSLMSAPARYIRVWIDSPILKEIKGKKESASGID
PIRY    LDYSLCQNTWDKVSRKEPLSPLDLSYLSPRAPGKGMAYTVINGTLHSAHAKYIRTWIDYGEMKEIKGGRGEYSKAP
SVCV    VEYTLCEGTKRKINKQEKLTSVDLSYLAPRIGGFGSVFRVRNGTLERGSTTYIRIEVEGPVVDSLNGIDPR-TNAS

CHP     SDIWTQWFKYGDMEIGPNGLLKTAGGYKFPWHLIGMGIVDNELHELSEANPLDHPQLPHAQSIADDS---EEIFFG
COCAL   RELWTEWFPYEGVEIGPNGILKTPTGYKFPLFMIGHGMLDSDLHKTSQAEVFEKPHLAEAPKQLPEE---ETLFFG
IND     RVLWDDWAPYEDVEIGPNGVLRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSDLHLSSKAQVFEKPHIQDAASQLPDD---ETLFFG
NJ      RQLWDQWFPFGEAEIGPNGVLKTKQGYKFPLHIIGTGEVDSDIKMERVVKHWEKPHIEAAQTFLKKDDTGEVLYYG
ISFA    TVLWEQWLPFNGMELGPNGLIKTKSGYKFPLYLLGMGIVDQDLQELSSVNPVDHPHVPIAQAFVSEG---EEVFFG
PIRY    ELLWSQWFDFGPFKIGPNGLLHTGKTFKFPLYLIGAGIIDEDLHELDEAAPIDHPQMPDAKSVLPED---EEIFFG
SVCV    RVFWDDWELDGNIYQGFNGVYKGKDGKIHIPLNMIESGIIDDELQHAFQADIIPHPHYDDDEIREDD-----IFFD

CHP     DTGVSKNPVELVTGWFTSWKESLAAGSCPDLRCPPLFPGIVYYLQKAQME-------ERGERSDSFEMRIFKPNNM
COCAL   DTGISKNPVELIEGWFSSWKSTVVTFFFAIGVFILLYVVARIVIAVRYRYQGS----NNKRIYNDIEMSRFRK---
IND     DTGLSKNPIEFVEGWFSSWKSSIASFFFIIGLIIGLFLVLRVGIYLCIKLKHT----KKRQIYTDIEMNRLGK---
NJ      DTGVSKNPVELVEGWFSGWRSSIMGVLAVIIGFVILIFLIRLIGVLSSLFRPK----RRPIYKSDVEMAHFR----
ISFA    DTGVSKNPIELISGWFSDWKETAAALGFAAISVILIIGLMRLLPLLCRRRK------QKKVIYKDVELNSFDPRQA
PIRY    DTGVSKNPIELIQGWFSNWRESVVAIVGIVLLIVVTFLAIKTVRVLNCLWRPRRKRIVRQEVDVESNLNHFEMRGF
SVCV    NTGENGNPVDAVVEWVSGWGTSLKFFGMTLVALILIFLLIRCCVACTYLMK------KSKRPATEEEEMRSLV
                                Transmembrane Domain

CHP     RARV--
COCAL   ------
IND     ----
NJ      ----
ISFA    FHR---
PIRY    PEYVKR
```

图3A

Indiana 病毒

MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIGTAIQVKMPKSHKAIQADGWMCHASKWVTT
CDFRWYGPKYITQSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTWLNPGFPPQSCGYATVTDAEAVIVQVTPHHVLVDEYTGEWVDSQFIN
GKCSNYICPTVHNSTTWHSDYKVKGLCDSNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYFAYETGGKACKMQYCKHWGVRLPS
GVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWSKIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPAF
TIINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVGMISGTTTERELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSDLHLS
SKAQVFEHPHIQDAASQLPDDESLFFGDTGLSKNPIELVEGWFSSWKSSIASFFFIIGLIIGLFLVLRVGIHLCIKLKHTKKR
QIYTDIEMNRLGK

Chandipura 病毒

MTSSVTISVVLLISFITPLYSYLSIAFPENTKLDWKPVTKNTRYCPMGGEWFLEPGLQEESFLSSTPIGATPSKSDGFLCHAA
KWVTTCDFRWYGPKYITHSIHNIKPTRSDCDTALASYKSGTLVSLGFPPESCGYASVTDSEFLVIMITPHHVGVDDYRGHWVD
PLFVGGECDQSYCDTIHNSSVWIPADQTKKNICGQSFTPLTVTVAYDKTKEIAAGGIVFKSKYHSHMEGARTCRLSYCGRNGI
KFPNGEWVSLMLKLRSKRNLYFPCLKMCPTGIRGEIYPSIRWAQVLTSEIQRILDYSLCQNTWDKVERKEPLSPLDLSYLASK
SPGKGLAYTVINGTLSFAHTRYVRMWIDGPVLKEPKGKRESPSGISSDIWTQWFKYGDMEIGPNGLLKTAGGYKFPWHLIGMG
IVDNELHELSEANPLDHPQLPHAQSIADDSEEIFFGDTGVSKNPVELVTGWFTSWKESLAAGSCPDLRCPPLFPGIVYYLQKA
QMEERGERSDSFEMRIFKPNNMRARV

Piry 病毒

MDLFPILVVVLMTDTVLGKFQIVFPDQNELEWRPVVGDSRHCPQSSEMQFDGSRSQTILTGKAPVGITPSKSDGFICHAAKWV
TTCDFRWYGPKYITHSIHHLRPTTSDCETALQRYKDGSLINLGFPPESCGYATVTDSEAMLVQVTPHHVGVDDYRGHWIDPLF
PGGECSTNFCDTVHNSSVWIPKSQKTDICAQSFKNIKMTASYPSEGALVSDRFAFHSAYHPNMPGSTVCIMDFCEQKGLRFTN
GEWMGLNVEQSIREKKISAIFPNCVAGTEIRATLESEGARTLTWETQRMLDYSLCQNTWDKVSRKEPLSPLDLSYLSPRAPGK
GMAYTVINGTLHSAHAKYIRTWIDYGEMKEIKGGRGEYSKAPELLWSQWFDFGPFKIGPNGLLHTGKTFKFPLYLIGAGIIDE
DLHELDEAAPIDHPQMPDAKSVLPEDEEIFFGDTGVSKNPIELIQGWFSNWRESVMAIVGIVLLIVVTFLAIKTVRVLNCLWR
PRKKRIVRQEVDVESRLNHFEMRGFPEYVKR

New Jersey 病毒

MLSYLIFALAVSPILGKIEIVFPQHTTGDWKRVPHEYNYCPTSADKNSHGTQTGIPVELTMPKGLTTHQVEGFMCHSALWMTT
CDFRWYGPKYITHSIHNEEPTDYQCLEAIKSYKDGVSFNPGFPPQSCGYGTVTDAEAHIVTVTPHSVKVDEYTGEWIDPHFIG
GRCKGQICETVHNSTKWFTSSDGESVCSQLFTLVGGIFFSDSEEITSMGLPETGIRSNYFPYISTEGICKMPFCRKQGYKLKN
DLWFQIMDPDLDKTVRDLPHIKDCDLSSSIITPGEHATDISLISDVERILDYALCQNTWSKIESGEPITPVDLSYLGPKNPGV
GPVFTIINGSLHYFTSKYLRVELESPVIPRMEGKVAGTRIVRQLWDQWFPFGEVEIGPNGVLKTKQGYKFPLHIIGTGEVDSD
IKMERVVKHWEHPHIEAAQTFLKKDDTGEVLYYGDTGVSKNPVELVEGWFSGWRSSLMGVLAVIIGFVILMFLIKLIGVLSSL
FRPKRRPIYKSDVEMAHFR

Cocal 病毒

MNFLLLTFIVLPLCSHAKFSIVFPQSQKGNWKNVPSSYHYCPSSSDQNWHNDLLGITMKVKMPKTHKAIQADGWMCHAAKWIT
TCDFRWYGPKYITHSIHSIQPTSEQCKESIKQTKQGTWMSPGFPPQNCGYATVTDSVAVVVQATPHHVLVDEYTGEWIDSQFP
NGKCETEECETVHNSTVWYSDYKVTGLCDATLVDTEITFFSEDGKKESIGKPNTGYRSNYFAYEKDKVCKMNYCKHAGVRLPS
GVWFEFVDQDVYAAAKLPECPVGATISAPTQTSVDVSLILDVERILDYSLCQETWSKIRSKQPVSPVDLSYLAPKNPGTGPAF
TIINGTLKYFETRYIRIDIDNPIISKMVGKISGSQTERELWTEWFPYEGVEIGPNGILKTPTGYKFPLFMIGHGMLDSDLHKT
SQAEVFEHPHLAEAPKQLPEEETLFFGDTGISKNPVELIEGWFSSWKSTVVTFFFAIGVFILLYVVARIVIAVRYRYQGSNNK
RIYNDIEMSRFRK

Isfahan 病毒

MTSVLFMVGVLLGAFGSTHCSIQIVFPSETKLVWKPVLKGTRYCPQSAELNLEPDLKTMAFDSKVPIGITPSNSDGYLCHAAK
WVTTCDFRWYGPKYITHSVHSLRPTVSDCKAAVEAYNAGTLMYPGFPPESCGYASITDSEFYVMLVTPHPVGVDDYRGHWVDP
LFPTSECNSNFCETVHNATMWIPKDLKTHDVCSQDFQTIRVSVMYPQTKPTKGADLTLKSKFHAHMKGDRVCKMKFCNKNGLR
LGNGEWIEVGDEVMLDNSKLLSLFPDCLVGSVVKSTLLSEGVQTALWETDRLLDYSLCQNTWEKIDRKEPLSAVDLSYLAPRS
PGKGMAYIVANGSLMSAPARYIRVWIDSPILKEIKGKKESASGIDTVLWEQWLPFNGMELGPNGLIKTKSGYKFPLYLLGMGI
VDQDLQELSSVNPVDHPHVPIAQAFVSEGEEVFFGDTGVSKNPIELISGWFSDWKETAAALGFAAISVILIIGLMRLLPLLCR
RRKQKKVIYKDVELNSFDPRQAFHR

SVCV 病毒

MSIISYIAFLLLIDSTFGIPIFVPSGQNISWQPVIQPFDYQCPIHGNLPNTMGLSATKLTIKSPSVFSTDKVSGWICHAAEWK
TTCDYRWYGPQYITHSIHPISPTIDECKRIISRIASGTDEDLGFPPQSCGWASVTTVSNTNYKVVPHSVHLEPYGGHWIDHEF
NGGECREKVCEMKGNHSIWITDETVQHECEKHIEEVEGIMYGNAPRGDAIYINNFIIDKHHRVYRFGGSCRMKFCNKDGIKFT
RGDWVEKTAETLTNIYANIPECADGTLVSGHRPGLDLIDTVFNLENVVEYTLCEGTKRKINNQEKLTSVDLSYLAPRIGGFGS
VFRVRNGTLERGSTTYIKIEVEGPIVDSLNGTDPRTNASRVFWDDWELDGNIYQGFNGVYKGKDGKIHIPLNMIESGIIDDEL
QHAFQADIIPHPHYDDDEIREDDIFFDNTGENGNPVDAVVEWVSGWGTSLKFFGTTLVALILIFLLIRCCVACTYLMKKSKRP
ATESHEMRSFV

图3B

TGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGG
ATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTAGCAGAACTACACACCAGG
GCCAGGGATCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTAC
CAGTTGAGCCAGAGAAGTTAGAAGAAGCCAACAAAGGAGAGAACACCAGC
TTGTTACAACCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGT
GTTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTCATCACGGTGGCCCGA
GAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCTGATATCGAGCTTGCTACAA
GGGACTTTCCGCTGGGGGACTTTCCAGGGAGGCGTGGCCTGGGCGGGACT
GGGGAGTGGCGAGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCCT
GTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGC
TAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCT
TCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCC
TCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACA
GGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACT
CGGCTTGCTGAAGCGCGGAATTCCGCGCCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGG
CGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAG
AGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGAT
GGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAAA
CATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGG
CCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAAC
CATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTA
GCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGA
AGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCAC
AGCAAGCGGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAA
TTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAG
GAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGA
GCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAG
CACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTAT
TGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCG
CAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGC
AAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGA
TTTGGGGTTGCTCTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAAT
GCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTG
GATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCT
TAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTG
GAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAAATTG
GCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTT
TAAGAATAGTTTTTGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGA
TATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGA
CAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGAT
CCATTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGCCGAATTCACAAATGG
CAGTATTCATCCACAATTTTaaaagaaaaagggggATTGGGGGGTACAGT
GCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGA
ATTACAAAAACAAATTACaaaaattcaaaattttCGGGTTTATTACAGGG
ACAGCAGAGATCCACTTTGGGGCGATAAGCTTGGGAGTTCCGCGTTACAT
AACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCA

图4A

TTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTT
CCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAG
TACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGAC
GGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTT
TCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGA
TGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGG
GGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCA
CCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGA
CGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT
CGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGA
CCTCCATAGAAGACACCGACTCTAGAggaCGTACGATGAGAGTTGTGTTT
GTCGTGCTATTGCTTTTGGTGGCCCCAGCTTACAGCTTCAACTGCCTTGG
AATGAGCAACAGAGACTTCTTGGAAGGAGTGTCTGGAGCAACATGGGTGG
ATTTGGTTCTCGAAGGCGACAGCTGCGTGACTATCATGTCTAAGGACAAG
CCTACCATCGATGTGAAGATGATGAATATGGAGGCGGTCAACCTGGCAGA
GGTCCGCAGTTATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAG
CTGCGTGCCCGACCATGGGAGAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCA
GCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGACAGGGGCTGGGGCAACGGCTG
CGGATTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAATTTGCCTGCT
CTACCAAGGCAATAGGAAGAACCATCTTGAAAGAGAATATCAAGTACGAA
GTGGCCATTTTTGTCCATGGACCAACTACTGTGGAGTCGCACGGAAACTA
CTCCACACAGGTTGGAGCCACTCAGGCAGGGAGATTCAGCATCACTCCTG
CGGCGCCTTCATACACACTAAAGCTTGGAGAATATGGAGAGGTGACAGTG
GACTGTGAACCACGGTCAGGGATTGACACCAATGCATACTACGTGATGAC
TGTTGGAACAAAGACGTTCTTGGTCCATCGTGAGTGGTTCATGGACCTCA
ACCTCCCTTGGAGCAGTGCTGGAAGTACTGTGTGGAGGAACAGAGAGACG
TTAATGGAGTTTGAGGAACCACACGCCACGAAGCAGTCTGTGATAGCATT
GGGCTCACAAGAGGGAGCTCTGCATCAAGCTTTGGCTGGAGCCATTCCTG
TGGAATTTTCAAGCAACACTGTCAAGTTGACGTCGGGTCATTTGAAGTGT
AGAGTGAAGATGGAAAAATTGCAGTTGAAGGGAACAACCTATGGCGTCTG
TTCAAAGGCTTTCAAGTTTCTTGGGACTCCCGCAGACACAGGTCACGGCA
CTGTGGTGTTGGAATTGCAGTACACTGGCACGGATGGACCTTGCAAAGTT
CCTATCTCGTCAGTGGCTTCATTGAACGACCTAACGCCAGTGGGCAGATT
GGTCACTGTCAACCCTTTTGTTTCAGTGGCCACGGCCAACGCTAAGGTCC
TGATTGAATTGGAACCACCCTTTGGAGACTCATACATAGTGGTGGGCAGA
GGAGAACAACAGATCAATCACCATTGGCACAAGTCTGGAAGCAGCATTGG
CAAAGCCTTTACAACCACCCTCAAAGGAGCGCAGAGACTAGCCGCTCTAG
GAGACACAGCTTGGGACTTTGGATCAGTTGGAGGGGTGTTCACCTCAGTT
GGGAAGGCTGtctaatgcgcgcGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAG
GCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGG
GCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGatcgtcgagAGATGCTGCATATAA
GCAGCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAG
CCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAA
AGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTC
TGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTA
GCAGT

图4B

TGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGG
ATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTAGCAGAACTACACACCAGG
GCCAGGGATCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTAC
CAGTTGAGCCAGAGAAGTTAGAAGAAGCCAACAAAGGAGAGAACACCAGC
TTGTTACAACCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGT
GTTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTCATCACGGTGGCCCGA
GAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCTGATATCGAGCTTGCTACAA
GGGACTTTCCGCTGGGGGACTTTCCAGGGAGGCGTGGCCTGGGCGGGACT
GGGGAGTGGCGAGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCCT
GTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGC
TAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCT
TCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCC
TCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACA
GGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACT
CGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAG
TACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCG
AGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATT
CGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATG
GGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAA
CATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAG
ACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTA
TTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACA
AGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCC
GCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTG
AATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCC
ACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAAT
AGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCG
CAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATA
GTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCT
GTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGG
CTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGC
TCTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAG
TAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGG
ACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAA
TCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAA
ATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATA
TAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTT
TTTGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATT
ATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAG
GAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTA
GTGAACGGATCTCGACGGTATCGCCGAATTCACAAATGGCAGTATTCATC
CACAATTTTaaaagaaaaggggggATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAG
AATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAAAC
AAATTACaaaaattcaaaatttcCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGAT
CCACTTTGGGGCGATAAGCTTGGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTA
AATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAAT

图5A

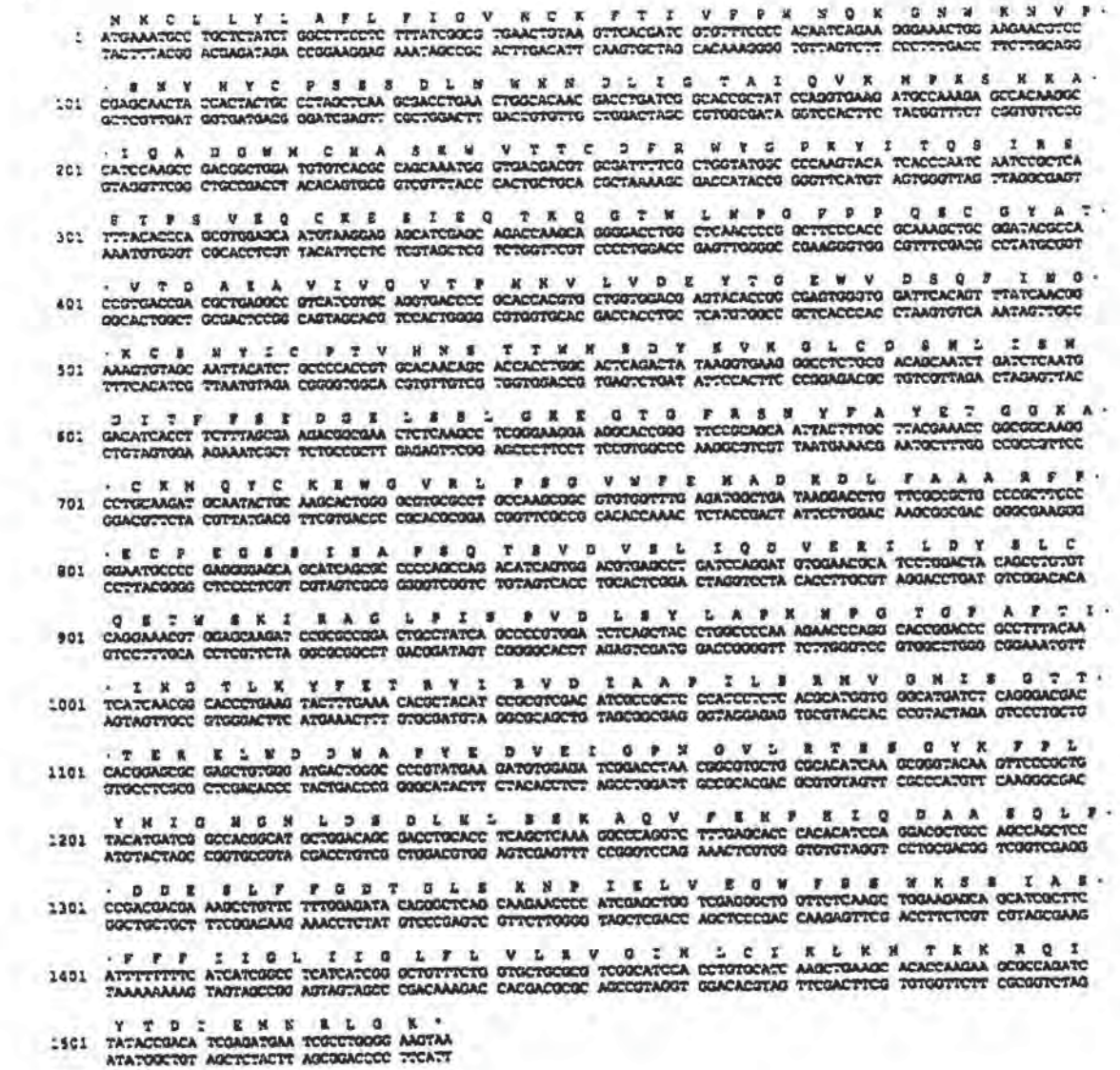
AATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC
AATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTG
TATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC
CGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGC
AGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGG
CAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAG
TCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAAC
GGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGC
GGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAA
CCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAA
GACACCGACTCTAGAggatccccaccggtcgccaccatggtgagcaaggg
cgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcg
acgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgcc
acctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcc
cgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgct
tcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttcttcaagtccgcc
atgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacgg
caactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtga
accgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctg
gggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggc
cgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaaca
tcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacaccccc
atcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcaccca
gtccgccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgc
tggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcggcatggacgagctgtac
aagtaaagcggccggactctagctcgagACCTAGAAAAACATGGAGCAAT
CACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGATTGTGCCTGGCTAGAAG
CACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTA
AGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGA
AAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGatcgtc
gagAGATGCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCT
GGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCA
CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGC
CCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGT
CAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGT

图5B

A.

MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLVGTALQVKMPKSHKAIQ
ADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTWLNPGFPPQSCGYATVTDA
EAAIVQVTPHHVLVDEYTGEWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTTWHSDYKVKGLCDSNLISMDITFFSE
DGELSSLGKKGTGFRSNYFAYETGDKACKMQYCKHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSIS
APSQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWSKIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPVFTIINGTLKYFETR
YIRVDIAAPILSRMVGMISGTTTERVLWDDWAPYEDVEIGPNGVLRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSDLHL
SSKAQVFEHPHIQDAASQLPDDETLFFGDTGLSKNPIEFVEGWFSSWKSSIASFFFIIGLIIGLFLVLR
VGIYLCIKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK (GenBank # M11048)

B.



C.

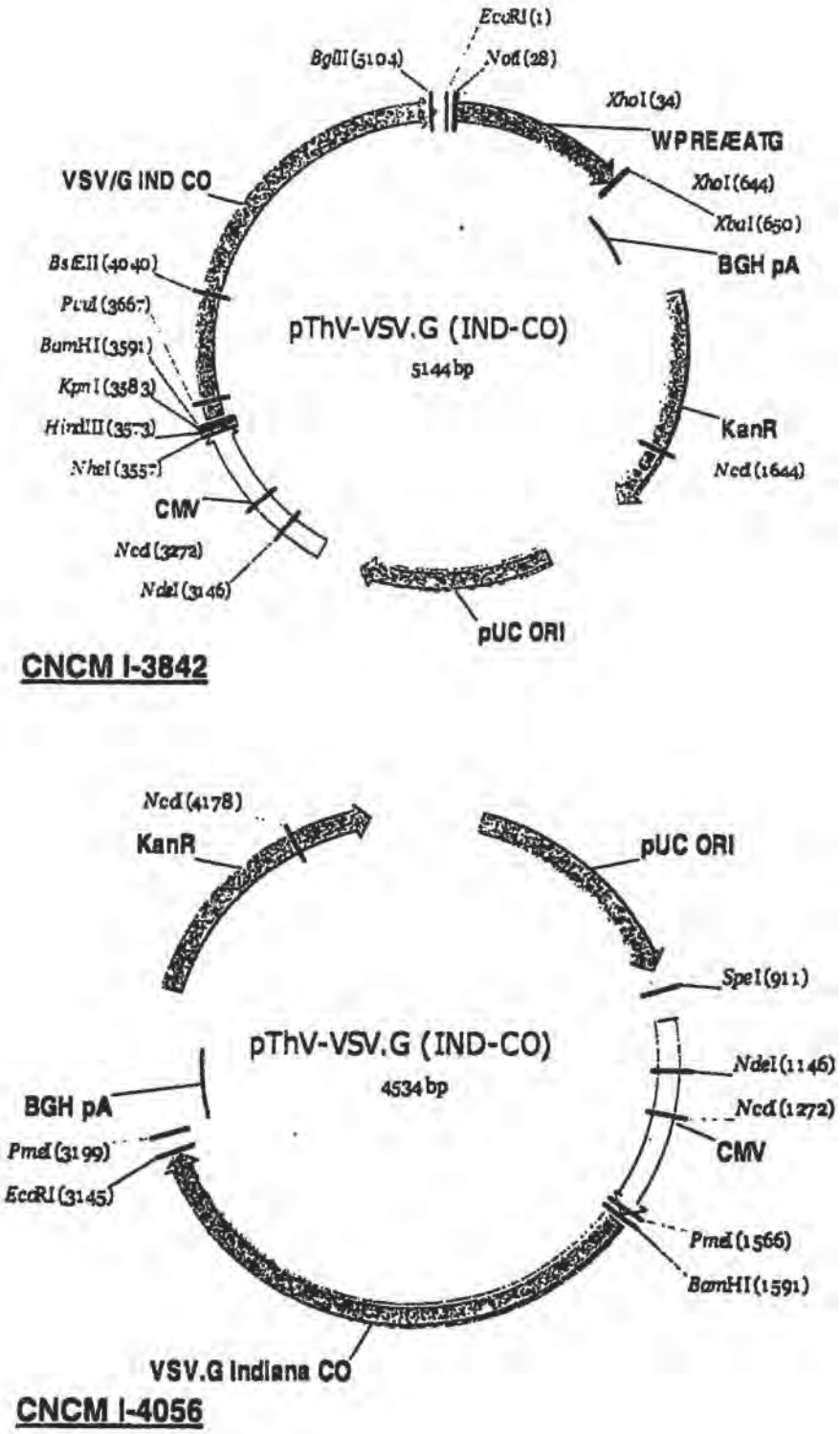
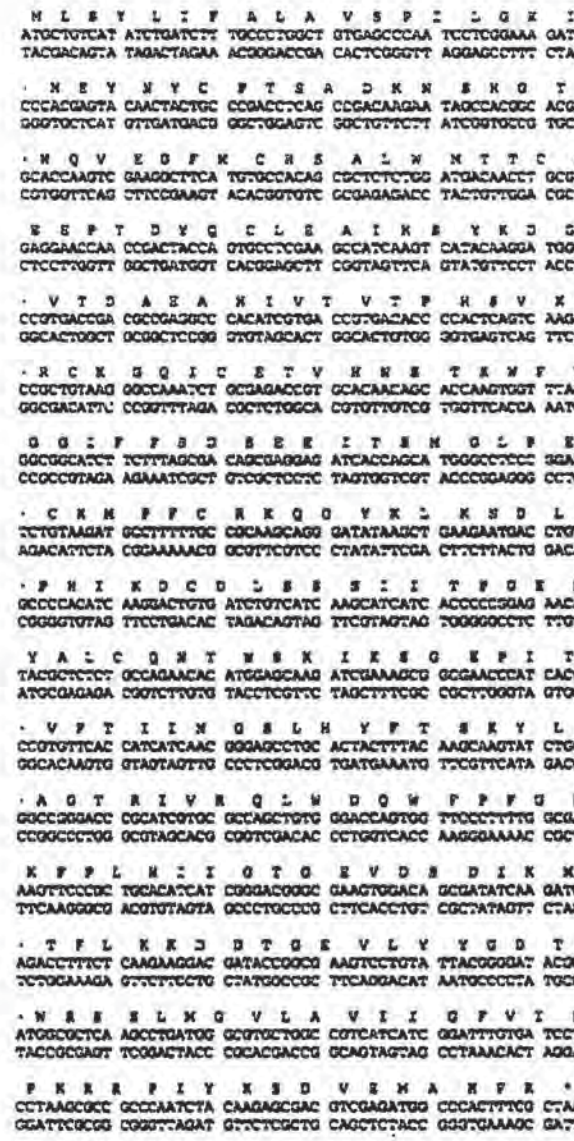

EcoRI(1)
BglII(5104)
NotI(28)
XhoI(34)
WPRE/ATG
XhoI(644)
XbaI(650)
BGH pA
VSV/G IND CO
BsEII(4040)
PvuI(3667)
BamHI(3591)
KpnI(3583)
HindIII(3573)
NheI(3557)
CMV
NcoI(3272)
NdeI(3146)
pThV-VSV.G (IND-CO)
5144 bp
KanR
NcoI(1644)
pUC ORI
CNCM I-3842
NcoI(4178)
KanR
pUC ORI
SpeI(911)
pThV-VSV.G (IND-CO)
4534 bp
NdeI(1146)
NcoI(1272)
CMV
BGH pA
PmeI(3199)
EcoRI(3145)
PmeI(1566)
BamHI(1591)
VSV.G Indiana CO
CNCM I-4056

图6

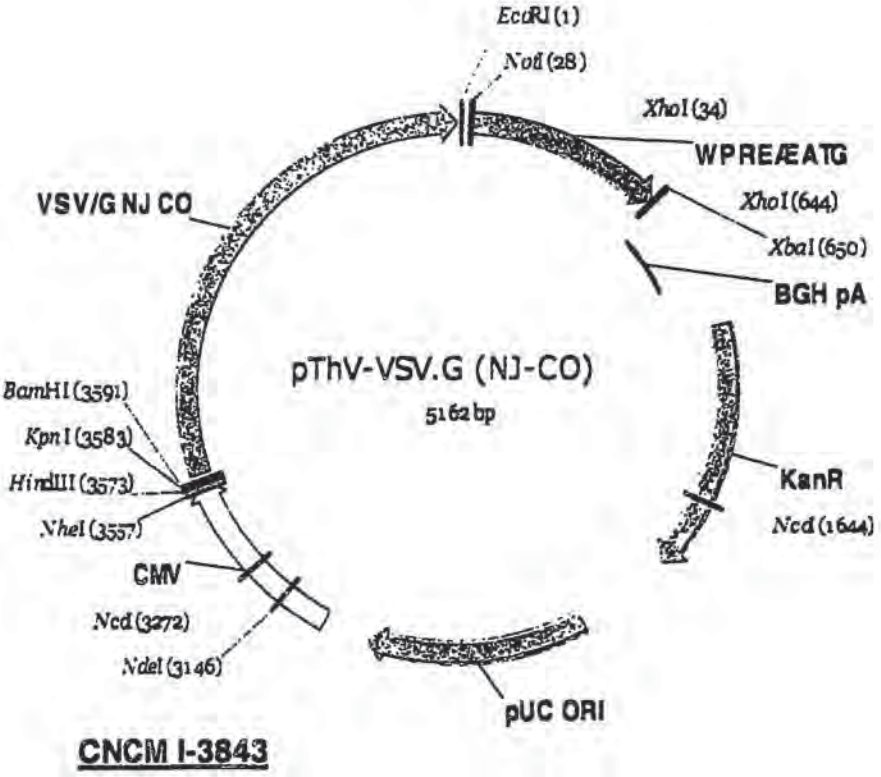
A.

MLSYLILAIVVSPILGKIEIVFPQHTTGDWKRVPHEYNYCPTSADKNSHGTQTGIPIELTMPKGLTTHQ
VDGFMCHSALWMTTCDFRWYGPKYITHSIHNEEPTDYQCLEAIKAYKDGVSFNPGFPPQSCGYGTVTDA
EAHIITVTPHSVKVDEYTGEWIDPHFIGGRCKGQICETVHNSTKWFTSSDGESVCSQLFTLVGGTFFSD
SEEITSMGLPETGIRSNYFPYISTEGICKMPFCRKPGYKLKNDLWFQITDPDLDKTVRDLPHIKDCDLS
SSIITPGEHATDISLISDVERILDYSLCQNTWSKIEAGEPITPVDLSYLGPKNPGVGPVFTIINGSLHY
FTSKYLRVELENPVIPRMEGRVAGTRIVRQLWDQWFPFGEAEIGPNGVLKTKQGYKFPLHIIGTGEVDS
DIKMERVVKHWEHPHIEAAQTFLKKDDTGEVLYYGDTGVSKNPVELVEGWFSGWRSSIMGVLAVIIGFV
ILIFLIRLIGVLSSLFRPKRRPIYKSDVEMAHFR (GenBank # AF170624)

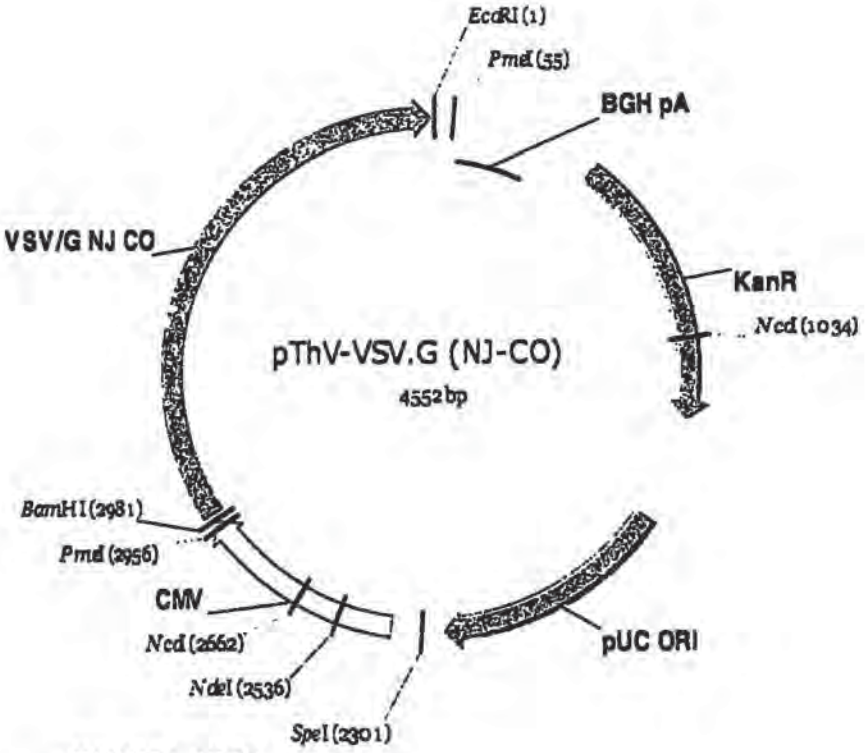
B.



C.



CNCM I-3843



CNCM I-4058

图7

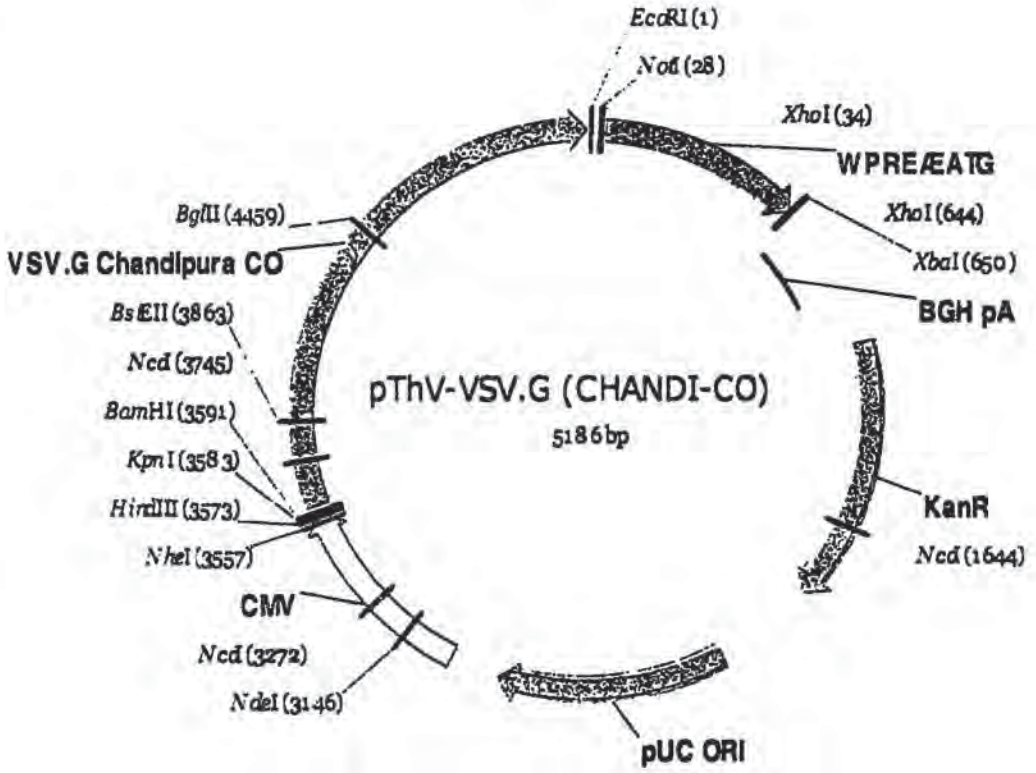
A.

MTSSVTISVVLLISFITPLYSYLSIAFPENTKLDWKPVTKNTRYCPMGGEWFLEPGLQEESFLSSTPIG
ATPSKSDGFLCHAAKWVTTCDFRWYGPKYITHSIHNIKPTRSDCDTALASYKSGTLVSLGFPPESCGYA
SVTDSEFLVIMITPHHVGVDDYRGHWVDPLFVGGECDQSYCDTIHNSSVWIPADQTKKNICGQSFTPLT
VTVAYDKTKEIAAGGIVFKSKYHSHMEGARTCRLSYCGRNGIKFPNGEWVSLMLKLRSKRNLYFPCLKM
CPTGIRGEIYPSIRWAQVLTSEIQRILDYSLCQNTWDKVERKEPLSPLDLSYLASKSPGKGLAYTVING
TLSFAHTRYVRMWIDGPVLKEPKGKRESPSGISSDIWTQWFKYGDMEIGPNGLLKTAGGYKFPWHLIGM
GIVDNELHELSEANPLDHPQLPHAQSIADDSEEIFFGDTGVSKNPVELVTGWFTSWKESLAAGSCPDLR
CPPLFPGIVYYLQKAQMEERGERSDSFEMRIFKPNNMRARV (GenBank # J04350)

B.

```
                BamHI
                                  M  T  S  S  V  T  I  S  V  V  L  L  I  S  F  I  T  P  L  Y  S  Y  L  S  I
   1    GGCGCGCCGG ATCCTGATCA GCCACCATGA CCAGCAGCGT GACCATCAGC GTGGTGCTGC TGATCAGCTT CATCACCCCC CTGTACAGCT ACCTGAGCAT
        CCGCGCGGCC TAGGACTAGT CGGTGGTACT GGTCGTCGCA CTGGTAGTCG CACCACGACG ACTAGTCGAA GTAGTGGGGG GACATGTCGA TGGACTCGTA

        A  F  P  E  N  T  K  L  D  W  K  P  V  T  K  N  T  R  Y  C  P  M  G  G  E  W  F  L  E  P  G  L  Q
 101    TGCCTTCCCC GAGAACACCA AGCTGGACTG GAAGCCCGTG ACCAAGAACA CCCGGTACTG CCCCATGGGC GGCGAGTGGT TTCTGGAACC CGGCCTGCAG
        ACGGAAGGGG CTCTTGTGGT TCGACCTGAC CTTCGGGCAC TGGTTCTTGT GGGCCATGAC GGGGTACCCG CCGCTCACCA AAGACCTTGG GCCGGACGTC

        E  E  S  F  L  S  S  T  P  I  G  A  T  P  S  K  S  D  G  F  L  C  H  A  A  K  W  V  T  T  C  D  F  R
 201    GAAGAGAGCT TCCTGAGCAG CACCCCCATC GGCGCCACCC CCAGCAAGAG CGACGGCTTC CTGTGCCACG CCGCCAAGTG GGTGACCACC TGCGACTTCC
        CTTCTCTCGA AGGACTCGTC GTGGGGGTAG CCGCGGTGGG GGTCGTTCTC GCTGCCGAAG GACACGGTGC GGCGGTTCAC CCACTGGTGG ACGCTGAAGG

        W  Y  G  P  K  Y  I  T  H  S  I  H  N  I  K  P  T  R  S  D  C  D  T  A  L  A  S  Y  K  S  G  T  L
 301    GGTGGTACGG CCCCAAGTAC ATCACCCACA GCATCCACAA CATCAAGCCC ACCAGAAGCG ACTGCGACAC AGCCCTGGCC TCTTACAAGA GCGGCACCCT
        CCACCATGCC GGGGTTCATG TAGTGGGTGT CGTAGGTGTT GTAGTTCGGG TGGTCTTCGC TGACGCTGTG TCGGGACCGG AGAATGTTCT CGCCGTGGGA

        V  S  L  G  F  P  E  S  C  G  Y  A  S  V  T  D  S  E  F  L  V  I  M  I  T  P  H  H  V  G  V  D
 401    GGTGTCCCTG GGCTTCCCTC CCGAGAGCTG CGGCTACGCC AGCGTGACCG ACAGCGAGTT CCTGGTGATT ATGATTACCC CCCACCACGT GGGCGTGGAC
        CCACAGGGAC CCGAAGGGAG GGCTCTCGAC GCCGATGCGG TCGCACTGGC TGTCGCTCAA GGACCACTAA TACTAATGGG GGGTGGTGCA CCCGCACCTG

        D  Y  R  G  H  W  V  D  P  L  F  V  G  G  E  C  D  Q  S  Y  C  D  T  I  H  N  S  S  V  W  I  P  A  D
 501    GACTACCGGG GCCACTGGGT GGACCCTCTG TTCGTGGGAG GGGAATGCGA CCAGAGCTAC TGCGATACCA TCCACAACTC CAGCGTGTGG ATTCCCGCCG
        CTGATGGCCC CGGTGACCCA CCTGGGAGAC AAGCACCCTC CCCTTACGCT GGTCTCGATG ACGCTATGGT AGGTGTTGAG GTCGCACACC TAAGGGCGGC

        Q  T  K  K  N  I  C  G  Q  S  F  T  P  L  T  V  T  V  A  Y  D  K  T  K  E  I  A  A  G  G  I  V  F
 601    ACCAGACCAA GAAGAACATC TGCGGCCAGA GCTTCACCCC TCTGACCGTG ACCGTGGCCT ACGACAAGAC CAAAGAGATT GCCGCCGGAG GGATCGTGTT
        TGGTCTGGTT CTTCTTGTAG ACGCCGGTCT CGAAGTGGGG AGACTGGCAC TGGCACCGGA TGCTGTTCTG GTTTCTCTAA CGGCGGCCTC CCTAGCACAA

        K  S  K  Y  M  S  N  M  E  G  A  R  T  C  R  L  S  Y  C  G  R  N  G  I  K  F  P  N  G  E  W  V  S
 701    CAAGAGCAAG TACCACAGCC ACATGGAAGG CGCCAGGACC TGCAGACTGT CCTACTGCGG CCGGAACGGC ATCAAGTTCC CCAACGGCGA GTGGGTGTCC
        GTTCTCGTTC ATGGTGTCGG TGTACCTTCC GCGGTCCTGG ACGTCTGACA GGATGACGCC GGCCTTGCCG TAGTTCAAGG GGTTGCCGCT CACCCACAGG

        L  M  L  K  L  R  S  K  R  N  L  Y  F  P  C  L  K  M  C  P  T  G  I  R  G  E  I  Y  P  S  I  R  W  A
 801    CTGATGCTGA AGCTGCGGAG CAAGCGGAAC CTGTACTTCC CCTGCCTGAA GATGTGCCCC ACCGGCATCC GGGGCGAGAT CTACCCCAGC ATCAGATGGG
        GACTACGACT TCGACGCCTC GTTCGCCTTG GACATGAAGG GGACGGACTT CTACACGGGG TGGCCGTAGG CCCCGCTCTA GATGGGGTCG TAGTCTACCC

        Q  V  L  T  S  E  I  Q  R  I  L  D  Y  S  L  C  Q  N  T  W  D  K  V  E  R  K  E  P  L  S  P  L  D
 901    CCCAGGTGCT GACCAGCGAG ATCCAGAGAA TCCTGGACTA CAGCCTGTGC CAGAACACCT GGGACAAGGT GGAGCGGAAA GAGCCCCTGA GCCCCCTGGA
        GGGTCCACGA CTGGTCGCTC TAGGTCTCTT AGGACCTGAT GTCGGACACG GTCTTGTGGA CCCTGTTCCA CCTCGCCTTT CTCGGGGACT CGGGGGACCT

        L  S  Y  L  A  S  K  S  P  G  K  G  L  A  Y  T  V  I  N  G  T  L  S  F  A  H  T  R  Y  V  R  M  W
 1001   CCTGAGCTAC CTGGCCAGCA AGTCCCCCGG CAAGGGCCTG GCCTACACCG TGATCAACGG CACCCTGAGC TTCGCCCACA CCAGATACGT GCGGATGTGG
        GGACTCGATG GACCGGTCGT TCAGGGGGCC GTTCCCGGAC CGGATGTGGC ACTAGTTGCC GTGGGACTCG AAGCGGGTGT GGTCTATGCA CGCCTACACC

        I  D  G  P  V  L  K  E  P  K  G  K  R  E  S  P  S  G  I  S  S  D  I  W  T  Q  W  F  K  Y  G  D  M  E
 1101   ATCGACGGCC CCGTGCTGAA AGAGCCCAAG GGCAAGAGAG AGAGCCCCAG CGGCATCAGC AGCGACATCT GGACCCAGTG GTTCAAGTAC GGCGACATGG
        TAGCTGCCGG GGCACGACTT TCTCGGGTTC CCGTTCTCTC TCTCGGGGTC GCCGTAGTCG TCGCTGTAGA CCTGGGTCAC CAAGTTCATG CCGCTGTACC

        I  G  P  N  G  L  L  K  T  A  G  G  Y  K  F  P  W  H  L  I  G  M  G  I  V  D  N  E  L  H  E  L  S
 1201   AATCGGCCC CAACGGCCTG CTGAAAACAG CCGGCGGATA CAAGTTTCCT TGGCACCTGA TCGGCATGGG CATCGTGGAC AACGAGCTGC ACGAGCTGTC
        TTTAGCCGGG GTTGCCGGAC GACTTTTGTC GGCCGCCTAT GTTCAAAGGA ACCGTGGACT AGCCGTACCC GTAGCACCTG TTGCTCGACG TGCTCGACAG

        E  A  N  F  L  D  K  P  Q  L  F  K  A  Q  S  I  A  D  D  S  E  E  I  F  F  G  D  T  G  V  S  K  N
 1301   CGAGGCCAAC CCCCTGGATC ACCCCCAGCT GCCCCAGCCC CAGAGCATTG CCGACGACAG CGAGGAAATC TTCTTCGGCG ACACCGGCGT GAGCAAGAAC
        GCTCCGGTTG GGGGACCTAG TGGGGGTCGA CGGGGTGCGG GTCTCGTAAC GGCTGCTGTC GCTCCTTTAG AAGAAGCCGC TGTGGCCGCA CTCGTTCTTG

        F  V  E  L  V  T  G  W  F  T  S  W  K  E  S  L  A  A  G  S  C  P  D  L  R  C  P  P  L  F  P  G  I  V
 1401   CCCGTGGAAC TGGTGACAGG CTGGTTCACC AGCTGGAAAG AGAGCCTGGC CGCCGGATCT TGCCCCGACC TGCGGTGCCC CCCTCTGTTC CCCGGCATCG
        GGGCACCTTG ACCACTGTCC GACCAAGTGG TCGACCTTTC TCTCGGACCG GCGGCCTAGA ACGGGGCTGG ACGCCACGGG GGGAGACAAG GGGCCGTAGC

        Y  Y  L  Q  K  A  Q  M  E  E  R  G  E  R  S  D  S  F  E  M  R  I  F  K  P  N  N  M  R  A  R  V  *
 1501   TGTACTACCT GCAGAAAGCC CAGATGGAAG AGCGGGCGA GCGGAGCGAC AGCTTCGAGA TGCGGATCTT CAAGCCCAAC AACATGCGGG CCAGAGTGTG
        ACATGATGGA CGTCTTTCGG GTCTACCTTC TCGCCCCGCT CGCCTCGCTG TCGAAGCTCT ACGCCTAGAA GTTCGGGTTG TTGTACGCCC GGTCTCACAC
            EcoRI
            -------
        . *
 1601   ATGAGAATTC TTAATTAA
        TACTCTTAAG AATTAATT
```

C.


EcoRI(1)
NotI(28)
XhoI(34)
WPREÆATG
XhoI(644)
XbaI(650)
BGH pA
KanR
NcoI(1644)
pUC ORI
NdeI(3146)
NcoI(3272)
CMV
NheI(3557)
HindIII(3573)
KpnI(3583)
BamHI(3591)
NcoI(3745)
BsEII(3863)
VSV.G Chandipura CO
BglII(4459)
pThV-VSV.G (CHANDI-CO)
5186bp

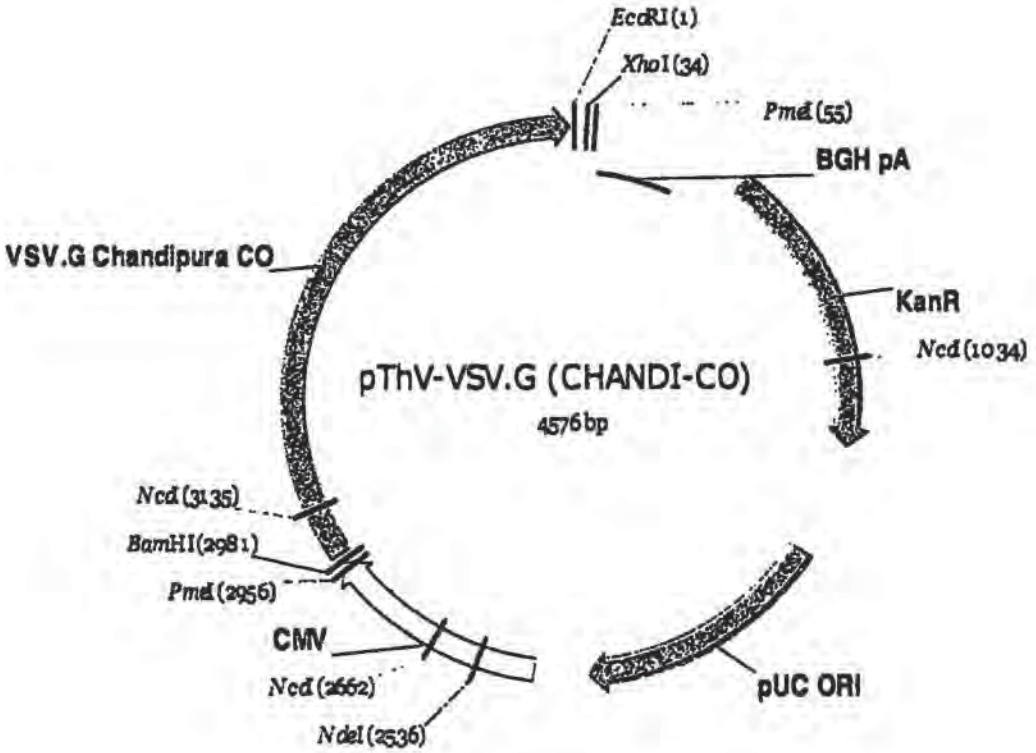
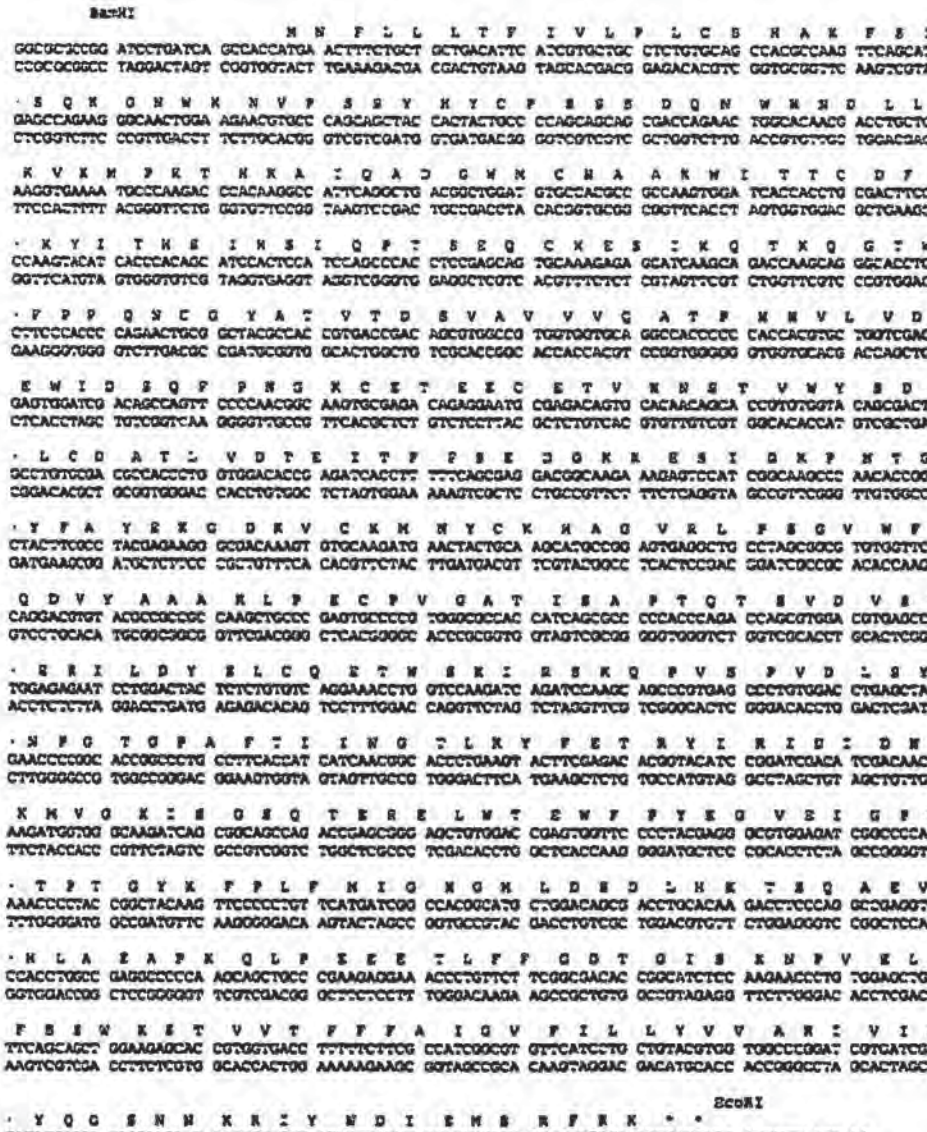

EcoRI(1)
XhoI(34)
PmeI(55)
BGH pA
KanR
NcoI(1034)
pUC ORI
NdeI(2536)
NcoI(2662)
CMV
PmeI(2956)
BamHI(2981)
NcoI(3135)
VSV.G Chandipura CO
pThV-VSV.G (CHANDI-CO)
4576bp

图8

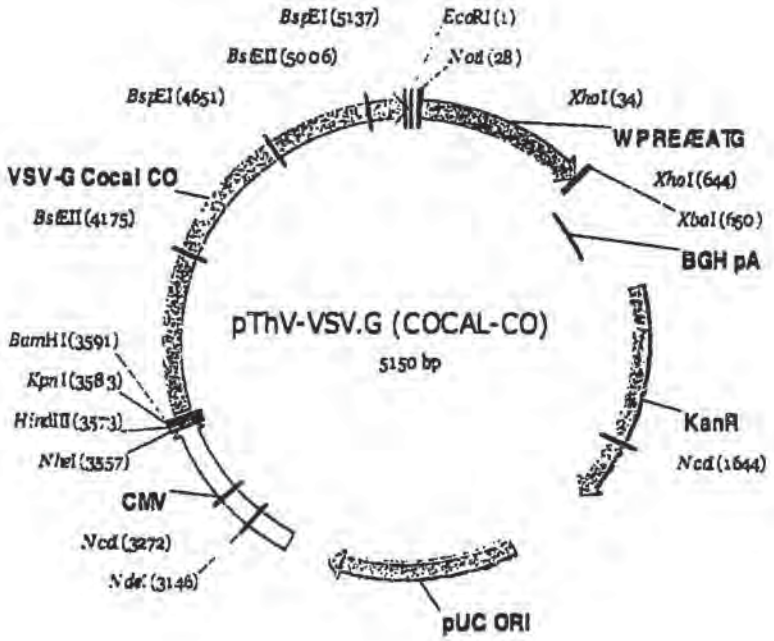
A.

MNFLLLTFIVLPLCSHAKFSIVFPQSQKGNWKNVPSSYHYCPSSSDQNWHNDLLGITMKVKMPKTHKAI
QADGWMCHAAKWITTCDFRWYGPKYITHSIHSIQPTSEQCKESIKQTKQGTWMSPGFPPQNCGYATVTD
SVAVVVQATPHHVLVDEYTGEWIDSQFPNGKCETEECETVHNSTVWYSDYKVTGLCDATLVDTEITFFS
EDGKKESIGKPNTGYRSNYFAYEKGDKVCKMNYCKHAGVRLPSGVWFEFVDQDVYAAAKLPECPVGATI
SAPTQTSVDVSLILDVERILDYSLCQETWSKIRSKQPVSPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFET
RYIRIDIDNPIISKMVGKISGSQTERELWTEWFPYEGVEIGPNGILKTPTGYKFPLFMIGHGMLDSDLH
KTSQAEVFEHPHLAEAPKQLPEEETLFFGDTGISKNPVELIEGWFSSWKSTVVTFFFAIGVFILLYVVA
RIVIAVRYRYQGSNNKRIYNDIEMSRFRK (GenBank # AF045556)

B.



C.


BspEI(5137)
EcoRI(1)
BsEII(5006)
NotI(28)
BspEI(4651)
XhoI(34)
WPREÆATG
VSV-G Cocal CO
XhoI(644)
BsEII(4175)
XbaI(650)
BGH pA
pThV-VSV.G (COCAL-CO)
5150 bp
BamHI(3591)
KpnI(3583)
HindIII(3573)
KanR
NheI(3557)
NcoI(1644)
CMV
NcoI(3272)
NdeI(3146)
pUC ORI

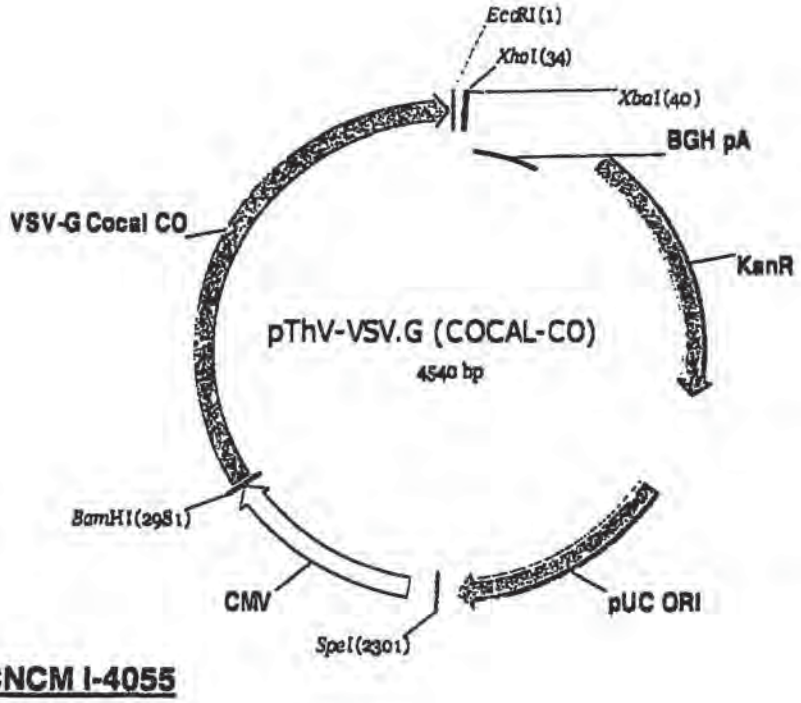

EcoRI(1)
XhoI(34)
XbaI(40)
BGH pA
VSV-G Cocal CO
KanR
pThV-VSV.G (COCAL-CO)
4540 bp
BamHI(2981)
CMV
pUC ORI
SpeI(2301)
CNCM I-4055

图9

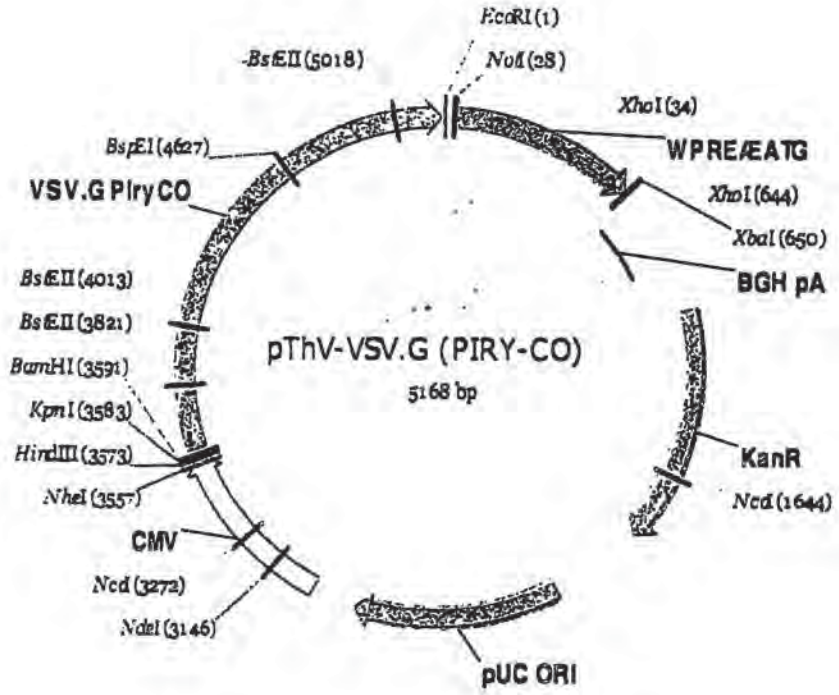
A.

MTDTVLGKFQIVFPDQNELEWTPVVGDSRHCPQSSEMQFDGSRSQTILTGKAPVGITPSKSDGFICHAA
KWVTTCDFRWYGPKYITHSIHHLRPTTSDCETALQRYKDGSLINLGFPPESCGYATVTDSEAMLVQVTP
HHVGVDDYRGHWIDPLFPGGECSTNFCDTVHNSSVWIPKSQKTDICAQSFKNIKMTASYPSEGALVSDR
FAFHSAYHPNMPGSTVCIMDFCEQKGLRFTNGEWMGLNVEQSIREKKISAIFPNCVAGTEIRATLESEG
ARTLTWETQRMLDYSLCQNTWDKVSRKEPLSPLDLSYLSPRAPGKGMAYTVINGTLHSAHAKYIRTWID
YGEMKEIKGGRGEYSKAPELLWSQWFDFGPFKIGPNGLLHTGKTFKFPLYLIGAGIIDEDLHELDEAAP
IDHPQMPDAKSVLPEDEEIFFGDTGVSKNPIELIQGWFSNWRESVMAIVGIVLLIVVTFLAIKTVRVLN
CLWRPRKKRIVRQEVDVESRLNHFEMRGFPEYVKR (GenBank # D26175)

B.

```
                BamHI
                                M  T  D  T  V  L  G  K  F  Q  I  V  F  P  D  Q  N  E  L  E  W  T  P  V  V
   1  GGCGCGCCGG ATCCTGATCA GCCACCATGA CCGATACAGT GCTGGGCAAG TTCCAGATCG TGTTCCCCGA CCAGAACGAG CTGGAATGGA CCCCCGTCGT
      CCGCGCGGCC TAGGACTAGT CGGTGGTACT GGCTATGTCA CGACCCGTTC AAGGTCTAGC ACAAGGGGCT GGTCTTGCTC GACCTTACCT GGGGGCAGCA
      G  D  S  R  H  C  P  Q  S  S  E  M  Q  F  D  G  S  R  S  Q  T  I  L  T  G  K  A  P  V  G  I  T  P
 101  GGGCGACAGC CGGCATTGCC CTCAGTCCAG CGAGATGCAG TTCGACGGCA GCAGAAGCCA GACCATCCTG ACCGGCAAGG CCCCCGTGGG CATCACACCC
      CCCGCTGTCG GCCGTAACGG GAGTCAGGTC GCTCTACGTC AAGCTGCCGT CGTCTTCGGT CTGGTAGGAC TGGCCGTTCC GGGGGCACCC GTAGTGTGGG

      S  K  S  D  G  F  I  C  H  A  A  K  W  V  T  T  C  D  F  R  W  Y  G  P  K  Y  I  T  H  S  I  H  H  L
 201  AGCAAGAGCG ACGGTTTCAT CTGCCACGCC GCCAAGTGGG TGACCACCTG CGACTTCCGG TGGTACGGCC CCAAGTACAT CACCCACAGC ATCCACCACC
      TCGTTCTCGC TGCCGAAGTA GACGGTGCGG CGGTTCACCC ACTGGTGGAC GCTGAAGGCC ACCATGCCGG GGTTCATGTA GTGGGTGTCG TAGGTGGTGG
      R  P  T  T  S  D  C  E  T  A  L  Q  R  Y  K  D  G  S  L  I  N  L  G  F  P  P  E  S  C  G  Y  A  T
 301  TGCGGCCCAC CACCTCCGAC TGCGAGACAG CCCTGCAGCG GTACAAGGAC GGCAGCCTGA TCAACCTGGG CTTCCCTCCC GAGAGCTGCG GCTACGCCAC
      ACGCCGGGTG GTGGAGGCTG ACGCTCTGTC GGGACGTCGC CATGTTCCTG CCGTCGGACT AGTTGGACCC GAAGGGAGGG CTCTCGACGC CGATGCGGTG

      V  T  D  S  E  A  M  L  V  Q  V  T  P  W  N  V  G  V  D  D  Y  R  G  H  W  I  D  P  L  F  P  G  G
 401  CGTGACAGAC AGCGAGGCCA TGCTGGTGCA GGTGACCCCC CACCACGTGG GCGTGGACGA CTACCGGGGC CACTGGATCG ACCCCCTGTT CCCTGGCGGC
      GCACTGTCTG TCGCTCCGGT ACGACCACGT CCACTGGGGG GTGGTGCACC CGCACCTGCT GATGGCCCCG GTGACCTAGC TGGGGGACAA GGGACCGCCG

      E  C  S  T  W  F  C  D  T  V  H  N  S  S  V  W  I  P  K  S  Q  K  T  D  I  C  A  Q  S  F  K  N  I  K
 501  GAGTGCAGCA CCAACTTCTG CGATACCGTG CACAACAGCA GCGTGTGGAT TCCCAAGAGC CAGAAAACCG ACATCTGCGC CCAGAGCTTC AAGAACATCA
      CTCACGTCGT GGTTAAAGAC GCTATGGCAC GTGTTGTCGT CGCACACCTA AGGGTTCTCG GTCTTTTGGC TGTAGACGCG GGTCTCGAAG TTCTTGTAGT

      M  T  A  M  Y  F  S  E  G  A  L  V  S  D  E  F  A  F  N  S  A  Y  H  P  N  M  P  G  S  T  V  C  I
 601  AGATGACCGC CAGCTACCCC AGCGAGGGAG CCCTGGTGTC CGACCGGTTC GCCTTCCACA GCGCCTACCA CCCCAACATG CCCGGCAGCA CCGTGTGCAT
      TCTACTGGCG GTCGATGGGG TCGCTCCCTC GGGACCACAG GCTGGCCAAG CGGAAGGTGT CGCGGATGGT GGGGTTGTAC GGGCCGTCGT GGCACACGTA

      M  D  F  C  E  Q  K  G  L  R  F  T  N  G  E  W  M  G  L  N  V  E  Q  S  I  R  E  K  K  I  S  A  I
 701  CATGGATTTC TGCGAGCAGA AGGGCCTGCG GTTCACCAAC GGCGAGTGGA TGGGCCTGAA CGTGGAGCAG AGCATCCGGG AGAAGAAGAT CAGCGCCATC
      GTACCTAAAG ACGCTCGTCT TCCCGGACGC CAAGTGGTTG CCGCTCACCT ACCCGGACTT GCACCTCGTC TCGTAGGCCC TCTTCTTCTA GTCGCGGTAG

      F  P  N  C  V  A  G  T  E  I  R  A  T  L  E  S  E  G  A  R  T  L  T  W  E  T  Q  R  M  L  D  Y  S  L
 801  TTCCCCAACT GCGTGGCCGG CACCGAGATC CGGGCCACCC TGGAATCCGA GGGCGCCAGG ACCCTGACCT GGGAGACACA GCGGATGCTG GACTACAGCC
      AAGGGGTTGA CGCACCGGCC GTGGCTCTAG GCCCGGTGGG ACCTTAGGCT CCCGCGGTCC TGGGACTGGA CCCTCTGTGT CGCCTACGAC CTGATGTCGG

      C  Q  N  T  W  D  K  V  S  R  K  E  P  L  S  P  L  D  L  S  Y  L  S  P  R  A  P  G  K  G  M  A  Y
 901  TGTGCCAGAA CACCTGGGAC AAGGTGTCCC GGAAAGAGCC TCTGTCCCCC CTGGACCTGA GCTACCTGAG CCCTAGAGCC CCTGGCAAGG GCATGGCCTA
      ACACGGTCTT GTGGACCCTG TTCCACAGGG CCTTTCTCGG AGACAGGGGG GACCTGGACT CGATGGACTC GGGATCTCGG GGACCGTTCC CGTACCGGAT

      T  V  I  N  G  T  L  H  S  A  H  A  K  Y  I  R  T  W  I  D  Y  G  E  M  K  E  I  K  G  G  R  G  E
1001  CACCGTGATC AACGGCACCC TGCACAGCGC CCACGCCAAG TATATCCGGA CCTGGATCGA CTACGGCGAG ATGAAAGAGA TCAAGGGCGG CAGGGGCGAG
      GTGGCACTAG TTGCCGTGGG ACGTGTCGCG GGTGCGGTTC ATATAGGCCT GGACCTAGCT GATGCCGCTC TACTTTCTCT AGTTCCCGCC GTCCCCGCTC

      Y  S  K  A  P  E  L  L  W  S  Q  W  F  D  F  G  P  F  K  I  G  P  N  G  L  L  H  T  G  K  T  F  K  F
1101  TACAGCAAGG CCCCTGAGCT GCTGTGGAGC CAGTGGTTCG ACTTCGGCCC CTTCAAGATC GGCCCCAACG GCCTGCTGCA CACCGGCAAG ACCTTCAAGT
      ATGTCGTTCC GGGGACTCGA CGACACCTCG GTCACCAAGC TGAAGCCGGG GAAGTTCTAG CCGGGGTTGC CGGACGACGT GTGGCCGTTC TGGAAGTTCA

      P  L  Y  L  I  G  A  G  I  I  D  E  D  L  H  E  L  D  E  A  A  P  I  D  H  P  Q  M  P  D  A  K  S
1201  TCCCTCTGTA TCTGATCGGA GCCGGCATCA TCGACGAGGA CCTGCACGAG CTGGACGAAG CCGCCCCTAT CGACCACCCC CAGATGCCCG ACGCCAAGAG
      AGGGAGACAT AGACTAGCCT CGGCCGTAGT AGCTGCTCCT GGACGTGCTC GACCTGCTTC GGCGGGGATA GCTGGTGGGG GTCTACGGGC TGCGGTTCTC

      V  L  P  E  D  E  E  I  F  F  G  D  T  G  V  S  K  N  P  I  E  L  I  Q  G  W  F  S  N  W  R  E  S
1301  CGTGCTGCCC GAGGACGAGG AAATCTTCTT CGGCGACACC GGCGTGAGCA AGAACCCCAT CGAGCTGATC CAGGGCTGGT TCAGCAACTG GCGGGAGAGC
      GCACGACGGG CTCCTGCTCC TTTAGAAGAA GCCGCTGTGG CCGCACTCGT TCTTGGGGTA GCTCGACTAG GTCCCGACCA AGTCGTTGAC CGCCCTCTCG

      V  M  A  I  V  G  I  V  L  L  I  V  V  T  F  L  A  I  K  T  V  R  V  L  N  C  L  W  R  P  R  K  K  R
1401  GTGATGGCCA TCGTGGGCAT CGTGCTGCTG ATCGTGGTGA CCTTCCTGGC CATCAAGACC GTGCGGGTGC TGAACTGCCT GTGGCGGCCC AGGAAGAAAC
      CACTACCGGT AGCACCCGTA GCACGACGAC TAGCACCACT GGAAGGACCG GTAGTTCTGG CACGCCCACG ACTTGACGGA CACCGCCGGG TCTTCTTTTG

                                                                                                EcoRI
      I  V  R  Q  E  V  D  V  E  S  R  L  N  H  F  E  M  R  G  F  P  E  Y  V  K  R  *  *
1501  GGATCGTCCG GCAGGAAGTG GACGTCGAGA GCCGCCTGAA CCACTTCGAG ATGAGAGGCT TCCCCGAGTA CGTGAAGCGG TGATGAGAAT TCTTAATTAA
      CCTAGCAGGC CGTCCTTCAC CTGCAGCTCT CGGCGGACTT GGTGAAGCTC TACTCTCCGA AGGGGCTCAT GCACTTCGCC ACTACTCTTA AGAATTAATT
```

C.


EcoRI(1)
NotI(28)
BsEII(5018)
XhoI(34)
WPREÆATG
BspEI(4627)
VSV.G PIryCO
XhoI(644)
XbaI(650)
BGH pA
BsEII(4013)
BsEII(3821)
pThV-VSV.G (PIRY-CO)
5168 bp
BamHI(3591)
KpnI(3583)
HindIII(3573)
KanR
NheI(3557)
NcoI(1644)
CMV
NcoI(3272)
NdeI(3146)
pUC ORI

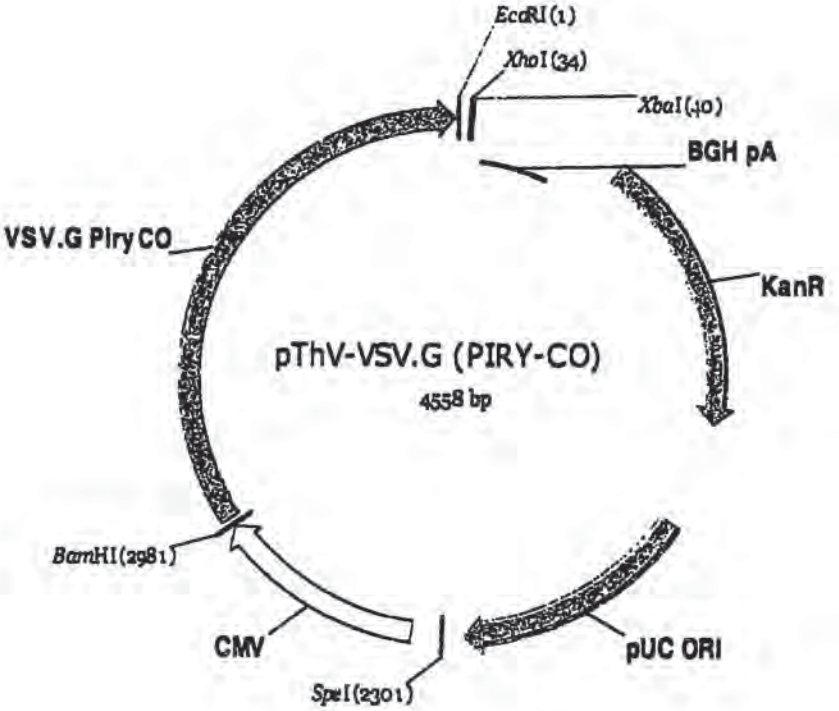
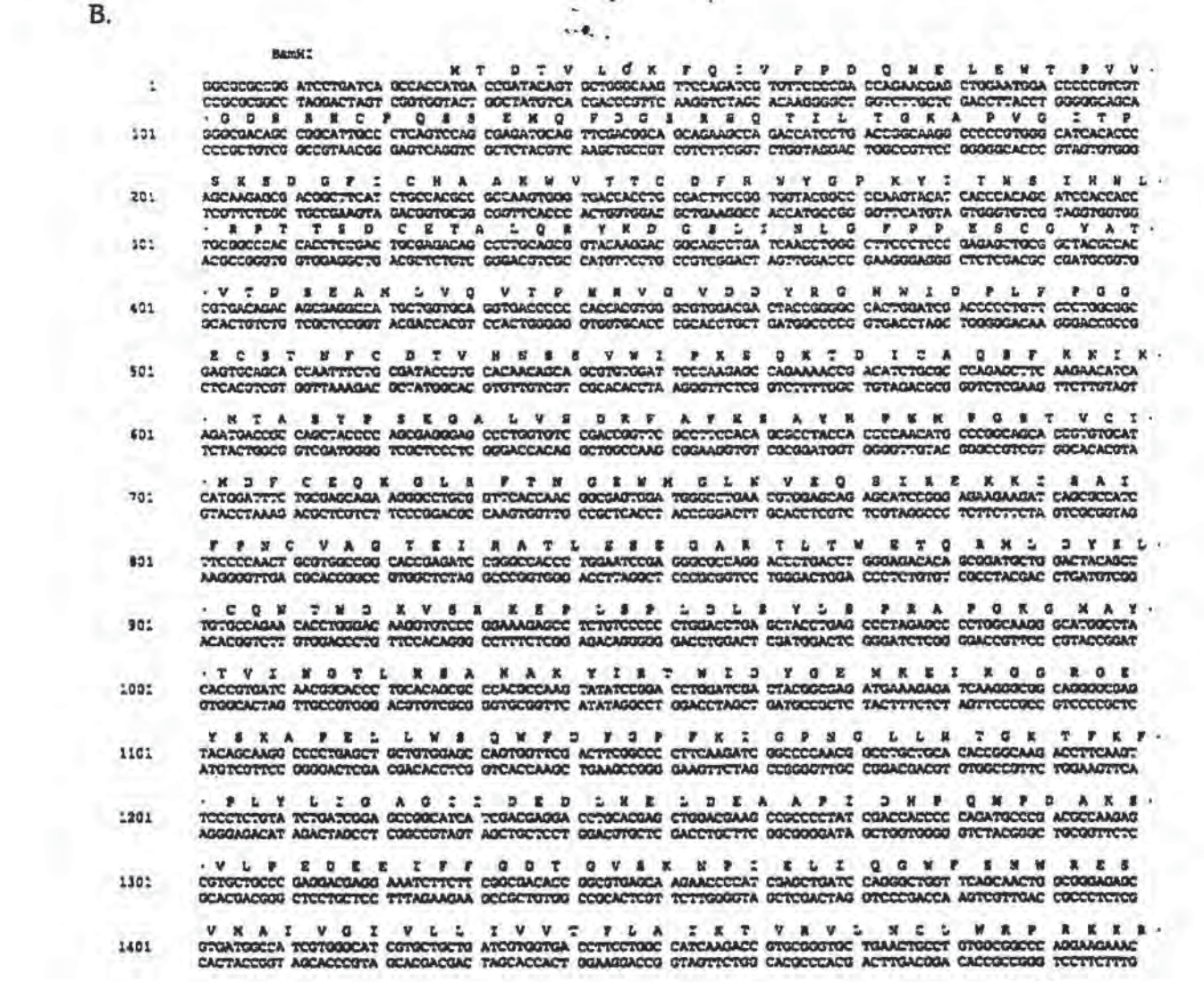

EcoRI(1)
XhoI(34)
XbaI(40)
BGH pA
VSV.G PIryCO
KanR
pThV-VSV.G (PIRY-CO)
4558 bp
BamHI(2981)
CMV
pUC ORI
SpeI(2301)

图10

A.

MTSVLFMVGVLLGAFGSTHCSIQIVFPSETKLVWKPVLKGTRYCPQSAELNLEPDLKTMAFDSKVPIG
ITPSNSDGYLCHAAKWVTTCDFRWYGPKYITHSVHSLRPTVSDCKAAVEAYNAGTLMYPGFPPESCGY
ASITDSEFYVMLVTPHPVGVDDYRGHWVDPLFPTSECNSNFCETVHNATMWIPKDLKTHDVCSQDFQT
IRVSVMYPQTKPTKGADLTLKSKFHAHMKGDRVCKMKFCNKNGLRLGNGEWIEVGDEVMLDNSKLLSL
FPDCLVGSVVKSTLLSEGVQTALWETDRLLDYSLCQNTWEKIDRKEPLSAVDLSYLAPRSPGKGMAYI
VANGSLMSAPARYIRVWIDSPILKEIKGKKESASGIDTVLWEQWLPFNGMELGPNGLIKTKSGYKFPL
YLLGMGIVDQDLQELSSVNPVDHPHVPIAQAFVSEGEEVFFGDTG11VSKNPIELISGWFSDWKETAA
ALGFAAISVILIIGLMRLLPLLCRRRKQKKVIYKDVELNSFDPRQAFHR (genBank # AJ810084)

B.



C.

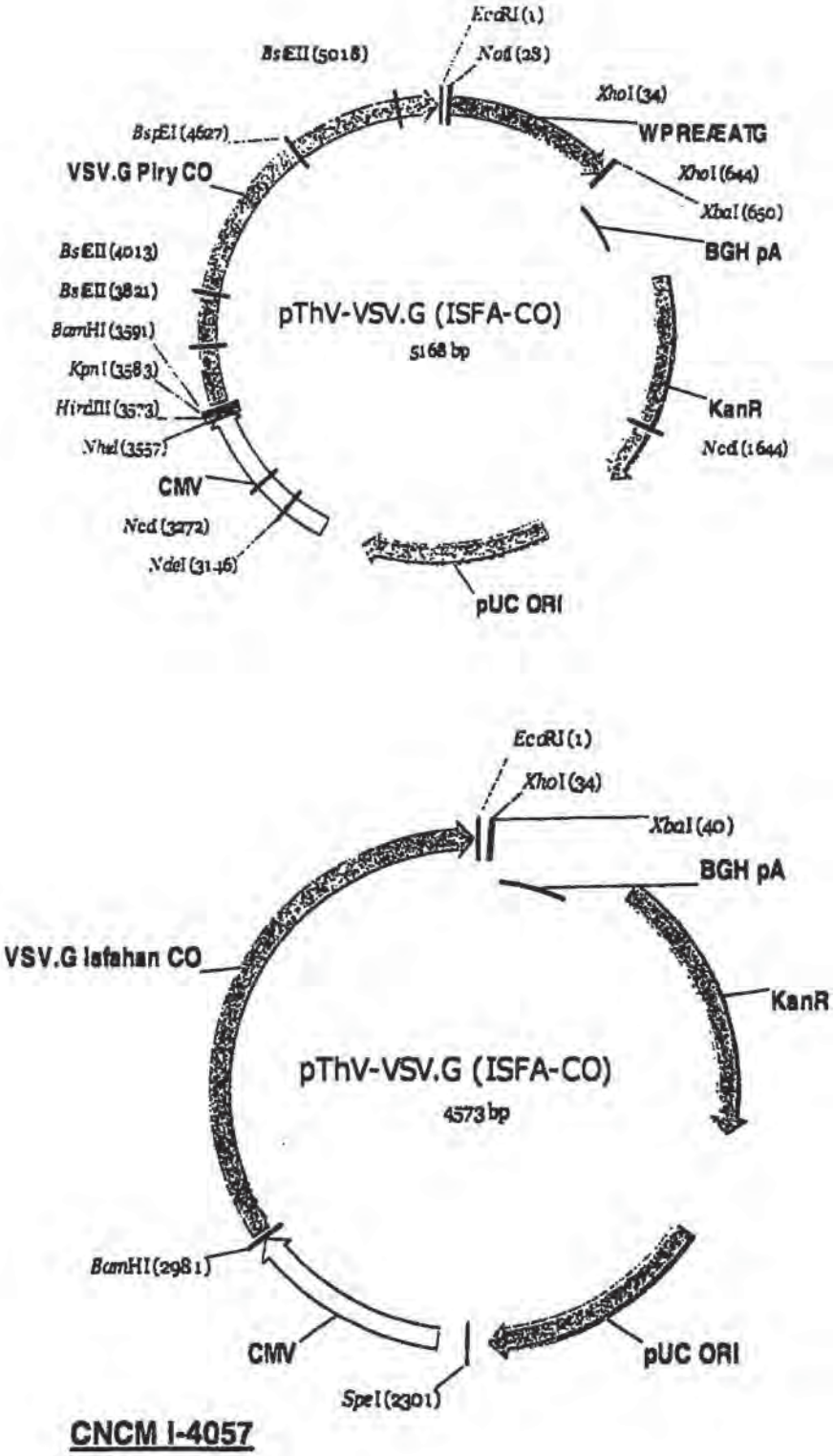
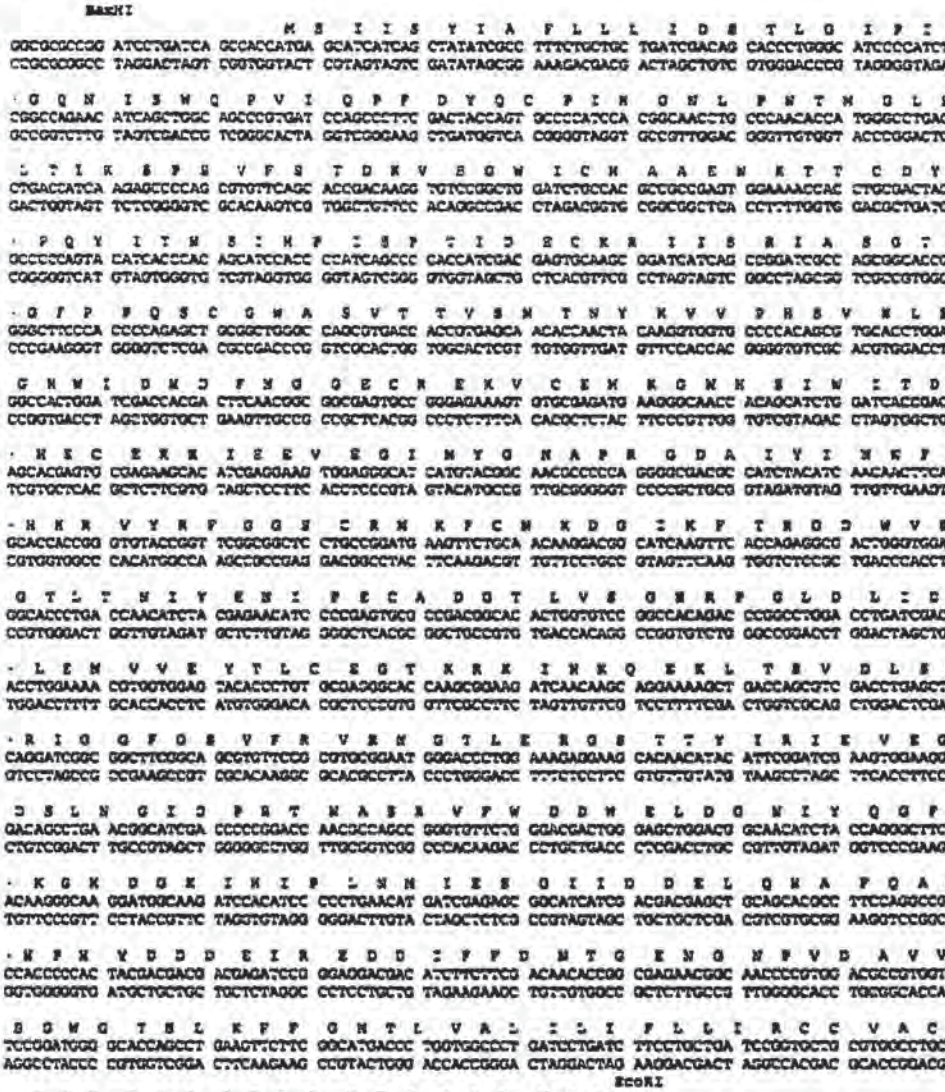

EcoRI(1)
NotI(28)
BsEII(5018)
XhoI(34)
WPREÆATG
BspEI(4627)
VSV.G Piry CO
XhoI(644)
XbaI(650)
BGH pA
BsEII(4013)
BsEII(3821)
BamHI(3591)
pThV-VSV.G (ISFA-CO)
5168 bp
KpnI(3583)
HindIII(3573)
KanR
NheI(3557)
NcoI(1644)
CMV
NcoI(3272)
NdeI(3146)
pUC ORI
EcoRI(1)
XhoI(34)
XbaI(40)
BGH pA
VSV.G Isfahan CO
KanR
pThV-VSV.G (ISFA-CO)
4573 bp
BamHI(2981)
CMV
pUC ORI
SpeI(2301)
CNCM I-4057

图11

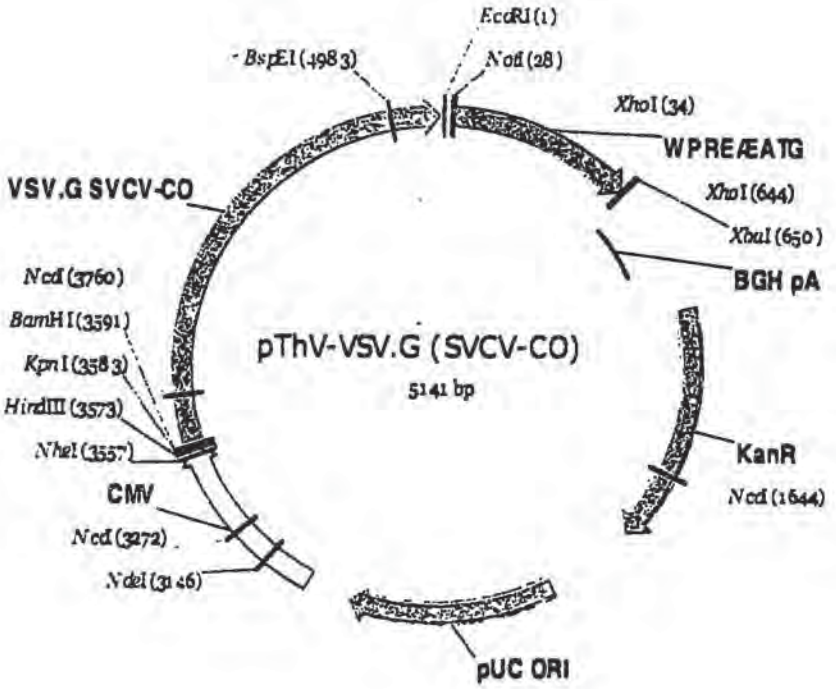
A.

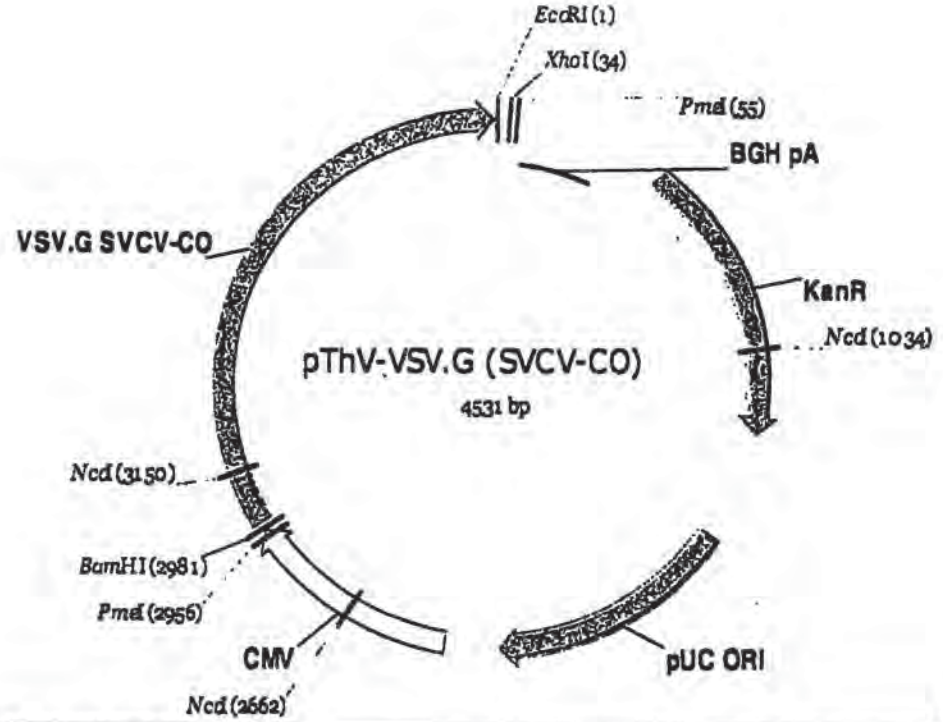
MSIISYIAFLLLIDSTLGIPIFVPSGQNISWQPVIQPFDYQCPIHGNLPNTMGLSATKLTIKSPSVFSTDKVSGW
ICHAAEWKTTCDYRWYGPQYITHSIHPISPTIDECKRIISRIASGTDEDLGFPPQSCGWASVTTVSNTNYKVVPH
SVHLEPYGGHWIDHDFNGGECREKVCEMKGNHSIWITDETVQHECEKHIEEVEGIMYGNAPRGDAIYINNFIIDK
HHRVYRFGGSCRMKFCNKDGIKFTRGDWVEKTAGTLTNIYENIPECADGTLVSGHRPGLDLIDTVFNLENVVEYT
LCEGTKRKINKQEKLTSVDLSYLAPRIGGFGSVFRVRNGTLERGSTTYIRIEVEGPVVDSLNGIDPRTNASRVFW
DDWELDGNIYQGFNGVYKGKDGKIHIPLNMIESGIIDDELQHAFQADIIPHPHYDDDEIREDDIFFDNTGENGNP
VDAVVEWVSGWGTSLKFFGMTLVALILIFLLIRCCVACTYLMKKSKRPATESHEMRSLV　　(GenBank
#AAZ20272)

B.



C.





CNCM I-4059

图12

1- Indiana PCR 片段

VSV-$G_{Indiana}$ 序列(优化密码子)

BamH1

5'CTCGGATCCTGATCAGCCACCATGAAATGCCTGCTCTATCTGGCCTTCCTCTTTATCGGCGTGAACTGTAAGTTCACGATC
GTGTTTCCCCACAATCAGAAGGGAAACTGGAAGAACGTCCCGAGCAACTACCACTACTGCCCTAGCTCAAGCGACCTGAACTG
GCACAACGACCTGATCGGCACCGCTATCCAGGTGAAGATGCCAAAGAGCCACAAGGCCATCCAAGCCGACGGCTGGATGTGTC
ACGCCAGCAAATGGGTGACGACGTGCGATTTTCGCTGGTATGGCCCCAAGTACATCACCCAATCAATCCGCTCATTTACACCC
AGCGTGGAGCAATGTAAGGAGAGCATCGAGCAGACCAAGCAGGGGACCTGGCTCAACCCCGGCTTCCCACCGCAAAGCTGCGG
ATACGCCACCGTGACCGACGCTGAGGCCGTCATCGTGCAGGTGACCCCGCACCACGTGCTGGTGGACGAGTACACCGGCGAGT
GGGTGGATTCACAGTTTATCAACGGAAAGTGTAGCAATTACATCTGCCCCACCGTGCACAACAGCACCACCTGGCACTCAGAC
TATAAGGTGAAGGGCCTCTGCGACAGCAATCTGATCTCAATGGACATCACCTTCTTTAGCGAAGACGGCGAACTCTCAAGCCT
CGGGAAGGAAGGCACCGGGTTCCGCAGCAATTACTTTGCTTACGAAACCGGCGGCAAGGCCTGCAAGATGCAATACTGCAAGC
ACTGGGGCGTGCGCCTGCCAAGCGGCGTGTGGTTTGAGATGGCTGATAAGGACCTGTTCGCCGCTGCCCGCTTCCCGGAATGC
CCCGAGGGGAGCAGCATCAGCGCCCCCAGCCAGACATCAGTGGACGTGAGCCTGATCCAGGATGTGGAACGCATCCTGGACTA
CAGCCTGTGTCAGGAAACGTGGAGCAAGATCCGCGCCGGACTGCCTATCAGCCCCGTGGATCTCAGCTACCTGGCCCCAAAGA
ACCCAGGCACCGGACCCGCCTTTACAATCATCAACGGCACCCTGAAGTACTTTGAAACACGCTACATCCGCGTCGACATCGCC
GCTCCCATCCTCTCACGCATGGTGGGCATGATCTCAGGGACGACCACGGAGCGCGAGCTGTGGGATGACTGGGCCCCGTATGA
AGATGTGGAGATCGGACCTAACGGCGTGCTGCGCACATCAAGCGGGTACAAGTTCCCGCTGTACATGATCGGCCACGGCATGC
TGGACAGCGACCTGCACCTCAGCTCAAAGGCCCAGGTCTTTGAGCACCCACACATCCAGGACGCTGCCAGCCAGCTCCCCGAC
GACGAAAGCCTGTTCTTTGGAGATACAGGGCTCAGCAAGAACCCCATCGAGCTGGTCGAGGGCTGGTTCTCAAGCTGGAAGAG
CAGCATCGCTTCATTTTTTTTCATCATCGGCCTCATCATCGGGCTGTTTCTGGTGCTGCGCGTCGGCATCCACCTGTGCATCA
AGCTGAAGCACACCAAGAAGCGCCAGATCTATACCGACATCGAGATGAATCGCCTGGGGAAGTAAGAATTCTGCAGATATCCA
GCA-3'

EcoR1

寡核苷酸 Indiana

- 1 (5'-AGCAGCATCGCTTCATTTTTTTTCATCATCGG-3')
- 2 (5'-GCTGGATATCTGCAGAATTCTTACTTCCCCAGGCG-3')

PCR 片段 (160bp):

Indiana 跨膜结构域

5'AGCAGCATCGCTTCATTTTTTTTCATCATCGGCCTCATCATCGGGCTGTTTCTGGTGCTGCGCGTCGGCATCCACCTGTGC
ATCAAGCTGAAGCACACCAAGAAGCGCCAGATCTATACCGACATCGAGATGAATCGCCTGGGGAAGTAAGAATTCTGCA3'

2. NewJersey PCR 片段

VSV-$G_{NewJersey}$ 序列(优化密码子)

BamH1

5'TACCGAGCTCGGATCCTGATCAGCCACCATGCTGTCATATCTGATCTTTGCCCTGGCTGTGAGCCCAATCCTCGGAAAGAT
CGAAATCGTGTTCCCACAACACACCACAGGGGACTGGAAGCGCGTGCCCCACGAGTACAACTACTGCCCGACCTCAGCCGACA
AGAATAGCCACGGCACGCAGACCGGCATCCCTGTGGAGCTGACCATGCCCAAGGGGCTCACAACGCACCAAGTCGAAGGCTTC
ATGTGCCACAGCGCTCTCTGGATGACAACCTGCGATTTTCGCTGGTATGGCCCCAAGTACATCACGCACAGCATCCACAATGA
GGAACCAACCGACTACCAGTGCCTCGAAGCCATCAAGTCATACAAGGATGGGGTGAGCTTCAACCCCGGCTTCCCGCCCCAAT
CATGTGGCTACGGCACCGTGACCGACGCCGAGGCCCACATCGTGACCGTGACACCCCACTCAGTCAAGGTGGACGAGTACACA
GGCGAATGGATCGACCCCCACTTCATCGGGGGCCGCTGTAAGGGCCAAATCTGCGAGACCGTGCACAACAGCACCAAGTGGTT
TACGTCATCAGACGGCGAAAGCGTGTGCAGCCAACTGTTTACGCTCGTGGGCGGCATCTTCTTTAGCGACAGCGAGGAGATCA
CCAGCATGGGCCTCCCGGAGACAGGAATCCGCAGCAACTACTTTCCGTACATCAGCACCGAGGGAATCTGTAAGATGCCTTTT
TGCCGCAAGCAGGGATATAAGCTGAAGAATGACCTGTGGTTCCAGATCATGGACCCGGACCTGGACAAGACCGTCCGCGATCT
GCCCCACATCAAGGACTGTGATCTGTCATCAAGCATCATCACCCCCGGAGAACACGCCACGGACATCAGCCTCATCAGCGATG
TGGAGCGCATCCTCGACTACGCTCTCTGCCAGAACACATGGAGCAAGATCGAAAGCGGCGAACCCATCACCCCAGTGGACCTG
AGCTATCTCGGCCCAAAGAACCCCGGCGTGGGGCCCGTGTTCACCATCATCAACGGGAGCCTGCACTACTTTACAAGCAAGTA
TCTGCGCGTGGAGCTCGAAAGCCCAGTCATCCCCCGCATGGAGGGGAAGGTGGCCGGGACCCGCATCGTGCGCCAGCTGTGGG
ACCAGTGGTTCCCTTTTGGCGAGGTGGAAATCGGCCCCAACGGCGTGCTGAAGACCAAGCAAGGATATAAGTTCCCGCTGCAC
ATCATCGGGACGGGCGAAGTGGACAGCGATATCAAGATGGAGCGCGTGGTCAAGCACTGGGAGCACCCACACATCGAGGCTGC
TCAGACCTTTCTCAAGAAGGACGATACCGGCGAAGTCCTGTATTACGGGGATACGGGAGTGAGCAAGAACCCTGTGGAGCTGG
TGGAAGGCTGGTTCAGCGGATGGCGCTCAAGCCTGATGGGCGTGCTGGCCGTCATCATCGGATTTGTGATCCTGATGTTCCTC
ATCAAGCTGATCGGCGTGCTGTCAAGCCTGTTCCGCCCTAAGCGCCGCCCAATCTACAAGAGCGACGTCGAGATGGCCCACTT
TCGCTAAGAATTCTGCAGATAT-3'

EcoR1

图13A

寡核苷酸NewJersey：

- 3 (5'-CGAGCTCGGATCCTGATCAGCCACCATGCTGTC-3')
- 4 (5'-**GAAAAAAAATGAAGCGATGCTGCT**GCGCCATCCGCTGAACCAGCCTTCCAC-3').

oligo 4的粗体和加下划线部分对应前28个Indiana跨膜结构域核苷酸

PCR NewJersey (1446bp):

```
          BamH1
5'CGAGCTCGGATCCTGATCAGCCACCATGCTGTCATATCTGATCTTTGCCCTGGCTGTGAGCCCAATCCTCGGAAAGATCGA
AATCGTGTTCCCACAACACACCACAGGGGACTGGAAGCGCGTGCCCCACGAGTACAACTACTGCCCGACCTCAGCCGACAAGA
ATAGCCACGGCACGCAGACCGGCATCCCTGTGGAGCTGACCATGCCCAAGGGGCTCACAACGCACCAAGTCGAAGGCTTCATG
TGCCACAGCGCTCTCTGGATGACAACCTGCGATTTTCGCTGGTATGGCCCCAAGTACATCACGCACAGCATCCACAATGAGGA
ACCAACCGACTACCAGTGCCTCGAAGCCATCAAGTCATACAAGGATGGGGTGAGCTTCAACCCCGGCTTCCCGCCCCAATCAT
GTGGCTACGGCACCGTGACCGACGCCGAGGCCCACATCGTGACCGTGACACCCCACTCAGTCAAGGTGGACGAGTACACAGGC
GAATGGATCGACCCCCACTTCATCGGGGGCCGCTGTAAGGGCCAAATCTGCGAGACCGTGCACAACAGCACCAAGTGGTTTAC
GTCATCAGACGGCGAAAGCGTGTGCAGCCAACTGTTTACGCTCGTGGGCGGCATCTTCTTTAGCGACAGCGAGGAGATCACCA
GCATGGGCCTCCCGGAGACAGGAATCCGCAGCAACTACTTTCCGTACATCAGCACCGAGGGAATCTGTAAGATGCCTTTTTGC
CGCAAGCAGGGATATAAGCTGAAGAATGACCTGTGGTTCCAGATCATGGACCCGGACCTGGACAAGACCGTCCGCGATCTGCC
CCACATCAAGGACTGTGATCTGTCATCAAGCATCATCACCCCCGGAGAACACGCCACGGACATCAGCCTCATCAGCGATGTGG
AGCGCATCCTCGACTACGCTCTCTGCCAGAACACATGGAGCAAGATCGAAAGCGGCGAACCCATCACCCCAGTGGACCTGAGC
TATCTCGGCCCAAAGAACCCCGGCGTGGGGCCCGTGTTCACCATCATCAACGGGAGCCTGCACTACTTTACAAGCAAGTATCT
GCGCGTGGAGCTCGAAAGCCCAGTCATCCCCCGCATGGAGGGGAAGGTGGCCGGGACCCGCATCGTGCGCCAGCTGTGGGACC
AGTGGTTCCCTTTTGGCGAGGTGGAAATCGGCCCCAACGGCGTGCTGAAGACCAAGCAAGGATATAAGTTCCCGCTGCACATC
ATCGGGACGGGCGAAGTGGACAGCGATATCAAGATGGAGCGCGTGGTCAAGCACTGGGAGCACCCACACATCGAGGCTGCTCA
GACCTTTCTCAAGAAGGACGATACCGGCGAAGTCCTGTATTACGGGGATACGGGAGTGAGCAAGAACCCTGTGGAGCTGGTGG
AAGGCTGGTTCAGCGGATGGCGCAGCAGCATCGCTTCATTTTTTTTC-3'
                        Indiana 跨膜结构域
```

3. 重叠 PCR (1620bp)

利用寡核苷酸2和3进行的PCR

```
        OLIGO 3
          BamH1
5'GAGCTCGGATCCTGATCAGCCACCATGCTGTCATATCTGATCTTTGCCCTGGCTGTGAGCCCAATCCTCGGAAAGATCGAA
ATCGTGTTCCCACAACACACCACAGGGGACTGGAAGCGCGTGCCCCACGAGTACAACTACTGCCCGACCTCAGCCGACAAGAA
TAGCCACGGCACGCAGACCGGCATCCCTGTGGAGCTGACCATGCCCAAGGGGCTCACAACGCACCAAGTCGAAGGCTTCATGT
GCCACAGCGCTCTCTGGATGACAACCTGCGATTTTCGCTGGTATGGCCCCAAGTACATCACGCACAGCATCCACAATGAGGAA
CCAACCGACTACCAGTGCCTCGAAGCCATCAAGTCATACAAGGATGGGGTGAGCTTCAACCCCGGCTTCCCGCCCCAATCATG
TGGCTACGGCACCGTGACCGACGCCGAGGCCCACATCGTGACCGTGACACCCCACTCAGTCAAGGTGGACGAGTACACAGGCG
AATGGATCGACCCCCACTTCATCGGGGGCCGCTGTAAGGGCCAAATCTGCGAGACCGTGCACAACAGCACCAAGTGGTTTACG
TCATCAGACGGCGAAAGCGTGTGCAGCCAACTGTTTACGCTCGTGGGCGGCATCTTCTTTAGCGACAGCGAGGAGATCACCAG
CATGGGCCTCCCGGAGACAGGAATCCGCAGCAACTACTTTCCGTACATCAGCACCGAGGGAATCTGTAAGATGCCTTTTTGCC
GCAAGCAGGGATATAAGCTGAAGAATGACCTGTGGTTCCAGATCATGGACCCGGACCTGGACAAGACCGTCCGCGATCTGCCC
CACATCAAGGACTGTGATCTGTCATCAAGCATCATCACCCCCGGAGAACACGCCACGGACATCAGCCTCATCAGCGATGTGGA
GCGCATCCTCGACTACGCTCTCTGCCAGAACACATGGAGCAAGATCGAAAGCGGCGAACCCATCACCCCAGTGGACCTGAGCT
ATCTCGGCCCAAAGAACCCCGGCGTGGGGCCCGTGTTCACCATCATCAACGGGAGCCTGCACTACTTTACAAGCAAGTATCTG
CGCGTGGAGCTCGAAAGCCCAGTCATCCCCCGCATGGAGGGGAAGGTGGCCGGGACCCGCATCGTGCGCCAGCTGTGGGACCA
GTGGTTCCCTTTTGGCGAGGTGGAAATCGGCCCCAACGGCGTGCTGAAGACCAAGCAAGGATATAAGTTCCCGCTGCACATCA
TCGGGACGGGCGAAGTGGACAGCGATATCAAGATGGAGCGCGTGGTCAAGCACTGGGAGCACCCACACATCGAGGCTGCTCAG
ACCTTTCTCAAGAAGGACGATACCGGCGAAGTCCTGTATTACGGGGATACGGGAGTGAGCAAGAACCCTGTGGAGCTGGTGGA
AGGCTGGTTCAGCGGATGGCGCAGCAGCATCGCTTCATTTTTTTTC
                       AGCAGCATCGCTTCATTTTTTTTCATCATCGGCCTCATCATCGGGCTGTTTCTGGTGCTG
CGCGTCGGCATCCACCTGTGCATCAAGCTGAAGCACACCAAGAAGCGCCAGATCTATACCGACATCGAGATGAATCGCCTGGG
GAAGTAAGAATTGTGCA-3'
        EcoR1
OLIGO 2
```

图13B

A

```
        M  T  S  S  V  T  I  S  V  V  L  L  I  S  F  I  T  P  L  Y  S  Y  L  S  I  A  F  P  E  N  T
3601    ATG ACCAGCAGCG TGACCATCAG CGTGGTGCTG CTGATCAGCT TCATCACCCC CCTGTACAGC TACCTGAGCA TTGCCTTCCC CGAGAACACC
        TAC TGGTCGTCGC ACTGGTAGTC GCACCACGAC GACTAGTCGA AGTAGTGGGG GGACATGTCG ATGGACTCGT AACGGAAGGG GCTCTTGTGG

     K  L  D  W  K  P  V  T  K  N  T  R  Y  C  P  M  G  G  E  W  F  L  E  P  G  L  Q  E  E  S  F  L  S  S -
3701 AAGCTGGACT GGAAGCCCGT GACCAAGAAC ACCCGGTACT GCCCCATGGG CGGCGAGTGG TTTCTGGAAC CCGGCCTGCA GGAAGAGAGC TTCCTGAGCA
     TTCGACCTGA CCTTCGGGCA CTGGTTCTTG TGGGCCATGA CGGGGTACCC GCCGCTCACC AAAGACCTTG GGCCGGACGT CCTTCTCTCG AAGGACTCGT

     - T  P  I  G  A  T  P  S  K  S  D  G  F  L  C  H  A  A  K  W  V  T  T  C  D  F  R  W  Y  G  P  K  Y -
3801 GCACCCCCAT CGGCGCCACC CCCAGCAAGA GCGACGGCTT CCTGTGCCAC GCCGCCAAGT GGGTGACCAC CTGCGACTTC CGGTGGTACG GCCCCAAGTA
     CGTGGGGGTA GCCGCGGTGG GGGTCGTTCT CGCTGCCGAA GGACACGGTG CGGCGGTTCA CCCACTGGTG GACGCTGAAG GCCACCATGC CGGGGTTCAT

     - I  T  H  S  I  H  N  I  K  P  T  R  S  D  C  D  T  A  L  A  S  Y  K  S  G  T  L  V  S  L  G  F  P
3901 CATCACCCAC AGCATCCACA ACATCAAGCC CACCAGAAGC GACTGCGACA CAGCCCTGGC CTCTTACAAG AGCGGCACCC TGGTGTCCCT GGGCTTCCCT
     GTAGTGGGTG TCGTAGGTGT TGTAGTTCGG GTGGTCTTCG CTGACGCTGT GTCGGGACCG GAGAATGTTC TCGCCGTGGG ACCACAGGGA CCCGAAGGGA

     P  E  S  C  G  Y  A  S  V  T  D  S  E  F  L  V  I  M  I  T  P  H  H  V  G  V  D  D  Y  R  G  H  W  V -
4001 CCCGAGAGCT GCGGCTACGC CAGCGTGACC GACAGCGAGT TCCTGGTGAT TATGATTACC CCCCACCACG TGGGCGTGGA CGACTACCGG GGCCACTGGG
     GGGCTCTCGA CGCCGATGCG GTCGCACTGG CTGTCGCTCA AGGACCACTA ATACTAATGG GGGGTGGTGC ACCCGCACCT GCTGATGGCC CCGGTGACCC

     - D  P  L  F  V  G  G  E  C  D  Q  S  Y  C  D  T  I  H  N  S  S  V  W  I  P  A  D  Q  T  K  K  N  I -
4101 TGGACCCTCT GTTCGTGGGA GGGGAATGCG ACCAGAGCTA CTGCGATACC ATCCACAACT CCAGCGTGTG GATTCCCGCC GACCAGACCA AGAAGAACAT
     ACCTGGGAGA CAAGCACCCT CCCCTTACGC TGGTCTCGAT GACGCTATGG TAGGTGTTGA GGTCGCACAC CTAAGGGCGG CTGGTCTGGT TCTTCTTGTA

     - C  G  Q  S  F  T  P  L  T  V  T  V  A  Y  D  K  T  K  E  I  A  A  G  G  I  V  F  K  S  K  Y  H  S
4201 CTGCGGCCAG AGCTTCACCC CTCTGACCGT GACCGTGGCC TACGACAAGA CCAAAGAGAT TGCCGCCGGA GGGATCGTGT TCAAGAGCAA GTACCACAGC
     GACGCCGGTC TCGAAGTGGG GAGACTGGCA CTGGCACCCG ATGCTGTTCT GGTTTCTCTA ACGCCGGCCT CCCTAGCACA AGTTCTCGTT CATGGTGTCG

     H  M  E  G  A  R  T  C  R  L  S  Y  C  G  R  N  G  I  K  F  P  N  G  E  W  V  S  L  M  L  K  L  R  S -
4301 CACATGGAAG GCGCCAGGAC CTGCAGACTG TCCTACTGCG GCCGGAACGG CATCAAGTTC CCCAACGGCG AGTGGGTGTC CCTGATGCTG AAGCTGCGGA
     GTGTACCTTC CGCGGTCCTG GACGTCTGAC AGGATGACGC CGGCCTTGCC GTAGTTCAAG GGGTTGCCGC TCACCCACAG GGACTACGAC TTCGACGCCT

     - K  R  N  L  Y  F  P  C  L  K  M  C  P  T  G  I  R  G  E  I  Y  P  S  I  R  W  A  Q  V  L  T  S  E -
4401 GCAAGCGGAA CCTGTACTTC CCCTGCCTGA AGATGTGCCC CACCGGCATC CGGGGCGAGA TCTACCCCAG CATCAGATGG GCCCAGGTGC TGACCAGCGA
     CGTTCGCCTT GGACATGAAG GGGACGGACT TCTACACGGG GTGGCCGTAG GCCCCGCTCT AGATGGGGTC GTAGTCTACC CGGGTCCACG ACTGGTCGCT
```

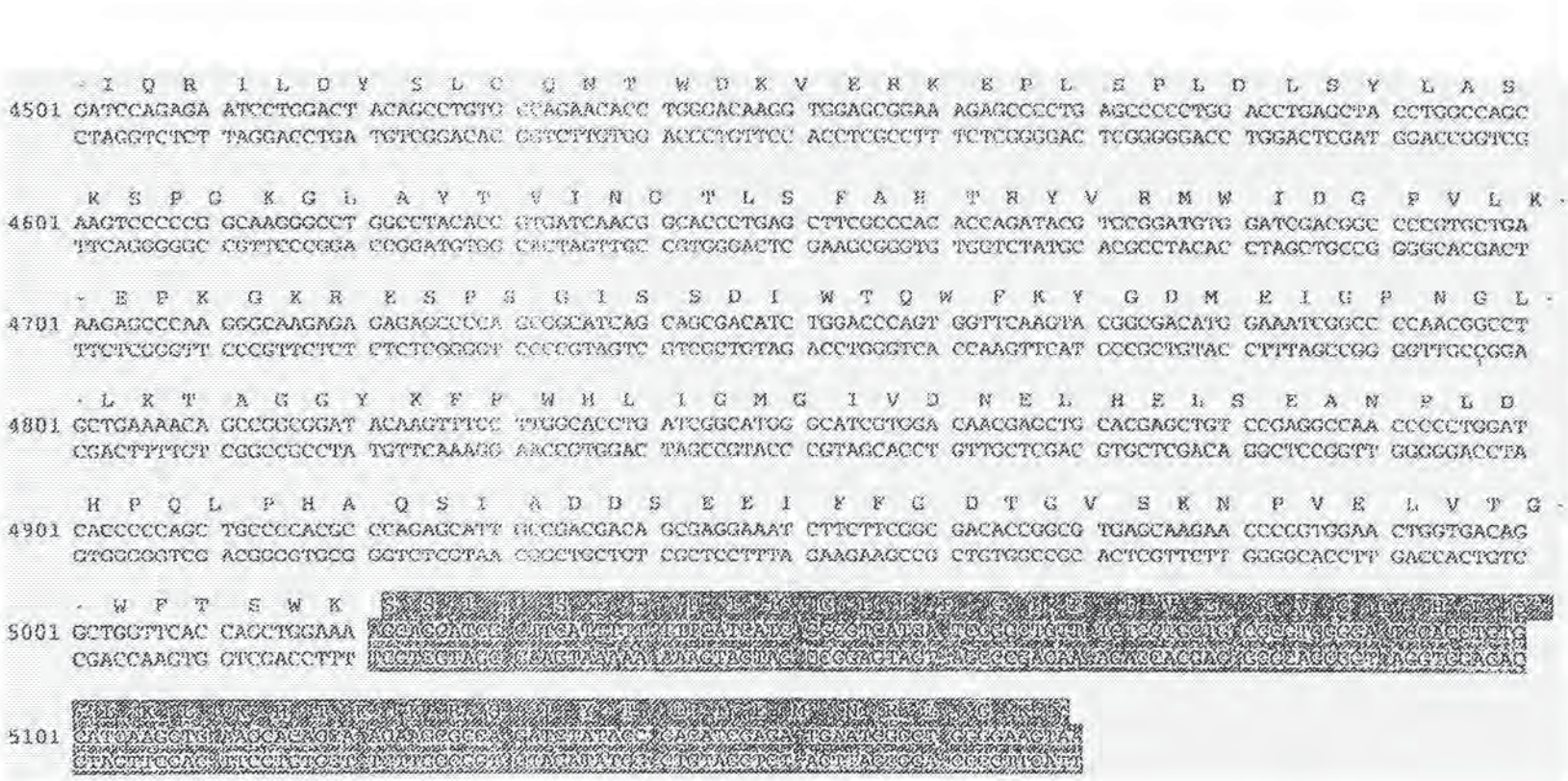
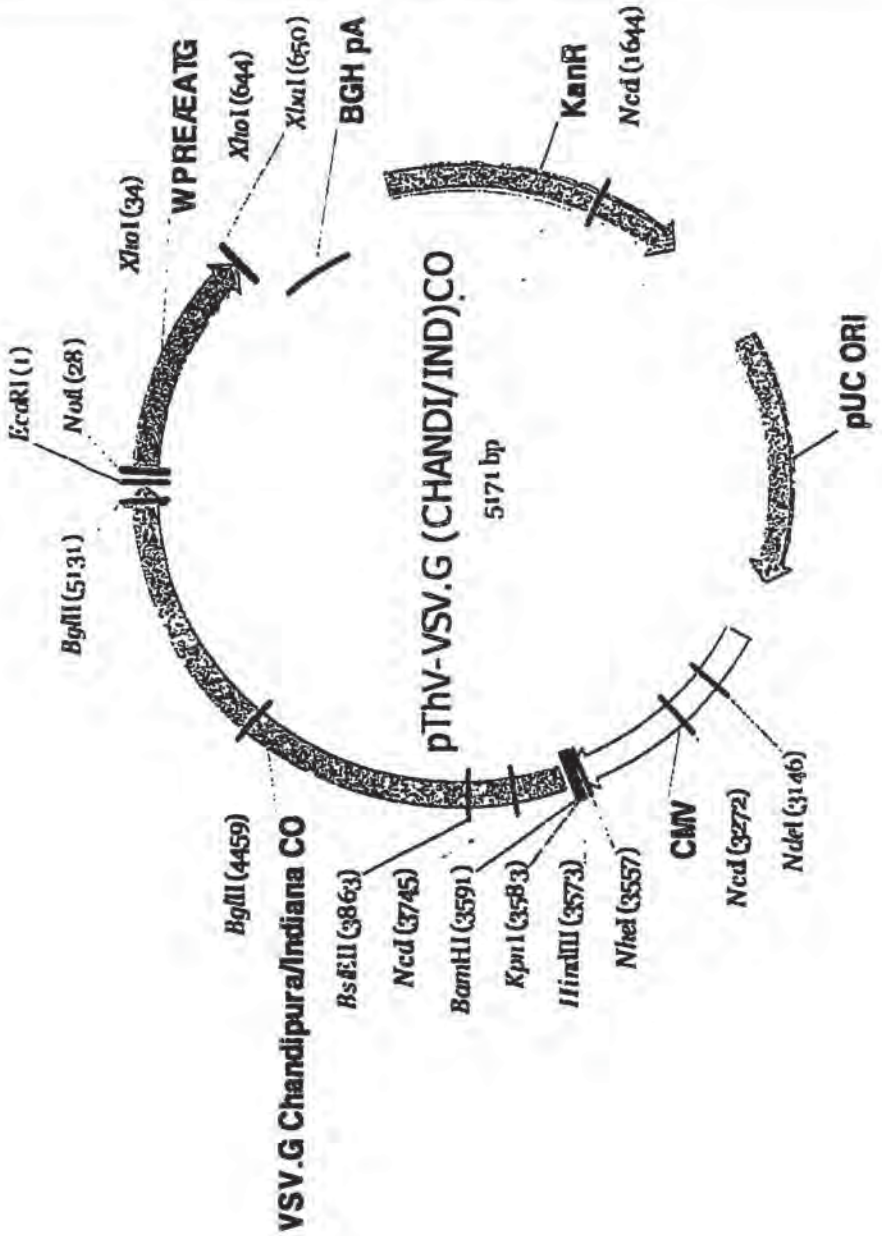

I Q R I L D Y S L C Q N T W D K V E R K E P L S P L D L S Y L A S
4501 GATCCAGAGA ATCCTGGACT ACAGCCTGTG CCAGAACACC TGGGACAAGG TGGAGCGGAA AGAGCCCCTG AGCCCCCTGG ACCTGAGCTA CCTGGCCAGC
K S P G K G L A Y T V I N C T L S F A H T R Y V R M W I D G P V L K
4601 AAGTCCCCCG GCAAGGGCCT GGCCTACACC GTGATCAACG GCACCCTGAG CTTCGCCCAC ACCAGATACG TGCGGATGTG GATCGACGGC CCCGTGCTGA
E P K G K R E S P S G I S S D I W T Q W F R Y G D M E I G P N G L
4701 AAGAGCCCAA GGGCAAGAGA GAGAGCCCCA GCGGCATCAG CAGCGACATC TGGACCCAGT GGTTCAAGTA CGGCGACATG GAAATCGGCC CCAACGGCCT
L K T A G G Y K F P W H L I G M G I V D N E L H E L S E A N P L D
4801 GCTGAAAACA GCCGGCGGAT ACAAGTTTCC TTGGCACCTG ATCGGCATGG GCATCGTGGA CAACGAGCTG CACGAGCTGT CCGAGGCCAA CCCCCTGGAT
H P Q L P H A Q S I A D D S E E I F F G D T G V S K N P V E L V T G
4901 CACCCCCAGC TGCCCCACGC CCAGAGCATT GCCGACGACA GCGAGGAAAT CTTCTTCGGC GACACCGGCG TGAGCAAGAA CCCCGTGGAA CTGGTGACAG
W F T S W K
5001 GCTGGTTCAC CACCTGGAAA
CGACCAAGTG GTCGACCTTT
5101

图14A


pThV-VSV.G (CHANDI/IND)CO
5171 bp
EcoRI (1)
NotI (28)
BglII (5131)
XhoI (34)
WPREÆATG
XhoI (644)
XbaI (650)
BGH pA
KanR
NcoI (1644)
pUC ORI
NdeI (3146)
NcoI (3272)
CMV
NheI (3557)
HindIII (3573)
KpnI (3583)
BamHI (3591)
NcoI (3745)
BsEII (3863)
BglII (4459)
VSV.G Chandipura/Indiana CO

B.

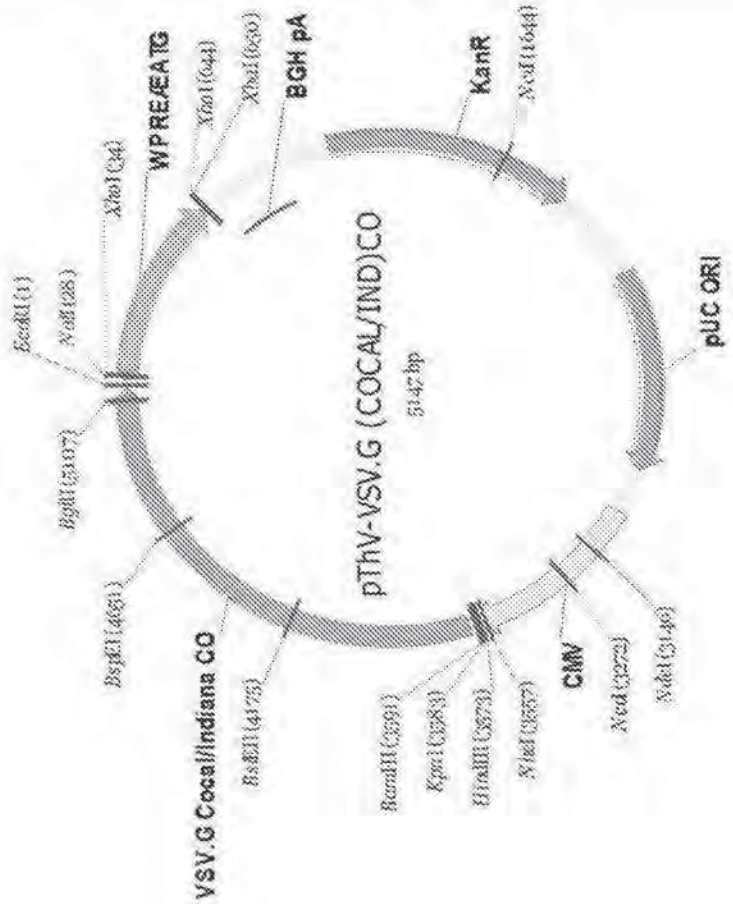
图14B

A.

```
                M  N  F  L  L   L  T  F   I  V  L   F  L  C  S   H  A  K   F  S  I   V  F  P  Q   S  Q  K   G  N  W
4601            ATC AACTTTCTCC TCCTGCATTT CATCCTCCTC CTTCTCTCCA GCCACCCCAA CTTCACCATC CTCTTCCCCC ACGACCCCAA CCCCAACTCC
                TAC TTGAAAGAGG AGGACTCTAA GTAGCACGAC GCAGACACCT CCACCCCCTT CAACTCCTAG CACAACCCCC TCTCCCCTCT CCCCTTCACC

     K  N  V  P   S  S  Y   H  Y  C   F  S  S  S   D  Q  N   W  H  N   D  L  L  G   I  T  M   K  V  K   M  P  K  T -
4701 AAGAACCTCC CCACCACCTA CCACTACTCC CCCAGCAGCA CTCCCACCAA CTCCCACAAC GACCTCCTCC GCATCACCAT GAAGCTCAAA ATCCCCAAGA
     TTCTTGGAGG GGTGGTGGAT GGTGATGAGG GGGTCGTCGT GAGGGTGGTT GACGGAGGTG CTGGGAGGGA CGTAGTGGTA CTTCCACTTT TACGGGTTCT

       H  K  A   I  Q  A   D  G  W  M   C  H  A   A  K  W   I  T  T  C   D  F  R   W  Y  G   P  K  Y  I   T  H  S
4801 CCCACAAGCC CATCCAGCCT GACGGCTGGA TGTGCCACCC CCCCAAGTGG ATCACCACCT GCGACTTCCC CTGGTACGGC CCCAAGTACA TCACCCACAG
     GGGTGTTCCG GTAGGTCCCA CTGCCGACCT ACACGTGCCG GGGGTTCACC TAGTGGTGGG CGCTGAAGGG GACCATGCCG GGGTTCATGT AGTGGGTGTC

       I  H  S   I  Q  P  T   S  E  Q   C  K  E   S  I  K  Q   T  K  Q   G  T  W   M  S  P  G   F  P  P   Q  N  C
4901 CATCCACTCC ATCCAGCCCA CCTCCTGCCA GTGCAAAGAG AGCATCAAGC AGACCAAGCA GGGACCTGGG ATGAGCCCCG GCTTCCCCCC CCAGAACTGC
     GTAGGTGAGG TAGGTCGGGT GGAGGACGGT CACGTTTCTC TCGTAGTTCG TCTGGTTCGT CCCCTGGACC TACTCGGGGG CGAAGGGGGG GGTCTTGACG

     G  Y  A  T   V  T  D   S  V  A   V  V  V  Q   A  T  P   H  H  V   L  V  D  E   Y  T  G   E  W  I   D  S  Q  F
4001 GGCTACGCCA CCCTGACCGA CAGCCGGGCC GTGCTGCTGC AGGCCACCCC CCACCACCTC CTGCTCGACG ACTACACCGG GGAGTGGATC GACAGCCAGT
     CCGATGCGGT GGGACTGGCT GTCCGACCGG CACGACGACG TCCCGTCGGG GGTGGTGGAG GACCAGCTGC TGATGTGGCC CCTCACCTAG CTGTCGGTCA

     -  P  N  G   K  C  E   T  E  E  C   E  T  V   H  N  S   T  V  W  Y   S  D  Y   K  V  T   G  L  C  D   A  T  L
4101 TCCCCAACGG CAAGTGCGAG ACACGGGAAT GCTGCACACT GCACAACAGC ACCCTGTGGT ACAGCGACTA CAAGCTGACC GGCCTGTGCG ACGCCACCCT
     AGGGGTTGCC GTTCACGCTC TGTGCCCTTA CGACGTGTCG CGTGTTGTCG TGGGACACGA TGTCGCTGCT GTTCGACTGG CCGGACACGC TGCGGTGGGA

     -  V  D  T   E  I  T  F   F  S  E   D  G  K   K  E  S  I   G  K  P   N  T  G   Y  R  S  N   Y  F  A   Y  E  K
4201 CCTGGCACCC GACATCACCT TTTTCAGCGA GCACGGCAAG AAAGAGTCCA TCGGCAAGCC CAACACGGGC TACAGAGCCA ACTACTTCGC CTACGCGAAG
     GGACCGTGGG CTGTAGTGGA AAAAGTCGCT CGTGCCGTTC TTTCTCAGGT AGCCGTTCGG GTTGTGCCCG ATGTCTCTGG TGATGCGCCG GATGCGCTTC

     G  D  K  V   C  K  M   N  Y  C   K  H  A  G   V  R  L   P  S  G   V  W  F  E   F  V  D   Q  D  V   Y  A  A  A
4301 GGCGACAAAG TGTGCAAGAT GAACTACTGC AAGCATGCCG GACTGCGGCT CCTCAGCGGC GTGGGTTTCG AGTTTGTGGA CCAGGACGTC TACGCCGCCG
     CCGCTGTTTC ACACGTTCTA CTTGATGACG TTCGTACCGC CTGACGCCGA GGAGTCGCCG CACCCAAAGC TCAAACACCT GGTCCTGCAG ATGCGGCGGC

     -  K  L  P   E  C  P   V  G  A  T   I  S  A   P  T  Q   T  S  V  D   V  S  L   I  L  D   V  E  R  I   L  D  Y -
4401 CCAAGCTGCC CGAGTGCCCC GTGGGCGCCA CCATCAGCCC CCCCACCCAG ACCAGCCCGG ACCTCAGCCT GATCCTGGAC GTGGAGAGGA TCCTGGACTA
     GGTTCGACGG GCTCACGGGG CACCCCGCGT GGTAGTCGGG GGGGTGGGTC TGGTCGTCGG TGGAGTCGGA CTAGGACCTG CACCTCTCCT AGGACCTGAT
```

```
     · S  L  C   Q  E  T  W   S  K  I   R  S  K   Q  F  V  S   P  V  D   L  S  Y   L  A  F  K   N  P  G   T  G  P
4501 CTCTCTGTGT CAGGAAACCT GGTCCAAGAT CAGATCCAAG CAGCCCGTCA GCCCTGTGGA CCTGAGCTAC CTGGCCCCTA AGAACCCCGG CACCGGCCCT
     GAGAGACACA GTCCTTTGGA CCAGGTTCTA GTCTAGGTTC GTCGGGCACT CGGGACACCT GGACTCGATG GACCGGGGAT TCTTGGGGCC GTGGCCGGGA

      A  F  T  I   I  N  G   T  L  K   Y  F  E  T   R  Y  I   R  I  D   I  D  N  P   I  I  S   R  M  V   G  K  I  S ·
4601 GCCTTCACCA TCATCAACGG CACCCTGAAG TACTTCGAGA CACGGTACAT CCGGATCGAC ATCGACAACC CCATCATCAG CAAGATGGTG GGCAAGATCA
     CGGAAGTGGT AGTAGTTGCC GTGGGACTTC ATGAAGCTCT GTGCCATGTA GGCCTAGCTG TAGCTGTTGG GGTAGTAGTC GTTCTACCAC CCGTTCTAGT

     · G  S  Q   T  E  R   A  L  W  T   E  W  P   P  Y  E   G  V  E  I   G  P  N   G  I  L   K  T  P  T   G  Y  K ·
4701 GCGGCAGCCA GACCGAGCGG GAGCTGTGGA CCGAGTGGTT CCCCTACGAG GGCGTGGAGA TCGGCCCCAA TGGCATCCTG AAAACCCCTA CCGGCTACAA
     CGCCGTCGGT CTGGCTCGCC CTCGACACCT GGCTCACCAA GGGGATGCTC CCGCACCTCT AGCCGGGGTT ACCGTAGGAC TTTTGGGGAT GGCCGATGTT

     · F  P  L   F  M  I  G   H  G  M   L  D  S   D  L  R  K   T  S  Q   A  E  V   F  E  H  P   H  L  A   E  A  P
4801 GTTCCCCCTG TTCATGATCG GCCACGGCAT GCTGGACAGC GACCTGCACA AGACCTCCCA GGCCGAGGTG TTCGAGCACC CCCACCTGGC CGAGGCCCCC
     CAAGGGGGAC AAGTACTAGC CGGTGCCGTA CGACCTGTCG CTGGACGTGT TCTGGAGGGT CCGGCTCCAC AAGCTCGTGG GGGTGGACCG GCTCCGGGGG

      E  Q  L  P   E  E  E   T  L  F   F  G  D  T   G  I  S   K  N  P   V  E  L  I   E  G  W   F  S  S   W  K  S  S ·
4901 AAGCAGCTGC CCGAAGAGGA AACCCTGTTC TTCGGCGACA CGGGCATCTC CAAGAACCCT GTGGAGCTGA TCGAGGGCTG GTTCAGCAGC TGGAAGAGCA
     TTCGTCGACG GGCTTCTCCT TTGGGACAAG AAGCCGCTGT GGCCGTAGAG GTTCTTGGGA CACCTCGACT AGCTCCCGAC CAAGTCGTCG ACCTTCTCGT

     · I  A  S   F  F  F   I  I  G  L   I  I  G   L  F  L   V  L  R  V   G  I  H   L  C  L   K  L  K  H   I  K  K ·
5001 GCATCGCTTC ATTTTTTTTC ATCATCGGCC TCATCATCGG GCTGTTTCTG GTGCTGCGCG TCGGCATCCA CCTGTGCATC AAGCTGAAGC ACACCAAGAA
     CGTAGCGAAG TAAAAAAAAG TAGTAGCCGG AGTAGTAGCC CGACAAAGAC CACGACGCGC AGCCGTAGGT GGACACGTAG TTCGACTTCG TGTGGTTCTT

     · R  Q  I   Y  T  D  I   R  M  N   R  I  G   K  *
5101 GCGCCAGATC TATACCGACA TCGACATGAA TCGCCTGCGG AAGTAA
     CGCGGTCTAG ATATGGCTGT AGCTCTACTT AGCGGACGCC TTCATT
```

图15A


pThV-VSV.G (COCAL/IND)CO
5147 bp
pUC ORI
KanR
NcoI(1644)
BGH pA
XbaI(650)
XbaI(644)
WPRE&ATG
XhoI(34)
NotI(28)
EcoRI(1)
BglII(2117)
BspEI(4691)
VSV.G CocalIndiana CO
BsRGI(4175)
BamHI(3591)
KpnI(3283)
HindIII(3273)
NheI(3267)
CMV
NcoI(3272)
NdeI(3146)

B.

图15B

A.

```
            M  T  D  T  V  L  G  K  F  Q  I  V  F  P  D  Q  N  E  L  E  W  T  P  V  V  G  D  S  R  H  C
3601        ATG ACCGATACAC TGCTGGGCAA GTTTCAGATC GTCTTTCCCG ACCACAACGA GCTGCAATGC ACCCCCCTCC TGGGGCACAC CCCGCATTGC
            TAC TGGCTATGTG ACGACCCGTT CAACGTCTAG CACAAGGGGC TGGTCTTGCT CGACCTTACC TGGGGGCACG ACCCGCTGTG GGGCGTAACG

            P  Q  S  S  E  M  Q  F  D  G  S  R  S  Q  T  I  L  T  G  K  A  F  V  G  I  T  P  S  K  S  D  G  F  I
3701 CCTCACTCCA CCCACATGCA GTTTCACGGC AGCAGAACCC ACACCATCCT GACCGGCAAG GCCCCCCTCG GCATCACACC CACCAAGACC GACGGCTTCA
     GGAGTGAGGT GGGTGTACGT CAAAGTGCCG TCGTCTGGG TGTGGTAGGA CTGGCCGAGC CGGGGGGACC CGTAGTGTGG GTGCCGCTGG CTGCCGAAGT

            -  C  H  A  A  K  W  V  T  T  C  D  F  R  W  Y  G  P  K  Y  I  T  H  S  I  H  H  L  R  P  T  T  S  D
3801 TCTGCCACCC CCCCAACGCG GTGACCACCT GCGACTTCCC GTGGTACGGC CCCAAGTACA TCACCCACAG CATCCACCAC CTGCGGCCCA CCACCTCCGA
     AGACGGTGGG GGGGTGCACC CACTGGTGGA CGCTGAGGGG CACCATGCCG GGGTTCATGT AGTGGGTGTC GTAGGTGGTG GACGCCGGGT GGTGGAGGCT

            -  C  E  T  A  L  Q  R  Y  K  D  G  S  L  I  N  L  G  F  P  P  E  S  C  G  Y  A  T  V  T  D  S  E  A
3901 CTGCCGAGCA GCCCTGCAGC GCTACAAGGA CGGCAGCCTC ATCAACCTGG GCTTCCCTCC CGAGAGCTGC GGCTACGCCA CCCTGACAGA CAGCCGAGGC
     GACGGCTCGT CGGGACGTCG CGATGTTCCT GCCGTCGGAG TAGTTGGACC CGAAGGGAGG GCTCTCGACG CCGATGCGGT GGGACTGTCT GTCGGCTCCG

            M  L  V  Q  V  T  P  H  H  V  G  V  D  D  Y  R  G  H  W  I  D  P  L  F  P  G  G  E  C  S  T  N  F  C
4001 ATGCTGGTGC AGGTGACCCC CCACCACGTG GGCGTGGACG ACTACCGGGG CCACTGGATC GACCCCCTCT TCCCTGGGGG CGAGTGCAGC ACCAATTTCT
     TACGACCACG TCCACTGGGG GTGGTGCTGC CGCGACCTGC TGATGGCCCC GTGGACCTAG CTGGGGGACA AGGGACCCCC GCTCACGTCG TGGTTAAAGA

            -  D  T  V  H  N  S  S  V  W  I  P  K  S  Q  K  T  D  I  C  A  Q  S  F  K  N  I  K  M  T  A  S  Y  P
4101 GGGATGCCCT GCACAACAGC AGCCTGTGGA TTCCCAAGAG CCAGAAAACC GACATCTGCG CCCAGAGTTC CAAGAACATC AAGATGACCG CCAGCTACCC
     CCCTATGGGA CGTGTTGTCG TCGCACGCCT AAGGGTTCTC GGTCTTTTGG CTGTAGACGC GGGTCTCAAG GTTCTTGTAG TTCTACTGGC GGTCGATGGG

            -  S  E  G  A  L  V  S  D  R  F  A  F  H  S  A  Y  H  P  N  M  P  G  S  T  V  C  I  M  D  F  C  E  Q
4201 CAGCGAGGGA GCCCTGGTCT CCGACCGGTT CGCTTTCCAC AGCGCCTACC ACCCCAACAT GCCCGGAGCC ACCGTGTGCA TCATGGATTT CTGCGAGCAG
     GTCGCTCCCT CGGGACCAGA GGCTGGCCAA GCGGAAGGTG TCGCGGATGG TGGGGTTGTA CGGGCCTCGG TGGCACACGT AGTACCTAAA GACGCTCGTC

            K  G  L  R  F  T  N  G  E  W  M  G  L  N  V  E  Q  S  I  R  E  K  K  I  S  A  I  F  P  N  C  V  A  G
4301 AAGGGCCTCC GCTTCACCAA CGGGGAGTGG ATGGGCCTCA ACGTGGAGCA GAGCATCCGG GAGAAGAAGA TCAGCGCCAT CTTCCCCAAC TGCGTGGCGG
     TTCCCGGAGG CGAAGTGGTT GCCCCTCACC TACCCGGAGT TGCACCTCGT CTCTTCTTCT AGTCGCGGTA GAAGGGGTTG ACGCACCGCC ACGCACCGCC

            -  T  E  I  R  A  T  L  E  S  E  G  A  R  T  L  T  W  E  T  Q  R  M  L  D  Y  S  L  C  Q  N  T  W  D
4401 GCACCGAGAT CGGGGCCAGC CTGCAACCCG AGGGGCCGAG GACCCTGACC TGGGAGACAC ACCCCACGCT GGACTACAGC CTGTGCCAGA ACACCTGGGA
     CGTGGCTCTA GCCCCGGTCG GACGTTGGGC TCCCCGGCTC CTGGGACTGG ACCCTGTGTG TCGGTGCGA CCTGATGTCG GACACGGTCT TGTGGACCCT
```

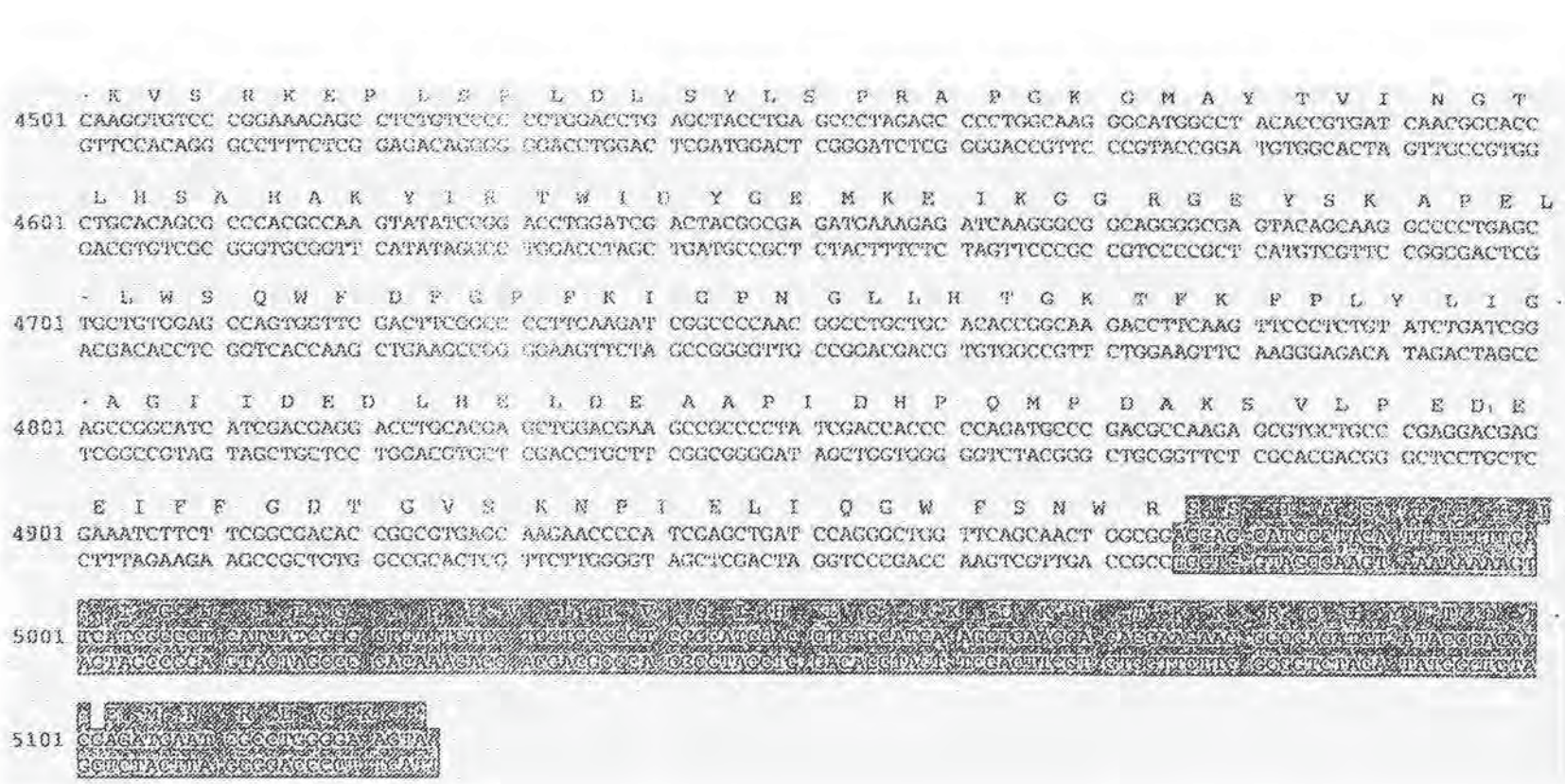
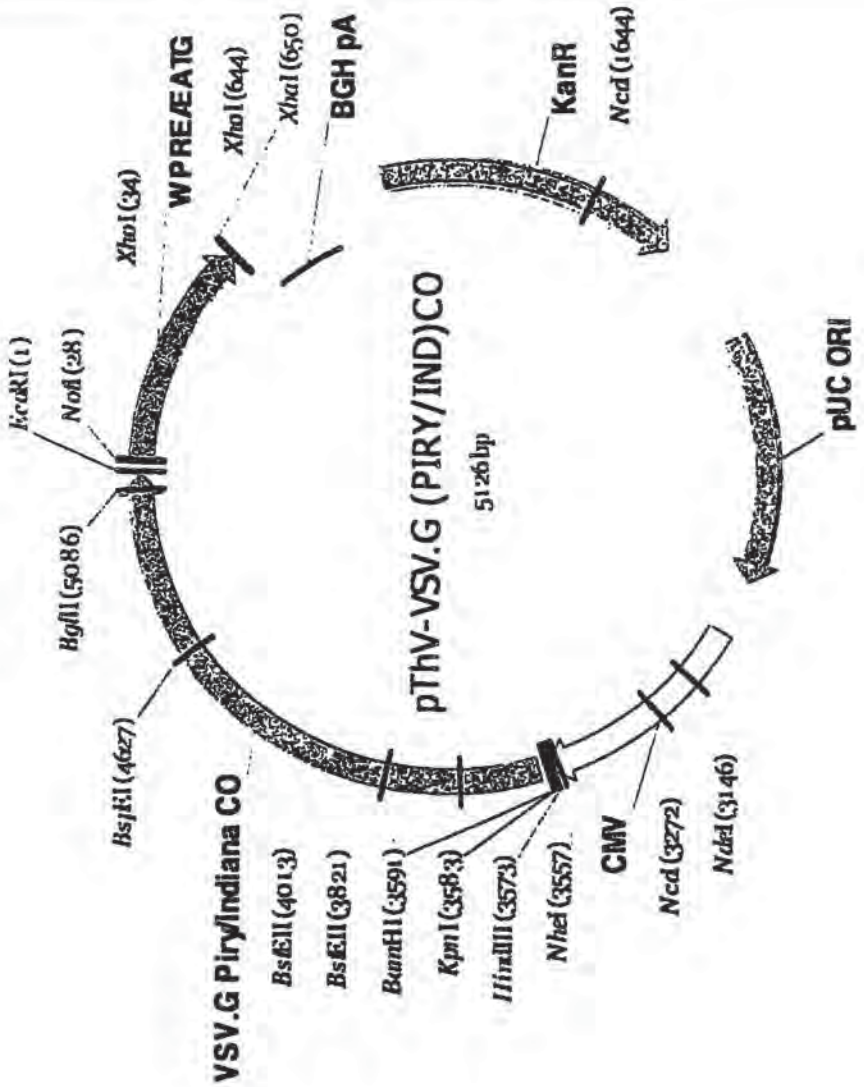


图16A


pThV-VSV.G (PIRY/IND)CO
5126bp
VSV.G Piry/Indiana CO
WPREÆATG
BGH pA
KanR
pUC ORI
CMV
EcoRI(1)
NotI(28)
XhoI(34)
XhoI(644)
XhoI(650)
NcoI(1644)
BglII(5086)
BsjTI(4627)
BsEII(4013)
BsEII(3821)
BamHI(3591)
KpnI(3583)
HinfIII(3573)
NheI(3557)
NcoI(3272)
NdeI(3146)

B.

图16B

A.

```
      M  T  S  V  L  F  M  V  G  V  L  L  G  A  F  G  S  T  H  C  S  I  Q  I  V  F  P  S  E  T  K
3601  ATG ACATCCGTGC TGTTTATGGT GGGCGTGCTG CTCGGAGCTT TCGGATCTAC CCACTGCAGC ATCCAGATCG TGTTCCCCAG CGACACAAAG
      TAC TGTAGGCACG ACAAATACCA CCCGCACGAC GAGCCTCGAA AGCCTAGATG GGTGACGTCG TAGGTCTAGC ACAAGGGGTC GCTCTGTTTC

      L  V  W  K  P  V  L  K  G  T  R  Y  C  P  Q  S  A  E  L  N  L  E  P  D  L  K  T  M  A  F  D  S  K  V  ·
3701  CTGGTGTGGA AGCCCGTGCT GAAGGGCACC CGGTACTGCC CCCAGAGCGC CGAGCTGAAC CTGGAACCCG ACCTGAAAAC CATGGCCTTC GACAGCAAGG
      GACCACACCT TCGGGCACGA CTTCCCGTGG GCCATGACGG GGGTCTCGCG GCTCGACTTG GACCTTGGGC TGGACTTTTG GTACCGGAAG CTGTCGTTCC

      ·  P  I  G  I  T  P  S  N  S  D  G  Y  L  C  H  A  A  K  W  V  T  T  C  D  F  R  W  Y  G  P  K  Y  I  ·
3801  TGCCCATCGG CATCACCCCC AGCAACAGCG ACGGCTACCT GTGCCACGCC GCCAAGTGGG TGACCACCTG CGACTTCCGG TGGTACGGCC CCAAGTACAT
      ACGGGTAGCC GTAGTGGGGG TCGTTGTCGC TGCCGATGGA CACGGTGCGG CGGTTCACCC ACTGGTGGAC GCTGAAGGCC ACCATGCCGG GGTTCATGTA

      ·  T  H  S  V  H  S  L  R  P  T  V  S  D  C  K  A  A  V  E  A  Y  N  A  G  T  L  M  Y  P  G  F  P  P
3901  CACCCACAGC GTGCACAGCC TGCGGCCCAC CGTGAGCGAC TGCAAGGCCG CCGTGGAAGC TTACAACGCT GGCACCCTGA TGTACCCCGG CTTCCCCCCC
      GTGGGTGTCG CACGTGTCGG ACGCCGGGTG GCACTCGCTG ACGTTCCGGC GGCACCTTCG AATGTTGCGA CCGTGGGACT ACATGGGGCC GAAGGGGGGG

      E  S  C  G  Y  A  S  I  T  D  S  E  F  Y  V  M  L  V  T  P  H  P  V  G  V  D  D  Y  R  G  H  W  V  D  ·
4001  GAGAGCTGCG GCTACGCCAG CATCACCGAC AGCGAGTTCT ACGTGATGCT GGTGACCCCC CACCCCGTGG GAGTGGACGA CTACCGGGGC CACTGGGTGG
      CTCTCGACGC CGATGCGGTC GTAGTGGCTG TCGCTCAAGA TGCACTACGA CCACTGGGGG GTGGGGCACC CTCACCTGCT GATGGCCCCG GTGACCCACC

      ·  P  L  F  P  T  S  E  C  N  S  N  F  C  E  T  V  H  N  A  T  M  W  I  P  K  D  L  K  T  H  D  V  C  ·
4101  ACCCTCTGTT CCCCACCTCC GAGTGCAACA GCAACTTCTG CGAGACAGTG CACAACGCCA CCATGTGGAT TCCCAAGGAT CTGAAAACCC ACGACGTGTG
      TGGGAGACAA GGGGTGGAGG CTCACGTTGT CGTTGAAGAC GCTCTGTCAC GTGTTGCGGT GGTACACCTA AGGGTTCCTA GACTTTTGGG TGCTGCACAC

      ·  S  Q  D  F  Q  T  I  R  V  S  V  M  Y  P  Q  T  K  P  T  K  G  A  D  L  T  L  K  S  K  F  H  A  H
4201  CAGCCAGGAC TTCCAGACCA TCAGAGTGAG CGTGATGTAC CCTCAGACCA AGCCCACCAA GGGAGCTGAC CTGACACTGA AGAGCAAGTT CCACGCCCAC
      GTCGGTCCTG AAGGTCTGGT AGTCTCACTC GCACTACATG GGAGTCTGGT TCGGGTGGTT CCCTCGACTG GACTGTGACT TCTCGTTCAA GGTGCGGGTG

      M  K  G  D  R  V  C  K  M  K  F  C  N  K  N  G  L  R  L  G  N  G  E  W  I  E  V  G  D  E  V  M  L  D  ·
4301  ATGAAGGGCG ACAGAGTGTG CAAGATGAAG TTCTGCAACA AGAACGGCCT GCGGCTGGGC AACGGCGAGT GGATCGAAGT GGGCGACGAG GTGATGCTGG
      TACTTCCCGC TGTCTCACAC GTTCTACTTC AAGACGTTGT TCTTGCCGGA CGCCGACCCG TTGCCGCTCA CCTAGCTTCA CCCGCTGCTC CACTACGACC

      ·  N  S  K  L  L  S  L  F  P  D  C  L  V  G  S  V  V  K  S  T  L  L  S  E  G  V  Q  T  A  L  W  E  T  ·
4401  ACAACAGCAA GCTGCTGTCC CTGTTCCCCG ACTGCCTGGT GGGCAGCGTG GTGAAGAGCA CCCTGCTGTC CGAGGGCGTG CAGACCGCCC TGTGGGAGAC
      TGTTGTCGTT CGACGACAGG GACAAGGGGC TGACGGACCA CCCGTCGCAC CACTTCTCGT GGGACGACAG GCTCCCGCAC GTCTGGCGGG ACACCCTCTG
```

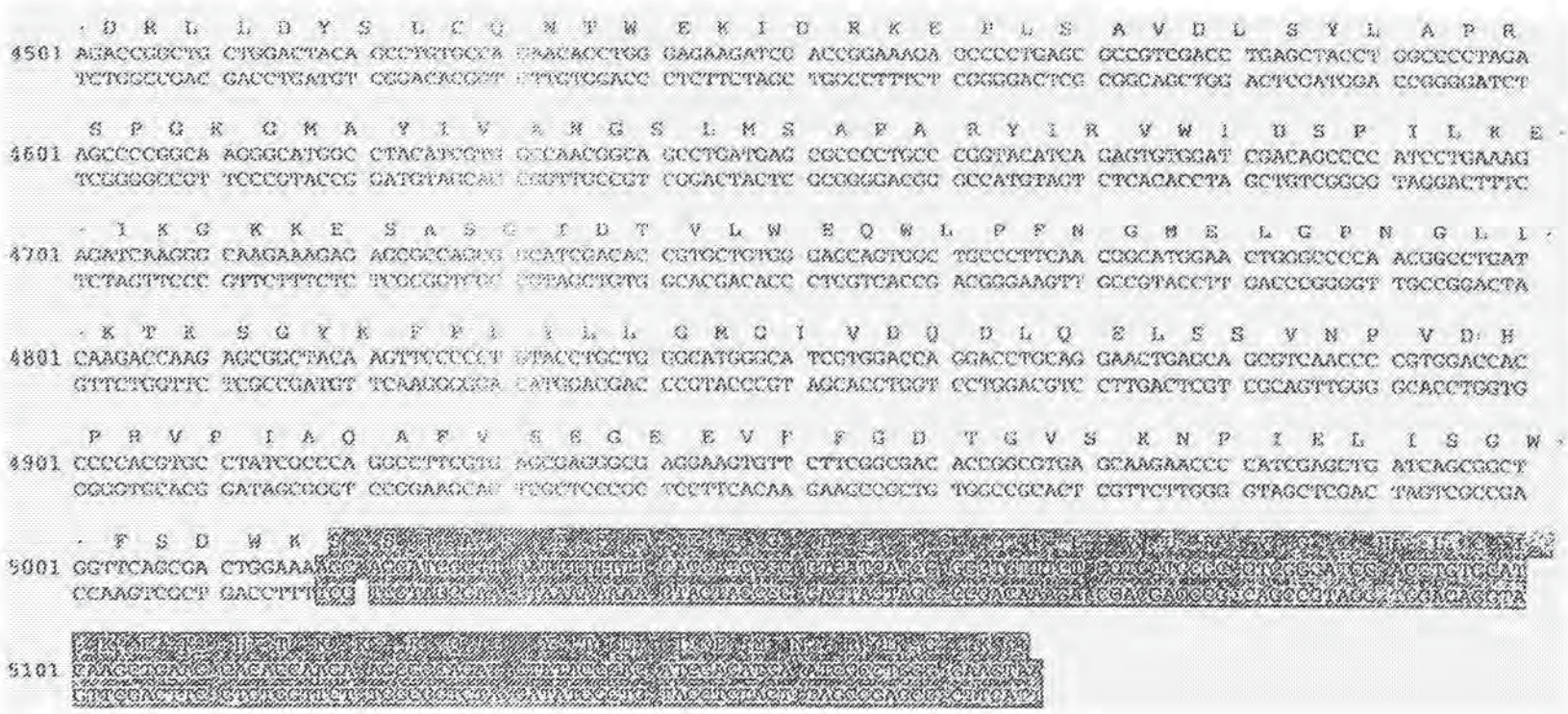
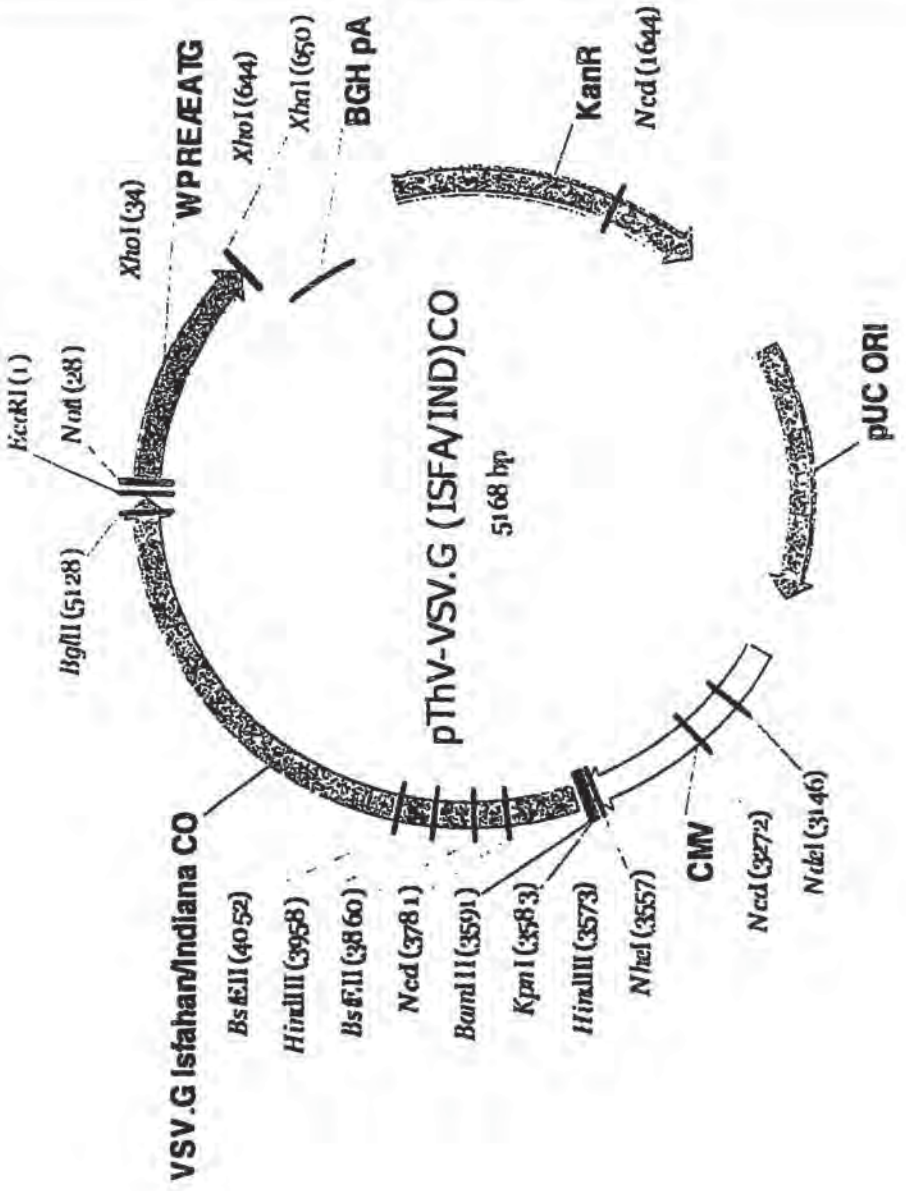


图17A


pThV-VSV.G (ISFA/IND)CO
5168 bp
VSV.G Isfahan/Indiana CO
BsEII (4052)
HindIII (3958)
BsEII (3860)
Ncd (3781)
BamHI (3591)
Kpn1 (3583)
HindIII (3573)
Nhel (3557)
CMV
Ncd (3272)
Ndel (3146)
pUC ORI
KanR
Ncd (1644)
BGH pA
Xho1 (650)
Xho1 (644)
WPREÆATG
Xho1 (34)
EcoRI (1)
Not (28)
HgiII (5128)

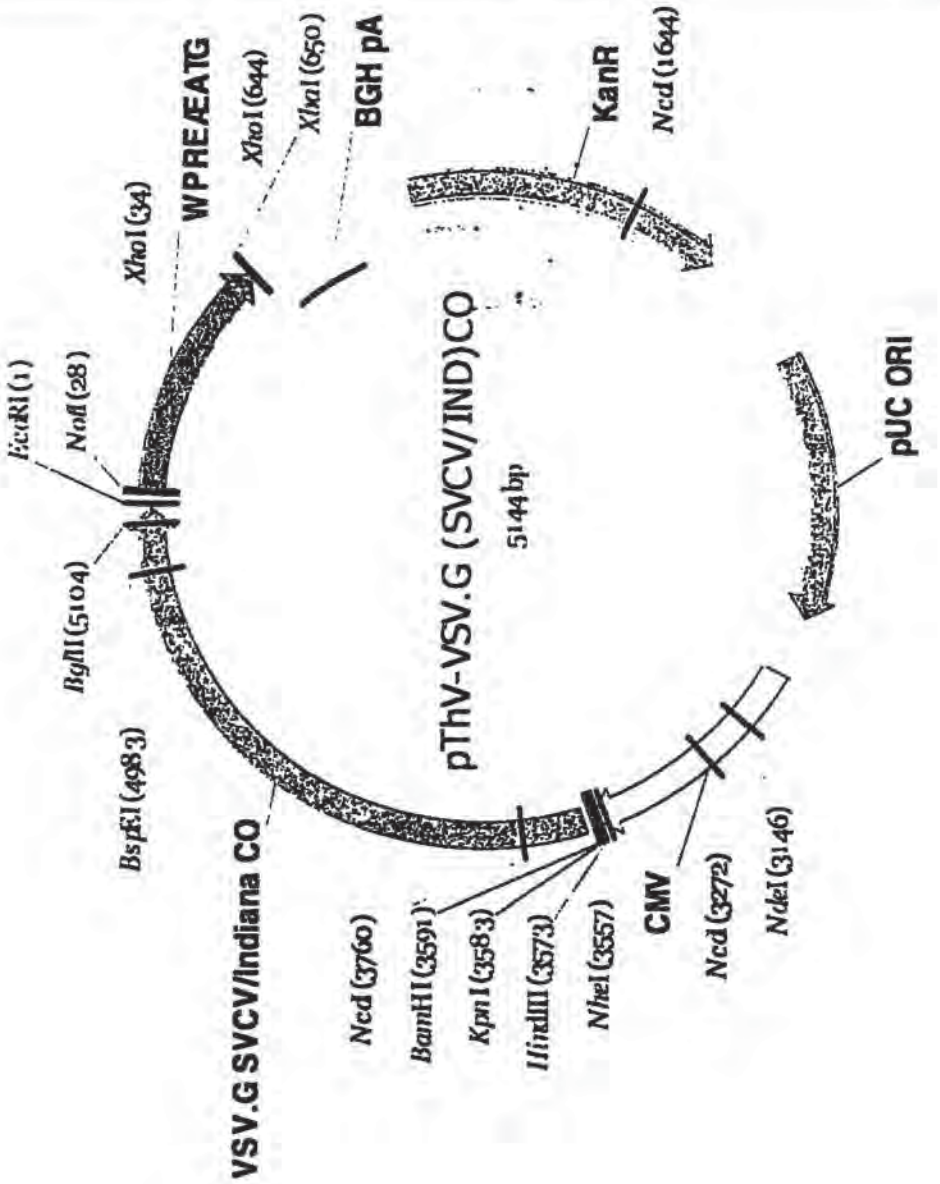
B.

图17B

A.

```
      M  S  I  I  S  Y  I  A  F  L  L  L  I  D  S  T  L  G  I  P  I  F  V  P  S  G  Q  N  I  S  W
3601  ATG AGCATCATCA GCTATATCGC CTTTCTGCTG CTGATCGACA GCACCCTGGG CATCCCCATC TTCGTGCCCA GCGGCCAGAA CATCAGCTGG
      TAC TCGTAGTAGT CGATATAGCG GAAAGACGAC GACTAGCTGT CGTGGGACCC GTAGGGGTAG AAGCACGGGT CGCCGGTCTT GTAGTCGACC

      Q  P  V  I  Q  P  F  D  Y  Q  C  P  I  H  G  N  L  P  N  T  M  G  L  S  A  T  K  L  T  I  K  S  P  S ·
3701  CAGCCCGTGA TCCAGCCCTT CGACTACCAG TGCCCCATCC ACGGCAACCT GCCCAACACC ATGGGCCTGA GCGCCACCAA GCTGACCATC AAGAGCCCCA
      GTCGGGCACT AGGTCGGGAA GCTGATGGTC ACGGGGTAGG TGCCGTTGGA CGGGTTGTGG TACCCGGACT CGCGGTGGTT CGACTGGTAG TTCTCGGGGT

      · V  F  S  T  D  K  V  S  G  W  I  C  H  A  A  E  W  K  T  T  C  D  Y  R  W  Y  G  P  Q  Y  I  T  H ·
3801  GCGTGTTCAG CACCGACAAG GTGTCCGGCT GGATCTGCCA CGCCGCCGAG TGGAAAACCA CCTGCGACTA CCGGTGGTAC GGCCCCCAGT ACATCACCCA
      CGCACAAGTC GTGGCTGTTC CACAGGCCGA CCTAGACGGT GCGGCGGCTC ACCTTTTGGT GGACGCTGAT GGCCACCATG CCGGGGGTCA TGTAGTGGGT

      · S  I  H  P  I  S  P  T  I  D  E  C  K  R  I  I  S  R  I  A  S  G  T  D  E  D  L  C  F  P  P  Q  S
3901  CAGCATCCAC CCCATCAGCC CCACCATCGA CGAGTGCAAG CGGATCATCA GCCGGATCGC CAGCGGCACC GACGAGGACC TGGGCTTCCC ACCCCAGAGC
      GTCGTAGGTG GGGTAGTCGG GGTGGTAGCT GCTCACGTTC GCCTAGTAGT CGGCCTAGCG GTCGCCGTGG CTGCTCCTGG ACCCGAAGGG TGGGGTCTCG

      C  G  W  A  S  V  T  T  V  S  N  T  N  Y  K  V  V  P  H  S  V  H  L  E  P  Y  G  C  H  W  I  D  H  D ·
4001  TGCGGCTGGG CCAGCGTGAC CACCGTGAGC AACACCAACT ACAAGGTGGT GCCCCACAGC GTGCACCTGG AACCCTACGG CGGCCACTGG ATCGACCACG
      ACGCCGACCC GGTCGCACTG GTGGCACTCG TTGTGGTTGA TGTTCCACCA CGGGGTGTCG CACGTGGACC TTGGGATGCC GCCGGTGACC TAGCTGGTGC

      · F  N  G  G  E  C  R  E  K  V  C  E  M  K  G  N  H  S  I  W  I  T  D  E  T  V  Q  H  E  C  E  K  H ·
4101  ACTTCAACGG CGGCGAGTGC CGGGAGAAAG TGTGCGAGAT GAAGGGCAAC CACAGCATCT GGATCACCGA CGAGACAGTG CAGCACGAGT GCGAGAAGCA
      TGAAGTTGCC GCCGCTCACG GCCCTCTTTC ACACGCTCTA CTTCCCGTTG GTGTCGTAGA CCTAGTGGCT GCTCTGTCAC GTCGTGCTCA CGCTCTTCGT

      · I  E  E  V  E  G  I  M  Y  G  N  A  P  R  G  D  A  I  Y  I  N  N  F  I  I  D  K  H  H  R  V  Y  R
4201  CATCGAGGAA GTGGAGGGCA TCATGTACGG CAACGCCCCC AGGGGCGACG CCATCTACAT CAACAACTTC ATCATCGACA AGCACCACCG GGTGTACCGG
      GTAGCTCCTT CACCTCCCGT AGTACATGCC GTTGCGGGGG TCCCCGCTGC GGTAGATGTA GTTGTTGAAG TAGTAGCTGT TCGTGGTGGC CCACATGGCC

      F  G  G  S  C  R  M  K  F  C  N  K  D  G  I  K  F  T  R  G  D  W  V  E  K  T  A  G  T  L  T  N  I  Y ·
4301  TTCGGCGGCT CCTGCCGGAT GAAGTTCTGC AACAAGGACG GCATCAAGTT CACCAGAGGC GACTGGGTGG AGAAAACCGC CGGCACCCTG ACCAACATCT
      AAGCCGCCGA GGACGGCCTA CTTCAAGACG TTGTTCCTGC CGTAGTTCAA GTGGTCTCCG CTGACCCACC TCTTTTGGCG GCCGTGGGAC TGGTTGTAGA

      · E  N  I  P  E  C  A  D  G  T  L  V  S  G  H  R  P  G  L  D  L  I  D  T  V  F  N  L  E  N  V  V  E ·
4401  ACGAGAACAT CCCCGAGTGC GCCGACGGCA CACTGGTGTC CGGCCACAGA CCCGGCCTGG ACCTGATCGA CACCGTGTTC AACCTGGAAA ACGTGGTGGA
      TGCTCTTGTA GGGGCTCACG CGGCTGCCGT GTGACCACAG GCCGGTGTCT GGGCCGGACC TGGACTAGCT GTGGCACAAG TTGGACCTTT TGCACCACCT
```

图18A


pThV-VSV.G (SVCV/IND)CO
5144 bp
VSV.G SVCV/Indiana CO
WPREÆATG
BGH pA
KanR
pUC ORI
CMV
EcoRI (1)
NotI (28)
XhoI (34)
XhoI (644)
XhoI (650)
NcoI (1644)
BglII (5104)
BspEI (4983)
NcoI (3760)
BamHI (3591)
KpnI (3583)
HindIII (3573)
NheI (3557)
NcoI (3272)
NdeI (3146)

B.

图18B

A.

```
            M  L  S  Y  L   I  F  A   L  A  V   S  P  I  L   C  K  I   E  I  V   F  P  Q  H   T  T  G   D  W  K
3601        ATG CTGTCATATC TGATCTTTGC CCTGGCTGTG AGCCCAATCC TCGGAAAGAT CGAAATCGTG TTCCCACAAC ACACCACAGG GGACTGGAAG
            TAC GACAGTATAG ACTAGAAACG GGACCGACAC TCGGGTTAGG AGCCTTTCTA GCTTTAGCAC AAGGGTGTTG TGTGGTGTCC CCTGACCTTC

     R  V  P  H   E  Y  N   Y  C  P   T  S  A  D   K  N  S   H  G  T   Q  T  G  I   P  V  E   L  T  M   P  K  G  L ·
3701 CGCGTGCCCC ACGAGTACAA CTACTGCCCG ACCTCAGCCG ACAAGAATAG CCACGGCACG CAGACCGGCA TCCCTGTGGA GCTGACCATG CCCAAGGGGC
     GCGCACGGGG TGCTCATGTT GATGACGGGC TGGAGTCGGC TGTTCTTATC GGTGCCGTGC GTCTGGCCGT AGGGACACCT CGACTGGTAC GGGTTCCCCG

     · T  T  H   Q  V  E   G  F  M  C   H  S  A   L  W  M   T  T  C  D   F  R  W   Y  G  P   K  Y  I  T   H  S  I ·
3801 TCACAACGCA CCAAGTCGAA GGCTTCATGT GCCACAGCGC TCTCTGGATG ACAACCTGCG ATTTTCGCTG GTATGGCCCC AAGTACATCA CGCACAGCAT
     AGTGTTGCGT GGTTCAGCTT CCGAAGTACA CGGTGTCGCG AGAGACCTAC TGTTGGACGC TAAAAGCGAC CATACCGGGG TTCATGTAGT GCGTGTCGTA

     · H  N  E   E  P  T  D   Y  Q  C   L  E  A   I  K  S  Y   K  D  G   V  S  F   N  P  G  F   P  P  Q   S  C  G
3901 CCACAATGAG GAACCAACCG ACTACCAGTG CCTCGAAGCC ATCAAGTCAT ACAAGGATGG GGTGAGCTTC AACCCCGGCT TCCCGCCCCA ATCATGTGGC
     GGTGTTACTC CTTGGTTGGC TGATGGTCAC GGAGCTTCGG TAGTTCAGTA TGTTCCTACC CCACTCGAAG TTGGGGCCGA AGGGCGGGGT TAGTACACCG

     Y  G  T  V   T  D  A   E  A  H   I  V  T  V   T  P  H   S  V  K   V  D  E  Y   T  G  E   W  I  D   P  H  F  I ·
4001 TACGGCACCG TGACCGACGC CGAGGCCCAC ATCGTGACCG TGACACCCCA CTCAGTCAAG GTGGACGAGT ACACAGGCGA ATGGATCGAC CCCCACTTCA
     ATGCCGTGGC ACTGGCTGCG GCTCCGGGTG TAGCACTGGC ACTGTGGGGT GAGTCAGTTC CACCTGCTCA TGTGTCCGCT TACCTAGCTG GGGGTGAAGT

     · G  G  R   C  K  G   Q  I  C  E   T  V  H   N  S  T   K  W  F  T   S  S  D   G  E  S   V  C  S  Q   L  F  T ·
4101 TCGGGGGCCG CTGTAAGGGC CAAATCTGCG AGACCGTGCA CAACAGCACC AAGTGGTTTA CGTCATCAGA CGGCGAAAGC GTGTGCAGCC AACTGTTTAC
     AGCCCCCCGGC GACATTCCCG GTTTAGACGC TCTGGCACGT GTTGTCGTGG TTCACCAAAT GCAGTAGTCT GCCGCTTTCG CACACGTCGG TTGACAAATG

     · L  V  G   G  I  F  F   S  D  S   E  E  I   T  S  M  G   L  P  E   T  G  I   R  S  N  Y   F  P  Y   I  S  T
4201 GCTCGTGGGC GGCATCTTCT TTAGCGACAG CGAGGAGATC ACCAGCATGG GCCTCCCGGA GACAGGAATC CGCAGCAACT ACTTTCCGTA CATCAGCACC
     CGAGCACCCG CCGTAGAAGA AATCGCTGTC GCTCCTCTAG TGGTCGTACC CGGAGGGCCT CTGTCCTTAG GCGTCGTTGA TGAAAGGCAT GTAGTCGTGG

     E  G  I  C   K  M  P   F  C  R   K  Q  G  Y   K  L  K   N  D  L   W  F  Q  I   M  D  P   D  L  D   K  T  V  R ·
4301 GAGGGAATCT GTAAGATGCC TTTTTGCCGC AAGCAGGGAT ATAAGCTGAA GAATGACCTG TGGTTCCAGA TCATGGACCC GGACCTGGAC AAGACCGTCC
     CTCCCTTAGA CATTCTACGG AAAAACGGCG TTCGTCCCTA TATTCGACTT CTTACTGGAC ACCAAGGTCT AGTACCTGGG CCTGGACCTG TTCTGGCAGG

     · D  L  P   H  I  K   D  C  D  L   S  S  S   I  I  T   P  G  E  H   A  T  D   I  S  L   I  S  D  V   E  R  I ·
4401 GCGATCTGCC CCACATCAAG GACTGTGATC TGTCATCAAG CATCATCACC CCCGGAGAAC ACGCCACGGA CATCAGCCTC ATCAGCGATG TGGAGCGCAT
     CGCTAGACGG GGTGTAGTTC CTGACACTAG ACAGTAGTTC GTAGTAGTGG GGGCCTCTTG TGCGGTGCCT GTAGTCGGAG TAGTCGCTAC ACCTCGCGTA
```

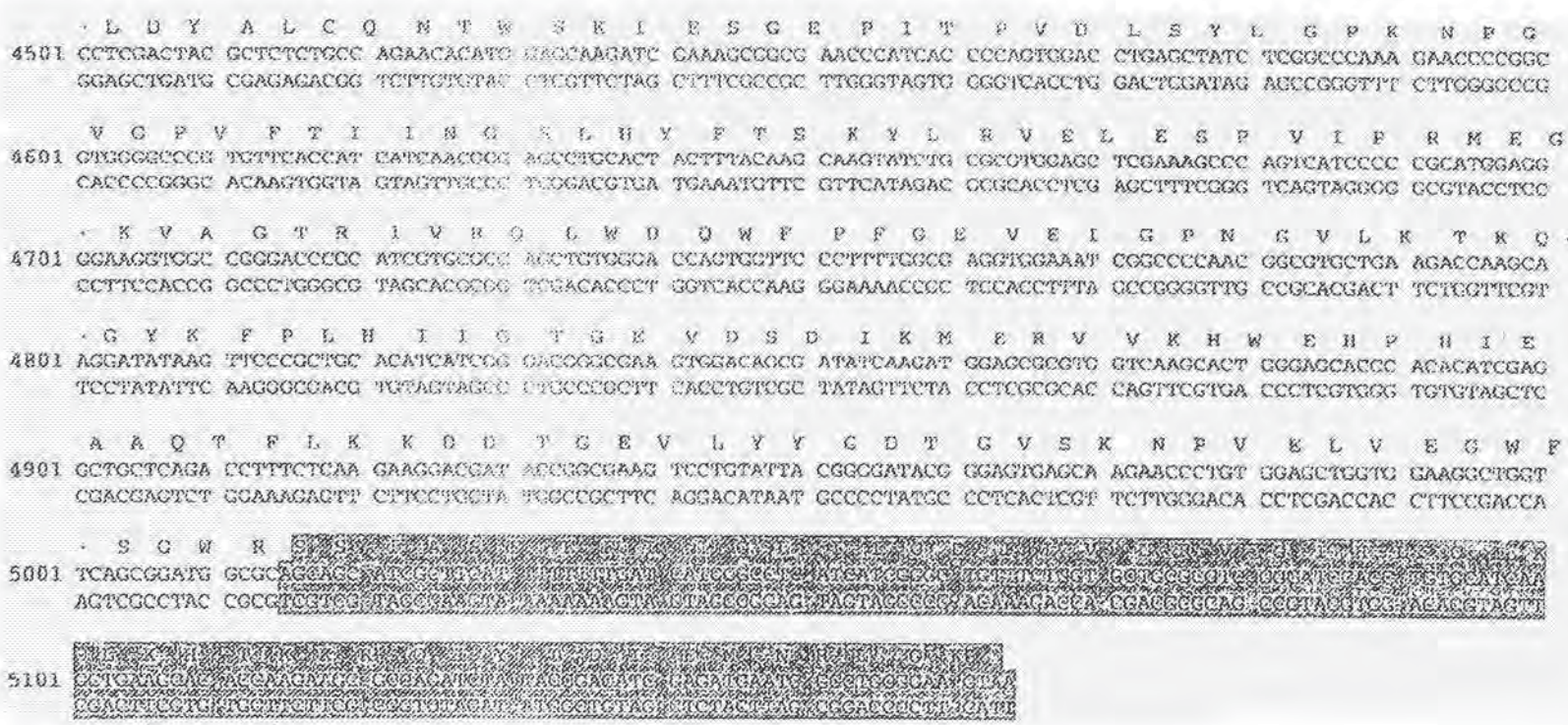
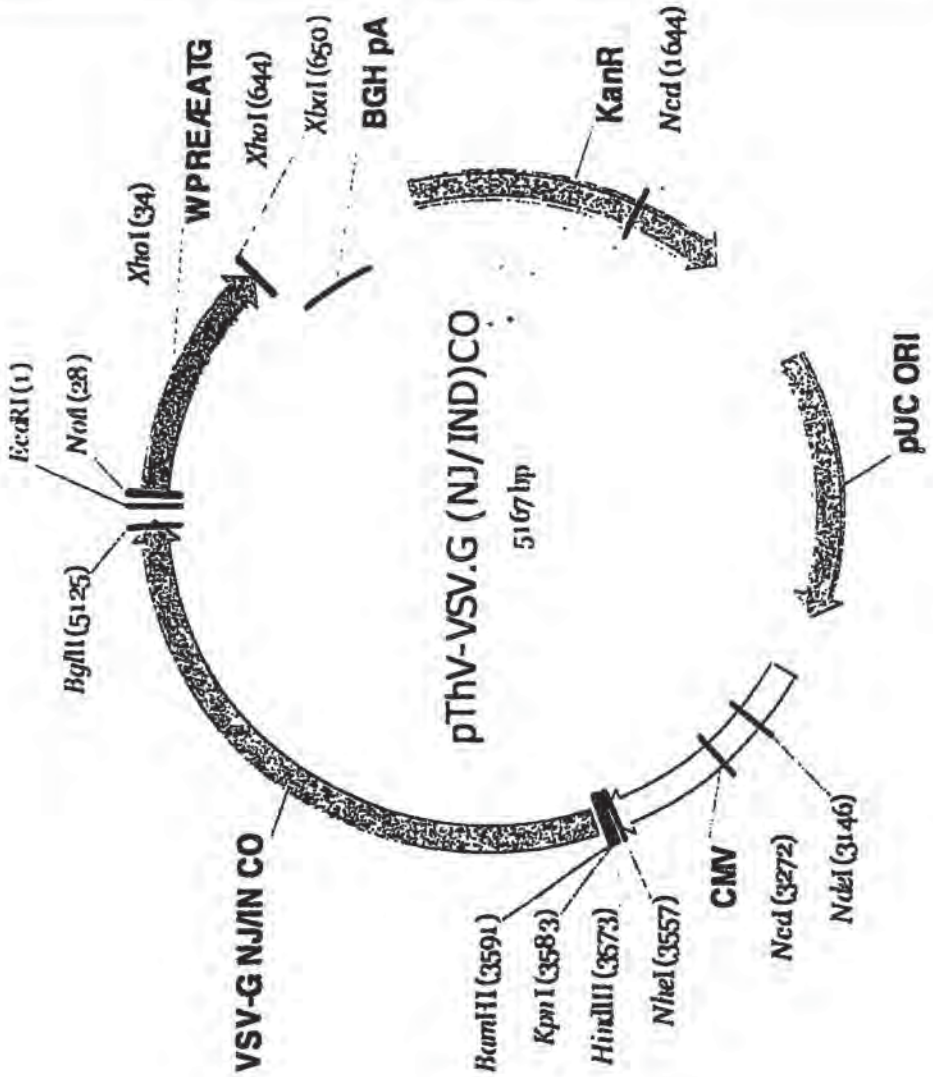

L D Y A L C Q N T W S K I E S G E P I T P V D L S Y L G P K N P G
4501 CCTCGACTAC GCTCTCTGCC AGAACACATG GAGCAAGATC CAAAGCCGCG AACCCATCAC CCCAGTGGAC CTGAGCTATC TCGGCCCAAA GAACCCCGGC
GGAGCTGATG CGAGAGACGG TCTTGTGTAC CTCGTTCTAG GTTTCGCCGC TTGGGTAGTG GGGTCACCTG GACTCGATAG AGCCGGGTTT CTTGGGCCCG
V G P V F T I I N G S L H Y F T S K Y L R V E L E S P V I P R M E G
4601 GTGGGGCCCG TGTTCACCAT CATCAACGGG AGCCTGCACT ACTTTACAAG CAAGTATCTG CGCGTGGAGC TCGAAAGCCC AGTCATCCCC CGCATGGAGG
CACCCCGGGC ACAAGTGGTA GTAGTTGCCC TCGGACGTGA TGAAATGTTC GTTCATAGAC GCGCACCTCG AGCTTTCGGG TCAGTAGGGG GCGTACCTCC
K V A G T R I V R Q L W D Q W F P F G E V E I G P N G V L K T R Q
4701 GGAAGGTGGC CGGGACCCGC ATCGTGCGCC AGCTGTGGGA CCAGTGGTTC CCTTTTGGCG AGGTGGAAAT CGGCCCCAAC GGCGTGCTGA AGACCAAGCA
CCTTCCACCG GCCCTGGGCG TAGCACGCGG TCGACACCCT GGTCACCAAG GGAAAACCGC TCCACCTTTA GCCGGGGTTG CCGCACGACT TCTGGTTCGT
G Y K F P L H I I G T G E V D S D I K M E R V V K H W E H P H I E
4801 AGGATATAAG TTCCCGCTGC ACATCATCGG GACGGGCGAA GTGGACAGCG ATATCAAGAT GGAGCGCGTG GTCAAGCACT GGGAGCACCC ACACATCGAG
TCCTATATTC AAGGGCGACG TGTAGTAGCC CTGCCCGCTT CACCTGTCGC TATAGTTCTA CCTCGCGCAC CAGTTCGTGA CCCTCGTGGG TGTGTAGCTC
A A Q T F L K K D D T G E V L Y Y G D T G V S K N P V E L V E G W F
4901 GCTGCTCAGA CCTTTCTCAA GAAGGACGAT ACCGGCGAAG TCCTGTATTA CGGCGATACG GGAGTGAGCA AGAACCCTGT GGAGCTGGTG GAAGGCTGGT
CGACGAGTCT GGAAAGAGTT CTTCCTGCTA TGGCCGCTTC AGGACATAAT GCCCCTATGC CCTCACTCGT TCTTGGGACA CCTCGACCAC CTTCCGACCA
S G W R
5001 TCAGCGGATG GCGC
AGTCGCCTAC CGCG
5101

图19A


pThV-VSV.G (NJ/IND)CO
5167 bp
VSV-G NJ/IN CO
BglII(5125)
EcoRI(1)
NotI(28)
XhoI(34)
WPREÆATG
XhoI(644)
XbaI(650)
BGH pA
KanR
NcoI(1644)
pUC ORI
NdeI(3146)
NcoI(3272)
CMV
NheI(3557)
HindIII(3573)
KpnI(3583)
BamHI(3591)

B.

图19B

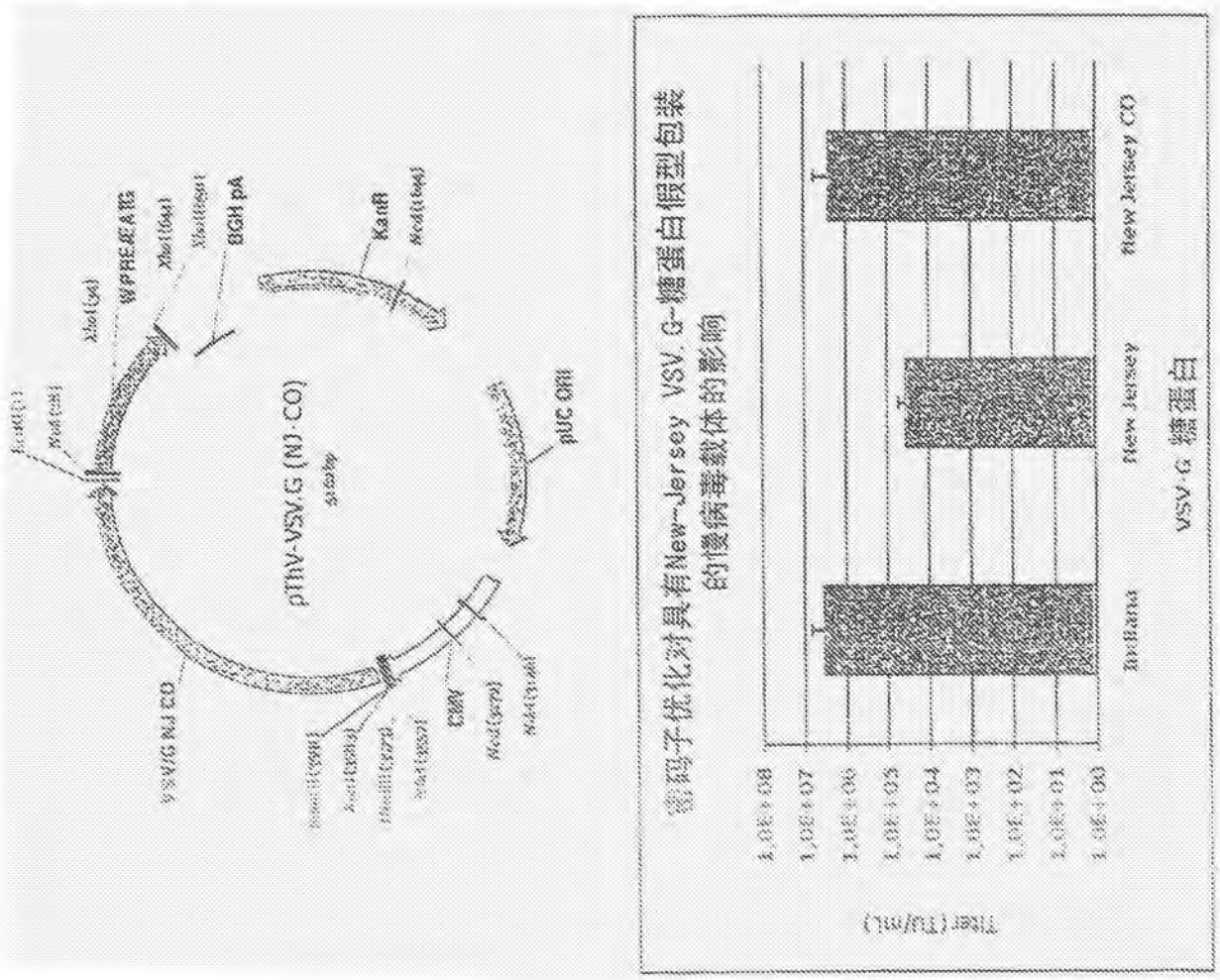

pTM-VSV G (NJ CO)
WPRE
BGH pA
KanR
pUC ORI
VSV G NJ CO
CMV
密码子优化对具有New-Jersey VSV G-糖蛋白假型包装的慢病毒载体的影响
Titer (TU/mL)
1.0E+08
1.0E+07
1.0E+06
1.0E+05
1.0E+04
1.0E+03
1.0E+02
1.0E+01
1.0E+00
Indiana
New Jersey
New Jersey CO
VSV-G 糖蛋白

图20

A.

MASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSL
YNTVATLYCVHQRIEVKDTKEALDKIEEEQNKSKKKAQQAAADTNHSSQVSQNYPIVQNLQGQMVHQAISPRTLN
AWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRLHPVHAGPIAPGQM
REPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKT
LRAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLAEAMSQVTNSATIMM
QRGNFRNQRKTVKCFNCGKEGHIAKNCRAPRKKGCWKCGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSHKGRPGNFLQSRP
EPTAPPEESFRFGEETTTPSQKQEPIDKELYPLASLRSLFGND

B.

KKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFRKQNPD
IVIYQYMDDLYVGSDLEIGQHRTEILKEPVHGVY

C.

VGFPVRPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIYSQKRQDILDLWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGIRYPLTFG
WCFKLVPVDPEKEVLVWKFDSRLAFHHMARELHPEYYapvkqtlnfdllklagdvesnpgp

D.

MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEEL
RSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEEQNKSKKKAQQAAADTGHSSQVSQNYPIVQNIQGQMVHQAISPR
TLNAWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAP
GQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRF
YKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLAEAMSQVTNSAT
IMMQRGNFRNQRKIVKCFNCGKEGHIARNCRAPRKKGCWKCGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSYKGRPGNFLQ
SRPEPTAPPFLQSRPEPTAPPEESFRSGVETTTPSQKQEPIDKELYPLTSLRSLFGNDPSSQ

E.

ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGA
AAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTG
TTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTT
AGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCT
TTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGACACAGC
AGCCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCAAATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGA
ACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTCAGCATTA
TCAGAAGGAGCCACCCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAATG
TTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAGTGCATCCAGTGCATGCAGGGCCTATTGCACCA
GGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAACTACTAGTACCCTTCAGGAACAAATAGGATGGATG
ACAAATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAATTTATAAAAGATGGATAATCCTGGGATTAAATAAAATAGTAAGA
ATGTATAGCCCTACCAGCATTCTGGACATAAGACAAGGACCAAAAGAACCCTTTAGAGACTATGTAGACCGGTTC
TATAAAACTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTCACAGGAGGTAAAAAATTGGATGACAGAAACCTTGTTGGTCCAAAAT
GCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTTAAAAGCATTGGGACCAGCAGCTACACTAGAAGAAATGATGACAGCATGT
CAGGGAGTGGGAGGACCCGGCCATAAGGCAAGAGTTTTGGCTGAAGCAATGAGCCAAGTAACAAATTCAGCTACC
ATAATGATGCAAAGAGGCAATTTTAGGAACCAAAGAAAGATTGTTAAGTGTTTCAATTGTGGCAAAGAAGGGCAC
ATAGCCAGAAATTGCAGGGCCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGACACCAAATGAAAGAT
TGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCCTACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTTCTTCAG
AGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTC
AGGTCTGGGGTAGAGACAACAACTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAACTGTATCCTTTAACTTCC
CTCAGATCACTCTTTGGCAACGACCCCTCGTCACAATAA

图21

Ag1
Gag
Pol/Nef 片段
Ag2
Gag
Pol/Nef 片段
Ag3
Pol/Nef 片段
Gag
Ag4
Pol/Nef 片段
Gag

图22

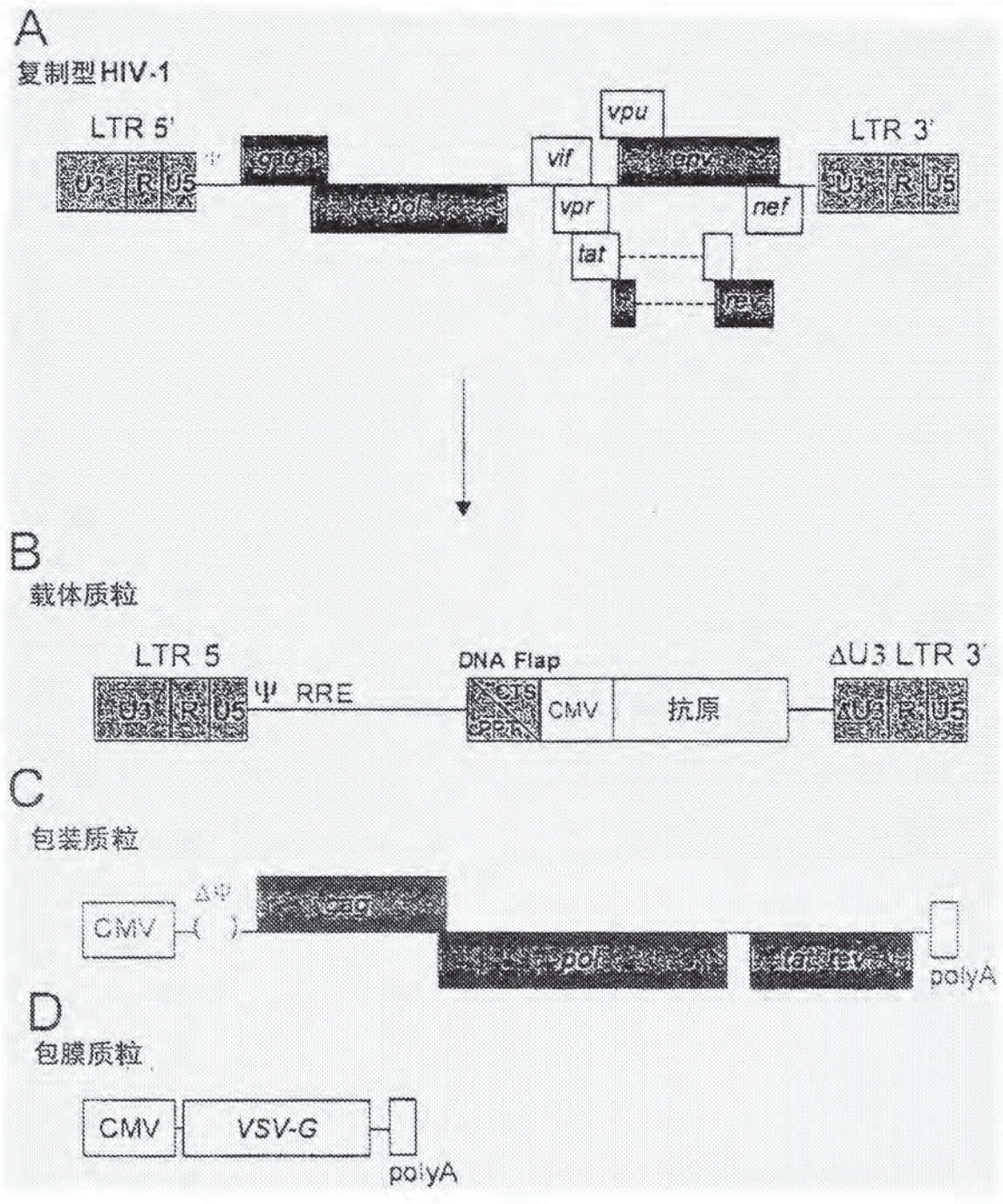

A
复制型HIV-1
LTR 5'
U3
R
U5
gag
pol
vif
vpu
env
vpr
tat
rev
nef
LTR 3'
B
载体质粒
LTR 5
Ψ RRE
DNA Flap
CTS
PPT
CMV
抗原
ΔU3 LTR 3'
C
包装质粒
CMV
ΔΨ
gag
pol
tat rev
polyA
D
包膜质粒
CMV
VSV-G
polyA

图23

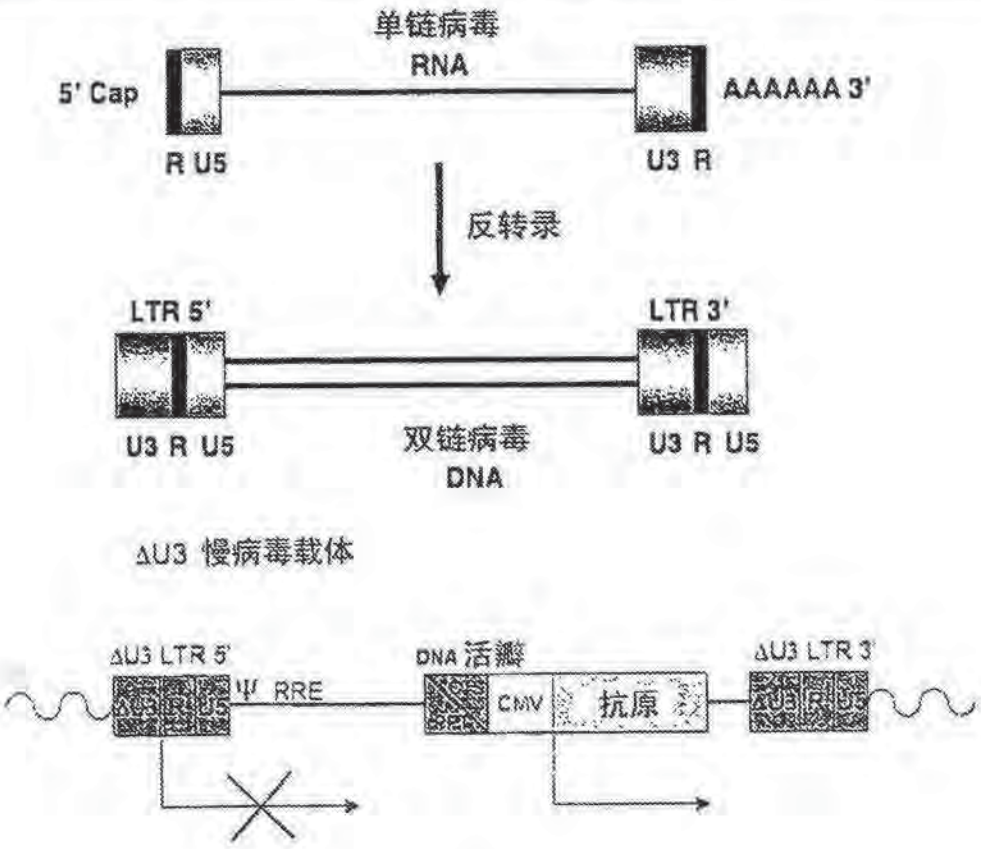
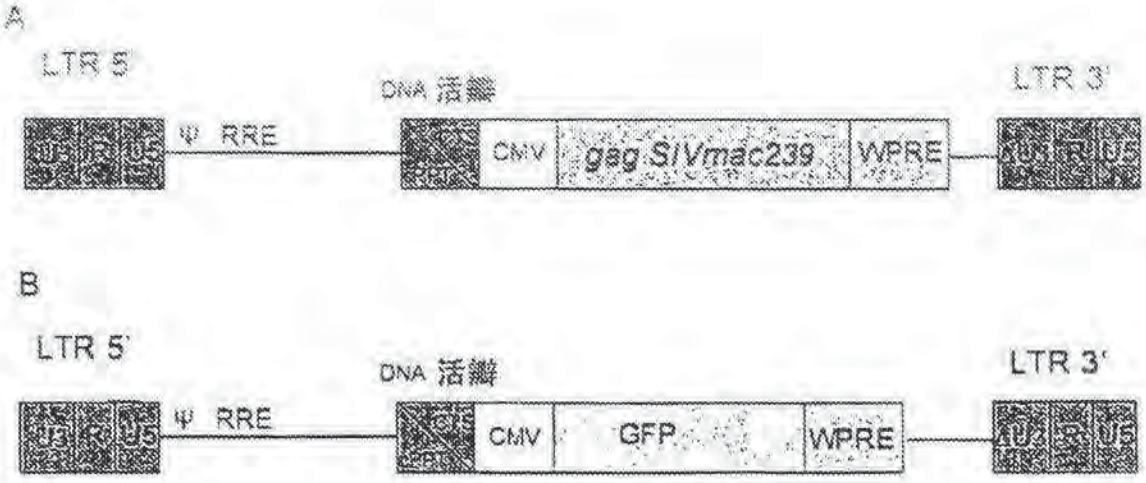
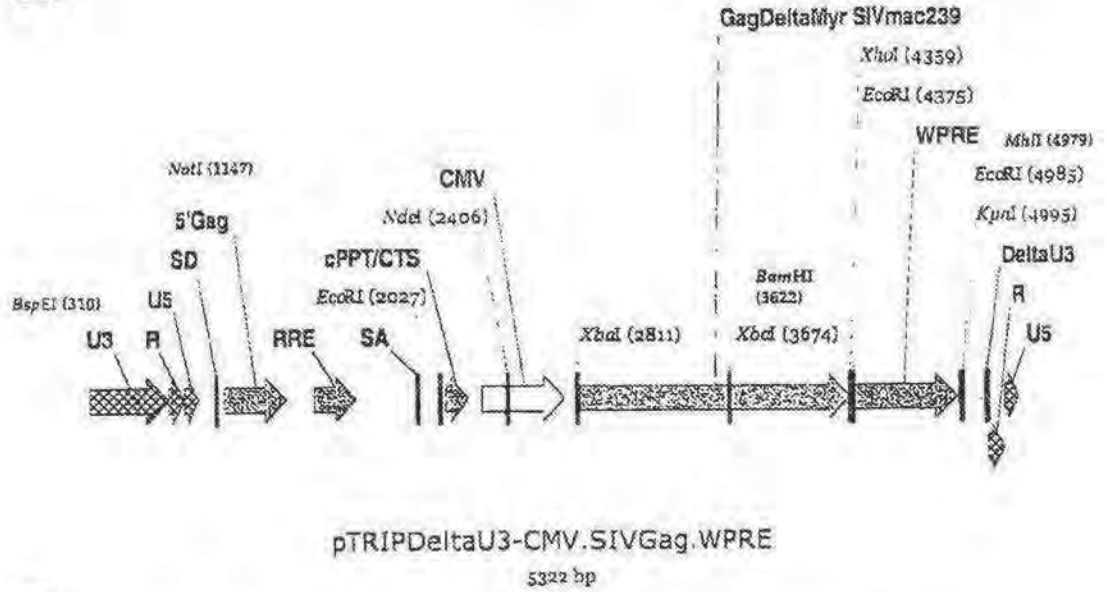

单链病毒
RNA
5' Cap
AAAAAA 3'
R U5
U3 R
反转录
LTR 5'
LTR 3'
U3 R U5
双链病毒
DNA
U3 R U5
ΔU3 慢病毒载体
ΔU3 LTR 5'
Ψ RRE
DNA 活瓣
CMV
抗原
ΔU3 LTR 3'

图24


A
LTR 5'
DNA 活瓣
LTR 3'
Ψ RRE
CMV
gag SIVmac239
WPRE
B
LTR 5'
DNA 活瓣
LTR 3'
Ψ RRE
CMV
GFP
WPRE

C1.

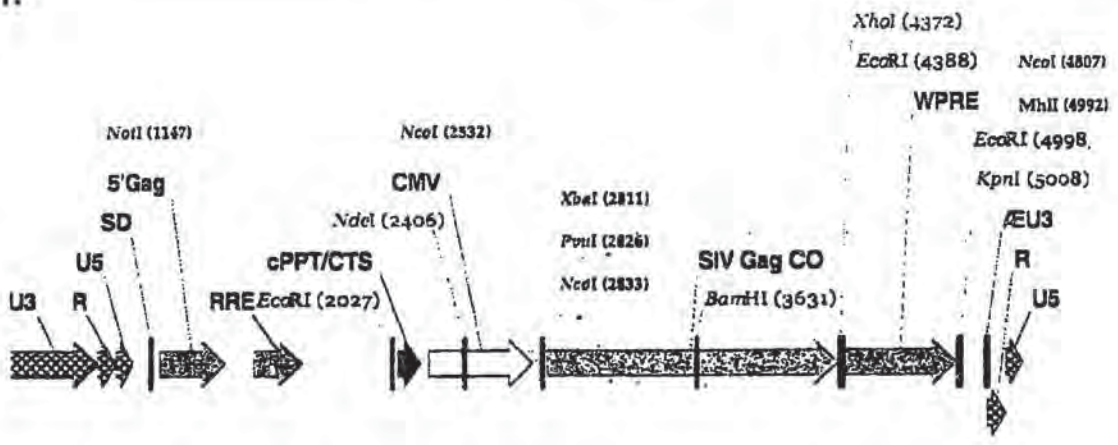


C2.

tggaagggctaattcactcccaacgaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggc
tacttccctgattagcagaactacacaccagggccagggatcagatatccactgacctttggatggtg
ctacaagctagtaccagttgagccagagaagttagaagaagccaacaaaggagagaacaccagcttgt
tacaacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtggaggtttgacagc
cgcctagcatttcatcacggtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgag
cttgctacaagggactttccgctgggggactttccagggaggcgtggcctgggcgggactggggagtg
gcgagccctcagatcctgcatataagcagctgctttttgcctgtactgggtctctctggttagaccag
atctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttg
agtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttt
agtcagtgtggaaaatctctagcagtggcgcccgaacagggacttgaaagcgaaagggaaaccagagg
agctctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgaggggcggcgactggtg
agtacgccaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagtattaa
gcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccagggggaaagaaaaaatataaat
taaaacatatagtatgggcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaaca
tcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttag
atcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaagg
aagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgat
cttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaatataaagtagtaa
aaattgaaccattaggagtagcacccaccaaggcaaagagaagagtggtgcagagagaaaaaagagca
gtgggaataggagctttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaat
gacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgcagcagcagaacaatttgctgaggg
ctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatc
ctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttggggttgctctggaaaactcat
ttgcaccactgctgtgccttggaatgctagttggagtaataaatctctggaacagatttggaatcaca
cgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaa
tcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaa
ttggtttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtag
gtttaagaatagtttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatcg

tttcagacccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaaggtggaga
gagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgccgaattcacaaatggc
agtattcatccacaattttaaaagaaaagggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtag
acataatagcaacagacatacaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcgg
gtttattacagggacagcagagatccactttggggcgataagcttgggagttccgcgttacataactt
acggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgt
tcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgccc
acttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatgg
cccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtatt
agtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttgact
cacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgg
gactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtggga
ggtctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgcctggagacgccatccacgctgttttg
acctccatagaagacaccgactctagaggatctgccacc**atg**gtgagaaactccgtcttgtcagggaa
gaaagcagatgaattagaaaaaattaggctacgacccaacggaaagaaaaagtacatgttgaagcatg
tagtatgggcagcaaatgaattagatagatttggattagcagaaagcctgttggagaacaaagaagga
tgtcaaaaaatactttcggtcttagctccattagtgccaacaggctcagaaaatttaaaaagccttta
taatactgtctgcgtcatctggtgcattcacgcagaagagaaagtgaaacacactgaggaagcaaaac
agatagtgcagagacacctagtggtggaaacaggaacaacagaaactatgccaaaaacaagtagacca
acagcaccatctagcggcagaggaggaaattacccagtacaacaaataggtggtaactatgtccacct
gccattaagcccgagaacattaaatgcctgggtaaaattgatagaggaaaagaaatttggagcagaag
tagtgccaggatttcaggcactgtcagaaggttgcaccccctatgacattaatcagatgttaaattgt
gtgggagaccatcaagcggctatgcagattatcagagatattataaacgaggaggctgcagattggga
cttgcagcacccacaaccagctccacaacaaggacaacttagggagccgtcaggatcagatattgcag
gaacaactagttcagtagatgaacaaatccagtggatgtacagacaacagaaccccataccagtaggc
aacatttacaggagatggatccaactggggttgcaaaaatgtgtcagaatgtataacccaacaaacat
tctagatgtaaaacaagggccaaaagagccatttcagagctatgtagacaggttctacaaaagtttaa
gagcagaacagacagatgcagcagtaaagaattggatgactcaaacactgctgattcaaaatgctaac
ccagattgcaagctagtgctgaaggggctgggtgtgaatcccaccctagaagaaatgctgacggcttg
tcaaggagtagggggccgggacagaaggctagattaatggcagaagccctgaaagaggccctcgcac
cagtgccaatcccttttgcagcagcccaacagaggggaccaagaaagccaattaagtgttggaattgt
gggaaagagggacactctgcaaggcaatgcagagccccaagaagacagggatgctggaaatgtggaaa
aatggaccatgttatggccaaatgcccagacagacaggcgggtttttaggccttggtccatggggaa
agaagccccgcaatttccccatggctcaagtgcatcaggggctgatgccaactgctcccccagaggac
ccagctgtggatctgctaaagaactacatgcagttgggcaagcagcagagagaaaagcagagagaaag
cagagagaagccttacaaggaggtgacagaggatttgctgcacctcaattctctctttggaggagacc
agtagctcgagctcaagcttcgaattcccgataatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattg
actggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatca
tgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatg
aggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccact
ggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttcccccctccctattgccac
ggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaatt
ccgtggtgttgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgcctgtgttgccacctggattctg
cgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgct
gccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttgggccg
cctccccgcgtcgacgcgtgaattcggtacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatctt
agccactttttaaaagaaaagggggggactggaagggctaattcactcccaacgaagacaagatcgtcg
agagatgctgcatataagcagctgctttttgcttgtactgggtctctctggttagaccagatctgagc
ctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttc
aagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagaccctttagtcagtg
tggaaaatctctagcagt

D1.



pTRIPDeltaU3-CMV-SIVGag CO-WPRE

5335 bp

D2.

tggaagggctaattcactcccaacgaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggc
tacttccctgattagcagaactacacaccagggccagggatcagatatccactgacctttggatggtg
ctacaagctagtaccagttgagccagagaagttagaagaagccaacaaaggagagaacaccagcttgt
tacaacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtggaggtttgacagc
cgcctagcatttcatcacggtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgag
cttgctacaagggactttccgctgggggactttccagggaggcgtggcctgggcgggactggggagtg
gcgagccctcagatcctgcatataagcagctgctttttgcctgtactgggtctctctggttagaccag
atctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttg
agtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttt
agtcagtgtggaaaatctctagcagtggcgcccgaacagggacttgaaagcgaaagggaaaccagagg
agctctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgaggggcggcgactggtg
agtacgccaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagtattaa
gcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccagggggaaagaaaaaatataaat
taaaacatatagtatgggcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaaca
tcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttag
atcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaagg
aagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgat
cttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaatataaagtagtaa
aaattgaaccattaggagtagcacccaccaaggcaaagagaagagtggtgcagagagaaaaaagagca
gtgggaataggagctttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaat
gacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgcagcagcagaacaatttgctgaggg
ctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatc
ctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttggggttgctctggaaaactcat
ttgcaccactgctgtgccttggaatgctagttggagtaataaatctctggaacagatttggaatcaca
cgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaa
tcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaa
ttggtttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtag
gtttaagaatagtttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatcg

tttcagacccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaaggtggaga
gagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgccgaattcacaaatggc
agtattcatccacaattttaaaagaaaagggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtag
acataatagcaacagacatacaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcgg
gtttattacagggacagcagagatccactttggggcgataagcttgggagttccgcgttacataactt
acggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgt
tcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgccc
acttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatgg
cccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtatt
agtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttgact
cacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgg
gactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtggga
ggtctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgcctggagacgccatccacgctgttttg
acctccatagaagacaccgactctagaggatctcgatcggccaccatgggcgtgcgcaacagcgtgct
gagcggcaagaaggccgacgagctggagaagatccgcctgcgccccaacggcaagaagaagtacatgc
tgaagcacgtggtgtgggccgctaacgagctggaccggttcggcctggccgagagcctgctggagaac
aaggagggctgccagaagatcctgagcgtgctggcccctctggtgcccaccggcagcgagaacctgaa
gagcctgtacaacaccgtgtgcgtgatctggtgcatccacgccgaggagaaggtgaagcacaccgagg
aggccaagcagatcgtgcagcgccacctggtggtggagaccggcaccaccgagaccatgcccaagacc
agcaggcccaccgcccctagcagcggcagaggcgggaactaccccgtgcagcagatcggcggcaacta
cgtgcacctgcccctgagccccaggaccctgaacgcctgggtgaagctgatcgaggagaagaagttcg
gcgctgaggtggtgcccggcttccaggccctgagcgagggctgcaccccctacgacatcaaccagatg
ctgaactgcgtgggcgaccaccaggccgccatgcagatcatccgcgacatcatcaacgaggaagccgc
cgactgggacctgcagcacccccagcctgccccccagcagggccagctgcgcgagcccagcggctccg
acatcgccggcaccaccagcagcgtcgacgagcagatccagtggatgtaccgccagcagaaccccatc
cccgtgggcaacatctaccgccgctggatccagctgggcctgcagaagtgcgtgcgcatgtacaaccc
caccaacatcctggacgtgaagcagggccccaaggagcccttccagagctacgtggaccgcttctaca
agagcctgagggccgagcagaccgatgccgccgtgaagaactggatgacccagaccctgctgatccag
aacgccaaccccgactgcaagctggtgctgaagggcctgggcgtgaaccccaccctggaggagatgct
gaccgcctgccagggcgtgggaggacctggccagaaggccaggctgatggccgaagccctgaaggagg
ccctggcccctgtgcccatccccttcgccgctgcccagcagaggggccctcgcaagcccatcaagtgt
tggaactgcggcaaggagggccacagcgccaggcagtgccgcgctccccgcaggcagggctgctggaa
gtgtgggaagatggaccacgtgatggccaagtgccccgaccgccaggccggcttcctgggcctgggcc
cctgggggaagaagccccgcaacttccctatggcgcaggtgcaccagggcctcatgcctaccgcccct
cccgaggaccctgccgtggacctgctgaagaactacatgcagctgggcaagcagcagcgcgagaagca
gcgcgagagccgcgagaagccctacaaggaggtgaccgaggacctgctgcacctgaacagcctgttcg
gcggagaccagtaatgaactcgagctcaagcttcgaattcccgataatcaacctctggattacaaaat
ttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgctgctttaa
tgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggttg
ctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctga
cgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccc
tccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttg
ggcactgacaattccgtggtgttgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgcctgtgttgc
cacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttcctt
cccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatc
tccctttgggccgcctccccgcgtcgacgcgtgaattcggtacctttaagaccaatgacttacaaggc
agctgtagatcttagccactttttaaaagaaaagggggggactggaagggctaattcactcccaacgaa
gacaagatcgtcgagagatgctgcatataagcagctgctttttgcttgtactgggtctctctggttag
accagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttg
ccttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacc
cttttagtcagtgtggaaaatctctagcagt

图25

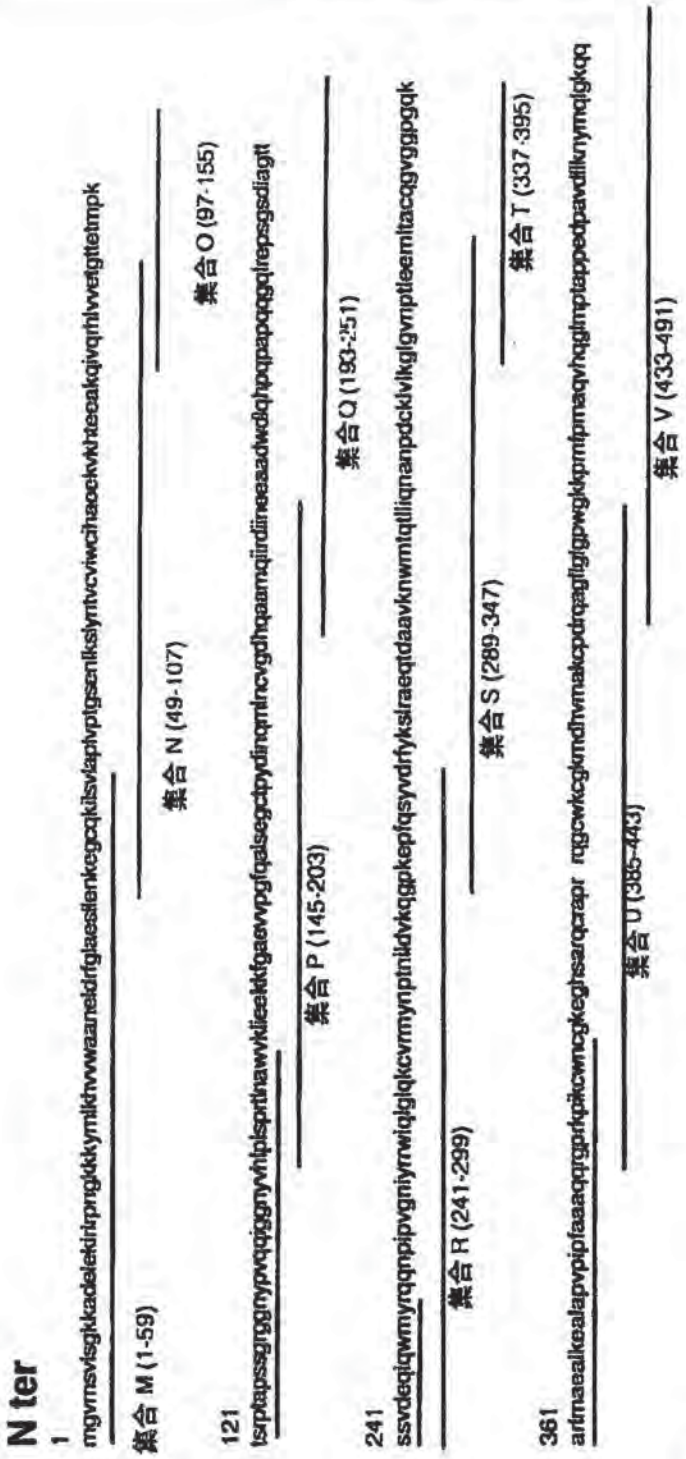

N ter
1
mgvrnsvlsgikkadelekdirlrpngkkkymlkthvwwaanelqrfglaesllenkegcqkilsvlaphvptgsenlksiyntvcvlwcihaeckvkhteeakqivqrhlvvetgttetmpk
集合 M (1-59)
集合 N (49-107)
集合 O (97-155)
121
tsrptapssgrggrnypvqqrgsgnyvhlpsprthawvkliealktfgaevvpgfqalseqcfpydinqmlrcvgdhqaamqiirdlnseaaadwdlqhpqpapqqgqlrepsgsdiagtt
集合 P (145-203)
集合 Q (193-251)
241
ssvdeqiqwmyrqqnpipvgnlyrrwiqlglqkcvrmynpthlkdvkqgpkepfqsyvdrfykslraeqtdaavknwmtqtliqnanpdcklvlkglgvnptleemltacqgvggpgqk
集合 R (241-299)
集合 S (289-347)
集合 T (337-395)
361
arlmaeallkealapvpipfaaaqqrgprkpikcwncgkeghsarqcrapr rqgcwkcgkmdhvmaikcpdrqagfigfgpwgkkprnlpmaqvhqglmptapqedpavdflknymdlgkqq
集合 U (385-443)
集合 V (433-491)
481
rakqreserkpykevtadilhlnsllggdq
集合 W (481-511)
C ter

图26

A.

PCR	Oligos	序列 5' → 3'
U5R 正向引物	M667	GGCTAACTAGGGAACCCACTG
U5R 反向引物	AASM	GCTAGAGATTTTCCACACTGACTAA
U5R 3' 末端供体探针	LTR FL	CACAACAGACGGGCACACACTACTTGA-FL
U5R 5' 末端供体探针	LTR LC	LC-CACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGGC
CD3 正向引物	CD3在5'	GGCTATCATTCTTCTTCAAGGTA
CD3 反向引物	CD3在3'	CCTCTCTTCAGCCATTTAAGTA
CD3 3' 末端供体探针	CD3 FL	GGCTGAAGGTTAGGGATACCAATATTCCTGTCTC-FL
CD3 5' 末端供体探针	CD3 LC	LC-CTAGTGATGGGCTCTTCCCTTGAGCCCTTC

	循环的步骤和数目	温度	持续时间
1 个循环	1: 变性	95°C	3 min
40 个循环	2: 变性	95°C	5 sec
	3: 退火	57°C	10 sec
	4: 延长	72°C	8 sec

B.

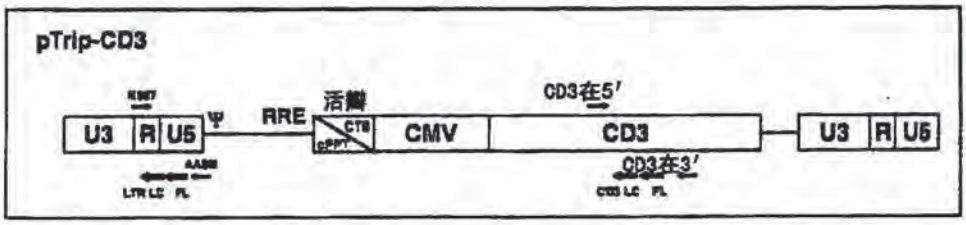


图27

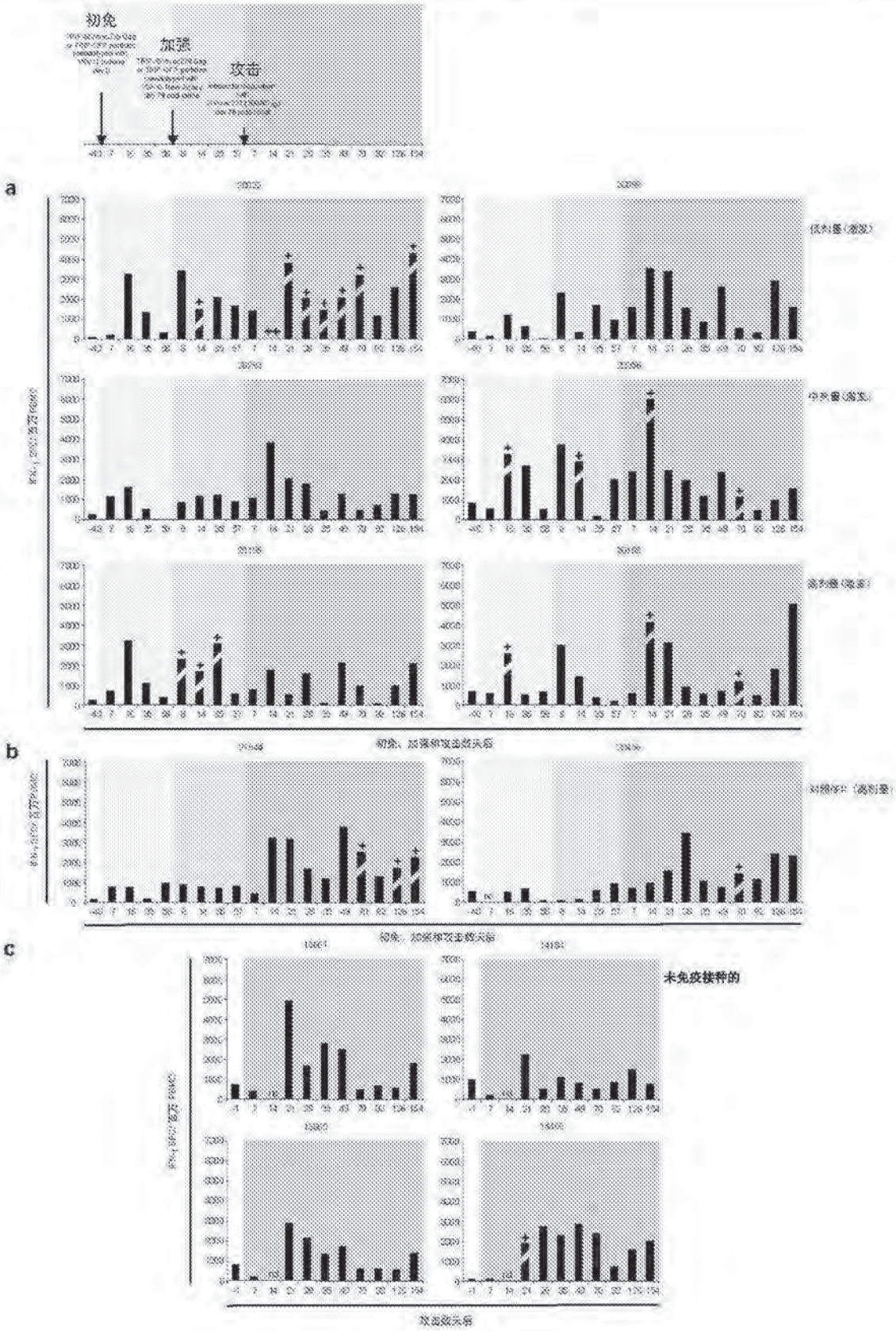


图28(1)

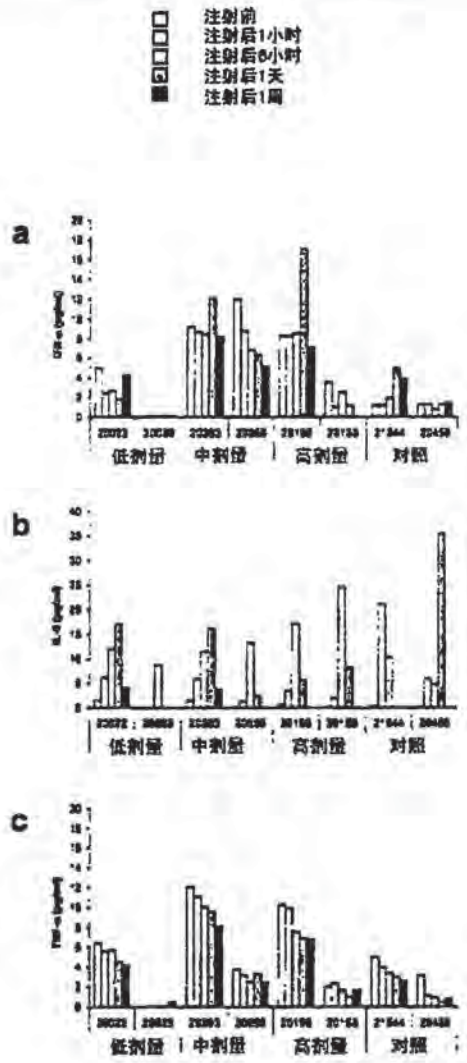

注射前
注射后1小时
注射后6小时
注射后1天
注射后1周
a
低剂量
中剂量
高剂量
对照
b
低剂量
中剂量
高剂量
对照
c
低剂量
中剂量
高剂量
对照

图28(2)

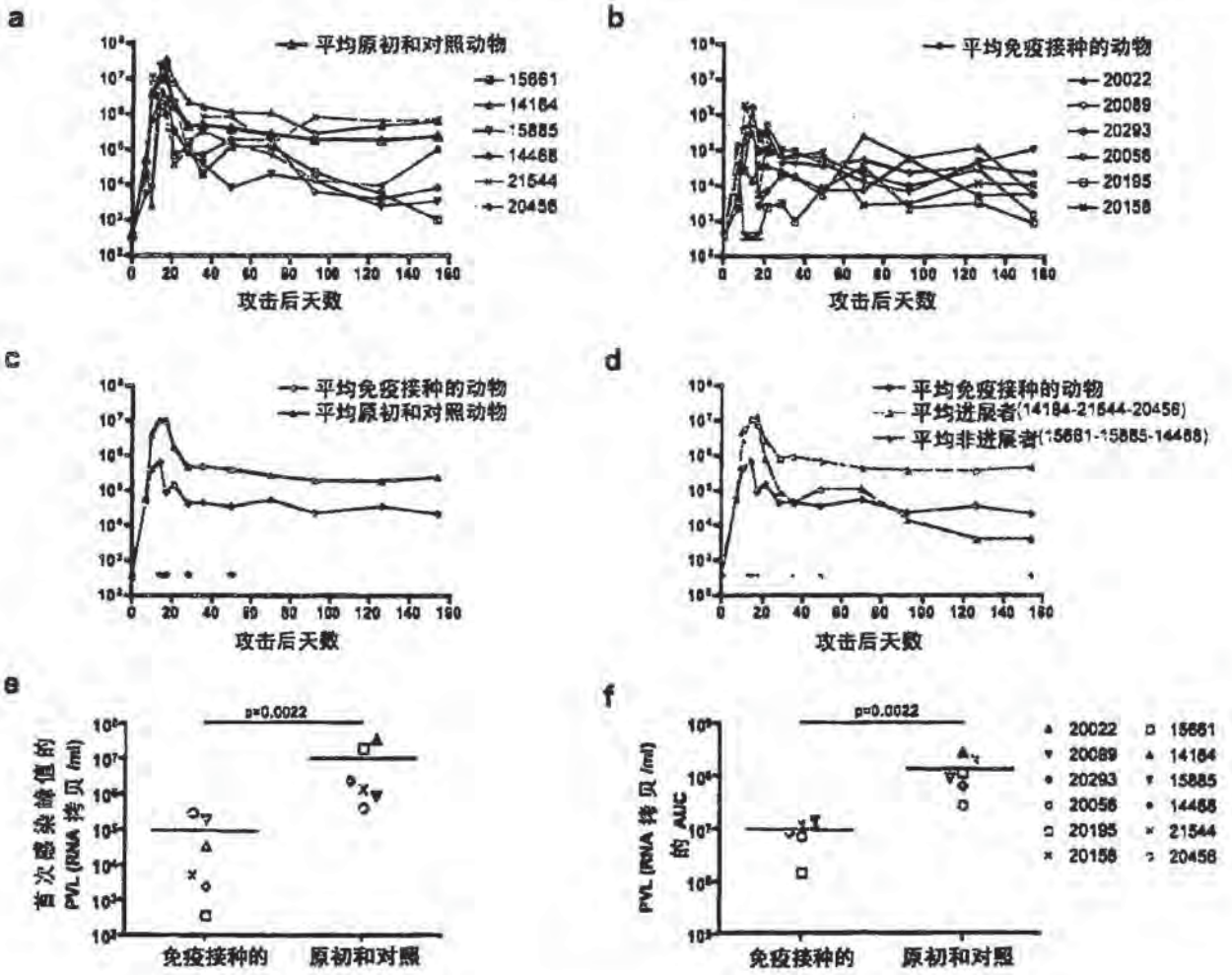

a
平均原初和对照动物
15661
14164
15885
14468
21544
20456
攻击后天数
b
平均免疫接种的动物
20022
20089
20293
20056
20195
20158
攻击后天数
c
平均免疫接种的动物
平均原初和对照动物
攻击后天数
d
平均免疫接种的动物
平均进展者(14164-21544-20456)
平均非进展者(15661-15885-14468)
攻击后天数
e
p=0.0022
首次感染峰值的 PVL (RNA 拷贝 /ml)
免疫接种的
原初和对照
f
p=0.0022
PVL (RNA 拷贝 /ml) 的 AUC
20022
20089
20293
20056
20195
20158
15661
14164
15885
14468
21544
20456
免疫接种的
原初和对照

图29 (1)

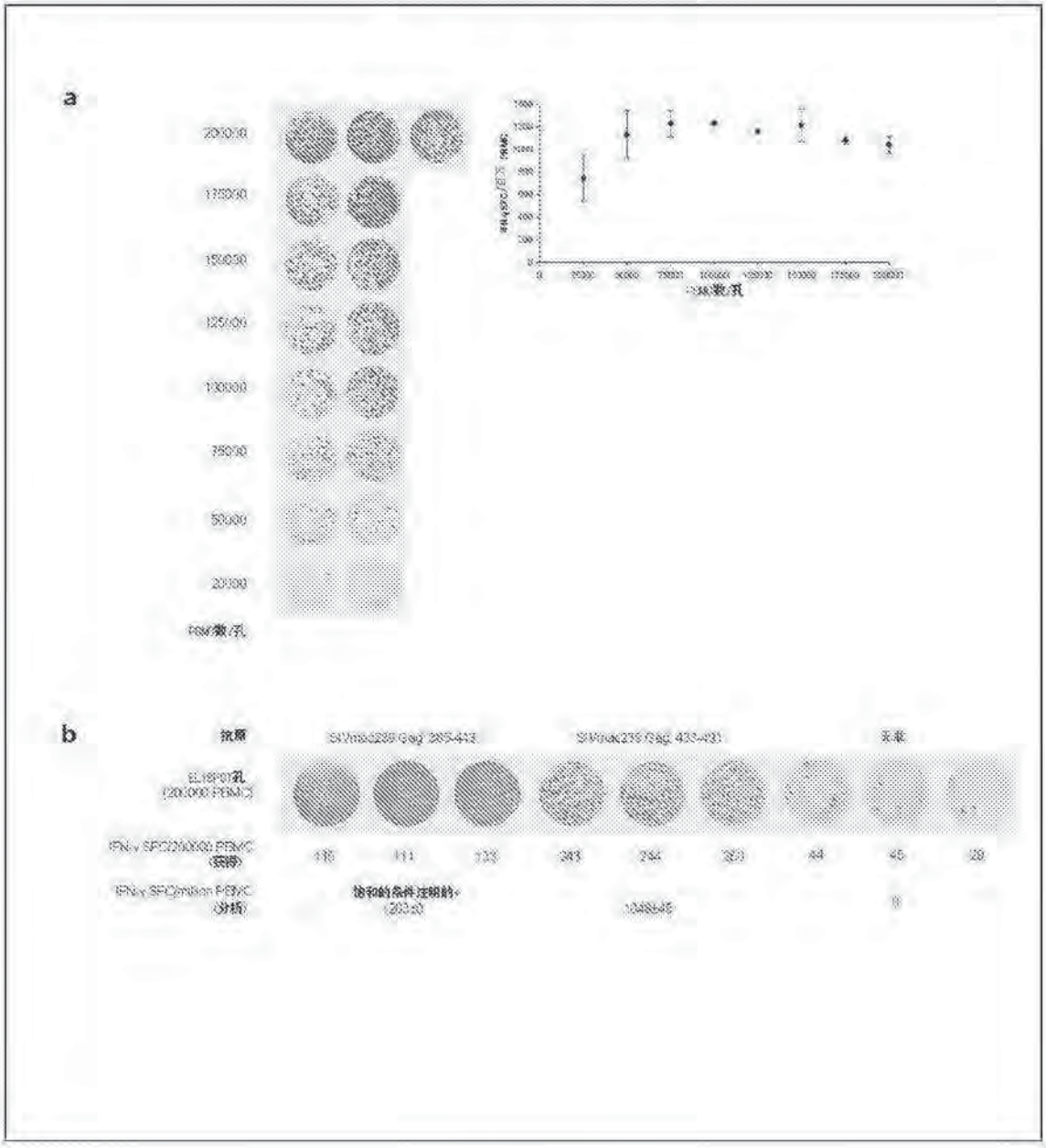


图29 (2)

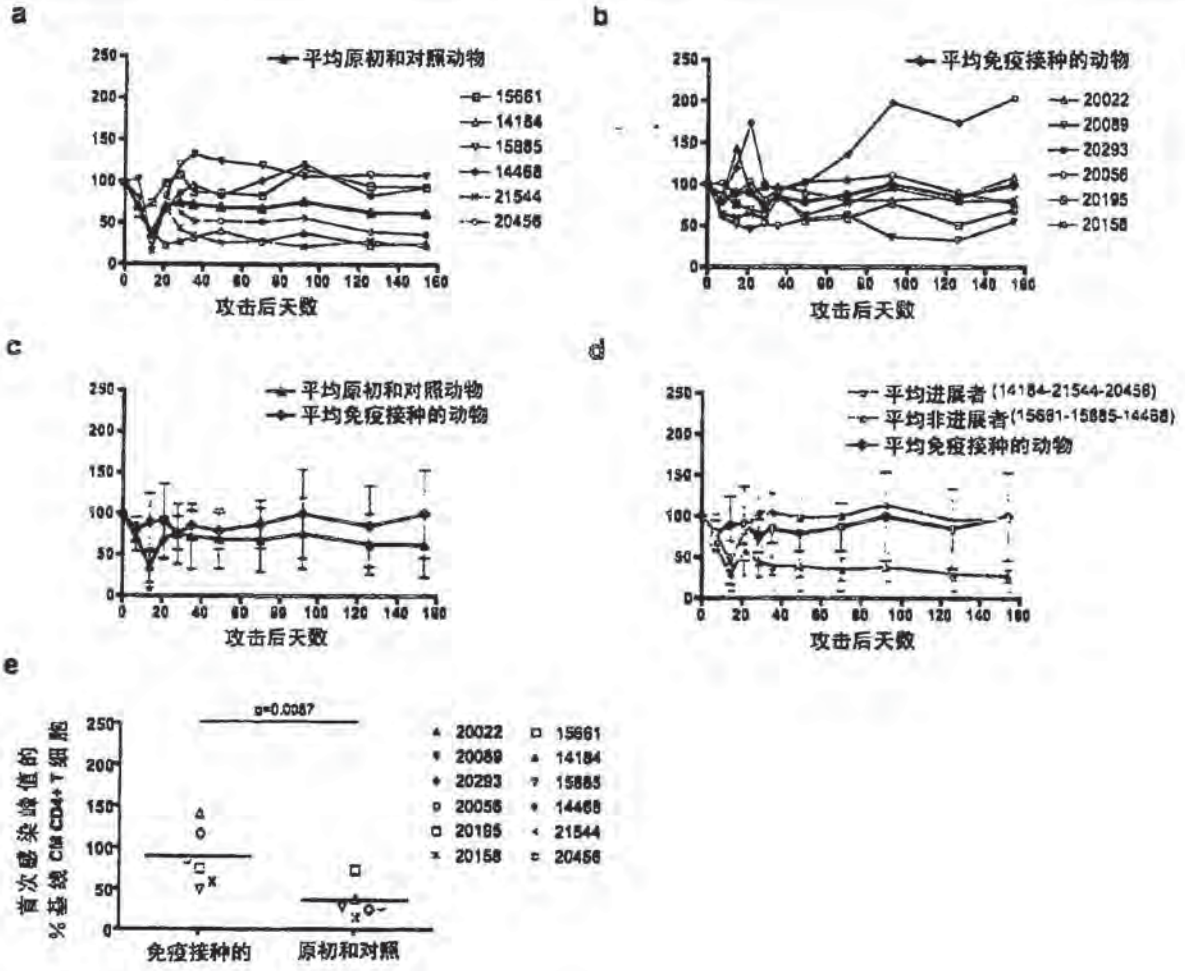

a
平均原初和对照动物
15661
14184
15885
14468
21544
20456
攻击后天数
b
平均免疫接种的动物
20022
20089
20293
20056
20195
20158
攻击后天数
c
平均原初和对照动物
平均免疫接种的动物
攻击后天数
d
平均进展者(14184-21544-20456)
平均非进展者(15661-15885-14468)
平均免疫接种的动物
攻击后天数
e
p=0.0087
首次感染峰值的
% 基线 CM CD4+ T 细胞
20022
20089
20293
20056
20195
20158
15661
14184
15885
14468
21544
20456
免疫接种的
原初和对照

图30(1)

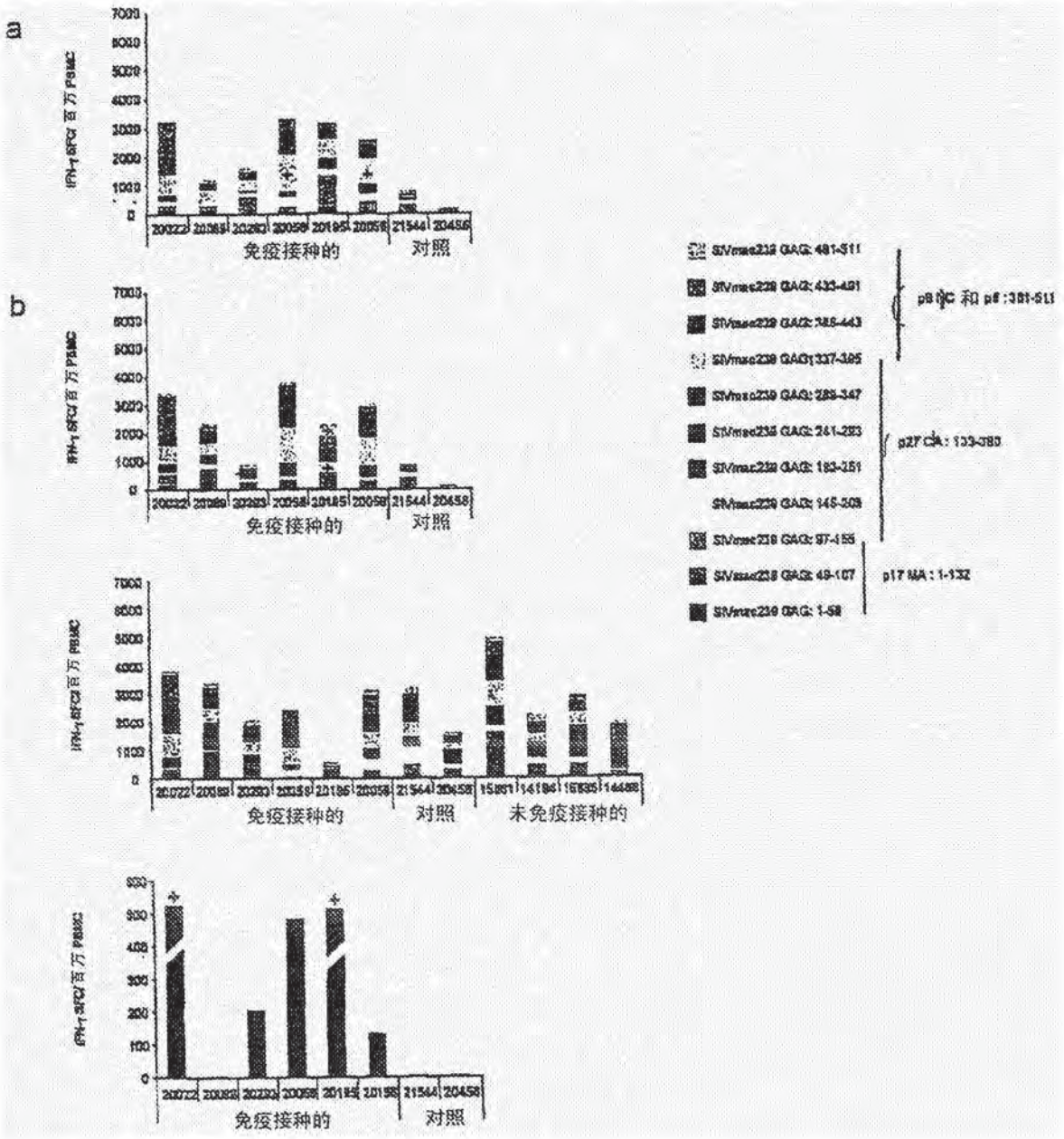


图30(2)

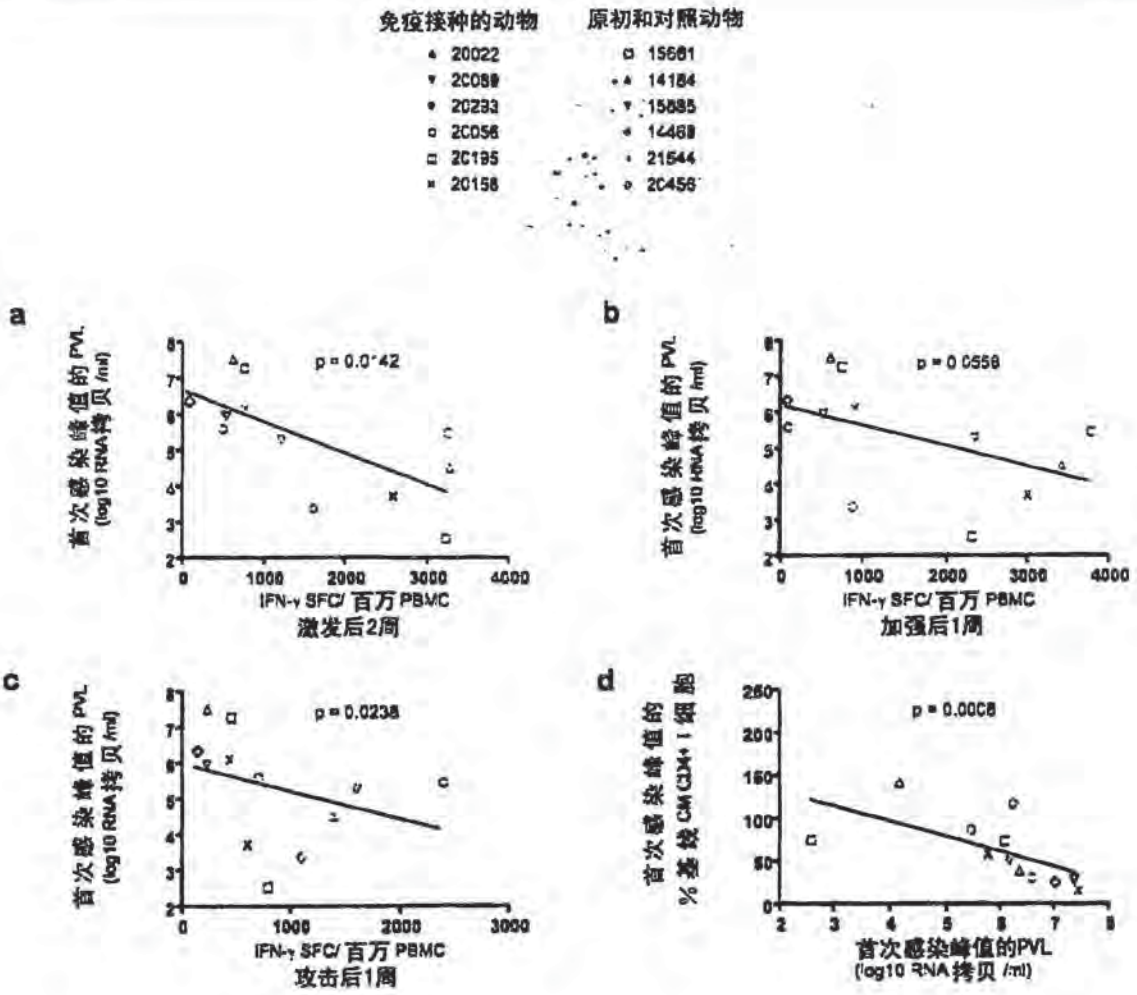

免疫接种的动物
20022
2C089
20233
2C056
2C195
20158
原初和对照动物
15661
14184
15885
14469
21544
2C456
a
首次感染峰值的PVL (log10 RNA拷贝/ml)
p = 0.0042
IFN-γ SFC/百万PBMC
激发后2周
b
首次感染峰值的PVL (log10 RNA拷贝/ml)
p = 0.0558
IFN-γ SFC/百万PBMC
加强后1周
c
首次感染峰值的PVL (log10 RNA拷贝/ml)
p = 0.0238
IFN-γ SFC/百万PBMC
攻击后1周
d
首次感染峰值的 % 基线 CM CD4+ T 细胞
p = 0.0008
首次感染峰值的PVL
(log10 RNA拷贝/ml)

图31 (1)

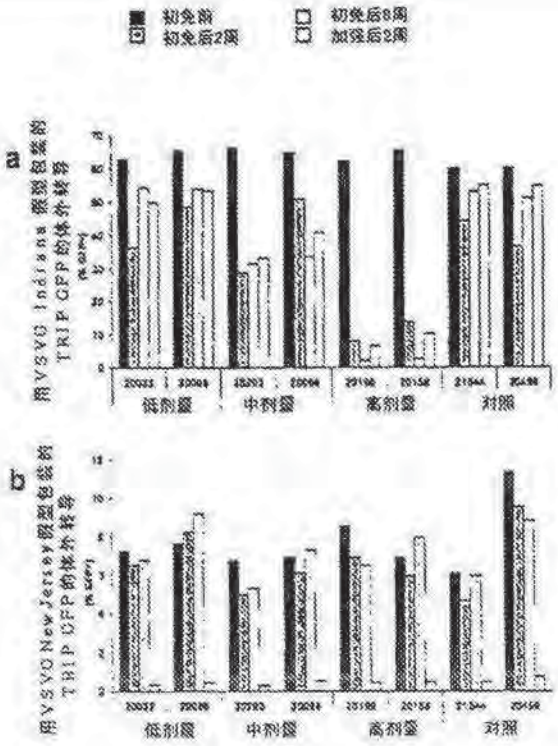

初免后
初免后2周
初免后8周
加强后2周
a
用VSVG Indiana假型包装的
TRIP GFP的体外转导
b
用VSVG New Jersey假型包装的
TRIP GFP的体外转导
低剂量
中剂量
高剂量
对照

图31 (2)

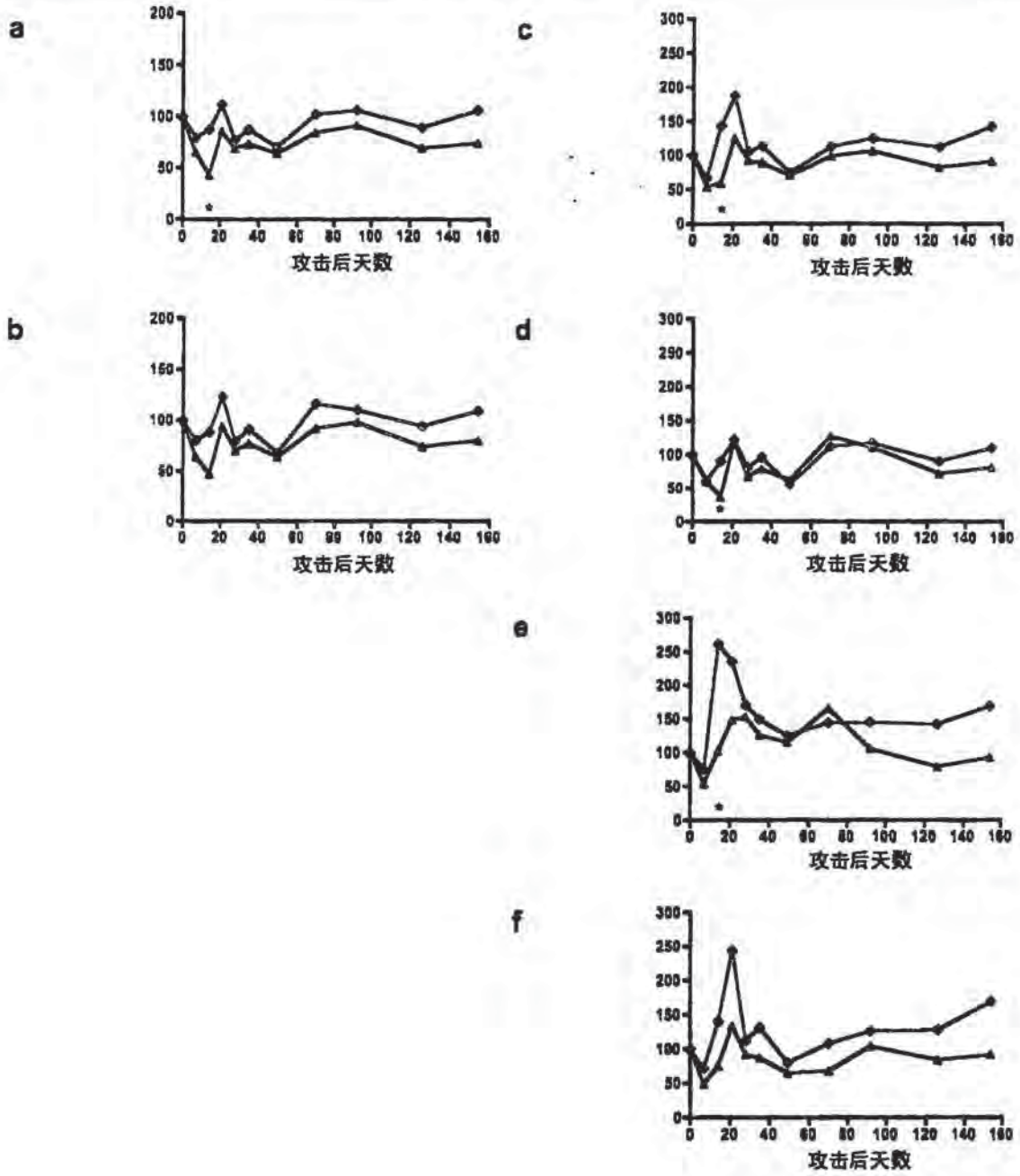


图32

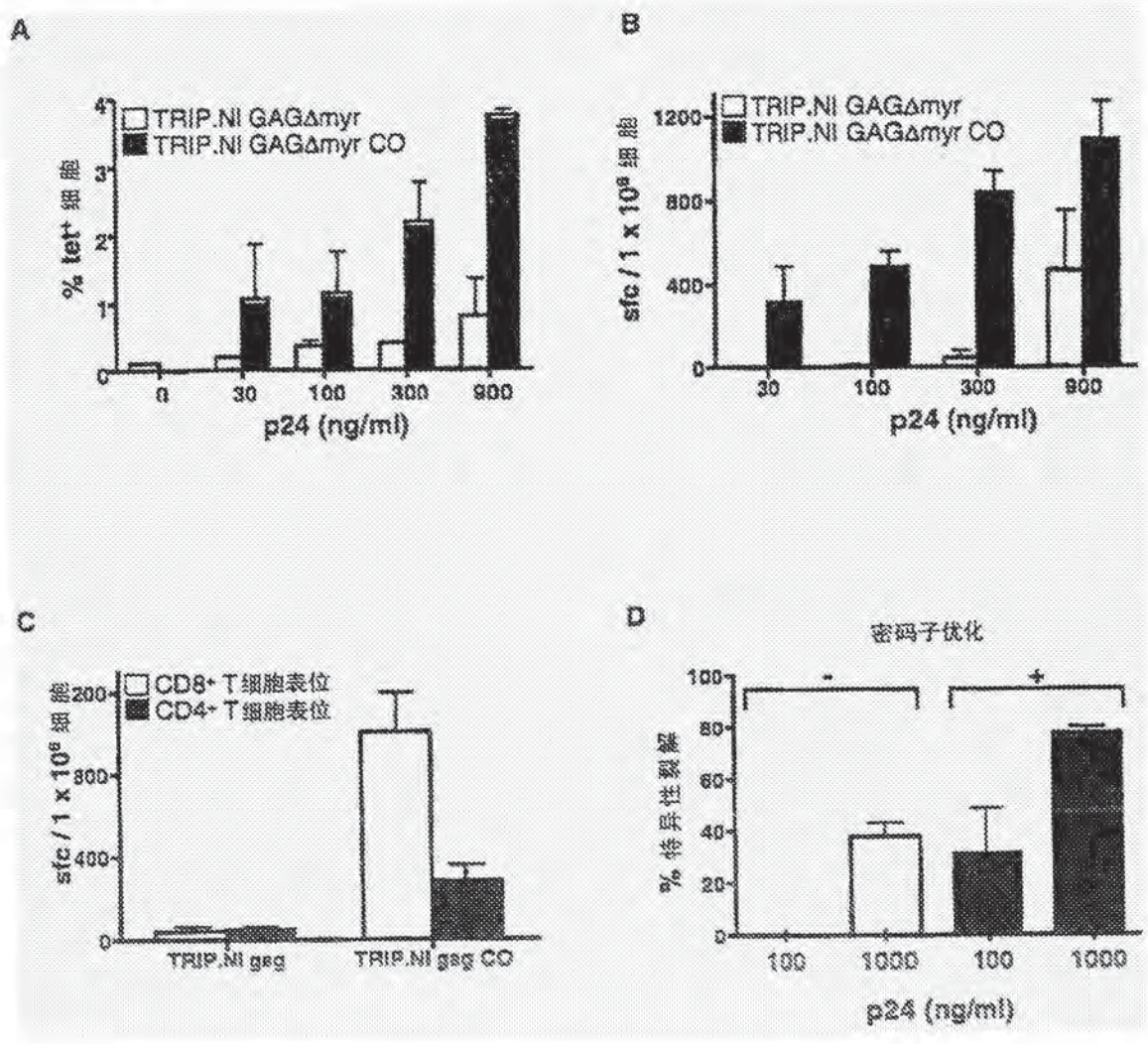

A
TRIP.NI GAGΔmyr
TRIP.NI GAGΔmyr CO
% tet+ 细胞
0
1
2
3
4
0
30
100
300
900
p24 (ng/ml)
B
TRIP.NI GAGΔmyr
TRIP.NI GAGΔmyr CO
sfc / 1 x 10⁶ 细胞
0
400
800
1200
30
100
300
900
p24 (ng/ml)
C
CD8+ T细胞表位
CD4+ T细胞表位
sfc / 1 x 10⁶ 细胞
0
400
800
1200
TRIP.NI gag
TRIP.NI gag CO
D
密码子优化
-
+
% 特异性裂解
0
20
40
60
80
100
100
1000
100
1000
p24 (ng/ml)

图33

非整合型慢病毒载体诱导的记忆T细胞应答

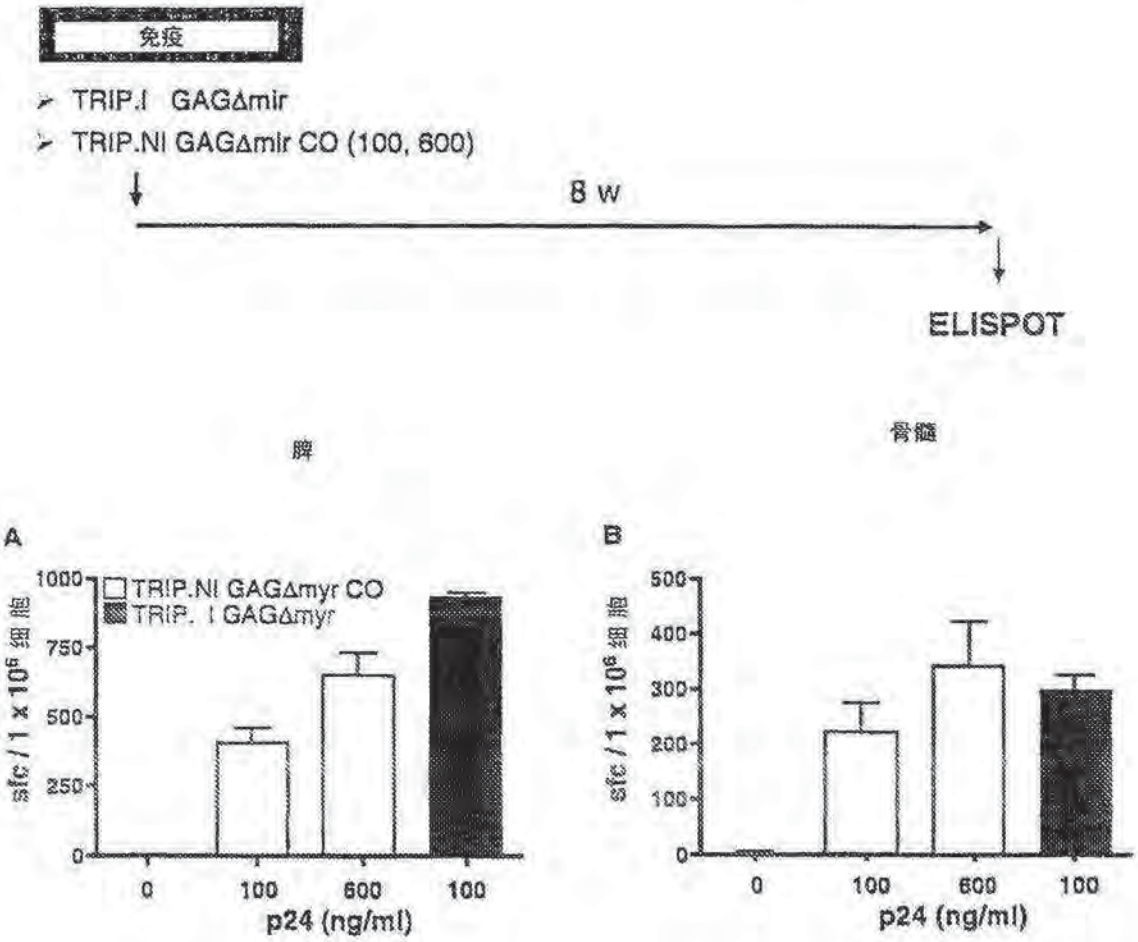


图34

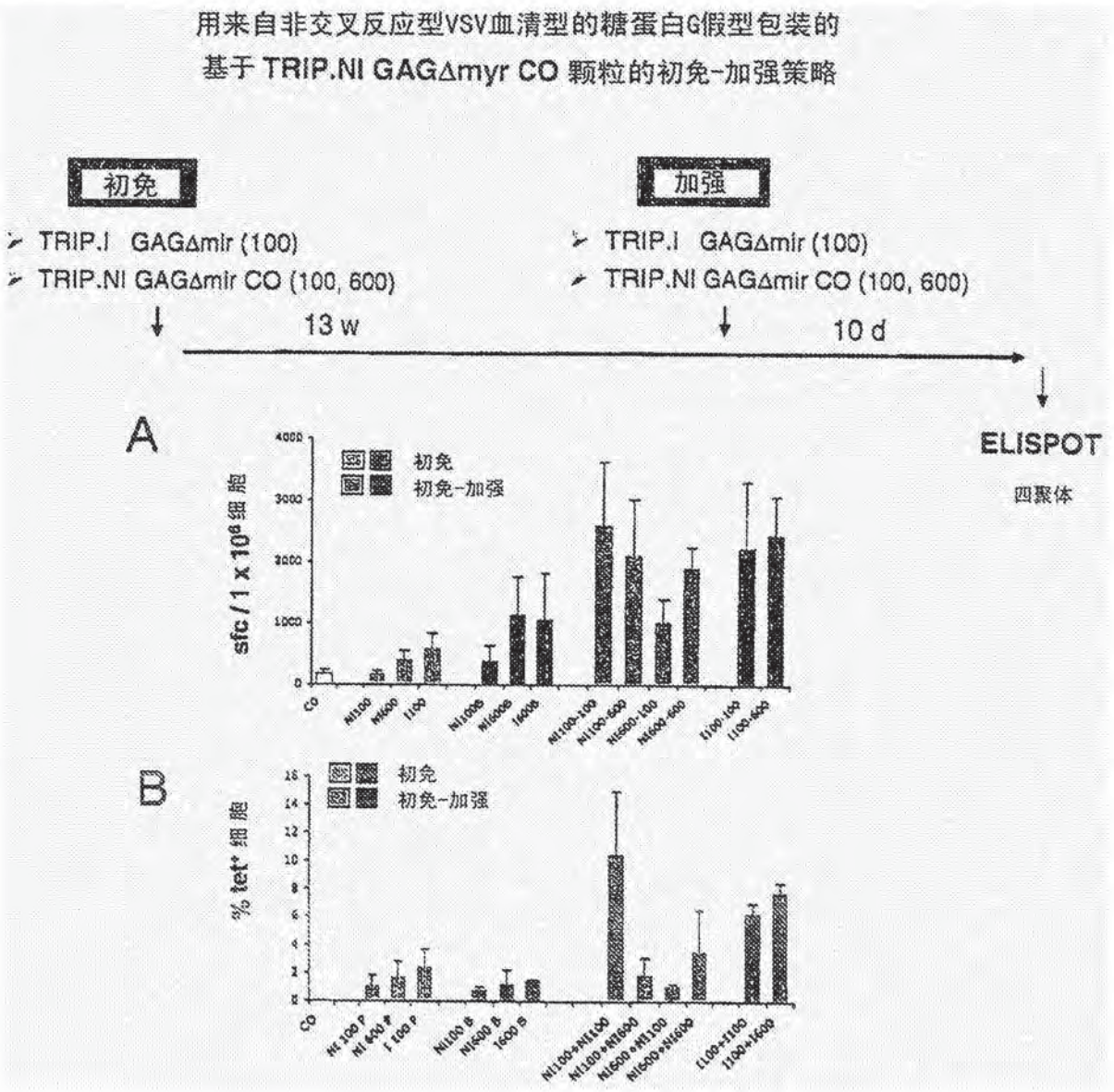

用来自非交叉反应型VSV血清型的糖蛋白G假型包装的
基于 TRIP.NI GAGΔmyr CO 颗粒的初免-加强策略
初免
加强
TRIP.I GAGΔmir (100)
TRIP.NI GAGΔmir CO (100, 600)
TRIP.I GAGΔmir (100)
TRIP.NI GAGΔmir CO (100, 600)
13 w
10 d
ELISPOT
四聚体
A
B
初免
初免-加强
sfc / 1 x 10⁶ 细胞
% tet⁺ 细胞

图35

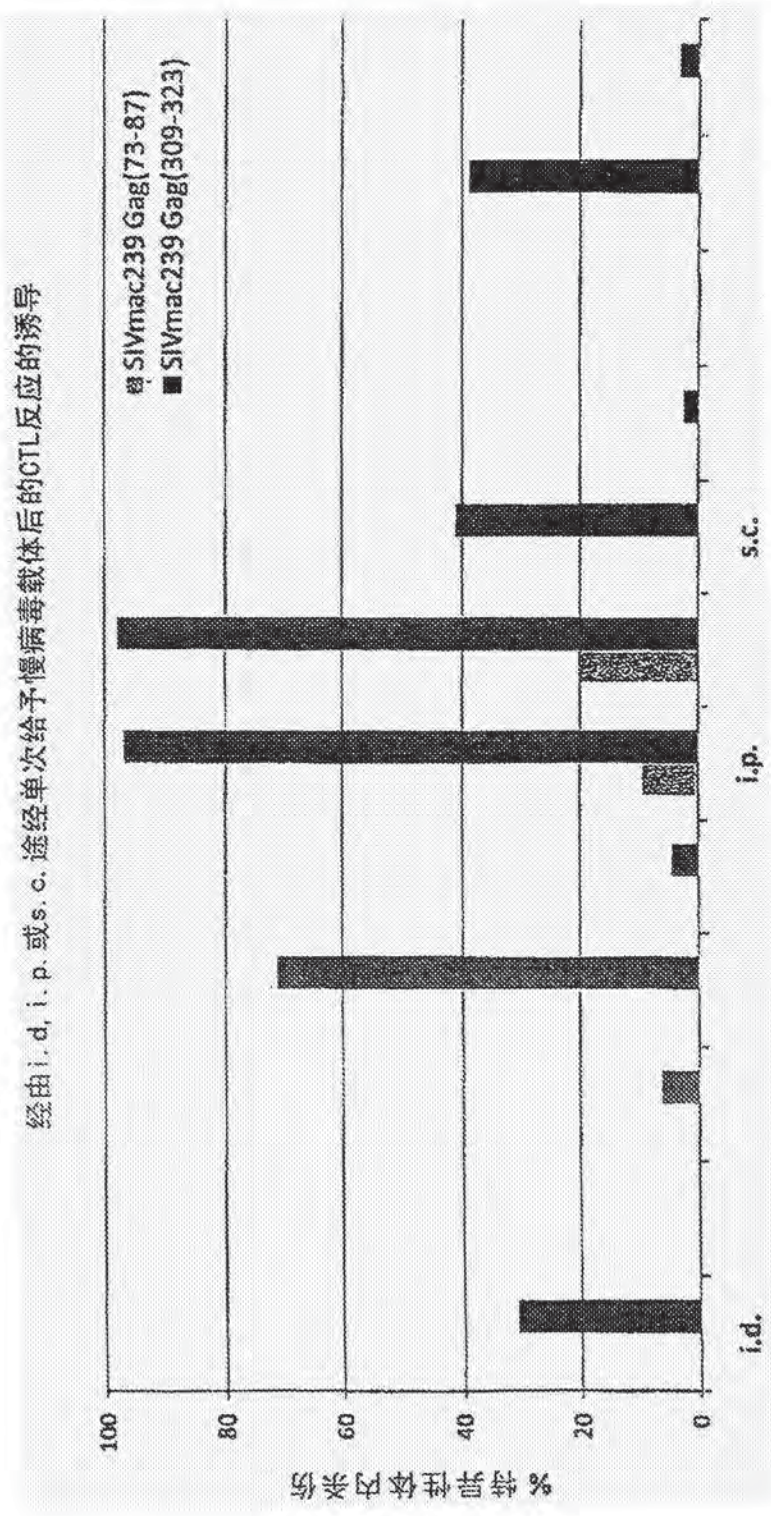

经由i.d, i.p.或s.c.途经单次给予慢病毒载体后的CTL反应的诱导
SIVmac239 Gag(73-87)
SIVmac239 Gag(309-323)
% 特异性体内杀伤
100
80
60
40
20
0
i.d.
i.p.
s.c.

图36

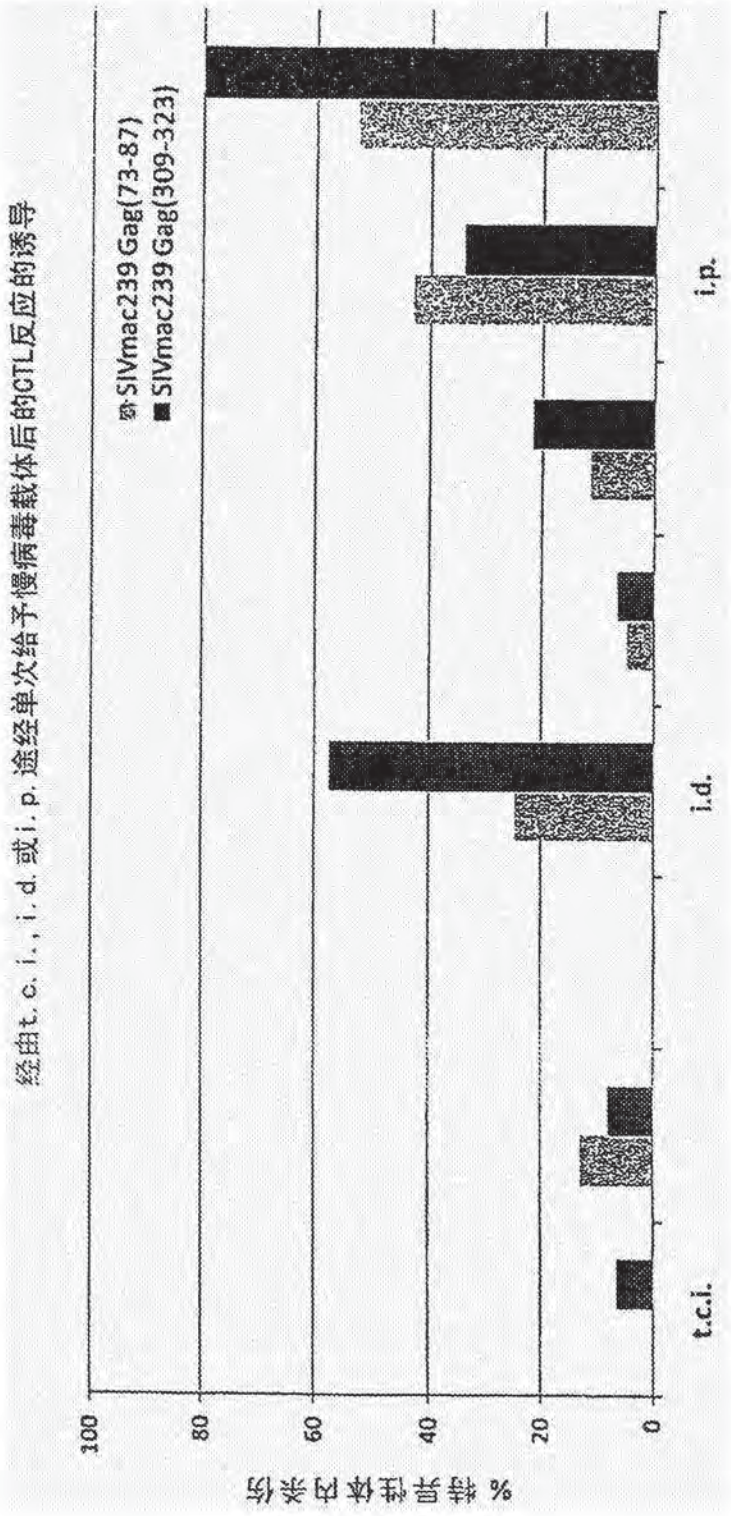

经由t.c.i.,i.d.或i.p.途经单次给予慢病毒载体后的CTL反应的诱导
SIVmac239 Gag(73-87)
SIVmac239 Gag(309-323)
% 特异性体内杀伤
100
80
60
40
20
0
t.c.i.
i.d.
i.p.

图37

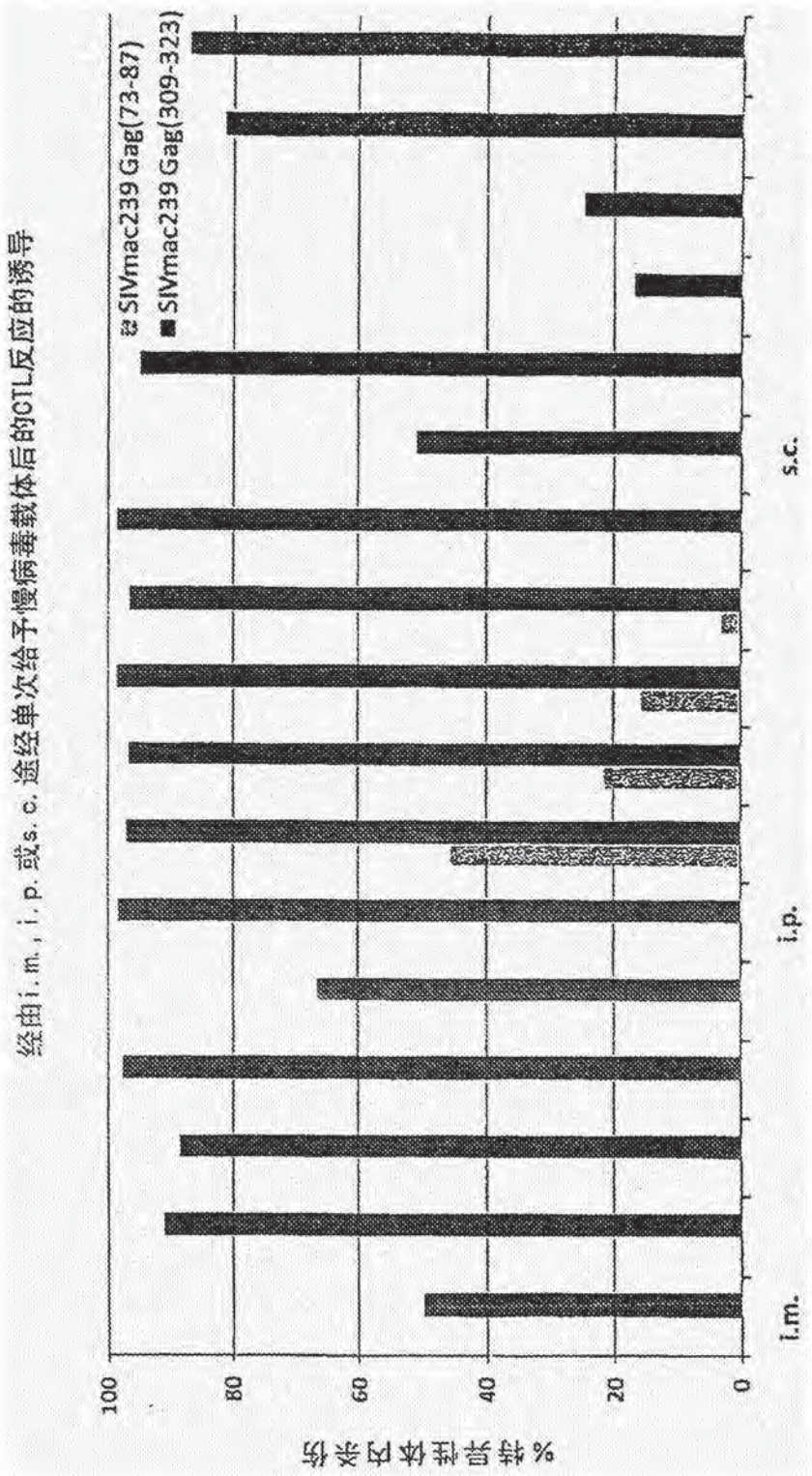

经由i.m.，i.p.或s.c.途经单次给予慢病毒载体后的CTL反应的诱导
SIVmac239 Gag(73-87)
SIVmac239 Gag(309-323)
% 特异性体内杀伤
100
80
60
40
20
0
i.m.
i.p.
s.c.

图38

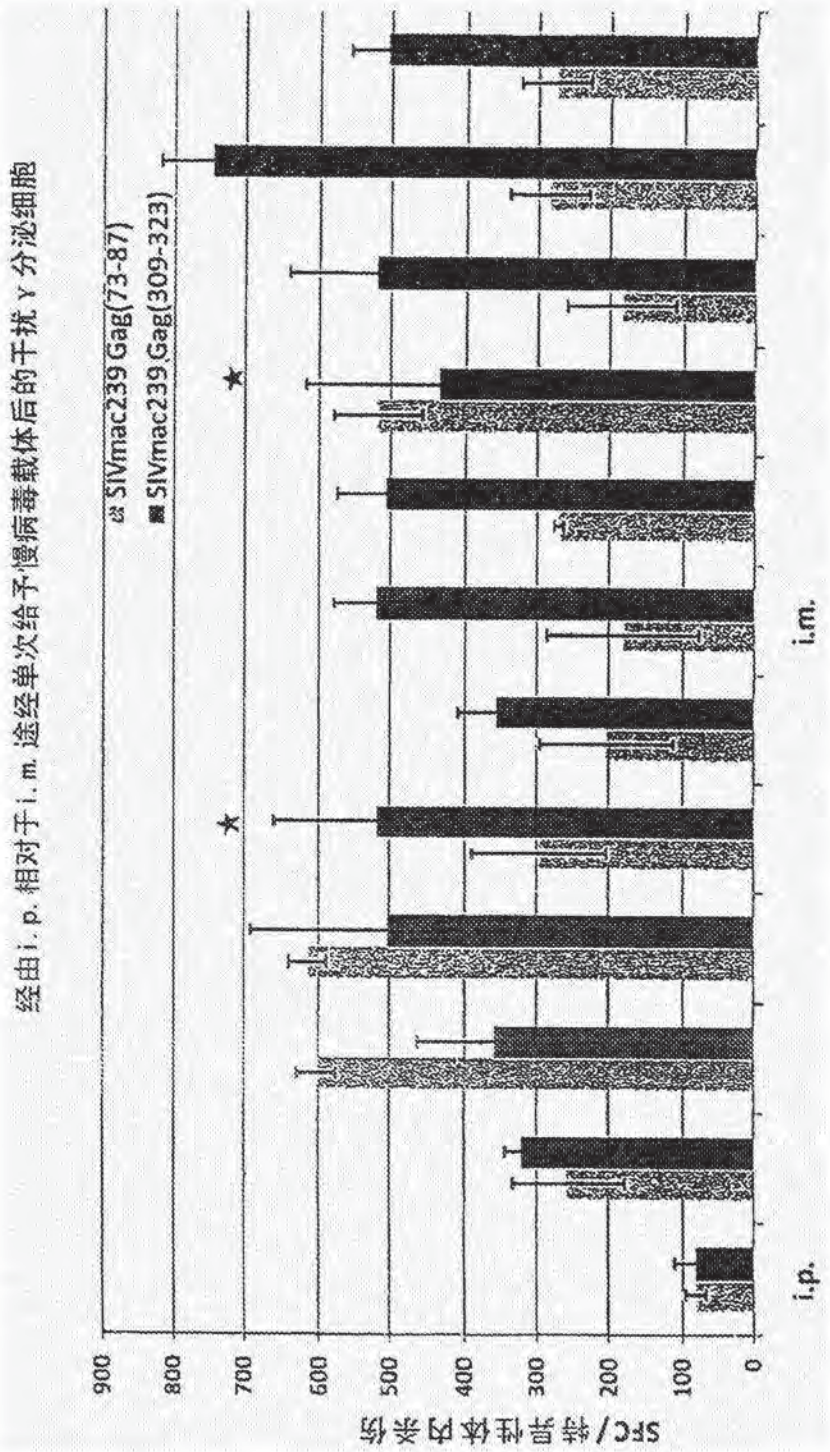

经由i.p.相对于i.m.途经单次给予慢病毒载体后的干扰γ分泌细胞
SIVmac239 Gag(73-87)
SIVmac239 Gag(309-323)
SFC/特异性体内杀伤
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
i.p.
i.m.

图39

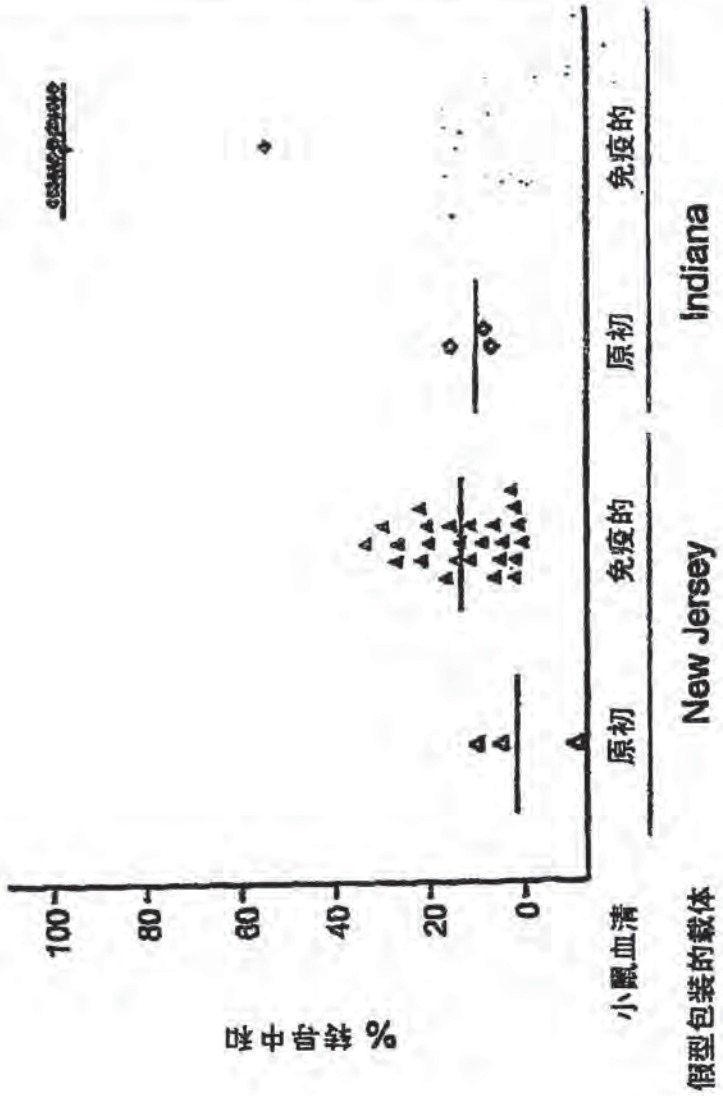

% 转导中和
100
80
60
40
20
0
小鼠血清
假型包装的载体
原初
免疫的
New Jersey
原初
免疫的
Indiana

图40

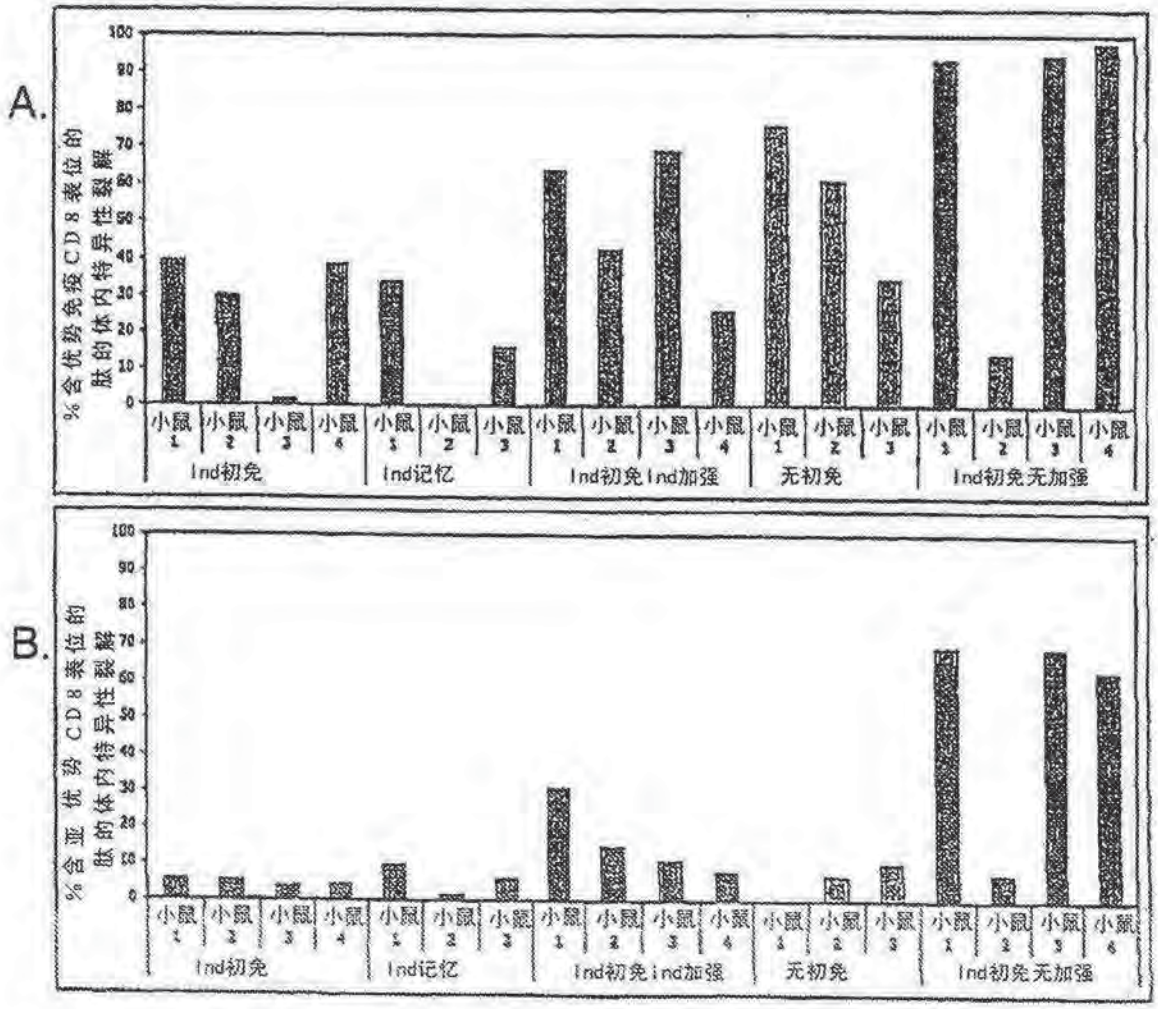

A.
%含优势免疫CD8表位的肽的体内特异性裂解
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
小鼠1
小鼠2
小鼠3
小鼠4
Ind初免
Ind记忆
Ind初免Ind加强
无初免
Ind初免无加强
B.
%含亚优势CD8表位的肽的体内特异性裂解

图41

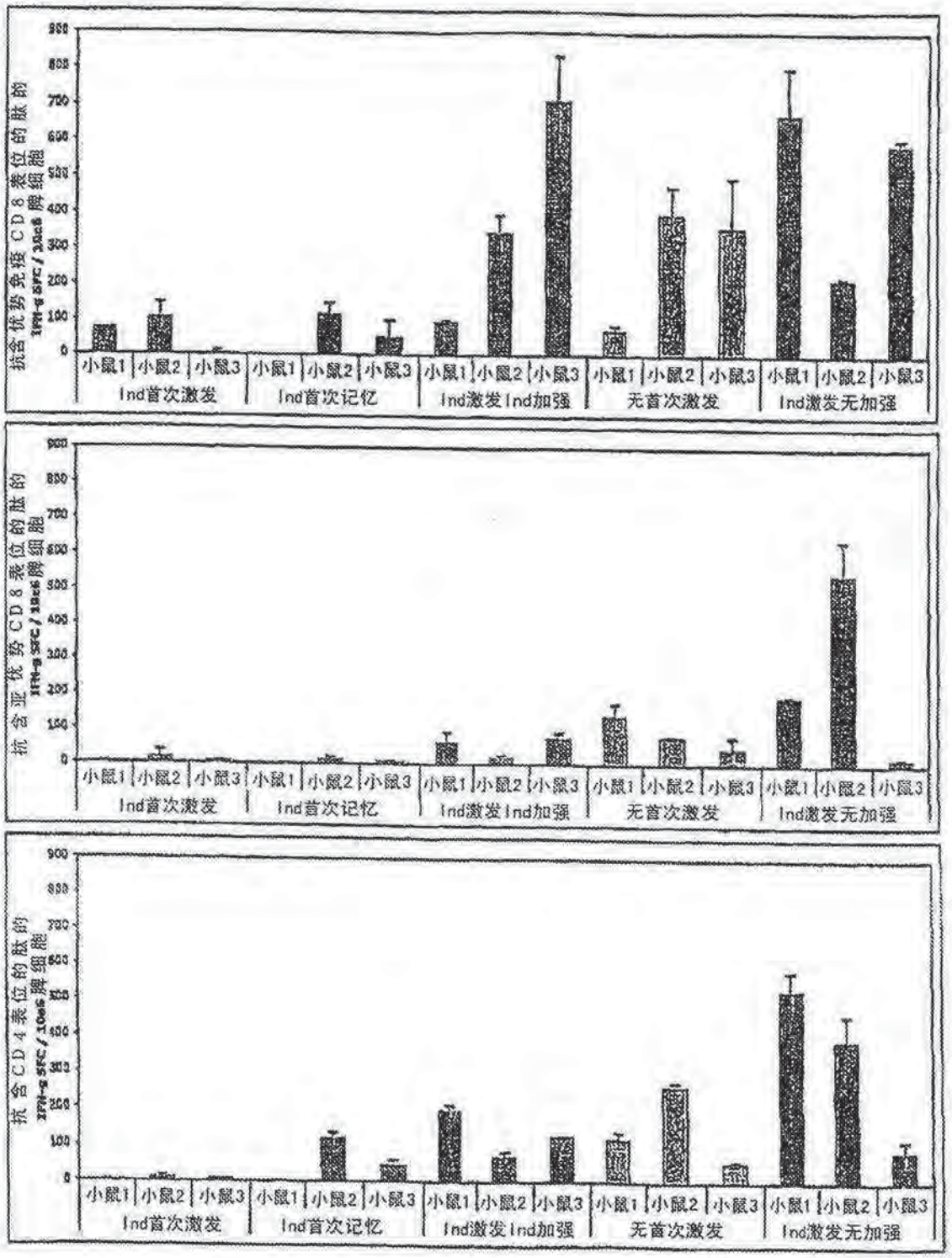

抗含优势免疫CD8表位的肽的
IFN-g SFC / 10e6 脾细胞
抗含亚优势CD8表位的肽的
IFN-g SFC / 10e6 脾细胞
抗含CD4表位的肽的
IFN-g SFC / 10e6 脾细胞
小鼠1
小鼠2
小鼠3
Ind首次激发
Ind首次记忆
Ind激发Ind加强
无首次激发
Ind激发无加强

图42

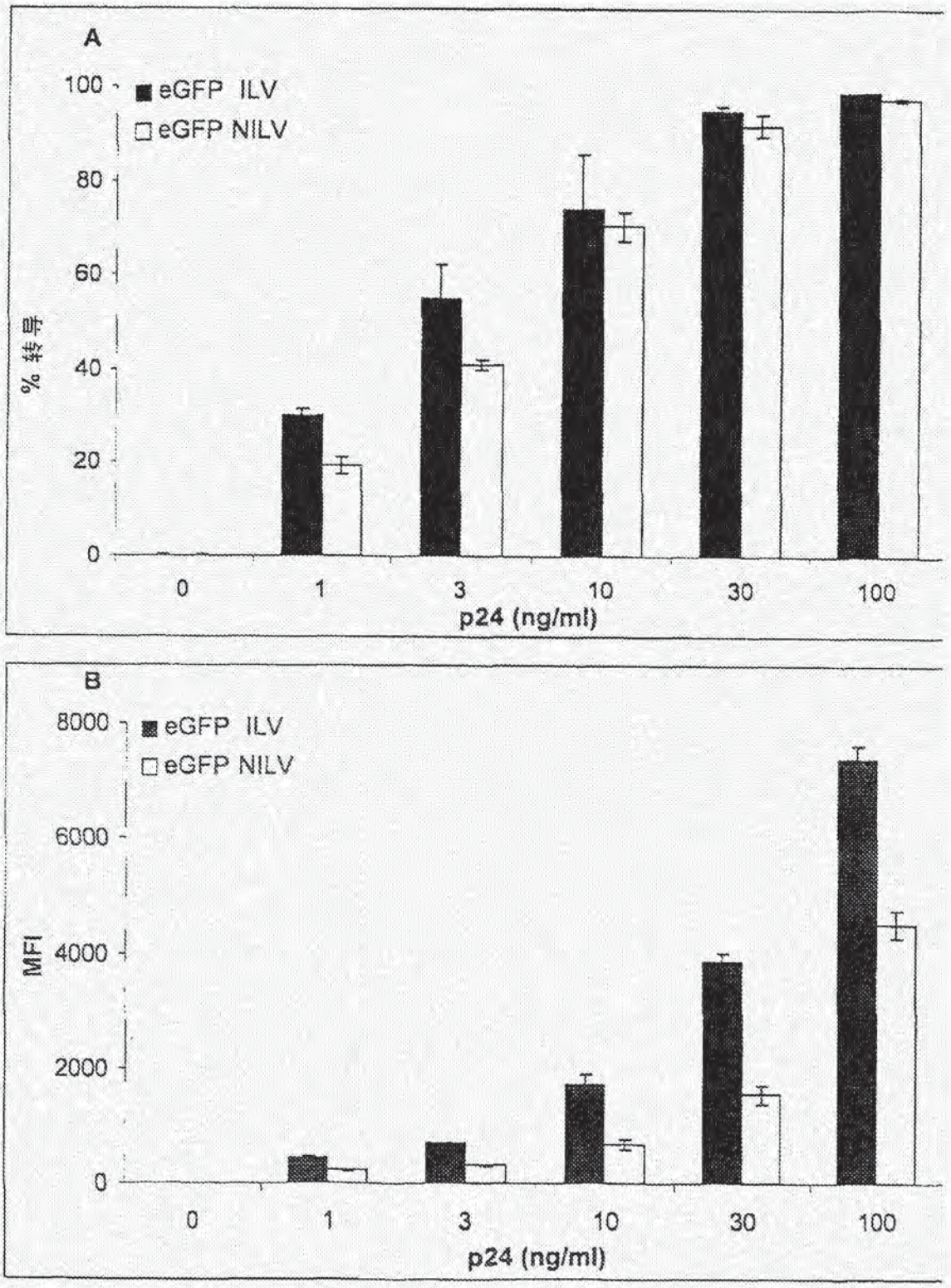

A
eGFP ILV
eGFP NILV
% 转导
100
80
60
40
20
0
0
1
3
10
30
100
p24 (ng/ml)
B
eGFP ILV
eGFP NILV
MFI
8000
6000
4000
2000
0
0
1
3
10
30
100
p24 (ng/ml)

图43

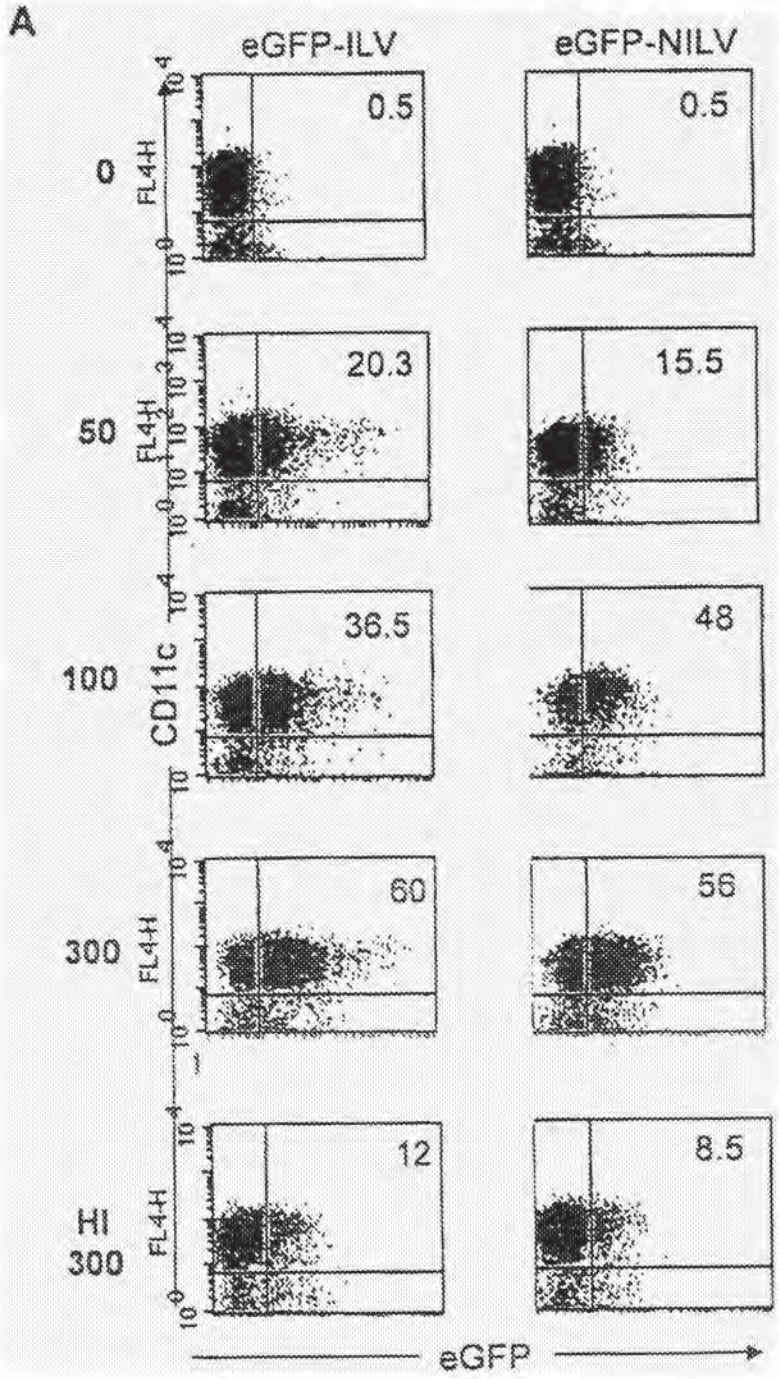

A
eGFP-ILV
eGFP-NILV
0
50
100
300
HI
300
FL4H
CD11c
0.5
0.5
20.3
15.5
36.5
48
60
56
12
8.5
eGFP

图44A

B

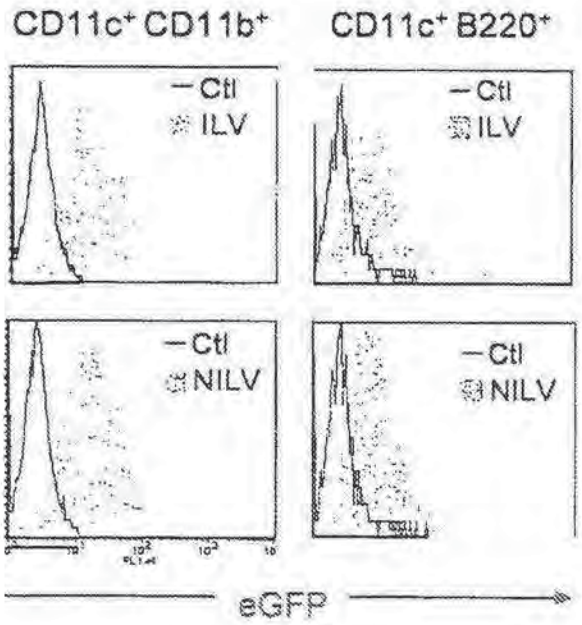
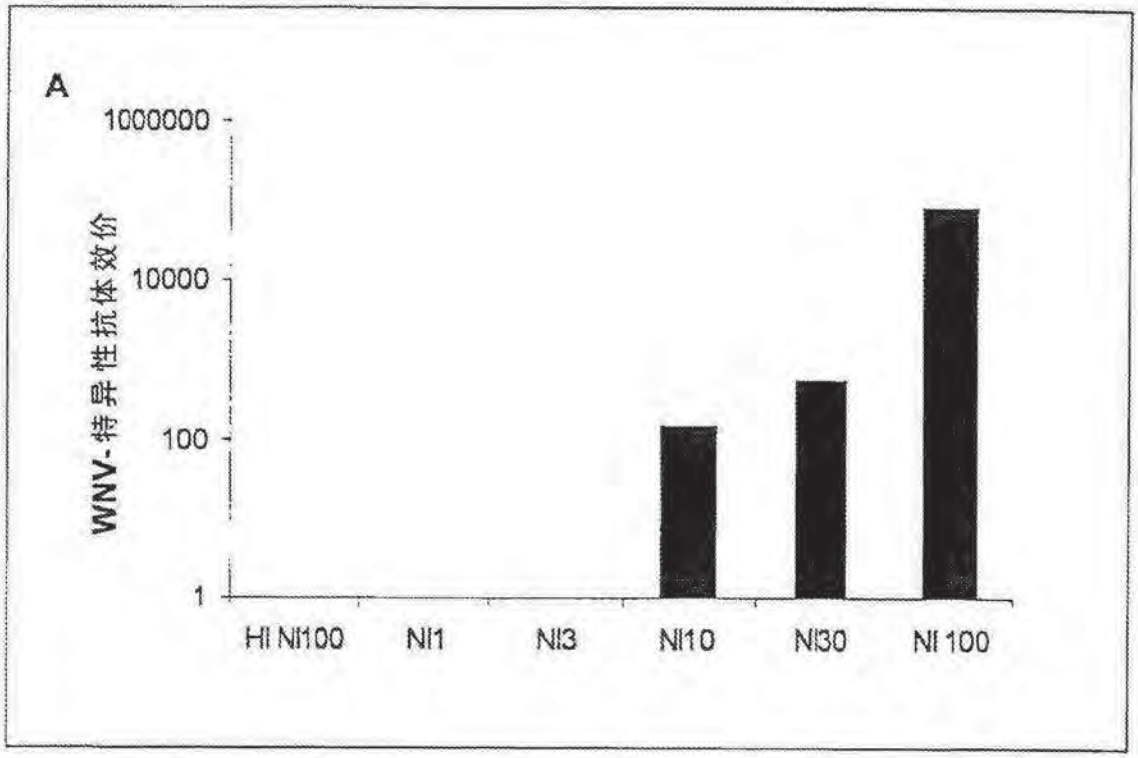


图44B


A
1000000
10000
100
1
WNV-特异性抗体效价
HI NI100
NI1
NI3
NI10
NI30
NI 100

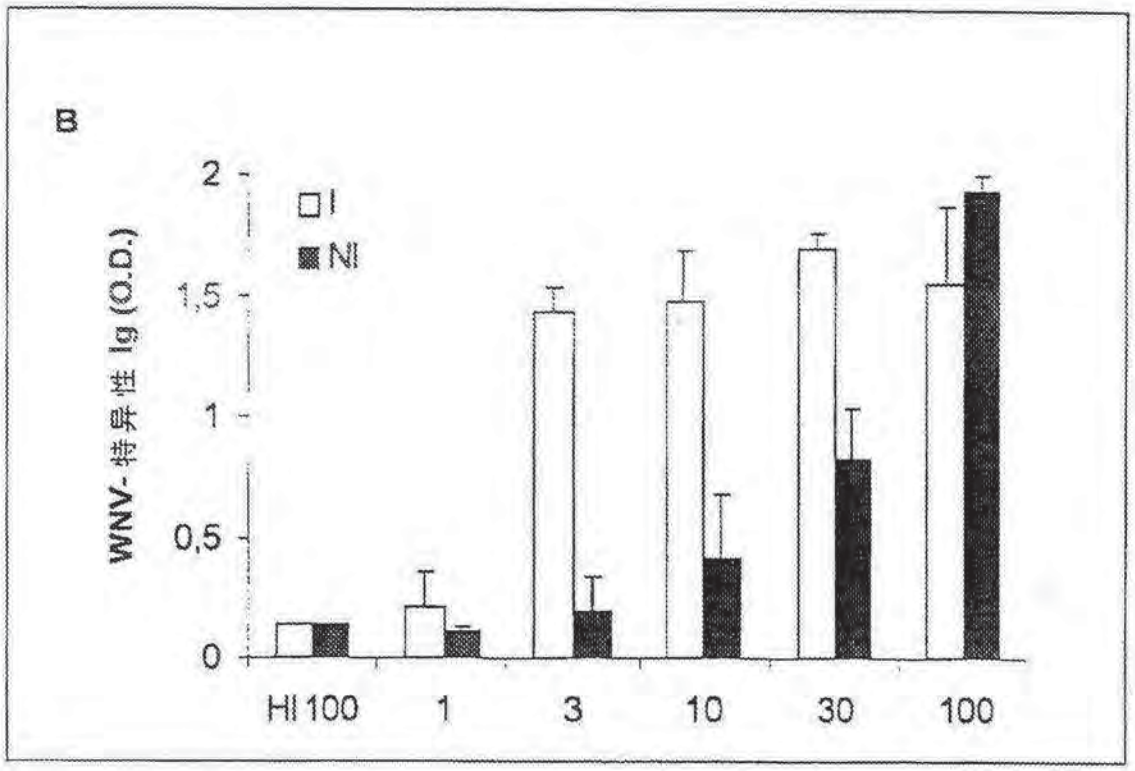

B
2
1,5
1
0,5
0
WNV-特异性 lg (O.D.)
I
NI
HI 100
1
3
10
30
100

图45

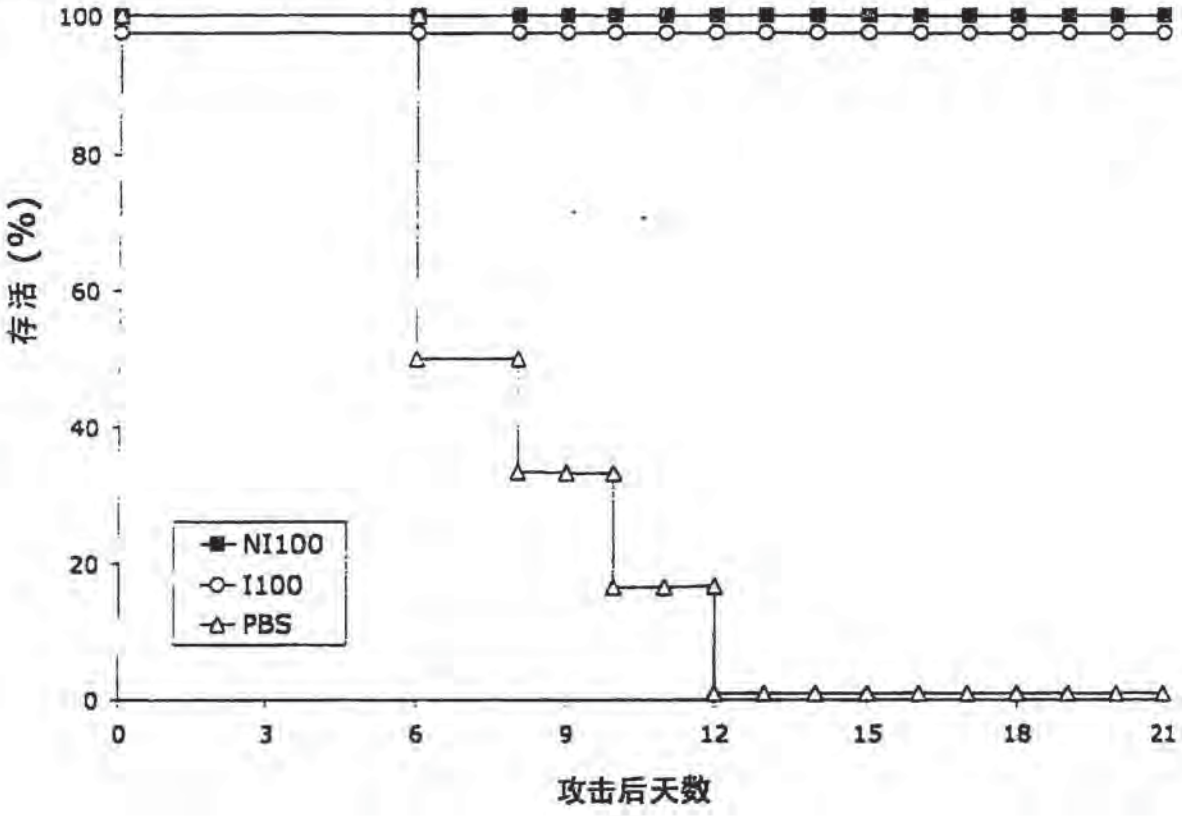
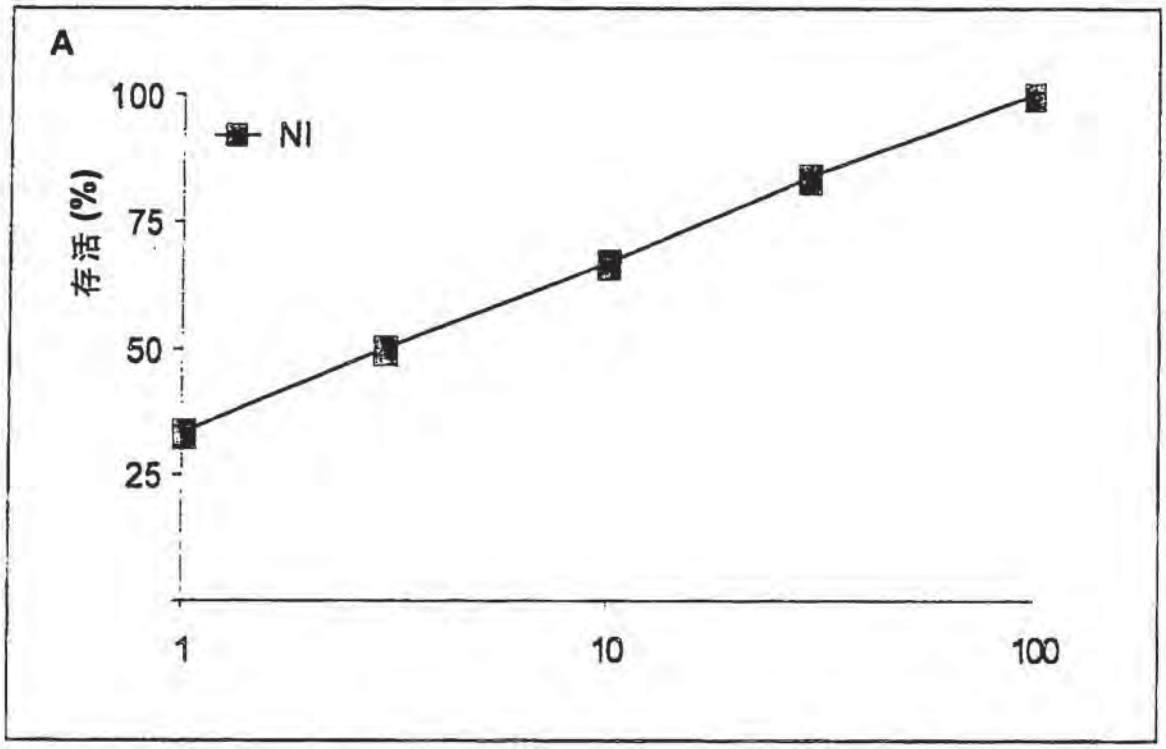


图46



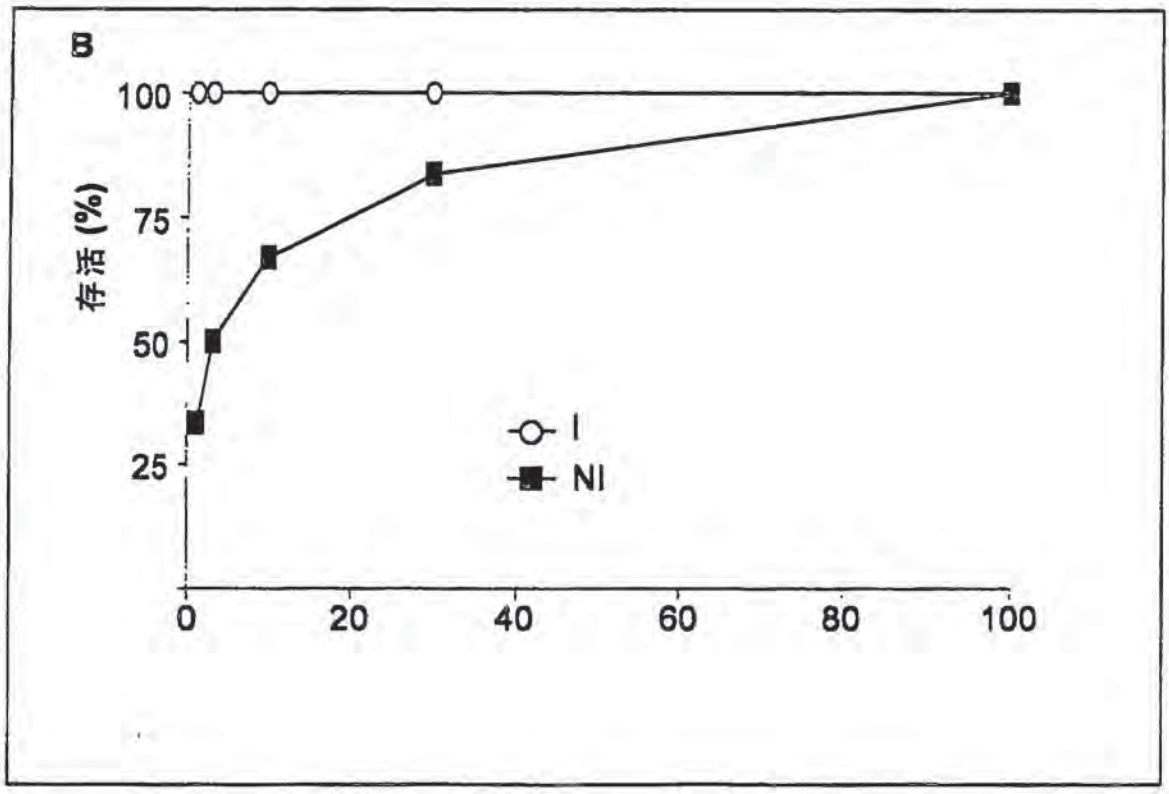


图47

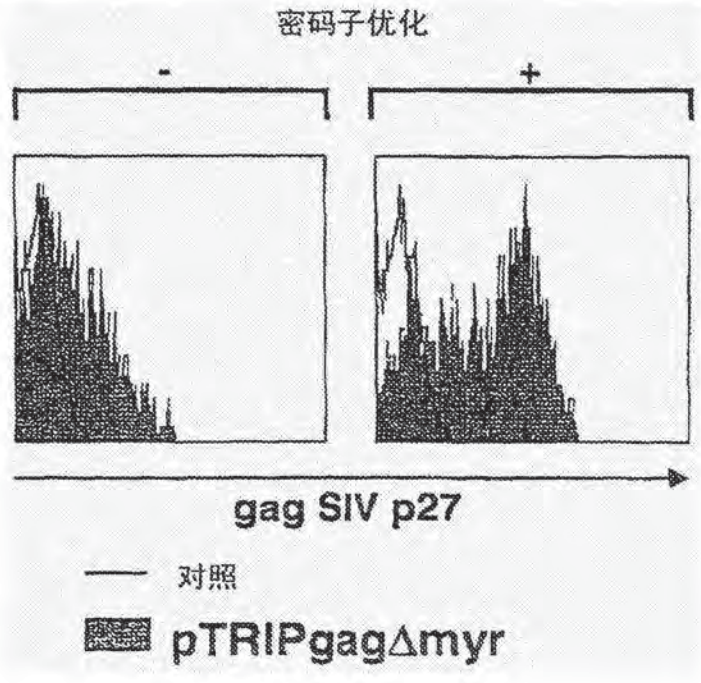


图48

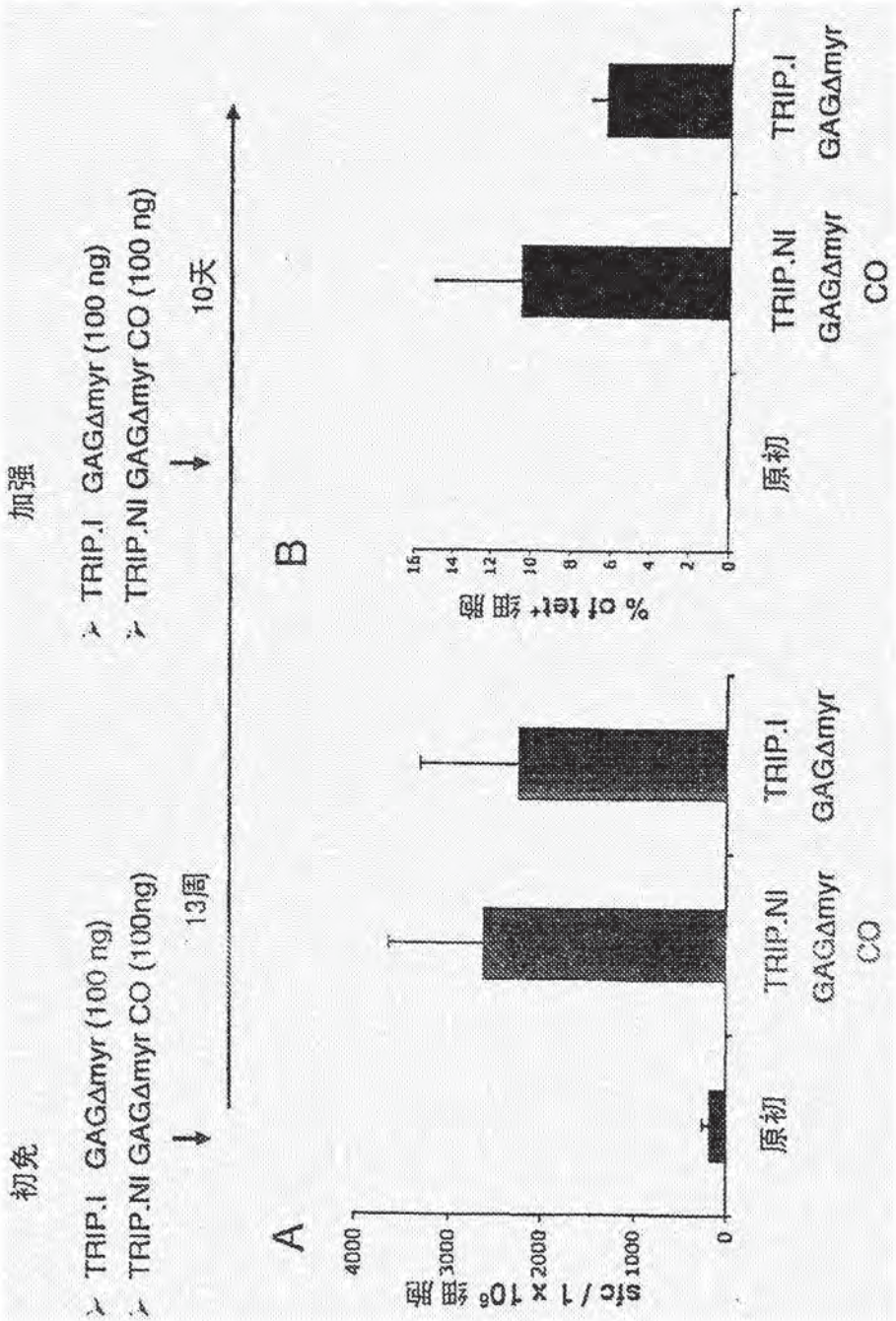

初免
TRIP.I GAGΔmyr (100 ng)
TRIP.NI GAGΔmyr CO (100ng)
13周
加强
TRIP.I GAGΔmyr (100 ng)
TRIP.NI GAGΔmyr CO (100 ng)
10天
A
B
sfc / 1 x 10⁶ 细胞
4000
3000
2000
1000
0
原初
TRIP.NI GAGΔmyr CO
TRIP.I GAGΔmyr
% of tet+ 细胞
15
14
12
10
8
6
4
2
0
原初
TRIP.NI GAGΔmyr CO
TRIP.I GAGΔmyr

图49

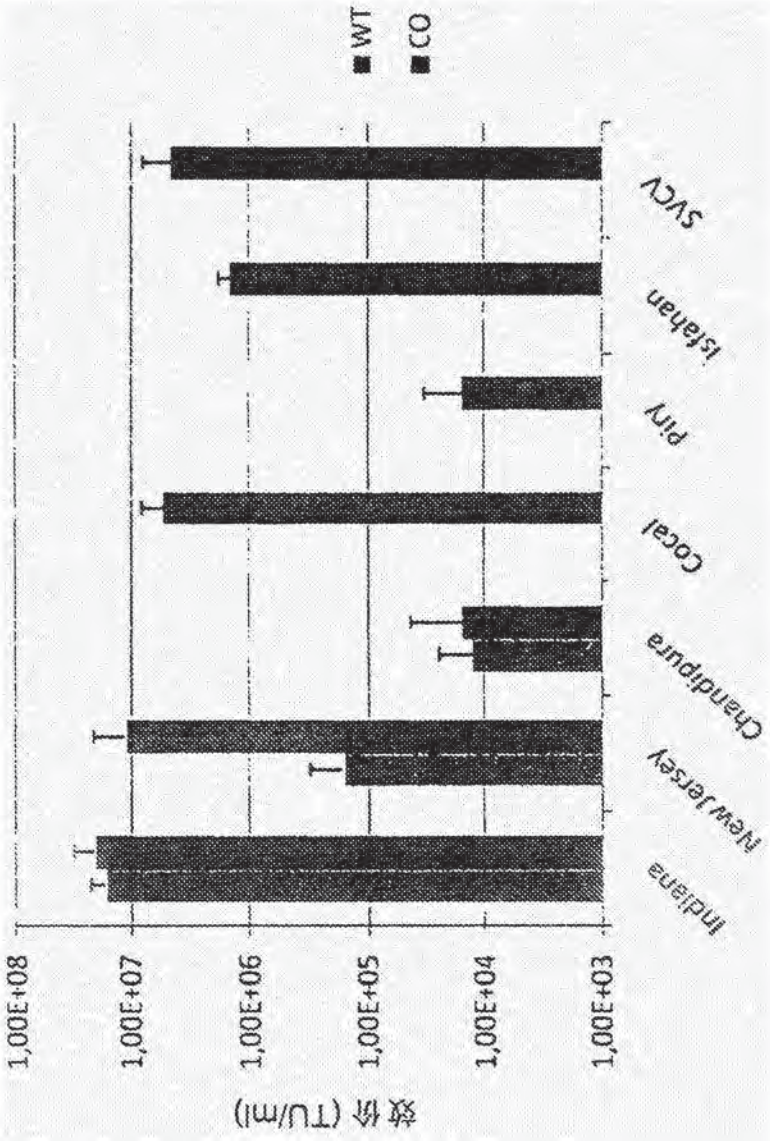

WT
CO
效价 (TU/ml)
1,00E+08
1,00E+07
1,00E+06
1,00E+05
1,00E+04
1,00E+03
Indiana
New Jersey
Chandipura
Cocal
Piry
Isfahan
SVCV

图50

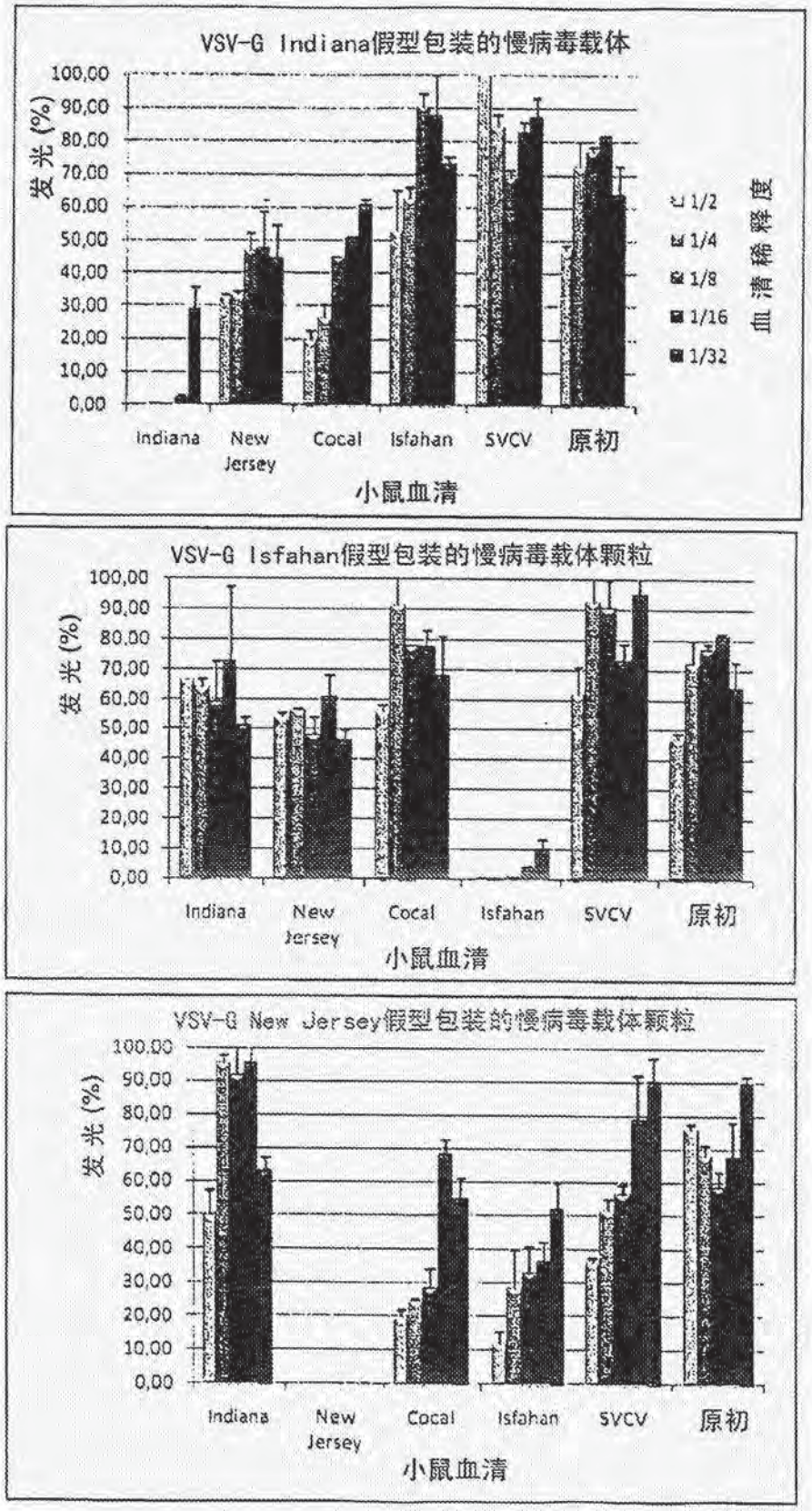
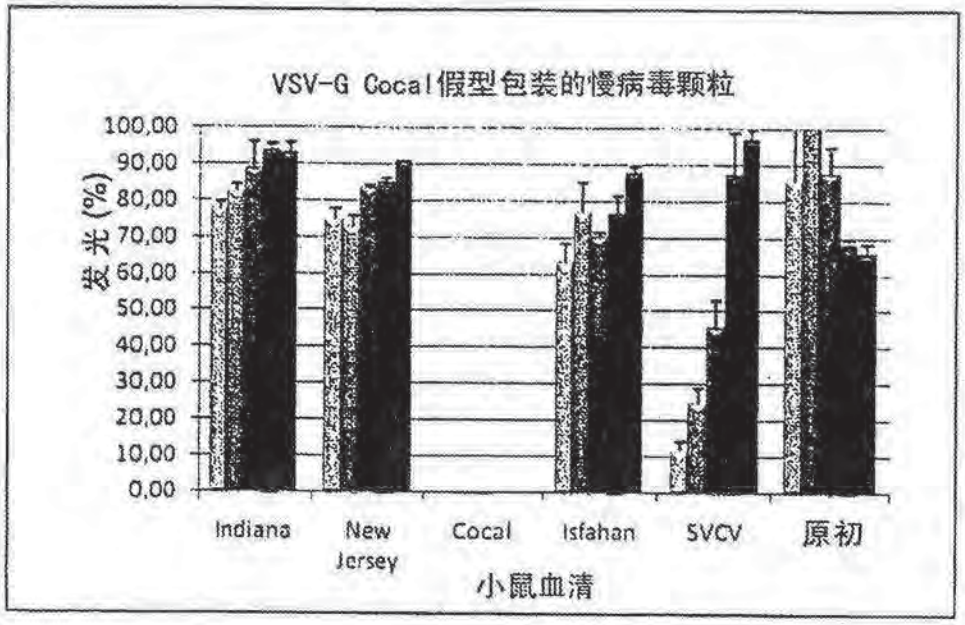

VSV-G Indiana假型包装的慢病毒载体
发光(%)
100,00
90,00
80,00
70,00
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
1/2
1/4
1/8
1/16
1/32
血清稀释度
Indiana
New Jersey
Cocal
Isfahan
SVCV
原初
小鼠血清
VSV-G Isfahan假型包装的慢病毒载体颗粒
发光(%)
Indiana
New Jersey
Cocal
Isfahan
SVCV
原初
小鼠血清
VSV-G New Jersey假型包装的慢病毒载体颗粒
发光(%)
Indiana
New Jersey
Cocal
Isfahan
SVCV
原初
小鼠血清

图51A


VSV-G Cocal假型包装的慢病毒颗粒
发光(%)
100,00
90,00
80,00
70,00
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
Indiana
New Jersey
Cocal
Isfahan
SVCV
原初
小鼠血清

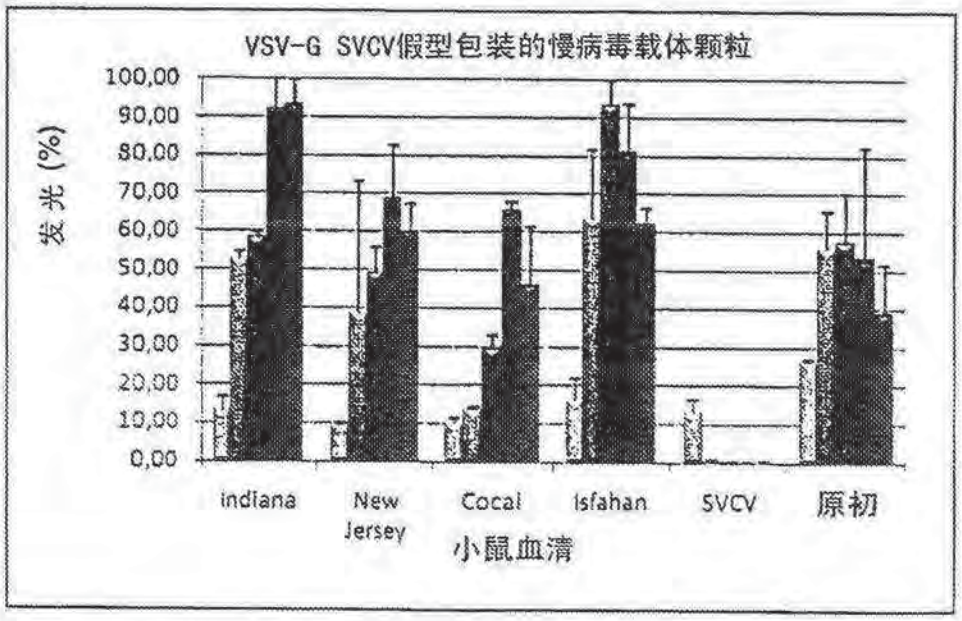

VSV-G SVCV假型包装的慢病毒载体颗粒
发光(%)
100,00
90,00
80,00
70,00
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
indiana
New Jersey
Cocal
Isfahan
SVCV
原初
小鼠血清

图51B

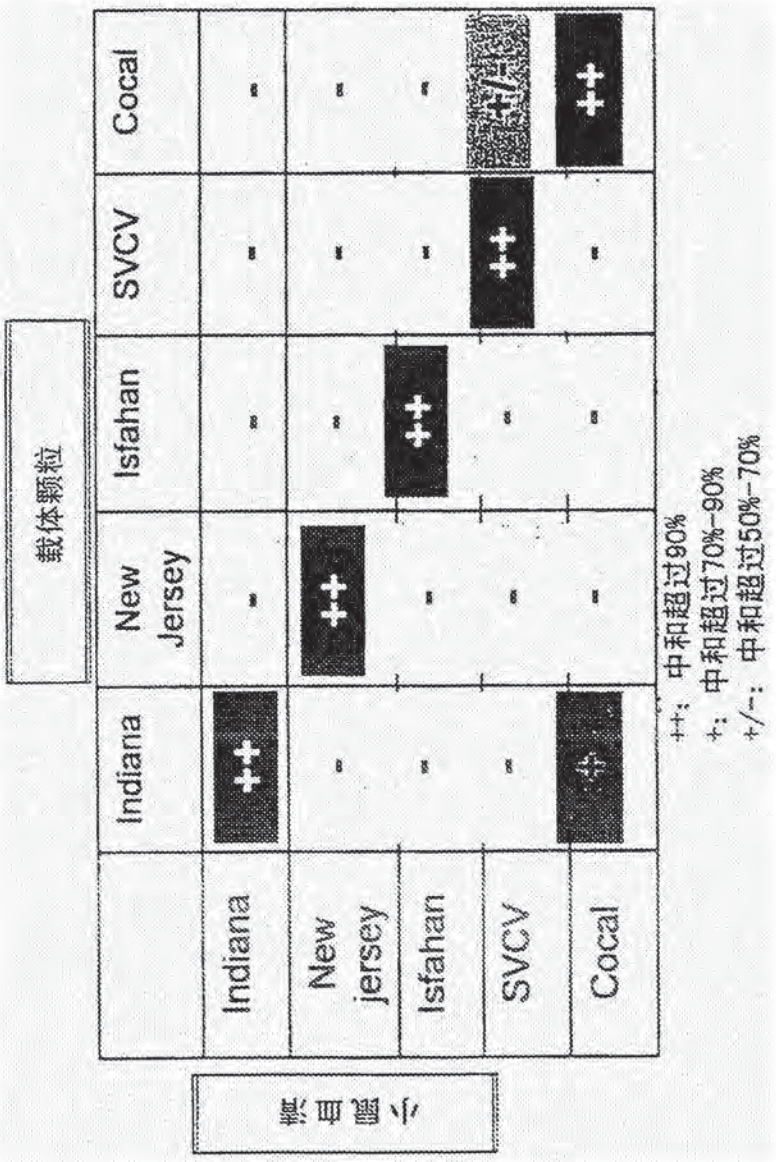

载体颗粒
小鼠血清
Indiana
New Jersey
Isfahan
SVCV
Cocal
Indiana
New jersey
Isfahan
SVCV
Cocal
++
+++
++
++
++
++：中和超过90%
+：中和超过70%-90%
+/-：中和超过50%-70%

图52

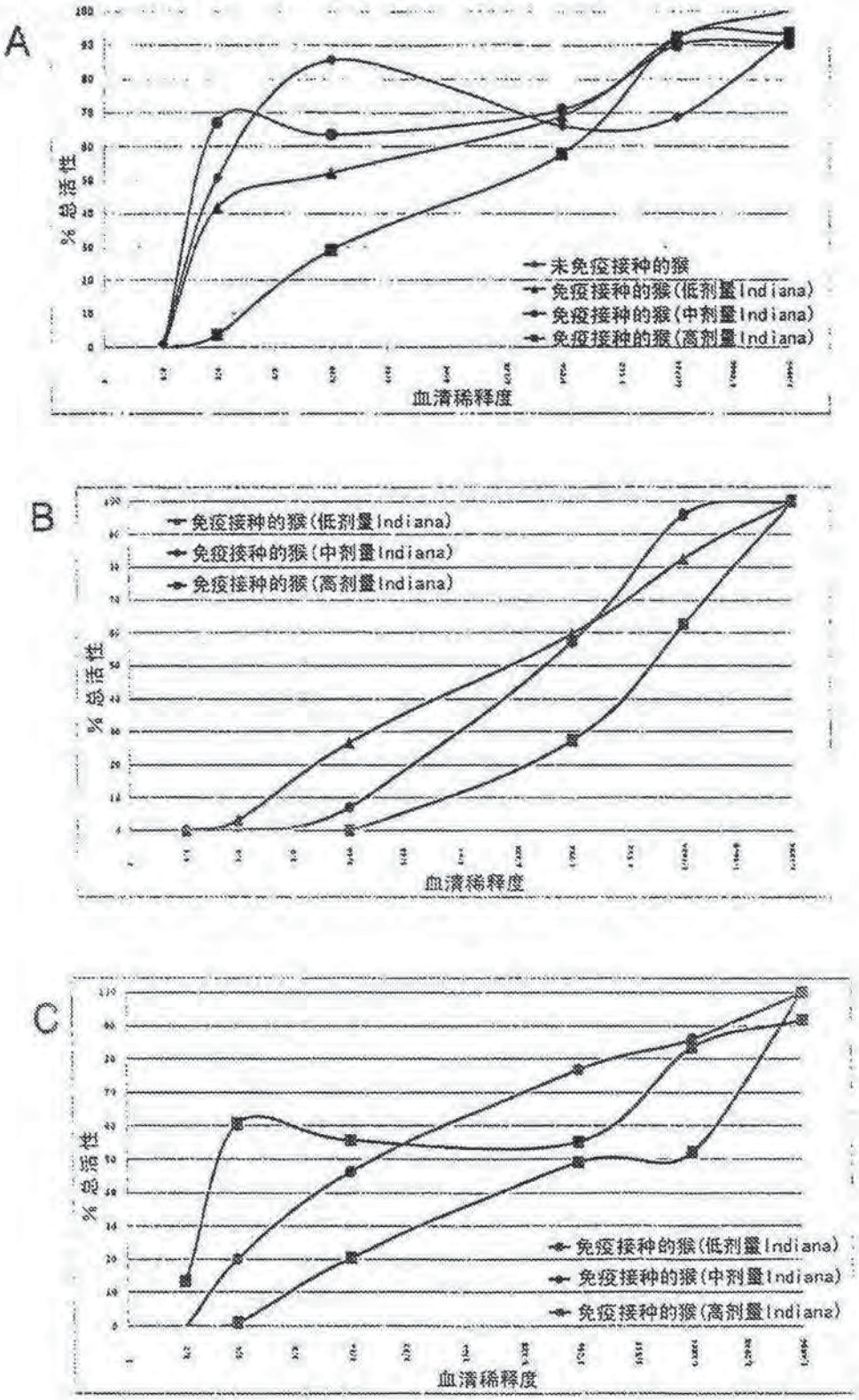

A
% 总活性
血清稀释度
未免疫接种的猴
免疫接种的猴(低剂量Indiana)
免疫接种的猴(中剂量Indiana)
免疫接种的猴(高剂量Indiana)
B
% 总活性
血清稀释度
免疫接种的猴(低剂量Indiana)
免疫接种的猴(中剂量Indiana)
免疫接种的猴(高剂量Indiana)
C
% 总活性
血清稀释度
免疫接种的猴(低剂量Indiana)
免疫接种的猴(中剂量Indiana)
免疫接种的猴(高剂量Indiana)

图53

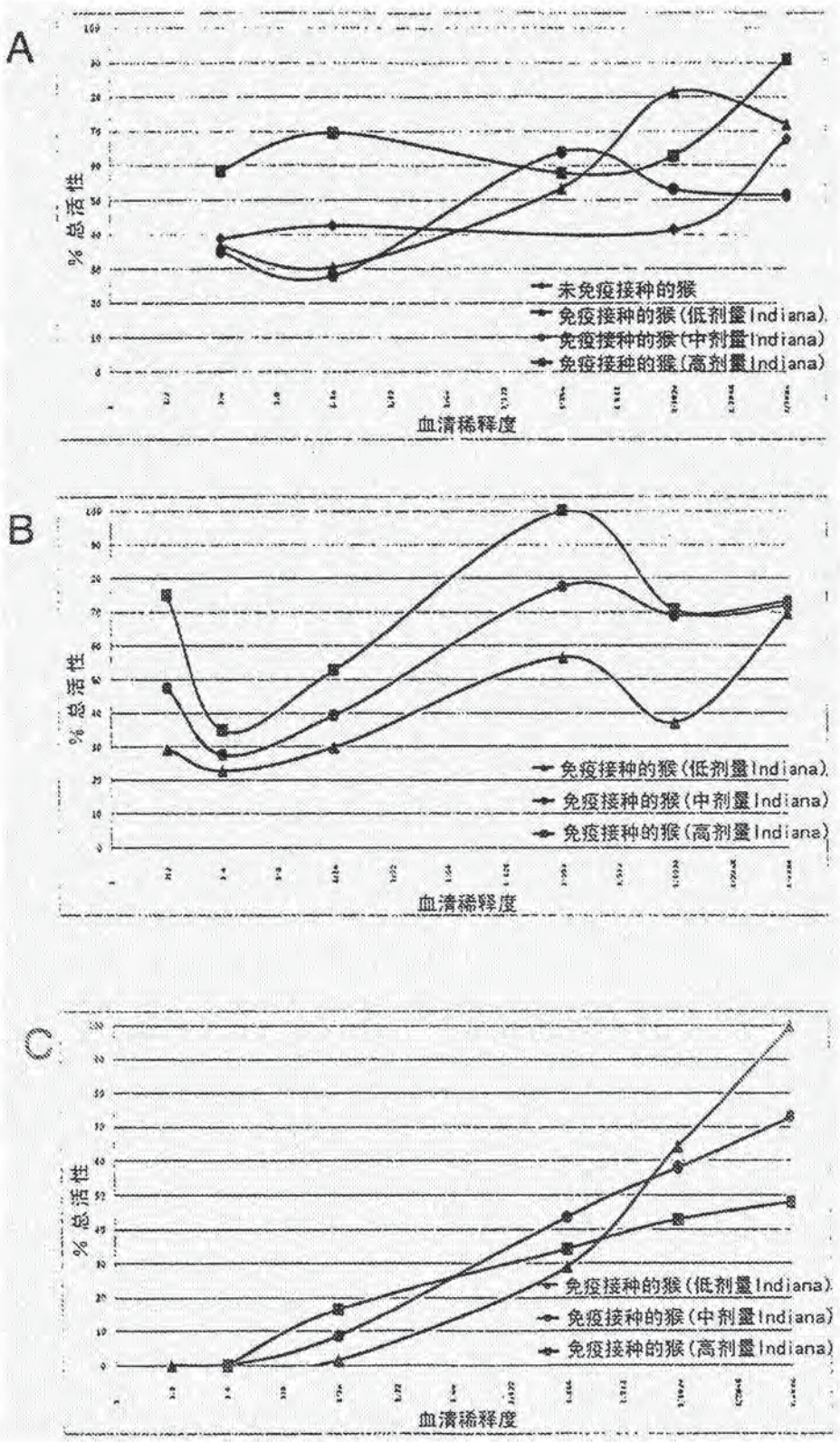

A
% 总活性
未免疫接种的猴
免疫接种的猴(低剂量Indiana)
免疫接种的猴(中剂量Indiana)
免疫接种的猴(高剂量Indiana)
血清稀释度
B
% 总活性
免疫接种的猴(低剂量Indiana)
免疫接种的猴(中剂量Indiana)
免疫接种的猴(高剂量Indiana)
血清稀释度
C
% 总活性
免疫接种的猴(低剂量Indiana)
免疫接种的猴(中剂量Indiana)
免疫接种的猴(高剂量Indiana)
血清稀释度

图54

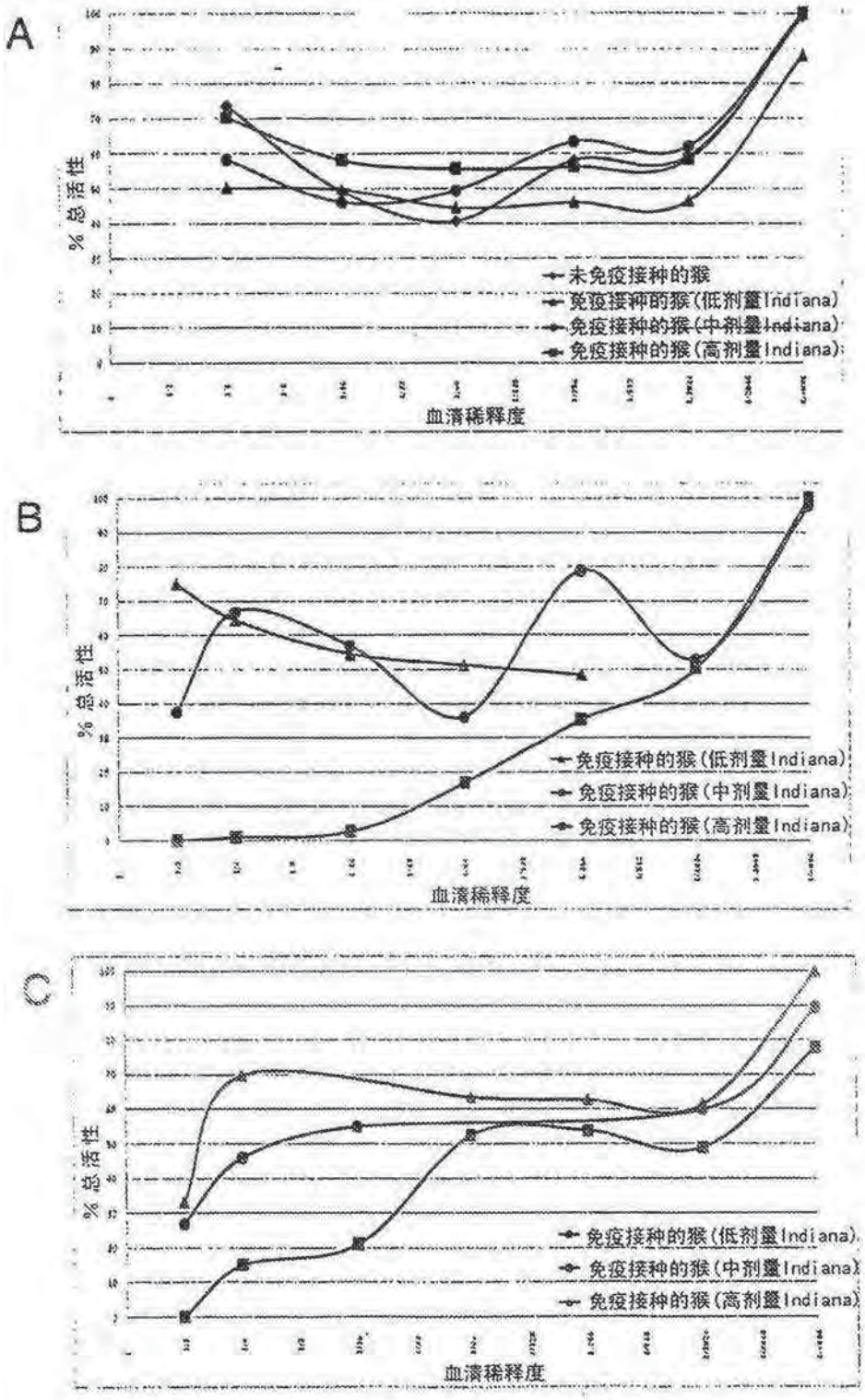

A
% 总活性
未免疫接种的猴
免疫接种的猴(低剂量Indiana)
免疫接种的猴(中剂量Indiana)
免疫接种的猴(高剂量Indiana)
血清稀释度
B
% 总活性
免疫接种的猴(低剂量Indiana)
免疫接种的猴(中剂量Indiana)
免疫接种的猴(高剂量Indiana)
血清稀释度
C
% 总活性
免疫接种的猴(低剂量Indiana)
免疫接种的猴(中剂量Indiana)
免疫接种的猴(高剂量Indiana)
血清稀释度

图55

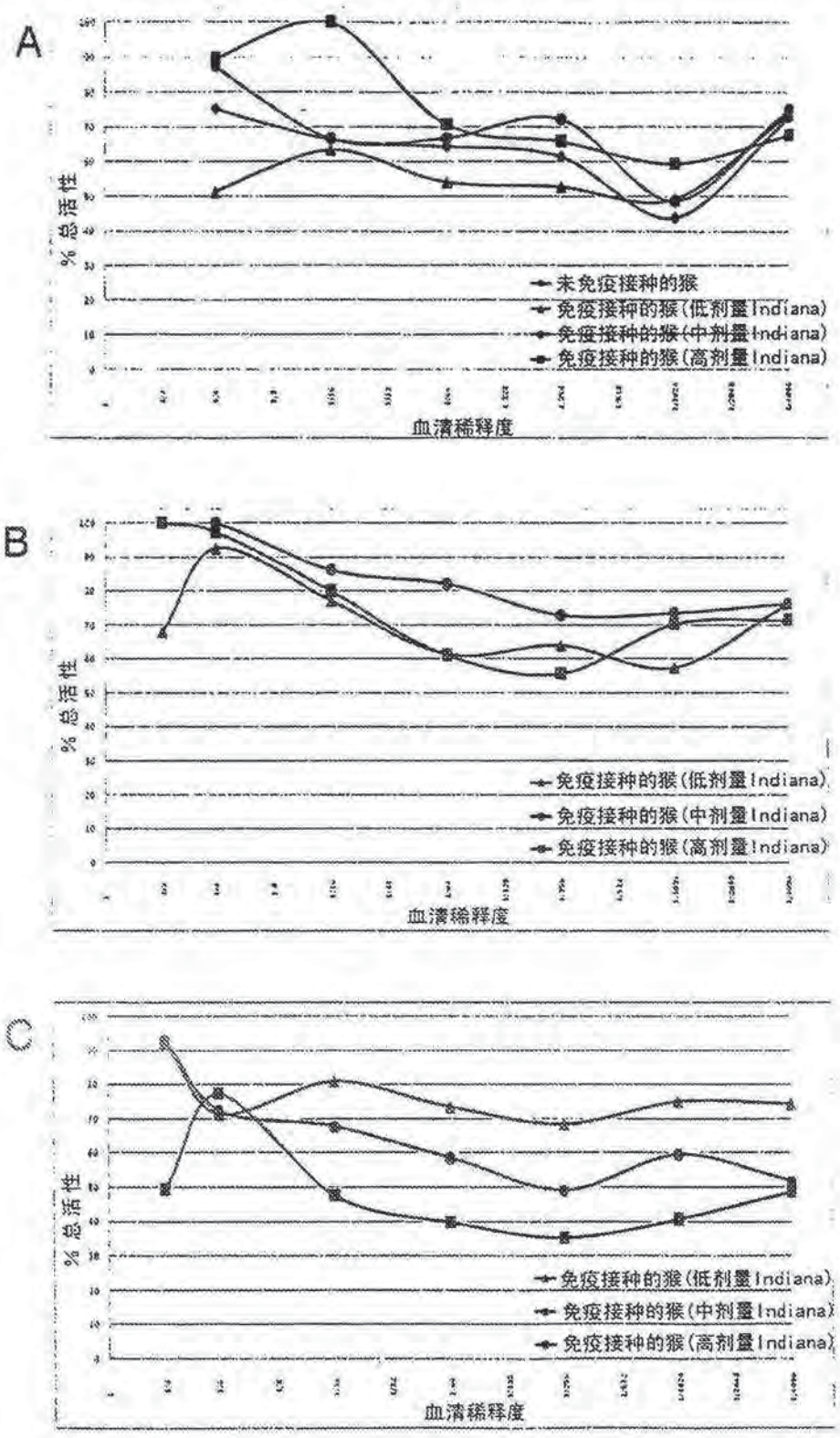

A
% 总活性
未免疫接种的猴
免疫接种的猴(低剂量Indiana)
免疫接种的猴(中剂量Indiana)
免疫接种的猴(高剂量Indiana)
血清稀释度
B
% 总活性
免疫接种的猴(低剂量Indiana)
免疫接种的猴(中剂量Indiana)
免疫接种的猴(高剂量Indiana)
血清稀释度
C
% 总活性
免疫接种的猴(低剂量Indiana)
免疫接种的猴(中剂量Indiana)
免疫接种的猴(高剂量Indiana)
血清稀释度

图56

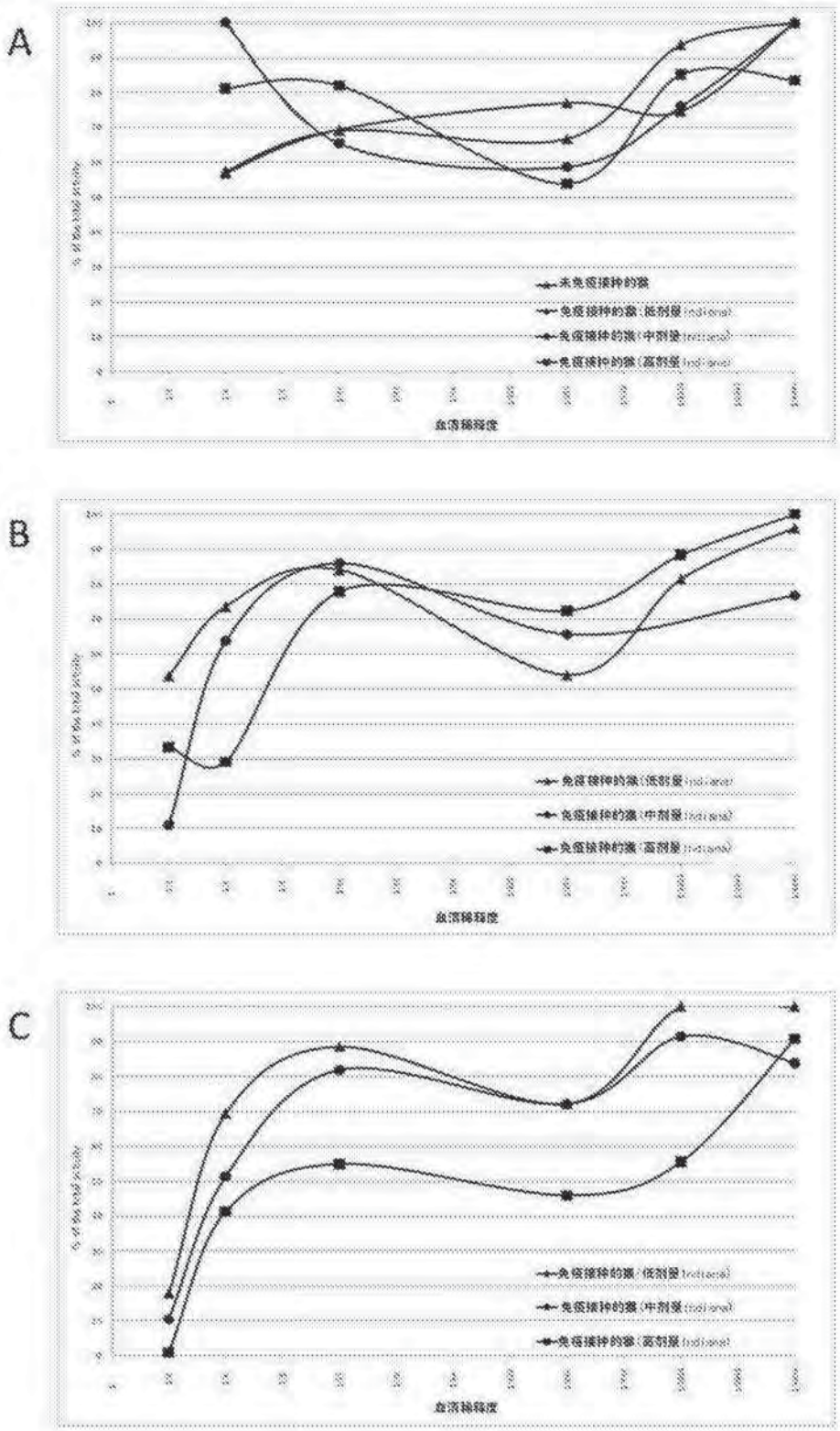


图57

A Indiana

血清	%转导 >75%	50<>75%	25<>50%	<25%	5%<>2%	<2%	总数
未加热	20	22	29	21	2	2	96
加热	13	21	37	22	2	1	96

B New jersey

血清	%转导 >75%	50<>75%	25<>50%	<25%	5%<>2%	<2%	总数
未加热	9	17	22	34	10	4	96
加热	7	9	33	37	8	2	96

C Cocal

血清	%转导 >75%	50<>75%	25<>50%	<25%	5%<>2%	<2%	总数
未加热	6	11	49	30	4	2	96
加热	10	12	40	34	6	1	96

D SVCV

血清	%转导 >75%	50<>75%	25<>50%	<25%	5%<>2%	<2%	总数
未加热	0	0	6	90	0	0	96
加热	0	2	3	91	0	0	96

E Isfahan

血清	%转导 >75%	50<>75%	25<>50%	<25%	5%<>2%	<2%	总数
未加热	16	17	42	17	3	0	95
加热	11	20	35	27	2	0	95

图58

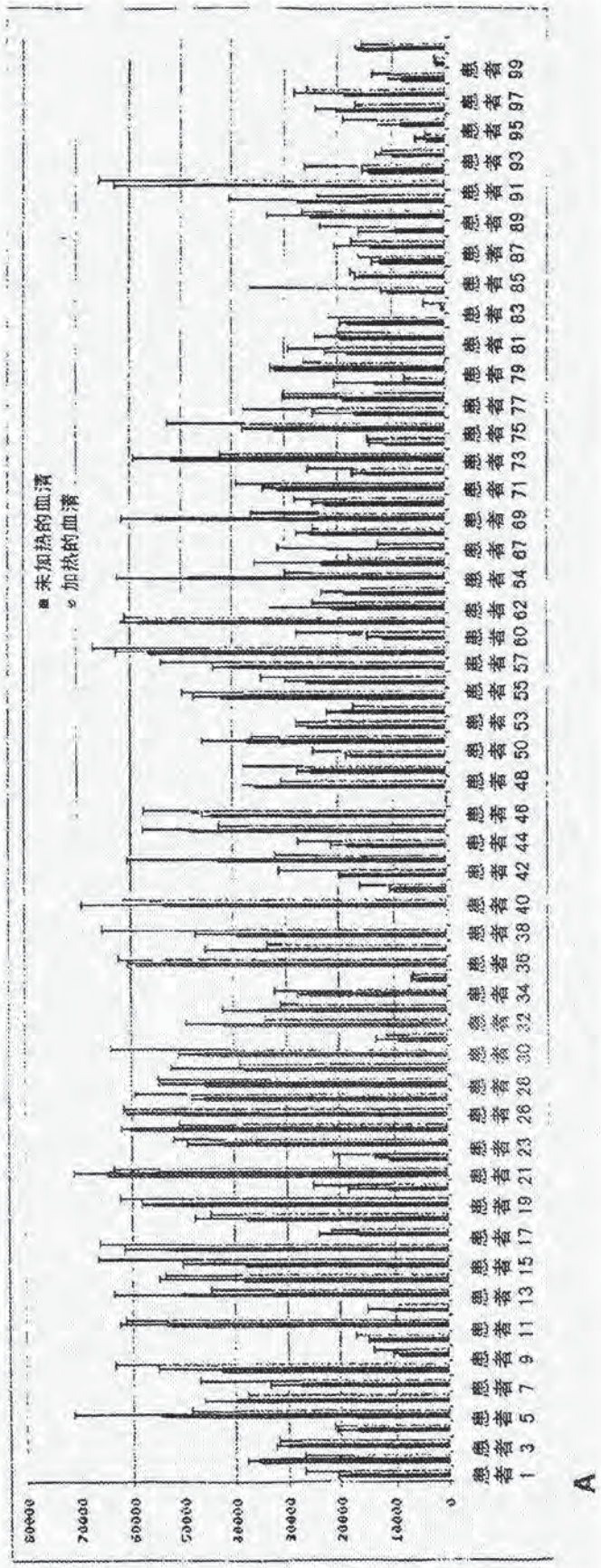

未加热的血清
加热的血清
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
患者1
患者3
患者5
患者7
患者9
患者11
患者13
患者15
患者17
患者19
患者21
患者23
患者26
患者28
患者30
患者32
患者34
患者36
患者38
患者40
患者42
患者44
患者46
患者48
患者50
患者53
患者55
患者57
患者60
患者62
患者64
患者67
患者69
患者71
患者73
患者75
患者77
患者79
患者81
患者83
患者85
患者87
患者89
患者91
患者93
患者95
患者97
患者99
A

图59A

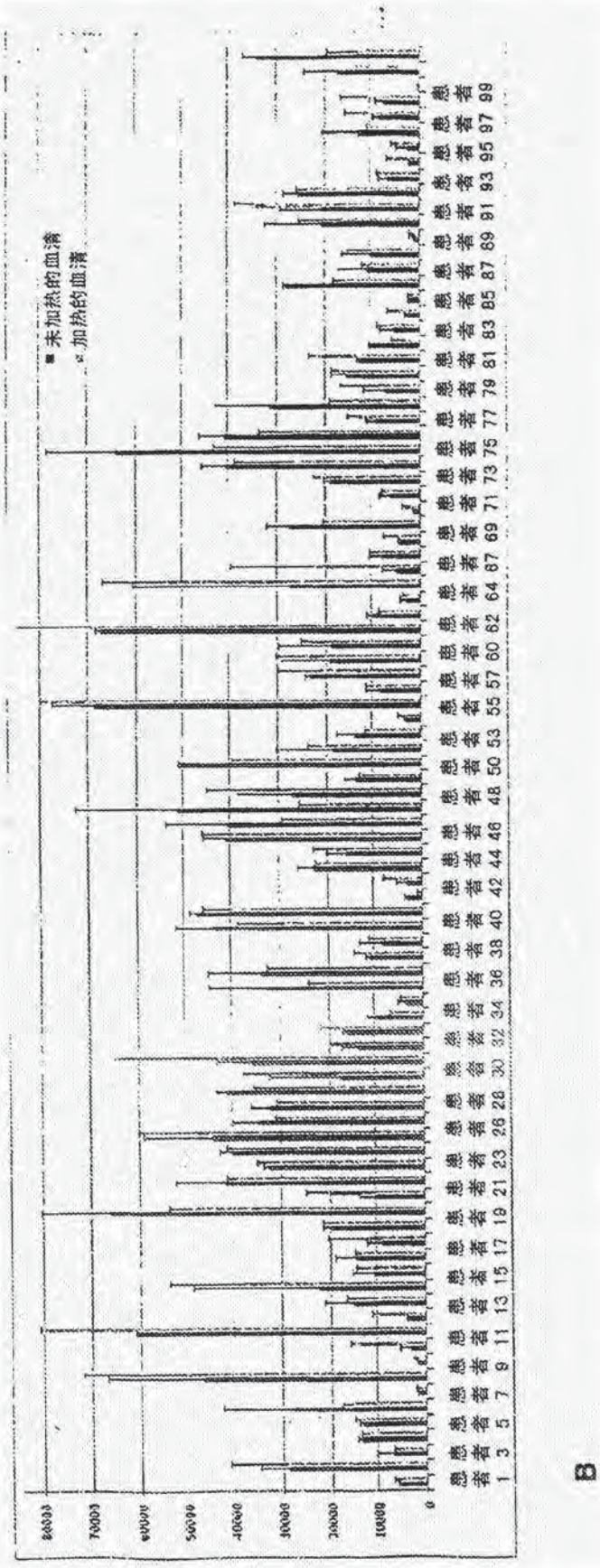


图59B

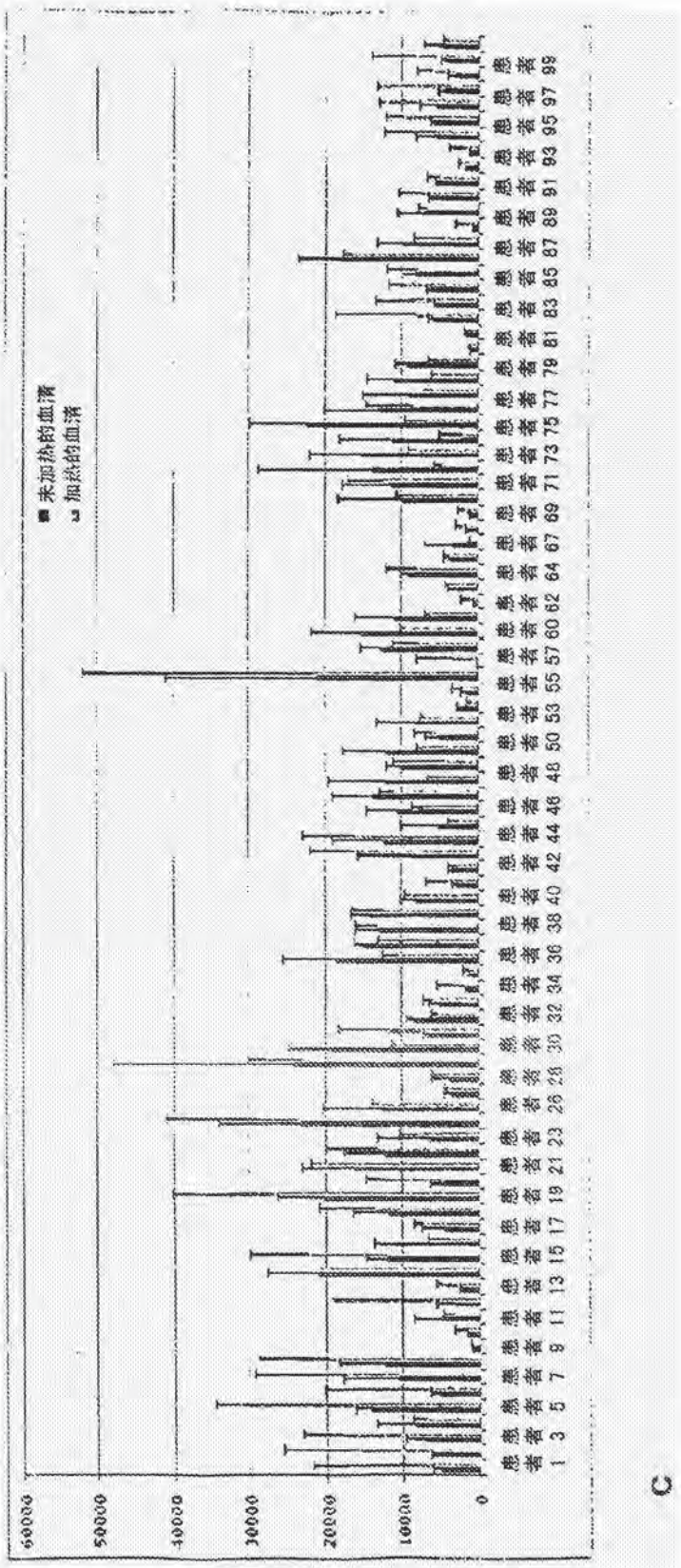
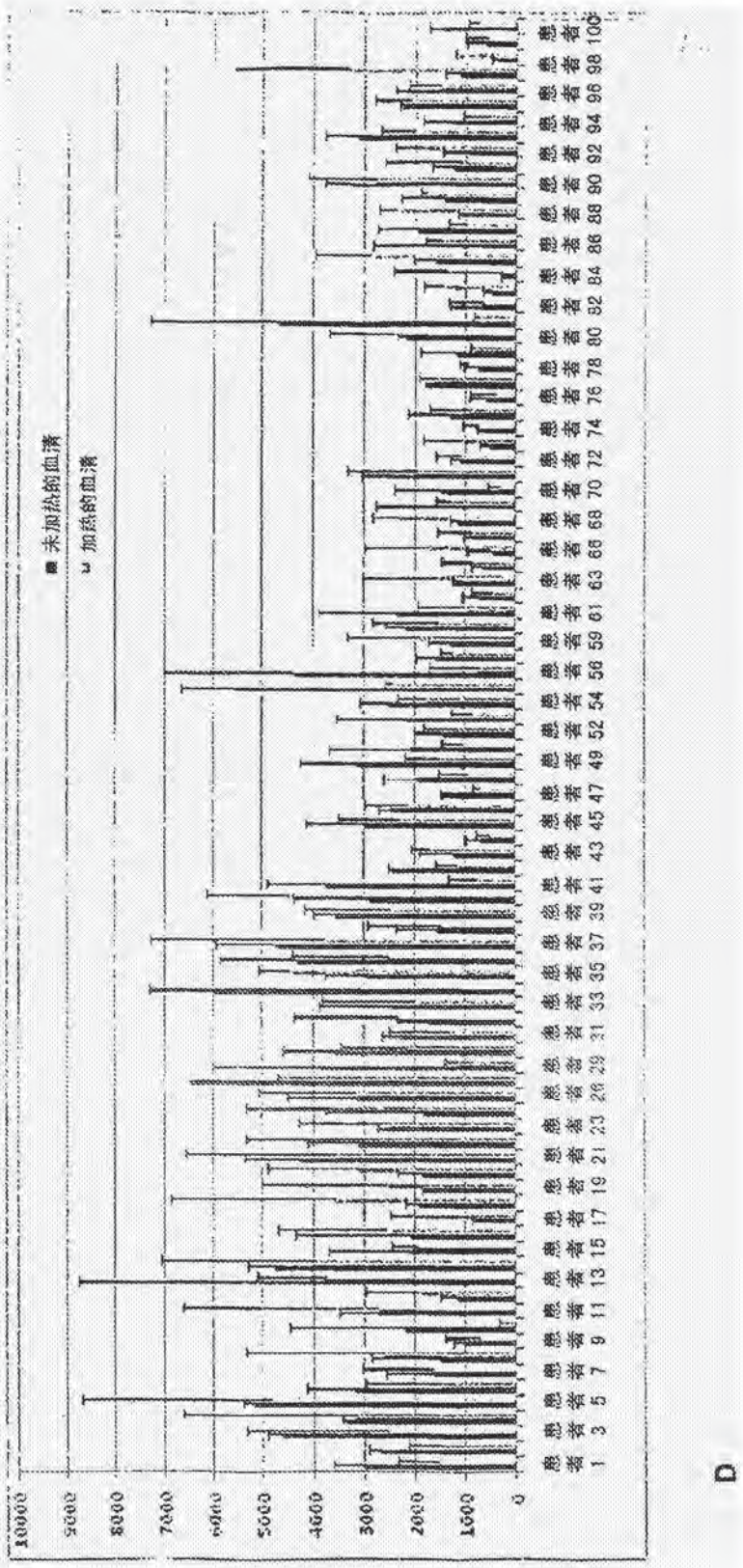

未加热的血清
加热的血清
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
患者1
患者3
患者5
患者7
患者9
患者11
患者13
患者15
患者17
患者19
患者21
患者23
患者25
患者27
患者29
患者31
患者33
患者35
患者37
患者39
患者41
患者43
患者45
患者47
患者49
患者51
患者53
患者55
患者57
患者59
患者61
患者63
患者65
患者67
患者69
患者71
患者73
患者75
患者77
患者79
患者81
患者83
患者85
患者87
患者89
患者91
患者93
患者95
患者97
患者99
C

图59C


未加热的血清
加热的血清
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
患者1
患者3
患者5
患者7
患者9
患者11
患者13
患者15
患者17
患者19
患者21
患者23
患者25
患者27
患者29
患者31
患者33
患者35
患者37
患者39
患者41
患者43
患者45
患者47
患者49
患者52
患者54
患者56
患者59
患者61
患者63
患者66
患者68
患者70
患者72
患者74
患者76
患者78
患者80
患者82
患者84
患者86
患者88
患者90
患者92
患者94
患者96
患者98
患者100

D

图59D

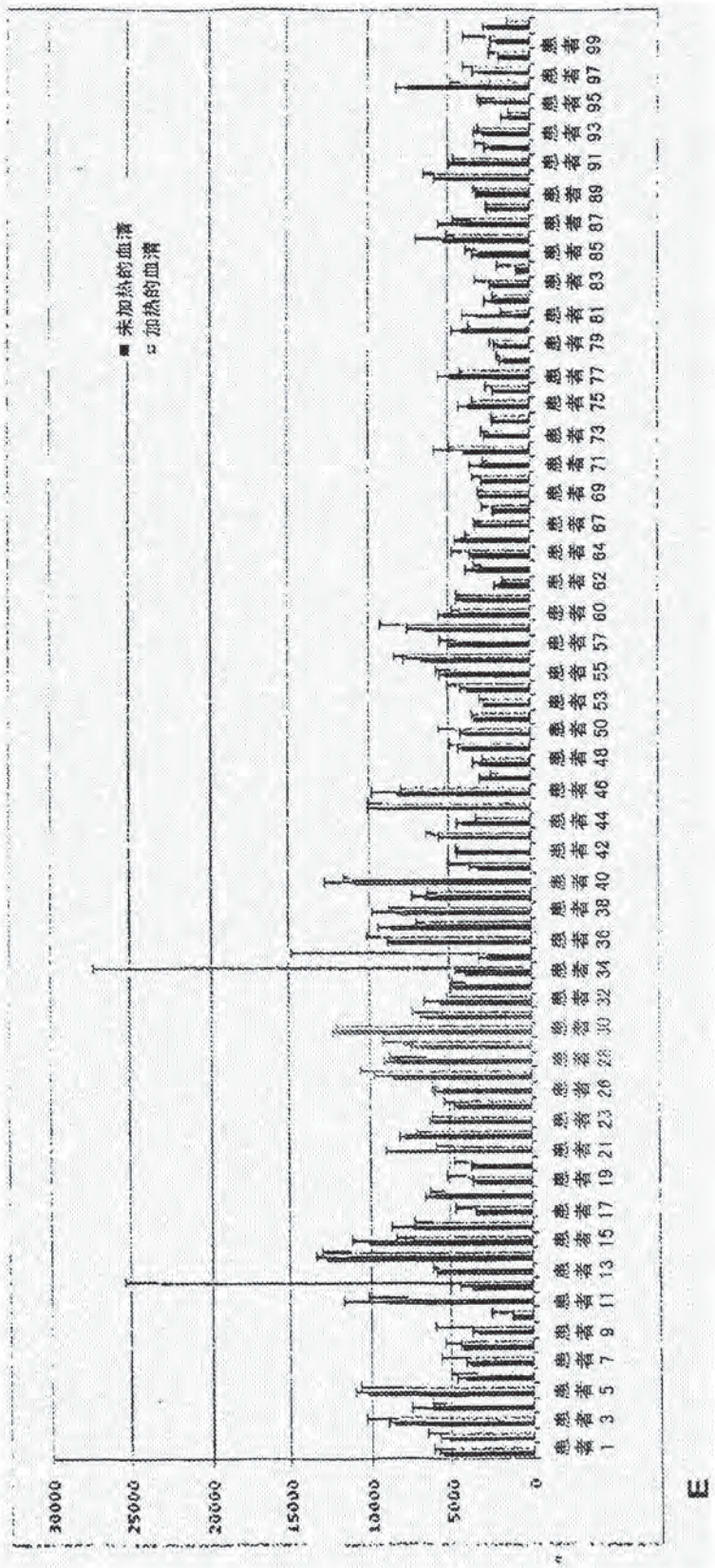
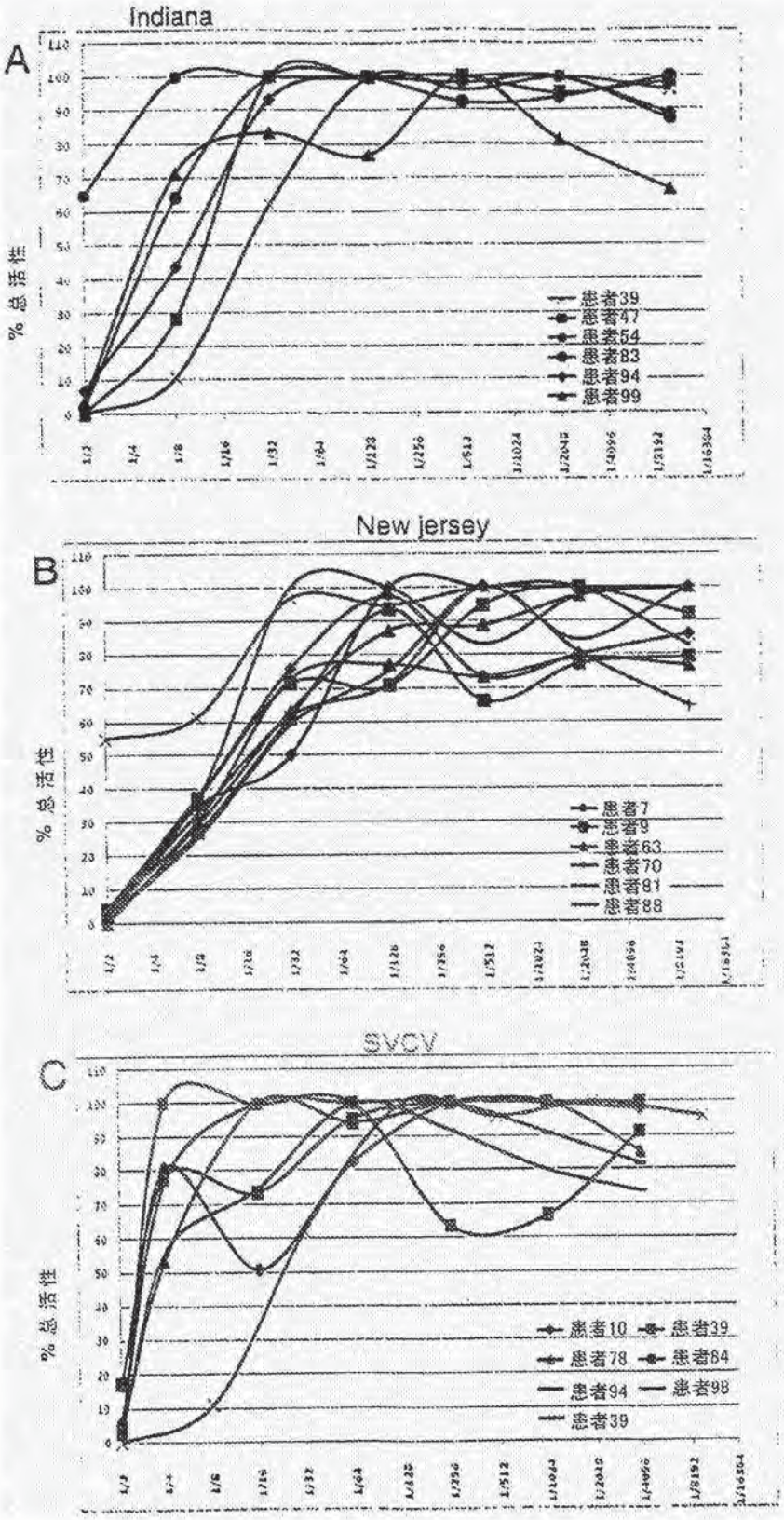


图59E


A
Indiana
% 总活性
患者39
患者47
患者54
患者83
患者94
患者99
B
New jersey
% 总活性
患者7
患者9
患者63
患者70
患者81
患者88
C
SVCV
% 总活性
患者10
患者39
患者78
患者84
患者94
患者98
患者39

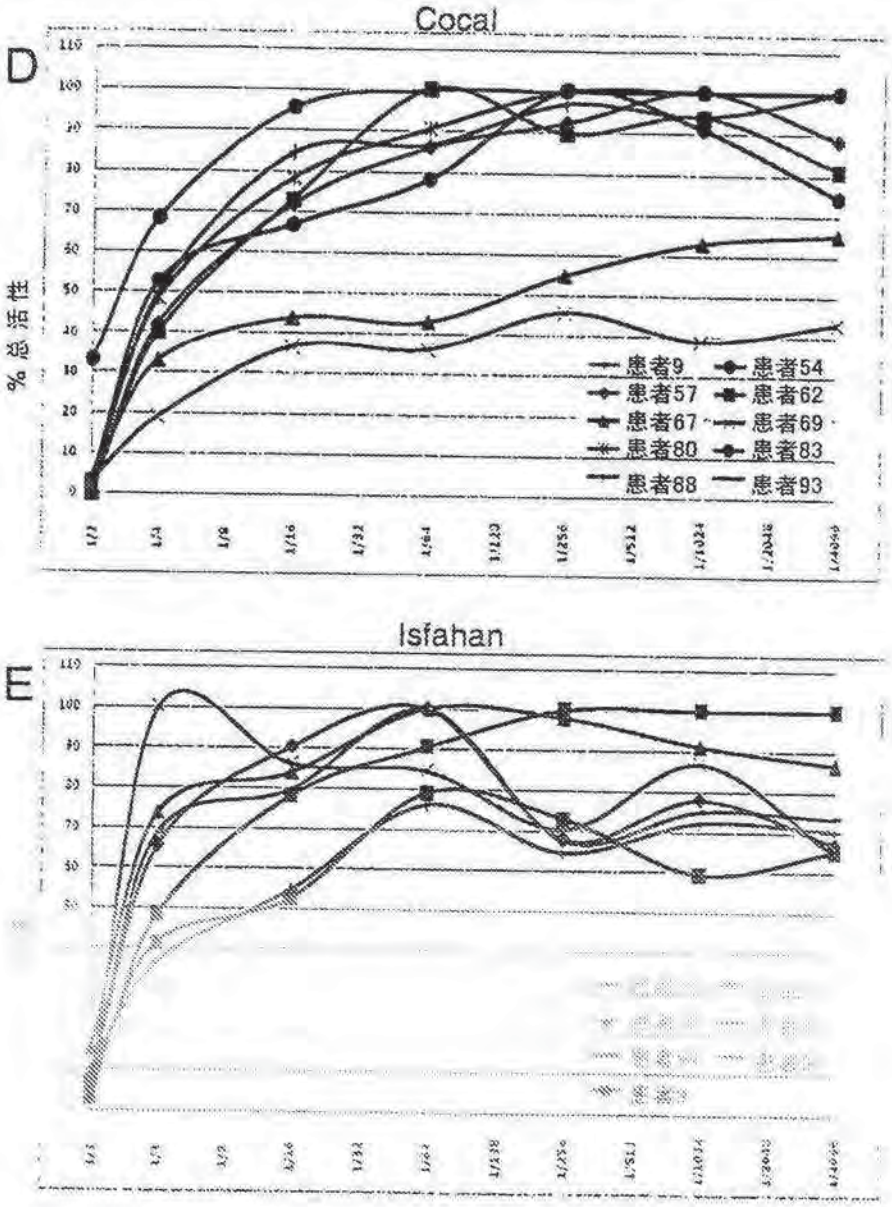
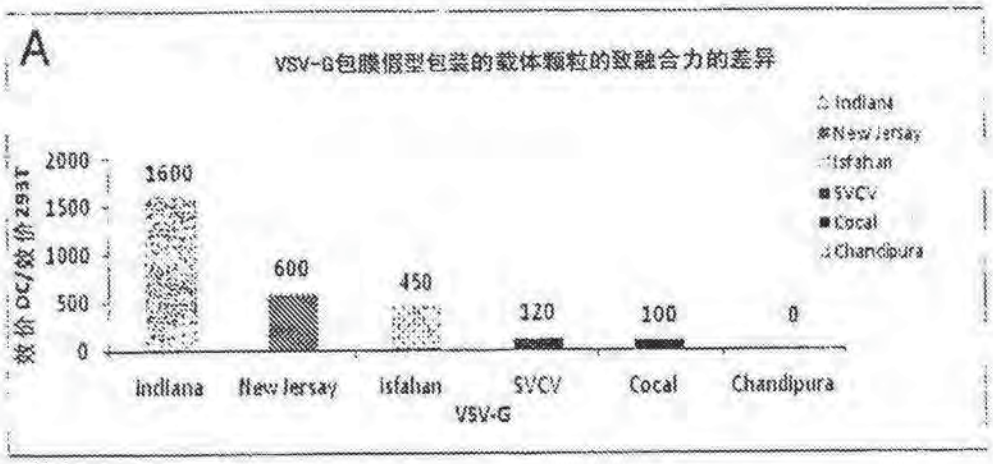

D
Cocal
% 总活性
患者9
患者54
患者57
患者62
患者67
患者69
患者80
患者83
患者88
患者93
E
Isfahan

图60


A
VSV-G包膜假型包装的载体颗粒的致融合力的差异
Indiana
New Jersay
Isfahan
SVCV
Cocal
Chandipura
效价 OC/效价 293T
2000
1500
1000
500
0
1600
600
450
120
100
0
Indiana
New Jersay
Isfahan
SVCV
Cocal
Chandipura
VSV-G

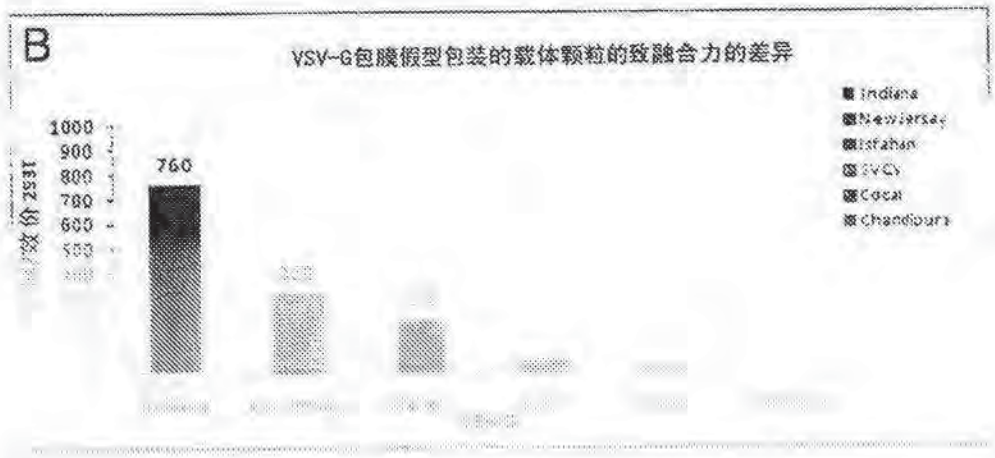

B
VSV-G包膜假型包装的载体颗粒的致融合力的差异
Indiana
New Jersay
Isfahan
SVCV
Cocal
Chandipura
1000
900
800
700
600
760

图61

Abstract

The present invention relates to the design of gene transfer vectors and especially provides lentiviral gene transfer vectors suitable for either a unique administration or, for iterative administration in a host, and to their medicinal application (such as vaccination against Immunodeficiency Virus, especially suitable in human hosts). Gene transfer vectors are either integrative or non-integrative (Nl) vectors, dependently upon the purpose of their use. The invention relates to the use of gene transfer vectors for unique or for multiple in vivo administration into a host in need thereof. The field of application of the present application concerns in particular animal treatment or treatment of human being (e.g. prophylactic or therapeutic or symptomatic or curative treatment), gene therapy or vaccination in vivo. These vectors may be used to elicit an immune response to prevent or to treat a pathogenic state, including virus infections (for example treatment or prevention against Immunodeficiency Virus and especially against AIDS), parasite and bacterial infections or cancers, and preferably to elicit a protective, long-lasting immune response.