

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0033650

(43) 공개일자 2023년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/86 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/86 (2013.01)
A61K 39/215 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7044997

(22) 출원일자(국제) 2021년06월01일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2022년12월21일

(86) 국제출원번호 PCT/US2021/035239

(87) 국제공개번호 WO 2021/247567

국제공개일자 2021년12월09일

(30) 우선권주장

63/032,815 2020년06월01일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

워싱턴 유니버시티

미국 미주리 세인트 루이스 브루킹즈 드라이브 1
(우:63130)

(72) 발명자

쿠리얼 데이비드

미국 미주리 63130 세인트 루이스 브루킹즈 드라이브 1
썬/오 워싱턴 유니버시티

다이아몬드 마이클

미국 미주리 63130 세인트 루이스 브루킹즈 드라이브 1
썬/오 워싱턴 유니버시티

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강명구

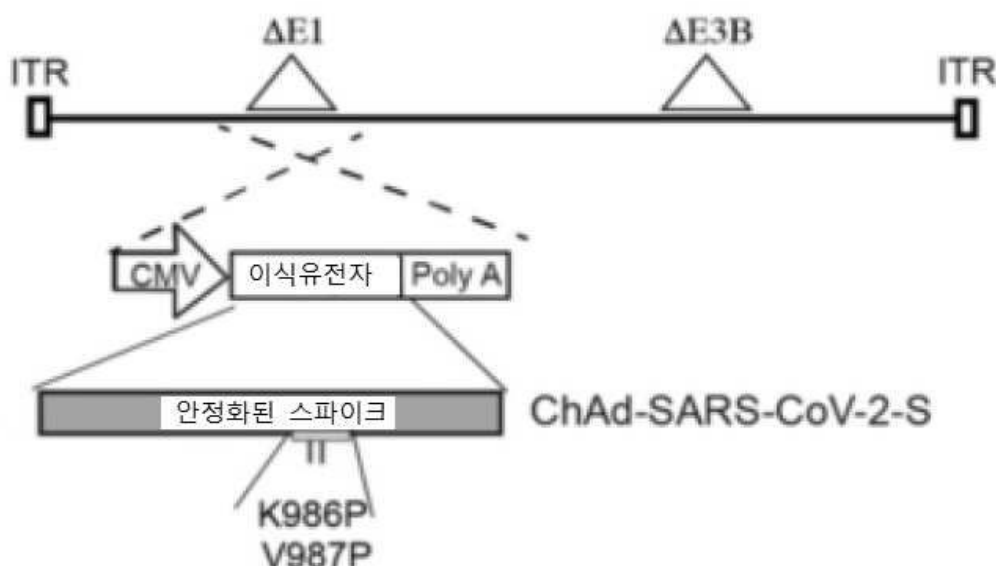
전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 코로나바이러스 백신 구조체 및 이의 제조 및 사용 방법

(57) 요약

바이러스 감염을 치료하기 위한 조성물 및 방법은 아데노바이러스 벡터의 사용을 포함할 수 있다. 본 발명의 아데노바이러스 벡터는 하나 이상의 유전자좌가 기능적으로 제거된 비-인간 아데노바이러스 게놈 및 이식유전자를 포함할 수 있다. 바이러스 감염을 치료하는 방법은 본 발명의 아데노바이러스 벡터를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하고 바이러스의 감염성 또는 전염을 감소시키는 것을 포함할 수 있다. 비강내 투여는 근육내 투여에 비해 대상체의 상기도 보호를 향상시킨다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61P 31/14 (2018.01)

C07K 14/005 (2013.01)

A61K 2039/5256 (2013.01)

A61K 2039/543 (2013.01)

A61K 2039/55555 (2013.01)

A61K 2039/575 (2013.01)

C12N 2710/10343 (2013.01)

C12N 2770/20022 (2013.01)

C12N 2770/20034 (2013.01)

(72) 발명자

디미트리브 이고르

미국 미주리 63130 세인트 루이스 브루킹즈 드라이
브 1 씨/오 워싱턴 유니버시티

하싼 아메드

미국 미주리 63130 세인트 루이스 브루킹즈 드라이
브 1 씨/오 워싱턴 유니버시티

(30) 우선권주장

63/051,103 2020년07월13일 미국(US)

63/162,417 2021년03월17일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

비인간 아데노바이러스의 게놈을 포함하는 아데노바이러스 벡터로서, 이 때 아데노바이러스의 게놈은 천연 E1, 그리고 선택적으로 E3 또는 E3B 유전자좌가 결여되도록 벡터가 변형되어 있고, 숙주 세포에서 전사, 번역 및/또는 발현을 지시하는 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결된 이식유전자를 포함하며, 이 때 이식유전자는 SARS-CoV-2 스파이크(S) 단백질 또는 이의 면역원성 부분, 변이체, 돌연변이체 또는 단편을 인코딩하는, 아데노바이러스 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 아데노바이러스는 유인원 아데노바이러스(SAdV)인, 아데노바이러스 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서, SAdV는 유인원 아데노바이러스 36인, 아데노바이러스 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서, 아데노바이러스 게놈은 서열번호 4와의 서열 동일성이 적어도 80%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1 %, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1 %, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9%인 핵산 서열을 가지는, 아데노바이러스 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서, 아데노바이러스 게놈은 서열번호 4의 핵산 서열을 가지는, 아데노바이러스 벡터.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 이식유전자는 SARS-CoV-2 스파이크(S) 단백질의 안정화된 융합전 형태를 인코딩하는, 아데노바이러스 벡터.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 이식유전자는 서열번호 3과의 서열 동일성이 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1 %, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1 %, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9%인 아미노산 서열을 가지는 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질을 인코딩하는, 아데노바이러스 벡터.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 이식유전자는 K986P 및 V987P 돌연변이가 있는 서열번호 3과의 서열 동일성이 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1 %, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1 %, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9%인 아미노산 서열을 가지는 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질을 인코딩하는, 아데노바이러스 벡터.

청구항 9

제1항에 있어서, 이식유전자는 WA1/2020, B.1.1.7, B.1.351, B.1.1.28, P.1, B.1.427, B.1.526, B.1.526.1, B.1.525, P.2, B.1.617, B.1.617.1, B.1.617.2, B.1.617.3, B.1.429 또는 B.1.429 변이체의 코로나바이러스 S 단백질인, 아데노바이러스 벡터.

청구항 10

제1항에 있어서, 아데노바이러스 벡터는 서열번호 2, 서열번호 5 또는 서열번호 6과의 서열 동일성이 적어도

80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1 %, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1 %, 99.2%, 99.3%, 99.4% 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9%인 핵산 서열을 가지는, 아데노바이러스 벡터.

청구항 11

제1항에 있어서, 아데노바이러스 벡터는 서열번호 2, 서열번호 5 또는 서열번호 6의 핵산 서열을 가지는, 아데노바이러스 벡터.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 아데노바이러스 벡터 및 약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 조성물은 비강내 투여용으로 제형화된, 약학 조성물.

청구항 14

전술한 청구항 중 어느 한 항에 따른 아데노바이러스 벡터 및 선택적으로 하나 이상의 추가 활성 성분, 약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 15

전술한 청구항 중 어느 한 항의 조성물 또는 아데노바이러스 벡터가 형질도입된 숙주 세포.

청구항 16

전술한 청구항 중 어느 한 항의 조성물 또는 바이러스 벡터를 생산하는 패키징 세포주.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 세포는 전술한 청구항 중 어느 한 항의 바이러스 벡터에서 기능적으로 결실된 아데노바이러스 유전자들의 보체를 포함하는, 패키징 세포주.

청구항 18

(i) 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 숙주 세포, 세포주, 조성물 또는 아데노바이러스 벡터 또는 이의 면역원성 조성물, 및 (ii) 사용 지침서를 포함하는 키트.

청구항 19

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 조성물 또는 아데노바이러스 벡터를 포함하는 코로나바이러스 백신.

청구항 20

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 조성물을 이미 투여받은 대상체의 혈청을 포함하는 조성물.

청구항 21

제20항의 혈청을 포함하는 면역원성 유효량의 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 코로나바이러스 감염된 제2 대상체의 치료 방법.

청구항 22

대상체에게 면역원성 유효량의 제1항 내지 제14항 또는 제19항 내지 제20항 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 코로나바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 23

대상체에게 면역원성 유효량의 제1항 내지 제14항 또는 제19항 내지 제20항 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는

것을 포함하는, 대상체에서 코로나바이러스 감염을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 24

대상체에게 면역원성 유효량의 제1항 내지 제14항 또는 제19항 내지 제20항 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 코로나바이러스 감염으로부터 대상체를 보호하는 방법.

청구항 25

제21항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 비강내 투여되는, 방법.

청구항 26

제21항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 면역원성 유효량의 조성물은 비강, 상기도, 폐 조직 및 모든 다른 전염 부위를 SARS-CoV-2 감염에 대해 보호하고/하거나 상기도 감염 및 비강 바이러스 배출을 예방하는, 방법.

청구항 27

제21항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 면역원성 유효량의 조성물은 근육내 투여되는, 방법.

청구항 28

제21항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2 바이러스, D614G 돌연변이를 포함하는 SARS-CoV-2 변이체, 또는 SARS-CoV-2 돌연변이체인, 방법.

청구항 29

제21항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 인간인, 방법.

청구항 30

제21항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 코로나바이러스에 노출된 적이 있는, 방법.

청구항 31

제21항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 코로나바이러스 감염이 없지만 감염될 위험이 있는, 방법.

청구항 32

제21항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 코로나바이러스가 유행하는 지역을 여행 중인, 방법.

청구항 33

제21항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물의 투여는 항원-특이적 면역 반응을 일으키는, 방법.

청구항 34

제21항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 코로나바이러스 감염되거나, 감염될 것으로 의심되거나, 감염될 위험이 있는, 방법.

청구항 35

제21항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체의 숙주 세포로 이식유전자를 전달하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 36

재조합 아데노바이러스의 제조 방법으로서, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 바이러스 벡터로 세포를 형질감염시키는 단계; 이러한 세포가 재조합 아데노바이러스를 생산하도록 하는 조건하에서 세포를 배양하는 단계; 및 재조합 아데노바이러스를 수집하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 세포는 HEK 세포, Vero 또는 PER 세포인, 방법.

발명의 설명**기술 분야****정부 지원**

본 발명은 국립 보건원 (National Institutes of Health)이 수여한 계약 AI131254하에서 정부의 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에서 일정한 권리를 가진다.

관련 출원에 대한 상호 참조

본 출원은 2021년 3월 17일에 출원된 미국 가출원 번호 63/162,417의 이익을 주장하고, 2020년 7월 13일에 출원된 미국 가출원 번호 63/051,103의 이익을 주장하며, 2020년 6월 1일 출원된 미국 가출원 번호 63/032,815의 이익을 주장하며, 이 문헌들의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

기술 분야

본 발명은 일반적으로 생명공학 및 의학 분야에 관한 것이며, 보다 구체적으로는 호흡기 바이러스 감염에 대한 강화된 요법을 위한 백신에 사용될 수 있는 핵산 구조체, 폴리펩티드 및 벡터 그리고 이의 사용 방법에 관한 것이다.

서열 목록에 대한 참조

본 출원에는 ASCII 형식으로 EFS-Web을 통해 제출된 서열 목록이 포함되어 있으며 이는 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다. 2021년 6월 1일에 생성된 ASCII 사본의 파일명은 688425_Sequence_listing_ST25.txt이고 크기는 212,366바이트이다.

배경 기술**배경기술**

바이러스 감염으로 매년 수십만 명이 사망한다. 그러나 많은 바이러스에 있어서 치료 방법은 제한적이다. 또한 바이러스 보균자는 무증상일 수 있어, 이는 감염되었으나 무증상인 개체들로부터의 감염률을 높이게 된다. 중증 급성 호흡기증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)는 코로나바이러스 질병 2019(COVID-19) 증후군의 병인이며 폐렴, 호흡 부전 및 전신 염증성 질병으로 빠르게 진행될 수 있다. SARS-CoV-2는 2019년 말 중국 우한에서 중증 호흡기 질병 환자로부터 처음 단리된 양성 센스 단일 가닥 RNA 바이러스이다. 베타코로나바이러스인 SARS-CoV-2는 다른 두 가지 고병원성 호흡기 바이러스인 SARS-CoV 및 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)와 관련이 있다. SARS-CoV-2 감염은 호흡 부전으로 진행될 수 있는 임상 증후군을 일으키고, 또한 심장병, 위장병, 응고장애 및 과염증 증후군을 동반하기도 한다. 노인, 면역력이 약한 사람, 동반 질병(예: 비만, 당뇨병, 고혈압)이 있는 사람은 COVID-19로 인한 사망 위험이 가장 크다. 대유행이 시작된 이후 전 세계적으로 1억 5,200만 건 이상의 감염과 320만 건의 사망이 기록되었다.

COVID-19의 광범위한 이환율, 사망률 및 불안정한 사회경제적 결과로 인해 감염의 중증도를 완화하고, 전염을 억제하고, 팬데믹을 종식시키고, 재발을 방지하기에 효과적인 SARS-CoV-2 백신의 개발이 매우 시급하다.

발명의 내용**요약**

본 발명의 다양한 양상 중에서 본원에 개시된 유효량의 나노입자 조성물을 포함하는 조성물 및 이의 사용 방법이 제공된다.

본 발명의 한 양상은 아데노바이러스 게놈의 적어도 일부를 갖는 아데노바이러스 벡터를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 아데노바이러스의 게놈은 적어도 천연 E1 유전자좌 및 선택적으로 E3 또는 E3B 유전자좌가 상기

백터에서 결여되도록 변형되어 있고/있거나 베타코로나바이러스 이식유전자를 포함한다. 한 양상에서, 이식유전자는 SARS-CoV-2 스파이크(S) 단백질(예: 우한, 남아프리카, 이의 다른 변이체 또는 돌연변이체 등)의 적어도 일부, S 단백질의 면역원성 단편, S 단백질의 면역원성 돌연변이체(예: 융합 전 안정화된 돌연변이체, D614G 돌연변이를 포함하는 SARS-CoV-2 변이체), 또는 이의 면역원성 부분, 변이체, 돌연변이체 또는 단편(예: 부가, 삽입, 결실, 치환)이다.

- [0015] 본 발명의 또 다른 양상은 유인원(유인원) 아데노바이러스 백터를 포함하는 핵산 분자; 또는 SARS-CoV-2 바이러스 폴리펩티드 또는 이의 면역원성 부분, 변이체, 돌연변이체 또는 단편의 스파이크 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 조성물을 제공한다. 예를 들어, 스파이크 단백질은 우한 또는 남아프리카 공화국 또는 이의 변이체일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 양상은 유인원 아데노바이러스 백터를 인코딩하는 핵산 분자; 또는 SARS-CoV-2 스파이크(S) 단백질의 적어도 일부, S 단백질의 면역원성 단편, S 단백질의 면역원성 돌연변이체(예: 융합 전 안정화된 돌연변이체, D614G 돌연변이를 포함하는 SARS-CoV-2 변이체), 또는 이의 면역원성 부분, 변이체, 돌연변이체 또는 단편(예를 들어, 부가, 삽입, 결실, 치환)을 포함하는 항원을 인코딩하는 핵산을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 양상은 코로나바이러스의 스파이크 단백질 또는 이의 면역원성 부분, 변이체, 돌연변이체 또는 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 다수의 아데노바이러스 구조 단백질 또는 코로나바이러스 폴리펩티드를 인코딩하는 아데노바이러스 백터를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 양상은 계놈에 코로나바이러스 스파이크 단백질(S) 단백질 또는 안정화된 돌연변이 S 단백질 또는 이의 면역원성 단편, 돌연변이체 또는 변이체의 적어도 일부를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 아데노바이러스 백본을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 양상은 다음을 포함하는 코로나바이러스 백신을 포함하는 조성물을 제공한다: 전술한 양상 또는 실시형태 중 어느 하나의 아데노바이러스 백터; 전술한 양상 또는 실시형태 중 어느 하나의 코로나바이러스 폴리펩티드 또는 이의 면역원성 부분 또는 변이체를 인코딩하는 핵산; 또는 부형제 또는 보조제.
- [0020] 일부 실시형태에서, 상기 코로나바이러스 폴리펩티드 또는 면역원성 부분은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 폴리펩티드 또는 이의 면역원성 부분, 변이체 또는 돌연변이체, 예를 들어, D614G 돌연변이를 포함하는 SARS-CoV-2 변이체이다.
- [0021] 일부 실시형태에서, 핵산(또는 뉴클레오타이드) 서열은 적어도 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질의 면역원성 부분, 또는 이의 면역원성 단편 또는 변이체를 인코딩하며, 아데노바이러스 계놈의 내인성 아데노바이러스 E1 유전자를 실질적으로 대체한다.
- [0022] 일부 실시형태들에서, 상기 핵산은 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질의 부분 또는 면역원성 단편 또는 서열번호 3의 코로나바이러스 스파이크 단백질 부분에 적어도 80% 동일한 서열을 가지는 면역우너성 단편 또는 이의 변이체를 인코딩하며; 서열번호 3은 K986P 및 V987P 돌연변이를 가지거나; 또는 서열번호 3은 D614G 돌연변이를 가진다.
- [0023] 일부 실시형태에서, 핵산은 서열번호 5 또는 서열번호 6과 적어도 80% 동일하고 면역원성 스파이크 단백질 또는 이의 면역원성 부분 또는 변이체를 인코딩한다.
- [0024] 일부 실시형태에서, 아데노바이러스 백터는 유인원 Ad36 백터(ChAd)이다.
- [0025] 일부 실시형태에서, 코로나바이러스 단백질은 서열번호 3으로 제시된 서열과 적어도 80%의 서열 동일성을 가지며; 서열번호 3은 K986P 및 V987P 돌연변이를 가지거나; 또는 서열번호 3은 D614G 돌연변이를 가진다.
- [0026] 일부 실시형태에서, 코로나바이러스 단백질은 서열번호 3으로 제시된 서열과 적어도 85%의 서열 동일성을 가지며; 서열번호 3은 K986P 및 V987P 돌연변이를 가지거나; 또는 서열번호 3은 D614G 돌연변이를 가진다.
- [0027] 일부 실시형태에서, 코로나바이러스 단백질은 서열번호 3으로 제시된 서열과 적어도 90%의 서열 동일성을 가지며; 서열번호 3은 K986P 및 V987P 돌연변이를 가지거나; 또는 서열번호 3은 D614G 돌연변이를 가진다.
- [0028] 일부 실시형태에서, 코로나바이러스 단백질은 서열번호 3으로 제시된 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 가지며; 서열번호 3은 K986P 및 V987P 돌연변이를 가지거나; 또는 서열번호 3은 D614G 돌연변이를 가진다.
- [0029] 일부 실시형태에서, 코로나바이러스 단백질은 서열번호 3으로 제시된 서열과 적어도 99%의 서열 동일성을 가지

며; 서열번호 3은 K986P 및 V987P 돌연변이를 가지거나; 또는 서열번호 3은 D614G 돌연변이를 가진다.

- [0030] 일부 실시형태에서, 코로나바이러스 단백질은 서열번호 3으로 제시된 서열을 가지며; 서열번호 3은 K986P 및 V987P 돌연변이를 가지거나; 또는 서열번호 3은 D614G 돌연변이를 가진다.
- [0031] 일부 실시형태에서, 항원은 융합 전 삼량체에서 스파이크를 안정화시키는 돌연변이를 포함한다.
- [0032] 일부 실시형태에서, 항원은 SARS-CoV-2 스파이크(S) 표면 당단백질의 일부 또는 안정화된 부분, 이와 실질적으로 동일한 서열, 또는 이의 기능적 단편 또는 기능적 돌연변이 또는 변이체이다.
- [0033] 일부 실시형태에서, 항원은 서열번호 3의 2개의 아미노산 돌연변이, K986P 및 V987P가 있는, 적어도 S 단백질의 기능적 부분 또는 돌연변이체이다.
- [0034] 일부 실시형태에서, 항원은 서열번호 3에 따른 서열에서 D614G 돌연변이를 갖는, 적어도 S 단백질의 기능적 부분 또는 돌연변이체이다.
- [0035] 일부 실시형태에서, 아데노바이러스는 비인간 아데노바이러스이다.
- [0036] 일부 실시형태에서, 아데노바이러스는 유인원 아데노바이러스이다.
- [0037] 일부 실시형태에서, 아데노바이러스는 SAd36이다.
- [0038] 일부 실시형태에서, 아데노바이러스는 E1 및 E3B 유전자에서 결실(서열번호 4; 각각 뉴클레오티드 30072-31869 및 뉴클레오티드 455-3026)을 갖는 유인원 아데노바이러스, SAd36이다.
- [0039] 일부 실시형태에서, 아데노바이러스는 기능적 E1 유전자좌 및 E3 유전자좌가 결여되어 있다.
- [0040] 본 발명의 한 양상은 전술한 양상 또는 실시형태 중 어느 하나에 따른 조성물 및 선택적으로 하나 이상의 추가 활성 성분, 약학적 허용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다.
- [0041] 본 발명의 한 양상은 전술한 양상 또는 실시형태 중 어느 하나의 조성물 또는 아데노바이러스 벡터를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다.
- [0042] 본 발명의 한 양상은 전술한 양상 또는 실시형태 중 어느 하나의 조성물 또는 아데노바이러스 벡터로 형질도입된 숙주 세포를 제공한다.
- [0043] 본 발명의 한 양상은 전술한 양상 또는 실시형태 중 어느 하나의 조성물 또는 바이러스 벡터를 생산하는 패키징 세포주를 제공한다.
- [0044] 일부 실시형태에서, 세포는 전술한 양상 또는 실시형태 중 어느 하나의 바이러스 벡터로부터 기능적으로 결실된 임의의 바이러스 유전자(예를 들어, E1)의 보체를 포함함으로써, 보완(complementation)을 통한 바이러스 복제를 허용한다.
- [0045] 본 발명의 한 양상은 (i) 전술한 양상 또는 실시형태 중 어느 하나에 따른 숙주 세포, 세포주, 조성물, 또는 아데노바이러스 벡터 또는 이의 면역원성 조성물, 또는 (ii) 사용 지침을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0046] 본 발명의 양상은 게놈에 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질의 적어도 일부 또는 이의 면역원성 단편 또는 변이체(예를 들어, K986P 및 V987P 돌연변이를 갖는 서열번호 3, D614G 돌연변이를 갖는 서열번호 3)를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터를 제공한다.
- [0047] 일부 실시형태에서, 핵산 또는 뉴클레오티드 서열은 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질의 적어도 면역원성 부분, 또는 이의 면역원성 단편 또는 변이체/돌연변이체를 인코딩하며, 아데노바이러스 게놈에서 내인성 아데노바이러스 E1 유전자를 실질적으로 대체한다.
- [0048] 일부 실시형태에서, 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질의 부분 또는 면역원성 단편 또는 이의 변이체/돌연변이체를 인코딩하는 핵산은 서열번호 3의 코로나바이러스 스파이크 단백질 부분에 적어도 80% 동일한 서열을 가지며; 서열번호 3은 K986P 및 V987P 돌연변이를 가지거나; 또는 서열번호 3은 D614G 돌연변이를 가진다.
- [0049] 본 발명의 양상은 전술한 양상 또는 실시형태 중 어느 하나의 재조합 아데노바이러스 벡터 및 약학적 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0050] 일부 실시형태에서, 상기 조성물은 보조제를 추가로 포함한다.
- [0051] 본 발명의 한 양상은 전술한 양상 또는 실시형태 중 어느 하나의 조성물 또는 재조합 아데노바이러스 벡터를 포

함하는 코로나바이러스 백신을 제공한다.

- [0052] 본 발명의 한 양상은 전술한 양상 또는 실시형태 중 어느 하나에 따른 재조합 아데노바이러스 벡터를 인코딩하는 핵산을 제공한다.
- [0053] 일부 실시형태에서, 핵산은 서열번호 3의 코로나바이러스 스파이크 단백질을 인코딩하는 부분과 적어도 80% 동일한 서열을 갖고; 서열번호 3은 K986P 및 V987P 돌연변이를 가지거나; 또는 서열번호 3은 D614G 돌연변이를 갖는다.
- [0054] 본 발명의 한 양상은 전술한 양상 또는 실시형태 중 어느 하나의 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0055] 본 발명의 한 양상은 전술한 양상 또는 실시형태 중 어느 하나에 따른 핵산 또는 발현 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.
- [0056] 본 발명의 한 양상은 전술한 양상 또는 실시형태 중 어느 하나의 구성물을 이전에 투여받은 대상체의 혈청을 포함하는 구성물을 제공한다.
- [0057] 본 발명의 한 양상은 대상체에게 전술한 양상에 따른 면역원성 유효량의 혈청을 포함하는 구성물을 투여하는 것을 포함하는, 코로나바이러스 감염된 제2 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0058] 본 발명의 한 양상은 전술한 양상 또는 실시형태 중 어느 하나에 따른 면역원성 유효량의 구성물 또는 백신을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 코로나바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0059] 본 발명의 한 양상은 대상체에게 전술한 양상 또는 실시형태 중 어느 하나의 면역원성 유효량의 구성물 또는 백신을 투여하는 것을 포함하는, 대상체의 코로나바이러스 감염을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0060] 본 발명의 한 양상은 전술한 양상 또는 실시형태 중 어느 하나에 따른 면역원성 유효량의 구성물 또는 백신을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 코로나바이러스로부터 대상체를 보호하는 방법을 제공한다.
- [0061] 일부 실시형태에서, 면역원성 유효량의 구성물 또는 백신은 비강, 상기도, 폐 조직 및 기타 모든 전염 부위를 SARS-CoV-2 감염에 대해 보호하고/하거나 상기도 감염 및 비강 바이러스 배출(shedding)을 예방한다.
- [0062] 일부 실시형태에서, 면역원성 유효량의 구성물 또는 백신은 비강내로 투여된다.
- [0063] 일부 실시예에서, 면역원성 유효량의 구성물 또는 백신은 근육내로 투여된다.
- [0064] 일부 실시예에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2 바이러스, D614G 돌연변이를 포함하는 SARS-CoV-2 변이체, 또는 SARS-CoV-2 돌연변이체이다.
- [0065] 일부 실시형태들에서, 대상체는 인간이다.
- [0066] 일부 실시예에서, 대상체는 코로나바이러스에 노출되었다.
- [0067] 일부 실시형태에서, 대상체는 코로나바이러스 감염이 없지만 발병할 위험이 있다.
- [0068] 일부 실시예에서, 대상체는 코로나바이러스가 유행하는 지역으로 여행 중이다.
- [0069] 일부 실시예에서, 대상체는 코로나바이러스에 노출된다.
- [0070] 일부 실시예에서, 백신의 전달은 항원 특이적 면역 반응을 야기한다.
- [0071] 일부 실시형태에서, 대상체는 코로나바이러스가 감염되거나, 감염될 것으로 의심되거나, 발병할 위험이 있다.
- [0072] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 대상체의 숙주 세포 내로 이식유전자를 전달하는 것을 포함한다.
- [0073] 본 발명의 한 양상은 재조합 아데노바이러스의 제조 방법을 제공하며, 이 방법은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질, 돌연변이체, 또는 그의 안정화된 돌연변이체를 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터를 인코딩하는 플라스미드로 세포를 형질감염시키는 단계; 세포가 재조합 아데노바이러스를 생산하도록 하는 조건하에서 세포를 배양하는 단계; 및 재조합 아데노바이러스를 수집하는 단계를 포함한다.
- [0074] 일부 실시형태에서, 세포는 HEK 세포, Vero 또는 PER 세포이다.
- [0075] 본 발명의 한 양상은 재조합 아데노바이러스 벡터의 생산 방법을 제공하며, 이 방법은 상기 아데노바이러스 벡터를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 숙주 세포에 통합시키는 단계를 포함하고, 여기서 아데노바이러스 벡

터는 아데노바이러스-안정화 스파이크 단백질, 아데노바이러스 야생형 스파이크 단백질 또는 이의 면역원성 단편 또는 변이체/돌연변이체를 생산할 수 있다.

[0076]

다수의 실시형태들이 개시되지만, 본 발명의 또 다른 실시형태들은, 본 발명의 예시적인 실시예를 나타내고 설명하는 다음의 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0077]

도면의 간단한 설명

당업자는 아래에 설명된 도면이 단지 설명을 위한 것임을 이해할 것이다. 도면은 어떤 식으로든 본원 개시내용의 범위를 제한하려는 의도가 아니다.

출원 파일에는 컬러로 완성된 하나 이상의 도면이 포함되어 있다. 컬러 도면이 있는 본 특허 출원 공개공보 사본은 요청 및 필요한 수수료 지불 시 특허청에서 제공할 것이다.

도 1A-1H는 ChAd-SARS-CoV-2-S의 면역원성을 도시한다. **도 1A**는 이식유전자 카세트의 다이어그램을 보여준다: ChAd-대조군에는 이식유전자 삽입물이 없고; ChAd-SARS-CoV-2-S는 표시된 두 개의 프롤린 돌연변이가 있는 SARS-CoV-2 S 단백질을 인코딩한다. **도 1B**는 ChAd-SARS-CoV-2-S 형질도입된 293 세포와 항-S mAbs의 결합을 보여준다. (왼쪽) 요약: +, ++, +++, -는 각각 < 25%, 25-50%, > 50%, 결합 없음을 나타낸다. (오른쪽) 두 실험의 대표적인 유세포분석 히스토그램. **도 1C**는 4주령 암컷 BALB/c 마우스를 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S로 근육내 경로를 통해 면역화시키고 4주 후에 부스트하였음을 보여준다. 프라이밍 또는 부스트 후 21일차에 면역화된 마우스의 혈청에서 항체 반응을 평가하였다. **도 1D**는 ELISA로 측정된 항-S 및 RBD IgG 수준을 보여준다. **도 1E**는 FRNT 결정된 중화 활성을 보여준다. 두 실험에서 데이터를 모았다(n = 15 내지 30; 맨-휘트니 검정: ****, P < 0.0001). **도 1F**는 부스터 면역화 후 7일차에 S 단백질 펩티드 폴로 재자극 후 분석한 세포 매개 반응을 보여준다. CD8⁺ T 세포에서 IFN γ 및 그랜자임 B 발현에 대해 비장세포를 분석하고 CD4⁺ T 세포에서만 그랜자임 B를 유동 세포측정법으로 분석했다. **도 1G**는 양성 세포 집단의 빈도 및 수의 요약을 보여준다(n = 5; 맨-휘트니 검정: *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001). 막대는 중앙값을 나타내고 점선은 분석의 검출 한계(LOD)이다. **도 1H**는 부스팅 후 7일차에 비장을 채취하였고 SARS-CoV-2 스파이크 특이적 IgG+ 항체 분비 세포(ASC) 빈도가 ELISPOT에 의해 측정되었음을 보여준다(맨-휘트니 검정: ****, P < 0.0001). 막대와 컬럼은 중앙값을 나타내고 점선은 분석의 검출 한계(LOD)를 나타낸다.

도 2A-2D는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신이 FRNT로 측정된 중화 항체를 유도함을 도시한다. 4주령 암컷 BALB/c 마우스를 근육내 경로를 통해 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S로 프라이밍하거나 프라이밍 및 부스팅했다. **도 2A**는 (**도 1**에 기재된 바와 같이) 프라이밍 또는 부스팅 후 21일차에 수집된 ChAd-대조군 면역화된 마우스로부터의 혈청을 ELISA로 S-특이적 IgG 반응에 대해 분석하여 보여준다. **도 2B**는 프라이밍 후 21일차에 수집된 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2 백신접종된 마우스로부터의 혈청 샘플들을 보여준다. **도 2C**는 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2 백신접종 마우스의 혈청 샘플을 부스팅 후 21일차에 수집하고 중화 활성에 대해 FRNT로 분석한 것을 보여준다. 표시된 백신에 대해 개별 마우스에 해당하는 혈청 중화 곡선을 보여준다(그룹 당 n = 15-30). 각 점은 2번의 기술적 중복의 평균을 나타내며 오차 막대는 표준 편차(SD)를 나타낸다. **도 2D**는 ChAd-대조군 또는 근육내 경로로 백신접종된 ChAd-SARS-CoV-2-S 마우스의 SARS-CoV-2 공격접종 5일 전과 8일 후에 얻은 한 쌍의 혈청에서 항-SARS-CoV-2 NP IgG 반응을 측정한 ELISA를 보여준다(n = 5: ** P < 0.01; *** P < 0.001; 대응표본 t 검정). 점선은 나이트 혈청의 평균 IgG 역가를 나타낸다.

도 3은 T 세포 반응을 분석하기 위한 게이팅 전략을 보여준다. 4주령 암컷 BALB/c 마우스를 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화하고 4주 후에 부스팅했다. 부스팅 후 7일차에 비장세포에서 T 세포 반응을 분석하였다. 세포들을 림프구(FSC-A/SSC-A), 단일형(SSC-W/SSC-H), 살아있는 세포(Aqua-), CD45⁺, CD19⁻에 이어, IFN γ 또는 그랜자임 B를 발현하는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ 세포 집단에 대해 게이팅하였다.

도 4A-4B는 Hu-AdV5-hACE2를 사용한 마우스의 형질도입에 대한 기존 ChAd 면역의 영향을 도시한다. 4주령 암컷 BALB/c 마우스를 프라이밍하거나 프라이밍하고 부스팅하였다. 혈청 샘플들을 Hu-AdV5-hACE2 형질도입 1일 전에 수집하였다. **도 4A**는 표시된 백신 그룹들의 혈청에서 Hu-AdV5-hACE2의 중화 활성을 프라이밍만 한 후 FRNT로 결정하여 보여준다. **도 4B**는 표시된 백신 그룹들의 혈청에서 Hu-AdV5-hACE2의 중화 활성을 프라이밍 및 부스팅 후 FRNT로 결정하여 보여준다. 각 기호는 단일 동물을 나타낸다; 각 점은 두 번의 기술적 중복을 나타내며 막대는 범위를 나타낸다. 양성 대조군(항-Hu-Adv5 혈청)이 참조 프레임으로 포함된다.

도 5A-5G는 근육내 전달된 ChAd-SARS-CoV-2-S의 SARS-CoV-2 감염에 대한 보호 효능을 보여준다. **도 5A**는 백신 접종 및 공격접종 계획이다. 4주령 BALB/c 암컷 마우스는 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화되었다. 일부 마우스는 동종 백신의 부스터 용량을 투여받았다. 면역화 후 35일차에, 마우스를 다음과 같이 SARS-CoV-2로 공격접종하였다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하고 하루 후 비강내 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입했다. 5일 후, 마우스들을 비강 경로를 통해 4×10^5 개의 초점 형성 단위(FFU)의 SARS-CoV-2로 공격접종하였다. **도 5B**는 분석을 위해 4 및 8dpi에서 채취된 조직들을 보여준다. 폐의 감염성 바이러스를 플라크 분석으로 측정하였다. **도 5C**는 RT-qPCR(C)로 4dpi 및 8dpi에서 폐, 비장 및 심장에서 측정된 바이러스 RNA 수준을 보여준다($n = 3-7$, 맨-휘트니 검정: *** $P < 0.001$). **도 5D**는 4dpi에서 채취된 폐의 SARS-CoV-2 프로브(갈색)를 사용한 바이러스 RNA 인시튜 혼성화를 보여준다. 이미지는 저배율(상단, 눈금 막대, $100 \mu\text{m}$) 및 중간 배율(중양, 눈금 막대, $100 \mu\text{m}$)을 고배율 삽입부(그룹 당 $n = 3$ 의 대표 이미지)와 함께 보여준다. **도 5E**는 4 dpi에서 폐 균질물로부터 얻은 표시된 사이토카인 및 케모카인의 유전자 발현의 배수 변화를 RT-qPCR로 결정하고 Gapdh 수준으로 정규화하여 나이브 비백신접종된, 공격접종되지 않은 대조군과 비교하여 보여준다($n = 7$; 맨-휘트니 검정: ***, $P < 0.001$). **도 5F**는 프라임-부스터 면역화를 받은 마우스들을 부스터 면역화 후 35일차에 공격접종한 결과를 보여준다. 분석을 위해 조직을 4dpi에서 수집했다. 폐의 감염성 바이러스를 플라크 분석으로 결정하였다. **도 5G**는 프라임-부스터 면역화를 받은 마우스를 부스터 면역화 후 35일차에 공격접종하고 RT-qPCR(G)를 사용하여 폐, 비장 및 심장에서 바이러스 RNA를 측정된 결과를 보여준다($n = 6-7$; 맨-휘트니 검정: **, $P < 0.01$). (B-C 및 E-G) 컬럼은 중앙값을 나타내고 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 6는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 사용한 단회 용량 근육내 백신접종이 폐에서 SARS-CoV-2-유도된 염증으로부터 마우스들을 보호함을 보여준다. 4주령 암컷 BALB/c 마우스를 ChAd-대조군 및 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화하고 도 5에 설명된 계획에 따라 공격접종하였다. 폐는 8dpi에서 채취되었다. 절편들을 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하고 40x(왼쪽; 눈금 막대, $250 \mu\text{m}$), 200x(중양; 눈금, $50 \mu\text{m}$) 및 400x(오른쪽; 눈금 막대, $25 \mu\text{m}$) 배율로 이미지화했다. 각 이미지는 3마리의 마우스 그룹을 나타낸다.

도 7A-7J는 ChAd-SARS-CoV-2-S의 비강내 면역화 후 면역 반응을 보여준다. **도 7A**는 실험 계획을 보여준다. 5주령 BALB/c 암컷 마우스를 비강내 경로를 통해 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화했다. **도 7B**는 프라이밍 후 1개월차에 면역화된 마우스의 혈청 내 항체 반응을 평가한 결과를 보여준다. ELISA는 SARS-CoV-2 S 및 RBD 특이적 IgG를 측정했다. **도 7C**는 SARS-CoV-2 S 및 RBD 특이적 IgA 수준을 ELISA로 측정된 결과를 보여준다. **도 7D**는 FRNT로 결정된 중화 활성을 보여준다. 그룹 당 $n = 10-25$ 마리의 마우스를 사용한 두 실험으로부터 데이터를 모았다(맨-휘트니 검정: ****, $P < 0.0001$). **도 7E**는 부스터 용량을 투여받은 마우스를 1주 후에 희생시킨 후 점막 및 세포-매개 면역 반응을 평가한 결과를 보여준다. SARS-CoV-2 S 및 RBD 특이적 IgG. **도 7F**는 BAL 유체에서의 SARS-CoV-2 S- 및 RBD 특이적 IgA 수준을 ELISA로 결정된 결과를 보여준다. 도 7G는 SARS-CoV-2에 대한 BAL 유체의 중화 활성을 FRNT로 측정된 결과를 보여준다. **도 7H**는 폐의 CD8+ T 세포를 S 단백질 펩티드 폴로 재자극한 후 유세포 측정법으로 IFN γ 및 그랜자임 B 발현에 대해 분석한 결과를 보여준다. **도 7I**는 또한 폐의 CD8+ T 세포를 CD103 및 CD69의 발현에 대해 표현형 결정된 결과를 보여준다. **도 7J**는 부스팅 1주 후 채취된 비장에서 SARS-CoV-2 스파이크 특이적 IgG+ 및 IgA+ 항체-분비 세포(ASC) 빈도를 ELISPOT으로 측정하여 보여준다. 점막 및 세포 매개 반응에 대한 데이터들을 두 가지 실험으로부터 모았다(E-I: 그룹 당 $n = 7-9$, 맨-휘트니 검정: ***, $P < 0.001$); J: 그룹 당 $n = 5$; 맨-휘트니 검정: **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). (B-J) 막대와 컬럼은 중앙값을 나타내고 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 8A-8C는 ChAd-SARS-CoV-2-S의 비강내 접종이 중화 항체를 유도함을 FRNT로 측정하여 보여준다. 5주령 암컷 BALB/c 마우스를 비강내 접종 경로를 통해 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화했다. 면역화 1개월 후에 수집된 혈청 샘플들을 중화 활성에 대해 FRNT로 분석하였다. 프라이밍 후 30일차에 마우스를 부스팅하고 면역 반응을 평가하기 위해 일주일 후에 희생시켰다. **도 8A**는 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신접종 마우스의 혈청 샘플을 SARS-CoV-2 균주 2019 n-CoV/USA_WA1/2020으로 중화 활성에 대해 테스트한 결과를 보여준다(그룹 당 $n = 8-10$). **도 8B**는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신접종 마우스의 혈청 샘플을 재조합 루시페라제 발현 SARS-CoV-2 바이러스(야생형(왼쪽) 및 D614G 변이체(중양))의 중화에 대해 테스트한 결과를 보여준다. (오른쪽) 대응표본 EC50 값이 표시된다($n = 5$; n.s. 유의하지 않음, 대응표본 t 검정). **도 8C**는 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신접종 마우스로부터 BAL 유체를 수집하고 SARS-CoV-2 균주 2019 n-CoV/USA_WA1/2020의 중화를 FRNT 분석을 사용하여 측정된 결과를 보여준다(그룹 당 $n = 8-10$). 각 점은 2번의 기술적 중복의 평균을 나타내며 오차 막대는 SD를 나타낸다.

도 9A-9E는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 사용한 단회 용량 비강내 면역화가 SARS-CoV-2 감염으로부터 보호를 제공함을

보여준다. 5주령 BALB/c 암컷 마우스를 비강내 경로를 통해 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화했다. 면역화 후 35일차에, 마우스를 다음과 같이 공격접종하였다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하고 하루 후 비강내 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입했다. 5일 후, 마우스들에게 4×10^5 FFU의 SARS-CoV-2를 비강 내로 공격접종했다. **도 9A**는 분석을 위해 4 및 8dpi에서 수집된 조직 및 비강 세척액의 결과를 보여준다. 폐의 감염성 바이러스를 플라크 분석으로 측정하였다. **도 9B**는 RT-qPCR에 의해 4 및 8dpi에서 측정된 폐, 비장, 심장, 비갑개 및 비강 세척액에서의 바이러스 RNA 수준을 보여준다. **도 9C**는 표시된 사이토카인 및 케모카인의 유전자 발현의 배수 변화를 RT-qPCR로 결정하고, Gapdh로 정규화하여, 4dpi에서 폐 균질물의 나이브 대조군과 비교한 결과를 보여준다(2회 실험, n = 6-9; 중앙값은 다음과 같이 표시됨: *, P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001; 맨-휘트니 검정). 꺾림은 중앙값을 나타내고 점선은 분석의 LOD를 나타낸다. **도 9D**는 8dpi에서 채취된 폐의 결과를 보여준다. 절편들을 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하고 40x(왼쪽; 눈금 막대, 250 μ m), 200x(중앙; 눈금, 50 μ m) 및 400x(오른쪽; 눈금 막대, 25 μ m) 배율로 이미지화했다. 각 이미지는 3마리의 마우스 그룹을 나타낸다. **도 9E**는 ChAd-대조군 또는 비강내 경로로 백신접종된 ChAd-SARS-CoV-2-S 마우스의 SARS-CoV-2 공격접종 5일 전과 8일 후에 얻은 한 쌍의 혈청에서 항-SARS-CoV-2 NP IgM(왼쪽) 및 IgG(오른쪽) 항체 반응을 측정한 ELISA를 보여준다(n = 6: ns; 유의하지 않음; ** P < 0.01, **** P < 0.0001; 대응표본 t 검정). 점선은 나이브 혈청의 평균 IgM 및 IgG 역가를 나타낸다(n = 6).

도 10A-10N은 ChAd-SARS-CoV-2-S가 지속적인 면역을 유도함을 보여준다. **도 10A**는 면역화 계획을 보여준다. 5주령의 암컷 BALB/c 마우스를 10^{10} 개의 ChAd-대조군 바이러스 입자 또는 감소하는 용량(10^{10} , 10^9 및 10^8 vp)의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IN 또는 IM 경로를 통해 백신접종했다. **도 10B-10M**은 면역화된 마우스의 혈청에서의 체액 반응을 평가한 결과를 보여준다(n = 6-14). 백신접종 후 100일(도 10B 및 도 10C) 또는 200일(도 10H-10I)차에 IN-면역화된 마우스로부터, 또는 백신접종 후 100일(도 10E-10F) 또는 200일(도 10K-10L)차 IM-면역된 마우스로부터 항-S 및 RBD IgG 및 IgA 수준을 ELISA로 측정하였다. 백신접종 후 100일(**도 10D**, **도 10G**) 또는 200일(**도 10J**)차에서 IN-(**도 10D**, **도 10J**) 또는 IM-(**도 10G**, **도 10M**) 면역화된 마우스로부터 얻은 혈청의 중화 활성을 FRNT로 결정하였다. **도 10N**은 골수에서 S-특이적 IgG 또는 IgA 생성 LLPC의 빈도를 ELISPOT 분석으로 측정하여 보여준다(n = 4). (**도 10B-10M**): 백신과 대조군을 비교하는 Dunnett의 사후 검정을 사용한 일원 ANOVA: ns, 유의하지 않음; **, P < 0.01; ****, P < 0.0001). (**도 10N**): 맨-휘트니 검정: *, P < 0.05. B-N, 막대는 중앙값을 나타내고 점선은 분석의 검출 한계(LOD)를 나타낸다.

도 11A-11B는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신이 중화 항체를 유도함을 FRNT로 측정하여 보여준다. 5주령 암컷 BALB/c 마우스를 단일 10^{10} , 10^9 , 또는 10^8 용량의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IN 또는 IM 경로를 통해 면역화하였다. **도 11A**는 100일차에 수집된 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신접종된 마우스의 혈청 샘플의 결과를 보여준다. **도 11B**는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신접종된 마우스로부터 얻은 혈청 샘플을 면역화 후 200일차에 수집하고 FRNT로 중화 활성에 대해 분석한 결과를 보여준다. 표시된 백신에 대해 개별 마우스에 해당하는 혈청 중화 곡선을 보여준다(그룹 당 n = 6-14). 각 점은 2번의 기술적 중복의 평균을 나타낸다.

도 12A-12E는 ChAd-SARS-CoV-2-S의 비강내 접종이 Fc 효과기 기능 능력으로 항체 반응을 유도함을 보여준다. **도 12A**는 혈청을 Luminex 플랫폼에 의해 분석하여 항-SARS-CoV-2(WA1/2020 D614G) 스파이크 및 RBD IgG1의 양을 정량화한 결과를 보여준다. 막대는 평균값을 나타낸다. **도 12B**는 루미넥스로 혈청을 분석하여 상이한 SARS-CoV-2 단백질 변이체에 대한 항-SARS-CoV-2 IgG1의 양을 정량화한 결과를 보여준다. 극 좌표는 각 SARS-CoV-2 단백질 및 변이체에 대한 IgG1 중앙값 백분위수 순위를 나타낸다. **도 12C**는 SARS-CoV-2 스파이크 또는 RBD 단백질에 대한 각 백신 요법의 IgG 역가 및 Fc γ 결합 역가를 보여주는 히트맵을 보여준다. 각 사각형은 조건에 대한 그룹 내의 평균 z 점수를 나타낸다. **도 12D**는 혈청을 1차 마우스 호중구(mADNP) 또는 J774A.1 세포(mADCP) 및 SARS-CoV-2 스파이크 코팅된 비드와 함께 인큐베이션하고, 1시간 후에 식세포작용을 측정한 결과를 보여준다. 막대는 평균을 나타내고 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. **도 12E**는 혈청을 1차 마우스 호중구(mADNP) 또는 J774A.1 세포(mADCP) 및 WA1/2020 D614G, B.1.1.7, 또는 B.1.351 스파이크 코팅된 비드와 함께 인큐베이션하고, 1시간 후에 식세포작용을 측정한 결과를 보여준다. 극 좌표는 각 SARS-CoV-2 단백질 및 변이체에 대한 mADNP 또는 mADCP 중앙값 백분위수 순위를 나타낸다. (A 및 D): 백신을 대조군과 비교한 Dunnett의 사후 검정을 사용한 일원 ANOVA: **, P < 0.01; ***, P < 0.001; ****, P < 0.0001). (A 및 D): 막대는 중앙값을 나타낸다.

도 13A-13L은 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 감염에 대한 ChAd-SARS-CoV-2-S의 보호 효능의 지속성을 보여준다. 5주령의 암컷 BALB/c 마우스를 10^{10} vp의 ChAd-대조군 또는 10^{10} , 10^9 및 10^8 vp의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IN 또는 IM 경로를 통해 면역화하였다. 면역화 후 100 또는 200일차에, 마우스를 다음과 같이 공격접종하였

다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하고 하루 후 IN 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입했다. 5일 후, 마우스들에게 5×10^4 FFU의 SARS-CoV-2 WA1/2020을 비강 경로를 통해 접종했다. 면역화 후 100일(도 13A-13F) 또는 200일(도 13G-13L)차 공격접종된 마우스의 조직들을 4 dpi에서 채취하고, 바이러스 RNA 수준을 RT-qPCR로 측정하였다($n = 6-14$, Kruskal Wallis with Dunn's 사후 검정: ns, 유의하지 않음; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.1$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$). 막대는 중앙값을 나타내고 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 14A-14H는 K18-hACE2 마우스에서 ChAd-SARS-CoV-2-S 비강내 투여의 면역원성을 보여준다. 5주령의 K18-hACE2 암컷 마우스를 10^9 vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IN 경로를 통해 면역화했다. 면역화 후 6주(도 14A-14D, $n=20$) 또는 9개월(도 14E-14H, $n=7$)차에 마우스의 혈청 내 항체 반응을 평가하였다. ELISA로 SARS-CoV-2 S-및 RBD-특이적 IgG(도 14A, 도 14E) 및 IgA 수준(도 14B, 도 14F)을 측정하였고, FRNT로 중화 활성(도 14C, 도 14D, 도 14G, 도 14H)을 결정하였다. 도 14C-14D, 도 14G-14H, 6주(도 14C, 도 14D) 또는 9개월(도 14G)차 수집된 면역화된 마우스의, WA1/2020 및 Wash-B.1.351 (도 14C, 도 14G), 또는 Wash-B.1.1.28 (도 14D, 도 14H)에 대한 혈청 중화 활성의 대응표본 분석. 도 14A-14B, 도 14E-14F: 맨-휘트니 검정: ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$. 도 14C-14D, 도 14G-14H: 양측 윌콕슨 매칭-대응 부호 순위 검정: *, $P < 0.05$; ****, $P < 0.0001$.

도 15A-15T는 ChAd-SARS-CoV-2-S가 K18-hACE2 마우스에서 변이체 바이러스에 대한 교차 보호를 부여함을 보여준다. 도 15A는 실험 계획을 보여준다. 5주령의 K18-hACE2 암컷 마우스를 10^{10} vp의 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IN 경로를 통해 면역화했다. 도 15B-15O는 10^4 FFU의 Wash-B.1.351 (도 15B-15F), Wash-B.1.1.28 (도 15G-15K), 또는 WA1/2020 (도 15L-15O)의 SARS-CoV-2로 공격접종된 마우스들에 대한 면역화 후 6주차의 결과를 보여준다. 도 15P-15T는 마우스를 10^4 FFU의 Wash-B.1.351로 공격접종된 마우스들에 대한 면역화 후 9개월차의 결과를 보여준다. 도 15B, 도 15G, 도 15L, 도 15P. 시간에 따른 체중 변화. 데이터는 백신과 대조군의 평균 $\pm$ SEM을 비교한다(각 그룹에 대해 $n = 6-9$; 곡선 아래 면적에 대한 비대응 t 검정, **** $P < 0.0001$). 도 15C-15F, 도 15H-15K, 도 15M-15O, 도 15Q-15T. 폐, 심장, 뇌 및 비강 세척액의 바이러스 RNA 수준을 RT-qPCR로 6dpi에서 측정하였다($n = 6-9$; 맨-휘트니 검정: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). 막대는 중앙값을 나타내고 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 16A-16B는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신이 중화 항체를 유도함을 FRNT로 측정한 결과를 보여준다. 도 4와 관련된 다. 5주령의 K18-hACE2 암컷 마우스를 10^9 vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IN 경로를 통해 면역화했다. 도 16A는 6주차에 수집된 혈청 샘플들의 결과를 보여준다. 도 16B는 면역화 후 9개월차에 혈청 샘플을 수집하여 WA1/2020, Wash-B.1.351 또는 Wash-B.1.1.28에 대한 중화 활성을 FRNT로 분석한 결과를 보여준다. 표시된 백신에 대해 개별 마우스에 해당하는 혈청 중화 곡선을 보여준다(그룹 당 $n = 7-20$). 각 점은 두 번의 기술적 중복의 평균을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

상세한 설명

본 발명은 적어도 부분적으로 코로나바이러스 감염을 치료하거나 예방하기 위한 재조합 비인간 아데노바이러스 벡터 조성물 및 이의 면역원성 조성물의 개발에 기초한다. 또한, 본 발명은 코로나바이러스 감염에 대한 지속성 있는 세포 및 체액 매개 면역을 제공하는 본원에 개시된 조성물의 투여 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 근육내 투여에 비해 개선되고 비강내 백신접종에 의해 유도된 점막 면역성을 나타내어 SARS-CoV-2 전염을 제한하는 비강내 투여용 조성물을 제공한다.

본원에 제시된 바와 같이, 본 발명의 아데노바이러스 조성물의 근육내 투여는 S 단백질에 대한 강력한 전신 체액성 및 세포 매개 면역 반응을 유도하고, SARS-CoV-2 공격접종 후 폐 감염, 염증 및 병리학에 대해 보호하지만, 잔류 바이러스 감염이 감지되었다. 대조적으로, 본 발명의 아데노바이러스 조성물의 단일 비강내 용량은 높은 수준의 전신 및 점막 IgA 면역 반응을 유도하고, 상기도 및 하기도의 감염을 완전히 예방하고, 살균 면역을 부여한다. 중요한 것은 백신을 접종한 대상체로부터 얻은 혈청이 SARS-CoV-2 변이체(예: S 단백질에 D614G 돌연변이를 포함하는 변이체; 이러한 적응 돌연변이가 있는 바이러스는 현재 전 세계적으로 돌고 있으며 적어도 세포 배양에서 더 큰 감염성과 관련됨)를 효율적으로 중화한다는 것이다. 따라서, 본 발명의 아데노바이러스 조성물의 비강내 투여(단회 용량에서조차도)는 SARS-CoV-2 감염 및 전염을 예방하고 이의 대유행 확산을

줄이는 데 유용하다.

- [0081] 출원인은 개시된 조성물을 사용한 단위 용량 비강내 면역화가 근육내 면역화보다 월등한 체액성 면역을 촉진시키고; 100배 더 낮은 접종 투여량이 강력한 중화 항체 반응을 유도하고; 근육내 면역화가 아닌 비강내 면역화가 SARS-CoV-2 S 단백질에 대한 혈청 IgA 반응 및 IgA 특이적인 긴 수명의 형질 세포(LLPC)를 유도하고; 본 발명의 조성물에 의해 유도된 체액성 면역은 백신접종 후 6개월 기간에 걸쳐 지속성이 있고 상승함을 발현하였다.
- [0082] 2002~2004년 사스 유행을 일으킨 중증 급성호흡기증후군 코로나바이러스 1(SARS-CoV-1), 2012년 처음 보고된 메르스를 일으킨 중동 호흡기증후군 코로나바이러스(MERS-CoV), 그리고 보다 최근의 코로나바이러스 질병 2019(Covid-19) 대유행의 원인이 되었던 SARS-CoV-2 모두 세포를 감염시키기 위해 세포 표면의 안지오텐신 전환 효소 2(ACE2)에 결합한다. 기본적으로 ACE-2는 SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, MERS-COV 및 향후 SARS-COV 변이체들에 대한 기능적 수용체이다. ACE-2는 레닌-안지오텐신-알도스테론 시스템(RAAS)의 중요한 구성 요소이다. ACE-2는 안지오텐신 2를 안지오텐신 1-7로 전환시킨다. 높은 안지오텐신 2는 혈관 수축, 염증 및 급성 폐 손상과 관련이 있다. ACE2는 폐, 심장, 신장, 간, 장 및 기타 조직을 포함한 다양한 장기에서 발현된다. SARS-CoV 바이러스는 ACE-2에 결합하여 세포 안으로 들어간다.
- [0083] SARS-CoV-2 RNA 게놈은 약 30,000개의 뉴클레오타이드 길이이다. 5' 2/3는 게놈 복제 및 바이러스 RNA 합성을 가능하게 하는 비구조 단백질을 인코딩한다. 나머지 1/3는 구형 비리온을 형성하는 스파이크(S), 외피, 막 및 핵 단백질(NP)과 같은 구조 단백질과 세포 반응을 조절하는 부속 단백질을 인코딩한다. S 단백질은 비리온에 동종 삼량체 스파이크를 형성하고 세포 표면 수용체 안지오텐신 전환 효소 2(ACE2)와 결합하여 코로나바이러스가 인간 세포로 들어가는 것을 촉진시킨다. SARS-CoV 및 SARS-CoV-2 S 단백질은 진입 과정에서 순차적으로 절단되어 S1 및 S2 단편들을 생성한 다음 S2를 추가 가공하여 더 작은 S2' 단백질을 생성한다(Hoffmann 외, 2020). S1 단백질은 수용체 결합 도메인(RBD)을 포함하고 S2 단백질은 막 융합을 촉진한다. SARS-CoV-2 S 단백질의 융해가능한 안정화 융합 전 형태의 구조를 극저온 전자 현미경으로 분석하였으며 SARS-CoV S 단백질과 상당한 유사성을 나타냈다. 이 형태의 S 단백질은 단클론 항체를 강력하게 중화함으로써 인식되며 유망한 백신 표적으로 기능할 수 있다.
- [0084] SARS-CoV-2 게놈 서열의 공개로 인해 학계, 정부 및 산업군들은 주로 바이러스 S 단백질을 표적으로 하는 백신 후보물 개발을 즉시 시작했다. DNA 플라스미드, 지질 나노입자 캡슐화 mRNA, 비활성화 비리온 및 바이러스 벡터화 백신을 비롯하여 SARS-CoV-2 S 단백질을 전달하기 위한 여러 플랫폼이 개발되었다. 여러 백신이 안전성을 평가하기 위해 임상 시험에 들어갔고 일부는 면역원성과 효능을 평가하는 시험들이 진행되었다. 대유행의 긴급성으로 인해 대부분의 백신은 동물에 대한 실질적인 효능 데이터 없이 인간 시험으로 진행되었다. 이러한 상황은 부분적으로 백신 설계 및 개발이 접근 가능한 SARS-CoV-2 감염 및 병인의 전임상 질병 모델 생성을 앞질렀기 때문에 발생했다.
- [0085] 베타코로나바이러스에 대한 아데노바이러스(Ad) 기반 백신은 이전에 평가된 바 있다. MERS-CoV의 전장 S 단백질을 인코딩하는 침팬지 Ad-벡터화 백신의 단위 용량은 임상 1상에서 인간 디펩티딜 펩티다제 4(hDPP4) 형질전환 마우스를 감염으로부터 보호하고 바이러스 배출을 감소시키며 낙타의 생존을 향상시켰으며 인간에게 안전하고 면역원성이었다. MERS S1-CD40L 융합 단백질을 발현하는 인간 Ad 기반 백신도 형질전환 hDPP4 마우스에서 보호성이었다. 전장 S 단백질을 발현하는 Ad 기반 SARS-CoV 백신은 공격접종 후 흰쥐체비에서 폐렴을 예방했으며 붉은털 원숭이에서 높은 면역원성을 보였다. 야생형 SARS-CoV-2 S 단백질(ChAdOx1 nCoV-19)을 인코딩하는 침팬지 Ad 벡터(Y25, 유인원 Ad-23)는 현재 인간에서 단일 근육 주사(NCT04324606)로 평가 중이다. 출판된 예비 분석에 따르면 이 백신은 폐 감염과 폐렴을 예방하지만 상기도 감염과 비강 바이러스 배출은 예방하지 못함을 시사한다(doi.org/10.1101/2020.05.13.093195).
- [0086] 호흡기 바이러스에 감염될 위험이 있거나, 호흡기 바이러스 감염의 경증 증상을 보이거나, 호흡기 바이러스 감염의 중증 증상을 보이는 개체를 치료하기 위한 조성물, 방법 및 치료 계획이 본원에 개시되어 있다. 본 발명의 조성물은 호흡기 바이러스 감염의 감염성을 치료, 예방 또는 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 치료 계획은 본 발명의 조성물을 바이러스 감염의 위험이 있거나 바이러스 감염이 있는 개체에게 투여함으로써 바이러스 감염을 예방 또는 치료하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기도에서의 바이러스 감염을 감소시킴으로써 바이러스 전염을 예방하거나 감소시킬 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법은 강력한 항원-특이적 항체, 중화 항체, 및 B 및 T 세포 반응을 제공한다. 이것은 감염에 대한 보호를 제공하여 폐에서의 바이러스 수율, 염증 및 병리학을 현저히 감소시킨다. 본 발명의 조성물 및 방법은 혈청 및 폐에서 높은 수준의 중화 및 항-RBD IgA 및 IgG 및 폐에서 SARS-CoV-2 특이적 상주 기억 T 세포를 포함하는 강력한 점막 면역을 생성한다. 개시된 조성물

및 방법은 비강, 상기도, 폐 조직 및 기타 모든 다른 가능한 전염 부위를 SARS-CoV-2 감염으로부터 완전히 보호한다. 항-NP 및 항-ORF8 반응의 측정에 기초하여, 본원에 개시된 조성물의 단일 비강내 용량은, 어떤 COVID-19 백신으로도 이전에 기재된 적이 없으며, 단회 투약 투여로는 훨씬 더 적은 살균 면역을 부여한다.

[0087] 본 발명의 조성물은 국소적으로, 예를 들어, 비강내로(예를 들어, 비강 스프레이 또는 흡입으로서) 또는 전신적으로(예를 들어, 정맥내 또는 복강내) 제형화되고 호흡기 바이러스 감염(예를 들어, SARS-CoV-2와 같은 코로나바이러스 감염)을 치료 또는 예방하기 위해 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물(예를 들어, 비강 전달 또는 흡입용으로 제형화된 조성물)은 바이러스 감염(예를 들어, SARS-CoV-2)에 걸릴 위험이 있을 수 있는 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물은 고위험 환경에 있는 개체(예를 들어, 의료 종사자), 바이러스(예: SARS-CoV-2)에 노출되었거나 노출된 것으로 의심되는 개체들, 또는 바이러스 감염에 양성인 것으로 테스트된 개체들에게 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 호흡기 감염(예를 들어, SARS-CoV-2 감염)의 증상을 나타내거나 투여 시점에 무증상인 개체에게 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 개체에 의해 자가 투여될 수 있고(예를 들어, 비강 스프레이 또는 흡입으로서) 의료 시설 외부에서(예를 들어, 집에서) 투여될 수 있다.

[0088] 본원에 개시된 방법 및 조성물은 호흡기 바이러스 감염의 감염성을 치료, 예방 또는 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 바이러스 감염은 코로나바이러스 감염일 수 있다. 잠복기가 긴 병원체, 예를 들어, 잠복기 중앙값이 약 5일인 SARS-CoV-2는 많은 감염된 개체가 자신이 감염되었다는 사실을 모를 수 있기 때문에 전염 위험이 높을 수 있다. 또한, 코로나바이러스 보균자는 종종 무증상이거나 경미한 증상을 보일 수 있어, 바이러스 숙주와 한 집단의 다른 구성원은 알지 못하는 사이에 접촉하게 된다. 코로나바이러스 감염 위험이 있는 대상체는 무증상인 코로나바이러스 감염 보균자와 접촉하여 자신도 모르게 코로나바이러스 감염에 걸릴 수 있다. 위험이 있는 개체(예를 들어, 코로나바이러스 보균자와 접촉했거나 코로나바이러스 보균자와 접촉할 수 있는 개체)에서 코로나바이러스 감염을 예방하기 위한 방법 및 조성물이 필요하다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 조성물, 방법 또는 치료 투약법은 SARS-CoV-2 감염(예를 들어, COVID-19)을 치료하거나 예방할 수 있다.

[0089] 본원에 개시된 방법에서 사용되는 조성물 자체, 뿐만 아니라 개시된 조성물을 제조하는 데 사용되는 성분들이 하기에 논의된다. 이들 및 기타 물질이 본원에 개시되어 있고, 이들 물질의 조합, 하위집합, 상호작용, 그룹 등이 개시될 때 이들 화합물의 각각의 다양한 개별 및 집합적 조합 및 순열에 대한 구체적인 언급은 명시적으로 개시되지 않을 수 있지만, 그 각각이 본원에서 구체적으로 고려되고 설명된다. 예를 들어, 특정 화합물이 개시 및 논의되고 다수의 화합물 분자에 대해 이루어질 수 있는 다수의 변형이 논의되는 경우, 구체적으로 달리 언급이 없는 한, 화합물의 각각의 모든 조합 및 순열 및 가능한 변형이 구체적으로 고려된다. 따라서, 분자 A, B 및 C의 분류, 뿐만 아니라 분자 D, E 및 F의 분류 및 조합 분자의 예가 개시되는 경우, A-D가 개시되면, 각각이 개별적으로 인용되지 않더라도 각각은 개별적으로 그리고 집합적으로 고려되는 의미 조합, A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E, 및 C-F가 개시된 것으로 간주된다. 마찬가지로, 이들의 임의의 하위집합 또는 조합도 개시된다. 따라서 예를 들어, A-E, B-F, 및 C-E의 하위군이 공개된 것으로 간주된다. 이러한 개념은 개시된 조성물을 제조하고 사용하는 방법의 단계들을 포함한다(그러나 이에 제한되지 않음) 본 출원의 모든 양상에 적용된다. 따라서, 실시될 수 있는 다양한 추가 단계가 있는 경우, 이들 추가 단계 각각은 개시된 방법의 임의의 특정 실시예 또는 실시예의 조합으로 실시될 수 있음을 이해해야 한다.

[0090] 본 발명의 다양한 양상들을 다음 섹션들에서 더 자세히 설명한다.

[0091] 정의

[0092] 본 발명이 보다 용이하게 이해될 수 있도록, 특정 용어를 먼저 정의한다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 해당 분야의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 같은 동일한 의미를 가진다. 본원에 기재된 것과 유사하거나, 변형되거나, 동등한 많은 방법 및 재료가 과도한 실험 없이 본 발명의 실시예의 실시예에 사용될 수 있으며, 바람직한 재료 및 방법이 본원에 기재되어 있다. 본 발명의 실시예를 설명하고 청구함에 있어서, 하기 정의에 따라 하기 용어가 사용될 것이다.

[0093] 보조제는 항원성을 강화하기 위해 사용되는 비히클을 말한다. 일부 실시형태에서, 보조제는 예를 들어, 항원 용액이 미네랄 오일(프로인트 불완전 보조제)에 유화되고, 때때로 항원성을 추가로 향상시키기 위해 사멸된 마이코박테리아가 포함된 유중수 에멀전(항원 분해를 억제하고/하거나 대식세포의 유입을 유발함) 또는 항원이 흡착되어 있는 미네랄(백반, 수산화알루미늄 또는 인산염)의 현탁액을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 개시된 면역원성 조성물에 사용되는 보조제는 레시틴과 카르보머 동중중합체의 배합물이다(예를 들어 Advanced BioAdjuvants, LLC에서 구입가능한 ADJUPLEX™ 보조제, 또한 Wegmann, Clin Vaccine Immunol, 22(9): 1004-

1012, 2015 참조). 개시된 면역원성 조성물에 사용하기 위한 추가 보조제는 QS21 정제된 식물 추출물, Matrix M, AS01, MF59 및 ALFQ 보조제를 포함한다. 면역자극성 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, CpG 모티프를 포함하는 것)도 보조제로 사용될 수 있다. 보조제는 보조자극 분자와 같은 생물학적 분자(“생물학적 보조제”)를 포함한다. 예시적인 보조제는 IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L, 4-1BBL 및 톨유사 수용체(TLR) 작용제, 예를 들어, TLR-9 작용제를 포함한다. 보조제에 대한 추가 설명은 예를 들어, Singh (ed.)의 문헌 Vaccine Adjuvants and Delivery Systems. Wiley-Interscience, 2007에서 찾을 수 있다. 보조제는 개시된 조성물과 병용될 수 있다.

[0094] 아미노산 치환은 폴리펩티드의 한 아미노산을 다른 아미노산으로 대체하는 것이다.

[0095] 용어 “항체”는 코로나바이러스 S 단백질, 이의 항원성 단편 또는 항원의 이량체 또는 다량체와 같은 분석물(항원)에 특이적으로 결합하여 이를 인식하는 면역글로불린, 항원 결합 단편 또는 이의 유도체를 지칭한다. 본 명세서에서 용어 “항체”는 가장 넓은 의미로 사용되고, 이들이 원하는 항원-결합 활성을 나타내는 한, 비제한적으로 단클론 항체, 다클론 항체, 다중특이성 항체(예를 들면, 이중특이성 항체), 및 항체 단편을 포함하는, 다양한 항체 구조를 포괄한다. 항체의 비제한적 예는, 예를 들어, 온전한 면역글로불린 및 항원에 대한 결합 친화성을 유지하는 이의 변이체 및 단편을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디; 선형 항체; 단일쇄 항체 분자(예를 들어, scFv); 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이성 항체를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 항체 단편은 전 항체의 변형에 의해 생성된 항원 결합 단편 또는 재조합 DNA 방법론을 사용하여 새롭게 합성된 것들을 포함한다(예를 들어, Kontermann and Dubel(Ed), Antibody Engineering, Vols. 1-2, 2nd Ed., Springer Press, 2010 참조).

[0096] “보존적” 아미노산 치환은 대상체에게 투여될 때 단백질의 기능, 예를 들어, 면역 반응을 유도하는 단백질의 능력에 실질적으로 영향을 미치거나 감소시키지 않는 치환이다. 용어 보존적 변이는 또한 치환되지 않은 모 아미노산 대신에 치환된 아미노산의 사용을 포함한다. 또한, 인코딩된 서열에서 단일 아미노산 또는 적은 백분율의 아미노산(예를 들어, 5% 미만, 일부 실시형태에서는 1% 미만)을 변경, 부가 또는 결실시키는 결실 또는 부가는 보존적 변형이며, 여기서 변경은 아미노산을 화학적으로 유사한 아미노산으로 치환시킨다.

[0097] 다음 6개 군은 서로 보존적 치환으로 간주되는 아미노산의 예이다:

[0098] 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T);

[0099] 아스파르트산(D), 글루탐산(E);

[0100] 아스파라긴(N), 글루타민(Q);

[0101] 아르기닌(R), 리신(K);

[0102] 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 발린(V); 그리고

[0103] 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W).

[0104] 비보존적 치환은 재조합 코로나바이러스 엑토도메인 삼량체의 활성 또는 기능, 예를 들어, 대상체에게 투여될 때 면역 반응을 유도하는 능력을 감소시키는 치환이다. 예를 들어, 아미노산 잔기가 단백질의 기능에 필수적인 경우, 하나의 보존적 치환조차도 그 활성을 방해할 수 있다. 따라서 보존적 치환은 관심 단백질의 기본 기능을 변경시키지 않는다.

[0105] 코로나바이러스는 중증 호흡기 질병을 일으키는 것으로 알려진 양성-센스, 단일 가닥 RNA 바이러스 계열이다. 현재 코로나바이러스 계열에서 인간을 감염시키는 것으로 알려진 바이러스는 알파코로나바이러스 및 베타코로나바이러스 속에 속한다. 또한 감마코로나바이러스 및 델타코로나바이러스 속이 차후 인간을 감염시킬 수 있다고 여겨진다.

[0106] 베타코로나바이러스의 비제한적 예는 중증 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV), 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 인간 코로나바이러스 HKU1(HKU1-CoV), 인간 코로나바이러스 OC43(OC43-CoV), 뮌헨 간염 바이러스(MHV-CoV), 박쥐 SARS-유사 코로나바이러스 WIV1(WIV1-CoV) 및 인간 코로나바이러스 HKU9(HKU9-CoV)를 포함한다. 알파코로나바이러스의 비제한적 예는 인간 코로나바이러스 229E(229E-CoV), 인간 코로나바이러스 NL63(NL63-CoV), 돼지 유행성 설사 바이러스(PEDV) 및 전염성 위장염 코로나바이러스(TGEV)를 포함한다. 델타코로나바이러스의 비제한적 예는 돼지 델타 코로나바이러스(SDCV)이다.

[0107] 바이러스 게놈은 캡핑되고 폴리아데닐화되며 뉴클레오타이드 단백질로 덮여 있다. 코로나바이러스 비리온은 스

파이크(S) 단백질로 지칭되는 유형 I 융합 당단백질을 포함하는 바이러스 외피를 포함한다. 대부분의 코로나바이러스는 계놈의 5' 부분에 복제효소 유전자가 포함되고 계놈의 3' 부분에 구조 유전자가 포함된 공통 계놈 조직을 가지고 있다.

[0108] 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질: 초기에 전구체 단백질로서 합성된 클래스 I 융합 당단백질. 개별 전구체 S 폴리펩티드는 동중삼량체를 형성하여 골지체 내에서 글리코실화되고, 뿐만 아니라 신호 펩티드를 제거하기 위한 처리를 거치고 세포 프로테아제에 의해 절단되어 동중삼량체 내에서 S1/S2 프로토머로서 결합된 상태로 남아 있는 별도의 S1 및 S2 폴리펩티드 사슬을 생성하며, 그러므로 이중량체의 삼량체이다. S1 소단위는 바이러스 막의 원위에 있으며 숙주 수용체에 대한 바이러스 부착을 매개하는 수용체 결합 도메인(RBD)을 포함한다. S2 소단위는 융합 펩티드, 2개의 헵타드 반복 서열(HR1 및 HR2) 및 전형적인 융합 당단백질의 중심 나선, 막횡단 도메인 및 세포질 꼬리 도메인과 같은 융합 단백질 기작을 포함한다.

[0109] 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질 융합 전 형태는 분비 시스템에서 성숙한 코로나바이러스 S 단백질로 가공된 후 코로나바이러스 S를 융합 후 형태로 전이시키는 융합생성 사건이 촉발되기 전 코로나바이러스 S 단백질의 엑토도메인이 채택한 구조적 형태이다. 융합 전 형태의 예시적인 코로나바이러스 S 단백질(HKU1-CoV)의 3차원 구조는 본원에 개시되어 있으며 Kirchdoerfer 외의 문헌” Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein,” Nature, 531:118-121, 2016에 제공되어 있다(본원에 참조로 포함됨).

[0110] “융합전 형태로 안정화된” 코로나바이러스 S 엑토도메인 삼량체는 상응하는 천연 코로나바이러스 S 서열로부터 형성된 코로나바이러스 S 엑토도메인 삼량체와 비교하여 융합전 형태의 유지 증가를 제공하는 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 천연 코로나바이러스 S 서열과 대비 포함한다. 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입에 의한 융합전 형태의 “안정화”는, 예를 들어, 에너지 안정화(예를 들어, 융합후 개방 형태에 비해 융합전 형태의 에너지를 감소시킴) 및 /또는 동역학 안정화(예를 들어, 융합 전 형태로부터 융합 후 형태로의 전이 속도를 감소시킴) 일 수 있다. 추가로, 융합 전 형태에서 코로나바이러스 S 엑토도메인 삼량체의 안정화는 상응하는 천연 코로나바이러스 S 서열과 비교하여 변성에 대한 내성 증가를 포함할 수 있다. 코로나바이러스 S 엑토도메인 삼량체가 융합전 형태인지 여부를 결정하는 방법이 본원에 제공되며, 이 방법들에는 융합전 형태 특이적 항체를 사용하는 음성-염색 전자 현미경 및 항체 결합 분석을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0111] 축퇴 변이체: 본 발명의 맥락에서, “축퇴 변이체”는 해당 유전자 코드의 결과로서 축퇴되는 서열을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 20개의 천연 아미노산이 있으며, 대부분은 하나 이상의 코돈으로 지정된다. 따라서, 뉴클레오티드 서열이 인코딩하는 펩티드의 아미노산 서열이 변하지 않는 한, 이러한 펩티드를 인코딩하는 축퇴성 뉴클레오티드 서열들 모두가 포함된다.

[0112] 한 예에서, 원하는 반응은 CoV(예를 들어, SARS-CoV-2) 감염을 억제하거나 감소시키거나 예방하는 것이다. 이 방법을 효과적으로 하기 위해 CoV 감염을 완전히 제거하거나 감소시키거나 예방할 필요는 없다. 예를 들어, 유효량의 면역원의 투여는 적절한 대조군과 비교하여 CoV 감염을 원하는 양만큼, 예를 들어, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 심지어 적어도 100%(검출가능한 CoV 감염의 제거 또는 예방) 감소시키는(예를 들어, 세포의 감염 또는 CoV에 의해 감염된 대상체의 수 또는 백분율로 측정) 면역 반응을 유도할 수 있다. 에피토프: 항원 결정인자. 이들은 하나의 분자 상에 존재하는 항원성인 특정 화학 작용기 또는 펩티드 서열들로서, 특정 면역 반응을 유도한다. 예를 들어, 에피토프는 B 및/또는 T 세포가 반응하는 항원의 영역이다. 항체는 특정 항원 에피토프, 예를 들어, 코로나바이러스 S 엑토도메인, 예를 들어, SARS-CoV S 엑토도메인 상의 에피토프에 결합할 수 있다. 에피토프는 연속 아미노산 또는 단백질의 3차 접합에 의해 병치된 비연속적인 아미노산 모두로부터 형성될 수 있다.

[0113] 발현은 핵산 서열의 전사 또는 번역을 지칭한다. 예를 들어, 유전자는 DNA가 RNA 또는 RNA 단편으로 전사될 때 발현되며, 일부 예에서는 가공되어 mRNA가 된다. 유전자는 mRNA가 단백질이나 단백질 단편과 같은 아미노산 서열로 번역될 때 발현될 수도 있다. 특정 예에서, 이중 유전자는 RNA로 전사될 때 발현된다. 다른 예에서, 이중 유전자는 이의 RNA가 아미노산 서열로 번역될 때 발현된다. 용어 “발현”은 본원에서 전사 또는 번역을 나타내기 위해 사용된다. 발현 조절에는 전사, 번역, RNA 수송 및 처리, mRNA와 같은 중간 분자들의 분해, 또는 생산 후 특정 단백질 분자의 활성화, 불활성화, 구획화 또는 분해에 대한 제어가 포함될 수 있다.

[0114] 발현 제어 서열은 이것이 작동가능하게 연결된 이중 핵산 서열의 발현을 조절하는 핵산 서열들을 지칭한다. 발현 제어 서열은 발현 제어 서열이 핵산 서열의 전사 및, 적절한 경우, 번역을 제어하고 조절하는 경우 핵산 서열에 작동가능하게 연결된다. 따라서 발현 제어 서열은 적절한 프로모터, 인핸서, 전사 종결자, 단백질 인코딩 유전자 앞의 시작 코돈(ATG), 인트론에 대한 스플라이싱 신호, mRNA의 적절한 번역을 허용하기 위한 해당 유전

자의 올바른 리딩 프레임 유지, 및 정지 코돈을 포함할 수 있다. “제어 서열”이라는 용어는 최소한 그 존재가 발현에 영향을 미칠 수 있는 구성요소를 포함하고자 하며, 또한 존재하는 것이 유리한 추가 구성요소들, 예를 들어, 리더 서열 및 융합 파트너 서열을 포함할 수 있다. 발현 조절 서열은 프로모터를 포함할 수 있다.

[0115] 프로모터는 전사를 지시하기에 충분한 최소 서열이다. 또한 세포 유형 특이적, 조직 특이적 또는 외부 신호 또는 작용제에 의해 유도 가능한 프로모터 의존성 유전자 발현을 제어할 수 있게 만드는 데 충분한 프로모터 요소들이 포함되며; 이러한 요소들은 유전자의 5' 또는 3' 영역에 위치할 수 있다. 항시성 및 유도성 프로모터 둘 다 포함된다(예를 들어, Bitter 외, Methods in Enzymology 153:516-544, 1987 참조). 예를 들어, 박테리아 시스템에서 클로닝하는 경우 박테리오파지 람다의 pL, plac, ptrp, ptac(ptrp-lac 하이브리드 프로모터) 등의 유도성 프로모터를 사용할 수 있다. 한 실시형태에서, 포유동물 세포 시스템에서 클로닝하는 경우, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유동물 바이러스(예를 들어, 레트로바이러스 긴 말단 반복; 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)를 사용할 수 있다. 재조합 DNA 또는 합성 기술에 의해 생성된 프로모터는 또한 핵산 서열의 전사를 제공하기 위해 사용될 수 있다. 발현 벡터: 발현될 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 발현 제어 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터. 발현 벡터는 발현하기에 충분한 시스 작용 요소를 포함하고; 발현을 위한 다른 요소들이 숙주 세포에 의해 또는 시험관내 발현 시스템에서 공급될 수 있다. 발현 벡터는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 통합시키는 코스미드, 플라스미드(예: 네이키드이거나 리포솜에 포함됨) 및 바이러스(예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노 관련 바이러스)와 같은 당업계에 공지된 모든 것을 포함한다.

[0116] “이종”이라는 용어는 상이한 유전자 공급원으로부터 기원하는 것을 지칭한다. 핵산 분자는 그것이 발현되는 세포 이외의 유전적 공급원에서 유래한 세포에 대해 이종이다. 하나의 구체적인 비제한적인 예에서, 재조합 코로나바이러스 S 단백질을 인코딩하는 이종 핵산 분자는 포유류 세포와 같은 세포에서 발현된다. 세포 또는 유기체에 이종 핵산 분자를 도입하는 방법, 예를 들어, 전기천공법, 리포펙션, 입자총 가속 및 상동 재조합을 비롯하여 핵산을 이용한 형질전환 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0117] 숙주세포는 벡터가 변식되어 그 DNA가 발현되는 세포를 지칭한다. 세포는 원핵생물 또는 진핵생물일 수 있다. 상기 용어는 또한 대상 숙주 세포의 임의의 자손을 포함한다. 복제 중에 발생하는 돌연변이가 있을 수 있으므로 모든 자손이 부모 세포와 동일하지 않을 수 있는 것으로 여겨진다. 그러나 “숙주세포”라는 용어를 사용하는 경우에는 이러한 자손도 포함된다.

[0118] 면역 반응은 자극에 대한 B 세포, T 세포 또는 단핵구와 같은 면역계 세포의 반응이다. 한 실시형태에서, 면역 반응은 특정 항원에 대해 특이적이다(“항원-특이적 반응”). 한 실시형태에서, 면역 반응은 CD4+ 반응 또는 CD8+ 반응과 같은 T 세포 반응이다. 또 다른 실시예에서, 면역 반응은 B 세포 반응이고, 특정 항체의 생성을 초래한다.

[0119] 핵산 분자는 뉴클레오타이드의 중합체 형태(RNA, cDNA, 게놈 DNA 및 합성 형태의 센스 및 안티센스 가닥 모두를 포함할 수 있음) 및 전술한 것들이 혼합된 중합체이다. 뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드, 데옥시뉴클레오타이드 또는 두 유형 중 하나의 뉴클레오타이드의 변형된 형태를 지칭한다. 본원에서 사용되는 용어 “핵산 분자”는 “핵산” 및 “폴리뉴클레오타이드”와 동의어이다. 달리 명시되지 않는 한 핵산 분자는 일반적으로 적어도 10개 염기 길이이다. 이 용어에는 단일 및 이중 가닥 형태의 DNA가 포함된다. 폴리뉴클레오타이드는 자연 발생 및/또는 비-자연 발생 뉴클레오타이드 연결(linkage)에 의해 함께 연결된 자연 발생 및 변형된 뉴클레오타이드 중 하나 또는 둘 모두를 포함할 수 있다. “cDNA”는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태의 mRNA와 상보적이거나 동일한 DNA를 지칭한다. “인코딩”은 생물학적 과정에서 다른 중합체 및 거대분자의 합성을 위해 정의된 뉴클레오타이드들(즉, rRNA, tRNA 및 mRNA)의 서열 또는 정의된 아미노산 서열을 가지는 템플릿으로 작용하는 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 유전자, cDNA 또는 mRNA의 뉴클레오타이드들의 특정 서열들의 고유한 특성 및 그로 인한 생물학적 특성을 지칭한다.

[0120] 용어 “작동가능하게 연결된”은 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능적 관계에 있을 때 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 작동 가능하게 연결됨을 지칭한다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미친다면 프로모터는 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 일반적으로 작동 가능하게 연결된 핵산 서열은 연속적이며, 필요한 경우 동일한 리딩 프레임에서 두 개의 단백질 코딩 영역들을 연결할 필요가 있다.

[0121] 폴리펩티드는 길이 또는 번역 후 변형(예: 글리코실화 또는 인산화)에 관계없이 임의의 아미노산 사슬이다. “폴리펩티드”는, 천연 발생 아미노산 중합체 및 하나 이상의 아미노산 잔기가 비천연 발생 아미노산, 예를 들어, 상응하는 자연 발생 아미노산의 인공 화학적 모방체인 비천연 아미노산 중합체를 포함하는 아미노산 중합

체에 적용된다. “잔기”는 아미드 결합 또는 아미드 결합 모방체에 의해 폴리펩티드에 통합된 아미노산 또는 아미노산 모방체를 지칭한다. 폴리펩티드는 아미노 말단(N-말단) 단부와 카르복시 말단(C-말단) 단부를 가지고 있다. “폴리펩티드”는 펩티드 또는 단백질과 상호교환적으로 사용되며, 본원에서 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 사용된다.

[0122] 프라이밍-부스터 백신접종은 제1 면역원성 조성물(1차 백신)을 투여한 후 대상체에게 제2 면역원성 조성물(부스터 백신)을 투여하여 면역 반응을 유도하는 것을 포함하는 면역요법이다. 프라이밍 백신 및/또는 추가 백신에는 면역 반응이 지시되는 항원을 발현하는 벡터(예: 바이러스 벡터, RNA 또는 DNA 벡터)가 포함된다. 부스터 백신은 프라이밍 백신 후에 대상체에게 투여된다; 프라이밍 백신과 부스터 백신의 투여 사이의 적절한 시간 간격, 및 이러한 시간 프레임의 예가 본원에 개시되어 있다. 일부 실시형태에서, 프라이밍 백신, 부스터 백신, 또는 프라이머 백신 및 부스터 백신 모두는 보조제를 추가로 포함한다. 하나의 비제한적 예에서, 프라이밍 백신은 DNA 기반 백신(또는 유전자 전달 기반의 다른 백신)이고, 부스터 백신은 단백질 소단위 또는 단백질 나노입자 기반 백신이다.

[0123] 재조합 핵산 분자는, 예를 들어, 하나 이상의 핵산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 것과 같이 자연적으로 발생하지 않는 서열을 가지고/가지거나 두 개의 다른 방식으로 분리된 서열 세그먼트들의 인공적 조합에 의해 만들어진 서열을 가지는 것이다. 이러한 인공적인 조합은 화학적 합성에 의해 또는 더 일반적으로, 예를 들어, 유전 공학 기술에 의해 단리된 핵산 세그먼트들의 인공적 조작에 의해 달성될 수 있다. 재조합 바이러스는 재조합 핵산 분자를 포함하는 계통을 포함하는 바이러스이다. 재조합 단백질은 자연적으로 발생하지 않는 서열을 가지고 있거나, 또는 두 개의 다른 방식으로 분리된 서열 세그먼트들의 인공적 조합에 의해 만들어진 서열을 갖는 단백질이다. 여러 실시예에서, 재조합 단백질은 세균 또는 진핵 세포와 같은 숙주 세포 또는 재조합 바이러스의 계통에 도입된 이중(예를 들어, 재조합) 핵산에 의해 인코딩된다.

[0124] 서열 동일성은 아미노산 서열들 사이의 유사성이 해당 서열들 사이의 유사성 양상에서 표현된 것이며, 그 외에도 서열 동일성으로 지칭된다. 서열 동일성은 백분율 동일성으로 측정되는 경우가 많다; 백분율이 높을수록 두 서열은 더 유사하다. 폴리펩티드의 상동체, 오르토로그 또는 변이체는 표준 방법을 사용하여 정렬할 때 상대적으로 높은 정도의 서열 동일성을 가질 것이다.

[0125] 비교를 위한 서열 정렬 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 다양한 프로그램 및 정렬 알고리즘이 문헌: Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, /. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, Gene, 73:237-44, 1988; Higgins & Sharp, CABIOS 5: 151-3, 1989; Corpet et al, Nuc. Acids Res. 16: 10881-90, 1988; Huang et al. Computer Appls. in the Biosciences 8, 155-65, 1992; 및 Pearson 외, Meth. Mol. Bio. 24:307-31, 1994. Altschul et al, J. Mol. Biol. 215:403- 10, 1990에 기재되어 있으며, 서열 정렬 방법 및 상동성 계산에 대한 상세한 고찰을 제시한다.

[0126] 폴리펩티드의 상동체 및 변이체(예를 들어, 코로나바이러스 S 엑토도메인)는 일반적으로 전장 정렬시 관심 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 예를 들어, 적어도 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가지는 것으로 특징된다. 참조 서열과 훨씬 더 유사한 단백질은 이 방법으로 평가할 때 증가하는 서열 동일성, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보일 것이다. 전체 서열 보다 짧은 서열을 서열 동일성으로 비교하는 경우, 상동체 및 변이체는 일반적으로 10-20개 아미노산의 짧은 구간에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 가질 것이며, 참조 서열과의 유사성에 따라 적어도 85% 또는 적어도 90% 또는 95%의 서열 동일성을 가질 수 있다. 이러한 짧은 구간에 대한 서열 동일성을 결정하는 방법은 NCBI 인터넷 웹사이트에서 찾을 수 있다. 본원에서 사용되는 “적어도 90%의 동일성” 또는 유사한 용어에 대한 언급은 특정 참조 서열에 대한 “적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 심지어 100% 동일성”을 지칭한다.

[0127] 백신은 대상체에서 예방적 또는 치료적 면역 반응을 유도하는 약학 조성물이다. 경우에 따라 면역 반응은 보호 면역 반응이다. 전형적으로, 백신은 병원체, 예를 들어, 바이러스 병원체의 항원 또는 병리학적 상태와 관련된 세포 성분에 대한 항원-특이적 면역 반응을 유도한다. 백신은 폴리뉴클레오티드(예: 개시된 항원을 인코딩하는 핵산), 펩티드 또는 폴리펩티드(예: 개시된 항원), 바이러스, 세포 또는 하나 이상의 세포 구성요소를 포함할 수 있다. 비제한적 예에서, 백신은 대조군과 비교하여 코로나바이러스 감염(예: SARS-CoV 또는 MERS-CoV 감염)과 관련된 증상의 중증도를 감소시키고/시키거나 바이러스 부하를 감소시키는 면역 반응을 유도한다. 또 다른

비제한적 예에서, 백신은 코로나바이러스 감염(예: SARS-CoV 또는 MERS-CoV 감염)을 감소시키거나 억제하는 면역 반응을 유도한다.

[0128] 벡터는 관심 항원(들)의 코딩 서열에 작동가능하게 연결되고 코딩 서열을 발현할 수 있는 프로모터(들)를 보유하는 DNA 또는 RNA 분자를 포함하는 엔터티이다. 비제한적 예에는 네이키드 또는 패키징된(지질 및/또는 단백질) DNA, 네이키드 또는 패키징된 RNA, 복제 불능일 수 있는 바이러스 또는 박테리아 또는 기타 미생물의 하위 구성요소, 또는 복제 가능일 수 있는 바이러스 또는 박테리아 또는 기타 미생물이 포함된다. 벡터는 때때로 구조체라고도 지칭된다. 재조합 DNA 벡터는 재조합 DNA를 갖는 벡터이다. 벡터는 복제 원점과 같이 숙주 세포에서 이의 복제를 가능하게 하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 또한 하나 이상의 선별 마커 유전자 및 당업계에 공지된 다른 유전자 요소들을 포함할 수 있다. 바이러스 벡터는 하나 이상의 바이러스로부터 유래된 적어도 일부의 핵산 서열을 갖는 재조합 핵산 벡터이다.

[0129] 바이러스 유사 입자(VLP)는 복제되지 않는 바이러스 쉘(viral shell)로서, 여러 바이러스에서 파생된다. VLP는 일반적으로 캡시드, 코트, 쉘, 표면 및/또는 외피 단백질로 지칭되는 단백질, 또는 이들 단백질로부터 유래된 입자-형성 폴리펩티드와 같은 하나 이상의 바이러스 단백질로 구성되지만 이에 제한되지 않는다. VLP는 적절한 발현 시스템에서 단백질의 재조합 발현 시 자발적으로 형성될 수 있다. 특정 VLP를 생성하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 바이러스 단백질의 재조합 발현 후 VLP의 존재는 전자현미경, 생물물리학적 특성화 등과 같은 당업계에 공지된 통상적인 기술을 사용하여 검출할 수 있다. 또한, VLP는 공지된 기술, 예를 들어 밀도 구배 원심분리에 의해 분리될 수 있고 특성 밀도 밴딩에 의해 식별될 수 있다. 예를 들어, 문헌 Baker et al. (1991) Biophys. J. 60: 1445-1456; 및 Hagensee et al. (1994) /. Virol. 68:4503-4505; Vincente, J Invertebr Pathol., 2011 ; Schneider-Ohnum and Ross, Curr. Top. Microbiol. Immunol, 354: 53073, 2012)를 참조하라.

[0130] 조성물

[0131] 본 발명의 조성물은 하나 이상의 활성 제제를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 활성 제제는 바이러스 감염의 감염성을 예방, 치료 또는 감소시키는 제제일 수 있다. 일부 실시형태에서, 바이러스 감염을 치료하는 것은 바이러스의 감염성 및/또는 전염을 감소시키는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 바이러스 감염을 예방하는 것은 바이러스의 감염성 및/또는 전염을 감소시키는 것을 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 바이러스 감염을 예방하기 위한 활성 제제, 바이러스 감염을 치료하기 위한 활성 제제, 바이러스 감염의 감염성을 감소시키기 위한 활성 제제, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 보존제, 가용화제, 안정제, 습윤제, 유화제, 감미제, 착색제, 방향제, 염(본 발명의 물질 자체가 약학적으로 허용되는 염의 형태로 제공될 수 있음). 완충제, 코팅제 또는 향산화제를 함유할 수 있다.

[0132] 본 발명은 비-인간 아데노바이러스 벡터 조성물 및 호흡기 바이러스 감염을 치료하거나 예방하기 위해 이러한 아데노바이러스 벡터 및 선택적으로 하나 이상의 추가 활성 성분, 약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제를 포함하는 면역원성 조성물을 사용하는 방법에 관한 것이다. 출원인은 유인원 아데노바이러스 벡터를 사용하여 인간 아데노바이러스 벡터 플랫폼(PMID:32450106)에서 볼 수 있었던 이중 벡터 교차 면역 문제가 극복되었음을 발견했다. 출원인은 안정화된 형태의 SARS-CoV-2 “S” 단백질과 같은 SARS-CoV-2 항원을 발현하는 침팬지 아데노바이러스 벡터를 제작하였으며 이것이 COVID-19에 대하여 질병의 동물 모델을 보호할 수 있음을 보여주었다. SARS-CoV-2 항원 또는 이의 면역원성 부분은 아데노바이러스 벡터에서 발현될 때 인간 감염 시 면역 반응을 자극함으로써, COVID-19 질병에 대한 면역성을 부여할 수 있다.

[0133] 본 발명의 다른 양상은 아래에서 더 상세히 설명된다.

[0134] 아데노바이러스 벡터

[0135] 본 발명은 아데노바이러스 벡터를 제공한다. 아데노바이러스는 직경이 약 90-100nm인 비-외피 바이러스로, 뉴클레오캡시드와 선형 이중 가닥 DNA 게놈을 포함한다. 바이러스 뉴클레오캡시드는 펜톤 및 핵소 캡소머를 포함한다. 고유한 섬유가 각 펜톤 염기와 연결되어 있으며 숙주 세포 표면의 콕사키-아데노바이러스 수용체를 통해 바이러스가 숙주 세포에 부착되는 것을 돕는다. 아데노바이러스의 50개 이상의 혈청형 군주가 확인되었으며, 이들 중 대부분은 인간에서 기도 감염, 결막염 및 위장염을 유발한다. 숙주 게놈에 통합되는 대신 아데노바이러스는 일반적으로 숙주 세포의 핵에서 에피솜 요소로서 복제된다. 아데노바이러스의 게놈은 4개의 초기 전사 단위(E1, E2, E3 및 E4)를 포함하는데, 이들은 주로 조절 기능을 갖고 바이러스 복제를 위해 숙주 세포를 준비한다. 상기 게놈은 또한 펜톤(L2), 핵소(L3), 스캐폴딩 단백질(L4) 및 섬유 단백질(L5)을 포함하는 구조 단백질을 인코딩하

는 5개의 후기 전사 단위(L1, L2, L3, L4 및 L5)를 포함하며, 이들은 단일 프로모터의 제어하에 있다. 상기 계놈의 각 말단은 바이러스 복제에 필요한 반전 말단 반복부(ITR)를 포함한다.

[0136] 재조합 아데노바이러스는 원래 유전자 치료를 위해 개발되었지만, 이러한 유전자 전달 인자에 의해 유도된 강력하고 지속적인 이식유전자 특이적 면역 반응으로 인해 백신 담체로 사용되었다. 높은 면역원성 외에도 아데노바이러스는 임상 백신 개발에 많은 다른 이점을 제공한다. 아데노바이러스 계놈은 상대적으로 작고(26 내지 45kbp) 특성이 잘 규명되어 있고 조작하기 쉽다. 단일 전사 단위인 E1의 결실은 바이러스를 복제 불능으로 만들어 예측 가능성을 높이고 임상 적용에서 부작용을 줄인다. 재조합 아데노바이러스는 어떤 경우에는 최대 8kb까지 비교적 큰 이식유전자를 수용할 수 있어 소단위 설계에 유연성을 허용하고 다양한 세포와 조직으로의 이식유전자 전달을 용이하게 하는 상대적으로 넓은 항성을 가지고 있다. 임상 적용을 위해 중요한 것은, 재조합 아데노바이러스의 생산 규모를 확대하고 높은 역가로 정제하는 방법이 잘 확립되어 있다는 것이다. 지금까지 하위그룹 C 혈청형 AdHu2 또는 AdHu5가 주로 벡터로 사용되었다. 그러나 전형적인 인간 아데노바이러스 AdHu5를 기반으로 한 1세대 백신 벡터는 고무적인 전임상 데이터에도 불구하고 임상 시험에서 낮은 효능을 보였다. 이후 많은 비율의 인간 성인이 자연 감염의 결과로 AdHu2 및 AdHu5와 같은 일반적인 인간 혈청형에 대해 상당한 역가의 중화 항체를 보유하고 있음이 발견되었다. 중화 항체는 바이러스가 숙주 세포로 유입되는 것을 차단하여 표적 이식유전자의 전달을 차단함으로써 바이러스 벡터 백신의 효능을 감소시킬 수 있다.

[0137] 본원에 기재된 조성물은 치료 또는 백신 목적을 위해 이종 분자를 세포에 전달하는 벡터를 포함한다. 본원에서 사용되는 벡터는 네이키드 DNA, 파지, 트랜스포존, 코스미드, 에피솜, 플라스미드 또는 바이러스를 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 유전자 요소를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서 이러한 벡터는 유인원 아데노바이러스 DNA(예: SAdV-36) 및 이식유전자를 함유한다. “이식유전자”는 선택된 이종 유전자와, 숙주 세포에서 유전자 산물의 번역, 전사 및/또는 발현을 유도하는 데 필요한 다른 조절 요소의 조합을 의미한다. 여러 실시형태에서, 바이러스 벡터는 코로나바이러스 S 단백질을 인코딩하는 이식유전자를 발현하는 아데노바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 다양한 기원, 하위유형 또는 하위유형의 혼합물로부터 얻은 아데노바이러스는 아데노바이러스 벡터를 위한 바이러스 계놈의 공급원으로 사용될 수 있다. 비인간 아데노바이러스(예: 원숭이, 침팬지, 고릴라, 조류, 개, 양 또는 소 아데노바이러스)는 아데노바이러스 벡터를 생성하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 유인원 아데노바이러스는 아데노바이러스 벡터의 바이러스 계놈의 공급원으로 사용될 수 있다. 유인원 아데노바이러스는 혈청형 1, 3, 7, 11, 16, 18, 19, 20, 27, 33, 36, 38, 39, 48, 49, 50, 또는 임의의 다른 유인원 아데노바이러스 혈청형일 수 있다. 유인원 아데노바이러스는, 예를 들어, SV, SAdV, SAV 또는 sAV와 같은 당업계에 공지된 임의의 적합한 약어를 사용하여 지칭될 수 있다. 일부 예에서, 유인원 아데노바이러스 벡터는 혈청형 36의 유인원 아데노바이러스 벡터이다.

[0138] 전형적으로, SAdV 유래 아데노바이러스 벡터는 선택된 아데노바이러스 유전자에 고유한 영역에 존재하는 다른 아데노바이러스 서열을 포함하는 핵산 분자 내에 이식유전자가 위치하도록 설계된다. 이식유전자는 원하는 경우 해당 영역의 기능을 방해하기 위해 기존 유전자 영역에 삽입될 수 있다. 대안적으로, 이식유전자는 부분적으로 또는 완전히 결실된 아데노바이러스 유전자 부위에 삽입될 수 있다. 예를 들어, 이식유전자는 선택될 수 있는 것들 중에서도, 기능적 E1 결실 또는 기능적 E3 결실(또는 E3B) 부위와 같은 부위에 위치할 수 있다. 용어 “기능적으로 결실된” 또는 “기능적 결실”은 유전자 영역이 더 이상 유전자 발현의 기능적 산물을 생성할 수 없도록 충분한 양의 유전자 영역이 제거되거나 예를 들어 돌연변이 또는 변형에 의해 손상되는 것을 의미한다. 원하는 경우 전체 유전자 영역을 제거할 수 있다. 한 실시형태에서, 본 발명에 따라 유용한 아데노바이러스 벡터는 E1 및 E3B 유전자에 결실이 있는 유인원 아데노바이러스, SAd36이다. 한 양상에서, 아데노바이러스 벡터는 서열번호 4의 핵산 서열을 갖는다. 또 다른 양상에서, 아데노바이러스 벡터는 서열번호 4에 적어도 80%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1 %, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1 %, 99.2%, 99.3%, 99.4% 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 서열 동일성을 가지는 핵산 서열을 가진다.

[0139] 예를 들어, 재조합 바이러스의 생성에 유용한 생산 벡터의 경우, 벡터는 이식유전자 및 아데노바이러스 계놈의 5' 단부 또는 아데노바이러스 계놈의 3' 단부 또는 아데노바이러스 계놈의 5' 및 3' 단부 모두를 함유할 수 있다. 아데노바이러스 계놈의 5' 단부에는 패키징 및 복제에 필요한 5' 시스-요소; 즉, 5' 역위 말단 반복(ITR) 서열(복제 기점으로 작용) 및 천연 5' 패키징 인핸서 도메인(전형 Ad 계놈 패키징에 필요한 서열 및 E1 프로모터용 인핸서 요소 포함)이 포함되어 있다. 아데노바이러스 계놈의 3' 단부에는 패키징 및 캡슐화에 필요한 3' 시스-요소(ITR 포함)가 포함된다. 적절하게는, 재조합 아데노바이러스는 5' 및 3' 아데노바이러스 시스-요소를 모두 함유하고 이식유전자는 5' 및 3' 아데노바이러스 서열 사이에 위치한다. 유인원 기반 아데노바이러스 벡터

(예: SAdV-36)는 또한 추가 아데노바이러스 서열을 포함할 수 있다.

- [0140] 적절하게는, 이들 유인원 기반 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 게놈으로부터 유래된 하나 이상의 아데노바이러스 요소를 함유한다. 한 실시형태에서, 벡터는 ITR을 제공하는 것과 상이한 아데노바이러스 혈청형으로부터 유래된 아데노바이러스 서열을 함유한다. 본원에 정의된 바와 같이, 위형(pseudotyped) 아데노바이러스는 아데노바이러스의 캡시드 단백질이 ITR을 제공하는 아데노바이러스와 상이한 아데노바이러스로부터 유래된 아데노바이러스를 지칭한다. 키메라 또는 하이브리드 아데노바이러스는 당업자에게 공지된 기술을 사용하여 본원에 기재된 아데노바이러스를 사용하여 작제할 수 있다. 예를 들어, US 7,291,498 참조.
- [0141] 이식유전자는 이식유전자에 연결한 벡터 서열에 대해 이중인 핵산 서열로서 관심 폴리펩티드, 단백질 또는 기타 생성물을 인코딩한다. 핵산 코딩 서열은 이식유전자 전사, 번역 및/또는 숙주 세포에서의 발현을 허용하는 방식으로 조절 성분들에 작동가능하게 연결된다.
- [0142] 일부 실시형태에서, 이식유전자는 SARS-CoV-2 항원, 예를 들어, SARS-CoV-2 “S” 단백질의 안정화된 형태를 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 이식유전자는 서열번호 3의 코로나바이러스 스파이크 단백질 부분(또는 이의 면역원성 부분 또는 변이체)에 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1 %, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1 %, 99.2%, 99.3%, 99.4% 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 서열 동일성인; 또는 K986P 및 V987P 돌연변이를 갖는 서열번호 3; 또는 D614G 돌연변이를 갖는 서열번호 3에 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1 %, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1 %, 99.2%, 99.3%, 99.4% 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 서열 동일성인 서열을 가지는 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질의 적어도 일부 또는 면역원성 단편 또는 이의 면역원성 단편 또는 변이체를 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 이식유전자는 SARS-CoV-2 변이체의 스파이크 단백질, 비-제한적 실시예에서 서열번호 3 대비 D80G, 144del, F157S, L5F, T95I, A67V, S477N, 144del, Q677H, A701V, F888L, T791I, T859N, D950H, E484Q, D614G, E484K, N501Y, Δ69-70, L452R, 또는 K417N 또는 RBD E484K 돌연변이를 가지는 스파이크 단백질을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 이식유전자는 WA1/2020, B.1.1.7, B.1.351, B.1.1.28, P.1, B.1.427, B.1.526, B.1.526.1, B.1.525, P.2, B.1.617, B.1.617.1, B.1.617.2, B.1.617.3, B.1.429, 또는 B.1.429 변이체의 스파이크 단백질을 인코딩한다. 각각의 상기 실시형태에서, 스파이크 단백질은 융합전 안정화된 형태(예를 들어, 잔기 1050 내지 1069 사이 또는 잔기 981 내지 999 사이에 이중 프롤린 치환을 가짐)가 되도록 추가로 변형된다.
- [0143] 이식유전자에 대해 위에서 확인된 주요 요소들 이외에도, 벡터는 또한 플라스미드 벡터로 형질감염되거나 본 발명에 의해 생산된 바이러스로 감염된 세포에서 전사, 번역 및/또는 발현을 허용하는 방식으로 이식유전자에 작동 가능하게 연결된 필요한 통상적인 제어 요소들을 포함한다. 본원에 사용된 “작동가능하게 연결된” 서열은 관심 유전자와 연속된 발현 제어 서열 및 관심 유전자를 제어하기 위해 트랜스포 또는 일정 거리에서 작용하는 발현 제어 서열 모두를 포함한다. 발현 제어 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닐화(polyA) 신호와 같은 효율적인 RNA 처리 신호; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 향상시키는 서열(즉, Kozak 컨센서스 서열); 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및 원하는 경우 인코딩된 생성물의 분비를 향상시키는 서열을 포함한다.
- [0144] 천연, 항시성, 유도성 및/또는 조직 특이적 프로모터를 포함하는 다수의 발현 제어 서열이 당업계에 공지되어 있고 이용될 수 있다. 항시성 프로모터의 예는 제한 없이 레트로바이러스성 Rous 육종 바이러스(RSV) LTR 프로모터(선택적으로 RSV 인핸서 포함), 거대세포바이러스(CMV) 프로모터(선택적으로 CMV 인핸서 포함)[예를 들어, Boshart 외, Cell, 41:521-530 (1985) 참조], SV40 프로모터, 디하이드로폴레이트 환원효소 프로모터, β-액틴 프로모터, 포스포글리세롤 키나제(PGK) 프로모터 및 EF1α 프로모터[Invitrogen]를 포함한다.
- [0145] 유도성 프로모터는 유전자 발현의 조절을 허용하고 외인성으로 공급된 화합물, 온도와 같은 환경적 요인 또는 특정 생리학적 상태(예: 급성기, 세포의 특정 분화 상태 또는 복제중인 세포에서만)의 존재에 의해 조절될 수 있다. 유도성 프로모터 및 유도성 시스템은 Invitrogen, Clontech 및 Ariad를 비롯한(이에 제한되지 않음) 다양한 상업적 공급원으로부터 구입할 수 있다. 많은 다른 시스템들이 설명된 바 있으며 당업자에 의해 쉽게 선택될 수 있다. 예를 들어, 유도성 프로모터는 아연-유도성 양 메탈로티오닌(MT) 프로모터 및 텍사메타손(Dex)-유도성 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터를 포함한다. 다른 유도 시스템에는 T7 폴리머라제 프로모터 시스템 [WO 98/10088]; 엑디손 곤충 프로모터[No et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)], 테트라사이클린 억제 시스템[Gossen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)], 테트라사이클린 유도 시스템[Gossen et al, Science, 268:1766-1769 (1995), Harvey et al, Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518

(1998) 또한 참조]이 포함된다. 다른 시스템으로는 FK506 이량체, 카스트라디올을 사용하는 VP 16 또는 p65, 디페놀 무리슬론, RU486 유도 시스템[Wang et al, Nat. Biotech., 15:239-243 (1997) 및 Wang et al, Gene Ther., 4:432-441 (1997)] 및 라파마이신 유도 시스템[Magari et al, J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)]이 포함된다. 일부 유도성 프로모터의 효과는 시간이 지남에 따라 증가한다. 이러한 경우에 IRES에 의해 TetR에 연결된 TetR과 같이 다수의 억제인자들을 직렬로 삽입함으로써 이러한 시스템의 효율성을 향상시킬 수 있다. 대안적으로 원하는 기능을 선별하기 전에 적어도 3일을 기다릴 수 있다. 이 시스템의 효율성을 향상시키기 위해 알려진 수단으로 원하는 단백질의 발현을 향상시킬 수 있다. 예를 들어, 우드척 간염 바이러스의 전사 후 조절 요소(WPRE)를 사용한다.

[0146] 또 다른 실시형태에서, 이식유전자에 대한 천연 프로모터가 사용될 것이다. 이식유전자의 발현이 천연 발현을 모방하는 것이 필요할 때 천연 프로모터가 바람직할 수 있다. 천연 프로모터는 이식유전자의 발현이 일시적으로 또는 발달적으로, 또는 조직 특이적 방식으로, 또는 특정 전사 자극에 대한 반응으로 조절되어야 할 때 사용될 수 있다. 추가 실시형태에서, 인핸서 요소, 폴리아데닐화 부위 또는 Kozak 컨센서스 서열과 같은 다른 천연 발현 제어 요소 또한 천연 발현을 모방하는데 사용될 수 있다. 이식유전자의 다른 실시형태는 조직-특이적 프로모터에 작동가능하게 연결된 이식유전자를 포함한다. 예를 들어, 골격근에서의 발현을 원하는 경우, 근육에서 활성화된 프로모터를 사용해야 한다. 이들은 골격 β -액틴, 미오신 경쇄 2A, 디스트로핀, 근육 크레아틴 키나제, 뿐만 아니라 천연 발생 프로모터보다 높은 활성을 갖는 합성 근육 프로모터를 포함한다(Li et al, Nat. Biotech., 17:241-245(1999)참조). 특히, 간(알부민, Miyatake et al, J. Virol., 71:5124-32 (1997); B형 간염 바이러스 코어 프로모터, Sandig 외, Gene Ther., 3:1002-9 (1996); 알파-태아단백질(AFP), Arbuthnot et al, Hum. Gene Ther., 7:1503-14 (1996)), 뼈 오스테오칼신(Stein et al, Mol. Biol. Rep., 24:185-96 (1997)); 뼈 시알로프로테인(Chen et al, J. Bone Miner. Res., 11:654-64 (1996)), 림프구(CD2, Hansal et al, J. Immunol., 161: 1063-8 (1998); 면역글로불린 중쇄; T 세포 수용체 사슬), 뉴런, 예를 들어, 뉴런-특이적 에놀라제(NSE) 프로모터(Andersen et al, Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993)), 신경필라멘트 경쇄 유전자(Piccioli et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991)), 뉴런-특이적 vgf 유전자(Piccioli et al, Neuron, 15:373-84 (1995))에 대한 조직 특이적 프로모터의 예가 공지되어 있다. 선택적으로, 치료적으로 유용한 또는 면역원성 산물을 인코딩하는 이식유전자를 운반하는 벡터는 또한 선별가능한 마커를 포함할 수 있고 또는 리포터 유전자는, 특히, 제네티신, 하이그로마이신 또는 퓨리마이신 내성을 인코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 이러한 선별가능한 리포터 또는 마커 유전자(바람직하게는 바이러스 입자에 패키징되는 바이러스 게놈 외부에 위치)는 박테리아 세포 내 플라스미드의 존재, 예를 들어, 암피실린 내성을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 벡터의 다른 구성요소들에는 복제 원점이 포함될 수 있다. 이러한 그리고 기타 프로모터 및 벡터 요소들의 선택은 통상적이며 이러한 많은 서열을 이용가능하다[예를 들어, Sambrook 외의 문헌, 및 이 문헌에 인용된 참조문헌 참조]. 이들 벡터는 당업자에게 공지된 기술과 함께 본원에 제공된 기술 및 서열들을 사용하여 생성된다. 이러한 기술은 문헌[Sambrook 외, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY]에 기재된 바와 같은 통상적인 cDNA 클로닝 기술, 아데노바이러스 게놈의 중첩 올리고뉴클레오타이드 서열의 사용, 중합효소 사슬 반응, 및 원하는 뉴클레오타이드 서열을 제공하는 임의의 적합한 방법을 포함한다.

[0147] 일부 실시형태에서, 본 발명에 따른 이식유전자를 포함하는 아데노바이러스 벡터는 서열번호 2의 핵산 서열을 포함하거나, 이들로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 실시형태에서, 아데노바이러스 벡터는 서열번호 2에 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 서열 동일성을 가지는 핵산 서열을 포함한다.

[0148] 일부 실시형태에서, 개시된 재조합 아데노바이러스 벡터를 포함하는 바이러스 유사 입자(VLP)가 제공된다. VLP는 바이러스 복제에 필요한 바이러스 구성요소들이 결핍되어 있으므로 매우 약독화되고 복제 불능인 형태의 바이러스를 나타낸다. 바이러스 유사 입자 및 이들의 생성 방법은 당업자에게 공지되어 있고 친숙하며, 인간 유두종바이러스, HIV (Kang 외, Biol. Chem. 380: 353-64 (1999)), Semliki-Forest 바이러스(Notka 외, Biol. Chem. 380: 341-52 (1999)), 인간 폴리오마바이러스(Goldmann 외, J. Virol. 73: 4465-9 (1999)), 로타바이러스(Jiang et al, Vaccine 17: 1005-13 (1999)), 파코바이러스(Casal, Biotechnology and Applied Biochemistry, Vol 29, Part 2, pp 141-150 (1999)), 개 파코바이러스(Hurtado 외, J. Virol. 70: 5422-9 (1996)), E형 간염 바이러스(Li et al, J. Virol. 71: 7207-13 (1997)), 및 뉴캐슬병 바이러스를 비롯한 여러 바이러스로부터 얻은 바이러스 단백질이 VLP를 형성하는 것으로 공지되어 있다. 이러한 VLP의 형성은 임의의 적합한 기술에 의해 검출될 수 있다. 배지에서 VLP를 검출하기 위한 당업계에 공지된 적합한 기술의 예는, 예를

들어, 전자 현미경 기술, 동적 광 산란(DLS), 선별적인 크로마토그래피 분리(예를 들어, VLP 이온 교환, 소수성 상호작용 및/또는 크기 배제 크로마토그래피 분리) 및 밀도 구배 원심분리가 포함된다.

[0149] **조성물의 구성요소**

[0150] 본 발명은 또한 약학 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물은 활성 성분으로서 본 발명의 아데노바이러스 조성물 및 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함한다.

[0151] 약학적으로 허용되는 부형제는 희석제, 결합제, 충전제, 완충제, pH 조절제, 붕해제, 분산제, 보존제, 윤활제, 맛-은폐제, 향미제 또는 착색제일 수 있다. 약학 조성물을 형성하기 위해 사용되는 부형제의 양 및 유형은 공지된 약학 과학 원리에 따라 선택될 수 있다.

[0152] 본원에 기재된 각각의 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 선택적으로 본 발명의 아데노바이러스 조성물에 이외에도 하나 이상의 추가 약물 또는 치료 활성 제제를 포함할 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 요법들에 더하여, 바이러스 감염의 치료에 효과적인 것으로 알려진 다른 요법을 대상체에게 제공할 수도 있다. 일부 실시형태에서, 제2 제제는 코르티코스테로이드, 비스테로이드성 항염증제(NSAID), 정맥내 면역글로불린, 키나제 억제제, 융합 또는 재조합 단백질, 모노클로날 항체 또는 이들의 조합으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 병용 요법에 적합한 제제는 흡입 기관지확장제 및 흡입 스테로이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0153] 희석제

[0154] 한 실시형태에서, 부형제는 희석제일 수 있다. 희석제는 압축가능(즉, 소성 변형 가능)하거나 마모되기 쉬울 수 있다. 적합한 압축가능 희석제의 비제한적 예는 미정질 셀룰로오스(MCC), 셀룰로오스 유도체, 셀룰로오스 분말, 셀룰로오스 에스테르(즉, 아세테이트 및 부티레이트 혼합 에스테르), 에틸 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 히드록시프로필 셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스, 소듐 카르복시메틸셀룰로오스, 옥수수 전분, 인산화옥수수전분, 전호화옥수수전분, 쌀전분, 감자전분, 타피오카전분, 전분-유당, 전분-탄산칼슘, 전분글리콜산나트륨, 포도당, 과당, 유당, 유당일수화물, 자당, 자일로오스, 락티톨, 만니톨, 말리톨, 소르비톨, 자일리톨, 말토덱스트린, 및 트레할로스를 포함한다. 적합한 마모성 취성 희석제의 비제한적 예는 제2 인산칼슘(무수 또는 이수화물), 제3인산칼슘, 탄산칼슘 및 탄산마그네슘을 포함한다.

[0155] 결합제

[0156] 다른 실시형태에서, 부형제는 결합제일 수 있다. 적합한 결합제는 전분, 전호화 전분, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 소듐 카르복시메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 폴리아크릴아미드, 폴리비닐옥소아졸리돈, 폴리비닐알코올, C₁₂-C₁₈ 지방산 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리올, 사카라이드, 올리고사카라이드, 폴리펩티드, 올리고펩티드 및 이들의 조합이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0157] 충전제

[0158] 다른 실시형태에서, 부형제는 충전제일 수 있다. 적합한 충전제는 탄수화물, 무기 화합물 및 폴리비닐피롤리돈을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 비제한적 예로서, 충전제는 황산칼슘(이염기성 및 삼염기성 모두), 전분, 탄산칼슘, 탄산마그네슘, 미정질 셀룰로오스, 이염기성 인산칼슘, 탄산마그네슘, 산화마그네슘, 규산칼슘, 활석, 개질된 전분, 유당, 자당, 만니톨 또는 소르비톨일 수 있다.

[0159] 완충제

[0160] 또 다른 실시예에서, 부형제는 완충제일 수 있다. 적합한 완충제의 대표적인 예는 인산염, 탄산염, 구연산염, 트리스 완충액 및 완충 식염수(예를 들어, 트리스 완충 식염수 또는 인산염 완충 식염수)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0161] pH 조절제

[0162] 다양한 실시형태에서, 부형제는 pH 조절제일 수 있다. 비제한적인 예로서, pH 조절제는 탄산나트륨, 중탄산나트륨, 시트르산나트륨, 시트르산 또는 인산일 수 있다.

[0163] 붕해제

[0164] 추가 실시형태에서, 부형제는 붕해제일 수 있다. 붕해제는 비발포성 또는 발포성일 수 있다. 비발포성 붕해제의 적합한 예는 옥수수 전분, 감자 전분, 전젤라틴화 및 변성 전분과 같은 전분, 감미료, 벤토나이트와 같은 점토, 미정질 셀룰로오스, 알기네이트, 소듐 전분 글리콜레이트, 검, 예를 들어, 한천, 구아, 메뚜기 콩, 카라야, 페

시턴 및 트라가칸트를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 적합한 발포성 봉해제의 비제한적 예는 시트르산과 조합된 중탄산나트륨 및 타르타르산과 조합된 중탄산나트륨을 포함한다.

[0165] 분산제

[0166] 또 다른 실시예에서, 부형제는 분산제 또는 분산 강화제일 수 있다. 적합한 분산제는 전분, 알긴산, 폴리비닐피롤리돈, 구아 검, 카올린, 벤토나이트, 정제된 목재 셀룰로오스, 나트륨 전분 글리콜레이트, 이소아몰퍼스 실리카이트 및 미정질 셀룰로오스를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0167] 부형제

[0168] 또 다른 대안적인 실시예에서, 부형제는 보존제일 수 있다. 적합한 보존제의 비제한적 예는 항산화제, 예컨대 BHA, BHT, 비타민 A, 비타민 C, 비타민 E 또는 레티닐 팔미테이트, 시트르산, 시트르산나트륨; EDTA 또는 EGTA 와 같은 킬레이트제; 및 파라벤, 클로로부탄올 또는 페놀과 같은 항균제가 포함된다.

[0169] 윤회제

[0170] 추가 실시형태에서, 부형제는 윤회제일 수 있다. 적합한 윤회제의 비제한적 예에는 활석 또는 실리카와 같은 광물; 및 식물성 스테아린, 마그네슘 스테아레이트 또는 스테아르산과 같은 지방이 포함된다.

[0171] 미각 차폐제(Taste-Masking Agent)

[0172] 또 다른 실시예에서, 부형제는 맛 차폐제일 수 있다. 맛을 차폐하는 물질에는 셀룰로오스 에테르; 폴리에틸렌 글리콜; 폴리비닐 알코올; 폴리비닐 알코올 및 폴리에틸렌 글리콜 공중합체; 모노글리세리드 또는 트리글리세리드; 아크릴 중합체; 아크릴 중합체와 셀룰로오스 에테르의 혼합물; 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트; 및 이들의 조합이 포함된다.

[0173] 향미제

[0174] 대안적인 실시형태에서, 부형제는 향미제일 수 있다. 향미제는 합성 향미 오일 및 향미 방향족 및/또는 천연 오일, 식물, 잎, 꽃, 과일 및 이들의 조합으로부터의 추출물로부터 선택될 수 있다.

[0175] 착색제

[0176] 또 다른 실시형태에서, 부형제는 착색제일 수 있다. 적합한 색상 첨가제에는 식품, 의약품 및 화장품 색상(FD&C), 의약품 및 화장품 색상(D&C) 또는 외용 의약품 및 화장품 색상(Ext. D&C)이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.

[0177] 조성물 중 부형제 또는 부형제의 조합의 중량 비율은 조성물 총 중량의 약 99% 이하, 약 97% 이하, 약 95% 이하, 약 90% 이하, 약 85% 이하, 약 80% 이하일 수 있다. , 약 75% 이하, 약 70% 이하, 약 65% 이하, 약 60% 이하, 약 55% 이하, 약 50% 이하, 약 45% 이하, 약 40% 이하, 약 35% 이하, 약 30% 이하, 약 25% 이하, 약 20% 이하, 약 15% 이하, 약 10% 이하, 약 5% 이하, 약 2% 이하, 또는 약 1% 이하이다.

[0178] 본원에 기재된 제제 및 조성물은, 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(AR Gennaro, Ed.), 21판, ISBN: 0781746736(2005)]에 기재된 바와 같은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 사용하여 임의의 통상적인 방식으로 제형화될 수 있으며, 상기 문헌은 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다. 이러한 제제는 본원에 기재된 생물학적 활성 제제(정제된 형태일 수 있음)의 치료적 유효량을 적합한 양의 담체와 함께 함유하여 대상체에게 적절한 투여를 위한 형태를 제공할 것이다.

[0179] “제형”이라는 용어는 약물을 인간과 같은 대상체에게 투여하기에 적합한 형태로 제조하는 것을 지칭한다. 따라서, “제형”은 희석제 또는 담체를 포함하는 약학적으로 허용되는 부형제를 포함할 수 있다.

[0180] 본원에서 사용되는 용어 “약학적으로 허용되는”은 허용할 수 없는 약리학적 활성의 손실 또는 허용할 수 없는 부작용을 일으키지 않는 물질 또는 성분을 기재하는 것일 수 있다. 약학적으로 허용되는 성분의 예는, 2005년 메틸렌디옥소 록빌 소재 미국 약전 위원회의 미국 약전(USP 29) 및 국민의약품집(NF 24)(“USP/NF”)에 모노그래프를 가진 성분들 또는 보다 최근 판 및 지속적으로 업데이트되는 FDA의 비활성 성분 검색 온라인 데이터베이스에 나열된 성분들이 될 수 있다. USP/NF 등에 기재되지 않은 다른 유용한 성분들도 사용할 수 있다.

[0181] 본원에서 사용되는 용어 “약학적으로 허용되는 부형제”는 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항균제 및 향진균제, 등장성 제제 또는 흡수 지연제를 포함할 수 있다. 이러한 매질 및 제제를 약학적 활성 물질로 사용하는 것은 당업계에 잘 알려져 있다(일반적으로 Remington's Pharmaceutical Sciences(AR Gennaro, Ed.), 21st

edition, ISBN: 0781746736 (2005) 참조). 임의의 통상적인 매질 또는 제제가 활성 성분과 상용불가능한 경우를 제외하고, 치료 조성물에서의 이의 사용이 고려된다. 보충용 활성 성분들 또한 상기 조성물에 혼입될 수 있다.

[0182] “안정한” 제형 또는 조성물은 약 0℃ 내지 약 60℃ 사이와 같은 편리한 온도에서 상업적으로 합당한 기간 동안, 예를 들어, 적어도 약 1일, 적어도 약 1주, 적어도 약 1개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 1년, 또는 적어도 약 2년 동안 저장을 허용하기에 충분한 안정성을 갖는 조성물을 지칭할 수 있다.

[0183] 이러한 제형은 투여 방식에 적합해야 한다. 본 발명과 함께 사용되는 제제는 비경구, 폐, 경구, 국소, 피내, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 비강내, 경막 외, 안구, 협측 및 직장을 비롯한(그러나 이에 제한되지 않음) 여러 경로를 사용하여 대상체에게 투여하기 위한 공지된 방법에 의해 제형화될 수 있다. 개개의 제제는 또한 하나 이상의 추가 제제와 함께 또는 다른 생물학적 활성 또는 생물학적 불활성 제제와 함께 투여될 수 있다. 이러한 생물학적 활성 또는 불활성 제제는 제제(들)와 유체 또는 기계적으로 소통하거나 이온성, 공유성, 반 데르 발스, 수소성, 친수성 또는 기타 물리적 힘에 의해 제제(들)에 부착될 수 있다.

[0184] 비강내 전달용 조성물을 포함하는 제형은 생리학적으로 산성인 비강 pH에 상응하는 pH를 가질 수 있다. 생리학적으로 산성인 비강 pH는 손상되지 않은 비강 점막 기능에 따라 달라질 수 있다. 조성물은 약 6.5 ± 0.5 (5.9 내지 7.3) 또는 약 6.7 ± 0.6 (5.3 내지 7.6)의 pH를 포함할 수 있다. 조성물은 약 3.8-7.7 (평균 $\pm$ SD 5.7 $\pm$ 0.9)의 pH를 포함할 수 있다. 비강 전달용 조성물은 약산성 범위일 수 있다. 평균 pH는 pH 5.7의 산도를 가질 수 있다.

[0185] 비강내 투여를 통한 치료제의 효과적인 전달은 점액층의 당단백질 결합으로 인한 약물 손실 외에도 비점막의 보호 점액 내벽을 통과시의 수송 속도 감소를 고려해야 한다. 정상적인 점액은 물, 전해질, 뮤신, 거대분자 및 박피된 상피 세포로 구성된 점탄성의 젤 같은 물질이다. 그것은 기본적으로 기저 점막 조직을 위한 세포 보호 및 윤활 덮개 역할을 한다. 점액은 비강 상피에 그리고 다른 점막 상피에 위치한 무작위로 분포된 분비 세포에 의해 분비된다. 점액의 구조 단위는 뮤신이다. 이 당단백질은 주로 점액의 점탄성 특성의 원인이 되지만 다른 거대분자도 이 특성에 기여할 수 있다. 기도 점액에서 이러한 거대분자는 국소적으로 생성된 분비 IgA, IgM, IgE, 리소자임 및 기관지트랜스페린을 포함하며, 이들은 또한 숙주 방어 메커니즘에서 중요한 역할을 한다.

[0186] 본 발명의 공동 투여 방법은 비강내 투여된 생물치료제의 흡수 및/또는 흡착을 용이하게 하기 위해 비강내 점막 표면으로부터 점액을 분해, 희석 또는 제거하는 역할을 하는 효과적인 점액용해제 또는 점액-제거제를 선택적으로 포함한다. 이들 방법 내에서, 점액 용해제 또는 점액 제거제는 생물학적 활성제의 비강내 전달을 향상시키기 위한 보조 화합물로서 공동으로 투여된다. 대안적으로, 유효량의 점액 용해제 또는 점액 제거제는 본 발명의 멀티프로세스 방법에서 가공 제제로서, 또는 본 발명의 조합 제형 내 첨가제로서 혼입되어, 비강 점액의 장벽 효과를 감소시켜 바이오 치료제 화합물의 비강내 전달을 향상시키는 개선된 제형을 제공한다.

[0187] 다양한 점액 용해제 또는 점액 제거제가 본 발명의 방법 및 조성물에 혼입될 수 있다. 작용 메커니즘에 따라, 점액 용해제 및 점액 제거제는 종종 다음 그룹들로 분류될 수 있다: 뮤신 당단백질의 단백질 코어를 절단하는 프로테아제(예: 프로나아제, 파파인); 점액단백질 이황화물 연결을 분리하는 설파히드릴 화합물; 및 점액 내의 비공유 결합을 끊는 세제(예: Triton X-100, Tween 20). 이와 관련하여 추가 화합물은 담즙산염 및 계면활성제, 예를 들어, 데옥시콜산나트륨, 타우로데옥시콜산나트륨, 글리코콜산나트륨 및 라이소포스파티딜콜린을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0188] 점액의 구조적 분해를 일으키는 담즙산염의 효과는 데옥시콜레이트>타우로콜레이트>글리코콜레이트의 순서이다. 본 발명의 방법에 따라 비강내 전달을 향상시키기 위해 점액 점도 또는 부착을 감소시키는 다른 효과적인 제제는, 예를 들어, 단쇄 지방산, 및 킬레이트화에 의해 작용하는 점액용해제, 예를 들어, N-아실콜라겐 펩티드, 담즙산 및 사포닌을 포함한다(후자는 부분적으로 점액층 구조를 유지하는 데 중요한 역할을 하는 Ca^{2+} 및/또는 Mg^{2+} 를 킬레이트화하여 기능한다).

[0189] 본 발명의 방법 및 조성물 내에서 사용하기 위한 추가적인 점액 용해제는, 폐기관지 점액의 점도 및 점착성을 모두 감소시키고 마취시킨 래트에서 인간 성장 호르몬의 비강 생체이용률(7.5~12.2%)을 적당히 증가시키는 것으로 보고된 강력한 점액 용해제인 N-아세틸-L-시스테인(ACS)을 포함한다. 이들 및 다른 점액용해제 또는 점액-제거제는 일반적으로 약 0.2 내지 20mM의 농도 범위에서 비점막과 접촉하여, 생물학적 활성 제제의 투여와 함께 비강내 점액의 극성 점도 및/또는 탄성을 감소시킨다.

[0190] 또 다른 점액 용해제 또는 점액 제거제는 점액 당단백질 내의 글리코시드 결합을 절단할 수 있는 다양한 글리코시다제 효소로부터 선택될 수 있다. α -아밀라아제와 β -아밀라아제는 점액 용해 효과가 제한적일 수 있지만 이

러한 종류의 효소를 대표한다. 대조적으로, 박테리아 글리코시다아제는 이러한 미생물이 숙주의 점액층에 침투할 수 있도록 한다.

[0191] 본 발명에 속하는 아데노바이러스 조성물과 병용하기 위해, 비이온성 세제가 일반적으로 점액 용해제 또는 점액 제거제로서 유용하다. 이들 제제는 전형적으로 아데노바이러스 조성물의 활성을 변형시키거나 실질적으로 손상시키지 않을 것이다.

[0192] **투여**

[0193] **투여 형태**

[0194] 조성물은 다양한 투여 형태로 제형화될 수 있고 치료학적 유효량의 활성 성분을 전달할 다수의 상이한 수단에 의해 투여될 수 있다. 이러한 조성물은 경구(예: 흡입)로 투여하거나, 필요에 따라 기존의 비독성 약학적으로 허용되는 담체, 보조제 및 비히클을 함유하는 투여 단위 제형으로 비경구로 투여할 수 있다. 국소 투여는 또한 경피 패치 또는 이온영동 장치와 같은 경피 투여의 사용을 수반할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 비경구는 피하, 정맥내, 근육내, 관절내 또는 흉골내 주사 또는 주입 기술을 포함한다. 약물의 제형화는 예를 들어, 문헌 Gennaro, AR, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. (18th ed, 1995), 및 Liberman, H. A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker Inc., New York, N.Y. (1980)에 논의되어 있다. 특정 실시형태서, 조성물은 식품 보충제일 수 있거나 조성물은 화장품일 수 있다.

[0195] 비경구 투여의 경우(피하, 안구내, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내 및 복강내 포함), 제제는 수성 또는 유성 용액일 수 있다. 수용액은 멸균 희석제, 예를 들어, 물, 식염수, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 또는 기타 합성 용매와 같은 약학적으로 허용되는 폴리올; 벤질 알코올, 메틸 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 티메로살 등과 같은 항균 및/또는 항진균제; 아스코르브산 또는 아황산수소나트륨과 같은 항산화제; 에틸렌디아민테트라아세트산과 같은 킬레이트제; 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트와 같은 완충액; 및/또는 염화나트륨, 텍스트로스 또는 폴리알코올, 예를 들어, 만니톨 또는 소르비톨과 같은 장성 조절제를 포함할 수 있다. 수용액의 pH는 염산 또는 수산화나트륨과 같은 산 또는 염기로 조절할 수 있다. 유성 용액 또는 현탁액은 참깨, 땅콩, 올리브유 또는 광유를 추가로 포함할 수 있다. 조성물은 단위 용량 또는 다회 용량 용기, 예를 들어, 밀봉된 앰플 및 바이알로 제공될 수 있고, 운반된 멸균 액체, 예를 들어 주사용수를 사용 직전 첨가하기만 하면 되는 냉동 건조(동결 건조) 상태로 저장될 수 있다. 임시 주사 용액 및 현탁액은 무균 분말, 과립, 및 정제로부터 제조될 수 있다.

[0196] 일반적으로, 아데노바이러스 조성물은 안전하고 유효한 양, 예를 들어, 바람직하지 않은 부작용을 최소화하면서 대상체에서 원하는 치료 효과를 유발할 양으로 투여된다. 다양한 실시형태에서, 본원에 기재된 아데노바이러스 조성물의 유효량은 바이러스 감염을 앓고 있는 대상체에서 바이러스 감염성을 실질적으로 감소시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 유효량은 호흡기 바이러스 감염을 치료할 수 있는 양이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 호흡기 바이러스 감염과 관련된 하나 이상의 증상을 치료할 수 있는 양이다.

[0197] 단일 투여 형태를 생산하기 위해 약학적으로 허용되는 담체와 조합될 수 있는 본원에 기재된 조성물의 양은 치료되는 숙주 및 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 각 투여 형태의 개별 용량에 함유된 제제의 단위 함량은 그 자체로 치료 유효량을 구성할 필요가 없으며, 필요한 치료 유효량은 수 회의 개별 용량 투여에 의해 도달될 수 있음을 당업자는 이해할 것이다.

[0198] 아데노바이러스 벡터의 투여량은 주로 치료되는 병태, 환자의 연령, 체중 및 건강과 같은 요인들에 따라 달라지므로 환자마다 다를 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터의 치료적으로 유효한 성인 인간 또는 수의학적 투여량은 일반적으로 약 100 μ L 내지 약 100 mL 범위의 담체에 약 1×10^6 내지 약 1×10^{15} 개 입자, 약 1×10^7 내지 1×10^{13} 개 입자, 또는 약 1×10^9 내지 1×10^{12} 개 입자의 바이러스를 함유하는 농도이다. 투여량은 동물의 크기와 투여 경로에 따라 달라진다. 예를 들어, 근육내 주사에 적합한 인간 또는 수의학적 투여량(약 80kg 동물에 대해)은 단일 부위에 대해 mL당 약 1×10^9 개 내지 약 5×10^{12} 개 입자 범위이다. 선택적으로 여러 투여 부위가 전달될 수 있다. 또 다른 예에서, 적합한 인간 또는 수의학적 투여량은 경구 제형에 대해 약 1×10^{11} 내지 약 1×10^{15} 개 입자 범위일 수 있다. 당업자는 투여 경로 및 재조합 벡터가 사용되는 치료 또는 백신 사용분야에 따라 이러한 용량을 조정할 수 있다. 이식유전자의 발현 수준, 또는 면역원의 경우 순환 항체의 수준을 모니터링하여 투여량 투여 빈도를 결정할 수 있다. 투여 빈도의 시기를 결정하기 위한 또 다른 방법은 당업자에게 쉽게 자명할 것이다.

- [0199] 선택적 방법 단계는 바이러스 벡터의 투여와 동시에 또는 투여 전, 또는 투여 후에 적절한 양의 속효성 면역 조절제를 환자에게 동시 투여하는 것을 포함한다. 선택된 면역 조절제는 본 발명의 재조합 벡터에 대한 중화 항체의 형성을 억제할 수 있거나 본 발명의 벡터의 세포용해성 T 림프구(CTL) 제거를 억제할 수 있는 제제로 정의된다. 면역 조절자는 T 헬퍼 서브세트(T_H 또는 T^H)와 B 세포 사이의 상호작용을 방해하여 중화 항체 형성을 억제할 수 있다. 대안적으로, 면역 조절제는 T_H 세포와 CTL 사이의 상호작용을 억제하여 상기 벡터의 CTL 제거 발생을 감소시킬 수 있다. 다양한 유용한 면역 조절제 및 이의 사용량은, 예를 들어, 문헌[Yang 외, J. Virol., 70(9) (Sept., 1996)]; 1996년 5월 2일 공개된 국제 특허 출원 공개 번호 WO 96/12406; 및 국제 특허 출원 번호 PCT/US96/03035에 개시되어 있으며, 이 문헌들 모두 본원에 참조로 포함된다.
- [0200] 임의의 특정 대상체에 대한 특정 치료적 유효량 수준은 치료되는 장애 및 장애의 중증도; 사용된 특정 화합물의 활성; 사용된 특정 조성; 대상체의 연령, 체중, 전반적인 건강, 성별 및 식이; 투여시간; 투여 경로; 사용된 조성물의 배출 속도; 치료 기간; 사용된 특정 화합물과 병용하여 또는 동시에 사용되는 약물; 및 의학 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 달라질 것이다(예를 들어, Koda-Kimble et al. (2004) Applied Therapeutics: The Clinical Use of Drugs, Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 0781748453; Winter (2003) Basic Clinical Pharmacokinetics, 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 0781741475; Sharqel (2004) Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics, McGraw-Hill/Appleton & Lange, ISBN 0071375503 참조). 예를 들어, 원하는 치료 효과를 달성하는데 필요한 수준보다 낮은 수준에서 조성물의 투여량을 시작하고 원하는 효과가 달성 될 때까지 투여량을 점진적으로 증가시키는 것은 당업자에게 잘 알려져 있다. 필요에 따라, 일일 유효 용량은 투여 목적을 위해 다회 용량으로 분할 될 수 있다. 결과적으로, 단회 용량 조성물은 이러한 양 또는 이러한 일일 용량을 구성하는 이의 복수개의 작은 단위를 함유할 수 있다. 그러나, 본 발명의 화합물 및 조성물의 총 일일 사용량은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 주치의에 의해 결정될 것이 이해될 것이다.
- [0201] 바이러스 조성물은 단일 이벤트로서 또는 시간 경과에 따라 치료 전반에 걸쳐 투여될 수 있다. 예를 들어, 나노 입자 조성물 중 하나 이상은 매일, 매주, 격주로 또는 매달 투여될 수 있다. 급성 병태의 치료에 있어서, 치료 시간 경과에 일반적으로 적어도 며칠이 될 것이다. 특정 병태는 치료를 며칠 내지 몇 주까지 연장시킬 수 있다. 예를 들어, 치료는 1주, 2주 또는 3주 이상 연장될 수 있다. 보다 만성 질병인 경우, 치료는 몇 주에서 몇 달 또는 1년 이상으로 연장될 수 있다.
- [0202] 본원에 기재된 방법에 따른 치료는 호흡기 바이러스에 대한 통상적인 치료 방식 이전에, 이와 동시에 또는 이후에 실시될 수 있다.
- [0203] 본 발명은 투여를 용이하게 하고 활성 제제의 안정성을 촉진하기 위해 상기 개시된 바와 같은 화합물을 포함하는 약학 조성물을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 하나의 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합되어 살아있는 대상체에게, 예를 들어, 적합한 대상체(즉, “치료를 필요로 하는 대상체” 또는 “필요로 하는 대상체”)에게 가능한 그리고 효과적으로 투여(제공)되는 약학 조성물을 생성할 수 있다. 본 발명의 양상 및 실시형태들에서, 대상체는 인간 또는 임의의 다른 동물일 수 있다.
- [0204] **방법**
- [0205] 본 발명은 필요로 하는 대상체에서 바이러스의 감염성 또는 전염을 치료, 예방 또는 감소시키는 방법을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 대상체의 세포 내에 바이러스의 내재화를 방지함으로써 또는 대상체의 세포 내에 바이러스 게놈의 내재화를 방지함으로써 바이러스 감염의 감염성을 예방 또는 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 조성물, 예를 들어, **섹션 II**에 기재된 조성물의 투여는 바이러스 표면 단백질(예를 들어, 스파이크 단백질 또는 외피 단백질)과 숙주 수용체 단백질(예를 들어, 상위 안지오텐신 전환 효소(ACE)) 간의 상호작용을 방해 또는 방지하는 면역 반응을 생성할 수 있다. 본 발명의 조성물을 바이러스 감염 위험이 있는 대상체에게 투여하는 것은 대상체의 코로나바이러스 감염 위험을 감소시킬 수 있다.
- [0206] 개시된 조성물을 대상체에게 투여하여 대상체에서 상응하는 코로나바이러스 스파이크 단백질에 대한 면역 반응을 유도할 수 있다. 특정한 예에서, 대상체는 인간이다. 면역 반응은 보호 면역 반응, 예를 들어, 상응하는 코로나바이러스에 의한 후속 감염을 억제하는 반응일 수 있다. 면역 반응의 유도는 또한 상응하는 코로나바이러스와 관련된 감염 및 질병을 치료하거나 억제하는 데 사용될 수 있다.
- [0207] 예를 들어, 코로나바이러스에 대한 노출 또는 노출 가능성 때문에 면역원의 S 단백질에 해당하는 코로나바이러스에 감염되었거나 감염이 발생할 위험이 있는 대상체가 치료를 위해 선택될 수 있다. 개시된 면역원의 투여

후, 감염 또는 코로나바이러스와 관련된 증상, 또는 둘 모두에 대해 대상체를 모니터링할 수 있다.

- [0208] 본 발명의 치료제 및 방법으로 치료하기 위한 전형적인 대상체는 인간, 뿐만 아니라 인간이 아닌 영장류 및 기타 동물을 포함한다. 본 발명의 방법에 따라 예방 또는 치료하기 위한 대상체를 식별하기 위해, 허용되는 스크리닝 방법을 사용하여 표적되는 또는 의심되는 질병 또는 병태와 관련된 위험 인자를 결정하거나, 대상체에서 기존 질병 또는 병태의 상태를 결정한다. 이러한 스크리닝 방법에는, 예를 들어, 환경적, 가족적, 직업적 및 표적 또는 의심되는 질병 또는 병태와 관련될 수 있는 기타 위험 요소를 결정하기 위한 기존 정밀 검사, 뿐만 아니라 진단 방법, 예를 들어, 다양한 ELISA 및 코로나바이러스 감염을 탐지 및/또는 특성화하는 기타 면역 분석 방법이 포함된다. 이들 및 기타 통상적인 방법으로 임상의는 본 발명의 방법 및 약학 조성물을 사용하여 치료를 필요한 환자를 선택할 수 있다. 이들 방법 및 원리에 따라, 조성물은 독립적인 예방 또는 치료 프로그램으로서, 또는 다른 치료에 대한 후속 조치, 보조 또는 병용 치료 요법으로서 본원에 개시된 내용 또는 다른 통상적인 방법에 따라 투여될 수 있다.
- [0209] 개시된 조성물의 투여는 예방 또는 치료를 위한 것일 수 있다. 예방적으로 제공되는 경우, 개시된 치료제는 임의의 증상, 예를 들어, 감염 전에 제공된다. 개시된 치료제의 예방적 투여는 임의의 후속 감염을 예방하거나 개선하는 역할을 한다. 치료적으로 제공되는 경우, 개시된 치료제는 질병 또는 감염 증상의 발병 시 또는 그 이후에, 예를 들어, 조성물 내의 S 단백질에 해당하는 코로나바이러스로 인한 감염 증상이 발생한 후 또는 코로나바이러스 감염 진단 후 제공된다. 따라서 치료제는 코로나바이러스에 대한 예상된 노출 전에는 예상되는 중증도를 약화시키기 위해, 상기 바이러스에 대한 노출 또는 의심되는 노출 후 또는 실제 감염 개시 후에는 감염 및/또는 관련 질병 증상의 지속 기간 또는 범위를 약화시키기 위해 제공될 수 있다.
- [0210] 본원에 기재된 조성물은 대상체, 바람직하게는 인간에서 코로나바이러스 S 단백질에 대한 면역 반응을 유도하거나 향상시키기에 유효한 양으로 대상체에게 제공된다. 개시된 조성물의 실제 투여량은 대상체의 질병 징후 및 특정 상태(예를 들어, 대상체의 연령, 체격, 체력, 증상 정도, 감수성 인자 등), 투여 시기 및 경로, 동시에 투여되는 다른 약물 또는 치료, 뿐만 아니라, 대상체에서 원하는 활성 또는 생물학적 반응을 유도하기 위한 조성물의 특이적인 약리학과 같은 요인들에 따라 달라질 것이다. 투여 요법은 최적의 예방 또는 치료 반응을 제공하도록 조절될 수 있다.
- [0211] 본 발명에 따른 조성물은 병용(또는 프라임-부스트) 백신접종 프로토콜 또는 병용 제제에 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 조성물 및 병용 면역화 프로토콜은 별도의 이식유전자 또는 제형을 사용하며, 이들 각각은 코로나바이러스 S 단백질에 대한 면역 반응과 같은 항바이러스 면역 반응을 유도하도록 지시된다. 항바이러스 면역 반응을 유도하는 별도의 면역원성 조성물들은 단일 면역화 단계에서 대상체에게 투여되는 다가 면역원성 조성물로 조합될 수 있거나, 또는 이들은 병용(또는 프라임-부스트) 면역화 프로토콜에서 개별적으로(1가 면역원성 조성물로) 투여될 수 있다.
- [0212] 여러 부스트가 있을 수 있으며 각 부스트는 서로 다른 개시된 이식유전자일 수 있다. 일부 예에서 부스트는 또 다른 부스트 또는 프라임과 동일한 이식유전자일 수 있다. 프라임 및 부스트는 단회 용량으로 또는 수 일, 수 주 또는 수 개월에 걸쳐 다회 용량으로, 예를 들어, 2회 용량, 3회 용량, 4회 용량, 5회 용량, 6회 용량 또는 그 이상으로 대상체에게 투여될 수 있다. 1회에서 5회(예: 1, 2, 3, 4 또는 5회의 부스트) 또는 그 이상과 같이 다회의 부스트를 제공할 수도 있다. 일련의 순차적 면역화에 서로 다른 투여량을 사용할 수 있다. 예를 들어, 1차 면역화에서 상대적으로 많은 용량을 투여한 다음 상대적으로 적은 용량의 부스트를 투여한다.
- [0213] 일부 실시형태에서, 부스트는 프라임 후 약 2주, 약 3주 내지 8주, 또는 약 4주 후, 또는 프라임 후 약 몇 개월 후에 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 부스트는 프라임 후 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 10, 약 12, 약 18, 약 24개월 후, 또는 프라임 후 이보다 긴 또는 짧은 시간 후에 투여될 수 있다. 대상체의 “면역 기억”을 향상시키기 위해 적절한 시점에 주기적인 추가 부스트를 사용할 수도 있다. 선택된 백신접종 매개변수, 예를 들어, 제형, 투여량, 투약법 등의 적합성은 대상체로부터 혈청 분취량을 취하고 면역화 프로그램 과정 동안 항체 역가를 분석함으로써 결정될 수 있다. 또한, 원하는 효과, 예를 들어, 감염의 예방 또는 질병 상태의 개선(예를 들어, 바이러스 부하의 감소)에 대해 대상체의 임상 상태를 모니터링할 수 있다. 이러한 모니터링에서 백신접종이 차선택이라고 나타난 경우, 대상체는 추가 용량의 면역원성 조성물로 부스팅될 수 있고 백신접종 매개변수는 면역 반응을 강화할 것으로 예상되는 방식으로 변형될 수 있다.
- [0214] 일부 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 단회 용량으로 투여된다.
- [0215] 본 발명의 개시된 조성물의 투여시, 대상체의 면역계는 전형적으로 조성물에 포함된 코로나바이러스 S 단백질에

특이적인 항체를 생성함으로써 조성물에 반응한다. 이러한 반응은 면역학적 유효량이 대상체에게 전달되었음을 의미한다.

- [0216] 일부 실시형태에서, 대상체의 항체 반응은 유효 투여량/면역화 프로토콜의 평가와 관련하여 결정될 것이다. 대부분의 경우 이는 대상체로부터 얻은 혈청 또는 혈장의 항체 역가를 평가하는 것으로 충분할 것이다. 부스터 접종을 할 것인지 및/또는 개체에게 투여되는 치료제의 양을 변경할 것인지에 대한 결정은 적어도 부분적으로 항체 역가 수준에 기초할 수 있다. 항체 역가 수준은, 예를 들어, 면역원에 포함된 재조합 코로나바이러스 S 단백질질을 비롯한 항원에 결합하는 혈청 내 항체의 농도를 측정하는 면역결합 분석을 기반으로 할 수 있다.
- [0217] 이 방법을 효과적이게 하기 위해 코로나바이러스 감염을 완전히 제거하거나 감소시키거나 예방할 필요는 없다. 예를 들어, 개시된 조성물 중 하나 이상을 사용한 코로나바이러스에 대한 면역 반응의 유도는 조성물 부재시 코로나바이러스 감염과 비교하여 코로나바이러스로 인한 감염을 원하는 양만큼, 예를 들어, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 심지어 적어도 100%(감염된 세포 검출을 제거 또는 저해) 만큼 감소 또는 억제할 수 있다. 추가 예에서, 코로나바이러스 복제는 본 발명의 방법에 의해 감소되거나 억제될 수 있다. 본 발명의 방법을 효과적이게 하기 위해 코로나바이러스 복제를 완전히 제거할 필요는 없다. 예를 들어, 본 발명의 조성물 중 하나 이상을 사용하여 유도된 면역 반응은 면역 반응 부재시 코로나바이러스 복제와 비교하여 상응하는 코로나바이러스 복제를, 원하는 양만큼, 예를 들어, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 심지어 적어도 100%(코로나바이러스의 복제 검출을 제거 또는 저해) 만큼 감소시킬 수 있다.
- [0218] 일부 실시형태에서, 개시된 조성물은 보조제의 투여와 동시에 대상체에게 투여된다. 다른 실시형태에서, 개시된 조성물은 보조제의 투여 후 면역 반응을 유도하기에 충분한 시간 내에 대상체에게 투여된다.
- [0219] 일부 실시형태에서, 개시된 조성물 중 하나 이상의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하면 대상체에서 중화 면역 반응이 유도된다. 중화 활성을 평가하기 위해, 대상체의 면역화 후, 적절한 시점에 대상체로부터 혈청을 수집하고, 동결하고, 중화 테스트를 위해 보관할 수 있다. 중화 활성에 대한 분석 방법은 당업자에게 공지되어 있고 본원에 추가로 기재되어 있으며, 여기에는 플라크 감소 중화(PRNT) 분석, 미세중화 분석, 유세포 측정에 기반한 분석, 단일 주기 감염 분석이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 실시형태에서, 혈청 중화 활성은 코로나바이러스 유사바이러스의 패널을 사용하여 분석될 수 있다. 예를 들어, 다수의 MERS-CoV 균주들에 대한 백신 후보들의 면역원성을 -생물학적 안전성 수준 3 시설의 필요 없이- 테스트하기 위해 SARS-CoV에 대해 이전에 개발된 것(Martin et al, Vaccine 26, 6338, 2008; Yang et al, Nature 428, 561, 2004; Naldini et al, PNAS 93, 11382, 1996; Yang et al, PNAS 102, 797, 2005)과 유사한, 위험 리포터 바이러스 중화 분석이 이전에 개발되었다(Wand 외, Nat Commun, 6:7712, 2015).
- [0220] 다른 실시형태에서, 본 발명은 호흡기 바이러스 감염의 감염성을 치료, 예방 또는 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 감염은 코로나바이러스 감염일 수 있다. 코로나바이러스는 SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV, HKU1, OC43 또는 229E일 수 있다. 코로나바이러스는 베타-코로나바이러스일 수 있다. 코로나바이러스 감염 위험이 있는 대상체는 무증상인 코로나바이러스 감염 보균자와 접촉하여 자신도 모르게 코로나바이러스 감염에 걸릴 수 있다.
- [0221] 일반적으로, 본원에 기재된 방법은 치료 유효량의 본 발명의 나노입자 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 본원에 기재된 방법은 일반적으로 이를 필요로 하는 대상체에 대해 실시된다. 대상체는 설치류, 인간, 가축, 반려동물 또는 동물일 수 있다. 한 실시형태에서, 대상체는 설치류, 예를 들어, 마우스, 랫트, 기니 피그 등 일 수 있다. 다른 실시형태에서, 대상체는 가축 동물일 수 있다. 적합한 가축 동물의 비제한적 예는 돼지, 소, 말, 염소, 양, 라마 및 알파카를 포함할 수 있다. 또 다른 실시예에서, 대상체는 반려 동물일 수 있다. 반려 동물의 비제한적인 예는 개, 고양이, 토끼 및 새와 같은 애완동물을 포함할 수 있다. 또 다른 실시예에서, 대상체는 동물원 동물일 수 있다. 본 명세서에 사용되는 “동물원 동물”은 동물원에서 발견될 수 있는 동물을 지칭한다. 이러한 동물에는 인간이 아닌 영장류, 큰 고양이, 늑대 및 곰이 포함될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 대상체는 인간이다.
- [0222] **키트**
- [0223] 키트도 제공된다. 이러한 키트는 본원에 기재된 제제 또는 조성물, 및 특정 실시형태에서 투여 지침서를 포함할 수 있다. 이러한 키트는 본원에 설명된 방법들의 실시를 용이하게 할 수 있다. 키트로 제공되는 경우, 조성물의

서로 다른 성분들은 별도의 용기에 포장되고 사용 직전에 혼합될 수 있다. 성분들은 본원에 기재된 나노입자 조성물을 포함하는 조성물 및 약학적 제형을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 상기 성분들의 이러한 개별 포장의 필요에 따라 상기 조성물을 함유하는 하나 이상의 단위 투여 형태를 함유할 수 있는 팩 또는 디스펜서 장치로 제공될 수 있다. 팩은, 예를 들어, 블리스터 팩과 같은 금속 또는 플라스틱 호일을 포함할 수 있다. 상기 성분들의 이러한 개별 포장은 또한 특정 경우에 구성성분들의 활성을 잃지 않고 장기 보관을 가능하게 할 수 있다.

[0224] 키트는 또한 개별 포장된 동결건조된 활성 성분에 추가될, 시약, 예를 들어, 멸균수 또는 식염수를 별도의 용기에 포함할 수 있다. 예를 들어, 밀봉된 유리 앰플은 동결건조된 성분을 함유할 수 있으며 별도의 앰플, 멸균수, 멸균 식염수 또는 질소와 같은 중성의 비반응 기체 하에 각각 포장되어 있는 멸균물을 포함할 수 있다. 앰플은 적절한 재료, 예를 들어, 유리, 유기 중합체, 예를 들어, 폴리카보네이트, 폴리스티렌, 세라믹, 금속 또는 일반적으로 시약을 담는 데 사용되는 기타 재료로 구성될 수 있다. 적합한 용기의 다른 예로는 앰플과 유사한 물질로 제작될 수 있는 병, 그리고 호일 라이닝된 내부, 예를 들어, 알루미늄 또는 합금으로 구성될 수 있는 외피가 포함된다. 다른 용기에는 시험관, 바이얼, 플라스크, 병, 주사기 등이 포함된다. 용기에는 멸균 액세스 포트, 예를 들어, 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개가 있는 병이 있을 수 있다. 다른 용기들에는 두 개의 구획들이 있을 수 있는데, 이들은 쉽게 제거할 수 있는 막으로 분리되어 있고 막을 제거 시 구성 요소가 혼합될 수 있다. 제거가능한 막은 유리, 플라스틱, 고무 등일 수 있다.

[0225] 특정 실시형태에서, 키트는 지침 자료와 함께 제공될 수 있다. 지침서는 종이 또는 기타 기질에 인쇄될 수 있고/있거나 플로피 디스크, 미니 CD-ROM, CD-ROM, DVD-ROM, Zip 디스크, 비디오 테이프, 오디오 테이프 등과 같은 전자 판독 가능 매체로 제공될 수 있다. 세부 지침은 키트와 물리적으로 결합되지 않을 수 있다; 대신 사용자는 키트 제조업체 또는 배포자가 지정한 인터넷 웹 사이트를 안내받을 수 있다.

[0226] 분자 생물학 프로토콜을 이용하는 본원에 기재된 조성물 및 방법은 당업계에 공지된 다양한 표준 기술에 따를 수 있다(예를 들어, Sambrook and Russel (2006) Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN-10: 0879697717; Ausubel et al. (2002) Short Protocols in Molecular Biology, 5th ed., Current Protocols, ISBN-10: 0471250929; Sambrook and Russel (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN-10: 0879695773; Elhai, J. and Wolk, C. P. 1988. Methods in Enzymology 167, 747-754; Studier (2005) Protein Expr Purif. 41(1), 207-234; Gellissen, ed. (2005) Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems, Wiley-VCH, ISBN-10: 3527310363; Baneyx (2004) Protein Expression Technologies, Taylor & Francis, ISBN-10: 0954523253 참조).

[0227] 본원에 개시된 특정 실시형태들은 “포함하는(comprising)” 이 아니라 “구성되는(consisting of)” 또는 “본질적으로 구성되는(consisting essential of)” 이라는 표현을 사용하여 청구범위에서 추가로 제한될 수 있다. 출원되었는지 또는 보정으로 추가되었는지 여부에 관계없이 청구항에서 사용될 때 “구성되는”이라는 전환 용어는 청구항에 명시되지 않은 요소, 단계 또는 성분을 제외시킨다. 전환 용어 “본질적으로 구성된”은 청구 범위를 명시된 재료 또는 단계 그리고 기본적인 그리고 새로운 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 재료 또는 단계들로 제한한다. 이렇게 청구된 본 발명의 실시형태들이 본원에서 본질적으로 또는 명시적으로 설명되어 있으며 가능한 것이다.

[0228] 본 발명의 범위를 벗어나지 않고 전술한 물질 및 방법에 다양한 변경이 이루어질 수 있으므로, 전술한 설명 및 하기 제시된 실시예에 포함된 모든 내용들은 설명을 위한 것으로 해석되어야 하며 제한적인 의미로 해석되어서는 안된다.

[0229] **실시예**

[0230] 하기 실시예들은 본 발명의 다양한 실시형태들을 증명하기 위하여 포함된다. 하기 실시예에 개시된 기술들은 본 발명의 실시에서 잘 기능하도록 발명자에 의해 발견된 기술들을 나타내므로, 그 실시예 바람직한 방식을 구성하는 것으로 고려될 수 있음은 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 자명하다. 그러나 해당 분야의 숙련된 기술자는, 본 출원의 개시내용에 비추어, 개시된 특정 실시형태들에 많은 변화들을 줄 수 있으며 여전히 본 발명의 사상 및 범위에서 벗어나지 않는 가능성 있는 또는 유사한 결과를 얻을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0231] **실시예 1: 인간 ACE2 수용체를 발현하는 마우스의 SARS-CoV-2 감염 및 폐렴을 예방하는 단위 용량 칩펜지 아데노바이러스 벡터 백신**

[0232] 본 실시예는 S2 소단위에 두 개의 프롤린 치환을 도입한 후 융합전 안정화된 스파이크(S) 단백질을 인코딩하는 침팬지 Ad(유인원 AdV-36) 기반 SARS-CoV-2 백신(ChAd-SARS-CoV-2-S)을 제공한다. ChAd-SARS-CoV-2-S의 근육내 투여는 S 단백질에 대한 강력한 전신적 체액 및 세포 매개 면역 반응을 유도했다. 1 또는 2회 백신 투약은 인간 ACE2(hACE2) 수용체를 일시적으로 발현하는 마우스의 SARS-CoV-2 공격접종 후 폐 감염, 염증 및 병리학에 대해 보호를 제공하였다. 혈청에서 높은 수준의 중화 항체가 유도되었음에도 불구하고 상당한 수준의 바이러스 RNA가 여전히 폐에서 검출되었기 때문에 어떠한 투약법도 SARS-CoV-2 감염에 대해 완전히 보호하지 못했다. 이에 비해 단회 용량의 ChAd-SARS-CoV-2-S를 비강 경로로 투여했을 때, 높은 수준의 중화 항체와 항-SARS-CoV-2 IgA, 및 상기도 및 하기도 모두의 감염에 대한 완전한 보호가 검출되었다. 또한 대조군 ChAd 백신과 달리 SARS-CoV-2 공격접종 후 8일차에 비강 전달을 통해 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화된 동물에서는 SARS-CoV-2 NP 단백질에 대한 혈청 항체 반응이 없었다. 따라서 ChAd-SARS-CoV-2-S는 접종 부위에 살균 면역을 부여하여 바이러스로 인한 질병과 전염을 모두 예방할 수 있는 잠재력이 있다.

[0233] 결과

[0234] 침팬지 Ad-백터 백신은 항-SARS-CoV-2에 대한 강력한 항체 반응을 유도한다: 유인원 Ad-36 바이러스를 기반으로 하는 2개의 복제 불능 ChAd 백터가 제작되었다. ChAd-SARS-CoV-2-S 백터는 엑토도메인, 막형단 도메인 및 세포질 도메인(GenBank: QJQ84760.1)을 포함하는 이식유전자로서 SARS-CoV-2 S 단백질의 전장 서열을 인코딩하고 잔기 K986 및 V987에서 2개의 프롤린 치환에 의한 융합전 형태로 안정화된다. ChAd-대조군에는 이식유전자가 없다. S 단백질 이식유전자는 거대세포바이러스 프로모터에 의해 전사적으로 조절된다. 백터를 복제 불능으로 만들고 패키징 능력을 향상시키기 위해, 각각 E1A/B 유전자를 대체하고 E3B 유전자의 결실을 도입하였다(도 1A). S 단백질이 발현되고 항원적으로 손상되지 않았음을 확인하기 위해, 293T 세포들을 형질도입하고 S 단백질에 대한 22개의 중화 단클론 항체들의 패널의 결합을 유세포 측정법으로 확인했다(도 1B).

[0235] ChAd-SARS-CoV-2-S의 면역원성을 평가하기 위해, 4주령 BALB/c 마우스 그룹을 10^{10} 개의 ChAd-SARS-CoV-2-S 또는 ChAd-대조군 바이러스 입자로 근육내 접종하여 면역화했다. 일부 마우스들은 4주 후에 부스터를 접종받았다. 1차 또는 부스터 면역화 후 21일차에 혈청 샘플을 수집하고(도 1C), 정제된 S 및 RBD 단백질에 대한 IgG 반응을 ELISA로 평가하였다. ChAd-SARS-CoV-2-S는 높은 수준의 S- 및 RBD-특이적 IgG를 유도한 반면, ChAd-대조군-면역 마우스에서는 임의의 수준이 검출된 경우 낮은 수준이었다(도 1D 및 도 2A). 혈청 샘플을 초점 감소 중화 테스트(FRNT)를 사용하여 감염성 SARS-CoV-2의 중화에 대해 시험관내 분석하였다. 예상대로 ChAd-대조군 면역화된 마우스의 혈청은 1차 면역화 또는 부스터 후 SARS-CoV-2 감염을 억제하지 못했다. 대조적으로, ChAd-SARS-CoV-2-S 백신접종 동물들의 혈청은 SARS-CoV-2 감염을 강력하게 중화시켰고, 부스터는 이 억제 활성을 강화시켰다(도 1E 및 도 2B-2C).

[0236] 백신-유도된 기억 CD8+ T 세포 및 항원 특이적 B 세포 반응: 최적의 백신 면역은 체액 반응과 세포 반응으로 구성되는 경우가 많기 때문에, 백신접종 후 SARS-CoV-2 특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포 수준을 측정했다. 4주령 BALB/c 마우스를 ChAd-SARS-CoV-2-S 또는 ChAd-대조군으로 면역화하고 3주 후에 부스터했다. 백신-유도된 SARS-CoV-2 특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응을 평가하기 위해, 부스터 1주일 후 비장 세포를 채취하고 253개의 증착된 15량체 S 펩티드들의 풀로 생체외 자극했다. 이어서, 세포내 IFN γ 및 그랜자임 B 발현을 유세포 측정법으로 결정하여 정량하였다. 생체 외에서 펩티드 재자극 후, 비장 CD8+ T 세포는 IFN γ 를 발현했고, 비장 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 모두 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화된 마우스에서 그랜자임 B를 발현했지만 ChAd-대조군 백터는 발현하지 않았다(도 1F-1G 및 도 3). 항원 특이적 B 세포 반응을 평가하기 위해, 비장 세포를 채취하고 S 단백질로 ELISPOT 분석을 실시했다. ChAd-SARS-CoV-2-S 백신은 비장에서 S 단백질 특이적 IgG 항체 분비 세포를 유도한 반면 대조군 백신은 그렇지 않았다(도 1H).

[0237] ChAd-SARS-CoV-2-S 백신을 사용한 근육내 면역화는 SARS-CoV-2 감염으로부터 폐를 보호한다: 최근에 개발된 SARS-CoV-2 감염 모델(백터화 인간 Ad(Hu-Ad5-hACE2)의 비강내 전달 후 BALB/c 마우스가 폐에서 hACE2를 발현함)에서 ChAd 백신의 보호 활성을 테스트했다. 내인성 마우스 ACE2는 바이러스 진입을 지원하지 않으며 이 시스템은 마우스 폐에서 생산적인 SARS-CoV-2 감염을 가능하게 한다. 4주령 BALB/c 마우스는 먼저 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신으로 근육내 경로를 통해 면역화되었다. 대략 30일 후, 마우스에게 10^8 개 플라크 형성 단위(PFU)의 Hu-Ad5-hACE2 및 항-Ifnar1 단클론 항체(mAb)를 각각 비강 및 복강 내 경로를 통해 투여했다. 이 모델에서 폐 병인을 강화시키기 위해 단회 용량의 항-Ifnar1 mAb도 투여되었다. ChAd와 Hu-Ad5 백터 사이에 교차 면역이 없음을 확인하였다. ChAd-면역화된 마우스로부터의 혈청은 Hu-Ad5 감염을 중화시키지 않았다(도 4A-4B).

- [0238] Hu-Ad5-hACE2 형질도입 후 5일차에, 마우스를 4×10^5 개 초점 형성 단위(FFU)의 SARS-CoV-2로 비강내 경로를 통해 공격접종하였다(도 2A). 감염 후 4일차(dpi)에, 이 모델에서 최고 바이러스량에서 마우스를 안락사시키고, 바이러스량 및 사이토카인 분석을 위해 폐, 비장 및 심장을 채취했다. 특히, 플라크 분석에 의해 결정된 바와 같이 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화된 마우스의 폐에서 검출가능한 감염성 바이러스가 없었던 반면, ChAd-대조군으로 백신접종된 마우스에서는 높은 수준으로 존재하였다(도 5B). 이 결과와 일치하게, ChAd-대조군 백신을 투여받은 마우스에 비해 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신접종된 동물의 폐, 심장 및 비장에서 바이러스 RNA 수준 감소가 관찰되었다(도 5C). 4dpi에서 채취한 폐의 바이러스 RNA에 대한 인시튜 혼성화 염색 결과 ChAd-대조군과 비교하여 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화된 동물의 폐포세포에서 SARS-CoV-2 RNA의 상당한 감소가 나타났다(도 5D). 면역화된 동물의 하위집합을 8dpi에서 안락사시키고 평가를 위해 조직을 채취하였다. 이 시점에서 바이러스 RNA 수준 또한 대조군 ChAd 백신과 비교하여 ChAd-SARS-CoV-2-S 면역화된 마우스의 폐와 비장에서 낮거나 존재하지 않았다(도 5C). 종합적으로, 이들 데이터는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 이용한 단일 근육내 면역화는 공격접종된 마우스의 폐에서 SARS-CoV-2 감염을 현저하게 감소시켰지만 완전히 제거하지는 않았음을 나타낸다.
- [0239] 다음으로 폐 염증 및 질병에 대한 백신의 효과를 평가했다. *CXCL10*, *IL1*, *IL-6*, *CCL5*, *IFN* 및 *IFN γ* 을 포함하는 ChAd-대조군과 비교하여 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화된 동물의 폐 조직에서 여러 전염증성 사이토카인 및 케모카인 mRNA 수준은 더 낮았다(도 5E). 또한, ChAd-대조군 백신으로 면역화되고 SARS-CoV-2로 공격접종된 마우스는 혈관 주위 및 폐포 위치에서의 면역 세포 축적, 혈관 울혈 및 간질 부종을 특징으로 하는 바이러스성 폐렴의 증거를 보여주었다. 대조적으로, ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화된 동물은 ChAd-대조군으로 면역화된 마우스에서 발생하는 폐의 염증 반응이 현저히 약화되었음을 보여주었다(도 6). 따라서 ChAd-SARS-CoV-2로 면역화하면 바이러스 감염과 그에 따른 SARS-CoV-2 감염과 관련된 폐 염증 및 손상이 모두 감소한다.
- [0240] 그런 다음 프라임 부스트 백신 요법을 사용하여 개선된 보호력을 평가했다. BALB/c 마우스는 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S로 근육내 경로를 통해 면역화되었고 4주 후에 동종의 부스터를 접종받았다. 부스팅 후 29일차에 마우스는 단회 용량의 항-*Ifnar1* 항체에 이어 Hu-Ad5-hACE2로 처치되었으며, 이어서 5일 후에 SARS-CoV-2로 공격접종되었다. 예상대로, 프라임-부스트 요법은 SARS-CoV-2 공격접종에 대하여 보호를 제공하여 폐에서 감염성 바이러스가 검출되지 않았다(도 5F). 4dpi에서 폐, 비장 및 심장에서 바이러스 RNA의 현저한 감소가 검출되었지만 바이러스 RNA의 잔류 수준이 여전히 존재하였는데, 이는 부스팅 후에도 보호가 완전하지 않았음을 시사한다(도 5g).
- [0241] ChAd-SARS-CoV-2-S를 사용한 단일 비강내 면역화는 SARS-CoV-2에 대한 살균 면역을 유도한다: 비인두 경로를 통한 점막 면역화는 호흡기 병원체의 접종 부위에서 또는 그 근처에서 보호를 제공하는 분비성 IgA 항체를 비롯한 국소 면역 반응을 유도할 수 있다. 점막 백신접종의 면역원성 및 보호 효능을 평가하기 위해, 5주령 BALB/c 마우스에 10^{10} 개의 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 바이러스 입자를 비강내 경로를 통해 접종하였다(도 7A). 체액성 면역 반응을 평가하기 위해 면역화 4주 후에 혈청 샘플을 수집하였다. ChAd-대조군은 접종되지 않고 ChAd-SARS-CoV-2-S를 비강내 면역화 하였을 때 혈청에서 높은 수준의 S- 및 RBD-특이적 IgG 및 IgA(도 7B-7C) 및 SARS-CoV-2 중화 항체(기하 평균 역가 1/1,574)가 유도되었다(도 7D 및 도 8A). ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화된 마우스의 혈청 항체는 S 단백질에서 D614G 돌연변이를 인코딩하는 SARS-CoV-2의 재조합 루시페라제 발현 변이체를 동일하게 중화시켰다(도 8B); 이러한 발견은, 많은 순환 바이러스가 이러한 치환을 포함하고, 이는 세포 배양에서 더 큰 감염성과 관련되기 때문에 중요하다(doi.org/10.1101/2020.06.12.148726). 면역화된 마우스의 기관지폐포 세척액(BAL)에서 SARS-CoV-2 특이적 항체 반응도 평가하였다. ChAd-대조군은 접종하지 않고 ChAd-SARS-CoV-2-S를 백신접종한 마우스로부터 얻은 BAL 유체는 중화 활성을 가진 것들을 비롯하여(도 7G 및 도 8C) 높은 수준의 S- 및 RBD-특이적 IgG 및 IgA 항체(도 7E-7F)를 보여주었다.
- [0242] 점막 면역화를 통해 활성화된 T 세포 반응을 평가하기 위해 마우스에게 비강 내 경로를 통해 ChAd-SARS-CoV-2-S 또는 ChAd-대조군을 백신접종하고 4주 후에 유사하게 부스팅했다. 부스팅 1주 후 폐를 채취하고 T 세포를 유세포 측정법으로 분석했다. S 펩티드 풀을 사용한 생체외 재자극은 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신을 투여받은 마우스의 폐에서 IFN γ 및 그랜자임 B 생산 CD8⁺ T 세포를 현저하게 증가시켰다(도 7H). 구체적으로, 폐에서 IFN- γ 를 분비하는, 항원-특이적 CD103⁺CD69⁺CD8⁺ T 세포 집단이 확인되었고(도 7I), 이는 백신-유도된 상주 기억 T 세포와 표현형적으로 일치한다. 비장에서 ChAd-SARS-CoV-2-S로 비강내 면역화한 후 S 단백질에 대한 IgA 또는 IgG를 생성하는 항체 분비 형질 세포가 검출되었다(도 7J). 중요한 것은, IgG보다 항-S IgA를 분비하는 B 세포가 ~5배 더 높은 빈도로 관찰되었다는 것이다.

[0243] 단회 용량의 비강내 면역화 후 ChAd 백신의 보호 효능을 평가하였다. 백신접종 후 30일차에 마우스에게 10^8 PFU의 Hu-Ad5-hACE2 및 항-Ifnar1 mAb를 상기 기재된 바와 같이 투여하였다. 5일 후, 마우스에게 4×10^5 FFU의 SARS-CoV-2를 공격접종했다. 4dpi 및 8dpi에서 폐, 비장, 심장, 비갑개 및 비강 세척액을 채취하고 바이러스량을 평가했다. ChAd-SARS-CoV-2-S 백신의 비강내 전달은 폐에 감염성 바이러스가 없고(도 9A) 폐, 비장, 심장, 비갑개, 또는 비강 세척액에 측정가능한 바이러스 RNA가 거의 없는 것으로(도 9B) 판단하여 볼 때 현저한 보호 효능을 입증했다. 4 dpi에서 폐 및 비갑개에서의 매우 낮은 바이러스 RNA 수준은, 이 시점에서 hACE2 수용체 발현이 없는 C57BL/6 마우스에서 유사한 수준이 측정되었기 때문에, 유입된, 비복제 바이러스를 나타낼 가능성이 높다. 폐 균질물 내 사이토카인 및 케모카인 mRNA 수준 또한 ChAd-대조군 백신보다 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화된 마우스에서 실질적으로 더 낮았으며(도 9C), 인간 Ad 벡터 hACE2 전달 시스템으로 인한 잔류 발현 가능성이 있다. 마지막으로, 비강내 경로를 통해 ChAd-SARS-CoV-2-S를 백신접종하고 SARS-CoV-2를 공격접종한 동물의 폐 조직에 대한 조직병리학적 분석은, ChAd-대조군 백신접종 동물에서 관찰된 광범위한 염증에 비해 8dpi에서 (존재하는 경우) 최소한의 혈관주위 및 폐포 침윤물을 보여주었다(도 9D).

[0244] ChAd-SARS-CoV-2-S의 비강 내 전달로 살균 면역이 달성되었는지 확인하기 위해 항-NP 항체를 8dpi에서 측정하고 SARS-CoV-2 감염 5일 전의 반응과 비교했다. 백신 벡터에는 NP 유전자가 없기 때문에 SARS-CoV-2 노출 후 NP에 대한 체액성 면역 반응 유도는 바이러스 단백질 번역 및 활성 감염을 시사하는 것이다. SARS-CoV-2 공격접종 후, 비강내 경로로 백신접종된 ChAd-대조군 마우스 또는 근육내 경로로 백신접종된 ChAd-대조군 및 ChAd-SARS-CoV-2-S 마우스에서 항-NP 항체 반응이 검출되었다(도 9E 및 도 2D). 놀랍게도, 비강내 경로를 통해 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화된 마우스는 SARS-CoV-2 감염 후 항-NP 항체 반응이 크게 증가하지 않았다. 우리의 바이러스 분석과 종합하여 이들 데이터는 ChAd-SARS-CoV-2-S의 단일 비강내 면역화가 강력하고 가능성이 있는 살균 점막 면역을 유도하여, hACE2 수용체를 발현하는 마우스의 상기도 및 하기도에서 SARS-CoV-2 감염을 예방함을 시사한다.

[0245] 논의

[0246] 본 실시예에서는 SARS-CoV-2에 대한 백신 플랫폼으로서 복제 불능 ChAd 벡터의 근육내 및 비강내 투여를 평가하였다. 근육내 경로를 통한 안정화된 S 단백질 기반 백신의 단회 용량 면역화는 중화 항체 뿐만 아니라 S 및 RBD 특이적 결합을 유도했다. 1회 또는 2회 용량의 백신접종은 SARS-CoV-2 공격접종에 대해 인간 ACE2를 발현하는 마우스를 보호하였는데, 이는 폐에 감염성 바이러스가 없고 폐 및 기타 장기들에서 바이러스 RNA 수준이 상당히 감소한 것으로 입증되었다. ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화된 마우스는 대조군 ChAd 백신에 비해 폐 병리, 폐 염증 및 폐렴의 증거가 현저히 감소되었거나 그렇지 않으면 없음을 보여주었다. 그러나 ChAd-SARS-CoV-2-S의 근육내 백신접종은 살균 면역을 제공하지 않았으며, 이는 폐를 포함한 여러 조직에서의 검출가능한 바이러스 RNA 수준 및 항-NP 항체 반응 유도로 입증되었다. 비강내 경로를 통해 단회 용량의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화된 마우스도 SARS-CoV-2 공격접종으로부터 보호되었다. 그러나 비강내 백신접종은 상기도 및 하기도 SARS-CoV-2 감염을 모두 예방하고 야생형 및 D614G 변이체 바이러스의 감염을 억제하는 강력한 IgA 및 중화 항체 반응을 생성했다. 상기도 조직의 바이러스 RNA가 매우 낮고 공격접종 상황에서 NP에 대한 혈청학적 반응이 없다는 점은 ChAd-SARS-CoV-2-S를 비강내 단회 용량으로 투여받은 대부분의 동물이 살균 면역을 달성했음을 강력하게 시사한다.

[0247] 대유행을 통제하기 위해 신속히 노력하여 여러 백신 후보(예: 지질 캡슐화 mRNA, DNA, 불활성화 및 바이러스 벡터화)에 대한 인간 임상 시험을 빠르게 진행시켰으나 전임상 모델에서 효능을 입증한 연구는 거의 없었다. 전장 SARS-CoV-2 S 단백질을 인코딩하는 DNA 플라스미드 백신을 2회 또는 3회 접종하여 붉은 털 원숭이를 면역화했을 때 혈청에서 중화 항체가 유도되었고 BAL 및 비강 점막액에서 바이러스량이 감소하였다. 또한, 정제되고 비활성화된 SARS-CoV-2 유도 중화 항체로 2주 동안 3회 면역화하였으며 이는 투여 용량에 따라 붉은털원숭이에서 감염 및 바이러스성 폐렴에 대해 부분적인 또는 완전한 보호를 제공했다. 이러한 공격접종 모델의 한 가지 한계는 일부 인간 및 기타 비인간 영장류 중에 비해 붉은털 원숭이는 SARS-CoV-2 감염 후 경미한 간질성 폐렴이 발생한다는 것이다. hACE2-발현 마우스에서 본 실시예는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신의 근육내 또는 비강내 단회 용량이 바이러스 복제, 염증 및 폐 질병에 대해 실질적이고 가능하게는 완전한 보호를 제공한다는 것을 보여주었다.

[0248] 본 발명은 SARS-CoV-2를 포함하는 신종 RNA 바이러스에 대한 비인간 Ad-벡터화된 백신의 사용을 뒷받침한다. 이전 연구에서는 임신 상황을 포함하여 여러 마우스 공격접종 모델에서 Zika 바이러스(ZIKV)의 prM-E 유전자를 인코딩하는 고티라 Ad의 단회 용량 또는 2회 용량 투약법의 효능을 보여주었다. 다른 사람들은 ZIKV에 대한 ChAd 또는 붉은 털 원숭이 Ad 백신 후보를 평가했으며 마우스 및 비인간 영장류에서 효능을 보여주었다. 야생형 SARS-CoV-2 S 단백질(ChAdOx1)을 인코딩하는 다른 ChAd가 현재 인간을 대상으로 임상 시험 중이다

(NCT04324606). 인간 실험의 데이터는 아직 보고되지 않았지만, 붉은 털 원숭이에 대한 연구에 따르면 근육 내 단회 용량은 폐의 감염은 보호하지만 상기도 감염은 보호하지 않는다 (biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.13.093195v1). SARS-CoV-2에 대해 평가된 백신 중 어느 것도 전임상 또는 임상 연구에서 면역 강화의 증거를 보여주지 않았으며, 이는 다른 인간 및 동물 코로나바이러스에 대한 연구에 기초하여 볼 때 이론적 위험이었다. 실제로 SARS-CoV 백신 또는 항체 데이터와 달리 ChAd 인코딩 SARS-CoV-2 S 단백질로 면역화되거나 수동적으로 전달된 단클론 항체를 투여한 동물에서 감염, 면역병리학 또는 질병의 향상은 관찰되지 않았다.

[0249] ChAd-SARS-CoV-2-S는 생체의 S 단백질펩티드 재자극 후 높은 백분율과 수의 IFN γ 및 그랜자임 발현 세포를 비롯한 SARS-CoV-2 특이적 CD8 $^{+}$ T 세포 반응을 유도하였다. ChAd-SARS-CoV-2-S 백신에 의한 강력한 CD8 $^{+}$ T 세포 반응의 유도는 다른 유인원 Ad 벡터에 대한 보고와 일치한다. ChAd 백신 벡터는 인간 아데노바이러스에 대한 기존 면역 문제를 극복할 뿐만 아니라 고갈된 T 세포 반응을 유도하지 않기 때문에 면역학적 이점도 있다.

[0250] ChAd-SARS-CoV-2-S의 비강내 단회 용량은 SARS-CoV-2 공격접종에 대해 동일한 백신 및 용량의 1 또는 2회 근육 내 면역화보다 더 많은 우수한 면역성을 제공했다. 혈청 중화 항체 반응이 비슷하다는 점을 감안할 때, 비강 전달 후 보호가 더 많이 관찰된 것은 생성된 점막 면역 반응 때문이라는 가설이 세워진다. 실제로 혈청과 폐에서 높은 수준의 항-SARS-CoV-2 IgA가 검출되었고 비강에서 IgA를 분비하는 B 세포가 검출되었다. 또한, 비강내 백신접종은 CD103 $^{+}$ CD69 $^{+}$ 세포를 비롯하여 폐에서 SARS-CoV-2 특이적 CD8 $^{+}$ T 세포를 유도했으며, 이는 상주 기억 표현형일 가능성이 있다. 우리가 아는 한, 현재 임상 시험 중인 SARS-CoV-2 백신 플랫폼 중 어느 것도 비강 전달 방식을 사용하지 않는다. 인플루엔자 A 바이러스 백신의 국소 체액성 및 세포성 면역 반응을 유도하는 능력 때문에 비강내 전달을 사용하는 것에 큰 관심이 있어 왔다. 실제로, 인플루엔자 A 바이러스 재감염에 대한 살균 면역은 근육내 접종이 아닌 비강내 접종에 의해 최적으로 유도되는 폐의 국소 적응 면역 반응을 필요로 한다. 비강 내 경로를 통해 약독화된 생 바이러스 백신을 투여하는 것에 대한 우려가 있지만, 소단위에 기반한 또는 복제 불능 벡터의 백신은 특히 제형의 발전을 고려할 때 더 안전한 방식으로 점막 면역을 생성할 수 있는 가능성이 있다.

[0251] 요약하면, 본 실시예는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 이용한 면역화가 중화 항체 및 항원 특이적 CD8 $^{+}$ T 세포 반응 모두를 유도한다는 것을 입증했다. ChAd-SARS-CoV-2-S의 근육내 단일 면역화는 SARS-CoV-2 감염 및 폐의 염증에 대한 보호를 제공하는 반면, ChAd-SARS-CoV-2-S의 비강내 전달은 적어도 일시적으로 hACE2 수용체를 발현하는 마우스에서 점막 면역을 유도하고 우수한 보호를 제공하며, 살균 면역을 촉진시킬 가능성이 있다. 따라서, 본 실시예는 SARS-CoV-2 감염, 질병 및 전염을 제어하기 위한 플랫폼으로서 ChAd-SARS-CoV-2-S의 비강내 전달을 뒷받침한다.

[0252] **방법**

[0253] *바이러스 및 세포*: Vero E6(CRL-1586, 미국 미생물 기탁소(ATCC), Vero CCL81(ATCC) 및 HEK293 세포를 10% 태아 소 혈청(FBS), 10 mM HEPES pH 7.3, 1mM 피루브산나트륨, 1X 비필수 아미노산 및 100U/ml의 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 Dulbecco's Modified Eagle 배지(DMEM)에서 37°C에서 배양했다.

[0254] SARS-CoV-2 변이체 2019 n-CoV/USA_WA1/2020은 질병 통제 예방 센터에서 입수했다(Natalie Thornburg 기증). 바이러스는 Vero CCL81 세포에서 한 번 계대되었고 Vero E6 세포에서 초점-형성 분석(FFA)으로 적정되었다. 재조합 루시퍼라제-발현 전장 SARS-CoV-2 리포터 바이러스(2019 n-CoV/USA_WA1/2020 균주)는 이전에 보고되었으며(Zost 등, 2020), D614G 변이체는 다른 곳에서 설명될 것이다. 감염성 SARS-CoV-2에 대한 모든 작업은 적절한 양압 공기 호흡기 및 보호 장비를 사용하여 BSL3 및 A-BSL3 시설을 승인한 기관 생물안전 위원회에서 실시되었다.

[0255] *마우스 실험*: 동물 연구는 국립 보건원의 실험실 동물 관리 및 사용에 대한 지침의 권장 사항에 따라 실시되었다. 이 프로토콜은 워싱턴 대학교 약대의 기관 동물 관리 및 사용 위원회의 승인(보증 번호 A3381-01)을 받았다. 바이러스 접종은 케타민 하이드로클로라이드와 자일라진으로 유도되어 유지되는 마취하에 실시되었으며 동물의 고통을 최소화하기 위해 모든 노력을 기울였다.

[0256] 암컷 BALB/c 마우스는 The Jackson Laboratory(카탈로그 000651)에서 구입했다. 생후 4 내지 5주령 동물들을 50 μ l PBS에 녹인 10 ^{10} 개의 ChAdV-empty 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 바이러스 입자(vp)로 뒷다리 근육 내 주사 또는 비강 내 접종으로 면역화했다. 1차 면역화에 사용된 동일한 경로를 사용하여 1차 면역화 후 4주 후에 면역화

된 동물의 부분집합들을 부스팅하였다. 10^8 PFU의 Hu-AdV5-hACE2를 비강내 투여하기 하루 전에 백신접종된 마우스(10 내지 11주령)에 항-Ifnar1 mAb(MAR1-5A3, Leinco) 2 mg을 단일 복강내 주사하였다. Hu-AdV5 형질도입 5일 후, 마우스에 비강 경로를 통해 4×10^5 FFU의 SARS-CoV-2를 접종했다. 동물을 4 또는 8 dpi에 안락사시키고, 바이러스학적, 면역학적 및 병리학적 분석을 위해 조직을 채취했다.

[0257]

침팬지 아데노바이러스 벡터의 제작: 유인원 Ad36 벡터(ChAd)는 펜실베이니아 대학의 Penn Vector Core에서 얻었다. ChAd 게놈을 E1 및 E3B 영역(GenBank: FJ025917.1; 각각 뉴클레오타이드 455-3026 및 30072-31869)에서 결실시켜 조작하였다. E1 유전자 대신 변형된 인간 거대분자바이러스 주요 극초기 프로모터 서열이 상보적 DNA 가닥에서 시계 반대 방향으로 통합되었다. CMV 변형에는 TATA 박스와 mRNA 시작(GenBank: MN920393, 뉴클레오타이드 174211-174212) 사이에 탠덤(5'-TCT CTA TCA CTG ATA GGG AGA TCT CTA TCA CTG ATA GG GA-3')(서열번호 7)으로 삽입된 tet 작동자 2(TetO2) 서열의 2개 사본이 추가되어 포함되었다. SARS-CoV-2 S(S의 융합전 형태를 안정화시키는, 잔기 K986 및 V987에 2개의 프롤린 치환이 있는 융합전 안정화 돌연변이체를 인코딩함)를 pSAd36 게놈 플라스미드의 CMV-tetO2 프로모터 제어 하에 고유한 *PmeI* 부위에 클로닝하여 pSAd36-S를 생성했다. 동시에, 도입유전자가 없는 빈 CMV-tetO2 카세트를 포함하는 pSAd36-대조군도 생성되었다. pSAd36-S 및 pSAd-대조군 플라스미드를 PacI 제한 효소로 선형화하여 바이러스 게놈을 T-Rex 293-HEK 세포(Invitrogen)에 형질감염시키기 위해 유리시켰다. 구조된 복제 불능 ChAd-SARS-CoV-2-S 및 ChAd-대조군 벡터를 293 세포들에서 확장시키고 CsCl 밀도 구배 초원심분리에 의해 정제했다. 각 벡터 제제에서 바이러스 입자 농도는 260nm에서 분광광도계로 결정되었다.

[0258]

인간 ACE2를 발현하는 인간 아데노바이러스 벡터의 제작: 코돈-최적화된 hACE2 서열들을 셔틀 벡터(pShuttle-CMV, Addgene 240007)에 클로닝하여 pShuttle-hACE2를 생성하였다. pShuttle-hACE2를 *PmeI*로 선형화한 후 HuAdv5 벡본 플라스미드(pAdEasy-1 벡터; Addgene 240005)와 함께 대장균 균주 BJ5183에 공동 형질전환시켜 동종 재조합에 의해 pAdV5-ACE2를 생성하였다. HuAdv5 게놈을 포함하는 pAdEasy-1 플라스미드는 E1 및 E3 유전자에서 결실을 갖는다. hACE2는 거대세포바이러스 프로모터의 전사 제어 하에 있으며 SV40 폴리아데닐화 신호에 의해 3' 말단에서 연결한다. pAd-hACE2를 PacI 제한 효소로 선형화한 후, T-Rex 293 HEK 세포(Invitrogen)로 형질감염시켜, HuAdv5-hACE2를 생성하였다. 재조합 HuAdv5-hACE2가 293-HEK 세포에서 생산되었고 CsCl 밀도 구배 초원심분리에 의해 정제되었다. 바이러스 역가는 293-HEK 세포에서 플라크 분석에 의해 결정되었다.

[0259]

인시튜 RNA 혼성화 및 조직학: RNA 인시튜 혼성화는 제조업체의 지침에 따라 RNAscope 2.5 HD(Brown)(Advanced Cell Diagnostics)를 사용하여 실시되었다. 좌측 폐 조직을 부검 시 수집하고, 10% 중성 완충포르말린(NBF)으로 부풀린 후 처리 전 7일 동안 10% NBF에 함침 고정시켰다. 파라핀 포매된 폐 절편들을 60° C에서 1시간 동안 배양하여 파라핀을 제거하고 내인성 과산화효소를 실온에서 10분 동안 H_2O_2 로 퀀칭시켰다. SARS-CoV2 RNA 프로브(Advanced Cell Diagnostics 848561) 혼성화 및 신호 증폭 전에 슬라이드를 RNAscope Target Retrieval 시약에서 15분 동안 끓이고 RNAscope Protease Plus 시약에서 30분 동안 배양했다. 절편들을 Gill 헤마톡실린으로 대조염색하고 명시야 현미경으로 시각화했다. 일부 폐 절편들은 헤마톡실린 및 에오신 염색 후 조직학을 위해 가공되었다.

[0260]

SARS-CoV-2 중화 분석: 열 불활성화 혈청 샘플을 연속 희석하고 10^2 FFU의 SARS-CoV-2와 함께 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션했다. 바이러스-혈청 혼합물을 96-웰 플레이트의 Vero 세포 단일층에 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션했다. 이어서, 세포를 2% FBS가 보충된 MEM에서 1%(w/v) 메틸셀룰로오스로 오버레이하였다. 플레이트를 30시간 동안 인큐베이션한 후, 실온에서 1시간 동안 PBS 중 4% PFA를 사용하여 고정하였다. 세포를 세척한 다음 0.1%(w/v) 사포닌(Sigma) 및 0.1% BSA가 보충된 PBS에서 HRP-접합 염소 항-인간 IgG(Sigma) 및 항-SARS-CoV-2 CR3022 항체(Yuan 외, 2020)(1g/mL)와 함께 인큐베이션하였다. TrueBlue 과산화효소 기질(KPL)을 사용하여 플레이트를 현상하고 BioSpot 분석기(Cellular Technology Limited)에서 초점을 계수했다. SARS-CoV-2를 발현하는 루시퍼라제를 사용한 중화 실험을 위해, 혈청 샘플을 1:50부터 시작하여 3배 희석하고 각 재조합 바이러스(야생형 및 D614G) 85 PFU와 혼합했다. 바닥이 투명한 검은색 벽 96-웰 플레이트(Corning)에 플레이트링된 Vero E6 세포에 혈청-바이러스 혼합물을 접종하고 세포를 37° C에서 48시간 동안 배양했다. 이어서, 세포를 용해시키고 제조업체의 사양에 따라 Nano-Glo 루시퍼라제 분석 시스템(Promega)을 사용하여 루시퍼라제 활성을 측정하였다.

[0261]

Hu-AdV5 중화 분석: Hu-AdV5-hACE2 형질도입 하루 전, ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S로 근육내 면역화된 마우스로부터 혈청 샘플을 수집했다. 혈청은 37°C에서 1시간 동안 10^2 FFU의 HuAdV5와 인큐베이션하기 전에 열-

불활성화되고 연속적으로 희석되었다. 바이러스-혈청 혼합물을 96-웰 플레이트의 HEK293 세포 단일층에 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션했다. 그런 다음 세포들을 5% FBS가 보충된 MEM에서 1%(w/v) 메틸셀룰로오스로 오버레이하였다. 플레이트를 37°C에서 48시간 동안 인큐베이션한 후, 실온에서 1시간 동안 PBS 중 2% PFA로 고정시켰다. 이어서, 플레이트들을 PBS로 세척하고 투과 완충액(0.1% (w/v) 사포닌 및 0.1% BSA가 보충된 PBS)에 희석시킨 비오틴화된 항-HuAdV5-핵소 항체(2 µg/mL; Novus Biologicals NB600413)와 함께 4°C에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 플레이트를 다시 세척하고 상온에서 30분 동안 투과 완충액에서 스트렙타비딘-HRP(1:3000; Vector Laboratories SA-5004)와 함께 인큐베이션했다. 일련의 세척을 종료한 후, 플레이트를 TrueBlue 과산화효소 기질(KPL)을 사용하여 현상하고 초점들을 BioSpot 분석기(Cellular Technology Limited)에서 계수하였다.

[0262] **단백질 발현 및 정제:** 정제된 2019-nCoV/USA-WA1/2020 SARS-CoV-2 균주의 RNA를 cDNA로 역전사하여 재조합 유전자 클로닝을 위한 템플릿으로 사용했다. 전장 SARS-CoV-2 NP(NP-FL)를 헥사히스티딘 태그가 있는 pET21a에 클로닝하고 Terrific 배지(bioWORLD)에서 BL21(DE3)-RIL 대장균을 사용하여 재조합적으로 발현시켰다. 25°C에서 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노사이드(Goldbio)로 발세 유도한 후, 세포를 니켈 친화도 정제를 위해 20mM Tris-HCl pH 8.5, 1M NaCl, 5mM β-메르캅토에탄올 및 5mM 이미다졸에서 용해시켰다. 단백질을 500mM 이미다졸이 보충된 이전 완충액에서 용리시킨 후, 크기 배제 및 경우에 따라 양이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 단백질을 균질하게 정제했다. SARS-CoV-2 RBD 및 S 엑토도메인(S1/S2 퓨린 절단 부위가 끊어졌고, 이중 프롤린 돌연변이가 S2 소단위에 도입되었으며, 폴돈 삼량체화 모티프가 통합되었음)을 C-말단 헥사히스티딘 또는 옥타히스티딘 태그가 있는 pFM1.2에 클로닝하고, Expi293F 세포에 일시적으로 형질감염시키고, 전술한 바와 같이 코발트 충전 수지 크로마토그래피(G-Biosciences)로 정제하였다(Alsoussi 외, 2020).

[0263] **ELISA:** 정제된 항원(S, RBD 또는 NP)을 96-웰 Maxisorp 투명 플레이트에 50mM Na₂CO₃ pH 9.6(70 µL) 중의 2 µg/mL로 4°C에서 밤새 코팅했다. 코팅 완충액을 흡인하고 웰들을 200 µL의 1X PBS + 0.05% Tween-20 + 1% BSA + 0.02% NaN₃(차단 완충액, PBSTBA)로 37°C에서 1시간 동안 또는 4°C에서 밤새 차단했다. 열 불활성화된 혈청 샘플들을 별도의 96-웰 폴리프로필렌 플레이트에서 PBSTBA로 희석했다. 그런 다음 플레이트를 1X PBS + 0.05% Tween-20(PBST)으로 3번 세척한 후 50 µL의 각 혈청 희석액을 첨가했다. 혈청을 차단된 ELISA 플레이트에서 실온에서 적어도 1시간 동안 인큐베이션하였다. ELISA 플레이트들을 다시 PBST로 3회 세척한 다음, PBST 중 1:2000 항-마우스 IgG-HRP(Southern Biotech Cat. #1030-05) 50 µL 또는 PBSTBA(SouthernBiotech) 중 1:10000 비오틴화된 항-마우스 IgG, 항-마우스 IgM, 또는 항-마우스 IgA를 첨가하였다. 플레이트들을 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고, PBST에서 3회 세척한 다음, 스트렙타비딘-HRP(ThermoFisher)의 1:5000 희석액을 웰에 첨가하였다. 실온에서 1시간 배양 후, 플레이트를 PBST로 3회 세척하고 50 µL의 1-Step Ultra TMB-ELISA(ThermoFisher 카탈로그 번호 34028)를 첨가했다. 12 내지 15분 배양 후, 50 µL의 2M 황산으로 반응을 중단시켰다. 450 nm에서 각 웰의 흡광도를 황산 첨가 2분 이내에 관독하였다(Synergy H1). 광학 밀도(450nm) 측정 은 마이크로플레이트 관독기(Bio-Rad)를 사용하여 결정되었다.

[0264] **ELISPOT 분석:** MultiScreen-HA 필터 96-웰 플레이트(Millipore) 플레이트를 4°C에서 밤새 SARS-CoV-2 S 단백질 3 µg/mL로 예비 코팅하였다. PBST로 행군 후, 플레이트들을 배양 배지(RPMI, 10% FBS, 페니실린-스트렙토마이신, 1mM 피루브산나트륨, 0.1mM 비필수 아미노산, 10mM HEPES 및 50mM β-메르캅토에탄올)와 함께 37°C에서 4시간 동안 차단했다. 배양 배지에 있는 비장 세포의 단일 세포 현탁액을 S 단백질 코팅된 플레이트에 첨가하고 37°C 및 5% 가습 CO₂에서 4시간 동안 배양했다. PBS 및 PBST로 세척한 후, 플레이트를 비오틴화된 항-IgG 또는 항-IgA(Southern Biotech)와 함께 인큐베이션한 다음, 스트렙타비딘 접합 양고추냉이 퍼옥시다제(Jackson ImmunoResearch)와 함께 실온에서 각각 1시간 동안 인큐베이션했다. PBS로 추가로 세척한 후, 스팟 현상을 위해 3-아미노-9-에틸카바졸(Sigma) 기질 용액을 첨가했다. 물로 행구어 반응을 정지시켰다. 스팟은 Biospot 플레이트 관독기(Cellular Technology)를 사용하여 계수되었다.

[0265] **바이러스량의 측정:** SARS-CoV-2에 감염된 마우스들을 케타민과 자일라진 각테일을 사용하여 안락사시키고 장기를 수집했다. 조직의 무게를 측정하고 2% 태아 소 혈청(FBS)을 함유하는 Dulbecco Modified Eagle 배지(DMEM) 1mL에서 MAGNA Lyser(Roche)를 사용하여 비드로 균질화했다. MagMax mirVana Total RNA 단리 키트(Thermo Scientific) 및 Kingfisher duo prime 추출 기기(Thermo Scientific)를 사용하여 정화된 조직 균질물에서 RNA를 추출했다. SARS-CoV-2 RNA 수준은 이전에 설명한 바와 같이 원-스텝 정량 역전사 효소 PCR(qRT-PCR) TaqMan 분석으로 측정했다(Hassan 외, 2020). SARS-CoV-2 뉴클레오펙시드(N) 특이적 프라이머 및 프로브 세트를 사용했다: (L 프라이머: ATGCTGCAATCGTGCTACAA (서열번호 8); R 프라이머: GACTGCCGCTCTGCTC (서열번호 9). 바이러

스 RNA는 log10 스케일에서 밀리그램당 유전자 사본 수(N)로 표현되었다. 일부 샘플의 경우, Vero E6 세포에 대한 플라크 분석으로 바이러스 역가를 결정했다. 사이토카인 및 케모카인 mRNA 측정. 폐 균질물에서 추출한 RNA를 DNase 처리하고 제조업체의 프로토콜에 따라 RNase 억제제를 추가한 고용량 cDNA 역전사 키트(Thermo Scientific)를 사용하여 cDNA를 합성하는 데 사용했다. IFN- γ (IDT: Mm.PT.58.41769240), IL-6 (Mm.PT.58.10005566), IL-1 (Mm.PT.58.41616450), TNF- α (Mm.PT.58.12575861), CXCL10 (Mm.PT.58.43575827), CCL2 (Mm.PT.58.42151692), CCL5 (Mm.PT.58.43548565), CXCL11 (Mm.PT.58.10773148.g), IFN- β (Mm.PT.58.30132453.g), 및 IFN- γ -2/3 (Thermo Scientific Mm04204156_gH)에 특이적인 시판 프라이머/프로브 세트와 함께 TaqMan Fast Universal PCR 마스터 믹스(Thermo Scientific)를 사용하여 사이토카인 및 케모카인 발현을 결정하고 결과를 GAPDH (Mm.PT.39a.1) 수준으로 정규화하였다. 배수 변화는 처리된 마우스를 나이브 대조군과 비교하는 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 사용하여 결정하였다.

[0266] **펩티드 재자극 및 세포내 사이토카인 염색:** 근육 내 백신을 접종한 마우스의 비장 세포를 37°C에서 12시간 동안 253개의 중복 15량체 SARS-CoV-2 S 펩티드 풀과 함께 배양물에서 인큐베이션하고, 브레펠딘 A(BioLegend, 420601)로 4시간 처리하였다. Fc γ R 항체(BioLegend, 클론 93)로 차단한 후, 세포를 얼음 위에서 CD45 BUV395(BD BioSciences 클론 30-F11); CD44 PE-Cy7, CD4 PE-Cy5, CD8b PreCP-Cy5.5 및 CD19 APC-Cy7(BioLegend 클론, 각각 IM7, GK1.5, YTS156.7.7 및 6D5) 및 Fixable Aqua Dead Cell Stain(Invitrogen, L34966)으로 염색했다. 염색된 세포를 Foxp3/전사 인자 염색 완충액 세트(eBiosciences, 00-5523)로 고정하고 투과성으로 만들었다. 이어서, 항-IFN- γ Alexa 647(BD Biosciences, 클론 XMG1.2), 항-TNF BV605(BioLegend, 클론 MP6-XT22) 및 항-GrB PE(Invitrogen, GRB04)로 세포내 염색을 실시하였다. 비장 내 면역화된 마우스의 폐를 채취하고(167 g/ml), 리버라제(Liberase) DH (Sigma) 및 (100 μ g/ml)의 DNase I (Sigma)이 보충된 RPMI 배지로 구성된 소화 완충액에서 37°C에서 1시간 동안 소화시켰다. 폐 세포는 37°C에서 5시간 동안 브레펠딘 A의 존재 하에 위에서 설명한 253개의 중첩된 15량체 SARS-CoV-2 S 펩티드 풀과 함께 37°C에서 인큐베이션되었다. 그런 다음 폐 세포들을 상기와 같이 염색하였으나, CD4-BV421(BioLegend 클론 GK1.5)이 CD4-PE-Cy5를 대체하고 CD19 염색이 포함되지 않았고 CD103-FITC 및 CD69-BV711(BioLegend 클론, 각각 2E7 및 H1.2F3)이 추가되었다. FlowJo X 10.0 소프트웨어를 사용하여 BD LSRFortessa X-20 세포측정기에서 분석을 실시했다.

[0267] **유세포측정 기반 항원 특성화:** HEK-293T 세포들을 ChAd-SARS-CoV-2-S(MOI 5)에 형질도입하기 24시간 전에 6웰 플레이트에 10^6 개 세포/웰로 시딩했다. 20시간 후, Foxp3 전사 인자 염색 완충액 세트(Thermo Fisher)를 사용하여 세포를 채취, 고정 및 투과화시키고 항-SARS-CoV-2 중화 뮤린 mAb: SARS2-01, SARS2-02, SARS2-07, SARS2-11, SARS2-12, SARS2-16, SARS2-18, SARS2-20, SARS2-21, SARS2-22, SARS2-23, SARS2-29, SARS2-31, SARS2-32, SARS2-34, SARS2-38, SARS2-39, SARS2-50, SARS2-55, SARS2-58, SARS2-66, and SARS2-71 (L. VanBlargan and M. Diamond, 결과 공개하지 않음)와 함께 인큐베이션한 후 바이러스 항원에 대해 염색했다. H77.39, 이소형-일치 항-HCV E2 mAb를 음성 대조군으로 사용했다. 세포를 세척하고, Alexa Fluor 647 접합된 염소 항-마우스 IgG(Thermo Fisher)와 함께 인큐베이션하고, MACSQuant 분석기 10(Miltenyi Biotec)을 사용하여 유세포 측정법으로 분석했다. 주어진 mAb에 대해 양성인 세포의 백분율을 항-SARS-CoV-2 mAb의 올리고클로날 혼합물의 포화량으로 염색한 세포와 비교했다.

[0268] **실시예 2: 비장 내 백신은 마우스의 SARS-CoV-2 변이체에 대한 지속적 보호를 제공한다.**

[0269] 항체 중화를 약화시키는 SARS-CoV-2 변이체들은 백신 효능과 COVID-19 대유행 종식을 위태롭게 할 수 있다. 실시예 1은 동물에서 비장내 투여된 스파이크 단백질 기반 침팬지 아데노바이러스 벡터 백신(ChAd-SARS-CoV-2-S)의 보호 활성을 보여주며, 이는 인간 실험으로 진전되었다. 본 실시예는 마우스에서 지속성, 용량 반응 및 교차 보호 활성을 제공한다. ChAd-SARS-CoV-2-S의 단일 비장내 투여는 골수에서 긴 수명의 형질 세포들을 분비하는 혈청 및 S-특이적 IgG 및 IgA에서 지속적으로 높은 중화 및 Fc 효과기 항체 반응을 유도했다. 과거 SARS-CoV-2 균주에 대한 보호는 100배 백신 용량 범위에 걸쳐 그리고 200일 기간에 걸쳐 관찰되었다. 백신접종 후 6주 또는 9개월에, 혈청 항체는 B.1.351 및 B.1.1.28 스파이크 단백질로 SARS-CoV-2 균주를 중화시켰고 공격접종 후 상기도 및 하기도에서 거의 완전한 보호를 제공했다. 따라서 마우스에서, ChAd-SARS-CoV-2-S를 사용한 비장내 면역화는 과거 및 새로운 SARS-CoV-2 균주들에 대한 지속적인 보호를 제공한다.

[0270] SARS-CoV-2 비리온의 스파이크(S) 단백질은 항체 기반 및 백신 대책의 주요 표적이다. S 단백질은 1차 바이러스 부착 및 진입 인자 역할을 하며 세포 표면 수용체 안지오텐신 전환 효소 2(ACE2)와 결합하여 SARS-CoV-2가 인간 세포로 진입하는 것을 용이하게 한다. SARS-CoV-2 S 단백질은 절단되어 S1 및 S2 단편을 생성하며, S1 단백질은 수용체 결합 도메인(RBD)을 포함하고 S2 단백질은 막 융합 및 세포질로의 바이러스 침투를 촉진한다. SARS-CoV-

2 S 단백질의 융합 전 형태는 단클론 항체 또는 단백질 억제제를 강력하게 중화함으로써 인식된다.

[0271] SARS-CoV-2 S 단백질을 표적으로 하는 많은 백신 후보는 DNA 플라스미드, 지질 나노입자 캡슐화 mRNA, 비활성화 비리온, 단백질 소단위 또는 바이러스 벡터화 백신 플랫폼을 사용하여 개발되었다. 근육내(IM) 주사로 투여되는 몇 가지 백신(예: Pfizer/BioNTech BNT162b2 및 Moderna 1273 mRNA 및 Johnson & Johnson Ad26.COV2 및 AstraZeneca ChAdOx1 nCoV-19 아데노바이러스 플랫폼)은 많은 국가에서 전 세계적으로 수억 개의 주어진 용량에 대해 긴급 사용 승인을 받았다(covid19.who.int).

[0272] IM 주사로 투여되는 백신은 심각한 질병과 사망에 대한 보호를 제공하는 강력한 전신 면역을 유도하지만, 특히, 상기도 감염이 감소하지 않는 경우, SARS-CoV-2 전염을 줄이는 능력은 여전히 의문이다. 실제로 IM으로 투여된 많은 백신은 전임상 연구에서 상기도 감염 및 전염에 대한 다양한 보호를 보여주었고 실질적인 점막(IgA) 면역을 유도하는 데 실패했다. 이 문제는 스파이크 단백질에 치환이 존재하는 B.1.1.7, B.1.351 및 B.1.1.28을 비롯한 보다 전염성이 높은 SARS-CoV-2 변이체들의 출현으로 인해 중요하다. 유사바이러스 및 정통 SARS-CoV-2 균주를 사용한 실험은 또한 위치 L452, E484 및 기타 위치에서 스파이크 유전자의 돌연변이를 발현하는 변이체에서 백신 유도된 혈청에 의한 중화가 감소함을 시사한다. 보호에 미칠 수 있는 가능한 부정적인 영향 이외에도, 특정 변이체에 대한 면역 감소와 호흡기 점막에서 자연적으로 더 낮은 항-S IgG 수준이 조합되어 상기도에서 내성이 추가적으로 선택되고 일반 집단으로 전염되는 조건을 만들 수 있다.

[0273] 본원에 기재된 바와 같이, 융합전 안정화된 S 단백질을 인코딩하는 단위 용량, 비강내(IN) 전달된 칩팬지 아데노바이러스(유인원 Ad-36) 기반 SARS-CoV-2 백신(ChAd-SARS-CoV-2-S)은 K18-hACE2 형질도입 마우스, 햄스터 및 비인간 영장류에서 강력한 체액성, 세포 매개성 및 점막 면역 반응과 제한된 상기도 및 하기도 감염을 유도했다. 인간 임상시험(BBV154, Clinical Trial NCT04751682)까지 진행된 이 백신은 현재 일부 국가에서 긴급사용이 허가된 칩팬지 Ad-23 기반 SARS-CoV-2 백신인 ChAdOx1 nCoV-19와는 다르다. 여기에서 ChAd-SARS-CoV-2-S의 잠재적 유용성을 평가하기 위한 추가 단계로 상기도 및 하기도 감염에 대한 영향을 비롯하여 마우스의 용량 반응, 지속성 및 교차 보호 활성을 평가했다. IN 면역화 약 9개월 후, ChAd-SARS-CoV-2-S-백신접종된 동물의 혈청 내 중화 항체 및 항-S 단백질 IgA 수준은 높게 유지되었고 B.1.351 및 B.1.1.28 스파이크 단백질로 SARS-CoV-2 균주 감염을 억제했다. 이때 감수성이 있는 K18-hACE2 형질도입 마우스는 B.1.351 스파이크 단백질을 나타내는 SARS-CoV-2 바이러스로 공격접종 후 상기도 및 하기도 감염으로부터 완전히 보호되었다.

[0274] 결과

[0275] 단일 ChAd-SARS-CoV-2-S 면역화는 다양한 용량에서 지속성 있는 스파이크 방지 및 중화 반응을 유도한다: 상용 용량의 ChAd-SARS-CoV-2-S (10^8 , 10^9 , 및 10^{10} 개 바이러스 입자[vp]) 또는 10^{10} vp의 ChAd-대조군 백신으로 IM-또는 IN-면역화 후 100 또는 200일차에 BALB/c 마우스에서 체액성 면역 반응의 지속성을 평가하였다(도 10A). 먼저 항-S 및 항-RBD IgG 및 IgA 수준을 ELISA로 측정했다. 백신접종 후 1개월 시점 30에서, 100일 또는 200일차에서의 이전 결과와 일치하게, ChAd-SARS-CoV-2-S를 이용한 IN 면역화는 ChAd-대조군으로 IM 면역화 또는 백신접종하는 것보다 우수한 항체 반응을 유도했다(도 10B-10M 및 도 11). 100일 또는 200일에서 혈청 내 항-S 및 항-RBD-특이적 결합 IgG 수준은 IM 면역화보다 IN 후 더 컸다. 10^{10} , 10^9 , 및 10^8 vp의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IN 면역화한 후 100일차에, S-특이적 IgG 반응의 기하 평균 역가(GMT)는 1.1×10^6 , 4.8×10^5 , 및 2.6×10^5 이었으며, RBD-특이적 IgG는 각각 3.2×10^5 , 1.8×10^5 및 8.7×10^4 였다(도 10B). 이에 비해 10^{10} , 10^9 , 및 10^8 vp의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IM 면역화 후 100일차에 S- 및 RBD-특이적 IgG 반응은 4 내지 6배 더 낮았으며($P < 0.0001$), S-특이적 IgG 역가는 각각 2.1×10^5 , 1.1×10^5 , 및 4.5×10^4 이고 RBD-특이적 IgG 역가는 각각 5.1×10^4 , 2.9×10^4 , 및 2.3×10^4 이었다(도 10E). IN 또는 IM 면역화 후 200일차에서 S- 및 RBD-특이적 IgG 역가에서 유사한 용량 반응이 관찰되었다(도 10H 및 도 10K). 10^{10} , 10^9 , 및 10^8 vp의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IN 면역화한 후 200일차에, S-특이적 IgG의 GMT는 2.8×10^6 , 2.4×10^6 및 1.2×10^6 이었고, RBD-특이적 IgG는 각각 1.1×10^6 , 6.1×10^5 및 3.2×10^5 이었다(도 10H). 10^{10} , 10^9 , 및 10^8 vp의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IM 면역화한 후 200일차에 S-특이적 IgG GMT는 8.1×10^5 , 6.9×10^5 , 및 2.6×10^5 이었고, RBD-특이적 IgG GMT는 각각 1.4×10^5 , 1.3×10^5 , 8.0×10^4 였다(도 10K). 따라서, 항-S 및 항-RBD IgG 수준은 IM 면역화보다 IN 후에 더 높았고 단위 용량 백신접종 후 수개월 후에도 혈청에서 계속 상승했다.

- [0276] 다음으로 혈청 IgA 반응의 유도 및 지속성을 평가했다. IM 면역은 S- 또는 RBD-특이적 IgA를 유도하는 데 실패했지만(도 1F 및 L), IN 면역화 후 100일 또는 200일차에 실질적인 수준의 항 S- 및 RBD IgA가 검출되었다(도 1C 및 I). 10^{10} , 10^9 , 및 10^8 vp의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IN 면역화한 후 100일차에, S-특이적 IgA의 GMT는 4.8×10^3 , 1.2×10^3 및 8.4×10^2 이었고, RBD-특이적 IgG는 각각 2.2×10^3 , 4.6×10^2 , 및 2.9×10^2 이었다(도 1C). IgG에서 볼 수 있듯이, 10^{10} , 10^9 , 및 10^8 vp의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IN 면역화한 후, IgA 수준은 시간이 지남에 따라 계속 증가하여 200일차에 S 특이 IgA의 GMT는 1.1×10^4 , 7.4×10^3 및 5.4×10^3 이었고 RBD 특이적 IgA는 5.2×10^3 , 3.8×10^3 및 9.8×10^2 였다(도 1I).
- [0277] 다음으로, 초점 감소 중화 테스트(FRNT)를 사용하여 중화 활성을 분석함으로써 혈청학적 반응의 기능적 상관성을 평가하였다(도 10D, 도 10G, 도 10J, 도 10M 및 도 11). 예상한 바와 같이, ChAd-대조군 처리된 마우스의 혈청에서는 중화 활성이 검출되지 않았다. 10^{10} , 10^9 , 및 10^8 vp의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IN 면역화 후 100일차에 평균 유효 최대 억제 역가[EC50]는 각각 39,449, 9,989 및 7,270이었다(도 10D). 이에 비해 10^{10} , 10^9 , 및 10^8 vp의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IM 면역화 후 이 시점에서 EC50 값은 각각 4,988, 2,017, 및 391로 8 내지 20배 더 낮았다($P < 0.0001$)(도 10G). 10^{10} , 10^9 , 및 10^8 vp의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IN 면역화 후 200일차에 EC50 값은 각각 45,591, 22,769 및 23,433이었으며, 이는 보다 높은 항-S 및 RBD 역가에서 나타난 값과 일관되었다(도 10J). 대조적으로, 10^{10} , 10^9 , 및 10^8 vp의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IM 면역화 후 200일차에 EC50 값은 각각 2,524, 940 및 716으로 훨씬 낮았다(도 10M).
- [0278] 긴 수명의 형질 세포(LLPC)는 골수에 상주하며 항시적으로 높은 수준의 항체를 분비하는데 이는 혈청 수준과 상관관계가 있다. 10^{10} vp의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IM 또는 IN 면역화 후 200일차에 항원 특이적 LLPC의 수준을 평가하기 위해 CD138⁺ 세포를 골수에서 분리하고 ELISPOT 분석을 사용하여 S-특이적 IgG 또는 IgA 생산을 분석하였다. IM 면역화보다 IN 면역화 후에 약 4배 더 높은 빈도의 LLPC가 S-특이적 IgG를 분비함이 관찰되었다(도 10N). 추가로, IN 면역화 후, S-특이적 IgA를 생산하는 더 많은 수의 LLPC가 검출되었고, 이는 IM 면역화 후에는 존재하지 않았다(도 10N). 종합하면, 이들 데이터로부터 다음을 알 수 있다: (a) 단위 용량 IN 면역화는 IM 면역화 보다 우수한 체액성 면역을 촉진시킨다; (b) 100배 더 낮은 ChAd-SARS-CoV-2-S 접종 용량은 마우스에서 강력한 중화 항체 반응을 유도한다; (c) IM이 아닌 IN 면역화는 SARS-CoV-2 S 단백질에 대한 혈청 IgA 반응 및 IgA 특이적 LLPC를 유도한다; 및 (d) ChAd-SARS-CoV-2-S에 의해 유도된 체액성 면역은 지속성이 있으며 백신접종 후 6개월 이상 증가한다.
- [0279] ChAd-SARS-CoV-2-S의 IN 접종은 Fc 효과기 기능 용량으로 광범위한 항체 반응을 유도한다: 체액 반응을 추가로 특성화하기 위해, IN 또는 IM 백신접종 후 90일차에 BALB/c 마우스에서 유래한 혈청을 사용하여 SARS-CoV-2 변이체 단백질에 대한 항체 결합 및 Fc 효과기 기능을 분석했다. SARS-CoV-2 단백질 패널에는 WA1/2020, B.1.1.7, B.1.351, B.1.1.28 균주에 해당하는 스파이크(D614G, E484K, N501Y, Δ69-70, K417N) 및 RBD(E484K) 항원이 포함되었다. 먼저, 여러 이소형(IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM 및 IgA)에 대한 항-SARS-CoV-2 특이적 항체 반응과 Fcγ 수용체(마우스 FcγRIIB, FcγRIII, FcγRIV)에 결합하는 능력을 루미넥스 플랫폼을 사용하여 측정했다. ELISA(도 10B 및 도 10E)에 의해 얻은 데이터와 일관되게, ChAd-SARS-CoV-2-S의 IN 백신접종은 IM 면역화보다 더 높은 수준의 IgG1에서 D614G 스파이크 및 WA1/2020 RBD 단백질을 유도했고, 예상대로, 백신 용량을 감소시키면 더 낮은 항체 역가가 유도되었다(도 12A). IN 면역화 후 항-SARS-CoV-2 IgG1 역가도 IM 면역화 후보다 모든 스파이크 및 RBD 변이체에서 더 높았고 역가는 백신 용량에 따라 감소했다(도 12B). 히트맵에서 보는 바와 같이, 이러한 경향은 모든 항-SARS-CoV-2 특이적 항체 이소형에서 관찰되었으며 FcγR 결합 패턴과 상관관계가 있었다(도 12C). 이러한 데이터는 IN 백신접종이 IM 백신접종보다 SARS-CoV-2에 대해 더 높은 규모 및 더 광범위한 항체 서브클래스 반응을 유도함을 시사한다.
- [0280] 옹조닌화와 같은 항체 효과기 기능은 일부분 Fcγ 수용체 결합에 의해 매개된다. 항체 역가 및 FcγR 결합 역가에서 관찰된 차이가 효과기 기능의 차이를 초래하는지 여부를 결정하기 위해, 항체-의존성 호중구(ADNP) 및 세포 식세포작용(ADCP) 분석을 실시하였다(도 12D-12E). IN 백신접종 마우스의 혈청은 IM 백신접종 마우스에서 얻은 것보다 실질적으로 더 많은 ADNP를 자극했다. 그러나, IN 및 IM 백신접종 후 유도된 항체로부터 ADCP 차이가 최소임은 명백하였다(도 12D-12E). 이 데이터는 ChAd-SARS-CoV-2-S의 IN 백신접종이 IM 백신접종 후보다 더 크고 기능적인 항체 반응을 유도한다는 것을 보여준다.

- [0281] *비강내 투여된 ChAd-SARS-CoV-2-S는 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 공격접종에 대한 지속적인 보호를 유도한다:* ChAd-SARS-CoV-2-S 백신의 효능을 평가하기 위해, 도 10A에 기재된 투여 요법을 제공받은 면역화된 BALB/c 마우스에 SARS-CoV-2를 공격접종하였다. 바이러스 공격접종 이전에 Hu-Ad5-hACE2의 비강내 도입이 있었는데, 이는 기존의 SARS-CoV-2 균주들에 의한 BALB/c 마우스에서 hACE2의 이소성 발현 및 SARS-CoV-2의 생산적 감염을 가능하게 한다. 동물을 10^{10} vp의 ChAd-대조군 또는 10^8 , 10^9 , 또는 10^{10} vp의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IN 또는 IM 경로를 통해 한 번 면역화시켰다. 백신접종 후 95일 또는 195일차에, 마우스에게 Hu-Ad5-hACE2 및 10^8 플라크 형성 단위(PFU)의 항-Ifnar1 mAb를 제공했다; 후자는 이 모델에서 선천 면역을 약화시키고 병인을 강화시켰다. 5일 후, BALB/c 마우스를 5×10^4 초점 형성 단위(FFU)의 SARS-CoV-2(Strain WA1/2020)로 IN 경로를 통해 공격접종하였다. 감염 후 4일차(dpi)에, 면역화 후 100일차에 공격접종된 마우스로부터 폐, 비장 및 심장을 채취하고, 면역화 후 200일차에 공격접종된 두 번차 코호트에서 폐, 비갑개 및 비강 세척액을 수집하였다. 서브게놈 RNA(N 유전자)에 대한 프라이머를 사용하여 정량적 역전사 PCR(qRT-PCR)에 의해 조직들의 바이러스량을 평가했다. ChAd-대조군 백신을 투여받은 동물과 비교하여 3가지 용량 모두에 의한 IN 면역화는 백신접종 후 100일차에 현저한 보호를 유도하였으며, 이는 폐, 비장 및 심장에서 바이러스 RNA가 사실상 부재하는 것에 의해 입증된다(도 13A-13C). 면역화 후 200일차에, IN 전달된 ChAd-SARS-CoV-2-S에 의해 제공된 보호는 ChAd-대조군 면역화 마우스와 비교하여 상기도 및 하기도에서 견고하게 유지되었다. 그럼에도 불구하고, 최저 10^8 vp 용량의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화된 동물의 폐 및 비갑개에서 제한적인 돌파 감염이 관찰되었다(도 13G 및 도 13I). 대조적으로, IM 면역화 후 100일차에서의 보호는 동일한 공격접종 시점에서 IN 면역화 후 보다 적었다. 바이러스 RNA는 심장과 비장에서 검출되지 않았지만(도 13E-13F), ChAd-SARS-CoV-2-S로 IM으로 면역화된 마우스의 폐에서 IN 경로와 비교하여 적어도 1,000배 내지 30,000배($P < 0.0001$) 더 높은 수준이 측정되었다(도 13A 및 도 13D). IM 경로에 의한 투여가 더 큰 영향을 미침이 또한 관찰되었는데, 이는 10^8 vp 투여량에서 폐에서의 바이러스 RNA 부하의 감소가 ChAd-대조군 백신접종된 마우스에서와 더 이상 다르지 않았기 때문이다(도 13D). IM 면역화 후 200일차에, 폐, 비강 세척액 및 비갑개에서 SARS-CoV-2 감염에 대한 보호가 IN 면역화 후 보다 더 적은 것으로 관찰되었다(도 13G-13L).
- [0282] *ChAd-SARS-CoV-2-S는 hACE2 형질전환 마우스에서 지속적인 면역성을 유도한다:* 다음으로, BALB/c 마우스보다 SARS-CoV-2 감염에 더 취약한 K18-hACE2 C57BL/6 마우스에서 비강내 전달된 ChAd-SARS-CoV-2-S의 면역원성을 평가했다. 5주령 K18-hACE2 마우스에 10^9 vp의 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 IN 경로를 통해 접종했다. 6주 후에 혈청 샘플을 채취하여 체액성 면역 반응을 평가했다. ChAd-SARS-CoV-2-S의 IN 면역화는 높은 수준의 S- 및 RBD-특이적 IgG 및 IgA를 유도했으나 ChAd-대조군은 그렇지 않았다(도 14A-14B). WA1/2020 및 B.1.351 및 B.1.1.28 변이체들의 스파이크 단백질을 보유하는 2개의 다른 SARS-CoV-2 균주에 대한 중화 항체 역가를 FRNT 분석으로 측정했다(도 14C-14D 및 도 16). ChAd-SARS-CoV-2-S의 단일 IN 투여 후 WA1/2020에 대한 높은 수준의 중화 항체가 유도되었다(9,591의 EC50). 백신-유도 인간 혈청에서 볼 수 있는 바와 같이, WA1/2020과 비교하여 Wash-B.1.351(~5배, $P < 0.0001$; 도 14C) 및 Wash-B.1.1.28(~3배, $P < 0.0001$; 도 4D) SARS-CoV-2 균주들에 대한 중화 역가의 감소가 관찰되었다. 체액 반응의 지속성을 평가하기 위해, 별도 코호트의 K18-hACE2 마우스들을 IN 경로를 통해 면역화하고 혈청 샘플을 9개월차에 수집했다. ChAd-SARS-CoV-2-S는 이 시점에서 WA1/2020에 대한 높은 수준의 S- 및 RBD-특이적 IgG 및 IgA 및 중화 항체를 유도했다(12,550의 EC50)(도 14E-14H 및 도 16). Wash-B.1.351 및 Wash-B.1.1.28 바이러스에 대해 테스트했을 때, 여전히 높은 수준을 유지했지만(각각 EC50은 1,627 및 1,918) WA1/2020과 비교하여 중화 역가의 감소가 관찰되었다(~6 내지 8배, $P < 0.05$; 도 14G-14H).
- [0283] *ChAd-SARS-CoV-2-S는 hACE2 형질전환 마우스에서 Wash B.1.351 및 Wash-B.1.1.28 공격접종에 대한 교차 보호를 제공한다:* WA1/2020 및 고려하는 변이체에 해당하는 스파이크 유전자들을 보유한 2개의 키메라 바이러스(Wash-B.1.351 및 Wash-B.1.1.28)에 대한 ChAd-SARS-CoV-2-S의 보호 효능을 테스트했다(도 15A). 5주령 K18-hACE2 마우스는 단일 10^9 vp 용량의 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IN 경로를 통해 면역화되었다. 6주 후, 마우스들을 10^4 FFU의 Wash-B.1.351, Wash B.1.1.28 또는 WA1/2020으로 IN 경로로 공격접종하였다. ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화된 모든 마우스들은 체중 감소를 나타내지 않은 반면, 대부분의 ChAd-대조군-백신접종된 마우스는 3 내지 6dpi에서 상당한 체중 감소를 경험했다(도 15B, 도 15G 및 도 15L). 놀랍게도, ChAd-SARS-CoV-2-S를 사용한 백신접종은 6dpi에서의 상기도 및 하기도, 심장 및 뇌에서 SARS-CoV-2 RNA를 거의 검출할 수 없게 하였다(도 15C-15F, 도 15H-15K 및 도 15M-15O). 교차 보호 반응의 지속성에 대한 추가 테스트로서, 5주령 K18-hACE2 마

우스를 IN 경로를 통해 단일 10^{10} vp 용량의 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화했다. 9개월 후, 마우스는 10^4 FFU의 Wash-B.1.351로 IN 경로를 통해 공격접종되었다. ChAd-SARS-CoV-2-S-백신접종 마우스는 ChAd-대조군 처치 마우스와 대조적으로 체중을 유지했다(도 15P). 더욱이, 일부 마우스의 상기도 및 하기도, 심장 및 뇌에서 Wash-B.1.351 SARS-CoV-2 RNA가 매우 적은 양만 검출되었기 때문에 실질적인 바이러스 보호가 관찰되었다(도 15Q-15T).

[0284] 논의

[0285] 백신 유도 면역 반응의 지속성은 SARS-CoV-2 감염에 대한 지속적인 보호를 제공하고 현재의 대유행을 줄이는 데 핵심이다. 여기에서, ChAd-SARS-CoV-2-S를 사용한 단일 IN 면역화는 S 및 RBD 특이적 결합 및 중화 항체를 몇 개월 동안 계속 증가시키는 것으로 나타났으며, 이는 지속적인 배종심 반응을 시사한다. IN 백신접종 6개월 후 골수에서 LLPC가 검출되어, 순환계 34에서 지속적으로 높은 항바이러스 항체 수준에 원인이 될 가능성이 있는 SARS-CoV-2-특이적 IgG 및 IgA를 분비했다. 이에 비해 ChAd-SARS-CoV-2-S로의 IM 면역화는 낮은 수준의 혈청 중화 항체, 더 적은 스파이크 특이적 IgG 분비 LLPC, 실제적인 혈청 또는 세포 IgA 반응을 유도하지 않았다. 적어도 마우스에서 ChAd-SARS-CoV-2-S를 사용한 단일 IN 용량 면역은 100배 용량 범위에서 관찰된 지속성 있는 체액성 면역을 생성했다. 이러한 전임상 면역원성 결과는 SARS-CoV-2에 대한 mRNA 백신을 사용하여 인간을 대상으로 한 연구와 비교할 때 적어도 몇 개월 동안 지속되는 체액성 면역 반응을 보여준다. 이에 비해, 자연 SARS-CoV-2 감염 후 항체 반응의 지속성은 이와 상당히 다를 수 있다.

[0286] ChAd-SARS-CoV-2-S의 단일 면역화는 6개월 동안 여러 시점에서 hACE2 형질전환 BALB/c 마우스 또는 K18-hACE2 형질전환 C57BL/6 마우스에서 SARS-CoV-2(WA1/2020 균주) 공격접종에 대한 지속적인 보호를 제공했다. 특히 IN 면역화는 상기도 및 하기도 감염에 대해 실제로 완전한 바이러스 보호를 제공했으며, 100배 더 낮은 백신 용량에서 제한된 돌과 감염만 나타났다. 상기도 감염의 제거는 IN 백신접종이 전염을 예방할 수 있음을 시사한다. 이에 비해, IM 면역화는 폐의 바이러스 RNA 수준을 감소시켰지만 상기도 샘플에서 동종 WA1/2020 균주에 대한 보호는 상당히 더 낮았다. 다양한 플랫폼의 많은 SARS-CoV-2 백신 후보들이 동물 모델에서 면역원성과 보호 효능을 입증했지만, 우리가 아는 한 어떤 것도 변이체 바이러스들에 대한 지속성 또는 보호를 확립하지 못했다. 100배 더 낮은 접종 용량에서조차도 제공되는 IN 면역화에 의한 장기간 보호는 유망하다. 마우스에서 얻은 결과를 요약하면 용량 절감 전략을 통해 SARS-CoV-2의 감염과 전염을 줄일 수 있는 많은 양의 백신을 생산할 수 있다.

[0287] 수용체 결합 모티프(예: B.1.351 및 B.1.1.28)에 아미노산 돌연변이가 있는 SARS-CoV-2 S 변이체의 출현은 많은 중화 항체의 억제 활성화에 대한 내성으로 인해 우려가 된다. 실제로, BNT162b2 mRNA 또는 ChAdOx1 nCoV-19(AZD1222) 백신으로 백신접종된 대상체의 인간 혈청은 B.1.351에 대해 감소된 중화를 보여주었다. 이와 관련하여, IM 투여된 ChAdOx1 nCoV-19(AZD1222)는 인간의 경증에서 중등도 B.1.351 감염에 대한 보호 효능이 감소한 것으로 나타났다. K18-hACE2 형질전환 마우스에서 B.1.1.28 또는 B.1.351 스파이크 단백질을 발현하는 키메라 SARS-CoV-2 균주 및 WA1/2020에 대한 IN-전달된 ChAd-SARS-CoV-2-S의 면역원성을 비교했을 때, 역가는 $>1,000$ 으로 유지되었지만 변이체 바이러스 중화 감소(3 내지 8배)도 관찰되었다. ChAd-SARS-CoV-2-S의 IN 면역화 6주 후, K18-hACE2 마우스는 상기도 및 하기도 그리고 뇌에서 WA1/2020, Wash-B.1.351, 및 Wash-B.1.1.28에 의한 감염 및 체중 손실에 대해 완전히 보호받은 마우스들이었다. 놀랍게도, 단일 IN 면역화 9개월 후에 공격접종된 K18-hACE2 마우스의 별도 코호트에서 동물들은 Wash-B.1.351 공격접종으로부터 완전히 보호되었다. SARS-CoV-2 백신에 대한 보호 상관관계가 완전히 확립되지는 않았지만 변이체 바이러스에 대한 높은 수준의 교차 중화 항체와 강력한 바이러스 특이적 전신 및 점막 $CD8^+$ T 세포 반응이 보호에 원인이 될 가능성이 높다. 이 외에도 항체 효과기 기능은 SARS-CoV-2 감염 및 질병을 예방하는 데에도 원인이 될 수 있다. 실제로, IN 전달된 ChAd-SARS-CoV-2-S에서 유래된 혈청에서 ADNP 및 ADCP 반응의 강력한 유도를 포함하여 SARS-CoV-2 변이체 단백질에 대한 향상된 Fc 효과기 기능이 관찰되었다.

[0288] 요약하면, 본 실시예는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 사용한 IN 면역화가 견고하고 지속성 있는 결합 IgG 및 IgA 항체, 중화 항체, Fc 효과기 기능 및 SARS-CoV-2에 대한 LLPC 반응을 유도함을 보여준다. 마우스에서 ChAd-SARS-CoV-2-S의 단일 IN 면역화는 백신접종 후 9개월 후에도 B.1.351 및 B.1.1.28 변이체들에 해당하는 스파이크 단백질을 나타내는 SARS-CoV-2 균주들에 대한 교차 보호를 제공한다. 여러 동물 모델 30, 31, 32에서 전임상 평가의 효능과 고려되는 변이체들에 대한 지속적인 보호 면역을 감안할 때, ChAd-SARS-CoV-2-S의 IN 전달은 SARS-CoV-2 감염을 예방하고 전염을 줄이기에 유망한 플랫폼이다.

[0289] 방법

[0290] 바이러스 및 세포: Vero E6(CRL-1586, 미국 미생물 기탁소(ATCC), Vero-TMPRSS2 57, Vero (CCL-81, ATCC) 및 HEK293(CRL-1573, ATCC) 세포를 10% 태아 소 혈청(FBS), 10 mM HEPES pH 7.3, 1mM 피루브산나트륨, 1X 비필수 아미노산 및 100U/ml의 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 Dulbecco's Modified Eagle 배지(DMEM)에서 37°C에서 배양했다. Vero-TMPRSS2 세포를 또한 5 µg/mL의 블라스티시딘으로 보충하였다.

[0291] SARS-CoV-2 균주 2019n-CoV/USA_WA1/2020(WA1/2020)은 질병 통제 예방 센터에서 입수했다. 바이러스는 Vero CCL-81 세포에서 한 번 계대되었고 Vero E6 세포에서 초점-형성 분석(FFA)으로 적정되었다. 변이체 스파이크 유전자를 가진 Wash-B.1.351 및 Wash-B.1.1.28 키메라 바이러스는 이전에 28, 58에 설명되었다. 모든 바이러스는 Vero-TMPRSS2 세포에서 1회 계대되었고 치환의 도입 및 안정성을 확인하기 위해 차례대로 시퀀싱을 거쳤다. 모든 바이러스 실험은 승인된 BSL-3(생물학적 안전성 수준 3) 시설에서 실시되었다.

[0292] 마우스 실험: 동물 연구는 국립 보건원의 실험실 동물 관리 및 사용에 대한 지침의 권장 사항에 따라 실시되었다. 이 프로토콜은 워싱턴 대학교 약대의 기관 동물 관리 및 사용 위원회의 승인(보증 번호 A3381-01)을 받았다. 바이러스 접종은 케타민 하이드로클로라이드와 자일라진으로 유도되어 유지되는 마취하에 실시되었으며 동물의 고통을 최소화하기 위해 모든 노력을 기울였다.

[0293] 암컷 BALB/c (카탈로그 000651) 및 K18-hACE2 C57BL/6 (카탈로그 034860) 마우스는 The Jackson Laboratory에서 구입했다. 4주 내지 5주령 동물들을 IM(뒷다리) 또는 IN 주사를 통해 50 µl PBS 중 10^{10} vp의 ChAdV-대조군 또는 10^8 , 10^9 , 또는 10^{10} vp의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화했다. 10^8 PFU의 Hu-Ad5-hACE2 37을 IN 투여하기 하루 전에 백신접종된 BALB/c 마우스(10 내지 11주령)에 항-Ifnar1 mAb(MAR1-5A3 59, Leinco) 2 mg을 단일 복강 내 주사하였다. Hu-Ad5-hACE2 형질도입 5일 후, 마우스에 4×10^5 FFU의 WA1/2020 SARS-CoV-2를 IN 경로를 통해 접종했다. K18-hACE2 마우스를 10^4 FFU의 SARS-CoV-2(WA1/2020, Wash-B.1.351 또는 Wash-B.1.1.28)로 IN 경로를 통해 면역화한 후 명시된 일차에 공격접종하였다. 동물을 6 dpi에 안락사시키고, 바이러스학적 분석을 위해 조직을 채취했다.

[0294] 침팬지 및 인간 아데노바이러스 벡터: ChAd-SARS-CoV-2 및 ChAd-대조군 백신 벡터는 유인원 Ad36 백본(60)에서 유래되었으며 제작 및 검증은 본 실시예에 설명되어 있다. 제작된 복제 불능 ChAd-SARS-CoV-2-S 및 ChAd-대조군 벡터를 HEK293 세포들에서 확장시키고 CsCl 밀도 구배 초원심분리에 의해 정제했다. 각 벡터 제제에서 바이러스 입자 농도는 260nm에서 분광광도계로 결정되었다. Hu-AdV5-hACE2 벡터 또한 상기 설명되었으며 HEK293 세포에서 생산되었다. HEK293 세포에서 플라크 분석에 의해 바이러스 역가를 결정하였다.

[0295] SARS-CoV-2 중화 분석: 열 불활성화 혈청 샘플을 연속 희석하고 10^2 FFU의 상이한 SARS-CoV-2 균주들과 함께 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션했다. 바이러스-혈청 혼합물을 96-웰 플레이트의 Vero 세포 단일층에 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션했다. 이어서, 세포를 2% FBS가 보충된 MEM에서 1%(w/v) 메틸셀룰로오스로 오버레이하였다. 플레이트를 30시간 동안 인큐베이션한 후, 실온에서 1시간 동안 PBS 중 4% PFA를 사용하여 고정하였다. 세포를 세척한 다음 0.1% 사포닌 및 0.1% 소 혈청 알부민이 보충된 PBS에서 SARS2-2, SARS2-11, SARS2-16, SARS2-31, SARS2-38, SARS2-57 및 SARS2-71 62 항-S 항체 및 HRP-접합된 염소 항-마우스 IgG(Sigma, 12-349)의 올리고클로날 풀과 함께 순차적으로 인큐베이션하였다. TrueBlue 과산화효소 기질(KPL)을 사용하여 플레이트를 현상하고 BioSpot 분석기(Cellular Technology Limited)에서 초점을 계수했다.

[0296] 단백질 발현 및 정제: WA1/2020 SARS-CoV-2 균주에 해당하는 정제된 S 및 RBD 단백질의 복제 및 생산은 이전에 설명된 바 있다. 간략히 말하면, 융합전 안정화 S 64 및 RBD를 헥사히스티딘 태그를 갖는 pCAGGS 포유동물 발현 벡터에 클로닝하고 Expi293F 세포에 일시적으로 형질감염시켰다. 단백질은 코발트 충전 수지 크로마토그래피(G-Biosciences)로 정제했다.

[0297] ELISA: 정제된 항원(S 또는 RBD)을 96-웰 Maxisorp 투명 플레이트에 50mM Na₂CO₃ pH 9.6(70 µL) 중의 2 µg/mL로 4°C에서 밤새 코팅했다. 코팅 완충액을 흡인하고 웰들을 200 µL의 1X PBS + 0.05% Tween-20 + 1% BSA + 0.02% NaN₃(차단 완충액, PBSTBA)로 4°C에서 밤새 차단했다. 열 불활성화된 혈청 샘플들을 별도의 96-웰 폴리프로필렌 플레이트에서 PBSTBA로 희석했다. 그런 다음 플레이트를 1X PBS + 0.05% Tween-20(PBST)으로 3번 세척한 후 50 µL의 각 혈청 희석액을 첨가했다. 혈청을 차단된 ELISA 플레이트에서 실온에서 적어도 1시간 동안 인큐베이션하였다. ELISA 플레이트들을 다시 PBST로 3회 세척한 다음, PBST 중 1:1,000 항-마우스 IgG-

HRP(Southern Biotech Cat. #1030-05) 50 μ L 또는 PBSTBA(SouthernBiotech) 중 1:1000 항-마우스 IgA-HRP를 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 PBST에서 3회 세척한 다음 100 μ L의 1-스텝 Ultra TMB-ELISA를 첨가했다(ThermoFisher 카탈로그 번호 34028). 10 내지 12분 배양 후, 50 μ L의 2M 황산으로 반응을 중단시켰다. 광학 밀도(450nm) 측정은 마이크로플레이트 판독기(Bio-Rad)를 사용하여 결정되었다.

[0298] **ELISPOT 분석:** 골수 내 S-특이 형질 세포를 정량화하기 위해 RPMI 1640에서 막자와 막자사발을 사용하여 대퇴골과 경골을 분쇄하고 100 μ m 스트레이너를 통해 여과하고 ACK 용해를 실시했다. CD138⁺ 세포는 제조업체의 지침(EasySep Mouse CD138 양성 선택, STEMCELL)에 따라 양성 선택 및 자기 비드에 의해 풍부해졌다. 풍부해진 CD138⁺ 세포는 SARS-CoV-2 S 단백질로 예비 코팅된 MultiScreen-HA 필터 플레이트(Millipore)에서 10% FBS가 보충된 RPMI 1640에서 밤새 인큐베이션되었다. 초점은 순차적으로 항마우스 IgG-비오틴 또는 항마우스 IgA-비오틴 및 스트렙타비딘-HRP와 함께 인큐베이션 한 후 TruBlue 기질(KPL)을 사용하여 현상되었다. BioSpot 기기를 사용하여 플레이트를 이미지화하고 초점을 수동으로 계수하였다.

[0299] **바이러스량의 측정:** SARS-CoV-2에 감염된 마우스들을 케타민과 자일라진 각테일을 사용하여 안락사시키고 장기를 수집했다. 조직의 무게를 측정하고 2% 태아 소 혈청(FBS)을 함유하는 Dulbecco Modified Eagle 배지(DMEM) 1ml에서 MagNA Lyser(Roche)를 사용하여 비드로 균질화했다. MagMax mirVana Total RNA 단리 키트(Thermo Scientific) 및 KingFisher Flex 추출 시스템(Thermo Scientific)를 사용하여 정화된 조직 균질물에서 RNA를 추출했다. SARS-CoV-2 RNA 수준은 이전에 설명한 바와 같이(37) 원-스텝 정량 역전사 효소 PCR(qRT-PCR) TaqMan 분석으로 측정했다. 상기 설명한 바와 같이 SARS-CoV-2 뉴클레오패시드(N) 특이적 프라이머 및 프로브 세트를 사용했다. 바이러스 RNA는 log10 스케일에서 밀리그램당 유전자 사본 수(N)로 표현되었다.

[0300] **루미넥스 분석:** 루미넥스 분석은 기존에 설명된 바와 같이 실시되었다. 간단히 말하면, 단백질들(스파이크: D614G, E484K, N501Δ69-70, K417N, B.1.1.7, B.1.351; 수용체 결합 도메인(RBD) (ImmuneTech): WT, E484K, B.1.1.7, B.1.351, B.1.128)을 세포-NHS와의 NHS-에스테르 연결부(linkage) 및 EDC (Thermo Fisher)를 사용하여 자성 루미넥스 마이크로플렉스 카르복실화 비드(Luminex Corporation)에 카르복시-커플링시킨 다음, 혈청(IgG1, Fc γ RIIb, Fc γ RIII 1:3000; IgG2a, G2b, G3, A, Fc γ RIV 1:1000, IgM 1:500)과 함께 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 상기 면역 복합체를 이차 염소 항-마우스-PE 항체(IgG1 1070-09, IgG2a 1080-09S, IgG2b 1090-09S, IgG3 1100-09, IgM 1020-09, IgA 1040-09 Southern Biotech)와 함께 배양하여 각 이소형에 대한 이소형 분석을 실시하였다. Fc γ R 결합은 상기 면역 복합체를 스트렙타비딘-PE(Prozyme)에 접합된 비오틴화된 Fc γ R(Fc γ RIIB, Fc γ RIII 및 Fc γ RIV, Duke Protein Production Facility 제공)과 함께 배양하여 정량화하였다. 유세포 측정법은 IQue(Intellicyt)로 실시되었고 분석은 IntelliCyt ForeCyt(v8.1)에서 실시되었다.

[0301] **항체 의존성 호중구 또는 세포 식세포작용:** 항체 의존성 호중구 식세포작용 (ADNP) 및 세포 식세포작용 (ADCP) 분석을 기존에 설명된 바와 같이 실시하였다. 간단히 말하면, 스파이크 단백질을 세포-NHS와의 NHS-에스테르 결합 및 EDC(Thermo Fisher)를 사용하여 청색, 황록색 또는 적색 FluoSphere™ 카르복실레이트 변형된 미세구, 0.2 μ m(ThermoFisher)에 카르복시 커플링시켰다. 스파이크 코팅된 비드는 37°C에서 2시간 동안 희석된 혈청(1:150 ADNP, 1:100 ADCP)과 함께 인큐베이션하였다. ADNP 분석을 위해, BALB/c 마우스로부터 골수 세포를 채취하고 적혈구를 ACK 용해시켰다. 남은 세포를 PBS로 세척하고 96-웰 플레이트에 분취하였다(웰 당 5 x 10⁴ 개 세포). 비드-항체 복합체를 세포에 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후 세포들을 다음 항체들로 염색했다: CD11b APC (BioLegend 101212), CD11c A700 (BioLegend 117320), Ly6G 퍼시픽 블루 (127628), Ly6C BV605 (BioLegend 128036), Fcblock (BD Bioscience 553142) 및 CD3 PE/Cy7 (BioLegend 100320). 세포들을 4% PFA로 고정하고 BD LSRFortessa(BD Biosciences)에서 처리하였다. 호중구는 CD3⁻, CD11b⁺, Ly6G⁺로 정의되었다. 호중구 식세포작용 점수를 (FITC+ %) x (FITC의 기하 평균 형광 강도)/10000으로 계산하였다. ADCP 분석을 위해, J774A.1(ATCC TIB-67) 류틴 단백질 세포들을 스파이크-코팅된 비드-항체 복합체와 함께 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포들을 5mM EDTA PBS로 세척하고, 4% PFA로 고정하고, BD LSRFortessa(BD Biosciences)에서 분석했다. 세포 식세포작용 점수를 (FITC+ %) x (FITC의 기하 평균 형광 강도)/10000으로 계산하였다.

[0302] **균등물**

[0303] 여러 가지 본 발명의 실시예가 본원에 설명되고 예시되었지만, 당업자는 해당 기능을 수행하고/하거나 본원에 기재된 결과 및/또는 이점들 중 하나 이상을 얻기 위한 다양한 다른 수단 및/또는 구조를 쉽게 예상할 것이며,

이러한 변화 및/또는 변형 각각은 본원에 설명된 본 발명의 실시형태들의 범위에 속하는 것으로 간주된다. 보다 일반적으로, 당업자는 본원에 기재된 모든 매개변수, 치수, 재료 및 구성이 예시를 의미하며 실제 매개변수, 치수, 재료 및/또는 구성이 특정 응용 또는 본 발명의 내용이 사용되는 응용분야에 따라 달라질 수 있음을 용이하게 이해할 것이다. 당업자는 단지 관례적인 실험을 사용하여 본원에 설명된 특정한 본 발명의 실시형태에 대한 많은 균등형태들을 인지하거나 확인할 수 있을 것이다. 따라서, 전술한 실시예는 단지 예로서 제시된 것이며, 첨부된 청구범위 및 이에 대한 균등물의 범위 내에서, 본 발명의 실시예는 구체적으로 설명되고 청구범위에 기재된 것과 달리 실시될 수 있음을 이해해야 한다. 본 발명의 실시예는 본원에 기재된 각각의 개별 특징, 시스템, 물품, 재료, 키트 및/또는 방법에 관한 것이다. 또한 이러한 기능, 시스템, 물품, 재료, 키트 및/또는 방법이 상호 불일치하지 않는 경우 두 개 이상의 이러한 기능, 시스템, 물품, 재료, 키트 및/또는 방법의 조합은 본 발명의 범위에 속하는 것으로 포함된다.

[0304] 본원에 개시된 모든 참조 문헌, 특허 및 특허 출원은 각각 인용되는 발명과 관련하여 참조로 포함되며 경우에 따라 문서 전체를 포함할 수 있다.

[0305] 본원 및 청구범위에서 사용된 “및/또는”이라는 어구는 이렇게 결합된 요소들, 즉, 어떤 경우에는 결합적으로 존재하고 다른 경우에는 분리되어 존재하는 요소들 중 “하나 또는 둘 모두”를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. “및/또는”으로 열거된 여러 요소들은 동일한 방식으로, 즉, 이렇게 결합된 요소들 중 “하나 이상”으로 해석되어야 한다. “및/또는” 어구에 의해 구체적으로 식별된 요소들 이외의 다른 요소들이 선택적으로 존재할 수 있으며, 구체적으로 식별된 요소들과 관련이 있든 없든 상관 없다. 따라서, 비제한적인 예로서, “포함하는”과 같은 개방형 언어와 함께 사용될 때 “A 및/또는 B”에 대한 지칭은, 한 실시형태에서는 A만을(선택적으로 B 이외의 요소들을 포함함); 다른 실시형태에서는, B만을(선택적으로 A 이외의 요소들을 포함함); 또 다른 실시형태에서는, A 및 B 모두(선택적으로 다른 요소들을 포함함) 등을 지칭할 수 있다.

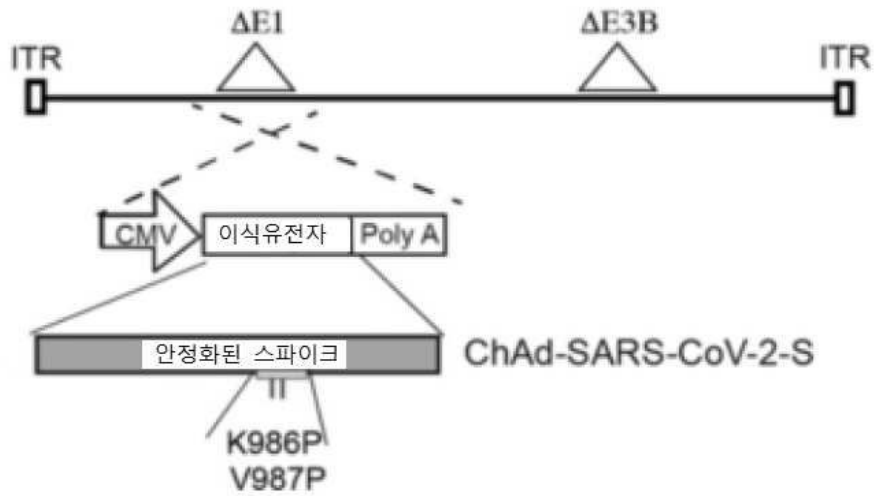
[0306] 본원 및 청구범위에서 사용된 “또는”은 상기 정의된 “및/또는”과 동일한 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 목록에서 항목을 분리할 때 “또는” 또는 “및/또는”은 포괄적인 것으로 해석되어야 한다, 즉, 소정의 구성요소들 또는 이의 목록 중 하나 이상을 포함하지만 선택적으로 목록에 없는 또 다른 항목을 포함하는 것이다. “~ 중 단 하나” 또는 “~ 중 정확히 하나” 또는 청구범위에서 사용되는 경우 “~로 이루어진”과 같이 명확하게 달리 언급이 되는 용어들만 소정의 구성요소들 또는 이의 목록 중 정확하게 하나의 구성요소의 포함을 지칭하게 될 것이다. 일반적으로, 본원에서 사용되는 용어 “또는”은 배타성에 관한 용어, 예를 들어, “둘 중 하나”(“either”, “one of”), “둘 중 단 하나”(“only one of”) 또는 “둘 중 정확히 하나”(“exactly one of”)가 선행되는 경우 배타적 대안(즉, “하나 또는 다른 하나 그러나 둘 모두는 아님”)을 나타내는 것으로 해석되어야 한다. “~로 본질적으로 구성된”(“Consisting essentially of”)은 청구범위에서 사용될 때 특허법 분야에서 사용되는 일반적인 의미를 가진다.

[0307] 명세서 및 청구범위에서 본 명세서에 사용된 바와 같이, 하나 이상의 요소의 목록과 관련하여 “적어도 하나”라는 문구는, 이러한 요소들의 목록에 있는 요소들 중 하나 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 요소를 의미하는 것으로 이해되어야 하지만, 해당 요소들의 목록에 구체적으로 열거된 각각의 그리고 모든 요소 중 적어도 하나를 반드시 포함하여야 하는 것은 아니며 해당 요소들의 목록에 있는 요소들의 임의의 조합을 반드시 배제하는 것도 아니다. 이 정의는 또한 “적어도 하나”라는 문구가 지칭하는 요소들의 목록 내에서 구체적으로 식별된 요소들 이외의 요소들이, 구체적으로 식별된 요소들과 관련이 있든 없든, 선택적으로 존재할 수 있음을 허용한다. 따라서, 비제한적인 예로서, “A 및 B 중 적어도 하나”(또는 동등하게 “A 또는 B 중 적어도 하나”, 또는 동등하게 “A 및/또는 B 중 적어도 하나”)는, 한 실시형태에서, 적어도 하나의 A (선택적으로 하나 이상을 포함)이고 B는 존재하지 않음 (그리고 선택적으로 B 이외의 요소들을 포함); 또 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 B (선택적으로 하나 이상을 포함)이고 A는 존재하지 않음 (그리고 선택적으로 A 이외의 요소들을 포함); 또한 또 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 A (선택적으로 하나 이상을 포함), 그리고 적어도 하나의 B (선택적으로 하나 이상을 포함); 등을 의미할 수 있다.

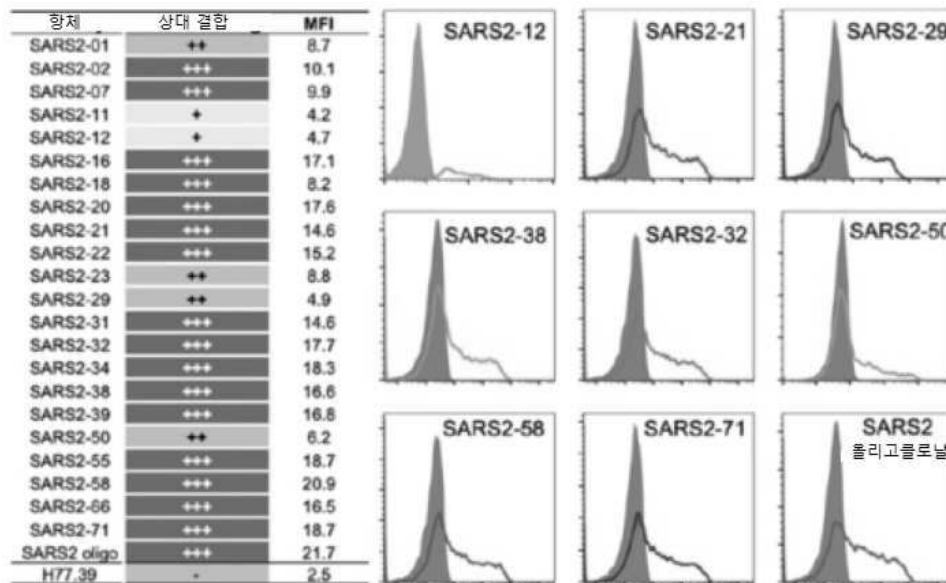
[0308] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용되는 단수형 ‘하나’ 및 ‘그것’은 내용에서 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함한다. 본원에서 “또는”에 대한 모든 언급은 달리 명시되지 않는 한 “및/또는”을 포함하고자 하는 것이다.

도면

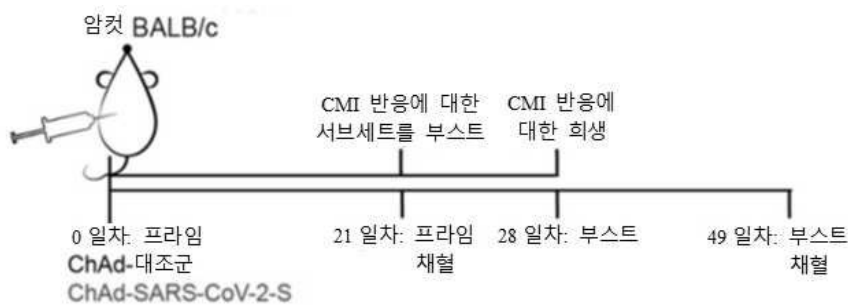
도면1a



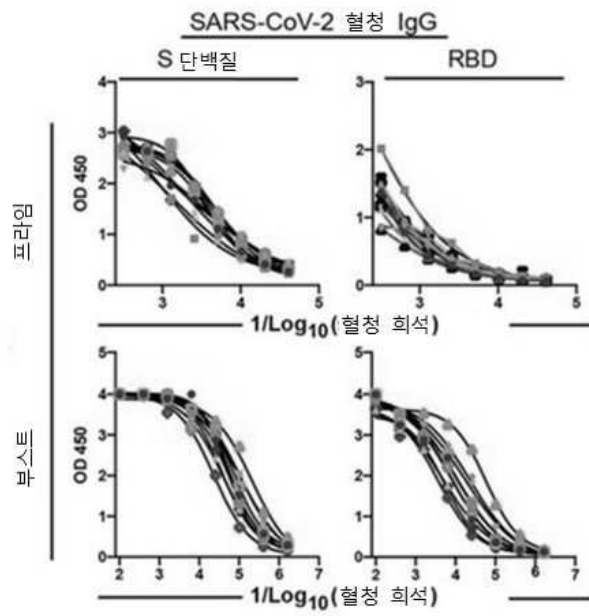
도면1b



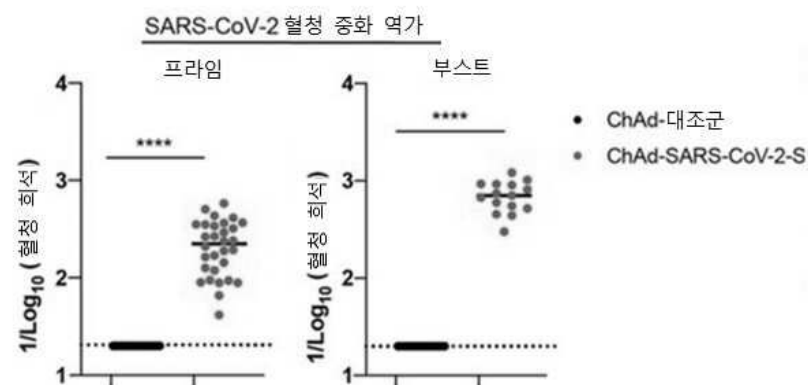
도면1c



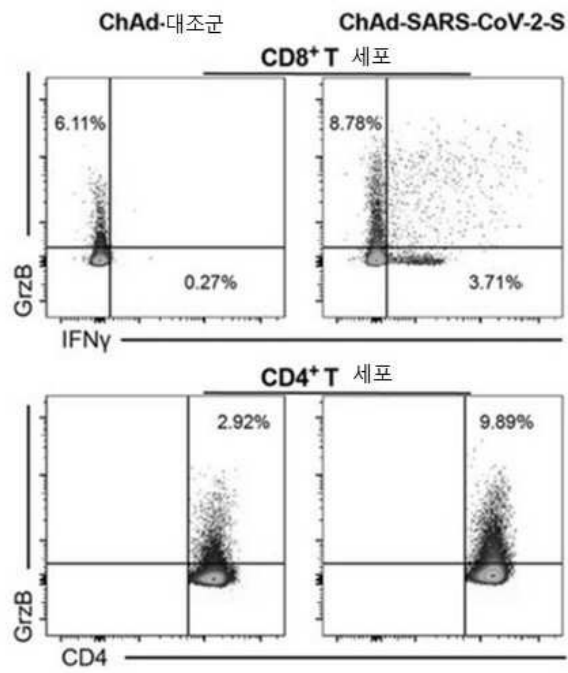
도면1d



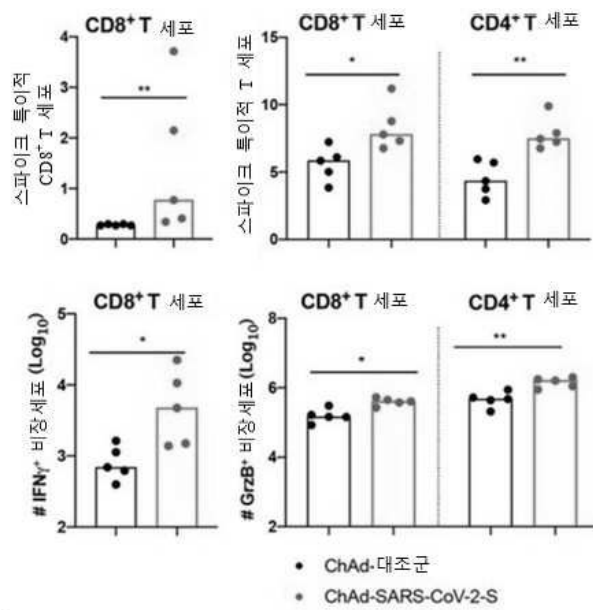
도면1e



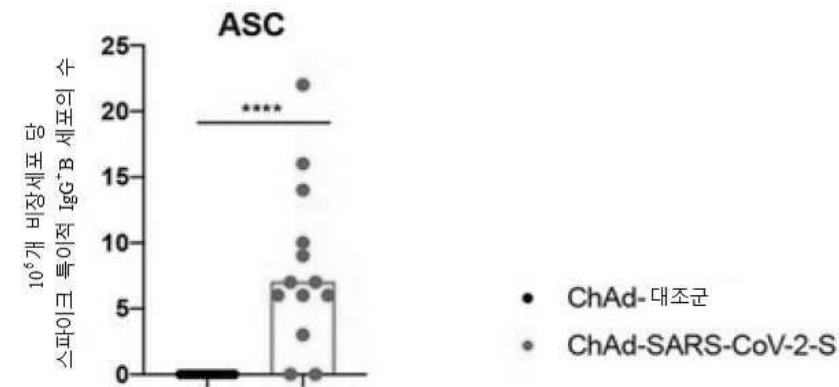
도면1f



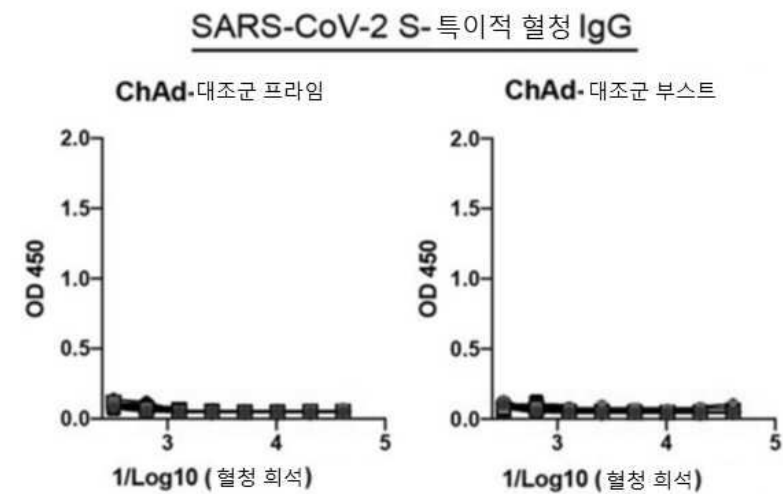
도면1g



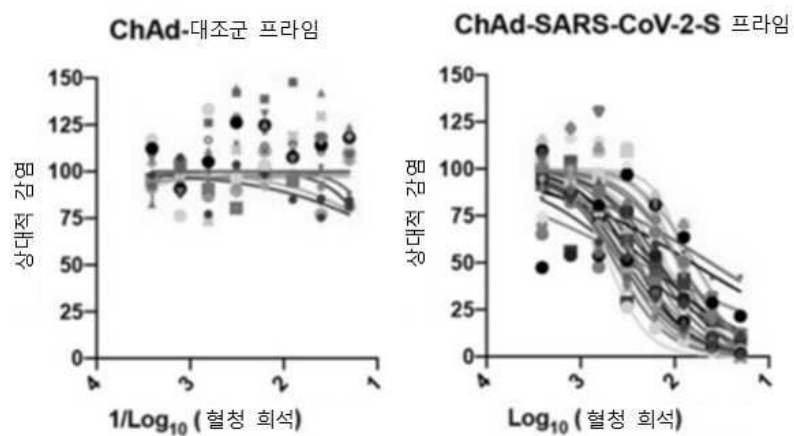
도면1h



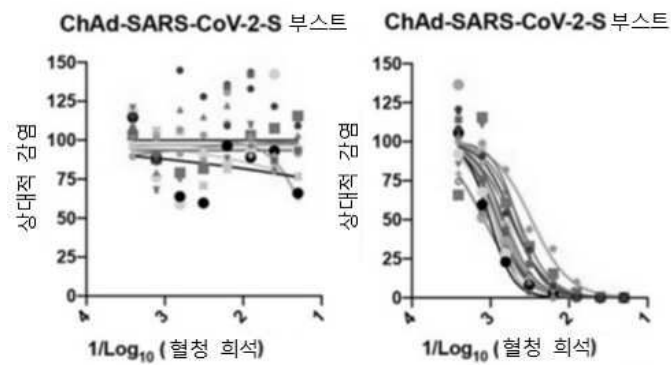
도면2a



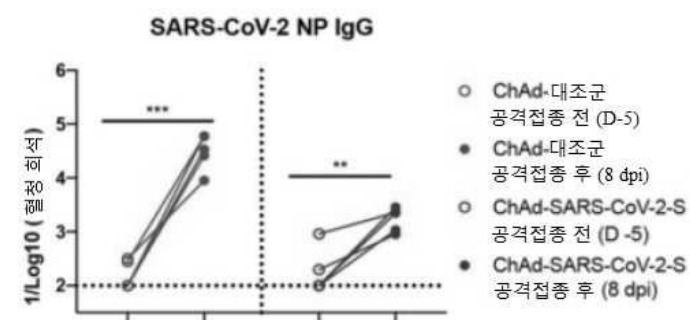
도면2b



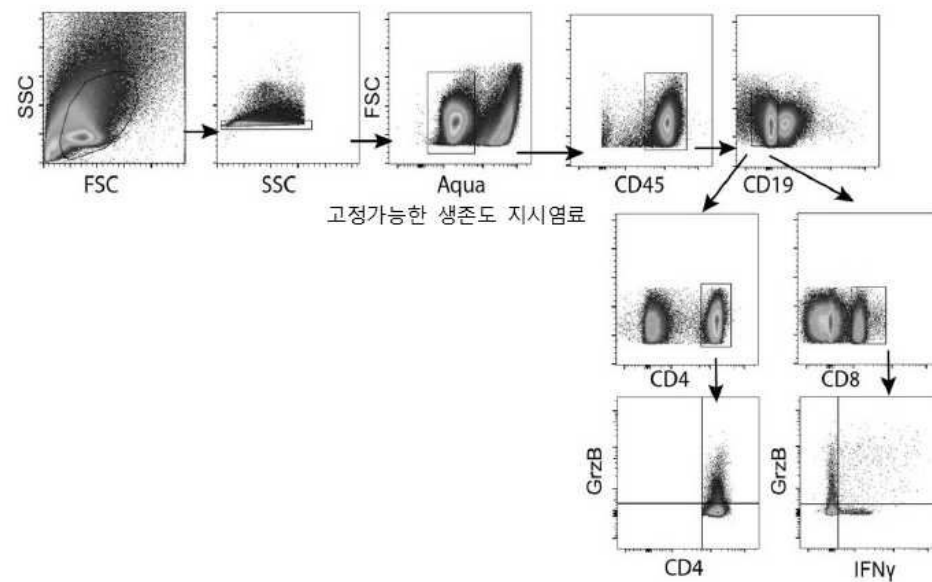
도면2c



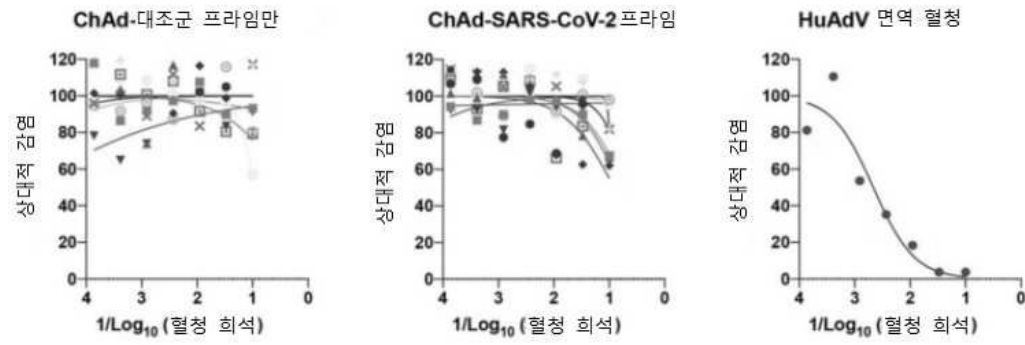
도면2d



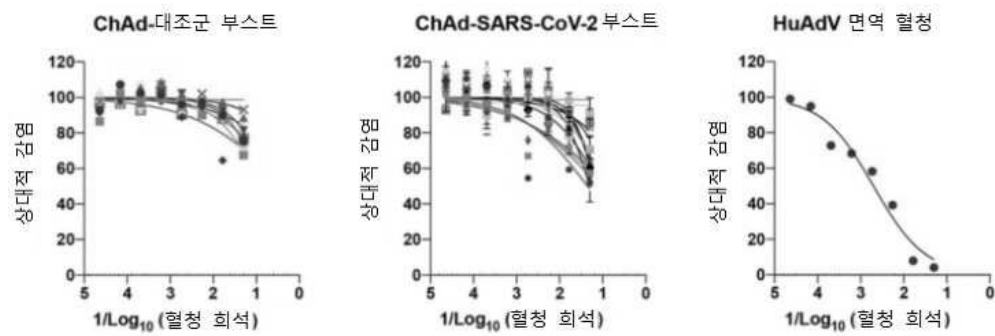
도면3



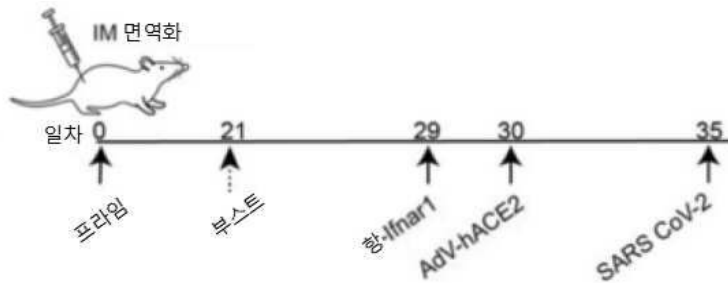
도면4a



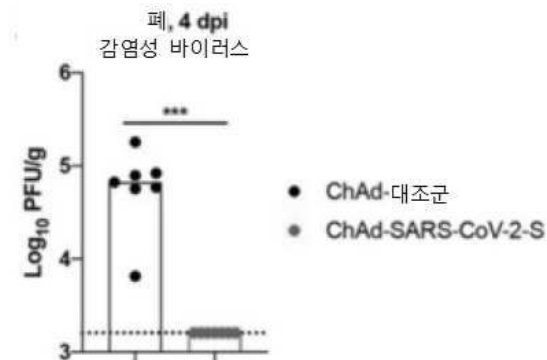
도면4b



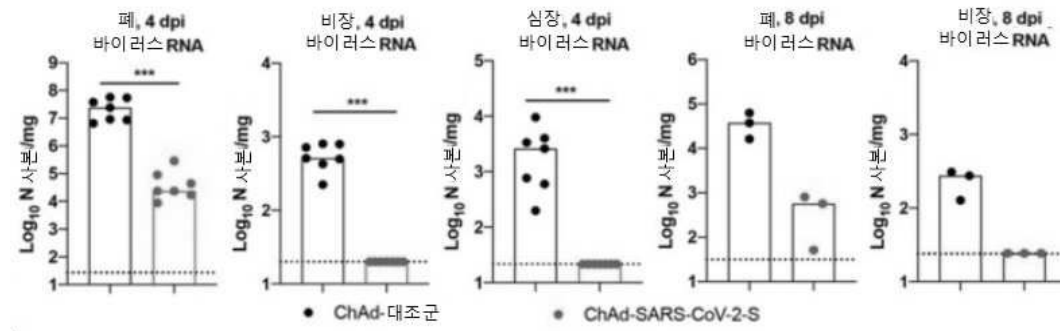
도면5a



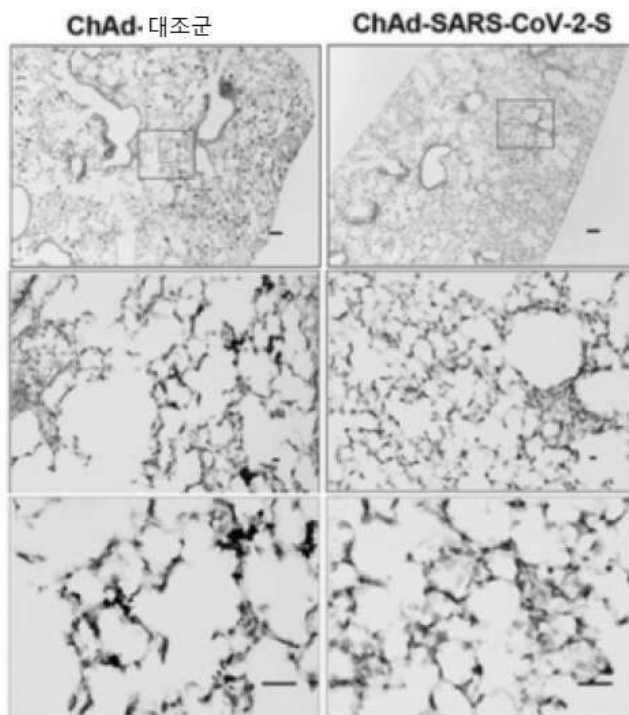
도면5b



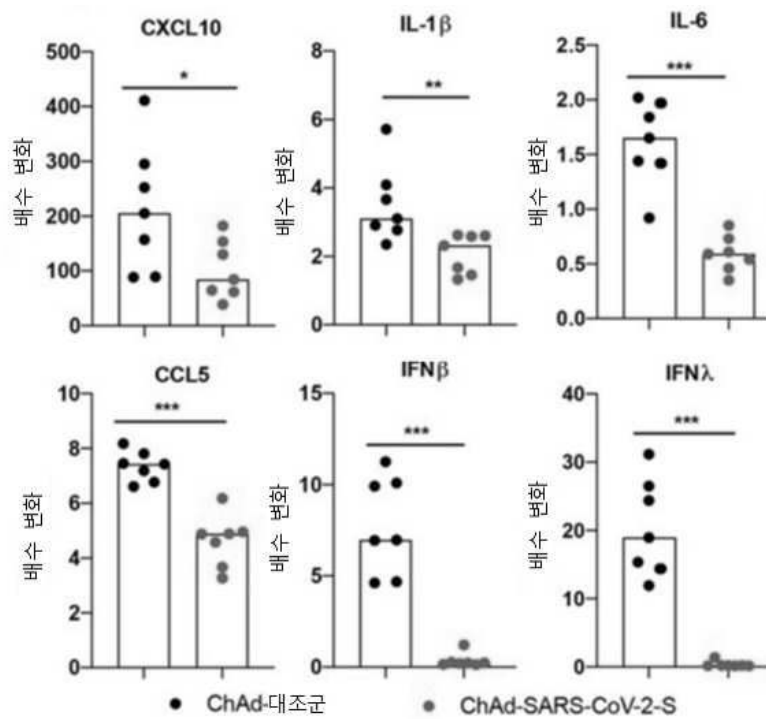
도면5c



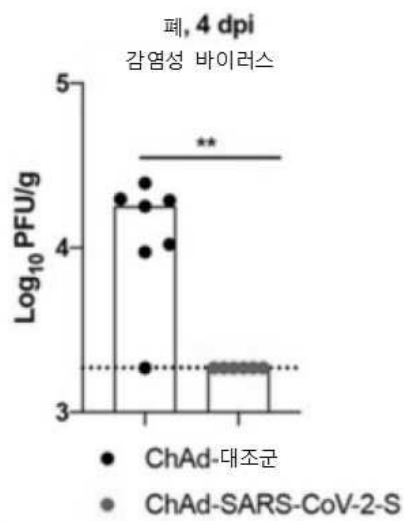
도면5d



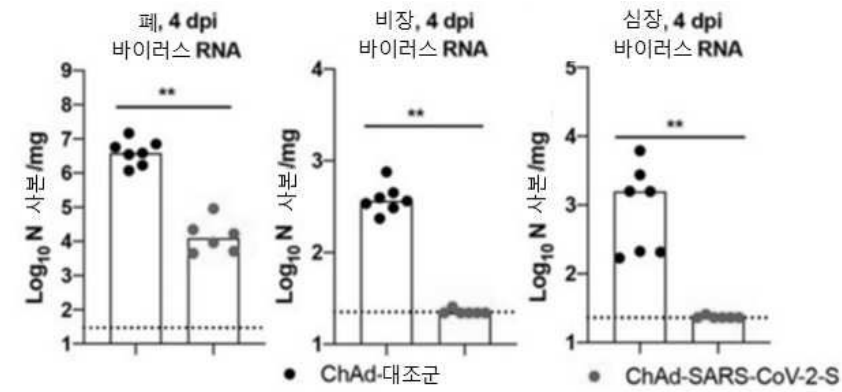
도면5e



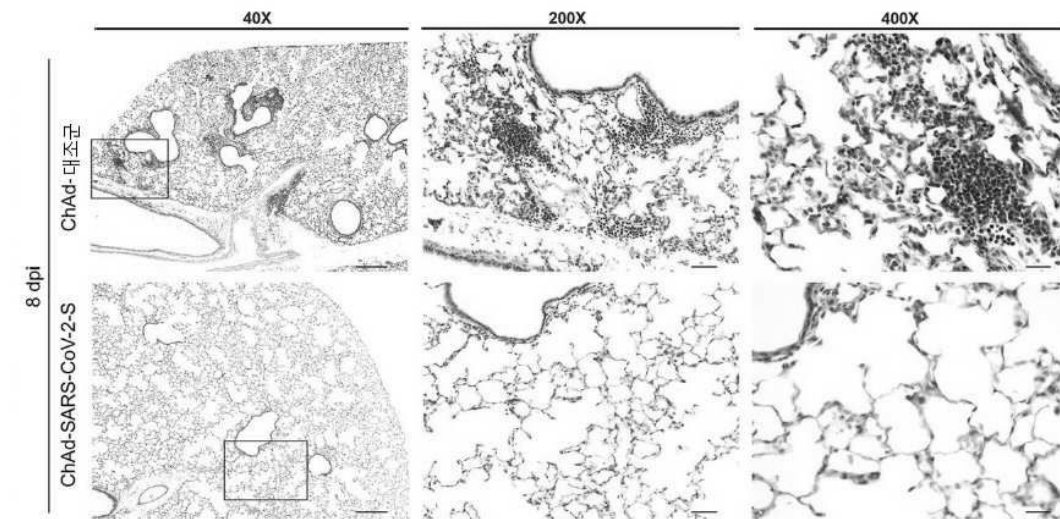
도면5f



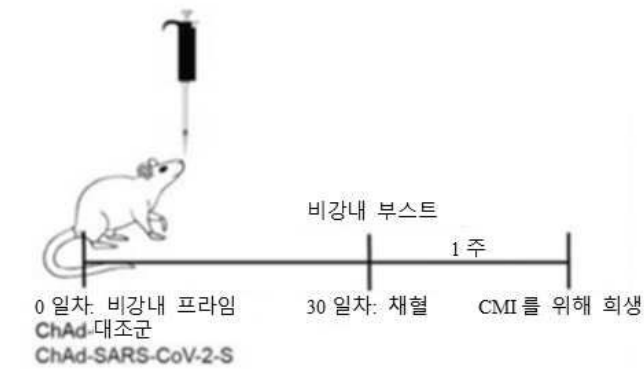
도면5g



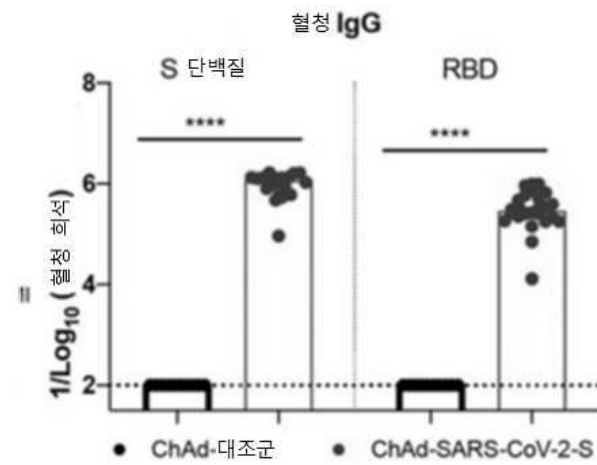
도면6



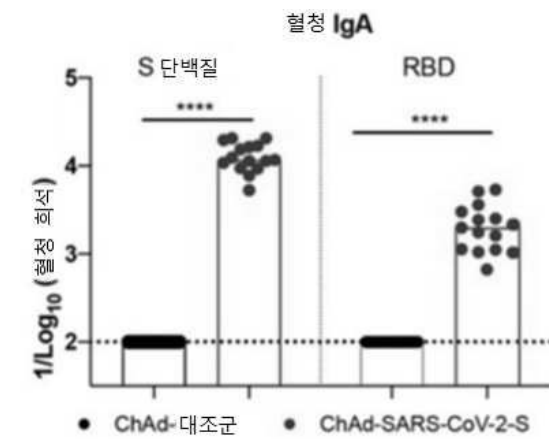
도면7a



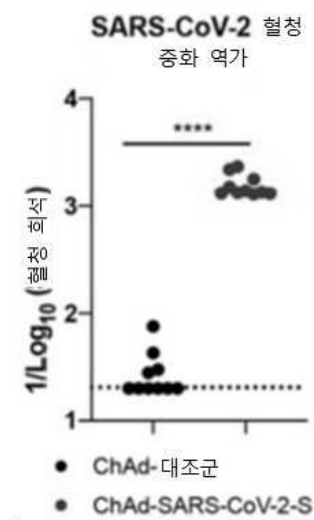
도면7b



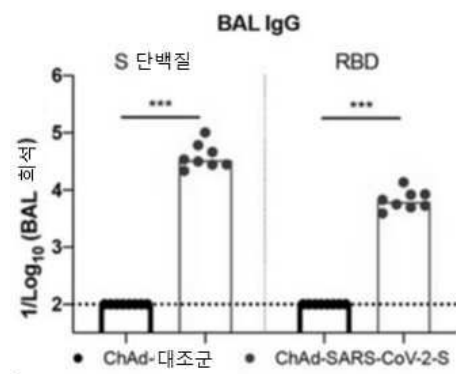
도면7c



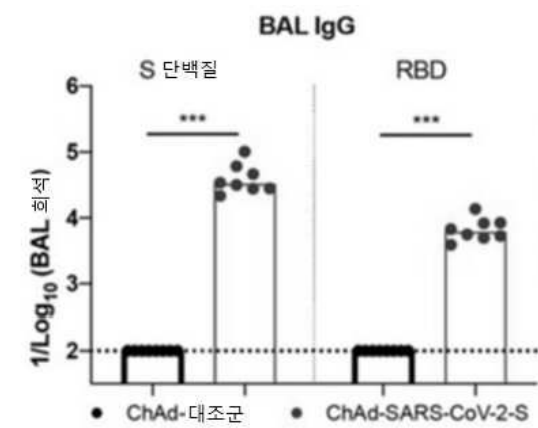
도면7d



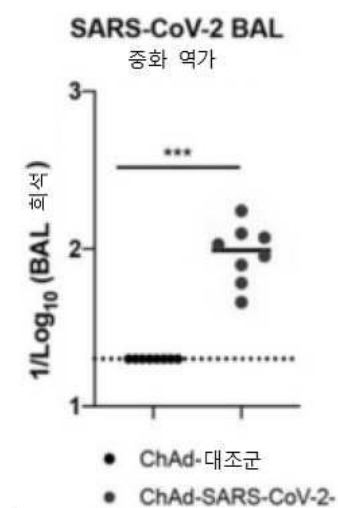
도면7e



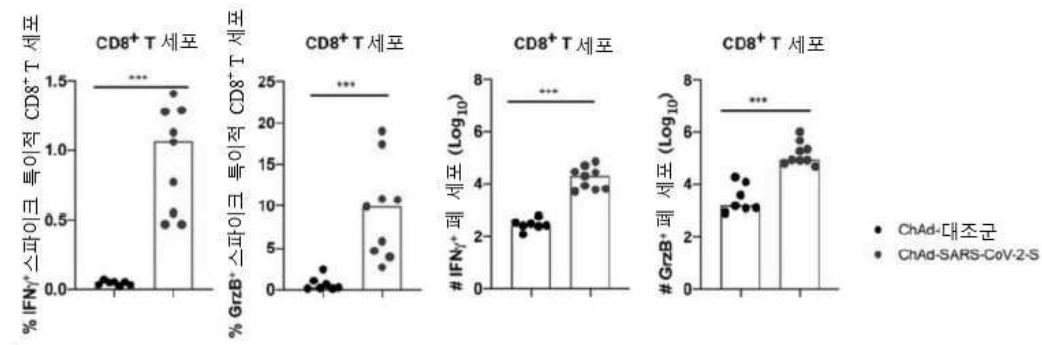
도면7f



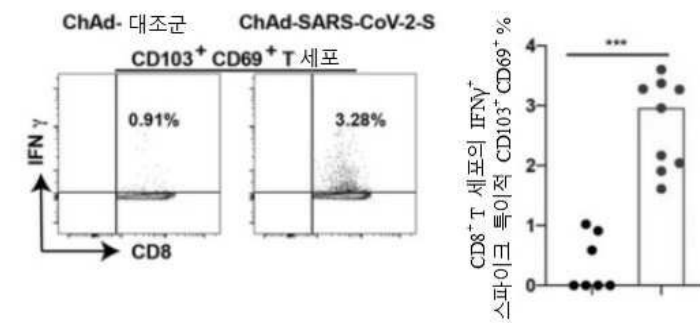
도면7g



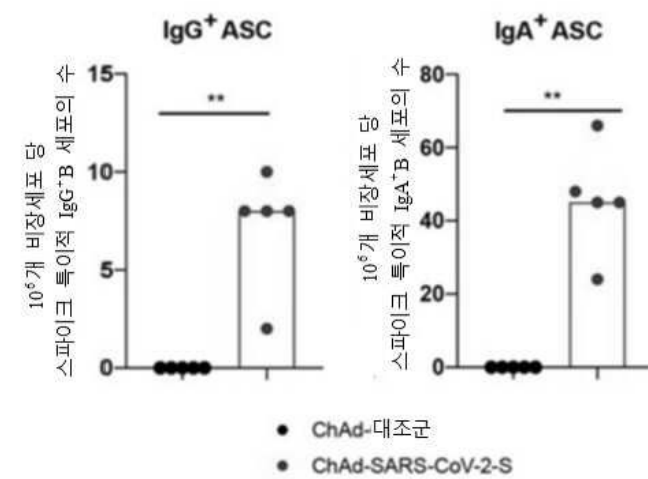
도면7h



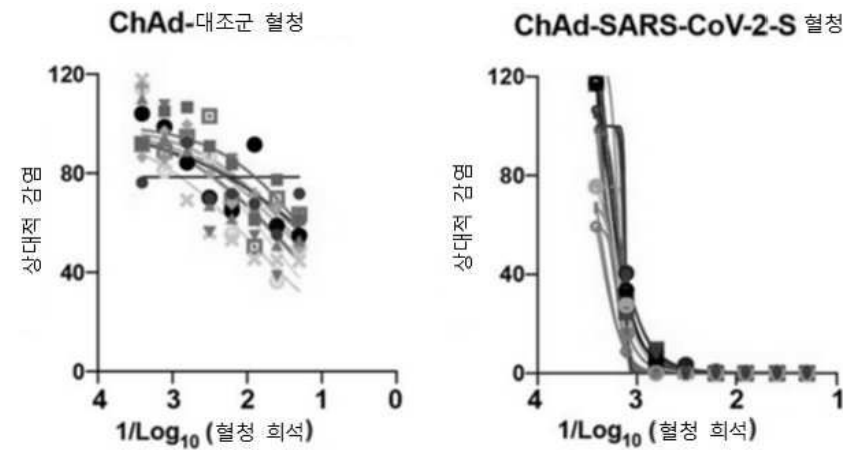
도면7i



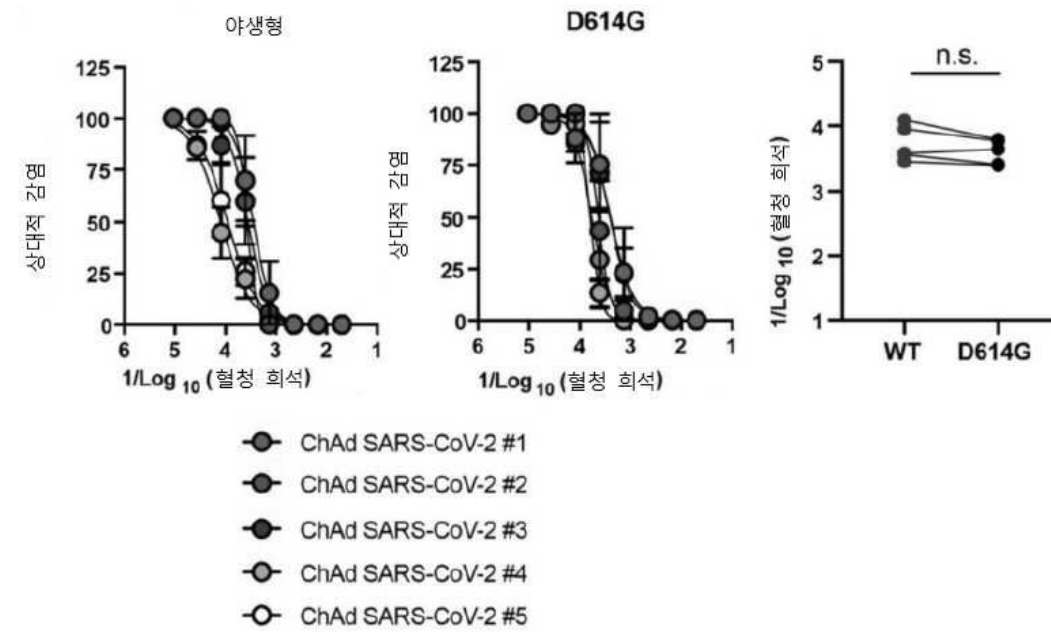
도면7j



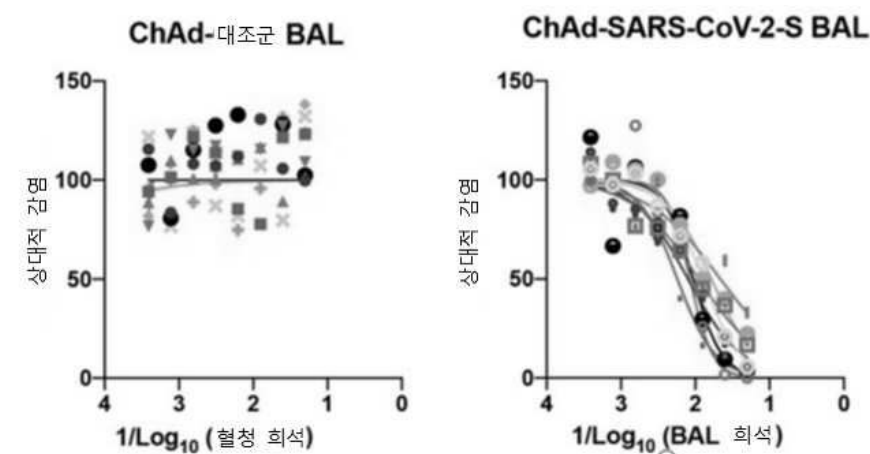
도면8a



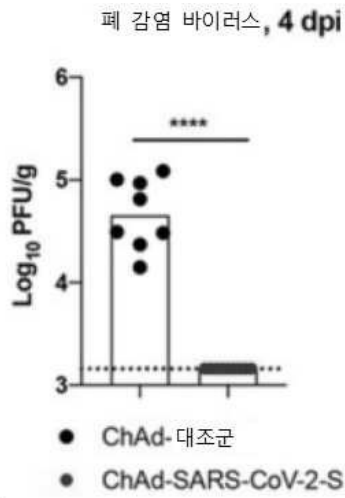
도면8b



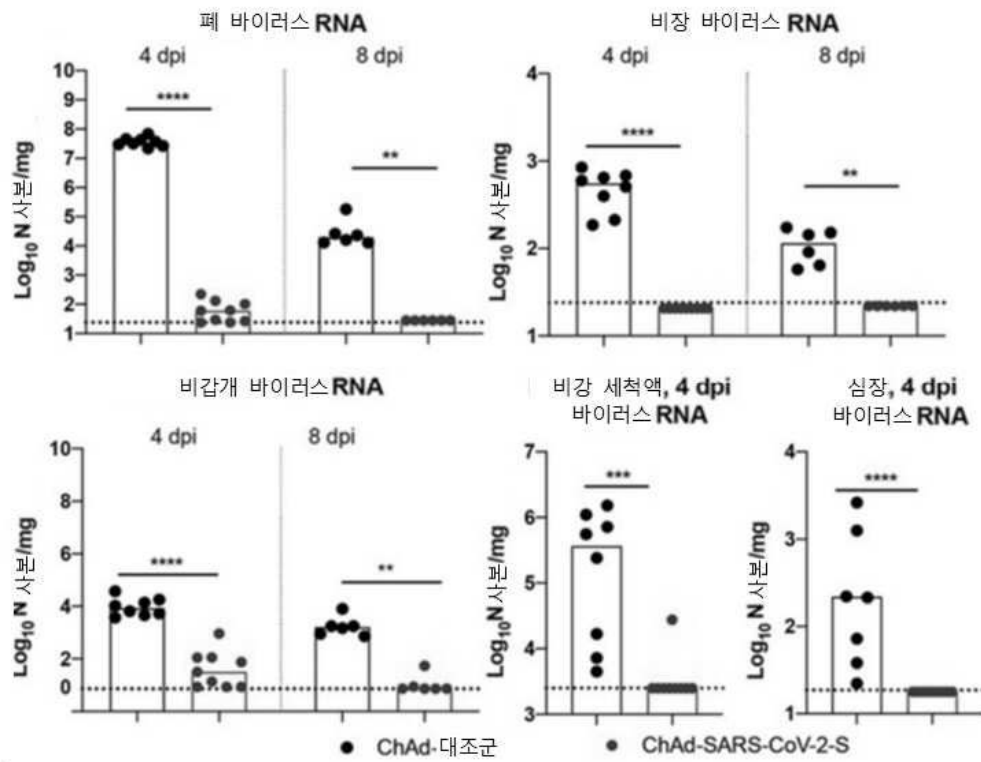
도면8c



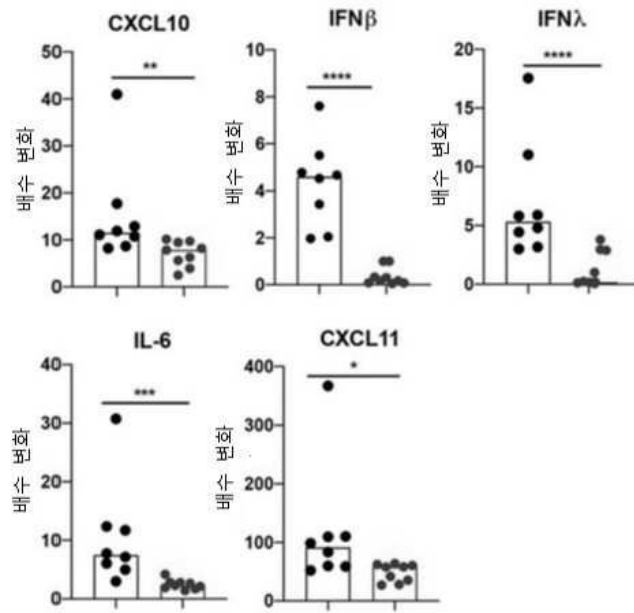
도면9a



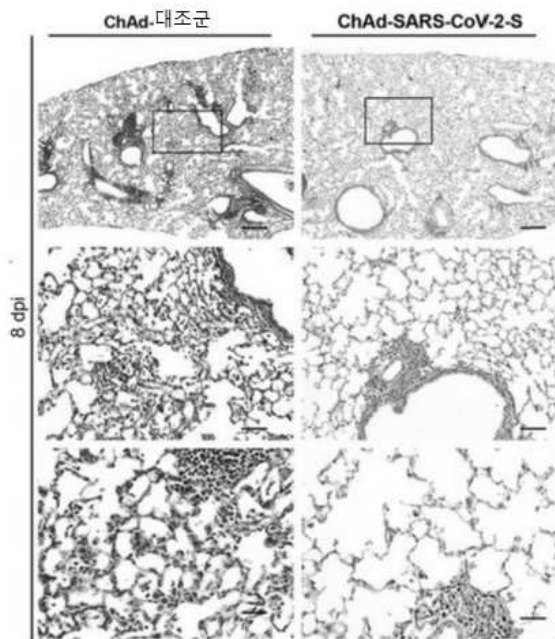
도면9b



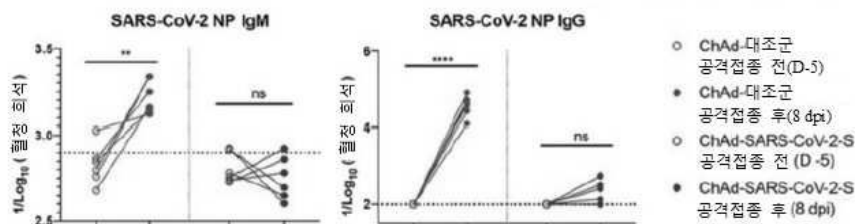
도면9c



도면9d

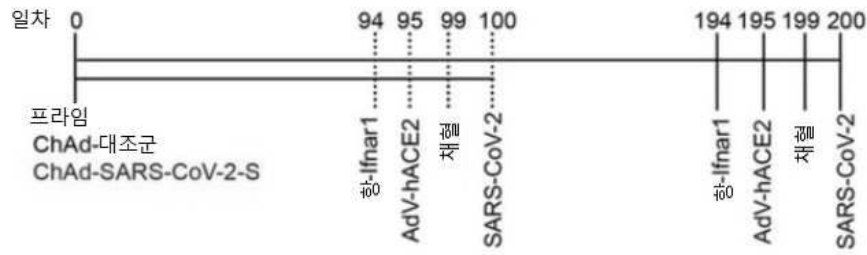


도면9e

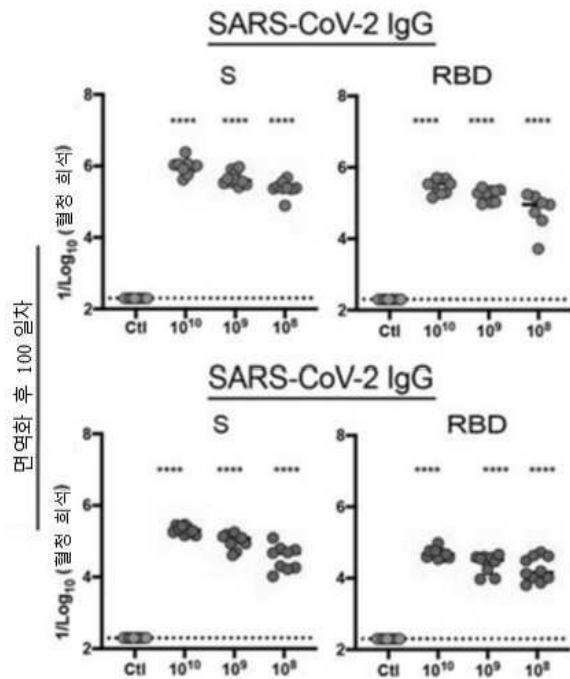


- ChAd-대조군 공격접종 전(D-5)
- ChAd-대조군 공격접종 후(8 dpi)
- ChAd-SARS-CoV-2-S 공격접종 전 (D-5)
- ChAd-SARS-CoV-2-S 공격접종 후 (8 dpi)

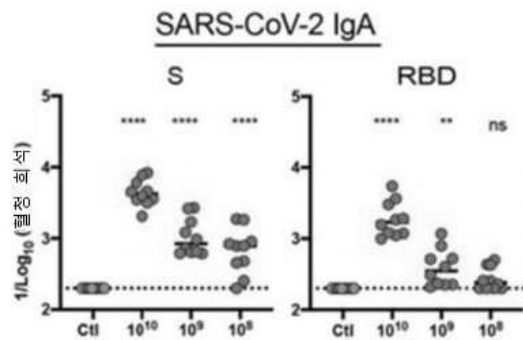
도면10a



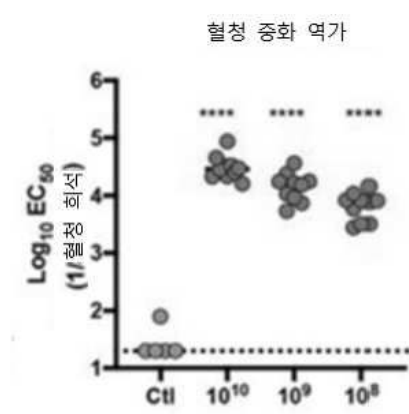
도면10b



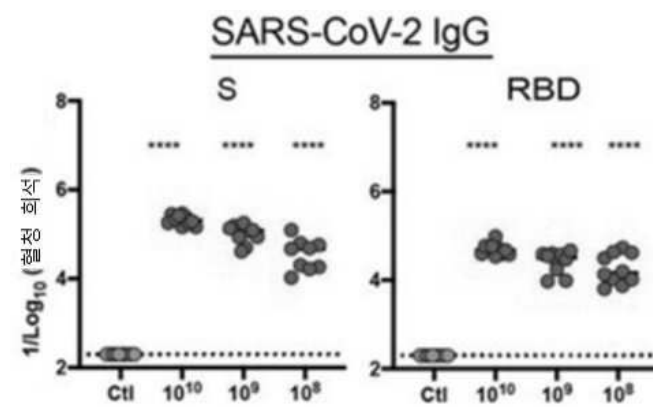
도면10c



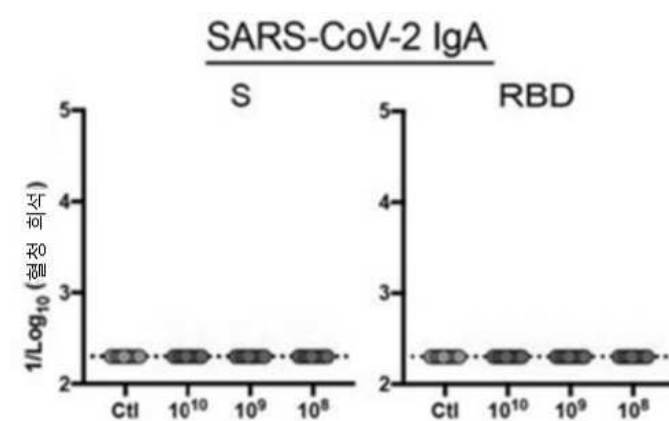
도면10d



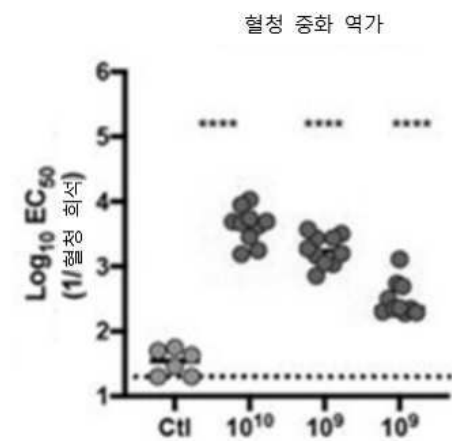
도면10e



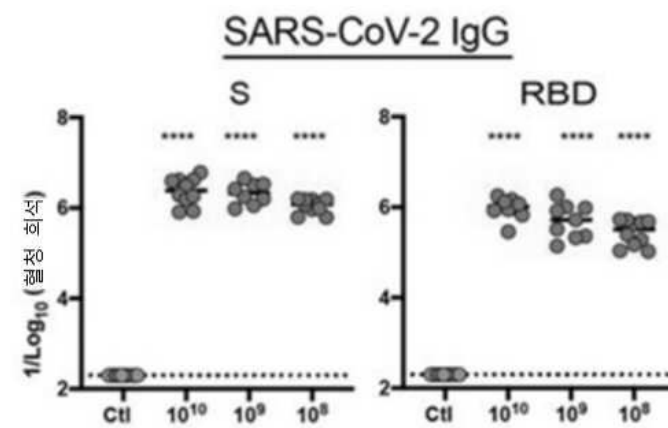
도면10f



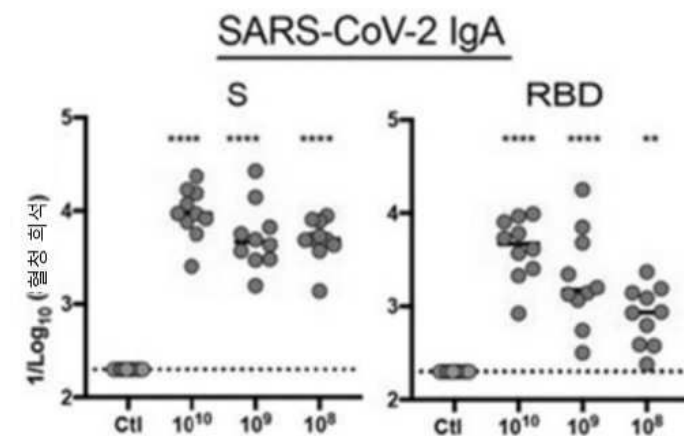
도면10g



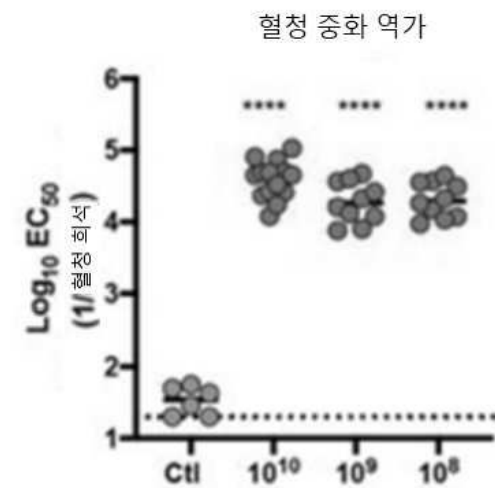
도면10h



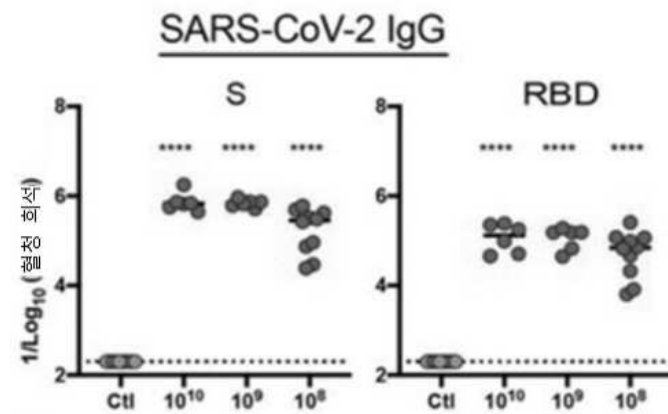
도면10i



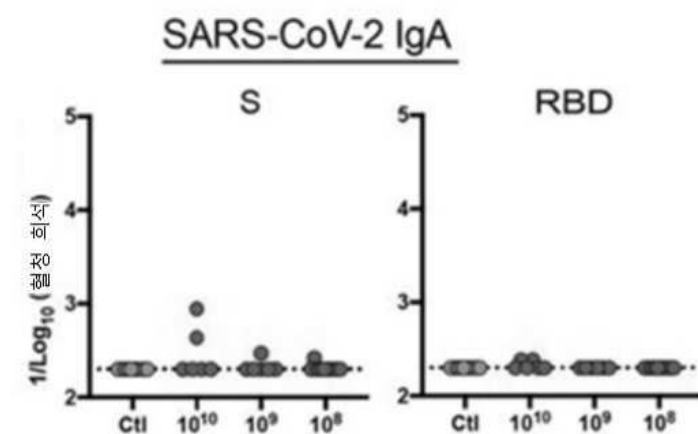
도면10j



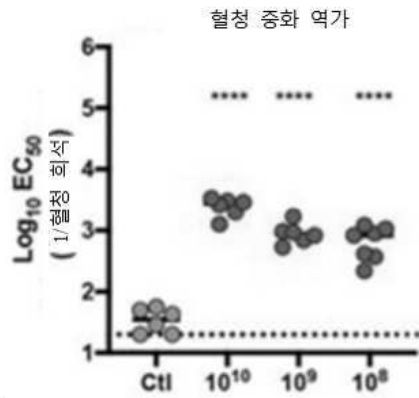
도면10k



도면10l



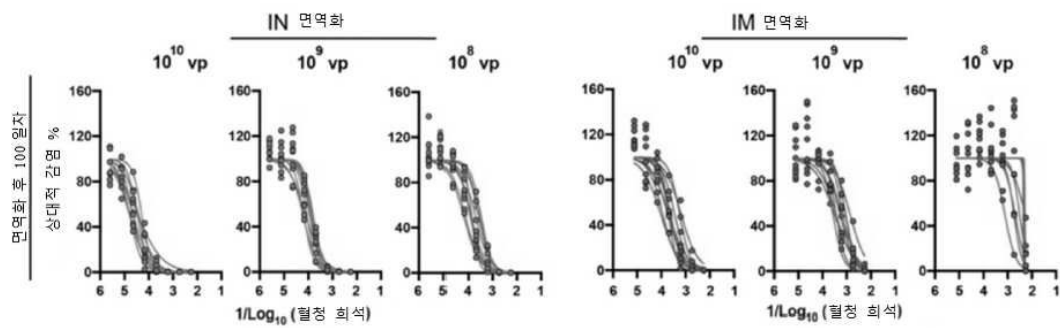
도면10m



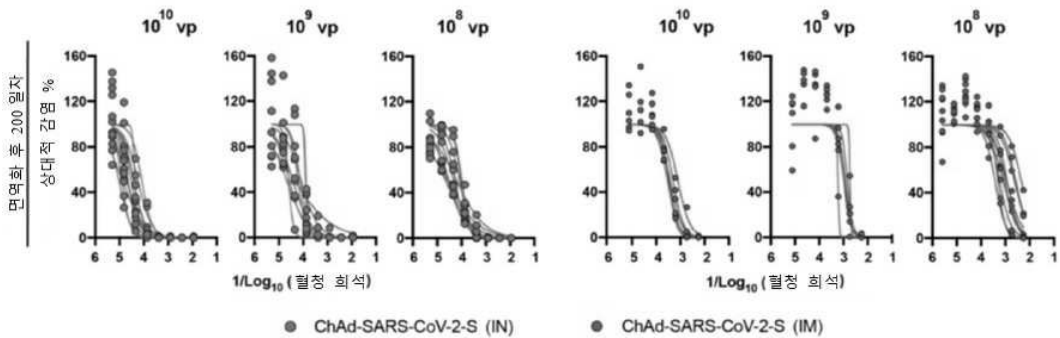
도면10n



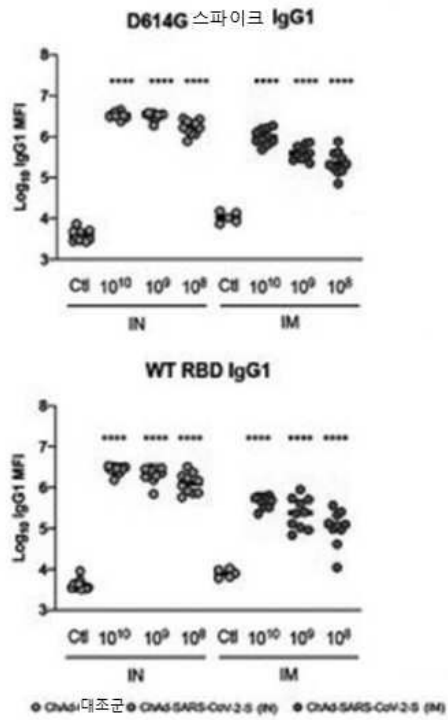
도면11a



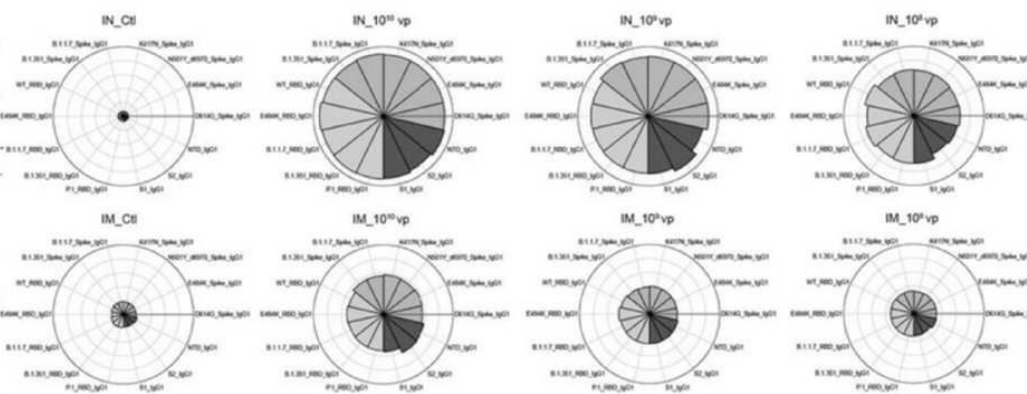
도면11b



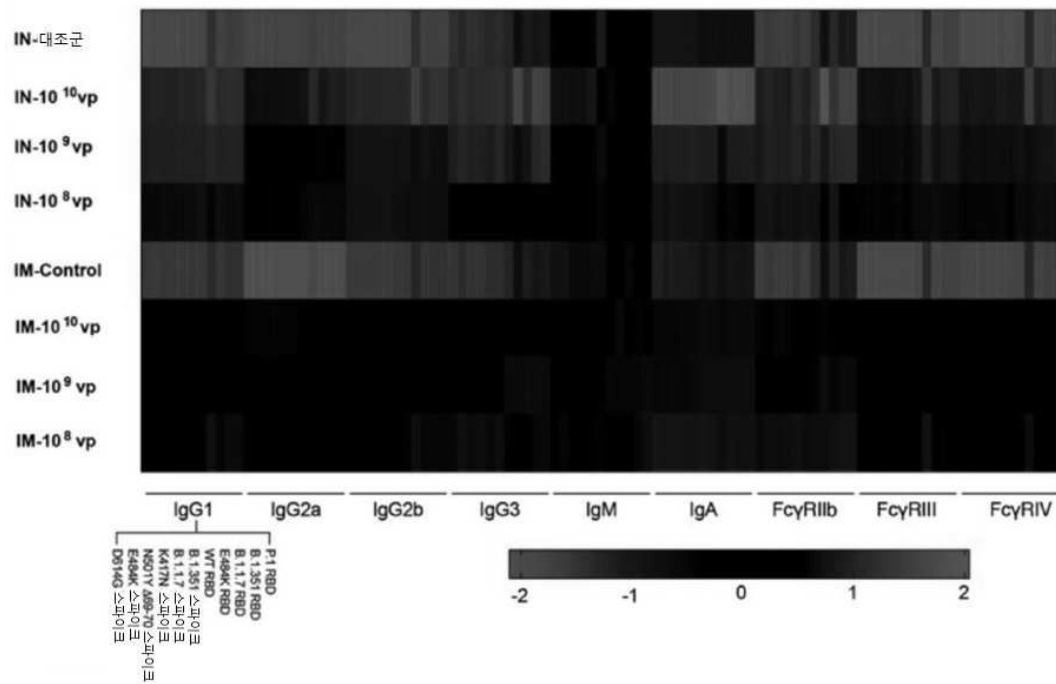
도면12a



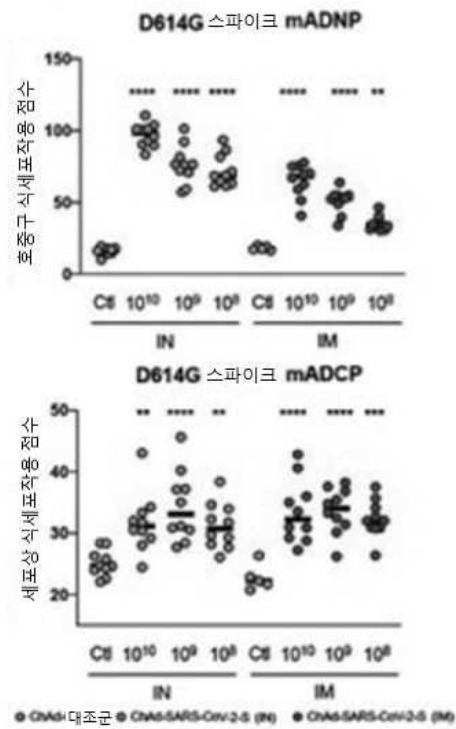
도면12b



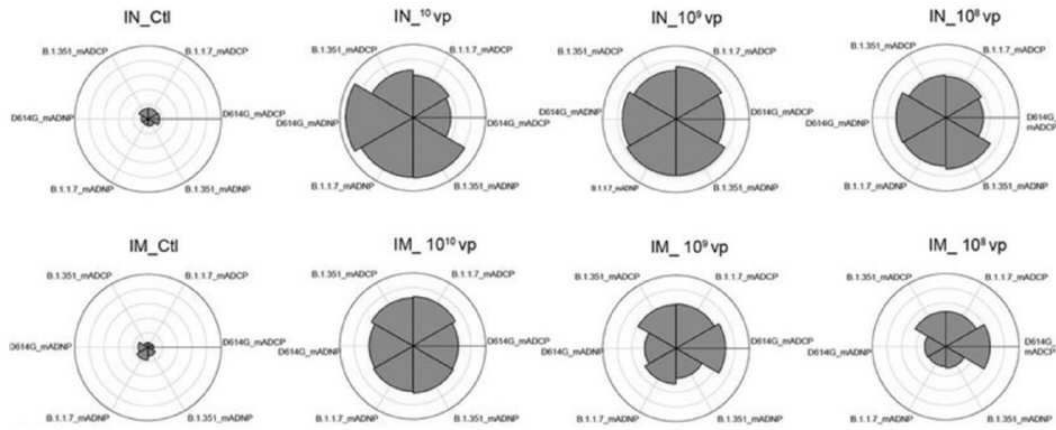
도면12c



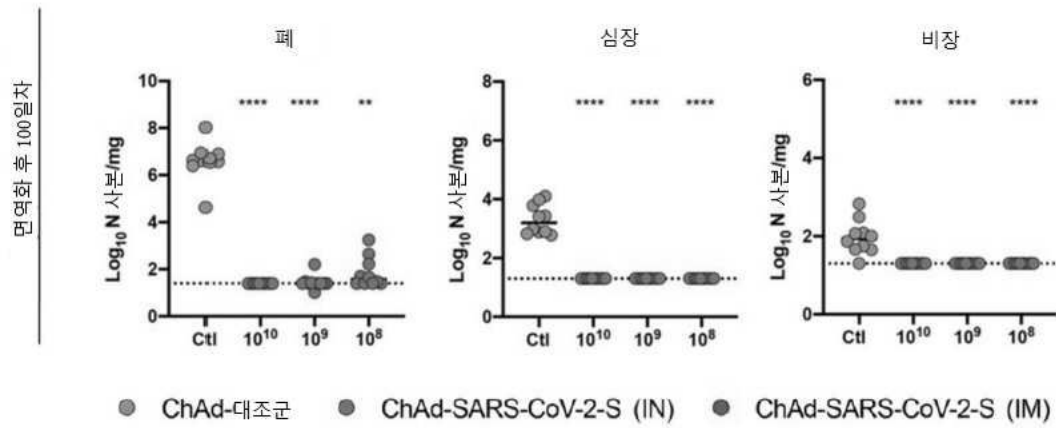
도면12d



도면12e



도면13abc

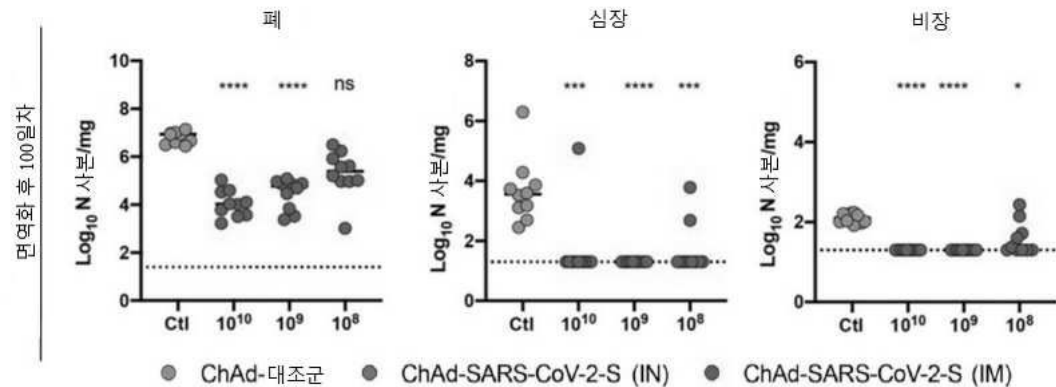


도. 13A

도. 13B

도. 13C

도면13def

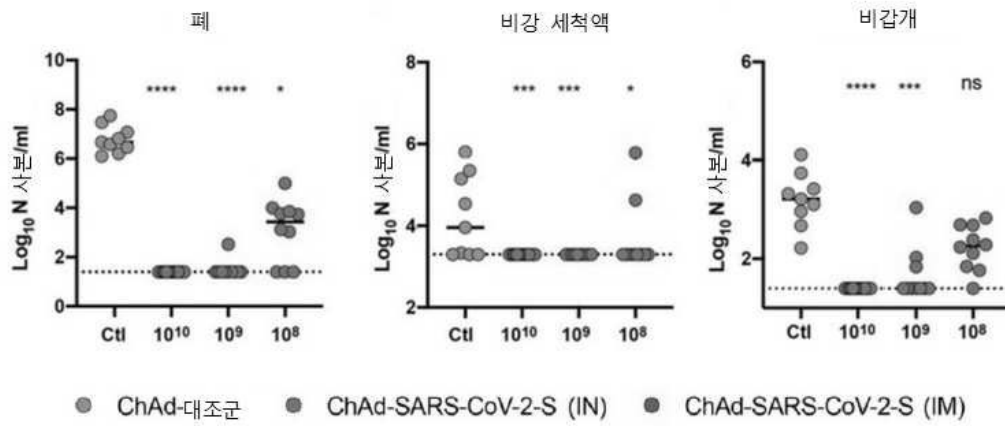


도. 13D

도. 13E

도. 13F

도면13ghi

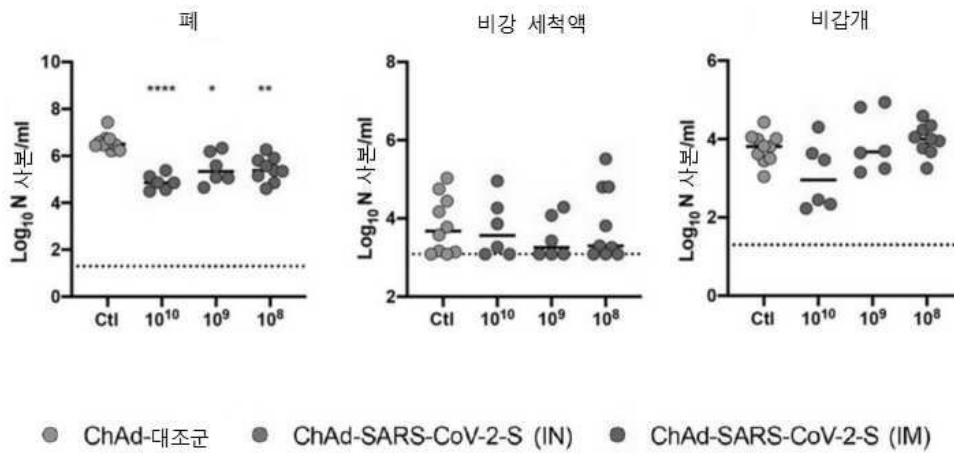


도. 13G

도. 13H

도. 13I

도면13jkl

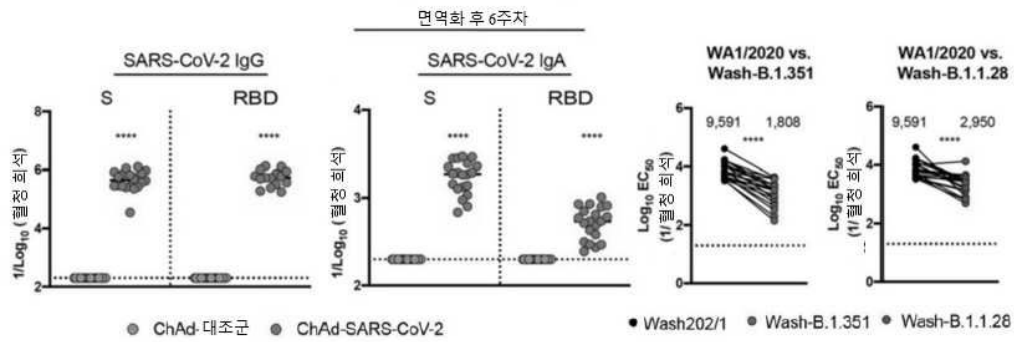


도. 13J

도. 13K

도. 13L

도면14

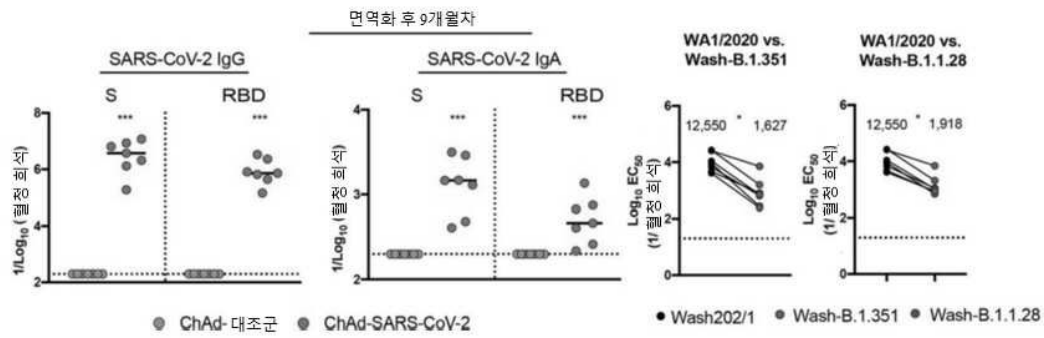


도. 14A

도. 14B

도. 14C

도. 14D



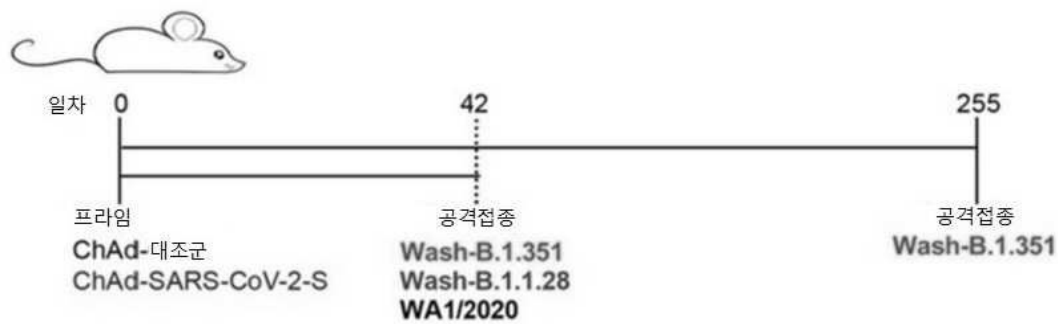
도. 14E

도. 14F

도. 14G

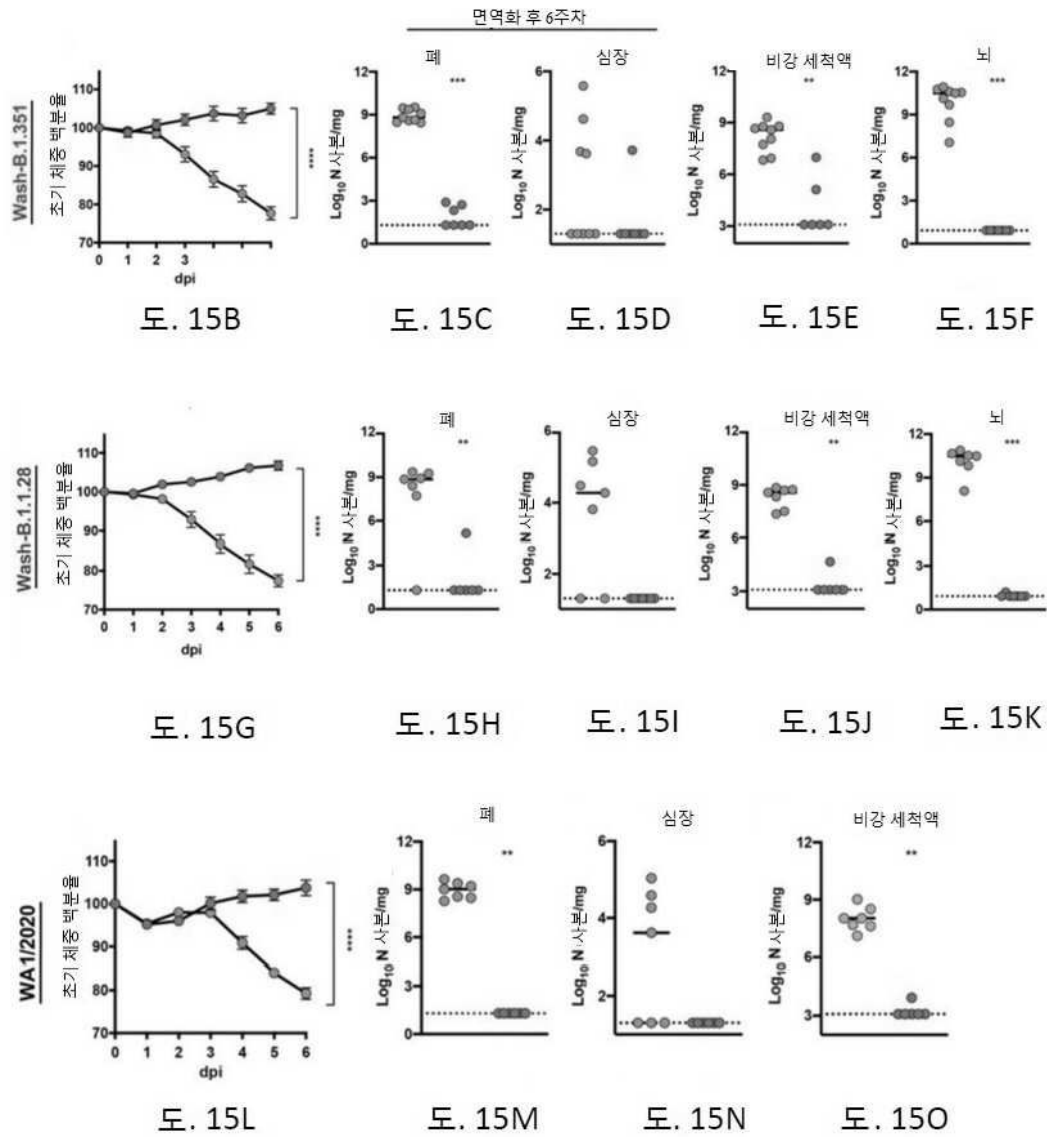
도. 14H

도면15a

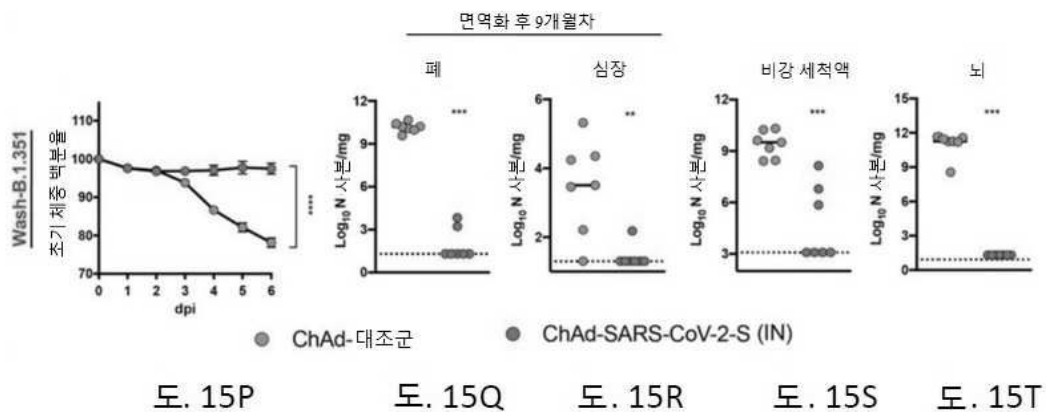


도. 15A

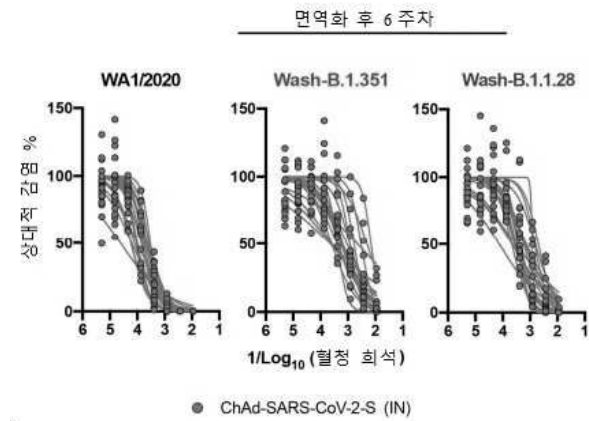
도면15b



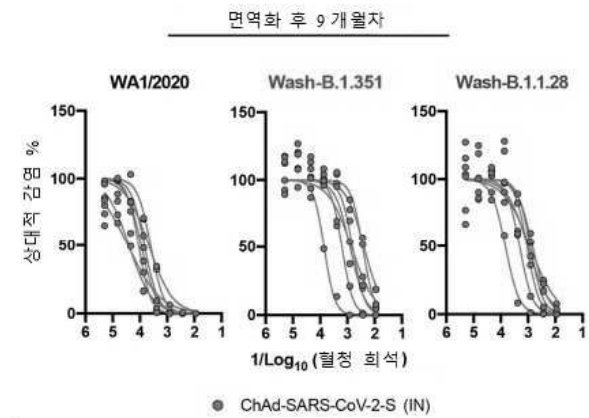
도면15c



도면16a



도면16b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Washington University

<120> CORONAVIRUS VACCINE

<130> 019478/US

<150> 63/162,417

<151> 2021-03-17

<150> 63/051,103

<151> 2020-07-13

<150> 63/032,815

<151> 2020-06-01

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6602

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 1

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtea	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcgggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc	240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aaggcgatc ggtgcgggcc tcttcgtat	300
tacgccagct ggcgaaagg ggatgtgctg caaggcgatt aagtgggta acgccagggt	360
tttcccagtc acgacgtgtg aaaacgacgg ccagtgaatt cgagctcggc acctcgcgaa	420
tgcactaga tatccactcc caggccaac tgcagccggc accgccacca tgtttgtctt	480
tctcgtgctc ctccctctcg tctcatcca gtgcgtgaac ctgactactc ggaccagct	540
ccctcccgt tacaccaact cttcacaag ggcgtgtac taccgcgaca aggtgttag	600
aagctccgtg ctgactcta cacaggatct gtttctgcct ttctttagca acgtgacctg	660
gttccacgct atccacgtgt ctggcaccaa cggaacaaag aggttcgaca acccagtgt	720
gccctttaac gatggcgtgt acttcgcctc taccgagaag agcaacatca tcagaggctg	780
gatctttgga accacactgg actccaagac acagtctctg ctgacgtga acaacgccac	840
caacgtggtc atcaagggtg gcgagttcca gttttgtaac gatccattcc tgggcgtgta	900
ctaccacaag aacaacaaga gctggatgga gtccgagttt agagtgtact ctacgcgcaa	960
caactgcaca tttagagtac tgtccagcc ctctctgatg gacctggagg gcaagcaggg	1020
aaacttcaag aacctgcggg agttctgtgt taagaacatc gatggctact ttaagatcta	1080
ctctaagcac accccaatca acctgggtgcg cgacctgcca cagggttca gcgcctgga	1140
gccactgggtg gatctgcccc tcggaatcaa catcaccagg ttccagacac tgctggccct	1200
gcacagaagc tacctgacac caggcgactc ctctagcgga tggaccgtg gagctgctgc	1260
ttactacgtg ggctacctgc agccccggac ctctctgctg aagtacaac agaacggaac	1320
catcacagac gctgtggatt gcgcctgga tccctgagc gagacaaagt gtacactgaa	1380
gtcctttacc gtggagaagg gcactacca gacatccaac ttccgggtgc agcctaccga	1440
gtctatcgtg cgctttccca acatcacaaa cctgtgccct ttgggagagg tgttcaacgc	1500
taccgccttc gccagcgtgt acgcttgga ccggaagcgc atctctaact gcgtggccga	1560

ctacagcgtg ctgtacaact ccgcttcttt cagcaccttt aagtgtctacg gcgtgtcccc	1620
tacaaagctg aacgacctgt gctttaccaa cgtgtacgcc gattctttcg tgatcagggg	1680
agacgaggtg cgccagatcg ctcccgcca gacaggaaag atcgtgact acaactacaa	1740
gctgcctgac gatttcaccg gctgcgtgat cgcctggaac agcaacaacc tggattccaa	1800
agtgggcgga aactacaact acctgtacag gctgtttaga aagagcaacc tgaagccatt	1860
cgagcgggac atctctacag agatctacca ggctggaagc accccatgca acggagtgga	1920
gggcttcaac tgttacttcc ctctgcagtc ctacggattc cagccaacaa acggcgtggg	1980
ataccagccc taccgcgtgg tggctgtgag ctttgagctg ctgcacgctc ctgtacagt	2040
gtgcggacca aagaagtcca ccaacctggt gaagaacaag tgcgtgaact tcaacttta	2100
cggactgacc ggcacaggag tgctgaccga gtccaacaag aagttcctgc cttttcagca	2160
gttcggccgg gacatcgccg ataccacaga cgtgtgcgc gaccctcaga ccctggagat	2220
ccctggacatc acaccatgct ctttcggcgg agtgagcgtg atcacaccag gaaccaacac	2280
aagcaaccag gtggccgtgc tgtaccagga cgtgaactgt accgaggtgc ccgtggctat	2340
ccacgccgat cagctgacct ctacatggag ggtgtacagc accggctcca acgtgttcca	2400
gacaagagcc ggctgtctga tcggagctga gcacgtgaac aactcctacg agtgcgacat	2460
ccctatcggc gccggaatct gtgtcttcta ccagaccag aaaaactctc caaggagagc	2520
caggagcgtg gtttccagt ctatcatgct ctacaccatg tccctgggcg ccgagaactc	2580
tgtggcttac ttaacaaca gcatcgctat ccctaccaac ttcacaatct ctgtgaccac	2640
agagatcctg ccagtgtcca tgaccaagac atctgtggac tgcacaatgt acatctgtgg	2700
agattctacc gagtgcagca acctgtgct gcagtacggc agcttttcta ccagctgaa	2760
cagagccctg acaggaatcg ctgtggagca ggacaagaac acacaggagg tgttcgcca	2820
ggtgaagcag atctacaaga cccccctat caaggacttt ggcggttca acttttcca	2880
gatcctgccc gatccttcca agccatctaa gaggagcttt atcgaggacc tgctgttcaa	2940
caaggtgacc ctggctgatg ccggttcat caagcagtac ggcgattgcc tgggagacat	3000
cgtgccagg gacctgatct gtgccagaa gtttaacgga ctgaccgtgc tgccaccct	3060
gctgacagat gagatgatcg ctcatgacac aagcgccctg ctggctggaa ccatcacatc	3120
cggatggacc ttcggcgtg gagctgcct gcagatcccc tttgccatgc agatggetta	3180
ccggttcaac ggcatcggag tgaccagaa cgtgctgtac gagaaccaga agctgatcgc	3240
caaccagttt aactccgcta tcggcaagat ccaggacagc ctgtcctcta cagcttccgc	3300
cctgggaaag ctgcaggatg tggtaacca gaacgtcag gcctgaaca ccctggtgaa	3360
gcagctgagc tccaacttcg gcgcatctc tagcgtgctg aacgacatcc tgagcaggct	3420

ggacaaggtg gaggctgagg tgcagatcga caggctgatac acaggaagac tgcagtctct 3480

gcagacctac gtgacacagc agctgatcag ggctgctgag atcagggcta gcgccaacct 3540

ggctgccacc aagatgtccg agtgctgtct gggccagtct aagagagtgg acttttgtgg 3600

caagggatac cacttgatgt ccttccccca gtctgccctt cacggagtgg tgtttctgca 3660

cgtgacctac gtgccagctc aggagaagaa cttcaccaca gctcccacca tctgccacga 3720

tggcaaggcc cactttcttc gggagggcgt gttcgtgtcc aacggaacct actggtttgt 3780

gacacagcgc aactttctac agccacagat catcaccaca gacaacacat tcgtgtctgg 3840

caactgtgac gtggtcatcg gaatcgtgaa caacaccgtg tacgatactc tgcagccaga 3900

gctggacagc tttaaggagg agctggataa gtacttcaag aaccacacct ccccgacgt 3960

ggatctgggc gacatcagcg gaatcaacgc ctccgtggtg aacatccaga aggagatcga 4020

caggctgaac gaggtggtca agaacctgaa cgagagcctg atcgatctgc aggagctggg 4080

caagtacgag cagtlacatca agtggccttg gtacatctgg ctgggcttca tcgccggact 4140

gatcgctatc gtgatggatga ccatcatgct gtgctgtatg acatcctgct gttcttgctt 4200

gaaggctgc tgtagtgtg gatctgtctg taaattcgat gaggacgatt ccgagcctgt 4260

gctgaagggc gtgaaactcc attacacctg aatcgattgc ggccgctctc gagtctagct 4320

gatatcggat cccgggcccc tgcactgcag aggcctgcat gcaagcttgg cgtaatcatg 4380

gtcatagctg ttctctgtgt gaaattgtta tccgtcaca attccacaca acatacgagc 4440

cggaagcata aagtgtaaag cctggggtgc ctaatgagt agctaactca cattaattgc 4500

gttgcgtca ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat 4560

cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc tcttccgtt cctcgctcac 4620

tgactcgctg cgctcggtc ttcgctgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcgggt 4680

aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca 4740

gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttcata ggctccgccc 4800

ccctgacgag catcacaaaa atcgacgtc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact 4860

ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctctg cgctctctg ttcggacctt 4920

gccgcttacc ggataacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag 4980

ctcacgtgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca 5040

cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa 5100

cccggtaaga cagacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc 5160

gaggtatgta ggcgggtgcta cagagtcttt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag 5220
aagaacagta ttgtgtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttag 5280
tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg ttgcaagca 5340
gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc 5400
tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag 5460
gatcttcacc tagatctttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata 5520
tgagtaaaact tggctctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat 5580

ctgtctatct cgttcaccca tagttgctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg 5640
ggagggttta ccatctggcc ccagtgtgct aatgataccg cgagaccac gctcacggc 5700
tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagcgagaa gtggtcctgc 5760
aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc 5820
gccagttaat agtttgcga acgttgttgc cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc 5880
gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc 5940
ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc ctccggctct ccgatcgttg tcagaagtaa 6000

gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat 6060
gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata 6120
gtgtatgccc cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca 6180
tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag 6240
gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc 6300
agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc 6360
aaaaaaggga ataaggcgca cacgaaatg ttgaatactc atactcttc tttttcaata 6420

ttattgaagc attatcagg gttattgtct catgagcgga tacatattg aatgtattta 6480
gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgcac ctgacgtcta 6540
agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg 6600
tc 6602

<210> 2
<211> 40403
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 2
taaccccatc atcaataata tacctcaaac ttttgggtgc cgtaatatg caaatgagct 60

gtttgaattt ggggatgcgg ggctgtgatt ggctgtggga gcggcgaccg ttaggggcgg 120

ggcgggtgac gttttgatga cgtgtttgtg aggcggagcc ggtttgcaag ttctcgtggg 180

aaaagtgacg tcaaacgagg tgtggtttga acacggaaat actcaatttt cccgcgtctt 240

ctgacaggaa atgaggtgtt tctgggcgga tgcaagtga aacgggccat tttcgcgca 300

aaactgaatg aggaagtga aatctgagta atttcgcgtt tatggcaggg aggagtattt 360

gccgagggcc gactagactt tgaccgatta cgtgggggtt tcgattaccg tatttttcac 420

ctaaatttcc gcgtacggtg tcaaagtcg gtgtttttac atcatttccc cgaaaagtgc 480

cacctgacgt aactataacg gtcctaaggt gatcaccgat ccagacatga taagatacat 540

tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaata aaatgcttta ttgtgaaat 600

ttgtgatgct attgctttat ttgtaacct tataagctgc aataaacaag ttcccggatc 660

tttctagcta gtctagacta gctagactcg agagcgccg caatcgattc aggtgtaatg 720

gagtttcacg cccttcagca caggctcgga atcgctctca tcgaatttac agcaggatcc 780

acagctacag cagcccttca ggcaagaaca gcaggatgtc atacagcaca gcatgatggt 840

caccatcacg atagcgatca gtccggcgat gaagccagc cagatgtacc aaggccactt 900

gatgtactgc tcgtacttgc ccagctcctg cagatcgatc aggtctctct tcaggttctt 960

agccacctcg ttcagcctgt cgatctctt ctggatgttc accacggagg cgttgattcc 1020

gctgatgtcg ccagatcca cgtcggggga ggtgtggttc ttgaagtact tatccagctc 1080

ctccttaaag ctgtccagct ctggctgcag aggatcgatc acggtgttgt tcacgattcc 1140

gatgaccacg tcacagtgc cagacacgaa tgtgttgtct gtggtgatga tctgtggctc 1200

glagaagtgt cgctgtgtca caaaccagt ggttccgttg gacacgaaca cgccctccc 1260

aggaaagtgg gccttgccat cgtggcagat ggccggagct gtggtgaagt tcttctcctg 1320

agctggcacg taggtcacgt gcagaaacac cactccgtga ggggcagact gggggaagga 1380

catcaggtgg tatcccttgc caaaaagtc cactctctta gactggcca gcacgactc 1440

ggacatcttg gtggcagcca ggttggcgct agccctgac tcagcagccc tgatcagctg 1500

ctgtgtcacg taggtctgca gagactgcag tcttctgtg atcagcctgt cgatctgcac 1560

ctcagcctcc acctgttcca gcctgctcag gatgtcgttc agcacgctag agatggcgcc 1620

gaagtggag ctacgtgct tcaccagggt gttcagggcc tgagcgttct ggttcaccac 1680

atcctgcagc ttcccaggc cggaagctgt agaggacagg ctgtcctgga tcttgccgat 1740

agcggagtta aactggttgg cgatcagctt ctggttctcg tacagcacgt tctgggtcac 1800

tccgatgccg ttgaaccggt aagccatctg catggcaaag gggatctgca gggcagctcc	1860
agcgccgaag gtccatccgg atgtgatggt tccagccagc agggcgcttg tgtactgagc	1920
gatcatctca tctgtcagca ggggtggcag cacggtcagt ccgttaaact tctgggcaca	1980
gatcagggtc ctggcagcga tgtctcccag gcaatcgccg tactgcttga tgaagccggc	2040
atcagccagg gtcaccttgt tgaacagcag gtccctcgata aagctcctct tagatggctt	2100
ggaaggatcg ggcaggatct gggaaaagt ttgaatcccca aagtccttga tagggggggt	2160
ctttagatc tgcttcacct gggcgaacac ctccctgtgtg ttcttgtcct gctccacagc	2220
gattcctgtc agggctctgt tcagctgggt acaaaagctg ccgtactgca gcagcaggtt	2280
gtcgcactcg gtagaatctc cacagatgia cattgtgcag tccacagatg tcttggtcat	2340
ggacactggc aggatctctg tggtcacaga gatttgtgaag ttggtaggga tagcgatgct	2400
gttgtagtag taagccacag agttctcggc gccccaggac atggtgtagg cgatgataga	2460
ctgggaagcc acgctcctgg ctctccttgg agagtttgtc tgggtctggt aagaagcaca	2520
gattccggcg ccgataggga tgctgcactc gtaggagttg ttcacgtgct cagctccgat	2580
cagacagccg gctcttgtct ggaacacgtt ggagccggtg ctgtacaccc tccatgtagg	2640
ggtcagctga tcggcggtga tagccacggg cacctcggta cagttcacgt cctggtagac	2700
cacggccacc tggttgcttg tgttggttcc tgggtgtatc acgctcactc cgccgaaaga	2760
gcatggtgtg atgtccagga tctccagggt ctgagggtcg cgcacagcgt ctgtggtatc	2820
ggcgatgtcc cgccgaact gctgaaaagg caggaaacttc ttgttggtact cggtcagcac	2880
tcctgtgccg gtcagtcctg taaagttgaa gttcacgcac ttgttcttca ccaggttgg	2940
ggacttcttt ggctccgaca ctgtagcagg agcgtgcagc agctcaaagc tcagcaccac	3000
cacgcggtag ggctgggtatc ccacgccgtt tgttggtctg aatccgtagg actgcagagg	3060
gaagtaacag ttgaagccct ccactccgtt gcatggggtg cttccagcct ggtagatctc	3120
tgtagagatg tcccgtctga atggcttcag gttgtcttt ctaaacagcc tgtacaggta	3180
gtttagttt cgccccactt tggaatccag gttgttctg ttccaggcga tcacgcagcc	3240
ggtgaaatcg tcaggcagct tgtagttgta gtcagcgatc tttcctgtct ggccgggagc	3300
gatctggcgc acctcgtctc ccctgatcac gaaagaatcg gcgtacacgt tggtaaagca	3360
caggctgttc agcttttagt gggacacgcc gtagcactta aaggtgctga aagaagcgga	3420
gttgtacagc acgtgtagt cggccacgca gtagagatg cgcttccggt tccaagcgta	3480
cacgtggcg aagcgggtag cggtgaacac ctctccaaa gggcacaggt ttgtgatgtt	3540
gggaaagcg acgatagact cggtaggctg caccggaag ttggatgtct ggtagatgcc	3600
cttctccag gtaaaggact tcagtgtaca ctttgtctcg ctccagggat ccaggcgca	3660

atccacagcg tcgtgatgg ttccgttctc gttgtacttc agcaggaagg tccggggctg	3720
caggtagccc acgtagtaag cagcagctcc agcgggccat ccgctagagg agtcgcctgg	3780
tgtcaggtag cttctgtgca gggccagcag tgtctgaaac ctggtgatgt tgattccgat	3840
gggcagatcc accagtggct ccaggcgct gaagccctgt ggcaggtcgc gcaccaggtt	3900
gattggggtg tgcttagagt agatcttaaa gtagccatcg atgttcttaa acacgaactc	3960
ccgcaggttc ttgaagtttc cctgcttgcc ctccaggtcc atcaggaagg gctgggacac	4020
glactcaaat gtgcagttgt tggcgctaga gtacactcta aactcggact ccatccagct	4080
cttgttgttc ttgtggtagt acacgccag gaatggatcg ttacaaaact ggaactcgca	4140
cacctgatg accacgttgg tggcgttgtt cacgatcagc agagactgtg tcttgagtc	4200
cagtgtggtt ccaaagatcc agcctctgat gatgttgctc ttctcggtag aggcgaagta	4260
cacgccatcg ttaaagggca gcaactgggtt gtcgaacctc tttgttccgt tgggtgccaga	4320
cacgtggata gcgtggaacc aggtcacgtt gctaaagaaa ggcagaaaca gatcctgtgt	4380
agagtgcagc acggagcttc taaacacctt gtcggggtag tacacgcccc ttgtgaagga	4440
gttgggtgtaa gcgaggagga gctgggtccg agtagtcagg ttacgcact gggatgagac	4500
gagagggagg agcacgagaa agacaaacat ggtggcggta ccggtgcag ttggacctgg	4560
gagtggacac ctgtggagag aaaggcaaag tggatgtcat tgtcactcaa gtgtatggcc	4620
agatctcaag cctgccacac ctcaagtga gccaaggggg tgggcctata gactctatag	4680
gcggtactta cgtcactctt ggcacgggga atccgcgttc caatgcaccg ttcccggccg	4740
cggaggctgg atcgggtccc gtgtcttcta tggaggtaaa aacagcgtgg atggcgtctc	4800
caggcgatct gacggttac taaacagact cgtcgacgat ctctatcact gatagggaga	4860
tctctatcac tgataggag agctctgctt atatagacct ccacacctac acgcctaccg	4920
cccatttgcg tcaatggggc ggagttgtta cgacattttg gaaagtcccg ttgattttgg	4980
tgccaaaaca aactccatt gacgtcaatg ggtggagac ttggaaatcc ccgtgagtca	5040
aaccgtatc cagccatt gatgtactgc caaaaccgca tcaccatgtt aatagcgatg	5100
actaatcgt agatgtactg ccaagtagga aagtccata aggtcatgta ctgggcataa	5160
tgccaggcgg gccatttacc gtcattgacg tcaatagggg gcgtacttgg catatgatac	5220
acttgatgta ctgccaagt ggcagtttac cgtaaatact ccaccattg acgtcaatgg	5280
aaagtcccta ttggcgttac tatgggaaca tacgtcatta ttgacgtcaa tgggcggggg	5340
tcgttggcg gtcagccagg cgggccattt accgtaagtt atgtaacgcg gaactccata	5400
tatgggctat gaactaatg ccccgtaatt gattactatt aataactaga ggcctgacca	5460
tctggtgctg gcctgcacca gggccgagtt tgggtctagc ttaagtttga tccgatcttt	5520

ttccctctgc caaaaattat ggggacatca tgaagccct tgagcatctg acttctggct	5580
aataaaggaa atttattttc attgcaatag tgtgttgga ttttttgtgt ctctcactcg	5640
gaagcgatct gaattcatct atgtcgggtg cggagaaaga ggtaatgaaa tggcattatg	5700
ggtattatgg gtctgcatta atgaatcggc cagattatgc tggccaccgt gcatgtggcc	5760
tcgcaccccc gcaagacatg gcccaggttc gagcacaacg tcatgaccg atgcaacgtg	5820
cacctgggct cccgcgagg catgttcatg cctaccagt gcaacatgca atttgtgaag	5880
gtgctgctgg agcccgatgc catgtccaga gtgagcctga cgggggtgtt tgacatgaat	5940
gtggagctgt ggaaaattct gagatatgat gaatccaaga ccaggtgccg ggcctgcgaa	6000
tgcggaggca agcacgccag gcttcagccc gtgtgtgtgg aggtgacgga ggacctgcga	6060
cccgatcatt tgggtgtgtc ctgcaacggg acggagtctg gctccagcgg ggaagaatct	6120
gactagagtg agtagtgttt ggggctgggt gggagtctgc atgatgggca gaatgactaa	6180
aatctgtgtt ttctgtgtg ttgcagcagc atgagcggaa gcgcctcctt tgagggaggg	6240
gtattcagcc cttatctgac ggggcgtctc cctcctggg cgggagtgcg tcagaatgtg	6300
atgggatcca cggtgacgg cgggccgtg cagcccgaac actcttcaac cctgacctac	6360
gcgacctga gctcctctg cgtggacgca gctgccgccg cagctgctgc ttccgccgcc	6420
agcgcctgct gcggaatggc cctgggcgcc ggctactaca gctctctggt ggccaactcg	6480
agttccacca ataattccgc cagcctgaac gaggagaagc tgttgctgct gatggcccag	6540
ctcgaggctc tgaccacgag cctgggcgag ctgaccacgc aggtggctca gctgcaggcg	6600
gagacgctgg ccgcggttgc caggtgaaa accaaataaa aaatgaatca ataaataaac	6660
ggagacggtt gttagtttta acacagagtc ttgaatcttt atttagtttt tcgcgcgcgg	6720
taggccttgg accaccgtc tcgatcattg agcaccgggt ggatcttttc caggaccggg	6780
tagaggtggg cttggatgtt gaggtacatg ggcatgagcc cgtcccgggg gtggaggtag	6840
ctccattgca gggcctctgt ctcggggggt gtgttgtaaa tcaccacgtc atagcagggg	6900
cgcagggcat ggtgttgac aatatctttg aggaggagac tgatggccac gggcagccct	6960
ttggtgtagg tgtttataaa tctgttgagc tgggagggat gcatgcgggg ggagatgagg	7020
tgcattctgg cctggatctt gagattggcg atgttaccgc ccagatccc cctggggttc	7080
atgttgtgca ggaccaccag caggtgtat ccggtgcact tggggaattt atcatgcaac	7140
ttggaaggga aggcgtgaaa gaatttggcg acgcccttgt gcccggccag gttttccatg	7200
cactcatcca tgatgatggc gatgggcccg tgggcggcgg cctgggcaaa gacgtttcgg	7260

gggtcggaca catcatagtt gtggtcctgg gtgagctcgt cataggccat tttaatgaat	7320
ttggggcgga ggggtccccg ctgggggacg aaggtgccct cgatcccggg ggcgtagttg	7380
ccctcgcaga tctgcatctc ccaggccttg agctcggagg gggggatcat gtccacctgc	7440
ggggcgatga aaaaaacggt ttccggggcg ggggagatga gctgggccga aagcaggttc	7500
cggagcagct gggacttgcc gcagccggtg ggaccgtaga tgaccccgat gaccggctgc	7560
aggtgtagt tgaggagag acagctgccg tcctcgcgga ggaggggggc cacctcgttc	7620
atcatctcgc gcacatgcat gttctcgcgc acgagttccg ccaggaggcg ctgccecccc	7680
agcgagagga gctcttgacg cgaggcgaag tttttcagcg gcttgagccc gtcggccatg	7740
ggcatttttg agagggtctg ttgcaagagt tccagacggt cccagagctc ggtgatgtgc	7800
tctagggcat ctgatccag cagacctctt cgtttcgcgg gttggggcga ctgcgggagt	7860
agggcaccag gcgatggcg tccagcgagg ccagggtccg gtccttcag gggcgagg	7920
tccgcgtcag cgtggtctcc gtcacggtga aggggtgcgc gccgggctgg gcgcttcga	7980
gggtgcgctt caggctcatc cggttggtcg agaaccgtc ccggtcggcg cctgcgcgt	8040
cggccaggta gcaattgagc atgagttcgt agttgagcgc ctgcggccgc tggcccttgg	8100
cgcgagctt acctttgaa gtgtgtccgc agacgggaca gaggaggac ttgaggcg	8160
agagcttggg ggcgaggaag acggactcgg gggcgtaggc gtccgcgccg cagctggcg	8220
agacggtctc gactccacg agccagggtga ggtcggggcg gtcggggtca aaaacagg	8280
ttctccgtg ctttttgat cgtttcttac ctctggtctc catgagttcg tgtccccgt	8340
gggtgacaaa gaggtgtcc gtgtccccgt agaccgactt tatgggccgg tcctcgagcg	8400
gggtgccgcg gtctcgtcg tagaggaacc ccgcccactc cgagacgaag gcccggtcc	8460
aggccagcac gaaggaggcc acgtgggagg gtagcggtc gttgtccacc agcgggtcca	8520
ccttctccag ggtatgcaag cacatgtccc cctcgtccac atccaggaag gtgattggt	8580
tgtaatgtga ggccacgtga ccgggggtcc cggccggggg ggtataaaag gggcgggcc	8640
cctgctcgc ctactgtct tccggtcgc tgtccaggag cgccagctgt tgggtaggt	8700
attccctctc gaaggcgggc atgacctcgg cactcagggt gtcagtttct agaaacagg	8760
aggatttgat attgacggtg ccgttggaga cgctttcat gagccctcg tccatctggt	8820
cagaaaagac gatctttttg ttgtcgagct tggtagcgaa ggagccgtag agggcgttgg	8880
agaggagctt ggcgatggag cgcatggtct ggttcttttc cttgtcggcg cgctccttgg	8940
cgcgcatgtt gagctgcacg tactcgcgcg ccacgcactt ccattcgggg aagacggtgg	9000
tgagctcgc gggcacgatt ctgacccgcc agcccggtt gtgcagggtg atgaggtcca	9060
cgctggtggc cacctcgcgc gcagggggt cgttgggtcca gcagggcg cgcaccttgc	9120

gcgagcagaa ggggggcagc ggggtccagca tgagctcgtc gggggggtcg gcgtccacgg	9180
tgaagatgcc gggcaggagc tcggggtcga agtagctgat gcaggtgccc agatcgtcca	9240
gcgccgcttg ccagtcgctc acggccagcg cgcgctcgta ggggctgagg ggcattgcccc	9300
agggcatggg gtgcgtgagc gcagaggcgt acatgccgca gatgtcgtag acgtagaggg	9360
gctcctcgag gacgccgatg taggtggggt agcagcgcgc cccgcggatg ctggcgcgca	9420
cgtatctgta cagctcgtgc gagggcgcgga ggagccccgc gccgaggttg gagcgtcgcg	9480
gcttttcggc gcggtagacg atctggcgga agatggcgtg ggagttggag gagatggtgg	9540
gcctctgtaa gatgttgaag tgggcgtggg gcaggccgac cgagtccttg atgaagtggg	9600
cgtaggagtc ctgcagcttg gcgacgagct cggcgggtgac gaggacgtcc agggcgagct	9660
agtcgagggt ctcttgatg atgtcgtact tgagctggcc cttctgttc cacagctcgc	9720
ggttgagaag gaactcttcg cggtccttcc agtactcttc gagggggaac ccgtcctgat	9780
cggcacggta agagcccacc atgtagaact ggttgacggc cttgtaggcg cagcagccct	9840
tctccacggg gagggcgtaa gcttcgcgg ccttgcgcag ggaggtgttg gtgagggcga	9900
aggtgtcgcg caccatgacc ttgaggaact ggtgcttgaa gtcgaggtcg tcgcagccgc	9960
cctgtcctca gagctggaag tccgtgcgct tctttaggc ggggttgggc aaagcgaaag	10020
taacatcgtt gaagaggatc ttgcccgcgc ggggcataaa gttgcgagt atgcgaaag	10080
gctggggcac ctgcgccgg ttgttgatga cctgggcggc gagcacgac tcgtcgaagc	10140
cgttgatgtt gtggcccacg atgtagagt ccacgaaccg tgggcggccc ttgacgtggg	10200
gcagcttctt gagctcctcg taggtgagct cgtcagggtc gctgagcccg tgctgtcga	10260
gggcccagtc ggcgagatgg tggttggcgc ggaggaagga agtccagaga tccacggcca	10320
gggcggtttg cagacggtc cggctactgac ggaactgctg gccgacggcc attttttcgg	10380
gggtgacgca gtagaagggt cgggggtccc cgtgccagcg atccatttg agctggaggg	10440
cgagatcgag ggcgagctcg acgaggcggc cgtccccgga gagtttcatg accagcatga	10500
aggggacgag ctgcttgccg aaggaccca tccaggtgta ggtttccaca tcgtaggtga	10560
ggaagagcct ttcggtgcga ggatgcgagc cgatggggaa gaactggatc tctgccacc	10620
aattggagga atggctgttg atgtgatgga agtagaaatg ccgacggcgc gccgaacact	10680
cgtgcttgtg ttatatacag cgccacagc gctcgcaacg ctgcacggga tgcacgtgct	10740
gcacgagctg tacctgagtt cctttgacga ggaatttcag tgggaagtgg agtcgtggcg	10800
cctgcatctc gtgctgtact acgtcgtggt ggtcggcctg gccctcttct gcctcgatgg	10860
tggatcatgct gacgagcccc gcggggaggc aggtccagac ctggcgcgga gcgggtcgga	10920
gagcgaggac gagggcgcg aggccggagc tgtccagggt cctgagacgc tgcggagtca	10980

ggtcagtggg cagcggcggc gcgcggttga cttgcaggag ttttccagg gcgcgcggga	11040
ggtcagatg gtacttgatc tccaccgcgc cgttgggtggc gacgtcgatg gcttgcaggg	11100
tcccgtgccc ctggggagtg accaccgtcc cccgtttctt cttgggcgtt gcttccatgc	11160
cggtcagaag cggcggcgag gacgcgcgc gccgcggcaga ggccggctcgg ggcccggagg	11220
cagggggcgc aggggcacgt cggcgccgcg cgcgggtagg ttctggtact gcgcccggag	11280
aagactggcg tgagcgacga cgcgacggtt gacgtcctgg atctgacgcc tctgggtgaa	11340
ggccacggga cccgtgagtt tgaacctgaa agagagttcg acagaatcaa tctcggtatc	11400
gttgacggcg gcctgccga ggatctcttg cacgtcgccc gattgtcct ggtaggcgat	11460
ctcggtcatg aactgctga tctctctctc ctgaaggtct ccgcggccgg gcgctccac	11520
ggtggccgcg aggtcgttgg agatcgggcc catgagctgc gagaaggcgt tcatgccgc	11580
ctcgttcag acgcggtgt agaccacgac gccctcggga tcgcgggcgc gcatgaccac	11640
ctggcgagg ttgagctcca cgtggcgctt gaagaccgc tagttgcaga ggcgctggt	11700
gaggtagttg agcgtggtgg cgatgtgtc ggtgacgaag aaatacatga tccagcgcg	11760
gagcgcatc tcgtgacgt cgcacgacgc ctccaagcgt tccatggcct cgtaaaagtc	11820
cacggcgaag ttgaaaaact gggagttgcg cgcgagacg gtcaactcct cctccagaag	11880
acggatgagc tcggcgatgg tggcgcgcac ctgcgctcg aaggccccgg gaacctcttc	11940
ttccatctcc tcttcttct cttccactaa catctctct acttctctc caggcggtagg	12000
cgggggaggg ggctgcgtc gccgcggcg cacgggcaga cggtcgatga agcgtcgtat	12060
ggtctcgccg cgcggcgctc gcatggtctc ggtgacggcc cgcctgtct cgcggggcgg	12120
cagcgtgaag acgcccgcg gcatttccag gtggccgggg gggtccccgt tgggcaggga	12180
gagggcgctg acgatgcatc ttatcaattg ccccgtaggg actccgcga aggacctgag	12240
cgtctcgaga tccacgggat ctgaaaaccg ttgaacgaag gcttcgagcc agtcgcagtc	12300
gcaaggtagg ctgagcacgg tttcttctgg cgggtcatgt tggggagcgg ggcggcgat	12360
gctgtggtg atgaagttga aataggcgtt tctgagacgg cggatggtgg caggagcac	12420
caggtctttg ggcccggctt gctggatgcg cagacggtcg gccatgcccc aggcgtggtc	12480
ctgacacctg gccagatcct ttagtagtc ctgcatgagc cgctccacgg gcacctctc	12540
ctgccccgcg cggccgtgca tgcgctgag cccgaagccg cgctggggtt ggacgagcg	12600
caggtcgcg acgacgcgt cggcgaggat ggctgtctgg atctgggtga ggttggtctg	12660
gaagtctca aagtcacga agcgggtgta ggctccggtg ttgatggtgt aggagcagtt	12720

ggccatgacg gaccagttag cggtctgggtg gccgggacgc acgagctcgt ggtacttgag	12780
gcgcgagtag gcgcgcgtgt cgaagatgta gtcgttgtag gtgcgcacca ggtactggta	12840
gccgatgagg aagtgcggcg gcggctggcg gtagagcggc catcgctcgg tggcgggggc	12900
gccgggcgcg aggtcctcga gcatggtagc gtggtagccg tagatgtacc tggacatcca	12960
ggtgatgccg gcggcggtgg tggaggcgcg cgggaactcg cggacgcggt tccagatgtt	13020
gcgcagcggc aggaagtagt tcatggtagg cacggtctgg cccgtgaggc gcgcgcagtc	13080
gtggatgctc tatacgggca aaaacgaaag cggtcagcgg ctgactccg tggcctggag	13140
gctaagcgaa cgggttgggc tgcgcgtgta ccccggttcg aatctcgaat caggctggag	13200
ccgcagctaa cgtggtagtg gcactcccgt ctgcaccaa gcctgcacca accctccagg	13260
atacggaggc gggtcgtttt tgcaactttt ttctggaggc cggaatgaa gactagtaag	13320
cgcgaaagc ggccgaccgc gatggctcgc tgccttagtc tggagaagaa tcgccagggt	13380
tgcgttgccg tgtgccccgg ttccaggccg gccggattcc gcggctaacg agggcgtggc	13440
tgccccgtcg ttccaagac ccctagccag ccgacttctc cagttagga gcgagcccct	13500
cttttgtttt ttgtttttgc cagatgcac cgtactgcg gcagatgcgc ccccaccacc	13560
ctccaccgca acaacagccc cctcctccac agccggcgct tctgccccg cccagcagc	13620
agcagcaact tccagccacg accgccgcgg ccgccgtgag cggggctgga cagacttctc	13680
agtatgatca cctggccttg gaagagggcg aggggctggc gcgcctgggg gcgtcgtcgc	13740
cggagcggca cccgcgcgtg cagatgaaaa gggacgctcg cgaggcctac gtgccaagc	13800
agaacctgtt cagagacagg agcggcgagg agcccagga gatgcgcgcg gcccggttcc	13860
acgcggggcg ggagctgcgg cgcgccctgg accgaaagag ggtgctgagg gacgaggatt	13920
tcgaggcgga cgagctgacg gggatcagcc ccgcgcgcgc gcacgtggcc gcggccaacc	13980
tggtcacggc gtacgagcag accgtgaagg aggagagcaa cttcaaaaa tccttcaaca	14040
accacgtgcg caccctgac gcgcgcgagg aggtgaccct gggcctgatg cacctgtggg	14100
acctgtgga ggcatcgtg cagaaccca ccagcaagcc gctgacggcg cagctgttcc	14160
tggtggtgca gcatagtcgg gacaacgagg cgttcaggga ggcgtgcta aatatcacg	14220
agcccagagg ccgctggctc ctggacctgg tgaacattct gcagagcatc gtggtgcagg	14280
agcgcgggct gccgctgtcc gagaagctgg cgccatcaa cttctcggtg ctgagtctgg	14340
gcaagtacta cgtaggaag atctacaaga ccccgtagct gcccatagac aaggaggatga	14400
agatcgacgg gttttacatg cgcatgacc tgaaagtgt gaccctgagc gacgatctgg	14460
gggtgtaccg caacgacagg atgcaccgag cgtgagcgc cagcaggcgg gcgagctga	14520
gcgaccagga gctgatgcac agcctgcagc gggccctgac cggggccggg accgaggggg	14580

agagctactt tgacatgggc gcggacctgc actggcaacc cagccgccgg gccttgagg	14640
cggcgccagg accctacgta gaagaggtgg acgatgaggt ggacgagggc gactacctgg	14700
aagactgatg gcgcgaccgt atttttgcta gatgcaaca cagccaccgc ctctgatcc	14760
cgcgatgcgg gcggcgctgc agagccagcc gtccggcatt aactcctcgg acgattggac	14820
ccaggccatg caacgcatca tggcgctgac gacccgcaat cccgaagcct ttagacagca	14880
gcctcaggcc aaccggctct cggccatcct ggaggccgtg gtgccctcgc gctcgaaccc	14940
cacgcacgag aaggtgctgg ccatcgtgaa cgcgctggtg gagaacaagg ccatccgcgg	15000
cgacgaggcc gggctggtgt acaacgcgct gctggagcgc gtggcccgt acaacagcac	15060
caacgtgcag accaacctgg acaggatggt gaccgacgtg cgcgaggccg tggcccagcg	15120
cgagcggttc caccgcgagt ccaacctggg atccatggtg gcgctgaacg ctttcctcag	15180
caccagccc gccaacgtgc cccggggcca ggaggactac accaacttca tcagcgcct	15240
gcgcctgatg gtgaccgagg tgccccagag cgagggtgtac cagtccgggc cggactactt	15300
cttcagacc agtcgccagg gcttgacagc cgtgaacctg agccaggcgt tcaagaactt	15360
gcagggcctg tggggcgctgc agggcccggt cggggaccgc gcgacggtgt cgagcctgct	15420
gacgccgaac tcgcgcctgc tgctgctgct ggtggccccc ttacggaca gcggcagtat	15480
caaccgcaac tcgtacctgg gctacctgat taacctgtac cgcgaggcca tcggccaggc	15540
gcacgtggac gagcagacct accaggagat caccacgtg agccgcgccc tgggccagga	15600
cgaccgggc aatctggaag ccacctgaa ctttttgctg accaacgggt cgcagaagat	15660
ccgccccag tacgcgtca gcgcgagga ggagcgcatc ctgcgatac tgcagcagag	15720
cgtgggcctg ttctgatgc aggagggggc caccaccagc gccgcgctcg acatgaccgc	15780
gcgcaacatg gagcccagca tgtacgccag caaccgcccg ttcatcaata aactgatgga	15840
ctacttgcat cgggcggccg ccatgaactc tgactatttc accaacgcca tcctaaaccc	15900
ccactggcta ccgccgccg ggttctacac gggcgagtac gacatgccg acccaatga	15960
cgggttctg tgggacgatg tggacagcag cgtgttttcc cccgaccgg gtgctaacga	16020
gcgccccctg tggaagaagg aaggcagcga ccgacgccg tctcggcgc tgtccggccg	16080
cgagggtgct gccgcggcgg tgcccaggc cgccagtcct tttcctagct tgcccttctc	16140
gctgaacagt attcgcaagc gcgagctggg caggatcacg cggccgctg tgcgcggcga	16200
ggaggagtac ttgaatgact cgctgttgag acccgagcgg gagaagaact tcccaataa	16260
cgggatagag agcctggtgg acaagatgag ccgctggaag acgtacgcgc aggagcacag	16320
ggacgatccg tcgcaggggg ccacgagccg gggcagcgcc gcccgtaaac gccggtggca	16380
cgacaggcag cggggactga tgtgggacga tgaggattcc gccgacgaca gcagcgtgtt	16440

ggacttgggt gggagtgggt gtggttaacc gtctgctcac ctgcgcccc gcctcgggcg	16500
catgatgtaa gaaaccgaaa ataatgata ctaccaagg ccatggcgac cagcgtgcgt	16560
tcgtttcttc tctgtttgtg tatctagtat gatgaggcgt gcgtacccgg agggtcctcc	16620
tccctcgtag gagagcgtga tgcagcaggc gatggcggcg gcgatgcagc ccccgctgga	16680
ggctccttac gtcccccg ggtacctggc gcctacggag gggcggaaca gcattcgta	16740
ctcggagctg gcaccttgt acgataccac ccggttgtac ctggtggaca acaagtcggc	16800
ggacatcgcc tcgtgaact accagaacga ccacagcaac ttcctgacca ccgtggtgca	16860
gaacaatgac ttcaccccca cggaggccag caccagacc atcaactttg acgagcgctc	16920
gcggtggggc ggccagctga aaacatcat gcacaccaac atgccaacg tgaacgaatt	16980
catgtacagc aacaagttca aggcgcgggt catggtctcc cgcaagacc ccaatggggt	17040
caaagtagat gaaaattatg atggtagtca ggatgagctg aaatacaggt ggggtggagt	17100
tgagctgccc gaaggcaact tctcgtgac catgaccatc gacctgatga acaacgcat	17160
catcgacaat tacttggcgg tggggcggca gaacggggtc ctggaaagcg acatcggcgt	17220
gaagttcgac actaggaact tcaggtggg ctgggacccc gtgaccgagc tggatcatgcc	17280
cggggtgtac accaacgagg ctttccatcc cgatgttgc ttgctgccc gctgcggggt	17340
ggactttacc gagagccgcc tcagcaacct gctgggcatt cgcaagagc agcccttcca	17400
ggagggattc cagatcatgt acgaggatct ggaggggggc aacatcccc cgctcctgga	17460
tgtcaggcc tatgaggaaa gcaaggaaaa agctgaagcc gaggcgactg cagccgtggc	17520
taccgccgcg accaccaatg cagatgcaac taccaccaga ggcgatacat tcgccactgt	17580
ggcggaggaa gcagccgcc tagcggctgc cgatgatagt gaaagtaaga tagttatcaa	17640
gccagtaaaa gtggatagca agaacagaag ctacaacgtg ctgccggacg aggtaaacac	17700
cgctaccgc agctggtacc tggcctacaa ctatggcgac cccgagaagg gcgtgcgctc	17760
ctggacgctg ctaccacct cggacgtcac ctgcggcgtg gagcaagtct actggtcgt	17820
gcccacatg atgcaagacc cggtaacctt ccgtccacg cgtcaagtta gcaactacc	17880
ggtggtgggc gccgagctcc tgcccgtcta ctccaagagc ttcttcaac agcaggccgt	17940
ctactcgag cagctgcgcg ctttacctc gctcacgcac gtcttcaacc gttccccga	18000
gaaccagatc ctctccgc gccccgcgc caccattacc accgtcagtg aaaacgttc	18060
tgctctcaca gatcacggga ccctgccgt gcgcagcagt atccggggag tccagcgct	18120
gaccgttact gacgccagac gccgcacctg ccctacgtc tacaaggccc tgggcatagt	18180

cgcgccgcgc gtctctctga gccgcacctt ctaaaaaatg tccatttctca tctcgcccag	18240
taataacacc ggttggggcc tgcgcgcgcc cagcaagatg tacggaggcg ctcgccaacg	18300
ctccacgcaa cccccgtgc gcgtgcgcgg gcaattccgc gctccctggg gcgcctcaa	18360
gggtcgcgtg cggtcgcgca ccaccgtcga cgacgtgatc gaccaggtgg tggccgacgc	18420
gcgcaactac acccccgccg ccgcgcccgt ctccaccgtg gacgccgtca tcgacagcgt	18480
ggtggccgac gcgcgccgtt acgcccgcgc caagagccgg cggcggcgca tcgcccggcg	18540
gcaccggagc acccccgcca tgcgcgcggc gcgagccttg ctgcgcaggg ccaggcgcac	18600
gggacgcagg gccatgctca gggcagccag acgcgcggcc tccggcagca gcagcagcgc	18660
cggcaggacc cgcagacgcg cggccacggc ggccggcggcg gccatcgcca gcatgtcccg	18720
cccgcggcgc ggcaacgtgt actgggtgcg cgacgccgcc accggtgtgc gcgtgcccgt	18780
gcgcaccgcg cccctctgca cttgaagatg ctgacttcgc gatgttgatg tgtcccagcg	18840
gcgaggagga tgtccaagcg caaatacaag gaagagatgc tccaggtcat cgcgcctgag	18900
atctacggcc ccgcggtgaa ggaggaaaga aagccccgca aactgaagcg ggtcaaaaag	18960
gacaaaaagg aggaggaaga tgtggatgga ctggtggagt ttgtgcgcga gttcgcccc	19020
cggcggcgcg tgcagtggcg cggcgggaaa gtgaagccgg tgctgcggcc aggcaccacg	19080
gtggtcttca cggccggcga gcgttcggc tccgcctcca agcgtccta cgacgaggtg	19140
tacggggacg aggacatcct cgagcaggcg gccgagcgtc tgggcgagtt tgcttacggc	19200
aagcgcagcc gccccgcgc cttgaaagag gaggcggtgt ccatcccgtt ggaccacggc	19260
aacccacgc cgagcctgaa gccggtgacc ctgcagcagg tgctgccgag cgcggcgccg	19320
cgcgggggt tcaagcgca gggcggcgag gatctgtacc cgaccatgca gctgatggtg	19380
ccaagcgcc agaagctgga ggacgtgctg gagcacatga aggtggacc cgaggtgcag	19440
cccagggtca aggtgcggcc catcaagcag gtggccccgg gcctgggct gcagaccgtg	19500
gacatcaaga tccccacgga gcccatggaa acgcagaccg agcccgtgaa gccagcacc	19560
agcccatgg aggtgcagac ggatccctgg atcccgcg cgcggcttc caccgccacc	19620
cgcgaagac gcaagtacgg cgcggccagc ctgctgatgc ccaactacgc gctgcatcct	19680
tccatcatcc ccacgccggg ctaccgcggc acgcgttct accgcggcta caccagccgc	19740
cgcgcaaga ccaccaccg ccgccgccgt cgtcgagcc gccgcagcag caccgcgact	19800
tccgccttgg tgcggagagt gtatcgagc gggcgcgagc ctctgacct gccgcgcgcg	19860
cgctaccacc cgagcatcgc catttaacta ccgcctccta cttgcagata tggccctcac	19920
atgccgcctc cgcgtcccca ttacgggcta ccgaggaaga aagccgcgcc gtagaaggct	19980
gacggggaac gggctgcgtc gccatcacca ccggcgcgcg cgcgcatca gcaagcggtt	20040

ggggggaggc ttctgcccc cgctgatccc catcatcgcc gcggcgatcg ggcgatccc	20100
cggcatagct tccgtggcgg tgcaggcctc tcagcgccac tgagacacaa aaaaagcatg	20160
gatttgtaat aaaaaaatgg actgacgctc ctggtcctgt gatgtgtgtt tttagatgga	20220
agacatcaat ttttcgtccc tggcaccgcg acacggcacg cggccgttta tgggcacctg	20280
gagcgacatc ggcaacagcc aactgaacgg ggcgcccttc aattggagca gtctctggag	20340
cgggcttaag aatttcgggt ccacgctcaa aacctatggc aacaaggcgt ggaacagcag	20400
cacagggcag gcgctgaggg aaaagctgaa agagcagaac ttccagcaga aggtggtcga	20460
tggcctggcc tcgggcatca acgggggtgt ggacctggcc aaccaggccg tcgagaaaca	20520
gatcaacagc cgcttgagc cggtcccgcc gcgggggtcc gtggagatgc cccaggtgga	20580
ggaggagctg cctcccctgg acaagcgcg cgacaagcga ccggtcccg acgcggagga	20640
gacgtgctg acgcacacgg acgagccgcc cccgtacgag gaggcggtga aactgggtct	20700
gcccaccacg cggcccgtgg cgctctggc caccggggtg ctgaaacca gcagcagcag	20760
cagccagccc gcgacctgg acttgctcc gcctcgcccc tccacagtgg ctaagcccct	20820
gccgccggtg gccgtcgct gcgcgcgccc ccgaggccgc cccagggcga actggcagag	20880
cactctgaac agcatctgg gtctgggagt gcagagtgtg aagcgccgc gctgctatta	20940
aaagacactg tagcgcttaa cttgcttgc tgtgtgtgta tatgtatgtc cgccgaccag	21000
aaggaggaag aggcgcgtcg ccgagttgca agatggccac cccatcgatg ctgccccagt	21060
ggcggtacat gcacatcgcc ggacaggacg ctccggagta cctgagtcg ggtctggtgc	21120
agttcgcccc cgccacagac acctacttca gtctggggaa caagtttagg aacccacagg	21180
tggcgccac gcacgatgtg accaccgacc gcagccagcg gctgacgctg cgcttcgtgc	21240
ccgtggaccg cgaggacaac acctactcgt acaaaagtgc ctacacgctg gccgtggcg	21300
acaaccggt gctggacatg gccagcacct actttgacat ccgcggcgtg ctggatcggg	21360
gccccagttt caaacctac tccggcaccg cctacaacag cctggctccc aaggagcgc	21420
ccaacacctc acagtgaag gattccgaca gcaaaatgca tacttttgga gttgctgcca	21480
tgcccggtgt tgttggtaaa aaaatagaag ccgatggtct gcctattgga atagattcat	21540
cctctggaac tgataccata atttatgtg ataaaacttt ccaaccagag ccacaggttg	21600
gaagtgcag ttgggtcgac accaatggtg cagaggaaaa atatggaggt agagctctta	21660
aggacactac aaacatgaag ccctgctacg gttcttttgc caggcctacc aacaaagaag	21720
gtgggcaggc taacataaaa gattctgaaa ctgccagcac tactcctaac tatgatatag	21780
atttggcatt ctttgacagc aaaaatattg ccgctaacta tgatccagat attgtaatgt	21840
acacagaaaa tgttgagttg caaactccag atactcatat tgtgtttaag ccaggaaactt	21900

cagatgaaag ttcagaagcc aatttgggcc agcaggccat gcccaacaga cccaactaca	21960
tcgggttcag agacaacttt atcgggctca tgtactacaa cagcactggc aatatgggtg	22020
tactggctgg tcaggcctcc cagctgaatg ctgtggtgga cttgcaggac agaaacaccg	22080
aactgtccta ccagctcttg cttgactctc tgggtgacag aaccaggtat ttcagtatgt	22140
ggaatcaggc ggtggacagc tatgaccccg atgtgcgcat tattgaaaat cacggtgtgg	22200
aggatgaact cccaattat tgcttccctt tgaatggtgt gggctttaca gatacttacc	22260
agggtgttaa agttaagaca gatacagccg ctgctggtac caatggaacg cagtgggaca	22320
aagatgatac cacagtcagc actgccaatg agatccactc aggcaatcct ttcgcatgg	22380
agatcaacat ccaggccaac ctgtggcgga acttcctcta cggaacgtg gcgctgtacc	22440
tgcccgactc ctacaagtac acgccggcca acatcacgt gccggccaac accaacacct	22500
acgattacat gaacggccgc gtggtggcgc cctcgctggt ggacgcctac atcaacatcg	22560
gggcgcgctg gtcgctggac cccatggaca acgtcaaccc cttcaaccac caccgcaacg	22620
cgggcctcgc ctaccgctcc atgctcctgg gcaacggcg ctacgtgccc ttccacatcc	22680
agggtgcccc aaagtttttc gccatcaaga gcctcctgct cctgcccggg tectacacct	22740
acgagtggaa ctccgcaag gacgtcaaca tgatcctgca gagtccctc ggcaacgacc	22800
tgcgcacgga cggggcctcc atcgcttca ccagcatcaa cctctacgc accttcttc	22860
ccatggcgca caacaccgcc tccacgctcg aggccatgct gcgcaacgac accaacgacc	22920
agtccttcaa cgactacctc tcggcgccca acatgctcta cccatcccg gccaacgcca	22980
ccaacgtgcc catctccatc ccctcgcgca actgggcccgc cttccgcgga tggctcttca	23040
cgcgctcaa gaccgcgag acgccctcgc tcggctccgg gttcgacccc tacttctgt	23100
actcgggctc catccctac ctgcagcgca cttctacct caaccacacc ttcaagaagg	23160
tctccatcac cttcgactcc tccgtcagct ggcccggcaa cgaccgctc ctgacgcca	23220
acgagttcga aatcaagcgc accgtcgacg gagaggggta caacgtggcc cagtgaaca	23280
tgaccaagga ctggttcctg gtccagatgc tggcccacta caacatcggc taccagggt	23340
tctacgtgcc cgagggtac aaggaccgca tgtactcctt cttccgcaac ttccagccca	23400
tgagccgcca ggtcgtggac gaggtcaact acaaggacta ccaggccgtc accctggcct	23460
accagcacia caactcgggc ttctcggct acctcgcc caccatgcgc cagggacagc	23520
cctacccgc caactacccc taccgctca tcggcaagag cgccgtcgcc agcgtcaccc	23580
agaaaaagtt cctctcgac cgggtcatgt ggcgcacccc cttctccagc aacttcatgt	23640

ccatgggcgc gctcaccgac ctccggccaga acatgtctta cgccaactcc gcccacgcgc	23700
tagacatgaa ttctgaagtc gaccccatgg atgagtcac ctttctctat gttgtcttcg	23760
aagtcttcga cgttgtccga gtgcaccagc cccaccgcgg cgtcatcgag gccgtctacc	23820
tgcgcacgcc ctctcggcc ggcaacgcca ccacctaaagc cccgtctttg ctctctgcaa	23880
gatgacggcc tgttgctccg gcgagcagga gctcagggcc atcctccgcg acctgggctg	23940
cgggccctac ttcttgggca ctttcgacaa gcgcttcccg ggattcatgg ccccgcaaa	24000
gctggcctgc gccatcgta acacggccgg ccgcgagacc gggggcgagc actggctggc	24060
cttcgcctgg aaccgcgct cccacacctg ctacctcttc gacccttcg ggttctcgga	24120
cgagcgctc aagcagatct accagttcga gtacgagggc ctgctgcgtc gcagcgccct	24180
ggccaccgag gaccgtcgc tcacctgga aaagtccacc cagaccgtgc agggctccgcg	24240
ctcgccgcc tgcgggctct tctgtgcat gttctgcac gccttcgtgc actggcccgga	24300
ccgccccatg gacaagaacc ccacctgaa cttgtgacg ggggtgccca acggcatgct	24360
ccagtgcgc caggtggaac ccacctgcg ccgaaccag gaggcgtct accgttctt	24420
caacgcccac tccgtctact ttctctcca ccgcgcgcgc atcgagaagg ccaccgctt	24480
cgaccgatg aatcaagaca tgtaactgt gtgtgtatgt gaatgcttta ttcataata	24540
taaacagcac atgtttatgc caccttctct gaggtctga ctttatttag aaatcgaagg	24600
ggttctgccg gctctggcg tgccccgcgg gcagggatac gttgcggaac tggacttgg	24660
gcagccactt gaactcgggg atcagcagct tcggcacggg gaggtcgggg aacgagtcgc	24720
tccacagctt gcgctgagt tgcagggcgc ccagcaggtc gggcgcgag atcttgaaat	24780
cgcagttggg acccgcttc tgcgcgcgag agttacggt caccgggttg cagcactgga	24840
acaccatcag ggccgggtgc ttcacgtcg ccagcaccgt cgcgtcgggt atgccctcca	24900
cgcccatatc ctccggcttg gccatcccga aggggtcat cttgcaggtc tgccgcccc	24960
tgctgggcac gcagccgggc ttgtggttgc aatcgagtg cagggggatc agcatcatct	25020
gggcctgctc ggagctcatg cccgggtaca tggccttcat gaaagcctcc agctggcgga	25080
aggcctgctg cgccttgccg ccctcggtga agaagacccc gcaggacttg ctagagaact	25140
ggttggtggc gcagcccgcg tcgtgcacgc agcagcgcg gtcgttgttg gccagctgca	25200
ccacgtcgc cccccagcg ttctgggtga tcttgcccg gtcgggttc tccttcagcg	25260
cgcgtgccc gtctcgtc gccacatcca tctgatcgt gtgtccttc tggatcatca	25320
cggtcccgtg caggcaccgc agcttgccct cggcctcggg gcagccgtgc agccacagcg	25380
cgcagccggt gactccag ttcttgtggg cgatctggga gtgcgagtc acgaagccct	25440
gcaggaagcg gcccatcatc gtggtcaggg tcttgttgc ggtgaagtc agcggaatgc	25500

cgcggtgctc ctctgtcaca tacaggtggc agatgcggcg gtacacctcg ccctgctcgg	25560
gcatcagctg gaaggcggac ttacagtcgc tctccacgcg gtaccggtcc atcagcagcg	25620
tcatcacttc catgcccttc tcccaggccg agacgatcgg caggctcagg gggtttctca	25680
ccgttgtcat cttagtgcgc gccgcccagg tcagggggtc gttctcgtcc agggctctca	25740
acactcgctt gccgtccttc tcgatgatgc gcacgggggg aaagctgaag cccacggccg	25800
ccagctcctc ctcgccctgc ctttcgtcct cgtgttcctg gctgatgtct tgcaaaggca	25860
catgcttggc ttgcccgggt ttcttttttg gcggcagagg cggcggcgga gacgtgctgg	25920
gcgagcgcga gttctcgtc accacgacta tttcttcttc ttggccgtcg tccgagacca	25980
cgcgccggta ggctgtcctc ttctggggca gaggcggagg cgacgggctc tcgcggttcg	26040
gcgggcggct ggagagccc cttccgcgtt cgggggtgcg ctcttgccgg cgtgctctg	26100
actgacttcc tccgcccgcg gccattgtgt tctcctaggg agcaagcatg gagactcagc	26160
catcgtcgcc aacatcgcca tctgccccg cggccgcagc cgacgaaaac cagcagcaga	26220
atgaaagctt aaccgccccg ccgcccagcc ccacctccga cgccgcggcc ccagacatgc	26280
aagagatgga ggaatccatc gagattgacc tgggctacgt gacgcccgcg gagcacgagg	26340
aggagctggc agcgcgcttt tcagccccg aagagaacca ccaagagcag ccagagcagg	26400
aagcagagag cgagcagcag caggctgggc tcgagcatgg cgactacctg agcggggcag	26460
aggacgtgct catcaagcat ctggccccg aatgcatcat cgtcaaggac gcgtgctcg	26520
accgcgccga ggtgccccctc agcgtggcgg agctcagccg cgcctacgag cgcaacctct	26580
tctcgccgcg cgtgcccccc aagcggcagc ccaacggcac ctgcgagccc aacccgcgcc	26640
tcaacttcta cccggtcttc gcggtgcccc aggccctggc cacctaccac ctctttttca	26700
agaaccaaag gatccccgtc tcttccgcg ccaaccgcac ccgcgccgac gccctgctca	26760
acctgggccc cggcgcgccg ctacctgata tcgctctctt ggaagagggt cccaagatct	26820
tcgagggctc gggcagcgac gagactcggg ccgcgaacgc tctgcaagga agcggagagg	26880
agcatgagca ccacagcgcc ctgggtggagt tggaaggcga caacgcgcgc ctggcggtgc	26940
tcaagcgcac ggtcgagctg acccacttcg cctaccggc gctcaacctg cccccaagg	27000
tcatgagcgc cgtcatggac cagggtctca tcaagcgcgc ctgccccctc tccgaggacg	27060
agatgcagga ccccagagac tcggacgagg gcaagcccgt ggtcagcgac gagcagctgg	27120
cgcgctggct gggagcaggt agcaccccc agagcctgga agagcggcgc aagctcatga	27180
tggccgtggc cctggtgacc gtggagctgg agtgtctgcg ccgcttcttc gccgacgcgg	27240
agacctgcg caaggtcgag gagaacctgc actacctctt caggcacggg ttcgtgcgcc	27300
aggcctgcaa gatctcaac gtggagctga ccaacctggc ctctacatg ggcatcctgc	27360

acgagaaccg cctggggcag aacgtgctgc acaccaccct gcgcggggag gcccgccgcg 27420

actacatccg cgactgcgtc tacctgtacc tctgccacac ctggcagacg ggcatgggcg 27480

tgtggcagca gtgcctggag gagcagaacc tgaagagct ctgcaagctc ctgcagaaga 27540

acctcaaggc cctgtggacc gggttcgacg agcgcaccac cgccgcggac ctggccgacc 27600

tcatcttccc cgagcgctg cggtgacgc tgcgcaacgg gctgcccacg tttatgagcc 27660

aaagcatgtt gcaaaacttt cgctctttca tcctcgaacg ctccgggacg ctgcccgcga 27720

cctgtctcgc actgccctcg gacttcgtgc cgctgacctt ccgcgagtgc cccccccgc 27780

tctggagcca ctgttacttg ctgcgcctgg ccaactacct ggctaccac tcggacgtga 27840

tcgaggacgt cagcggcgag ggtctgctcg aatgccactg ccgctgcaac ctctgcacgc 27900

cgcaccgtc cctggcctgc aacccccagc tgctgagcga aaccagatc atcggcacct 27960

tcgagttgca agggcccgag gagggcaagg ggggtctgaa actcaccccg gggctgtgga 28020

cctcggccta ctgcgcaag ttcgtgcccc aggactacca tcccttcgag atcaggttct 28080

acgaggacca atcccagccg cccaaggccg agctgtcggc ctgcgtcatc acccaggggg 28140

ccatcctggc ccaattgcaa gccatccaga aatcccgcca agaatttctg ctgaaaaagg 28200

gccacggggt ctacctggac cccagaccg gagaggagct caacccagc ttccccagg 28260

atgccccgag gaagcagcaa gaagctgaaa gtggagctgc cgctgccgcc ggaggatttg 28320

gaggaagact gggagagcag tcaggcagag gaggaggaga tggaagactg ggacagcact 28380

caggcagagg aggacagcct gcaagacagt ctggaggaag acgaggtgga ggaggaggca 28440

gaggaagaag cagccgccgc cagaccgtcg tcctcggcgg aggaggagaa agcaagcagc 28500

acggatacca tctccgtcc gggctcggggt cgcggcggcc gggcccacag taggtgggac 28560

gagaccgggc gttccccgaa cccaccacc cagaccgta agaaggagcg gcagggatac 28620

aagtcttggc gggggcacia aaacccatc gtctcctgct tgcaagcctg cgggggcaac 28680

atctccttca cccggcgcta cctgtcttc caccgcgggg tgaacttccc ccgcaacatc 28740

ttgcattact accgtcacct ccacagcccc tactactgtt tccaagaaga ggcagaaacc 28800

cagcagcagc agcagaaaac cagcggcagc tagaaaatcc acagcggcgg cggcaggtgg 28860

actgaggatc gcggcgaacg agccggcgca gaccggggag ctgaggaacc ggatctttcc 28920

cacctctat gccatcttcc agcagagtcg ggggcaggag caggaaactga aagtcaagaa 28980

ccgttctctg cgctcgctca cccgcagttg tctgtatcac aagagcgaag accaacttca 29040

gcgcactctc gaggacgccg aggtctctct caacaagtac tgcgcgtca ctcttaaaga 29100

gtagcccgcg cccgcccaca cacggaaaaa ggccgggaatt acgtcaccac ctgcgcctt	29160
cggccgacca tcatcatgag caaagagatt cccacgcctt acatgtggag ctaccagccc	29220
cagatgggccc tggccgcccgg cgccgcccag gactactcca cccgcatgaa ctggctcagt	29280
gcccggcccc cgatgatctc acgggtgaat gacatccgcg cccaccgaaa ccagatactc	29340
ctagaacagt cagcgatcac cgccacgccc cgccatcacc ttaatccgcg taattggccc	29400
gccgccttgg tgtaccagga aattccccag cccacgaccg tactacttcc gcgagacgcc	29460
caggccgaag tccagctgac taactcaggt gtccagctgg ccggcggcgc cgccctgtgt	29520
cgtcaccgcc ccgtcaggg tataaagcgg ctggtgatcc gaggcagagg cacacagctc	29580
aacgacgagg tggtagctc ttgcgtgggt ctgcgacctg acggagtctt ccaactcgcc	29640
ggatcgggga gatcttctt cagcctctgt caggccgtcc tgactttgga gatttcgtcc	29700
tcgcagcccc gctcgggtgg catcggcact ctccagtctg tggaggagt cactccctcg	29760
gtctacttca acccttctc cggtcccccc ggccactacc cggacgagtt catcccgaac	29820
ttcgacgcca tcagcgagtc ggtggacggc tacgattgaa tgtcccatgg tggcgagct	29880
gacctagctc ggcttcgaca cctggaccac tgccgcccgt tccgtgctt cgctcgggat	29940
ctcgccgagt ttgcctactt tgagctgccc gaggagcacc ctgagggccc ggcccacgga	30000
gtgcggatcg tcgtcgaagg gggcctcgac tcccacctgc ttcgatctt cagccagcgt	30060
ccgatcctgg tcgagcgca gcaaggacat acccgtctga cctgtactg catctgcaac	30120
caccccgccc tgcataaag tctttgtgt ctgctgtgta ctgagtataa taaaagctga	30180
gatcagcgac tactccggac ttccgtgtgt tcctgaatcc atcaaccagt ctttgttctt	30240
caccgggaac gagaccgagc tccagctcca gtgtaagccc cacaagaagt acctcacctg	30300
gctgttccag ggctccccga tcgccgttgt caaccactgc gacaacgacg gagtctgt	30360
gagcgccct gccaacctta ctttttccac ccgcagaagc aagctccagc tcttccaacc	30420
cttctcccc gggacctatc agtgcgtctc gggacctgc catcacacct tccacctgat	30480
cccgaatacc acagcgccc tccccgtac taacaaccaa actaccacc aacgccgccg	30540
tcgcgacctt tctgaatcta atactaccac ccacaccgga ggtgagctcc gaggtcgacc	30600
aacctctggg atttactacg gcccctggga ggtggtaggg ttaatagcg taggcctagt	30660
tgcgggtggg cttttggctc tctgtacct atacctcct tgctgttctg acttagtggt	30720
gtgtgtttgc tggtttaaga aatggggaag atcaccctag tgagctgcgg tgtgtgtgtg	30780
gcggtggtgg tgctttcgat tgtgggactg ggccggcgcg ctgtagtgaa ggaggagaag	30840
gccgatccct gcttgcattt caatcccgc aaatgccagc tgagttttca gcccgatggc	30900
aatcggtgca cggtgctgat taagtgcgga tgggaatgcg agaacgtgag aatcgagtac	30960

aataacaaga ctcggaacaa tactctcgcg tccgtgtggc agcccgggga ccccgagtgg	31020
tacaccgtct ctgtccccgg tgctgacggc tccccgcgca ccgtgaataa tactttcatt	31080
tttgcacaca tgtgcgacac ggtcatgtgg atgagcaagc agtacgatat gtggccccc	31140
acgaaggaga acatcgtggg cttctccatc gcttacagcc tgtgcacggc gctaatacacc	31200
gctatcgtgt gcctgagcat taacatgttc atcgtatttc gcccagaaa taatgccgaa	31260
aaagagaaac agccataaca cgtttttttc acacaccttt ttcagacat ggcctctgtt	31320
aaatTTTTgc tttatttgc cagtctcatt gccgtcattc atggaatgag taatgagaaa	31380
attactatTT acactggcac taatcacaca ttgaaaggtc cagaaaaagc cacagaagtt	31440
tcatggtatt gttattttaa tgaatcagat gtatctactg aactctgtgg aaacaataac	31500
aaaaaaaaatg agagcattac tctcatcaag ttccaatgtg gatctgactt aaccctaatt	31560
aacatcacta gagactatgt aggtatgtat tatggaacta cagcaggcat ttggacatg	31620
gaatTTTatc aagtttctgt gtctgaaccc accacgccta gaatgaccac aaccacaaaa	31680
actacacctg ttaccactat acagctcact accaatggct ttcttgccat gttcaagtg	31740
gctgaaaata gcaccagcat tcaaccacc ccaccagtg aggaaattcc cagatccatg	31800
attggcatta ttgttgctgt agtgggtgtc atgttgatca tcgccttggt catgggtac	31860
tatgccttct gctacagaaa gcacagactg aacgacaagc tggaacactt actaagtgtt	31920
gaatTTTaat tttttagaac catgaagatc ctaggccttt taatTTTTc tatcattacc	31980
tctgctctat gcaattctga caatgaggac gttactgtcg ttgtcggatc aaattataca	32040
ctgaaaggtc cagcgaaggg tatgctttcg tggatattgt attttggatc tgacactaca	32100
gaaactgaat taigcaatct taagaatggc aaaattcaaa attctaaaat taacaattat	32160
atatgcaatg gtactgatct gatactctc aatatcacga aatcatatgc tggcagttac	32220
acctgccctg gagatgatgc tgacagtatg attttttaca aagtaactgt tgttgatccc	32280
actactccac ctccaccac cacaactact cacaccacac acacagatca aaccgcagca	32340
gaggaggcag caaagttagc cttgcaggtc caagacagtt catttggttg cattaccct	32400
acacctgac agcgggtgcc ggggttgctc gtcagcggta ttgtcgggtg gctttcggga	32460
ttagcagtca taatcatctg catgttcatt ttgtcttgc gctatagaag gctttaccga	32520
caaaaatcag acccactgct gaacctctat gtttaatttt ttccagagcc atgaaggcag	32580
ttagcgtct agtttttgt tctttgattg gcattgttt tagtgctggg tttttgaaaa	32640
atcttaccat ttatgaaggt gagaatgcca ctctagtggg catcagtgtg caaaatgtca	32700
gttggtctaa ataccatcta gatgggtgga aagacatttg cgattggaat gtcactgtgt	32760
atacatgtaa tggagttaac gcgatcgctc acccccttat ccagtgaat aaagatcata	32820

ttgatgatga tttaaataaa aaaataatca tttgatttga aataaagata caatcatatt	32880
gatgatattga gttaacaaa aaataaagaa tcacttactt gaaatctgat accaggtctc	32940
tgtccatgtt ttctgccaac accacttcac tccccctctc ccagctctgg tactgcaggc	33000
cccgcggggc tgcaaaactc ctccacacgc tgaaggggat gtcaaattcc tctgtccct	33060
caatcttcat tttatcttct atcagatgtc caaaaagcgc gtccgggtgg atgatgactt	33120
cgaccccgtc tacccttacg atgcagacaa cgcaccgacc gtgcccttca tcaaccccc	33180
cttcgtctct tcagatggat tccaagagaa gcccctgggg gtgttgtccc tgcgactggc	33240
cgaccccgtc accaccaaga acgggggaaat caccctcaag ctgggagagg ggggtggacct	33300
cgactcctcg ggaaaactca tctccaacac ggccaccaag gccgcccgc ctctcagttt	33360
ttccaacaac accatttccc ttaacatgga tcctcccttt tacactaaag atggaaaatt	33420
atccttaca gtttctccac cattaaatat actgagaaca agcattctaa acacactagc	33480
tttaggtttt ggatcaggtt taggactccg tggtctctgcc ttagcagtac agttagtctc	33540
tccacttaca ttgatactg atggaaacat aaagcttacc ttagacagag gtttgcatgt	33600
tacaacagga gatgcaattg aaagcaacat aagctgggct aaaggtttta aatttgaaga	33660
tggagccata gcaaccaaca ttggaaatgg gttagagttt ggaagcagta gtacagaaac	33720
aggtgttgat gatgcttacc caatccaagt taaacttga tctggcctta gctttgacag	33780
tacaggagcc ataattggctg gtaacaaaga agacgataaa ctactttgt ggacaacacc	33840
tgatccatca ccaaactgc aaatactcgc agaaaatgat gcaaaactaa cactttgctt	33900
gactaaatgt ggtagtcaaa tactggccac tgtgtcagtc ttagttgtag gaagtggaaa	33960
cctaaacccc attactggca ccgtaagcag tgctcaggtg tttctacgtt ttgatgcaaa	34020
cgggtgttctt ttaacagaac attctacact aaaaaaatac tgggggtata ggcagggaga	34080
tagcatagat ggcactccat ataccaatgc ttaggattc atgccaatt taaaagctta	34140
tccaaagtca caaagtctca ctactaaaaa taatatagta gggcaagtat acatgaacgg	34200
agatgtttca aaacctatgc ttctcactat aacctcaat ggtactgatg acagcaacag	34260
tacatattca atgtcatttt catacacctg gactaatgga agctatgttg gagcaacatt	34320
tggggctaac tcttatacct tctctacat tgcccaagaa tgaacactgt atcccacct	34380
acattgccc acccttccc cccactctg tctatggaaa aaactctgaa acacaaaata	34440
aaataaagtt caagtgtttt attgattcaa cagttttaca ggattcgagc agttatttt	34500
cctccacct cccaagacat ggaatacacc acctctccc ccgcacagc cttgaacatt	34560

tgaaagccat tggatgatga catgcttttg gtctccacgt tccacacagt ttcagagcga	34620
gccagtctcg ggtcggtagc ggagatgaaa ccctccgggc actcccgcat ctgcacctca	34680
cagctcaaca gctgaggatt gtctcgggtg gtcgggatca cggttatctg gaagaagcag	34740
aagagcggcg gtgggaatca tagtccgcaa acgggatcgg ccggtggtgt cgcacaggc	34800
cccgcagcag tcgtgccgc cgccgtccg tcaagctgct gctcaggggg tccgggtcca	34860
gggactccct cagcatgatg cccacggccc tcagcatcag tcgtctggtg cggcgggcgc	34920
agcagcgcat gcggatctcg ctacggctgc tgcagtacgt gcaacacagg accaccaggt	34980
tgtttaacag tccatagttc aacacgtcc agccgaaact catcgcgga aggatgctac	35040
ccacgtggcc gtctaccag atcctcaggt aaatcaagtg gcgtccctc cagaacacgc	35100
tgccacgta catgatctcc ttgggcatgt ggcggttcac cacctcccgg taccacatca	35160
ccctctggtt gaacatgcag ccccgatga tctgcggaa ccacagggcc agcacggccc	35220
cgcccccat gcagcgaaga gaccccggt cccggcaatg gcaatggagg acccacgct	35280
cgtaccgtg gatcatctgg gagtgaaca agtctatgtt ggacacgac aggcataatgc	35340
tcatgcatct cttcagcact ctacgtctct cgggggtcaa aaccatatcc cagggcacgg	35400
ggaactcttg caggacagcg aaccccgag aacagggcaa tcctcgaca taacttacat	35460
tgtgcatgga cagggtatcg caatcaggca gcaccgggtg atcctccacc agggaagcgc	35520
gggtctcgtt ctctcacag cgtggttaagg gggccggccg atacgggtga tggcgggacg	35580
cggctgatcg tgttctgcag cgtgtcatga tgcagttgct ttcggacatt ttcgtacttg	35640
ctgtagcaga acctggtccg ggcgctgcac accgatcgcc ggcgcggtc ccggcgcttg	35700
gaacgctcgg tgttgaagtt gtaaacagc cactctctta gaccgtgcag caaatctagg	35760
gcctcaggag tgatgaagat cccatcatgc ctgatagctc tgatcacatc gaccaccgtg	35820
gaatgggcca gaccagcca gatgatgcaa ttttgttggg tttcgggtgac ggcgggggag	35880
ggaagaacag gaagaacct gattaacttt taatccaaac ggtctcggag cacttcaaaa	35940
tgaaggtcgc ggagatggca cctctcgccc ccgtgtgtt ggtggaaaat aacagccagg	36000
tcaaagggtg tacggttctc gagatgttcc acggtggctt ccagcaaagc ctccacgcgc	36060
acatccagaa acaagacaat agcaaaagcg ggagggttct ctaattcctc aatcatcatg	36120
ttacactcct gcaccatccc tagataattt tcatttttcc agccttgaat gattcgaact	36180
agttcctgag gtaaatccaa gccagccatg ataaagagct cgcgagagc gccctccacc	36240
ggcattctta agcacacct cataattcca agatattctg ctcttggttc acctgcagca	36300
gattgacaag cggaatatca aaatctctgc cgcgatccct aagctcctcc ctacgaata	36360
actgtaagta ctctttcata tcgtctccga aatttttagc cataggaccc ccaggaataa	36420

gagaagggca agccacatta cagataaacc gaagtccccc ccagtggagca ttgccaaatg	36480
taagattgaa ataagcatgc tggctagacc cggtgatata ttccagataa ctggacagaa	36540
aatcgggcaa gcaattttta agaaaaataa caaaagaaaa atcttccagg tgcacgttta	36600
gggcctcggg aacaacgatg gagtacgtgc aaggggtgcg ttccagcatg gttagttagc	36660
tgatctgtaa aaaacaaaaa ataaaacatt aaaccatgct agcctggcga acaggtgggt	36720
aaatcgttct ctccagcacc aggcaggcca cggggtctcc ggcgcgaccc tcgtaaaaat	36780
tgctgctatg attgaaaacc atcacagaga gacgttcccg gtggccggcg tgaatgattc	36840
gacaagatga atacaccccc ggaacattgg cgtccgcgag tgaaaaaaag cggccgagga	36900
agcaataagg cactacaatg ctacgtctca agtccagcaa agcgtatcca tgcggatgaa	36960
gcacaaaatt ctcaggtgcg taaaaatgt aattactccc ctctgcaca ggcagcgaag	37020
ccccgatcc ctccagatac acatacaaag cctcagcgtc catagcttac cgagcagcag	37080
cacacaacag gcgcaagagt cagagaaaga ctgagctcta acctgtccac ccgtctctctg	37140
ctcaatatat agcccagatc tacactgacg taaaggccaa agtctaaaaa taccgcgcaa	37200
ataatcacac acgcccagca cagcccaga aaccggtgac aactcagaa aaatacgcgc	37260
acttctctaa acgcccacac tgccgtcatt tccgggttcc cagctacgt catcagaatt	37320
cgactttcaa attccgtcga ccgttaaaaa tgtcacccgc cccgcccta acggtcgccg	37380
ctccacagc caatcacagc cccgcatecc caaattcaaa cagctcattt gcatattaac	37440
gcgcaccaa agtttgaggt atattattga tgatgatctt aattaagaat taattcgatc	37500
ctgaatggcg aatggacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt gtggtggtta	37560
cgcgcagcgt gaccgtiaca ctgcccagcg cctagcgcc cgctccttc gctttcttc	37620
cttctttct cgccacgttc gccgctttc ccgtcaagc tctaaatcgg gggctccctt	37680
tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat tagggtgatg	37740
gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cgttttttcg cctttgacg ttggagtcca	37800
cgttctttta tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcggtct	37860
attcttttga ttataagggt attttgccga ttccggccta ttggttaaaa aatgagctga	37920
tttaacaaaa attttaacaa aattcagaag aactcgtcaa gaaggcgata gaaggcgatg	37980
cgctgcgaat cgggagcggc gataccgtaa agcacagga agcggtcagc ccattcgccg	38040
ccaagctctt cagcaatata cgggtagcc aacgctatgt cctgatagcg gtccgccaca	38100
cccagccggc cacagtcgat gaatccagaa aagcggccat ttccaccat gatattcggc	38160
aagcaggcat cgccatgggt cagcagaga tcctcgccgt cgggcatgct cgccttgagc	38220
ctggcgaaca gticggctgg cgcgagcccc tgatgctctt cgtccagatc atcctgatcg	38280

acaagaccgg cticcatccg agtacgtgct cgctcgatgc gatgtttcgc ttggtggtcg	38340
aatgggcagg tagccggatc aagcgtatgc agccgccgca ttgcatcagc catgatggat	38400
actttctcgg caggagcaag gtgagatgac aggagatcct gcccggcac ttcgccaat	38460
agcagccagt cccttccgc ttcagtgaca acgtcgagca cagctgcgca aggaacgccc	38520
gtcgtggcca gccacgatag ccgctgctcc tcgtcttgca gttcattcag ggcaccggac	38580
aggtcggctt tgacaaaaag aaccgggcgc cctgctgctg acagccggaa cacggcggca	38640
tcagagcagc cgattgtctg ttgtgcccag tcatagccga atagcctctc cacccaagcg	38700
gccggagaac ctgctgcaa tccatcttgt tcaatcatgc gaaacgatcc tcctctgtc	38760
tcttgatcag agcttgatcc cctgcgccat cagatccttg gcggcgagaa agccatccag	38820
tttactttgc agggcttccc aaccttacca gagggcgccc cagctggcaa ttccggttcg	38880
cttgctgtcc ataaaaccgc ccagtctagc tatcgccatg taagcccact gcaagctacc	38940
tgctttctct ttgcgcttgc gttttccctt gtccagatag ccagtagct gacattcatc	39000
cggggtcagc accgtttctg cggactggct ttctacgtga aaaggatcta ggtgaagatc	39060
ctttttgata atctcatggc tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaaactggc	39120
gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt	39180
gcaggaccac ttctgcgtc ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga	39240
gccggtgagc gtgggtctcg cggatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc	39300
cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag	39360
atcgtgaga taggtgcctc actgattaaag catlgttaac tgtcagacca agtttactca	39420
tataactttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc	39480
ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca	39540
gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt ttttctgcg cgtaatctgc	39600
tgcttgcaaa caaaaaaacc accgtacca gcggtggttt gtttccgga tcaagagcta	39660
ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt	39720
ctagtgtagc cgtagttagg cccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct	39780
cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg	39840
gttgactca agacgatagt taccggataa ggccgagcgg tcgggctgaa cgggggggttc	39900
gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga	39960
gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggttaagcgg	40020

cagggtcggg acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta 40080
tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg 40140
ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg 40200
ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat 40260
taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc 40320
agtgagcgag gaagcgggaag agcgcctgat gcggtatctt ctccttacgc atctgtgcgg 40380
tatttcacac cgcataatct aat 40403

<210> 3

<211> 1273

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 3

Met Phe Val Phe Leu Val Leu Leu Pro Leu Val Ser Ser Gln Cys Val

1 5 10 15

Asn Leu Thr Thr Arg Thr Gln Leu Pro Pro Ala Tyr Thr Asn Ser Phe

20 25 30

Thr Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Lys Val Phe Arg Ser Ser Val Leu

35 40 45

His Ser Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Phe Ser Asn Val Thr Trp

50 55 60

Phe His Ala Ile His Val Ser Gly Thr Asn Gly Thr Lys Arg Phe Asp

65 70 75 80

Asn Pro Val Leu Pro Phe Asn Asp Gly Val Tyr Phe Ala Ser Thr Glu

85 90 95

Lys Ser Asn Ile Ile Arg Gly Trp Ile Phe Gly Thr Thr Leu Asp Ser

100 105 110

Lys Thr Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn Ala Thr Asn Val Val Ile

115 120 125

Lys Val Cys Glu Phe Gln Phe Cys Asn Asp Pro Phe Leu Gly Val Tyr

130 135 140

Tyr His Lys Asn Asn Lys Ser Trp Met Glu Ser Glu Phe Arg Val Tyr

145 150 155 160
 Ser Ser Ala Asn Asn Cys Thr Phe Glu Tyr Val Ser Gln Pro Phe Leu
 165 170 175
 Met Asp Leu Glu Gly Lys Gln Gly Asn Phe Lys Asn Leu Arg Glu Phe

 180 185 190
 Val Phe Lys Asn Ile Asp Gly Tyr Phe Lys Ile Tyr Ser Lys His Thr
 195 200 205
 Pro Ile Asn Leu Val Arg Asp Leu Pro Gln Gly Phe Ser Ala Leu Glu
 210 215 220
 Pro Leu Val Asp Leu Pro Ile Gly Ile Asn Ile Thr Arg Phe Gln Thr
 225 230 235 240
 Leu Leu Ala Leu His Arg Ser Tyr Leu Thr Pro Gly Asp Ser Ser Ser

 245 250 255
 Gly Trp Thr Ala Gly Ala Ala Ala Tyr Tyr Val Gly Tyr Leu Gln Pro
 260 265 270
 Arg Thr Phe Leu Leu Lys Tyr Asn Glu Asn Gly Thr Ile Thr Asp Ala
 275 280 285
 Val Asp Cys Ala Leu Asp Pro Leu Ser Glu Thr Lys Cys Thr Leu Lys
 290 295 300
 Ser Phe Thr Val Glu Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg Val

 305 310 315 320
 Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys
 325 330 335
 Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala
 340 345 350
 Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu
 355 360 365
 Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro

 370 375 380
 Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe
 385 390 395 400

Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly
405 410 415

Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys
420 425 430

Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn
435 440 445

Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe
450 455 460

Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys
465 470 475 480

Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly
485 490 495

Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val Val
500 505 510

Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro Lys
515 520 525

Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe Asn Phe Asn
530 535 540

Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Glu Ser Asn Lys Lys Phe Leu
545 550 555 560

Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Ile Ala Asp Thr Thr Asp Ala Val
565 570 575

Arg Asp Pro Gln Thr Leu Glu Ile Leu Asp Ile Thr Pro Cys Ser Phe
580 585 590

Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Thr Ser Asn Gln Val
595 600 605

Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Glu Val Pro Val Ala Ile
610 615 620

His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val Tyr Ser Thr Gly Ser
625 630 635 640

Asn Val Phe Gln Thr Arg Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu His Val

645 650 655
 Asn Asn Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala
 660 665 670
 Ser Tyr Gln Thr Gln Thr Asn Ser Pro Arg Arg Ala Arg Ser Val Ala
 675 680 685
 Ser Gln Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Glu Asn Ser

 690 695 700
 Val Ala Tyr Ser Asn Asn Ser Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Thr Ile
 705 710 715 720
 Ser Val Thr Thr Glu Ile Leu Pro Val Ser Met Thr Lys Thr Ser Val
 725 730 735
 Asp Cys Thr Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ser Asn Leu
 740 745 750
 Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Thr

 755 760 765
 Gly Ile Ala Val Glu Gln Asp Lys Asn Thr Gln Glu Val Phe Ala Gln
 770 775 780
 Val Lys Gln Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp Phe Gly Gly Phe
 785 790 795 800
 Asn Phe Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Ser Lys Pro Ser Lys Arg Ser
 805 810 815
 Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly

 820 825 830
 Phe Ile Lys Gln Tyr Gly Asp Cys Leu Gly Asp Ile Ala Ala Arg Asp
 835 840 845
 Leu Ile Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu
 850 855 860
 Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala Gly
 865 870 875 880
 Thr Ile Thr Ser Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile

 885 890 895

Pro Phe Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr
900 905 910

Gln Asn Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Leu Ile Ala Asn Gln Phe Asn
915 920 925

Ser Ala Ile Gly Lys Ile Gln Asp Ser Leu Ser Ser Thr Ala Ser Ala
930 935 940

Leu Gly Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn

945 950 955 960

Thr Leu Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val
965 970 975

Leu Asn Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln
980 985 990

Ile Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val
995 1000 1005

Thr Gln Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn

1010 1015 1020

Leu Ala Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys
1025 1030 1035

Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro
1040 1045 1050

Gln Ser Ala Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val
1055 1060 1065

Pro Ala Gln Glu Lys Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His

1070 1075 1080

Asp Gly Lys Ala His Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Ser Asn
1085 1090 1095

Gly Thr His Trp Phe Val Thr Gln Arg Asn Phe Tyr Glu Pro Gln
1100 1105 1110

Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val
1115 1120 1125

Val Ile Gly Ile Val Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro

1130 1135 1140
 Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn
 1145 1150 1155
 His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn
 1160 1165 1170
 Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu
 1175 1180 1185
 Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu

1190 1195 1200
 Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro Trp Tyr Ile Trp Leu
 1205 1210 1215
 Gly Phe Ile Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val Met Val Thr Ile Met
 1220 1225 1230
 Leu Cys Cys Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly Cys Cys
 1235 1240 1245
 Ser Cys Gly Ser Cys Cys Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro

1250 1255 1260
 Val Leu Lys Gly Val Lys Leu His Tyr Thr
 1265 1270

<210> 4
 <211> 36556
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthesized
 <220><221> misc_feature
 <222> (18533)..(18535)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220><221> misc_feature
 <222> (18595)..(18595)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220><221> misc_feature
 <222> (18620)..(18620)
 <223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (18668)..(18668)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (18688)..(18690)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 4

atcatcaaat aatatacctc aaacttttgg tgcgcgttaa tatgcaaatg agctgtttga	60
atttggggat gcggggctgt gattggctgt gggagcggcg accgttaggg gcggggcggg	120
tgacgttttg atgacgtgtt tgtgaggcgg agccggtttg caagtctctg tgggaaaagt	180
gacgtcaaac gaggtgtggt ttgaacacgg aaatactcaa ttttcccgcg ctctctgaca	240
ggaaatgagg tgtttctggg cggatgcaag tgaaacggg ccattttcgc gcgaaaactg	300
aatgaggaag tgaaaatctg agtaatttcg cgtttatggc agggaggagt atttgccgag	360
ggccgagtag actttgaccg attacgtggg ggtttcgatt accgtatttt tcacctaaat	420
ttccgcgtac ggtgtcaaa tccggtgttt ttacgtaggc gtcagctgat cgccagggtg	480
tttaaacctg cgctctctag tcaagaggcc actcttgagt gccagcgagt agagttttct	540
catccgcgcc gcgagtcaga tctacacttt gaaagatgag gcacctgaga gacctgcccc	600
glaatgtttt cctggctact gggaacgaga ttctggaact ggtggtggac gccatgatgg	660
gtgacgacct tctgagccc catacccat ttgaggcgcc ttcgctgtac gatttgtatg	720
atctggaggt ggatgtgccc gagaacgacc ccaacgagga ggcggtgaat gatttgttta	780
gcgatgccgc gctgctggct gccgagcagg ctaatacga ctctggctca gacagcgatt	840
cctctctcca tacccecgaga cccggcagag gtgagaaaaa gatccccgag cttaaagggg	900
aagagcttga cctgcgctgc tatgaggaat gcttgctcc gagcgatgat gaggaggacg	960
aggaggcgat tcgagctgca gcgaaccagg gagtgaagc agcgagcgag ggcttttagcc	1020
tggactgtcc tactctgccc ggacacggct gtaagtcttg tgaatttcat cgcatgaata	1080
ctggagataa gaatgtgatg tgtgcctgt gctatatgag agcttacaac catttgtttt	1140
acagtaagtg tgattaaactt tagttgggaa ggcagagggt gactgggtgc tgactggttt	1200
atttatgtat atgtttttta tgtgtaggct ccgtctctga cgcagatgag acccccactt	1260
cagagtgcac ttcatcacc ccagaaattg gcgaggaacc gccgaagat attattcata	1320
gaccagtgc agtgagagtc accgggcgga gacgagctgt ggagagtttg gatgacttgc	1380
tacagggtgg ggatgaacct ttggacttgt gtaccggaa acgccccagg cactaagtgc	1440

cacacatgtg tgtttactta aggtgatgtc agtatttata ggggtgtggag tgcaataaaa	1500
tccgtgttga ctttaagtc gtgttttatg actcaggggt gggactgtgg gtatataagc	1560
aggtgcagac ctgtgtggc agttcagagc aggactcatg gagatctgga ctgtcttga	1620
agactttcac cagactagac agctgctaga gaactcatcg gagggagtct cttacctgtg	1680
gagattctgc ttcggtgggc ctctagctaa gctagtctat agggccaaac aggattataa	1740
ggatcaatth gaggataatth tgagagagtg tcttggtatt ttgtactctc tcaacttggg	1800
ccatcagtct cactttaacc agagtattct gagagccctt gacttttcta ctctggcag	1860
aactaccgcc gcggtagcct tttttgcctt tatccttgac aaatggagtc aagaaaccca	1920
tttcagcagg gattaccgtc tggactgcct agcagtagct ttgtggagaa catggaggtg	1980
ccagcgctg aatgcaatct ccggtactt gccagtacag ccggtagaca cgctgaggat	2040
cctgagtctc cagtacccc aggaacacca acgcccag cagccgcagc aggagcagca	2100
gcaagaggag gaggaggacc gagaagagaa cccgagagcc ggtctggacc ctccggtggc	2160
ggaggaggag gtagtagtga cttgtttccc gagctgcgcc ggggtgctgac taggtcttcc	2220
agtggacggg agagggggat taagcgggag aggcagtagg agactagcca cagaactgaa	2280
ctgactgtca gtctgatgag ccgagggcgc ccagaatcgg tgtggtggca tgaggcagc	2340
tcgagggga tagatgaggt ctcatgatg catgagaaat attccctaga acaagtcaag	2400
acttgttggg ttgagcccca ggatgattgg gaggtagcca tcaggaatta tgccaagctg	2460
gctctgaagc cagacaagaa gtacaagatt accaaactga ttaatatcag aaattcctgc	2520
tacatttcag ggaatggggc cgaggtggag atcagtaccc aggagagggc ggccttcaga	2580
tgttgtatga tgaatatgta cccgggggtg gtgggcatgg agggagtcac ctttatgaac	2640
acgaggttca ggggtgatgg gtataatggg gtggtcttta tggccaacac caagctgaca	2700
gtgcacggat gctccttctt tggcttcaat aacatgtgca tcgaggcctg gggcagtgtt	2760
tcagtgaggg gatgcagctt ttcagccaac tggatggggg tcgtgggcag aaccaagagc	2820
gtggtttcag tgaagaaatg tctgttcgag aggtgccacc tgggggtgat gagcgagggc	2880
gaagccaaag tcaaactg cgcctctacc gagacgggct gctttgtgct gatcaagggc	2940
aatgccaaag tcaagcataa catgatctgt ggggcctcgg atgagcgcgg ctaccagatg	3000
ctgacctgcg ccggtgggaa cagccatatg ctggccaccg tgcatgtggc ctgcacccc	3060
cgcaagacat ggcccagatt cgagcacaac gtcatgaccc gatgcaacgt gcacctgggc	3120
tcccgcgag gcatgttcat gccctaccag tgcaacatgc aatttgtgaa ggtgctgctg	3180

gagcccgatg ccatgtccag agtgagcctg acgggggtgt ttgacatgaa tgtggagctg	3240
tggaaaattc ttagataatga tgaatccaag accaggtgcc gggcctgcga atgcggaggc	3300
aagcacgccca ggcttcagcc cgtgtgtgtg gaggtgacgg aggacctgcg acccgatcat	3360
ttggtgttgt cctgcaacgg gacggagtgc ggctccagcg gggaagaatc tgactagagt	3420
gagtagtgtt tggggctggg tgggagtctg catgatgggc agaataacta aaatctgtgt	3480
ttttctgtgt gttgcagcag catgagcggg agcgcctcct ttgagggagg ggtattcagc	3540
ccttatctga cggggcgtct cccctcctgg gcgggagtgc gtcagaatgt gatgggatcc	3600
acggtggacg gccggcccgt gcagcccgca aactcttcaa ccctgaccta cgcgacctg	3660
agctcctcgt ccgtggacgc agctcccgc gcagctgctg cttccgccgc cagcgccgtg	3720
cgcggaatgg ccttgggcgc cggctactac agctctctgg tggccaactc gagttccacc	3780
aataatcccc ccagcctgaa cgaggagaag ctgttgcctg tgatggccca gctcagagct	3840
ctgaccacgc gcctgggcga gctgaccacg caggtggctc agctgcaggc ggagacgcgg	3900
gccgcggttg ccacggtgaa aaccaaataa aaaatgaatc aataaataaa cggagacggt	3960
tgttgatttt aacacagagt cttgaatctt tatttgatit ttcgcgcgcg gtaggccctg	4020
gaccaccggt ctgatcatt gagcacccgg tggatctttt ccaggaccgc gtagaggtgg	4080
gcttggatgt ttaggtacat gggcatgagc ccgtcccggg ggtggaggta gctccattgc	4140
agggcctcgt gctcgggggt ggtgttgtaa atcacccagt catagcaggg gcgcagggca	4200
tggttgttga caatatcttt gaggaggaga ctgatggcca cgggcagccc tttggtgtag	4260
gtgtttacaa atctgttgag ctgggaggga tgcatgcggg gggagatgag gtgcatcttg	4320
gcctggatct ttagattggc gatgttaccg ccagatccc gcctggggtt catgttgtgc	4380
aggaccacca gcacggtgta tccggtgcac ttggggaatt tatcatgcaa cttggaaggg	4440
aaggcgtgaa agaatttggc gacgcccttg tgcccgcga ggttttccat gcactcatec	4500
atgatgatgg cgatgggccc gtgggcggcg gcctgggcaa agacgtttcg ggggtcggac	4560
acatcatagt tgttgtctg ggtgagctcg tcataggcca ttttaataaa tttggggcgg	4620
agggtgcccc actgggggac gaaggtgccc tcgatcccgg gggcgtagt tgcctcgag	4680
atctgcatct ccaggcctt gagctcggag ggggggatca tgtccacctg cgggagcag	4740
aaaaaaacgg tttccggggc gggggagatg agctgggccc aaagcaggtt ccggagcagc	4800
tgggacttgc cgcagccggt gggaccgtag atgacccga tgaccggctg caggtggtag	4860
ttgagggaga gacagctgcc gtcctcgcgg aggagggggg ccacctcgtt catcatctcg	4920

cgacatgca tgttctcgcg cacgagttcc gccaggaggc gctcgcccc cagcgagagg 4980

agctcttgca gcgaggcgaa gtttttcagc ggcttgagcc cgtcgcccat gggcattttg 5040

gagagggtct gttgcaagag ttccagacgg tcccagagct cggtagatgt ctctagggca 5100

tctcgatcca gcagacctcc tcgtttcgcg ggttggggcg actgcgggag tagggcacca 5160

ggcgatgggc gtccagcgag gccagggtcc ggtccttcca ggggcgcagg gtccgcgtca 5220

gcgtggtctc cgtcacggtg aagggtgctg cgcgggctg ggcgcttgcg aggggtcgct 5280

tcaggctcat ccggctggtc gagaaccgct cccggtcggc gccctgcgcg tcggccaggt 5340

agcaattgag catgagttcg tagttgagcg cctcgccgcg gtggcccttg gcgcggagct 5400

tacctttgga agtgtgtccg cagacgggac agaggaggga cttgaggcg tagagcttgg 5460

gggcgaggaa gacggactcg gggcgtagg cgtccgcgcc gcagctggcg cagacggtct 5520

cgcactccac gagccaggtg aggtcggggc ggtcggggtc aaaaacagg tttcctcgt 5580

gctttttgat gcgtttctta cctctggtct ccatgagttc gtgtccccgc tgggtgacaa 5640

agaggtgtc cgtgtcccg tagaccgact ttatggccg gtcctcgagc ggggtgccgc 5700

ggtcctcgtc gtagaggaac cccgccact ccgagacgaa ggcccgggtc caggccagca 5760

cgaaggaggc cagtgaggag gggtagcggc cgttgtccac cagcgggtcc accttctcca 5820

gggtatgcaa gcacatgtcc cctcgtcca catccaggaa ggtgattggc ttgtaagtgt 5880

agggcacgtg accgggggtc ccggccgggg gggataaaa gggggcgggc cctgtctgt 5940

cctcactgtc ttccgatcg ctgtccagga gcgccagctg ttggggtagg tattccctct 6000

cgaaggcggg catgacctcg gcaactcaggt tgtcagttc tagaaacgag gaggatttga 6060

tattgacggt gccgttgag acgcctttca tgagccctc gtccatctgg tcagaaaaga 6120

cgatcttttt gttgtcagc ttggtggcga aggagccgta gagggcgttg gagaggagct 6180

tggcgatgga gcgcatggtc tggttctttt ccttgtcggc gcgtccttg gcggcgatgt 6240

tgagctgcac gtactcgcg gccacgcaact tccattcggg gaagacggtg gtgagctcgt 6300

cgggcacgat tctgacctcg cagcccggt tgtgcagggt gatgaggtcc acgtggtgg 6360

ccacctcgcc gcgcaggggc tcgttggtcc agcagaggcg cccgcccttg gcgagcaga 6420

aggggggcag cgggtccagc atgagctcgt cgggggggtc gggtccacg gtgaagatgc 6480

cgggcaggag ctgggggtcg aagtagctga tgcaggtgcc cagatcgtcc agcgcgctt 6540

gccagtcgcg cacggccagc gcgcgtcgt aggggtgag gggcatgccc cagggcattg 6600

ggtgcgtgag gcgagaggcg tacatgccgc agatgtcgta gacgtagagg ggctcctcga 6660

ggacgccgat gtaggtgggg tagcagcgcc ccccgcgat gctggcgcg acgtagtct 6720

acagctcgtg cgagggcgcg aggagccccg gcgcgaggtt ggagcgctgc ggcttttcgg 6780

cgcggtagac gatctggcgg aagatggcgt gggagttaga ggagatggtg ggcctctgga 6840
 agatgttgaa gtgggcgtgg ggcaggccga ccgagtcctt gatgaagtgg gcgtaggagt 6900
 cctgcagctt ggcgacgagc tcggcgggtga cgaggacgtc cagggcgcag tagtcgaggg 6960
 tctcttggat gatgtcgtac ttgagctggc ccttctgctt ccacagctcg cggttgagaa 7020

 ggaactcttc gcggtccttc cagtactctt cgagggggaa cccgtcctga tcggcacggt 7080
 aagagccac catgtagaac tggttgacgg cctttagtagc gcagcagccc ttctccacgg 7140
 ggagggcgta agcttgcgcg gccttgcgca gggaggtgtg ggtgagggcg aaggtgtcgc 7200
 gcacatgac cttgaggaac tgggtcctga agtcgaggtc gtcgcagccg ccctgtctcc 7260
 agagctggaa gtccgtgcgc ttctttagag cggggttggg caaagcgaaa gtaacatcgt 7320
 tgaagaggat ctgcccgcg cggggcataa agttgcgagt gatgcggaaa ggctggggca 7380
 cctcgccccg gttgttgatg acctgggcgg cgagcacgat ctctgcaag ccgttgatgt 7440

 tgtggccac gatgtagagt tccacgaacc gtgggcggcc cttgacgtgg ggcagcttct 7500
 tgagctcttc gtaggtgagc tcgtcagggt cgctgagccc gtgtgtctcg agggcccagt 7560
 cggcgagatg gtggttggcg cggaggaagg aagtcagag atccacggcc agggcggttt 7620
 gcagacggtc ccgtactga cggaactgct ggccgacggc cttttttcg ggggtgacgc 7680
 agtagaagggt gcgggggtcc ccgtccagc gatccattt gagctggagg gcgagatcga 7740
 gggcgagctc gacgaggcgg tcgtccccgg agagtttcat gaccagcatg aaggggacga 7800
 gctgcttgcc gaaggacccc atccaggtgt aggtttccac atcgtaggtg aggaagagcc 7860

 ttctggtgcg aggatgcgag ccgatgggga agaactggat ctctgccac caattggagg 7920
 aatggctgtt gatgtgatg aagtagaaat gccgacggcg cgccgaacac tcgtgcttgt 7980
 gttatacaa gcggccacag tgctcgcaac gctgcacggg atgcacgtgc tgcacgagct 8040
 gtacctgagt tcctttgacg aggaatttca gtgggaagtg gagtctgtgc gcctgcatct 8100
 cgtgctgtac tacgtcgtgg tggtcggcct ggccctcttc tgcctcgatg gtggtcatgc 8160
 tgacgagccc gcgcgggagg caggtccaga cctcggcgcg agcgggtcgg agagcgagga 8220
 cgagggcgcg caggccggag ctgtccaggg tctgagacg ctgcggagtc aggtcagtgg 8280

 gcagcggcgg cgcgcggttg acttgcagga gttttccag ggcgcgcggg aggtccagat 8340
 ggtacttgat ctccaccgcg ccgttggtgg cgagctcgat ggcttgcagg gtcccgtgcc 8400
 cctggggagt gaccaccgtc cccgtttct tcttgggcgc tgcttccatg ccggtcagaa 8460
 gcggcgcgca ggacgcgcgc cgggcggcag aggcggctcg gggcccggag gcaggggcgg 8520
 caggggcacg tcggcgccgc gcgcgggtag gttctggtac tgcgccgga gaagactggc 8580
 gtgagcgacg acgcgacggt tgacgtcctg gatctgacgc ctctgggtga aggccacggg 8640

acccgtgagt ttgaacctga aagagagttc gacagaatca atctcggtat cgttgacggc	8700
ggcctgccgc aggatctctt gcacgtcgcc cgagttgtcc tggtaggcga tctcggtcat	8760
gaactgctcg atctctctct cctgaaggtc tccgcggccg gcgcgctcca cggtagggccgc	8820
gaggtcggtg gagatgcggc ccatgagctg cgagaaggcg ttcattgccc cctcgttcca	8880
gacgcggctg tagaccacga cgccctcggg atcgcggggc cgcatgacca cctgggcgag	8940
gttgagctcc acgtggcgcg tgaagaccgc gtagttgcag aggcgctggt agaggtagtt	9000
gagcgtgggt gcgatgtgct cggtagacga gaaatacatg atccagcggc ggagcggcat	9060
ctcgtgacg tcgcccagcg cctccaagcg ttccatggcc tcgtaaaagt ccacggcgaa	9120
gttgaaaaac tgggagttgc gcgccgagac ggtcaactcc tcctccagaa gacggatgag	9180
ctcggcgatg gtggcgcgca cctcgcgtc gaaggccccg ggaacctctt ctccatctc	9240
ctcttcttcc tcttccacta acatctcttc tacttcttcc tcaggcgggt gcgggggagg	9300
gggcctgcgt cgccggcgcc gcacgggcag acggtcgatg aagcgctcga tggctctgcc	9360
gcgccggcgt cgatgggtc cggtagacgc cgcctcgtcc tcgcggggcc gcagcgtgaa	9420
gacgcgcgcg cgcatttcca ggtggccggg ggggtccccg ttgggcaggg agaggcgct	9480
gacgatgcat cttatcaatt gcccgtagg gactccgcgc aaggacctga gcgtctcgag	9540
atccacggga tctgaaaacc gttgaacgaa ggcttcgagc cagtgcagc cgcaaggtag	9600
gctgagcacg gtttcttctg gcgggtcatg ttggggagcg gggcgggcga tgctgctggt	9660
gatgaagttg aaataggcgg ttctgagacg gcggatggtg gcgaggagca ccaggtcttt	9720
gggcccggct tgctggatgc gcagacggtc ggccatgccc caggcgtggt cctgacacct	9780
ggccagatcc ttgtagtagt cctgcatgag ccgctccacg ggcacctctt cctcgcccgc	9840
gcggccgtgc atgcgcgtga gccgaagcc gcgctggggc tggacgagcg ccaggtcggc	9900
gacgacgcgc tcggcgagga tggcctgctg gatctgggtg agggtggtct ggaagtcgtc	9960
aaagtgcagc aagcggtggt aggtccggt gttgatggtg taggagcagt tggccatgac	10020
ggaccagttg acggtctggt ggccgggacg cagcagctcg tggtagttga ggccgagta	10080
ggcgcgctg tcgaagatgt agtcgttgca ggtgcgcacc aggtactggt agccgatgag	10140
gaagtgcggc ggccgctggc ggtagagcgg ccatcgctcg gtggcggggc cgccgggcgc	10200
gaggtcctcg agcatggtgc ggtgtagacc gtagatgtac ctggacatcc aggtgatgcc	10260
ggcgcggtg gtgaggcgc gcgggaactc gcggacgcgg ttccagatgt tgcgcagcgg	10320
caggaagtag ttcatggtgg gcacggtctg gcccgtagg gcgcgcagc cgtggatgct	10380

ctatacgggc aaaaacgaaa gcggtcagcg gctcgactcc gtggcctgga ggctaagcga	10440
acgggttggg ctgcgcgtgt accccggttc gaatctcgaa tcaggctgga gccgcagcta	10500
acgtggtact ggcactccc tctcgacca agcctgcacc aaccctccag gatacggagg	10560
cgggtcgttt ttgcaacttt ttttcggagg ccggaatga agactagtaa gcgcgaaag	10620
cggccgaccg cgatggctcg ctgccgtagt ctggagaaga atcgccaggg ttgcgttcg	10680
gtgtgccccg gttcgaggcc ggccggattc cgcggctaac gagggcgtgg ctgccccgtc	10740
gtttccaaga cccctagcca gccgacttct ccagttacgg agcgagcccc tcttttgttt	10800
tttgtttttg ccagatgcat cccgtactgc ggcagatgcg cccccaccac cctccaccgc	10860
aacaacagcc cctcctcca cagccggcgc ttttgcccc gccccagcag cagcagcaac	10920
ttccagccac gaccgccg cgcccgctga gcggggctgg acagacttct cagtatgac	10980
acctggcctt ggaagagggc gaggggctgg cgcgcctggg ggctgctcg ccggagcggc	11040
acccgcgcgt gcagatgaaa agggacgctc gcgaggccta cgtgcccag cagaacctgt	11100
tcagagacag gagcggcgag gagcccgagg agatgcgcgc ggcccgttc cagcggggc	11160
gggagctcg gcgcggcctg gaccgaaaga ggtgctgag ggacgaggat ttcgaggcgg	11220
acgagctgac ggggatcagc cccgcgcgcg cgcacgtggc cgcggccaac ctggtcacgg	11280
cgtacgagca gaccgtgaag gaggagagca acttcaaaa atccttcaac aaccacgtgc	11340
gcacctgat cgcgcgcgag gaggtgacct tgggcctgat gcacctgtgg gacctgtgg	11400
aggccatcgt gcagaacccc accagcaagc cgctgacggc gcagctgttc ctggtggtgc	11460
agcatagtcg ggacaacgag gcgttcaggg aggcgctgct aaatatcacc gagcccagg	11520
gccgctggct cctggacctg gtgaacattc tgcagagcat cgtggtgcag gagcgcgggc	11580
tgccgtgtc cgagaagctg gcggccatca acttctcggt gctgagtctg ggcaagtact	11640
acgctaggaa gatctacaag accccgtacg tgcccataga caaggagtg aagatcgacg	11700
ggttttacat gcgcatgacc ctgaaagtgc tgacctgag cgacgatctg ggggtgtacc	11760
gcaacgacag gatgcaccga gcggtgagcg ccagcaggcg gcgcgagctg agcgaccagg	11820
agctgatgca cagcctgcag cgggacctga ccggggccgg gaccgagggg gagagctact	11880
ttgacatggg cgcggaacct cactggcaac ccagccgccg ggccttgag gcggcggcag	11940
gacctactgt agaagaggtg gacgatgagg tggacgaggg cgagtacctg gaagactgat	12000
ggcgcgaccg taittttct agatgcaaca acagccaccg cctcctgatc ccgcatgcg	12060
ggcggcgctg cagagccagc cgtccggcat taactcctcg gacattgga cccaggccat	12120
gcaacgcac atggcgtga cgaccgcga tcccgaagcc tttagacagc agcctcaggc	12180
caaccggctc tcggccatcc tggaggccgt ggtgcctcg cgctgaacc ccacgcacga	12240

gaagggtgctg gccatcgtga acgcgctggt ggagaacaag gccatccgcg gcgacgaggc	12300
cgggctggtg tacaacgcgc tgctggagcg cgtggcccg cacaacagca ccaacgtgca	12360
gaccaacctg gacaggatgg tgaccgacgt gcgcgaggcc gtggcccagc gcgagcggtt	12420
ccaccgcgag tccaacctgg gatccatggt ggcgctgaac gccttcctca gcacccagcc	12480
cgccaacgtg ccccggggcc aggaggacta caccaacttc atcagcgccc tgcgcctgat	12540
ggtgaccgag gtgccccaga gcgagggtga ccagtcgggg ccggactact tcttcagac	12600
cagtcgccag ggcttgca cctgaacct gagccaggcg ttcaagaact tgcagggcct	12660
gtggggcgctg caggccccg tgggggaccg gcgcgaggtg tgcagcctgc tgacgccgaa	12720
ctcgccctg ctgctgctgc tgggtggccc cttcacggac agcggcagta tcaaccgcaa	12780
ctcgtacctg ggctacctga ttaacctgta ccgcgaggcc atcgccagg cgacgtgga	12840
cgagcagacc taccaggaga taccacacgt gagccgcgcc ctgggcccagg acgacccggg	12900
caatctggaa gccaccctga actttttgct gaccaaccgg tcgcagaaga tcccgcccca	12960
gtacgcgctc agcgccgagg aggagcgcat cctgcgatac gtgcagcaga gcgtgggcct	13020
gttctgatg caggaggggg ccacccccag cgcgcgctc gacatgaccg gcgcgaacat	13080
ggagcccagc atgtacgcca gcaaccgccc gtcatcaat aaactgatgg actacttgca	13140
tcggggcgcc gccatgaact ctgactatct caccaacgcc atcctaaacc cccactggt	13200
accgcccgcg gggttctaca cgggcgagta cgacatgccc gaccccaatg acgggttct	13260
gtgggacgat gtggacagca gcgtgttttc cccccgaccg ggtgctaacg agcgccctt	13320
gtggaagaag gaaggcagcg accgacgccc gtcttcggcg ctgtccggcc gcgagggtgc	13380
tgccgcggcg gtgcccaggg ccgccagtcc ttttcctagc ttgcccttct cgctgaacag	13440
tattcgagc agcgagctgg gcagatcac gcgcccgcgc ttgctcggcg aggaggagta	13500
cttgaatgac tcgtgttga gaccgagcg ggagaagaac ttcaccaata acgggataga	13560
gagcctggtg gacaagatga gccgctggaa gacgtacgcg caggagcaca gggacgatcc	13620
gtcgagggg gccacgagcc ggggcagcgc cggcgtaaa cgccggtgac acgacaggca	13680
gcggggactg atgtgggacg atgaggattc cgccgacgac agcagcgtgt tggacttggg	13740
tgggagtgtt ggtggttaacc cgttcgctca cctgcgccc cgcatcgggc gcatgatgta	13800
agaaaccgaa aataaatgat actcaccaag gccatggcga ccagcgtgcg ttcgtttctt	13860
ctctgttgtt gtatctagta tgatgaggcg tgcgtaccg gaggtctct ctcctctgta	13920
cgagagcgtg atgcagcagg cgatggcggc ggcatgcag cccccgctgg aggtcctta	13980
cgtgcccccg cgttacctgg gcctacgga ggggcggaac agcatctgtt actcgagct	14040
ggcaccttg tacgatacca cccggttgta cctggtggac aacaagtcgg cggacatcg	14100

ctcgctgaac taccagaacg accacagcaa cttcctgacc accgtggtgc agaacaatga	14160
cttcaccccc acggaggcca gcaccagac catcaacttt gacgagcgt cgcggtggg	14220
cggccagctg aaaacatca tgcacaccaa catgcccaac gtgaacgaat tcatgtacag	14280
caacaagttc aaggcgcggg tcatggtctc ccgaagacc cccaatgggg tcaaagtaga	14340
tgaaaattat gatggtagtc aggatgagct gaaatacgag tgggtggagt ttgagctgcc	14400
cgaaggcaac ttctcggtga ccatgacat cgacctgatg aacaacgcca tcatcgacaa	14460
ttacttggcg gtggggcggc agaacggggt cctggaaagc gacatcgcg tgaagttcga	14520
cactaggaac ttcaggctgg gctgggaccc cgtgaccgag ctggtcatgc ccggggtgta	14580
caccaacgag gccttccatc ccgatgttgt cttgctgccc ggctgcgggg tggactttac	14640
cgagagccgc ctcagcaacc tgctgggcat tcgcaagagg cagcccttcc aggagggatt	14700
ccagatcatg tacgaggatc tggagggggg caacatcccc gcgtcctgg atgtcgaggc	14760
ctatgaggaa agcaaggaaa aagctgaagc cgaggcgact gcagccgtgg ctaccgccgc	14820
gaccaccaat gcagatgcaa ctaccaccag aggcgatata ttcgccactg tggcggagga	14880
agcagccgcc ctagcggtcg ccgatgatag tgaaagtaag atagtatca agccagtaaa	14940
agtggatagc aagaacagaa gctacaacgt gctgccggac gagttaaaca ccgcctaccg	15000
cagctggtac ctggcctaca actatggcga ccccgagaag ggctgcgct cctggacgt	15060
gtcaccacc tcggacgtca cctgcggcgt ggagcaagtc tactggtcgc tgcccacat	15120
gatgcaagac ccgtcacct tccgtccac gcgtcaagtt agcaactacc cgggtgtggg	15180
cgccgagctc ctgccgtct actccaagag cttcttcaac gagcaggccg tctactcga	15240
gcagctgcgc gccttcacct cgctcacgca cgtcttcaac cgcttcccc agaaccagat	15300
cctcgtccgc ccgccgcgc ccaccattac caccgtcagt gaaaacgttc ctgctctcac	15360
agatcacggg accctgcgc tgccgcagcag tatccgggga gtccagcgcg tgaccgttac	15420
tgacgccaga cgccgcacct gccctacgt ctacaaggcc ctgggcatag tcgcgccgcg	15480
cgctctctcg agccgcacct tctaaaaaat gtccattctc atctcgcca gtaataaac	15540
cggttggggc ctgcgcgcgc ccagcaagat gtacggaggc gctcgccaac gctccacgca	15600
acaccccgct cgctgcgcgc ggcacttccg cgctccctgg ggccctca agggtcgcgt	15660
gcggtcgcgc accaccgtcg acgacgtgat cgaccagtg gtggccgacg cgcgcaacta	15720
cacccccgc gccgcgccg tctccaccgt ggacgccgtc atcgacagcg tgggtggcca	15780
cgcgcgccg tacgccgcg ccaagagccg gcggcggcgc atcgccgcg ggcaccggag	15840

cacccccgcc atgcgcgcgg cgcgagcctt gctgcgcagg gccaggcgca cgggacgcag	15900
ggccatgctc agggcagcca gacgcgcggc ctccggcagc agcagcagcg ccggcaggac	15960
ccgcagacgc gcggccacgg cggcggcggc ggccatcgcc agcatgtccc gcccgcggcg	16020
cggcaacgtg tactgggtgc gcgacgccgc caccggtgtg cgcgtgcccg tgcgcacccg	16080
ccccctcgc acttgaagat gctgacttcg cgatgttgat gtgtcccagc ggcgaggagg	16140
atgtccaagc gcaatacaaa ggaagagatg ctccaggtca tcgcgcctga gatctacggc	16200
cccgcggtga aggaggaaaag aaagccccgc aaactgaagc gggtcaaaaa ggacaaaaag	16260
gaggaggaag atgtggatgg actggtggag tttgtgcgcg agttcgcccc ccggcggcgc	16320
gtgcagtggc gcggcgcgaa agtgaagccg gtgctgcggc caggcaccac ggtggcttc	16380
acgcccggcg agcgttcggc ctccgcctcc aagcgctcct acgacgaggt gtacggggac	16440
gaggacatcc tcgagcagcg gcccgagcgt ctggcgagat ttgcttacgg caagcgacgc	16500
cgccccgcgc ccttgaaaga ggaggcgggtg tccatcccgc tggaccacgg caacccacg	16560
ccgagcctga agccggtgac cctgcagcag gtgctgccga gcgcggcgcc gcgccggggc	16620
ttcaagcgcg agggcggcga ggatctgtac ccgaccatgc agctgatggt gcccaagcgc	16680
cagaagctgg aggacgtgct ggagcacatg aaggtggacc ccgaggtgca gcccaggtc	16740
aaggtgcggc ccatcaagca ggtggccccg ggcttggcg tgcagaccgt ggacatcaag	16800
atccccacgg agcccatgga aacgcagacc gagccccgta agcccagcac cagcaccatg	16860
gaggtgcaga cggatccctg gatgccggcg cccgcggctt ccaccgccac ccgccgaaga	16920
cgcaagtacg gcgcggccag cctgtgatg cccaactacg cgctgcatcc ttccatcatc	16980
cccacgccgg gctaccgcgg cacgcgcttc taccgcggct acaccagccg ccgccgaag	17040
accaccaccc gccgccgcg tcgtgcgacg cgccgcagca gcaccgcgac ttccgccttg	17100
gtgcggagag tgtatcgag cgggcgcgag cctctgaccc tgccgcgcgc gcgtaccac	17160
ccgagcatcg ccatttaact accgcctcct acttgagat atggccctca catgccgct	17220
ccgctcccc attacgggct accgaggaag aaagccgcgc cgtagaaggc tgacggggaa	17280
cgggctgctg cgccatcacc accggcggcg gcgcgccatc agcaagcggg tggggggagg	17340
cttcctgccc gcgtgatcc ccatcatcgc cgcggcgatc ggggcgatcc ccggcatagc	17400
ttcctggcg gtgcaggcct ctacgcgcca ctgagacaca aaaaaagcat ggatttgtaa	17460
taaaaaatg gactgacgct cctggtcctg tgatgtgtgt ttttagatgg aagacatcaa	17520
ttttctgccc ctggcaccgc gacacggcac gcggccgttt atgggcacct ggagcgacat	17580
cggcaacagc caactgaacg ggggcgcctt caattggagc agtctctgga gcgggcttaa	17640
gaatttcggg tccacgtca aaacctatgg caacaaggcg tggaacagca gcacagggca	17700

ggcgtgagg gaaaagctga aagagcagaa cttccagcag aaggtggtcg atggcctggc	17760
ctcgggcatc aacgggggtgg tggacctggc caaccaggcc gtgcagaaac agatcaacag	17820
ccgcctggac gcggtccgc ccgcggggtc cgtggagatg ccccagggtg aggaggagct	17880
gcctcccctg gacaagcgcg gcgacaagcg accgcgtccc gacgcggagg agacgtgct	17940
gacgcacacg gacgagccgc cccgtacga ggaggcgggtg aaactgggtc tgcccaccac	18000
gcggcccggtg gcgcctctgg ccaccggggt gctgaaaccc agcagcagca gcagccagcc	18060
cgcgaccctg gacttgctc cgctcgccc ctccacagtg gctaagcccc tgccgcccgt	18120
ggcgtcgcg tcgcgcgccc ccgaggccg cccccaggcg aactggcaga gcactctgaa	18180
cagcatcgtg ggcttgggag tgcagagtgt gaagcgccgc cgctgctatt aaaagacact	18240
gtagcgctta acttgcttgt ctgtgtgtgt atatgtatgt ccgccgacca gaaggaggaa	18300
gaggcgctc gccgagttgc aagatggcca ccccatcgat gctgccccag tgggcgtaca	18360
tgcacatcgc cggacaggac gcttcggagt acctgagtcc gggtctggtg cagttcgccc	18420
gcgccacaga cacctacttc agtctgggga acaagtttag gaacccacg gtggcgccca	18480
cgcacgatgt gaccaccgac cgcagccagc ggttgacgt gcgcttcgtg cennnggacc	18540
gcgaggacaa cacctactcg tacaagtgc gctacacgt ggccgtgggc gacanccgcg	18600
tgctggacat ggccagcacn tactttgaca tccgcggcgt gctggatcgg ggccccagtt	18660
tcaaaccnta ctccggcacc gcctacannn gcctggctcc caaggagcg cccaacacct	18720
cacagtggaa ggattccgac agcaaatgc atacttttg agttgctgcc atgcccggtg	18780
ttgttggtaa aaaaatagaa gccgatggtc tgcctattgg aatagattca tcctctggaa	18840
ctgataccat aatttatgct gataaaactt tccaaccaga gccacaggtt ggaagtgaca	18900
gttgggtcga caccaatggt gcagaggaaa aatatggagg tagagctctt aaggacacta	18960
caaacatgaa gccctgtac ggttcttttg ccaggcctac caacaaagaa ggtgggcagg	19020
ctaacataaa agattctgaa actgccagca ctactcctaa ctatgatata gatttggcat	19080
tctttgacag caaaaatatt gccgtaact atgatccaga tattgtaatg tacacagaaa	19140
atgttgagtt gcaaaactca gatactcata ttgtgtttaa gccagggaact tcagatgaaa	19200
gttcagaagc caatttgggc cagcaggcca tgcccaacag acccaactac atcgggttca	19260
gagacaactt tatcgggctc atgtactaca acagcactgg caatatgggt gtactggctg	19320
gtcaggcctc ccagctgaat gctgtgggtg acttgcagga cagaaacacc gaactgtcct	19380
accagctctt gcttgactct ctgggtgaca gaaccaggta tttcagtatg tggaatcagg	19440
cggtggacag ctatgacccc gatgtgcgca ttattgaaaa tcacggtgtg gaggatgaac	19500
tcccaatta ttgcttccct ttgaatggtg tgggctttac agatacttac cagggtgtta	19560

aagttaagac agatacagcc gctgctggta ccaatggaac gcagtgggac aaagatgata	19620
ccacagtcag cactgccaat gagatccact caggcaatcc ttctgccatg gagatcaaca	19680
tccaggccaa cctgtggcgg aacttcctct acggaacgt ggcgctgtac ctgcccgaact	19740
cctacaagta cagccgggcc aacatcacgc tgcgggcaa caccaacacc tacgattaca	19800
tgaacggcgg cgtgggtggc cctcgctgg tggacgccta catcaacatc gggggcgcgt	19860
ggtcgctgga ccccatggac aacgtcaacc cttcaacca ccaccgaac gcgggcctgc	19920
gctaccgctc catgctcctg ggcaacgggc gctacgtgcc cttccacatc caggtgcccc	19980
aaaagttttt cgccatcaag agcctcctgc tctgcccgg gtcttacacc tacgagtgga	20040
acttcgcaa ggacgtcaac atgatcctgc agagctccct cggcaacgac ctgcgcacgg	20100
acggggcctc catgccttc accagcatca acctctacgc caccttcttc cccatggcgc	20160
acaacaccgc ctccacgctc gaggccatgc tgcgaacga caccaacgac cagtcttca	20220
acgactacct ctggcgccc aacatgctct accccatccc ggccaacgcc accaacgtgc	20280
ccatctccat cccctcggc aactggggcg ctttccgagg atggtcttc acgcgctca	20340
agaccgga gacgacctc ctcggtccg ggttcgacc ctacttcgtc tactcgggct	20400
ccatccccta cctcgacggc accttctacc tcaaccacac cttcaagaag gtctccatca	20460
ccttcgactc ctccgtcagc tggcccgga acgaccgct cctgacgcc aacgagttcg	20520
aatcaagcg caccgtcgac ggagaggggt acaacgtggc ccagtgaac atgaccaagg	20580
actggttctt ggtccagatg ctggccact acaacatcg ctaccagggc ttctactgctc	20640
ccgagggcta caaggaccgc atgtactctt tcttccgaa cttccagccc atgagccgcc	20700
aggtcgtgga cgaggtcaac tacaaggact accaggcgt caccctggcc taccagcaca	20760
acaactcggg cttcgtcgcc tacctcgcc ccaccatgcg ccagggacag ccctaccccg	20820
ccaactacce ctaccegtc atcggaaga gcgccgtgc cagcgtcacc cagaaaaagt	20880
tcctctgca cggggtcatg tggcgcatcc ctttctccag caacttcatg tccatgggcg	20940
cgctaccga cctcgccag aacatgctct acgccaactc cgccacgcg ctagacatga	21000
atttcgaagt cgaccccatg gatgagtcca ccttctcta tgttgtcttc gaagtcttcg	21060
acgttgtccg agtgcaccag cccaccgcg gcgtcatcga ggccgtctac ctgcgcacgc	21120
ccttctcgcc cggcaacgcc accacctaa ccccgctctt gcttcttgca agatgacggc	21180
ctgtggctcc ggcgagcagg agctcagggc catctccgc gacctgggct gcgggacctc	21240
cttctgggc accttcgaca agcgttccc gggattcatg gccccgaca agctggcctg	21300

cgccatcgctc aacacggccg gccgcgagac cgggggcgag cactggctgg ccttcgcctg 21360

gaaccgcgcg tcccacacct gctacctctt cgacccttc gggttctcgg acgagcgctt 21420

caagcagatc taccagtctg agtacgaggg cctgctgcgt cgcagcgccc tggccaccga 21480

ggaccgctgc gtcaccctgg aaaagtccac ccagaccgtg cagggtccgc gctcggccgc 21540

ctgcgggctc ttctgctgca tgttctgca cgccttcgtg cactggcccg accgccccat 21600

ggacaagaac cccaccatga acttgctgac gggggtgccc aacggcatgc tccagtcgcc 21660

ccaggtggaa cccaccctgc gccgcaacca ggaggcgctc taccgcttcc tcaacgccc 21720

ctcgtctac ttctgctccc accgcgcgcg catcgagaag gccaccgctt tcgaccgcat 21780

gaatcaagac atgtaaactg tgtgtgtatg tgaatgcttt attcatcata ataaacagca 21840

catgtttatg ccaccttctc tgaggctctg actttattta gaaatcgaag gggttctgcc 21900

ggctctcggc gtcccccg gcgaggata cgttcggaa ctggtacttg ggcagccact 21960

tgaactcggg gatcagcagc ttccgacagg ggaggtcggg gaacgagtcg ctccacagct 22020

tgcgctgag ttgcaggcg cccagcaggt cgggcgcgga gatcttgaa tcgcagttgg 22080

gaccgcggtt ctgcgcgca gagttacggt acacgggggt gcagcactgg aacaccatca 22140

gggcccgggtg cttcacgctc gccagcaccg tcgctcggt gatgccctcc acgtccatat 22200

cctcggcggtt ggccatcccg aaggggggtca tcttgaggt ctgccgccc atgctgggca 22260

cgcagccggg cttgtggtg caatcgaggt gcagggggat cagcatcctc tgggctgct 22320

cggagctcat gcccgggtac atggccttca tgaaagctc cagctggcgg aaggcctgct 22380

gcgccttgcc gccctcgggtg aagaagacc cgcaggactt gctagagaac tggttggtg 22440

cgcagcccg gtcgtgcacg cagcagcgcg cgtcgttgtt ggccagctgc accacgtgc 22500

gccccacgc gtcttggtg atcttgccc ggtcgggggt ctccttcagc gcgcgtgcc 22560

cgttctcgct cgccacatcc atctcgatcg tgtgctcctt ctggatcctc acggtcccgt 22620

gcaggcaccg cagcttgccc tcggcctcgg tcagccgtg cagccacagc gcgcagccgg 22680

tgcactccca gttcttggtg gcgatctggg agtgcgagtg cacgaagccc tgcaggaagc 22740

ggcccatcat cgtggtcagg gtcttggtg tggtgaagg cagcggaatg ccgcggtgct 22800

cctcggtcac atacagggtg cagatgcggc ggtacacctc gccctgctcg ggcatcagct 22860

ggaaggcgga cttcaggtc ctctccacgc ggtaccggtc catcagcagc gtcactactt 22920

ccatgccctt ctcccaggcc gagacgatcg gcaggctcag ggggttcttc accgttgtca 22980

tcttagtcgc cgccgccgag gtcaggggggt cgttctcgtc cagggtctca aacactcgt 23040

tgcgctcctt ctcgatgatg cgcacggggg gaaagctgaa gccacggcc gccagctcct 23100

cctcggcctg ccttctgccc tcgctgctc ggctgatgct ttgcaaaggc acatgcttgg 23160

tcttgcgggg tttctttttg ggccggcagag gcggcgccgg agacgtgctg ggcgagcgcg	23220
agttctcgt caccacgact atttcttctt ctggccgtc gtccgagacc acgcggcggt	23280
aggcgtgcct ctctggggc agaggcggag gcgacgggct ctgcgggttc ggcgggcggc	23340
tggcagagcc cttccgcgt tcgggggtgc gtcctggcg gcgtgctct gactgacttc	23400
ctccgggcc ggccattgtg ttctcctagg gagcaagcat ggagactcag ccatcgtcgc	23460
caacatgcc atctgcccc gccgccgag ccgacgaaaa ccagcagcag aatgaaagct	23520
taaccgcccc gccgcccag cccacctccg acgcccgcc cccagacatg caagagatgg	23580
aggaatccat cgagattgac ctgggctacg tgacggccgc ggagcacgag gaggagctgg	23640
cagcgcgctt ttacgcccc gaagagaacc accaagagca gccagagcag gaagcagaga	23700
gcgagcagca gcaggctggg ctgagcatg gcgactacct gagcggggca gaggacgtgc	23760
tcatcaagca tctggccgc caatgcatca tcgtcaagga cgcgtgctc gaccgcgccg	23820
agggtccct cagcgtggcg gagctcagcc gcgcctacga gcgcaacctc ttctcgccgc	23880
gcgtgcccc caagcgccag cccaacggca cctgcgagcc caaccgcgc ctcaacttct	23940
acccggtctt cgcgggtccc gaggccctgg ccacctacca cctcttttc aagaacaaaa	24000
ggatccccgt ctctgccc gccaacgca ccgcgcgca cgccctgctc aacctgggcc	24060
ccggcggccg cctacctgat atgcctctt tggaagaggt tccaagatc ttcgagggtc	24120
tgggcagcga cgagactcg gccgcgaacg ctctgcaagg aagcggagag gagcatgagc	24180
accacagcgc cctgggtggag ttggaaggcg acaacgcgc cctggcggtg ctcaagcgca	24240
cggtcgagct gacccaactc gcctaccg cgctcaacct gcccccaag gtcagagcg	24300
ccgtcatgga ccagggtgct atcaagcgcg cctcgccct ctccgaggac gagatgcagg	24360
accccgagag ctcgagcag ggcaagccc tggtcagcga cgagcagctg gcgcgtggc	24420
tgggagcgag tagcaccgcc cagagcctgg aagagcggcg caagctcatg atggcctgg	24480
tcctggtgac cgtggagctg gactgtctgc gccgttctt cgccgacgc gagacctgc	24540
gcaaggtcga ggagaacctg cactacctct tcaggcacgg gttctgctgc caggcctgca	24600
agatctccaa cgtggagctg accaacctgg tctctacat gggcatcctg cacgagaacc	24660
gcctggggca gaacgtgctg cacaccacc tgccggggga gggccgccc gactacatcc	24720
gcgactgct ctacctgac ctctgccaca cctggcagac gggcatgggc gtgtggcagc	24780
agtgcctgga ggagcagaac ctgaaagagc tctgcaagct cctgcagaag aacctcaagg	24840
ccctgtggac cgggttcgac gagcgacca ccgccggga cctggccgac ctcatcttc	24900
ccgagcgct gcggctgacg ctgcgcaacg ggctgcccga ctttatgagc caaagcatgt	24960
tgcaaaactt tcgtctttc atcctcgaa gctccgggat cctgcccgc acctgctccg	25020

cactgccctc ggacttcgtg ccgctgacct tccgcgagtg ccccccgcg ctctggagcc	25080
actgttactt gctgcgcctg gccaaactacc tggcctacca ctcgagcgtg atcgaggacg	25140
tcagcggcga ggggtctgctc gaatgccact gccgctgcaa cctctgcacg ccgcaccgct	25200
ccctggcctg caacccccag ctgctgagcg aaaccagat catcggcacc ttcgagttgc	25260
aaggccccgg cgagggcaag gggggtctga aactacccc ggggctgtgg acctcggcct	25320
acttgcgcaa gtctgtcccc gaggactacc atcccttcga gatcaggttc tacgaggacc	25380
aatcccagcc gcccaaggcc gagctgtcgg cctgcgtcat caccagggg gccatcctgg	25440
cccaattgca agccatccag aaatcccgcc aagaatttct gctgaaaaag ggccacgggg	25500
tctacctgga cccccagacc ggagaggagc tcaaccccag cttccccag gatgccccga	25560
ggaagcagca agaagctgaa agtggagctg ccgctgccgc cggaggattt ggaggaagac	25620
tgggagagca gtcaggcaga ggaggaggag atggaagact gggacagcac tcaggcagag	25680
gaggacagcc tgcaagacag tctggaggaa gacgaggtgg aggaggaggc agaggaagaa	25740
gcagccgcg ccagaccgtc gtcctcggcg gaggaggaga aagcaagcag cacggatacc	25800
atctccgctc cgggtcgggg tcgcggcggc cgggccaca gtaggtggga cgagaccggg	25860
cgcttcccga accccaccac ccagaccggt aagaaggagc ggcagggata caagtcttg	25920
cgggggcaca aaaacgcat cgtctcctgc ttgcaagcct gcgggggcaa catctccttc	25980
accggcgct acctgctctt ccaccgcggt gtgaacttc cccgcaacat cttgcattac	26040
taccgtcacc tccacagccc ctactactgt ttccaagaag aggcagaaac ccagcagcag	26100
cagcagaaaa ccagcggcag ctagaaaatc cacagcggcg gcggcaggtg gactgaggat	26160
cgcgcgcaac gagccggcg agaccggga gctgaggaac cggatcttcc ccacctcta	26220
tgccatcttc cagcagagtc gggggcagga gcaggaactg aaagtcaaga accgttctct	26280
gcgtcgtctc accgcagtt gtctgtatca caagagcgaa gaccaacttc agcgcactct	26340
cgaggacgcc gaggtctctt tcaacaagta ctgcgcgtc actcttaaag agtagccgc	26400
gccccccac acacggaaaa aggcgggaat tacgtacca cctgcgcct tcgcccgacc	26460
atcatcatga gcaaagagat tcccacgcct tacatgtgga gctaccagcc ccagatgggc	26520
ctggccgcg gcgcccga ggactactcc acccgcatga actggctcag tgccgggcc	26580
gcgatgatct cacgggtgaa tgacatccgc gccaccgaa accagatact cctagaacag	26640
tcagcgatca ccgccagcc ccgcatcac cttaatccgc gtaattggcc cgccgcctg	26700
gigtaccagg aaattccca gccacgacc gtactacttc cgcgagacgc ccaggccgaa	26760

gtccagctga ctaactcagg tgtccagctg gccggcggcg ccgccctgtg tcgtcaccgc	26820
cccgctcagg gtataaagcg gctggatgac cgaggcagag gcacacagct caacgacgag	26880
gtggtagact cttcgctggg tctgcgacct gacggagtct tccaactcgc cggatcgggg	26940
agatcttctt tcacgcctcg tcaggccgtc ctgactttgg agagttcgtc ctgcgagccc	27000
cgctcgggtg gcatcggcac tctccagttc gtggaggagt tcactccctc ggtctacttc	27060
aacccttctt ccggctcccc cggccactac ccggacgagt tcatcccga cttcgacgcc	27120
atcagcgagt cgggtggacgg ctacgattga atgtcccatg gtggcgcagc tgacctagct	27180
cggtctcgac acctggacca ctgccgccgc ttcgctgtct tcgctcggga tctcgccgag	27240
tttgctact ttgagctgcc cgaggagcac cctcagggcc cggccacagg agtgcggatc	27300
gtcgtcgaag ggggcctcga ctcccacctg cttcggatct tcagccagcg tccgatcctg	27360
gtcgagcgcg agcaaggaca taccgtctg accctgtact gcatctgcaa ccacccggc	27420
ctgcatgaaa gtctttgttg tctgtgtgt actgagtata ataaaagctg agatcagcga	27480
ctactccgga cttccgtgtg ttctgaatc catcaaccag tctttgttct tcaccgggaa	27540
cgagaccgag ctccagctcc agtgtaagcc ccacaagaag tacctcacct ggctgttcca	27600
gggctccccg atcgccgttg tcaaccactg cgacaacgac ggagtcctgc tgagcggccc	27660
tgccaacctt actttttcca cccgcagaag caagctccag ctcttccaac ctttctccc	27720
cgggacctat cagtgcgtct cgggacctg ccatcacacc ttccacctga tcccgaatac	27780
cacagcgccg ctccccgcta ctaacaacca aactaccac caacgccgc gtcgcgacct	27840
ttctgaatct aatactacca cccacaccgg aggtgagctc cgaggtcgac caacctctgg	27900
gatttactac ggccccctgg aggtggtagg gttaatagcg ctaggcctag ttgcgggtgg	27960
gcttttggct ctctgtacc tatactccc ttgctgttcg tacttagtgg tgctgtgtg	28020
ctggtttaag aaatggggaa gatcacccta gtgagctgcg gtgtgctggt ggcgggtggtg	28080
gtgctttcga ttgtgggact gggcggcgcg gctgtagtga aggaggagaa ggccgatccc	28140
tgcttgcat tcaatcccga caaatgccag ctgagttttc agcccgatgg caatcgggtc	28200
acggtgctga ttaagtgcgg atgggaatgc gagaacgtga gaatcgagta caataacaag	28260
actcggaaca atactctgc gtccgtgtgg cagccccggg accccgagtg gtacaccgtc	28320
tctgtcccc gtgtgacgg ctccccgcgc accgtgaata atactttcat ttttgacac	28380
atgtgcgaca cggatcatgt gatgagcaag cagtacgata tgtggcccc cacgaaggag	28440
aacatcgtgg tcttctccat cgcttacagc ctgtgcacgg cgctaatac cgctatcgtg	28500
tgctgagca ttaacatgtt catgctatt cgccccagaa ataatgccga aaaagagaaa	28560
cagccataac acgtttttt cacacacct tttcagacca tggcctctgt taaattttt	28620

cttttatattg ccagtcctcat tgccgtcatt catggaatga gtaatgagaa aattactatt	28680
tacactggca ctaatcacac attgaaaggt ccagaaaaag ccacagaagt ttcattggtat	28740
tgttatttta atgaatcaga tgtatctact gaactctgtg gaaacaataa caaaaaaat	28800
gagagcatta ctctcatcaa gtttcaatgt ggatctgact taaccctaata taacatcact	28860
agagactatg taggtatgta ttatggaact acagcaggca ttttggacat ggaattttat	28920
caagtttctg tgcttgaacc caccacgcct agaatgacca caaccacaaa aactacacct	28980
gttaccacta tacagctcac taccaatggc tttcttgcca tgcttcaagt ggctgaaaat	29040
agcaccagca ttcaaccac cccaccaggt gaggaaattc ccagatccat gattggcatt	29100
attgttgctg tagtgggtgtg catgttgatc atcgcttgt gcatgggtga ctatgccttc	29160
tgctacagaa agcacagact gaacgacaag ctggaacact tactaagtgt tgaattttaa	29220
tttttttagaa ccatgaagat cctaggcctt ttaatttttt ctatcattac ctctgctcta	29280
tgcaattctg acaatgagga cgttactgtc gttgtcggat caaattatac actgaaaggt	29340
ccagcgaagg gtatgctttc gtggtattgc tattttggat ctgacactac agaaactgaa	29400
ttatgcaatc ttaagaatgg caaaattcaa aattctaaaa ttaacaatta tatatgcaat	29460
ggtactgac tgatactct caatatcacg aaatcatatg ctggcagtta cacctgccct	29520
ggagatgatg ctgacagtat gatTTTTTtac aaagtaactg ttgttgatcc cactactcca	29580
cctccacca ccacaactac tcacaccaca cacacagatc aaaccgcagc agaggaggca	29640
gcaaagttag ccttgcaggt ccaagacagt tcattttgtg gcattacccc tacacctgat	29700
cagcgggtgc cggggttgc ctgcagcgggt attgtcgggtg tgctttcggg attagcagtc	29760
ataatcatct gcatgttcat ttttgcttgc tgctatagaa ggctttaccg acaaaaatca	29820
gaccactgc tgaacctcta tgtttaattt tttccagagc catgaaggca gttagcgctc	29880
tagttttttg ttctttgatt ggcatgtttt ttagtgctgg gtttttgaaa aatcttacca	29940
tttatgaagg tgagaatgcc actctagtgg gcatcagtgg tcaaaatgtc agctggctaa	30000
aataccatct agatgggtgg aaagacattt gcgattggaa tgtcactgtg tatacatgta	30060
atggagttaa cctcaccatt actaatgcca cccaagatca gaatggtagg ttttaagggcc	30120
agagtttcac tagaaataat gggatatgaat ccataacat gtttatctat gacgtcactg	30180
tcacagaaa tgagactgcc accacacaga tgeccactac acacagttct accactacta	30240
ccatgcaaac cacacagaca accactacat caactcagca tatgaccacc actacagcag	30300
caaagccaag tagcgcagcg cctcagccac aggctttggc tttgaaagct gcgcaagcta	30360
gtacaactac taggaccaat gagcagacta ctgatttttt gtccactgtc gagagccaca	30420
ccacagctac ctcgagtgcc ttctctagca ccgccaatct ctctcgtt tcctctacac	30480

caatcagtc cgtactact cctagccccg ctcattctcc cactccccctg aagcaaactg	30540
aggacagcgg catgcaatgg cagatcaccc tgctcattgt gatcgggttg gtcattcctgg	30600
ccgtgttgct ctactacatc ttctgccgcc gcattcccaa cgcgaccgc aagccggtct	30660
acaagcccat cattgtcggg cagccggagc cgcttcaggt ggaagggggt ctaaggaatc	30720
ttctcttctc ttttacagta tgggtattga actatgattc ctagacaatt ctgtatcact	30780
attcttatct gctctctcca agtctgtgcc accctcgctc tggtagccaa cgccagtcca	30840
gactgtattg ggcccttcgc ctctacgtg ctctttgcct tcatcacctg catctgctgc	30900
tgtagcatag tctgcctgct taccaccttc ttccagttca ttgactggat ctttgtgcgc	30960
atcgctacc tgcgccacca cccccagtac caccgaccgc gagtggcgcg gctgctcagg	31020
ctctctgat aagcatgcgg gctctgctac ttctcgcgct tctgctgtta gtgctcccc	31080
gtcccgctga cccccgttc cccactcagt cccccgagga gggtcgcaaa tgcaaatcc	31140
aagaaccctg gaaattcttc aaatgctacc gccaaaaatc agacatgcat ccagctgga	31200
tcatgatcat tgggatcgtg aacattctgg cctgcacct catctcttt gtgatttacc	31260
cctgctttga ctttggttgg aactcgccag aggcgctcta tctccgcct gaacctgaca	31320
caccaccaca gcagcaacct caggcacacg cactaccacc accacgcct aggccacaat	31380
acatgcccatt attagactat gaggccgagc cacagcgacc catgctcccc gctattagtt	31440
acttcaatct aaccggcgga gatgactgac cactggcca acaacaacgt caacgacctt	31500
ctctggaca tggacggcgg cgctcggag cagcgactcg cccaattcg cattcgccag	31560
cagcaggaga gagccgtcaa ggagctgcag gacggcatag ccatccacca gtgcaagaaa	31620
ggcatcttct gcctggtgaa acaggccaag atctctacg aggtcactcc aaatgacct	31680
cgctctctc acgagctctc gcagcagcgc cagaagtca cctgcctggt cggagtcaac	31740
cccctgctca tcaccagca gtcgggcat accaaggggt gcatccactg ctctgcgcac	31800
tccccgact ggtccacac tctgatcaag accctctgcg gcctccgga cctctcccc	31860
atgaactaat cccccctta tccagtgaat taaagatcat attgatgatg atttaataa	31920
aaaaataatc atttgatttg aaataaagat acaatcatat tgatgatttg agtttaacaa	31980
aaaataaaga atcacttact tgaaatctga taccaggtct ctgtccatgt tttctgcaa	32040
caccacttca ctccccctt cccagctctg gtactgcagg ccccgcgagg ctgcaaaatt	32100
cctccacacg ctgaaggga tgtcaaattc ctctgtccc tcaatcttca tttatcttc	32160
tatcagatgt ccaaaaagcg cgtccgggtg gatgatgact tcgacccgt ctaccctac	32220

gatgcagaca acgcaccgac cgtgcccttc atcaaccccc cttcgtctc ttcagatgga	32280
ttccaagaga agccctggg ggtgttgtcc ctgcgactgg ccgaccccg caccaccaag	32340
aacggggaaa tcacctcaa gctgggagag ggggtggacc tcgactctc gggaaaactc	32400
atctccaaca cggccacca ggcgcgcgc cctctcagtt tttccaaca caccatttcc	32460
cttaacatgg atcatccctt ttactactaa gatggaaaat tctcttaca agtttctcca	32520
ccattaaata tactgagaac aagcattcta aacacactag ctttaggttt tggatcaggt	32580
ttaggactcc gtggctctgc cttagcagta cagttagtct ctccacttac atttgatact	32640
gatggaaaca taaagcttac cttagacaga ggtttgcatg ttacaacagg agatgcaatt	32700
gaaagcaaca taagctgggc taaaggttta aaatttgaag atggagccat agcaaccaac	32760
attggaaatg ggtagagtt tggagcagc agtacagaaa cagggtgtga tgatgcttac	32820
ccaatccaag ttaaaacttg atctggcctt agctttgaca gtacaggagc cataatggct	32880
ggtaacaaag aagacgataa actcactttg tggacaacac ctgatccatc accaaactgt	32940
caaatactcg cagaaaatga tgcaaaacta acactttgct tgactaaatg tggtagtcaa	33000
atactggcca ctgtgtcagt cttagtgtga ggaagtggaa acctaaaccc cattactggc	33060
accgtaagca gtgctcaggt gtttctacgt tttgatgcaa acggtgttct tttacagaa	33120
cattctacac taaaaaata ctgggggtat aggcaggag atagcataga tggcactcca	33180
tataccaatg ctgtaggatt catgcccaat ttaaaagctt atccaaagtc acaaagtctt	33240
actactaaaa ataatatagt agggcaagta tacatgaacg gagatgttct aaacctatg	33300
cttctacta taacctcaa tggtagtcat gacagcaaca gtacatatc aatgtcattt	33360
tcatacacct ggactaatgg aagctatgtt ggagcaacat ttggggctaa ctcttatacc	33420
ttctctaca ttgccaaga atgaacactg tatccaccc tacattgccc aaccttccc	33480
acccactct gtctatggaa aaaactctga aacacaaaat aaaataaagt tcaagtgttt	33540
tattgattca acagttttac aggtctgag cagttatttt tcctccacc tccaagaca	33600
tggaaataac caccctctcc cccgcacag ccttgaacat ttgaaagcca ttggtgatgg	33660
acatgctttt ggtctccacg ttccacacag tttcagagcg agccagtctc gggctggtea	33720
gggagatgaa accctccggg cactcccga tctgcacctc acagctcaac agctgaggat	33780
tgctctcggt ggtcgggatc acggttatct ggaagaagca gaagagcggc ggtgggaatc	33840
atagtccga aacgggatcg gccggtgtg tcgcatcagg cccgcagca gtcgctgccg	33900
ccgccgtcc gtcaagctgc tgctcagggg gtccgggtcc agggactccc tcagcatgat	33960
gcccacggcc ctccagatca gtcgtctggt gcggcggcg cagcagcga tgcggatctc	34020
gctcaggtcg ctgcagtacg tgcaacacag gaccaccagg ttgtttaaca gtccatagtt	34080

caacacgctc cagccgaaac tcatcgccgg aaggatgcta cccacgtggc cgtcgtacca	34140
gatcctcagg taaatcaagt ggcgtccct ccagaacacg ctgccacgt acatgatctc	34200
cttggcatg tggcggttca ccacctcccg gtaccacatc acctctggt tgaacatgca	34260
gccccggatg atcctgcgga accacagggc cagcaccgcc ccgcccgcga tgcagcgaag	34320
agaccccggg tcccggaat ggcaatggag gaccaccgc tcgtaccgt ggatcatctg	34380
ggagctgaac aagtctatgt tggcacagca caggcatatg ctcatgcatc tcttcagcac	34440
tctcagctcc tcgggggtca aaaccatac ccagggcacg gggaactctt gcaggacagc	34500
gaaccccgca gaacaggga atcctgcac ataacttaca ttgtgcatgg acagggtatc	34560
gcaatcaggc agcacgggt gatcctccac cagggaagcg cgggtctcgg tctcctcaca	34620
gcgtggaag gggccggcc gatacgggtg atggcgggac gcggctgac gtgttctcga	34680
ccgtgtcatg atgcagttgc tttcggacat tttcgtactt gctgtagcag aacctggtcc	34740
gggcgctgca caccgatcg cggcggcgg tccggcgctt ggaacgctcg gtgttgaagt	34800
tgtaaacag cactctctt agaccgtgca gcaaatctag ggcctcagga gtgatgaaga	34860
tccatcatg cctgatagct ctgatcacat cgaccacgt ggaatgggc agaccagcc	34920
agatgatgca atttgttgg gtttcggtga cggcggggga gggaagaaca ggaagaacca	34980
tgattaactt ttaatcaaaa cggctcggga gcacttcaaa atgaaggtcg cggagatggc	35040
acctctgcc cccgctgtgt tgggtggaaaa taacagccag gtcaaagggtg atacggttct	35100
cgagatgttc cagggtggct tccagcaaag cctccacgcg cacatccaga aacaagacaa	35160
tagcaaaagc gggagggttc tctaattcct caatcatcat gttacactcc tgcaccatcc	35220
ctagataatt ttcatTTTT cagccttgaa tgattcgaac tagttcctga ggtaaatcca	35280
agccagccat gataaagagc tcgcgcagag cgccctccac cggcattctt aagcacacce	35340
tcataattcc aagatattct gctcctggtt cacctgcagc agattgacaa gcggaatac	35400
aaaatctctg ccgcgatccc taagtcctc cctcagcaat aactgtaagt actctttcat	35460
atcgtctccg aaatTTTT tag ccataggacc ccaggaata agagaagggc aagccacatt	35520
acagataaac cgaagtcccc cccagtgagc attgccaaat gtaagattga aataagcatg	35580
ctggctagac ccggtgatat cttccagata actggacaga aaatcgggca agcaatTTTT	35640
aagaaaaatc acaaaagaaa aatcttcag gtgcacgttt agggcctcgg gaacaacgat	35700
ggagtacgtg caaggggtgc gttccagcat ggtagtttag ctgatctgta aaaaacaaaa	35760
aataaaacat taaacatgc tagcctggcg aacaggtggg taaatcgttc tctccagcac	35820
caggcaggcc acggggtctc cggcgcgacc ctcgtaaaaa ttgtcgctat gattgaaaac	35880
catcacagag agacgttccc ggtggccggc gtgaatgatt cgacaagatg aataaccccc	35940

cggaacattg gcgtccgcga gtgaaaaaaa gcggccgagg aagcaataag gcactacaat 36000

gctcagtctc aagtcagca aagcgatgcc atgcggatga agcacaaaat tctcaggtgc 36060

gtacaaaatg taattactcc cctcctgcac aggcagcgaa gcccccgatc cctccagata 36120

cacatacaaa gcctcagcgt ccatagctta ccgagcagca gcacacaaca ggcgcaagag 36180

tcagagaaag actgagctct aacctgtcca cccgctctct gctcaatata tagcccagat 36240

ctacactgac gtaaaggcca aagtctaaaa ataccgcca aataatcaca cacgcccagc 36300

acacgccag aaaccggtga cacactcaga aaaatacgcg cacttctca aacgccc aaa 36360

ctgccgtcat ttccgggttc ccacgtacg tcatcagaat tcgactttca aattccgtcg 36420

accgttaaaa atgtcacccg cccgcccct aacggtcgcc gctcccacag ccaatcacag 36480

ccccgcattc ccaaattcaa acagctcatt tgcattataa cgcgcaccaa aagtttgagg 36540

tatattattg atgatg 36556

<210> 5

<211> 34874

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 5

catcatcaat aatatacctc aaacttttgg tgcgcgttaa tatgcaaatg agctgtttga 60

atttggggat gcggggctgt gattggctgt gggagcggcg accgttaggg gcggggcggg 120

tgacgttttg atgacgtgtt tgtgaggcgg agccggtttg caagtctctg tgggaaaagt 180

gacgtcaaac gaggtgtggt ttgaacacgg aaatactcaa tttcccgcg ctctctgaca 240

ggaaatgagg tgtttctggg cggatgcaag tgaaaacggg ccattttcgc gcgaaaactg 300

aatgaggaag tgaaaatctg agtaatttcg cgtttatggc agggaggagt atttgccgag 360

ggccgagtag actttgaccg attacgtggg ggtttcgatt accgtatttt tcacctaaat 420

ttccgcgtac ggtgtcaaag tccggtgttt ttacatcatt tccccgaaaa gtgccacctg 480

acgtaactat aacggctcta aggtgatcac cgatccagac atgataagat acattgatga 540

gtttggacaa accacaacta gaatgcagtg aaaaaaatgc tttatttgtg aaatttgtga 600

tgctattgct ttatttgtaa ccattataag ctgcaataaa caagttcccg gatctttcta 660

gctagtctag actagctaga ctcgagagcg gccgcaatcg attcaggtgt aatggagttt 720

cacgcccctc agcacaggct cggaatcgtc ctcatcgaat ttacagcagg atccacagct 780

acagcagccc ttcaggcaag aacagcagga tgcatacag cacagcatga tggtcacat 840

cacgatagcg atcagtcagg cgatgaagcc cagccagatg taccaaggcc acttgatgta	900
ctgctcgtag ttgcccagct cctgcagatc gatcaggctc tcgttcaggt tcttagccac	960
ctcgttcagc ctgtcgatct ccttctggat gttcaccacg gaggcgttga ttccgctgat	1020
gtcgcccaga tccacgtcgg gggagggtgtg gttcttgaag tacttatcca gtcctcctt	1080
aaagctgtcc agctctggct gcagaggatc gtacacggtg ttgttcacga ttccgatgac	1140
cacgtcacag ttgccagaca cgaatgtgtt gtctgtgggtg atgatctgtg gtcgtagaa	1200
gttgcgtgtg gtcacaaacc agtgggttcc gttggacacg aacacgcctt cccgaggaaa	1260
gtgggccttg ccatcgtggc agatggcggg agctgtgggtg aagtctcttct cctgagctgg	1320
cacgtaggtc acgtgcagaa acaccactcc gtgaggggca gactggggga aggacatcag	1380
gtggtatccc ttgccacaaa agtcactctt cttagactgg cccagcacgc actcggacat	1440
cttgggtggca gccaggttgg cgctagccct gatctcagca gccctgatca gctgctgtgt	1500
cacgtaggtc tgcagagact gcagcttcc tgtgatcagc ctgtcgatct gcacctcagc	1560
ctctggaggg tccagcctgc tcaggatgtc gttcagcacg ctagagatgg cgccgaagtt	1620
ggagctcagc tgcctcacca ggggtgttcag ggcctgagcg ttctggttca ccacatcctg	1680
cagctttccc agggcggaag ctgtagagga caggctgtcc tggatcttgc cgatagcggg	1740
gttaaaactgg ttggcgatca gcttctggtt ctcgtacagc acgttctggg tcactccgat	1800
gccgttgaac cggtlaagcca tctgcatggc aaaggggagc tgcagggcag ctccagcgcc	1860
gaaggtccat ccggatgtga tggttccagc cagcagggcg cttgtgtact gagcgatcat	1920
ctcatctgtc agcaggggtg gcagcacggt cagtccttta aacttctggg cacagatcag	1980
gtccctggca gcgatgtctc ccaggcaatc gccgtactgc ttgatgaagc cggcatcagc	2040
cagggtcacc ttgttgaaca gcaggtctc gataaaagctc ctcttagatg gcttggaaagg	2100
atcgggcagg atctgggaaa agttgaatcc gccaaagtcc ttgatagggg gggctcttga	2160
gatctgcttc acctgggcga acacctctg tgtgttcttg tctgctcca cagcgattcc	2220
tgtcagggct ctgttcagct ggggtacaaa gctgccgtac tgcagcagca ggttgcctga	2280
ctcggtagaa tctccacaga tgtacattgt gcagtcaca gatgtcttgg tcatggacac	2340
tggcaggatc tctgtgttca cgctaattgt gaagttggta gggatagcga tgctgttgtt	2400
agagtaagcc acagagttct ccacgcccag ggacatgggtg taggcgatga tagactggga	2460
agccacgctc ctggctctcc ttggagagtt tgtctgggtc tggtaagaag cacagattcc	2520
ggcgccgata gggatgtcgc actcgtagga gttgttcacg tgctcagctc cgatcagaca	2580
gccggtcttt gtctggaaca cgttggagcc ggtgctgtac acctccatg taggggtcag	2640

ctgatcggcg tggatagcca cgggcacctic ggtacagttc acgccctggt acagcacggc	2700
cacctggttg cttgtgttgg ttcctggtgt gatcacgtc actccgccga aagagcatgg	2760
tgtgatgtcc aggatctcca gggctctgagg gtcgcgcaca gcgtctgtgg tatcgcgcat	2820
gtcccgcccg aactgctgaa aaggcaggaa ctctctgttg gactcggta gcactcctgt	2880
gccggtcagt ccgttaaagt tgaagttaac gcacttggtc ttaccagggt tgggtgactt	2940
ctttggtccg cacactgtag caggagcgtg cagcagctca aagctcagca ccaccacgcg	3000
glagggtcgtg tatcccacgc cgtatgttgg ctggaatccg taggactgca gagggaagta	3060
acagttgaag ccttcactc cgttgcattg ggtgcttcca gcctggtaga tctctgtaga	3120
gatgtccgc tcgaatggct tcagttgct ctttctaaac agcctgtaca ggtagtgtga	3180
gtttccgcc actttggaat ccagttgtt gctgttcag gcgatcacgc agccggtgaa	3240
atcgtcaggc agctttagt ttagtcagc gatgtttct gtctggccgg gagcgatctg	3300
gcgcacctcg tctcccctga tcacgaaaga atcggcgta acgttggtaa agcacaggtc	3360
gttcagcttt gtaggggaca cgccgtagca cttaaagggt ctgaaagaag cggagtgtga	3420
cagcagctg tagtcggcca cgcagttaga gatgcgttc cggttccaag cgtacacgt	3480
ggcgaagcgg gtagcgtga acacctctc aaaagggcac aggtttgtga tgttgggaaa	3540
gcgcacgata gactcggtag gctgcaccg gaagttacta gtctggtaga tgccctctc	3600
cacggtaaag gacttcagtg tacactttgt ctgcctcagg gggccaggcg cgcaatccac	3660
agcgtctgtg atggttccgt tctcgttga ctccagcagg aaggtccggg gctgcaggta	3720
gcccacgtag taagcagcag ctccagcggg ccatccgcta gaggagtcgc ctggtgtcag	3780
gtagcttctg tgcagtgtc gaaacctggt gatgttgatt ccgatgggca gatccaccag	3840
tggctccagg gcgtgaagc cctgtggcag gccgcgcacc aggttgattg ggggtgtgctt	3900
agagtagatc ttaaagtagc cgtcagatt cttaaacacg aactcccga ggttcttgaa	3960
gtttccctgc ttgccctcca ggtccatcag gaagggtcgg gacacgtact caaatgtgca	4020
gttgttggcg ctagagtaca ctctaaactc ggactccatc cagctcttgt tgttcttgtg	4080
gtagtacacg cccaggaatg gatcgttaca aaactggaac tcgcacacct tgatgaccac	4140
gttgggtggcg ttgttcacga tcagcagaga ctgtgtcttg gactccagtg tggttccaaa	4200
gatccagcct ctgatgatg tgcctctctc ggtagaggcg aagtacacgc catcgtaaa	4260
gggcagcact ggggtggcga acctcttctg tccgttgggt ccagacacgt ggatagcgtg	4320
gaaccaggtc acgttgctaa agaaaggcag aaacagatcc tgtgtagagt gcagcacgga	4380

gcttctaacc accttgtcgg ggtaatacac tcctcttgtg aaggagttag tgtaagcggg 4440

agggagctgg gtccgagtag tcaggttcac gactgggat gagacgagag ggaggagcac 4500

gagaaagaca aacatggtgg cggtaccggc tgcagttgga cctgggagtg gacacctgtg 4560

gagagaaagg caaagtggat gtcattgtca ctcaagtga tggccagatc tcaagcctgc 4620

cacacctcaa gtgaagccaa gggggtgggc ctatagactc tataggcggt acttacgtca 4680

ctcttggcac ggggaatccg cgttccaatg caccgttccc ggccgaggag gctggatcgg 4740

tcccgtgtc ttctatggag gtcaaacag cgtggatggc gtctccaggc gatctgacgg 4800

ttcactaac gagctcgtcg acgatctcta tctatgtag ggagatctct atcactgata 4860

gggagagctc tgcttatata gacctccac cgtacacgcc taccgcccatt ttgcgtcaat 4920

ggggcggagt tgttacgaca ttttgaaag tcccgttgat tttggtgcca aaacaaactc 4980

ccattgacgt caatggggtg gagacttga aatccccgtg agtcaaaccg ctatccacgc 5040

ccattgatgt actgcaaaa ccgcatcacc atggtaatag cgatgactaa tacgtagatg 5100

tactgccaag taggaaagtc ccataaggtc atgtactggg cataatgcca ggcgggcccatt 5160

ttaccgtcat tgacgtcaat agggggcgta ctggcataat gatacacttg atgtactgcc 5220

aagtgggcag ttaccgtaa atactccacc cattgacgtc aatggaaagt ccctattggc 5280

gttactatgg gaacatacgt cattattgac gtcaatgggc gggggtcgtt gggcggtcag 5340

ccaggcgggc cattaccgt aagttatgta acgcggaact ccatatatgg gctatgaact 5400

aatgaccccg taattgatta ctattaataa ctagaggcct gaccatctgg tgctggcctg 5460

caccagggcc gagtttgggt ctactttaag ttgatccga tctttttccc tctgcaaaaa 5520

attatgggga catcatgaag ccccttgagc atctgacttc tggctaataa aggaaattta 5580

ttttcattgc aatagtgtgt tggaattttt tgtgtctctc actcggaagc gatctgaatt 5640

catctatgtc ggggtcggag aaagaggtaa tgaatggca ttatgggtat tatgggtctg 5700

cattaatgaa tcggccagat tatgttgcc accgtgcatg tggcctcgca cccccgaag 5760

acatgcccc agttcgagca caacgtcatg acccgatgca acgtgcacct gggctcccgc 5820

cgaggcatgt tcatgcccta ccagtgaac atgcaatttg tgaaggtgct gctggagccc 5880

gatgccatgt ccagagttag cctgacgggg gtgtttgaca tgaatgtgga gctgtggaaa 5940

attctgagat atgatgaate caagaccagg tgccgggcct gcgaatcgag aggcaagcac 6000

gccaggcttc agcccgtgtg tgtggagggt acggaggacc tgcgacccga tcatttgggtg 6060

ttgtcctgca acgggacgga gttcggctcc agcggggaag aatctgacta gagtgagtag 6120

tgtttggggc tgggtgggag tctgcatgat gggcagaatg actaaaatct gtgtttttct 6180

gtgtgttgca gcagcatgag cggaagcgcc tcctttgagg gaggggtatt cagcccttat 6240

ctgacggggc gtctccctc ctgggcggga gtgcgtcaga atgtgatggg atccacggtg	6300
gacggccggc ccgtgcagcc cgcaaaactct tcaacctga cctacgcgac cctgagctcc	6360
tcgtccgtgg acgcagctgc cgccgcagct gctgcttccg ccgccagcgc cgtgcgcgga	6420
atggccctgg gcgccggcta ctacagctct ctggtggcca actcgagttc caccaataat	6480
ccgccagcc tgaacgagga gaagctgttg ctgctgatgg ccagctcga ggctctgacc	6540
cagcgctgg gcgagctgac ccagcaggtg gctcagctgc aggcggagac gcgggccgcg	6600
gttgccacgg tgaacacaa ataaaaaatg aatcaataaa taaacggaga cggttgttga	6660
ttttaacaca gagtcttgaa tctttatttg atttttcgcg cgcggtagac cctggaccac	6720
cggctctgat cattgagcac ccggtggatc ttttcagga ccggtagag gtgggcttgg	6780
atgttaggtt acatgggcat gagcccgctc cgggggtgga ggtagctcca ttgcagggcc	6840
tcgtgctcgg ggggtgtgtt gtaaatcacc cagtcatagc aggggcgcag ggcattgtgt	6900
tgacaatat ctttagaggag gagactgatg gccacgggca gccctttggt gtaggtgttt	6960
acaaatctgt tgagctggga gggatgcatg cggggggaga tgaggtgcat cttggcctgg	7020
atcttgagat tggcgtgtt accgccaga tccgcctgg ggttcatgtt gtgcaggacc	7080
accagcacgg tglatccgtt gcacttgggg aatttatcat gcaacttga agggaaggcg	7140
tgaagaatt tggcgacgcc cttgtgccg ccaggtttt ccatgcactc atccatgatg	7200
atggcgatgg gcccgtaggc ggccgcctgg gcaaagacgt ttcgggggtc ggacacatca	7260
tagttgtgtt cttgggtgag ctctcatag gccattttaa tgaatttggg gcggagggtg	7320
cccgactggg ggacgaaggt gccctcgatc cggggggcgt agttgccctc gcagatctgc	7380
atctcccagg ccttagctc ggaggggggg atcatgtcca cctgcggggc gatgaaaaa	7440
acggtttccg ggccggggga gatgagctgg gccgaaagca ggttccggag cagctgggac	7500
ttgccgcagc cggtagggacc gtagatgacc ccgatgaccg gctgcaggtg gtagttgagg	7560
gagagacagc tgccgtcctc gcggaggagg ggggccacct cgttcatcat ctgcgcaca	7620
tgcatgttct cgcgcacgag ttccgccagg aggcgctcgc ccccgagca gaggagctct	7680
tgacgcgagg cgaagttttt cagcggcttg agcccgctcg ccatgggcat ttgggagagg	7740
gtctgttgca agagttccag acggtcccag agctcgtga tgtgctctag ggcattctga	7800
tccagcagac ctctcgttt cgccgggttg gcgcactgcg ggagtagggc accaggcgat	7860
gggcgtccag cgaggccagg gtccggtcct tccagggcg cagggtccgc gtcagcgtgg	7920
tctccgtcac ggtgaagggg tgcgcgccgg gctgggcgct tgcgagggtg cgcttcaggc	7980
tcatccggct ggtcgagaac cgctcccgtt cggcgccctg cgcgtcgcc aggtagcaat	8040
tgagcatgag ttcttagttg agcgctcgg ccgcgtggcc cttggcgagg agcttacctt	8100

tggaagtgtg tccgcagacg ggacagagga gggacttgag ggcgtagagc ttgggggcga	8160
ggaagacgga ctcgggggcg taggcgtccg cgccgcagct ggcgagacg gtctgcact	8220
ccacgagcca ggtgaggtcg gggcggtcgg ggtcaaaaac gaggtttcct ccgtgctttt	8280
tgatgcgttt cttacctctg gtctccatga gtctgtgtcc ccgtgggtg acaaagaggc	8340
tgccgtgtc cccgtagacc gactttatgg gccggtcctc gagcgggggtg ccgcggtcct	8400
cgctcgtagag gaaccccgcc cactccgaga cgaaggcccg ggtccaggcc agcacgaagg	8460
agggcacgtg ggaggggtag cggtcgttgi ccaccagcgg gtccacctc tccagggtat	8520
gcaagcacat gtccccctcg tccacatcca ggaaggtgat tggcttgtaa gtgtaggcca	8580
cgtagccggg ggtcccgcc ggggggggtat aaaagggggc gggccctgc tcgtcctcac	8640
tgtcttccgg atcgctgtcc aggagcgcca gctgttgggg taggtattcc ctctcgaagg	8700
cgggcatgac ctcggcactc aggttgtcag ttctagaaa cgaggaggat ttgatattga	8760
cgggtgccgtt ggagacgctt ttcatgagcc cctcgtccat ctggtcagaa aagacgatct	8820
ttttgtgtc gagcttgggt gcgaaggagc cgtagagggc gttggagagg agcttggcga	8880
tggagcgcat ggtctgttct ttttccttgi cggcgcgctc cttggcggcg atgttgagct	8940
gcacgtactc gcgcgccacg cacttccatt cggggaagac ggtggtgagc tcgtcgggca	9000
cgattctgac ccgccagccg cggttgtgca ggtgatgag gtccacgtg gtggccacct	9060
cgccgcgcag gggctcgttg gtccagcaga ggccgccgcc cttgcgcgag cagaaggggg	9120
gcagcgggtc cagcatgagc tcgtcggggg ggtcggcgtc cacggtgaag atgccgggca	9180
ggagctcggg gtcgaagtag ctgatgcagg tgcccagatc gtccagcgcc gcttgccagt	9240
cgcgcacggc cagcgcgcgc tcgtaggggc tgaggggcat gcccagggc atggggtgcg	9300
tgagcgcaga ggctacatg ccgcagatgt cgtagacgta gaggggctcc tcgaggacgc	9360
cgatgtaggt ggggtagcag cgcccccgcc ggatgctggc gcgcacgtag tcgtacagct	9420
cgtagcaggg cgcgaggagc cccgcgccga ggttgagcgt ctgcggcttt tcggcgcggt	9480
agacgatctg gcggaagatg gcgtgggagt tgaggagat ggtgggcctc tggaagatgt	9540
tgaagtgggc gtggggcagg ccgaccgagt ccctgatgaa gtgggcgtag gagtctgca	9600
gcttggcgac gagctcggcg gtgacgagga cgtccagggc gcagtagtcg agggctctct	9660
ggatgatgtc gtacttgagc tggcccttct gcttcacag ctgcgggttg agaaggaact	9720
cttcgcggtc cticcagtac tcttcgaggg ggaacccgtc ctgatcgga cggtaagagc	9780
ccaccatgta gaactgggtg acggccttgi aggcgcagca gcccttctcc acggggaggg	9840

cgtaagcttg cgcggccttg cgcagggagg tgtgggtgag ggcgaagggtg tcgcgcacca	9900
tgaccttgag gaactgggtc ttgaagtcga ggtcgtcgca gccgccctgc tcccagagct	9960
ggaagtccgt gcgcttcttg taggcggggt tgggcaaagc gaaagtaaca tcgttgaaga	10020
ggatcttgcc cgcgcggggc ataaagtgtc gagtgatgag gaaaggctgg ggcacctcgg	10080
cccgttggt gatgacctgg gcggcgagca cgatctctgc gaagccgttg atgttggtgc	10140
ccacgatgta gattccacg aaccgtgggc ggcccttgac gtggggcagc ttcttgagct	10200
cctcgtaggt gagctcgta gggtcgctga gcccgctgtg ctcgagggcc cagtcggcga	10260
gatggtggtt ggcgcgagg aaggaagtcc agagatccac ggccaggcg gtttcagac	10320
ggtcccgta ctgacggaac tgctggccga cgccatctt ttcgggggtg acgcagtaga	10380
aggtgcgggg gtccccgtgc cagcgatccc atttgagctg gagggcgaga tcgaggcgga	10440
gctcgacgag gcggtcgtcc ccggagagtt tcatgaccag catgaagggg acgagctgct	10500
tgccgaagga ccccatccag gtgtaggttt ccacatcgta ggtgaggaag agcctttcgg	10560
tgcgaggatg cgagccgatg gggaagaact ggatctctg ccaccaattg gaggaatggc	10620
tgttgatgtg atggaagtag aaatgccgac ggcgcgccga acactcgtgc ttgtgtttat	10680
acaagcggcc acagtgtctg caacgtcgca cgggatgcac gtgctgcacg agctgtacct	10740
gagttccttt gacgaggaat ttcagtggga agtggagtcg tggcgccctgc atctcgtgct	10800
gtactacgtc gtggtggtcg gcctggccct ctctgcctc gatggtggtc atgctgacga	10860
gccccgcggg gaggcaggtc cagacctcgg cgcgagcggg tcggagagcg aggacgaggg	10920
cgcgaggcc ggagctgtcc agggctctga gacgtgcgg agtcaggtca gtgggcagcg	10980
gcggcgcgcg gttgacttg aggagtctt ccaggcgcg cgagggtcc agatgttact	11040
tgatctccac cgcgccgttg gtggcgacgt cgatggcttg cagggtccc tgcccctggg	11100
gagtgaccac cgtccccgt tttctcttg gcgtgtctc catgccgtc agaagcgcg	11160
gcgaggacgc gcgccggcg gcagaggcg ctggggccc ggaggcaggg gcggcagggg	11220
cacgtcgcg ccgcgcgcg gtaggtctg gtactgcgc cggaagac tggcgtgagc	11280
gacgacgga cggttgacgt cctggatctg acgcctctgg gtgaaggcca cgggacctgt	11340
gagtttgaac ctgaaagaga gttcgacaga atcaatctg gtatcgttga cggcgccctg	11400
ccgcaggatc tcttgacgt gcgccgagtt gtctgttag gcgatctcg tcatgaactg	11460
ctcgatctc tctctctgaa ggtctccgc gccggcgcg tccacggtgg ccgcgaggtc	11520
gttgagatg cgcccatga gctgcgagaa ggcgttcctg cccgcctcgt tccagacgcg	11580
gctgtagacc acgacccct cgggatcgcg ggcgcgcatg accacctggg cgaggttag	11640
ctccacgtgg cgcgtgaaga ccgctagtgt gcagaggcg tggtagaggt agttgacgt	11700

ggtggcgatg tgctcggiga cgaagaaata catgatccag cggcggagcg gcatctcgct	11760
gacgtcgccc agcgcctcca agcgttccat ggctctgtaa aagtccacgg cgaagttgaa	11820
aaactgggag ttgcgcgccg agacgggtcaa ctctctctcc agaagacgga tgagctcggc	11880
gatgggtggcg cgcacctcgc gctcgaaggc cccgggaacc tcttcttcca tctctcttc	11940
ttctcttcc actaacatct cttctacttc ctctcaggc ggtggcgggg gagggggcct	12000
gcgtcgccgg cggcgacagg gcagacggtc gatgaagcgc tcgatggtct cgccgcgccg	12060
gcgtcgcatg gtctcggiga cggcccgccc gtctctcggg ggccgcagcg tgaagacgcc	12120
gccgcgcat tccaggtggc cgggggggtc cccgttgggc agggagaggg cgctgacgat	12180
gcatcttacc aattgcccc tagggactcc gcgcaaggac ctgagcgtct cgagatccac	12240
gggatctgaa aaccgttgaa cgaaggcttc gagccagtcg cagtcgcaag gtaggctgag	12300
cacggtttct tctggcgggt catgttgggg agcggggcgg gcgatgctgc tggatgatgaa	12360
gttgaatatag gcggttctga gacggcggat ggtggcgagg agcaccaggt ctttgggccc	12420
ggcttgctgg atgcgcagac ggtcggccat gccccaggcg tggctctgac acctggccag	12480
atcctttag tagtcttga tgagccgtc caggggcacc tctctctgc ccgcgcggcc	12540
gtgatcgcg gtgagcccga agccgcgtg gggctggacg agcggcaggt cggcgacgac	12600
gcgctcggcg aggatggcct gctggatctg ggtgagggtg gtctggaagt cgtcaaagtc	12660
gacgaagcgg tggtaggtc cggtgtgat ggtgtaggag cagttggcca tgacggacca	12720
gttgacggtc tggtagccgg gacgcacgag ctggtgtac ttgaggcgcg agtaggcgcg	12780
cgtgtcgaag atgtagtctg tgcaggtgcg caccaggtac tggtagccga tgaggaagtg	12840
cggcggcggc tggcgttga gcggccatcg ctcggtggcg gggcgccgg gcgcgaggtc	12900
ctcgagcatg gtgcggtggt agccgtagat gtacctggac atccaggtga tgccgcggc	12960
ggtggtggag gcgcgcggga actcgcggac gcggttccag atgttgcga gcggcaggaa	13020
gtagtcatg gtgggcacgg tctggccgt gaggcgcgcg cagtcgtgga tgctctatac	13080
gggcaaaaac gaaagcggtc agcggtcga ctccgtggcc tggaggctaa gcgaacgggt	13140
tgggtgcgc gtgtaccccg gttcgaatct cgaatcaggc tggagccga gtaacgtgg	13200
tactggcact cccgtctcga cccaagcctg caccaaccct ccaggatacg gaggcgggtc	13260
gtttttgcaa cttttttcg gaggcgggaa atgaagacta gtaagcgcgg aaagcggccg	13320
accgcgatgg ctgctgccg tagtctggag aagaatcgcc agggttgcgt tgcggtgtgc	13380
cccgttcca gcccgccgg attccgcggc taacgagggc gtggtgccc cgtcgtttcc	13440
aagacccta gccagccgac ttctccagtt acggagcgag cccctctttt gttttttgtt	13500
tttgccagat gcatcccga ctgcggcaga tgcgccccca ccacctcca ccgaacaac	13560

agccccctcc tccacagccg gcgcttctgc ccccgcccca gcagcagcag caacttcag	13620
ccacgaccgc cgcggccgcc gtgagcgggg ctggacagac ttctcagtat gatcacctgg	13680
ccttgggaaga gggcgagggg ctggcgcgcc tgggggcgtc gtcgccggag cggcacccgc	13740
gcgtgcagat gaaaaggac gctcgcgagg cctacgtgcc caagcagaac ctgttcagag	13800
acaggagcgg cgaggagccc gaggagatgc gcgcggcccg gttccacgc gggcgggagc	13860
tgcggcgagg cctggaccga aagagggtgc tgaggacga ggatttcag gcggacgagc	13920
tgacggggat cagccccgc gcgcgcacg tggcccggc caacctggc acggcgtacg	13980
agcagaccgt gaaggaggag agcaacttc aaaaatcctt caacaaccac gtgcgcacc	14040
tgatcgcgcg cgaggagggtg accctgggcc tgatgcacct gtgggacctg ctggaggcca	14100
tcgtgcagaa cccaccagc aagccgtga cgcgcagct gttcctggtg gtgcagcata	14160
gtcgggacaa cgaggcgttc agggaggcgc tgctaaatat caccagagccc gagggccgt	14220
ggctcctgga cctggtgaac attctgcaga gcatcgtggt gcaggagcgc gggtgccgc	14280
tgtccgagaa gctggcgccc atcaacttct cggctgtgag tctgggcaag tactacgcta	14340
ggaagatcta caagacccc tacgtgccc tagacaagga ggtgaagatc gacgggtttt	14400
acatgcgcat gacctgaaa gtgctgacc tgagcgacga tctgggggtg taccgcaacg	14460
acaggatgca ccgagcgggtg agcgccagca ggcgccgca gctgagcgac caggagctga	14520
tgacagacct gcagcgggcc ctgaccgggg ccgggaccga gggggagagc tactttgaca	14580
tgggcgcgga cctgcactgg caaccagcc gccgggcctt ggaggcggcg gcagaccct	14640
acgtagaaga ggtggacgat gagggtggacg agggcgagta cctggaagac tgatggcgcg	14700
accgtatttt tgctagatgc aacaacagcc accgcctcct gatcccgcga tgcgggcggc	14760
gctgcagagc cagccgtccg gcattaaact ctcggacgat tggaccagg ccatgcaacg	14820
catcatggcg ctgacgacc gcaatcccga agcctttaga cagcagctc aggccaaccg	14880
gctctcggcc atcctggagg ccgtggtgcc ctgcgctcg aacccacgc acgagaaggt	14940
gctggccatc gtgaacgcgc tgggtggagaa caaggccatc cgcggcgacg aggccgggct	15000
ggtgtacaac gcgtgtctgg agcgctggc ccgctacaac agcaccaacg tgcagaccaa	15060
cctggacagg atggtgaccg acgtgcgcga ggccgtggcc cagcgcgagc ggttcaccg	15120
cgagtccaac ctgggatcca tgggtggcgt gaacgccttc ctcagcacc agcccgccaa	15180
cgtgccccgg ggccaggagg actacaccaa ctcatcagc gccctgcgc tgatggtgac	15240
cgaggtgccc cagagcgagg tgtaccagtc cgggcccggac tactttctcc agaccagtcg	15300

ccagggttg cagaccgtga acctgagcca ggcgttcaag aacttgcagg gcctgtgggg	15360
cgtgcaggcc ccggtcgggg accgcgcgac ggtgtcgagc ctgctgacgc cgaactcgcg	15420
cctgtctgtg ctgctggtgg cccctttcac ggacagcggc agtatcaacc gcaactcgta	15480
cctgggctac ctgattaacc tgtaccgcga ggccatcggc caggcgcacg tggacgagca	15540
gacctaccag gagatcaccc acgtgagccg cgccttgggc caggacgacc cgggcaatct	15600
ggaagccacc ctgaactttt tgctgaccaa ccggtcgcag aagatcccgc cccagtacgc	15660
gctcagcgcc gaggaggagc gcatcctgcg atacgtgcag cagagcgtgg gcctgttcct	15720
gatgcaggag ggggccaccc ccagcgcgcg gctcgacatg accgcgcgca acatggagcc	15780
cagcatgtac gccagcaacc gcccgttcat caataaactg atggactact tgcacgggc	15840
ggccggcatg aactctgact atttcacaa cgccatccta aacccccact ggctaccgcc	15900
gccgggttc tacacggcg agtacgacat gcccgacccc aatgacgggt tcctgtggga	15960
cgatgtggac agcagcgtgt tttcccccg accgggtgct aacgagcgcc ctttgtgaa	16020
gaaggaaggc agcgaccgac gcccgctctc ggcgctgtcc ggccgcgagg gtgctgccgc	16080
ggcggtgccc gaggccgcca gtcttttcc tagcttgccc ttctcgctga acagtattcg	16140
cagcagcgag ctgggcagga tcacgcgccc gcgcttgctc ggcgaggagg agtacttgaa	16200
tgactcgctg ttgagaccgc agcgggagaa gaacttcccc aataacggga tagagagcct	16260
ggtggacaag atgagccgct ggaagacgta cgcgcaggag cacagggacg atccgtcgca	16320
ggggggccacg agccgggcca gcgcgccccg taaacgccgg tggcacgaca ggacgagggg	16380
actgatgtgg gacgatgagg attccgccga cgacagcagc gtgttgact tgggtgggag	16440
tgggtggtgt aaccggttcg ctacactgcg ccccgcatc gggcgcatga tgtaagaaac	16500
cgaataaaa tgatactcac caaggccatg gcgaccagcg tgcgttcgtt tcttctctgt	16560
tgttgatct agtatgatga ggcgtgcgta ccggagggt cctcctccct cgtacgagag	16620
cgtgatgcag caggcgatgg cggcggcgat gcagccccg ctggaggctc cttacgtgcc	16680
cccgcggtac ctggcgcta cggaggggcg gaacagcatt cgttactcgg agctggcacc	16740
cttgtacgat accaccggt tgtacctggt ggacaacaag tcggcggaca tcgcctcgt	16800
gaactaccag aacgaccaca gcaacttcct gaccaccgtg gtgcagaaca atgacttcac	16860
ccccaggag gccagcacc agaccatcaa ctttgacgag cgctcgggt gggcgggcca	16920
gtgaaaacc atcatgcaca ccaacatgcc caacgtgaac gaattcatgt acagcaacaa	16980
gttcaaggcg cgggtcatgg tctcccgcaa gacccccaat ggggtcaaag tagatgaaaa	17040
ttatgatggt agtcaggatg agctgaaata cgagtgggtg gagtttgagc tgcccgaagg	17100
caacttctcg gtgacatga ccatcgacct gatgaacaac gccatcatcg acaattactt	17160

ggcgggtgggg cggcagaacg gggtcctgga aagcgacatc ggcgtgaagt tcgacactag	17220
gaacttcagg ctgggctggg accccgtgac cgagctggtc atgcccgggg tgtacaccaa	17280
cgaggccttc catcccgatg ttgtcttgct gcccggctgc ggggtggact ttaccgagag	17340
ccgcctcagc aacctgctgg gcattcgcaa gaggcagccc ttccaggagg gattccagat	17400
catgtacgag gatctggagg ggggcaacat cccgcgctc ctggatgtcg aggcctatga	17460
ggaaagcaag gaaaaagctg aagccgaggc gactgcagcc gtggctaccg ccgcgaccac	17520
caatgcagat gcaactacca ccagaggcga tacattcgcc actgtggcgg aggaagcagc	17580
cgccctagcg gtcgccgatg atagtgaag taagatagtt atcaagccag taaaagtgga	17640
tagcaagaac agaagctaca acgtgctgcc ggacgaggta aacaccgcct accgcagctg	17700
gtacctggcc tacaactatg gcgaccccgga gaaggcgctg cgctcctgga cgctgctcac	17760
cacctcggac gtcacctcgc gcgtggagca agtctactgg tcgctgcccg acatgatgca	17820
agacccggtc accttccgct ccacgcgtca agttagcaac tacccggtgg tgggcgccga	17880
gtcctgccc gtctactcca agagcttctt caacgagcag gccgtctact cgcagcagct	17940
gcgcgccttc acctcgctca cgcacgtctt caaccgttc cccgagaacc agatcctcgt	18000
ccgccgccc gcgcccacca ttaccaccgt cagtgaagac gttcctgctc tcacagatca	18060
cgggacctg ccgctgcgca gcagtatccg gggagtccag cgcgtgaccg ttactgacgc	18120
cagacgccgc acctgccct acgtctacaa ggccctgggc atagtcgccc cgcgcgtcct	18180
ctcgagccgc accttctaaa aaatgtccat tctcatctcg cccagtaata acaccggttg	18240
gggcctgccc gcgcccagca agatgtacgg aggcgctcgc caacgctcca cgcaacaccc	18300
cgtgcgcgtg cgcgggcaact tccgcgtcc ctggggcgcc ctcaagggtc gcgtgcggtc	18360
gcgcaccacc gtcgacgacg tgatcgacca ggtggtggcc gacgcgcgca actacacccc	18420
cgccgccgcg cccgtctcca ccgtggacgc cgtcatcgac agcgtggtgg ccgacgcgcg	18480
ccggtacgcc cgcgccaaga gccggcggcg gcgcatcgcc cggcggcacc ggagcacccc	18540
cgccatgcgc gcggcgcgag ccttgctcgc cagggccagg cgcacgggac gcagggccat	18600
gctcagggca gccagacgcg cggcctccgg cagcagcagc agcgcgggca ggaccgcgag	18660
acgcgcggcc acggcggcgg cggcggccat cgccagcatg tcccggccgc ggcgcggcaa	18720
cgtgtactgg gtgcgcgacg ccgccaccgg tgtgcgcgtg cccgtgcgca cccgcccccc	18780
tcgcacttga agatgctgac ttgcgatgt tgatgtgtcc cagcggcgag gaggatgtcc	18840
aagcgcaaat acaaggaaga gatgtccag gtcacgcgc ctgagatcta cggccccgcg	18900
gtgaaggagg aaagaaagcc ccgcaactg aagcgggtca aaaaggacaa aaaggaggag	18960
gaagatgtgg atggactggt ggagtttgtg cgcgagttcg cccccggcg gcgcgtgcag	19020

tggcgcgggc ggaaagtga gccggtgctg cgccaggca ccacggtggt cttcacgccc	19080
ggcgagcgtt ccggctccgc ctccaagcgc tcctacgacg aggtgtacgg ggacgaggac	19140
atcctcgagc aggcggccga gcgtctgggc gagtttgctt acggcaagcg cagccgcccc	19200
gcgccttga aagaggaggc ggtgtccatc ccgttgacc acggcaacc cagccgagc	19260
ctgaaccgg tgacctga gcaggtgctg ccgagcggc cgccgcgcg gggttcaag	19320
cgcgaggcg gcgaggaict gtaccgacc atgcagctga tgggtccca gcgccagaag	19380
ctggaggacg tgctggagca catgaagggt gaccccgagg tgcagccga ggtcaagggtg	19440
cggcccatca agcaggtggc ccggggcctg ggctgtcaga ccgtggacat caagatcccc	19500
acggagccca tggaacgca gaccgagccc gtgaagccca gcaccagcac catggagggtg	19560
cagacggatc cctggatgcc ggcccccgc gcttcaccg ccaccgcg aagacgaag	19620
tacggcggc ccagcctgt gatgccaac tacgctgc atccttccat catccccacg	19680
ccgggctacc ggcgcacgc cttctaccgc ggctacacca gccgcgccc caagaccacc	19740
acccgcgcc gccgtctgc cagccgccgc agcagcacc cgacttccgc cttggtgcgg	19800
agagtgtatc gcagcggcg cgagcctctg accctgccgc gcgcgcgcta ccaccgagc	19860
atcgccattt aactaccgc tctacttgc agatatggc ctcatatgcc gcctccgct	19920
ccccattac ggctaccgag gaagaaagcc gcgccgtaga aggtgacgg ggaacgggct	19980
gcgtcgccat caccaccgc ggccgcgcgc catcagcaag cggttggggg gaggttcct	20040
gccccgctg atccccatc tcgcccggc gatcggggcg atccccgca tagcttccgt	20100
ggcgggtgag gcctctcagc gccactgaga cacaaaaaa gcatggattt gtaataaaaa	20160
aatggactga cgctcctggt cctgtgatgt gtgttttttag atggaagaca tcaatttttc	20220
gtccctggca ccgcgacag gcacgcggcc gtttatgggc acctggagcg acatcgcaa	20280
cagccaactg aacggggcg ctttcaattg gagcagtcctc tggagcgggc ttaagaattt	20340
cgggtccacg ctcaaacct atggcaaca gccgtggaac agcagcacag ggcaggcgt	20400
gagggaaaag ctgaaagagc agaacttcca gcagaagggt gtcgatggc tggcctcggg	20460
catcaacggg gtggtggacc tggccaacca gccgtgacg aaacagatca acagccgct	20520
ggacgcggtc ccgcccgcg ggtccgtgga gatgccccag gtggaggagg agctgcctcc	20580
cctggacaag cgcggcgaca agcgaccgcg tcccagcgc gaggagacgc tgctgacgca	20640
cacggacgag ccgccccgt acgaggaggc ggtgaaactg ggtctgcca ccacgcggcc	20700
cgtggcgct ctggccaccg ggggtctgaa acccagcagc agcagcagcc agcccgcgac	20760

cctggacttg cctccgctc gccctccac agtggctaag cccctgccgc cggtgccgt	20820
cgctcgcg ccccccgag gcccccca ggcaactgg cagagcactc tgaacagcat	20880
cgtgggtctg ggagtgcaga gtgtgaagcg cgcgcgtgc tattaaaaga cactgtagcg	20940
cttaacttgc ttgtctgtgt gtgtatatgt atgtccgccg accagaagga ggaagaggcg	21000
cgtcgccgag ttgaagatg gccacccat cgatgctgcc ccagtggcg tacatgcaca	21060
tcgccggaca ggacgttcg gagtacctga gtccgggtct ggtgcagttc gcccgccca	21120
cagacaccta cticagtctg gggaacaagt ttaggaaccc cacggtggcg cccacgcacg	21180
atgtgaccac cgaccgcagc cagcggctga cgctcgctt cgtgcccgtg gaccgcgagg	21240
acaacaccta ctctacaaa gtgcgtaca cgctggccgt gggcgacaac cgctgctgg	21300
acatggccag cacctacttt gacatccgcg gcgtgctgga tcggggcccc agtttcaaac	21360
cctactccgg caccgctac aacagcctgg ctcccaaggg agcgcccaac acctcacagt	21420
ggaaggattc cgacagcaaa atgcatactt ttggagtgc tgccatgcc ggtgtgttg	21480
glaaaaaat agaagccgat ggtctgccta ttggaataga ttcactctt ggaactgata	21540
ccataattta tgcigataaa actttccaac cagagccaca ggttggaagt gacagttggg	21600
tcgacaccaa tggcgcagag gaaaaatat gaggtagagc tcttaaggac actacaaca	21660
tgaagccctg ctacggttct ttgcccaggc ctaccaacaa agaaggtggg caggctaaca	21720
taaaagattc tgaactgcc agcactact ctaactatga tatagatttg gcattctttg	21780
acagcaaaaa tattgccgt aactatgatc cagatatgt aatgtacaca gaaatgttg	21840
agttgcaaac tcagatact catattgtgt ttaagccagg aacttcagat gaaagttcag	21900
aagccaattt gggccagcag gccatgcca acagaccaa ctacatcggg ttcagagaca	21960
actttatcgg gctcatgtac tacaacagca ctggcaatat ggggtactg gctggtcagg	22020
cctcccagct gaatgctgtg gtggacttgc aggacagaaa caccgaactg tctaccagc	22080
tcttgcttga ctctctgggt gacagaacca ggtatttcag tatgtggaat caggcgttg	22140
acagctatga ccccgatgtg cgcatatttg aaatcacgg tgtggaggat gaactccca	22200
attattgctt cctttgaat ggtgtgggt ttacagatac ttaccagggt gttaaagtta	22260
agacagatac agccgtgct ggtaccaatg gaacgcagtg ggacaaagat gataccacag	22320
tcagcactgc caatgagatc cactcaggca atcctttcgc catggagatc aacatccagg	22380
ccaacctgtg gcggaactc ctctacgca acgtggcgct gtacctgcc gactcctaca	22440
agtacacgcc ggccaacatc acgtgccgg ccaacaccaa cacctacgat tacatgaacg	22500
gccgcgtggt ggccctcg ctggtggacg cctacatcaa catcgggcg cgctggtcgc	22560
tggaccccat ggacaacgtc aacccttca accaccacg caacgcgggc ctgcgtacc	22620

gtccatgct cctgggcaac gggcgctacg tgccttcca catccagggtg ccccaaaagt	22680
ttttcgccat caagagcctc ctgctcctgc ccgggtccta cacctacgag tggaaattcc	22740
gcaaggacgt caacatgac ctgcagagct ccctcggaac cgacctgcgc acggacgggg	22800
cctccatgc cttaccagc atcaacctct acgccacctt cttcccatg gcgcacaaca	22860
ccgctccac gctcgaggcc atgctgcgca acgacacca cgaccagtcc ttcaacgact	22920
acctctggc ggccaacatg ctctaccca tcccggccaa cgccaccaac gtgcccattt	22980
ccatccctc gcgcaactgg gccgccttc gcggatggtc cttcacgcgc ctcaagacct	23040
gcgagacgc ctgctcgcc tccgggttcg accctactt cgtctactg ggctccatcc	23100
cctacctga cggcaccttc tacctcaacc acaccttcaa gaaggcttcc atcaccttcg	23160
actctccgt cagctggccc ggcaacgacc gcctcctgac gccaacgag ttcgaaatca	23220
agcgaccgt cgacggagag gggatcaacg tggcccagt caacatgacc aaggactggt	23280
tcttggtcca gatgctggcc cactacaaca tcggctacca gggcttctac gtgcccagg	23340
gtacaagga ccgatgtac tcttcttcc gcaacttcca gccatgagc cgccaggctg	23400
tggacagggt caactacaag gactaccagg ccgtaccct ggctaccag cacaacaact	23460
cgggcttctg cggctacctc gcgcccacca tgcgccagg acagccctac cccgccaact	23520
accttacc gctcatcgcc aagagcgccg tcgccagct caccagaaa aagttctct	23580
gcgaccgggt catgtggcgc atcccttct ccagcaactt catgtccatg ggcgcgctca	23640
ccgacctcg ccagaacatg ctctacgcca actccgcca cgcgctagac atgaatttcg	23700
aagtcgacc catggtgag tccaccttc tctatgtgt cttcgaagtc ttcgacgttg	23760
tccgagtga ccagccccc cgcgcgctca tcgaggccgt ctacctgcgc acgcccctt	23820
cggccggcaa cgccaccacc taagccccgc tcttgcttct tgcaagatga cggcctgtgg	23880
ctccggcgag caggagctca gggccatcct ccgcgacctg ggctgcgggc cctacttct	23940
gggcaccttc gacaagcgt tcccggtatt catggcccc cacaagctgg cctgcgcat	24000
ctgaacacg gccggccgag agaccggggg cgagcactgg ctggccttcg cctggaacct	24060
gcgtccca acctgtacc tcttgacc cttcggttc tcggacgagc gcctcaagca	24120
gatctaccag ttcgagtac agggcctgct gcgtcgagc gccctggcca ccgaggaccg	24180
ctgctcacc ctggaaaagt ccaccagac cgtgcagggt ccgcgctcgg ccgctgcgg	24240
gctcttctgc tgcatgttc tgcacgcctt cgtgcactgg cccgaccgcc ccatggacaa	24300
gaacccacc atgaacttg tgacgggggt gcccaacggc atgtccagt cgcgccagg	24360
ggaacccacc ctgcgccga accaggaggc gctctaccg ttcctcaac cccactccgt	24420
ctactttgc tcccaccg cgcgcatga gaaggccacc gccttcgacc gcatgaatca	24480

agacatgtaa acitgtgtgtg tatgtgaatg ctttattcat cataataaac agcacatgtt	24540
tatgccacct tctctgaggc tctgacttta tttagaaatc gaaggggttc tgccggtctt	24600
cggcgtgccc cgcgggcagg gatacgttgc ggaactggta cttgggcagc cacttgaact	24660
cggggatcag cagcttcggc acggggaggt cggggaacga gtcgtccac agcttgcgcg	24720
tgagtgcag ggcgccagc aggtcgggcg cggagatctt gaaatcgag ttgggacccg	24780
cgttctgcgc gcgagagtta cggtagacgg ggttcgagca ctggaacacc atcagggcgc	24840
ggtgcttcac gtcgccagc accgtcgct cggtagatcc ctccacgtcc atacctcgg	24900
cgttgcccat cccgaagggg gtcacttgc aggtctgccg ccccatgctg ggcacgcagc	24960
cgggcttgtg gtigcaatcg cagtcagggt ggatcagcat catctgggcc tgctcggagc	25020
tcatgcccgg gtacatggcc ttcatgaaag cctccagctg gcggaaggcc tgctgcgcct	25080
tgccgccctc ggtgaagaag accccgcagg acttgctaga gaactggttg gtggcgagc	25140
ccgcgtcgtg cagcagcag cgcgcgtcgt tgttgccag ctgcaccacg ctgcgcccc	25200
agcggttctg ggtgatcttg gcccggtcgg ggttctcctt cagcgcgcgc tgcccgttct	25260
cgtcgcac atccatctg atcgtgtgct cttctggat catcacggtc ccgtgcaggc	25320
accgcagctt gccctcgcc tcggtgcagc cgtgcagcca cagcgcgcag ccggtgcact	25380
cccagttctt gtggcgatc tgggagtgcg agtcacgaa gccctgcagg aagcgccca	25440
tcatcgtggt cagggtcttg ttgctggtga aggtcagcgg aatgccgcgg tgctcctcgt	25500
tcacatacag gtggcagatg cggcggtaca cctgcacctg ctcgggcatc agctggaagg	25560
cggacttcag gtcgtctcc acgcggtacc ggtccatcag cagcgtcatc acttccatgc	25620
ccttctccca ggccgagacg atcggcaggc tcagggggtt cttcacctt gtcatcttag	25680
tcgccgccgc cgaggtcagg gggctgttct cgtccagggt ctcaaact cgttgccgt	25740
ccttctcgat gatgcgcagc gggggaaagc tgaagccac ggccgcagc tctctctcg	25800
cctgccttct gtctcgtg tcttggtga tgtcttgcaa aggcacatgc ttggtcttgc	25860
ggggtttctt tttggcgcc agagcggcg gcggagacgt gctgggcgag cgcgagttct	25920
cgctcaccac gactatttct tcttcttggc cgtcgtccga gaccacgcgg cggtaggcgt	25980
gcctcttctg gggcagaggc ggagcgacg ggctctcgcg gttcggcggg cggctggcag	26040
agcccttcc gcgttcgggg gtgcgtctct ggcgcgctg ctctgactga ctctctccgc	26100
ggccggccat tgtgttctcc tagggagcaa gcatggagac tcagccatcg tcgccaacat	26160
cgccatctgc ccccgccgc gcagccgacg aaaaccagca gcagaatgaa agcttaaccg	26220

ccccgccgcc cagccccacc tccgacgccg cggccccaga catgcaagag atggaggaat	26280
ccatcgagat tgacctgggc tacgtgacgc ccgcggagca cgaggaggag ctggcagcgc	26340
gcttttcagc cccggaagag aaccaccaag agcagccaga gcaggaagca gagagcgagc	26400
agcagcaggc tgggctcgag catggcgact acctgagcgg ggacagaggac gtgctcatca	26460
agcatctggc ccgccaatgc atcatcgtca aggacgcgct gctcgaccgc gccgaggtgc	26520
ccctcagcgt ggcgagagtc agccgcgcct acgagcgcaa cctcttctcg ccgcgcgtgc	26580
cccccaagcg ccagcccaac ggcacctgcg agcccaaccc gcgcctcaac ttctacccgg	26640
tcttcgcggt gcccgaggcc ctggccacct accacctctt tttcaagaac caaaggatcc	26700
ccgtctcctg ccgcgccaac cgcacccgcg ccgacgcct gctcaacctg ggccccggcg	26760
cccgctacc tgatatgcc tcttgggaag aggttcccaa gatcttcgag ggtctgggca	26820
gcgacgagac tcgggccgcg aacgctctgc aaggaagcgg agaggagcat gacaccaca	26880
gcgccctggt ggagtggaa ggcgacaacg cgcgcctggc ggtgctcaag cgcacggtcg	26940
agctgacca cttgcctac ccggcgctca acctgcccc caaggtcatg agcgccgtca	27000
tggaccaggt gctcatcaag cgcgcctcgc cctctccga ggacgagatg caggaccccg	27060
agagctcgga cgagggaag cccgtgggtca gcgacgagca gctggcgcg tcgctgggag	27120
cgagtagcac cccccagagc ctggaagagc ggcgcaagct catgatggcc gtggtcctgg	27180
tgaccgtgga gctggagtg ctgcgccgt tcttcgccga cgcggagacc ctgcgcaagg	27240
tcgaggagaa cctgcactac ctcttcaggc acgggttcgt gcgccaggcc tgcaagatct	27300
ccaacgtgga gctgaccaac ctggtctcct acatgggcat cctgcacgag aaccgcctgg	27360
ggcagaacgt gctgcacacc accctgcgcg gggaggcccg ccgcgactac atccgcgact	27420
gcgtctacct gtacctcgc cacacctggc agacgggcat gggcgtgtgg cagcagtgcc	27480
tggaggagca gaacctgaaa gagctctgca agctcctgca gaagaacctc aaggccctgt	27540
ggaccgggtt cgacgagcgc accaccgccg cggacctggc cgacctatc ttccccgagc	27600
gcctgcggct gacgctgcgc aacgggctgc ccgactttat gagccaaagc atgttgcaaa	27660
actttcgctc ttcatcctc gaacgctccg ggatcctgcc cgccacctgc tccgactgc	27720
cctcggaactt cgtgccgctg accttccgcg agtgccccc gccgctctgg agccactgtt	27780
acttgcctgc cctggccaac tacctggcct accactcgga cgtgatcgag gacgtcagcg	27840
gcgagggtct gctcgaatgc cactgccgt gcaacctctg cagccgcac cgctccctgg	27900
cctgcaaccc ccagctgctg agcgaaaccc agatcatcgg caccttcgag ttgcaaggcc	27960
ccggcgaggg caaggggggt ctgaaactca cccggggct gtggacctcg gcctacttgc	28020
gcaagttcgt gcccgaggac taccatccct tcgagatcag gttctacgag gaccaatccc	28080

agccgccc	aa	ggccgagctg	tccgctcg	tcacacca	ggggccatc	ctggccaat	28140	
tgcaagcc	at	ccagaaatcc	cgccaaga	at	ttctgtgaa	aaaggccac	gggtctacc	28200
tggaacccc	a	gaccggagag	gagctcaac	c	cagcttccc	ccaggatgcc	ccgaggaagc	28260
agcaagaagc		tgaaagtga	gctgccgctg		ccgccggagg	atttggagga	agactgggag	28320
agcagtcagg		cagaggagga	ggagatggaa		gactgggaca	gcactcaggc	agaggaggac	28380
agcctgcaag		acagtctgga	ggaagacgag		gtggaggagg	aggcagagga	agaagcagcc	28440
gccgccagac		cgctgtcctc	ggcggaggag		gagaaagcaa	gcagcacgga	taccatctcc	28500
gctccgggtc		gggtcgcg	ggccgggcc		cacagtaggt	gggacgagac	cgggcgcttc	28560
ccgaaccccc		ccaccagac	cggtagaag		gagcggcagg	gatacaagtc	ctggcggggg	28620
cacaaaaacg		ccatcgtctc	ctgcttgcaa		gcctgcgggg	gcaacatctc	cttcaccg	28680
cgctacctgc		tcttcaccg	cgggtgaac		ttccccgca	acatcttgca	ttactaccgt	28740
cacctccaca		gcccctacta	ctgtttccaa		gaagaggcag	aaaccagca	gcagcagcag	28800
aaaaccagcg		gcagctagaa	aatccacagc		ggcggcgcca	ggtggactga	ggatcgcggc	28860
gaacgagccg		gcgcagacc	gggagctgag		gaaccggatc	tttcccaccc	tctatgccat	28920
cttcacgagc		agtcgggggc	aggagcagga		actgaaagtc	aagaaccgtt	ctctgcgctc	28980
gctcacccgc		agttgtctgt	atcacaagag		cgaagaccaa	cttcagcgca	ctctcgagga	29040
cgccgaggct		ctttcaaca	agtactgcgc		gtcactctt	aaagagtagc	ccgcgcccgc	29100
ccacacacgg		aaaaaggcgg	gaattacgtc		accacctgcg	cccttcgccc	gaccatcatc	29160
atgagcaaag		agattccac	gccttacatg		tggagctacc	agccccagat	gggcctggcc	29220
gccggcgccg		cccaggacta	ctccaccgc		atgaactggc	tcagtgccgg	gcccgcgatg	29280
atctcacggg		tgaatgacat	ccgcgccac		cgaaccaga	tactcctaga	acagtcagcg	29340
atcacgcga		cgcgcgcga	tcaccttaat		ccgcgtaatt	ggcccgccgc	ctgggtgtac	29400
caggaaattc		cccagccac	gaccgtacta		cttcgcgag	acgcccagcg	cgaagtccag	29460
ctgactaaat		caggtgtcca	gctggccggc		ggcgccgccc	tgtgtcgtca	ccgcccgcgt	29520
cagggtataa		agcggtggt	gacccgagcg		agaggcacac	agctcaacga	cagggtggtg	29580
agctcttcgc		tgggtctcg	acctgacgga		gtcttccaac	tcgccgcatc	ggggagatct	29640
tccttcacgc		ctcgtcagcg	cgctctgact		ttggagagtt	cgtctcgcga	gcccgcctcg	29700
ggtggcatcg		gcactctcca	gttcgtggag		gagttcactc	cctcgggtcta	cttcaacccc	29760
ttctccggt		cccccgcca	ctaccggac		gagttcatcc	cgaacttcga	cgccatcagc	29820
gagtcggtgg		acggctacga	ttgaatgtcc		catggtggcg	cagctgacct	agctcggctt	29880
cgacacctgg		accactgccg	ccgcttcgc		tgcttcgctc	gggatctcgc	cgagtttgcc	29940

tactttgagc tgccccagga gcacccctcag ggccccggccc acggagtgcg gatcgtcgtc	30000
gaagggggcc tcgactccca cctgcttcgg atcttcagcc agcgtccgat cctggtcgag	30060
cgcgagcaag gacatacccg tctgaccctg tactgcatct gcaaccaccc cggcctgcat	30120
gaaagtcttt gtgtcttgct gtgtactgag tataataaaa gctgagatca gcgactactg	30180
cgatcgtca cccctttatc cagtgaata aagatcatat tgatgatgat ttaaataaaa	30240
aaataatcat ttgatttgaa ataaagatac aatcatattg atgatttgag ttaacaaaa	30300
aataaagaat cacttacttg aaatctgata ccaggtctct gtccatgttt tctgccaaca	30360
ccacttcaact cccctcttcc cagctctggt actgcaggcc ccggcgggct gcaaacttcc	30420
tccacacgct gaaggggatg tcaaattcct cctgtccctc aatcttcatt ttatcttcta	30480
tcagatgtcc aaaaagcgcg tccgggtgga tgatgacttc gaccccgctc acccctacga	30540
tgagacaac gcaccgaccg tgcccttcat caaccccccc ttctgtctctt cagatggatt	30600
ccaagagaag cccctggggg tgttgtccct gcgactggcc gaccccgta ccaccaagaa	30660
cggggaaatc accctcaagc tgggagaggg ggtggacctc gactcctcgg gaaaactcat	30720
ctccaacacg gccaccaagg ccgccgcccc tctcagtttt tccaacaaca ccatttccct	30780
taacatggat catccctttt acactaaaga tggaaaatta tccttacaag tttctccacc	30840
attaaatata ctgagaacaa gcattctaaa cacactagct ttaggttttg gatcaggttt	30900
aggactccgt ggctctgcct tagcagtaca gttagtctct ccacttacat ttgatactga	30960
tggaaacata aagcttacct tagacagagg ttgcatgtt acaacaggag atgcaattga	31020
aagcaacata agctgggcta aaggttttaa atttgaagat ggagccatag caaccaacat	31080
tggaaatggg ttagagtttg gaagcagtag tacagaaaca ggtgttgatg atgcttacct	31140
aatccaagtt aaacttggat ctggccttag ctttgacagt acaggagcca taatggctgg	31200
taacaaagaa gacgataaac tcactttgtg gacaacacct gatccatcac caaactgtca	31260
aatactcgca gaaaatgatg caaaactaac actttgcttg actaaatgtg gtagtcaaat	31320
actggccact gtgtcagctc tagttgtagg aagtggaaac ctaaacccca ttactggcac	31380
cgtaagcagt gctcaggtgt ttctacgttt tgatgcaaac ggtgttcttt taacagaaca	31440
ttctacacta aaaaaatct gggggtatag gcaggagat agcatagatg gcactccata	31500
taccaatgct gtaggattca tgcccaattt aaaagcttat ccaaagtcac aaagtcttac	31560
tactaaaaat aatatagtag ggcaagtata catgaacgga gatgtttcaa aacctatgct	31620
tctcactata accctcaatg gtactgatga cagcaacagt acatattcaa tgtcattttc	31680

atacacctgg actaatggaa gctatgttgg agcaacattt ggggctaact cttatacctt	31740
ctcctacatt gcccaagaat gaacactgta tcccacccta cattgcccaa cccttcccac	31800
cccactctgt ctatggaata aactctgaaa cacaaaataa aataaagttc aagtgtttta	31860
ttgattcaac agttttacag gattcgagca gttatttttc ctccaccctc ccaagacatg	31920
gaatacacca ccctctcccc ccgcacagcc ttgaacattt gaaagccatt ggtgatggac	31980
atgcttttgg tctccacgtt ccacacagtt tcagagcgag ccagtcctcg gtcggtcagg	32040
gagatgaaac cctccgggca ctcccgcatc tgcacctcac agctcaacag ctgaggattg	32100
tcctcggtagg tcgggatcac gggttatctg aagaagcaga agagcggcgg tgggaatcat	32160
agtcgcgaaa cgggatcggc cggtaggtgc gcatcaggcc ccgcagcagt cgctgccgcc	32220
gccgctccgt caagctgctg ctccaggggt ccgggtccag ggactccctc agcatgatgc	32280
ccacggccct cagcatcagt cgtctggtgc ggccggcgca gcagcgcatg cggatctcgc	32340
tcaggctcgt gcagtacgtg caacacagga ccaccaggtt gtttaacagt ccatagtcca	32400
acacgtcca gccgaaactc atcgccggaa ggatgctacc cacgtggccg tcgtaccaga	32460
tcctcaggta aatcaagtgg cgctccctcc agaacacgt gcccacgtac atgatctct	32520
tgggcatgtg gcggttcacc acctcccgt accacatcac cctctggtt aacatgcagc	32580
cccggatgat cctgcggaac cacagggcca gcaccgccc gcccgccatg cagcgaagag	32640
accccggtc ccggcaatgg caatggagga ccaccgctc gtaccgtgg atcatctggg	32700
agctgaacaa gtctatgttg gcacagcaca ggcatatgct catgcatctc ttcagcactc	32760
tcagctctc gggggtcaaa accatatccc agggcacggg gaactcttg aggacagcga	32820
accccgaga acagggcaat cctcgacat aacttacatt gtgcatggac agggatcgc	32880
aatcaggcag caccgggtga tcctccacca gggaagcgcg ggtctcggtc tcctcacagc	32940
gtggtaaggg ggccggccga tacgggtgat ggccgggacgc ggctgatcgt gttctcgacc	33000
gtgtcatgat gcagttgctt tcggacattt tcgtacttgc tgtagcagaa cctgggtccg	33060
gcgtgcaca ccgatcgccg gcggcggtcc cggcgcttgg aacgctcgt gttgaagttg	33120
taaaacagcc actctcttag accgtgcagc aaatctaggg cctcaggagt gatgaagatc	33180
ccatcatgcc tgatagctct gatcacatcg accaccgtgg aatgggccag acccagccag	33240
atgatgcaat tttgttgggt ttccgtgacg gcgggggagg gaagaacagg aagaaccatg	33300
attaactttt aatccaaacg gtctcggagc acttcaaat gaaggtcgcg gagatggcac	33360
ctctcgcgcc cgctgtgttg gtggaaaata acagccaggt caaaggtgat acggttctcg	33420
agatgttcca cggtaggttc cagcaaagcc tccacgcga catccagaaa caagacaata	33480
gcaaaagcgg gaggtttctc taattcctca atcatcatgt tacactcctg caccatccct	33540

agataat ttt cattttcca gccttgaatg attcgaacta gttcctgagg taaatccaag 33600
 ccagccatga taaagagctc gcgcagagcg cctccaccg gcattcttaa gcacaccctc 33660
 ataattccaa gatattctgc tcttggttca cctgcagcag attgacaagc ggaatatcaa 33720
 aatctctgcc gcgatcccta agctcctccc tcagcaataa ctgtaagtac tctttcatat 33780

 cgtctccgaa atttttagcc ataggacccc caggaataag agaagggcaa gccacattac 33840
 agataaacgg aagtcccccc cagtgagcat tgccaaatgt aagattgaaa taagcatgct 33900
 ggctagaccc ggtgatatct tccagataac tggacagaaa atcgggcaag caatttttaa 33960
 gaaaaatcaac aaaagaaaaa tcttccagggt gcacgttttag ggctcggga acaacgatgg 34020
 agtacgtgca aggggtgctg tccagcatgg ttagtttagct gatctgtaaa aaacaaaaaa 34080
 taaaacatta aaccatgcta gcctggcgaa cagggtgggt aatcgttctc tccagcacca 34140
 ggagggccac ggggtctccg gcgcgaccct cgtaaaaatt gtcgctatga ttgaaaacca 34200

 tcacagagag acgttcccg tggccggcgt gaatgattcg acaagatgaa tacacccccg 34260
 gaacattggc gtccgcgagt gaaaaaaagc ggccgaggaa gcaataaggc actacaatgc 34320
 tcagtctcaa gtccagcaaa gcgatgccat gcggatgaag cacaaaattc tcagggtcgt 34380
 acaaaatgta attactcccc tctgcacag gcagcgaagc ccccgatccc tccagataca 34440
 catacaaagc ctcagcgtcc atagcttacc gagcagcagc acacaacagg cgcaagagtc 34500
 agagaaaagc tgagctctaa cctgtccacc cgtctctctgc tcaatatata gccagatct 34560
 aactgacgt aaaggccaaa gtctaaaaat acccgccaaa taatcacaca cgccagcac 34620

 acgccagaa accggtgaca cactcagaaa aatcgcgca cttcctcaaa cgcccaaact 34680
 gccgtcattt ccgggttccc acgtcagtc atcagaattc gactttcaaa ttccgtcgac 34740
 cgttaaaaat gtcaccgcc ccgccctaa cgtcgcgcgc tcccagacc aatcacagcc 34800
 ccgcatcccc aaattcaaac agctcatttg catattaacg cgcacaaaaa gtttgaggta 34860
 tattattgat gatg 34874

 <210> 6
 <211> 34836
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthesized
 <400> 6
 catcatcaat aatatacctc aaacttttgg tgcgcgttaa tatgcaaatg agctgtttga 60

 atttggggat gcggggctgt gattggctgt gggagcggcg accgttaggg gcggggcggg 120

tgacgttttg atgacgtgtt tgtgaggcgg agccggtttg caagttctcg tgggaaaagt	180
gacgtcaaac gaggtgtggt ttgaacacgg aaatactcaa ttttcccgcg ctctctgaca	240
ggaaatgagg tgtttctggg cggatgcaag tgaaaacggg ccattttcgc gcgaaaactg	300
aatgaggaag tgaaaatctg agtaatttcg cgtttatggc agggaggagt atttgccgag	360
ggccgagtag actttgaccg attacgtggg ggtttcgatt accgtatttt tcacctaaat	420
ttccgcgtac ggtgtcaaag tccggtgttt ttacatcatt tccccgaaaa gtgccacctg	480
acgtaactat aacggctcta aggtgatcac cgatccagac atgataagat acattgatga	540
gtttggacaa accacaacta gaatgcagtg aaaaaaatgc tttatttgtg aaatttgtga	600
tgctattgct ttatttgtaa ccattataag ctgcaataaa caagttcccg gatctttcta	660
gctagtctag actagctaga ctcgagagcg gccgcaatcg attcaggtgt aatggagttt	720
cacgcccctca ggatccacag ctacagcagc ccttcaggca agaacagcag gatgtcatac	780
agcacagcat gatggtcacc atcacgatag cgatcagtcg ggcgatgaag cccagccaga	840
tgtaccaagg ccacttgatg tactgctcgt acttgcccag ctcttcgaga tcgatcaggc	900
tctcgttcag gttcttagcc acctcgttca gctgtcgat ctcttctgg atgttcacca	960
cggaggcggtt gattccgctg atgtcgccca gatccacgtc gggggagggtg tggttcttga	1020
aatacttate cagctctctc ttaaagctgt ccagctctgg ctgcagagga tcgtacacgg	1080
tgttgttcac gattccgatg accacgtcac agttgccaga cacgaatgtg ttgtctgtgg	1140
tgatgatctg tggctcgtag aagttagcgt gtgtcacaaa ccagtggtt ccgttgagca	1200
cgaacacgcc ctcccagga aagtgggcct tgccatcgtg gcagatggcg ggagctgtgg	1260
taaagtctt ctctgagct ggcacgtagg tcacgtgcag aaacacgact ccgtgagggg	1320
cagactgggg gaaggacatc aggtggtatc ccttgccaca aaagtcact ctcttagact	1380
ggcccagcac gcactcggac atcttggtgg cagccagggt ggctctagcc ctgatctcag	1440
cagccctgat cagctgctgt gtcacgtagg tctgcagaga ctgcagctt cctgtgatca	1500
gcctgtcgat ctgcacctca gcctctggag ggtccagcct gctcagatg tcgttcagca	1560
cgctagagat ggcgcgaag ttggagctca gctgcttcac cagggtgtt agggcctgag	1620
cgttctgggt caccacatcc tgcagcttcc ccaggcgga agctgtagag gacaggtgt	1680
cctggatctt gccgatagcg gagttaaaact ggttggcgat cagcttctgg ttctctgaca	1740
gcacgttctg ggtcactccg atgccgttga accggttaagc catctgcatg gcaaagggga	1800
tctgcagggc agctccagcg ccgaaggtcc atccgatgt gatggttcca gccagcaggg	1860
cgcttgtgta ctgagcgatc atctcatctg tcagcagggg tggcagcacg gtcagtcctg	1920
taaacttctg ggcacagatc aggtccctgg cagcgatgtc tcccaggcaa tcgccgtact	1980

gcttgatgaa gccggcatca gccaggggtca ccttggtgaa cagcaggtcc tcgataaagc	2040
tcctcttaga tggcttgtaa ggatcgggca ggatctggga aaagtgaat ccgcaaagt	2100
ccttgatagg gggggtcttg tagatctgct tcacctgggc gaacacctcc tgtgtgttct	2160
tgtcctgctc cacagcgatt cctgtcaggg ctctgttcag ctgggtacaa aagctgccgt	2220
actgcagcag caggttgctg cactcggttag aatctccaca gatgtacatt gtgcagtcca	2280
cagatgtctt ggtcatggac actggcagga tctctgtggt cacgctaatt gtgaagttag	2340
tagggatagc gatgctgttg ttagagtaag ccacagagtt ctccacgccc agggacatgg	2400
tgtaggcgtat gatagactgg gaagccacgc tcctggctct ccttggagag ttgtctctggg	2460
tctggtaaga agcacagatt ccggcgccga tagggatgtc gcactcgtag gagttgttca	2520
cgtgctcagc tccgatcaga cagccggctc ttgtctggaa cacgttggag ccggtgctgt	2580
acacctcca ttaggggtc agctgatcgg cgtggatagc cacgggcacc tcggtacagt	2640
tcacgccctg gtacagcacg gccacctggt tgcttgtgtt ggttcctggt gtgatcacgc	2700
tcactccgcc gaaagagcat ggtgtgatgt ccaggatctc cagggtctga gggtcgcgca	2760
cagcgtctgt ggtatcggcg atgtcccgcc cgaactgctg aaaaggcagg aacttcttgt	2820
tggactcgggt cagcactcct gtgccgggtca gtccgttaaa gttgaagtta acgacttgt	2880
tcttcaccag gttggtggac ttctttgttc cgcacactgt agcaggagcg tgcagcagct	2940
caaagctcag caccaccacg cggtagggtc ggtatccac gccgtatgtt ggctggaatc	3000
cgtaggactg cagaggggaag taacagttga agcccttcac tccgttgcatt ggggtgcttc	3060
cagcctggta gatctctgta gagatgtccc gctcgaatgg cttcaggttg ctctttctaa	3120
acagcctgta caggtagtgt tagtttccgc ccactttgga atccaggttg ttgctgttcc	3180
aggcgatcac gcagccgggt aaatcgtcag gcagcttgta gttgtagtca gcgatgttc	3240
ctgtctggcc gggagcgatc tggcgacct cgtctccct gatcacgaaa gaatcggcgt	3300
acacgttgggt aaagcacagg tcgttcagct ttgtaggga cacgccgtag cacttaaagg	3360
tgtgaaaga agcggagtgt tacagcacgc ttagtcggc cacgcagtta gagatgcgt	3420
tccggttcca agcgtacacg ctggcgaagc gggtagcgtt gaacacctct ccaaaagggc	3480
acaggtttgt gatgttggga aagcgcacga tagactcgggt aggcctgcacc cggaagtac	3540
tagtctggta gatgcccttc tccacggtaa aggacttcag tgtacacttt gtctcgtca	3600
gggggtccag ggcgcaatcc acagcgtctg tgatgggtcc gttctcgttg tacttcagca	3660
ggaaggtccg gggctgcagg tagccacgt agtaagcagc agctccagcg gtccatccgc	3720
tagaggagtc gcctggtgtc aggtagcttc tgtgcagtgt ctgaaacctg gtgatgttga	3780

ttccgatggg cagatccacc agtggctcca gggcgctgaa gccctgtggc aggccgcgca	3840
ccaggttgat tggggtgtgc ttagagtaga tcttaaagta gccgtcgatg ttcttaaaca	3900
cgaactcccg caggtttcttg aagtttccct gcttgccctc caggtccatc aggaagggt	3960
gggacacgta ctcaaatgtg cagttgttgg cgctagagta cactctaaac tcggactcca	4020
tccagctctt gttgttcttg tggtagtaca cgcccaggaa tggatcgta caaaactgga	4080
actcgcacac cttgatgacc acgttgggtgg cgttggtcac gatcagcaga gactgtgtct	4140
tggagtcag tgtggttcca aagatccagc ctctgatgat gttgctcttc tcggtagagg	4200
cgaagtacac gccatcgta aagggcagca ctgggttggc gaacctcttt gttccgttgg	4260
tgccagacac gtggatagcg tggaaccagg tcacgttgct aaagaaaggc agaaacagat	4320
cctgtgtaga gtgcagcacg gagcttctaa acaccttgct ggggtaatac actcctcttg	4380
tgaaggagtt ggtgtaagcg ggaggagct gggtcgagt agtcaggttc acgcactggg	4440
atgagacgag agggaggagc acgagaaaga caaacatggt ggcggtaccg gctgcagttg	4500
gacctgggag tggacacctg tggagagaaa ggcaaagtgg atgtcattgt cactcaagtg	4560
tatggccaga tctcaagcct gccacacctc aagtgaagcc aagggggtgg gcctatagac	4620
tctataggcg gtacttactg cactcttggc acggggaatc cgcgttccaa tgcaccgttc	4680
ccggcccgcg aggttggatc ggtcccggtg tcttctatgg aggtcaaac agcgtggatg	4740
gcgtctccag gcgatctgac gggttactaa acgagctcgt cgacgatctc tatcactgat	4800
agggagatct ctatcactga tagggagagc tctgcttata tagacctccc accgtacacg	4860
cctaccgccc atttgcgtca atggggcgga gttgttacga cattttggaa agtcccgttg	4920
attttggtgc caaaacaac tccattgac gtcaatgggg tggagacttg gaaatccccg	4980
tgagtcaaac cgctatccac gccattgat gtactgcaa aaccgatca ccatgttaat	5040
agcgtgact aatacgtaga tgtactgcca agtaggaaag tcccataagg tcatgtactg	5100
ggcataatgc caggcgggcc atttaccgtc attgacgtca atagggggcg tacttggcat	5160
atgatacact tgatgtactg ccaagtgggc agtttaccgt aaatactcca cccattgacg	5220
tcaatggaaa gtcctattg gcgttactat gggaacatac gtcattattg acgtcaatgg	5280
gcgggggtcg ttgggcggtc agccaggcgg gccatttacc gtaagttaat taacgcggaa	5340
ctccatatat gggctatgaa ctaatgacct cgtaattgat tactattaat aactagaggc	5400
ctgaccatct ggigtgtgcc tgcaccaggc ccgagtttgg gtctagctta agtttgatcc	5460
gatctttttc cctctgcaa aaattatggg gacatcatga agccccttga gcatctgact	5520

tctggctaataaaggaatttattttcattgcaatagtgtgttggaattttttgtgtctc	5580
tcactcggaagcatctgaattcatctatgtcgggtgcggagaaagaggaatgaaatgg	5640
cattatgggtattatgggtctgcattaatgaatcgccagattatgctggccaccgtgca	5700
tgtggcctcgcccccgagacatggcccgagtttcgagcacaacgtctgacccgatg	5760
caacgtgcacctgggctcccgccgaggaatgttcacgtcccaccagtgcacatgcaatt	5820
tgtgaagggtctgctggagccgatgccatgtccagagtgagcctgacgggggtgtttga	5880
catgaatgtggagctgtggaatattctgagatatgatgaatccaagaccagtgccgggc	5940
ctgcgaatgcggaggcaagcacgccaggcttcagcccgtgtgtgtggaggtgacggagga	6000
cctgcgacccgatcatttgggtgtgtctctgcaacgggacggagttcggtccagcgggga	6060
agaatctgacatagagtgaatgtgtttgggctgggtgggagtcctgcatgatgggcagaa	6120
tgactaaaatctgtgtttttctgtgtgttcagcagcatgagcggaagcgcctcctttga	6180
gggagggggtttcagcccttatctgacggggcgtctccccctctgggcgggagtgcgtca	6240
gaatgtgatggatccacgggtggacggccgcccggtgcagcccgaaactctcaaccct	6300
gacctacggaccctgagctcctcgtccgtggacgcagctgccgccgagctgctgcttc	6360
cgccgccagcgccgtgcggaatggccctgggcgccggctactacagctctctggtggc	6420
caactcgagttccaccaataatcccgccagcctgaacgaggagaagctgtgtctgtgat	6480
ggcccagctcgaggctctgacccagcgcctgggcgagctgaccagcagggtgctcagct	6540
gcaggcgaggacgcgggcccgggttgccacgttgaaaaccataaaaaatgaatcaata	6600
aataaacggaacgggtgtgtgattttaacacagagtcctgaatctttattgatttttcg	6660
cgcgcggttaggccctggaccaccggctctcgtcatttgagcccggtggaacctttccag	6720
gacccggttagggtgggcttgatgttgaggtacatgggcagagcccgctccggggggtg	6780
gaggtagctcattgcaggccctcgtgtctcgggggtggtgttgtaaatcacccagtcata	6840
gcaggggcgcaggcatggtgttcacaatattcttgaggaggagactgtggccacggg	6900
cagccctttgtgttagtgtttacaaatctgttgagctggagggatgcatcggggggga	6960
gatgagggtcattctggcctggatcttgagattggcgatgttaccgccaatccgcct	7020
ggggttcatgttgtgcaggaccaccagcacgtgtatccgtgcacttggggaatttatc	7080
atgcaacttggaaggggaagcgtgaaagaaattggcgacgacctgtgcccgccaggtt	7140
ttcatgcacatcatcatgagtatggcgatggcccggtggcggcgcctgggcaaagac	7200
gtttcgggggtcgacacatcatagttgtgtcctgggtgagctcgtcataggccatttt	7260
aatgaatttgggcgagggtgcccactgggggacgaaggtgccctcgatccccgggggc	7320
glagttgcccctgcagatctgcattcccaagccttgagctcgagggggggatcatgtc	7380

cacctgcggg gcgatgaaaa aaacggtttc cggggcgggg gagatgagct gggccgaaag 7440
caggttccgg agcagctggg acttgccgca gccggtggga ccgtagatga ccccgatgac 7500
cggctgcagg tggtagttga gggagagaca gctgccgtcc tcgcggagga ggggggccac 7560
ctcgttcac c atctcgcga catgcatgtt ctcgcgcacg agttccgcca ggaggcgctc 7620

gccccccagc gagaggagct cttgcagcga ggcaagttt ttcagcggct tgagcccgtc 7680
ggccatgggc attttggaga gggctctgtt caagagtcc agacgggtccc agagctcggc 7740
gatgtgctct agggcatctc gatccagcag acctcctcgt ttcgcgggtt ggggcgactg 7800
cgggagtagg gcaccaggcg atgggcgtcc agcaggagcca ggggtccgtc cttccagggg 7860
cgcagggtcc gcgtcagcgt ggtctccgtc acggtgaagg ggtgcgcgcc gggctgggcg 7920
cttgcgaggg tgcgttcag gctcatccgg ctggtcgaga accgctccc gtcggcgccc 7980
tgcgcgtcgg ccaggtagca attgagcatg agttcgtagt tgagcgcctc ggccgcgtgg 8040

cccttggcgc ggagcttacc tttggaagtg tgtccgcaga cgggacagag gagggacttg 8100
agggcgtaga gcttgggggc gaggaagacg gactcggggg cgtaggcgtc cgcgccgcag 8160
ctggcgaga cggctctcga ctccacgagc cagggtgaggt cggggcggtc ggggtcaaaa 8220
acgaggtttc ctccgtgctt tttgatgctt ttcttacctc tggcttccat gagttcgtgt 8280
ccccgtggg tgacaaagag gctgtccgtg tccccgtaga ccgactttat gggccgggtc 8340
tcgagcgggg tgccgcggtc ctcgtcgtag aggaaccccg cccactccga gacgaaggcc 8400
cgggtccagg ccagcacgaa ggaggccacg tgggaggggt agcggtcgtt gtccaccagc 8460

gggtccacct tctccagggt atgcaagcac atgtccccct cgtccacatc caggaagggtg 8520
attggcttgt aagtgtagc cacgtgaccg ggggtcccgg ccgggggggt ataaaagggg 8580
gcgggccct gctcgtctc actgtcttc ggatcgtgt ccaggagcgc cagctgttgg 8640
ggtaggtatt cctctcgaa ggcgggcatg acctcgccac tcaggttgtc agtttctaga 8700
aacgaggagg atttgatatt gacggtgccg ttggagacgc cttcatgag cccctcgtcc 8760
atctggctag aaaagacgat cttttgttg tcgagcttgg tggcgaagga gccgtagagg 8820
gcgttggaga ggagcttggc gatggagcgc atggtctggt tcttttctt gtcggcgcg 8880

tccttggcgg cgatgttgag ctgcacgtac tcgcgcgcca cgcacttcca ttcggggaag 8940
acggtggtga gctcgtcggg cacgattctg acccgccagc cgcggttgtg cagggtgatg 9000
agggtccagc tgggtggccac ctgcgcgcgc aggggctcgt tgggtccagca gaggcgccc 9060
cccttgcgcg agcagaaggg gggcagcggg tcagcatga gctcgtcggg ggggtcggcg 9120
tcacaggtga agatgccggg caggagctcg ggtcgaagt agctgatga ggtgccaga 9180
tcgtccagc ccgcttgcca gtcgcgcac gccagcgcgc gctcgtaggg gctgaggggc 9240

atgccccagg gcatggggtg cgtgagcgca gaggcgtaaca tgccgcagat gtcgtagacg	9300
tagaggggct cctcgaggac gccgatgtag gtggggtagc agcgcccccc gcggatgctg	9360
gcgcgcacgt agtcgtacag ctctgtcgag ggcgcgagga gccccgcgcg gaggttggag	9420
cgctgcggct tticggcgcg gtagacgatc tggcggaaga tggcgtggga gttggaggag	9480
atggtgggcc tctggaagat gttgaagtgg gcgtggggca ggccgaccga gtccttgatg	9540
aagtgggctg aggagtcctg cagcttggcg acgagctcgg cggtgacgag gacgtccagg	9600
gcgcagtagt cgagggtctc ttggatgatg tcgtacttga gctggccctt ctgcttcac	9660
agctcgcggt tgagaaggaa ctcttcgcgg tccttcagat actcttcgag ggggaacccg	9720
tcctgatcgg caccgtaaga gcccacatg tagaactggt tgacggcctt gtaggcgcag	9780
cagcccttct ccacggggag ggcgtaagct tgcgcggcct tgcgcaggga ggtgtgggtg	9840
agggcgaagg tgcgcgcac catgaccttg aggaactggt gcttgaagtc gaggtcgtcg	9900
cagccgccct gctcccagag ctggaagtcc gtgcgcttct ttaggcgggg gttgggcaaa	9960
gcgaaagtaa catcgttgaa gaggatcttg cccgcgcggg gcataaagtt gcgagtgatg	10020
cggaaaggct ggggcacctc ggcccgggtt ttgatgacct gggcggcgag cacgatctcg	10080
tcgaagccgt tgatgttgtg gccacgatg tagagtcca cgaaccgtgg gcggcccttg	10140
acgtggggca gcttcttgag ctctcgtag gtgagctcgt cagggtcgct gagcccgctc	10200
tgctcgaggg ccagtcggc gagatggttg ttggcgcgga ggaagggaagt ccagagatcc	10260
acggccaggg cggtttgcag acggtcccgg tactgacgga actgctggcc gacggccatt	10320
ttttcggggg tgacgcagta gaaggtgcgg ggggtcccgt gccagcgatc ccatttgagc	10380
tggagggcga gatcgagggc gagctcgacg aggcggctct ccccgagag tttcatgacc	10440
agcatgaagg ggacgagctg cttgccgaag gaccccatcc aggtgtaggt ttccacatcg	10500
taggtgagga agagccttcc ggtgcgagga tgcgagccga tggggaagaa ctggatctcc	10560
tgccaccaat tggaggaatg gctgttgatg tgatggaagt agaaatgccg acggcgcgcc	10620
gaacactcgt gcttgtgttt atacaagcg ccacagtgtc cgcaacgctg cacgggatgc	10680
acgtgctgca cgagctgtac ctgagttcct ttgacgagga atttcagtgg gaagtggagt	10740
cgtggcgctt gcatctcgtg ctgtactacg tcgtgggtgt cggcctggcc ctcttctgcc	10800
tcgatggtgg tcatgctgac gagcccgcg gcggaggcagg tccagacctc ggcgcgagcg	10860
ggtcgggagag cgaggacgag ggcgcgcagg ccggagctgt ccagggtcct gagacgtgc	10920
ggagtccagt cagtgggcag cggcggcgcg cggttgactt gcaggagttt ttccaggcg	10980

cgcgaggaggt ccagatggta cttgatctcc accgcgccgt tggtaggcgac gtcgatggct	11040
tgcagggtcc cgtgcccctg gggagtgacc accgtccccc gtttcttctt gggcgctgct	11100
tccatgccgg tcagaagcgg cgccgaggac gcgcgccggg cggcagaggc ggctcggggc	11160
ccggaggcag gggcggcagg ggcacgtcgg cgccgcgcgc gggtaggttc tggtagtcg	11220
cccggagaag actggcgtga gcgacgacgc gacggttgac gtcctggatc tgacgcctct	11280
gggtgaaggc cacgggaccc gtgagtttga acctgaaaga gagttcgaca gaatcaatct	11340
cggtatcggt gacggcggcc tgccgcagga tctcttgac gtcgcccgag ttgtcctggt	11400
aggcgatctc ggtcatgaac tgctcgatct cctcctctg aaggctccg cgccggcg	11460
gtccacgggt gggcgagg tctgtggaga tgcggcccat gagctgcgag aaggcgttca	11520
tgccgcctc gtccagacg cggctgtaga ccacgacgcc ctccggatcg cggcgcgca	11580
tgaccacctg ggcgaggttg agctccacgt ggcgcgtgaa gaccgcgtag ttgcagaggc	11640
gttggttagag gtagttgagc gtggtggcga tgtgctcggg gacgaagaaa tacatgatcc	11700
agcggcgag cggcatctcg ctgacgtcg ccagcgctc caagcgttcc atggcctcgt	11760
aaaagtccac ggcgaagtg aaaaactggg agttgcgcgc cgagacggtc aactcctct	11820
ccagaagacg gatgagctcg gcgatggtgg gcgcacctc gcgctcgaag gccccgggaa	11880
cctctcttc catctctct tcttctctt ccaactaacat ctctctact tctcctcag	11940
gcggtggcgg gggagggggc ctgcgtcgcc ggcggcgac gggcagacgg tcgatgaagc	12000
gtcgatggt ctgcgccgc cggcgtcgca tggctcggg gacggcccgc ccgtcctcg	12060
ggggcccgag cgtgaagacg ccgccgcga ttccaggtg gccggggggg tccccgttg	12120
gcaggagag ggcgctgacg atgcatctta tcaattgccc cgtagggact ccgcgaagg	12180
acctgagcgt ctgagatcc accggatctg aaaaccgtg aacgaaggct tcgagccagt	12240
cgcatcgca aggtagctg agcacggtt cttctggcgg gtcagtgttg ggagcggggc	12300
ggcgatgct gctggtgatg aagtgaat aggcggttct gagacggcgg atggtggcga	12360
ggagaccag gtctttggc ccggttgct ggatgcgag acggtcggc atgccccagg	12420
cgtggtcctg acacctggc agatcctgt agtagtctg catgagccgc tccacgggca	12480
cctcctctc gcccgcgcg ccgtgcatgc gcgtgagccc gaagccgcgc tggggctgga	12540
cgagccag gtcggcgacg acgcgtcgg cgaggatggc ctgctggatc tgggtgagg	12600
tggctggaa gtcgtcaaag tcgacgaagc ggtggtaggc tccggtgtg atggtgtagg	12660
agcagttggc catgacggac cagttgacgg tctggtggc gggacgcac agctcgtggt	12720
acttgaggcg cgagtaggc gcggtgca agatgtagtc gttgcaggtg cgcaccaggt	12780
actggtagcc gatgaggaag tgcggcgcg gctggcgta gagcgccat cgctcggtgg	12840

cgggggcgcc gggcgcgagg tcctcgagca tgggtcggtg gtagccgtag atgtacctgg	12900
acatccagggt gatgccggcg gcggtgggtg aggcgcgcgg gaactcgcgg acgcggttcc	12960
agatgttgcg cagcggcagg aagtagttca tgggtgggcac ggtctggccc gtgaggcgcg	13020
cgcagtcgtg gatgctctat acgggcaaaa acgaaagcgg tcagcggctc gactccgtgg	13080
cctggaggct aagcgaacgg gttgggctgc gcgtgtaccc cggttcgaat ctgaaatcag	13140
gctggagccg cagctaactg ggtactggca ctcccgtctc gaccaagcc tgcaccaacc	13200
ctccaggata cggaggcggg tcgtttttgc aacttttttt cggaggccgg aatgaagac	13260
tagtaagcgc ggaagcggc gcaccgcgat ggctcgtcgc cgtagtctgg agaagaatcg	13320
ccagggttgc gttgcggtgt gccccggttc gaggcggcc ggattccgcg gctaacgagg	13380
gcgtggctgc cccgtcgttt ccaagacccc tagccagccg acttctccag ttacggagcg	13440
agcccctctt ttgttttttg tttttgccag atgcatcccg tactgcggca gatgcgcccc	13500
caccaccctc caccgaaca acagccccct cctccacagc cggcgcttct gccccgccc	13560
cagcagcagc agcaacttc agccacgacc gccgcggccg ccgtgagcgg ggctggacag	13620
acttctcagt atgateacct ggccttggaa gagggcgagg ggctggcgcg cctgggggcg	13680
tcgtcgccgg agcggcacc gcgcgtgcag atgaaaagg acgctcgcga ggcctacgtg	13740
cccaagcaga acctgttcag agacaggagc ggcgaggagc ccgaggagat gcgcgcggcc	13800
cggttccacg cggggcgggg gctgcggcgc ggctggacc gaaagagggt gctgagggac	13860
gaggatttcg aggcggacga gctgacgggg atcagccccg cgcgcgcgca cgtggccgcg	13920
gccaaactgg tcacggcgta cgagcagacc gtgaaggagg agagcaactt ccaaaaatcc	13980
ttcaacaacc acgtgcgcac cctgatcgcg cgcgaggagg tgaccctggg cctgatgcac	14040
ctgtgggacc tgctggagcg catcgtgcag aacccccacca gcaagccgt gacggcgcag	14100
ctgttcttgg tgggtgcagca tagtcgggac aacgaggcgt tcagggaggc gctgctaaat	14160
atcaccgagc ccgagggccg ctggctcctg gacctggtga acattctgca gagcatcgtg	14220
gtgcaggagc gcgggctgcc gctgtccgag aagctggcgg ccatcaactt ctcggtgctg	14280
agtctgggca agtactacgc taggaagatc tacaagaccc cgtacgtgcc catagacaag	14340
gaggtgaaga tcgacgggtt ttacatgcgc atgacctga aagtctgac cctgagcgac	14400
gatctggggg tgtaccgcaa gcacaggatg caccgagcgg tgagcgccag caggcggcgc	14460
gagctgagcg accaggagct gatgcacagc ctgcagcggg cctgaccgg gcccgggacc	14520
gagggggaga gctactttga catgggcgcg gacctgcact ggcaaccag ccgccgggcc	14580
ttggaggcgg cggcaggacc ctacgtagaa gaggtggacg atgaggtgga cgaggcgag	14640
tacctggaag actgatggcg cgacctatt ttgctagat gcaacaacag ccaccgcctc	14700

ctgatccgc gatgcgggcg gcgctgcaga gccagccgtc cggcattaac tcctcggacg	14760
attggaccca ggccatgcaa cgcatcatgg cgtgacgac ccgaatccc gaagccttta	14820
gacagcagcc tcaggccaac cggctctcgg ccatcctgga ggccgtgggtg ccctcgcgt	14880
cgaacccac gcacgagaag gtgctggcca tcgtgaacgc gctggaggag aacaaggcca	14940
tccgcggcga cgaggccggg ctgggtgtaca acgcgctgct ggagcgcgtg gcccgtaca	15000
acagcaccaa cgtgcagacc aacctggaca ggatgggtgac cgacgtgcgc gaggccgtgg	15060
cccagcgcga gcggttccac cgcgagtgca acctgggatc catggaggcg ctgaacgct	15120
tcctcagcac ccagcccgc aacgtgcccc ggggccagga ggactacacc aacttcata	15180
gcgcctgcg ccgatgggtg accgaggtgc cccagagcga ggtgtaccag tccgggccgg	15240
actacttctt ccagaccagt cgccagggtg tgcagaccgt gaacctgagc caggcgttca	15300
agaacttgca gggcctgtgg ggctgacagg ccccggtcgg ggaccgcgcg acggtgtcga	15360
gcctgtgac gccgaactcg gcctgtgctg tgctgtggt gggcccttc acggacagcg	15420
gcagtatcaa ccgaactcg tacctgggt acctgattaa cctgtaccgc gaggccatcg	15480
gccaggcgca cgtggacgag cagacctacc aggagatcac ccacgtgagc cgcgccctgg	15540
gccaggacga cccgggcaat ctggaagcca cctgaactt tttgtgacc aaccggtcgc	15600
agaagatccc gcccagtac gcgctcagcg ccgaggagga gcgcacctg cgatacgtgc	15660
agcagagcgt gggcctgttc ctgatgcagg agggggccac cccagcgcc gcgctcgaca	15720
tgaccgcgcg caacatggag cccagcatgt acgccagca cggccgttc atcaataaac	15780
tgatggacta cttgcatcgg gcggccgcca tgaactctga ctatttacc aacgccatcc	15840
taaaccccca ctggctaccg ccgccggggt tctacacggg cgagtagac atgccgacc	15900
ccaatgacgg gtctctgtgg gacgatgtgg acagcagcgt gttttcccc cgaccgggtg	15960
ctaacgagcg ccccttgtgg aagaaggaag gcagcgaccg acgcccgtcc tcggcgtgt	16020
ccggccgcga ggggtgtgcc gcggcggtgc ccgaggccgc cagtcctttt cctagcttgc	16080
ccttctcgt gaacagtatt cgcagcagcg agctgggcag gatcacgcgc ccgcgttgc	16140
tcggcgagga ggagtacttg aatgactcgc tgttgagacc cgagcgggag aagaacttcc	16200
ccaataacgg gatagagagc ctgggtggaca agatgagccg ctggaagacg tacgcgcagg	16260
agcacaggga cgatccgtcg cagggggcca cgaccgggg cagcgccgcc cgtaaacgcc	16320
ggtggcacga caggcagcgg ggactgatgt gggacgatga ggattccgc gacgacagca	16380
gcgtgttgga cttgggtggg agtgggtgtg gtaaccgtt cgctcacctg cggccccga	16440

tcgggcgcgat gatgtaagaa accgaaaata aatgatactc accaaggcca tggcgaccag	16500
cgtgcgttcg tttcttctct gttgttgtat ctagtatgat gaggcgtgcg taccggagg	16560
gtcctcctcc ctctacgag agcgtgatgc agcaggcgat ggcggcggcg atgcagcccc	16620
cgctggaggc tccttacgtg ccccgcggt accctggcgcc tacggagggg cggaacagca	16680
ttcgttactc ggagctggca cctttgtacg ataccaccg gttgtacctg gtggacaaca	16740
agtcggcgga catcgctcg ctgaactacc agaacgacca cagcaacttc ctgaccaccg	16800
tgggtgcagaa caatgacttc acccccacgg aggccagcac ccagaccatc aactttgacg	16860
agcgctcgcg gtggggcggc cagctgaaaa ccatcatgca caccaacatg cccaacgtga	16920
acgaattcat gtacagcaac aagtccaagg cgcgggtcat ggtctccgc aagaccccca	16980
atggggtcaa agtagatgaa aattatgatg gtagtcagga tgagctgaaa tacgagtggg	17040
tggagtttga gctccccgaa ggcaacttct cggtgacct gaccatcgac ctgatgaaca	17100
acgccatcat cgacaattac ttggcgggtg ggcggcagaa cggggtcctg gaaagcgaca	17160
tcggcgtgaa gttcgacct aggaacttca ggctgggctg ggaccccgat accgagctgg	17220
tcatgcccgg ggtgtacacc aacgaggcct tccatccga tgttgtcttg ctgcccggct	17280
gcgggggtgga cttaccgag agccgcctca gcaacctgct gggcattcgc aagaggcagc	17340
ccttcaggga gggattccag atcatgtacg aggatctgga ggggggcaac atccccgcgc	17400
tcctggatgt cgaggcctat gaggaagca aggaagaaagc tgaagccgag gcgactgcag	17460
ccgtggctac cgcgcgacc accaatgcag atgcaactac caccagagc gatacttcg	17520
ccactgtggc ggaggaagca gccgcctag cggtcgccga tgatagtga agtaagatag	17580
ttatcaagcc agtaaaagtg gatagcaaga acagaagcta caactgtctg ccggacgagg	17640
taaacaccgc ctaccgcagc tggtagctgg cctacaacta tggcgacccc gagaagggcg	17700
tgcgctcctg gacgtgctc accacctcgg acgtcacctg cggcgtggag caagtctact	17760
ggtcgctgcc cgacatgatg caagaccggt tcaccttcg ctccacgcgt caagttagca	17820
actaccgggt ggtgggcgcc gagctcctgc ccgtctactc caagagcttc ttcaacgagc	17880
aggccgtcta ctgcagcag ctgcgcgct tcacctcgt cagcacgtc ttcaaccgt	17940
tccccgagaa ccagatctc gtccgcccgc ccgcgccac cattaccacc gtcagtgaag	18000
acgttctcgc tctcacagat caggggaccc tgccgtgcg cagcagtatc cggggagtc	18060
agcgctgac cgttactgac gccagacgcc gcacctgccc ctacgtctac aaggccctgg	18120
gcatagtcgc gccgcgctc ctctcgagcc gcaccttcta aaaaatgtcc attctcatct	18180
cgcccagtaa taacaccggt tggggcctgc gcgcgccag caagatgtac ggaggcgctc	18240
gccaacgctc cagcaaac cccgtgcgcg tgcgcgggca cttccgcgt cctggggcg	18300

ccctcaaggg tcgctgcgg tcgcgacca ccgtcgacga cgtgatcgac caggtggtgg	18360
ccgacgcgcg caactacacc cccgcccg cgccgtctc caccgtggac gccgtcatcg	18420
acagcgtggt ggccgacgcg cgccggtacg cccgcgcaa gagccggcgg cggcgcatcg	18480
cccggcggca ccggagcacc cccgccatgc gcgcggcgcg agccttgctg cgcagggcca	18540
ggcgcacggg acgcagggcc atgctcaggg cagccagacg cgcggcctcc ggcagcagca	18600
gcagcgccgg caggaccgcg agacgcgcgg ccacggcggc ggccggcgcc atcgccagca	18660
tgtccgccc gcggcgcggc aacgtgtact ggggtgcgca cgccgccacc ggtgtgcgcg	18720
tgcctgtgcg caccgcccc cctcgactt gaagatgctg acttcgcgat gttgatgtgt	18780
cccagcgcg agggagatgt ccaagcgcaa atacaaggaa gagatgctcc aggtcatcg	18840
gcctgagatc tacggcccc cggtgaagga ggaaagaaag ccccgcaaac tgaagcgggt	18900
caaaaaggac aaaaaggagg aggaagatgt ggatggactg gtggagtgtg tgcgcgagtt	18960
cgcccccg cgcgcgctgc agtggcgcg gcggaaagtg aagccggtgc tgcggccagg	19020
caccacggtg gtcttcacgc ccggcgagcg ttccggctcc gcctccaagc gtcctacga	19080
cgaggtgtac ggggacgagg acatcctcga gcaggcgcc gagcgtctgg gcgagtttg	19140
ttacggcaag cgagccgcc ccgcgccctt gaaagaggag gcggtgtcca tcccgtgga	19200
ccacggcaac ccacgccga gcctgaagcc ggtgaccctg cagcaggtgc tgccgagcgc	19260
ggcgccgcgc ggggcttca agcgcgaggg cggcgaggat ctgtaccga ccatgcagct	19320
gatggtgccc aagcgccaga agctggagga cgtgctggag cacatgaagg tggacccga	19380
ggtgcagccc gaggtcaagg tgcggcccat caagcaggtg gccccgggcc tggcggtgca	19440
gaccgtggac atcaagatcc ccacggagcc catggaaacg cagaccgagc ccgtgaagcc	19500
cagcaccagc accatggagg tgcagacgga tccttgatg ccggcgcccg cggcttcac	19560
cgccaccgc cgaagacgca agtacggcg gcgcagcctg ctgatgccca actacgcgt	19620
gcatccttcc atcatccca cgccgggcta ccgcggcacg cgcttctacc gcggctacac	19680
cagccgcgc cgcaagacca ccaccgcg ccgccgtcgt cgcagccgc gcagcagcac	19740
cgcgacttcc gccttggtgc ggagagtgt tgcagcggg cgcgagcctc tgacctgcc	19800
gcgcgcgcgc taccaccga gcatcgccat ttaactaccg cctcctactt gcagatatgg	19860
ccctcacatg ccgcctccg gteccatta cgggtaccg aggaagaaag ccgcgccgta	19920
gaaggtgac ggggaacggg ctgcgtcgcc atcaccaccg gcggcgcgcc gccatcagca	19980
agcggttggg gggaggcttc ctgcccgcgc tgatcccat catcgccgc gcgatcgggg	20040
cgatccccg catagcttcc gtggcggtgc aggcctctca gcgccactga gacacaaaaa	20100
aagcatggat ttgtaataaa aaaatggact gacgctcctg gtcctgtgat gtgtgtttt	20160

agatggaaga catcaatttt tcgtccctgg caccgcgaca cggcacgcgg ccgtttatgg	20220
gcacctggag cgacatcggc aacagccaac tgaacggggg cgccttcaat tggagcagtc	20280
tctggagcgg gcttaagaat ttcgggtcca cgtcctcaaac ctatggcaac aaggcgtgga	20340
acagcagcac agggcaggcg ctgagggaaa agctgaaaga gcagaacttc cagcagaagg	20400
tggctgatgg cctggcctcg ggcatcaacg ggggtgtgga cctggccaac caggccgtgc	20460
agaaacagat caacagccgc ctggacgcgg tcccgcgccg ggggtccgtg gagatgcccc	20520
aggtggagga ggagctgcct cccctggaca agcgcggcga caagcgaccg cgtcccgacg	20580
cggaggagac gctgctgacg cacacggacg agccgcccc gtacgaggag gcggtgaaac	20640
tgggtctgcc caccacgcgg cccgtggcgc ctctggccac cggggtgctg aaaccagca	20700
gcagcagcag ccagcccgcg accctggact tgcctccgcc tcgcccctcc acagtggcta	20760
agcccctgcc gccggtggcc gtgcgtcgcg gcgcccccg aggcgcgcc caggcgaact	20820
ggcagagcac tctgaacagc atcgtgggtc tgggagtga gagtgtgaag cgccgccgt	20880
gctattaaaa gacactgtag cgcttaactt gcttgtctgt gtgtgtatat gtatgtccgc	20940
cgaccagaag gaggaagagg cgcgtcgccg agttgcaaga tggccacccc atcgatgctg	21000
ccccagtggg cgtacatgca catcgccgga caggacgctt cggagtacct gagtccgggt	21060
ctggtgcagt tcgcccgcgc cacagacacc tacttcagtc tggggaacaa gtttaggaac	21120
cccacggtgg cgcccacgca cgatgtgacc accgaccgca gccagcggct gacgctgcgc	21180
ttcgtgcccc tggaccgca ggacaacacc tactcgtaca aagtgcgcta cacgtggcc	21240
gtggcgaca accgcgtgct ggacatggcc agcacctact ttgacatccg cggcgtgctg	21300
gacggggcc ccagtttcaa accctactcc ggaccgcct acaacagcct ggctcccaag	21360
ggagcgccca acacctcaca gtggaaggat tccgacagca aaatgcatac ttttggagtt	21420
gctgccatgc ccggtgttgt tggtaaaaaa atagaagccg atggtctgcc tattggaata	21480
gattcatcct ctggaactga taccataatt tatgtgata aaactttcca accagagcca	21540
caggttggaa gtgacagttg ggtcgacacc aatggtgcag aggaataata tggaggtaga	21600
gctcttaagg aactacaaa catgaagccc tgctacggtt cttttgccag gcctaccaac	21660
aaagaaggtg ggcaggctaa cataaagat tctgaaactg ccagcactac tcctaactat	21720
gatatagatt tggcattctt tgacagcaaa aatattgccg ctaactatga tccagatatt	21780
glaatgtaca cagaaaatgt tgagttgcaa actccagata ctcatattgt gtttaagcca	21840
ggaacttcag atgaaagttc agaagccaat ttgggccagc aggcctatgcc caacagaccc	21900

aactacatcg gggtcagaga caactttatc gggctcatgt actacaacag cactggcaat	21960
atgggtgtac tggctggta ggcctcccag ctgaatgctg tgggtgactt gcaggacaga	22020
aacaccgaac tgtcctacca gctcttgctt gactctctgg gtgacagaac caggtatttc	22080
agtatgtgga atcaggcggg ggacagctat gaccccgatg tgcgcattat tgaaaatcac	22140
ggtgtggagg atgaactccc caattattgc ttccctttga atggtgtggg ctttacagat	22200
acttaccagg gtgttaaagt taagacagat acagccgctg ctggtacca tggaacgcag	22260
tgggacaaag atgataccac agtcagcact gccaatgaga tccactcagg caatccttc	22320
gccatggaga tcaacatcca ggccaacctg tggcggaact tectctacgc gaacgtggcg	22380
ctgtacctgc ccgactccta caagtacacg ccggccaaca tcacgctgcc ggccaacacc	22440
aacacctacg attacatgaa cggccgcgtg gtggcgccct cgctggtgga cgcctacatc	22500
aacatcgggg cgcgctgggc gctggacccc atggacaacg tcaacccctt caaccaccac	22560
cgcaacgcgg gcctgcgcta ccgctccatg ctccctgggca acgggcgcta cgtgcccttc	22620
cacatccagg tgccccaaaa gtttttcgcc atcaagagcc tctgtctct gcccggtcc	22680
tacacctacg agtggaaactt ccgcaaggac gtcaacatga tctgcagag ctccctcggc	22740
aacgacctgc gcacggacgg ggcctccatc gccttcacca gcatcaacct ctacgccacc	22800
ttcttcccca tggcgcaaca caccgcctcc acgctcgagg ccatgctgcg caacgacacc	22860
aacgaccagt cttcaacga ctacctctcg gcggccaaca tgctctaccc catcccgcc	22920
aacgccacca acgtgcccat ctccatcccc tcgcgcaact gggccgcctt ccgcggatgg	22980
tccttcacgc gcctcaagac ccgcgagacg ccctcgtctg gctccgggtt cgaccctac	23040
ttcgtctact cgggctccat cccctacctc gacggcacct tctacctcaa ccacaccttc	23100
aagaaggctt ccatcacctt cgactcctcc gtcagctggc ccggcaacga ccgcctcctg	23160
acgcccaacg agttcgaat caagcgcacc gtcgacggag aggggtacaa cgtggcccag	23220
tgcaacatga ccaaggactg gttcctggtc cagatgctgg cccactaaa catcggtac	23280
cagggttct acgtgccga gggctacaag gaccgcatgt actcttctt ccgcaacttc	23340
cagccatga gccgccaggf cgtggacgag gtcaactaca aggactacca ggccgtcacc	23400
ctggcctacc agcacaacaa ctcgggcttc gtcggctacc tcgcgccac catgcgccag	23460
ggacagccct accccgcaa ctaccctac ccgtcatcg gcaagagcgc cgtcgccagc	23520
gtcaccaga aaaagttcct ctgcgaccgg gtcattgtgc gcatccctt ctccagcaac	23580
ttcatgtcca tgggcgcgt caccgacctc ggccagaaca tgctctacgc caactccgc	23640
cacgcgctag acatgaattt cgaagtgcac cccatggatg agtccacct tctctatgtt	23700
gtcttcgaag tcttcgactg tgtccgagt caccagcccc accgcggcgt catcgaggcc	23760

gtctacctgc gcacgccctt ctggccggc aacgccacca cctaagcccc gctcttgctt	23820
cttgcaagat gacggcctgt ggctccggcg agcaggagct cagggccatc ctccgcgacc	23880
tgggctgcgg gccctacttc ctgggcacct tcgacaagcg cttcccggga ttcattggccc	23940
cgcacaagct ggcttgcgcc atcgtaaca cggccggccg cgagaccggg ggcgagcact	24000
ggctggcctt cgcttgaac ccgcgtccc acacctgcta cctcttcgac ccttcgggt	24060
tctcggacga ggcctcaag cagatctacc agttcgagta cgagggcctg ctgcgtcgca	24120
gcgccctggc caccgaggac cgctgcgtca ccttggaata gtccaccag accgtgcagg	24180
gtccgcgtc gcccgctgc gggctcttct gctgcatgtt cctgcacgcc ttcgtgact	24240
ggcccgaccg ccccatggac aagaaccca ccatgaactt gctgacgggg gtgccaacg	24300
gcatgtcca gtgccccag gtggaaccca cctgcgccg caaccaggag gcgtctacc	24360
gcttcctcaa cgcctactcc gtctactttc gctcccaccg cgcgcgcac cagaaggcca	24420
ccgccttcga ccgcatgaat caagacatgt aaactgtgtg tgtatgtgaa tgctttattc	24480
atcataataa acagcacatg tttatgccac ctctctgag gctctgactt tatttagaaa	24540
tcgaagggtt tctgcggct ctccgcgtgc ccgcgggca gggatacgtt gcggaactgg	24600
tacttgggca gccacttgaa ctccgggatc agcagcttcg gcacggggag gtcggggaac	24660
gagtcgtcc acagcttgcg cgtgagttgc agggcgccca gcaggtcggg cgcggagatc	24720
ttgaaatcgc agttgggacc cgcgttctgc gcgcgagagt tacggtacac ggggttcgag	24780
cactggaaca ccatcagggc cgggtgcttc acgctcgcca gcaccgtcg gtcggtgatg	24840
ccctccactt ccatatcctc ggcttggcc atcccgaagg gggatcatct gcaggtctgc	24900
cgcctcatgc tgggcacgca gccgggcttg tggttgcaat cgaggtgcag gggatcagc	24960
atcatctggg cctgctcgga gctcatgcc gggtacatgg ccttcatgaa agcctccagc	25020
tggcggaagg cctgctgcgc cttgccgcc tcggtgaaga agaccccgca ggacttgcta	25080
gagaactggt tggtagcgca gcccgctcg tgcacgcagc agcgcgcgc gttgttgcc	25140
agctgcacca cgtgcgcc ccagcggttc tgggtgatct tggcccggtc ggggttctcc	25200
ttcagcggc gctgccgtt ctgctcgcc acatccatct cgatcgtgtg ctccttctgg	25260
atcatcacgg tcccgtgcag gcaccgcagc ttgccctcgg cctcggtgca gccgtgcagc	25320
cacagcggc agccggtgca ctccagttc ttgtggcgga tctgggagtg cgagtgcagc	25380
aagccctgca ggaagcgcc catcatctg gtcagggtct tgttctgtt gaaggtcagc	25440
ggaatgccgc ggtgctctc gttcacatac aggtggcaga tgcggcggt cactcgccc	25500
tgctcgggca tcagctggaa ggcggacttc aggtcgtct ccacgcggta ccggtccatc	25560
agcagcgtca tcacttccat gcccttctcc caggccgaga cgatcggcag gtcaggggg	25620

ttcttcaccg ttgtcatctt agtcgccgcc gccgaggtca gggggtcgtt ctctccagg	25680
gtctcaaca ctcgttggc gtcttctcgt atgatgcga cggggggaaa gctgaagccc	25740
acggcgcga gtcctcctc ggctgcctt tcgtcctcgc tgccttggt gatgtcttc	25800
aaaggcacat gcttggctt gcggggtttc tttttggcg gcagaggcgg cggcggagac	25860
gtgctggcg agcgcgagtt ctcgtcacc acgactatit cttctcttg gccgtcgtc	25920
gagaccacgc ggcggtaggc gtgcctcttc tggggcagag gcggaggcga cgggctctc	25980
cggttcggcg ggcggctggc agagccctt ccgcgttcgg gggtgcgtc ctggcggcg	26040
tgctctgact gacttctcc gcggccggcc attgtgttct cctagggagc aagcatggag	26100
actcagccat cgtcgccaac atcgccatct gccccgccg ccgcagccga cgaaccag	26160
cagcagaatg aaagcttaac cggccgccg ccagcccca cctccgacgc cgcggcccca	26220
gacatgcaag agatggagga atccatcgag attgacctgg gctacgtgac gcccgcgag	26280
cacgaggagg agctggcgc gcgcttttca gccccggaag agaaccacca agagcagcca	26340
gagcaggaag cagagagcga gcagcagcag gctgggctcg agcatggcga ctacctgagc	26400
ggggcagagg acgtgctcat caagcatctg gcccgccaat gcatcatcgt caaggacgcg	26460
ctgctcgacc gcgccgaggt gcccctcagc gtggcggagc tcagccgcgc ctacgagcgc	26520
aacctcttct cgcgcgcgt gcccccaag cgcagccca acggcacctg cgagcccaac	26580
ccgcgcctca acttctacc ggtcttcgcg gtgcccagg ccctggccac ctaccacctc	26640
tttttcaaga accaaaggat ccccgctctc tgccgcgcca accgcaccg cgcgcacgc	26700
ctgctcaacc tgggccccgg cgcgcgcta cctgatatcg cctccttgga agaggttccc	26760
aagatcttcg agggctctggg cagcgacgag actcgggccg cgaacgtct gcaaggaagc	26820
ggagaggagc atgagcacca cagcgccctg gtggagtgg aaggcgaca cgcgcgctg	26880
gcggtgctca agcgcacggt cgagctgacc cacttcgctt acccggcgt caacctgccc	26940
cccaaggta tgagcgccgt catggaccag gtgctcatca agcgcgcctc gcccctctcc	27000
gaggacgaga tgcaggacc cgagagctcg gacgaggga agcccggtgt cagcgacgag	27060
cagctggcg gctggctggg agcgagtagc acccccaga gcctggaaga gcggcgcaag	27120
ctcatgatgg ccgtggctct ggtgaccgtg gagctggagt gtctgcgcc cttcttcgcc	27180
gacgcggaga ccttcgcga ggtcgaggag aacctgcact acctcttcag gcacgggttc	27240
gtgcgccagg cctgcaagat ctccaacgtg gagctgacca acctggtctc ctacatgggc	27300
atcctgcacg agaaccgctt ggggcagaac gtgctgcaca ccacctgcg cggggaggcc	27360

cgccgcgact acatccgcga ctgcgtctac ctgtacctct gccacacctg gcagacgggc	27420
atgggcgtgt ggcagcagtg cctggaggag cagaacctga aagagctctg caagctcctg	27480
cagaagaacc tcaaggccct gtggaccggg ttcgacgagc gcaccaccgc cgcggacctg	27540
gccgacctca tcttccccga gcgcctgcgg ctgacgtctg gcaacgggct gcccgacttt	27600
atgagccaaa gcatgttgca aaactttcgc tctttcatcc tcgaacgtc cgggatcctg	27660
cccgccacct gctccgact gccctcggac ttcgtgccgc tgaccttcg cgagtcccc	27720
ccgccgtctt ggagccactg ttacttgctg cgcttgcca actacctggc ctaccactcg	27780
gacgtgatcg aggacgtcag cggcgagggt ctgctcgaat gccactgccg ctgcaacctc	27840
tgcacccgc accgctccct ggcttgcaac cccagctgc tgagcgaaac ccagatcatc	27900
ggcaccttcg agttgaagg ccccgccgag ggcaaggggg gtctgaaact caccgcgggg	27960
ctgtggacct cggcctactt gcgcaagttc gtccccgagg actaccatcc cttcgagatc	28020
aggtttctacg aggaccaatc ccagccgcc aaggccgagc tgtcggcctg cgtcatcacc	28080
cagggggcca tcttgccca attgcaagc atccagaaat cccgccaaga atttctgtg	28140
aaaaagggcc acggggtcta cctggacccc cagaccggag aggagctcaa cccagcttc	28200
ccccaggatg ccccgaggaa gcagcaagaa gctgaaagt gagctgccgc tgccgccgga	28260
ggatttggag gaagactggg agagcagtca ggcagaggag gaggagatgg aagactggga	28320
cagcactcag gcagaggagg acagcctgca agacagtctg gaggaagacg aggtggagga	28380
ggaggcagag gaagaagcag ccgcccccag accgtcgtcc tcggcggagg aggagaaagc	28440
aagcagcacg gataccatct ccgctccggg tcggggctgc ggccggccggg cccacagtag	28500
gtgggacgag accgggcgtt tccgaaccc caccaccag accggtgaga aggagcggca	28560
gggatacaag tcttgccggg ggcacaaaaa cgccatcgtc tctgcttgc aagcctgcgg	28620
gggcaacatc tcttccacc ggctctacct gctcttcac cgccgggtga acttcccccg	28680
caacatcttg cattactacc gtcacctca cagcccctac tactgtttcc aagaagaggc	28740
agaaaccag cagcagcagc agaaaaccag cggcagctag aaaatccaca gcggcggcgg	28800
caggtggact gaggatcgcg gcgaacgagc cggcgcagac ccgggagctg aggaaccgga	28860
tctttccac cctctatgcc atcttcagc agagtcgggg gcaggagcag gaactgaaag	28920
tcaagaaccg ttctctgcgc tcgctaccc gcagttgtct gtatcacaag agcgaagacc	28980
aacttcagcg cactctcgag gacgccgagg ctctcttcaa caagtactgc gcgtcactc	29040
ttaaagagta gcccgcgcc gccacacac gaaaaaggc gggaattacg tcaccacctg	29100
cgcccttcgc ccgacctca tcatgagcaa agagattccc acgccttaca tgtggagcta	29160
ccagccccag atgggcctgg ccgccggcgc cgcccaggac tactccacc gcataactg	29220

gctcagtgcc gggcccgcca tgatctcacg ggtgaatgac atccgcgccc accgaaacca	29280
gatactccta gaacagtcag cgatcacccg cagcccccgc catcacctta atccgcgtaa	29340
ttggccccgc gccctggtgt accaggaaat tccccagccc acgaccgtac tacttccgcg	29400
agacgcccag gccgaagtcc agctgactaa ctcagggtgc cagctggccg gcggcgccgc	29460
cctgtgtcgt caccgccccg ctcagggtat aaagcggtcg gtgatccgag gcagaggcac	29520
acagctcaac gacgaggtgg tgagctcttc gctgggtctg cgacctgacg gagtcttcca	29580
actcgccgga tcggggagat cttccttcac gcctcgtcag gccgtcctga ctttgagag	29640
ttcgtctcgc cagccccgct cgggtggcat cggcactctc cagtctgtgg aggagtccac	29700
tccctcggtc tacttcaacc ctttctccgg ctcccccggc cactaccggg acgagttcat	29760
cccgaacttc gacgccatca gcgagtcggt ggacggctac gattgaatgt cccatggtgg	29820
cgcagctgac ctagctcggc ttcgacacct ggaccactgc cgcgccttcc gctgcttcgc	29880
tcgggatctc gccgagtttg cctactttga gctgcccag gagcaccctc agggccccgc	29940
ccacggagtg cggatcgtcg tcgaaggggg cctcgactcc cacctgttc ggatcttcag	30000
ccagcgtccg atcctggtcg agcgcgagca aggacatacc cgtctgacct tgtactgcat	30060
ctgcaaccac cccggcctgc atgaaagtct ttgttgtctg ctgtgtactg agtataataa	30120
aagctgagat cagcgactac tgcgatcgt caccacctta tccagtgaat taaagatcat	30180
attgatgatg atttaataaa aaaaataatc atttgatttg aaataaagat acaatcatat	30240
tgatgatattg agtttaacaa aaaataaaga atcacttact tgaaatctga taccaggtct	30300
ctgtccatgt tttctgcca caccatttca ctcccccttt cccagctctg gtactgcagg	30360
ccccggcggg ctgcaaatct cctccacacg ctgaagggga tgtcaaatc ctctgtccc	30420
tcaatcttca ttttatcttc tatcagatgt ccaaaaagcg cgtccgggtg gatgatgact	30480
tcgacccgt ctacccctac gatgcagaca acgcaccgac cgtgcccttc atcaaccccc	30540
ccttcgtctc ttcatagga ttccaagaga agccccctggg ggtgttgtcc ctgcgactgg	30600
ccgacccgt caccaccaag aacggggaaa tcacctcaa gctgggagag ggggtggacc	30660
tcgactctc gggaaaactc atctccaaca cgccaccaaa ggccgcgcc cctctcagtt	30720
tttccaacaa caccatttcc cttacatgg atcatccctt ttactactaa gatggaaaat	30780
tatccttaca agtttctcca ccatttaata tactgagaac aagcattcta aacacactag	30840
ctttaggttt tggatcaggt ttaggactcc gtggctctgc cttagcagta cagttagtct	30900
ctccacttac atttgatact gatggaaaca taaagcttac cttagacaga ggtttgcatg	30960
ttacaacagg agatgcaatt gaaagcaaca taagctgggc taaagggtta aaatttgaag	31020
atggagccat agcaaccaac attggaaatg ggtagagtt tggaagcagt agtacagaaa	31080

caggtgttga tgatgcttac ccaatccaag ttaaacttgg atctggcctt agctttgaca	31140
gtacaggagc cataatggct ggtaacaaag aagacgataa actcactttg tggacaacac	31200
ctgatccatc accaaactgt caaatactcg cagaaaatga tgcaaaacta acactttgct	31260
tgactaaatg tggtagtcaa atactggcca ctgtgtcagt cttagtgtga ggaagtggaa	31320
acctaaccac cattactggc accgtaagca gtgctcaggt gttttctacgt tttgatgcaa	31380
acggtgtttc tttaacagaa cattctacac taaaaaaata ctgggggtat aggcaggag	31440
atagcataga tggcactcca tataccaatg ctgtaggatt catgcccaat ttaaaagctt	31500
atccaaagtc acaaagttct actactaaaa ataatatagt agggcaagta tacatgaacg	31560
gagatgtttc aaaacctatg cttctcacia taaccctcaa tggtagtgat gacagcaaca	31620
gtacatatc aatgtcattt tcatacacct ggactaatgg aagctatgtt ggagcaacat	31680
ttggggctaa ctcttatacc ttctctaca ttgcccaaga atgaacctg tatccaccc	31740
tacattgccc aacccttccc accccactct gtctatggaa aaaactctga aacacaaaat	31800
aaaataaagt tcaagtgttt tattgattca acagttttac aggattcgag cagttatfff	31860
tcctccaccc tcccaagaca tggaatacac caccctctcc ccccgcacag ccttgaacat	31920
ttgaaagcca ttggtgatgg acatgctttt ggtctccacg ttccacacag tttcagagcg	31980
agccagtctc gggtcggta gggagatgaa accctccggg cactcccga tctgcacctc	32040
acagctcaac agctgaggat tgtctcgggt ggtcgggatc acggttatct ggaagaagca	32100
gaagagcggc ggtgggaatc atagtcgca aacgggatcg gccggtggtg tcgcatcagg	32160
ccccgcagca gtctgtgccc ccgcccgtcc gtcaagctgc tgcacagggg gtccgggtcc	32220
agggactccc tcagcatgat gcccacggcc ctacagcatca gtctgtctgt gcggcgggcg	32280
cagcagcgca tgcggatctc gctcaggtcg ctgcagtacg tgcaacacag gaccaccagg	32340
ttgtttaaca gtccatagtt caacacgtc cagccgaaac tcacgcggg aaggatgcta	32400
cccacgtggc cgtcgtacca gatcctcagg taaatcaagt ggcgtccct ccagaacacg	32460
ctgccacgt acatgatctc cttgggcatg tggcgggtca ccacctccg gtaccacatc	32520
acctctggt tgaacatgca gccccgatg atcctgcgga accacagggc cagcaccgcc	32580
ccgcccga tgcagcgaag agaccccggt tcccggcaat ggcaatggag gaccaccgc	32640
tcgtaccct ggatcatctg ggagctgaac aagtctatgt tggcacagca caggcatatg	32700
ctcatgcatc tcttcagcac tctcagctcc tcgggggtca aaaccatc ccagggcacg	32760
gggaactctt gcaggacagc gaaccccga gaacaggga atcctcgac ataacttaca	32820

ttgtgcatgg acagggatc gcaatcaggc agcaccgggt gatcctccac caggggaagcg	32880
cgggtctcgg tctcctcaca gcgtggtaag ggggccggcc gatacgggtg atggcgggac	32940
gcggctgata gtgttctcga ccgtgtcatg atgcagttgc tttcggacat tttcgtactt	33000
gctgtagcag aacctgggtc gggcgctgca caccgatcgc cggcggcggt cccggcgctt	33060
ggaacgctcg gtgttgaagt tgtaaacag ccactctctt agaccgtgca gcaaacttag	33120
ggcctcagga gtgatgaaga tcccatcatg cctgatagct ctgatcacat cgaccaccgt	33180
ggaatgggcc agaccagcc agatgatgca attttgttg gtttcggtga cggcggggga	33240
gggaagaaca ggaagaacca tgattaactt ttaatccaaa cggctctcgga gcacttcaaa	33300
atgaaggctc cggagatggc acctctcgcc cccgctgtgt tggaggaaaa taacagccag	33360
gtcaaagggt atacggttct cgagatgttc cagggtggct tccagcaaag cctccacgcg	33420
catatccaga aacaagaca tagcaaaagc gggagggttc tctaattcct caatcatcat	33480
gttacctcc tgcacctcc ctagataatt ttcatttttc cagccttgaa tgattcgaac	33540
tagttcctga ggtaaatcca agccagccat gataaagagc tcgcgcagag cgccctccac	33600
cggcatctct aagcacacce tcataattcc aagatatctt gctcctggtt cacctgcagc	33660
agattgacaa gcggaatatc aaaatctctg ccgcgatccc taagctctc cctcagcaat	33720
aactgtaagt actctttcat atcgtctccg aaatttttag ccataggacc cccaggaata	33780
agagaagggc aagccacatt acagataaac cgaagtcccc cccagtgagc attgccaaat	33840
glaagattga aataagcatg ctggctagac ccggtgatat cttccagata actggacaga	33900
aaatcgggca agcaattttt aagaaaatca acaaaagaaa aatcttcag gtgcacgttt	33960
agggcctcgg gaacaacgat ggagtacgtg caagggtgac gttccagcat ggtagtttag	34020
ctgatctgta aaaaacaaaa aataaaacat taaacatgc tagcctggcg aacaggtggg	34080
taaatcgttc tctccagcac caggcaggcc acggggtctc cggcgcgacc ctcgtaaaaa	34140
ttgtcgctat gattgaaaac catcacagag agacgttccc ggtggccggc gtgaatgatt	34200
cgacaagatg aataaccccc cggaacattg gcgtccgcga gtgaaaaaaa gcggccgagg	34260
aagcaataag gcactacaat gctcagtctc aagtccagca aagcgatgcc atgcggatga	34320
agcacaaaat tctcagggtc gtacaaaatg taattactcc cctcctgcac aggcagcgaa	34380
gccccgata cctccagata cacatacaaa gcctcagcgt ccatagctta ccgagcagca	34440
gcacacaaca ggcgcaagag tcagagaaaag actgagctct aacctgtcca cccgtctctt	34500
gctcaatata tagcccagat ctacactgac gtaaaggcca aagtctaaaa ataccgcca	34560
aataatcaca cagccccagc acacccccag aaaccggtga cacactcaga aaaatacgcg	34620
cacttctca aacgccccaa ctgccgtcat ttccgggttc ccacgtacg tcatacagaat	34680

tcgactttca aattccgtcg accgttaaaa atgtcacccg ccccgcccct aacggtcgcc 34740
 gctcccacag ccaatcacag ccccgcatcc ccaaattcaa acagtcatt tgcataataa 34800
 cgcgcaccaa aagtttgagg tatattattg atgatg 34836

<210> 7

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 7

tctctatcac tgataggag atctctatca ctgatagga 40

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 8

atgctgcaat cgtgctacaa 20

<210> 9

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GACTGCCGCCTCTGCTC

<400> 9

gactgccgcc tctgctc 17