



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt



(10) DE 600 26 554 T2 2006.09.28

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 218 019 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 600 26 554.4

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US00/25510

(96) Europäisches Aktenzeichen: 00 965 106.8

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2001/019380

(86) PCT-Anmeldetag: 18.09.2000

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 22.03.2001

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 03.07.2002

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 08.03.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 28.09.2006

(51) Int Cl.⁸: A61K 35/76 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 15/47 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

397873 17.09.1999 US

(73) Patentinhaber:

Wellstat Biologics Corp., Gaithersburg, Md., US

(74) Vertreter:

Bosch, Graf von Stosch, Jehle
Patentanwaltsgesellschaft mbH, 80639 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:

BELL, Cameron, John, Ottawa, Ontario K1G 0K8,
CA; SONENBERG, Nahum, Montreal, Quebec H4W
2S9, CA; STOJDL, Francis, David, Ottawa, Ontario
K2P 0H6, CA; BROWN, Garnet, Earl, Nepean,
Ontario K2E 5Y6, CA; ATKINS, Lawrence, Harold,
Orleans, Ontario K1C 8E3, CA; MARIUS,
Marcellus, Ricardo, Ottawa, Ontario K1G 1R2, CA;
LICHTY, Dennis, Brian, Russell, Ontario K4R 1E5,
CA; KNOWLES, Brendan, Shane, Ottawa, Ontario
K1N 5C3, CA

(54) Bezeichnung: ONKOLYTISCHES VESICULAR STOMATITIS VIRUS

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingeleitet, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Medikament zur Krebstherapie. Insbesondere betrifft diese Erfindung Viren, die selektiv Tumorzellen infizieren und Tumorzell-Wachstum inhibieren.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Bekannt ist die Verwendung onkolytischer Bakterien oder von Zusammensetzungen onkolytischer Bakterien zur Bekämpfung von Neoplasmen in Menschen und Tieren. Beispielsweise offenbaren EP 564 121, GB 1,587,244 und U.S. 3,192,116 die Verwendung nicht-pathogener Bakterien, die zu einer Verflüssigung und Lyse von Tumoren in Vertebraten führen. Jedoch werden in vielen Fällen, beispielsweise bei Verwendung von Chlostridium, die Tumore nur teilweise zerstört, und es kann weiterhin ein erneutes Wachstum des Tumors auftreten. Zur Kontrolle des Tumorwachstums wurde die Verabreichung von Bakterien und anschließende Verabreichung chemotherapeutischer Wirkstoffe, beispielsweise 5-Fluorodesoxyuridin oder Alkylierungsmitteln, vorgeschlagen (z. B. GB 1,069,144).

[0003] Außerdem wurde gezeigt, dass etliche Viren, beispielsweise das Parvovirus H-1 (Dupressor et al., 1996. Cancer Res, 49: 3203–3208), das Newcastle Disease Virus (Reichand et al., 1992. J. Surg. Res, 52: 448–453) oder retrovirale Vektoren, welche Wirkstoff-Suszeptibilitäts-Gene enthalten, (Takamiya et al., 1993. J. Neurosurg., 79: 104–110), Tumorzellen zerstörende (tumorizidale) Eigenschaften aufweisen. WO 97/26904 und WO 96/03997 offenbaren ein mutantes Herpes Simplex Virus (HSV-1761), welches Tumorzellwachstum inhibiert. Die Verabreichung von HSV-1761, welches eine Deletion von 759 Basenpaaren in jeder Kopie von γ 34.5 der langen Sequenzwiederholungs-Region (R_L) enthält, an Tumorzellen tötet diese Zellen. Jedoch ist dieses Virus spezifisch für neuronale Zellen, da HSV bekanntermaßen selektiv das neuronale System bewohnt. Zudem ist die Verwendung von gewöhnlichen humanen Pathogenen als onkolytische Viren begrenzt, da es wahrscheinlich ist, dass der größte Teil der Bevölkerung infiziert ist und eine Immunantwort auf derartige Viren erworben hat. Eine vorexistierende Immunantwort auf einen viralen Stamm ähnlich dem, der als therapeutisches Agens bei der Behandlung von Krebs eingesetzt wird, kann die Wirksamkeit des Virus als therapeutisches Agens abschwächen.

[0004] Von anderen Virusstämmen wurde gezeigt, dass sie onkolytische Aktivität aufweisen. Von dem humanen Adenovirus ONYX-015 (hergestellt von ONYX-Pharmaceuticals) wird angenommen, dass es sich bevorzugt in p53-negativen Tumorzellen repliziert. Dieses Virus ist vielversprechend bei klinischen Versuchen mit Kopf- und Halskrebspatienten (Kirn, D., T. et al., Nat. Med., 1998. 4: 1341–1342). Das Reovirus Typ3 wurde von Oncolytic Biotech als Krebs-Therapeutikum entwickelt, welches bevorzugt in PKR $^{+/-}$ -Zellen wächst (Yin, H.S., J. Virol. Methods, 1997. 67: 93–101; Strong, J.E. and P.W. Lee, J. Virol, 1996. 70: 612–616; Strong, J.E., et al. Virology, 1993. 197: 405–411.; Minuk, G.Y., et al., J. Hepatol., 1987. 5: 8–13; Rozee, K.R., et al., Appl. Environ Microbiol., 1978. 35: 297–300). Das Reovirus Typ III weist verstärkte Replikationseigenschaften in Zellen auf, die das mutante Ras-Onkogen exprimieren (Coffey, M.C., et al. Science, 1998. 282: 1332–1334; Strong, J.E., et al. Embo J., 1998. 17: 3351–1362). Mundschaup und Faller (Mundschaup, L.J. and D.V. Faller, J. Biol. Chem., 1992. 267: 23092–23098) zeigten, dass das Ras-Onkogen-Produkt einen Inhibitor der PKR aktiviert, was, zusammen mit der Beobachtung, dass der chemische PKR-Inhibitor 2-Aminopurin das Wachstum von Reo Typ III in normalen Zellen erhöht, nahe legt, dass PKR ein entscheidender Regulator des Wachstums des Reovirus ist.

[0005] WO 99/04026 lehrt die Verwendung von VSV als Vektor in der Gentherapie zur Expression eines weiten Spektrums von Produkten, einschließlich Antikörpern, Immunogenen, Toxinen usw., zur Behandlung verschiedener Erkrankungen.

[0006] WO 99/45783 beschreibt Produktionszellen für Replikations-selektive Viren bei der Behandlung einer Malignität.

[0007] WO 96/34625 beschreibt rekombinante Vesiculo-Viren und ihre Verwendungen.

[0008] Interferone sind zirkulierende Faktoren, welche an Zelloberflächen-Rezeptoren binden und eine Signalkaskade aktivieren, die schließlich zu einer Anzahl biologischer Antworten führt. Zwei der Folgen der Interferon-Signalgebung sind eng miteinander verbunden: (1) eine antivirale Antwort und (2) die Induktion von wachstumsinhibierenden und/oder apoptotischen Signalen.

[0009] U.S. 4,806,347 offenbart die Verwendung von γ -Interferon und eines Fragments von INF- γ (bekannt

als $\Delta 4\alpha 2$) gegen humane Tumorzellen.

[0010] WO 99/18799 beschreibt die cytotoxische Aktivität des Newcastle-Disease-Virus (NDV) und des Sindbis-Virus gegen verschiedene humane Krebszellen. Jedoch zeigten beide Viren eine Selektivität ihrer cytotoxischen Aktivität gegenüber Tumorzellen.

[0011] WO 99/18799 offenbart, dass Interferon-Zugabe zu normalen Zellen diese Zellen resistent gegen NDV macht; diese Wirkung wurde jedoch nicht beobachtet bei Interferon-behandelten Tumorzellen, die weiterhin eine NDV-induzierte Sensitivität aufwiesen. WO 99/18799 offenbarte ebenso die cytotoxische Aktivität von VSV-Zellen gegen KB-Zellen (Kopf- und Halskarzinom) und HT 1080 (Fibrosarkom) und die Milderung der Cytotoxizität in normalen und Tumorzellen durch VSV in Gegenwart von Interferon. Es wurden keine anderen Zelltypen auf cytotoxische Aktivität von VSV getestet.

[0012] Es wurden bestimmte mutante Stämme von VSV beschrieben. Stanners, et al., *Virology* (1987) 160(1): 255–8. Francoer, et al., *Virology* (1987) 160(1): 236–45. Stanners, et al., *J. Gen. Virol.* (1975) 29(3): 281–96. Stanners, et al., *Cell* (1977) 11(2): 273–81.

[0013] Die vorliegende Erfindung betrifft virale Formulierungen, die zur Behandlung von Krankheiten und Krebserkrankungen, bevorzugt Leukämie, geeignet sind. Derartige Formulierungen können ebenso einen onkolytischen VSV-Stamm und ein chemisches Agens, beispielsweise ein Cytokin, welches normalen Zellen Resistenz gegen virale Infektion verleiht, wobei erkrankte Zellen oder Krebszellen jedoch empfänglich für virale Infektion und Lyse bleiben, enthalten.

[0014] Es ist eine Aufgabe der Erfindung, die Nachteile des Standes der Technik zu überwinden.

[0015] Die obige Aufgabe wird gelöst durch die Kombination von Merkmalen der Hauptansprüche; die untergeordneten Ansprüche offenbaren weitere vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0016] Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Krebs-Therapeutikum. Insbesondere betrifft diese Erfindung Viren, die selektiv Tumorzellen infizieren und Tumorzellwachstum inhibieren.

[0017] Erfindungsgemäß wird die Verwendung eines Virus zur Herstellung eines Medikaments zur Reduktion der Lebensfähigkeit einer Tumorzelle zur Verfügung gestellt, wobei das Virus ein attenuierter (abgeschwächter) Stamm des vesikulären Stomatitis-Virus ist und wobei die Tumorzelle eine hämatopoietische Krebszelle, ein Melanom, ein Sarkom, ein neuroendokriner Tumor, ein Lungenkarzinom oder ein Colon-Karzinom ist.

[0018] Diese Erfindung ist ebenso gerichtet auf die Reduzierung der Lebensfähigkeit einer Tumorzelle durch Verabreichung von VSV an die Tumorzelle, wobei das VSV unfähig ist, PKR-Aktivität innerhalb einer Wirtszelle zu inaktivieren.

[0019] Die vorliegende Erfindung betrifft ebenso die Reduzierung der Lebensfähigkeit einer Tumorzelle innerhalb einer Population von Zellen durch Verabreichung von VSV an die Zellpopulation, wobei das VSV selektiv die Tumorzelle infizieren und töten kann. Bevorzugt ist das VSV unfähig, PKR-Aktivität in einer Wirtszelle zu inaktivieren.

[0020] Diese Erfindung betrifft ebenso die Reduzierung der Lebensfähigkeit einer Tumorzelle innerhalb einer Population, wobei die Zellpopulation vor der Verabreichung des VSV mit Interferon behandelt wird.

[0021] Die vorliegende Erfindung ist auf ein mutantes VSV gerichtet, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es kaum in auf Interferon ansprechenden Zellen wächst. Derartige Stämme werden hierin ebenso als attenuierte Stämme von VSV bezeichnet oder VSV-Stämme, die kaum in auf Interferon ansprechenden Zellen wachsen. Sie können dadurch identifiziert werden, dass sie in einschichtig wachsenden, auf Interferon ansprechenden Zellen kleinere Plaques bilden als in nicht auf Interferon ansprechenden Zellen, wie später beschrieben wird. Abgeschwächte VSV-Stämme können ebenso dadurch identifiziert werden, dass sie in dem unten beschriebenen Assay bei intranasaler Verabreichung an $PKR^{+/-}$ -Mäuse einen höheren LD50-Wert im Vergleich zu dem WT-Indiana aufweisen.

[0022] Die vorliegende Erfindung ist ebenso auf isolierte Nukleinsäure-Moleküle (DNA oder RNA) gerichtet,

die eine Sequenz aufweisen, die mutante VSV-Proteine codiert und Sequenzen, die dazu komplementär sind. Derartige Nukleinsäure-Moleküle können bei der Herstellung eines rekombinanten VSV oder als DNA-Vakzin verwendet werden.

[0023] Die Verwendung eines hierin beschriebenen Virus als therapeutisches Virus hat gegenüber anderen Viren mehrere Vorteile:

- Rhabdoviren sind keine gewöhnlichen humanen Pathogene. Beispielsweise wird VSV hauptsächlich in Insekten, Nagern und bei Zuchttieren gefunden; somit ist ein großer Anteil der Bevölkerung nicht mit VSV infiziert oder gegen eine VSV-Infektion immunisiert. Auf der anderen Seite sind Adenoviren oder Reoviren humane Pathogene, und der größte Anteil der Gesamtbevölkerung ist mit beiden dieser Viren infiziert und hat eine Immunantwort auf diese Viren erworben. Eine vorexistierende Immunantwort auf einen viralen Stamm, ähnlich dem, der als therapeutisches Agens bei der Behandlung von Krebs verwendet wird, könnte die Wirksamkeit des Virus als therapeutisches Agens abschwächen.
- VSV repliziert sich sehr viel schneller als ein Adenovirus oder Reovirus und kann schnell zu hohen Titern konzentriert werden. Die Herstellung von Virus-Präparationen mit hohem Titer stellt eine beträchtliche Einschränkung anderer potentieller viraler therapeutischer Stämme dar.
- VSV ist ein einfaches Virus, welches lediglich fünf Gene umfasst, die leicht genetischer Manipulation zugänglich sind. Derzeit ist kein derartiges System für ein Reovirus erhältlich.
- Die zelluläre Infektion durch VSV ist hoch empfänglich für zusätzliche chemische Agenzien, wie beispielsweise Interferon, ein Merkmal, dass seinen therapeutischen Wert erhöht.
- VSV besitzt einen breiten Wirksbereich und kann die meisten Typen humaner Zellen infizieren, während andere Viren hinsichtlich der Zelltypen, die sie infizieren können, stärker eingeschränkt sind.
- VSV ist ein RNA-Virus und verbringt seinen gesamten Lebenszyklus im Cytoplasma. Aus diesem Grund besteht weniger Gefahr einer unerwünschten Integration in das Genom eines Patienten.

[0024] Zusammengefasst liefern diese Eigenschaften von VSV beträchtliche Vorteile gegenüber der Verwendung anderer Viren, von denen bekannt ist, dass sie onkolytische Aktivität aufweisen.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0025] Diese und andere Merkmale der Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung, in der auf die angefügten Zeichnungen Bezug genommen wird, ersichtlich, wobei

[0026] [Fig. 1](#) ein allgemeines Schema der Interferon-Kaskade zeigt.

[0027] [Fig. 2](#) die Wirkung von VSV auf normale humane Fibroblasten, die humane Melanom-Zelllinie SK-MEL3, die Prostatakrebs-Zelllinie LNCaP und die Ovarienkrebszellen A2780 in Gegenwart und Abwesenheit von Interferon, bestimmt durch einen modifizierten CPE-Assay, zeigt. Monolayer der Zellen wurden mit einer Menge (moi) von 0,1 pfu in einer 12-Loch-Platte infiziert. Zum Zeitpunkt 0 und nachfolgend alle 12 Stunden bis zu 48 Stunden wurde ein Loch infizierter Zellen mit 0,5 ml Leukostat-Fixiermittel 2 Minuten lang fixiert. Am Ende des Experiments wurden die Monolayer mit Leukostat-Farbstoffen angefärbt.

[0028] [Fig. 3](#) die cytopathische Wirkung von VSV in normalen Fibroblasten-Zellen ([Fig. 3\(a\)](#)) und Tumorzelllinien, einschließlich Ovarien-Tumorzellen ([Fig. 3\(b\)](#)) und KB-Tumorzellen ([Fig. 3\(c\)](#)), zeigt.

[0029] [Fig. 4](#) die Wirkung von VSV auf normale humane Fibroblasten zeigt, die über einen Zeitraum von 24 Stunden mit 293T-Tumorzellen co-kultiviert wurden. Die Co-Kulturen wurden mit einer Menge (moi) von 0,1 pfu/Zelle infiziert und zur weiteren Infektion in Gegenwart (IFN +) oder Abwesenheit (IFN -) von Interferon inkubiert. Die Kulturen wurden mit Antikörpern gegen das große T-Antigen (rote Nuklei) zum Nachweis der 293T-Zellen gefärbt; außerdem wurden sie mit DAPI (blaue Nuklei) gefärbt, welches alle Zelltypen anfärbt.

[0030] [Fig. 5](#) die Wirkung von VSV *in vivo* auf Tumoren zeigt, die in Nacktmäuse implantiert wurden. Humane Melanomzellen wurden in Nacktmäuse implantiert und entweder scheininjiziert (VSV(-)), mit Wildtyp-VSV injiziert (Daten nicht dargestellt), oder es wurden zusätzliche Melanomzellen, die eine Stunde vor der Injektion in die Tumorstelle *in vitro* mit VSV infiziert wurden, injiziert (VSV(+)). Die Größe der Tumoren wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen bestimmt.

[0031] [Fig. 6](#) Geschwüre zeigt, die auf einem Tumor gebildet wurden, der in einer Nacktmaus, wie in [Fig. 5](#) beschrieben, produziert wurde.

[0032] [Fig. 7](#): VSV und VSV-infizierte Zellen inhibieren das Wachstum humaner Melanom-Xenoimplantate in Nacktmäusen.

[0033] [Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#): PKR^{-/-}-Mäuse reagieren akut sensitiv auf intranasale VSV-Infektion und zeigen eine Defizienz in der IFN-vermittelten Resistenz.

[0034] [Fig. 9](#): Interferon kann Xenoimplantat-tragende Nacktmäuse während VSV-Behandlung schützen.

[0035] [Fig. 10A](#) und [Fig. 10B](#): Virusproduktion von Tumorzellen und normalen Zellen, die mit dem Wildtyp Indiana und verschiedenen mutanten VSV-Stämmen infiziert sind.

[0036] [Fig. 11](#): Maligne Zellen werden nach VSV (WT Indiana)-Infektion schnell getötet und sind nicht durch IFN- α geschützt.

[0037] [Fig. 12](#): VSV-induzierte cytopathische Wirkung ist in humanen Melanomzellen, jedoch nicht in primären humanen Zellen, mit oder ohne IFN- α sichtbar.

[0038] [Fig. 13](#): Wirksamkeit einer einzigen intravenösen Dosis eines mutanten VSV bei der Behandlung von humanen Melanom-Xenoimplantaten in Nacktmäusen.

[0039] [Fig. 14](#): N-Protein-cDNA-Sequenz von Wildtyp und mutanten VSVs.

[0040] [Fig. 15](#): N-Protein-Aminosäuresequenz von Wildtyp und mutanten VSVs.

[0041] [Fig. 16](#): P-Protein-cDNA-Sequenz von Wildtyp und mutanten VSVs.

[0042] [Fig. 17](#): P-Protein-Aminosäuresequenz von Wildtyp und mutanten VSVs.

[0043] [Fig. 18](#): M-Protein-cDNA-Sequenz von Wildtyp und mutanten VSVs.

[0044] [Fig. 19](#): M-Protein-Aminosäuresequenz von Wildtyp und mutanten VSVs.

[0045] [Fig. 20](#): G-Protein-cDNA-Sequenz von Wildtyp und mutanten VSVs.

[0046] [Fig. 21](#): G-Protein-Aminosäuresequenz von Wildtyp und mutanten VSVs.

[0047] [Fig. 22](#): L-Protein-cDNA-Sequenz von Wildtyp und mutanten VSVs.

[0048] [Fig. 23](#): L-Protein-Aminosäuresequenz von Wildtyp und mutanten VSVs.

BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0049] Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Medikament zur Krebstherapie. Insbesondere betrifft diese Erfindung Viren, die selektiv eine Tumorzelle infizieren und ihr Zellwachstum inhibieren.

[0050] Bei der folgenden Beschreibung einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich lediglich um ein Beispiel, ohne dass dadurch die Kombinationen von Merkmalen, die notwendig sind, um mit Hilfe der Erfindung eine Wirkung zu erzielen, eingeschränkt werden.

[0051] Krebszellen haben einen Überlebensvorteil gegenüber den normalen Zellen, indem sie Mutationen hinsichtlich der wachstums-inhibierenden oder apoptotischen Signalwegen erwerben; im Fall von Interferonen tun sie dies auf Kosten der entscheidenden antiviralen Abwehrmechanismen. Da Tumorzellen einen entscheidenden Wachstumsvorteil durch Mutation der auf Interferon ansprechenden Gene erlangen, sind sie empfänglicher für Virusinfektionen.

[0052] Unter „Reduzierung der Lebensfähigkeit“ einer Tumorzelle wird verstanden, dass die Tumorzelle entweder abgetötet oder ihr Wachstum für einen Zeitraum begrenzt wird.

[0053] Unter „kein gewöhnliches humanes Pathogen“ wird ein Virus verstanden, das hauptsächlich in nicht-menschlichen Wirten, beispielsweise (ohne hierauf beschränkt zu sein) in Insekten, Nagetieren und

Zuchttieren, gefunden wird. Derartige Viren treten typischerweise nicht innerhalb der allgemeinen humanen Bevölkerung auf.

[0054] Die Bezeichnungen Mutante I, Mutante 1, Mut 1 und M1 beziehen sich auf den abgeschwächten mutanten Stamm T1026. Die Mutanten II, III, IV und V (und Nomenklatur-Varianten analog zu Mutante I) beziehen sich auf die abgeschwächten Mutanten T1026R, TP3, TP6 bzw. G31.

[0055] Das neue Krebstherapeutikum der vorliegenden Erfindung beinhaltet die Verwendung wenigstens eines onkolytischen Virus, das selektiv Tumorzellen befällt und zu ihrer Zerstörung führt. Bevorzugt ist das onkolytische Virus ein vesikuläres Stomatitis-Virus (VSV), wobei es sich beispielsweise um den Indiana-Stamm, andere Stämme oder ein Derivat davon handelt. Unter einem Derivat von VSV wird ein VSV-Virus verstanden, das entweder durch Selektion des Virus unter verschiedenen Wachstumsbedingungen erhalten wird, oder ein Virus, das verschiedenen Selektionsdrücken ausgesetzt wurde, oder ein Virus, welches unter Verwendung von auf dem Gebiet bekannten Rekombinationstechniken genetisch modifiziert wurde. Beispielsweise kann ein VSV-Derivat ein mutantes VSV umfassen, das nach Infektion einer humanen Zelle, die mit Interferon – wie hierin beschrieben – behandelt wurde, selektiert wurde, oder ein VSV, welches einen Affinitätstag, welcher zur Affinitäts-Reinigung verwendet werden kann, aufweist; sie sind jedoch nicht darauf beschränkt.

[0056] Die Wirksamkeit der Suppression des Tumorzellwachstums durch das onkolytische Virus beruht zum Teil auf der veränderten Empfänglichkeit von Tumorzellen, im Vergleich zu normalen Zellen, für eine virale Infektion. Ohne an diese Theorie gebunden zu sein, könnte die unterschiedliche Empfänglichkeit teilweise auf die Herunterregulierung oder Inaktivierung von Faktoren innerhalb einer Zelle, die anderenfalls die Zelle vor Tumorzellwachstum und Virusinfektion schützen, zurückzuführen sein. Zu Beispielen für Faktoren, bei denen eine Inaktivierung zu Tumorzellwachstum führt, und die ebenso in die Vermittlung einer Virusinfektion verwickelt sind, zählen unter anderem PKR (doppelsträngige RNA-abhängige Kinase) und PML (promyelozytisches Leukämie-Gen); jedoch können ebenso andere Faktoren eine Rolle spielen.

[0057] Es ist bekannt, dass die Herunterregulierung oder Inaktivierung von PKR durch verschiedene Mechanismen, beispielsweise durch PKR-verwandte Mediatoren, in Zusammenhang mit Tumorzellwachstum steht, wobei normale Zellen aktive PKR aufweisen. Außerdem weisen Wildtyp-Zellen, die einer viralen Infektion ausgesetzt werden, erhöhte PKR-Expression auf, was zu einer Suppression der viralen Replikation führt, während Zellen, die reduzierte oder gar keine PKR-Aktivität aufweisen, für einen viralen Angriff empfänglich sind und Krebswachstum aufweisen. Auf ähnliche Weise fungiert das PML-Genprodukt als Tumorsuppressor und unterdrückt ebenso bekanntermaßen virale Replikation.

[0058] Unter „unterschiedliche Empfänglichkeit (Suszeptibilität)“ wird eine Eigenschaft in Verbindung mit einer Zelle verstanden, die sowohl zu Tumorzellwachstum als auch zu der Unfähigkeit der Zelle, virale Replikation zu unterdrücken, führt. Zellen, die unterschiedliche Empfänglichkeit aufweisen, sind bevorzugte Kandidaten für die Behandlung von Tumorzellwachstum unter Verwendung des erfindungsgemäßen Krebstherapeutikums. Diese unterschiedliche Empfänglichkeit kann durch die Zugabe einer oder mehrerer chemischer Agenten vor oder während der Behandlung der Tumorzelle hervorgerufen oder verstärkt werden. Bevorzugt erhöht dieses chemische Agens die Resistenz einer Wildtypzelle gegen virale Infektion, hat jedoch geringe oder keine Auswirkung auf die Antwort einer Tumorzelle auf virale Infektion. Ein Beispiel für ein derartiges chemisches Agens ist Interferon, ohne dass dies in irgendeiner Form beschränkt wäre.

[0059] Unter „PKR“ wird eine Serin/Threonin-Kinase verstanden, die vielfältige Funktionen, einschließlich Rollen bei der Kontrolle der mRNA-Translation und Gentranskription, aufweist (1, 2). Die Kinase enthält zwei doppelsträngige RNA-(dsRNA)-Bindungsmotive in ihrer aminoterminalen regulatorischen Hälfte und eine katalytische Kinase-Domäne in ihrem Carboxylabschnitt. Die Bindung von dsRNA an den Amino-Terminus induziert eine Konformationsänderung in dem Enzym, welche die katalytische Kinasedomäne freilegt und aktiviert. Die Expression von PKR wird durch verschiedene PKR-Mediatoren, wie beispielsweise Interferon, induziert.

[0060] Unter „PKR-Mediator“ werden Proteine oder Verbindungen verstanden, die direkt oder indirekt PKR-Aktivität beeinflussen, entweder auf Gen- oder Proteinniveau; dazu zählen sowohl PKR-Aktivatoren als auch PKR-Inhibitoren. Zu Beispielen für PKR-Aktivatoren zählen unter anderem STAT1 (siehe [Fig. 1](#)), der Interferonregulierende Faktor (IRF-1) und Interferon. Zu Beispielen für PKR-Inhibitoren zählen unter anderem VA RNAs, p58(IPK), Faktoren, die mit dem Ras-Signalweg in Verbindung stehen, das ribosomale Protein L18 oder Proteasen, die das PKR-Protein abbauen. Die PKR-Aktivität kann ebenso durch Mutationen des PKR-codierenden Gens oder des regulatorischen Bereichs, der die Expression von PKR antreibt, vermittelt werden. Diese Mutationen können entweder PKR-Aktivität erhöhen oder herabsetzen. Zu PKR-Mutationen, die die

PKR-Aktivität herabsetzen, gehören beispielsweise der Verlust der dsRNA-Bindungsfähigkeit von PKR oder Mutationen, die zu negativen katalytischen Mutanten führen. Zu Mutationen, die die PKR-Aktivität erhöhen, zählen beispielsweise Überexpression von PKR oder Mutationen, die zu einem aktiveren PKR-Protein führen.

[0061] PKR reguliert die Translation durch die Phosphorylierung von eIF-2 α , einem Faktor, der in die Initiation der Proteintranslation verwickelt ist. Nach Phosphorylierung bildet eIF-2 α -GDP einen inaktiven Komplex mit eIF-2B, was zu einer schnellen Inhibierung der Proteinsynthese führt. PKR nimmt indirekt Einfluss auf die Gentranskription durch die Aktivierung von NF κ B. Diese Aktivierung scheint durch die PKR-Phosphorylierung einer 1 κ B-Kinase (3) zu erfolgen, welche wiederum 1 κ B phosphoryliert, was zu dessen gezielter Zerstörung führt.

ANTIVIRALE AKTIVITÄT VON PKR

[0062] Die Infektion einer Zelle durch viele verschiedene Virustypen führt zur Bildung von dsRNA (z. B. als Replikations-Zwischenprodukte), was zur Aktivierung von PKR und ihrer nachfolgenden „Downstream“-Effektoren führt (siehe [Fig. 1](#)). Insbesondere wird schnell die Proteinsynthese beendet und eine apoptotische Kaskade initiiert (4, 5). Als Ergebnis der Aktivierung der PKR wird die Produktion neuer Virionen herabgesetzt und die Ausbreitung des Virus in dem Organismus begrenzt. Der et al. (12) beschreiben, dass PKR bei der Induktion der zellulären Apoptose als Antwort auf verschiedene Stress-Induktoren notwendig ist.

[0063] Ohne an eine Theorie gebunden zu sein, wäre es möglich, dass Malignitäten als Ergebnis multipler Mutationen in Genen, die Zellproliferation und Apoptose kontrollieren, entstehen. Die Rolle der PKR bei der Regulierung der Proteinsynthese zusammen mit ihren anti-proliferativen und pro-apoptotischen Eigenschaften macht sie zum Ziel für onkogene Mutationen, die direkt oder indirekt ihre Aktivität beeinflussen.

[0064] Wie detaillierter in Beispielen beschrieben wird, zeigte ein anfänglicher Screen verschiedener Viren unter Verwendung von PKR $^{-/-}$ -Tieren, dass PKR-Null-Tiere für eine Infektion durch das vesikuläre Stomatitis-Virus (VSV) empfänglich sind. Ähnliche Ergebnisse wurden in vitro erhalten, wo VSV-Infektion schneller in PKR $^{-/-}$ -Fibroblasten fortschritt, im Vergleich zu einer Infektion in PKR $^{+/+}$ -Fibroblasten. Diese Ergebnisse zeigen, dass PKR in Säugetierzellen erforderlich ist, um Infektionen durch VSV zu widerstehen. Des Weiteren waren bestimmte Zelllinien, beispielsweise primäre humane Knochenmarkszellen, resistent gegen VSV-Infektion, während Leukämie-Zelllinien empfänglich für eine VSV Infektion waren.

[0065] Es wird erwartet, dass mit VSV verwandte Viren oder andere Viren, die ähnliche Mechanismen der viralen Infektion aufweisen, identifiziert werden können, die selektiv Zellen mit reduzierter oder gar keiner PKR-Aktivität infizieren können. Ein Fachmann auf diesem Gebiet ist leicht dazu in der Lage, unter Anwendung der hierin beschriebenen Verfahren andere Viren auf ihre Fähigkeit, die Lebensfähigkeit von Zellen zu reduzieren oder Zellen ohne PKR-Aktivität abzutöten, oder PKR $^{-/-}$ -Zellen, oder PKR $^{-/-}$ -Tiere oder sowohl PKR $^{-/-}$ -Zellen als auch -Tiere, zu screenen.

[0066] Wie in den späteren Beispielen beschrieben, reduziert eine Vorbehandlung der Zellen mit Interferon die Virus-Infektiosität um mehrere Größenordnungen. Ohne an eine Theorie gebunden zu sein, könnte die Zufügung von Interferon die PKR-Expression hochregulieren, was zu dieser erhöhten Resistenz gegen virale Infektion führt.

[0067] Aufgrund ihrer potenter antiviraler Aktivität entwickelten Viren Strategien, um PKR zu umgehen. Beispielsweise codieren HIV und Hepatitis C Proteine, die auf die Bindung und Inaktivierung von PKR gerichtet sind (6, 7). Adenovirus codiert kleine RNA-Moleküle (VA RNAs), die an PKR binden, diese jedoch nicht aktivieren (8). Das Influenza-Virus bemächtigt sich eines zellulären Proteins p58(IPK), um PKR zu inhibieren, während das Poliovirus den proteolytischen Abbau von PKR initiiert (9, 10). Das große T-Antigen von SV-40 scheint stromabwärts von eIF-2 α zu wirken, wodurch Proteintranslation auch in Gegenwart von aktiver PKR gefördert wird (10).

PKR UND TUMORSUPPRESSION

[0068] Die Expression dominanter negativer katalytischer PKR-Mutanten in NIH-3T3-Zellen führt zur ihrer malignen Transformation und vereinfacht ihr Wachstum als Tumoren in Nacktmaus-Modellen (13, 14). Ein ähnliches Phänomen wurde bei Verwendung von PKR-Mutanten, die ihre dsRNA-Bindungsaktivität verloren hatten, beobachtet. Die induzierte Expression von PKR in *S. cerevisiae* führt zu Wachstumsstillstand in der Hefe – ein Phänomen, das durch Co-Expression einer nicht-phosphorylierbaren Version von eIF-2 α umgekehrt werden kann. Somit besitzt PKR anti-proliferative Aktivität und fungiert als Tumorsuppressor.

[0069] Es gibt mehrere Hinweise dafür, dass PKR in einem breiten Spektrum humaner Malignitäten inaktiviert, abwesend oder reduziert exprimiert ist:

- Onkogene Ras-Mutationen treten in etwa 30 Prozent aller humanen Tumoren auf, wobei Mutationen in Upstream-Ras-Aktivatoren (d. h., EGF-Rezeptor, Neu-Rezeptor, PDGF-Rezeptor) sogar noch häufiger sind. Munschau und Faller (15, 16) beschrieben einen onkogenen, Ras-induzierten PKR-Inhibitor. Außerdem zeigten Strong et al. (17), dass die Aktivierung des Ras-Signalwegs zur Herunterregulierung der PKR-Aktivität führt.
- Das ribosomale Protein L18 wird in primären kolorektalen Krebsgeweben überexprimiert; kürzlich wurde gezeigt, dass es an PKR bindet und diese inaktiviert (18).
- Patienten mit 5q-Translokationen weisen verminderte PKR-Expression auf (19–21). Der Interferon-regulierende Faktor 1 (IRF-1) ist ein Transkriptionsfaktor mit Tumorsuppressor-Aktivität, der in dem humanen chromosomal Bereich 5q liegt. Die PKR-Gentranskription wird teilweise durch IRF-1 reguliert.
- Die humane PKR liegt in 2p21–22; kürzlich wurde sie als Stelle der Translokation im Fall akuter myelogener Leukämie identifiziert.
- Bei Biopsien aus wenig differenzierten, hochmalignen Tumoren lag das PKR-Protein auf sehr geringem Niveau vor oder war nicht nachzuweisen (23–25).

STAT1

[0070] STAT1 ist ein essentieller Mediator des Interferon-Signalwegs, und seine Aktivierung führt zu einer Hochregulierung von PKR-mRNA und -Protein (siehe [Fig. 1](#)).

[0071] Es besteht ein deutliches Defizit im Niveau/der Aktivität von STAT1-Proteinen in Interferon-resistenten Melanom-Zelllinien und primärem Melanom-Biopsiematerial (26), in einer Anzahl humaner Tumorzelllinien, einschließlich myeloischer Leukämie, cervikalem Karzinom, Eierstockkrebs und Lungenkarzinom (27), und bei einem gastrischen Adenokarzinom (28, 29). Zudem ist das cutane T-Zell-Lymphom (CTCL) eine Malignität, die im allgemeinen auf Interferon anspricht (jedoch tritt häufig eine klinische Resistenz bei einem großen Teil der Fälle auf). Sun et al. (30) beschrieben, dass das STAT1-Protein in einer CTCL-Zelllinie nicht vorliegt, was darauf hinweist, dass die Entwicklung klinischer Resistenz gegen Interferon auf STAT1-Mutationen zurückzuführen sein könnte.

PML: PROMYELOZYTISCHES LEUKÄMIE-GEN

[0072] PML ist ein Interferon-induziertes Gen, das normalerweise als Tumorsuppressor und Schlüsselregulator von Fas-, TNF α - und Interferon-induzierter Apoptose fungiert. Kürzlich zeigten Chelbi-Alix et al., dass eine weitere normale Funktion des PML-Genprodukts die Suppression der Virus-Replikation ist. Das PML-RAR-Fusionsprotein fungiert als dominant-negativer Inhibitor von Interferon-induzierter Apoptose, und es ist zu erwarten, dass es ebenso APL-Zellen bevorzugt für eine Virusinfektion empfänglich macht.

[0073] Die Herunterregulierung des PKR-Proteins oder dessen Aktivität tritt in einem breiten Spektrum humaner Malignität auf. Während Krebszellen einen Wachstumsvorteil und ungezügelte Proteintranslations-Kapazität durch Eliminieren von PKR oder PKR-Mediatoren erreicht haben, haben diese Zellen gleichzeitig einen der wichtigsten und wirksamen antiviralen Abwehrmechanismen der Zelle eliminiert. Aus diesem Grund sind Tumorzellen mit reduzierter PKR-Aktivität leichter für eine Infektion empfänglich als die entsprechenden normalen Zellen. Wie oben ausgeführt, sind häufig andere Komponenten (z. B. STAT1 und PML) des Interferon-Signalwegs bei humanen Malignität mutiert, und der Verlust ihrer Aktivität macht Tumorzellen für eine Virusinfektion sensitiv. Diese unterschiedliche Empfänglichkeit bildet die Grundlage für die Verwendung von erfindungsgemäßen Krebstherapeutika auf Virusbasis zur Behandlung von Tumorzell-Wachstum.

[0074] Ein Screening der PKR-Null-Mausstämme mit verschiedenen Viren zeigte, dass PKR-Null-Tiere eine Anzahl von Virusinfektionen, einschließlich Vakzinia, Influenza und EMCV, unterdrücken können. Jedoch besitzt das vesikuläre Stomatitis-Virus (VSV) die Fähigkeit, PKR $^{−/−}$ -Tiere zu infizieren. Es wurde beobachtet, dass VSV, ein Mitglied der Rhabdovirus-Familie, 100% der PKR-Null-Tiere nach intranasaler Infektion durch lediglich 50 infektiöse Viruspartikel (oder Plaque-bildende Einheiten, pfu) tötete. Im Gegensatz dazu waren über 20.000-mal so viele VSV-Partikel notwendig, um die Hälfte der infizierten Wildtyp-Tiere zu töten.

[0075] VSV ist ein umhülltes Antisense-RNA-Virus mit einem einfachen, fünf Gene umfassenden Genom. Es handelt sich um eine sehr gut charakterisierte Virusfamilie mit mehreren serologisch verschiedenen Laborstämmen und einer Vielzahl charakterisierter Mutanten. Zu den natürlichen Wirten von VSV zählen Insekten, Nager und Zuchttiere. Im allgemeinen kommen sehr wenig Nordamerikaner in Kontakt mit dem Virus – die

meisten humanen Infektionen treten bei Laborpersonal und Landwirten auf. Beim Menschen sind die Infektionen entweder asymptomatisch oder manifestieren sich als leichte „Grippe“. Es sind keine Fälle von schwerer Erkrankung oder Tod unter den infizierten Menschen beschrieben.

[0076] Ebenso wurde die Fähigkeit von VSV, selektiv Tumorzellen gegenüber Wildtypzellen zu infizieren, beobachtet. Tumorzelllinien, die über Nacht infiziert wurden, wiesen eine 100- bis 1000-mal höhere Infektionsrate als normale primäre Fibroblasten auf. Zudem war der cytopathische Effekt (CPE) in den Tumorzellkulturen beschleunigt.

[0077] Da PKR ein Interferon-induzierbares Genprodukt ist, wurde die Vorbehandlung der Zellen mit Interferon vor der Exposition gegenüber VSV getestet, um die Wirkung der viralen Infektion zu bestimmen. Wildtyp-Zellkulturen, die mit Interferon vorbehandelt wurden, waren gegen VSV-Infektion resistent, während Tumorzelllinien, wie beispielsweise Fibrosarkom, Melanom, Prostata-Karzinom, Leukämie und Ovarien-Sarkom, für eine Virusinfektion empfänglich waren (siehe Tabelle 1, Beispiel 2; [Fig. 2](#)). Lungenkarzinom-Zellen (LC80) waren in Gegenwart und Abwesenheit von Interferon ebenso für eine VSV-Infektion empfänglich (Daten nicht dargestellt).

[0078] Jedoch waren mehrere Tumorzelllinien gegen eine VSV-Infektion in Gegenwart von Interferon resistent.

[0079] Ovarien-Karzinom-Zellen, Fibrosarkom-, Lungenkarzinom-, Melanom-, Prostatakarzinom-, Lungenkarzinom- und Leukämiezellen sind VSV-sensitiv, und diese Sensitivität wurde in Gegenwart von Interferon aufrechterhalten; aus diesem Grund könnten derartige daraus erhaltene Tumorzellen und Krebserkrankungen besonders empfänglich für eine VSV-Behandlung sein. Jedoch können, wie hierin beschrieben, auch andere Krebsarten für eine virale Behandlung empfänglich sein. Studien bezüglich der VSV-Sensitivität unter Verwendung primären Tumormaterials sind leicht in Ascites-Fluid durchführbar. Da der Tumor in der peritonealen Kavität enthalten ist, kann er sich außerdem als besonders geeignet für örtliche Verabreichung eines Therapeutikums auf Virusbasis erweisen. In dieser Hinsicht kann lebendes Gewebe aus dem ascitischen Fluid eines Patienten auf die Fähigkeit der Tumorzellen, VSV-Infektion in Gegenwart oder Abwesenheit von Interferon zu unterstützen, getestet werden.

[0080] Es wird erwartet, dass VSV therapeutische Aktivität in vivo aufweist und die Fähigkeit besitzt, entferntes (metastatisches) Tumorwachstum zu zerstören. Bisher wurde kein signifikanter pathologischer Befund eines Organs in behandelten Mäusen beobachtet; es bedarf jedoch einer weiteren Untersuchung der Kinetik der VSV-Virämie. Nacktmäuse, denen humane Melanomzellen implantiert worden waren, erhielten VSV oder zusätzliche in vitro mit VSV infizierte Melanomzellen über eine Injektion (siehe Beispiel 5), um die kontinuierliche Produktion infektiöser Partikel am Tumor über einen Zeitraum von mehreren Stunden zu gewährleisten ([Fig. 5](#)). In schein-infizierten Tieren (VSV-); es wird nur das Vehikel injiziert) wuchsen die Tumorzellen kontinuierlich während der Dauer des Experiments. Tiere, die lediglich reines Virus erhalten hatten, zeigten anfänglich kontinuierliches Wachstum der Tumoren über die ersten 4 Tage; nach diesem Zeitraum wurden die Tumoren in ihrer Größe reduziert; dies hielt über den gesamten Verlauf des Experiments an. Bei Tumoren, in die infizierte Zellen injiziert wurden, wurde das Zellwachstum gestoppt, und sie bildeten sich zu kleinen harten Knötchen, welche Narbengewebe ähnelten, zurück. In einigen der größeren Tumoren, in die injiziert wurde, bildeten sich auf dem Tumor innerhalb von ein bis zwei Tagen Geschwüre (siehe [Fig. 6](#)). Sowohl die Injektion von gereinigtem Virus als auch von infizierten Melanomzellen bewirkte signifikante Regressionen; infizierte Produktionszellen waren jedoch effektiver.

[0081] Anhand von Studien mit einem immunokompetenten Maustumor-Modell (wie von Strong et al. beschrieben; 17) werden die Effekte einer Antikörper-Antwort auf therapeutische VSV-Infektion untersucht und bestimmt, ob VSV-Infektion der Tumorzellen ihre Immunogenität erhöht und die Erkennung der Tumorantigene durch den Wirtsorganismus fördert.

[0082] Es stellte sich heraus, dass auch primäres humanes Knochenmark resistent gegen VSV-Infektion in Abwesenheit von Interferon-Vorbehandlung ist (siehe Tabelle 1, Beispiel 2), was darauf hinweist, dass diese Zellen eine angeborene Resistenz gegen VSV-Infektion besitzen. Im Gegensatz dazu wurden ebenso zwei Leukämie-Zelllinien (M07E und L1210) getestet, wobei sich herausstellte, dass sie empfänglich für VSV-Infektion sind, was durch die cytopathische Wirkung, das Viruswachstum und den Verlust der Zelllebensfähigkeit sichtbar wird.

[0083] Obwohl sich die hierin offenbarten Ergebnisse auf VSV beziehen, ist es für einen Fachmann auf dem

Gebiet durch Anwendung der in diesem vorliegenden Dokument beschriebenen Verfahren ohne weiteres möglich, andere VSV-Stämme, Derivate von VSV, einschließlich Mutanten von VSV, oder verwandte Viren, auf ihre Fähigkeit, selektiv Tumorzellen abzutöten, zu screenen. Es gibt mehrere andere serologisch und biologisch von VSV verschiedene Stämme, die auf diese Eigenschaft getestet werden können. Zu diesen VSV-Stämmen zählen beispielsweise New Jersey, Piry, Coccal und Chandipura. Die Identifizierung anderer geeigneter serologisch nicht verwandter Stämme könnte nützlich sein, wenn aufeinander folgende VSV-Injektionen notwendig sind, um die Tumore vollständig zu vernichten. Des weiteren können Kombinationen der Viren benutzt werden, um die mit VSV beobachtete, cytopathische Wirkung zu verstärken.

[0084] Um zu bestimmen, ob die Gegenwart einer normalen Zelle oder einer Tumorzelle Einfluss auf den anderen Zelltyp (entweder eine normale oder eine Tumorzelle) haben kann, und die Resistenz oder die Empfänglichkeit irgendeiner dieser Zellen für eine Virusinfektion verändern kann, wurden normale Zellen und Fibroblasten in Gegenwart von VSV co-kultiviert. Die Kultur wurde mit einer Menge (moi) von 0,1 pfu/Zelle infiziert und in Gegenwart oder Abwesenheit von Interferon inkubiert. Nach 0, 12 und 24 Stunden ([Fig. 4](#)) wurden die Kulturen fixiert und mit Antikörpern gegen das große T-Antigen (rote Nuklei) gefärbt, um die 293T-Zellen nachzuweisen; außerdem wurde mit DAPI (blaue Nuklei) gefärbt, welches alle Zelltypen anfärbt ([Fig. 4](#)). Die Anzahl der 293T-Zellen (rote Nuklei) nahm während des Zeitverlaufs stetig ab; die Zellen zeigten schwer kondensierte oder fragmentierte Nuklei, die für eine Zelle charakteristisch sind, die an viral induzierter Apoptose stirbt. Diese selektive Zerstörung der transformierten Zellen wurde sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Interferon beobachtet. Die normalen Fibroblasten entwickelten keine Zellkern-Veränderungen, noch wurde ihre Anzahl als Antwort auf VSV-Infektion reduziert, selbst wenn die 293T-Zellen große Mengen an Virus innerhalb der Co-Kultur produzierten. Dies weist darauf hin, dass Mischungen von Zellpopulationen mit VSV behandelt werden können, wobei sie ihre Tumorzell-Sensitivität und ihre normale Zellresistenz gegen VSV beibehalten.

[0085] Außerdem gibt es eine Anzahl von Mutanten von VSV, beispielsweise Mutanten, die in Hinblick auf die Beendigung der Wirtsproteinsynthese beeinträchtigt oder mehr oder weniger sensitiv auf Interferon reagieren, was die unterschiedliche Infektion zwischen normalen Zellen und Tumorzellen darstellen kann. Beispielsweise sind andere virale Mutanten bekannt, die Tropismus zu STAT1 oder PKR-negativen Zellen zeigen; dazu zählen ein Influenza-Virus-Stamm, von dem beschrieben wurde, dass er unfähig ist, PKR zu inaktivieren (36), und Adenovirus-Mutanten, denen das PKR-inaktivierende VA-Gen fehlt und die in Abwesenheit von PKR bekanntermaßen besser wachsen.

[0086] Wie hierin beschrieben, wurden VSV-Mutanten isoliert, die nur schwaches Wachstum in auf Interferon ansprechenden Zellen zeigten. Diese Mutanten wurden auf der Grundlage ihrer Fähigkeit, kleine Plaques in Monolayern von auf Interferon ansprechenden Zellen zu bilden, isoliert. Auf nicht auf Interferon ansprechenden Zellen (d. h., Tumorzellen) bilden diese Mutanten große Plaques. Die Selektion der Mutanten durch die Plaquegröße in auf Interferon ansprechenden Zellen ermöglicht die Isolierung des Virus, der in normalen Zellen nur schwaches Wachstum zeigt. Jedoch können andere VSV-Mutanten unter verschiedenen Selektionskriterien erhalten werden. Die unter Verwendung von auf Interferon ansprechenden Zellen isolierten Mutanten wurden amplifiziert und auf ihre Fähigkeit, Tumorzellen und normale Zellen abzutöten, untersucht. Das Grundprinzip hierbei ist, dass VSV-Mutanten, die Interferon in Zielzellen induzieren können, ihre eigene Replikation in einer auf Interferon ansprechenden Zellpopulation begrenzen würden. Diese gleichen Viren würden jedoch unbegrenztes Wachstum in Tumorzellen, denen die Interferon-Ansprechempfindlichkeit fehlt. Diese Mutanten sind wertvoll, da sie sogar weniger cytopathische Wirkung auf normales Gewebe aufweisen als Wildtyp-VSV und dabei ihre onkolytische Aktivität beibehalten.

[0087] Es wurden vier Mutanten (Mut 1–4) auf der Grundlage ihrer Fähigkeit, Plaques in Monolayern von auf Interferon ansprechenden Zellen zu bilden, erhalten. Diese Mutanten und ein Wildtyp-Virus (Menge (moi) 1,0 pfu/Zelle) wurden verwendet, um Melanomzellen und normale humane Vorhaut-Fibroblasten zu infizieren. Alle diese Mutanten konnten Tumorzellen effizient abtöten; jedoch schienen normale Zellen, die mit den Mutanten infiziert worden waren, auch nach langen Infektionszeiträumen durchweg nicht infiziert zu sein. Mit der gleichen Menge zeigte Wildtyp-VSV eine cytopatische Wirkung auf die normalen Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass das mutante Virus eine größere therapeutische Wirkung aufweist, da es Tumorzellen effizient abtötet, während es normale Zellen verschont; die Mutanten besitzen außerdem die Fähigkeit, größere Mengen an Viruspartikeln zu produzieren und die Virusverbreitung durch den Tumor hindurch zu erhöhen (siehe Beispiel 4). Überraschenderweise wuchsen diese Mutanten schneller als das Wildtyp-VSV (Indiana) in HCT 116-Darmkarzinomzellen, jedoch nicht in OSF7-Zellen (siehe Beispiel 21 und [Fig. 10A](#) und [Fig. 10B](#)). Bevorzugt sind VSV-Mutanten, die ein schnelles Wachstum in der interessierenden Tumorzelle jedoch nicht in normalen Zellen zeigen.

[0088] Frühere Experimente zeigten, dass PKR^{-/-}-Mäuse durch VSV über verschiedene Infektionswege getötet wurden; jedoch bleiben diese Mäuse von intravenösen Injektionen des Virus unbeinträchtigt. Um zu bestimmen, ob Plasma-Komponenten das Virus nach Kontakt inaktivieren, wurde VSV, welches aus verschiedenen Quellen stammte, einschließlich in Maus-L-Zellen produziertes VSV, mit humanem Serum (von normalen, nicht infizierten Spendern) inkubiert und der Virustiter nach der Inkubation bestimmt (Beispiel 6). Der Virustiter von in L-Zellen produziertem VSV fiel um das 400-fache, während in humanen Melanomzellen produziertes VSV durch Inkubation in Plasma nicht beeinflusst wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Auswahl der Zelllinie für die Produktion von VSV entscheidend ist. Auf der Grundlage dieser Beobachtung ist es möglich, humane Zelllinien zu screenen, um solche zu erhalten, die optimale Mengen an Virus produzieren, welches nicht sensitiv auf humanes Serum reagiert.

[0089] Ohne an eine Theorie gebunden zu sein, könnte es sein, dass der Unterschied bei diesen beiden Virus-Präparationen die Natur der Proteingruppen, die auf der Oberfläche der Virus-produzierenden Zellen gefunden werden, widerspiegelt. Als Teil seines Replikationszyklus dringt VSV durch die Plasmamembran und erwirbt zelluläres Protein auf seiner Hülle. Bestimmte auf L-Zellen auftretende Proteine könnten bei ihrer Expression im Zusammenhang mit dem Viruspartikel Komplement aktivieren. Tatsächlich wurde bereits gezeigt, dass Retrovirus-Partikel, die in bestimmten Mauszellen produziert wurden, durch Serum inaktiviert wurden, während das gleiche Virus, das in einer Reihe humaner Zelllinien produziert wurde, durch das Plasma nicht beeinflusst wurde (Pensiero, M.N. et al., Hum. Gene Ther., 1996. 7: 1095–1101).

[0090] VSV kann genetisch modifiziert werden, um seine Eigenschaften für die Verwendung in vivo zu verändern. Methoden für die genetische Modifikation von VSV sind auf dem Fachgebiet gut etabliert. Beispielsweise wurde ein reversees genetisches System für VSV etabliert (Roberts. A. und J. K. Rose, Virology, 1998. 247: 1–6), was es ermöglicht, die genetischen Eigenschaften des Virus zu verändern. Außerdem können dem Fachmann auf den Gebiet gut bekannte Standardtechniken verwendet werden, um VSV genetisch zu modifizieren und gewünschte Gene in das VSV-Genom zur Herstellung rekombinanter VSVs einzuführen (z. B. Sambrook et al., 1989, A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

[0091] VSV kann an eine gewünschte Stelle in vivo gelenkt werden, um die virale Wirksamkeit zu erhöhen. Beispielsweise kann eine Modifikation des VSV-G-Proteins zur Erzeugung von Fusionen, die auf spezifische Stellen gerichtet sind, verwendet werden, um die VSV-Effizienz in vivo zu erhöhen. Jedoch können auch andere Protein-Targets neben dem VSV-G-Protein modifiziert werden, um derartige Fusionsproteine herzustellen. Solche Fusionsproteine umfassen beispielsweise, aber nicht ausschließlich, einkettige Fv-Fragmente (Lorimer, I.A. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1996. 93: 14815–20), die eine Spezifität für Tumor-Antigene aufweisen. Ein Beispiel für ein derartiges einkettiges Fv-Fragment, das zur Produktion eines VSV-G-Fusionsproteins verwendet werden kann, ist ein Fv-Fragment, das gegen einen mutanten EGF-Rezeptor gerichtet ist, der in etwa 80% der humanen Brusttumor-Zellen gefunden wird.

[0092] VSV kann außerdem derart modifiziert werden, dass es ein oder mehrere Suizid-Gene exprimiert, die ein Pro-Pharmakon in einen toxischen Metaboliten metabolisieren können, wodurch es ermöglicht wird, VSV-infizierte Zellen durch Verabreichung dieses Pro-Pharmakons abzutöten. Beispielsweise codiert VSV, welches das Herpes-Virus-Thymidinkinase-Gen oder das Cytosindeaminase-Gen enthält, ein Enzym, welches Ganciclovir beziehungsweise 5-FC in eine toxische Verbindung überführen kann. Selbstverständlich können auch andere Suizid-Gene verwendet werden. Bekanntermaßen töten Ganciclovir-Metaboliten nicht nur HSV-TK-exprimierende Zellen, sondern ebenso Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft ab, wodurch rVSVs, welche diese Suizid-Gene enthalten, mehrere Vorteile aufweisen. Beispielsweise wird das effektive Abtöten durch das Virus erhöht, da eine infizierte Zelle zehn oder mehr benachbarte Tumorzellen abtötet; zudem ermöglicht rVSV, welches ein Suizid-Gen enthält, gegebenenfalls die Eliminierung des Virus aus einem mit dem Virus infizierten Individuum. Dies kann in Situationen wichtig sein, in denen unklar ist, welche Wirkung VSV auf ein Individuum haben könnte. Beispielsweise könnte ein immunschwaches Individuum unerwartet für VSV anfällig sein. Somit könnte durch Addition eines Suizid-Gens eine Verbesserung der Sicherheit des viralen Therapeutikums erreicht werden.

[0093] VSV kann ebenso durch die Einführung eines Säugetier-Genprodukts modifiziert werden. Ein derartiges Säugetier-Genprodukt könnte das Wachstum von VSV in normalen Zellen, jedoch nicht das Wachstum von VSV in Tumorzellen oder erkrankten Zellen, begrenzen. Beispielsweise aktiviert rVSV, welches einen oder mehrere Transaktivatoren von p53 exprimieren kann, die apoptotischen Signalwege in normalen Zellen, nicht jedoch in Tumorzellen. Somit begrenzen rVSVs selektiv die Virusverbreitung in normalen Geweben. Selbstverständlich können auch andere Säugetier-Genprodukte zu diesem Zweck in VSV exprimiert werden. Dazu gehört beispielsweise, ohne beschränkend zu sein, das PKR-Gen. Ein rVSV, welches das PKR-Gen exprimiert,

begrenzt die Virusreplikation in allen normalen Zellen; in Zellen, die PKR-Inhibitoren exprimieren, wird jedoch die viral codierte PKR inaktiviert. Ein Beispiel für eine Zelle, die einen oder mehrere PKR-Inhibitoren exprimiert, ist eine chronisch mit Hepatitis C infizierte Zelle. Da Hepatitis C zwei bekannte PKR-Inhibitoren codiert und exprimiert (nämlich NS5A und E2) wird ein VSV-codiertes PKR-Genprodukt neutralisiert, wodurch sich VSV frei replizieren kann.

[0094] Die obige Beschreibung begrenzt die beanspruchte Erfindung in keiner Weise; die beschriebene Kombination der Merkmale ist für die erforderliche Lösung nicht unbedingt notwendig.

[0095] Die vorliegende Erfindung wird in den folgenden Beispielen weiter veranschaulicht. Diese Beispiele dienen jedoch lediglich illustrativen Zwecken und schränken den Umfang der vorliegenden Erfindung in keiner Weise ein.

Beispiel 1: PKR-negative Zellen sind empfänglich für VSV-Infektion

In vivo-Experimente

[0096] Anfängliche Studien waren auf die Identifizierung von Viren gerichtet, die $\text{PKR}^{-/-}$ -Tiere und -Zellen infizieren können. Unter Verwendung homologer Rekombinationsstrategien wurden PKR-Null-Mausstämme erzeugt (35) und auf ihre Fähigkeit, sich gegen Virusinfektionen zur Wehr zu setzen, getestet. Da diese Mäuse $\text{PKR}^{-/-}$ sind, sollten sie für Virusinfektion empfänglich sein. In PKR-Null-Tieren wurden mehrere Virusarten in unterschiedlichen Konzentrationen verabreicht.

Infektion von PKR-Null-Mäusen

[0097] Unter Verwendung konventioneller Knockout-Technologie (Abraham N., et al., J. Biol. Chem., 1999. 274: 5953–5962) wurde eine PKR-Null-Mauslinie erzeugt. Gruppen von jeweils fünf weiblichen, mindestens 3 Monate alten Mäusen wurden intranasal mit variierenden Mengen des vesikulären Stomatitis-Virus (Indiana-Stamm) infiziert. Wildtyp-Tiere gleichen Alters wurden parallel infiziert und beide Tiergruppen täglich auf Infektionszeichen untersucht. Dazu zählen Hydratation, Piloerektion (Haaraufrichtung), Aktivitätsgrad, Appetit, Paralyse der hinteren Gliedmaßen, Atmungsgeschwindigkeit, Körpergewicht und alle anderen Symptome, die auf Schmerz oder Unpässlichkeit bei den Tieren hinweisen.

[0098] Wildtyp-Tiere zeigten geringe und nur vorübergehende Symptome bei vielfachen Infektionen mit bis zu 10^5 pfu VSV. Im Gegensatz dazu entwickelten PKR-Null-Tiere sehr schnell Dehydratierung, Piloerektion, Appetitverlust, schnelle Atmung, verminderte Aktivität und schielende, verkrustete Augen. Bei hohen Dosen von VSV-Infektionen (10^5 pfu) zeigten die Tiere die Symptome in weniger als 24 Stunden und erlagen gewöhnlich der Infektion innerhalb von 48 Stunden. Bei Infektionsdosen von nur 25 pfu starben 100% der PKR-Null-Tiere an der VSV-Infektion innerhalb von 5 Tagen. In getrennten Experimenten wurden Gruppen von fünf Wildtyp- und PKR-Null-Tieren 48 Stunden nach der Infektion mit VSV getötet und die Organe entnommen, um die viralen Titer festzustellen. In den PKR-Tieren wurden zu diesem Zeitpunkt Titer mit mehr als einer Million pfu/ml Lungen-Homogenat gefunden, während bei den Wildtyp-Tieren die Virustiter in einem Bereich von 0 bis 100 pfu pro ml Lungen-Homogenat lagen. In den Wildtyp- und PKR-Null-Tieren wurden ähnliche Virusmengen im Gehirn gefunden. In den übrigen Geweben konnte bei beiden Mausstämmen zu diesem Zeitpunkt nach der Infektion kein Virus nachgewiesen werden.

[0099] Das vesikuläre Stomatitis-Virus, ein Mitglied der Rhabdovirus-Familie, war imstande, 100% der PKR-Null-Tiere nach intranasaler Infektion mit nur 50 infektiösen Viruspartikeln (oder Plaque-bildenden Einheiten, pfu) zu töten. Im Gegensatz dazu waren über 20.000-mal so viele VSV-Partikel erforderlich, um die Hälfte der infizierten normalen Tiere zu töten. Diese Ergebnisse zeigen, dass PKR-Null-Tiere eine Anzahl verschiedener Virusinfektionen, einschließlich Vakzinia, Influenza und EMCV, unterdrücken können. Jedoch besaß VSV die Fähigkeit, $\text{PKR}^{-/-}$ -Tiere zu infizieren. Diese Ergebnisse machen außerdem deutlich, dass PKR von den Säugetierzellen benötigt wird, um VSV-Infektionen zu widerstehen (Indiana-Laborstamm).

Beispiel 2: Selektives Abtöten von Tumorzellen mit VSV

In vitro-Experimente

[0100] Es wurden verschiedene Tumorzelllinien zufällig aus dem „Ottawa Regional Cancer Center“ ausgewählt und auf ihre Empfänglichkeit für VSV-Infektion getestet. Als Kontrollzellen wurden primäre Fibroblas-

ten-Kulturen aus gesunden adulten Freiwilligen oder primären Knochenmarkproben von gesunden Spendern verwendet.

Infektion der Tumorzellen mit VSV:

[0101] Als erster Test der onkolytischen Eigenschaften von VSV wurden Virusproduktion und cytopathische Wirkung nach einer Übernacht-Inkubation mit VSV untersucht. Monolayer der Zellen wurden mit dem VSV-Indiana-Stamm mit einer Infektionsmultiplizität (moi) von 0,1 Plaque-bildenden Einheiten (pfu) inkubiert. Nach 30-minütiger Adsorption des Virus bei 37 °C wurden die Kulturen gründlich mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gespült und dann weitere 18 Stunden bei 37 °C kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Kulturen mikroskopisch auf eine cytopathische Wirkung (CPE) untersucht und fotografiert. Der nach 18 Stunden erhaltene Überstand wurde entfernt und die Virustiter pro ml Medium bestimmt. In einigen Experimenten wurden die Kulturen 12 Stunden mit humanem α -Interferon (100 Einheiten/ml) vor der Infektion prä-inkubiert.

[0102] Um die Infektionskinetik der verschiedenen Zelltypen zu untersuchen, wurde ein modifizierter CPE-Assay (Heise, C., et al., Nat. Med., 1997; 3: 639–645) verwendet. Dabei wurden im Wesentlichen Monolayer von Zellen mit einer Menge (moi) von 0,1 pfu in einer 12-Loch-Platte infiziert. Zum Zeitpunkt 0 und anschließend alle 12 Stunden bis zu 48 Stunden wurde ein Loch der infizierten Zellen mit 0,5 ml Leukostat-Fixiermittel (Fisher Diagnostics) 2 Minuten lang fixiert. Am Ende des Experiments wurden die Monolayer mit Leukostat-Farbstoffen 1 und 2 gemäß den Anleitungen des Herstellers angefärbt. Da PKR ein Interferon-induzierbares Genprodukt ist, wurde eine Vorbehandlung mit Interferon – 100 Einheiten/ml humanes α -Interferon – 12 Stunden vor der Infektion durchgeführt, um zu bestimmen, ob Interferon den Schutz innerhalb der verschiedenen Zellkulturen verstärken kann. Die Daten sind in Tabelle 1 und in den [Fig. 2](#) und 3 wiedergegeben.

Tabelle 1: Auf VSV-Empfindlichkeit getestete Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Literaturhinweis	Unbehandelt Übernacht- Virus-Ausbeute	Interferon Übernacht- Virus-Ausbeute
OSF16	Humane nor- male Fibrobla- sten	ORCC ¹	1x10 ⁵ pfu	0 pfu
AG 1522	Humane Vor- haut- Fibroblasten	[20]		0 pfu
OSF 7	Humane nor- male Fibrobla- sten	ORCC	1x10 ⁶	0 pfu
OSF12	Humane nor- male Fibrobla- sten	ORCC	2x10 ⁵ pfu	0 pfu
MN 11	Maus- Fibrosarkom	[21]	1x10 ⁸	1x10 ⁴
A 2780	Humanes Ova- rien-Karzinom	[22]	2x10 ⁸	1x10 ⁷
H-1078	Normales hu- manes Kno- chenmark	ORCC	0 pfu (moi 10 pfu)	nicht bestimmt
M07E	Humane Leu- kämie-Zelllinie	[23]	2 x 10 ⁶ (moi 1,0 pfu)	nicht bestimmt
L1210	Maus- Leukämie- Zelllinie	[24]	4x10 ⁶	2x10 ⁴
SK-MEL3	Humanes Me- lanom	[25]	nicht bestimmt: CPE-Assay positiv	nicht bestimmt: CPE-Assay positiv

LNCAP	Humanes Prostata-Karzinom	[26]	nicht bestimmt: CPE-Assay positiv	nicht bestimmt: CPE-Assay positiv
293T	Fibrosarkom, transformiert mit SV-40 Large T und Adenovirus E1A	[27]	1×10^8	8×10^7
OVCA 432		[28]	1×10^7	0 pfu
C13	Ovarien-Karzinom	[29]	1×10^8	1×10^5
OVCA 3		[30]	5×10^7	nicht bestimmt
COS	Large T-transformierte Affennieren-Zelllinie	[31]	2×10^8	nicht bestimmt
HCT 116	Colon-Karzinom	[32]	nicht bestimmt: CPE-Assay positiv	nicht bestimmt: CPE-Assay positiv
OVCA 420		[28]	1×10^8	3×10^6

1: etabliert an der ORCC aus einer Unterarm-Biopsie

[0103] Aus den Daten aus Tabelle 1 ist ersichtlich, dass, obwohl normale humane Fibroblasten virale Replikation unterstützen können, die Menge an produziertem Virus und das Fortschreiten der Zelllyse im Vergleich zu den Tumorzellen wesentlich verzögert waren. Ein noch deutlicherer Unterschied in der Virusproduktion wurde nach Vorbehandlung mit Interferon beobachtet. Während normale humane Fibroblasten-Monolayer durch Interferon vollständig vor der cytolytischen Wirkung von VSV geschützt waren, blieben Tumorzellen sensiv, wobei sie reichliche Mengen an Virus-Partikeln produzierten und schnell einer Cytolyse unterlagen.

[0104] Es stellte sich auch heraus, dass andere Zelllinien, einschließlich einer Lungenkarzinom-Zelllinie (LC 80) und einer Leukämie-Zelllinie, AML 5 (akute myelogene Leukämie 5)-Zellen effektiv durch VSV abgetötet wurden. Im Fall von AML 5 wurden mit einer Menge (moi) von 1,0 pfu/ml die Zellen innerhalb von 24 Stunden vollständig abgetötet, während mit 0,0001 pfu/ml die Zellen innerhalb von 72 Stunden abgetötet wurden, was wiederum die Sensitivität von Leukämiezellen gegenüber VSV zeigt.

[0105] Wie aus [Fig. 2](#) ersichtlich, wurden die Monolayer der Tumorzellen sehr viel schneller durch VSV-Infektion zerstört als die normalen humanen Fibroblasten. Die humane Melanom-Zelllinie SK-MEL3, die LNCaP-Prostatakrebs-Zelllinie und die Ovarien-Karzinom-Zellen A2780 zeigten alle bereits 12 Stunden nach der Infektion jeweils beträchtliche CPE. Obwohl die normalen humanen Fibroblasten-Kulturen infiziert wurden und das Virus produzieren konnten (siehe Tabelle 1), waren die Infektionskinetik wesentlich langsamer als in den drei Tumor-Zelllinien, die in diesem Experiment getestet wurden. Außerdem schützte, wie in dem Übernacht-Viruswachstums-Assay (Tabelle 1, [Fig. 2](#)), die Interferon- α -Behandlung die normalen humanen Fibroblasten vollständig, konnte jedoch nicht die drei Tumorzelllinien vor der cytopathischen Wirkung von VSV schützen.

[0106] Die in Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Screening-Strategie zur Bestimmung der Tumortypen, die empfänglich sind, durch VSV abgetötet zu werden, verwendet werden kann, wobei beispielsweise, jedoch nicht ausschließlich, die NIH/NCI-Standard-Tumorzelllinien, die von ATCC erhältlich sind, verwendet werden können. Diese Zelllinien werden gescreent, um die Zeit bis zur vollständigen CPE und/oder das Viruswachstum unter Verwendung verschiedener anfänglicher Infektionsmengen(-multiplizitäten) zu bestimmen. Die Experimente werden in Gegenwart oder Abwesenheit von Interferon durchgeführt, so dass die Anzahl der Tumore und die Tumortypen, die VSV-sensitiv und resistent gegen die antivirale Aktivität von Interferon sind, bestimmt werden.

[0107] VSV infiziert nicht produktiv Knochenmark-Stammzellen, auch nicht in hohen Mengen von 10 pfu/Zelle (H-1078; Tabelle 1). Die behandelten Kulturen behielten alle ihre Stammzell-Eigenschaften bei. Zwei Leukämie-Zelllinien (MO7E und L1210; Tabelle 1) wurden nach einer Übernacht-Infektion abgetötet; sie produzierten große Virusmengen.

[0108] Um zu bestimmen, ob VSV primäre Leukämiezellen eines Krebspatienten abtöten kann, wurde eine periphere Blutprobe von einem AML-Patienten entnommen und die weißen Blutzellen gesammelt und in RPMI-Medium + 10% FBS (10^7 /Loch in einer 6-Loch-Platte, jede Infektion in doppelter Ausführung) ausplattiert. Die Zellen wurden schein-infiziert oder mit einer Menge von 10,0/Zelle infiziert. VSV tötete selektiv myeloische Leukämiezellen ab, wie durch die Abnahme des prozentualen Anteils an Blastenzellen (leukämische Blasten) gezeigt wurde, während die Gesamtzellzahl nur minimal beeinflusst wurde (d. h., Neutrophile gediehen). Die leukämische Probe produzierte VSV-Titer von über 10^7 pfu/ml 16 Stunden nach der Infektion. Die Anzahl der Blastenzellen in der Probe wurde 21 Stunden nach der Infektion dramatisch reduziert, während der Anteil der normalen neutrophilen Zellen sich erhöhte. Die schein-infizierten Zellen (-VSV) enthielten nahezu 70% Blastenzellen in einem Monolayer, wobei in Zellen, die mit VSV infiziert wurden (+VSV), normale Zellen vorherrschten. Diese Ergebnisse zeigen, dass VSV imstande ist, bevorzugt primäre leukämische Blastenzellen abzutöten, wobei normale Blutzellen verschont bleiben.

Beispiel 3: Abtöten von Tumorzellen in Mischkulturen

[0109] Normale humane Fibroblasten und 293T-Tumorzellen wurden in einer 50:50-Mischung co-kultiviert. Da die 293T-Zellen das große T-Antigen exprimieren, welches nicht in normalen Zellen gefunden wird, können die zwei Zelltypen durch Immunofluoreszenz unterschieden werden.

[0110] In diesem Experiment wurden Kulturen mit einer Menge (moi) von 0,1 pfu/Zelle infiziert und die Infektion in Gegenwart oder Abwesenheit von Interferon durchgeführt. Nach 0, 18 und 24 Stunden ([Fig. 4](#)) wurden die Kulturen fixiert und mit Antikörpern gegen das große T-Antigen gefärbt (rote Nuklei), um die 293T-Zellen nachzuweisen; außerdem wurde mit DAPI (blaue Nuklei) gefärbt, welches alle Zelltypen anfärbt ([Fig. 4](#)). Anfänglich wiesen beide Zelltypen eine spindelähnliche Morphologie mit großen ovalen Zellkernen auf. Nach 18 Stunden war die Anzahl der 293T-Zellen (rote Nuklei) reduziert, und viele der übrig gebliebenen 293T-Zellen zeigten eine veränderte Morphologie des Zellkerns. 24 Stunden nach der Infektion wurden sehr wenige 293T-Zellen nachgewiesen, und diese wenigen verbliebenen Zellen wiesen stark kondensierte oder fragmentierte Nuklei auf, wie sie für eine Zelle charakteristisch sind, die an viral induzierter Apoptose stirbt.

[0111] Diese selektive Zerstörung der transformierten Zellen wurde sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Interferon festgestellt. Die normalen Fibroblasten entwickelten weder Zellkernveränderungen, noch war ihre Anzahl als Antwort auf die VSV-Infektion reduziert, obwohl 293T-Zellen großen Virusmengen innerhalb der Co-Kultur produzierten.

Beispiel 4: VSV-Mutanten als onkolytische Agenzien:

[0112] VSV-Mutanten wurden auf der Grundlage ihrer Fähigkeit, kleine Plaques in Monolayern auf Interferon ansprechenden Zellen zu bilden, isoliert, (im Gegensatz zur Größe von Plaques in Monolayern von nicht auf Interferon ansprechenden Zellen). Virale Isolate, welche kleine Plaques in auf Interferon ansprechenden Zellen bildeten, wurden gepickt, amplifiziert und subkloniert. Mutanten, die auf diese Weise isoliert wurden, wurden amplifiziert und auf ihre Fähigkeit, Tumorzellen und normale Zellen abzutöten, getestet. Das Grundprinzip hierbei ist, dass VSV-Mutanten, die Interferon in Zielzellen induzieren können, ihre eigene Replikation in einer auf Interferon ansprechenden Zellpopulation begrenzen würden. Diese gleichen Viren zeigen jedoch unbegrenztes Wachstum in Tumorzellen, denen die Interferon-Ansprechempfindlichkeit fehlt. Diese Mutanten sind von Wert, da sie eine sogar geringere cytopathische Wirkung auf normale Gewebe ausüben, während sie ihre onkolytische Aktivität aufrechterhalten.

[0113] Es wurden vier Mutanten (Mut 1–4) auf der Grundlage ihrer Fähigkeit, kleine Plaques in Monolayern auf Interferon ansprechender Zellen zu bilden, erhalten. Diese Mutanten wurden anfänglich von Dr. Lauren Poliquin (University of Quebec, Montreal) identifiziert und von ihm zur Verfügung gestellt. Nach fünf Durchgängen einer Plaque-Aufreinigung wurden diese Mutanten und das Wildtyp-Virus (moi von 1,0 pfu/Zelle) verwendet, um Melanomzellen und normale humane Vorhaut-Fibroblasten zu infizieren; 12 und 24 Stunden nach der Infektion wurden die Titer an freigesetztem Virus bestimmt.

[0114] Alle Mutanten konnten Tumorzellen effizient abtöten, wobei normale, mit den Mutanten infizierte Zellen sogar nach einem langen Zeitraum vollständig uninfiziert erschienen. Mit der gleichen Menge (moi) zeigte Wildtyp-VSV eine cytopathische Wirkung auf normale Zellen. Ebenso wurde beobachtet, dass alle VSV-Mutanten nach einer Übernacht-Infektion von Melanomzellen ungefähr das 10-fache an Virus produzierten im Vergleich zum Wildtyp-VSV. Während die Mutanten 1 bis 4 signifikant geringere cytopathische Wirkung als das Wildtyp-VSV aufwiesen, wurden auf normalen Zellen ähnliche Mengen an Virus von den infizierten Kulturen produziert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die mutanten Viren eine größere therapeutische Wirkung aufweisen, da sie Tumorzellen effizient abtöten, während sie normale Zellen verschonen, und dass sie außerdem die Fähigkeit aufweisen, größere Mengen an Viruspartikeln zu produzieren und die Virusverbreitung durch den Tumor hindurch zu erhöhen.

Beispiel 5: Infektion von Nacktmäusen, welche humane Tumor-Fremdimplantate (Xenografts) tragen:

[0115] In Nacktmäuse wurden humane Melanomzellen implantiert; die Mäuse wurden in Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe erhielt eine Schein-Injektion (VSV(-)); in die anderen wurde das Wildtyp-VSV oder zusätzliche Melanomzellen, die eine Stunde vor der Injektion in die Tumorstelle in vitro mit VSV infiziert worden waren, injiziert, um Zellen zu liefern, die kontinuierlich über mehrere Stunden infektiöse Partikel in dem Tumor produzieren (VSV(+)). Die Ergebnisse dieser Experimente sind in [Fig. 5](#) dargestellt, welche die durchschnittliche Tumogröße in Abhängigkeit von der Zeit bei behandelten und schein-injizierten Tieren zeigt.

[0116] Im Fall von schein-injizierten Tieren (VSV(-); Injektion nur mit dem Vehikel) wuchsen die Tumore kontinuierlich über die gesamte Dauer des Experiments. Tiere, die lediglich reines Virus erhalten hatten, zeigten ein anfängliches kontinuierliches Wachstum der Tumoren, obwohl am Tag 4 nach der Infektion die Tumoren begannen zu schrumpfen und dies über die gesamte Dauer des Experiments fortgesetzt taten. Tumore, in die infizierte Zellen injiziert worden waren, zeigten die dramatischsten Regressionen. Die meisten Tumoren hörten auf zu wachsen und bildeten sich zu kleinen harten Knötchen, die Narbengewebe ähnelten, zurück.

[0117] In einigen der größeren injizierten Tumoren bildeten sich auf dem Tumor innerhalb von 1 bis 2 Tagen Geschwüre (siehe [Fig. 6](#)); darauf folgte eine kontinuierliche Schrumpfung der zunächst schnell wachsenden Malignität. Während sowohl die Injektion von gereinigtem Virus als auch von infizierten Melanomzellen signifikante Regressionen verursachten, waren die infizierten Produktionszellen effektiver.

Beispiel 6: Die Auswahl einer Zelllinie zur Produktion von VSV beeinflusst die Sensitivität des Virus gegenüber dem Plasma.

[0118] Frühere Experimente zeigten, dass PKR^{-/-}-Mäuse mit VSV über verschiedene Infektionswege abgetötet wurden; diese Mäuse waren jedoch nicht von intravenösen Injektionen des Virus beeinträchtigt. Dies könnte möglicherweise (ohne an eine Theorie gebunden zu sein) darauf zurückzuführen sein, dass die vaskulären endothelialen PKR^{-/-}-Zellen eine Barriere für die Gewebe-Infektion darstellen, oder Plasma-Komponenten das Virus nach Kontakt inaktivieren. Um diese letztere Möglichkeit zu untersuchen, wurde VSV, welches aus verschiedenen Quellen, einschließlich Maus L-Zellen, stammte, mit humanem Serum (von einem normalen, nicht infizierten Spender) inkubiert und der Virus-Titer nach der Inkubation bestimmt.

[0119] Nach der Inkubation von VSV in humanem Serum fiel der virale Titer von durch L-Zellen produziertem VSV um das 400-fache ab. Andererseits blieb das in humanen Melanomzellen produzierte VSV von der Inkubation in Plasma unbeeinflusst.

[0120] Diese Ergebnisse zeigen, dass die Auswahl der Zelllinie zur Produktion von VSV entscheidend ist. Auf der Grundlage dieser Beobachtung ist es möglich, humane Zelllinien zu screenen, um solche zu identifizieren, die optimale Mengen an Virus, das nicht sensitiv gegenüber humanem Serum ist, produzieren.

Beispiel 7: Verwendung von VSV zur Behandlung chronischer Infektionen

[0121] Einige humane Erkrankungen entstehen als Ergebnis chronischer viraler Infektionen; dazu zählen latente Herpes-Infektion, Hepatitis, AIDS und Gebärmutterhalskrebs. In jedem dieser Fälle entwickelten die ursächlichen viralen Agenzien Mechanismen, um Komponenten des Interferon-Reaktionssignalwegs, einschließlich PKR, zu inaktivieren (siehe z. B. Chelbi-Ali, M.K. und H. de The, *Oncogene*, 1999; 18: 935–941; Gale, M.J., Jr., et al., *Virology*, 1997; 230: 217–227; Gale, M.J. et al., *Clin. Diagn. Virol.*, 1998; 10: 157–162; Gale, M., Jr. und M.G. Katze, *Methods*, 1997; 11: 383–401; Barnard, P. und N.A. McMillan, *Virology*, 1999; 259: 305–313). Aus diesem Grund führt die Verabreichung von VSV oder Interferon-induzierenden VSV-Mutanten

oder einer Kombination davon an Personen, die an diesen Erkrankungen leiden, zur selektiven Beseitigung der chronisch infizierten Zellen. Weitergehende therapeutische Effizienz könnte erreicht werden, indem durch Zellrezeptoren oder virale Rezeptoren nur auf die chronisch infizierten Zellen gezielt wird.

Beispiel 8: Genetische Modifizierung von VSV

[0122] Es wurde ein reverses genetisches System für VSV etabliert (Roberts A. and J.K. Rose, *Virology*, 1998; 247: 1–6), welches es ermöglicht, die genetischen Eigenschaften des Virus zu verändern.

Zielgerichtete Einführung (Targeting) von VSV an gewünschte Stellen in vivo

[0123] VSV kann gegenwärtig an die meisten Säugetier-Zelltypen binden, obwohl seine Replikation innerhalb der Zelle begrenzt werden kann (zum Beispiel durch auf Interferon ansprechende Genprodukte, einschließlich PKR). Somit kann die Virusdosis, die notwendig ist, um effektiv Zielzellen (z. B. Tumorzellen) aufzufinden, stark durch den „Abfluss“ in anderes normales Gewebe begrenzt werden. Aus diesem Grund kann VSV genetisch modifiziert werden, um ausschließlich an Tumorzellen zu binden und diese zu infizieren.

[0124] Es wurden auf dem Fachgebiet bekannte rekombinante DNA-Techniken (z. B. Sambrook et al., 1989; *A Laboratory Manual*; New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) verwendet, um das VSV-G-Protein zu modifizieren. Es wurden einkettige Fv-Fragmente (Lorimer, I.A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1996; 93: 14815–20), die eine Spezifität für Tumor-Antigene aufweisen, mit dem VSV-G-Protein fusioniert. Ein Beispiel für ein derartiges einkettiges Fv-Fragment ist eines, das auf den mutanten EGF-Rezeptor, der in etwa 80% humarer Brusttumorzellen gefunden wird, abzielt.

Expression von Suizid-Genen in VSV

[0125] Das VSV-Genom wird derart modifiziert, dass es das Herpes-Virus-Thymidin-Kinase-Gen oder das Cytosin-Deaminase-Gen enthält. Beide Gene codieren Enzyme, die Pro-Pharmakons in toxische Verbindungen überführen können (z. B. Ganciclovir oder 5-FC). Viren, die auf diese Weise modifiziert sind, exprimieren diese Suizid-Gene, wodurch VSV-infizierte Zellen durch Verabreichung des Pro-Pharmakons abgetötet werden können. Dies liefert zwei Vorteile: Erstens ist bekannt, dass Ganciclovir-Metaboliten nicht nur Zellen, die HSV-TK exprimieren, sondern auch Zellen in der unmittelbaren Nachbarschaft abtöten können. Diese „Nebenwirkung“ kann das effektive Abtöten durch das Virus erhöhen (d. h., eine infizierte Zelle kann zum Abtöten von 10 oder mehr benachbarten Tumorzellen führen); zweitens ermöglicht ein VSV mit einem Suizid-Gen gegebenenfalls die Eliminierung des Virus aus einem mit dem Virus infizierten Individuum.

Regulierung von VSV-Wachstum in vivo

[0126] Es wird ein Säugetier-Genprodukt in das VSV eingeführt, um VSV-Wachstum in normalen Zellen zu begrenzen; dieses Genprodukt beeinflusst jedoch nicht das VSV-Wachstum in Tumorzellen oder erkrankten Zellen.

[0127] Rekombinante VSVs (rVSV), welche einen oder mehrere Transaktivatoren von p53 enthalten, aktivieren apoptotische Signalwege in normalen Zellen, jedoch nicht in Tumorzellen. Derartige rVSVs begrenzen die Virusausbreitung in normalen Geweben, ermöglichen jedoch Viruswachstum in Tumorzellen.

[0128] Ein rVSV, welches das PKR-Gen enthält, begrenzt Virus-Replikation in allen normalen Zellen; in Zellen jedoch, die PKR-Inhibitoren exprimieren, wird die viral codierte PKR inaktiviert. Ein Beispiel für eine Zelle, die einen oder mehrere PKR-Inhibitoren exprimiert, ist eine chronisch mit Hepatitis C infizierte Zelle. Da Hepatitis C zwei bekannte Inhibitoren der PKR codiert und exprimiert (NS5A und E2), wird ein VSV-codiertes PKR-Genprodukt neutralisiert, wodurch sich VSV frei replizieren kann.

Beispiel 9: Progressiver Verlust der Interferon-Ansprechempfindlichkeit bei onkogener Transformation

[0129] Murine Fibroblasten in verschiedenen Transformationsstadien, die entweder mit 100 Einheiten α -Interferon vorbehandelt wurden oder unbehandelt blieben, wurden mit WT-Indiana-VSV mit einer Menge (moi) von 0,1 pfu/Zelle infiziert. Die virale Produktion wurde 18 Stunden nach der Infektion (pi) durch einen Standard-Plaque-Assay gemessen. MEF: Primäre Maus-Fibroblasten-Kulturen, isoliert aus Balb/C-Maus-Embryos. NIH 3T3-Zellen: immortalisierte (unsterblich gemachte) Mausembryo-Fibroblasten. PVSrc: NIH 3T3-Zellen, transformiert mit dem viralen src-Gen. MOP 8: NIH 3T3-Zellen, transformiert mit dem Großen T-Antigen des

Polyoma-Virus. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

[0130] In diesem Beispiel korreliert der Verlust der Interferon-Ansprechempfindlichkeit mit der Empfänglichkeit für VSV-Infektion und der Progression des malignen Phänotyps. Die MEF-Zellen sind sterblich (d. h., sie haben in Kultur eine begrenzte Lebensdauer) und sprechen vollständig auf Interferon an. Die NIH 3T3-Zellen sind immortalisiert, obwohl sie nicht tumorartig (Tumor erzeugend) sind, und zeigen eine etwa 10.000-fach niedrigere Ansprechempfindlichkeit auf Interferon als die MEF-Zellen. Die PVSrc- und MOP 8-Zellen sind vollständig tumorartig, unterstützen starke VSV-Replikation und werden durch Interferon-Behandlung minimal geschützt.

Tabelle 2

Zelllinie	Viraler Titer (pfu/ml) unbehandelt	Viraler Titer (pfu/ml) IFN- α
MEF (embryonale Maus-Fibroblasten)	4×10^6	<10
NIH 3T3	8×10^7	1×10^4
PVSrc	3×10^9	2×10^7
MOP 8	1×10^8	5×10^6

Beispiel 10: Virusausbeute nach Übernacht-Infektion verschiedener, entweder unbehandelter oder mit IFN behandelter Zelllinien

[0131] Verschiedene normale und transformierte Zelllinien blieben entweder unbehandelt oder wurden mit 100 Einheiten IFN- α vorbehandelt, mit einer MOI von 0,1 pfu/ml mit WT-Indiana-VSV infiziert und 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Kulturmedien aus jeder Probe wurden auf VSV-Produktion untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

[0132] Dieses Beispiel zeigt, dass die virale Produktion bei verschiedenen Tumorzelltypen um das 10- bis 10.000-fache erhöht ist im Vergleich zu normalen primären Geweben. In Gegenwart von α -Interferon wird die Virusproduktion in normalen primären Zellen nahezu komplett blockiert, während in Tumorzellen das Interferon wenig oder keine Wirkung auf die VSV-Replikation hat.

Tabelle 3

Zelllinie	Viraler Titer (pfu/ml) unbehandelt	Viraler Titer (pfu/ml) IFN- α
OSF7 (primäre normale humane Fibroblasten)	1×10^6	<10
OSF12 (primäre normale humane Fibroblasten)	2×10^5	<10
OSF16 (primäre normale humane Fibroblasten)	1×10^5	<10
PrEC (primäres normales Prostata-Epithel)	8×10^6	<10
HOSE (primäres normales humanes Ovarien-Oberflächen-Epithel)	1×10^7	<1000
A2780 (humanes Ovarien-Karzinom)	2×10^8	1×10^7
OVCA 420 (humanes Ovarien-Karzinom)	1×10^8	3×10^6
C13 (humanes Ovarien-Karzinom)	1×10^8	1×10^5
LC 80 (humanes Lungenkarzinom)	2×10^9	6×10^7
SK-MEL3 (humanes Melanom)	1×10^9	1×10^9
LNCAp (humanes Prostata-Karzinom)	4×10^9	5×10^9
HCT 116 (humanes Colonkarzinom)	1×10^9	2×10^9
293T (HEK-Zellen, transformiert mit dem T-Antigen und dem Ad-Virus E1A)	1×10^8	8×10^7

Beispiel 11: LD₅₀ bei WT und mutantem VSV, welches intranasal PKR^{+/−}(129× Balb/c)-Mäusen verabreicht wurde

[0133] 8 bis 10 Wochen alte weibliche Mäuse wurden anästhesiert und intranasal (in die Nasenhöhlen jedes Tiers) mit Virus, verdünnt in 50 µl Posphat-gepufferter Salzlösung (PBS), infiziert (PKR^{+/−}; 129× Balb/c-Stamm). Die LD-(letale Dosis) 50-Werte wurden unter Verwendung des Korler-Spearman-Verfahrens berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

[0134] Dieses Beispiel zeigt, dass insbesondere die Mutanten I, II und III attenuiert (abgeschwächt) sind im Vergleich zu dem Wildtyp-Indiana-Stamm des Virus, dessen Toxizität in 129× Balb/c-Mäusen getestet wurde.

Tabelle 4

Virus	Intranasale LD50 (pfu)
WT-Indiana	1×10^4
Mutante I	1×10^{10}
Mutante II	$>1 \times 10^{10}$
Mutante III	3×10^8
Mutante IV	$<1 \times 10^5$

Beispiel 12: PKR^{-/-}-Mäuse reagieren ausgezeichnet sensitiv auf VSV im Vergleich zu verschiedenen PKR^{+/+}-Mausstämmen

[0135] PKR^{-/-} und PKR^{+/+}-Mäuse wurden intranasal mit verschiedenen Dosen infiziert und ihr Überleben in Abhängigkeit der Zeit beobachtet. Alle PKR^{-/-}-Mäuse unterlagen der Infektion dosisabhängig zwischen Tag 2 und Tag 5, während die Kontrollmäuse über diesen Zeitpunkt hinaus lebten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

[0136] Dieses Beispiel zeigt die Bedeutung des PKR-Genprodukts bei der Resistenz von Mäusen gegen VSV-Infektion.

Tabelle 5

	Genetischer Hintergrund	In-Dosis (pfu)	Überleben an Tag 5
PKR ^{+/+}	Balb/c	5×10^4	5/5
	CD-1	5×10^4	5/5
	Balb/c x 129	5×10^4	5/5
PKR ^{-/-}	Balb/c x 129	5×10^4	0/5
		5×10^3	0/4
		5×10^2	0/3
		5×10^1	0/3

Beispiel 13: AML3-Zellen sterben an Apoptose nach Infektion mit VSV

[0137] OCI/AML3 (akute myelogene Leukämie)-Zellen wurden mit VSV mit einer MOI von 3,0 pfu/Zelle infiziert. Vierzehn und zwanzig Stunden nach der Infektion wurden unfixierte Proben analysiert. Apoptotische Zellen mit Phosphatidylserin-Membran-Translokation wurden durch Fließzytometrie unter Verwendung von Annexin-V-Biotin-X/NeutrAvidin-PE rotem fluoreszierendem Protein (Molecular Probes) nachgewiesen. Die Depolarisation der mitochondrialen Membran in frühen apoptotischen Zellen wurde durch Fließzytometrie unter Verwendung von JC-1 potentiell-sensitivem Farbstoff (Molecular Probes) analysiert. JC-1 wird durch polarisierte Mitochondrien akkumuliert, was die Fluoreszenz-Emission vom grünen in das rote Spektrum verschiebt. Nicht lebende AML3-Zellen wurden unter Verwendung von Ethidium (EthD-1)-Homodimer-1 rotem fluoreszierendem Vital-Farbstoff (Molecular Probes) identifiziert. Die Assays wurden gemäß den Anleitungen des Herstellers durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

[0138] Dieses Beispiel zeigt, dass VSV AML-Zellen wenigstens teilweise durch einen viral induzierten apoptotischen Signalweg abtötet.

Tabelle 6

	Tests	MOI 0,0 % positiv	MOI 3,0 % positiv	Netto positiv (Verstorben)
14 Std. p.i.	EthD-1	6,6	32,3	25,7
	Annexin V	14,3	52,7	38,4
	JC-1	7,5	21,4	13,4
20 Std. p.i.	EthD1 positiv	6,4	58,5	52,1
	Annexin V-positiv	10,8	79,6	68,8
	JC-1	3,9	43,2	39,3

Beispiel 14: Mutante VSV-Stämme infizieren und töten AML-Zellen

[0139] OCI/AML3 (akute myelogene Leukämie)-Zellen wurden mit einer MOI von 1,0 infiziert und 23 Stunden inkubiert. Unfixierte Zellen wurden mit Eth-D1 (Ethidium-Dimer, Molecular Probes) gemäß den Anleitungen des Herstellers angefärbt, um nicht lebende Zellen nachzuweisen. Die Anzahl der angefärbten Zellen pro 10.000 gezählter Zellen wurde zur Berechnung der prozentualen Todesrate verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 wiedergegeben.

[0140] Dieses Beispiel zeigt, dass die verwendeten mutanten VSV-Stämme genauso effektiv bei der Abtötung von AML-Zellen sind wie der Wildtyp-Indiana-Stamm.

Tabelle 7

	Schein-infiziert	WT IND	Mut I	Mut II	Mut III	Mut IV	Mut V
Prozentuale Todesrate	30,0	64,7	60,7	86,7	72,1	74,4	82,8

Beispiel 15: VSV und VSV-infizierte Zellen weisen Antitumor-Aktivität gegen humane Melanom-Fremdimplante (Xenografts) in Nacktmäusen auf

[0141] Von SK-MEL 3 (Melanom) stammende Tumore wurden in 8 bis 10 Wochen alten weiblichen athymischen Balb/c-Mäusen entwickelt. Am Tag 0 wurden die Tumore entweder unbehandelt gelassen oder mit 10^8 pfu WT-Indiana-VSV in Kulturmedium oder mit SK-MEL3-Zellen (VSV-produzierenden Zellen), die mit $2,5 \times 10^6$ WT-Indiana-VSV infiziert worden waren, infiziert. Es wurden die statistischen Differenzen zwischen behandelten und unbehandelten Gruppen an jedem Messpunkt mit folgenden Vertrauenswerten berechnet (b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$; d: $p = 0,007$). Die Ergebnisse sind in [Fig. 7](#) dargestellt. An Tag 3 waren nur die mit VSV-produzierenden Zellen behandelten Tumoren signifikant kleiner als die unbehandelten Tumore (a: $p < 0,001$). Es waren keine statistisch signifikanten Unterschiede der Tumor-Volumina zwischen den Gruppen von Tag 0 bis Tag 2 sichtbar. Die Messpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus verschiedenen Tumoren (unbehandelt $n = 8$; VSV-produzierende Zellen $n = 8$; VSV allein $n = 4$).

[0142] Dieses Beispiel zeigt, dass eine einzige Injektion von VSV direkt in die soliden Tumore stark das Tumorwachstum beeinflusst, was zu partieller oder vollständiger Regression führt. Die Verwendung infizierter Tumorzellen als Vehikel zur Abgabe des Virus ist ebenso effizient.

Beispiel 16: $\text{PKR}^{-/-}$ -Mäuse reagieren akut sensitiv auf intranasale VSV-Infektion und zeigen ein Fehlen der IFN-vermittelten Resistenz.

[0143] (A & B) $\text{PKR}^{-/-}$ und Kontrollmäuse (Balb/c \times 129) wurden intranasal mit 5×10^4 pfu VSV infiziert; die Morbidität und das Überleben wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet, wobei angenommen wurde, dass nach diesem Zeitraum verbliebene Tiere die Infektion überlebt hatten. Die Ergebnisse sind in den [Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#) dargestellt. $\text{PKR}^{-/-}$ -Mäuse zeigten eine deutliche Abnahme der Überlebensrate im Vergleich zu den Kontrollmäusen (WT); sie unterlagen der Krankheit am Tag 3 oder Tag 4, während alle Kontrollmäuse die Infektion überlebten.

[0144] $\text{IFN}\alpha/\beta$ -Vorbehandlung (18 Stunden vor der Infektion) mit entweder 2×10^4 IU ([Fig. 8A](#)) oder 2×10^5 IU ([Fig. 8B](#)) hatte in $\text{PKR}^{-/-}$ -Tieren keine schützende Wirkung. Dieses Beispiel zeigt, dass ein einziger Defekt in dem Interferon-Signalweg (Abwesenheit des PKR-Genprodukts) ausreicht, um die Mäuse unfähig zu machen, VSV-Infektionen zu widerstehen. Dieser Defekt kann nicht durch Interferon behoben werden.

Beispiel 17: Interferon kann Fremdimplantat (Xenograft)-tragende Nacktmäuse während VSV-Behandlung schützen.

[0145] SK-MEL3-Melanomzellen wurden intradermal in athymische CD-1-Nacktmäuse injiziert. Am Tag 0 wurden in die Tumore entweder lebende WT-Indiana-VSV (1×10^9 pfu) oder eine äquivalente Menge durch UV inaktiviertes VSV injiziert; die Tumoren wurden täglich gemessen. Die Ergebnisse sind in [Fig. 9](#) dargestellt. Interferon wurde einer Tiergruppe (VSV-IFN) zu den angegebenen Zeiten (schwarze Pfeile) verabreicht. (UV-VSV $n = 4$; VSV-IFN $n = 6$; VSV $n = 6$). In diesen Experimenten wirkt eine einzige intratumorale Injektion

von VSV in allen Fällen Tumorinhibierend. Alle Tumore zeigten eine zumindest partielle Regression; in drei von zwölf behandelten Mäusen trat eine vollständige Tumor-Regression auf. Die Tumoren, die UV-inaktiviertes Virus erhalten hatten, setzten ihr Wachstum ungehindert fort, bis diese Tiere an Tag 11 getötet wurden. Die Nacktmäuse, die kein Interferon erhalten hatten und in die lebendes Virus injiziert worden war, begannen an Tag 10 zu sterben; nur zwei von sechs Tieren überlebten bis zum Tag 15. Im Gegensatz dazu waren alle Interferon-behandelten, infizierten Nacktmäuse vor VSV-Toxizität geschützt und blieben für mehr als 45 Tage symptomfrei.

[0146] Dieses Beispiel zeigt, dass eine einzige intratumorale Injektion von lebendem VSV wirksam gegen Tumore ist. Zudem können infizierte, tumortragende Nacktmäuse durch Interferon-Injektion vor VSV-Toxizität geschützt werden.

Beispiel 18: VSV infiziert und tötet Leukämie- und Myelom-Zellen.

[0147] Die angegeben Zelllinien wurden mit einem VSV-Indiana-HR-Stamm mit mehrfachen Infektionen einer Plaque-bildenden Einheit pro Zelle infiziert. Nach 24, 48 und 72 Stunden post Infektion (p.i.) wurden Proben aus den infizierten Kulturen genommen und direkt mit Propidiumjodid gemäß den Anweisungen des Herstellers (Molecular Probes) angefärbt. Die Proben wurden dann durch Fließzytometrie unter Verwendung des FACSsort WinMDI-Programms Version 2.7 analysiert. In Tabelle 8 ist der prozentuale Anteil der toten Zellen für jeden Leukämie-Zelltyp zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion (p.i.) angegeben.

[0148] Dieses Beispiel zeigt, dass VSV unterschiedliche Leukämie-Typen infizieren und abtöten kann. Die K-562-Zellen wurden aus einem Patienten mit chronischer myelogener Leukämie (CML) isoliert, während MOLT-4 eine T-Zell-Leukämie und SR und N929 Myelome sind.

Tabelle 8

Zelllinie	24 Std. p.i.	48 Std. p.i.	72 Std. p.i.
K-562 (CML)	15,38%	52,36%	N/D
MOLT-4 (T-Zell-Leukämie)	53,94%	48,80%	N/D
SR (Myelom)	32,10%	46,38%	N/D
H929 (Myelom)	10,73%	17,35%	64,41%

Beispiel 19: Vesikuläres Stomatitis-Virus (VSV)-Stämme, einschließlich des Wildtyp-Stammes Indiana und fünf abgeschwächter VSV-Mutanten, zeigen selektive Cytotoxizität gegenüber humanen Prostata-Karzinom-Zellen im Unterschied zu normalen humanen Fibroblasten.

[0149] Stämme des vesikulären Stomatitis-Virus, einschließlich des Wildtyp-Stammes Indiana und der abgeschwächten Mutanten-Stämme I (TR 1026), II (TR 1026R), III (TP3), IV (TP 6) und V (G31) wurden von Dr. Lauren Poliquin, University of Quebec, Montreal, zur Verfügung gestellt. Jeder dieser Virusstämme wurde vor Verwendung in diesem Experiment fünfmal Plaque-gereinigt.

[0150] Humane Prostatakarzinom-Zellen (LNCAP) und normale humane Zellen (OSF7-Unterarm-Fibroblasten) wurden in 96-Loch-Gewebekultur-Platten bis zu einer Dichte von ungefähr 5×10^4 Zellen/Loch kultiviert. Das Virus wurde in 10-fachen Verdünnungen im Bereich von von 5×10^5 pfu bis 5 pfu zugegeben. Auf jeder Platte befanden sich Kontroll-Löcher ohne Virus. Die Platten wurden 48 Stunden bei 37 °C in 5% CO₂ inkubiert. Die Cytotoxizität wurde unter Verwendung eines kolorimetrischen MTS ((3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxyphenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium, inneres Salz)-Assays (CellTiter 96 Aqueous, catalog #G1112, Promega Corporation, Madison WI 53711-5399) bei 490 nm, welcher mitochondriale Enzymaktivität nachweist, quantifiziert. Die Menge an getöteten Zellen in den Virusbehandelten Löchern wurde durch den Verlust der Lebensfähigkeit in den Virusbehandelten Löchern, bezogen auf die nichtbehandelten Löcher, bestimmt. Die Daten wurden graphisch als pfu/Zelle gegen den prozentualen Zelltod, bezogen auf die Kontrolle, aufgetragen. Der TC50-Wert für diese Zellen wurde als die Menge an Virus in pfu/Zelle, die eine 50%ige Abnahme der Menge der lebenden Zellen bewirkt, berechnet. Niedrigere TC50-Werte spiegeln eine erhöhte Sensitivität der Zellen auf die lytischen Wirkungen des Virus wider. Der therapeutische Index in vitro für jeden VSV-Stamm wurde als Verhältnis des TC50-Werts der OSF7-Zellen im Vergleich zu dem TC50-Wert der LNCAP-Zellen berechnet.

[0151] Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 wiedergegeben. Der Wildtyp-VSV-Indiana und jeder der fünf Mutanten zeigten einen hohen Toxizitätsgrad gegenüber den humanen Prostatakarzinom-Zellen, der sich in den geringen TC50-Werten, die alle unter 0,01 pfu/Zelle liegen, widerspiegelt. Die normalen humanen Fibroblasten-Zellen waren eine bis zu mehr als drei Größenordnungen resistenter gegen die cytotoxischen Wirkungen aller sechs VSV-Stämme. Alle fünf Mutanten besaßen eine geringere Toxizität bei den normalen OSF7-Fibroblasten-Zellen und einen höheren therapeutischen Index in vitro als der Wildtyp-Indiana-VSV.

Tabelle 9. Ergebnisse des Cytotoxizitäts-Assays für VSV-Stämme (Wildtyp-Indiana und Mutanten I bis V) bei Prostata-Karzinom-Zellen und normalen Fibroblasten

	Mutante I	Mutante II	Mutante III	Mutante IV	Mutante V	WT Indiana
LNCAP Prostata-Karzinom TC50 (pfu/Zelle)	0,0064	0,0048	0,0014	0,0006	0,0012	0,0017
OSF7 normale Fibroblasten TC50 (pfu/Zelle)	>42	22	4,3	0,031	9,8	0,022
Therapeutischer Index (TC50 OSF7 /TC50 LNCAPP)	>6562	4583	3071	52	8167	13

Beispiel 20: Virus-Produktion von Tumorzellen und normalen Zellen, die mit dem Wildtyp-Indiana und verschiedenen mutanten VSV-Stämmen infiziert sind

[0152] HCT116-Colon-Karzinom-Zellen und OSF-7-Unterarm-Fibroblasten wurden bis zur Konfluenz in 35-mm-Gewebekulturschalen kultiviert. Das Medium wurde entfernt und das Virus in einem Volumen von 30 µl mit einer Infektionsmenge(multiplizität) von 0,1 pfu/Zelle bei den HCT116-Zellen und 1,5 pfu/Zelle bei den OSF 7-Zellen zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurde 1 ml des Gewebekulturmediums zu den Schalen gegeben. Die Ergebnisse sind in den [Fig. 10A](#) und [Fig. 10B](#) dargestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 10-µl-Proben des Mediums aus den Schalen entfernt. Der Virustiter dieser Proben wurde durch einen Plaque-Assay bestimmt.

[0153] Dieses Beispiel zeigt die schnellen Replikations-Kinetik von Wildtyp- und mutanten VSV-Stämmen in HCT116-Colon-Karzinom-Zellen. Alle vier mutanten VSV-Stämme zeigten schnelleres Wachstum in HCT116-Tumorzellen als das Wildtyp-VSV. Es wird darauf hingewiesen, dass in den normalen OSF-7-Zellkulturen eine 10-fach höhere Viruszugabe nötig ist, um eine ähnliche Replikations-Kinetik zu erreichen.

Beispiel 21: Maligne Zellen werden nach VSV (WT Indiana)-Infektion schnell abgetötet und sind nicht durch IFN-α geschützt.

[0154] Monolayer normaler primärer humaner Fibroblasten (AG 1522) und verschiedener Tumorzelllinien blieben entweder unbehandelt oder wurden mit IFN-α (100 Units) vorbehandelt und dann mit VSV mit einer MOI von 0,1 pfu/ml infiziert. Nach 12-stündigem Wachstum wurden die Infektionen durch Zellfixierung und Anfärbung beendet, um die Kinetik der Zellabtötung zu bestimmen. Nicht infizierte Kontroll (CNTL)-Monolayer wurden über den gesamten Ablauf des Experiments inkubiert und färbten sich dadurch intensiver an. Die Ergebnisse sind in [Fig. 11](#) dargestellt. LNCAP ist ein humanes Prostata-Karzinom; A 2780 ist ein humanes Ovarien-Epithel-Karzinom, und SK MEL3 ist ein humanes Melanom.

[0155] Dieses Experiment zeigt die schnelle Kinetik der Tumorzellabtötung durch VSV-Indiana auch in Gegenwart von α-Interferon. Obwohl normale Zellen ebenso durch VSV abgetötet wurden, war die Kinetik langsamer, und die normalen Zellen konnten vollständig durch α-Interferon geschützt werden.

Beispiel 22: VSV-induzierte cytopathische Wirkung ist in normalen Melanomzellen, jedoch nicht in primären humanen Zellen mit oder ohne α -Interferon sichtbar.

[0156] Gelatine-beschichtete Deckgläser mit normalen humanen Zellen und SK-MEL3-Zellen, die unbehandelt blieben oder mit IFN- α (100 U/ml) vorbehandelt worden waren, wurden mit WT-Indiana-VSV mit einer MOI von 0,1 pfu/ml infiziert. Die Ergebnisse sind in [Fig. 12](#) dargestellt. Die humanen Melanomzellen (SK-MEL3) zeigten CPE 12 Stunden nach der Infektion auch in Gegenwart von Interferon. 24 Stunden nach der Infektion starben diese malignen Zellen ab und lösten sich von dem Deckglas. Humane primäre Zellen, einschließlich Vorhaut-Fibroblasten (AG 1522), Ovarien-Epithelzellen (HOSE) und Prostata-Epithelzellen (PrEC), zeigten keine CPE (Cytopathische Wirkung) bis zu 36 Stunden in Abwesenheit von Interferon und waren in Gegenwart von Interferon über 72 Stunden nach der Infektion hinaus komplett geschützt.

[0157] Dieses Beispiel zeigt, dass VSV-Indiana auch in Gegenwart von α -Interferon Melanomzellen schnell zerstören kann, während normale Fibroblasten und Epithelzellen langsamer getötet werden und vollständig durch α -Interferon geschützt werden können.

Beispiel 23: VSV tötet selektiv mit normalen Fibroblasten co-kultivierte transformierte Zellen.

[0158] Die gleiche Anzahl von 293T-Zellen (humane Embryo-Nierenzellen, transformiert mit dem Adenovirus E1A und dem großen T-Antigen) und normalen humanen Vorhaut-Fibroblasten wurde auf Gelatine-beschichteten Deckgläsern ausplattiert und mit WT-Indiana-VSV in einer MOI von 0,1 sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Interferon infiziert. Die Zellen wurden 12 (nicht dargestellt), 24 und 36 Stunden nach der Infektion fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit einem Anti-Tag-Antikörper und DAPI angefärbt. Die rot gefärbten 293T-Zellen wurden bereits 12 Stunden nach der Infektion schnell abgetötet, ungeachtet einer Interferon-Behandlung, wobei die wenigen verbliebenen Zellen kondensierte oder fragmentierte Nuklei aufwiesen. Die normalen Fibroblasten zeigten veränderte Nuklei 36 Stunden nach der Infektion in Abwesenheit von Interferon, waren jedoch durch das Virus in Gegenwart von Interferon über diesen Zeitpunkt hinaus geschützt.

[0159] Dieses Beispiel zeigt, dass sich in einer Mischkultur aus normalen Zellen und Tumorzellen das VSV-Indiana bevorzugt in Tumorzellen repliziert und diese abtötet. Normale Zellen in den infizierten Co-Kulturen starben langsamer ab und konnten durch Interferon-Behandlung vollständig geschützt werden.

Beispiel 24: Wirksamkeit einer einzigen intravenösen Dosis von mutantem VSV bei der Behandlung von humanen Melanom-Fremdimplantaten (Xenografts) in Nacktmäusen

[0160] Humane SK-MEL3-Melanom-Fremdimplantate (Xenografts) wurden in 5 bis 6 Wochen alten athymischen CD-1-Mäusen etabliert. An Tag 0 wurden die Tumore entweder unbehandelt gelassen oder intravenös mit 5×10^9 pfu eines mutanten VSV, wie angegeben, behandelt. Die Ergebnisse sind in [Fig. 13](#) dargestellt.

[0161] Dieses Beispiel zeigt, dass die Mutanten II und III Tumorwachstum nach einer einzigen intravenösen Injektion inhibieren können. Somit muss das Virus nicht an der Tumorstelle verabreicht werden, um bei der Inhibition des Tumorwachstums wirksam zu sein. Obwohl die Mutanten bezüglich des Wachstums in normalen Mausgeweben abgeschwächt sind, können sie dennoch gezielt Tumorzellen in vivo erreichen.

Beispiel 25: Selektive Abtötung von AML-Zellen, die mit normalem Knochenmark co-kultiviert sind

[0162] Die Wachstumsfaktor-unabhängige Zelllinie OC1/AML3 wurde 1:9 mit normalem Knochenmark gemischt und über 24 Stunden mit dem WT-Indiana-VSV infiziert. Dann wurden verschiedene Zellverdünnungen in Methylzellulose mit (+) und ohne (-) Wachstumsfaktoren ausplattiert; 14 Tage später wurden die Kolonien gezählt. Tabelle 10 zeigt die Daten für die Schalen, die 10^4 Zellen erhalten hatten. Der Stern (*) gibt an, dass keine leukämischen Kolonien auf den Platten ohne Wachstumsfaktor (Minus-Platten) nachgewiesen wurden, auch wenn 10^5 Zellen pro Schale ausplattiert worden waren.

[0163] Dieses Beispiel zeigt das schnelle und selektive Abtöten von Leukämiezellen in Gegenwart normaler Knochen-Stammzellen. Außerdem zeigt es, dass das Knochenmark bei onkolytischer Therapie mit VSV kein Dosis-begrenzendes Ziel (Target) so wie bei den meisten anderen konventionellen Krebstherapien ist.

Tabelle 10

Verschiedene Infektionen

Kolonie-Typ	0,0	1,0	5,0
Leukämisch	172	0*	0*
Neutrophil	12	7	5
Gemischt	6	3	4
Monozyten	10	7	5

Beispiel 26: VSV-Sequenzen

[0164] Das Genom von VSV enthält Gene, welche die viralen Proteine N, P, M, G und L codieren. Die cDNA-Sequenzen und die offenen Leseraster (ORF) für diese Proteine aus dem hitzeresistenten Wildtyp-Stamm VSV (HR) und drei mutanten VSVs wurden (durch jeweils fünfmaliges Sequenzieren) bestimmt und mit den Sequenzen der GenBank Accession No. NC 001560 (erhalten von den Colorado- und San-Juan-Stämmen von VSV) verglichen. Die Mutanten sind M2 (TR 1026R), M3 (TP3) und M4 (TP6). Die Nukleinsäuresequenzen sind in den [Fig. 14](#), [16](#), [18](#), [20](#) und [22](#) wiedergegeben. Die entsprechenden abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind in den [Fig. 15](#), [Fig. 17](#), [Fig. 19](#), 21 bzw. 23 wiedergegeben. Unterschiede sind durch die hervorgehobenen Buchstaben deutlich gemacht. Die gepunkteten Linien stellen unvollständige Sequenzierungen dar.

[0165] Einige der Unterschiede zwischen den Aminosäuresequenzen sind in Tabelle 11 unter Verwendung einer Schreibweise auf der Grundlage der Spaltenüberschrift dargestellt (d. h., bei der Spaltenüberschrift „Unterschiede zwischen GenBank und HR“ bedeutet die Notation K155R, dass die Aminosäure an Position 155 in der GenBank K und in HR R ist). In Fällen, in denen die HR-Sequenz noch nicht verfügbar ist, können die Vergleiche lediglich zwischen GenBank und einer bestimmten Mutante vorgenommen werden. M3* bezeichnet einen Unterschied zwischen der Mutante 3 und HR; jedoch stimmt in diesem Fall die Aminosäure mit der GenBank-Angabe an der Position überein, (d. h., die Mutante 3 und die GenBank-Sequenz stimmen an der Position überein, während sich HR unterscheidet).

[0166] Diese Daten zeigen die vielen Sequenzunterschiede zwischen dem HR-Stamm und der GenBank-Hinterlegung (welche hauptsächlich von dem San-Juan-Stamm erhalten wurde). Außerdem zeigen sie einige der Unterschiede zwischen den Mutanten und dem HR-Stamm, aus dem sie erhalten wurden. Diese genetischen Unterschiede korrelieren mit den phänotypischen Unterschieden.

Tabelle 11

Gen	Unterschiede zwischen GenBank und HR	Unterschiede zwischen HR und den Mutanten	Unterschiede zwischen GenBank und Mutante #2	Unterschiede zwischen GenBank und Mutante #4
N	D10A, K155R, N353S	A10D (M3*), Keine (M4)		
P	K50R, A76V, Q77P, E99D, P110Q, S126L, S140L, Y151H, M168I, E170K, D237N	Keine (M2, M3 und M4)		
M	S32N, Y54H, N57H, T133A, I171V, I226V	M51R (M3), Keine (M4)		
G	H24Y, I57L, Q96H, V141A, Y172D, G132D, H242R, S438T, L453F, H487Y	Q26R, R242H, S431A (alle M3), E254G (M4)	A331V	
L	T367A, T689S, T2026I, R2075K	Keine (M4)		I202L, K296R

Literaturhinweise

1. Stark, G.R. et al., How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, 1998. 67: p. 227–64.
2. Jaramillo, M.L., N. Abraham, and J.C. Bell, The interferon system: a review with emphasis on the role of PKR in growth control. *Cancer Invest*, 1995. 13(3): p. 327–38.
3. Cuddihy, A.R., et al., Double-stranded-RNA-activated protein kinase PKR enhances transcriptional activation by tumor suppressor p53. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(4): p. 2475–84.
4. Lee, S.B. et al., The apoptosis pathway triggered by the interferon-induced protein kinase PKR requires the third basic domain, initiates upstream of Bcl-2 and involves ICE-like proteases. *Virology*, 1997. 231(1): p. 81–8.
5. Lee, S.B. and M. Estaban, The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase induces apoptosis. *Virology*. 1994. 199(2): p. 491–6.
6. Gale, M.J. Jr. et al., Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the non-structural 5A protein. *Virology*, 1997. 230(2): p. 217–27.
7. McMillan, N.A., et al., HIV-1 Tat directly interacts with the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent kinase, PKR. *Virology*, 1995. 213(2): p. 413–24.
8. Kitajewski, J., et al., Adenovirus VAI RNA antagonizes the antiviral action of interferon by preventing activation of the interferon-induced eIF-2 alpha kinase: *Cell*, 1986. 45(2): p. 195–200.
9. Black, T.L., G.N. Barber, and M.G. Katze, Degradation of the interferon-induced 68,000-M(r)protein kinase by polio virus requires RNA. *J Virol*, 1993. 67(2): p. 791–800.
10. Melville, M.W., et al. The molecular chaperone hsp40 regulates the activity of P58IPK, the cellular inhibitor of PKR. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1997. 94(1): p. 97–102.
11. Swaminathan, S. et al., Simian Virus 40 Large-T Bypasses the Translational Block Imposed by the Phosphorylation of eIF-2alpha. *Virology*, 1996. 219(1): p. 321–3.
12. Der, S.D., et al., A double-stranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1997. 94(7): p. 3279–83.

13. Meurs, E.F., et al., Tumor suppressor function of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1993. 90(1): p. 232–6.
14. Koromilas, A.E., et al., Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible dsRNA-dependent protein kinase. *Science*, 1992. 257(5077): p. 1685–9.
15. Munschau, L.J. and D.V. Faller, Oncogenic ras induces an inhibitor of double-stranded RNA-dependent eukaryotic initiation factor 2 alpha-kinase activation. *J Biol Chem*, 1992. 267(32): p. 23092–8.
16. Munschau, L.J. and D.V. Faller, Endogenous inhibitors of the dsRNA-dependent eIF-2 alpha protein kinase PKR in normal and ras-transformed cells. *Biochemie*, 1994. 76(8): p. 792–800.
17. Strong, J.E., et al., The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signalling pathway by reovirus. *Embo J*, 1998. 17(12): p. 3351–62.
18. Kumar, K.U., S.P. Srivastava, and R. J. Kaufman, Double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is negatively regulated by 60S ribosomal subunit protein L18. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(2): p. 1116–25.
19. Peralta, R.C., et al., Distinct regions of frequent loss of heterozygosity of chromosome 5p and 5q in human esophageal cancer. *Int J Cancer*, 1998. 78(5): p. 600–5.
20. Kirchhoff, S. et al., IRF-1 induced cell growth inhibition and interferon induction requires the activity of the protein kinase PKR. *Oncogene*, 1995. 11(3): p. 439–45.
21. Beretta, L. et al., Expression of the protein kinase PKR is modulated by IRF-1 and is reduced in 5q-associated leukemias. *Oncogene*, 1996. 12(7): p. 1593–6.
22. Lossos, I. S., et al., A novel translocation (1; 2) (p34; p21–22) in acute myelomonocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 1998. 106(1): p. 78–9.
23. Haines, G. K.d., et al., Expression of the double stranded RNA-dependent protein kinase (p68) in squamous cell carcinoma of the head and neck region. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1993. 119(10): p. 1142–7.
24. Haines, G. K. et al., Correlation of the expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (p68) with differentiation in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1993. 63(5): p. 289–95.
25. Shimada, A., et al., Aberrant expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase in hepatocytes of chronic hepatitis and differentiated hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 1998. 58(19): p. 4434–8.
26. Wong, L. H. et al., Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. *J Biol Chem*, 1997. 272(45): p. 28779–85.
27. Petricoin, E., 3rd, et al., Human cancer cell lines express a negative transcriptional regulator of the interferon regulatory factor family of DNA binding proteins. *Mol Cell Biol*, 1994. 14(2): p. 1477–86.
28. Abril, E., et al., Characterization of a gastric tumor cell line defective in MHC class I inducibility by both alpha- and gamma-interferon. *Tissue Antigens*, 1996. 47(5): p. 391–8.
29. Abril E., et al., Unresponsivness to interferon associated with STAT1 protein deficiency in a gastric adenocarcinoma cell line. *Cancer Immunol Immunother*, 1998. 47(2): p. 113–20.
30. Sun, W. H., et al., Interferon-alpha resistance in a cutaneous T-cell lymphoma cell line is associated with lack of STAT1 expression. *Blood*, 1998. 91(2): p. 570–6.
31. Chelbi-Alix, M. K., et al., Resistance to virus infection conferred by the interferon-induced promyelocytic leukaemia protein. *J Virol*, 1998. 72(2): p. 1043–51.
32. Chelbi-Alix, M. K., et al., Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells. *Leukemia*, 1995. 9(12): p. 2027–33.
33. Stadler, M. et al., Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene*, 1995. 11(12): p. 2565–73.
34. Koken, M. H., et al., Leukemia-associated retinoic acid receptor alpha fusion partners PML and PLZF, heterodimerize and colocalize to nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1997. 94(19): p. 10255–60.
35. Abraham, N., et al., Characterization of transgenic mice with targeted disruption of the catalytic domain of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *J Biol Chem*, 1999. 274(9): p. 5953–62-
36. Garcia-Sastre, A., et al., Influenza A virus lacking the NS 1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*, 1998. 252(2): p. 324–30.

Patentansprüche

1. Verwendung eines Virus zur Herstellung eines Medikaments zur Reduktion der Lebensfähigkeit einer Tumorzelle, wobei das Virus ein attenuierter Stamm des vesikulären Stomatitis-Virus ist und wobei die Tumorzelle eine hämatopoietische Krebszelle, ein Melanom, ein Sarkom, ein neuroendokriner Tumor, ein Lungenkarzinom oder ein Colon-Karzinom ist.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Tumorzelle ein Lungenkarzinom ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Tumorzelle eine hämatopoietische Krebszelle ist.

4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei die hämatopoietische Krebszelle eine Leukämie, ein Lymphom oder ein Myelom ist.
5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die hämatopoietische Krebszelle Leukämie ist.
6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die Leukämie akute myelogene Leukämie ist.
7. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die Leukämie chronische myelogene Leukämie ist.
8. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die Leukämie promyelozytische Leukämie ist.
9. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die Leukämie eine T-Zell-Leukämie ist.
10. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die hämatopoietische Krebszelle ein Lymphom ist.
11. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die hämatopoietische Krebszelle ein Myelom ist.
12. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Tumorzelle ein Sarkom ist.
13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei das Sarkom ein Osteosarkom ist.
14. Verwendung nach Anspruch 12, wobei das Sarkom ein Fibrosarkom ist.
15. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Tumorzelle ein neuroendokriner Tumor ist.
16. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Tumorzelle im wesentlichen keine PKR-Aktivität aufweist.
17. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Tumorzelle $\text{PKR}^{-/-}$, $\text{STAT1}^{-/-}$ oder sowohl $\text{PKR}^{-/-}$ und $\text{STAT1}^{-/-}$ ist.
18. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die Verwendung weiterhin die Verabreichung von Interferon an die Tumorzelle vor der Verabreichung von VSV umfasst.
19. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Virus der vesikuläre Stomatitis-Virus-Stamm M1 ist.
20. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Virus der vesikuläre Stomatitis-Virus-Stamm M2 ist.
21. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Virus der vesikuläre Stomatitis-Virus-Stamm M3 ist.
22. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Virus der vesikuläre Stomatitis-Virus-Stamm M4 ist.
23. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Virus der vesikuläre Stomatitis-Virus-Stamm M5 ist.
24. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Tumorzelle in einem Säugetier-Lebewesen auftritt und das Virus für die Verabreichung an die Tumorzelle durch intravenöse, intranasale, intraperitoneale oder intratumorale Verabreichung an das Lebewesen geeignet ist.
25. Verwendung nach Anspruch 24, wobei das Säugetier-Lebewesen ein Mensch oder ein nicht-humaner Säugetier ist.
26. Verwendung nach Anspruch 24, wobei das Virus in einer mit dem Virus infizierten Zelllinie enthalten ist und die Verabreichung die Verabreichung der Virusinfizierten Zelllinie an das Lebewesen auf einem Weg, ausgewählt aus intratumoraler, intravenöser oder intraperitonealer Verabreichung, umfasst.
27. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Virus eine N-Gen-Nukleinsäuresequenz aufweist, die für dieselbe N-Protein-Aminosäuresequenz kodiert, wie die N-Gen-cDNA-Sequenz für den vesikulären Stomatitis-Virus-Stamm M2, M3 oder M4, wie in **Fig. 14** gezeigt.
28. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Virus eine P-Gen-Nukleinsäuresequenz aufweist, die für dieselbe P-Protein-Aminosäuresequenz kodiert, wie die P-Gen-cDNA-Sequenz für den vesikulären Stomatitis-Vi-

rus-Stamm M2, M3 oder M4, wie in **Fig. 16** gezeigt.

29. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Virus eine M-Gen-Nukleinsäuresequenz aufweist, die für dieselbe M-Protein-Aminosäuresequenz kodiert, wie die M-Gen-cDNA-Sequenz für den vesikulären Stomatitis-Virus-Stamm M3 oder M4, wie in **Fig. 18** gezeigt.

30. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Virus eine G-Gen-Nukleinsäuresequenz aufweist, die für dieselbe G-Protein-Aminosäuresequenz kodiert, wie die G-Gen-cDNA-Sequenz für den vesikulären Stomatitis-Virus-Stamm M2, M3 oder M4, wie in **Fig. 20** gezeigt.

31. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Virus eine L-Gen-Nukleinsäuresequenz aufweist, die für dieselbe L-Protein-Aminosäuresequenz kodiert, wie die L-Gen-cDNA-Sequenz für den vesikulären Stomatitis-Virus-Stamm M2 oder M4, wie in **Fig. 22** gezeigt.

32. Isoliertes Nukleinsäure-Molekül mit einer Sequenz, umfassend:

- (a) eine Sequenz, die für ein Protein kodiert, umfassend die Aminosäuresequenz von Protein N des VSV-Stammes HR, wie in **Fig. 15** gezeigt; oder
- (b) die N-Gen-cDNA-Sequenz eines VSV-Stammes, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus HR, M2 und M3, wie in **Fig. 14** gezeigt; oder
- (c) eine RNA-Sequenz entsprechend (b); oder
- (d) eine Sequenz komplementär zu (a), (b) oder (c).

33. Isoliertes Nukleinsäure-Molekül mit einer Sequenz, umfassend:

- (a) eine Sequenz, die für ein Protein kodiert, umfassend die Aminosäuresequenz von Protein P des VSV-Stammes HR, wie in **Fig. 17** gezeigt; oder
- (b) die P-Gen-cDNA-Sequenz eines VSV-Stammes, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus HR und M3, wie in **Fig. 16** gezeigt; oder
- (c) eine RNA-Sequenz entsprechend (b); oder
- (d) eine Sequenz komplementär zu (a), (b) oder (c).

34. Isoliertes Nukleinsäure-Molekül mit einer Sequenz, umfassend:

- (a) eine Sequenz, die für ein Protein kodiert, umfassend die Aminosäuresequenz von Protein M eines VSV-Stammes, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus HR, M3 und M4, wie in **Fig. 19** gezeigt; oder
- (b) die M-Gen-cDNA-Sequenz eines VSV-Stammes, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus HR, M3 und M4, wie in **Fig. 18** gezeigt; oder
- (c) eine RNA-Sequenz entsprechend (b); oder
- (d) eine Sequenz komplementär zu (a), (b) oder (c).

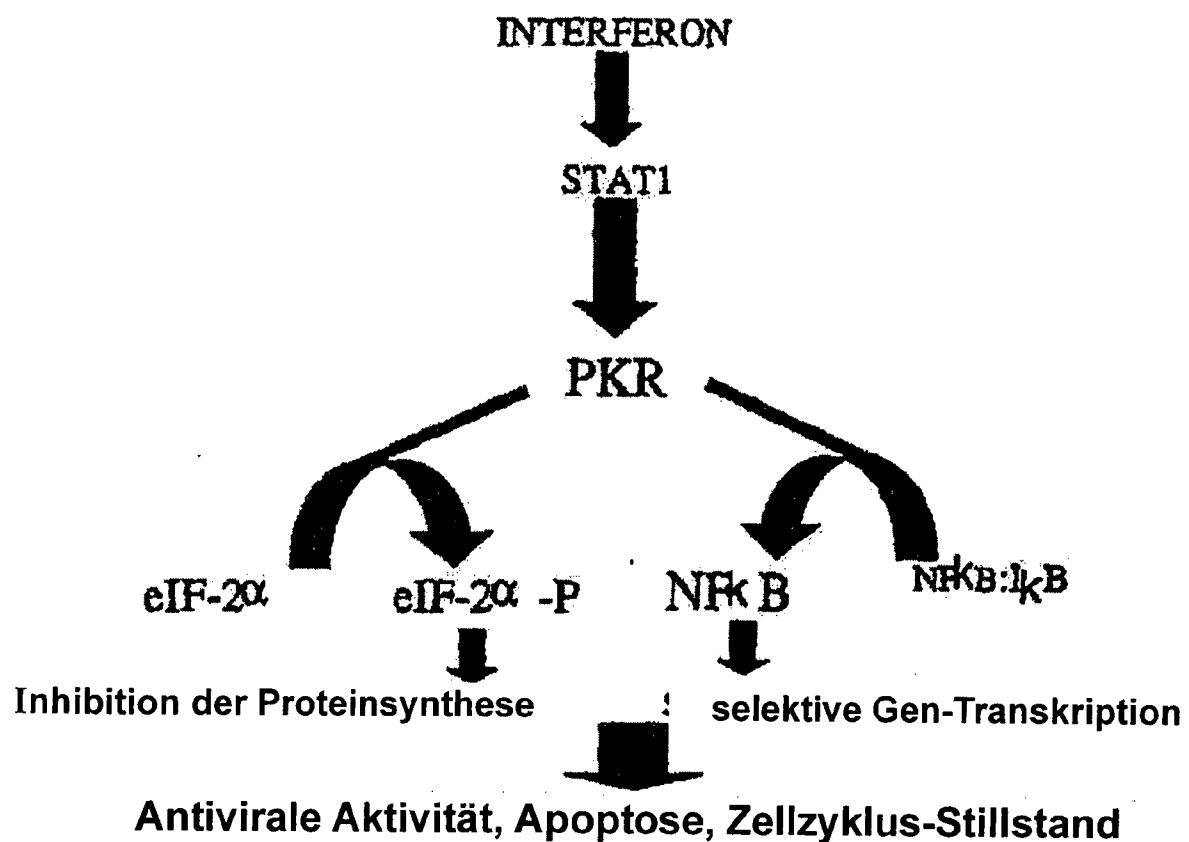
35. Isoliertes Nukleinsäure-Molekül mit einer Sequenz, umfassend:

- (a) eine Sequenz, die für ein Protein kodiert, umfassend die Aminosäuresequenz des Proteins G des VSV-Stammes M3, wie in **Fig. 21** gezeigt; oder
- (b) eine G-Gen-cDNA-Sequenz des VSV-Stammes M3, wie in **Fig. 20** gezeigt; oder
- (c) eine RNA-Sequenz entsprechend (b); oder
- (d) eine Sequenz komplementär zu (a), (b) oder (c).

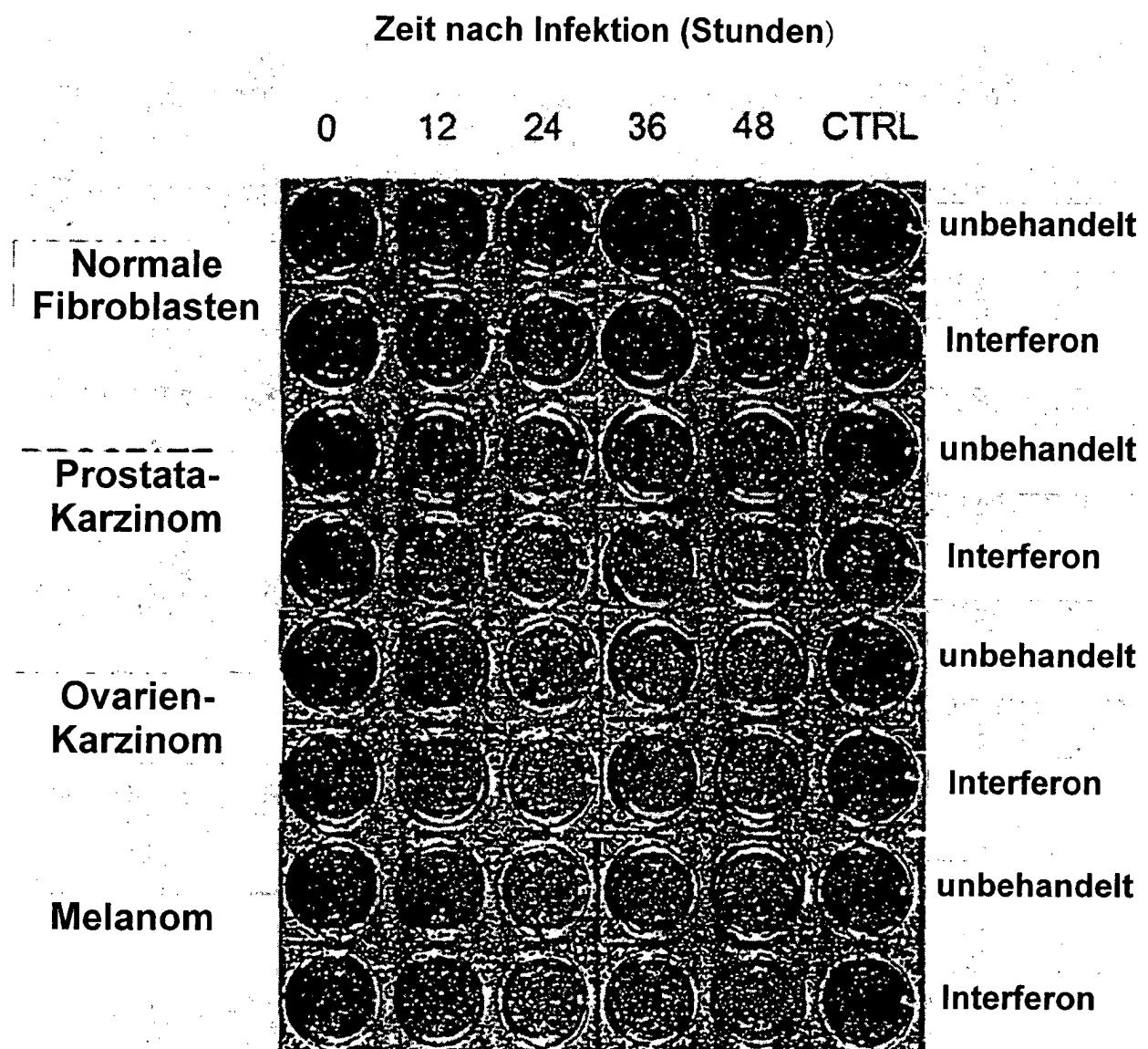
36. Isoliertes Nukleinsäure-Molekül mit einer Sequenz, umfassend:

- (a) eine Sequenz, die für ein Protein kodiert, umfassend die Aminosäuresequenz des Proteins L des VSV-Stammes M4, wie in **Fig. 23** gezeigt; oder
- (b) eine L-Gen-cDNA-Sequenz des VSV-Stammes M4, wie in **Fig. 22** gezeigt; oder
- (c) eine RNA-Sequenz entsprechend (b); oder
- (d) eine Sequenz komplementär zu (a), (b) oder (c).

Es folgen 49 Blatt Zeichnungen

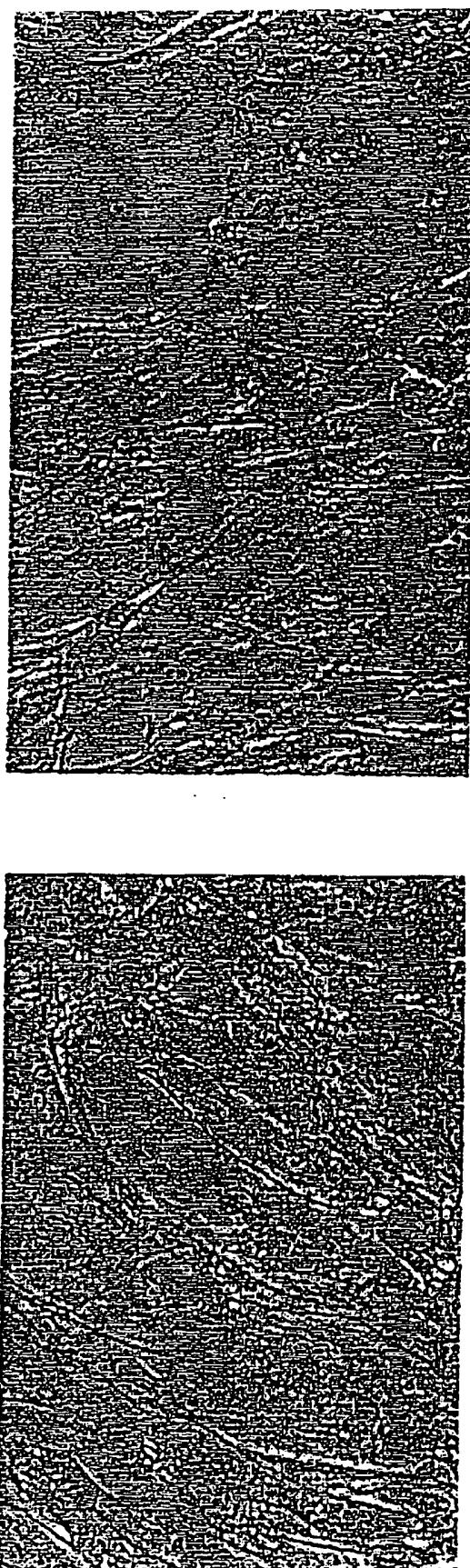


Figur 1



Figur 2

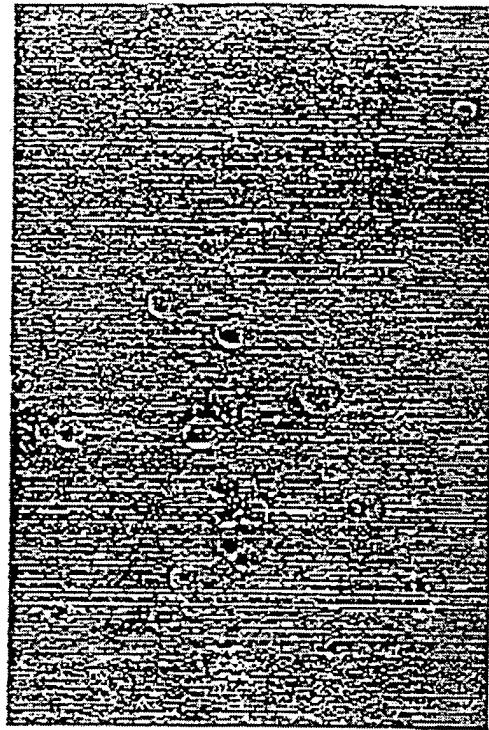
**VSV- Infektion von normalen
humanen Fibroblasten**



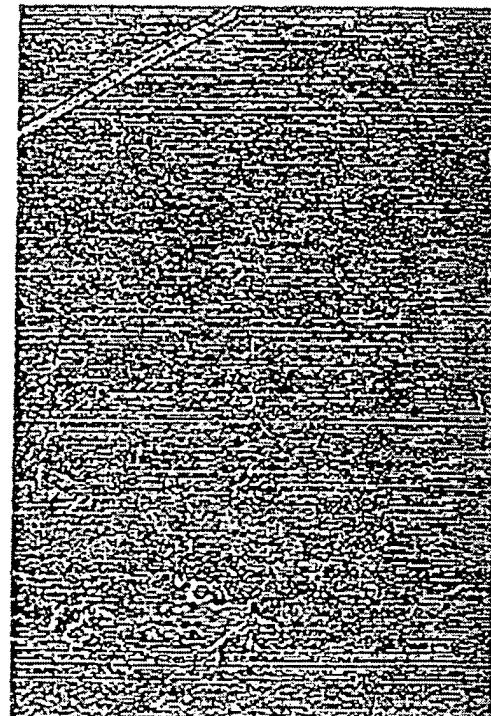
Schein- Infektion
VSV MOI 1pfu/18 Stunden

Figur 3A

VSV- Infektion von OVCAR 433



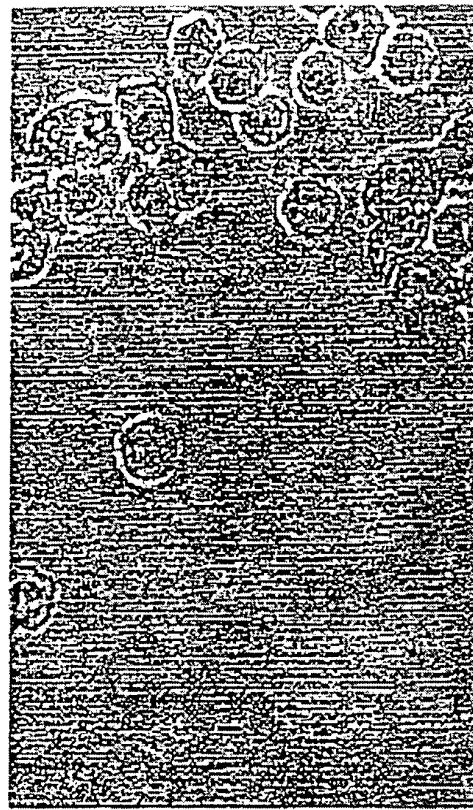
VSV 0,1 pfu/18 Stunden



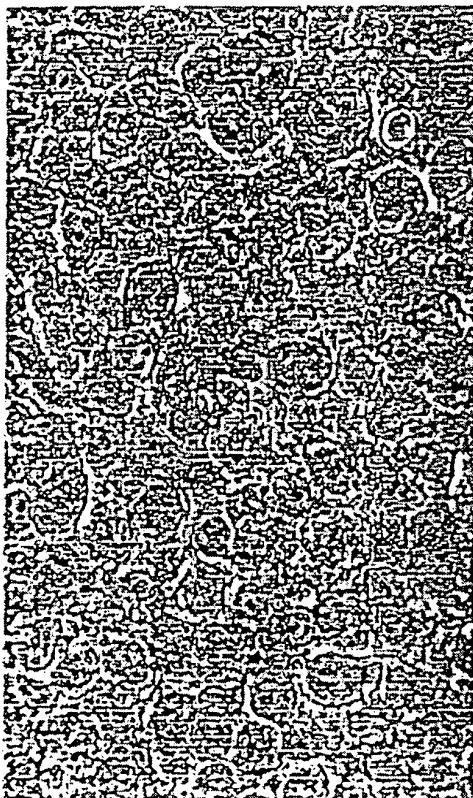
Schein- Infektion

Figur 3B

VSV- Infektion von KB-Zellen

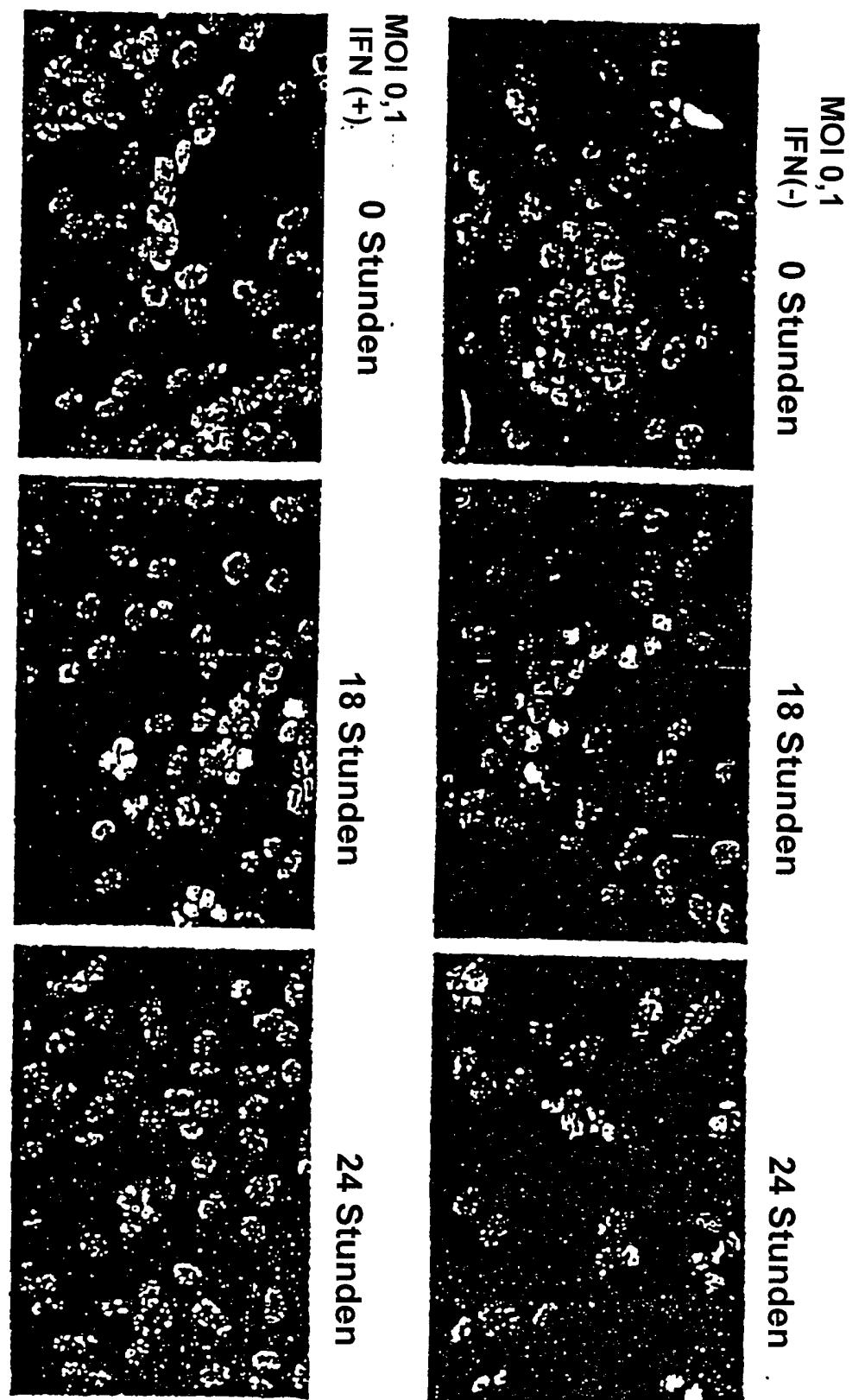


VSV Moi 1 pfu/18 Stunden



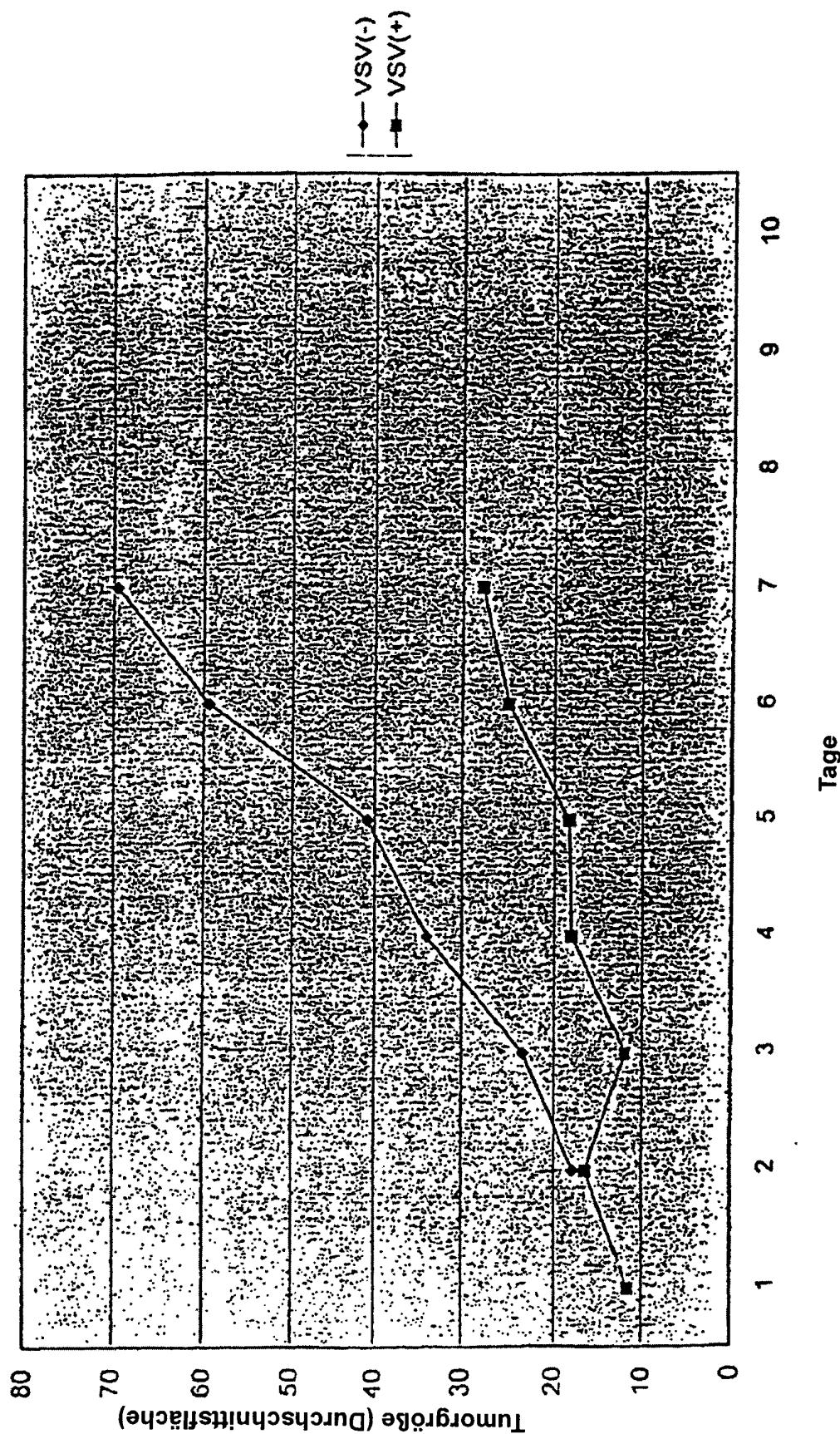
Schein-Infektion

Figur 3C

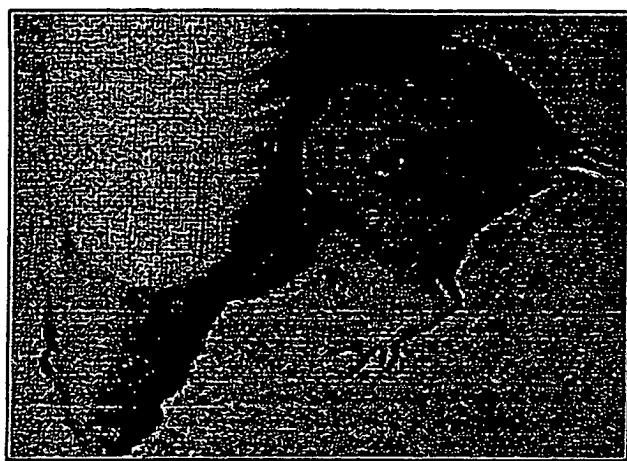


Figur 4

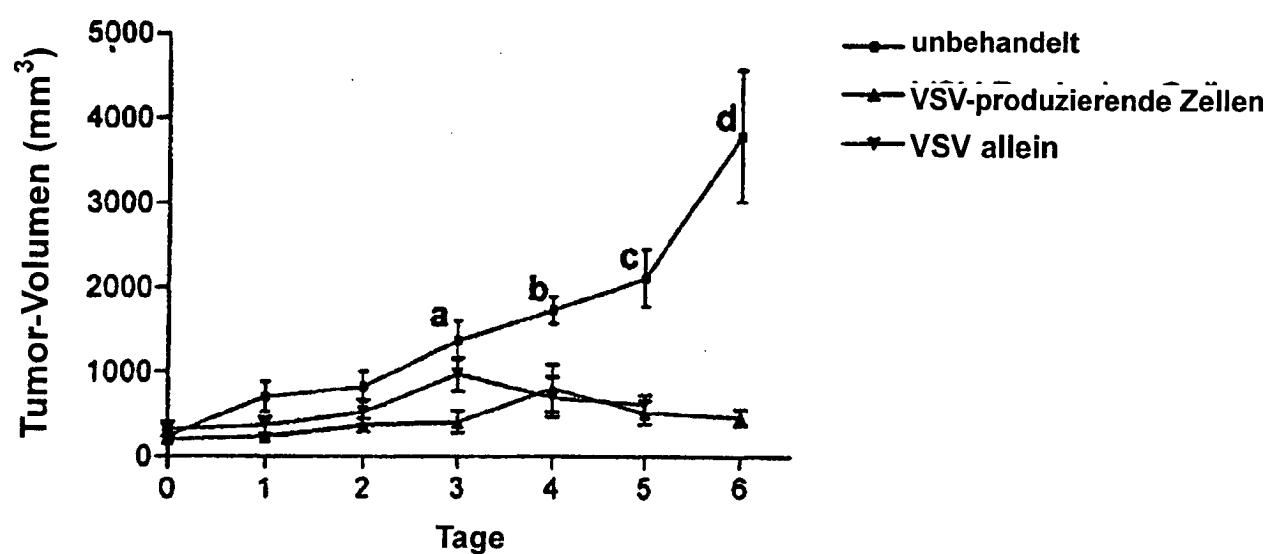
Nacktmaus-Tumoren



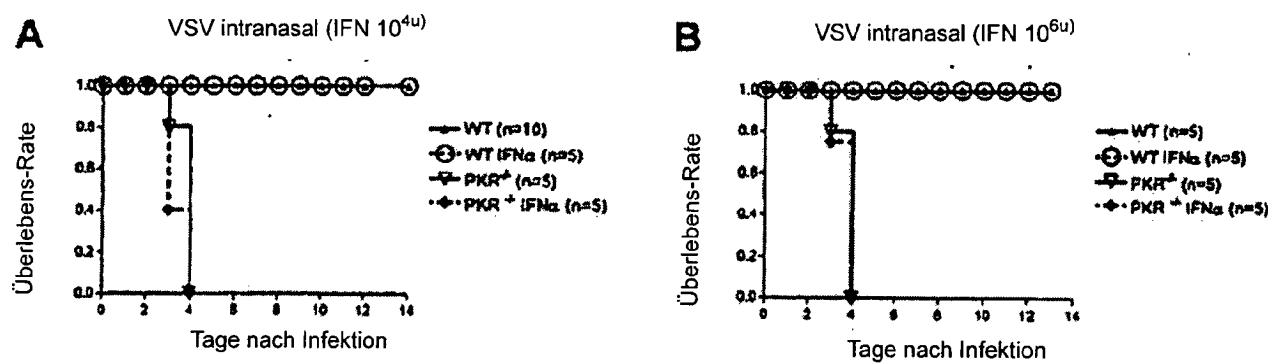
Figur 5



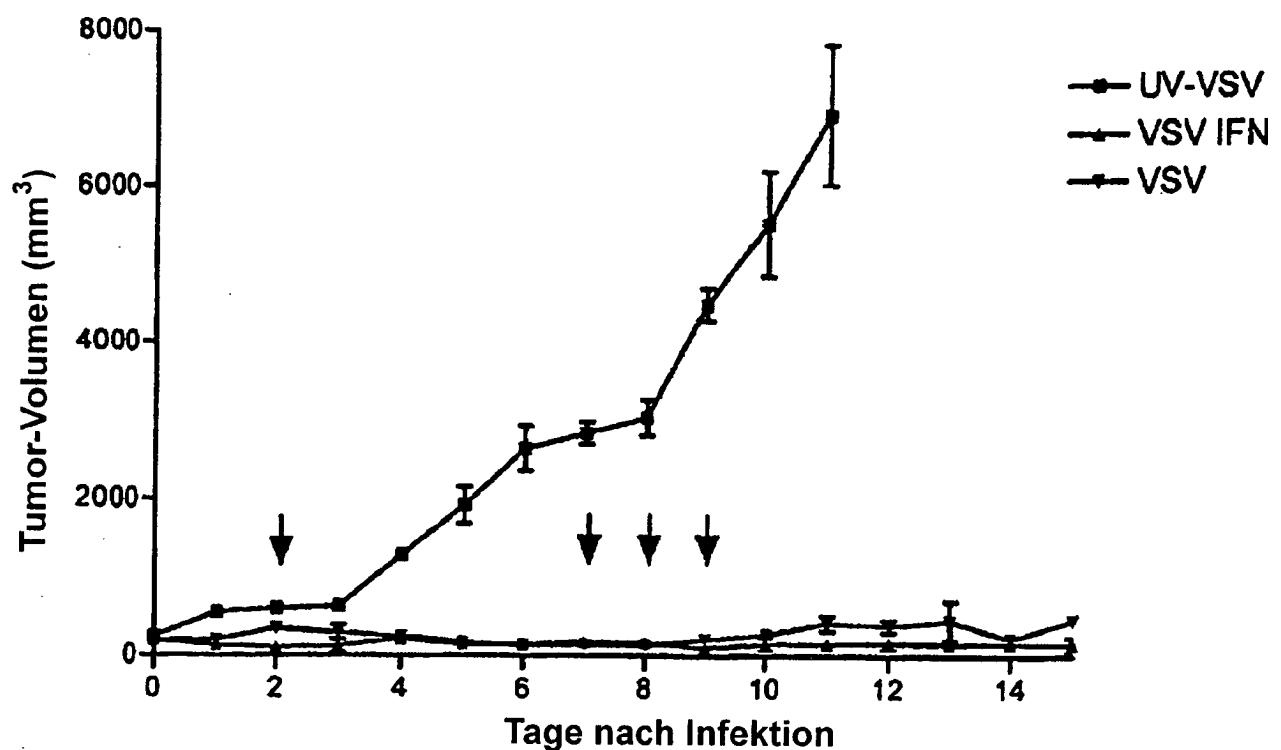
FIGUR 6



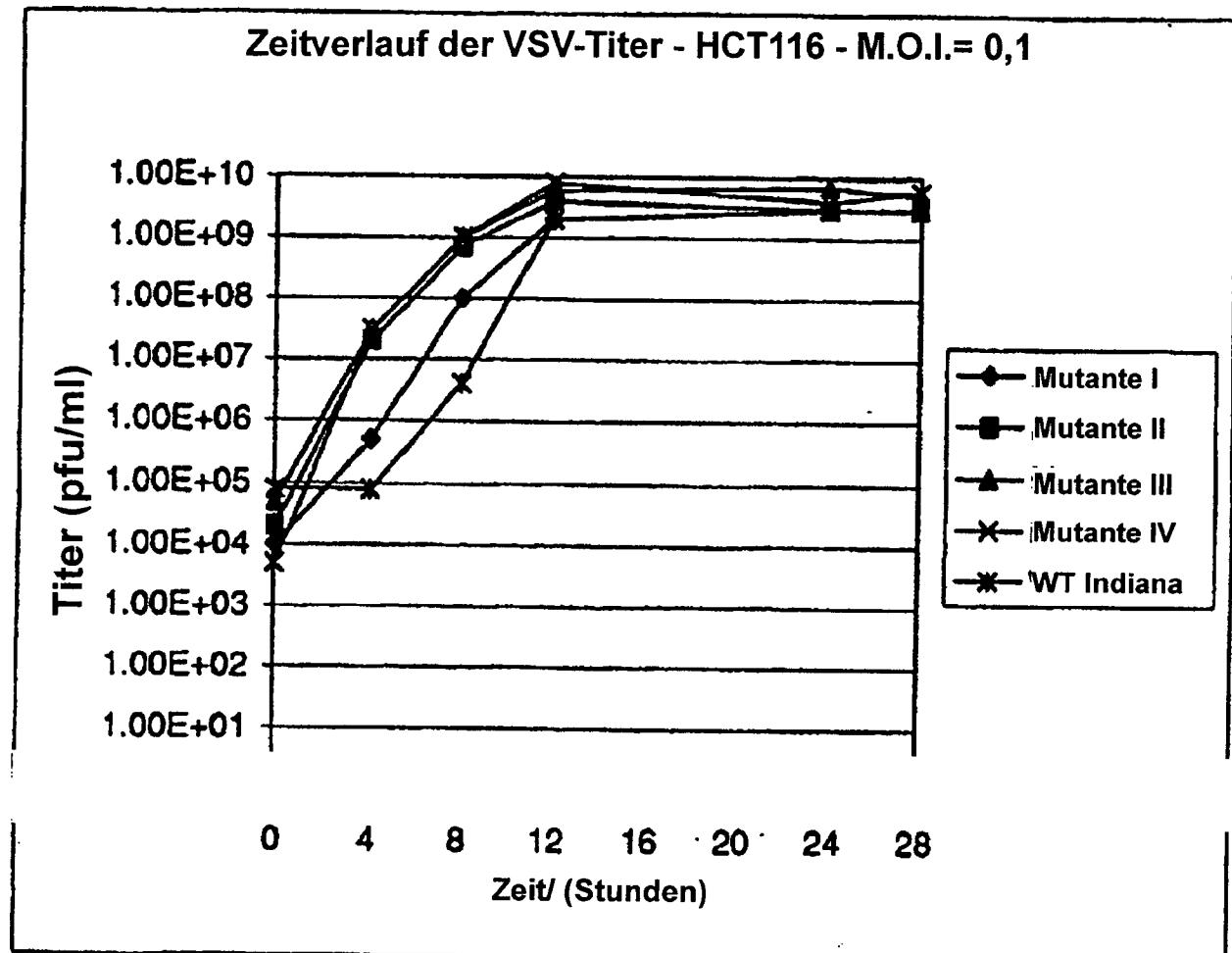
Figur 7



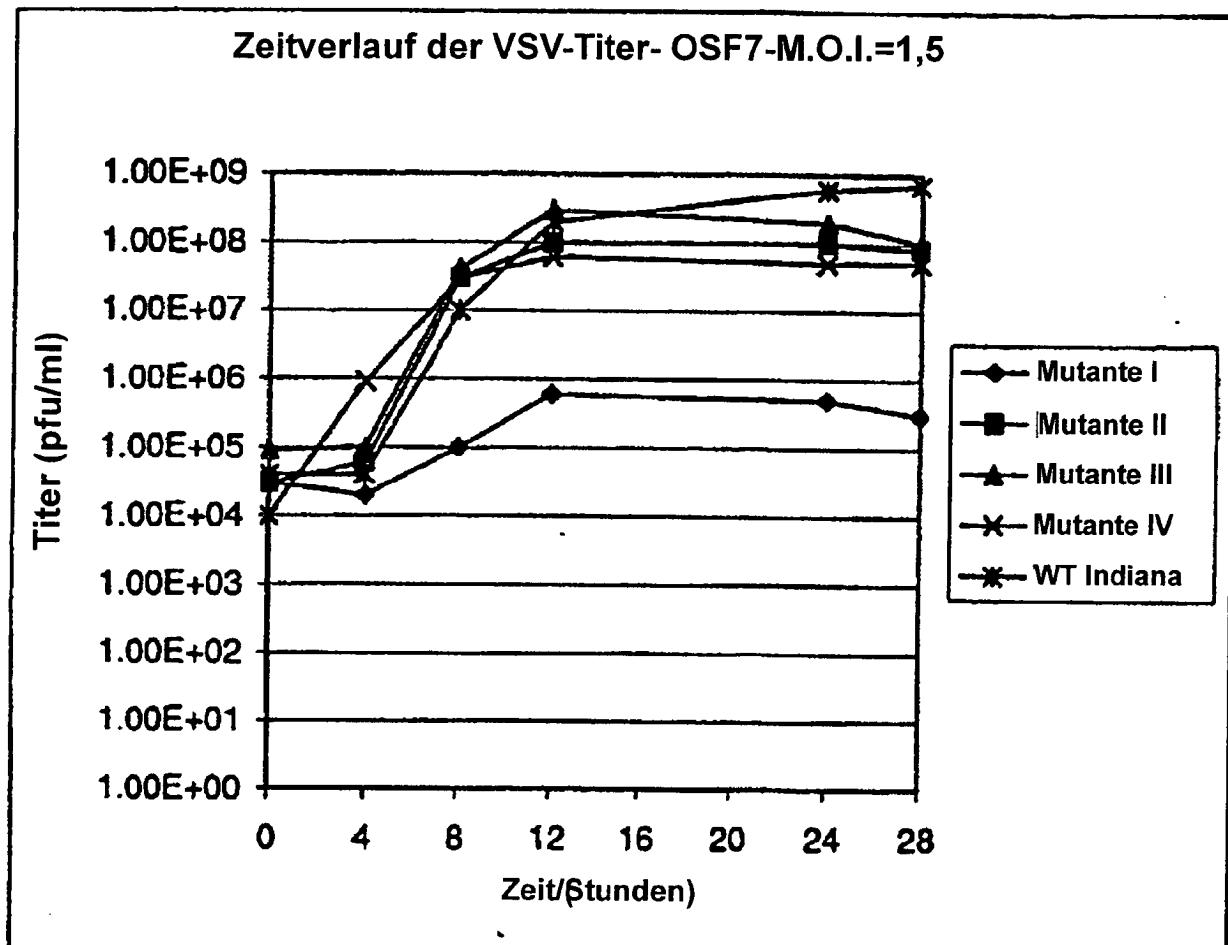
Figuren 8A und 8B



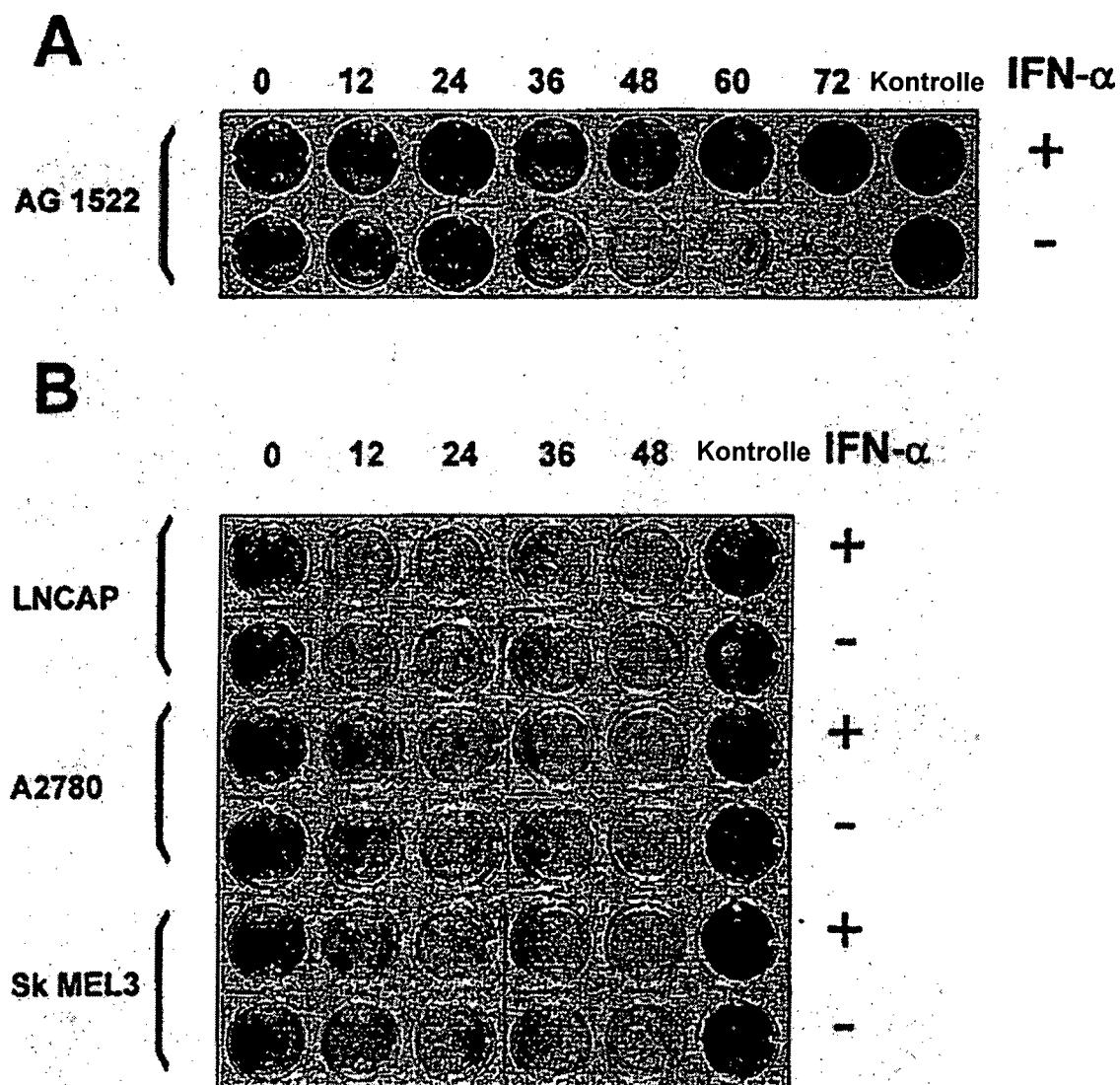
Figur 9



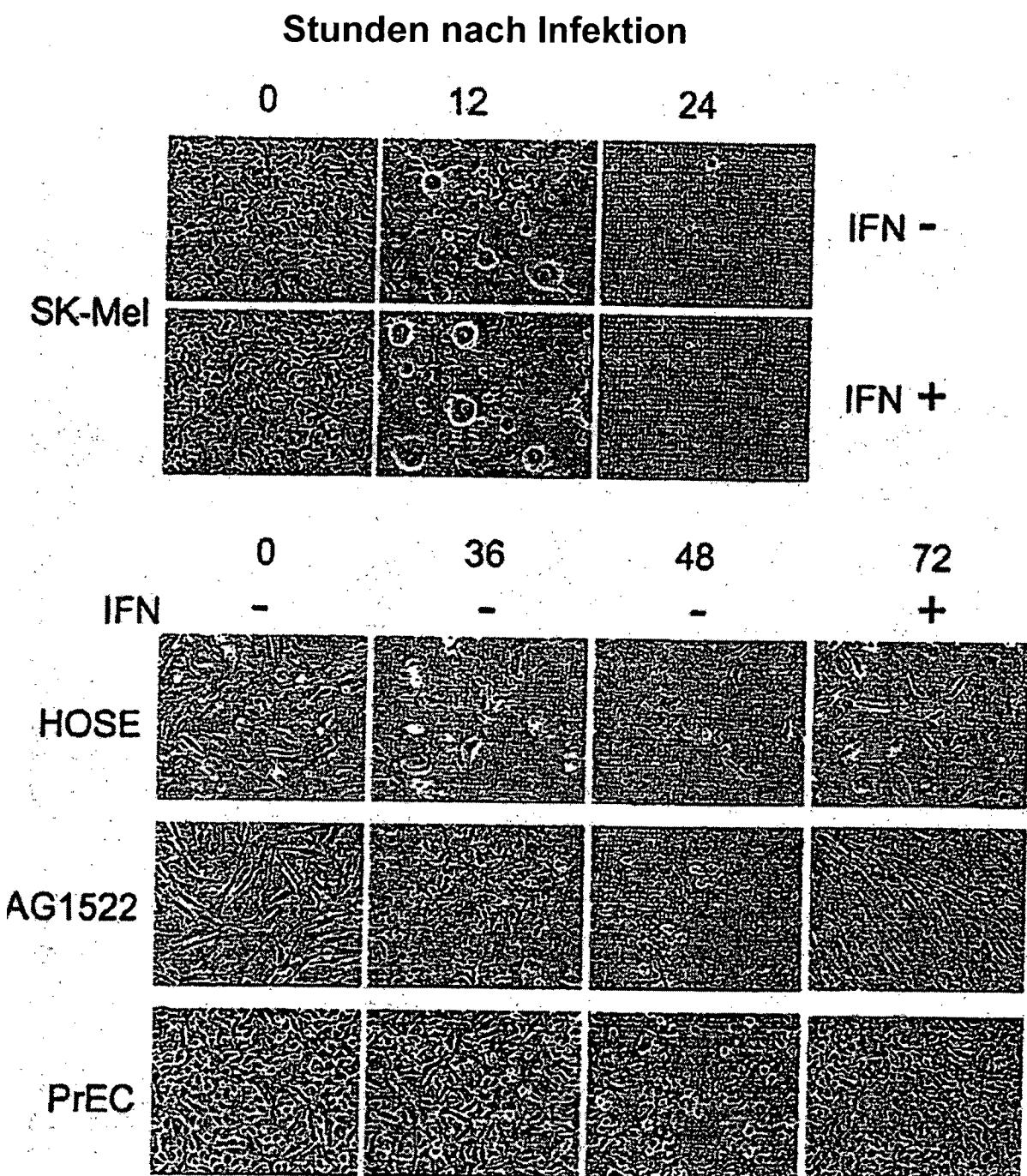
Figur 10A



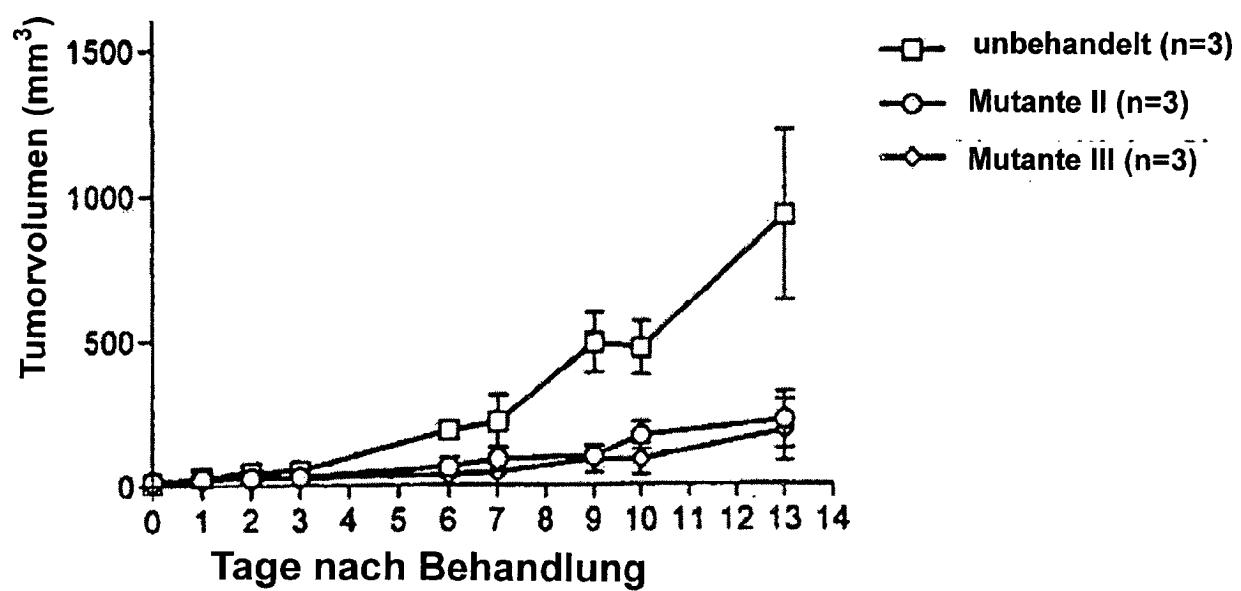
Figur 10B



Figur 11



Figur 12



Figur 13

GenBank	N	nucl.	1	ATGTCTGTTACAGTCAAGAGAACTATTGACAACACAGTCATAGTTCCAAAACCTTCCTGCA	60
HR	N	nucl.		ATGTCTGTTACAGTCAAGAGAACTATTGACAACACAGTCATAGTTCCAAAACCTTCCTGCA	
M2	N	nucl.		ATGTCTGTTACAGTCAAGAGAACTATTGACAACACAGTCATAGTTCCAAAACCTTCCTGCA	
M3	N	nucl.		ATGTCTGTTACAGTCAAGAGAACTATTGACAACACAGTCATAGTTCCAAAACCTTCCTGCA	
M4	N	nucl.		
GenBank	N	nucl.	61	AATGAGGATCCAGTGGAAATACCCGGCAGATTACTTCAGAAAATCAAAGGAGATTCCCTCT	120
HR	N	nucl.		AATGAGGATCCAGTGGAAATACCCGGCAGATTACTTCAGAAAATCAAAGGAGATTCCCTCT	
M2	N	nucl.		AATGAGGATCCAGTGGAAATACCCGGCAGATTACTTCAGAAAATCAAAGGAGATTCCCTCT	
M3	N	nucl.		AATGAGGATCCAGTGGAAATACCCGGCAGATTACTTCAGAAAATCAAAGGAGATTCCCTCT	
M4	N	nucl.		
GenBank	N	nucl.	121	TACATCAATACTACAAAAAGTTGTCAGATCTAACAGAGGATATGTCATCAAGGCCTCAA	180
HR	N	nucl.		TACATCAATACTACAAAAAGTTGTCAGATCTAACAGAGGATATGTCATCAAGGCCTCAA	
M2	N	nucl.		TACATCAATACTACAAAAAGTTGTCAGATCTAACAGAGGATATGTCATCAAGGCCTCAA	
M3	N	nucl.		TACATCAATACTACAAAAAGTTGTCAGATCTAACAGAGGATATGTCATCAAGGCCTCAA	
M4	N	nucl.		
GenBank	N	nucl.	181	TCCGGAAATGTATCAATCATACATGTCAACAGCTACTTGTATGGAGCATTGAAGGACATC	240
HR	N	nucl.		TCCGGAAATGTATCAATCATACATGTCAACAGCTACTTGTATGGAGCATTGAAGGACATC	
M2	N	nucl.		TCCGGAAATGTATCAATCATACATGTCAACAGCTACTTGTATGGAGCATTGAAGGACATC	
M3	N	nucl.		TCCGGAAATGTATCAATCATACATGTCAACAGCTACTTGTATGGAGCATTGAAGGACATC	
M4	N	nucl.	 TCAATCATACATGTCAACAGCTACTTGTATGGAGCATTGAAGGACATC	
GenBank	N	nucl.	241	CGGGGTAAGTGGATAAAGATTGGCAAGTTTGGAAATAAACATCGGGAAAGCAGGGAT	300
HR	N	nucl.		CGGGGTAAGTGGATAAAGATTGGCAAGTTTGGAAATAAACATCGGGAAAGCAGGGAT	
M2	N	nucl.		CGGGGTAAGTGGATAAAGATTGGCAAGTTTGGAAATAAACATCGGGAAAGCAGGGAT	
M3	N	nucl.		CGGGGTAAGTGGATAAAGATTGGCAAGTTTGGAAATAAACATCGGGAAAGCAGGGAT	
M4	N	nucl.		CGGGGTAAGTGGATAAAGATTGGCAAGTTTGGAAATAAACATCGGGAAAGCAGGGAT	
GenBank	N	nucl.	301	ACAATCGGAATATTTGACCTTGTATCCTTGAAAGCCCTGGACGGGTACTTCCAGATGGA	360
HR	N	nucl.		ACAATCGGAATATTTGACCTTGTATCCTTGAAAGCCCTGGACGGGTACTTCCAGATGGA	
M2	N	nucl.		ACAATCGGAATATTTGACCTTGTATCCTTGAAAGCCCTGGACGGGTACTTCCAGATGGA	
M3	N	nucl.		ACAATCGGAATATTTGACCTTGTATCCTTGAAAGCCCTGGACGGGTACTTCCAGATGGA	
M4	N	nucl.		ACAATCGGAATATTTGACCTTGTATCCTTGAAAGCCCTGGACGGGTACTTCCAGATGGA	
GenBank	N	nucl.	361	GTATCGGATGCTTCCAGAACCGCGCAGATGACAATGGTTGCCTTGTATCTACTTGGC	420
HR	N	nucl.		GTATCGGATGCTTCCAGAACCGCGCAGATGACAATGGTTGCCTTGTATCTACTTGGC	
M2	N	nucl.		GTATCGGATGCTTCCAGAACCGCGCAGATGACAATGGTTGCCTTGTATCTACTTGGC	
M3	N	nucl.		GTATCGGATGCTTCCAGAACCGCGCAGATGACAATGGTTGCCTTGTATCTACTTGGC	
M4	N	nucl.		GTATCGGATGCTTCCAGAACCGCGCAGATGACAATGGTTGCCTTGTATCTACTTGGC	
GenBank	N	nucl.	421	TTATACAGAGTGGGCAGAACACAAATGCCCTGAATACAGAAAAAGCTCATGGATGGCTG	480
HR	N	nucl.		TTATACAGAGTGGGCAGAACACAAATGCCCTGAATACAGAAAAAGCTCATGGATGGCTG	
M2	N	nucl.		TTATACAGAGTGGGCAGAACACAAATGCCCTGAATACAGAAAAAGCTCATGGATGGCTG	
M3	N	nucl.		TTATACAGAGTGGGCAGAACACAAATGCCCTGAATACAGAAAAAGCTCATGGATGGCTG	
M4	N	nucl.		TTATACAGAGTGGGCAGAACACAAATGCCCTGAATACAGAAAAAGCTCATGGATGGCTG	

FIGURE 14-1

GenBank N nucl.	481	540
HR N nucl.	ACAAATCAATGCAAAATGATCAATGAACAGTTAACCTCTGTGCCAGAAGGTGCGAC	
M2 N nucl.	ACAAATCAATGCAAAATGATCAATGAACAGTTAACCTCTGTGCCAGAAGGTGCGAC	
M3 N nucl.	ACAAATCAATGCAAAATGATCAATGAACAGTTAACCTCTGTGCCAGAAGGTGCGAC	
M4 N nucl.	ACAAATCAATGCAAAATGATCAATGAACAGTTAACCTCTGTGCCAGAAGGTGCGAC	
GenBank N nucl.	541	600
HR N nucl.	ATTTTGATGTGTGGGGAAATGACAGTAATTACACAAAAATTGTCGTCAGTGGACATG	
M2 N nucl.	ATTTTGATGTGTGGGGAAATGACAGTAATTACACAAAAATTGTCGTCAGTGGACATG	
M3 N nucl.	ATTTTGATGTGTGGGGAAATGACAGTAATTACACAAAAATTGTCGTCAGTGGACATG	
M4 N nucl.	ATTTTGATGTGTGGGGAAATGACAGTAATTACACAAAAATTGTCGTCAGTGGACATG	
GenBank N nucl.	601	660
HR N nucl.	TTCTTCCACATGTTCAAAAAACATGAATGTGCCCTCGTTCAAGATAACGAACTATTGTTCC	
M2 N nucl.	TTCTTCCACATGTTCAAAAAACATGAATGTGCCCTCGTTCAAGATAACGAACTATTGTTCC	
M3 N nucl.	TTCTTCCACATGTTCAAAAAACATGAATGTGCCCTCGTTCAAGATAACGAACTATTGTTCC	
M4 N nucl.	TTCTTCCACATGTTCAAAAAACATGAATGTGCCCTCGTTCAAGATAACGAACTATTGTTCC	
GenBank N nucl.	661	720
HR N nucl.	AGATTCAAAGATTGTGCTGCATTGGCAACATTGGACACCTCTGCAAAATAACCGGAATG	
M2 N nucl.	AGATTCAAAGATTGTGCTGCATTGGCAACATTGGACACCTCTGCAAAATAACCGGAATG	
M3 N nucl.	AGATTCAAAGATTGTGCTGCATTGGCAACATTGGACACCTCTGCAAAATAACCGGAATG	
M4 N nucl.	AGATTCAAAGATTGTGCTGCATTGGCAACATTGGACACCTCTGCAAAATAACCGGAATG	
GenBank N nucl.	721	780
HR N nucl.	TCTACAGAAGATGTAACGACCTGGATCTGAACCGAGAAGTTGCAGATGCAATGGTCCAA	
M2 N nucl.	TCTACAGAAGATGTAACGACCTGGATCTGAACCGAGAAGTTGCAGATGAGATGGTCCAA	
M3 N nucl.	TCTACAGAAGATGTAACGACCTGGATCTGAACCGAGAAGTTGCAGATGAGATGGTCCAA	
M4 N nucl.	TCTACAGAAGATGTAACGACCTGGATCTGAACCGAGAAGTTGCAGATGAGATGGTCCAA	
GenBank N nucl.	781	840
HR N nucl.	ATGATGCTTCCAGGCCAAGAAATTGACAAGGCCGATTCATACATGCCTTATTGATCGAC	
M2 N nucl.	ATGATGCTTCCAGGCCAAGAAATTGACAAGGCCGATTCATACATGCCTTATTGATCGAC	
M3 N nucl.	ATGATGCTTCCAGGCCAAGAAATTGACAAGGCCGATTCATACATGCCTTATTGATCGAC	
M4 N nucl.	ATGATGCTTCCAGGCCAAGAAATTGACAAGGCCGATTCATACATGCCTTATTGATCGAC	
GenBank N nucl.	841	900
HR N nucl.	TTTGGATTGTCTTCTAAGTCTCCATTCTCCGTCAAAACCTGCCTTCCACTCTGG	
M2 N nucl.	TTTGGATTGTCTTCTAAGTCTCCATTCTCCGTCAAAACCTGCCTTCCACTCTGG	
M3 N nucl.	TTTGGATTGTCTTCTAAGTCTCCATTCTCCGTCAAAACCTGCCTTCCACTCTGG	
M4 N nucl.	TTTGGATTGTCTTCTAAGTCTCCATTCTCCGTCAAAACCTGCCTTCCACTCTGG	

FIGUR 14-2

GenBank N nucl.	901	960
HR N nucl.	GGGCAATTGACAGCTTCTGCTCAGATCCACCAGAGCAAGGAATGCCGACAGCCTGAT	
M2 N nucl.	GGGCAATTGACAGCTTCTGCTCAGATCCACCAGAGCAAGGAATGCCGACAGCCTGAT	
M3 N nucl.	GGGCAATTGACAGCTTCTGCTCAGATCCACCAGAGCAAGGAATGCCGACAGCCTGAT	
M4 N nucl.	GGGCAATTGAC....	T
GenBank N nucl.	961	1020
HR N nucl.	GACATTGAGTATACTCTTACTACAGCAGGTTGTTGACGTTATGCAGTAGGATCC	
M2 N nucl.	GACATTGAGTATACTCTTACTACAGCAGGTTGTTGACGTTATGCAGTAGGATCC	
M3 N nucl.	GACATTGAGTATACTCTTACTACAGCAGGTTGTTGACGTTATGCAGTAGGATCC	
M4 N nucl.	GACATTGAGTATACTCTTACTACAGCAGGTTGTTGACGTTATGCAGTAGGATCC	
GenBank N nucl.	1021	1080
HR N nucl.	TCTGCCTGACCTGGCACAACAGTTTGTTGGAGATA	
M2 N nucl.	TCTGCTGACCTGGCACAACAGTTTGTTGGAGATA	
M3 N nucl.	TCTGCTGACCTGGCACAACAGTTTGTTGGAGATA	
M4 N nucl.	TCTGCTGACCTGGCACAACAGTTTGTTGGAGATA	
GenBank N nucl.	1081	1140
HR N nucl.	ACCGGAGGATTGACGACTAATGCACCGCCACAAGGCAGAGATGTGGTCGAATGGCTCGGA	
M2 N nucl.	ACCGGAGGATTGACGACTAATGCACCGCCACAAGGCAGAGATGTGGTCGAATGGCTCGGA	
M3 N nucl.	ACCGGAGGATTGACGACTAATGCACCGCCACAAGGCAGAGATGTGGTCGAATGGCTCGGA	
M4 N nucl.	ACCGGAGGATTGACGACTAATGCACCGCCACAAGGCAGAGATGTGGTCGAATGGCTCGGA	
GenBank N nucl.	1141	1200
HR N nucl.	TGGTTTGAAAGATCAAAACAGAAAACCGACTCCTGATATGATGCAGTATGCCAA	
M2 N nucl.	TGGTTTGAAAGATCAAAACAGAAAACCGACTCCTGATATGATGCAGTATGCCAA	
M3 N nucl.	TGGTTTGAAAGATCAAAACAGAAAACCGACTCCTGATATGATGCAGTATGCCAA	
M4 N nucl.	TGGTTTGAAAGATCAAAACAGAAAACCGACTCCTGATATGATGCAGTATGCCAA	
GenBank N nucl.	1201	1260
HR N nucl.	GTCATGTCACTGCAAGGCCTAACAGAGAGACAATTGCAAGTATGCTAAGTCAGAATT	
M2 N nucl.	GTCATGTCACTGCAAGGCCTAACAGAGAGACAATTGCAAGTATGCTAAGTCAGAATT	
M3 N nucl.	GTCATGTCACTGCAAGGCCTAACAGAGAGACAATTGCAAGTATGCTAAGTCAGAATT	
M4 N nucl.	GTCATGTCACTGCAAGGCCTAACAGAGAGACAATTGCAAGTATGCTAAGTCAGAATT	
GenBank N nucl.	1261 1269	
HR N nucl.	GACAAATGA	
M2 N nucl.	GACAAATGA	
M3 N nucl.	GACAAATGA	
M4 N nucl.	GACAAATGA	

FIGUR 14-3

1 60
 GenBank N a.a. MSVTVKRIIDNTVIVPKL PANEDPVEYPADYFRKSKEIPLYINTTKSLSDLRGYVYQGLK
 HR N a.a. MSVTVKRIIDNTVIVPKL PANEDPVEYPADYFRKSKEIPLYINTTKSLSDLRGYVYQGLK
 M3 N a.a. MSVTVKRIIDNTVIVPKL PANEDPVEYPADYFRKSKEIPLYINTTKSLSDLRGYVYQGLK
 M4 N a.a.

61 120
 GenBank N a.a. SGNVSIIVNSYLYGALKDIRGKLDKDWSFGINIGKAGDTIGIFDLVSLKALDGVLPDG
 HR N a.a. SGNVSIIVNSYLYGALKDIRGKLDKDWSFGINIGKAGDTIGIFDLVSLKALDGVLPDG
 M3 N a.a. SGNVSIIVNSYLYGALKDIRGKLDKDWSFGINIGKAGDTIGIFDLVSLKALDGVLPDG
 M4 N a.a.SIIHVNSYLYGALKDIRGKLDKDWSFGINIGKAGDTIGIFDLVSLKALDGVLPDG

121 180
 GenBank N a.a. VSDASRTSADDKWLPLYLLGLYRVRGRTQMPEYRKRLMDGLTNQCKMINEQFEPLVPEGRD
 HR N a.a. VSDASRTSADDKWLPLYLLGLYRVRGRTQMPEYRKRLMDGLTNQCKMINEQFEPLVPEGRD
 M3 N a.a. VSDASRTSADDKWLPLYLLGLYRVRGRTQMPEYRKRLMDGLTNQCKMINEQFEPLVPEGRD
 M4 N a.a. VSDASRTSADDKWLPLYLLGLYRVRGRTQMPEYRKRLMDGLTNQCKMINEQFEPLVPEGRD

181 240
 GenBank N a.a. IFDVWGNDNSNYTKIVAAVDMFFHMFKKHECASFRYGTIVSRFKDCAALATFGHLCKITGM
 HR N a.a. IFDVWGNDNSNYTKIVAAVDMFFHMFKKHECASFRYGTIVSRFKDCAALATFGHLCKITGM
 M3 N a.a. IFDVWGNDNSNYTKIVAAVDMFFHMFKKHECASFRYGTIVSRFKDCAALATFGHLCKITGM
 M4 N a.a. IFDVWGNDNSNYTKIVAAVDMFFHMFKKHECASFRYGTIVSRFKDCAALATFGHLCKITGM

241 300
 GenBank N a.a. STEDVTTWILNREVADEMVOQMLPGQEIDKADSYMPYLIDFGLSSKSPYSSVKNPAHFW
 HR N a.a. STEDVTTWILNREVADEMVOQMLPGQEIDKADSYMPYLIDFGLSSKSPYSSVKNPAHFW
 M3 N a.a. STEDVTTWILNREVADEMVOQMLPGQEIDKADSYMPYLIDFGLSSKSPYSSVKNPAHFW
 M4 N a.a. STEDVTTWILNREVADEMVOQMLPGQEIDKADSYMPYLIDFGLSSKSPYSSVKNPAHFW

301 360
 GenBank N a.a. GQLTALLLRSTRARNARQPDDIEYTSLTAGLLYAYAVGSSADLAQQFCVGDSKYTPDDS
 HR N a.a. GQLTALLLRSTRARNARQPDDIEYTSLTAGLLYAYAVGSSADLAQQFCVGDSSKYTPDDS
 M3 N a.a. GQLTALLLRSTRARNARQPDDIEYTSLTAGLLYAYAVGSSADLAQQFCVGDSSKYTPDDS
 M4 N a.a. GQLT....DIEYTSLTAGLLYAYAVGSSADLAQQFCVGDSSKYTPDDS

361 420
 GenBank N a.a. TGGLTTNAPPQGRDVVEWLGFEDQNRKPTPDMMQYAKRAVMSLQGLREKTIGKYAKSEF
 HR N a.a. TGGLTTNAPPQGRDVVEWLGFEDQNRKPTPDMMQYAKRAVMSLQGLREKTIGKYAKSEF
 M3 N a.a. TGGLTTNAPPQGRDVVEWLGFEDQNRKPTPDMMQYAKRAVMSLQGLREKTIGKYAKSEF
 M4 N a.a. TGGLTTNAPPQGRDVVEWLGFEDQNRKPTPDMMQYAKRAVMSLQGLREKTIGKYAKSEF

421 423
 GenBank N a.a. DK.
 HR N a.a. DK.
 M3 N a.a. DK.
 M4 N a.a. DK.

FIGUR 15

GenBank P nucl.	1	ATGGATAATCTCACAAAAGTCGTGAGTATCTCAAGTCCTATTCTCGTCTGATCAGGCG	60
HR P nucl.		ATGGATAATCTCACAAAAGTCGTGAGTATCTCAAGTCCTATTCTCGTCTGATCAGGCG	
M2 P nucl.		ATGGATAATCTCACAAAAGTCGTGAGTATCTCAAGTCCTATTCTCGTCTGATCAGGCG	
M3 P nucl.		ATGGATAATCTCACAAAAGTCGTGAGTATCTCAAGTCCTATTCTCGTCTGATCAGGCG	
M4 P nucl.		ATGGATAATCTCACAAAAGTCGTGAGTATCTCAAGTCCTATTCTCGTCTGATCAGGCG	
GenBank P nucl.	61	GTAGGAGAGATAGATGAGATCGAACGACAACGAGCTGAAAAGTCCAATTATGAGTTGTT	120
HR P nucl.		GTAGGAGAGATAGATGAGATCGAACGACAACGAGCTGAAAAGTCCAATTATGAGTTGTT	
M2 P nucl.		GTAGGAGAGATAGATGAGATCGAACGACAACGAGCTGAAAAGTCCAATTATGAGTTGTT	
M3 P nucl.		GTAGGAGAGATAGATGAGATCGAACGACAACGAGCTGAAAAGTCCAATTATGAGTTGTT	
M4 P nucl.		GTAGGAGAGATAGATGAGATCGAACGACAACGAGCTGAAAAGTCCAATTATGAGTTGTT	
GenBank P nucl.	121	CAAGAGGA T GGAGTGGAAAGAGCATACTA A GGCCCTCTTATTTCAGGCAGCAGATGATTCT	180
HR P nucl.		CAAGAGGACGGAGTGGAAAGAGCATACTAGGCCCTCTTATTTCAGGCAGCAGATGATTCT	
M2 P nucl.		CAAGAGGACGGAGTGGAAAGAGCATACTAGGCCCTCTTATTTCAGGCAGCAGATGATTCT	
M3 P nucl.		CAAGAGGACGGAGTGGAAAGAGCATACTAGGCCCTCTTATTTCAGGCAGCAGATGATTCT	
M4 P nucl.		CAAGAGGACGGAGTGGAAAGAGCATACTAGGCCCTCTTATTTCAGGCAGCAGATGATTCT	
GenBank P nucl.	181	GACACAGAAC T CTGAACCAGAAATTGAAGACAA T CAAGG T TTGTATG A CG A GGATCC G AA	240
HR P nucl.		GACACAGAAC T CTGAACCAGAAATTGAAGACAA T CAAGG T TTGTATG A CCAGATCCGGAA	
M2 P nucl.		GACACAGAAC T CTGAACCAGAAATTGAAGACAA T CAAGG T TTGTATG A CCAGATCCGGAA	
M3 P nucl.		GACACAGAAC T CTGAACCAGAAATTGAAGACAA T CAAGG T TTGTATG A CCAGATCCGGAA	
M4 P nucl.		GACACAGAAC T CTGAACCAGAAATTGAAGACAA T CAAGG T TTGTATG A CCAGATCCGGAA	
GenBank P nucl.	241	GCTGAGCAAGTTGAAGGCTTTATACAGGGCCTT T AGATGACTATG C GATGAGGA T G	300
HR P nucl.		GCTGAGCAAGTTGAAGGCTTTATACAGGGCCTT T AGATGACTATGCGGATGAGGACGTG	
M2 P nucl.		GCTGAGCAAGTTGAAGGCTTTATACAGGGCCTT T AGATGACTATGCGGATGAGGACGTG	
M3 P nucl.		GCTGAGCAAGTTGAAGGCTTTATACAGGGCCTT T AGATGACTATGCGGATGAGGACGTG	
M4 P nucl.		GCTGAGCAAGTTGAAGGCTTTATACAGGGCCTT T AGATGACTATGCGGATGAGGACGTG	
GenBank P nucl.	301	GATGTTGTATT T ACTTCGGACTGGAAAC C CTGAGCTTGAATC G ACGGAGCATGGAAAG	360
HR P nucl.		GATGTTGTATT T ACTTCGGACTGGAAACAGCCTGAGCTTGAATCCGACGAGCATGGAAAG	
M2 P nucl.		GATGTTGTATT T ACTTCGGACTGGAAACAGCCTGAGCTTGAATCCGACGAGCATGGAAAG	
M3 P nucl.		GATGTTGTATT T ACTTCGGACTGGAAACAGCCTGAGCTTGAATCCGACGAGCATGGAAAG	
M4 P nucl.		GATGTTGTATT T ACTTCGGACTGGAAACAGCCTGAGCTTGAATCCGACGAGCATGGAAAG	
GenBank P nucl.	361	ACCTTACGGTTGACAT G CCAGAGGGTTAAGTGGAGAGCAGAAATCC C AGTGGCTTT G	420
HR P nucl.		ACCTTACGGTTGACAT G CCAGAGGGTTAAGTGGAGAGCAGAAATCC C AGTGGCTTT G	
M2 P nucl.		ACCTTACGGTTGACAT G CCAGAGGGTTAAGTGGAGAGCAGAAATCC C AGTGGCTTT G	
M3 P nucl.		ACCTTACGGTTGACAT G CCAGAGGGTTAAGTGGAGAGCAGAAATCC C AGTGGCTTT G	
M4 P nucl.		ACCTTACGGTTGACAT G CCAGAGGGTTAAGTGGAGAGCAGAAATCC C AGTGGCTTT G	

FIGUR. 16-1

GenBank	P	nucl.	421	ACGATTAAGCAGTCGTCAAAGTGCACAACTGGAAATCTGGCAGAGTCACATTGAA	480
HR	P	nucl.		ACGATTAAGCAGTCGTCAAAGTGCACAACTGGAAATCTGGCAGAGTCACATTGAA	
M2	P	nucl.		ACGATTAAGCAGTCGTCAAAGTGCACAACTGGAAATCTGGCAGAGTCACATTGAA	
M3	P	nucl.		ACGATTAAGCAGTCGTCAAAGTGCACAACTGGAAATCTGGCAGAGTCACATTGAA	
M4	P	nucl.		ACGATTAAGCAGTCGTCAAAGTGCACAACTGGAAATCTGGCAGAGTCACATTGAA	
GenBank	P	nucl.	481	GCATCGGGAGAAGGGGTCAATCGAGCGCCAGATAACTCCGGATGTATATAAGGTC	540
HR	P	nucl.		GCATCGGGAGAAGGGGTCAATCGAGCGCCAGATAACTCCGGATGTATATAAGGTC	
M2	P	nucl.		GCATCGGGAGAAGGGGTCAATCGAGCGCCAGATAACTCCGGATGTATATAAGGTC	
M3	P	nucl.		GCATCGGGAGAAGGGGTCAATCGAGCGCCAGATAACTCCGGATGTATATAAGGTC	
M4	P	nucl.		GCATCGGGAGAAGGGGTCAATCGAGCGCCAGATAACTCCGGATGTATATAAGGTC	
GenBank	P	nucl.	541	ACTCCAGTGATGAACACACATCCGTCCAATCAGAAGCGTATCAGATGTTGGTCTCTC	600
HR	P	nucl.		ACTCCAGTGATGAACACACATCCGTCCAATCAGAAGCGTATCAGATGTTGGTCTCTC	
M2	P	nucl.		ACTCCAGTGATGAACACACATCCGTCCAATCAGAAGCGTATCAGATGTTGGTCTCTC	
M3	P	nucl.		ACTCCAGTGATGAACACACATCCGTCCAATCAGAAGCGTATCAGATGTTGGTCTCTC	
M4	P	nucl.		ACTCCAGTGATGAACACACATCCGTCCAATCAGAAGCGTATCAGATGTTGGTCTCTC	
GenBank	P	nucl.	601	TCAAAGACATCCATGACTTTCAACCCAAAGAAAGCAAGTCTCAGCCTCTCACCATATCC	660
HR	P	nucl.		TCAAAGACATCCATGACTTTCAACCCAAAGAAAGCAAGTCTCAGCCTCTCACCATATCC	
M2	P	nucl.		
M3	P	nucl.		
M4	P	nucl.		
GenBank	P	nucl.	661	TTGGATGAATTGTTCTCATCTAGAGGGAGAATTCTCTGTGCGGAGGTACGGACGAATG	720
HR	P	nucl.		TTGGATGAATTGTTCTCATCTAGAGGGAGAATTCTCTGTGCGGAGGTACGGACGAATG	
M2	P	nucl.		
M3	P	nucl.		
M4	P	nucl.		
GenBank	P	nucl.	721	TCTCATAAAAGAGGCCATCCTGCTCGGCTGAGGAGATACAAAAAGTTGTACAATCAGGGAGA	780
HR	P	nucl.		TCTCATAAAAGAGGCCATCCTGCTCGGCTGAGGAGATACAAAAAGTTGTACAATCAGGGAGA	
M2	P	nucl.		
M3	P	nucl.		
M4	P	nucl.		
GenBank	P	nucl.	781	GTCAAATATTCTCTGTAG	798
HR	P	nucl.		GTCAAATATTCTCTGTAG	
M2	P	nucl.		
M3	P	nucl.		
M4	P	nucl.		GTCAAATATTCTCTGTAG	

FIGUR . 16-2

GenBank	P a.a.	1	MDNLTKREYLKSYSRLDQAVGEIDEIEAQRAEKSNYELFQEDGVEEHT PSY FQAADD ⁶⁰
HR	P a.a.		MDNLTKREYLKSYSRLDQAVGEIDEIEAQRAEKSNYELFQEDGVEEHT PSY FQAADD ⁶⁰
M2	P a.a.		MDNLTKREYLKSYSRLDQAVGEIDEIEAQRAEKSNYELFQEDGVEEHT PSY FQAADD ⁶⁰
M3	P a.a.		MDNLTKREYLKSYSRLDQAVGEIDEIEAQRAEKSNYELFQEDGVEEHT PSY FQAADD ⁶⁰
M4	P a.a.		MDNLTKREYLKSYSRLDQAVGEIDEIEAQRAEKSNYELFQEDGVEEHT PSY FQAADD ⁶⁰
GenBank	P a.a.	61	DTESEPEIEDNQGLY AD PEAEQVEGFIQGPLDDYADE S VDVVFTSDWK Q PELESDEHGK ¹²⁰
HR	P a.a.		DTESEPEIEDNQGLYV PD PEAEQVEGFIQGPLDDYADE D VDVVFTSDWK Q PELESDEHGK
M2	P a.a.		DTESEPEIEDNQGLYV PD PEAEQVEGFIQGPLDDYADE D VDVVFTSDWK Q PELESDEHGK
M3	P a.a.		DTESEPEIEDNQGLYV PD PEAEQVEGFIQGPLDDYADE D VDVVFTSDWK Q PELESDEHGK
M4	P a.a.		DTESEPEIEDNQGLYV PD PEAEQVEGFIQGPLDDYADE D VDVVFTSDWK Q PELESDEHGK
GenBank	P a.a.	121	TLRLT S PEGLSGEQKSQWL S TIKAVVQSAK W NLAECTFEASGEGVI K ERQITPDVYKV ¹⁸⁰
HR	P a.a.		TLRLT S PEGLSGEQKSQWL S TIKAVVQSAK W NLAECTFEASGEGVI K ERQITPDVYKV
M2	P a.a.		TLRLT S PEGLSGEQKSQWL S TIKAVVQSAK W NLAECTFEASGEGVI K ERQITPDVYKV
M3	P a.a.		TLRLT S PEGLSGEQKSQWL S TIKAVVQSAK W NLAECTFEASGEGVI K ERQITPDVYKV
M4	P a.a.		TLRLT S PEGLSGEQKSQWL S TIKAVVQSAK W NLAECTFEASGEGVI K ERQITPDVYKV
GenBank	P a.a.	181	TPVMNT H PSQSEAVSDVWSLSKTSMTFQPKKASLQPLTISLDELFSSRGEFISVGG G GRM ²⁴⁰
HR	P a.a.		TPVMNT H PSQSEAVSDVWSLSKTSMTFQPKKASLQPLTISLDELFSSRGEFISVGGNGRM
M2	P a.a.		TPVMNT H PSQ.....
M3	P a.a.		TPVMNT H PSQSEAVSDVWSLSKTSMTFQPKKASLQPLTISLDELFSSRGEFISVGGNGRM
M4	P a.a.		TPVMNT H PSQSEAVSDVWSLSKTSMTFQPKKASLQPLTISLDELFSSRGEFISVGGNGRM
GenBank	P a.a.	241	SHKEAILLGLRYKKLYNQARVKYSL ²⁶⁶
HR	P a.a.		SHKEAILLGLRYKKLYNQARVKYSL
M2	P a.a.	
M3	P a.a.		SHKEAILLGLRYKKLYNQARVKYSL
M4	P a.a.		SHKEAILLGLRYKKLYNQARVKYSL

FIGUR 17

GenBank M nucl.	1	ATGAGTTCTTAAAGAAGATTCTCGGTCTGAAGGGAAAGGTAAGAAATCTAAGAAATTA	60
HR M nucl.		ATGAGTTCTTAAAGAAGATTCTCGGTCTGAAGGGAAAGGTAAGAAATCTAAGAAATTA	
M3 M nucl.		ATGAGTTCTTAAAGAAGATTCTCGGTCTGAAGGGAAAGGTAAGAAATCTAAGAAATTA	
M4 M nucl.		ATGAGTTCTTAAAGAAGATTCTCGGTCTGAAGGGAAAGGTAAGAAATCTAAGAAATTA	
GenBank M nucl.	61	GGGATCGCACCACCCCTTATGAAGAGGGACACTA	120
HR M nucl.		CATGGAGTATGCTCCGAGCGCTCCA	
M3 M nucl.		GGGATCGCACCACCCCTTATGAAGAGGGACACTAACATGGAGTATGCTCCGAGCGCTCCA	
M4 M nucl.		GGGATCGCACCACCCCTTATGAAGAGGGACACTAACATGGAGTATGCTCCGAGCGCTCCA	
GenBank M nucl.	121	ATTGACAAATCCTATTTGGAGTTGACGAGATGGACAC	180
HR M nucl.		ATTGACAAATCCTATTTGGAGTTGACGAGATGGACACTCATGATCCGATCAATTAAAGA	
M3 M nucl.		ATTGACAAATCCTATTTGGAGTTGACGAGA	
M4 M nucl.		GGGACACTCATGATCCGATCAATTAAAGA	
GenBank M nucl.	181	ATTGACAAATCCTATTTGGAGTTGACGAGATGGACACTCATGATCCGATCAATTAAAGA	240
HR M nucl.		ATTGACAAATCCTATTTGGAGTTGACGAGATGGACACTCATGATCCGATCAATTAAAGA	
M3 M nucl.		ATTGACAAATCCTATTTGGAGTTGACGAGA	
M4 M nucl.		GGGACACTCATGATCCGATCAATTAAAGA	
GenBank M nucl.	241	TACTCAGATGTGGCAGCCGCTGTATCCATTGGGATCACATGTACATCGGAATGGCAGGG	300
HR M nucl.		TACTCAGATGTGGCAGCCGCTGTATCCATTGGGATCACATGTACATCGGAATGGCAGGG	
M3 M nucl.		TACTCAGATGTGGCAGCCGCTGTATCCATTGGGATCACATGTACATCGGAATGGCAGGG	
M4 M nucl.		TACTCAGATGTGGCAGCCGCTGTATCCATTGGGATCACATGTACATCGGAATGGCAGGG	
GenBank M nucl.	301	AAACGTCCCTTCTACAA	360
HR M nucl.		AAACGTCCCTTCTACAAAGATCTGGCTTTGGGTTCTCTAATCTAAAGGCCACTCCA	
M3 M nucl.		AAACGTCCCTTCTACAAAGATCTGGCTTTGGGTTCTCTAATCTAAAGGCCACTCCA	
M4 M nucl.		AAACGTCCCTTCTACAAAGATCTGGCTTTGGGTTCTCTAATCTAAAGGCCACTCCA	
GenBank M nucl.	361	GCGGTATTGGCAGATCAAGGTCAACCAGAGTATCAC	420
HR M nucl.		CTCACTGGAAGGCAGGGCTTAT	
M3 M nucl.		GCGGTATTGGCAGATCAAGGTCAACCAGAGTATCACGCTCACTGTGAAGGCAGGGCTTAT	
M4 M nucl.		GCGGTATTGGCAGATCAAGGTCAACCAGAGTATCACGCTCACTGTGAAGGCAGGGCTTAT	
GenBank M nucl.	421	TTGCCACACAGAATGGGAAGACCCCTCCCATGCTCAATGTACCAAGAGCCTTCAGAAGA	480
HR M nucl.		TTGCCACACAGAATGGGAAGACCCCTCCCATGCTCAATGTACCAAGAGCCTTCAGAAGA	
M3 M nucl.		TTGCCACACAGAATGGGAAGACCCCTCCCATGCTCAATGTACCAAGAGCCTTCAGAAGA	
M4 M nucl.		TTGCCACACAGAATGGGAAGACCCCTCCCATGCTCAATGTACCAAGAGCCTTCAGAAGA	
GenBank M nucl.	481	CCATTCAATATAGGTCTTACAAGGAAACG	540
HR M nucl.		ATTGAGCTCACAAATGACCACATACGATGAT	
M3 M nucl.		CCATTCAATATAGGTCTTACAAGGAAACGGTTGAGCTCACAAATGACCACATACGATGAT	
M4 M nucl.		CCATTCAATATAGGTCTTACAAGGAAACGGTTGAGCTCACAAATGACCACATACGATGAT	
		CCATTCAATATAGGTCTTACAAGGAAACGGTTGAGCTCACAAATGACCACATACGATGAT	

FIGUR 18-1

GenBank M nucl. HR M nucl. M3 M nucl. M4 M nucl.	541 600 GAGTCACTGGAAGCAGCTCTATGATCTGGATCATTCAATTCTTCAAATTTCTGAT GAGTCACTGGAAGCAGCTCTATGATCTGGATCATTCAATTCTTCAAATTTCTGAT GAGTCACTGGAAGCAGCTCTATGATCTGGATCATTCAATTCTTCAAATTTCTGAT GAGTCACTGGAAGCAGCTCTATGATCTGGATCATTCAATTCTTCAAATTTCTGAT
GenBank M nucl. HR M nucl. M3 M nucl. M4 M nucl.	601 660 TTCAGAGAGAAGGCCTTAATGTTGGCTGATTGTCGAGAAAAAGGCATCTGGAGCTGG TTCAGAGAGAAGGCCTTAATGTTGGCTGATTGTCGAGAAAAAGGCATCTGGAGCTGG TTCAGAGAGAAGGCCTTAATGTTGGCTGATTGTCGAGAAAAAGGCATCTGGAGCTGG TTCAGAGAGAAGGCCTTAATGTTGGCTGATTGTCGAGAAAAAGGCATCTGGAGCTGG
GenBank M nucl. HR M nucl. M3 M nucl. M4 M nucl.	661 690 GTCCTGGATTCTTCAGCCACTTCAATGA GTCCTGGATTCTGTCAGCCACTTCAATGA GTCCTGGATTCTGTCAGCCACTTCAATGA GTCCTGGATTCTGTCAGCCACTTCAATGA

FIGUR 18-2

GenBank M a.a.	1	MSSLKKILGLKGKKSKKLGIAPPPYEEDTSMEYAPSAPIDKSYFGVDEM T YD P N QLR	60
HR M a.a.		MSSLKKILGLKGKKSKKLGIAPPPYEEDTNMEYAPSAPIDKSYFGVDEM T HD P QLR	
M4 M a.a.		MSSLKKILGLKGKKSKKLGIAPPPYEEDTNMEYAPSAPIDKSYFGVDEM T HD P QLR	
M3 M a.a.		MSSLKKILGLKGKKSKKLGIAPPPYEEDTNMEYAPSAPIDKSYFGVDEM T HD P QLR	
GenBank M a.a.	61	YEKFFFTVKMTVRSNRPRTYS D VAAVSHWDHMYIGMAGKRPFYKILAFLGSSNLKATP	120
HR M a.a.		YEKFFFTVKMTVRSNRPRTYS D VAAVSHWDHMYIGMAGKRPFYKILAFLGSSNLKATP	
M4 M a.a.		YEKFFFTVKMTVRSNRPRTYS D VAAVSHWDHMYIGMAGKRPFYKILAFLGSSNLKATP	
M3 M a.a.		YEKFFFTVKMTVRSNRPRTYS D VAAVSHWDHMYIGMAGKRPFYKILAFLGSSNLKATP	
GenBank M a.a.	121	AVLADQQPEYH H C E GRAYLPHRMGKTPPM L N V EH F RR P FNIGLYKGT H EL T MTIYDD	180
HR M a.a.		AVLADQQPEYH H C E GRAYLPHRMGKTPPM L N V EH F RR P FNIGLYKGT H EL T MTIYDD	
M4 M a.a.		AVLADQQPEYH H C E GRAYLPHRMGKTPPM L N V EH F RR P FNIGLYKGT H EL T MTIYDD	
M3 M a.a.		AVLADQQPEYH H C E GRAYLPHRMGKTPPM L N V EH F RR P FNIGLYKGT H EL T MTIYDD	
GenBank M a.a.	181	ESLEAAPMIWDHF N SSKFSD F REKALM F GLIVEKKASGA W LDS H FK.	230
HR M a.a.		ESLEAAPMIWDHF N SSKFSD F REKALM F GLIVEKKASGA W LDS H FK.	
M4 M a.a.		ESLEAAPMIWDHF N SSKFSD F REKALM F GLIVEKKASGA W LDS H FK.	
M3 M a.a.		ESLEAAPMIWDHF N SSKFSD F REKALM F GLIVEKKASGA W LDS H FK.	

FIGUR 19

GenBank G nucl.	1	ATGAAGTGCCTTTGACTTAGC	TTTTTATTCA	GGGGTGAATTGCAAGTCACCATA	60
HR G nucl.		ATGAAGTGCCTTTG	ACTTAGCTTTTATTCA	TCGGGGTGAATTGCAAGTCACCATA	
M2 G nucl.		
M3 G nucl.		ATGAAGTGCCTTTGACTTAGCTTTTATTCA	TCGGGGTGAATTGCAAGTCACCATA	
M4 G nucl.		ATGAAGTGCCTTTGACTTAGCTTTTATTCA	TCGGGGTGAATTGCAAGTCACCATA	
GenBank G nucl.	61	GT	TTTCCACACAACCAAAAGGAAACTGGAAAATGTTCCCTC	TAATTACCAATTATTGC	120
HR G nucl.		GT	TTTCCATACAACCAAAAGGAAACTGGAAAATGTTCCCTCCAAATTACCAATTATTGC	
M2 G nucl.		
M3 G nucl.		GT	TTTCCATACAACCAAAAGGAAACTGGAAAATGTTCCCTCCAAATTACCAATTATTGC	
M4 G nucl.		GT	TTTCCATACAACCAAAAGGAAACTGGAAAATGTTCCCTCCAAATTACCAATTATTGC	
GenBank G nucl.	121	CCGTCAAGCTCAGATTAAATTGGCATAATGACTTAATAGGCACAGC	CTACAAGTCAAA	180	
HR G nucl.		CCGTCAAGCTCAGATTAAATTG	NCATAATGACTTAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAAA		
M2 G nucl.			
M3 G nucl.		CCGTCAAGCTCAGATTAAATTGGCATAATGACTTAATAGGCACAGC	CTACAAGTCAAA		
M4 G nucl.		CCGTCAAGCTCAGATTAAATTGGCATAATGACTTAATAGGCACAGCCTTACA	GTCAAGTCAAA		
GenBank G nucl.	181	ATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGTCATGCTTCCAAATGG	240	
HR G nucl.		ATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGTCATGCTTCCAAATGG		
M2 G nucl.			
M3 G nucl.		ATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGTCATGCTTCCAAATGG		
M4 G nucl.		ATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGTCATGCTTCCAAATGG		
GenBank G nucl.	241	GTCACTACTTGTGATTCCGCTGGT	GGACCGAAGTATAACACAC	300	
HR G nucl.		GTCACTACTTGTGATTCCGCTGGTACGGACCGAAGTATAACACAC	ATCCATCCGATCC		
M2 G nucl.			
M3 G nucl.		GTCACTACTTGTGATTCCGCTGGTACGGACCGAAGTATAACACAC	ATCCATCCGATCC		
M4 G nucl.		GTCACTACTTGTGATTCCGCTGGTACGGACCGAAGTATAACACAC	ATCCATCCGATCC		
GenBank G nucl.	301	TTCACTCCATCTGTAGAACATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAGGAAC	TTGG	360	
HR G nucl.		TTCACTCCATCTGTAGAACATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAGGAAC	TTGG		
M2 G nucl.			
M3 G nucl.		TTCACTCCATCTGTAGAACATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAGGAAC	TTGG		
M4 G nucl.		TTCACTCCATCTGTAGAACATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAGGAAC	TTGG		
GenBank G nucl.	361	CTGAATCCAGGCTCCCTCCTCAAAGTTGTTGGATATGCAACTGTGACGGATG	CGAAGCA	420	
HR G nucl.		CTGAATCCAGGCTCCCTCCTCAAAGTTGTTGGATATGCAACTGTGACGGATG	CTGAAGCA		
M2 G nucl.			
M3 G nucl.		CTGAATCCAGGCTCCCTCCTCAAAGTTGTTGGATATGCAACTGTGACGGATG	CTGAAGCA		
M4 G nucl.		CTGAATCCAGGCTCCCTCCTCAAAGTTGTTGGATATGCAACTGTGACGGATG	CTGAAGCA		
GenBank G nucl.	421	G	GTGATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGCT	GTGATGAATACACAGGAGAATGGGTT	480
HR G nucl.		GCGATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGCTTGTGATGAATACACAGGAGAATGGGTT		
M2 G nucl.			
M3 G nucl.		GCGATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGCTTGTGATGAATACACAGGAGAATGGGTT		
M4 G nucl.		GCGATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGCTTGTGATGAATACACAGGAGAATGGGTT		

FIGUR 20-1

GenBank G nucl.	481	540
HR G nucl.	GATTACAGTTCATCAACGGAAAATGCAGCAATGACATATGCCCACTGTCCATAACTC	
M2 G nucl.	
M3 G nucl.	GATTACAGTTCATCAACGGAAAATGCAGCAATGACATATGCCCACTGTCCATAACTC	
M4 G nucl.	GATTACAGTTCATCAACGGAAAATGCAGCAATGACATATGCCCACTGTCCATAACTC	
GenBank G nucl.	541	600
HR G nucl.	ACAACCTGGCATTCGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTCCATG	
M2 G nucl.	ACAACCTGGCATCCGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTCCATG	
M3 G nucl.	ACAACCTGGCATCCGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTCCATG	
M4 G nucl.	ACAACCTGGCATCCGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTCCATG	
GenBank G nucl.	601	660
HR G nucl.	GACATCACCTTCTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGAAAGGAGGGCACAGGG	
M2 G nucl.	GACATCACCTTCTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTAGGAAAGGAGGGCACAGGG	
M3 G nucl.	
M4 G nucl.	GACATCACCTTCTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTAGGAAAGGAGGGCACAGGG	
GenBank G nucl.	661	720
HR G nucl.	TTCAGAAGTAACTACTTTGCTTATGAAACTGGAGCAAGGCCTGAAAATGCAACTACTGC	
M2 G nucl.	TTCAGAAGTAACTACTTTGCTTATGAAACTGGAGACAAGGCCTGAAAATGCAACTACTGC	
M3 G nucl.	
M4 G nucl.	TTCAGAAGTAACTACTTTGCTTATGAAACTGGAGACAAGGCCTGAAAATGCAACTACTGC	
GenBank G nucl.	721	780
HR G nucl.	AAGCATTGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTC	
M2 G nucl.	AAGCGTTGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTC	
M3 G nucl.	AAGCATTGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTC	
M4 G nucl.	AAGCGTTGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTC	
GenBank G nucl.	781	840
HR G nucl.	TTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAG	
M2 G nucl.	TTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAG	
M3 G nucl.	CCATCTCAG
M4 G nucl.	TTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAG	
GenBank G nucl.	841	900
HR G nucl.	TTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAG	
M2 G nucl.	ACCTCAGTGGATGTAAGTCTATTCAAGGACGTTGAGAGGATCTGGATTATTCCCTCTGC	
M3 G nucl.	ACCTCAGTGGATGTAAGTCTATTCAAGGACGTTGAGAGGATCTGGATTATTCCCTCTGC	
M4 G nucl.	ACCTCAGTGGATGTAAGTCTATTCAAGGACGTTGAGAGGATCTGGATTATTCCCTCTGC	

FIGUR 20-2

GenBank G nucl.	901	CAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCC	960
HR G nucl.	ATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTAT
M2 G nucl.
M3 G nucl.	CAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCC
M4 G nucl.	CAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCC
GenBank G nucl.	961	CAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCC	1020
HR G nucl.	ATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTAT
M2 G nucl.
M3 G nucl.	CTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTGCTT
M4 G nucl.	ACCCAGGAACCGGTCTGCTT
GenBank G nucl.	1021	CTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTGCTT	1080
HR G nucl.	ACCCAGGAACCGGTCTGCTT
M2 G nucl.
M3 G nucl.	CTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTGCTT
M4 G nucl.	ACCCAGGAACCGGTCTGCTT
GenBank G nucl.	1081	CTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTGCTT	1140
HR G nucl.	ACCCAGGAACCGGTCTGCTT
M2 G nucl.
M3 G nucl.	GGAATGATCAGTGGAACTACCACAGAAAGGGAACTGTGGGATGACTGGGC
M4 G nucl.	ACCATATGAA
GenBank G nucl.	1141	GGAATGATCAGTGGAACTACCACAGAAAGGGAACTGTGGGATGACTGGGC	1200
HR G nucl.	CTCCATATGAA
M2 G nucl.
M3 G nucl.	GGAATGATCAGTGGAACTACCACAGAAAGGGAACTGTGGGATGACTGGGC
M4 G nucl.	CTCCATATGAA
GenBank G nucl.	1201	GACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTCAGGATATAAG	1260
HR G nucl.	TTTCCTTTA
M2 G nucl.
M3 G nucl.	GACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTCAGGATATAAG
M4 G nucl.	TTTCCTTTA
GenBank G nucl.	1261	GACGTGGAAATTGGACATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCT	1320
HR G nucl.	CAAAGGCTCAGGTG
M2 G nucl.
M3 G nucl.	TATATGATTGGACATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCT
M4 G nucl.	CAAAGGCTCAGGTG
GenBank G nucl.	TATATGATTGGACATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCT
HR G nucl.	CAAAGGCTCAGGTG
M2 G nucl.
M3 G nucl.	TTTGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCTTCGCA
M4 G nucl.	CTTCCTGATGATGAGA
GenBank G nucl.	TTTGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCTTCGCA
HR G nucl.	CTTCCTGATGATGAGA
M2 G nucl.
M3 G nucl.	TTTGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCTTCGCA
M4 G nucl.	CTTCCTGATGATGAGA

FIGUR 20-3

GenBank G nucl.	1321	1380
HR G nucl.	TTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAATCCAATCGAG	TTGTAGAAGGTGGTCAGTAGT
M2 G nucl.
M3 G nucl.	TTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAATCCAATCGAG	TTGTAGAAGGTGGTCAGTAGT
M4 G nucl.	TTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAATCCAATCGAG	TTGTAGAAGGTGGTCAGTAGT
GenBank G nucl.	1381	1440
HR G nucl.	TGGAA	AGCTCTATTGCCTTTTTCTTTATCATAGGGTAATCATTGGACTATTCTTG
M2 G nucl.
M3 G nucl.	TGGAAGAGCTCTATTGCCTTTTTCTTTATCATAGGGTAATCATTGGACTATTCTTG
M4 G nucl.	TGGAAGAGCTCTATTGCCTTTTTCTTTATCATAGGGTAATCATTGGACTATTCTTG
GenBank G nucl.	1441	1500
HR G nucl.	GTTCTCCGAGTTGGTAT	CCATCTTGCATTAAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATT
M2 G nucl.
M3 G nucl.	GTTCTCCGAGTTGGTATTTATCTTTGCATTAAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATT
M4 G nucl.	GTTCTCCGAGTTGGTATTTATCTTTGCATTAAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATT
GenBank G nucl.	1501	1536
HR G nucl.	TATACAGACATAGAGATGAACCGACTTGG	AAAGTAA
M2 G nucl.
M3 G nucl.	TATACAGACATAGAGATGAACCGACTTGGGAAGTAA
M4 G nucl.	TATACAGACATAGAGATGAACCGACTTGGGAAGTAA

FIGUR 20-4

GenBank G a.a. 1 MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPYQKGNWKNVPSNYHCPSSSDLNWHNDLIGTAQVK
 HR G a.a. MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPYQKGNWKNVPSNYHCPSSSDLNWHNDLIGTAQVK
 M2 G a.a. MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPYQKGNWKNVPSNYHCPSSSDLNWHNDLIGTAQVK
 M3 G a.a. MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPYQKGNWKNVPSNYHCPSSSDLNWHNDLIGTAQVK
 M4 G a.a. MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPYQKGNWKNVPSNYHCPSSSDLNWHNDLIGTAQVK

GenBank G a.a. 60 MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPYQKGNWKNVPSNYHCPSSSDLNWHNDLIGTAQVK
 HR G a.a. MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPYQKGNWKNVPSNYHCPSSSDLNWHNDLIGTAQVK
 M2 G a.a. MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPYQKGNWKNVPSNYHCPSSSDLNWHNDLIGTAQVK
 M3 G a.a. MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPYQKGNWKNVPSNYHCPSSSDLNWHNDLIGTAQVK
 M4 G a.a. MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPYQKGNWKNVPSNYHCPSSSDLNWHNDLIGTAQVK

GenBank G a.a. 120 MPKSHKAIQADGWMCHASKWTTCDFRWYGPKYITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTQGTTW
 HR G a.a. MPKSHKAIQADGWMCHASKWTTCDFRWYGPKYITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTQGTTW
 M2 G a.a.
 M3 G a.a.
 M4 G a.a.

GenBank G a.a. 180 LNPGFPPQSCGYATVTDAAIVQVTPHHVLVDEYTGEWVDSQFINGKCSNIDCPVHNS
 HR G a.a. LNPGFPPQSCGYATVTDAAIVQVTPHHVLVDEYTGEWVDSQFINGKCSNIDCPVHNS
 M2 G a.a.
 M3 G a.a.
 M4 G a.a.

GenBank G a.a. 240 TTWHSDYKVKGCLDSNLISMDITFFSEDELSSLGKEGTGFRSNYFAYETGDKACKMQYC
 HR G a.a. TTWHSDYKVKGCLDSNLISMDITFFSEDELSSLGKEGTGFRSNYFAYETGDKACKMQYC
 M2 G a.a.
 M3 G a.a.
 M4 G a.a.

GenBank G a.a. 300 KHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSDVSLIQDVERILDYSLC
 HR G a.a. KHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSDVSLIQDVERILDYSLC
 M2 G a.a.
 M3 G a.a.
 M4 G a.a.

GenBank G a.a. 360 QETWSKIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPFTIINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMV
 HR G a.a.
 M2 G a.a.
 M3 G a.a.
 M4 G a.a.

GenBank G a.a. 420 GMISGTTTERELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRRTSSGYKFPLYMIGHGMLSDLHLSSKAQV
 HR G a.a. GMISGTTTERELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRRTSSGYKFPLYMIGHGMLSDLHLSSKAQV
 M2 G a.a.
 M3 G a.a.
 M4 G a.a.

FIGUR 21-1

GenBank G a.a. HR G a.a. M2 G a.a. M3 G a.a. M4 G a.a.	421 FEHPHIQDAASQLPDDE S LFFGDTGLSKNPIE E VEGFSSWKSSIASF FF IIIGLIIGLFL FEHPHIQDAASQLPDDE T LFFGDTGLSKNPIE F VEGFSSWKSSIASF FF IIIGLIIGLFL FEHPHIQDA A X A QLPDDE T LFFGDTGLSKNPIE F VEGFSSWKSSIASF FF IIIGLIIGLFL FEHPHIQDAASQLPDDE T LFFGDTGLSKNPIE F VEGFSSWKSSIASF FF IIIGLIIGLFL	480
GenBank G a.a. HR G a.a. M2 G a.a. M3 G a.a. M4 G a.a.	481 VLRVG I LCI K LKHTKKRQIYTDIEMNRLGK VLRVG I LCI K LKHTKKRQIYTDIEMNRLGK VLRVG I LCI K LKHTKKRQIYTDIEMNRLGK VLRVG I LCI K LKHTKKRQIYTDIEMNRLGK	512

FIGUR 21-2

GenBank L nucl.	1	60
HR L nucl.	ATGGAAGTCCACGATTTGAGACCGACGAGTTCAATGATTCAATGAAGATGACTATGCC	
M2 L nucl.	
M4 L nucl.	ATGGAAGTCCACGATTTGAGACCGACGAGTTCAATGAAGATGACTATGCC	
GenBank L nucl.	121	120
HR L nucl.	ACAAGAGAATTCTGAATCCCGATGAGCGATGACGTACTTGAATCATGCTGATTACAAT	
M2 L nucl.	
M4 L nucl.	ACAAGAGAATTCTGAATCCCGATGAGCGATGACGTACTTGAATCATGCTGATTACAAT	
GenBank L nucl.	121	180
HR L nucl.	TTGAATTCTCCTCTAATTAGTGTATGACAATTGATTCAGGAAATTCAATTCTCTT	
M2 L nucl.	
M4 L nucl.	TTGAATTCTCCTCTAATTAGTGTATGACAATTGATTCAGGAAATTCAATTCTCTT	
GenBank L nucl.	181	240
HR L nucl.	CCGATTCCCTCGATGTGGGATAGTAAGAACTGGATGGAGTTCTGAGATGTTAACATCA	
M2 L nucl.	
M4 L nucl.	CCGATTCCCTCGATGTGGGATAGTAAGAACTGGATGGAGTTCTGAGATGTTAACATCA	
GenBank L nucl.	241	300
HR L nucl.	TGTCAAGCCAATCCCCTCAACATCTCAGATGCATAATGGATGGAGTTGGTTAATG	
M2 L nucl.	
M4 L nucl.	TGTCAAGCCAATCCCCTCAACATCTCAGATGCATAATGGATGGAGTTGGTTAATG	
GenBank L nucl.	301	360
HR L nucl.	TCTGATAATCATGATGCCAGTCAGGTATAGTTTACATGAAGTGACAAAGAGGCA	
M2 L nucl.	
M4 L nucl.	TCTGATAATCATGATGCCAGTCAGGTATAGTTTACATGAAGTG	
GenBank L nucl.	361	420
HR L nucl.	GAAATAACATTGACGTGGTGGAGACCTTCATCCGGCTGGGCAACAAACCAATTGAA	
M2 L nucl.	
M4 L nucl.	GAAATAACATTGACGTGGTGGAGACCTTCATCCGGCTGGGCAACAAACCAATTGAA	
GenBank L nucl.	421	480
HR L nucl.	TACATCAAAAGGAAAGATGGACTGACTCATTCAAATTCTCGTTATTGTGTCAAAG	
M2 L nucl.	
M4 L nucl.	TACATCAAAAGGAAAGATGGACTGACTCATTCAAATTCTCGTTATTGTGTCAAAG	
GenBank L nucl.	481	540
HR L nucl.	TTTTGGACTTACACAAGTTGACATTAATCTTAAATGCTGTCTGAGGTGGAATTGCTC	
M2 L nucl.	
M4 L nucl.	TTTTGGACTTACACAAGTTGACATTAATCTTAAATGCTGTCTGAGGTGGAATTGCTC	

FIGUR 22-1

GenBank L nucl.	541	600
HR L nucl.	AACTTGGCGAGGACTTTCAAAGCAAAGTCAGAAGAAGTTCTCATGGAACGAAACATATGC
M2 L nucl.
M4 L nucl.	AACTTGGCGAGGACTTTCAAAGCAAAGTCAGAAGAAGTTCTCATGGAACGAAACATATGC
GenBank L nucl.	601	660
HR L nucl.	AGGTTAGGGTCCCAGCTGGTCTACTTTATTCAGAAGGATGGGTTACTTCAAG
M2 L nucl.
M4 L nucl.	AGGTTAGGGTCCCAGCTGGTCTACTTTATTCAGAAGGATGGGTTACTTCAAG
GenBank L nucl.	661	720
HR L nucl.	AAACTTGATATTCTAATGGACCGAAACTTCTGTTAATGGTCAAAGATGTGATTATAGGG
M2 L nucl.
M4 L nucl.	AAACTTGATATTCTAATGGACCGAAACTTCTGTTAATGGTCAAAGATGTGATTATAGGG
GenBank L nucl.	721	780
HR L nucl.	AGGATGCAAACGGTGCTATCCATGGTATGTAGAATAGACAACCTGTTCTCAGAGCAAGAC
M2 L nucl.
M4 L nucl.	AGGATGCAAACGGTGCTATCCATGGTATGTAGAATAGACAACCTGTTCTCAGAGCAAGAC
GenBank L nucl.	781	840
HR L nucl.	ATCTTCTCCCTCTAAATATCTACAGAATTGGAGATAAAATTGTGGAGAGGCAGGGAAAT
M2 L nucl.
M4 L nucl.	ATCTTCTCCCTCTAAATATCTACAGAATTGGAGATAAAATTGTGGAGAGGCAGGGAAAT
GenBank L nucl.	841	900
HR L nucl.	TTTTCTTATGACTTGAATTGGAGATAAAATTGTGGAGAGGCAGGGAAAT
M2 L nucl.
M4 L nucl.	TTTTCTTATGACTTGAATTGGAGATAAAATTGTGGAGAGGCAGGGAAAT
GenBank L nucl.	901	960
HR L nucl.	GCAAGAGAATCAAGGCCTTAGTCCCACAAATTCCCTCATTTGAAAATCATATCAAGACT
M2 L nucl.
M4 L nucl.	GCAAGAGAATCAAGGCCTTAGTCCCACAAATTCCCTCATTTGAAAATCATATCAAGACT
GenBank L nucl.	961	1020
HR L nucl.	TCTGTTGATGAAGGGGCAAAATTGACCGAGGTATAAGATTCTCCATGATCAGATAATG
M2 L nucl.
M4 L nucl.	TCTGTTGATGAAGGGGCAAAATTGACCGAGGTATAAGATTCTCCATGATCAGATAATG

FIGUR 22-2

GenBank L nucl.	1021	1080
HR L nucl.	AGTGTGAAAACAGTGGATCTCACACTGGTATTATGGATCGTCAGACATTGGGTCA
M2 L nucl.	CATTGGGTCA
M4 L nucl.	AGTGTGAAAACAGTGGATCTCACACTGGTATTATGGATCGTCAGACATTGGGTCA
GenBank L nucl.	1081	1140
HR L nucl.	CCTTTTATAGATTATTACCTGGACTAGAAAAATTACATTCCAAGTAACCATGAAGAAA
M2 L nucl.	CCTTTTATAGATTATTACGCTGGCTAGAAAAATTACATTCCAAGTAACCATGAAGAAA
M4 L nucl.	CCTTTTATAGATTATTACGCTGGACTAGAAAAATTACATTCCAAGTAACCATGAAGAAA
GenBank L nucl.	1141	1200
HR L nucl.	GATATTGATGTGTCATATGCAAAAGCACTTGCAGTGATTAGCTCGGATTGTTCTATTT
M2 L nucl.	GATATTGATGTGTCATATGCAAAAGCACTTGCAGTGATTAGCTCGGATTGTTCTATTT
M4 L nucl.	GATATTGATGTGTCATATGCAAAAGCACTTGCAGTGATTAGCTCGGATTGTTCTATTT
GenBank L nucl.	1201	1260
HR L nucl.	CAACAGTTCAATGATCATAAAAAGTGGTTCGTGAATGGAGACTTGCTCCCTCATGATCAT
M2 L nucl.	CAACAGTTCAATGATCATAAAAAGTGGTTCGTGAATGGAGACTTGCTCCCTCATGATCAT
M4 L nucl.	CAACAGTTCAATGATCATAAAAAGTGGTTCGTGAATGGAGACTTGCTCCCTCATGATCAT
GenBank L nucl.	1261	1320
HR L nucl.	CCCTTAAAAGTCATGTTAAAGAAAATACATGGCCCACAGCTGCTCAAGTTCAAGATTTT
M2 L nucl.	CCCTTAAAAGTCATGTTAAAGAAAATACATGGCCCACAGCTGCTCAAGTTCAAGATTTT
M4 L nucl.	CCCTTAAAAGTCATGTTAAAGAAAATACATGGCCCACAGCTGCTCAAGTTCAAGATTTT
GenBank L nucl.	1321	1380
HR L nucl.	GGAGATAATGGCATGAACCTCCGCTGATTAAATGTTTGAAATACCCGACTTACTAGAC
M2 L nucl.	GGAGATAATGGCATGAACCTCCGCTGATTAAATGTTTGAAATACCCGACTTACTAGAC
M4 L nucl.	GGAGATAATGGCATGAACCTCCGCTGATTAAATGTTTGAAATACCCGACTTACTAGAC
GenBank L nucl.	1381	1440
HR L nucl.	CCATCGATAATATACTCTGACAAAAGTCATTCAATGAATAGGTCAAGAGGTGTTGAAACAT
M2 L nucl.	CCATCGATAATATACTCTGACAAAAGTCATTCAATGAATAGGTCAAGAGGTGTTGAAACAT
M4 L nucl.	CCATCGATAATATACTCTGACAAAAGTCATTCAATGAATAGGTCAAGAGGTGTTGAAACAT
GenBank L nucl.	1441	1500
HR L nucl.	GTCCGAATGAATCCGAACACTCCTATCCCTAGTAAAAGGTGTTGCAGACTATGTTGGAC
M2 L nucl.	GTCCGAATGAATCCGAACACTCCTATCCCTAGTAAAAGGTGTTGCAGACTATGTTGGAC
M4 L nucl.	GTCCGAATGAATCCGAACACTCCTATCCCTAGTAAAAGGTGTTGCAGACTATGTTGGAC

FIGUR 22-3

GenBank L nucl.	1501	1560
HR L nucl.	ACAAAGGCTACCAATTGAAAGAATTCTTAAAGAGATTGATGAGAAGGGCTTAGATGAT	
M2 L nucl.	ACAAAGGCTACCAATTGAAAGAATTCTTAAAGAGATTGATGAGAAGGGCTTAGATGAT	
M4 L nucl.	ACAAAGGCTACCAATTGAAAGAATTCTTAAAGAGATTGATGAGAAGGGCTTAGATGAT	
GenBank L nucl.	1561	1620
HR L nucl.	GATGATCTAATTATTGGCTTAAAGGAAAGGAGAGGGAACTGAAGTGGCAGGTAGATTT	
M2 L nucl.	GATGATCTAATTATTGGCTTAAAGGAAAGGAGAGGGAACTGAAGTGGCAGGTAGATTT	
M4 L nucl.	GATGATCTAATTATTGGCTTAAAGGAAAGGAGAGGGAACTGAAGTGGCAGGTAGATTT	
GenBank L nucl.	1621	1680
HR L nucl.	TTCTCCCTAATGCTTGGAAATTGCGAGAACTTTGTAATTACCGAATATTTGATAAAG	
M2 L nucl.	TTCTCCCTAATGCTTGGAAATTGCGAGAACTTTGTAATTACCGAATATTTGATAAAG	
M4 L nucl.	TTCTCCCTAATGCTTGGAAATTGCGAGAACTTTGTAATTACCGAATATTTGATAAAG	
GenBank L nucl.	1681	1740
HR L nucl.	ACTCATTTCGTCCTATGTTAAAGGCCGTGACAATGGCGGACGATCTAAGTCAGTCATT	
M2 L nucl.	ACTCATTTCGTCCTATGTTAAAGGCCGTGACAATGGCGGACGATCTAAGTCAGTCATT	
M4 L nucl.	ACTCATTTCGTCCTATGTTAAAGGCCGTGACAATGGCGGACGATCTAAGTCAGTCATT	
GenBank L nucl.	1741	1800
HR L nucl.	AAAAAGATGTTAGATTCCCTATCCGGCCAAGGATTGAGTCATATGAGGAATTGCAATA	
M2 L nucl.	AAAAAGATGTTAGATTCCCTATCCGGCCAAGGATTGAGTCATATGAGGAATTGCAATA	
M4 L nucl.	AAAAAGATGTTAGATTCCCTATCCGGCCAAGGATTGAGTCATATGAGGAATTGCAATA	
GenBank L nucl.	1801	1860
HR L nucl.	GCCAATCACATTGATTACGAAAATGGAATAACCACCAAGGAAGTTATCAAACGGCCA	
M2 L nucl.	GCCAATCACATTGATTACGAAAATGGAATAACCACCAAGGAAGTTATCAAACGGCCA	
M4 L nucl.	GCCAATCACATTGATTACGAAAATGGAATAACCACCAAGGAAGTTATCAAACGGCCA	
GenBank L nucl.	1861	1920
HR L nucl.	GTGTTCCGAGTTATGGGCCAGTTCTTAGGTTATCCATCCTTAATCGAGAGAACTCATGAA	
M2 L nucl.	GTGTTCCGAGTTATGGGCCAGTTCTTAGGTTATCCATCCTTAATCGAGAGAACTCATGAA	
M4 L nucl.	GTGTTCCGAGTTATGGGCCAGTTCTTAGGTTATCCATCCTTAATCGAGAGAACTCATGAA	
GenBank L nucl.	1921	1980
HR L nucl.	TTTTTGAGAAAAGTCTTATATACTACAATGGAAGACCAGACTTGATGCGTGTTCACAAC	
M2 L nucl.	TTTTTGAGAAAAGTCTTATATACTACAATGGAAGACCAGACTTGATGCGTGTTCACAAC	
M4 L nucl.	TTTTTGAGAAAAGTCTTATATACTACAATGGAAGACCAGACTTGATGCGTGTTCACAAC	
GenBank L nucl.	1981	2040
HR L nucl.	AACACACTGATCAATTCAACCTCCCAACGAGTTGTTGGCAAGGACAAGAGGGTGGACTG	
M2 L nucl.	AACACACTGATCAATTCAACCTCCCAACGAGTTGTTGGCAAGGACAAGAGGGTGGACTG	
M4 L nucl.	AACACACTGATCAATTCAACCTCCCAACGAGTTGTTGGCAAGGACAAGAGGGTGGACTG	

FIGUR 22-4

GenBank L nucl.	2041	
HR L nucl.	GAAGGTCTACGGCAAAAGGATGGA	2100
M2 L nucl.	GAAGGTCTACGGCAAAAGGATGGAGTATCCTCAATCTACTGGTTATTCAAAGAGAGGCT	
M4 L nucl.	GAAGGTCTACGGCAAAAGGATGGAGTATCCTCAATCTACTGGTTATTCAAAGAGAGGCT	
GenBank L nucl.	2101	2160
HR L nucl.	AAAATCAGAAAACACTGCTGTCAAAGTCTTGGCACAGGTGATAATCAAGTTATTGCACA	
M2 L nucl.	AAAATCAGAAAACACTGCTGTCAAAGTCTTGGCACAGGTGATAATCAAGTTATTGCACA	
M4 L nucl.	AAAATCAGAAAACACTGCTGTCAAAGTCTTGGCACAGGTGATAATCAAGTTATTGCACA	
GenBank L nucl.	2161	2220
HR L nucl.	CAGTATAAAACGAAGAAATCGAGAACGTTGAGAATTACAGGGTGCTCTCAATCAAATG	
M2 L nucl.	CAGTATAAAACGAAGAAATCGAGAACGTTGAGAATTACAGGGTGCTCTCAATCAAATG	
M4 L nucl.	CAGTATAAAACGAAGAAATCGAGAACGTTGAGAATTACAGGGTGCTCTCAATCAAATG	
GenBank L nucl.	2221	2280
HR L nucl.	GTTCCTAATAATGAGAAAATTATGACTGCAATCAAATAGGGACAGGGAAAGTTAGGACTT	
M2 L nucl.	GTTCCTAATAATGAGAAAATTATGACTGCAATCAAATAGGGACAGGGAAAGTTAGGACTT	
M4 L nucl.	GTTCCTAATAATGAGAAAATTATGACTGCAATCAAATAGGGACAGGGAAAGTTAGGACTT	
GenBank L nucl.	2281	2340
HR L nucl.	TTGATAAAATGACGATGAGACTATGCAATCTGCAGATTACTTGAATTATGGAAAATACCG	
M2 L nucl.	TTGATAAAATGACGATGAGACTATGCAATCTGCAGATTACTTGAATTATGGAAAATACCG	
M4 L nucl.	TTGATAAAATGACGATGAGACTATGCAATCTGCAGATTACTTGAATTATGGAAAATACCG	
GenBank L nucl.	2341	2400
HR L nucl.	ATTTCCGTGGAGTGATTAGAGGGTTAGAGACCAAGAGATGGTCACGAGTGACTTGTGTC	
M2 L nucl.	ATTTCCGTGGAGTGATTAGAGGGTTAGAGACCAAGAGATGGTCACGAGTGACTTGTGTC	
M4 L nucl.	ATTTCCGTGGAGTGATTAGAGGGTTAGAGACCAAGAGATGGTCACGAGTGACTTGTGTC	
GenBank L nucl.	2401	2460
HR L nucl.	ACCAATGACCAAATACCCACTTGTGCTAATATAATGAGCTCAGTTCCACAAATGCTCTC	
M2 L nucl.	ACCAATGACCAAATACCCACTTGTGCTAATATAATGAGCTCAGTTCCACAAATGCTCTC	
M4 L nucl.	ACCAATGACCAAATACCCACTTGTGCTAATATAATGAGCTCAGTTCCACAAATGCTCTC	
GenBank L nucl.	2461	2520
HR L nucl.	ACCGTAGCTCATTTGCTGAGAACCCAAATCAATGCCATGATACAGTACAATTATTTGGG	
M2 L nucl.	ACCGTAGCTCATTTGCTGAGAACCCAAATCAATGCCATGATACAGTACAATTATTTGGG	
M4 L nucl.	ACCGTAGCTCATTTGCTGAGAACCCAAATCAATGCCATGATACAGTACAATTATTTGGG	
GenBank L nucl.	2521	2580
HR L nucl.	ACATTTGCTAGACTCTTGTGATGATGCATGATCCTGCTCTCGTCAATCATTGTATGAA	
M2 L nucl.	ACATTTGCTAGACTCTTGTGATGATGCATGATCCTGCTCTCGTCAATCATTGTATGAA	
M4 L nucl.	ACATTTGCTAGACTCTTGTGATGATGCATGATCCTGCTCTCGTCAATCATTGTATGAA	

FIGUR 22-5

GenBank L nucl.	2581	GTTCAAGATAAGATAACCGGGCTTGCACAGTTCTACTTTCAAATACGCCATGTTGTATTTG
HR L nucl.		GTTCAAGATAAGATAACCGGGCTTGCACAGTTCTACTTTCAAATACGCCATGTTGTATTTG
M2 L nucl.		
M4 L nucl.		GTTCAAGATAAGATAACCGGGCTTGCACAGTTCTACTTTCAAATACGCCATGTTGTATTTG
GenBank L nucl.	2640	
HR L nucl.		
M2 L nucl.		
M4 L nucl.		
GenBank L nucl.	2641	GACCCTTCATTGGAGGGAGTGTGGGGCATGTCTTGTCCAGGTTTTGATTAGAGCCTTC
HR L nucl.		GACCCTTCATTGGAGGGAGTGTGGGGCATGTCTTGTCCAGGTTTTGATTAGAGCCTTC
M2 L nucl.		
M4 L nucl.		GACCCTTCATTGGAGGGAGTGTGGGGCATGTCTTGTCCAGGTTTTGATTAGAGCCTTC
GenBank L nucl.	2700	
HR L nucl.		
M2 L nucl.		
M4 L nucl.		
GenBank L nucl.	2760	CCAGATCCCGTAACAGAAAAGTCTCTCATCTGGAGATTCAATCCATGTACATGCTCGAAGT
HR L nucl.		CCAGATCCCGTAACAGAAAAGTCTCTCATCTGGAGATTCAATCCATGTACATGCTCGAAGT
M2 L nucl.		
M4 L nucl.		CCAGATCCCGTAACAGAAAAGTCTCTCATCTGGAGATTCAATCCATGTACATGCTCGAAGT
GenBank L nucl.	2761	GAGCATCTGAAGGGAGATGAGTCAGTATTGGAAACCCCGAGATAGCCAAGTTCGAATA
HR L nucl.		GAGCATCTGAAGGGAGATGAGTCAGTATTGGAAACCCCGAGATAGCCAAGTTCGAATA
M2 L nucl.		
M4 L nucl.		GAGCATCTGAAGGGAGATGAGTCAGTATTGGAAACCCCGAGATAGCCAAGTTCGAATA
GenBank L nucl.	2820	ACTCACATAGACAAGCTAGTAGAAGATCCAACCTCTCTGAACATCGCTATGGGAATGAGT
HR L nucl.		ACTCACATAGACAAGCTAGTAGAAGATCCAACCTCTCTGAACATCGCTATGGGAATGAGT
M2 L nucl.		
M4 L nucl.		ACTCACATAGACAAGCTAGTAGAAGATCCAACCTCTCTGAACATCGCTATGGGAATGAGT
GenBank L nucl.	2880	CCAGCGAACCTTGTAAAGACTGAGGTTAAAAAATGCTTAATCGAACATCAAGACAAACCATC
HR L nucl.		CCAGCGAACCTTGTAAAGACTGAGGTTAAAAAATGCTTAATCGAACATCAAGACAAACCATC
M2 L nucl.		
M4 L nucl.		CCAGCGAACCTTGTAAAGACTGAGGTTAAAAAATGCTTAATCGAACATCAAGACAAACCATC
GenBank L nucl.	2940	
HR L nucl.		
M2 L nucl.		
M4 L nucl.		
GenBank L nucl.	2941	AGGAACCAGGTGATTAAGGATGCAACCATAATTGTATCATGAAGAGGGATCGGCTCAGA
HR L nucl.		AGGAACCAGGTGATTAAGGATGCAACCATAATTGTATCATGAAGAGGGATCGGCTCAGA
M2 L nucl.		
M4 L nucl.		AGGAACCAGGTGATTAAGGATGCAACCATAATTGTATCATGAAGAGGGATCGGCTCAGA
GenBank L nucl.	3001	AGTTTCTTATGGTCAATAAAATCCTCTGTTCCCTAGATTTAAGTGAATTCAAATCAGGC
HR L nucl.		AGTTTCTTATGGTCAATAAAATCCTCTGTTCCCTAGATTTAAGTGAATTCAAATCAGGC
M2 L nucl.		
M4 L nucl.		AGTTTCTTATGGTCAATAAAATCCTCTGTTCCCTAGATTTAAGTGAATTCAAATCAGGC
GenBank L nucl.	3060	
HR L nucl.		
M2 L nucl.		
M4 L nucl.		
GenBank L nucl.	3120	ACTTTTTGGGAGTCGCAGACGGGCTCATCAGTCTATTCAAATTCGTACTATTCGG
HR L nucl.		ACTTTTTGGGAGTCGCAGACGGGCTCATCAGTCTATTCAAATTCGTACTATTCGG
M2 L nucl.		
M4 L nucl.		ACTTTTTGGGAGTCGCAGACGGGCTCATCAGTCTATTCAAATTCGTACTATTCGG

FIGUR 22-6

GenBank L nucl.	3121	
HR L nucl.	AACTCCTTAAGAAAAAGTATCATAGGAATTGGATGATTGAGGAGTGAGGTA	3180
M2 L nucl.	AACTCCTTAAGAAAAAGTATCATAGGAATTGGATGATTGAGGAGTGAGGTA	
M4 L nucl.	AACTCCTTAAGAAAAAGTATCATAGGAATTGGATGATTGAGGAGTGAGGTA	
GenBank L nucl.	3181	3240
HR L nucl.	TCCTCTTGACACATTTAGGGAACTTCATTTGAGAAGGGATCATGAAAATGTGGACA	
M2 L nucl.	TCCTCTTGACACATTTAGGGAACTTCATTTGAGAAGGGATCATGAAAATGTGGACA	
M4 L nucl.	TCCTCTTGACACATTTAGGGAACTTCATTTGAGAAGGGATCATGAAAATGTGGACA	
GenBank L nucl.	3241	3300
HR L nucl.	TGTTCAGCTACTCATGCTGACACATTAAGATAACAAATCCTGGGCGTACAGTTATTGGG	
M2 L nucl.	TGTTCAGCTACTCATGCTGACACATTAAGATAACAAATCCTGGGCGTACAGTTATTGGG	
M4 L nucl.	TGTTCAGCTACTCATGCTGACACATTAAGATAACAAATCCTGGGCGTACAGTTATTGGG	
GenBank L nucl.	3301	3360
HR L nucl.	ACAACGTACCCCATCCATTAGAAATGTTGGTCCACAACATCGAAAAGAGACTCCTTGT	
M2 L nucl.	ACAACGTACCCCATCCATTAGAAATGTTGGTCCACAACATCGAAAAGAGACTCCTTGT	
M4 L nucl.	ACAACGTACCCCATCCATTAGAAATGTTGGTCCACAACATCGAAAAGAGACTCCTTGT	
GenBank L nucl.	3361	3420
HR L nucl.	GCACCATGTAACACATCAGGGTTCAATTATGTTCTGTGCATTGTCCAGACGGGATCCAT	
M2 L nucl.	GCACCATGTAACACATCAGGGTTCAATTATGTTCTGTGCATTGTCCAGACGGGATCCAT	
M4 L nucl.	GCACCATGTAACACATCAGGGTTCAATTATGTTCTGTGCATTGTCCAGACGGGATCCAT	
GenBank L nucl.	3421	3480
HR L nucl.	GACGTCTTAGTCACGGGACCATTGCCCTGCTTATCTAGGGTCTAAAACATCTGAATCT	
M2 L nucl.	GACGTCTTAGTCACGGGACCATTGCCCTGCTTATCTAGGGTCTAAAACATCTGAATCT	
M4 L nucl.	GACGTCTTAGTCACGGGACCATTGCCCTGCTTATCTAGGGTCTAAAACATCTGAATCT	
GenBank L nucl.	3481	3540
HR L nucl.	ACATCTATTTGCAGCCTGGGAAAGGAAAGCAAAGTCCCCTGATTAAAAGAGCTACA	
M2 L nucl.	ACATCTATTTGCAGCCTGGGAAAGGAAAGCAAAGTCCCCTGATTAAAAGAGCTACA	
M4 L nucl.	ACATCTATTTGCAGCCTGGGAAAGGAAAGCAAAGTCCCCTGATTAAAAGAGCTACA	
GenBank L nucl.	3541	3600
HR L nucl.	CGTCTTAGAGATGCTATCTCTGGTTGTTGAACCCGACTCTAAACTAGCAATGACTATA	
M2 L nucl.	CGTCTTAGAGATGCTATCTCTGGTTGTTGAACCCGACTCTAAACTAGCAATGACTATA	
M4 L nucl.	CGTCTTAGAGATGCTATCTCTGGTTGTTGAACCCGACTCTAAACTAGCAATGACTATA	
GenBank L nucl.	3601	3660
HR L nucl.	CTTTCTAACATCCACTCTTAAACAGGCCAAGAATGGACCAAAAGGCAGCATGGGTTCAAA	
M2 L nucl.	CTTTCTAACATCCACTCTTAAACAGGCCAAGAATGGACCAAAAGGCAGCATGGGTTCAAA	
M4 L nucl.	CTTTCTAACATCCACTCTTAAACAGGCCAAGAATGGACCAAAAGGCAGCATGGGTTCAAA	

FIGUR 22-7

GenBank L nucl.	3661	3720
HR L nucl.	AGAACAGGGCTGCCCTCATAGGTTTCGACATCTGGATGAGCCATGGTGGGTCGCA	
M2 L nucl.	AGAACAGGGCTGCCCTCATAGGTTTCGACATCTGGATGAGCCATGGTGGGTCGCA	
M4 L nucl.	AGAACAGGGCTGCCCTCATAGGTTTCGACATCTGGATGAGCCATGGTGGGTCGCA	
GenBank L nucl.	3721	3780
HR L nucl.	TCTCAGAGCACTGCAGCATTGACCAGGTTGATGGCAACTACAGACACCATGAGGGATCTG	
M2 L nucl.	TCTCAGAGCACTGCAGCATTGACCAGGTTGATGGCAACTACAGACACCATGAGGGATCTG	
M4 L nucl.	TCTCAGAGCACTGCAGCATTGACCAGGTTGATGGCAACTACAGACACCATGAGGGATCTG	
GenBank L nucl.	3781	3840
HR L nucl.	GGAGATCAGAATTTCGACTTTTATTCCAAGCAACGTTGCTCTATGCTCAATTACCACC	
M2 L nucl.	GGAGATCAGAATTTCGACTTTTATTCCAAGCAACGTTGCTCTATGCTCAATTACCACC	
M4 L nucl.	GGAGATCAGAATTTCGACTTTTATTCCAAGCAACGTTGCTCTATGCTCAATTACCACC	
GenBank L nucl.	3841	3900
HR L nucl.	ACTGTTGCAAGAGACGGATGGATCACCAGTTGACAGATCATTATCATATTGCCCTGTAAG	
M2 L nucl.	ACTGTTGCAAGAGACGGATGGATCACCAGTTGACAGATCATTATCATATTGCCCTGTAAG	
M4 L nucl.	ACTGTTGCAAGAGACGGATGGATCACCAGTTGACAGATCATTATCATATTGCCCTGTAAG	
GenBank L nucl.	3901	3960
HR L nucl.	TCCTGTTTGAGACCCATAGAAGAGATCACCTGGACTCAAGTATGGACTACACGCCCCCA	
M2 L nucl.	TCCTGTTTGAGACCCATAGAAGAGATCACCTGGACTCAAGTATGGACTACACGCCCCCA	
M4 L nucl.	TCCTGTTTGAGACCCATAGAAGAGATCACCTGGACTCAAGTATGGACTACACGCCCCCA	
GenBank L nucl.	3961	4020
HR L nucl.	GATGTATCCCATGTGCTGAAGACATGGAGGAATGGGAAAGGTTCTGTGGGACAAGAGATA	
M2 L nucl.	GATGTATCCCATGTGCTGAAGACATGGAGGAATGGGAAAGGTTCTGTGGGACAAGAGATA	
M4 L nucl.	GATGTATCCCATGTGCTGAAGACATGGAGGAATGGGAAAGGTTCTGTGGGACAAGAGATA	
GenBank L nucl.	4021	4080
HR L nucl.	AAACAGATCTATCCTTTAGAAGGAAATTGGAAGAATTAGCACCTGCTGAGCAATCTAT	
M2 L nucl.	AAACAGATCTATCCTTTAGAAGGAAATTGGAAGAATTAGCACCTGCTGAGCAATCTAT	
M4 L nucl.	AAACAGATCTATCCTTTAGAAGGAAATTGGAAGAATTAGCACCTGCTGAGCAATCTAT	
GenBank L nucl.	4081	4140
HR L nucl.	CAAGTCGGCAGATGTATAGGTTCTATATGGAGACTTGGCTATAGAAAATCTACTCAT	
M2 L nucl.	CAAGTCGGCAGATGTATAGGTTCTATATGGAGACTTGGCTATAGAAAATCTACTCAT	
M4 L nucl.	CAAGTCGGCAGATGTATAGGTTCTATATGGAGACTTGGCTATAGAAAATCTACTCAT	
GenBank L nucl.	4141	4200
HR L nucl.	GCCGAGGACAGTCTCTATTCCCTCTATCTATACAAGGTCGTATTAGAGGTCGAGGTTTC	
M2 L nucl.	GCCGAGGACAGTCTCTATTCCCTCTATCTATACAAGGTCGTATTAGAGGTCGAGGTTTC	
M4 L nucl.	GCCGAGGACAGTCTCTATTCCCTCTATCTATACAAGGTCGTATTAGAGGTCGAGGTTTC	

FIGUR 22-8

GenBank L nucl.	4201	TTAAAAGGGTTGCTAGACGGATTAATGAGAGCAAGTTGCTGCCAAGTAATAACACCGGAGA
HR L nucl.		TTAAAAGGGTTGCTAGACGGATTAATGAGAGCAAGTTGCTGCCAAGTAATAACACCGGAGA
M2 L nucl.		TTAAAAGGGTTGCTAGACGGATTAATGAGAGCAAGTTGCTGCCAAGTAATAACACCGGAGA
M4 L nucl.		TTAAAAGGGTTGCTAGACGGATTAATGAGAGCAAGTTGCTGCCAAGTAATAACACCGGAGA
GenBank L nucl.	4261	AGTCTGGCTCATTGAAAGAGGCCGGCAACGCAGTGTACGGAGGTTGATTACTTGATT
HR L nucl.		AGTCTGGCTCATTGAAAGAGGCCGGCAACGCAGTGTACGGAGGTTGATTACTTGATT
M2 L nucl.		AGTCTGGCTCATTGAAAGAGGCCGGCAACGCAGTGTACGGAGGTTGATTACTTGATT
M4 L nucl.		AGTCTGGCTCATTGAAAGAGGCCGGCAACGCAGTGTACGGAGGTTGATTACTTGATT
GenBank L nucl.	4321	GATAAATTGAGTGTATCACCTCCATTCTTCTTACTAGATCAGGACCTATTAGAGAC
HR L nucl.		GATAAATTGAGTGTATCACCTCCATTCTTCTTACTAGATCAGGACCTATTAGAGAC
M2 L nucl.		GATAAATTGAGTGTATCACCTCCATTCTTCTTACTAGATCAGGACCTATTAGAGAC
M4 L nucl.		GATAAATTGAGTGTATCACCTCCATTCTTCTTACTAGATCAGGACCTATTAGAGAC
GenBank L nucl.	4381	GAATTAGAAACGATTCCCCACAAGATCCAACTCCTATCCGACAAGCAACCGTGATATG
HR L nucl.		GAATTAGAAACGATTCCCCACAAGATCCAACTCCTATCCGACAAGCAACCGTGATATG
M2 L nucl.		GAATTAGAAACGATTCCCCACAAGATCCAACTCCTATCCGACAAGCAACCGTGATATG
M4 L nucl.		GAATTAGAAACGATTCCCCACAAGATCCAACTCCTATCCGACAAGCAACCGTGATATG
GenBank L nucl.	4441	GGGGTGATTGTCAGAAATTACTTCAAATACCAATGCCGTCTAATTGAAAAGGAAAAATAC
HR L nucl.		GGGGTGATTGTCAGAAATTACTTCAAATACCAATGCCGTCTAATTGAAAAGGAAAAATAC
M2 L nucl.		GGGGTGATTGTCAGAAATTACTTCAAATACCAATGCCGTCTAATTGAAAAGGAAAAATAC
M4 L nucl.		GGGGTGATTGTCAGAAATTACTTCAAATACCAATGCCGTCTAATTGAAAAGGAAAAATAC
GenBank L nucl.	4501	AGATCACATTATTCAAAATTATGGTTATTCTCAGATGTCTTATCCATAGACTTCATTGGA
HR L nucl.		AGATCACATTATTCAAAATTATGGTTATTCTCAGATGTCTTATCCATAGACTTCATTGGA
M2 L nucl.		AGATCACATTATTCAAAATTATGGTTATTCTCAGATGTCTTATCCATAGACTTCATTGGA
M4 L nucl.		AGATCACATTATTCAAAATTATGGTTATTCTCAGATGTCTTATCCATAGACTTCATTGGA
GenBank L nucl.	4561	CCATTCTCTATTCCACCAACCCCTTGCACAACTCTATACAGCCATTTCATCTGGGAAA
HR L nucl.		CCATTCTCTATTCCACCAACCCCTTGCACAACTCTATACAGCCATTTCATCTGGGAAA
M2 L nucl.		CCATTCTCTATTCCACCAACCCCTTGCACAACTCTATACAGCCATTTCATCTGGGAAA
M4 L nucl.		CCATTCTCTATTCCACCAACCCCTTGCACAACTCTATACAGCCATTTCATCTGGGAAA
GenBank L nucl.	4621	GATAAGAATGAGTTGAGAGAGCTGGCAAATCTTCTTCATTGCTAAGATCAGGAGAGGGG
HR L nucl.		GATAAGAATGAGTTGAGAGAGCTGGCAAATCTTCTTCATTGCTAAGATCAGGAGAGGGG
M2 L nucl.		GATAAGAATGAGTTGAGAGAGCTGGCAAATCTTCTTCATTGCTAAGATCAGGAGAGGGG
M4 L nucl.		GATAAGAATGAGTTGAGAGAGCTGGCAAATCTTCTTCATTGCTAAGATCAGGAGAGGGG
GenBank L nucl.	4681	TGGGAAGACATACATGTGAAATTCTCACCAAGGGACATATTATTGTGTCCAGAGGAAATC
HR L nucl.		TGGGAAGACATACATGTGAAATTCTCACCAAGGGACATATTATTGTGTCCAGAGGAAATC
M2 L nucl.		TGGGAAGACATACATGTGAAATTCTCACCAAGGGACATATTATTGTGTCCAGAGGAAATC
M4 L nucl.		TGGGAAGACATACATGTGAAATTCTCACCAAGGGACATATTATTGTGTCCAGAGGAAATC

FIGUR 22-9

GenBank L nucl.	4741	4800
HR L nucl.	AGACATGCTTGCAGTTGGGATTGCTAAGGATAATAATAAAGACATGAGCTATCCCCCT	
M2 L nucl.	AGACATGCTTGCAGTTGGGATTGCTAAGGATAATAATAAAGACATGAGCTATCCCCCT	
M4 L nucl.	AGACATGCTTGCAGTTGGGATTGCTAAGGATAATAATAAAGACATGAGCTATCCCCCT	
GenBank L nucl.	4801	4860
HR L nucl.	TGGGGAAAGGGATCCAGAGGGACAATTACAACAATCCCTGTTATTATACGACCACCCCT	
M2 L nucl.	TGGGGAAAGGGATCCAGAGGGACAATTACAACAATCCCTGTTATTATACGACCACCCCT	
M4 L nucl.	TGGGGAAAGGGATCCAGAGGGACAATTACAACAATCCCTGTTATTATACGACCACCCCT	
GenBank L nucl.	4861	4920
HR L nucl.	TACCCAAAGATGCTAGAGATGCCCTCCAAGAATCCAAAATCCCTGCTGTCCGGAATCAGG	
M2 L nucl.	TACCCAAAGATGCTAGAGATGCCCTCCAAGAATCCAAAATCCCTGCTGTCCGGAATCAGG	
M4 L nucl.	TACCCAAAGATGCTAGAGATGCCCTCCAAGAATCCAAAATCCCTGCTGTCCGGAATCAGG	
GenBank L nucl.	4921	4980
HR L nucl.	TTGGGCCATTACCAACTGGCGCTCATTTATAAAATTGGAGTATATTACATGGAATGGGA	
M2 L nucl.	TTGGGCCAGTTACCAACTGGCGCTCATTTATAAAATTGGAGTATATTACATGGAATGGGA	
M4 L nucl.	TTGGGCCAGTTACCAACTGGCGCTCATTTATAAAATTGGAGTATATTACATGGAATGGGA	
GenBank L nucl.	4981	5040
HR L nucl.	ATCCATTACAGGGACTTCTGAGTTGGAGACGGCTCCGGAGGGATGACTGCTGCATTA	
M2 L nucl.	ATCCATTACAGGGACTTCTGAGTTGGAGACGGCTCCGGAGGGATGACTGCTGCATTA	
M4 L nucl.	ATCCATTACAGGGACTTCTGAGTTGGAGACGGCTCCGGAGGGATGACTGCTGCATTA	
GenBank L nucl.	5041	5100
HR L nucl.	CTACGAGAAAATGTGCATAGCAGAGGAATTCAATAGTCTGTTAGAATTATCAGGGTCA	
M2 L nucl.	CTACGAGAAAATGTGCATAGCAGAGGAATTCAATAGTCTGTTAGAATTATCAGGGTCA	
M4 L nucl.	CTACGAGAAAATGTGCATAGCAGAGGAATTCAATAGTCTGTTAGAATTATCAGGGTCA	
GenBank L nucl.	5101	5160
HR L nucl.	GTCATGCGAGGCCCTCTCTGAGCCCCCAGTGCCTAGAAACTTGGAGGAGATAAA	
M2 L nucl.	GTCATGCGAGGCCCTCTCTGAGCCCCCAGTGCCTAGAAACTTGGAGGAGATAAA	
M4 L nucl.	GTCATGCGAGGCCCTCTCTGAGCCCCCAGTGCCTAGAAACTTGGAGGAGATAAA	
GenBank L nucl.	5161	5220
HR L nucl.	TCGAGATGTAAATGGTAAACATGTTGGAAATATCCATCTGACTTATGTGACCCAAGG	
M2 L nucl.	TCGAGATGTAAATGGTAAACATGTTGGAAATATCCATCTGACTTATGTGACCCAAGG	
M4 L nucl.	TCGAGATGTAAATGGTAAACATGTTGGAAATATCCATCTGACTTATGTGACCCAAGG	
GenBank L nucl.	5221	5280
HR L nucl.	ACTTGGGACTATTCCTCCGACTCAAAGCAGGCTGGGCTCAAAATTGATTTAATTGTA	
M2 L nucl.	ACTTGGGACTATTCCTCCGACTCAAAGCAGGCTGGGCTCAAAATTGATTTAATTGTA	
M4 L nucl.	ACTTGGGACTATTCCTCCGACTCAAAGCAGGCTGGGCTCAAAATTGATTTAATTGTA	

FIGUR 22-10

GenBank L nucl.	5281	5340
HR L nucl.	ATGGATATGGAAGTCGGATTCTTACTAGCCTGAAAATTGAGACGAATGTTAGAAAT	
M2 L nucl.	ATGGATATGGAAGTCGGATTCTTACTAGCCTGAAAATTGAGACGAATGTTAGAAAT	
M4 L nucl.	ATGGATATGGAAGTCGGATTCTTACTAGCCTGAAAATTGAGACGAATGTTAGAAAT	
GenBank L nucl.	5341	5400
HR L nucl.	TATGTGACCGGATTTGGATGAGCAAGGAGTTAACATCTACAAGACTTATGGAACATAT	
M2 L nucl.	TATGTGACCGGATTTGGATGAGCAAGGAGTTAACATCTACAAGACTTATGGAACATAT	
M4 L nucl.	TATGTGACCGGATTTGGATGAGCAAGGAGTTAACATCTACAAGACTTATGGAACATAT	
GenBank L nucl.	5401	5460
HR L nucl.	ATTTGTGAGAGCGAAAAGAATGCAGTAACAATCCTGGTCCCATGTTCAAGACGGTCGAC	
M2 L nucl.	ATTTGTGAGAGCGAAAAGAATGCAGTAACAATCCTGGTCCCATGTTCAAGACGGTCGAC	
M4 L nucl.	ATTTGTGAGAGCGAAAAGAATGCAGTAACAATCCTGGTCCCATGTTCAAGACGGTCGAC	
GenBank L nucl.	5461	5520
HR L nucl.	TTAGTTCAACAGAATTAGTAGTTCTAAACGTCGAAGTATATATGGTATGTAAGGT	
M2 L nucl.	TTAGTTCAACAGAATTAGTAGTTCTAAACGTCGAAGTATATATGGTATGTAAGGT	
M4 L nucl.	TTAGTTCAACAGAATTAGTAGTTCTAAACGTCGAAGTATATATGGTATGTAAGGT	
GenBank L nucl.	5521	5580
HR L nucl.	TTGAAGAAATTATCGATGAACCCAATCCCGATTGGCTTCCATCAATGAATCCTGGAAA	
M2 L nucl.	TTGAAGAAATTATCGATGAACCCAATCCCGATTGGCTTCCATCAATGAATCCTGGAAA	
M4 L nucl.	TTGAAGAAATTATCGATGAACCCAATCCCGATTGGCTTCCATCAATGAATCCTGGAAA	
GenBank L nucl.	5581	5640
HR L nucl.	AACCTGTACGCATTCCAGTCATCAGAACAGGAATTGCCAGAGCAAAGAAGGTTAGTACA	
M2 L nucl.	AACCTGTACGCATTCCAGTCATCAGAACAGGAATTGCCAGAGCAAAGAAGGTTAGTACA	
M4 L nucl.	AACCTGTACGCATTCCAGTCATCAGAACAGGAATTGCCAGAGCAAAGAAGGTTAGTACA	
GenBank L nucl.	5641	5700
HR L nucl.	TACTTACCTTGACAGGTATTCCCTCCAATTCAATTCTGATCCTTTGTGAACATTGAG	
M2 L nucl.	TACTTACCTTGACAGGTATTCCCTCCAATTCAATTCTGATCCTTTGTGAACATTGAG	
M4 L nucl.	TACTTACCTTGACAGGTATTCCCTCCAATTCAATTCTGATCCTTTGTGAACATTGAG	
GenBank L nucl.	5701	5760
HR L nucl.	ACTATGCTACAAATATCGGAGTACCCACGGGTGTCATGCCGCTGCCCTAAATCA	
M2 L nucl.	ACTATGCTACAAATATCGGAGTACCCACGGGTGTCATGCCGCTGCCCTAAATCA	
M4 L nucl.	ACTATGCTACAAATATCGGAGTACCCACGGGTGTCATGCCGCTGCCCTAAATCA	
GenBank L nucl.	5761	5820
HR L nucl.	TCTGATAGACCTGCAGATTATTGACCATAGCCTTTTATATGGCGATTATATCGTAT	
M2 L nucl.	TCTGATAGACCTGCAGATTATTGACCATAGCCTTTTATATGGCGATTATATCGTAT	
M4 L nucl.	TCTGATAGACCTGCAGATTATTGACCATAGCCTTTTATATGGCGATTATATCGTAT	

FIGUR 22-11

GenBank L nucl.	5821	5880
HR L nucl.	TATAACATCAATCATATCAGAGTAGGACCGATACTCCGAACCCCCATCAGATGGAATT	
M2 L nucl.	TATAACATCAATCATATCAGAGTAGGACCGATACTCCGAACCCCCATCAGATGGAATT	
M4 L nucl.	TATAACATCAATCATATCAGAGTAGGACCGATACTCCGAACCCCCATCAGATGGAATT	
GenBank L nucl.	5881	5940
HR L nucl.	GCACAAAATGTGGGGATCGCTATAACTGGTATAAGCTTTGGCTGAGTTGATGGAGAAA	
M2 L nucl.	GCACAAAATGTGGGGATCGCTATAACTGGTATAAGCTTTGGCTGAGTTGATGGAGAAA	
M4 L nucl.	GCACAAAATGTGGGGATCGCTATAACTGGTATAAGCTTTGGCTGAGTTGATGGAGAAA	
GenBank L nucl.	5941	6000
HR L nucl.	GACATTCCACTATATCAACAGTGTAGCAGTTATCCAGCAATCATTCCGATTAGGTGG	
M2 L nucl.	GACATTCCACTATATCAACAGTGTAGCAGTTATCCAGCAATCATTCCGATTAGGTGG	
M4 L nucl.	GACATTCCACTATATCAACAGTGTAGCAGTTATCCAGCAATCATTCCGATTAGGTGG	
GenBank L nucl.	6001	6060
HR L nucl.	GAGGCTGTTTCAGTAAAAGGAGGATACAAGCAGAAGTGGAGTACTAGAGGTGATGGGCTC	
M2 L nucl.	GAGGCTGTTTCAGTAAAAGGAGGATACAAGCAGAAGTGGAGTACTAGAGGTGATGGGCTC	
M4 L nucl.	GAGGCTGTTTCAGTAAAAGGAGGATACAAGCAGAAGTGGAGTACTAGAGGTGATGGGCTC	
GenBank L nucl.	6061	6120
HR L nucl.	CCAAAAGATAACCGAA G TTCAGACTCCTGGCCCCAATCGGAACTGGATCAGATCTCG	
M2 L nucl.	CCAAAAGATAACCGAA T TTCAGACTCCTGGCCCCAATCGGAACTGGATCAGATCTCG	
M4 L nucl.	CCAAAAGATAACCGAA T TTCAGACTCCTGGCCCCAATCGGAACTGGATCAGATCTCG	
GenBank L nucl.	6121	6180
HR L nucl.	GAATTGGTCCGAAACCAAGTTCGTCTAAATCCATTCAATGAGATCTTGTCAATCAGCTA	
M2 L nucl.	GAATTGGTCCGAAACCAAGTTCGTCTAAATCCATTCAATGAGATCTTGTCAATCAGCTA	
M4 L nucl.	GAATTGGTCCGAAACCAAGTTCGTCTAAATCCATTCAATGAGATCTTGTCAATCAGCTA	
GenBank L nucl.	6181	6240
HR L nucl.	TGTCGTACAGTGGATAATCATTGAAATGGTCAAATTGCGAA G AAAACACAGGAATGATT	
M2 L nucl.	TGTCGTACAGTGGATAATCATTGAAATGGTCAAATTGCGAAAAAAACACAGGAATGATT	
M4 L nucl.	TGTCGTACAGTGGATAATCATTGAAATGGTCAAATTGCGAAAAAAACACAGGAATGATT	
GenBank L nucl.	6241	6300
HR L nucl.	GAATGGATCAATAGACGAATTCAAAGAAGACCGGTCTACTGATGTTGAAGAGTGAC	
M2 L nucl.	GAATGGATCAATAGACGAATTCAAAGAAGACCGGTCTACTGATGTTGAAGAGTGAC	
M4 L nucl.	GAATGGATCAATAGACGAATTCAAAGAAGACCGGTCTACTGATGTTGAAGAGTGAC	

FIGUR 22-12

GenBank L nucl.	6301	6360
HR L nucl.	CTACAGAGGAAAACCTCTGGAGAGATCAA
M2 L nucl.	CTACATGAGGAAAACCTCTGGAGAGATCAA
M4 L nucl.	CTACATGAGGAAAACCTCTGGAGAGATCAA
GenBank L nucl.	6361	6395
HR L nucl.	ATGAAAAAAACTTTGATCCTTAAGACCCCTTTGTG
M2 L nucl.
M4 L nucl.

FIGUR 22-13

GenBank L a.a.	1	60
HR L a.a.	MEVHDFETDEFNDFNEDDYATREFLNPDERTYLNHADYNLNSPLISDDIDNLIRKFNSL	
M4 L a.a.	
GenBank L a.a.	MEVHDFETDEFNDFNEDDYATREFLNPDERTYLNHADYNLNSPLISDDIDNLIRKFNSL	
GenBank L a.a.	61	120
HR L a.a.	PIPSMWDSKNWDGVLEMLTSCQANPISTSQMHKWMGSWLMSDNHDASQGYSFLHEVDKEA	
M4 L a.a.	
GenBank L a.a.	PIPSMWDSKNWDGVLEMLTSCQANPISTSQMHKWMGSWLMSDNHDASQGYSFLHEVDKEA	
GenBank L a.a.	121	180
HR L a.a.	EITFDVVEFTIRGWGNKPIEYIKKERWTDASFKILAYLCQKFLDLHKLTILNAVSEVELL	
M4 L a.a.	
GenBank L a.a.	EITFDVVEFTIRGWGNKPIEYIKKERWTDASFKILAYLCQKFLDLHKLTILNAVSEVELL	
GenBank L a.a.	181	240
HR L a.a.	NLARTFKGVRRSSHGTNICR[RVPSLGPTFISEGWAYFKKLDILMDRNFLLMVKDVIIG	
M4 L a.a.	
GenBank L a.a.	NLARTFKGVRRSSHGTNICR[RVPSLGPTFISEGWAYFKKLDILMDRNFLLMVKDVIIG	
GenBank L a.a.	241	300
HR L a.a.	RMQTVLSMVCRIDNLFSEQDIFSLLNIYRIGDKIVERQGNFSYDLIKMVEPICNL[LMKL	
M4 L a.a.	
GenBank L a.a.	RMQTVLSMVCRIDNLFSEQDIFSLLNIYRIGDKIVERQGNFSYDLIKMVEPICNL[LMKL	
GenBank L a.a.	301	360
HR L a.a.	ARESRPLVPQFPFENHIKTSVDEGAKIDRGIRFLHDQIMSVKTVDLTLVIYGSFRHWH	
M4 L a.a.	
GenBank L a.a.	ARESRPLVPQFPFENHIKTSVDEGAKIDRGIRFLHDQIMSVKTVDLTLVIYGSFRHWH	
GenBank L a.a.	361	420
HR L a.a.	PFIDYY[GLEKLHSQVTMKKDIDVSYAKALASDLARIVLFQQFNDHKKWFVNGDLLPHDH	
M4_L.pro	PFIDYYAGLEKLHSQVTMKKDIDVSYAKALASDLARIVLFQQFNDHKKWFVNGDLLPHDH	
GenBank L a.a.	PFIDYYAGLEKLHSQVTMKKDIDVSYAKALASDLARIVLFQQFNDHKKWFVNGDLLPHDH	
GenBank L a.a.	421	480
HR L a.a.	PFKSHVKENTWPTAAQVQDFGDKWHELPLIKCFEIPDLDPSIIYSDKSHSMNRSEVLKH	
M4 L a.a.	PFKSHVKENTWPTAAQVQDFGDKWHELPLIKCFEIPDLDPSIIYSDKSHSMNRSEVLKH	
GenBank L a.a.	PFKSHVKENTWPTAAQVQDFGDKWHELPLIKCFEIPDLDPSIIYSDKSHSMNRSEVLKH	
GenBank L a.a.	481	540
HR L a.a.	VRMNPNTPIPSKVKLQMLDTKATNWKEFLKEIDEKGLDDDDLIIGLKGKERELKLAGRF	
M4 L a.a.	VRMNPNTPIPSKVKLQMLDTKATNWKEFLKEIDEKGLDDDDLIIGLKGKERELKLAGRF	
GenBank L a.a.	VRMNPNTPIPSKVKLQMLDTKATNWKEFLKEIDEKGLDDDDLIIGLKGKERELKLAGRF	
GenBank L a.a.	541	600
HR L a.a.	FSLMSWKLREYFVITEYLIKTHFVPMFKGLTMADDLTAVIKKMLDSSSGQGLKSYEACI	
M4 L a.a.	FSLMSWKLREYFVITEYLIKTHFVPMFKGLTMADDLTAVIKKMLDSSSGQGLKSYEACI	
GenBank L a.a.	FSLMSWKLREYFVITEYLIKTHFVPMFKGLTMADDLTAVIKKMLDSSSGQGLKSYEACI	

FIGUR . 23-1

GenBank L a.a.	601	660
HR L a.a.	ANHIDYEKWNNHQRLSNGPVFRVMQFLGYP SLIERTHEFFEKSLIYYNGRPDLMRVHN	
M4 L a.a.	ANHIDYEKWNNHQRLSNGPVFRVMQFLGYP SLIERTHEFFEKSLIYYNGRPDLMRVHN	
GenBank L a.a.	661	720
HR L a.a.	NTLINSTSQRVCWQGQEGGLEGLRQKGWILNLVIQREAKIRNTAVKVL A QGDNQVICT	
M4 L a.a.	NTLINSTSQRVCWQGQEGGLEGLRQKGWISILNLVIQREAKIRNTAVKVL A QGDNQVICT	
GenBank L a.a.	721	780
HR L a.a.	QYKTKKSRNVVELQGALNQMVSNNEKIMTAIKIGTGKGLLINDDETMQSADYLNYGKIP	
M4 L a.a.	QYKTKKSRNVVELQGALNQMVSNNEKIMTAIKIGTGKGLLINDDETMQSADYLNYGKIP	
GenBank L a.a.	781	840
HR L a.a.	IFRGVIRGLETKRWSRVTCTNDQIPTCANIMSSVSTNALTVAHFAENPINAMIQYNYFG	
M4 L a.a.	IFRGVIRGLETKRWSRVTCTNDQIPTCANIMSSVSTNALTVAHFAENPINAMIQYNYFG	
GenBank L a.a.	841	900
HR L a.a.	TFARLLMMHDPA RQSLYEVQDKIPGLHSSTFKYAMLYLDP SIGGVSGMSLSRFLIRAF	
M4 L a.a.	TFARLLMMHDPA RQSLYEVQDKIPGLHSSTFKYAMLYLDP SIGGVSGMSLSRFLIRAF	
GenBank L a.a.	901	960
HR L a.a.	PDPVTESLSFWRFIHVHARSEHLKEMSAVFGNPEIAKFRITHIDKLVEDPTSLNIAMGMS	
M4 L a.a.	PDPVTESLSFWRFIHVHARSEHLKEMSAVFGNPEIAKFRITHIDKLVEDPTSLNIAMGMS	
GenBank L a.a.	961	1020
HR L a.a.	PANLLKTEVKKCLIESRQ TIRNQVIKDATIYLYHEEDRLRSFLWSINPLFPRFLSEFKSG	
M4 L a.a.	PANLLKTEVKKCLIESRQ TIRNQVIKDATIYLYHEEDRLRSFLWSINPLFPRFLSEFKSG	
GenBank L a.a.	1021	1080
HR L a.a.	TFLGVADGLISLFQNSRTIRNSFKKYHRELDDLIVRSEVSSLTHLGKLHRRGSKMWT	
M4 L a.a.	TFLGVADGLISLFQNSRTIRNSFKKYHRELDDLIVRSEVSSLTHLGKLHRRGSKMWT	
GenBank L a.a.	1081	1140
HR L a.a.	TFLGVADGLISLFQNSRTIRNSFKKYHRELDDLIVRSEVSSLTHLGKLHRRGSKMWT	
M4 L a.a.	CSATHADTLRYKSWGRTVIGTTVPHPLEMLGPQH R KETPCAPCNTSGFNYVSVHCPDGIH	
GenBank L a.a.	1141	1200
HR L a.a.	CSATHADTLRYKSWGRTVIGTTVPHPLEMLGPQH R KETPCAPCNTSGFNYVSVHCPDGIH	
M4 L a.a.	DVFSSRGPLPAYLGSKTSESTSILQPWERESKVPLIKRATRLRDAISWFVEPD SKLAMTI	
	DVFSSRGPLPAYLGSKTSESTSILQPWERESKVPLIKRATRLRDAISWFVEPD SKLAMTI	
	DVFSSRGPLPAYLGSKTSESTSILQPWERESKVPLIKRATRLRDAISWFVEPD SKLAMTI	

FIGUR 23-2

GenBank L a.a.	1201	1260
HR L a.a.	LSNIHSLTGEETKQRQHGFRTGSALHRFSTSRMHSGGFASQSTAALTRLMATTDTMRDL	
M4 L a.a.	LSNIHSLTGEETKQRQHGFRTGSALHRFSTSRMHSGGFASQSTAALTRLMATTDTMRDL	
GenBank L a.a.	1261	1320
HR L a.a.	GDQNFDPLFQATLLYAQITTTVARDGWITSCTDHYHIACKSCLRPIEEEITLDSSMDYTPP	
M4 L a.a.	GDQNFDPLFQATLLYAQITTTVARDGWITSCTDHYHIACKSCLRPIEEEITLDSSMDYTPP	
GenBank L a.a.	GDQNFDPLFQATLLYAQITTTVARDGWITSCTDHYHIACKSCLRPIEEEITLDSSMDYTPP	
GenBank L a.a.	1321	1380
HR L a.a.	DVSHVLKTWRNGEGSWGQEIKQIYPLEGNWKNLAPAEQSYQVGRCIGFLYGDLAYRKSTH	
M4 L a.a.	DVSHVLKTWRNGEGSWGQEIKQIYPLEGNWKNLAPAEQSYQVGRCIGFLYGDLAYRKSTH	
GenBank L a.a.	DVSHVLKTWRNGEGSWGQEIKQIYPLEGNWKNLAPAEQSYQVGRCIGFLYGDLAYRKSTH	
GenBank L a.a.	1381	1440
HR L a.a.	AEDSSLFPLSIQGRIRGRGFLKGLLDGLMRASCCQVIHRRSLAHLKRPANAVYGGIYLI	
M4 L a.a.	AEDSSLFPLSIQGRIRGRGFLKGLLDGLMRASCCQVIHRRSLAHLKRPANAVYGGIYLI	
GenBank L a.a.	AEDSSLFPLSIQGRIRGRGFLKGLLDGLMRASCCQVIHRRSLAHLKRPANAVYGGIYLI	
GenBank L a.a.	1441	1500
HR L a.a.	DKLSVSPFLSLTRSGPIRDELETIPHKIPTSYPTSNDMGIVRNYFKYQCRLIEKGKY	
M4 L a.a.	DKLSVSPFLSLTRSGPIRDELETIPHKIPTSYPTSNDMGIVRNYFKYQCRLIEKGKY	
GenBank L a.a.	DKLSVSPFLSLTRSGPIRDELETIPHKIPTSYPTSNDMGIVRNYFKYQCRLIEKGKY	
GenBank L a.a.	1501	1560
HR L a.a.	RSHYSQLWFLSDVLSIDFIGPFSISTTLLQILYKPFLSGKDKNELRELANLSSLLRSGEG	
M4 L a.a.	RSHYSQLWFLSDVLSIDFIGPFSISTTLLQILYKPFLSGKDKNELRELANLSSLLRSGEG	
GenBank L a.a.	RSHYSQLWFLSDVLSIDFIGPFSISTTLLQILYKPFLSGKDKNELRELANLSSLLRSGEG	
GenBank L a.a.	1561	1620
HR L a.a.	WEDIHVKKFTKDILLCPEEIRHACKFGIAKDNNKDMSYPPWGRESRTITTIIPVYTTTP	
M4 L a.a.	WEDIHVKKFTKDILLCPEEIRHACKFGIAKDNNKDMSYPPWGRESRTITTIIPVYTTTP	
GenBank L a.a.	WEDIHVKKFTKDILLCPEEIRHACKFGIAKDNNKDMSYPPWGRESRTITTIIPVYTTTP	
GenBank L a.a.	1621	1680
HR L a.a.	YPKMLEMPPRIQNPLLGSIRLGQLPTGAHYKIRSLILHGMGIHYRDFLSCGDGSGGMTAAL	
M4 L a.a.	YPKMLEMPPRIQNPLLGSIRLGQLPTGAHYKIRSLILHGMGIHYRDFLSCGDGSGGMTAAL	
GenBank L a.a.	YPKMLEMPPRIQNPLLGSIRLGQLPTGAHYKIRSLILHGMGIHYRDFLSCGDGSGGMTAAL	
GenBank L a.a.	1681	1740
HR L a.a.	LRENVHSRGIFNSLLELSGSVMRGASPEPPSALETLGGDKSRCVNGETCWEYPSLCDPR	
M4 L a.a.	LRENVHSRGIFNSLLELSGSVMRGASPEPPSALETLGGDKSRCVNGETCWEYPSLCDPR	
GenBank L a.a.	LRENVHSRGIFNSLLELSGSVMRGASPEPPSALETLGGDKSRCVNGETCWEYPSLCDPR	
GenBank L a.a.	1741	1800
HR L a.a.	TWDYFLRLKAGLGLQIDLIVMDMEVRDSTSLSKIETNVRNYVHRILDEQGVLIYKTYGTY	
M4 L a.a.	TWDYFLRLKAGLGLQIDLIVMDMEVRDSTSLSKIETNVRNYVHRILDEQGVLIYKTYGTY	
GenBank L a.a.	TWDYFLRLKAGLGLQIDLIVMDMEVRDSTSLSKIETNVRNYVHRILDEQGVLIYKTYGTY	
GenBank L a.a.	1801	1860
HR L a.a.	ICESEKNAVТИLGMFKTVDLVQTEFSSSQTSEVYVMCKGLKKLIDEPNPDWSSINESWK	
M4 L a.a.	ICESEKNAVТИLGMFKTVDLVQTEFSSSQTSEVYVMCKGLKKLIDEPNPDWSSINESWK	
GenBank L a.a.	ICESEKNAVТИLGMFKTVDLVQTEFSSSQTSEVYVMCKGLKKLIDEPNPDWSSINESWK	

FIGUR 23-3

GenBank L a.a.	1861	1920
HR L a.a.	NLYAFQSSEQEFARAKVSTYFTLTGIPSQFIPDPFVNIEMLQIFGVPTGVSHAAALKS	
M4 L a.a.	NLYAFQSSEQEFARAKVSTYFTLTGIPSQFIPDPFVNIEMLQIFGVPTGVSHAAALKS	
GenBank L a.a.	1921	1980
HR L a.a.	SDRPADLLTISLYMAIISYYNINHIRVGPIPPNPPSDGIAQNVGIAITGISFWLSLMEK	
M4 L a.a.	SDRPADLLTISLYMAIISYYNINHIRVGPIPPNPPSDGIAQNVGIAITGISFWLSLMEK	
GenBank L a.a.	1981	2040
HR L a.a.	DIPLYQQCLAVIOQSFPPIRWEAVSVKGGYKQKWSTRGDGLPKDTRISDSLAPIGNWIRSL	
M4 L a.a.	DIPLYQQCLAVIQQSFPPIRWEAVSVKGGYKQKWSTRGDGLPKDTRISDSLAPIGNWIRSL	
GenBank L a.a.	2041	2100
HR L a.a.	ELVRNQVRLNPNEILFNQLCRTVDNHLKWSNLRKNTGMIEWINRRISKEDRSILMLKSD	
M4 L a.a.	ELVRNQVRLNPNEILFNQLCRTVDNHLKWSNLRKNTGMIEWINRRISKEDRSILMLKSD	
GenBank L a.a.	2101 2110	
HR L a.a.	LHEENSWRD	
M4 L a.a.	LHEENSWRD	

FIGUR 23-4