



공개특허 10-2020-0066349



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0066349
(43) 공개일자 2020년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7013668

(22) 출원일자(국제) 2018년10월16일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2020년05월13일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/078206

(87) 국제공개번호 WO 2019/076877

국제공개일자 2019년04월25일

(30) 우선권주장

62/572,927 2017년10월16일 미국(US)

(71) 출원인
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
벨기에왕국 럭센사르트 (비)-1330 루 드 린스티튜트 89

(72) 발명자
아멘돌라, 벼지니아
이탈리아 로마 비아 디 카스텔 로마노 100 레이테라 에스알엘
콜로카, 스테파노
이탈리아 로마 비아 살라리아 73 레이테라 에스알엘
비텔리, 알레산드라
이탈리아 로마 비아 디 카스텔 로마노 100 레이테라 에스알엘

(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 복제 가능 아데노바이러스 백터

(57) 요 약

복제 가능 원숭이 아데노바이러스 백터가 외인성 면역원의 전달을 위해 제공된다. 본 발명의 백터는 외인성 면역원의 우수한 복제 및 발현을 입증한다. 이들은 유전자 요법에서뿐만 아니라 예방 및 치료 백신으로서도 유용하다.

(52) CPC특허분류

A61P 31/14 (2018.01)
A61P 31/20 (2018.01)
A61K 2039/572 (2013.01)
C12N 2710/10343 (2013.01)
C12N 2730/10134 (2013.01)
C12N 2760/20134 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

프로모터 및 트랜스진을 포함하고, 벡터의 E3 영역, HE1 부위 또는 HE2 부위에 삽입되는 발현 카세트를 포함하는 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 원숭이는 침팬지인 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 침팬지 아데노바이러스 섬유 폴리펩티드 또는 그의 기능적 유도체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및/또는 침팬지 아데노바이러스 E4 영역을 추가로 포함하는 복제 가능 침팬지 아데노바이러스 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서, 벡터는 인간에서 낮은 혈청 유병률을 갖는 아데노바이러스인 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서, 벡터는 ChAd155인 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터.

청구항 6

제4항에 있어서, 벡터는 ChAd83인 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터.

청구항 7

제1항에 있어서, 프로모터는 CASI 프로모터 및 증강된 시토메갈로바이러스 프로모터로부터 선택되는 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터.

청구항 8

제7항에 있어서, 프로모터는 CASI 프로모터인 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터.

청구항 9

제7항에 있어서, 프로모터는 증강된 시토메갈로바이러스 프로모터인 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터.

청구항 10

제1항에 있어서, 발현 카세트는 전사후 조절 요소를 추가로 포함하는 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터.

청구항 11

제10항에 있어서, 전사후 조절 요소는 우드척 간염 전사후 조절 요소인 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터.

청구항 12

제1항에 있어서, 트랜스진은 항원인 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터.

청구항 13

제12항에 있어서, 항원은 광견병 바이러스 항원, 호흡기 세포융합 바이러스 항원, 인간 면역결핍 바이러스 항원, 결핵 항원, 말라리아 항원, C형 간염 바이러스 항원, 치쿤군야 항원 및 B형 간염 바이러스 항원으로부터 선택되는, 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터.

청구항 14

제1항에 있어서, 발현 카세트는 E3 영역 내에 삽입되는 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터.

청구항 15

제1항에 있어서, 발현 카세트는 HE1 영역 내에 삽입되는 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터.

청구항 16

제1항에 있어서, 발현 카세트는 HE2 영역 내에 삽입되는 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터.

청구항 17

병원체에 의해 야기되는 질환에 대한 면역 반응을 이를 필요로 하는 대상체에서 유도하기 위한 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터의 사용 방법.

청구항 18

질환의 예방 또는 치료를 위한 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터의 용도.

청구항 19

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터는 근육내 주사에 의해 투여되는 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터.

청구항 20

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터는 경구 투여되는 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터.

청구항 21

벡터는 근육내 주사에 의해 투여되는, 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터의 사용 방법.

청구항 22

벡터는 경구 투여되는, 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터의 사용 방법.

발명의 설명**발명의 내용****[0001]**

서열 목록

[0002]

본 출원은 아스키(ASCII) 형식으로 전자 제출된 서열 목록을 함유하고, 그 전문이 본원에 참고로 포함되었다. 2018년 9월 28일에 생성된 상기 아스키 사본은 VU66430_WO_SL.txt로 명명되고, 그 크기가 100,598 바이트이다.

[0003]

발명의 분야

[0004]

본 발명은 재조합 아데노바이러스 분야에 관한 것이다. 이는 단리된 복제 가능 아데노바이러스 벡터, 재조합 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 벡터 및 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0005]

발명의 배경

[0006]

인간 아데노바이러스는 이들의 큰 트랜스제인(transgene) 용량 및 다양한 표적 조직에서 고도로 효율적인 유전자 전달을 달성하는 능력으로 인해 유전자 전달 응용에 널리 사용되고 있다. 재조합 아데노바이러스는 유전자 요

법에서 및 백신으로서 유용하다. 원숭이 아데노바이러스를 기반으로 하는 바이러스 벡터는 핵산 기반 백신의 개발을 위한 인간 유래 아데노바이러스 벡터의 사용에 대한 대안을 제공할 수 있다.

[0007] 대부분의 인간은 인간 아데노바이러스에 노출되고 이에 면역을 발생시킨다. 분자를 표적에 효과적으로 전달하고, 인간 아데노바이러스 혈청형에 대한 기존 면역의 효과를 최소화하는 벡터가 요구된다. 이와 관련하여 원숭이 아데노바이러스는 효과적이고; 이들은 인간 바이러스와 충분히 밀접하게 관련되어서, 인간이 기존 면역을 거의 또는 전혀 갖지 않는 전달된 외인성 항원에 대한 면역을 유도하는 데 효과적이다.

[0008] 복제 결합 아데노바이러스는 그들의 게놈(genome)을 세포의 내부로 전달하고, 이들이 복제하지 않기 때문에 트랜스진 페이로드(payload)를 증폭시키지 않는다. 전형적으로, E1 유전자는 선택된 프로모터 및 관심 유전자 또는 유전자들에 상응하는 핵산 서열을 포함하는 트랜스진 카세트(cassette)로 대체되어 복제 결합 재조합 바이러스를 초래한다.

[0009] 복제 결합 아데노바이러스와 달리, 복제 가능 아데노바이러스는 이들의 DNA 및 이들의 트랜스진을 복제하여, 이들의 트랜스진 발현을 훨씬 더 큰 정도로 증폭시킨다. 복제 가능 아데노바이러스는 더 큰 효능의 잠재력을 갖지만, 이들은 가족 구성원 또는 의료 서비스 종사자로의 확산 및 감염 위험을 제기한다. 잠재적 안전성 문제에도 불구하고, 호흡기 질환에 대해 면역화하기 위해 복제 가능 인간 아데노바이러스가 성공적으로 사용되어 왔다. 수십만 명의 미군 신병은 장용성 코팅된 캡슐 또는 정제로서 제제화된 전바이러스(whole virus) 인간 Ad4, Ad7 및 Ad21의 약독화되지 않은 생(live, non-attenuated) 단리물로 급성 호흡기 질환(Acute Respiratory Disease)에 대해 효과적이고 안전하게 백신 접종되었다 (Cancer Gene Therapy (2004) 11:819).

[0010] 인간 및 개 복제 가능 벡터가 기재되었지만 (Vaccine (2002) 20:3485), 어떠한 원숭이 복제 가능 아데노바이러스 벡터도 아직 질환의 예방 또는 치료를 위해 면역원 또는 치료제를 전달할 수 있는 것으로 밝혀지지 않았다. 이러한 벡터는 강한 복제 가능 벡터의 이점과 원숭이 아데노바이러스의 이점을 겸비할 것이다. 또한, 원숭이 벡터는 인간 세포에서 복제하는 능력을 갖는 반면, 이들은 원숭이 세포에서보다 잘 복제하지 못하고, 따라서 그들의 효능은 원숭이에서와 비교하여 약독화된다. 따라서, 당업계에서는 강한 복제 및 인간에서 기존 면역이 없는 이점을 겸비한 벡터에 대한 요구가 존재한다.

[0011] 본 발명의 요약

[0012] 본 발명의 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터는 복제 결합 원숭이 아데노바이러스 벡터보다 더 강한 유전자-기반 백신 반응을 생성한다. 본 발명의 벡터는 인간 면역화에 적합한 안전성 프로파일(profile)을 유지하면서 개선된 생체내 효능을 제공하도록 최적화되었다. 이들은 강하고 지속적인 트랜스진 발현을 유도할 수 있는 본질적으로 강한 면역조절 백본(backbone) 및 프로모터를 갖는다. 본 발명의 복제 가능 벡터는 치료 및 제조 공정에서의 사용 방법, 대상체에서 면역 반응의 유도를 위한 면역원성 조성물의 성분으로서 유용하다.

[0013] 본 발명은 프로모터 및 트랜스진을 포함하는 발현 카세트를 포함하는 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터를 제공하며, 여기서 발현 카세트는 벡터의 E3 영역, HE1 부위 또는 HE2 부위에 삽입된다.

[0014] 본 발명은 또한 병원체에 의해 야기되는 질환에 대한 면역 반응을 이를 필요로 하는 대상체에서 유도하기 위해 상기 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터를 사용하는 방법을 제공한다.

[0015] 한 실시양태에서, 원숭이는 침팬지이다. 벡터는 ChAd155 또는 ChAd83일 수 있다.

[0016] 복제 가능 침팬지 아데노바이러스는 침팬지 아데노바이러스 섬유 폴리펩티드 또는 그의 기능적 유도체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및/또는 침팬지 아데노바이러스 E4 영역을 추가로 포함할 수 있다.

[0017] 프로모터는 CASI 프로모터 및 증강된 시토메갈로바이러스(cytomegalovirus) 프로모터로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 발현 카세트는 전사후 조절 요소를 추가로 포함할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 전사후 조절 요소는 우드Chuck 간염(Woodchuck Hepatitis) 전사후 조절 요소이다.

[0018] 트랜스진은 항원일 수 있다. 항원은 광견병 바이러스 항원, 호흡기 세포융합 바이러스 항원, 인간 면역결핍 바이러스 항원, 결핵 항원, 말라리아 항원, C형 간염 바이러스 항원, 치쿤군야(Chikungunya) 항원 및 B형 간염 바이러스 항원으로부터 선택될 수 있다.

[0019] 도면의 설명

[0020] 도 1: 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 구축물. 반전 말단 반복부(ITR)는 3' 및 5' 말단에 플랭킹(flank)되고; E1은 초기 유전자 1이고; CMV는 시토메갈로바이러스 프로모터이고; CASI는 CASI 프로모터이

고, RG는 모델 항원이고, WPRE는 우드체 간염 전사후 조절 요소이고, ΔE3은 초기 유전자 3이 결실된 것을 나타내고; 섬유는 섬유 단백질을 코딩하는 아데노바이러스 유전자를 나타내고, E4는 초기 유전자 4이다.

[0021] 아데노바이러스 계놈의 E3 영역의 위치에 트랜스진 발현 카세트를 삽입함으로써 ("RC1") (상부 패널), HE1 영역에, 즉 섬유 유전자의 종결 코돈과 E4 영역 사이에 트랜스진 발현 카세트를 삽입함으로써 (중앙 패널), 또는 HE2 영역에, 즉 우측 ITR의 하류에 트랜스진 발현 카세트를 삽입함으로써 ("RC2") (하부 패널) 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터를 구축하였다.

[0022] 도 2: 1 차 인간 세포주에서 RC1 및 RC2 벡터를 발현하는 복제 가능 ChAd155 및 ChAd83의 생산. 막대는 세포당 발현된 바이러스 입자 수를 나타낸다.

[0023] 도 3: 1 차 인간 세포주에서 RC1 및 RC2 벡터를 발현하는 복제 가능 ChAd155 및 ChAd83의 총 바이러스 계놈 카피 수(copy number). 막대는 세포당 벡터 계놈 카피 수를 나타낸다.

[0024] 도 4: 250 및 1250의 감염다중도(multiplicity of infection)에서 1 차 인간 세포주에 의한 ChAd155 복제 결함(RD) 및 복제 가능(RC1 및 RC2) 벡터의 발현 수준. 벡터는 웨스턴 블롯(Western blot)에 의해 입증되는 광견병 당단백질 트랜스진 (51 kDa)을 발현한다. 좌측 패널은 감염 후 2 일에 발현을 나타내고, 우측 패널은 감염 후 7 일에 발현을 나타낸다.

[0025] 도 5: 250 및 1250의 감염다중도에서 1 차 인간 세포주에 의한 ChAd83 복제 결함(RD) 및 복제 가능(RC1 및 RC2) 벡터의 발현 수준. 벡터는 웨스턴 블롯에 의해 입증되는 광견병 당단백질 트랜스진 (51 kDa)을 발현한다. 상부 패널은 감염 후 2 일에 발현을 나타내고, 하부 패널은 감염 후 7 일에 발현을 나타낸다.

[0026] 도 6: 쥐 세포주 NMuLi에서 (상부 패널) 및 베로(Vero) 비-인간 영장류 세포주에서 (하부 패널) 복제 가능 ChAd155 RC1 및 RC2와 RC1 및 RC2 벡터를 발현하는 ChAd83의 바이러스 계놈 카피 수. 50 및 250의 감염다중도에서 세포를 감염시켰다.

[0027] 도 7: 감염 후 2 및 5 일에 웨스턴 블롯에 의해 입증된, 쥐 세포주에서 모델 광견병 당단백질(RG) 트랜스진을 발현하는 ChAd155 RC1 및 RC2 벡터의 발현 수준의 비교 (상부 패널). 감염 후 2 및 5 일에 웨스턴 블롯에 의해 입증된, 쥐 세포주에서 모델 광견병 당단백질(RG) 트랜스진을 발현하는 ChAd155 RC1 및 RC2 벡터와 ChAd83 RC1 및 RC2 벡터의 발현 수준의 비교 (하부 패널). 50, 250 및 1250의 감염다중도에서 세포를 감염시켰다.

[0028] 도 8: 마우스에서 모델 단백질 트랜스진을 발현하고, IFN-감마 ELISpot에 의해 측정되고, 10^6 개 비장세포당 스팟 형성 세포(spot forming cell)로서 표현되는 ChAd155 복제 결함(RD), ChAd155 RC1 및 ChAd83 RC1 벡터의 면역원성.

[0029] 도 9: 마우스에서 모델 광견병 당단백질 단백질 트랜스진을 발현하는 ChAd155 RD 및 ChAd155 RC1의 경구 및 근육내(IM) 전달에 대한 중화 항체 (상부 패널) 및 T 세포 (하부 패널) 반응. 상부 패널은 형광 항체 바이러스 중화 검정(FAVN)으로 측정된, 광견병 감염에 대한 중화 항체 보호를 나타낸다. 점선은 보호의 역치를 나타낸다. 하부 패널은 인터페론 감마 ELISpot 검정에 의해 측정된, 광견병 특이적 T 세포 반응을 나타낸다.

[0030] 서열의 주석

[0031] 서열 1 - 야생형 ChAd155를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열

[0032] 서열 2 - 야생형 ChAd83을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열

[0033] 서열 3 - CASI 프로모터를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열

[0034] 서열 4 - 증강된 hCMV 프로모터를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열

[0035] 발명의 상세한 설명

[0036] 아데노바이러스

[0037] 아데노바이러스는 대략 36 kb의 선형 이중 가닥 DNA 계놈을 갖는 비외피성 이십면체 바이러스이다. 아데노바이러스는 숙주 세포의 계놈 내로 통합되지 않으면서 분열 및 비분열 세포 모두를 포함하여 여러 포유동물 종의 수 많은 세포 유형을 형질도입할 수 있다. 이들은 이들의 입증된 안전성, 다양한 표적 조직에서 고도로 효율적인 유전자 전달을 달성하는 능력, 및 큰 트랜스진 용량으로 인해 유전자 전달 응용을 위해 널리 사용되고 있다. 인간 아데노바이러스 벡터는 유전자 요법 및 백신에 현재 사용되지만, 통상적인 인간 아데노바이러스에 대한 이

전의 노출 후에, 기존 면역의 전세계적으로 높은 유병률이라는 단점을 갖는다.

[0038] 아데노바이러스는 다수의 다른 미량 단백질, VI, VIII, IX, IIIa 및 IVa2와 함께 3 개의 주요 단백질, 헥손 (II), 웬톤 염기 (III) 및 노브(knobbed) 섬유 (IV)를 포함하는 이십면체 캡시드(capsid)를 갖는 특징적인 형태를 갖는다. 헥손은 캡시드의 구조적 성분 대부분을 차지하며, 이는 240 개의 삼량체 헥손 캡소머(capsomer) 및 12 개의 웬톤 염기로 구성된다. 헥손은 3 개의 보존 이중 배럴(conserved double barrel)을 갖고, 상부는 3 개의 타워를 갖고, 각각의 타워는 대부분의 캡시드를 형성하는 각각의 서브유닛으로부터 루프(loop)를 함유한다. 헥손의 염기는 아데노바이러스 혈청형 사이에서 고도로 보존되고, 반면에 표면 루프는 가변적이다. 웬톤은 또 다른 아데노바이러스 캡시드 단백질이고; 섬유가 부착되는 오량체 염기를 형성한다. 삼량체 섬유 단백질은 캡시드의 각각의 12 개의 정점에서 웬톤 염기로부터 돌출되고, 노브 막대형 구조이다. 섬유 단백질의 주요 역할은 노브 영역의 세포 수용체와의 상호작용을 통해 세포 표면에 바이러스 캡시드를 테더링하는 것이다. 섬유의 노브 영역뿐만 아니라 연질 샤프트(shaft)에서의 변이는 상이한 아데노바이러스 혈청형의 특징이다.

[0039] 아데노바이러스 게놈은 잘 특징지어져 있다. 선형 이중 가닥 DNA는 고도로 염기성인 단백질 VII 및 소형 펩티드 pX (또한 뮤(mu)로 지칭됨)와 연관된다. 또 다른 단백질 V는 이러한 DNA-단백질 복합체로 패키징되고, 단백질 VI를 통해 캡시드에 구조적 연결을 제공한다. 특이적 개방 판독 프레임이 유사하게 위치하는 것, 예를 들어 각각의 바이러스의 E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 및 L5 유전자의 위치와 관련하여 아데노바이러스 게놈의 전체적인 구조에 있어서 일반적인 보존이 있다. 아데노바이러스 게놈의 각각의 말단부는 반전 말단 반복부(ITR)로서 공지된 서열을 포함하며, 이는 바이러스 복제를 위해 필요하다. 아데노바이러스 게놈의 5' 말단은 패키징 및 복제를 위해 필요한 5' 시스-요소를 함유하고; 즉 5' ITR 서열 (복제 기점으로서 기능할 수 있음) 및 E1 프로모터에 대한 선형 아데노바이러스 게놈 및 인핸서(enhancer) 요소를 패키징하기 위해 필요한 서열을 함유하는 천연(native) 5' 패키징 인핸서 도메인이다. 아데노바이러스 게놈의 3' 말단은, ITR을 포함하여, 패키징 및 캡시드화(encapsidation)를 위해 필요한 3' 시스-요소를 포함한다. 바이러스는 바이러스-코딩 프로테아제를 또한 포함하고, 이는 감염성 비리온을 생산하는 데 필요한 구조 단백질의 일부를 가공하는 데 필요하다.

[0040] 아데노바이러스 게놈의 구조는 바이러스 유전자가 숙주 세포 형질도입 후에 발현되는 순서를 기반으로 기재된다. 보다 구체적으로, 바이러스 유전자는, DNA 복제의 개시 이전 또는 이후에 전사가 일어나는지에 따라 초기 (E) 또는 후기 (L) 유전자로 지칭된다. 형질도입의 초기 단계에서, 아데노바이러스의 E1A, E1B, E2A, E2B, E3 및 E4 유전자를 발현시켜 바이러스 복제를 위한 숙주 세포를 제조한다. E1 유전자는 마스터 스위치로 간주되고, 이는 전사 활성화제로서 작용하고, 초기 및 후기 유전자 전사 모두에 관여한다. E2는 DNA 복제에 관여하고; E3은 면역 조절에 관여하고, E4는 바이러스 mRNA 대사를 조절한다. 감염의 후기 단계 동안, 바이러스 입자의 구조적 성분을 코딩하는 후기 유전자 L1-L5의 발현이 활성화된다. 교호 스플라이싱(alternative splicing)을 갖는 주요 후기 프로모터(MLP)로부터 후기 유전자를 전사하였다.

[0041] 아데노바이러스 캡시드 단백질 및 이들의 코딩 폴리뉴클레오티드

[0042] 상기 요약된 바와 같이, 아데노바이러스 캡시드는 3 개의 주요 단백질, 헥손, 웬톤 및 섬유를 포함한다. 헥손은 캡시드의 구조적 성분 대부분을 차지하며, 이는 240 개의 삼량체 헥손 캡소머 및 12 개의 웬톤 염기로 구성된다. 헥손은 3 개의 보존 이중 배럴을 갖고, 상부는 3 개의 타워를 갖고, 각각의 타워는 대부분의 캡시드를 형성하는 각각의 서브유닛으로부터 루프를 함유한다. 헥손의 염기는 아데노바이러스 혈청형 사이에서 고도로 보존되고, 반면에 표면 루프는 가변적이다.

[0043] 웬톤은 섬유가 부착되는 오량체 염기를 형성하는 또 다른 아데노바이러스 캡시드 단백질이다. 삼량체 섬유 단백질은 캡시드의 각각의 12 개의 정점에서 웬톤 염기로부터 돌출되고, 노브 막대형 구조이다. 대부분의 다른 이십면체 바이러스의 것과 비교하여 아데노바이러스 캡시드의 표면에서 현저한 차이는 긴 얇은 섬유 단백질의 존재이다. 섬유 단백질의 주요 역할은 세포 수용체와의 상호작용을 통해 세포 표면에 바이러스 캡시드를 테더링하는 것이다.

[0044] 많은 아데노바이러스 혈청형의 섬유 단백질은 공통적인 구조를 공유한다: N-말단 꼬리, 반복 서열로 제조된 중심 샤프트, 및 C-말단 구형 노브 도메인 (또는 "헤드"). 중심 샤프트 도메인은 가변적인 수의 베타-반복부로 구성된다. 베타-반복부는 연결되어 고도로 경질이고 안정한 3 개의 꼬인 나선형 가닥의 신장된 구조를 형성한다. 샤프트는 구형 노브 구조와 N-말단 꼬리를 연결하고, 이는 표적 세포 수용체와의 상호작용을 담당한다. 아데노바이러스 노브 도메인의 구형 성질은 측면에 및 첨단에 수용체를 결합시키기 위한 큰 표면을 제시한다. 이와 같은 구조의 효과는 바이러스 캡시드로부터 멀리 수용체-결합 부위를 위치시켜, 상대적으로 평평한 캡시드

표면에 의해 제시되는 입체적 제약으로부터 바이러스를 자유롭게 하는 것이다.

[0045] 많은 아데노바이러스 혈청형의 섬유가 동일한 전체적인 구조를 갖지만, 이들은 이들의 구조뿐만 아니라 기능에 영향을 미치는 가변 아미노산 서열을 갖는다. 예를 들어, 섬유 노브의 표면 상의 많은 노출 영역은 쉽게 적응 가능한 수용체 결합 부위를 제시한다. 섬유 노브의 구형 형상은 수용체가 노브의 측면에 또는 섬유 노브의 상부에 결합할 수 있게 한다. 이들 결합 부위는 전형적으로 인간 아데노바이러스 사이에 잘 보존되지 않은 베타-가닥을 연결하는 표면-노출 루프에 놓인다. 이들 루프 상의 노출된 측쇄(side chain)는 3 차 및 4 차 구조를 보존하면서 다양한 표면 특징부를 노브에 제공한다. 예를 들어, 노브 표면에서의 정전기 전위 및 전하 분포는 섬유 노브 서열에서의 등전점의 넓은 범위로 인해 변할 수 있고, 아데노바이러스 "Ad" 8, Ad 19, 및 Ad 37에서 대략 9의 pI부터 하위군 B 아데노바이러스에서 대략 5의 pI로 변한다. 구조적으로 복잡한 바이러스 리간드로서, 섬유 단백질은 바이러스 캡시드로부터 다수의 배향 및 거리 (샤프트)의 다양한 결합 표면 (노브)을 제시하게 할 수 있다.

[0046] 일부 혈청형 사이의 가장 명백한 변이 중 하나는 섬유 길이이다. 연구는 섬유 샤프트의 길이가 노브 및 바이러스와 그의 표적 수용체의 상호작용에 강하게 영향을 미친다는 것을 보여 주었다. 또한, 혈청형 사이의 섬유 단백질은 또한 구부러지는 이들의 능력에서 다양할 수 있다. 샤프트 내의 베타-반복부는 고도로 안정하고 규칙적인 구조를 형성하지만, 전자 현미경(EM) 연구는 섬유 내의 구분되는 힌지(hinge)를 보여 주었다. 여러 아데노바이러스 혈청형 섬유로부터의 단백질 서열의 분석은 N-말단 꼬리로부터 제 3 베타-반복부에서 샤프트의 반복 서열에서의 파괴를 정확히 보여주고, 이는 EM에 의해 보이는 바와 같이 샤프트 내 힌지 중 하나와 강하게 상호 관련된다. 섬유 내 힌지는 노브가 바이러스 캡시드에 비해 다양한 배향을 채택하게 하고, 이는 노브 상의 수용체 결합 부위의 올바른 제시를 필요로 하는 수용체 맞물림에 입체 장애를 회피할 수 있다. 예를 들어, 하위군 D 아데노바이러스의 경질 섬유는 그 자체가 구부러질 수 없기 때문에 연질 수용체 또는 바이러스 부착을 위해 미리 위치한(prepositioned) 것을 필요로 한다.

[0047] 상이한 Ad 혈청형에 대한 특이적 세포 수용체의 확인 및 이들이 어떻게 조직 굴성에 기여하는지에 대한 지식은 섬유 슈도타이핑(pseudotyping) 기술의 사용을 통해 달성되었다. 일부 하위군의 Ad가 1 차 수용체로서 콕사키 바이러스(Coxsackievirus) 및 아데노바이러스 수용체("CAR")를 사용하지만, 많은 Ad가 대안적인 1 차 수용체를 사용하여 시험관내 및 생체내에서 매우 상이한 굴성을 초래한다는 것이 명백해지고 있다. 이들 혈청형의 섬유는 섬유 노브 내의 순 전하 차이와 함께, 이들의 1 차 및 3 차 구조, 예컨대 섬유 샤프트 경도, 섬유 샤프트의 길이, 및 CAR 결합 부위 및/또는 추정 HSPG 결합 모티프의 결여에서 명백한 차이를 나타낸다. 따라서, 대안적 섬유 샤프트 및 노브를 갖는 Ad 5 입자의 슈도타이핑은 중요한 세포 결합 도메인을 제거할 기회를 제공하고, 추가로, Ad 5에 의해 달성된 것과 비교하여 정의된 세포 유형으로 더 효율적인 (및 잠재적으로 더 세포-선택적인) 트랜스진 전달을 허용할 수 있다. 인간 또는 실험 모델에서 더 낮은 혈청 유병률을 갖는 Ad로부터의 섬유가 사용되면, 섬유-슈도타이핑된 Ad 입자의 중화는 또한 감소할 수 있고, 이는 벡터의 성공적인 투여에 호의적인 상황이다. 또한, 단리된 섬유 노브 영역뿐만 아니라, 전장 섬유는, 핵손 또는 웜톤 단독으로는 아니지만, 수지상 세포 성숙을 유도할 수 있고, 강한 CD8+ T 세포 반응의 유도와 연관된다. 종합하면, 아데노바이러스 섬유 단백질은 적어도 아데노바이러스 벡터의 수용체-결합 및 면역원성에서 중요한 역할을 한다.

아데노바이러스 복제

[0049] 역사적으로, 아데노바이러스 백신 개발은 결합, 비-복제 벡터에 초점을 맞추었다. 이들은 복제에 필수적인 E1 영역 유전자의 결실에 의해 복제 결함이 된다. 전형적으로, 비-필수적 E3 영역 유전자는 또한 외인성 트랜스진에 대한 공간을 만들기 위해 결실된다. 이어서 외인성 프로모터의 제어하에 트랜스진을 포함하는 발현 카세트를 삽입한다. 이어서, 이들 복제-결함 바이러스는 E1-보완 세포에서 생산된다.

[0050] 용어 "복제-결함" 또는 "복제-불가능" 아데노바이러스는, 적어도 기능적 결실 (또는 "기능-의-손실" 돌연변이), 즉, 유전자를 완전히 제거하지 않고 그의 기능을 손상시키는 결실 또는 돌연변이, 예를 들어, 인공 종결 코돈의 도입, 활성 부위 또는 상호작용 도메인의 결실 또는 돌연변이, 유전자 등의 조절 서열의 돌연변이 또는 결실, 또는 바이러스 복제에 필수적인 유전자 생산물을 코딩하는 유전자, 예컨대, E1A, E1B, E2A, E2B, E3 및 E4 (예컨대, E3 ORF1, E3 ORF2, E3 ORF3, E3 ORF4, E3 ORF5, E3 ORF6, E3 ORF7, E3 ORF8, E3 ORF9, E4 ORF7, E4 ORF6, E4 ORF4, E4 ORF3, E4 ORF2, 및/또는 E4 ORF1)로부터 선택되는 하나 이상의 아데노바이러스 유전자의 완전한 제거를 포함하도록 조작되었기 때문에, 복제가 불가능한 아데노바이러스를 지칭한다. 적합하게는, E1 및 임의로 E3 및/또는 E4가 결실된다. 결실된 경우, 또 다른 서열에 대해 동일성 백분율을 결정할 때 상기 언급된 결실된 유전자 영역이 정렬에서 적합하게 고려되지 않을 것이다.

- [0051] 용어 "복제-가능" 아데노바이러스는 세포 내에 포함된 임의의 재조합 헬퍼(helper) 단백질의 부재하에 숙주 세포에서 복제될 수 있는 아데노바이러스를 지칭한다. 적합하게는, "복제-가능" 아데노바이러스는 온전한 구조 유전자 및 하기의 온전한 또는 기능적 필수 초기 유전자: E1A, E1B, E2A, E2B 및 E4를 포함한다. 특정 동물로부터 단리된 야생형 아데노바이러스는 그 동물에서 복제 가능일 것이다.
- [0052] 본 발명의 벡터
- [0053] 비-인간 원숭이 아데노바이러스를 기반으로 하는 바이러스 벡터는 유전자 요법 및 유전자 백신을 위한 인간 유래 벡터의 사용에 대한 대안을 나타낸다. 인간 기원의 세포에서의 이들의 효율적인 증식에 의해 입증되는 바와 같이, 비-인간 원숭이로부터 단리된 특정 아데노바이러스는 인간으로부터 단리된 아데노바이러스와 밀접하게 관련된다. 인간은 원숭이 아데노바이러스에 대한 면역성이 거의 또는 전혀 발생하지 않기 때문에, 이들은 인간 아데노바이러스 사용에 대한 개선된 대안을 제공하는 것이 가능하다.
- [0054] 용어 "벡터"는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드, 또는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입할 수 있는 적어도 하나의 폴리펩티드의 혼합물을 지칭한다. "낮은 혈청 유병률"은 인간 아데노바이러스 5(Ad5)와 비교하여 감소된 기존 중화 항체 수준을 갖는 것을 의미할 수 있다. 유사하게 또는 대안적으로, "낮은 혈청 유병률"은 약 35 % 미만의 혈청 유병률, 약 30 % 미만의 혈청 유병률, 약 20 % 미만의 혈청 유병률, 약 15 % 미만의 혈청 유병률, 약 10 % 미만의 혈청 유병률, 약 5 % 미만의 혈청 유병률, 약 4 % 미만의 혈청 유병률, 약 3 % 미만의 혈청 유병률, 약 2 % 미만의 혈청 유병률, 약 1 % 미만의 혈청 유병률, 또는 검출 불가능한 혈청 유병률을 의미할 수 있다. 혈청 유병률은 문헌 [Hum. Gene Ther. (2004) 15:293]에 기재된 것과 같은 방법을 사용함으로써 임상적으로 관련 있는 중화 역가(50 % 중화 역가 >200으로서 정의됨)를 갖는 개체의 백분율로서 측정될 수 있다.
- [0055] 한 실시양태에서, 본 발명의 아데노바이러스 벡터는 "원숭이 아데노바이러스"라고도 지칭되는 비인간 원숭이 아데노바이러스로부터 유래된다. 수많은 아데노바이러스는 비인간 원숭이, 예컨대 침팬지, 보노보, 레서스 마카크(rhesus macaques), 오랑우탄 및 고릴라로부터 단리된다. 이들 아데노바이러스로부터 유래된 벡터는 이들 벡터에 의해 코딩되는 트랜스진에 대한 강한 면역 반응을 유도할 수 있다. 비인간 원숭이 아데노바이러스를 기반으로 하는 벡터의 특정 이점은 인간 표적 집단에서 이들 아데노바이러스에 대한 교차-중화 항체의 상대적인 결여를 포함하고, 따라서 이들의 사용은 인간 아데노바이러스에 대한 기존 면역을 극복한다. 예를 들어, 일부 원숭이 아데노바이러스는 기존 인간 중화 항체와 교차 반응성을 갖지 않고, 특정 후보 인간 아데노바이러스 벡터의 경우의 35 %에 비교하여, 기존 인간 중화 항체와 특정 침팬지 아데노바이러스의 교차-반응은 단지 표적 집단의 2 %에 존재한다 (Sci. Transl. Med. (2012) 4:1).
- [0056] 본 발명의 아데노바이러스 벡터는 비-인간 아데노바이러스로부터, 예컨대 원숭이 아데노바이러스, 예를 들어, 침팬지(판 트로글로디테스(*Pan troglodytes*)), 보노보(판 파니스쿠스(*Pan paniscus*)), 고릴라(고릴라 고릴라 (*Gorilla gorilla*)) 및 오랑우탄(퐁고 아벨리이 및 퐁고 피그마에우스(*Pongo abelii* and *Pongo pygmaeus*))으로부터 유래될 수 있다. 이들은 군 B, 군 C, 군 D, 군 E 및 군 G로부터의 아데노바이러스를 포함한다. 침팬지 아데노바이러스는 ChAd3, ChAd15, ChAd19, ChAd25.2, ChAd26, ChAd27, ChAd29, ChAd30, ChAd31, ChAd32, ChAd33, ChAd34, ChAd35, ChAd37, ChAd38, ChAd39, ChAd40, ChAd63, ChAd83, ChAd155, ChAd157, ChAd0x1, ChAd0x2 및 SadV41을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 대안적으로, 아데노바이러스 벡터는 보노보로부터 단리된 비인간 원숭이 아데노바이러스, 예컨대 PanAd1, PanAd2, PanAd3, Pan5, Pan6, Pan7 (C7로서 또한 지칭됨) 및 Pan9로부터 유래될 수 있다. 벡터는, 전체적으로 또는 부분적으로, 비-인간 아데노바이러스의 섬유, 펜톤 또는 헥손을 코딩하는 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0057] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 원숭이는 침팬지이다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 복제 가능 침팬지 아데노바이러스 벡터는 침팬지 아데노바이러스 섬유 폴리펩티드 또는 그의 기능적 유도체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및/또는 침팬지 아데노바이러스 E4 영역을 추가로 포함한다.
- [0058] 본 발명의 한 실시양태에서, 벡터는 인간에서 낮은 혈청 유병률을 갖는 아데노바이러스이고, 여기서 "낮은 혈청 유병률"은 인간 대상체에서 30 % 미만이다. 본 발명의 아데노바이러스 벡터의 한 실시양태에서, 아데노바이러스는 인간 대상체에서 혈청 유병률이 30 % 미만이고, 바람직하게는 인간 대상체에서의 혈청 유병률이 없고, 더 바람직하게는 침팬지 아데노바이러스와 이전에 접촉하지 않은 인간 대상체에서 혈청 유병률이 없다.
- [0059] 복제 결합 벡터의 유전자 발현 카세트 삽입 부위의 선택은 바이러스 복제에 관여하는 것으로 공지된 영역을 대체하는 것에 주로 초점이 맞추어져 왔다. 복제 가능 벡터의 유전자 발현 카세트 삽입 부위의 선택은 복제 기구

를 보존하여야 한다. 바이러스는 다중 프로모터 및 교호 스플라이싱에 의해 제어되는 고도로 복잡한 전사 단위를 생성함으로써 이들의 코딩 용량을 최대화한다. 결과적으로, 복제 가능 바이러스 벡터는 기능적 발현 카세트에 대한 공간을 허용하면서 복제에 필요한 서열을 보존해야 한다.

[0060] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 원숭이 아데노바이러스 벡터는 ChAd155 또는 ChAd83이다.

[0061] 본 발명의 아데노바이러스 벡터의 실시양태에서, 아데노바이러스 DNA는 포유동물 표적 세포에 진입할 수 있고, 즉 감염성이다. 본 발명의 감염성 재조합 아데노바이러스는 예방 또는 치료 백신으로서 및 유전자 요법을 위해 사용될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 재조합 아데노바이러스는 표적 세포 내로 전달하기 위한 내인성 분자를 포함한다. 표적 세포는 포유동물 세포, 예를 들어 소 세포, 개 세포, 염소 세포, 사슴 세포, 침팬지 세포, 익수목 세포, 말 세포, 고양이 세포, 인간 세포, 이리 세포, 양 세포, 돼지 세포, 설치류 세포, 곰 세포 또는 여우 세포이다. 예를 들어, 표적 세포로 전달하기 위한 내인성 분자는 발현 카세트일 수 있다.

[0062] 본 발명에 따르면, 프로모터 및 트랜스진을 포함하는 발현 카세트를 포함하는 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터가 존재하며, 여기서 발현 카세트는 벡터의 E3 영역, HE1 부위 또는 HE2 부위에 삽입된다. 벡터는 복제에 필요한 E1 영역 또는 그의 단편을 포함한다.

[0063] 한 실시양태에서, 프로모터는 CASI 프로모터 및 증강된 시토메갈로바이러스 프로모터로부터 선택된다.

[0064] 추가의 실시양태에서, 발현 카세트는 전사후 조절 요소를 추가로 포함할 수 있고, 전사후 조절 요소는 우드척 간염 전사후 조절 요소일 수 있다.

[0065] 또 다른 실시양태에서, 트랜스진은 항원이다. 항원은 광견병 바이러스 항원, 호흡기 세포융합 바이러스 항원, 인간 면역결핍 바이러스 항원, 결핵 항원, 말라리아 항원, C형 간염 바이러스 항원, 치쿤군야 항원 및 B형 간염 바이러스 항원으로부터 선택될 수 있다.

[0066] 본 발명의 실시양태에서, 복제를 위해 필요한 E1 영역 또는 그의 단편이 존재하고, 관심 외인성 서열이 완전히 또는 부분적으로 결실된 E3 영역 내로 삽입된다. 한 실시양태에서, 벡터는 좌측 ITR 영역, 뒤이어 E1 영역, 이어서 E3 영역을 포함하고, 이는 프로모터, 관심 항원, 및 임의로 추가의 인핸서 요소를 포함하는 발현 카세트로 치환되고; 뒤이어 섬유 영역, E4 영역 및 우측 ITR이고; 번역은 우측 방향으로 일어난다. 추가의 실시양태에서, 프로모터는 CMV 프로모터이다. 보다 추가의 실시양태에서, 인핸서 요소는 B형 간염 번역후 조절 요소(HPRE) 또는 우드척 간염 번역후 요소(WPRE)이다.

[0067] 다른 실시양태에서, 벡터는 좌측 ITR 영역; 뒤이어 E1 영역; 완전히 또는 부분적으로 결실된 E3 영역; 섬유 영역; E4 영역; 프로모터, 관심 항원 및, 임의로, HE1 부위, 즉 섬유 유전자의 종결 코돈과 E4 영역 사이("HE1 부위")에 삽입된 하나 이상의 인핸서 요소를 포함하는 발현 카세트; 뒤이어 우측 ITR을 포함한다. ChAd155 HE1 삽입 부위는 야생형 ChAd155 서열의 bp 34611과 34612 사이이다. ChAd83 HE1 삽입 부위는 야생형 ChAd83 서열의 bp 33535와 33536 사이이다. 번역은 우측 방향으로 일어난다. 추가의 실시양태에서, 프로모터는 CASI 프로모터이다. 보다 추가의 실시양태에서, 인핸서 요소는 HPRE 또는 WPRE이다.

[0068] 추가의 실시양태에서, 벡터는 좌측 ITR 영역; 뒤이어 E1 영역; 완전히 또는 부분적으로 결실된 E3 영역; 섬유 영역; E4 영역; 프로모터, 관심 항원 및, 임의로, HE2 부위, 즉 좌측 ITR의 말단과 E4 mRNA의 캡(cap) 부위 사이("HE2 부위")에 삽입된 하나 이상의 인핸서 요소를 포함하는 발현 카세트; 뒤이어 우측 ITR을 포함한다. ChAd155 HE2 삽입 부위는 야생형 ChAd155 서열의 bp 37662와 37663 사이이다. ChAd83 HE2 삽입 부위는 야생형 ChAd83 서열의 bp 36387과 36388 사이이다. 번역은 좌측 방향으로 일어난다. 추가의 실시양태에서, 프로모터는 CASI 프로모터이다. 보다 추가의 실시양태에서, 인핸서 요소는 HPRE 또는 WPRE이다.

[0069] HE1 및 HE2 부위는 트랜스진에 대한 삽입 부위로서 확인되었는데, 이는 이들 특이적 지점에서의 삽입이 ChAd155 및 ChAd83의 코딩 서열 또는 조절 서열을 방해하지 않기 때문이다. 따라서, ChAd 계놈의 HE1 또는 HE2 부위에 발현 카세트를 삽입하는 것은 바이러스 복제 주기에 영향을 주지 않는다.

[0070] 본 발명의 한 실시양태에서, 벡터는 아데노바이러스 벡터의 기능적 또는 면역원성 유도체이다. "아데노바이러스 벡터의 유도체"는 예를 들어, 벡터의 하나 이상의 뉴클레오티드가 결실, 삽입, 변형 또는 치환되는 벡터의 변형된 버전을 의미한다.

[0071] 조절 요소

[0072] 조절 요소, 즉, 발현 제어 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 효율적인 RNA 가공 신호,

예컨대 스플라이싱 및 토키 베타-글로빈 폴리A를 포함하는 폴리아데닐화(폴리 A) 신호; 테트라시클린 조절 가능 시스템, 마이크로RNA, 전사후 조절 요소, 예를 들어 WPRE, 우드체 간염 바이러스의 전사후 조절 요소; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 증강시키는 서열 (예를 들어, 코자크(Kozak) 컨센서스(consensus) 서열); 단백질 안정성을 증강시키는 서열; 및 원하는 경우에, 코딩된 생산물의 분비를 증강시키는 서열을 포함한다.

[0073] "프로모터"는 RNA 폴리머라제의 결합을 허용하고 유전자의 전사를 지시하는 뉴클레오티드 서열이다. 전형적으로, 프로모터는 전사 시작 부위에 근접한 유전자의 비-코딩 영역에 위치한다. 전사의 개시에서 기능하는 프로모터 내의 서열 요소는 종종 컨센서스 뉴클레오티드 서열을 특징으로 한다. 프로모터의 예는 박테리아, 효모, 식물, 바이러스, 및 원숭이와 인간을 포함한 포유동물로부터의 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 내부(internal), 천연, 항시성(constitutive), 유도성(inducible) 및/또는 조직-특이적인 프로모터를 포함한다수의 발현 제어 서열이 당업계에 공지되어 있고, 사용될 수 있다.

[0074] 본 발명의 프로모터는 전형적으로 이종 프로모터일 것이다. "이종"은 그것이 비교되는 나머지 개체의 것과는 유전자형으로 구분되는 개체로부터 유래됨을 의미한다. 본 발명의 프로모터는 항시성 또는 유도성일 수 있다. 항시성 프로모터는 조절 영향으로부터 독립적으로 RNA 합성을 개시한다. 유도성 프로모터는 유전자 발현의 조절을 허용하고, 외인성으로 공급되는 화합물, 온도 같은 환경 인자, 또는 특이적 생리학적 상태의 존재에 의해 조절될 수 있다.

[0075] 본 발명의 프로모터는 CMV 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 예를 들어 닭 베타 액틴(CAG) 프로모터, CASI 프로모터, 인간 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터, TBG 프로모터, 레트로바이러스 라우스(Rous) 육종 바이러스 LTR 프로모터, SV40 프로모터, 디히드로풀레이트 리덕타제 프로모터, 포스포글리세롤 키나제(PGK) 프로모터, EF1a 프로모터, 아연-유도성 양 메탈로티오닌(MT) 프로모터, 덱사메타손(Dex)-유도성 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, T7 폴리머라제 프로모터 시스템, 엑디손 곤충 프로모터, 테트라시클린-억제성 시스템, 테트라시클린-유도성 시스템, RU486-유도성 시스템 및 라파마이신-유도성 시스템을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0076] 트랜스진은 조직-특이적 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 예를 들어, 골격근에서의 발현을 원하는 경우, 근육에서 활성인 프로모터가 사용되어야 한다. 이들은, 천연 발생 프로모터보다 더 높은 활성을 갖는 합성 근육 프로모터뿐만 아니라 골격 베타-액틴, 미오신 경쇄(light chain) 2A, 디스트로핀, 근육 크레아틴 키나제를 코딩하는 유전자로부터의 프로모터를 포함한다. 조직-특이적인 프로모터의 예는 간, 예를 들어 알부민, B 형 간염 바이러스 코어, 알파-태아 단백질(AFP); 골, 예를 들어 오스테오칼신, 골 시알로단백질; 림프구, 예를 들어 CD2, 면역글로불린 중쇄(heavy chain) 및 T 세포 수용체 사슬; 및 뉴런, 예를 들어 뉴런-특이적 에놀라제(NSE)에 대해 공지되어 있다.

[0077] 임의로, 치료상 유용한 또는 면역원성 생산물을 코딩하는 트랜스진을 보유하는 백터는 또한 선별 가능한 마커 또는 리포터 유전자를 포함할 수 있다. 리포터 유전자는 당업계에 공지된 것으로부터 선택될 수 있다. 적합한 리포터 유전자는 증강된 녹색 형광 단백질, 적색 형광 단백질, 루시퍼라제 및 분비된 배아 알칼리성 포스파타제(seAP)를 포함하나, 이에 제한되지는 않으며, 이는 무엇보다도 게네티신, 히그로미신 또는 퓨리마이신 내성을 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 이러한 선별 가능한 리포터 또는 마커 유전자 (이는 바이러스 입자 내로 패키징되는 바이러스 게놈 외부에 위치할 수 있거나 그렇지 않을 수 있음)는 암피실린 내성과 같이, 박테리아 세포 내의 플라스미드의 존재를 표시하기 위해 사용될 수 있다. 백터의 다른 성분은 복제 기점을 포함할 수 있다.

[0078] 적합한 프로모터는 시토메갈로바이러스(CMV) 프로모터 및 CASI 프로모터를 포함한다. CMV 프로모터는 강하고 편재적으로(ubiquitously) 활성이다. 이는 많은 조직 유형에서 높은 수준의 트랜스진 발현을 유도하는 능력을 갖고, 당업계에 공지되어 있다. CMV 프로모터는 CMV 인핸서와 함께 또는 이를 없이 본 발명의 백터에서 사용될 수 있다.

[0079] CASI 프로모터는 CMV 인핸서, 닭 베타-액틴 프로모터, 및 유비퀴틴(UBC) 인핸서에 플랭킹된 스플라이스 공여자 및 스플라이스 수용자의 조합으로서 기재된 합성 프로모터이다 (US 8865881).

[0080] 일부 실시양태에서, CASI 프로모터는 서열 3에 대한 서열 동일성을 적어도 약 90 %, 적어도 약 95 %, 적어도 약 96 %, 적어도 약 97 %, 적어도 약 98 %, 적어도 약 99 %, 또는 그 이상 갖는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열 3의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시양태에서, 증강된

hCMV 프로모터는 서열 4에 대한 서열 동일성을 적어도 약 90 % 이상, 적어도 약 95 %, 적어도 약 96 %, 적어도 약 97 %, 적어도 약 98 %, 적어도 약 99 % 또는 그 이상 갖는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열 4의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0081] 적합한 프로모터는 또한 생체내에서 트랜스진의 지속적인 발현을 생산하는, 강하게 활성이고 편재성 프로모터인 침팬지 신장 인자 1 프로모터(chEF 1)를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 한 실시양태에서, 프로모터는 CMV 인핸서를 갖는 인간 폐리틴 경쇄 프로모터이다. 이 실시양태에서, 폐리틴 중쇄 및 경쇄의 5' UTR은 폐리틴에 의한 철 조절을 제거하기 위해 침팬지 신장 인자 1 알파의 5' UTR에 의해 대체된다. 한 실시양태에서, 프로모터는 CMV 인핸서를 갖는 담 베타 액틴 프로모터이다. 한 실시양태에서, 프로모터는 하이브리드 프로모터이다. 한 실시양태에서, 하이브리드 프로모터는 CMV 인핸서 및 유비퀴틴 유전자 인핸서를 갖는 CMV 프로모터이고, 통상적인 CMV 프로모터보다 더 강한 프로모터이다.

[0082] 본원에서 사용되는 "전사후 조절 요소"는 전사될 때 본 발명의 바이러스 벡터에 의해 전달되는 트랜스진(들) 또는 그의 단편의 발현을 증강시키는 DNA 서열이다. 전사후 조절 요소는 B형 간염 바이러스 전사후 조절 요소(HPRE) 및 우드척 간염 전사후 조절 요소(WPRE)를 포함하고 이로 제한되지 않는다. WPRE는 모두는 아니나, 특정 프로모터에 의해 유도되는, 트랜스진 발현을 증강시키는 것으로 입증된 3분체(tripartite) 시스 작용 요소이다.

[0083] 본 발명의 실시양태에서, ChAd155 벡터는 프로모터, 인핸서, 및 리포터 유전자 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터는 임의로 테트라시클린 온/오프 전사 제어를 갖는 ChAd155-증강된 hCMV-SeAP, ChAd155-CASI-seAP 및 ChAd155-hCMV-seAP 및 테트라시클린 온/오프 전사 제어를 갖는 ChAd155 -CMV-hFerL-chEF1-seAP를 포함할 수 있다.

[0084] 본 발명의 실시양태에서, ChAd83 벡터는 프로모터, 인핸서, 및 리포터 유전자 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터는 임의로 테트라시클린 온/오프 전사 제어를 갖는 ChAd83 증강된 hCMV SeAP, ChAd83 증강된 hCMV SeAP, ChAd83-CASI-seAP 및 ChAd83-hCMV-seAP 및 테트라시클린 온/오프 전사 제어를 갖는 ChAd83 -CMV-hFerL-chEF1-seAP를 포함할 수 있다.

[0085] 본 발명의 벡터는 당업자에게 공지된 기술과 함께, 본원에 제공된 기술을 사용하여 생성된다. 이러한 기술은 cDNA의 통상적인 클로닝 기술, 예컨대 본 명세서에 기재된 것, 아데노바이러스 계놈의 중복 올리고뉴클레오티드 서열의 사용, 폴리미라제 연쇄 반응, 및 원하는 뉴클레오티드 서열을 제공하는 임의의 적합한 방법을 포함한다.

트랜스진

[0087] 아데노바이러스 벡터는 생체내 발현을 위해 원하는 RNA 또는 단백질 서열, 예를 들어 이종 서열을 전달하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 벡터는 네이키드(naked) DNA, 과지, 트랜스포존, 코스미드, 에피솜, 플라스미드 또는 바이러스 성분을 포함한 임의의 유전 요소를 포함할 수 있다. 본 발명의 벡터는 원숭이 아데노바이러스 DNA 및 발현 카세트를 함유할 수 있다. "발현 카세트"는 숙주 세포에서 트랜스진의 번역, 전사 및/또는 발현에 필요한 트랜스진 및 조절 요소를 포함한다.

[0088] "트랜스진"은 관심 폴리펩티드를 코딩하는, 트랜스진에 플랭킹하는 벡터 서열에 이종인 핵산 서열이다. 핵산 코딩 서열은 숙주 세포에서 트랜스진 전사, 번역 및/또는 발현을 허용하는 방식으로 조절 성분에 작동 가능하게 연결된다. 본 발명의 실시양태에서, 벡터는 치료적 또는 예방적 수준으로 트랜스진을 발현한다. 트랜스제닉(transgenic) 폴리펩티드의 "기능적 유도체"는 예를 들어, 하나 이상의 아미노산이 결실, 삽입, 변형 또는 치환된 폴리펩티드의 변형된 버전이다.

[0089] 트랜스진은 예방 또는 치료를 위해, 예를 들어, 면역 반응을 유도하기 위한 백신으로서, 결합 또는 누락 유전자를 교정 또는 대체함으로써 유전자 결핍을 교정하기 위해, 또는 암 치료제로서 사용될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 면역 반응의 유도는 단백질에 대한 T 세포 및/또는 체액성 항체 면역 반응을 유도하는 단백질의 능력을 지칭한다.

[0090] 트랜스진에 의해 유도된 면역 반응은 항원 특이적 B 세포 반응일 수 있고, 이는 중화 항체를 생산한다. 유도된 면역 반응은 항원 특이적 T 세포 반응일 수 있고, 이는 전신 및/또는 국소 반응일 수 있다. 항원 특이적 T 세포 반응은 CD4+ T 세포 반응, 예컨대 시토카인, 예를 들어 인터페론 감마(IFN 감마), 종양 피사 인자 알파(TNF 알파) 및/또는 인터류킨 2(IL2)를 발현하는 CD4+ T 세포를 수반하는 반응을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 항원 특이적 T 세포 반응은 CD8+ T 세포 반응, 예컨대 시토카인, 예를 들어 IFN 감마, TNF 알파 및/또

는 IL2를 발현하는 CD8+ T 세포를 수반하는 반응을 포함한다.

[0091] 본 발명의 트랜스진은 광견병 바이러스 항원, 예를 들어, 광견병 당단백질(RG), 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 항원, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 항원, 결핵 항원, 말라리아 항원 C형 간염 바이러스(HCV) 항원, 치쿤군야 항원 및 B형 간염(HBV) 항원을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0092] 트랜스진 서열의 조성은 생성되는 벡터가 놓인 용도에 따라 달라질 것이다. 한 실시양태에서, 트랜스진, 예컨대 예방적 트랜스진, 치료적 트랜스진 또는 면역원성 트랜스진은 생물학 및 의약에서 유용한 생산물, 예를 들어 단백질 또는 RNA를 코딩하는 서열이다. 단백질 트랜스진은 항원을 포함한다. 본 발명의 항원성 트랜스진은 질환 유발 유기체에 대한 면역원성 반응을 유도한다. RNA 트랜스진은 tRNA, dsRNA, 리보솜 RNA, 촉매 RNA 및 안티센스 RNA를 포함한다. 유용한 RNA 서열의 예는 치료된 동물에서 표적 핵산 서열의 발현을 끝내는 서열이다.

[0093] 대안적으로, 트랜스진 서열은 리포터 서열을 포함할 수 있으며, 이는 발현 시 검출 가능한 신호를 생산한다. 이러한 리포터 서열은, 제한 없이, 베타-락타마제, 베타-갈락토시다제(LacZ), 알칼리성 포스파타제, 티미딘 키나제, 녹색 형광 단백질(GFP), 클로로페니콜 아세틸트랜스페라제(CAT), 루시퍼라제, 예를 들어 CD2, CD4, CD8, 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질, 및 그를 향한 고친화도 항체가 존재하거나 통상적인 수단에 의해 생산될 수 있는, 당업계에 널리 공지된 다른 것들을 포함하는 막 결합 단백질, 및 무엇보다도 헤마글루티닌 또는 Myc로부터의 항원 태그 도메인에 적절하게 융합된 막 결합 단백질을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 포함한다. 이들 코딩 서열은, 이들의 발현을 유도하는 조절 요소와 관련이 있을 때, 효소적, 방사선 활성, 비색, 형광 또는 다른 분광학적 검정, 형광 활성화 세포 분류 검정, 및 효소 연결 면역흡착 검정(ELISA), 방사면역검정(RIA) 및 면역조직화학을 포함한 면역학적 검정을 포함한 통상적인 수단에 의해 검출 가능한 신호를 제공한다.

[0094] 유전자 코드에서의 중복성의 결과로서, 폴리펩티드는 다양한 상이한 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다. 코딩은 일부 동의 코돈(synonymous codon), 즉 다른 것들보다 더 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈을 사용하도록 편향된다. "코돈 최적화"란, 재조합 핵산의 코돈 조성의 변형이 아미노산 서열을 변경시키지 않으면서 이루어진다는 것을 의미한다. 유기체-특이적 코돈-사용 빈도를 사용하여 상이한 유기체에서 mRNA 발현을 개선하기 위해 코돈 최적화를 사용하였다.

[0095] 코돈 편향에 추가로 및 독립적으로, 일부 동의 코돈 쌍이 다른 것보다 더 빈번하게 사용된다. 이러한 코돈 쌍 편향은 일부 코돈 쌍이 과다표시되고 다른 것이 과소표시됨을 의미한다. 코돈 쌍 탈최적화는 바이러스 독성을 감소시키는 데 사용되어 왔다. 예를 들어, 과소표시된 코돈 쌍을 함유하도록 변형된 폴리오바이러스 (poliovirus)가 감소된 번역 효율을 나타내고 야생형 폴리오바이러스와 비교하여 약독화되었음이 보고되었다 (Science (2008) 320:1784). 코돈 쌍 탈최적화에 의해 합성 약독화 바이러스를 조작하는 것은 야생형과 동일한 아미노산 서열을 코딩하지만, 동의 코돈의 상이한 쌍별(pairwise) 배열을 사용하는 바이러스를 생산할 수 있다. 코돈 쌍 탈최적화에 의해 약독화된 바이러스는 야생형과 비교하여 최대 1000 배 더 적은 플라크(plaque)를 생성하고, 더 적은 바이러스 입자를 생산하고, 플라크를 형성하기 위해 약 100 배 더 많은 바이러스 입자를 필요로 하였다.

[0096] 대조적으로, 인간 계놈에서 과다표시된 코돈 쌍을 함유하도록 변형된 폴리오바이러스는 야생형 RNA와 유사한 방식으로 작용하고, 크기가 야생형 RNA와 동일한 플라크를 생성하였다 (Coleman et al. (2008) Science 320:1784). 이는 과다표시된 코돈 쌍을 갖는 바이러스가 과소표시된 코돈 쌍을 갖는 바이러스와 유사한 수의 돌연변이를 함유하고, 야생형과 비교하여 증강된 번역을 나타낸다는 사실에도 불구하고 발생하였다. 이러한 관찰은 코돈 쌍 최적화된 구축물이 이들의 비-코돈 쌍 최적화된 대응물과 유사한 방식으로 작용할 것으로 예상되고, 기능적 이점은 제공할 것으로 예상되지 않는다는 것을 시사한다.

[0097] 본 발명의 구축물은 코돈 최적화된 핵산 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 본 발명의 벡터는 트랜스진 또는 그의 면역원성 유도체 또는 단편의 코돈 최적화된 서열을 포함한다. 본 발명의 구축물은 코돈 쌍 최적화 핵산 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 본 발명의 벡터는 트랜스진 또는 그의 면역원성 유도체 또는 단편의 코돈 쌍 최적화된 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0098] 복제 가능 아데노바이러스 벡터의 전달

[0099] 일부 실시양태에서, 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 표피 투여, 피내 투여, 근육내 주사, 복강내 주사, 정맥내 주사, 점막 투여, 비내 투여, 경구 투여, 직장 투여, 피하 주사, 경피 투여 또는 질내 투여에 의해 대상체에게 투여된다.

- [0100] 치료 요법이 각각 상이한 조성물로 제제화된 하나 이상의 아데노바이러스 백터 및 추가 성분의 공동-투여를 수반하는 경우, 이들은 동일한 부위에서 또는 그 근처에서 공동-위치적(co-locational ly)으로 유리하게 투여된다. 예를 들어, 성분은 동일한 측면 또는 말단부("동측성" 투여)에 또는 반대쪽 측면 또는 말단부("대측성" 투여)에(예를 들어, 근육내, 경피, 피내, 피하로부터 선택된 투여 경로를 통해) 투여될 수 있다.
- [0101] 본 발명의 한 실시양태에서, 백터는 근육내(IM), 즉, 근육 안으로 직접 주사하여 투여될 수 있다. 근육은 혈관이 많이 지나가고, 흡수는 전형적으로 신속하다.
- [0102] 본 발명의 실시양태에서, 백터는 경구 투여될 수 있다. 경구 백신 전달은 근육내 전달과 비교하여, 주사 부위에서의 통증의 제거, 전달의 용이성 및 편의를 포함한 여러 이점을 제공한다. 이는 덜 숙련된 의료 서비스 종사자가 백신을 효과적으로 투여하는 것을 가능하게 하고, 예를 들어 HIV, B형 간염 및 C형 간염의 높은 유병률을 갖는 분야에서 오염된 바늘 및 주사기의 가능성을 회피한다.
- [0103] 구강 점막은 대부분 각질화되지 않은 총화된 편평 상피의 외부 층, 및 치밀한 결합 조직의 기저 층, 고유판으로 구성된다. 고유판은 많은 면역 세포를 포함하고, 면역 반응이 병원성 유기체로부터 내부 조직을 보호하는 장벽으로서 발생하는 부위이다. 경구/위장 경로를 통한 투여는 단순한 원주형 상피의 단일 세포층을 통한 큰 표면적에 접근하는 항원을 제공하고, 여기서 이것은 페이에르판(Peyer's Patch)을 표적으로 하고 전신 반응을 유도한다.
- [0104] 생 복제 가능 아데노바이러스는 수십년 동안 경구적으로 성공적으로 투여되었지만, 항원성 트랜스진을 코딩하는 바이러스 백터의 투여는 더욱 어렵다. 면역 인식 메카니즘은 장의 내강측에 쉽게 접근 가능하지 않고; 이는 신체가 음식에서 섭취된 단백질에 대한 면역 반응을 개시(mount ing)하는 것으로부터 보호한다. 따라서, 본 발명의 구축물은 경구 경로를 통해 장으로 전달될 때 단백질 항원에 대한 면역 반응을 상승시켜야 하는 장애물에 직면한다. 예를 들어, 1 상 연구에서, 인간 대상체에게 트랜스진으로서 인플루엔자 헤마글루티닌 항원을 사용하여 복제 가능 생 인간 Ad4 백신을 경구 투여하였다. 이들은 세포 면역 반응에 반응하였지만, 근육내 부스팅될 때까지 체액성 항체 반응을 개시하지 않았다 (Lancet Infect Dis (2013) 13:238). 유사하게, 통상적인 돼지에게 트랜스진으로서 돼지콜레라 바이러스 항원을 사용하여 복제 가능 생 재조합 돼지 아데노바이러스 백신을 경구 또는 피하 투여하였다. 경구 투여된 돼지 중 어느 것도 트랜스제닉 항원에 대한 항체를 발생시키지 않았으나, 피하 투여된 돼지의 75 %는 이를 발생시켰다 (Vaccine (2001) 146:1787).
- [0105] 본 발명의 실시양태에서, 백터는 점막으로 투여될 수 있다. 점막 백신 전달은 또한 백신의 근육내 전달에 여러 이점을 제공한다. 점막이 신체의 외부와 접촉하기 때문에, 점막 백신은 비경구 백신과 비교하여 약간 더 낮은 정도의 순도에서 효과적이고 안전할 수 있고, 따라서 이들은 생산하기가 더 용이하다. 이들은 또한 전형적으로 낮은 용량에서 효과적이며, 따라서 비용-효율적이다.
- [0106] 본원에서 사용되는 "점막" 전달은 모든 점막을 포괄한다. 점막은 전형적으로 상피 및 고유판을 포함하는 체강 및 통로에서 막을 형성한다. 점막은 각질화되거나 또는 각질화되지 않을 수 있다. 점막 조직은 폐포, 기관지, 협측, 피부, 자궁내막, 위, 장, 협골, 내벽(lining), 젖작, 비내, 후각, 경구, 귀, 구개, 직장, 특수 (혀), 설하, 기관 및 질 점막을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0107] 점막은 페이에르판, 장간막 림프절, 맹장, 편도 및 아데노이드와 같은 림프성 마이크로구획이 포함된 고도로 특수화된 면역계를 제공한다. 점막의 흡수성 상피 세포에 의해 흡수된 항원은 항원 제시 세포로 이동(shuttle)되거나, 직접 제시되고 T 세포에 제시될 수 있다. 점막 조직에서 면역 반응은 항원의 성질, 항원 제시 세포의 유형 및 국소 미세환경에 의해 결정된다. 감작된 점막 B 및 T 세포는 초기 항원 접촉의 부위를 떠나고, 림프를 통하여 순환계로 진입한다. 점막 전달은, 예를 들어, 협측, 생식기, 예를 들어 질, 비강내, 안구, 예를 들어 눈 결막, 귀, 예를 들어 내이, 직장 또는 설하일 수 있다.
- [0108] 본 발명의 실시양태에서, 백터는 설하 투여될 수 있다. 설하 경로를 통한 백신 전달은 각질화되지 않은 총화된 편평 상피의 매우 얇은 층을 통한 신속한 접근을 갖는 항원을 제공하고, 여기서 그것은 랑게르ハン스 세포를 표적으로 하고 전신 반응을 유도한다. 혀 아래에서 전달되는 항원은 설하 점막에서 수지상 세포의 치밀한 네트워크에 이용 가능해진다. 설하로 전달되는 복제 가능 백터는 간을 우회하여, 초회 통과 대사를 피하고, 이들의 지속성을 증가시키고, 따라서 잠재적으로 더 강한 면역 반응을 생성한다.
- [0109] 본 발명의 한 실시양태에서, 백터는 협측으로 투여될 수 있다. 협측 경로를 통한 백신 전달은 또한 설하 층보다 다소 두꺼운 각질화되지 않은 총화된 편평 상피의 층을 통한 접근을 갖는 항원을 제공한다. 협측 전달은 랑게르ハン스 세포를 표적으로 하고, 전신 반응을 유도한다.

[0110] 아주반트

특정 병원체에 대한 강하고 지속되는 면역을 확립하는 접근법은 백신에 대한 아주반트의 첨가를 포함한다. "아주반트"는 조성물의 활성 성분에 대한 면역 반응을 증대, 자극, 활성화, 강화 또는 조절하는 작용제를 의미한다. 아주반트 효과는 세포성 또는 체액성 수준, 또는 둘 모두에서 발생할 수 있다. 아주반트는 실제 항원에 대한 면역계의 반응을 자극하지만 그 자체로 면역학적 효과를 갖지는 않는다. 대안적으로 또는 추가로, 본 발명의 아주반트 조성물은 하나 이상의 면역자극제를 포함할 수 있다. "면역자극제"는 항원과 함께 또는 개별적으로 투여되든지 간에 대상체의 면역 반응에서 일반적인, 일시적 증가를 유도하는 작용제를 의미한다.

[0112] 본 발명의 조성물은 아주반트와 함께 또는 그 없이 투여될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 조성물은 하나 이상의 아주반트 (예를 들어, 백신 아주반트)를 포함할 수 있거나 또는 이와 함께 투여될 수 있고, 특히 조성물은 트랜스진을 코딩하는 본 발명의 면역학적 유효량의 벡터를 포함한다.

[0113] 사용 방법/용도

[0114] 본원에 개시된 바와 같은 구축물 또는 조성물의 면역학적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 병원체에 의해 야기되는 질환에 대한 면역 반응을 이를 필요로 하는 대상체에서 유도하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 트랜스제닉 항원에 대한 면역 반응을 이를 필요로 하는 대상체에서 유도하기 위한 본원에 개시된 구축물 또는 조성물의 용도가 제공된다. 본 발명의 벡터는 감염으로 인한 질환의 예방, 치료 또는 개선을 위해 응용될 수 있다.

[0115] 본 발명의 방법은 의약에서의 본 발명의 벡터의 용도를 포함한다. 이들은 병원체에 의해 야기되는 질환의 치료를 위한 본 발명의 벡터의 용도를 포함한다. 본 발명의 벡터는 병원체에 의해 야기되는 질환을 치료하기 위한 의약의 제조에 사용될 수 있다.

[0116] 아데노바이러스 벡터로의 효과적인 면역화는 아데노바이러스 벡터 백본의 본질적인 면역조절 능력에 의존한다. 면역학적으로 덜 강한 아데노바이러스는 더 적은 항원 발현을 유도한다. 효과적인 면역화는 또한 강하고 지속적인 트랜스진 발현을 유도하는 프로모터의 능력에 의존한다. 예를 들어, 바이러스 프로모터 CMV-IE에 의해 유도되는 아데노바이러스 벡터는 이들이 발현을 감쇠시키는 시토카인을 유도하기 때문에 장기 트랜스진 발현을 지속하지 않는다.

[0117] "대상체"는 척추동물, 예컨대 포유동물, 예를 들어 인간 또는 수의학용 포유동물을 의도한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0118] 일반

[0119] 본 발명의 벡터는 당업자에게 공지된 기술과 함께 본원에 제공된 기술 및 서열을 사용하여 생성된다. 이러한 기술은 cDNA의 통상적인 클로닝 기술, 예컨대 본원에 기재된 것, 아데노바이러스 게놈의 중복 올리고뉴클레오티드 서열의 사용, 폴리머라제 연쇄 반응, 및 원하는 뉴클레오티드 서열을 제공하는 임의의 적합한 방법을 포함한다.

[0120] 달리 설명되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시 내용이 속한 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 같은 의미를 갖는다. 단수 용어 "한," "하나," 및 "그"는 문맥상 명백히 달리 나타나지 않는 한 복수 지시 대상을 포함한다. 유사하게, 단어 "또는"은 문맥상 명백히 달리 나타나지 않는 한 "및"을 포함하도록 의도된다. 용어 "복수"는 둘 이상을 지칭한다. 추가로, 용액 성분 농도 또는 그의 비와 같은, 물질의 농도 또는 수준, 및 온도, 압력 및 주기 시간(cycle time)과 같은, 반응 조건에 대해 주어진 수치 제한은 대략적인 것으로 의도된다. 본원에서 사용되는 용어 "약"은 ±10 %의 양을 의미하는 것으로 의도된다.

[0121] 이제, 본 발명은 하기 비제한적인 실시예에 의해 추가로 기재될 것이다.

[0122] 실시예

[0123] 실시예 1: 복제 가능 침팬지 아데노바이러스의 구축

[0124] 야생형 침팬지 아데노바이러스 유형 155(ChAd155) (WO 2016 198621) 및 유형 83(ChAd83) (WO 2010/086189)을 문헌 [Sci Transl Med (2012) 4:1] 및 WO 2010/086189에 기재된 바와 같이 표준 절차를 사용하여 건강한 침팬지로부터 단리하고, 복제 결합 바이러스로서 구축하였다.

[0125] 트랜스진 발현 카세트를 삽입함으로써 복제 가능 ChAd155 및 ChAd83을 각각 구축하였다. 발현 카세트 성분은

전통적인 인간 CMV 프로모터 또는 CASI 프로모터, 모델 항원으로서의 광견병 당단백질, 및 임의로 WPRE 인핸서를 사용하였다. 트랜스진 카세트를 위한 삽입 부위는 E3 영역을 대체하는 것, 섬유와 E4 영역 사이 (HE1 부위)에 삽입하는 것, 및 우측 ITR의 하류 (HE2 부위)에 삽입하는 것을 포함하였다.

[0126] 도 1의 상부 패널은 트랜스진 카세트가 E3 영역을 대체하는 RC1 벡터를 도시한다. 중앙 패널은 트랜스진 카세트가 섬유 유전자의 종결 코돈과 E4 영역 사이 (HE1 부위)에 삽입된 구축물을 도시한다. 트랜스진 카세트가 HE1 부위에 삽입되었을 때, ChAd155는 복제에 실패하였다. 그러나, ChAd83의 HE1 부위 새로 트랜스진을 삽입하면 생존 벡터가 생산되었다. 하부 패널은 트랜스진 카세트가 우측 ITR의 하류 (HE2 부위)에 삽입된 RC2 벡터를 도시한다. E1 영역은 RC1 및 RC2 배열 모두에서 온전하게 유지된다. 트랜스진을 서열 1 및 서열 2의 하기 위치의 상동 재조합 기술에 의해 삽입하였다:

[0127] HE1 ChAd155: 서열 1의 bp 34611과 34612 사이의 삽입 부위;

[0128] HE2 ChAd155: 서열 1의 bp 37662와 37663 사이의 삽입 부위;

[0129] HE1 ChAd83: 서열 2의 bp 33535와 33536 사이의 삽입 부위;

[0130] HE2 ChAd83: 서열 2의 bp 36387과 36388 사이의 삽입 부위.

실시예 2: 바이러스 생산, 벡터 역가 및 발현

[0132] 벡터 복제를 평가하기 위한 동물 모델을 확인하기 위해, 유형 C 복제 가능 아데노바이러스 ChAd155 RC2 및 유형 E 복제 가능 아데노바이러스 ChAd83 RC2 벡터를 다양한 동물 유래 세포에서 벡터 역가 및 게놈 카피 수에 의해 측정된 이들의 복제 능력에 대해 평가하였다. 결과를 표 1에 제시하였다.

표 1. 복제 가능 ChAd155 및 ChAd83의 복제 및 발현

세포주: 종	벡터	벡터 역가	게놈 카피	발현	
				2 일	7 일
MRC5: 인간	ChAd155	+++	+++	++	++++
	ChAd83	+++++	+++++	+++	+++++
PK15: 돼지	ChAd155	+++++	+++++	NA	NA
	ChAd83	+++	+++	NA	NA
NMuLi: 마우스	ChAd155	++	++	++	++
	ChAd83	ND	+	++	++
베로: 비-인간 영장류	ChAd155	++	++++	+++	+++
	ChAd83	ND	+	+	+

ND= 검출 불가능함; NA= 이용 불가능함

[0134]

[0135] 표 1에 제시한 바와 같이, 인간 MRC5 세포 및 돼지 PK15 세포는 복제 가능 ChAd155 및 ChAd83 둘 모두 높은 벡터 역가 및 높은 게놈 카피 수를 생산하였다. 쥐 NMuLi 및 비-인간 영장류 베로 세포는 또한 RC ChAd155를 생산하였지만, 인간 또는 돼지 세포보다 더 적은 정도였다. RC ChAd83은 쥐 NMuLi 세포에서, 및 놀랍게도 비-인간 영장류 베로 세포에서 잘 성장하는 데 실패했다.

[0136]

인간 MRC5, 마우스 NMuLi 및 비-인간 영장류 베로 세포는 7 일까지 RC ChAd155의 발현을 지지하였다. 인간 MRC5 세포는 7 일까지 RC ChAd83의 발현을 지지하였고, 마우스 NMuLi 및 비-인간 영장류 베로 세포도 그려하였으나, 인간 세포보다 더 적은 정도였다.

[0137]

바이러스 생산

[0138]

도 2는 각각 RC1 또는 RC2를 포함하는, 복제 가능 ChAd155 또는 ChAd83으로 감염된 인간 1 차 MRC5 세포에 의해 생산된 바이러스의 양을 제시한다. 세포를 감염 7 일 후에 수확하고, 3 회 동결-해동 주기 후에 수득된 세포 용해물에서 벡터 역가를 평가하였다. 각각의 프로모터 영역에 대해 설계된 프라이머를 사용한 정량적 PCR(QPCR) 분석에 의해 벡터 역가를 측정하였다. 감염다중도(moi)는 세포당 1250 개의 바이러스 입자였다. 바이러스 생산은 벡터 입자/세포로서 막대 위에 표시된다.

[0139]

인간 MRC5 세포는 RC1 (2.17×10^3 vp/세포) 또는 RC2 (4.40×10^3 vp/세포)를 포함하는 ChAd155의 생산을 지지

하고, 또한 RC1 (1.18×10^4 vp/세포) 또는 RC2 (1.06×10^5 vp/세포)를 포함하는 ChAd83의 생산을 지지하였다. 도 2에 제시한 바와 같이, ChAd83은 ChAd155보다 더 높은 수준으로 생산되었고; RC2를 포함하는 ChAd83 백터는 4 개의 바이러스/백터 조합 중 가장 강력하였다.

[0140] 백터 게놈 카피 수

감염 후, 백터는 세포 내에서 복제되고, 백터 게놈 카피 수는 QPCR에 의해 측정될 수 있다. 백터 DNA 복제는 심지어 바이러스 복제 및 증식을 완전히 허용하지 않는 세포에서도 발생할 수 있다. 백터 DNA의 QPCR은 바이러스가 복제 주기를 완료하고 성숙한 바이러스 자손으로서 방출되는 능력과 독립적으로, 감염된 세포 내에서 백터 복제의 척도를 제공한다. 따라서, 백터 복제는 ChAd 바이러스 복제 또는 증식을 허용하지 않는 동물 종, 조직 유형 및 세포 유형에서 정량화될 수 있다.

[0142] 백터 게놈 카피 수를 백터 역가와 병행하여 측정하고, 결과를 도 3에 제시하였다. 인간 MRC5 세포를 각각 RC1 또는 RC2를 포함하는 ChAd155 또는 ChAd83으로 감염시켰다. 세포를 감염 7 일 후에 수확하고, 총 DNA를 추출하고, QPCR에 의해 바이러스 게놈을 정량화하고, 결과를 세포당 백터 게놈 카피로서 표현하였다. Moi는 세포당 250 개의 바이러스 입자이고, 세포당 바이러스 입자의 수는 세포당 바이러스 게놈 카피를 나타내는 막대 위에 표시된다. 카피 수는 트랜스진 발현의 수준에 정비례한다.

[0143] 도 3에 제시한 바와 같이, ChAd155에 의한 RC1 (6.21×10^3 vp/세포) 및 RC2 (6.71×10^3 vp/세포)의 바이러스 DNA 복제의 양은 유사하였다. ChAd83은 ChAd155보다 더 많은 RC1 (2.76×10^4 vp/세포) 및 RC2 (9.19×10^4 vp/세포) 바이러스 DNA를 생산하였다. 최고 수준의 바이러스 DNA 복제는 ChAd83 RC2에 의해 관찰되었다.

[0144] 실시예 3: 인간 세포로부터의 바이러스 트랜스진 발현

[0145] 복제 결함 및 복제 가능 ChAd155 (도 4) 및 ChAd83 (도 5) 바이러스 백터에서의 트랜스진 발현의 수준을 비교하기 위해 웨스턴 블로트 분석을 수행하였다. MRC5 세포를 세포당 250 또는 1250 개의 바이러스 입자의 moi에서 ChAd155 RC1 또는 ChAd155 RC2 백터로 형질도입하였다. 세포를 감염 후 2 및 7 일에 수확하고, 표준 방법을 사용하여 추출물을 제조하고, 등가량의 추출물을 SDS-PAGE 겔 상에 로딩하였다. 전기영동 분리 후, 단백질을 니트로셀룰로스 막 상에 전달하고, 이어서 이를 시판되는 모노클로날(monoclonal) 항체로 광견병 당단백질 트랜스진에 대해 프로빙하였다.

[0146] 도 4 및 도 5는 감염 후 2 및 7 일 모두에서, 복제 가능 ChAd155 RC (도 4) 및 ChAd83 RC (도 5) 백터가 복제 결함 ChAd155 RD 및 ChAd83 RD 백터 각각보다 더 높은 수준으로 트랜스진을 발현한다는 것을 입증한다. 광견병 당단백질에 대한 항체로 프로빙하였을 때, 블로트의 좌측에 막대에 의해 표시되는 바와 같이, 광견병 당단백질의 예상 분자량에 상응하는 약 51 kDa의 밴드가 관찰되었다.

[0147] 시험된 모든 백터에 대해 2 일째 및 7 일째 모두에서 moi의 증가는 트랜스진 발현의 증가를 초래하였다. ChAd155와 관련하여, RC2 백터는 최고 수준의 트랜스진 발현을 생산하였고, 이어서 ChAd155 RC1, 이어서 ChAd155 RD이었다. ChAd83과 관련하여, RC2 백터는 최고 수준의 트랜스진 발현을 생산하였고, 이어서 ChAd155 RD 백터, 이어서 ChAd155 RC1이었다.

[0148] 감염 후 2 일에, ChAd155에 의한 낮은 수준의 발현이 hCMV (RC1) 또는 CASI (RC2) 프로모터로부터 유도되었을 때 웨스턴 블로트에 의해 관찰되었다. ChAd83에 의한 트랜스진의 피크 발현은 감염 2 일 후에 관찰되었는데, 이는 ChAd83 백터가 MRC5 세포에서 세포변성이기 때문에 이러한 초기 시점에서 발생하였을 가능성이 높다. 또한, MRC5 세포에서 CMV 프로모터에 의해 유도된 ChAd83 발현은, 아데노 백본 E가 프로모터 차단/전사 침묵을 증강시키기 때문에 2 일보다 오래 지속되지 않았다.

[0149] 7 일에, hCMV 프로모터에 의해 유도된 발현은 적은 정도로 증가하였고, CASI 프로모터에 의해 유도된 발현은 크게 증가하였고, hCMV 프로모터에 의해 유도된 발현보다 더 강력하였다. 대조적으로, 감염 후 2 일에, hCMV 및 CASI 둘 모두에 의해 유도된 ChAd83 발현은 ChAd155로 관찰된 것보다 훨씬 더 높았다. 그러나, 7 일에, hCMV 프로모터에 의해 유도된 발현은 거의 검출 불가능한 수준으로 떨어졌고, 반면에 CASI 프로모터에 의해 유도된 발현은 일정하게 유지되었다. 이론에 의해 제약되지 않으면서, 이는 ChAd83의 아데노 백본 (E형 아데노바이러스)이 프로모터 차단을 증강시키는 반면에, CASI 프로모터는 전사 침묵을 극복할 수 있음을 시사한다.

[0150] 이들 연구는, HE2 유전자좌 내에 위치한, 좌측 배향으로 CASI 프로모터를 포함하는 RC2 백터가 우측 배향으로 CMV 프로모터를 위치시키고, 결실된 E3 영역에 위치한 RC1 백터보다 더 강력하게 트랜스진을 발현한다는 것을

입증한다 (도 1).

[0151] 실시예 4: 복제 가능 아데노바이러스 계놈 카피 수

[0152] 세포당 벡터 카피로서 표현된 본 발명의 복제 가능 아데노바이러스 벡터의 효율을 마우스 및 비-인간 영장류 모두로부터 유래된 세포 배양물에서 평가하였다. 도 6 (상부 패널)은 세포당 250 개 바이러스 입자의 moi에서, 단층으로 성장되고 ChAd155 RC1, ChAd155 RC2, ChAd83 RC1 또는 ChAd83 RC2로 감염된 쥐 간 NMuLi 세포에서 성장한 복제 가능 벡터의 계놈 카피 수를 제시한다. 총 DNA를 감염 후 5 일에 추출하고 벡터의 프로모터 영역에 어닐링(annealing)하는 프라이머를 사용하여 QPCR에 의해 벡터 복제를 측정하였다.

[0153] 세포당 벡터 카피로서 표현된 결과를 도 6에 제시하였다 (상부 패널). ChAd155는 NMuLi 세포에서 높은 효율로 RC1 및 RC2 벡터 둘 모두를 증폭시켰다. ChAd155는 대략 동일한 정도로 RC1 (1.73×10^4) 및 RC2 (1.92×10^4) 벡터를 복제하였다. ChAd83은 RC1 및 RC2 벡터를 복제하는 데 있어서 ChAd155보다 덜 효율적이었다. ChAd83은 쥐 세포에서 소량으로만 벡터 DNA를 복제하였다. RC1 벡터는 세포당 5.47×10^2 카피의 수준으로, 및 RC2 벡터는 세포당 6.74×10^2 카피의 수준으로 복제되었다.

[0154] 비-인간 영장류 베로 세포를 또한 단층으로 성장시키고, ChAd155 RC1, ChAd155 RC2, ChAd83 RC1 또는 ChAd83 RC2로 감염시켰다 (도 6 하부 패널). 감염의 2 가지 상이한 다중도를 사용하였다: 세포당 50 및 250 개의 바이러스 입자. 총 DNA를 감염 후 5 일에 추출하고 벡터의 프로모터 영역에 어닐링하는 프라이머를 사용하여 QPCR에 의해 벡터 복제를 측정하였다.

[0155] 세포당 벡터 카피로서 표현된 결과를 도 6에 제시하였다 (하부 패널). 베로 영장류 세포주는 ChAd155 RC1 (50의 moi에서 세포당 3.71×10^3 카피 및 250의 moi에서 세포당 4.93×10^4 카피) 및 ChAd155 RC2 (50의 moi에서 세포당 8.15×10^3 카피 및 250의 moi에서 세포당 7.05×10^4 카피)에 대해 허용하였다. 베로 영장류 세포주는, 한다 하더라도, ChAd83 RC1 또는 ChAd83 RC2에 대해 잘 허용하지 않았다. ChAd83 RC1 또는 ChAd83 RC2 벡터는 50의 moi에서 베로 세포로부터 발현되는 것으로 검출되지 않았다. 250의 moi에서, ChAd83은 세포당 1.13×10^2 카피의 수준으로 RC1 벡터를, 및 세포당 1.29×10^3 카피의 수준으로 RC2 벡터를 복제하였다.

[0156] 실시예 5: 쥐 및 비-인간 영장류 세포로부터의 트랜스진 발현

[0157] 웨스턴 블로트 분석을 수행하여 쥐 NMuLi 세포에서 ChAd155 RC1 및 ChAd155 RC2에 의한 트랜스진 발현의 수준을 비교하였다 (도 7 상부 패널). 세포를 세포당 50, 250 또는 1250 개의 바이러스 입자의 moi에서 ChAd155 RC1 또는 ChAd155 RC2로 감염시켰다. 세포를 감염 후 2 일 및 5 일에 수화하고, 표준 방법을 사용하여 추출물을 제조하고, 등가량의 총 세포 추출물을 SDS-PAGE 겔 상에 로딩하였다. 전기영동 분리 후, 단백질을 니트로셀룰로스 막 상에 전달하고, 이어서 이를 시판되는 모노클로날 항체로 광견병 당단백질(RG)에 대해 프로빙하였다.

[0158] 도 7 (상부 패널)은 ChAd155 RC1 및 ChAd155 RC2 둘 모두가 쥐 NMuLi 세포에서 트랜스진을 발현함을 입증한다. 감염 후 2 및 5 일 둘 모두에서 발현이 관찰되었고, 약 51 kDa의 밴드로 나타났고, 이는 광견병 당단백질(RG)의 예상 분자량에 상응한다. 감염 후 2 및 5 일 둘 모두에서 ChAd155 RC2 벡터는 ChAd155 RC1 벡터보다 더 높은 수준의 트랜스진 발현을 생산하였다.

[0159] 이어서, 웨스턴 블로트 분석을 수행하여 쥐 NMuLi 세포에서 ChAd155 RC1, ChAd155 RC2, ChAd83 RC1 및 ChAd83 RC2에 의한 트랜스진 발현의 수준을 비교하였다 (도 7 하부 패널). 세포를 세포당 50, 250 또는 1250 개의 바이러스 입자의 moi에서 (ChAd83 RC1에서는 250 및 1250) ChAd155 RC1, ChAd155 RC2, ChAd83 RC1 또는 ChAd83 RC2로 감염시켰다. 세포를 도 4에 기재된 바와 같이 웨스턴 블로트를 위해 가공하였다.

[0160] 도 7 (하부 패널)은 ChAd155 RC1, ChAd155 RC2, ChAd83 RC1 및 ChAd83 RC2가 쥐 NMuLi 세포에서 트랜스진을 발현함을 입증한다. 감염 후 2 및 5 일 둘 모두에서 발현이 관찰되었고, 약 51 kDa의 밴드로 나타났고, 이는 광견병 당단백질(RG)의 예상 분자량에 상응한다. ChAd155는 ChAd83보다 트랜스진의 더 효율적인 발현을 입증하였다. 감염 2 일 후에, ChAd155 RC2에 의한 강력한 트랜스진 발현이 심지어 50 vp/세포의 낮은 moi에서도 관찰되었고, 반면에 ChAd155 RC1에 의한 강력한 트랜스진 발현은 더 높은 moi에서 처음 관찰되었다. 또한, RC2는 ChAd155 및 ChAd83 바이러스 혈청형 둘 모두에서 RC1보다 더 효율적인 트랜스진 발현을 입증하였다. 각각의 직접 비교에서 RC2는 RC1보다 더 강력하게 발현되었다.

[0161] 실시예 6: 마우스에서 RD 및 RC1 벡터의 면역원성

T 세포 반응을 유도하기 위한 ChAd155 RD 벡터의 면역학적 효능을 Balb/c 마우스, 군당 6 마리 마우스에서의 ChAd155 RC1 및 ChAd83 RC1 벡터의 것과 비교하였다. 벡터를 10^5 및 10^6 바이러스 입자의 용량으로 근육내 주사하였다. 면역화 3 주 후에, 동물을 희생시키고, 면역화된 마우스의 비장세포를 단리하고, 광견병 당단백질 T 세포 에피토프(epitope)를 사용하여 IFN-감마-ELISpot에 의해 분석하였다. 백만 개 비장세포당 IFN-감마 스폿 형성 세포(SFC)로서 표현된 결과를 도 8에 제시하였다. 각각의 점은 단일 마우스에서의 반응을 나타내고, 수평선은 각각의 용량 군에 대한 기하평균에 상응한다.

[0163] 10^6 vp의 용량에서, 모든 마우스는 양성으로 반응하였고, 항원성 트랜스진에 대한 면역 반응을 개시하였다 (도 8). 예상된 바와 같이, 면역 반응은 각각의 3 개의 벡터에 대해 더 높은 용량에서 더 강력하였다. ChAd155 RC1은 등가의 ChAd155 RD 또는 ChAd83 RC1 벡터 용량보다 면역 반응을 유도하는 데 더 강하였다. 이들 결과는 실시예 4 및 도 6에 제시한 데이터와 일치하였고, 이는 ChAd155 RC1 벡터와 비교하여 마우스 NMuLi 세포에서의 ChAd83의 복제 및 더 낮은 수준의 항원 발현을 거의 또는 전혀 나타내지 않는다.

[0164] 실시예 7: 마우스에게 경구 투여된 RD 및 RC1 벡터의 면역원성

ChAd155-RD 및 ChAd155 RC1 벡터의 면역학적 효능을 마우스에서 평가하고; 복제 결합 및 복제 가능 ChAd155 벡터를 비교하고, 결과를 도 9에 제시한다. 동물 (군당 6 마리)을 경구 또는 근육내 경로에 의해 면역화시킨 다음, 트랜스제닉 항원에 대한 중화 항체 반응 (상부 패널) 및 T 세포 반응 (하부 패널)에 대해 평가하였다.

[0166] 도 9 (상부 패널)는 경구 5×10^8 개 바이러스 입자 또는 근육내 1×10^7 개 바이러스 입자가 투여된 마우스의 체액성 중화 항체 면역 반응을 기재한다. 면역화 8 주 후에, 중화 항체 역가를 시판되는 모노클로날 항체를 사용하여 광견병 G 단백질에 대해 형광 항체 바이러스 중화 검정(FAVN)으로 측정하였다.

[0167] 바이러스 중화 역가, B 세포 (항체) 반응의 척도가 도 9에 제시되어 있다 (상부 패널). 각각의 점은 단일 마우스의 반응을 나타낸다. 도 9의 상부 패널은 ChAd155 RD 또는 ChAd155 RC1의 단일 투여 이후 8 주 내에 혈청에서 기능적 중화 항체가 검출되었음을 입증한다. ChAd155 RC1을 경구 투여할 때, 6 마리의 마우스 모두는 보호 역치 초과의 중화 항체 역가를 가졌다 (점선). ChAd155 RD의 경구 투여는 6 마리의 마우스 중 4 마리가 보호 역치 초과의 중화 항체 역가를 생산하는 결과를 초래하였다.

[0168] ChAd155 RC1을 근육내 투여할 때, 모든 6 마리의 마우스는 보호 역치 초과의 중화 항체 역가를 가졌다. ChAd155 RD의 근육내 투여는 6 마리 마우스 중 5 마리가 보호 역치 초과의 중화 항체 역가를 생성하는 결과를 초래하였다.

[0169] ChAd155 RC1 벡터로 면역화된 마우스의 중화 역가는 경구 또는 IM 투여되는지 관계 없이 ChAd155 RD 벡터로 면역화된 것보다 더 높았다. 이는 본 발명의 복제 가능 ChAd155 벡터가 경구 또는 근육내 투여되든지 간에 트랜스제닉 항원에 대한 항체 반응을 유도하는 데 있어서 복제 결합 ChAd155 벡터보다 더 효과적이라는 것을 입증한다.

[0170] 트랜스제닉 항원으로 백신 접종된 동물의 비장세포에서 ELISpot에 의해 IFN-감마 분비에 의한 T 세포 반응을 측정하였고, 이를 도 9에 제시하였다 (하부 패널). 마우스에게 경구 5×10^8 개 바이러스 입자 또는 근육내 1×10^7 개 바이러스 입자를 투여하였다. 면역화 3 주 후에, T 세포 반응을 실시예 6에 기재된 바와 같이 ELISpot에 의해 측정하였다. 각각의 점은 단일 마우스의 반응을 나타낸다.

[0171] T 세포 (세포 면역) 반응의 척도인, IFN-감마 분비를 도 9에 제시하였다 (하부 패널). 각각의 점은 단일 마우스의 반응을 나타낸다. 도 9는 ChAd155 RD 또는 ChAd155 RC1의 단일 투여 이후 면역화 후 3 주 이내에 T 세포 면역 반응이 검출되었음을 입증한다. ChAd155 RC1을 경구 투여하는 경우, 모든 6 마리의 마우스는 T 세포 반응을 개시하였다. ChAd155 RD의 경구 투여는 6 마리 마우스 중 4 마리가 T 세포 반응을 개시하는 결과를 초래하였다.

[0172] ChAd155 RC1 벡터로 면역화된 마우스의 T 세포 반응은 경구 또는 IM 투여되는지 관계 없이 ChAd155 RD 벡터로 면역화된 것보다 더 높았다. 이는 본 발명의 복제 가능 ChAd155 벡터가 경구 또는 근육내 투여되든지 간에 트랜스제닉 항원에 대한 세포성 면역 반응을 유도하는 데 있어서 복제 결합 ChAd155 벡터보다 더 효과적이라는 것을 입증한다.

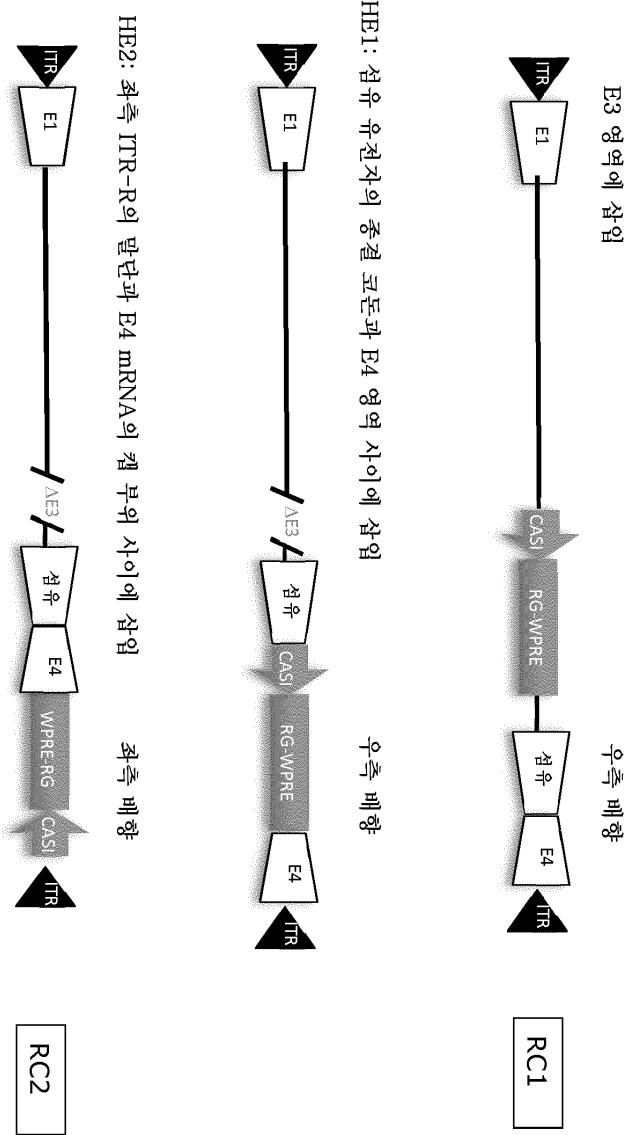
[0173] 실시예 8: 돼지에서의 복제 가능 백터의 면역원성

[0174] 통상 돼지 또는 맷돼지로서 공지된 맷돼지 속(*genus Sus*)의 동물은 PK1 돼지 세포에서 시험관내 데이터를 기반으로 하여, 이들이 ChAd 복제를 허용할 가능성이 있기 때문에 관련 모델을 제공한다. 면역원성을 입증하기 위해, 돼지, 예를 들어, 집돼지(*Sus scrofa domesticus*)는 대략 $1 \times 10^{10} - 1 \times 10^{12}$ 개 바이러스 입자의 용량으로 근육내 또는 비강내 전달되는 복제 가능 ChAd155 또는 ChAd83 백터로 면역화될 수 있다. 수집된 혈청 샘플을 중화 항체, T 세포 반응 및 B 세포 반응에 대해 분석할 수 있다. 백신 접종 후 쉐딩(shedding)은 비내 분비물, 타액 또는 분변을 수집함으로써 모니터링할 수 있다. 바이러스가 쉐딩되는 부위는 그의 생체분포를 나타낼 수 있고, 예를 들어 쉐딩이 비내 분비물로부터 우세하게 발생하는 경우에, 바이러스가 상기도에서 복제하는 선호도를 갖는 것으로 추론될 수 있다. 안전성의 지표는 체중, 체온, 음식물 소비, 혈액학적 파라미터 및 혈청 화학의 측정을 포함할 수 있다.

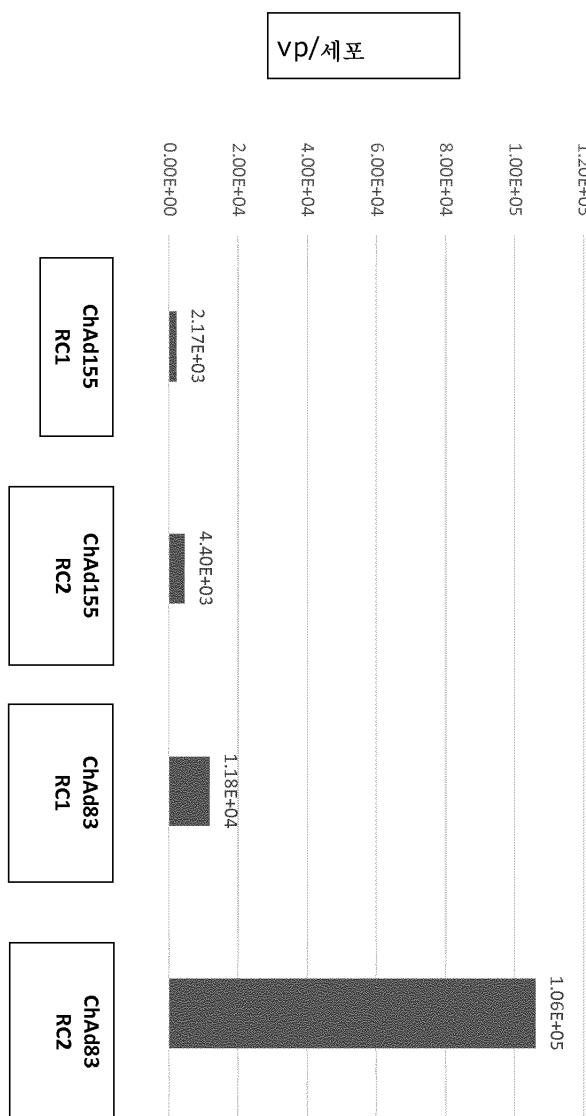
[0175] 일단 본 발명의 백터의 면역원성이 근육내 및 비강내 투여를 통해 돼지 모델에서 입증되면, 설하 투여를 포함한 다른 경로를 통해 면역원성을 시험할 수 있다. 실험 설계는 복제 가능 및 복제 결합 백터의 비교, ChAd155 및 ChAd83 백터의 비교, 구축물 내의 다양한 위치에서의 CASI 및 CMV 프로모터를 포함한 프로모터의 비교, 다양한 인핸서 요소, 예를 들어 WPRE의 효과의 비교, 및 설하 경로와 다른 면역화 경로의 비교를 포함할 수 있다.

도면

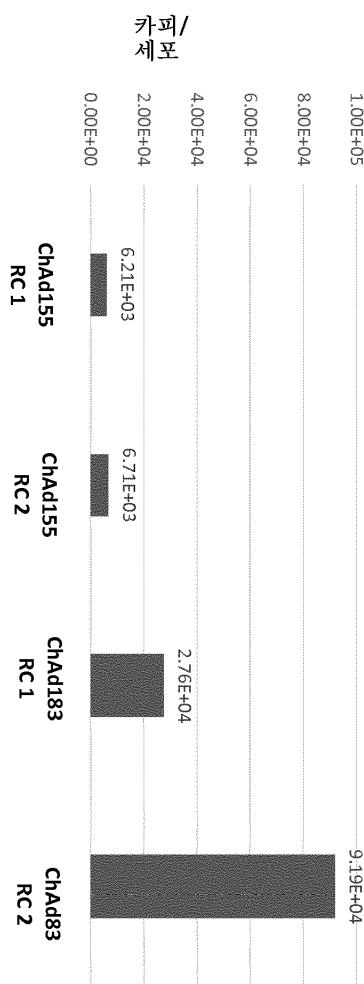
도면1



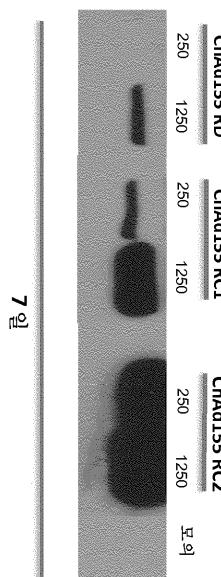
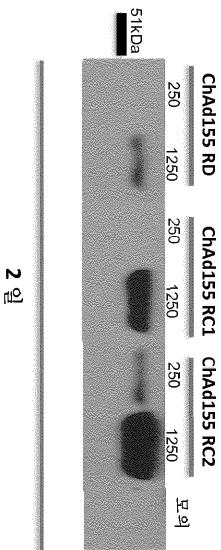
도면2



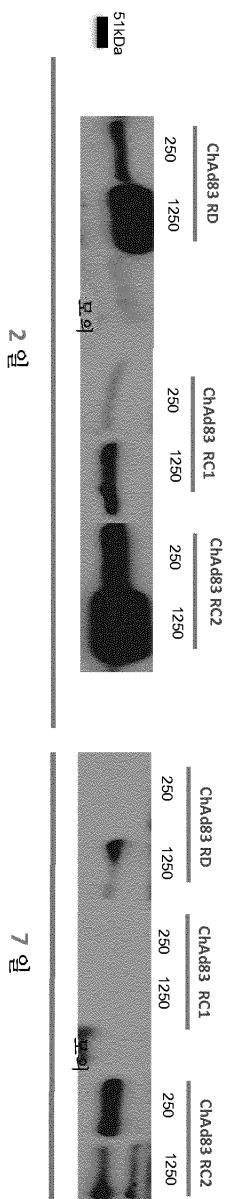
도면3



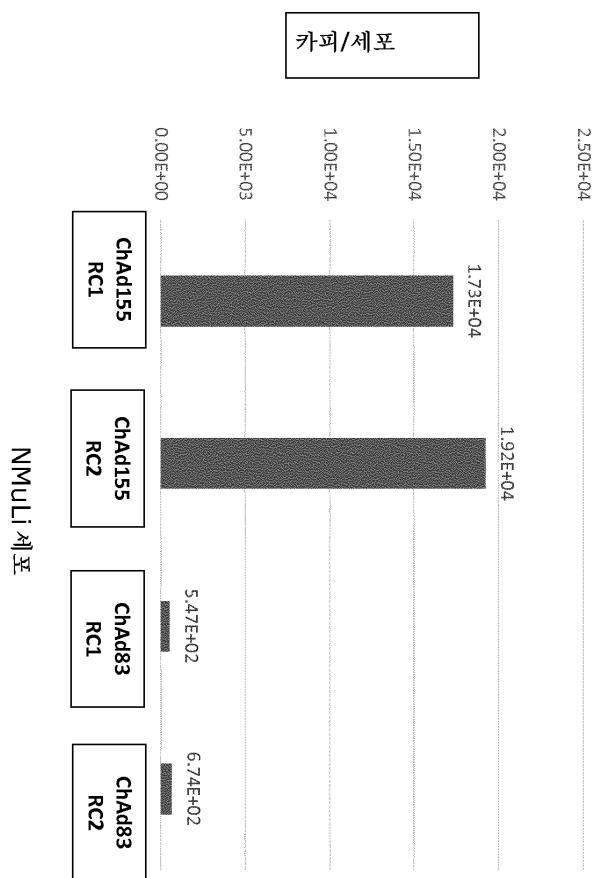
도면4



도면5



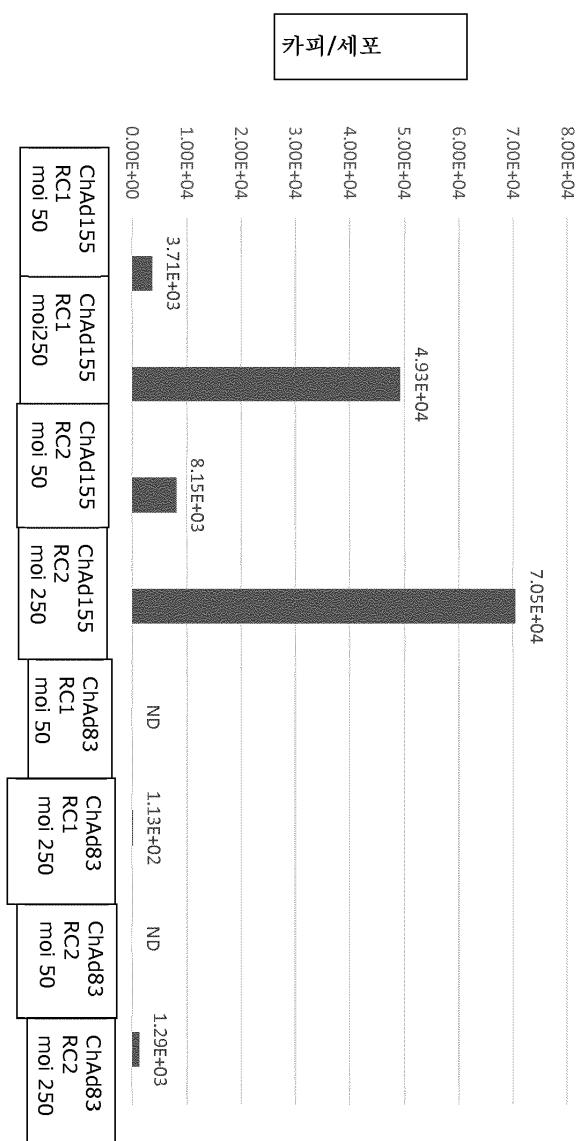
도면6a



(상부 패널)

NMULi 세포

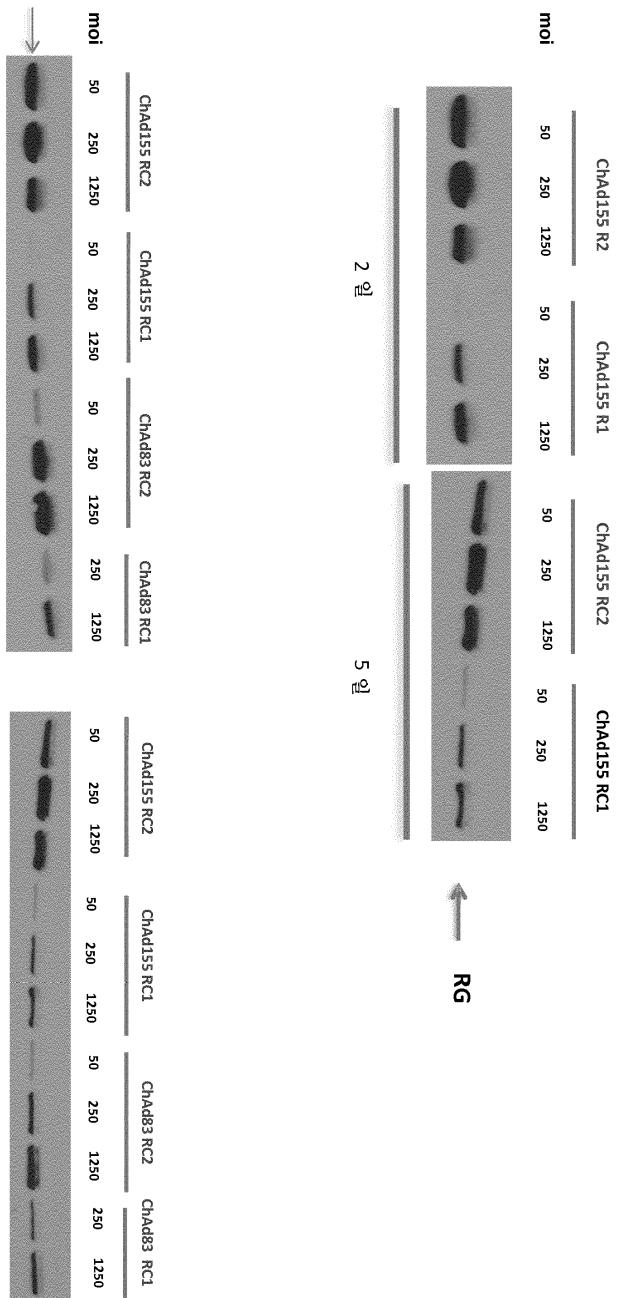
도면6b



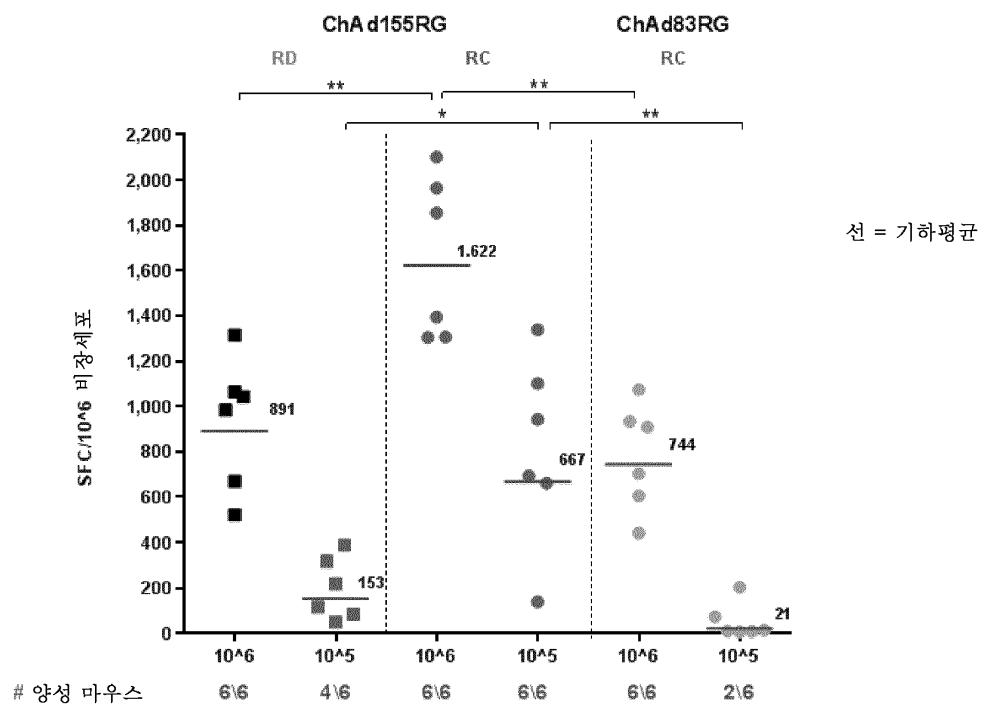
베로 세포

(하부 폐널)

도면7

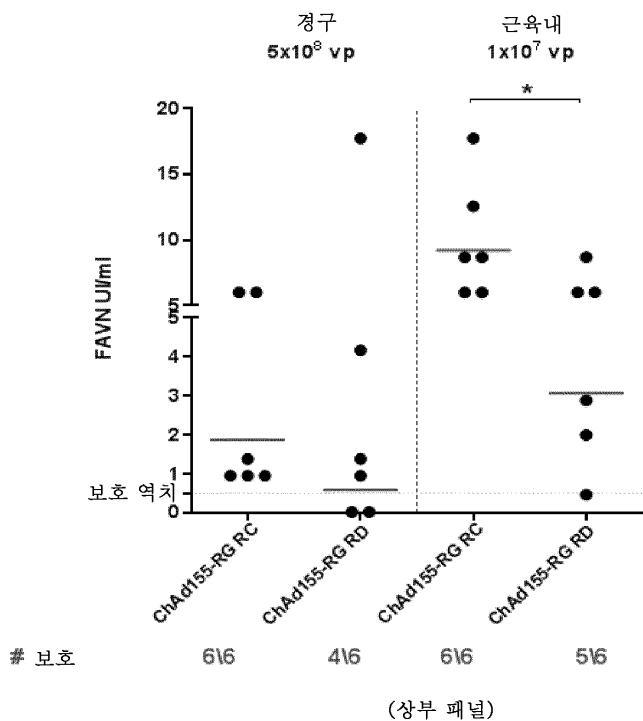


도면8

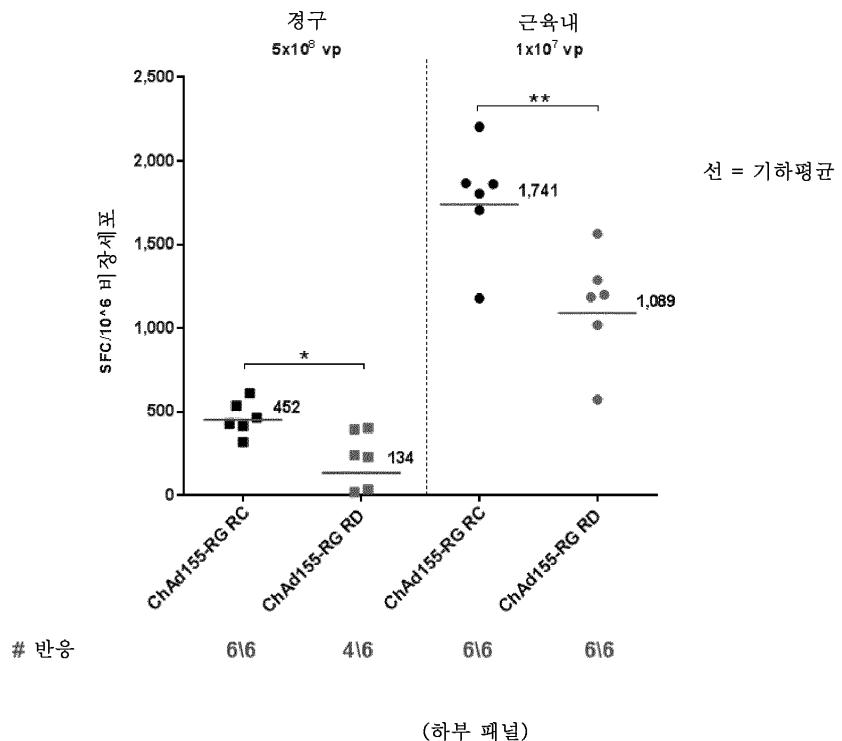


선 = 기하평균

도면9a



도면9b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GSK BIOLOGICALS S.A.

<120> REPLICATION COMPETENT ADENOVIRAL VECTORS

<130> VU66430 WO

<140><141><150> 62/572,927

<151> 2017-10-16

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 37830

<212> DNA

<213> Chimpanzee adenovirus

<400> 1

```

catcatcaat aataaacctt atttggatt gaagccaata tgataatgag atggcgccg 60
cggggcgaaa ggcgggtccg ggggcgggcc ggcggcgccc gcggtgtggc ggaagtggac 120
ttttaagtgt tggcgatgt gacttgctag tgccggccgc ggtaaaagtg acgtttccg 180

```


acgtcctgga tttctggcc atgcaactgt ggagagcatg gatcagacac aagaacaggc	2100
tgcaacttgt gtcttcgtc cgcccgttgc tgattccggc ggaggagcaa cagggcggt	2160
cagaggaccg gccccgtcg gatccggagg agagggcacc gaggccggc gagaggagcg	2220
cgctgaacct gggAACCGGG ctgagcggcc atccacatcg ggagtgaatg tcggcaggt	2280
ggtgatctt ttccagaac tgccgcggat ttgactatt agggaggatg ggcaatttgt	2340
taagggtctt aagaggaga ggggggcttc tgacataac gaggaggcca gtaatttagc	2400
tttagctt atgaccagac accgtccaga gtgcataact ttccagcaga ttaaggacaa	2460
ttgtccaat gagttggatc ttttgggtca gaagtatagc atagacgacg tgaccactta	2520
ctggctgcag ccgggtgatg atctggagga agctattagg gtgtatgcta aggtggccct	2580
gcggcccgat tcaagtaca agtcaaggg gctggtaat atcagaaatt gttgtacat	2640
ttctggcaac gggccggagg tggagataga gaccgaagac agggtggctt tcagatgcag	2700
catgatgaat atgtggccgg ggggtgctggg catggacggg gtgggtgatta tgaatgtgag	2760
ttcacgggg cccaacttta acggcacggt gttttgggg aacaccaacc tggtccctgca	2820
cggggtgagc ttctatgggt ttaacaacac ctgtgtggag gcctggaccg atgtgaaggt	2880
ccgcggttgc gcctttatg gatgttggaa gccatagtg agccgcctta agagcaggag	2940
ttccattaag aaatgcttgt ttgagaggtg caccttgggg atcctggccg agggcaactg	3000
cagggtgcbc cacaatgtgg cctccgagtg cggttgcttc atgctagtc agagcgtggc	3060
ggtaatcaag cataatatgg tgtcggcaa cagcgaggac aaggccctac agatgctgac	3120
ctgcacggat ggcaactgcc acttgctaaa gaccatccat gtaaccagcc acagccggaa	3180
ggcctggccc gtgtcgagc acaacttgt gacccgctgc tcctgcac tggcaacag	3240
gcggggggtg ttctgtccct atcaatgcaat ctttagtcac accaagatct tgctagagcc	3300
cgagagcatg tccaagggtga acttgaacgg ggtgttgac atgaccatga agatctggaa	3360
ggtgtcgagg tacgacgaga ccaggtcccg gtgcagaccc tgcgagtgcg gggcaagca	3420
tatgaggaac cagccgtga tgctggatgt gaccgaggag ctgaggacag accacttgg	3480
tctggcctgc accaggcccg agtttggttc tagcgtgaa gacacagatt gaggtgggtg	3540
agtggcggt gcctggggtg gtcatgaaaa tatataagtt ggggtctta gggctcttt	3600
atttgttgtc cagagaccgc cggagccatg agcgggagca gcagcagcag cagtagcagc	3660
agcgccttgg atggcagcat cgtgagccct tatttgacga cgccgtgcc ccactggcc	3720
ggggtgcgtc agaatgtgat gggctccagc atcgacggcc gacccgtctt gcccacaat	3780
tccgcccacgc tgacctatgc gaccgtcgcg gggacccgt tggacgccac cgccggcc	3840
gccgccaccc cagccgcctc ggccgtgcgc agcctggcca cggactttgc attcctggga	3900

ccactggcga cagggctac ttctcgccc gctgctgccg ccgttcgcga tgacaagctg	3960
accggccctgc tggcgcagtt ggatgcgcatt actcggaac tgggtgacct ttctcagcag	4020
gtcatggccc tgcgcagca ggtctctcc ctgcaagctg gcggaaatgc ttctccaca	4080
aatggcgttt aagataaata aaaccagact ctgtttggat taaagaaaag tagcaagtgc	4140
attgtctct ttatttcata atttccgcg cgcgataggc cctagaccag cgtttcggt	4200
cgttgagggt gcgggttatac ttctccagga cgtggtagag gtggctctgg acgttgagat	4260
acatgggcat gagccgtcc cgggggtgga ggttagcacca ctgcagagct tcatgctccg	4320
gggtggtgtt gtatgtatc cagtcgtac aggagcgctg ggcattggc ctaaaaatgt	4380
ccttcagcag caggccgatg gccaggggga ggcccttggtaa gtaagtgtt aaaaaacggt	4440
taagttggga agggtcatt cggggagaga tggatgtcat ctggactgt atttttagat	4500
tggcgatgtt tccggcaga tcccttctgg gattcatgtt gtgcaggacc accagtacag	4560
tgtatccggt gcacttgggg aatttgcattt gcaacttgcggg gggaaaagcg tggaagaact	4620
tggagacgcc ttgtggcct cccagattt ccatgcattt gtccatgtatg atggcaatgg	4680
ccccggggaa ggcagcttgg gcaaagatattt ttctgggtc gtcgacgtcg tagttgttt	4740
ccagggtgag gtcgtcatag gccatTTTA caaagcgccg gcccggggcggcccactggg	4800
ggatgatggt cccctctggc cctggggcgt agttgcctc gcagatctgc atttccagg	4860
ccttaatctc ggagggggaa atcatatcca cctgcgggca gatgaagaaa acggtttccg	4920
gagccgggaa gattaactgg gatgagagca ggttctaaag cagctgtat tttccacaac	4980
cggggccccccataaataaca cctataaccc gttgcagctg gtatgttgcggcggcggc	5040
tgcgtcgcc tcggaggagg gggccacccgttgcgtat gtcctgcacgcgcgttct	5100
ccccgaccag atccggcaga aggcgcgtcc cggccaggaa cagcagctt tgcaagggaa	5160
caaagtttt cagcggcttg aggccgtccg ccgtggcat gttttcagg gtctggctca	5220
gcagctccag gcggtcccag agctcggtga cgtgcctac ggcatctcta tccagcatat	5280
ctcctcgttt cgggggttgg ggcgacttgc gctgtaggc accaagcggt ggtcgccag	5340
cggggccaga gtcatgtcttccatggcgc cagggtccctc gtcagggtgg tctgggtcac	5400
ggtaaggggg tgctccgg gctgagcgct tgccaaagggtcgcttggaggc tggttctgt	5460
ggtgctgaag cgcgtccggc ttgcgtccctg cgcgtccggc aggtgcatt tgaccatgg	5520
gtcatagtc accccctccg cggcgtgtcc ctggcgcgc agttgccttggagggtggc	5580
gccgcacgag gggcagagca ggctttgag cgcgtagac ttggggcga ggaagaccga	5640

ttcgggggag taggcgtccg cgccgcagac cccgcacacg gtctcgact ccaccagcca	5700
ggtagctcg gggcgccg ggtcaaaaac caggttccc ccatgcttt tgatcgctt	5760
cttacctcg gtcctcatga ggtggtgtcc cgcgtcggtg acgaagaggc tgtccgtgc	5820
tccgttagacc gacttgaggg gtctttctc cagggggtc ctcggctt cctcgtagag	5880
gaactcggac cactctgaga cgaaggcccg cgtccaggcc aggacgaagg aggctatgt	5940
ggaggggtag cggtcggtgt ccactagggg gtccaccc tccaagggtgt gaagacacat	6000
gtcgccttcc tcggcgtcca ggaagggtat tggcttgcgt gttaggcca cgtgaccggg	6060
gtttcctgac ggggggtat aaaaggggtt gggggcgcc tcgtcgac tctttccgc	6120
atcgctgtct gcgagggcca gctgctgggg tgagtattcc ctctcgaaagg cggccatgac	6180
ctccgcgtg aggttgcag ttccaaaaa cgaggaggat ttgatgttca cctgtccga	6240
ggtgataacct ttgagggtac cgcgtccat ctggtcagaa aacacgatct ttttattgtc	6300
cagcttggtg gcgaacgacc cgtagaggc gttggagagc agcttggcga tggagcgcag	6360
ggtctggttc ttgtccctgt cggcgccgtc cttggccgcg atgttgcgt gcacgtactc	6420
gcgcgcgacg cagcgcact cgggaaagac ggtggcgcc tcgtcggca ccaggcgcac	6480
gcgcgcgcgc cggttgtca gggtgaccag gtccacgcgt gtggcgacct cgccgcgcag	6540
gcgcctgttgc tcgcaggaga gacggccgc cttgcgcgag cagaaggggg gcaggggtc	6600
gagctgggtc tcgtccgggg ggtccgcgtc cacggtaaaa accccggggc gcaggcgcgc	6660
gtcgaagtag tctatcttc aaccttgcgt gtccagcgcc tgctgcagt cgccggcgcc	6720
gagcgcgcgc tcgttaggggt tgagcggcgg gccccaggc atgggtggg tgagtgcgga	6780
ggcgtacatg cgcgcgtatgt catagacgt aaggggctcc cgcaggaccc cgatgttaggt	6840
ggggtagcag cggccgcgcgc ggatgctggc ggcacgtatgt cgtgcgaggg	6900
ggcgaggagg tcggggccca gttgggtcg ggcggggcgc tccgcgcga agacgatctg	6960
cctgaagatg gcatgcgagt tgaaagagat ggtggggcgc tgaaagacgt tgaagctggc	7020
gtcctgcagg cgcgcgcgt cgcgcacgaa ggaggcgtag gagtcgcgcgca gcttgcgtac	7080
cagctcgccg gtgacctgca cgtcgacgcgc gcagtagtcg agggtctcgc ggtatgtc	7140
atatttagcc tgcccctct tttccacag ctcgcgggttg aggacaaact cttcgccgtc	7200
tttccagtagtac tcttggatcg gaaaccgtc cggttccgaa cggtaagagc ctagcatgt	7260
gaactggttg acggcctggt aggcgcagca gccctctcc acggggaggg cgtaggcgt	7320
cgccgccttg cggagcgagg tgtgggtcg ggcgaagggtg tccctgacca tgactttgag	7380
gtactgggtc ttgaagtcgg agtcgtcgca ggcgcgcgc tcccgacgtc agaagtcgt	7440
gcgccttcttgc gagcgggggt tggcagagc gaagggtaca tcgttgaaga ggatggcc	7500

cgcgccccgc atgaagttgc gggtgatgcg gaaggcccc ggcacttcag agcggttgc	7560
gatgacctgg cggcggagca cgatctcgta gaagccgttg atgttgtggc ccacatgtaa	7620
gagttccagg aagcggggcc ggcccttac ggtggcagc ttcttagct cttcttaggt	7680
gagctccctcg ggccggcga ggccgtgcg ggccaggccc cagtccgcga ggtgcgggtt	7740
gtctctgagg aaggacttcc agaggtcgcg ggccaggagg gtctcaggc ggtctctgaa	7800
ggtcctgaac tggcgccccca cggccatttt ttccgggggtg atgcagtaga aggtgagggg	7860
gtcttgcgc cagcggtccc agtcgagctg caggcggagg tcgcgcgcgg cggtgaccag	7920
gchgctcgatc ccccaattt tcatgaccag catgaaggc acgagctgct ttccgaaggc	7980
cccccataaa gtgttagtct ctacatcgta ggtgacaag aggccgtccg tgccaggatg	8040
cggccgatc gggagaact ggatctcccg ccaccagttg gaggagtggc tggtatgtg	8100
gtggaaatgg aagtcccgta gcccggccga acactcgatc tggctttgt aaaagcgagc	8160
gcagacttgg cagcgtcgca cgggctgtac ctcatgcacg agatgcaccc ttccggcg	8220
cacgaggaag ccgagggaa atctgagccc cccgcctggc tcgcggcatg gctggttctc	8280
ttctactttg gatgcgtgtc cgtctccgtc tggctctcg aggggttta cggtggagcg	8340
gaccaccacg cgcgcgcgc cgcaggatcca gatatcgccg cgccgcggc ggagtttgc	8400
gacgacatcg cgcagctggg agctgtccat ggtctggagc tcccgccggc gcccggatc	8460
agccggagat tcttgcaggt tcacctcgca gagtcggcc agggcgcggg gcaggatctag	8520
gtgttacctg atctctatgg gcgtgttggt ggccggcgtcg atggctcgca ggagcccgca	8580
gccccggggg gcgacgacgg tgccccggg ggtgggttg gtgggtggcgg tgcagctcag	8640
aagcggtgcc cggggcgccc ccccgaggat agggggggct ccggccccc gggcaggggc	8700
ggcagcggca cgtcgccgtg gagcgcggcc aggagttgt gctgtccccg gaggttgctg	8760
gcgaaggcga cgacgcggcg gttgatctcc tggatctggc gcctctgcgt gaagacgacg	8820
ggcccggtga gtttgcacct gaaagagat tcgcacagaat caatctcggt gtcatcgacc	8880
gcggccctggc gcaggatctc ctgcacgtct cccgagttgt ctggtaggc gatctcgcc	8940
atgaactgtc cgtatcttc ctcctggagg tctccgcgtc cggcgcgttc cacgtggcc	9000
gccaggtcg tggagatgcg cccatgagc tgcgagaagg cggtgagttcc gccctcggtc	9060
cagactcgcc ttagaccac gccccctgg tcatcgccgg cgccatgac cacatcgccg	9120
aggttgagct ccacgtcgcc cgcgaagacg gcgttagttgc gcagacgtc gaagaggtag	9180
ttgggggtgg tggcggtgtc ctggccacg aagaagttca tgaccagcg ggcacacgt	9240
gattcggtga tgtccccaa ggcctccacg cggtccatgg cctcgtagaa gtccacggcg	9300
aagtgtaaaa actgggagtt ggcgcgcgac acggtaact ctcctccag aagacggatg	9360

agctcggcga cggtgtcgcg cacctcgcc tcgaaggcta tgggatctc ttccctcgct	9420
agcatcacca cctccctc tcctccctct tctggcactt ccatgatggc ttccctct	9480
tcgggggtg gggcgccgg cggtggggga gggggcgctc tgcgcggcg gcggcgacc	9540
gggaggcggt ccacaaagcg cgcatc tccccggc ggcggcgat ggtctcggt	9600
acggcgccgc cgttctcccg gggcgcaagt tggaagacgc cgccggacat ctggtgctgg	9660
ggcgggtggc cgtgaggcag cgagacggcg ctgacatgc atctcaacaa ttgctgcgt	9720
gttacgcgc cgaggacact gagggatcc atatccaccc gatccaaaa ctttcgagg	9780
aaggcgtcta accagtgcga gtcgcaaggt aggctgagca cctggcgccc cggcgaaaa	9840
tggggggagt gtctggcga ggtgctgctg atgatgtaat tgaagttaggc ggacttgaca	9900
cgccggatgg tcgacaggag caccatgtcc ttgggtccgg cctgctggat gcggaggcg	9960
tccgctatgc cccaggcttc gttctggcat cggcgcaagt cttgttagta gtcttgcatg	10020
agccttcca ccggcaccc tcctccctcc tcttctgctt cttccatgtc tgcttcggcc	10080
ctggggcgcc gcccggcccc cctggggggc atgcgtgtaa cccgaaccc cctgagcggt	10140
tggagcaggg ccaggtcgcc gacgacgcgc tcggccagga tggctgctg cacctgcgt	10200
agggtggttt ggaagtcatc caagtccacg aagcggtgtt aggcggccgt gttgtatgggt	10260
taggtgcagt tggccatgac ggaccagttt acggctgtt ggcccggtt cgacatctcg	10320
gtgtacctga gtgcgagta ggccggggag tcgaagacgt agtcgttgca agtccgcacc	10380
aggtaacttgtt agccaccag gaagtgcggc ggccgtggc ggttagaggg ccagcgcaagg	10440
gtggcgcccc ctccggggc caggcttcc agcatgaggg ggtggtaggc gtagatgtac	10500
ctggacatcc aggtgatacc cgccggcggt gtggaggcgcc gcccggaaatc gcccggccgg	10560
ttccagatgt tgccgaggg cagaaagtgc tccatggtag gctgtgtctg tccagtcaga	10620
cgcgcgcagt cttgtataact ctagaccagg gaaaacgaaa gcccggtcagc gggcacttt	10680
ccgtggctgt gtgaatagat cgcaaggta tcatggcga gggctcggt tcgagccccg	10740
ggtcggggcc ggacggtccg ccatgatcca cgccgttacc gcccgggtgt cgaacccagg	10800
tgtgcgacgt cagacaacgg tggagtgttc ctttggcgt tttctggcc gggcgccggc	10860
gcccgtaag agactaagcc gcaaaggcga aagcgttaag tggctcgctc cccgtagccg	10920
gagggtatct tgcataagggt tgcgttgcc cgaacccgg ttcgaatccc gtactcgcc	10980
cggccggacc cgccggtaag gtgttggatt ggcctcccc tctataaaag accccgcttgc	11040
cggattgact cggacacgg ggacgagccc ctttatccc tgctttcccc agatgcatacc	11100

ggtgctgcgg cagatgcgcc cccgccccca gcagcagcaa caacaccaggc aagagcggca	11160
gcaacagcag cggggagtcat gcagggcccc ctcaccacc ctcggccggc cggcacacc	11220
ggcgcccgcc gccgtgtctg ggcctgcgg cggccgggg gggccggctg acgaccccga	11280
ggagcccccg cggcgcaggg ccagacacta cctggacctg gaggaggcgc agggcctgtc	11340
gcggctgggg gcgcgtctc ccgagcgcca cccgcgggtg cagctgaagc gcgactcg	11400
cggcgtac gtgcctcgcc agaacctgtt cagggaccgc gcggccgagg agcccgagga	11460
gatgcgggac aggaggttca gcgcaggcgc ggagctgcgg cagggctga accgcgagcg	11520
gctgctgcgc gaggaggact ttgagcccga cgcgccgacg gggatcagcc cgcgcgcgc	11580
gcacgtggcg gccgcgacc tggtgacggc gtacgacgacg acggtaacc aggagatcaa	11640
cttccaaaag agttcaaca accacgtgcg cacgctggc gcgcgcgagg aggtgaccat	11700
cgggctgatg cacctgtggg acttttagg cgcgtggc cagaacccca acagcaagcc	11760
tctgacggcg cagctgtcc tgatagtgcg gcacagcagg gacaacgagg cgtagggaa	11820
cgcgtctg aacatcaccc agcccgaggg tcggtggtc ctggacctga ttaacatcct	11880
cgagagcata gtggtgcagg agcgcagcct gagcctggcc gacaaggtagg cggccatcaa	11940
ctactcgatg ctgagcctgg gcaagttta cgcgcccaag atctaccaga cgccgtacgt	12000
gccccatagac aaggaggtaa agatcgacgg ttttacatg cgcattggc tgaagggtct	12060
caccctgagc gacgacactgg gcgtgtaccg caacgacgcg atccacaagg ccgtgagcgt	12120
gagccggcgg cgcgagctga gcgaccgcga gctgatgcac agcctgcagc gggcgtggc	12180
gggcgcggc acggcgaca gggaggcggg tccctacttc gaigcggggg cggacctgcg	12240
ctggcgcgcc accggcgccc ccctggaggc cgccgggggtc cgcgaggact atgacgagga	12300
cgccgaggag gatgaggagt acgagctaga ggagggcgg tacctggact aaaccgcggg	12360
tgggtttcc ggtagatgca agacccgaac gtggtgacc cggcgtcgc ggcggctcg	12420
cagagccagc cgtccggct taactcctca gacgactggc gacaggatcat ggaccgcata	12480
atgtcgctga cggcgcgtaa cccggacgcg ttccggcgc agccgcaggc caacaggctc	12540
tccgcattcc tggaggcggt ggtgcctgcgc cgctcgaacc ccacgcacga gaagggtct	12600
gccatagtga acgcgtggc cgagaacagg gccatccgcg cggacgaggc cggcgtggc	12660
tacgacgcgc tgcgtcagcg cgtggccgc tacaacagcg gcaacgtgc gaccaacctg	12720
gaccggctgg tggggacgt gcgcgaggcgt gtggcgcagc gcgacgcgc ggatcggcag	12780
ggcaacctgg gtcctcatggt ggcgtaat gccttcgtga gcacgcagcc ggccaacgtg	12840
ccgcgggggc aggaagacta caccaactt gtgagcgcgc tgccgtat ggtgaccgag	12900
accccccaga gcgagggtta ccagtcggc cggactact tctccagac cagcagacag	12960

ggcctgcaga cggtaacct gagccaggct ttcaagaacc tgcggggct gtggggcgtg	13020
aaggcgcca ccggcggaccg ggacgggtg tccagcctgc tgacgccccaa ctgcgcctg	13080
ctgcgtctgc tgcgtcgcc gttcacggac agcggcagcg tgtccggga cacctacgt	13140
ggcaccctgc tgaccctgta ccgcgaggcc atcggcagg cgccaggatggc cgagcacacc	13200
ttccaggaga tcaccagcgt gagccgcgcg ctggggcagg aggacacgag cagcctggag	13260
gcgactctga actacctgt gaccaaccgg cgccagaaga ttccctcgct gcacagcctg	13320
acctccgagg aggagcgcatttgcgcgtac gtgcagcaga gcgtgagcct gaacctgtat	13380
cgcgacgggg tgacgcccag cgtggcgctg gacatgaccg cgccacaat ggaaccggc	13440
atgtacgcgcg cgacccggcc ttacatcaac cgcctgatgg actacctgca tcgcgcggcg	13500
gccgtgaacc ccgagttactt taccaacgccc atcctgaacc cgccactggct cccggccccc	13560
gggttctaca gcgaaaaaatttcccg gagatggccggc atggcttcct gtgggacgac	13620
atggacgaca gcgtttctc cccgcggccg caggcgtgg cggaaacgcgc cctgctgcgt	13680
cccaagaagg aggaggagga ggaggcgagt cgccgcgcg gcagcagcgg cgtggctct	13740
ctgtccgagc tggggcgcc agccgcgcg cgcccccgggt ccctggcg cagccccctt	13800
ccgagcctgg tggggctct gcacagcgcg cgcaccaccc gcctcggt gctggcgag	13860
gacgagtacc tgaataactc cctgctgcag cccgtgcggg agaaaaaccc gcctccgc	13920
ttcccaaca acggataga gacgcgtgt gacaagatga gcagatggaa gacctatgca	13980
caggagcaca gggacgcgc tgcgtccgg ccgcacgcg ggcgcacgc ccacgacgg	14040
cagcggggc tgggtggaa tgacgaggac tccgcggacg atagcagcgt gctggacgt	14100
ggagggagcg gcaacccgtt cgccgcaccc cgcccccggcc tggggaggat gtttaaaa	14160
aaaaaaaaaa aagcaagaag catgatgcaaa aattaaata aaactcacca aggccatggc	14220
gaccgagcgt tggttcttg tggcccttc agtatgcggc gcgcggcgat gtaccaggag	14280
ggaccccttc cctttacga gacgtgggt ggcgcggcc cgccggccccc ctctctccc	14340
tggcgtcgc agctgctgaa gcccgtac gtgcctccgc gtacccgtcg gcctacgggg	14400
gggagaaaca gcatccgtt ctcggagctg gcgcacccgt tgcacaccac ccgggtgtac	14460
ctgggtggaca acaagtccgc ggacgtggcc tccctgaact accagaacga ccacagcaat	14520
ttttgacca cggcatcca gaacaatgac tacagcccgaa gcgaggccag cacccagacc	14580
atcaatctgg atgaccggcgc gactggggc ggcgacccgtaaaccatcttgcacccaca	14640
atgccccaaacg tgaacgagtt catgttcacc aataagttca aggcgcgggt gatgggtcg	14700
cgctcgacca ccaaggaaga ccgggtggag ctgaagttacg agtgggtgaa gttcgagctg	14760
ccagagggca actactccga gaccatgacc attgacccgtt tgaacaacgc gatcggtggag	14820

cactatctga aagtgggcag gcagaacggg gtcctggaga gcgacatcg ggtcaagttc	14880
gacaccagga acttccgcct ggggctggac cccgtgaccg ggctggttat gcccgggtg	14940
tacaccaacg aggcccca tcccgacatc atcctgctgc cggctgcgg ggtggacttc	15000
acttacagcc gcctgagcaa ctcctggc atccgcaagc ggcagccctt ccaggagggc	15060
ttcaggatca cttacgagga cttggaggg ggcaacatcc cccgcctc cgtatgtggag	15120
gcctaccagg atagcttcaa ggaaaatgag gcgggacagg aggataccgc ccccgccccc	15180
tccggcccg ccgagcaggg cgaggatgtc gctgacaccg cggccgcggc cggggcagag	15240
gccgaccccg ctatggtggt ggaggctccc gagcaggagg aggacatgaa tgacagtgcg	15300
gtgcgcggag acacccgtc cacccggggg gaggaaaagc aagcggaggc cgaggccgcg	15360
gccgaggaaa agcaactggc ggcagcagcg gcggcggcg cttggccgc ggcggaggct	15420
gagttctgagg ggaccaagcc cgcctgatc agccctgtac cgaagatagc	15480
aagaagcga ttacaacct gctcaaggac agcacaaca ccgcgtaccg cagctggta	15540
ctggcctaca actacggcga cccgtcgacg ggggtgcgt cctggaccct gctgtgcacg	15600
ccggacgtga cctgcggctc ggagcagggt tactggtcgc tgccgcacat gatgcaagac	15660
cccggtaccc tccgctccac gcggcaggc agcaacttcc cgggtggggg cgccgagctg	15720
ctgcccgtgc actccaagag cttctacaac gaccaggccg tctactccca gtcataccgc	15780
cagttcacct ctctgaccca cgtgttcaat cgctttctt agaaccagat tctggcgcgc	15840
ccgccccccc ccaccatcac caccgtcagt gaaaacgttc ctgtctcac agatcacggg	15900
acgctaccgc tgccacaacag catcgaggaa gtccagcgag tgaccgttac tgacgcaga	15960
cgccgcacct gcccctacgt ttacaaggcc ttggcatag tctgcgcgc cgtcccttcc	16020
agccgcactt tttagcaac accaccatca tgtccatctt gatctcaccc agcaataact	16080
ccggctgggg actgtgcgc gcccacca agatgttcgg aggggcagg aagcgttccg	16140
agcagcaccc cgtgcgcgtg cggggcact tccgcgcctt ctggggagcg cacaacgcg	16200
gccgcgcggg ggcacccacc gtggacgacg ccatgcactc ggtggggag caggcgcgc	16260
actacaggcc cgcgtcttcc accgtggacg cggccatcca gaccgtggc cggggcgcgc	16320
ggcgtacgc caagctgaag agccgcggaa agcgcgtgc cggccgcac cggccgcac	16380
ccggggccgc cggccaaacgc gcccgcgcg ccctgcctcg cggggcaag cgcacggcc	16440
gccgcgcgc catgaggccc ggcgcgcgt tggccgcgg catcaccgc gccaccatgg	16500
ccccccgtac cggacacgc gggccgcgc cggccgcgc cggccatcgt gacatggcca	16560

gcaggcgccg gggcaacgtg tactgggtgc gcgactcggt gaccggcacg cgcgtgccg	16620
tgcgttccg ccccccggcgg acttgagatg atgtaaaaaa acaacactga gtctcctgct	16680
gttgtgtta tcccgccgc ggcggcgcgc gcagcgtcat gtccaagcgc aaaatcaaag	16740
aagagatgct ccaggtcgtc gcccggaga tctatggcc cccgaagaag gaagagcagg	16800
attcaagcc ccgcaagata aagcgggtca aaaagaaaaa gaaagatgat gacgatgccg	16860
atggggaggt ggagttcctg cgccacgg cgcggcgcgc cccggcgcag tggaaggcc	16920
ggcgcgtaaa ggcgtcctg cgcgggttgt ctacgcccc ggcgagcgt	16980
ccacccggac ttcaagcgc gtctatgacg aggtgtacgg cgacgaagac ctgctggagc	17040
aggccaacga gcgttcgga gagtttgct acgggaagcg tcagcggcgc ctggggagg	17100
aggacctgct ggcgtgccg ctggaccagg gcaacccac cccagcttg aagccgtga	17160
ccctgcagca ggtgtgccg agcagcgcac cctccgagc gaagcgggt ctgaagegcg	17220
agggcggcga cttggcgc accgtgcagc tcatggtgc caagcggcag aggctggagg	17280
atgtgctgga gaaaatgaaa gtagaccccg gtctgcagcc ggacatcagg gtccgc	17340
tcaagcaggt ggcgcgggc ctgcgtgc agaccgtgga cgtggcgtatc cccaccggca	17400
actccccgc cggccacc actaccgctg cctccacgga catggagaca cagaccgatc	17460
ccgcgcagc cgcagccgca gcccgcgcg cgacccctc ggccggaggc cagacggacc	17520
cctggctgcc gcccgcgtatc tcaatcccc ggcgcgtcg cggcgcagg aagtacggcg	17580
ccgccaacgc gctctgccc gagttacgcct tgcatttc catcgcccc accccggct	17640
accgaggcta tacctaccgc cgcgaagag ccaagggttc caccggcgt cccggccac	17700
gcccgcgcgc caccaccgcg cgcgcgcgc gcagacgcca gcccgcactg gtcgcgtct	17760
ccgtgaggaa agtggcgcgc gacggacaca ccctgggtct gcccaggcgc cgctaccacc	17820
ccagcatcg taaaaggct gttgtggttc ttgcagatat ggccctact tgccgcctcc	17880
gtttcccggt gcccggatac cgaggaggaa gatcgcgcgc caggagggt ctggccggcc	17940
gcccgcgtatc cggaggcgcg cgcgcgcgc accggcggcg acgcgcacc agccgacgca	18000
tgcgcggcgg ggtgtgccct ctgttaatcc ccctgtatcg cgcggcgtc ggcgcgtgc	18060
ccggatcgc ctccgtggcc ttgcaagcgt cccagaggca ttgacagact tgcaaacttg	18120
caaatatgga aaaaaaaaaacc ccaataaaaaa agtctagact ctacgctcg ctgtgtctg	18180
tgactatgtt gtagaatgga agacatcaac ttgcgtcgc tggccgcgc tcacggctcg	18240
cgcccggttcc tgggacactg gaacgatatac ggcaccagca acatgagcgg tggcgccttc	18300
atgtggggct ctctgtggag cggcattaaa agtatacggt ctgcgtttaa aaattacggc	18360
tcccgccctt ggaacagcag cacggccag atgttggag acaagttgaa agagcagaac	18420

ttccagcaga aggtggtga gggctggcc tccggcatca acgggttgt ggacctggcc	18480
aaccaggccg tgcaagaataa gatcaacagc agactggacc cccggccgcc ggtggaggag	18540
gtgccgcgg cgctggagac ggtgtcccc gatggcggt gcgagaagcg cccgcggccc	18600
gatagggaaag agaccactt ggtcacgcag accgatgagc cgcccccgtt tgaggaggcc	18660
ctgaagcaag gtctgcccac cacgcggccc atcgcgcaca tggccaccgg ggtggtggc	18720
cgcacacccc ccgcacacgt ggacttgccct cgcgcgcgg atgtgccgca gcagcagaag	18780
cgccacacgc cggccgcggc cgcgaccgc tccgcgtc cgcgcgtcc tctgcgcgc	18840
gcggccagcg gccccgcgg ggggtcgcg aggacggca actggcagag cacgtgaac	18900
agcatcgtag gctgggggt ggggtcgtag aagcgcgcg gaigctactg aatagcttag	18960
ctaacgtgtt gtatgtgtt atgcgccta tgtgcgcgc agaggagctg ctgagtgcgc	19020
ccgcgttcgcg cgeccaccac caccgcact cgcgcctca agatggcgac cccatcgatg	19080
atgcgcagt ggtcgatcat gcacatctcg ggccaggacg cctggagta cctgagcccc	19140
gggctggtgc agttgcgcgcg cgcgcacgcg agctacttca gcctgagtaa caagtttagg	19200
aacccacgg tggcccccac gcacgatgt accacggacc ggtctcagcg cctgacgtcg	19260
cggttcattt cctgtggaccg cgaggacacc gcgtactcgt acaaggcgcg gttcacccgt	19320
gccgtggcg acaaccgcgt gctggacatg gcctccaccc acttgacat ccgcgggtg	19380
ctggaccggg gtccacttt caagccctac tctggcaccg cctacaactc cctggccccc	19440
aaggcgctc ccaactcctg cgagtggag caagagaaaa cttagcgt tgaagaagca	19500
gcagaagagg aagaagaaga tgctgacggt caagctgagg aagagcaagc agctacaaa	19560
aagactcatg tatatgctca ggctccctt tctggcgaaa aaatttagtaa agatggtctg	19620
caaataggaa cggacgctac agctacagaa caaaaaccta ttatgcaga ccctacattt	19680
cagcccgaac cccaaatcg ggagtcccg tggaaatgagg cagatgtac agtcgcggc	19740
ggttagatgc taaagaaatc tactccatg aaaccatgtc atggttccta tgcaagaccc	19800
acaatgtca atggaggctca gggtgtacta acggcaaattt cccaggaca gctagaatct	19860
caggttggaa tcaattttt ttcaacttctt gaaaacgcgc gtaacggaggc taacaacatt	19920
cagccaaat tggtgctgta tagtgaggat gtgcacatgg agacccggta tacgcacatt	19980
tcttacaagg ccgcgggggg cgtgacaat tcaaaaatca tgctgggtca gcagtccatg	20040
cccaacagac ctaatttacat cggcttcaga gacaacttta tcggccatgtt gtattacaat	20100
agcaactggca acatgggagt gttgcaggat caggccttc agttgaatgc agtgggtggac	20160
ttgcaagaca gaaacacaga actgtcctac cagctttgc ttgattccat gggtgacaga	20220
accagatact ttccatgtt gaatcaggca gtggacaggat atgaccaga tggtagatt	20280

attgaaaatc atgaaactga agacgagctc cccaaactatt gttccctct gggtggata	20340
gggtaactg acacttacca ggctgttaaa accaacaatg gcaataacgg gggccaggtg	20400
acttggacaa aagatgaaac tttgcagat cgcaatgaaa taggggtgg aaacaatttc	20460
gctatggaga tcaacctcg tgccaacctg tggagaaact tcctgtactc caacgtggcg	20520
ctgtacccac cagacaagct taagtacaac ccctccaatg tggacatctc tgacaacccc	20580
aacacctacg attacatgaa caagcgagt gtggcccg ggctggtgga ctgctacatc	20640
aacctggcg cgcgctggc getggactac atggacaacg tcaaccctt caaccaccac	20700
cgaatgcgg gcctgcgcta ccgctccatg ctccctggca acggcgcta cgtgcccttc	20760
cacatccagg tgccccagaa gttctttgcc atcaagaacc tcctccctt gccgggtcc	20820
tacacctacg agtggactt caggaaggat gtcaacatgg tcctccagag ctctctgggt	20880
aacgatctca gggggacgg ggccagcatc aagttcgaga gcatctgcct ctacgccacc	20940
ttctccca tggccacaa cacggcctcc acgctcgagg ccatgctcag gaacgacacc	21000
aacgaccagt cttcaatga ctaccttcc gccgccaaca tgcctaccc cataccgcc	21060
aacgccacca acgtccccat ctccatcccc tcgcgcaact gggccgcctt ccggcgtgg	21120
gccttcaccc gcctcaagac caaggagacc ccctccctgg gctcgggatt cgaccctac	21180
tacacctact cgggctccat tccttacctg gacggcacct tctacctaa ccacacttc	21240
aagaaggctt cggcacctt cgactccctg gtcaactggc cggcaacga ccgtctgttc	21300
accccaacg agttcgagat caagcgctcg gtgcacgggg agggctacaa cgtggccag	21360
tgcaacatga ccaaggactg gttctggc cagatgtgg ccaactacaa catggctac	21420
caggcttct acatcccaga gagctacaag gacaggatgt actccttctt caggaacttc	21480
cagcccatga gcccggcagg ggtggaccag accaagtaca aggactacca ggaggtggc	21540
atcatccacc agcacaacaa ctgggcttc gtggctacc tcgccccac catgcgcgag	21600
ggacaggcct accccgccaa cttccctat ccgctcatag gcaagaccgc ggtcgacagc	21660
atcacccaga aaaagttctt ctgcgaccgc accctctggc gcatccctt ctccagcaac	21720
ttcatgtcca tgggtgcgt ctggacactg ggccagaact tgctctacgc caactccgc	21780
cacccctcg acatgacccctt cgaggtcgac cccatggacg agccacccct tcttatgtt	21840
ctgttcgaag tctttgacgt ggtccgggtc caccagccgc accgcggcgt catcgagacc	21900
gtgtacctgc gtaccccctt ctggccggc aacgcccacca cttaaagaag caagccgcag	21960
tcatgcgcgc ctgcattgcgc tcgggttcca ccgagcaaga gctcagggcc atcgtagag	22020

acctggatg cggccctat ttttggca cttcgacaa gcgttcct ggcttgct	22080
ccccacaca gctggctgc gccatcgta acacggccg ccgcagacc gggggcgtgc	22140
actggctgg ctgcctgg aaccgcgt caaaacatg ttcccttt gacccttcg	22200
cttticga ccagcgctc aagcaaact acgagtctga gtacgaggc ttgcgtgc	22260
gcagcgccat cgccctctg cccgaccgt gcgtaccct cgaaaagtcc acccagaccg	22320
tgcagggcc cgactcgcc gcctgcggc tcttcgtc catgttctg caccccttg	22380
tgcactggcc tcagagtccc atggaccgca accccaccat gaacttgctg acgggggtgc	22440
ccaactccat gctccagagc ccccaggctg agcccaccct gcgcgcac caggagcagc	22500
tctacagctt ccggagcgc cactgcctt acttccgcg ccacagcgca cagatcgaga	22560
gggcacaccc ctctgccac ttgcaagaga tgcaagaagg gtaataacga tgtacacact	22620
tttttctca ataatggca tcttttatt tatacaagct ctctgggta ttcatattcc	22680
accaccaccc gccgttgtcg ccatctggct ctattnaa atcgaaaggg ttctgcggg	22740
agtgcgcgtg cgccacgggc agggacacgt tgcgatactg gtagcgggtg ccccaactga	22800
actcgggcac caccaggcga ggcagctcg ggaagtttc gctccacagg ctgcgggtca	22860
gcaccagcgc gttcatcagg tcgggcgcg agatcttga gtcgcagttt gggccgcgc	22920
cctgcgcgcg cgagttgcgg tacaccgggt tgcaactg gaacaccaac agcgcgggt	22980
gcttcacgct ggcacgcacg ctgcgtcg agatcagctc ggcgtccagg tcctccgcgt	23040
tgctcagcgc gaacggggtc atttggca ctggccccc caggaaggc gcgtgccccg	23100
gttcgagtt gcagtcgcag cgacgggaa tcagcaggc cccgtcccg gactcggcgt	23160
tgggtacag cgccgcgtat aaggcctgca tctggggaa ggccatctgg gccttggcgc	23220
cctccgagaa gaacatgcgc caggacttgc ccgagaactg gtttgcgggg cagtcggcgt	23280
cgtgcaggca gcagcgccgc tcgggttgg cgatctgcac cacgttgcgc ccccaccgt	23340
tcttcacgat ctggccttg gacgattgtc cttcagcgc ggcgtcccg ttctcgctgg	23400
tcacatccat ctgcgtacata tggccctgt tcaccatgtc gtcgcgtgc agacactca	23460
gctgcgcctc cgtctcggtg cagcggtgt gacacgcgc gcagccgtg ggctcgaaag	23520
actttaggt cacccgcgc aaggactgca ggtacccctg caaaaagcgg cccatcatgg	23580
tcacgaaggt ctgttgctg ctgaaggta gtcgcagccc ggggtgcgtc tcgttcagcc	23640
aggcttgca cacggccgcc aggcctcca cctggcggtt cagcatctt aagttcacct	23700
tcagtcatt ctccacgtgg tacttgtcca tcagcgtgcg cgccgcctcc atgccttct	23760
cccaaggccga caccagcgcc aggctcacgg ggttcttac catcaccgtg gcccgcct	23820
ccgcccgcgtt tcgcgttcc gccccgtgt tcttccttc ttctcctct tcctgcgc	23880

cgtttctg cagccactcg accacgggtt cgtttctg caggcgtgc accttcgct	23940
tgcgttgcc cccctgttg atgcgcacgg gcgggttgt gaagccacc atcaccagcg	24000
cggcttc ttgtcgatcc tcgtgtcca gaatgaccc tcggggagggg gggttgtca	24060
tcctcgtac cgaggcacgc ttcttttct tccggggc gttcgccagc tccgcggct	24120
cggccgtgc cgaggctgaa ggccgagggc tggcgctgca cggcaccagc gcgtcctgca	24180
agccgtctc gtcctctcg gactcgagac ggaggcggc cgcgttctc gggggcgcgc	24240
ggggcggcgg aggccggcgc ggacggcggag acggggacga gacatcgatcc agggtgtggtg	24300
gacggcggcgc cgcgtcgatcc gggttgtctc gcgttgtcc tcttccgac	24360
tggccatctc ccactgctcc ttctccata ggcagaaaga gatcatggag tctctatgc	24420
gagtcgagaa ggaggaggac agcctaaccg ccccctctga gccctccacc accggcccca	24480
ccaccgccaa tgccggcgcg gacgacgcgc ccaccgagac cacggcagt accaccctcc	24540
ccagcgtgc acccccgctc gagaatgaag tgctgtatcgac gcaggaccccg gttttgtga	24600
gcggagagga ggttggatgtt gatgagaagg agaaggagga ggtcgccgc tcagtgc当地	24660
aaggatcaa aaagcaagac caggacgtac cagataagga tgagacagca gtcggcggg	24720
ggaacgaaag ccatgtatgtt gatgacggctt accttagacgtt gggagacgcgt gtgtgttta	24780
agcacctgca ccggcgtgc gtcgtatgtt gcgtatgtt gcgtatgtt gcgtatgtt	24840
ccctggacgtt ggcggaggtc agccgcgcctt acgagcggca cctttcgcc cgcacgtgc	24900
cccccaagcgc cccggagaac ggcacctgca agcccaaccc gctctcaac ttctaccgg	24960
tcttcgttgtt acccgaggtt ctggccacctt accacatctt ttccaaaac tgcaagatcc	25020
ccctctctcg ccgcgc当地 accgcacccgcg ccgc当地aaac cctgaccctg cggcaggcgc	25080
cccacatacc tggatatcgcc tctctggagg aagtgc当地aa gatcttcgat ggtctcggtc	25140
gcgtacgagaa acggccggcgc aacgctctgc acggagacag cggaaacgc当地 agtactcggt	25200
gggtgttgtt ggagctcgat ggcacaacgc cgcgttgcgc cgtactcaag cgc当地atag	25260
aggtcacccca cttgcctac ccggcgtca acctgc当地cc caaggtcatg agtgttgtca	25320
tggcgagctt catcatgcgc cgc当地ccgc ccctggccgc ggttgc当地aa ttgc当地aggt	25380
ccttcgtggg aggccgtcccc gcgggtcagcg acgagcagctt ggccgtctgg ctggagaccc	25440
gcgc当地ccgc gcagctggag gaggccgc当地 agtctatgtt ggccgtctgg ctggtaccgc	25500
tggagctcgat tggatctcgat cggacccgc当地 gatgc当地gc当地 aagctcgagg	25560
agaccctgca ctacacccctt cgc当地ccgc当地 acgtgc当地cc ggc当地ccaaatg atctccaaacg	25620
tggagctctg caacctggtc tccctacctgg gcatctcgat cggaaaccgc ctcggccaga	25680
acgttc当地gc当地 ctccaccctt aaaggggagg cgc当地ccgc当地 ctacatccgc gactgc当地ct	25740

acctttcct ctgtacacc tggcagacgg ccatgggggt ctggcagcag tgcctggagg	25800
agcgcaacct caaggagctg gaaaagctcc tcaagcgac cctcaggac ctctggacgg	25860
gcttcaacga gcgcctggc gcccgcgc tggcggacat catcttccc gagcgcctgc	25920
tcaagacccct gcagcaggc ctgcccact tcaccagcca gagcatgctg cagaacttca	25980
ggactttcat cctggagcgc tcgggcattcc tgccggccac ttgctgcgcg ctgcccacgc	26040
acttcgtgcc catcaagtac agggagtgcc cgccgcgcct ctggggccac tgctacctct	26100
tccagctggc caactacccctc gcctaccactt cggacccat ggaagacgtg agcggcgagg	26160
gcctgctcga gtgccactgc cgctgcaacc tctgcacgcc ccaccgcctct ctatctgca	26220
acccgcagct gtcagcgag agtcagatta tcggtaacctt cgagctgcag ggtccctcgc	26280
ctgacgagaa gtccgcggct ccaggcgtga aactcactcc gggctgtgg acttccgcct	26340
acctacgcaa atttgtaccc gaggactacc acgcccacga gatcaggttc tacgaagacc	26400
aatcccgccc gcccaaggcg gagctcaccc cctgcgtcat cacccagggg cacatcctgg	26460
gccaatttgcg accatcaac aaagccgcg gagagttttt gctaaaaaag ggtcggggg	26520
tgtacctgga cccccagtcg ggcgaggaggc taaaccgcgt accccgcgcg ccgcggcagc	26580
agcgggaccc tgcctcccgatggcaccc agaaagaagc agcagccgcg gcccgcgcg	26640
cagccataca tgcttctgga ggaagaggag gaggactggg acatcaggc agaggaggtt	26700
tcggacgagg agcaggagga gatgatggaa gactggagg aggacacgcg cctagacgag	26760
gaagcttcag agccgaaga ggtggcagac gcaacaccat cgcctcggt cgcagcccc	26820
tgcggggc ccctgaaatc ctccgaaccc agcaccagcg ctataaccc cgcctcccg	26880
gcccggcgc caccggcccg cagacccaaac cgttagatggg acaccacagg aaccgggtc	26940
ggttaagtcca agtgccgcg cccgcaccc cagcagcagc agcagcagcg ccaggctac	27000
cgctcggtgc gccccacaa gaacgcccata gtgcctgct tgcaagactg cggggcaac	27060
atcttttcg cccgcgcctt cctgtattt caccacgggg tcgccttcc cgcataatgtc	27120
ctgcattact acgtcatctt ctacagcccc tactgcagcg ggcgcacaga ggcgcgcagcg	27180
gcagccacag cggcgcaccac cacctaggaa gatatccctc gcccccaaga cagcggcagc	27240
agcggccagg agacccgcgg cagcagcggc gggagcggtg ggcgcactgc gcctctcgcc	27300
caacgaaccc ctctcgaccc gggagctcag acacaggatc ttccccactt tgtatgcct	27360
cttccaaacag agcagaggcc aggaggcagga gctgaaaaata aaaaacagat ctctgcgc	27420
cctcaccgcg agctgtctgt atcacaaaag cgaagatcag ctgcggcga cgctggagga	27480

cgcggaggca ctttcagca aatactgcgc gtcactttt aaagacttagc tccgcgcct	27540
tctcgattt aggccccgaa aaactacgtc atcgccggcc gcccggcagc cggcccgacc	27600
gagatgagca aagagattcc cacgccatac atgtggagct accagccgca gatggactc	27660
gcggcgggag cgccccagga ctactccacc cgcatgaact acatgagcgc gggacccac	27720
atgatctcac aggtcaacgg gatccgcgc cagcgaaacc aaatactgct ggaacaggcg	27780
gccatcaccg ccacgccccg ccataatctc aaccccgaa attggccgc cgcctcgta	27840
taccaggaaa cccctccgc caccaccgta ctactccgc gtgacgccc ggcgaagtc	27900
cagatgacta actcaggggc gcagctcgcg ggccgtttc gtacggggc gcggccgctc	27960
cgaccaggta taagacacct gatgatcaga ggccgaggta tccagctcaa cgacgagtgc	28020
gtgagcttt cgctcggtct ccgtccggac ggaactttcc agctcgccgg atccggccgc	28080
tcttcgttca cgcggccca ggcgtacctg actctgcaga cctcgcttc ggagccccgc	28140
tccggccggca tcggaaccct ccagttcgtg gaggagttcg tgccctcggt ctacttcaac	28200
cccttctcggt gacctcccg acgctacccc gaccagttca ttccgaactt tgacgcccgt	28260
aaggactcgg cgacggcta cgactgaatg tcaggtgtcg aggcagagca gttcgcttg	28320
agacacccctcg agcactgccc ccggccacaag tgcttcgccc gcggttctgg tgagttctgc	28380
tactttcagc tacccgagga gcataccgag gggccggcgc acggcgatcc cctgaccacc	28440
cagggcgagg ttacctgttc cctcatccgg gagtttaccc tccgtccct gctagtgagg	28500
cgggagcggg gtccctgtgt cctaactatc gcctgcaact gccctaacc tggattacat	28560
caagatcttt gctgtcatct ctgtgcttag ttataataac gctgagatca gaatctactg	28620
gggctcctgt cccatcctg tgaacgccac cgtcttccacc caccggacc aggccccaggc	28680
gaacccctacc tgcggctctgc atcgaggggc caagaagtac ctcacccgtt acttcaacgg	28740
caccccttt gtggtttaca acagcttcga cggggacggc gtctccctga aagaccagct	28800
ctccggcttc agctactcca tccacaagaa caccaccctc caactttcc ctccctacc	28860
gccggaaacc tacgagtgcg tcacccggcgt ctgcacccac ctcacccggc tgatcgtaaa	28920
ccagagcttt ccgggaaacag ataactccct ttcccccaga acaggaggtg agctcaggaa	28980
actccccggg gaccaggcgc gagacgtacc ttgcaccctt gtgggttag gatTTTTAT	29040
tacccgggtt ctggctttt taatcaaagt ttccctgaga ttgtttttt ctttctacgt	29100
gtatgaacac ctcacccctcc aataactcta cccttcttc ggaatcaggta gacttctcg	29160
aaatcgggct tgggtgtctg cttactctgt tgatTTTTT ctttatcata ctcagccttc	29220
tgtgcctcag gtcggccgc tgcgtgcac acatctatat ctactgctgg ttgcgtcaagt	29280
gcaggggtcg ccaccaaga tgaacaggta catggctcta tcgatcctag gcctgctggc	29340

cctggcgccc	tgcagcgcg	ccaaaaaga	gattacctt	gaggagcccg	cttgcaatgt	29400
aactttcaag	cccgagggtg	accaatgcac	caccctcgtc	aatgcgtta	ccaaatcatga	29460
gaggctgcgc	atcgactaca	aaaacaaaac	tggccagttt	gcggctata	gtgtgtttac	29520
gcccgagac	ccctctaact	actctgtcac	cgtcttccag	ggcggacagt	ctaaagatatt	29580

caattacact ttccctttt atgagttatg ccatgcggc atgtacatgt caaaacagta	29640
caacctgtgg cctcccttc cccaggcggtg tgtggaaaat actgggtctt actgctgtat	29700
ggcttcgcata tcactaacgc tcgctcta atgcacggtg ctatacataa aattcaggca	29760
gaggcgaatc tttatcgatg aaaagaaaat gccttgatcg ctaacaccgg ctttctatct	29820
gcagaatgaa tgcaatcacc tcctactaa tcaccaccac cctcttgcg attgccatg	29880
ggttgacacg aatcgaagt ccagtgggt ccaatgtcac catggtggc cccggccgca	29940
atccaccct catgtggaa aaattgtcc gcaatcaatg ggttcatttc tgctctaacc	30000

gaatcgttat caagcccaaga gcccacgtcg atgggcaaaa tctaactctg atcaatgtgc	30060
aaatgatgga tgctgggtac tattacgggc agcggggaga aatcattaat tactggcgac	30120
ccccacaagga ctacatgtcg catgttagtcg aggcaacttcc cactaccacc cccactacca	30180
cctctcccac caccaccacc actactacta ctactactac tactactact actaccacta	30240
ccgctgcccc ccatacccgcaaaaaggcacca tgattagcac aaaggccccct cgtgctcact	30300
ccccacgccccgg cgggccccatc ggtgcgacct cagaaaccac cgagcttgc ttctgccaat	30360
gcacttaacgc cagcgctcat gaactgttcg acctggagaa tgaggatgtc cagcagagct	30420

ctccacggcc gatacccgat ggtcgtagg tggctcagg agctacttaa ctatctgaa	30900
tagctccact tccccggca tatccccaac caagtagccaa tgcaatgcc a gcctgttac	30960
cctcatcaac gttccaccc tggacaatgg actctatgt a ggctatgtac ccttggtgg	31020
gcaaggaaag acccacgctt acaacctgga agttcgccag cccagaacca ctacccaagc	31080
ttctccccacc accaccacca ccaccacca t caccagcagc agcagcagca gcagccacag	31140
cagcagcagc agattattga ct tttttt ggc cagctca tctggccgcta cccaggccat	31200

ctacagctct gtgccgaaa ccactcagat ccaccgccc gaaacgacca cggccaccac	31260
cctacacacc tccagcgatc agatgccgac caacatcacc cccttggctc ttcaaattgg	31320
acttacaagg cccactccaa aaccagtggta tgccggccgag gtctccgccc tcgtcaatga	31380
ctggcgcccc ctgggaatgt ggtggtcgc cataggcatg atggcgctct gcctgcttct	31440
gctctggctc atctgctgcc tccaccgcag gcgagccaga ccccccattt atagacccat	31500
cattgtcctg aaccccgata atgatggat ccatagatg gatggcctga aaaacctact	31560
tttttctttt acagtagatgaa atttgagac atgcctcgca tttcttgta cattttcctt	31620
ctcccacctt ttctgggtgt ttctacgctg gccgctgtgt ctacacgtt ggttagactgc	31680
ctctcacccct tcactgtcta cctgctttac ggattggtca ccctcactct catctgcagc	31740
ctaattcacag taatcatcgcc cttcatcccg tgcattgatt acatctgtgt ggcctcgca	31800
tacttcagac accacccgca gtaccgagac aggaacatgtt cccaacttct aagactgctc	31860
taatcatgca taagactgtg atctgccttc tgatcccttg catcctgccc accctcacct	31920
cctgccagta caccacaaaa tctccgcga aaagacatgc ctctggcgc ttcacccaac	31980
tgtgaaatat acccaaattgc tacaacgaaa agagcgagct ctccgaagct tggctgtatg	32040
gggtcatctg tgtcttagtt ttctgcagca ctgtcttgc cctcataatc taccctact	32100
ttgatttggg atgaaacgca atcgatgcca tgaattaccc caccttccc gcacccgaga	32160
taattccact gcgacaagtt gtacccgttg tcgttaatca acgccccca tcccttacgc	32220
ccactgaaat cagctacttt aacctaaccat gcggagatga ctgacccctt agatctagaa	32280
atggacggca tcagtaccga gcagcgctc ctagagaggc gcaggcaggc ggctgagcaa	32340
gagccctca atcaggagct ccgagatctc gttaacctgc accagtgc aaaggcatc	32400
ttttgtctgg taaaggcaggc caaagtacc tacgagaaga ccggcaacag ccacccctc	32460
agttacaaat tggccaccca gcccagaag ctggtgctca tggtggtga gaatccatc	32520
accgtcaccc agcactcggt agagaccgag gggtgtctgc actccccctg tcgggtcca	32580
gaagacccctt gcacccctggtaa agaccctg tgccgtctca gagatttagt cccctttaac	32640
taatcaaaca ctggaatcaa taaaagaat cacttactta aaatcagaca gcaggctct	32700
gtccagtttta ttccggcagca ctccttccc ctccctccaa ctctggactt ccaaacgcct	32760
tctggccggca aacttcctcc acaccctgaa ggaaatgtca gattctgtct cctgtccctc	32820
cgcacccact atcttcatgt tggcagat gaagcgacca aaaacgtctg acgagagctt	32880
caacccctgt taccctatg acacggaaag cggccctccc tccgtccctt tcctcacccc	32940

tcccttcgtg tctcccgatg gattccaaga aagtcccccc ggggtcctgt ctctgaacct	33000
ggcccgagccc ctggtcaactt cccacggcat gctcgcctg aaaatggaa gtggcctctc	33060
cctggacgac gctggcaacc tcacctctca agatatcacc accgctagcc ctccctcaa	33120
aaaaaccaag accaacctca gcctagaaac ctcatcccc ctaactgtga gcacctcagg	33180
cgcctcacc gtagcagccg ccgctcccgt ggccgtggcc ggcacctccc tcaccatgca	33240
atcagaggcc cccctgacag tacaggatgc aaaactcacc ctggccacca aaggccccct	33300
gaccgtgtct gaaggcaaac tggccttgca aacatcgccc ccgctgacgg ccgctgacag	33360
cagcacccctc acagtcagtgc cacaccacc ccttagcaca agcaatggca gcttggtat	33420
tgacatgaa gccccattt acaccacca tggaaaacta ggacttaact ttggcgctcc	33480
cctgcatgtg gtagacagcc taaatgcact gactgttagtt actggccaag gtcttacgat	33540
aaacggaaaca gccttacaaa ctagagtctc aggtgcctc aactatgaca catcaggaaa	33600
cctagaattt agagctgcag ggggtatgctg agttgatgca aatggtaaac ttatccttga	33660
tgttagttac ccatttgatg cacaaaacaa tctcagcctt aggcttggac agggaccct	33720
gtttgttaac tctgcccaca acttggatgt taactacaac agaggcctct actgttac	33780
atctggaaat accaaaaagc tagaagttaa tatcaaaaca gccaagggtc tcatttatga	33840
tgacactgct atagcaatca atgcgggtga tgggtacag tttgactcag gctcagatac	33900
aaatccatta aaaactaaac ttggattagg actggattat gactccagca gagccataat	33960
tgctaaactg ggaactggcc taagcttga caacacaggt gccatcacag taggaacaa	34020
aatgatgac aagcttacct tgtggaccac accagaccca tcccctaact gtagaatcta	34080
ttcagagaaa gatgttaat tcacacttgt tttgactaaa tgccgcagtc aggtgttggc	34140
cagcgttct gtttatctg taaaaggtag cttgcgcacc atcgtggca cagtaactag	34200
tgctcagatt gtcctcagat ttgatgaaaa tggagttcta ctaagcaatt ctcccttga	34260
ccctcaatac tggaaactaca gaaaagggtga ctttacagag ggcactgcat ataccaacgc	34320
agtgggattt atgccaacc tcacagcata cccaaaaaca cagagccaa ctgctaaaag	34380
caacattgtt agtcagggtt acttgaatgg ggacaaatcc aaacccatga ccctcaccat	34440
taccctcaat ggaactaatg aaacaggaga tgccacagta agcacttact ccatgtcatt	34500
ctcatggaac tggaaatggaa gtaattacat taatgaaacg ttccaaacca actccctcac	34560
cttccctac atgcggcaag aataaaaagc atgacgctgt tgatttgatt caatgtttt	34620
ctgttttatt ttcaagcaca aaaaaatcat tcaagtctt cttccatctt agcttaatag	34680
acacagtagc ttaatagacc cagtagtgca aagccccatt cttagttata gatcagacag	34740
tgataattaa ccaccaccac caccataacct tttgattcag gaaatcatga tcatcacagg	34800

atcctagtct tcaggccgcc ccctccctcc caagacacag aatacacagt cctctcccc	34860
cgactggctt taaaataaacac catctggtt gtcacagaca tggctttagg ggttatattc	34920
cacacggctt cctgcccgc caggcgctcg tcggtgatgt tgataaactc tccggcagc	34980
tcgctcaagt tcacgtcgct gtccagcggc tgaacctccg gctgacgcga taactgtcg	35040
accggctgct ggacgaacgg aggccgcgcc tacaaggggg tagagtctata atcctcggtc	35100
aggatagggc ggtgtatgcag cagcagcggc cgaaacatct gctgccgcg ccgcgtccgc	35160
cggcaggaaa acaacacgcg ggtggctcc tccgcgataa tccgcaccgc ccgcagcatc	35220
agcttcctcg ttctccgcgc gcagcacctc acccttatct cgctcaaatac ggcgcagtag	35280
gtacagcaca gcaccacgt gttattcatg atccccacgt gcagggcgct gtatccaaag	35340
ctcatgccgg gaaccaccgc ccccacgtgg ccatgttacc acaagcgcac gtaaatcaag	35400
tgtcgacccc tcatgaacgc gctggacaca aacattactt cttggcat gttgttaattc	35460
accacccccc ggtaccagat aaacctctgg ttgaacaggg cacctccac caccatctgg	35520
aaccaagagg ccagaacctg cccaccggct atgcactgca gggAACCCGG gttggaaaca	35580
tgacaatgca gactccaagg ctgcgttaccg tggatcatcc gggtgtctaa ggcattcgat	35640
ttggcacaac acagacacac gtgcattgcac tttctcatga ttagcagctc ttccctcg	35700
aggatcatat cccaaggaaat aacccattct tgaatcaacg taaaacccac acagcaggaa	35760
aggcctcgca cataactcac gttgtcatg gtcagcgtgt tgcattccgg aaacagcgg	35820
tgtatccatcc gatcgaggc gcggtctcc ttctcacagg gaggtaaagg gtcctcgct	35880
tacggactgc gccgggacga ccgagatcgt gttgagcgta gtgtcatgga aaaggaaacg	35940
ccggacgtgg tcatacttct tgaaggcagaa ccaggttcgc gcgtggcagg cctccctcg	36000
tctgcgtct cggcgtagt ctgcgtccgt gtgtatgtt tagtacagcc actcccgag	36060
agcgtcgagg cgcaccctgg cttccggatc tatgttagact ccgtcttgca ccgcggcc	36120
gataatatcc accaccgttag aataagcaac acccagccaa gcaatacact cgctctgcg	36180
gcggcagaca ggaggagcgg gcagagatgg gagaaccatg ataaaaaaact ttttttaaag	36240
aatatttcc aattttcgaa agtaagatc tatcaagttt cagcgctccc ctccactggc	36300
gcggtcaaac tctacggcca aagcacagac aacggcattt ctaagatgtt ctttaatggc	36360
gtccaaaaga cacaccgctc tcaagtttgc gtaaaactatg aatgaaaacc catccggct	36420
atttccaat atagacgcgc cggcagcgtc caccaaaaccc agataatttt cttctctcc	36480
gcggtttacg atctgtctaa gcaaatccct tataatcaagt ccgaccatgc caaaaatctg	36540
ctcaagagcg ccctccaccc tcatgttacaa gcagcgcac atgattgcaaa aattttagt	36600
tcttcagaga cctgtataag attcaaaaatg ggaacattaa caaaaattcc tctgtcg	36660

agatcccttc gcagggcaag ctgaacataa tcagacaggt ccgaacggac cagtgaggcc 36720

aaatccccac caggaaccag atccagagac cctatactga ttatgacgca cataactcggg	36780
gctatgctga ccagcgtagc gccgatgtag gcgtgctgca tggcgccgca gataaaatgc	36840
aaagtgctgg ttaaaaaatc aggcaaagcc tcgcgcaaaa aagctaacac atcataatca	36900
tgcctcatgca ggtagttgca ggtaagctca ggaacccaaaa cggaaataaca cacgatttc	36960
ctctcaaaca tgacttcgca gatactgcgt aaaacaaaaa attataaata aaaaattaat	37020
taaaataactt aaacattgga agcctgtctc acaacaggaa aaaccacttt aatcaacata	37080
agacggggcca cgggcgtgcc ggcatacgcc taaaaaaaaatt ggtccccgtg attaacaagt	37140

accacagaca gctccccgt catgtcgaaa gtcataatgt gagacttgtt atacacgttt	37200
ggatttgtaaa catcagacaa acaaagaat cggccacgt agcccgagg tataatcacc	37260
cgcaggcgga ggtacagcaa aacgacccccc ataggaggaa tcacaaaatt agtaggagaa	37320
aaaaatacat aaacaccaga aaaacctgt tgctgaggca aaatagcgcc ctcccgatcc	37380
aaaacaacat aaagcgcttc cacaggagca gccataacaa agacccgagt cttaccagta	37440
aaagaaaaaaaaa gatctctcaa cgccggccca gcaccaacac ttgcgttgtt aaaaggccaa	37500
gtgcgcgatggatggatata ggaataaaaaa gtgacgtaaa cggggcaaaatgtt ccaaaaaacgtt	37560

cccgaaaaaa ccgcacgcca acctaacgccc cgaaacgaaa gccaaaaaac actagacact	37620
cccttccggc gtcaacttcc gctttccac gctacgtcac ttccccggt caaacaact	37680
acatatcccg aacttccaag tcgccacgcc caaaaacaccg cctacacacctc cccgcccccc	37740
ggcccccccc cggaacccgcc tccccccccg cgccgccccat ctcattatca tattggcttc	37800
aatccaaaaat aaggttatatt attgtatgt	37830

<210> 2

<211> 36571

<212> DNA

<213> Chimpanzee adenovirus

<400> 2

catcatcaat aatacacctc aaactttgg tgcgcgtaa tatgcaaatg agctgttga 60

atttggggat gcggggcgct gattggctgc gggagcggcg accgttaggg gcggggcgaa	120
tgcacgtttg atgacgtggc cgtgaggcgg agccggtttgc caagttctcg tggaaaagt	180
gacgtcaaaccgagggtggtttgaacacgg aaatactcaa ttcccgcg ctctctgaca	240
ggaaatgagggtgtttctggcgatgcaagtggaaacggccatttcgcgaaaactg	300
aatgagaaatgaaaatctgtgttatggcaggaggatattgcggag	360

ggccgagtag acttgaccg attacgtgg ggttcgatt accgtatTT tcacctaAT	420
ttcccgtaC ggtgtcaaAG tccgggttt ttacgtaggc gtcaGCTGAT cgccaggta	480
ttaaacctg cgctactag tcaagaggCC actcttgagt gccagcgagt agagTTTCT	540
cctccgcGCC gcgaGTCaga tctacactt gaaAGatgag GCACTTGAGA gacCTGCCG	600
gtaatgttt cctggctact ggaaacgaga ttctggatt ggtggTggac gccatgatgg	660
gtgacgacCC tcccgaGCC CCTACCCat ttgaggcGCC ttcgctgtac gatttgtatg	720
atctggaggt ggatgtGCC gagaacgacc ccaacgagGA ggcggtaat gattgttA	780
gcgaTgCCGC gctgctggct gccgagcagg ctaatacgGA ctTggctca gacagcatt	840
cttctctcca tacCCCGAGA CCCGGAGAG gtgagaaaaa gatccccgag cttaagggg	900
aagagctcga cctgcgctgc tatgagGAAT gcttgcctCC gagcgtatgat gaggaggacG	960
aggaggcGat tcgagctgca gCGAACCCAGG gagtgaaAGC tgccggcgAA agctttAGCC	1020
tggactgtcc tactctgccc ggacacggct gtaagtcttG tgaatttcat cgcatgata	1080
ctggagataa gaatgtgatG tgtgccctgt gctatatgag agcttacaac cattgttt	1140
acagtaagtG tgatTAactt tagtggaa ggcagaggGT gactgggtgc tgactggtt	1200
atTTatgtat atgtttta tgtgtaggTC ccgtctctGA cgcaGatgag acccccactt	1260
cagagtGcat ttcatcacCC ccagaaattG gCGAGGAACC gcccgaAGat attattcata	1320
gaccagtGtc agtgagAGtc accgggcGGA gagcagctgt ggagagttG gatgacttG	1380
tacagggTgg ggatgaacct ttggacttGt gtacccggaa acgcccagg cactaagtGc	1440
cacacatgtG tgTTactta aggtgatGtc agtattata gggTgtggag tgcaataaaa	1500
tccgtGttGA cttaagtGc gtggTTatG actcaggGGt gggactgtG ggtatataAG	1560
caggGtcaga cctgtgtggT cagttcagAG caggactcat ggagatctgg acggcttgg	1620
aagactttca ccagactaga cagctgctAG agaactcatc ggagggagtc tcttacctgt	1680
ggagattctG cticggTggG cctctagctA agctagtctA tagggcaAG caggattata	1740
aggatcaatt tgaggatatt ttgagagAGt gtcctggat tttgactct ctcaacttgg	1800
gccccatcAGtc tcaCTtaAC cagagtattc tgagagccct tgactttcc actcctggca	1860
gaactaccgc cgggtAGcc ttTTTgcct ttatcTTGA caaatggagt caagaaACCC	1920
atttcagcAG ggattaccgt ctggactgtc tagcagttagc ttgtggaga acatggaggt	1980
gccagcgcct gaatgcaatc tccggctact tgccagtaca gcccgtAGAC acgctgagGA	2040
tcctgagtct ccagtacCC caggaacacc aacGCCGCCA gcagccgcAG caggagcAG	2100

agcaagagga ggaccgagaa gagaacccga gagccggtct ggaccctccg gtggcggagg	2160
aggaggagta gctgacttgt ttcccagact gcgcgggtg ctgacttagt cttccagtgg	2220
acgggagagg gggattaagc gggagaggca tgaggagact agtcacagaa ctgaactgac	2280
tgtcagtctg atgagccgca ggcgccaga atcggtgtgg tggcatgagg tgcagtcgca	2340
ggggatagat gaggctcgg tcatgcatga gaaaattcc ctagaacaag tcaagacttg	2400
ttggttggag cctgaggatg attgggaggt agccatcagg aattatgcc a gctagctct	2460
gaagccagac aagaagtaca agattacca actgattaat atcagaattt cctgtacat	2520
ttcagggaat gggccgagg tggagatcag tacccaggag agggtggcct tcagatgctg	2580
catgatgaat atgtacccgg gggtggtggg catggaggga gtcacctta tgaacgcgag	2640
ttcaggggc gatgggtata atgggggtt ctatggcc aacccaagc tgacagtca	2700
cggatgctcc ttcttgct tcaataacat gtgcacgag gcctggggca gtgttgcgt	2760
gagggatgc agttttcag ccaactggat gggggtcgtg ggcagaacca agagcaaggt	2820
gtcagtgaag aaatgcctgt tcgagaggat ccacctgggg gtatgagcg agggcgaagc	2880
caaagtcaaa cactgcgcct ctactgagac gggctgctt gtgtatca agggcaatgc	2940
ccaagtcaag cataacatga tctgtggggc ctcggatgag cgccgcgtacc agatgctgac	3000
ctgcgcgggt gggAACAGCC atatgctggc caccgtcat gtgacctcgc acccccgcac	3060
gacatggccc gagttcgagc acaacgtcat gacccgtcgc aatgtgcacc tgggtcccg	3120
ccgaggcatg ttcatgcctt accagtgcac catgcaattt gtgaagggtgc tgctggagcc	3180
cgtgcacatg tccagagtga gcctgacggg ggtgttgc acatgtgtgg agatgtggaa	3240
aattctgaga tatgtatgaat ccaagaccag gtgcggggcc tgcgaatgcg gaggcaagca	3300
cgccaggcctt cagccgtgt gtgtggaggt gacggaggac ctgcgaccccg atcatttgg	3360
gttgtcctgc aacgggacgg agttcggtc cagcggggaa gaatctgact agagtggata	3420
gtgtttgggg gaggtggagg gcctggatga gggcagaat gactaaaatc tgtgttttc	3480
tgcgcagcag catgagcgga agcgccctct ttgaggagg ggtattcage ctttatctga	3540
cggggcgtct cccctctgg gcgggagtgc gtcagaatgt gatggatcc acggtgacg	3600
gccggccccgt gcagccccgcg aactttcaa ccctgaccta cgccacccgt agctcctcg	3660
ccgtggacgc agctgcccgc gcagctgctg cttccgcccgc cagcgccgtg cgcggaaatgg	3720
ccctggggcgc cgctactac agctctctgg tggcaactc gagttccacc aataatcccg	3780
ccagcctgaa cgaggagaag ctgctgctgc tgatggccca gctcgaggcc ctgacccagc	3840

gcctggcga gctgacccag cagggtgctc agctgcaggc ggagacgcgg gccgcgttg	3900
ccacggtaa aaccaaataa aaaatgaatc aataaataaa cggagacggt tggtgattt	3960
aacacagagt ctgtaatctt tatttgcatt ttgcgcgcg gtaggcctg gaccaccgt	4020
ctcgatcatt gagcacccgg tggatcttt ccaggacccg gttagggatgg cttggatgt	4080
tgaggtacat gggcatgagc ccgtcccggg ggtggaggtt gtcattgc agggcctgt	4140
gctcgaaaaat ggtgttgtaa atcaccatgt catagcaggc ggcaggcggc tggtgctgca	4200
cgtatgcctt gaggaggaga ctgtatggcca cggcagcccc cttggatgt tagtgcacga	4260
acctgttgag ctggaggaga tgcattgcggg gggagatgag atgcatttg gcctggatct	4320
ttagatggc gaatgtcccg cccagatccc gccgggggtt caatgtgtgc aggaccacca	4380
gcacgggtgtatccgggtcac ttgggaatt tgcattgcattt ctggaaaggaa aaggcgtgaa	4440
agaatttgga gacgccttg tggccgccta ggtttccat gcactcatcc atgatgtgg	4500
cgtatggcccc gtggcggcgc gcctggcaaa agacgtttcg ggggtcgac acatcgatgt	4560
tgtgtcctg ggtgagctcg tcataaggcca tttaatgaa ttggggcgg agggtgcccg	4620
actggggac gaagggtgccc tcgatcccg gggcgtatgtt gcctcgacatctgcatt	4680
cccgaggcatt gagctcgag gggggatca tgtccacctg cggggcgatg aaaaaaacgg	4740
tttcggggc gggggagatg agctgcgcg aaagcagggtt cggagcagc tggacttgc	4800
cgccgggtt gggccgtatg atgaccccgatgc tggccgtcg caggtggtag ttgagggaga	4860
gacagctgcc gtcctcgcc aggaggggg ccacctcgatcatctcg cgacatgcata	4920
tgttctcgcc cacgagttcc gccaggaggc gctgcgcgc cagcgagagg agctttgcata	4980
gcgaggcgaa gttttcagcc ggcttgatgc cgtggccat gggatggtagt gagagggtct	5040
gttgcaagag ttccagacgg tccagatgtt cggatgttgc ctctaggca tctcgatcca	5100
gcagacacctc tcgttgcgc ggttggggcg actgcggag tagggcacca ggcgtatggc	5160
gtccagcgag gccagggtcc ggtccatcca ggtcgagg gtccgcgtca gcgtggctc	5220
cgtcacggta aaggggtgcg cggccggctg ggcgttgcg agggtgcgt tcaggctcat	5280
ccggctggtc gagaaccgct cccggctggc gcccgtgcg tggccaggt agcaattgag	5340
catgagttcg tagttgatgc cctcgccgc gtggcccttgc ggcggagct tacctttgaa	5400
agtgtgtccg cagacgggac agaggaggaa cttggggcg tagagcttgg gggcgaggaa	5460
gacggactcg gggcgtagg cgtccgcgc gcagctggcg cagacggct cgcactccac	5520
gagccaggtg aggtcgggc ggtcggggtc aaaaacgagg tttccctcgatgttgc	5580
cggtttctta cctctggctc ccatgagctc gtgtcccgcc tgggtgacaa agaggctgc	5640
cgtgtcccg tagaccgact ttatggccgc gtcctcgagc ggggtgcgc gtcctcgatgt	5700

gtagaggaac cccggccact ccgagaccaa ggcccgggc caggccagca cgaaggaggc	5760
cacgtggag gggtagcggt cggtgtccac cagcgggtcc accttctcca gggtatgcaa	5820
gcacatgtcc ccctcgcca catccaggaa ggtgattggc ttgttaagtgt aggccacgtg	5880
accgggggtc cccggccggg gggtaaaaaa gggggcggc ccctgctcg t ctcactgtc	5940
ttccggatcg ctgtccagga gcgccagtg ttggggtagg tattccctct cgaaggcggg	6000
catgacctcg gcactcaggt tgtcagttc tagaaacgag gaggatttga tattgacggt	6060
gccgttggag acgccttca tgagccctc gtccatctgg tcagaaaaga cgatctttt	6120
gttgtcgagc ttggtggcga aggagccgt a gggcgttg gagagcagct tggcgatgga	6180
gcgcataatgtc tggttctttt ctttgtcggc gcgccttgc gggcgatgt tgagctgcac	6240
gtactcgcgc gccacgcact tccattcggg gaagacggtg gtgagctcg t cggcacgat	6300
tctgaccgc cagccgcggt tgtgcagggt gatgagggtcc acgctggtg ccacctcgcc	6360
gcgcaggggc tcgttggtcc agcagaggcg cccgccttg cgcgagcaga agggggcag	6420
cgggtccagc atgagctcg t cgggggggtc ggcgtccacg gtgaagatgc cggcaggag	6480
ctcgggtcg aagttagctga tgcaggtgcc cagatcgcc agcgcgcctt gccagtgcgc	6540
cacggccagc gcgcgcgtg aggggctgag gggcgtgcc cagggcatgg ggtgcgtgag	6600
cgcggaggcg tacatgccgc agatgtcgta gacgttagagg ggctctcga ggacgcccgt	6660
gttagtgggg tagcagcgcc cccgcggat gctggcgcgc acgtagtcgt acagctcg	6720
cgagggcgcg aggagccccg tgccgagggtt ggagcgttgc ggctttcgg cgcgttagac	6780
gatctggcgg aagatggcgt gggagttgga ggagatggtg ggctctgga agatgtgaa	6840
gtggcgtgg ggcaggccga ccgagtccct gatgaagttgg gcgttaggat cctcagctt	6900
ggcgcacgagc tcggcgtga cgaggacgtc cagggcgcag tagtcgaggg tctttggat	6960
gatgtcgta tttagctggc cttctgtttt ccacagctcg cggttgagaa ggaacttttc	7020
gcggcccttc cagtactttt cgagggggaa cccgtcttgc tcggcacgtt aagagccac	7080
catgttagaac tggttgacgg cttgttaggc gcagcagccc ttctccacgg ggagggcgta	7140
agcttgcgcg gccttgcgc gggaggtgtg ggtgaggcgc aaggtgtcgc gcaccatgac	7200
ttttaggaac tggtgtttga agtcgagggtc gtgcgcgg ccctgctccc agagttggaa	7260
gtccgtgcgc ttctttagg cgggggttggg caaagcgaaa gtaacatcg tgaagaggat	7320
cttggccgcg cggggcatga agttgcgtgat gatgcggaaa ggctggggca cctcgcccg	7380
gttgttgcgtg acctggcgg cgaggacgt ctcgtcgaag ccgttgcgt tgcgtccgc	7440
gatgttaggt tccacgaatc gcgggcagcc cttgacgtgg ggcagcttgc tgagctcg	7500
gttaggtgagc tcggcgggtt cgctgagccc gtgctgcgt gggcccaagt cggcgcgtg	7560

ggggttggcg ctgaggaagg aagtccagag atccacggcc agggcggct gcaagcggc	7620
ccggtaactga cgaaactgct ggcccacggc catttttcg ggggtgacgc agtagaaggt	7680
gcgggggtcg ccgtgccagc ggtccactt gagttggagg gcgaggttgt gggcgagctc	7740
gacgagcggc gggccccgg agagttcat gaccagcatg aagggacga gctgttgcc	7800
gaaggacccc atccaggatgt aggttccac atcgtaggtg aggaagagcc tttcggtgct	7860
aggatgcgag ccgatgggaa agaactggat ctccctgccac cagttggagg aatggcttt	7920
gatgtatgg aagtagaaat gccgacggcg cgccgagcac tcgtgttgt gtttatacaa	7980
gcgtccgcag tgctcgcaac gctgcacggg atgcacgtgc tgacacgact gtacctgggt	8040
tccttgacg aggaattca gtgggcagtg gagcgcgtgc ggctgcacatct ggtgtgtac	8100
tacgtcctgg ccatcgccgt ggccatcgct tcgcctcgatg gtggcatgc tgacgagccc	8160
gcgcgggagg caggtccaga cctcggtcg gacgggtcg agagcgagga cgagggcg	8220
caggccggag ctgtccaggg tcctgagacg ctgcggagtc aggtcagtgg gcagcggcgg	8280
cgcgcgttg acttgcagga gctttccag ggccgcggg aggtccagat ggtacttgat	8340
ctccacggcg ccgttggtgg cgacgtccac ggcttgagg gtccctgtcc cctggggcgc	8400
caccaccgtg ccccgttct tcttggcgg cggcggctcc atgcttagaa gcccggcga	8460
ggacgcgcgc cggcggcag gggcggctcg gggccggag gcagggcgg cagggcacg	8520
tcggcgcgc gcgcggcag gttctggfac tcgcggcgaa gaagactggc gtgagcgcac	8580
acgcgcacgt tgacgtcctg gatctgacgc ctctgggtga aggccacggg acccgtagt	8640
ttgaacctga aagagagttc gacagaatca atttcggat ctttgacggc ggcctgcgc	8700
aggatctttt gcacgtcgcc cgagttgtcc tggtaggcga tctcggtcat gaactgtcg	8760
atctcctctt cctgaagggtc tccgcggccg gcgcgtcga cggtgccgc gaggtcggt	8820
gagatgcggc ccatgagctg cgagaaggcg ttcatgcgg cctcgatccca gacgcggctg	8880
tagaccacgg ctccgttggg gtcgcgcgc cgcatgacca cctggcggag gttaagctcg	8940
acgtggcgc tgaagaccgc gtagttgcag aggcgttgtt agaggttagtt gagcgtggtg	9000
gcgtgtgtc cgggtgacgaa gaagtacatg atccagcggc ggagcggcat ctcgcgtac	9060
tcgcggcggg ctccaagcg ctccatggtc tcgttagaaat ccacggcgaa gttaaaaaac	9120
tgggagttgc gcgcggagac ggtcaactcc tcctccagaa gacggatgag ctcggcgatg	9180
gtggcgcgc cctcgcgctc gaaggccccg gggggctctt ctcttccat ctccctcc	9240
tcttcctctt ccactaacat ctcttctact tcctcctcag gaggcggcgg cggggggaggg	9300

gccctgcgtc	gccggcgccg	cacgggcaga	cggtcgatga	agcgctcgat	ggtctccccg	9360
cgccggcgac	gcatggtctc	ggtgacggcg	cgcccgctct	cgccgggccc	cagcgtgaag	9420
acgccgcgc	gcatctccag	gtggccgccc	ggggggtctc	cgttggcag	ggagagggcg	9480
ctgacgtatgc	atcttatcaa	ttggccgtia	gggactccgc	gcaaggacct	gagcgtctcg	9540
agatccacgg	gatccgaaaa	ccgctgaacg	aaggcttcga	gccagtgcga	gtcgcaaggt	9600
aggctgagcc	cggttcttg	ttttcgggt	atttgtcg	gaggcggcg	ggcgatgctg	9660
ctgggtatga	agttaagta	ggcggtcctg	agacggcgga	tggtggcgag	gagcaccagg	9720
tccttggcc	cggttgctg	gatgcgcaga	cggtcgccca	tgccccaggc	gtggtctgaa	9780
cacctggcga	ggtccttcta	gtagtcctgc	atgagccct	ctacggcac	gtcccttcg	9840
cccgccggc	cgtgcacgtcg	cgtgagcccg	aacccgcgt	gcccgtggac	gagcgcagg	9900
tcggcgacga	cgcgcgtggc	gaggatggcc	tgctggatct	gggtgagggt	ggcttggaaag	9960
tcgtcgaagt	cgacgaagcg	gtggtaggct	ccggtgttga	tggtgttagga	gcagttggcc	10020
atgacggacc	agttgacggt	ctggtgcccg	gggcgcacga	gctcgtggta	cttgaggcgc	10080
gagtaggcgc	gcgtgtcgaa	gatgtatcg	ttgcagggtc	gcacgaggta	ctggatccg	10140
acgaggaagt	gccccggcgg	ctggcggtag	agcggccatc	gctcggtggc	ggggcgcccg	10200
ggcgcgaggt	cctcgagcat	gaggcggtgg	tagccgtaga	tgtacctgga	catccagggt	10260
atgcggcgg	cggtgtggaa	ggcgcgcggg	aactcgcgga	cgcgttcca	gatgttgcgc	10320
agcggcagga	atgtttcat	ggtgcccg	gtctggcccg	tgaggcgcgc	gcagtcgtgg	10380
atgcctttaga	catacggca	aaaacgaaag	cggtcagcgg	ctcgactccg	tggctggag	10440
gctaagcgaa	cgggtggc	tgccgtgtaa	ccccggttcg	aatctcgaaat	caggctggag	10500
ccgcagctaa	cgtggtaactg	gcactccgt	ctcgacccaa	gcctgctaacc	gaaacactcca	10560
ggataacggag	gccccggcgtt	tttggcctt	ggtcgttgt	catgaaaaac	tagtaagcgc	10620
ggaaagcgcc	cggccgcgt	ggctcgctgc	cgtatctgg	agaaagaatc	gccagggttg	10680
cgttgcgtt	tgcccggtt	cgagccttag	cgctcggtgc	cgccggatt	ccgcggctaa	10740
cgtggcgctg	gctggcccg	cgtttccaa	accccttagc	cagccgactt	ctccagttac	10800
ggagcgagcc	ccttttttc	ttgtgtttt	gccagatgca	tcccgtactg	cggcagatgc	10860
gccccccaccc	tccaccacaa	ccgccccctac	cgcagcagca	gcaacagccg	gcccgttctgc	10920
ccccggccca	gcagcagcag	ccagccacta	ccgcggcg	cgccgtgagc	ggagccggcg	10980
ttcagtatga	cctggccttg	gaagagggcg	aggggctggc	gcccgtgggg	gggtcgctcg	11040
cgagcgcc	cccgccgtt	cagatgaaaa	gggacgctcg	cgaggcctac	gtgcccgg	11100
agaacctgtt	cagagacagg	agcggcgagg	agcccgagga	gatgcgcg	tcccgttcc	11160

acgcggggcg ggagctgcgg cgccgcctgg accgaaagcg ggtgctgagg gacgaggatt	11220
tcgaggcga cgagctgacg gggatcagcc ccgcgcgcgc gcacgtggcc gcggccaacc	11280
tggcacggc gtacgagcag accgtgaagg aggagagcaa cttcaaaaa tccttcaaca	11340
accacgtcg cacgtgatc gcgcgcgagg aggtgaccct gggctgatg caccgtggg	11400
acctgctgga gcccacatcgatcagaacccca cgagcaagcc gctgacggcg cagctgttc	11460
tggtggtgca gcacagtccg gacaacgaga cgttcaggga ggcgctgctg aatatcaccg	11520
agcccgaggc ccgctggctc ctggacattgg tgaacattct gcagagcatc gtgggtcagg	11580
agcgcggct gccgctgtcc gagaagctgg cggccatcaa cttctcggtg ctgagcctgg	11640
gcaagtacta cgcttaggaag atctacaaga cccctacgt gcccatagac aaggaggta	11700
agatcgacgg gtttacatg cgcatgaccc tgaaagtgt gaccctgagc gacgatctgg	11760
gggtgtaccg caacgacagg atgcaccgcg cggtgagcgc cagccgccgg cgcgagctga	11820
gcgaccagga gctgatgcac agcctgcacg gggccctgac cggggccggg accgaggggg	11880
agagctactt tgacatggc gcggacactgc gctggcagcc cagccggcg gccttggaaag	11940
ctgcccggcg cgtgccctac gtggaggagg tggacatga ggaggaggag ggcgagtacc	12000
tggaagactg atggcgcac cgtattttg ctagatgcac caacagccac cggccctcc	12060
tgatcccgcg atgcggccgg cgctgcagag ccagecgcc ggcattaaact cctggacga	12120
ttggaccctcg gccatgcaac gcatcatggc gctgacgacc cgcaatcccg aagccttag	12180
acagcagccct caggccaaacc ggctctcgcc catcctggag gccgtggc cctcgccctc	12240
gaaccccaacg caccgagaagg tgctggccat cgtgaacgcg ctgggtggaga acaaggccat	12300
ccgcggcgac gaggccgggc tgggtacaa cgcgcgtctg gagcgcgtgg cccgctacaa	12360
cagcaccaac gtgcagacga acctggaccg catggtacc gacgtgcgcg aggccgtgtc	12420
gcagcgcgag cgggtccacc gcgagtcgaa cctggcctcc atggtggcgc tgaacgcctt	12480
cctgagcacg cagcccgcca acgtcccccg gggccaggag gactacacca acttcatcag	12540
cgcgctgcgg ctgatggtgg ccgaggtgccc ccagagcgcg gtgtaccagt cggggccgg	12600
ctacttcttc cagaccagtc gccaggctt gcagaccgtg aacctgagcc aggcttcaa	12660
gaacttgcag ggactgtggg gcgtgcaggc cccggctggg gaccgcgcga cgggtgtcgag	12720
cctgcgtacg cggaaactcgc gcctgcgtct gctgcgtggc gcgccttca cggacagcgg	12780
cagcgtgagc cgcgcactcgt acctggctaa cctgcgttac ctgtaccgcg aggccatcg	12840
gcagcgcac gtggacgagc agacctacca ggagatcacc cacgtgagcc gcgcgcgtgg	12900
ccaggaggac cggggcaacc tggaggccac cctgaacttc ctgctgacca accggctcg	12960
gaagatcccg ccccagtacg cgctgagcac cgaggaggag cgcatcctgc gctacgtca	13020

gcagagcgtg gggctgttcc tcatgcagga gggggccacg cccagcgccg cgctcgacat	13080
gaccgcgcgc aacatggagc ccagcatgt a cgcccccaac cgcccggtca tcaataagct	13140
gatggactac ttgcattcggg cggccgccc gaactcggt tactttacca acggcatctt	13200
gaacccgcac tggctccgc cgccccgggtt ctacacgggc gagtacgaca tgcccgacc	13260
caacgacggg ttccctgtggg atgacgtgga cagcagcgtg ttctcgccgc gtccaccac	13320
caccgtgtgg aagaaagagg gcggggaccc gcggccgtcc tcggcgctgt ccggtcgcgc	13380
gggtgctgcc gcggcggtgc ccgaggccgc cagcccttt ccgagcctgc cctttcgct	13440
gaacagcgtg cgacgcagcg agctgggtcg gctgacgcgg ccgcgcctgc tggcgagga	13500
ggagtagacctg aacgactcct ttttgggccc cgagcgcgaa aagaacttcc ccaataacgg	13560
gatagagagc ctggtgacca agatgagccg ctggaaagacg tacgcgcacg agcacaggga	13620
cgagccccga gctagcagcg cagggcacccg tagacgccag cggcacgaca ggcagcgggg	13680
tctggtgtgg gacgatgagg attccgcccga cgacagcagc gtgttgact tgggtggag	13740
tgggtgttgtt aacccttgc ctcacttgcg cccctgtatc gggcgctga tgtaagaatc	13800
tgaaaaataa aaaacggta tcaccaaggc catggcacc agcgtgcgtt cttctgtt	13860
gtttgttagta gtatgttag ggcgtgtac ccggagggtc ctccctcgtc gtacgagac	13920
tgatgcgc aggccgtggc ggcggcgatg cagccccgc tggaggcgcc ttacgtgccc	13980
ccgcggtaacc tggcgctac ggagggcgaa acagcatc gttactcgaa gctggcaccc	14040
ttgtacgata ccacccgggtt gtacctgggt gacaacaagt cggcgacat cgcctcgctg	14100
aactaccaga acgaccacag caacttcctg accaccgtgg tgcagaacaa cgatttacc	14160
cccacggagg ccagcaccca gaccatcaac ttgacgagc gctcgccgtg gggcgccag	14220
ctgaaaacca tcatgcacac caacatgcc aacgtgaacg agttcatgtt cagcaacaag	14280
ttcaaggcgc gggtgatgtt ctcgcgaag acccccaacg gggtcacagt aacagatggt	14340
agtccaggacg agctgaccta cgagtgggtg gagtttggc tgcccgaggg caacttcgt	14400
gtgaccatga ccatcgatct gatgaacaaac gccatcatcg acaactactt ggcgtgggg	14460
cggcagaacg gggtgctgga gagcgcacatc ggcgtgaagt tcgacacgcg caacttcgg	14520
ctgggtgtgg accccgtgac cgagctgggt atgcggcg tgcacaccaa cgaggccttc	14580
cacccgaca tcgtcctgct gcccggctgc ggcgtggact tcaccgagag ccgcctcagc	14640
aacctgtgg gcatccgaa gcggcagccc ttccaggagg gcttccagat cctgtacgag	14700
gacctggagg gggcaacat ccccgctc ttggatgtcg aagctacga gaaaagcaag	14760

gaggatagca ccgcgtggc taccgcgcg actgtggcag atgccactgt caccagggc	14820
gatacatcg ccacccaggc ggaggaagca gccgcctag cggcaccga tgatagtcaa	14880
agtaagatag ttatcaagcc ggtggagaag gacagcaagg acaggagcta caacgttcta	14940
tcggatggaa agaacaccgc ctaccgcagc tggtacctgg cctacaacta cggcacc	15000
gagaagggcg tgcgctcctg gacgctgctc accacctcg acgtcacctg cggcgtggag	15060
caagtctact ggtcgctgcc cgacatgtatg caagacccgg tcaccttccg ctccacgcgt	15120
caagtttagca actacccggt ggtggcgcc gagctctgc ccgtctactc caagagttc	15180
ttcaacgagc aggccgtcta ctgcgcagc ctgcgcgc tcacctcgct cacgcacgtc	15240
ttcaaccgct tccccgagaa ccagatccctc gtccgcgc cccgcacccac cattaccacc	15300
gtcagtgaaa acgttccctgc tctcacagat cacgggaccc tgccgctgctc cagcagtatc	15360
cggggagtcc agecgctgac cgtactgac gccagacgcc gcacctgccc ctacgtctac	15420
aaggccctgg gcgttagtcgc gccgcgcgtc ctctcgagcc gcaccttcta aaaaatgtcc	15480
atttcatct cggccagtaa taacacccggt tggggcctgc ggcgcggccag caagatgtac	15540
ggaggcgctc gccaacgctc cacgcaacac cccgtgcgcg tgccgggca cttccgcgt	15600
ccctggggcg ccctcaaggg tcgcgtgcgc tcgcgcacca ccgtcgacga cgtgatcgac	15660
caggtggtgg ccgacgcgcg caactacacg cccgcgcgcg cgcgcgcgc caccgtggac	15720
gccgtcatcg acagcgttgtt ggccgacgcg cggcgtacg cccgcgcac gagccggcgg	15780
cggcgcacatcg cccggcggca cggagcacc cccgcacatgc gcgcggcgcg agccttgctg	15840
cgcagggcca ggcgcacggg acgcagggcc atgctcaggg cggccagacg cgcgcctcc	15900
ggcagcagca ggcgcggcag gacccgcaga cgcgcggca cggcggcggc ggcggccatc	15960
gccagcatgt cccggccgcg ggcggcaac gtgtactgg tgccgcacgc cgccacccgg	16020
gtgcgcgtgc ccgtgcgcac ccgcacccct cgcacttcaa gatgctgact tgcgcgtt	16080
gatgtgtccc agcggcgagg aggtatgtcca agcgcaata caaggaagag atgctccagg	16140
tcatgcgcctc ttagatctac ggccccggc cggcgtgaa ggagaaaga aagccccca	16200
aactgaagcg ggtcaaaaag gacaaaaagg aggaggaaga tgtggacgga ctggtgag	16260
ttgtgcgcga gttcgcccc cggcggcgcg tgcagtggcg cggcggaaa gtgaaaccgg	16320
tgctgcggcc cggcaccacg gtggcttca cggccggca gcgttccggc tccgcctcca	16380
agcgctctta cgacgagggt tacggggacg aggacatcct cgagcaggcg gccgagcgtc	16440
tggcgcgagtt tgcttacggc aagcgcagcc gccccgcgc cttgaaagag gaggcgggtgt	16500
ccatcccgct ggaccacggc aaccccacgc cgagcgtgaa gcccgtgacc ctgcagcagg	16560
tgctgccgag cgcggcgccg cggccggct tcaagcgcga gggcggcag gatctgtacc	16620

cgaccatgca gctgatggtg cccaagcgcc agaagctgga ggacgtgctg gagcacatga	16680
aggtggacct cgagggtgcag cccgaggtca aggtgcggcc catcaagcag gtggcccccgg	16740
gcctggcgt gcagaccgtg gacatcaaga tccccacgga gcccatggaa acgcagaccg	16800
agcccgtaaa gcccagcacc agcaccatgg aggtgcagac ggatccctgg atgcggcgc	16860
cggcttccac caccactcgc cgaagacgca agtacggcgc ggccagcctg ctgatgcaca	16920
actacgcgt gcatttcctcc atcatccca cgccggcata ccgcggcacg cgcttctacc	16980
cgggctacag cagccgcccgc aagaccacca cccgcccgcg ccgtcgccgc acccgccca	17040
gcaccaccgc gacttccgcc gccccttgg tgccggagagt gtaccgcagc gggcgtgagc	17100
ctctgaccct gccgcgcgcg cgctaccacc cgagcatcgc catttaactc tgccgtcgcc	17160
tccttgcaga tatggccctc acatgccccc tccgcgtccc cattacggc taccgaggaa	17220
gaaagccgcg ccgtagaagg ctgacgggaa acgggctgca tcgcacatcac caccggcggc	17280
ggcgcgcccatt cagcaagcgg ttgggggag gcttcctgcc cgctgtgatc cccatcatcg	17340
ccggcgcat cggggcgatc cccggcatag ctccgtggc ggtgcaggcc tctcagcgcc	17400
actgagacac agcttgaaa attttaata aaaaatgga ctgacgctcc tggtccctgt	17460
atgtgtgttt ttagatggaa gacatcaatt ttctgtccct ggcaccgcga cacggcacgc	17520
ggccgtttat gggcacctgg agcgacatcg gcaacagcca actgaacggg ggcgccttca	17580
attggagcag tctctggagc gggcttaaga atttcgggtc cacgctaaaa acctatggca	17640
acaaggcgtg gaacagcagc acagggcagg cgctgaggaa aaagctgaaa gagcagaact	17700
tccagcagaa ggtggtcgat ggcctggct cgggcatcaa cgggggtggtg gacctggcca	17760
accaggccgt gcagaaacag atcaacagcc gcctggacgc ggtccgcggc gcgccgtccg	17820
tggagatgcc ccaggtggag gaggagctgc ctcccctgga caagcgcggc gacaagcgcac	17880
cgcgtcccgaa cggggaggagg acgctgctga cgacacacgga cgagccgcggc ccgtacgagg	17940
aggccgtgaa actgggtctg cccaccacgc ggccctggc gcctctggcc accgggggtgc	18000
tgaaacccag cagcagcagc agccagcccg cgaccctgga ctgcctcca cctgcggccct	18060
ccacagtggc taagccccctg cggccgggtgg ccgtcgccgtc ggcgcggccccc cgaggccccc	18120
cccaggcgaa ctggcagagc actctgaaca gcatcgtggg tctgggagtg cagagtgtga	18180
agcggccggc ctgttattaa aagacactgt agcgcttaac ttgttgtct gtgttatata	18240
gtatgtccgc cgaccagaag gaggaggaag aggccgtcg ccgagttgca agatggccac	18300
cccatcgatg ctgcggccat gggcgtacat gcacatcgcc ggacaggacg cttcggagta	18360
cctgagtccg ggtctggtgc agttcgcccg cgccacagac acctacttca gtctggggaa	18420
caagtttagg aacccacgg tggcacccac gcacgtgtg accaccgacc gcagccagcg	18480

gctgacgctg cgttcgtgc ccgtggaccg cgaggacaac acctactcgt acaaagtgcg	18540
ctacacgctg gccgtggcg acaaccgcgt gctggacatg gccagcacct acttgacat	18600
ccgccccgtg ctggatcggg gccccagctt caaacccctac tccggcaccg cctacaacag	18660
cctggctccc aaggagcgc ccaacacctc acagtggata accaaagaca atggaactga	18720
taagacatac agtttggaa atgctccagt cagaggattt gacattacag aagagggtct	18780
ccaaatagga accgatgagt caggggggtga aagcaagaaa attttgcag aaaaaaccta	18840
tcagcctgaa cctcagctt gagatgagga atggcatgtat actattggag ctgaagacaa	18900
gtatggaggc agagcgctta aacctgccac caacatgaaa ccctgctatg ggtcttcgc	18960
caagccaact aatgctaagg gaggtcaggc taaaagcaga accaaggacg atggcactac	19020
tgagccctgat attgacatgg cttctttga cgatcgagt cagcaagcta gttcagtcc	19080
agaacttgtt ttgtatactg agaatgtcga tctggacacc cggatacc acattattta	19140
caaacctggc actgtatgaaa caagttctt tttcaactt ggtcagcagt ccatgccaa	19200
cagacccaaac tacattggct tcagagacaa ctttatcggg ctcatgtact acaacagcac	19260
tggcaatatg ggtgtactgg ccggtcaggc ctccagctg aatgctgtgg tggacttgca	19320
ggacagaaac actgaactgt cctaccagct ttgcttgac tctctgggtg acagaaccag	19380
gtatttcagt atgtgaaatc aggccgtgga cagctatgac cccgatgtgc gcattattga	19440
aaatcacggt gtggaggatg aactcccaa ctattgttc ctttgaatg gtgtggcctt	19500
tacagataca ttccagggaa ttaaggtaa aactacaat aacgaaacag caaatgtac	19560
agagtggaa tctgataacct ctgtcaataa tgctaatgag attgccaagg gcaatcctt	19620
cggccatggag atcaacatcc aggccaaacct gtggcggAAC ttccctacg cgaacgtggc	19680
gctgtacctg cccgactctt acaagtacac gccggccaaac atcacgtgc ccaccaacac	19740
caacacccat gattacatga acggccgcgt ggtggcgccc tcgctgggtgg acgcctacat	19800
caacatcggt gcgcgctggt cgctggaccc catggacaac gtcaaccct tcaaccacca	19860
ccgcaacgcg ggctcgctt accgctccat gctcctggc aacggggcgt acgtgcctt	19920
ccacatccag gtgcggccaa agttttcgc catcaagagc ctctgtctcc tgccgggtc	19980
ctacacccat gagtggact tccgcaagga cgtcaacatg atcctgcaga gtcctcggt	20040
caacgacccgt cgcacggacg gggccctccat cgccttacc accatcaacc tctacgccac	20100
cttcttcccc atggcgcaca acaccgcctc cacgctcgag gccatgtgc gcaacgacac	20160
caacgaccag tcctcaacg actacccctc ggccggccaaac atgctctacc ccatccggc	20220

caacgccacc aacgtcccc tctccatccc ctgcgcAAC tggccgcct tccgcggatg	20280
gtccttacg cgcctcaaga cccgcgagac gccctcgctc ggctccgggt tcgaccctta	20340
cttcgtctac tcgggctcca tcccctacct cgacggcacc ttctacctca accacacctt	20400
caagaaggTC tccatcacct tcgactccTC cgtcagCTgg cccggcaacg accggcctc	20460
gacggccaaAC gagttcgaaa tcaagcgcAC cgtcgacgGA gaggggtaca acgtggccCA	20520
gtgcAACatG accaaggACT ggttcctGGT ccagatgCTG gcccactaca acatcgCTA	20580
ccaggGCCTC tacgtccccG agggctacAA ggaccgcatG tactcTTtC tccgcAACTt	20640
ccagccccatG agccGCCAGG tcgtggacGA ggtcaactAC aaggactACC aggccgtcAC	20700
cctggcctac cagcacaACA actcgggCT cgtcgctac ctgcGCCCA ccatgcGCCA	20760
gggcCAGCCC tacCCCGCCA actaccCTA cccgctcatC ggcaagAGCG ccgtcgCCAG	20820
cgtcacCCAG AAAAGATTC tctgcgACCG ggtcatgtGG cgcataCCCT tctcAGCAA	20880
cttcatgtCC atggcgcgcC tcaccgACCT cggccAGAAc atgctctACG ccaactCCGc	20940
ccacgcgCTA gacatgaATT tcgaagtCGA cccatggat gagtccACCC ttcttatGT	21000
tgtttcgaa gtcttcgacG tcgtccgagt gcaccAGCC caccgCGGCG tcatcgaggc	21060
cgtctacCTG cgcacGCCt tctcgGCCGG caacGCCACC acctaAGCCT ctgtttCTT	21120
gcaagatgac ggcctgtggC tccggcgAGC aggagetcAG ggccatCCTC cgcgacCTGG	21180
gctgcggGCC ctacttCCTG ggcacCTCG acaAGCgtt cccggattC atggccccGC	21240
acaagctGGC ctgcGCCATC gtcaacACGG cccggcGGA gaccggGGGc gagcactGGC	21300
tggccttCGC ctggaACCCG cgcacCCACA cctgtacCT ctgcacCCCC ttCGGGtCT	21360
cggacgAGCG cctcaAGCAG atctaccAGT tcgagtacGA gggctGCTG cggcAGCG	21420
ccctggccAC cgaggACCGC tggtcacCC tggAAAAGTC cacccAGACC gtgcaggGTc	21480
cgcgcTcGGC cgcctgcGGG ctttCTGt gcatgttCCT gcacGCCtC gtgcactGGC	21540
ccgaccGCC catggacaAG AACCCACCA tgaacttGt gacggggGtG cccaaACGGCA	21600
tgctccAGtC gcccAGGTG gaACCCACCA tgcGCCGCA ccaggaggCG ctctaccGCT	21660
tcctcaACGC ccactCCGCC tacttCGtC cccaccGCGC ggcacatCGAG aaggCCACCG	21720
ccttcgacCG catgaatCAA gacatgtAAA ctgtgtGtAt gtgaatGtT tattcataat	21780
aaacAGCACA tggttatGCC accttCTG AGGCTCTG tttatttAGA aatcGAAGGG	21840
gttctgCCGG ctctcgCGt GccccGCCGG caggatacG ttgcggAAcT ggtacttGGG	21900
cagccacttG aactcgGGGA tcagcagtt cggcacGGGG aggtcgGGGA acgagtcGtC	21960
ccacagCTtG cgcgtgAGtT gcaggGCgCC cagcaggTCG ggCGCGGATA tcttGAAatC	22020
acagttGGGA cccgcTTtC ggcgcgAGA gttgcggTAC acggggTTGC agcactGGAA	22080

caccatcagg gccgggtgct tcacgctcg cagcacgc gcgtcggtga tgccctcac	22140
gtccagatcc tcggcggttgg ccatccgaa gggggtcata ttgcagggtct gcccggccat	22200
gctgggcacg cagccggct tgtggttgca atcgcatgc agggggatca gcatcatctg	22260
ggcctgtctcg gagtcatgc ccgggtacat ggcctcatg aaagccctcca gctggcgaa	22320
ggcctgtctgc gccttgccgc cctcggtgaa gaagaccccg caggacttgc tagagaactg	22380
gttggtgccg cagccggcgt cgtgcacgca gcagcgcgc tcgttggccagactgcac	22440
cacgctgcgc cccagcggt tctgggtat ctggccgg tcgggttct cttcagcgc	22500
gchgctgccc ttctcgctcg ccacatccat ctgcgttgat tgctccctct ggatcatcac	22560
gttcccgtgc aggacccgca gttgccctc ggcttcggtg caiccgatgc gccacagcgc	22620
gcagccggtg cactccagt tcttgtggc gatctggag tgcgagtgc cgaagccctg	22680
caggaagcgg cccatcatcg cggtcagggt ctgttgcgt gtgaaggta gggatgcc	22740
gcgggtgtcc tcgttacat acaggtggca gatgcggcgg tacacctcgc cctgtcggt	22800
catcagctgg aaggcggact tcaggtcgct ctccacgcgg taccgcctca tcagcagegt	22860
catgacttcc atgccttct cccaggccga aacgatcggc aggtcaggg gtttcttac	22920
cgttgtcatc ttagtcggc cggccgaggt cagggggtcg ttctcgccca ggtctcaaa	22980
cactcgcttgc cgtccttct cggtgatgcg cacgggggaa aagctgaagc ccacggccgc	23040
cagctccctcc tcggcctgccc ttctcgcttc gctgtcctgg ctgtatgtctt gcaaaggcac	23100
atgtttggtc ttgcggggtt tcttttggg cggcagagggc ggcggcgag acgtgtggg	23160
cgagcgcgag ttctcgctca ccacgactat ttcttcttct tggccgtcgt ccgagaccac	23220
gcggcggtag gcatgcctct tctggggcag aggcggagggc gacgggtct cgcgggttcgg	23280
cggcggtcg gcagagcccc ttccgcgttc ggggggtgcgc tcctggccgc gctgtctga	23340
ctgacttcc cgcggccgg ccattgtgtt ctccctaggaa gcaaggatgg agactcagcc	23400
atcgctgcaca acatcgccat ctgccccccgc cgccgcgcac gagaaccaggc agcagcagaa	23460
tgaagctta accgcggccgc cgcccagcccc cacctccgac gccgcggccc cagacatgca	23520
agagatggag gaatccatcg agattgaccc gggctacgtg acgcggccgg agcagcaggg	23580
ggagctggca ggcgcgtttt cagccccggaa agagaaccac caagagcagc cagagcaggg	23640
agcagagagc gagcagagcc aggctgggtt cgagcatggc gactacgtt gggggcaga	23700
ggacgtgtctc atcaagatccat tggcccgcca atgcataatc gtcaaggatg cgctgtcgaa	23760
ccgcgcgcgat gtgcggccatc gctggcggtt gctcagccgc gcctacggc gcaacccctt	23820
ctcgccgcgcgt gtgcggccatc agcggccagcc caacggccacc tgcgagccca acccggccct	23880
caacttctac cgggtcttcg cggtgccgaa ggccctggcc acctaccacc tcttttcaa	23940

gaaccaaagg atccccgtct cctgccgcgc caaccgcacc cgccgcgacg ccctgctcaa	24000
cctggggccc ggcgcggcc tacctgatcg cgcctccttg gaagagggttc ccaagatctt	24060
cgagggtctg ggcagcgacg agactcggtc cgcaacgct ctgcaaggaa gcggagagga	24120
gcatgagcac cacagcgccc tggtgagtt ggaaggcgac aacgcgcgc tggcggtcct	24180
caagcgcacg gtccgagctga cccacttcgc ctacccggcg ctcaacctgc ccccaaggt	24240
catgagcgcc gtcatggacc aggtgctcat caagcgcgc tcgcccctct cggaggagga	24300
gatgcaggac cccgagagct cggacgaggg caagccgtg gtccgacg agcagctggc	24360
gcgcggctg ggagcgagta gcaccccca gagcctggaa gagcggcgca agctcatgat	24420
ggccgtggtc ctggtgaccg tggagctgga gtgtctgcgc cgcttcttcg ccgacgcgga	24480
gaccctgcgc aaggtcgagg agaacctcgca ctacctcttc aggacgggt tcgtgcgcac	24540
ggcctgcaag atctccaacg tggagctgac caacctggtc tcctacatgg gcatcctgca	24600
cgagaaccgc ctggggcaga acgtgctgca caccacccgt cgccgggagg cccggcgca	24660
ctacatccgc gactgcgtct acctgtaccc ctgcccacacc tggcagacgg gcatggcggt	24720
gtggcagcag tgccctggagg agcagaacct gaaagagctc tgcaagctcc tgcaagaagaa	24780
cctgaaggcc ctgtggaccg ggttcgacga ggcacccacc gcctcgacc tggccgacct	24840
catttcccc gagcgcctgc ggctgacgct ggcacacggg ctgcccact ttatgagcca	24900
aagcatgttg caaaaacttgc gctttcat cctcgacgc tccggatcc tgccgcac	24960
ctgctccgcg ctggccctgg acttcgtgcc gctgaccccttc cgccgggtgcc cccggccct	25020
ctggagccac tgctacactgc tgctctggc caactacccgt gcctaccact cggacgtgat	25080
cgaggacgtc agcggcgagg gtctgctgca gtgcactgca cgctgcaacc tctgcacgcc	25140
gcaccgcctcc ctggccctgca acccccaagct gctgaggcgag acccagatca tcggcacctt	25200
cgagtgc当地 ggccccggcg aggaggccaa ggggggtctg aaactcaccc cggggctgtg	25260
gacctcgcc tacttgcgca agttcggtcc cgaggactac catcccttcg agatcagggt	25320
ctacgaggac caatcccage cgcccaaggc cgagctgtcg gctcggtca tcacccagggg	25380
ggccatcctg gcccaattgc aagccatcca gaaatccgc caagaatttc tgctgaaaaa	25440
ggccacccggg gtctacttgg acccccaagac cggagaggag ctcaacccca gttccccca	25500
ggatgcccag aggaagcagc aagaagctga aagtggagct ggcgtgcgc ccggaggatt	25560
tggaggaaga ctggagagc agtcaggcag aggaggagga gatggaagac tggacagca	25620
ctcaggcaga ggaggacagc ctgcaagaca gtctggaaga cgaggtggag gaggaggcag	25680

aggaagaagc agccggccgc agaccgtcg cctcgccgga gaaagcaagc agcacggata	25740
ccatctccgc tccgggtcg ggctcgccg gccgggccca cagtaggtgg gacgagaccg	25800
ggcgctccc gaacccacc acccagaccg gtaagaagga gcggcaggga tacaagtctt	25860
ggcggggca caaaaacgcc atcgctctt gcttgcggc ctgcggggc aacatctctt	25920
tcacccggcg ctacctgctc ttccaccgag gggtgaactt ccccgcaac atcttgatt	25980
actacccgtca cctccacagc ccctactact gtttccaaga agaggcagaa acccagcagc	26040
agcagaaaac cagcagcagc tagaaaatcc acagcggcgg cgccggcagg tggactgagg	26100
atcgccggca acgagccggc gcagacccgg gagctgagga accggatctt tcccaccctc	26160
tatgccatct tccaggcagag tcggggcag gagcagggaa taaaagtcaa gaaccgtct	26220
ctgcgctcgc tcacccgcag ttgtctgtat cacaagagcg aagaccaact tcagcgcact	26280
ctcgaggacg ccgaggctct cttcaacaag tactgcgcgc tcactttaa agagttagccc	26340
gcccggccca acacacggaa aaaggcggga attacgtcac cacctgcgcc cttcgccgaa	26400
ccatcatcat gagcaaagag attcccacgc cttacatgtg gagctaccag cccagatgg	26460
gcctggccgc cggccggcc caggactact ccacccgcat gaactggctc agtggccggc	26520
ccgcgatgat ctacgggtg aatgacatcc gcgcggcccg aaaccagata ctcctagaac	26580
agtcaagcgat caccggccacg cccggccatc accttaatcc gctaattgg cccggccccc	26640
tggtgtacca gggaaattccc cagccccacga ccgtactact tccgcgagac gcccaggccg	26700
aagtccagct gactaactca ggtgtccagc tggccggcgg cggccgcctg tgtcgtaacc	26760
gccccgccta gggataaaag cggctggta tccgaggcag aggcacacag ctcaacgacg	26820
agggtggtag ctttcgctg ggtctgcgac ctgacggagt ctccaactc gccggatcg	26880
ggagatcttc ctacgcct cgtcaggccg tcctgactt ggagagttcg tcctcgacg	26940
cccgctcggt tggcatcgcc actctccagt tcgtggagga gttcaactccc tcggctact	27000
tcaacccctt ctccggctcc cccggccact acccggacga gttcatcccg aacttcgacg	27060
ccatcagcga gtccgtggac ggctacgatt gaatgtccca tggccgcgc gctgacctag	27120
ctcgcttcg acacctggac cactgcgcgc gttccgcgtc ctgcgtcgat gatctcgccg	27180
agtttgcccta ctttgagctg cccgaggagc accctcaggg cccggccac ggagtgcggaa	27240
tcatcgatcg aaaaaaaaaaaaaatcc gactccacc tgcttcggat cttcaggccag cgtccgatcc	27300
tggtcgagcg cgagcaagga cagacccgtc tgaccctgta ctgcacatgc aaccaccccg	27360
gcctgcatga aagtctttgt tgtctgtgt gtactgagta taataaaagc tgagatcagc	27420
gactactccg gacttcgtg tggctctgaa tccatcaacc agtccctgtt ctccaccggg	27480
aacgagacccg agtccagct ccagtgtaa ccccaacaaga agtacccac ctggctgttc	27540

cagggctccc cgatcgccgt tgtcaaccac tgcgacaacg acggagtcct gctgagcggc	27600
cctgccaacc ttacttttc cacccgcaga agcaagctcc agctcttcca acccttcctc	27660
ccgggacct atcagtgcgt ctcgggaccc tgccatcaca cttccacct gatcccgaat	27720
accacagcgt cgctccccgc tactaacaac caaactaccc accaacgccca ccgtcgac	27780
ctttcctctg aatctaatac cactaccgga ggtgagctcc gaggtcgacc aacctctggg	27840
atttactacg gccctggga ggtggtgaaa ttaatagcgc taggcctagt tgtgggtggg	27900
ctttggctc tctgtacact atacctccct tgctgtcgt acttagtggt gctgtgtgc	27960
tggtaaga aatggggcag atcaccctag tgagctgcgg tggctggg gcgggtgggc	28020
tttcgatgt gggactggc ggcgcggctg tagtgaagga gaaggccgat ccctgcgtgc	28080
atttcaatcc cgacaaatgc cagctgagtt ttcagccga tggcaatcgg tgccgggtgc	28140
tgatcaagtg cgatggaa tgcgagaacg tgagaatcga gtacaataac aagactcgga	28200
acaatactct cgcgtccgtg tggcagcccg gggacccga gtgg tacacc gtctctgtcc	28260
ccgggtctga cggtcccccgcgcaccgtga ataatacttt cattttgcg cacatgtgcg	28320
acacggcat gtggatgagc aacgagtacg atatgtggcc cccacagaag gagaacatcg	28380
tggcttctc catcgcttac agcctgtgca cgggtctaat caccgtatc gtgtgcgtga	28440
gcattcacat gtcatcgct attcgccca gaaataatgc cgaaaaagag aaacagccat	28500
aacacgtttt ttacacaccc ttgttttac agacaatgcg tctgttaaat ttttaaaca	28560
ttgtgctcag tattgcttat gcctctggct atgcaaacat acagaaaacc ctctatgtag	28620
gatctgtatga tacactagag ggtacccat cacaagctag ggttcatgg tattttata	28680
aaagctcaga taatcctatt actctttgca aaggtgatca gggcggaca acaaagccgc	28740
ctatcacatt tagctgtacc agaacaatc tcacgtttt ctcaattaca aaacaatatg	28800
ctggatattt ttacagtaca aactttcata gtggcaaga taaatattt actgttaagg	28860
tagaaaaatcc taccactctt agaactacca ccaccaccc caccacccactactgca	28920
agcccaactaa acctaaaact accaagaaaa ccactgtgaa aactacaact agaaccacca	28980
caactacaga aaccacccacc agcacaacac ttgctgcaac tacacacaca cacactgagc	29040
taaccttaca gaccactaat gatttgatag ccctgttgc aaagggggat aacagcacca	29100
cttccaatga ggagataccca aatccatga ttggcattat tttgtgtgtca gtgggtgtca	29160
tgttgatcat cgccttgtgc atgggtact atgccttcgt ctacagaaag cacagactga	29220
acgacaagct ggaacactta ctaagtgttg aattttatt ttttagaacc atgaagatcc	29280
taggcctttt agtttttctt atcattacct ctgctctatg caattctgac aatgaggacg	29340
ttactgtcgt tgtcgatca aattatacac tgaaaggtcc agcgaaggat atgcttcgt	29400

cactcagtcc cccgaggagg tccgcaaatg caaatccaa gaaccctgga aattcctaa	31200
atgctaccgc caaaaatcg acatgcattc cagctggatc atgatcattt ggatcgtaa	31260
cattctggcc tgacccctca ttcctttgt gatttacccc tgcttgact ttggttgaa	31320
ctcggcagag gcgtctatac tccccctga acctgacaca ccaccacagc aacctcaggc	31380
acacgcacta ccaccaccac agcctaggcc acaatacatg cccatattag actatgaggc	31440
cgagccacag cgacccatgc tccccgtat tagttacttc aatctaaccg gcgagatga	31500
ctgacccact ggccaacaac aacgtcaacg accttctcct ggacatggac ggccgcgcct	31560
cggagcagcg actcgccaa cttcgcattc gccagcagca ggagagagcc gtcaaggagc	31620
tgcaggacgg catagccatc caccagtca agaaaaggcat ctctgcctg gtgaaacagg	31680
ccaagatctc ctacgaggc acccagaccc accatgcct ctctacgag ctccgcgc	31740
agcgcagaa gttcacctgc ctggcggag tcaacccat cgatcacc cagcagtcgg	31800
gcatccaa ggggtgcattc cactgctct gcgactcccc cgactgcgtc cacactctga	31860
tcaagaccct ctgcggcctc cgacccctcc tccccatgaa ctaatcaccc acttatccag	31920
tgaataaaaa aaataatcat ttgatttgaataaaagatac aatcatattt atgattttag	31980
ttaacaaaa ataaagaatc acttacttga aatctgatac caggtctctg tccatattt	32040
ctgccaacac cacctcactc ccctttccc agctctggta ctgcaggccc cggcggctg	32100
caaacttctt ccacacgctg aagggatgt caaatccctc ctgcctctca atttcattt	32160
tatcttctat cagatgtcca aaaagcgcgt cgggtggat gatgacttcg accccgtcta	32220
cccttacgt gcagacaacg caccgaccgt gcccttcata aaccccccct tcgtctttc	32280
agatggattc caagagaagc ccctgggggt gttgtccctg cgactggccg accccgtcac	32340
caccaagaac gggaaatca ccctcaagct gggagagggg gtggacctcg actcctcg	32400
aaaactcatc tccaacacgg ccaccaaggc cgctgccct ctcatggat ccaacaacac	32460
cattttttt aacatggatc acccccttta cactaaagat ggaaaatttgc ctttacaagt	32520
ttctccacca ttaaatatac tgagaacaag cattctaaac acactagctt tagttttgg	32580
atcagggtta ggactccgtg gctctgcctt ggcagtacag ttatctctc cacttacatt	32640
tgatactgat gggaaatataa agcttacattt agacagaggt ttgcatgtt caacaggaga	32700
tgcaattgaa agcaacataa gctggctaa aggtttaaaa ttgaaatgtt gagccatagc	32760
aaccaacatt gggaaatgggt tagatggat aagcgtatc acagaaacag gtgtcgatga	32820
tgcttaccca atccaagtta aacttggatc tggccttagc tttgacagta caggagccat	32880
aatggcttgtt aacaaagaag acgataaaact cacttggatc acaacacctg atccatcacc	32940
aaactgtcaa atactcgatc aaaatgttgc aaaaactaaca ctttgcttga ctaaatgtgg	33000

tagtcaaata ctggccactg tgcgtttt agttgttagga agtgaaacc taaacccat	33060
tactggcacc gtaaggcgtg ctcagggtt tctacgttt gatgaaacg gtgttcttt	33120
aacagaacat tctacactaa aaaaactgt ggggtatagg cagggagata gcatagatgg	33180
cactccatat gtcaatgtg taggattcat gcccaattt aaagcttac caaagtaca	33240
aagttctact actaaaaata atatagtagg gcaagtatac atgaatggag atgttcaa	33300
acctatgctt ctcactataa ccctcaatgg tactgtatgac agcaacagta catattcaat	33360
gtcatttca tacacctgga ctaatggaa ctatgttggaa gcaacattt gagctaactc	33420
ttatacccttc tcctacatcg cccaagaatg aatactgtat cccaccctgc atgccaacc	33480
ctccccacc tcigtctata tgaaaactc tgaaacacaa aataaaataa agtcaagt	33540
ttttattgtat tcaacagttt tacaggattc gagcagttat tttccctca ccctcccagg	33600
acatggata caccaccctc tccccccgca cagcctgaa catctgaatg ccattggta	33660
tggacatgct ttggctcc acgttccaca cagttcaga gcgagccagt ctcgggtcg	33720
tcagggagat gaaaccctcc gggcactccc gcacatgcac ctcacagctc aacagctgag	33780
gattgtcctc ggtggtcggg atcacgttta tctggaaagaa gcagaagagc ggcgggtgg	33840
atcatagtcgc gcaaacggga tcggccggg gtgtcgcatc aggccccca gcagtgcgt	33900
ccgcgcgcgc tcgtcaagc tgctgcttag ggggtccggg tccaggact ccctcagcat	33960
gatgccacg gcccctagca tcaatgtct ggtgcggcgg ggcgcagcgc gcatgcggat	34020
ctcgctcagg tcgtcgact acgtgcaaca caggaccacc aggttgtca acagtccata	34080
gttcaacacg ctccagccga aactcatcg gggaaaggatg ctacccacgt gcccgtcgta	34140
ccagatcctc aggttaatca agtggcgccc cctccagaac acgctgccc tgtacatgt	34200
ctccttggc atgtggcggt tcaaccaccc cccgttaccac atcaccctct gttgaacat	34260
gcagccccgg atgatcctgc ggaaccacag ggccagcacc gcccccccg ccatgcagcg	34320
aagagacccc ggtcccgcc aatggcaatg gaggaccac cgctcgatc cgtggatcat	34380
ctggagctg aacaagtcta tggatggcaca gcacaggcac acgctcatgc atctttcag	34440
cactctcagg tcctcgcccc tcaaaaccat atcccgaggc acgggaaact cttgcaggac	34500
agcgaagccc gcagaacagg gcaatcctcg cacataactt acattgtgca tggacagggt	34560
atcgcaatca ggcagcaccc ggtgatcctc caccagagaa ggcgggtct cggtctcc	34620
acagcgttgtt aagggggccg gccgatacgg gtgtatggcgg gacgcggctg atcgtgttc	34680
cgaccgtgtc atgatgcgt tgcttcgga catttcgtt cttgtgttgg cagaacctgg	34740
tccggcgct gcacaccgtt cgcggccggc ggtctcgcc cttggaaacgc tgggtgttga	34800
agttgtaaaa cagccactct ctcagaccgtt gcagcagatc tagggcctca ggagtgtatga	34860

agatcccatc atgcctgatg gctctgatca catcgaccac cgtggaatgg gccagaccca	34920
gccagatgat gcaattttgt tgggttcgg tgacggcggg ggaggaaaga acaggaagaa	34980
ccatgattaa cttaaatcc aaacggtctc ggagcacttc aaaatgaagg tcgcccggat	35040
ggcacctctc gcccccgctg tggtggtaa aaataacagc caggtcaaag gtgatacggt	35100
tctcgagatg ttccacggtg gttccagca aagcctccac gcgcacatcc agaaacaaga	35160
caatagcgaa agcgggaggg ttctctaatt cctcaatcat catgttacac tcctgcacca	35220
tccccagata atttcattt ttccagcctt gaatgattcg aactagttcc tgaggtaat	35280
ccaagccagc catgataaag agctcgcgca gagcgcctc caccggcatt cttaaagcaca	35340
ccctcataat tccaagatat tctgctcctg gttcacctgc agcagattga caagcggat	35400
atcaaaatct ctgcccgcgt ccctgagtc ctccctcagc aataactgta agtactctt	35460
catatcctct ccgaaatttt tagccatagg acccccagga ataagagaag ggcaagccac	35520
attacagata aaccgaagtc ccccccagtg agcattgcca aatgtaaatg tgaataaagc	35580
atgctggcta gaccgggtga tatcttccag ataactggac agaaaatcg gcaagcaatt	35640
tttaagaaaa tcaacaaaag aaaaatctt caggtgcacg ttttagggcct cgaaaacaac	35700
gatggagtaa gtgcaagggg tgcgttccag catggttagt tagctgatct gtaaaaaaaaac	35760
aaaaaaaaaa acattaaacc atgctagcct ggcgaacagg tggtaaatac gttctctcca	35820
gcaccaggca gcccacgggg tctccggcgc gaccctcgta aaaattgtcg ctatgatga	35880
aaaccatcac agagagacgt tcccggtggc cggcgtgaat gattcgagaa gaagcataca	35940
ccccggAAC attggagtcc gtgagtgaaa aaaagcggcc gaggaagcaa tgaggcacta	36000
caacgctcac tctcaagtcc agcaaagcga tgccatgcgg atgaagcaca aaattttcag	36060
gtgcgtaaaa aatgttaatta ctcccctct gcacaggcag cgaagctccc gatccctcca	36120
gatacacata caaaggctca gcgtccatag cttaccgagc ggcagcagca gcccacaca	36180
acagggcgcggaa gagtcagaga aaagactgag ctctaacctg tccgcccgt ctctgctcaa	36240
tatataggccc cagatctaca ctgacgtaaa ggccaaagtc taaaaatacc cgccaaataaa	36300
tcacacacgc ccagcacacg cccagaaacc ggtgacacac taaaaaaaaat acgcgcactt	36360
cctcaaactgc ccaaactgccc gtcatttccg gttccacag ctacgtcatc aaaacacgac	36420
tttcaaattc cgtcgaccgt taaaaacgtc acccgccccg cccctaacgg tcgcccgtcc	36480
cgcagccaat cagccccccg catccccaaa ttcaaacagc tcatttgcat attaacgcgc	36540
accaaaaagtt tgaggtatat tattgatgat g	36571

<210> 3

<211> 1109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 3

ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc	60
ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca	120
ttgacgtcaa tgggtggagt attacggta aactgccac ttggcagttac atcaagtgtat	180
tcatatgccat agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg cctggcatta	240
tgcccagttac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtcat	300
cgctattacc atggtcgagg tgagccccac gttctgcttc actctccccca tctccccccc	360
ctccccaccc ccaattttgt atttatttat ttttaatta ttttgtgcag cgatggggc	420
gggggggggg gggggcgcgc gccaggcggg gcggggcggg gcgagggcgc gggcggggc	480
aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcgc tccgaaagtt tcctttatg	540
gcgaggcggc ggcggcggc gcctataaaa aagcgaagcg ctccctatca gtgatagaga	600
tctccctatc agtgatagag atcgtcgacg agctcgccgc gggcgggagt cgctgcgcgc	660
tgccttcgccc ccgtgccccg ctccggccgc gcctcgccgc gcccggcccg gctctgactg	720
accgcgttac taaaacaggt aagtccggcc tccgcgcgg gtttggcgc ctccgcggg	780
cgcggccctc ctacggcga ggcgtgccac gtcagacgaa gggcgcagcg agcgtctga	840
tccttccccc cggacgctca ggacagcggc ccgctgtca taagactcgg ctttagaacc	900
ccagtagcag cagaaggaca ttttaggacg ggacttgggt gactctaggg cactggttt	960
ctttccagag agcggAACAG gcgaggaaaa gtagtccctt ctggcgatt ctggcggagg	1020
atctccgtgg ggcggtaac gccgatgtatg cctctactaa ccatgttcat gtttcttt	1080
ttttctaca ggtcctgggt gacgaacag	1109

<210> 4

<211> 1187

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 4

ccattgcata cgttgtatcc atatcataat atgtacattt atattggctc atgtccaaca	60
ttaccgcccatttgacatttattttgact agttatataat agtaatcaat tacggggtca	120
tttagttcata gccccatataat ggaggccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgct	180
ggctgaccgc ccaacgaccc ccggccatttgc acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta	240
acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactggccac	300

tgtggcgtac atcaagtgt a tcataatgcc a agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt	360
aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag	420
tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtgatgc gggtttggca gtacatcaat	480
gggcgtggat agcgggttga ctcacgggta tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat	540
gggagtttgt ttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc	600
ccattgacgc aaatggcggt taggcgtgt a cggtggagg tctatataag gcgaagcgct	660
cccttatcgt gatagagatc tcccttatcgt tgatagagat cgtcgacgag ctgcggccgg	720

gcgggagtcg ctgcgcgtg cttcgcccc gtgcccgcgt ccggccgcgc ctcgcgccgc	780
ccgccccggc tctgactgac cgcttacta aaacaggtaa gtccggcctc cgccgcgggt	840
tttggcgct cccgcggcgc cccccccttca cacggcgagc gctgccacgt cagacgaagg	900
gcgcagcgcgcg cgtcctgatc cttccggcccg gacgctcagg acagcggcccc gctgtcatat	960
agactcgcccc tttagaaccccc agtatacgca gaaggacatt ttaggacggg acttgggtga	1020
ctcttagggca ctggttttct ttccagagag cgaaacagggc gaggaaaagt agtcccttct	1080
ccggcgattct gccccggat ctccgtgggg cggtaacgc cggatgtgcc tctactaacc	1140

atgttcatgt tttttttt ttctacagg tcctgggtga cgaacag 1187