



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

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

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12N 15/86</i> (2006.01) <i>A61K 39/00</i> (2006.01)
 <i>A61K 39/12</i> (2006.01) <i>A61P 31/14</i> (2006.01)
 <i>A61P 31/20</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12N 15/86</i> (2013.01)
 <i>A61K 39/12</i> (2013.01)</p> <p>(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)</p> | <p>(71) 출원인
 글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
 벨기에왕국 릭센사르트 (비-1330) 루 드 린스티튜트 89</p> <p>(72) 발명자
 아넬돌라, 버지니아
 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</p> <p>(74) 대리인
 양영준, 김영</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 복제 가능 아데노바이러스 벡터

(57) 요약

복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터가 외인성 면역원의 전달을 위해 제공된다. 본 발명의 벡터는 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 이룰 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. 2018 년 9 월 28 일에 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 트랜스진(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 결함 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 결함 재조합 바이러스를 초래한다.

[0009] 복제 결함 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 종사자의 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 이점들을 겸비한 벡터에 대한 요구가 존재한다.

[0011] 본 발명의 요약

[0012] 본 발명의 복제 가능 원숭이 아데노바이러스 벡터는 복제 결함 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 뉴클레오타이드 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 우드척 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(flan)되고; E1은 초기 유전자 1이고; CMV는 시토메갈로바이러스 프로모터이고; CASI는 CASI 프로모터이

고, RG는 모델 항원이고, WPRE는 우드척 간염 전사후 조절 요소이고, $\Delta E3$ 은 초기 유전자 3이 결실된 것을 나타내고; 섬유는 섬유 단백질을 코딩하는 아데노바이러스 유전자를 나타내고, E4는 초기 유전자 4이다.

- [0021] 아데노바이러스 게놈의 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 게놈 카피 수(copy number). 막대는 세포당 벡터 게놈 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 게놈 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 게놈을 갖는 비외피성 이십면체 바이러스이다. 아데노바이러스는 숙주 세포의 게놈 내로 통합되지 않으면서 분열 및 비분열 세포 모두를 포함하여 여러 포유동물 종의 수많은 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 전세기적으로 높은 유병률이라는 단점을 갖는다.

[0038] 아데노바이러스는 다수의 다른 미량 단백질, VI, VIII, IX, IIIa 및 IVa2와 함께 3 개의 주요 단백질, 핵손 (II), 펜톤 염기 (III) 및 노브(knobbed) 섬유 (IV)를 포함하는 이십면체 캡시드(capsid)를 갖는 특징적인 형태를 갖는다. 핵손은 캡시드의 구조적 성분 대부분을 차지하며, 이는 240 개의 삼량체 핵손 캡소머(capsomer) 및 12 개의 펜톤 염기로 구성된다. 핵손은 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. 핵손의 염기는 아데노바이러스 혈청형 사이에서 고도로 보존되고, 반면에 표면 루프는 가변적이다. 펜톤은 또 다른 아데노바이러스 캡시드 단백질이고; 섬유가 부착되는 오량체 염기를 형성한다. 삼량체 섬유 단백질은 캡시드의 각각의 12 개의 정점에서 펜톤 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 연결 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 기점으로 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 폴리뉴클레오타이드

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

[0043] 펜톤은 섬유가 부착되는 오량체 염기를 형성하는 또 다른 아데노바이러스 캡시드 단백질이다. 삼량체 섬유 단백질은 캡시드의 각각의 12 개의 정점에서 펜톤 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 보여주었고, 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 연결 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 유효성을 갖는 Ad로부터의 섬유가 사용되면, 섬유-슈도타이핑된 Ad 입자의 중화는 또한 감소할 수 있고, 이는 백신의 성공적인 투여에 호의적인 상황이다. 또한, 단리된 섬유 노브 영역뿐만 아니라, 전장 섬유는, 핵소 또는 펜톤 단독으로는 아니지만, 수지상 세포 성숙을 유도할 수 있고, 강한 CD8+ T 세포 반응의 유도와 연관된다. 종합하면, 아데노바이러스 섬유 단백질은 적어도 아데노바이러스 백신의 수용체-결합 및 면역원성에서 중요한 역할을 한다.

[0048] 아데노바이러스 복제

[0049] 역사적으로, 아데노바이러스 백신 개발은 결합, 비-복제 백신에 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 카세트가 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 제조함 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(풍고 아벨리이 및 풍고 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 핵산을 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 결함 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 계통의 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 뉴클레오타이드가 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,

에컨대 스플라이싱 및 토끼 베타-글로빈 폴리A를 포함하는 폴리아데닐화(폴리 A) 신호; 테트라시클린 조절 가능 시스템, 마이크로RNA, 전사후 조절 요소, 예를 들어 WPRE, 우드척 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 뉴클레오타이드 서열이다. 전형적으로, 프로모터는 전사 시작 부위에 근접한 유전자의 비-코딩 영역에 위치한다. 전사의 개시에서 기능하는 프로모터 내의 서열 요소는 종종 컨센서스 뉴클레오타이드 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 포함한다. 다수의 발현 제어 서열이 당업계에서 공지되어 있고, 사용될 수 있다.

[0074] 본 발명의 프로모터는 전형적으로 이중 프로모터일 것이다. "이중"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, 디히드로폴레이트 리덕타제 프로모터, 포스포글리세롤 키나제(PGK) 프로모터, EF1a 프로모터, 아연-유도성 양 메탈로티오닌(MT) 프로모터, 텍사메타손(Dex)-유도성 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, T7 폴리머라제 프로모터 시스템, 엑시손 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, 디스트로빈, 근육 크레아틴 키나제를 코딩하는 유전자로부터의 프로모터를 포함한다. 조직-특이적인 프로모터의 예는 간, 예를 들어 알부민, B형 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 벡터는 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 포스포타제(seAP)를 포함하나, 이에 제한되지는 않으며, 이는 무엇보다도 게네틴신, 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. 벡터의 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 이들 없이 본 발명의 벡터에서 사용될 수 있다.

[0079] CASI 프로모터는 CMV 인핸서, 닭 베타-액틴 프로모터, 및 유비퀴틴(UBC) 인핸서에 플랜킹된 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 페리틴 경쇄 프로모터이다. 이 실시양태에서, 페리틴 중쇄 및 경쇄의 5' UTR은 페리틴에 의한 철 조절을 제거하기 위해 침팬지 신장 인자 1 알파의 5' UTR에 의해 대체된다. 한 실시양태에서, 프로모터는 CMV 인핸서를 갖는 닭 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 계통의 중복 올리고뉴클레오타이드 서열의 사용, 폴리머라제 연쇄 반응, 및 원하는 뉴클레오타이드 서열을 제공하는 임의의 적합한 방법을 포함한다.

[0086] *트랜스진*

[0087] 아데노바이러스 벡터는 생체내 발현을 위해 원하는 RNA 또는 단백질 서열, 예를 들어 이중 서열을 전달하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 벡터는 네이키드(naked) DNA, 파지, 트랜스포존, 코스미드, 예피솜, 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 이중인 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 괴사 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 의학에서 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), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(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 촬영, 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 과대표시되고 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 계통에서 과대표시된 코돈 쌍을 함유하도록 변형된 폴리오바이러스는 야생형 RNA와 유사한 방식으로 작용하고, 크기가 야생형 RNA와 동일한 플라크를 생성하였다 (Coleman et al. (2008) Science 320:1784). 이는 과대표시된 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 벡터 및 추가 성분의 공동-투여를 수반하는 경우, 이들은 동일한 부위에서 또는 그 근처에서 공동-위치적(co-locationally)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, 벡터는 근육내(IM), 즉, 근육 안으로 직접 주사하여 투여될 수 있다. 근육은 혈관이 많이 지나가고, 흡수는 전형적으로 신속하다.
- [0102] 본 발명의 실시양태에서, 벡터는 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 층화된 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 벡터의 투여는 더욱 어렵다. 면역 인식 메카니즘은 장의 내강측에 쉽게 접근 가능하지 않고; 이는 신체가 음식에서 섭취된 단백질에 대한 면역 반응을 개시(mounting)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, 벡터는 점막으로 투여될 수 있다. 점막 백신 전달은 또한 백신의 근육내 전달에 여러 이점을 제공한다. 점막이 신체의 외부와 인접하기 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), 저작, 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. 감각된 점막 B 및 T 세포는 초기 항원 접촉의 부위를 떠나고, 림프를 통과하여 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, 벡터는 설하 투여될 수 있다. 설하 경로를 통한 백신 전달은 각질화되지 않은 층화된 편평 상피의 매우 얇은 층을 통한 신속한 접근을 갖는 항원을 제공하고, 여기서 그것은 랑게르한스 세포를 표적으로 하고 전신 반응을 유도한다. 혀 아래에서 전달되는 항원은 설하 점막에서 수지상 세포의 치밀한 네트워크에 이용 가능해진다. 설하로 전달되는 복제 가능 벡터는 간을 우회하여, 초회 통과 대사를 피하고, 이들의 지속성을 증가시키고, 따라서 잠재적으로 더 강한 면역 반응을 생성한다.
- [0109] 본 발명의 한 실시양태에서, 벡터는 협측으로 투여될 수 있다. 협측 경로를 통한 백신 전달은 또한 설하 층보다 다소 두꺼운 각질화되지 않은 층화된 편평 상피의 층을 통한 접근을 갖는 항원을 제공한다. 협측 전달은 랑게르한스 세포를 또한 표적으로 하고, 전신 반응을 유도한다.

- [0110] *아주반트*
- [0111] 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 감소시키는 시토킨을 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 올리고뉴클레오타이드 서열의 사용, 폴리머라제 연쇄 반응, 및 원하는 뉴클레오타이드 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 $\pm 10\%$ 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 결함 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 내로 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.

[0131] 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.

[0133] 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 그러하였으나, 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 벡터는 4 개의 바이러스/벡터 조합 중 가장 강력하였다.

[0140] 벡터 게놈 카피 수

[0141] 감염 후, 벡터는 세포 내에서 복제되고, 벡터 게놈 카피 수는 QPCR에 의해 측정될 수 있다. 벡터 DNA 복제는 심지어 바이러스 복제 및 증식을 완전히 허용하지 않는 세포에서도 발생할 수 있다. 벡터 DNA의 QPCR은 바이러스가 복제 주기를 완료하고 성숙한 바이러스 자손으로서 방출되는 능력과 독립적으로, 감염된 세포 내에서 벡터 복제의 척도를 제공한다. 따라서, 벡터 복제는 ChAd 바이러스 복제 또는 증식을 허용하지 않는 동물 종, 조직 유형 및 세포 유형에서 정량화될 수 있다.

[0142] 벡터 게놈 카피 수를 벡터 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 벡터 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 벡터에서의 트랜스진 발현의 수준을 비교하기 위해 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. MRC5 세포를 세포당 250 또는 1250 개의 바이러스 입자의 moi에서 ChAd155 RC1 또는 ChAd155 RC2 벡터로 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) 벡터가 복제 결함 ChAd155 RD 및 ChAd83 RD 벡터 각각보다 더 높은 수준으로 트랜스진을 발현한다는 것을 입증한다. 광견병 당단백질에 대한 항체로 프로빙하였을 때, 블롯의 좌측에 막대에 의해 표시되는 바와 같이, 광견병 당단백질의 예상 분자량에 상응하는 약 51 kDa의 밴드가 관찰되었다.

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

[0148] 감염 후 2 일에, ChAd155에 의한 낮은 수준의 발현이 hCMV (RC1) 또는 CASI (RC2) 프로모터로부터 유도되었을 때 웨스턴 블롯에 의해 관찰되었다. ChAd83에 의한 트랜스진의 피크 발현은 감염 2 일 후에 관찰되었는데, 이는 ChAd83 벡터가 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 벡터가 우측 배향으로 CMV 프로모터를 위치시키고, 결실된 E3 영역에 위치한 RC1 벡터보다 더 강력하게 트랜스진을 발현한다는 것을

입증한다 (도 1).

[0151] 실시예 4: 복제 가능 아데노바이러스 계통 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 계통 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 배로 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). 배로 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. 배로 영장류 세포주는, 한다 하더라도, ChAd83 RC1 또는 ChAd83 RC2에 대해 잘 허용하지 않았다. ChAd83 RC1 또는 ChAd83 RC2 벡터는 50의 moi에서 배로 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 블롯 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 수확하고, 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 트랜스진에 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 블롯 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 블롯을 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 백터의 면역원성
- [0162] T 세포 반응을 유도하기 위한 ChAd155 RD 백터의 면역학적 효능을 Balb/c 마우스, 군당 6 마리 마우스에서의 ChAd155 RC1 및 ChAd83 RC1 백터의 것과 비교하였다. 백터를 10^5 및 10^6 바이러스 입자의 용량으로 근육내 주사하였다. 면역화 3 주 후에, 동물을 희생시키고, 면역화된 마우스의 비장세포를 분리하고, 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 백터에 대해 더 높은 용량에서 더 강력하였다. ChAd155 RC1은 등가의 ChAd155 RD 또는 ChAd83 RC1 백터 용량보다 면역 반응을 유도하는 데 더 강하였다. 이들 결과는 실시예 4 및 도 6에 제시한 데이터와 일치하였고, 이는 ChAd155 RC1 백터와 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 백터의 면역원성
- [0165] ChAd155-RD 및 ChAd155 RC1 백터의 면역학적 효능을 마우스에서 평가하고; 복제 결함 및 복제 가능 ChAd155 백터를 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 초과 중화 항체 역가를 가졌다 (점선). ChAd155 RD의 경구 투여는 6 마리의 마우스 중 4 마리가 보호 역치 초과 중화 항체 역가를 생산하는 결과를 초래하였다.
- [0168] ChAd155 RC1을 근육내 투여할 때, 모든 6 마리의 마우스는 보호 역치 초과 중화 항체 역가를 가졌다. ChAd155 RD의 근육내 투여는 6 마리 마우스 중 5 마리가 보호 역치 초과 중화 항체 역가를 생성하는 결과를 초래하였다.
- [0169] ChAd155 RC1 백터로 면역화된 마우스의 중화 역가는 경구 또는 IM 투여되는지 관계 없이 ChAd155 RD 백터로 면역화된 것보다 더 높았다. 이는 본 발명의 복제 가능 ChAd155 백터가 경구 또는 근육내 투여되든지 간에 트랜스제닉 항원에 대한 항체 반응을 유도하는 데 있어서 복제 결함 ChAd155 백터보다 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 백터로 면역화된 마우스의 T 세포 반응은 경구 또는 IM 투여되는지 관계 없이 ChAd155 RD 백터로 면역화된 것보다 더 높았다. 이는 본 발명의 복제 가능 ChAd155 백터가 경구 또는 근육내 투여되든지 간에 트랜스제닉 항원에 대한 세포성 면역 반응을 유도하는 데 있어서 복제 결함 ChAd155 백터보다 더 효과적이라는 것을 입증한다.

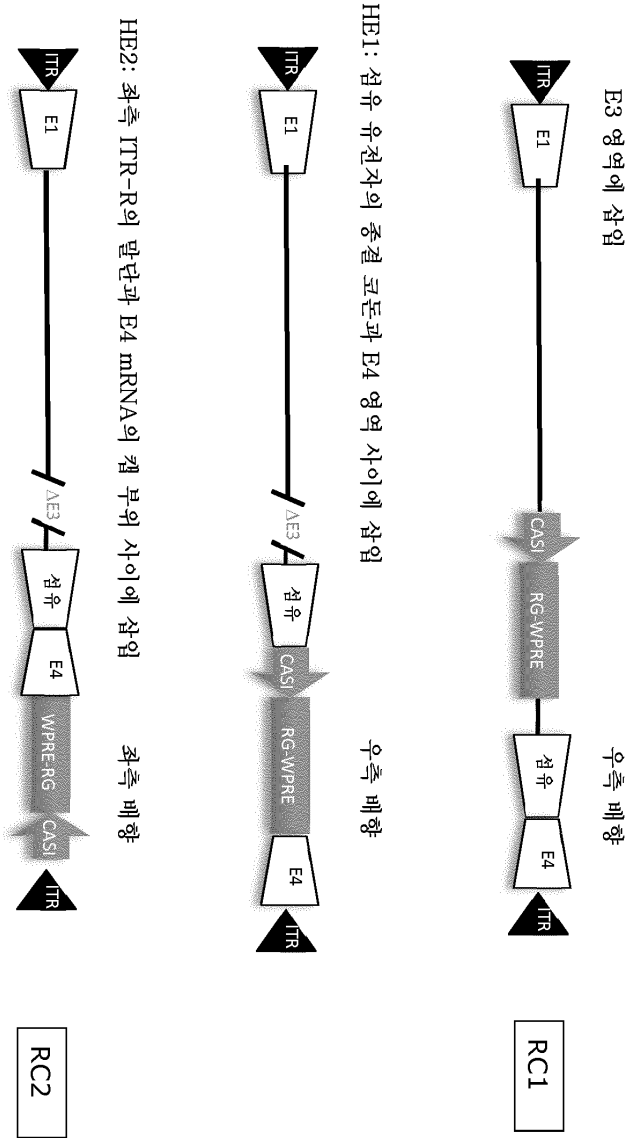
[0173] 실시예 8: 돼지에서의 복제 가능 벡터의 면역원성

[0174] 통상 돼지 또는 멧돼지로서 공지된 멧돼지 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 1×10^{10} - 1×10^{12} 개 바이러스 입자의 용량으로 근육내 또는 비강내 전달되는 복제 가능 ChAd155 또는 ChAd83 벡터로 면역화될 수 있다. 수집된 혈청 샘플을 중화 항체, T 세포 반응 및 B 세포 반응에 대해 분석할 수 있다. 백신 접종 후 shedding(shedding)은 비내 분비물, 타액 또는 분변을 수집함으로써 모니터링할 수 있다. 바이러스가 shedding되는 부위는 그의 생체분포를 나타낼 수 있고, 예를 들어 shedding이 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.

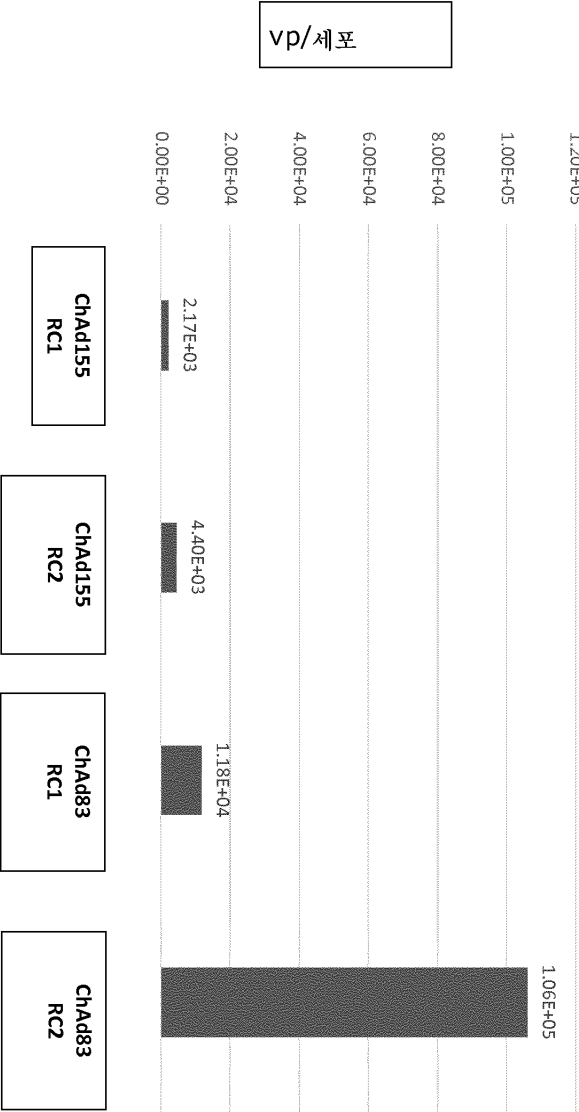
[0175] 일단 본 발명의 벡터의 면역원성이 근육내 및 비강내 투여를 통해 돼지 모델에서 입증되면, 설하 투여를 포함한 다른 경로를 통해 면역원성을 시험할 수 있다. 실험 설계는 복제 가능 및 복제 결함 벡터의 비교, ChAd155 및 ChAd83 벡터의 비교, 구축물 내의 다양한 위치에서의 CASI 및 CMV 프로모터를 포함한 프로모터의 비교, 다양한 인핸서 요소, 예를 들어 WPRE의 효과의 비교, 및 설하 경로와 다른 면역화 경로의 비교를 포함할 수 있다.

도면

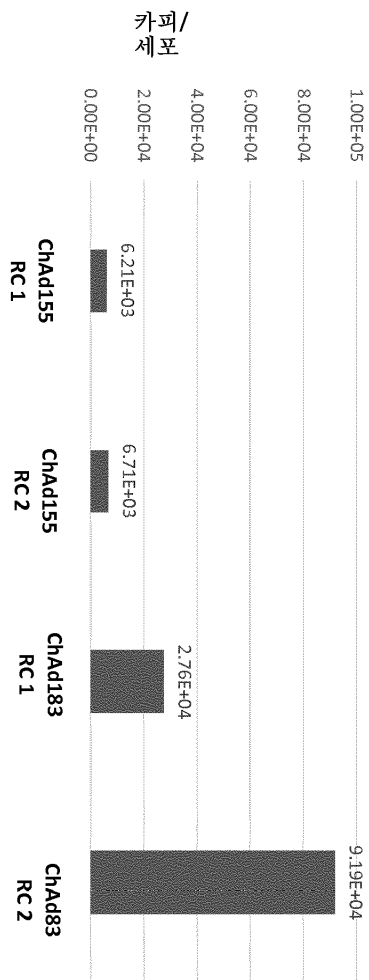
도면1



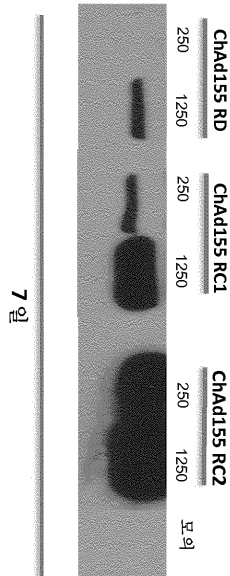
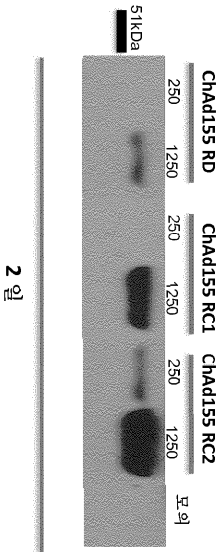
도면2



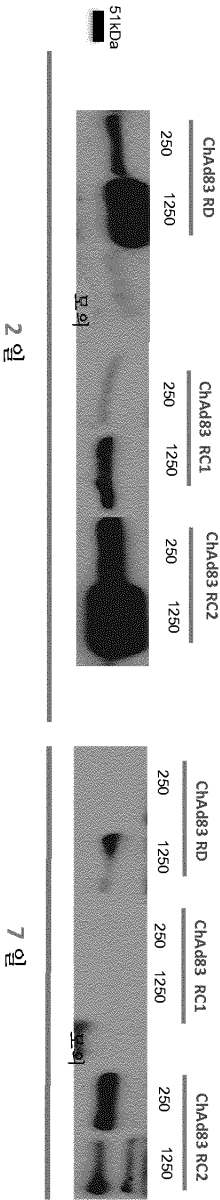
도면3



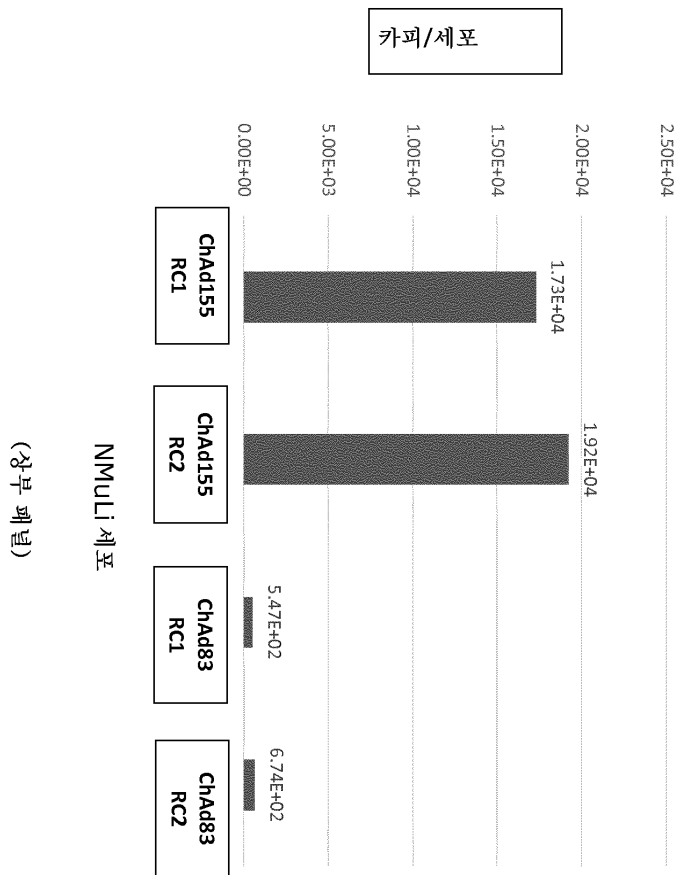
도면4



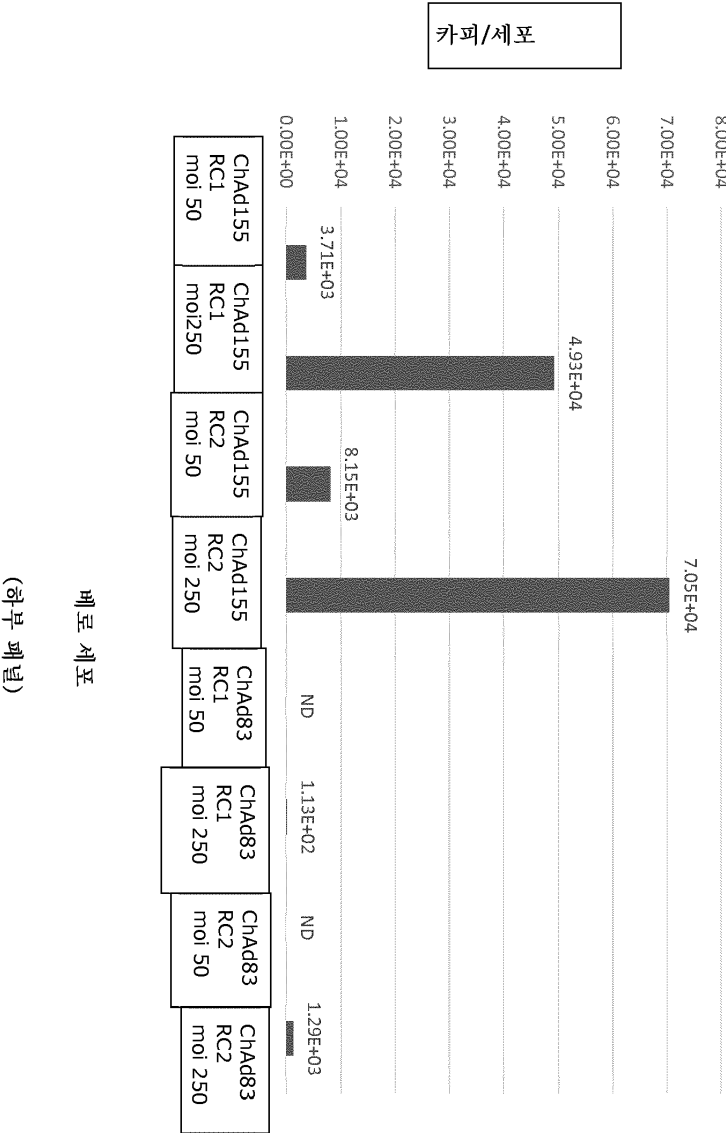
도면5

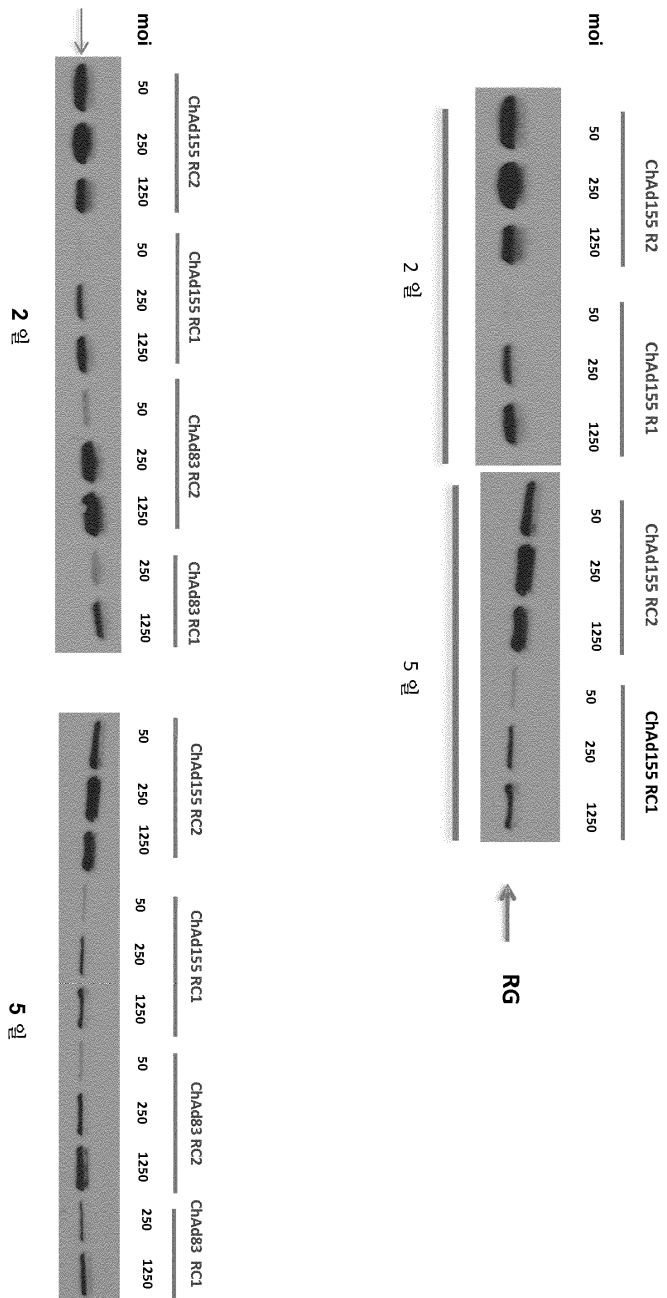


도면6a

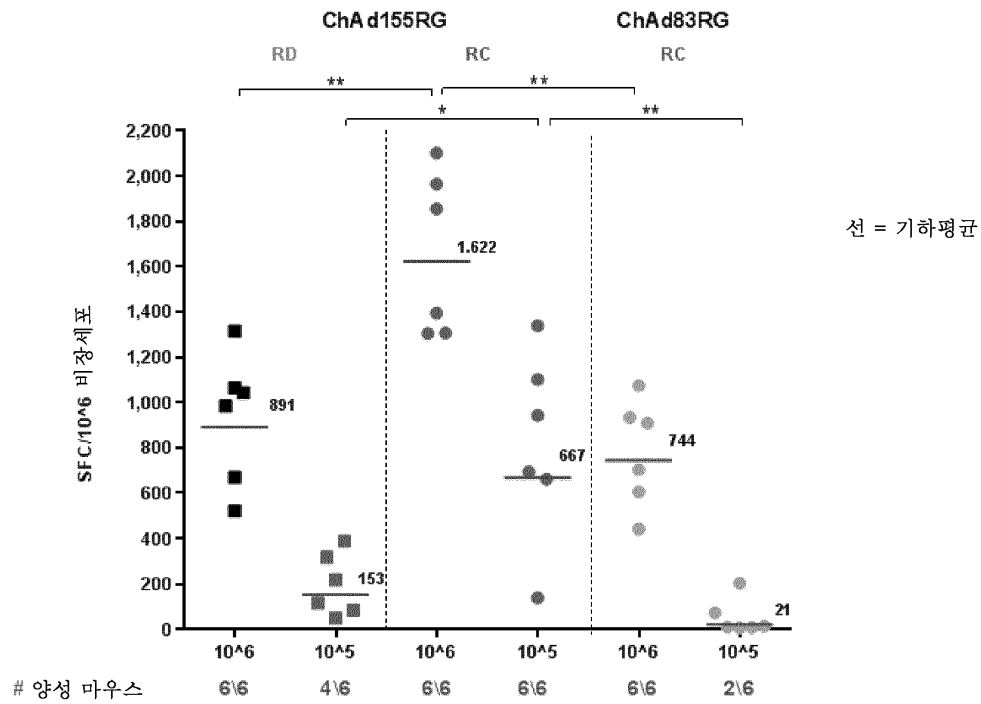


도면6b

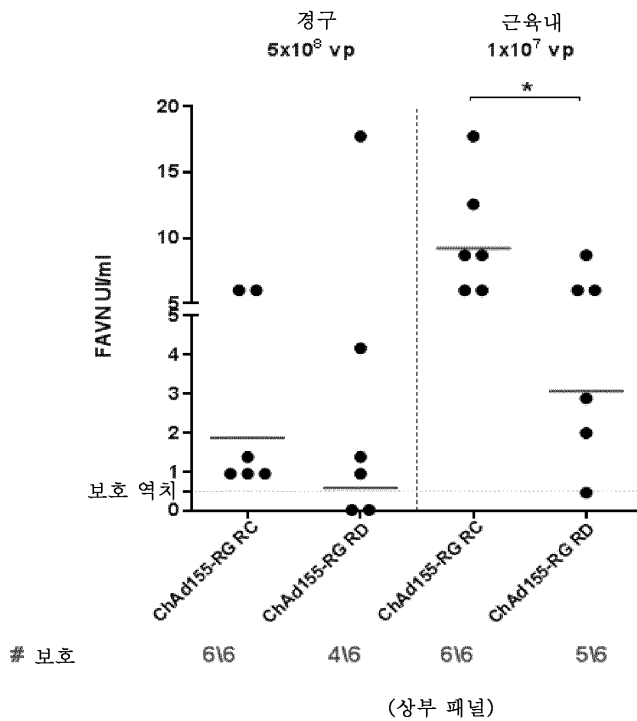




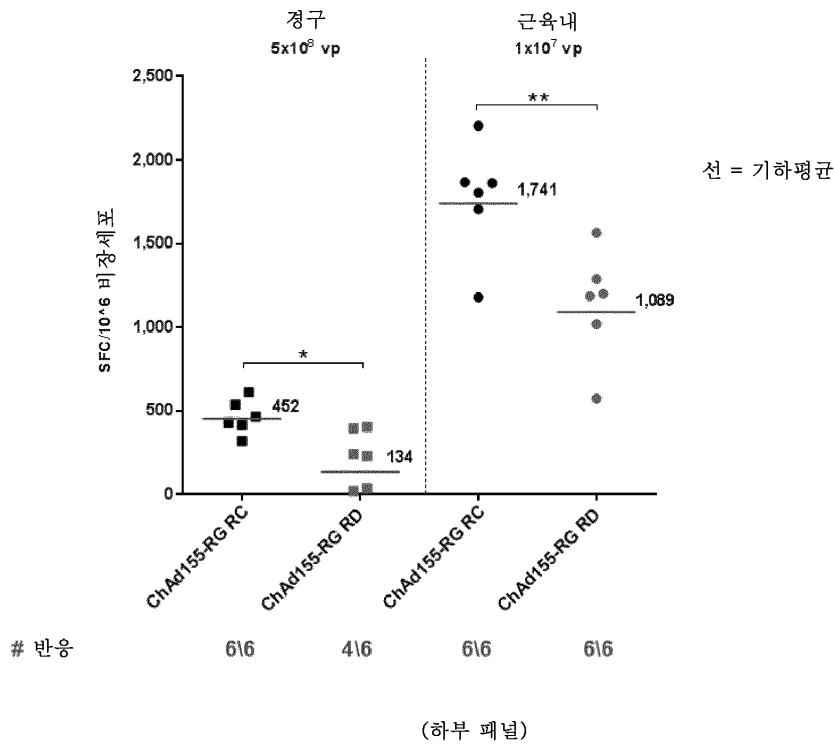
도면8



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 aatatacctt attttggatt gaagccaata tgataatgag atgggcggcg 60

cggggcggga ggcggttccg ggggcgggcc ggcgggcggg gcggtgtggc ggaagtggac 120

tttctaagtg tggcggatgt gacttgctag tgccgggcgc ggtaaaagtg acgttttccg 180

tgcgcgacaa cgccacggg aagtgcatt tttccgcgg tttttaccgg atgtttagt	240
gaatttgggc gtaaccaagt aagatttggc cattttcgcg gaaaaactga aacggggaag	300
tgaaatctga ttaatttcgc gttatgcata ccgcgtaata tttgtcgagg gccgaggac	360
tttggccgat tacgtggagg actcgcgcag gtgttttttg aggtgaattt ccgcgttccg	420
ggtcaaagtc tccgttttat tattatagtc agctgacgcg gagtgtattt ataccctctg	480
atctcgtcaa gtggccactc ttgagtcca gcgagtagag ttttctctc tgccgtctc	540
cgctccgctc cgctcggctc tgacaccggg gaaaaaatga gacatttcac ctacgatggc	600
ggtgtgctca ccggccagct ggctgctgaa gtcctggaca ccctgatcga ggaggtattg	660
gccgataatt atctcctc gactcctttt gagccaccta cacttcacga actctacgat	720
ctggatgtgg tggggcccag cgatccgaac gacgagcgg tttccagttt tttccagag	780
tccatgttgt tgccagcca ggagggggtc gaacttgaga cccctctcc gatcgtggat	840
tccccgatc cgccgcagct gactaggcag cccgagcgt gtgcgggacc tgagactatg	900
ccccagctgc tacctgaggt gatcgatctc acctgtaatg agtctggttt tccaccagc	960
gaggatgagg acgaagagg tgagcagttt gtgttagatt ctgtggaaca acccgggcga	1020
ggatgcaggt ctgtcaata tcaccgaaa aacacaggag actcccagat tatgtttct	1080
ctgtgttata tgaagatgac ctgtatgttt atttacagta agtttatcat ctgtgggcag	1140
gtgggcata gtgtgggtgg tggcttttgg ggggtttttt aatatatgtc aggggttatg	1200
ctgaagactt tttattgtg atttttaag gtccagtgc tgagcccag caagaacctg	1260
aaccggagcc tgagccttct cgccccagga gaaagcctgt aatcttaact agaccagcg	1320
caccgtagc gagaggctc agcagcgcgg agaccaccga ctccggtgct tcctcatcac	1380
ccccggagat tcacccctg gtgcccctgt gtcccgttaa gccgttgcc gtgagagtca	1440
gtgggcggcg gtctgctgtg gactgcattg aggacttgct tttgattca caggaacctt	1500
tggacttag ctigaaacgc ccaggcatt aaacctggc acctggactg aatgagtga	1560
cgctatgtt tgcttttgaa tgacttaatg tgtatagata ataaagagt agataatgtt	1620
ttaattgcat ggtgtgttta acttgggcgg agtctgctgg gtatataagc ttccctgggc	1680
taaaacttgt tacactgac ctcatggagg cctgggagt tttggagaac tttgccggag	1740
ttcgtgcctt gctggacgag agctctaaca atacctctg gtggtggagg tatttgtggg	1800
gtctcccca gggcaagtta gttttagaa tcaaggagga ttacaagtgg gaatttgaag	1860
agcttttgaa atcctgttgt gagctattgg attctttgaa tctaggccac caggctctct	1920
tccaggagaa ggtcatcagg actttggatt tttccacacc ggggcgcatt gcagccgcgg	1980
ttgcttttct agcttttttg aaggatagat ggagcgaaga gaccacttg agttcgggct	2040

acgtcctgga ttttctggcc atgcaactgt ggagagcatg gatcagacac aagaacaggc 2100
tgcaactgtt gtcttccgtc cgcccgttgc tgattccggc ggaggagcaa caggccgggt 2160
cagaggaccg ggcccgtcgg gatccggagg agagggcacc gaggccgggc gagaggagcg 2220
cgctgaacct gggaaccggg ctgagcggcc atccacatcg ggagtgaatg tcgggcaggt 2280

ggtaggatctt tttccagaac tgcggcggat ttgactatt agggaggatg ggcaatttgt 2340
taagggtctt aagagggaga ggggggcttc tgagcataac gaggaggcca gtaatttagc 2400
ttttagcttg atgaccagac accgtccaga gtgcatcact tttcagcaga ttaaggacaa 2460
ttgtgccaat gagttagtc tgttgggtca gaagtatagc atagagcagc tgaccactta 2520
ctggctgcag ccgggtgatg atctggagga agctattagg gtgtatgcta aggtggccct 2580
gcggcccgat tgcaagtaca agctcaaggg gctgggtgaat atcaggaatt gttgctacat 2640
ttctggcaac ggggcggagg tggagataga gaccgaagac agggtaggctt tcagatgcag 2700

catgatgaat atgtggccgg gggtagctggg catggacggg gtggtagatta tgaatgtgag 2760
gttcacgggg cccaacttta acggcacggg gtttttgggg aacaccaacc tggctctgca 2820
cggggtgagc ttctatgggt ttaacaacac ctgtgtggag gcctggaccg atgtgaagg 2880
ccgcggttgc gccttttatg gatgttggaa ggccatagtg agccgcccta agagcaggag 2940
ttccattaag aaatgcttgt ttgagagggt caccttgggg atcctggccg agggcaactg 3000
cagggtgcgc cacaatgtgg cctccgagtg cggttgcttc atgctagtca agagcgtggc 3060
ggtaatcaag cataatatgg tgtgcggcaa cagcgaggac aaggcctcac agatgctgac 3120

ctgcacggat ggcaactgcc acttgctgaa gaccatccat gtaaccagcc acagccggaa 3180
ggcctggccc gtgttcgagc acaacttgct gaccgctgc tccttgcatc tgggcaacag 3240
gcgggggggtg ttctgcctt atcaatgcaa ctttagtcac accaagatct tgctagagcc 3300
cgagagcatg tccaaggatg acttgaacgg ggtgtttgac atgacatga agatctggaa 3360
ggtgctgagg tacgacgaga ccaggccccg gtgcagacc tgcgagtgcg ggggcaagca 3420
tatgaggaac cagccccgtg tgctggatgt gaccgaggag ctgaggacag accacttgg 3480
tctggcctgc accagggccg agtttgggtc tagcgatgaa gacacagatt gaggtgggtg 3540

agtgggcgtg gcctgggggtg gtcataaaaa tatataagtt gggggtctta ggtctcttt 3600
atttgtgtt cagagaccgc cggagccatg agcgggagca gcagcagcag cagtagcagc 3660
agcgccttgg atggcagcat cgtgagccct tatttgacga cgcgatgcc cactgggcc 3720
ggggtgcgtc agaattgat gggctccagc atcgacggcc gaccgtcct gcccgcaaat 3780
tccgccacgc tgacctatgc gaccgtcgcg gggacgccgt tggacgccac cgcccgccc 3840
gccgccaccg cagccgcctc ggccgtgcgc agcctggcca cggactttgc attcctggga 3900

ccactggcga caggggctac ttctcgggcc gctgctgccg ccgttcgcga tgacaagctg 3960

accgccctgc tggcgcagtt ggatgcgctt actcgggaac tgggtgacct ttctcagcag 4020

gtcatggccc tgcgccagca ggtctcctcc ctgcaagctg gcgggaatgc ttctccaca 4080

aatgccgttt aagataaata aaaccagact ctgtttggat taaagaaaag tagcaagtgc 4140

attgctctct ttatttcata attttcgcg cgcgataggc cctagaccag cgttctcggt 4200

cgttgagggt gcggtgtatc ttctccagga cgtggtagag gtggctctgg acgttgagat 4260

acatgggcat gagcccgctc cgggggtgga ggtagcacca ctgcagagct tcatgctccg 4320

gggtggtgtt gtagatgac cagtcgtagc aggagcgtg ggcatggtgc ctaaaaatgt 4380

ccctcagcag caggccgatg gccaggggga ggcccttgggt gtaagtgttt acaaacgggt 4440

taagtggga aggggtgcatt cggggagaga tgatgtgcat cttggactgt attttagat 4500

tggcgtgttt tccgccaga tcccttctgg gattcatgtt gtgcaggacc accagtacag 4560

tgtatccgtt gcacttgggg aatttgtcat gcagcttaga gggaaaagcg tggaagaact 4620

tggagacgcc ttgtggcct cccagatttt ccatgcattc gtccatgatg atggcaatgg 4680

gcccgcggga ggagcttgg gcaaagatai ttctggggtc gctgacgtcg tagttgtgtt 4740

ccagggtgag gtcgtcatag gccattttta caaagcgcgg gcggagggtg cccgactggg 4800

ggatgatggt cccctctggc cctggggcgt agttgccctc gcagatctgc atttccagg 4860

ccttaatctc ggagggggga atcatatcca cctgcggggc gatgaagaaa acggtttccg 4920

gagccgggga gattaactgg gatgagagca ggtttctaag cagctgtgat ttccacaac 4980

cgggtggccc ataaataaca cctataaccg gttgcagctg gtagtttaga gagctgcagc 5040

tgccgtctc cgggaggagg ggggccacct cgttagcat gtccctgacg cgcatttct 5100

ccccgaccag atccgccaga aggcgctcgc cggccaggga cagcagctct tgcaaggaag 5160

caaagttttt cagcggttg aggcgctccg ccgtgggcat gtttttcagg gtctggctca 5220

gcagctccag gcggtccag agctcgggtga cgtgctctac ggcatctcta tccagcatat 5280

ctctctgttt cgcgggttgg ggcgactttc gctgtagggc accaagcgggt ggtcgtccag 5340

cggggccaga gtcatgtcct tccatgggcg cagggtcctc gtcagggtgg tctgggtcac 5400

ggtgaagggg tgcgtccgg gctgagcgt tgccaagggt cgcttgaggc tggttctgct 5460

ggtgtctaag cgtgccggt cttgccctg cgcgtcggcc aggtagcatt tgaccatggt 5520

gtcatagtcc agccccctcg cggcgtgtcc cttggcgcgc agcttgccct tggaggtggc 5580

gccgcacgag gggcagagca ggctcttag cgcgtagagc ttgggggcga ggaagaccga 5640

ttcgggggag taggcgtccg cgccgcagac cccgcacacg gtctcgact ccaccagcca 5700
 ggtgagctcg gggcgcgcg ggtcaaaaac caggtttccc ccatgctttt tgatgcgttt 5760
 cttaacctcg gtctccatga ggtggtgtcc ccgctcggtg acgaagaggc tgtccgtgtc 5820
 tccgtagacc gacttgaggg gtcttttttc caggggggtc cctcggcttt cctcgtagag 5880
 gaactcggac cactctgaga cgaaggcccg cgtccaggcc aggacgaagg aggctatgtg 5940
 ggaggggtag cggtcgttgt ccactagggg gtccaccttc tccaagggtg gaagacacat 6000
 gtcgccttcc tcggcgcca ggaaggtagt tggctttag gtgtaggcca cgtgaccggg 6060

 ggttcctgac gggggggtat aaaagggggt gggggcgcgc tcgtcgtcac tctcttccgc 6120
 atcgtgtct gcgaggcca gctgctgggg tgagtattcc ctctcgaagg cgggcatgac 6180
 ctccgcgtg aggttgtcag ttccaaaaa caggaggat ttgatgttca cctgtcccga 6240
 ggtgatacct ttgaggtag ccgctccat ctggtcagaa aacacgatct ttttattgtc 6300
 cagcttgggt gcgaacgacc cgtagagggc gttggagagc agcttggcga tggagcgag 6360
 ggtctggttc ttgtccctgt cggcgcgtc cttggccgcg atgttagct gcacgtactc 6420
 gcgcgcgacg cagcgccact cggggaagac ggtggtgcgc tcgtcgggca ccaggcgac 6480

 gcgccagccg cggttgtgca gggtagaccg gtccacgctg gtggcgacct cgccgcgag 6540
 gcgctcgttg gtccagcaga gacggccgcc ctgcgcgag cagaaggggg gcagggggtc 6600
 gagctgggtc tcgtccgggg ggtccgcgtc caggtgaaa accccggggc gcaggcgcg 6660
 gtcgaagtag tctatcttgc aaccttgcat gtccagcgcc tgctgccagt cgcgggcggc 6720
 gagcgcgcg tcgtaggggt tgagcggcgg gcccagggc atggggtggg tgagtgcgga 6780
 ggctacatg ccgcagatgt catagacgta gaggggctcc cgcaggaccc cgatgtaggt 6840
 ggggtagcag cggcccgccg ggatgctggc gcgcacgtag tcatacagct cgtgcgaggg 6900

 ggcgaggagg tcggggccca ggttggtgcg ggcggggcgc tccgcgcgga agacgatctg 6960
 cctgaagatg gcatgcgagt tggaagagat ggtggggcgc tggaagacgt tgaagctggc 7020
 gtctgcagg ccgacggcgt cgcgcacgaa ggaggcgtag gagtgcgca gcttgtgtac 7080
 cagctcggcg gtgacctgca cgtcgagcgc gcagtagtcg aggtctcgc ggatgatgtc 7140
 atatttagcc tgccccctt tttccacag ctgcggttg aggacaaact cttcgcggtc 7200
 tttccagtac tcttgatgc ggaaccgtc cgttccgaa cggttaagagc ctagcatgta 7260
 gaactggttg acggcctggt aggcgcagca gcccttctcc acggggaggg ctaggcctg 7320

 cgcggccttg cggagcgagg tgtgggtcag ggcgaagggt tccctgacca tgactttgag 7380
 gtactggtgc ttgaagtcgg agtcgtcgca gccgccccgc tcccagagcg agaagtcggt 7440
 gcgcttcttg gagcgggggt tgggcagagc gaaggtgaca tcgttgaaga ggattttgcc 7500

cgcgcggggc atgaagttgc gggatgatgcg gaaggggccc ggcacttcag agcggttgtt 7560
gatgacctgg gggcgagca cgatctctgc gaagccgttg atgttgtggc ccacgatgta 7620
gagttccagg aagcggggcc ggccctttac ggtgggcagc ttcttttagct ctctcgtagg 7680
gagctcctcg ggcgaggcga ggccgtgctc ggccagggcc cagtccgcga ggtgcgggtt 7740

gtctctgagg aaggacttcc agaggtcgcg ggccaggagg gtctgcaggc ggtctctgaa 7800
ggtcctgaac tggcgggcca cggccatttt ttcggggggtg atgcagtaga aggtgagggg 7860
gtcttctgctc cagcgggtccc agtcgagctg cagggcgagg tcgcgcgcgg cggtgaccag 7920
gcgctcgtcg cccccgaatt tcatgaccag catgaagggc acgagctgct ttccgaaggc 7980
ccccatccaa gtgtaggctc ctacatcgta ggtgacaaag aggcgctccg tgcgaggatg 8040
cgagccgatc gggaagaact ggatctcccg ccaccagttg gaggagtggc tgttgatgtg 8100
gtggaagtag aagtcccgtc gccggggccga aactcgtgc tggcttttgt aaaagcgagc 8160

gcagtactgg cagcgtgca cgggctgtac ctcatgcacg agatgcacct ttccccgcg 8220
cacgaggaag ccgaggggaa atctgagccc cccgcctggc tcgcggcatg gctggttctc 8280
ttctactttg gatgcgtgct cgtctccgtc tggctcctcg aggggtgtta cggtgagcgc 8340
gaccaccacg ccgcgcgagc cgcaggtcca gatatcggcg cgcggcggct ggagtttgat 8400
gacgacatcg cgcagctggg agctgtccat ggtctggagc tcccgcggcg gcggcaggtc 8460
agccgggagt tcttgaggt tcacctcgca gattcgggcc agggcgcggg gcaggtctag 8520
gtggtacctg atctctaggg gcgtgttggg ggccggcgtc atggcttgca ggagcccga 8580

gccccggggg gcgacgacgg tggccgcgg ggtggtggtg gtggtggcgg tgcagctcag 8640
aagcggtgcc gcggcggggc ccccgaggt aggggggggt ccggtcccgc gggcaggggc 8700
ggcagcgga cgtcgcgctg gagcggggc aggagttggt gctgtgcccg gaggttgctg 8760
gcgaaggcga cgacgcggcg gttgatctcc tggatctggc gcctctgctg gaagacgacg 8820
ggccccgtga gcttgaacct gaaagagat tcgacagaat caatctcggt gtcattgacc 8880
gcggcctggc gcaggatctc ctgcacgtct cccgagttgt cttgtaggc gatctcgcc 8940
atgaactgct cgatctcttc ctctggagg ttccgcgtc cggcgcttc cacggtggcc 9000

gccaggtcgt tggagatgcg ccccatgagc tgcgagaagg cgttgagtcc gccctcgttc 9060
cagactcgcc ttagaccac gcccccctgg tcatcgcggg cgcgcatgac cacctgcgcg 9120
agggttagct ccacgtgccg cgcgaagacg gcgtagttgc gcagacgctg gaagaggtag 9180
ttgagggtgg tggcgggtg ctcggccacg aagaagtca tgaccagcg gcgcaacgtg 9240
gattcgttga tgtccccaa ggcctccagc cgttccatgg cctcgtagaa gtccacggcg 9300
aagttgaaaa actgggagtt gcgcgccgac acggtcaact cctctccag aagacggatg 9360

agctcggcga cggtgtcgcg cacctcgcg tcgaaggcta tggggatctc ttcctccgct	9420
agcatcacca cctcctctc ttcctcctct tctggcactt ccatgatggc ttcctcctct	9480
tcgggggggtg gcggcgccgg cggtggggga gggggcgctc tgcgccggcg gcggcgacc	9540
gggaggcgggt ccacgaagcg cgcgatcatc tcccccgggc ggccggcgcat ggtctcggtg	9600
acggcgccggc cgttctcccg gggcgcgagt tggaaagacg cgcggacat ctggtgctgg	9660
ggcggtggc cgtgaggcag cgagacggcg ctgacgatgc atctcaaca ttgctgcgtg	9720
ggtacccgc cgaggacgt gagggagtcc atatccaccg gatccgaaaa ctttcgagg	9780
aaggcgtcta accagtcgca gtcgaagggt aggctgagca ccgtggcggg cgccgggggg	9840
tggggggagt gtctggcgga ggtgctgctg atgatgtaat tgaagtaggc ggactigaca	9900
cgccggatgg tcgacaggag caccatgtcc ttgggtccgg cctgctggat gcggaggcgg	9960
tcggctatgc cccaggtctt gttctggcat cggcgcgagt cctttagta gtcttgcgtg	10020
agcctttcca ccggcacctc ttcctcttc tcttctgctt cttccatgtc tgcttcggcc	10080
ctggggcggc gccgcgccc cctgcccc atgcgcgtga ccccgaaacc cctgagcgggt	10140
tggagcaggg ccaggtcggc gacgacgcgc tcggccagga tggcctgctg cacctgcgtg	10200
agggtggttt ggaagtcac caagtcacg aagcgggtgt aggcgcccgt gttgatggtg	10260
taggtgcagt tggccatgac ggaccagtgt acggtctggt ggcccgttg cgacatctcg	10320
gtgtacctga gtgcgagta ggccggggag tcgaagacgt agtcgttgca agtcgcacc	10380
aggtactggt agcccaccg gaagtgcggc ggccgctggc ggtagagggg ccagcgcagg	10440
gtggcggggg ctccgggggc caggctcttc agcatgaggc ggtggtaggc gtagatgtac	10500
ctggacatcc aggtgatacc cgcggcgggt gtggaggcgc gcgggaagtc gcgcaccgg	10560
ttccagatgt tgcgcagggg cagaaagtgc tccatgtag gcgtgctctg tccagtcaga	10620
cgcgcgcagt cgttgatact ctagaccagg gaaaacgaaa gccggtcagc gggcactctt	10680
ccgtggtctg gtgaatagat cgcaagggtg tcatggcgga gggcctcggt tcgagccccg	10740
ggtccgggcc ggacggtccg ccatgatcca cgcggttacc gcccgctgt cgaaccagg	10800
tgtgcgacgt cagacaacgg tggagtgttc cttttggcgt tttctggcc gggcgccggc	10860
gcccgtaag agactaagcc gcgaaagcga aagcagtaag tggctcgctc cccgtagccg	10920
gagggatect tgctaagggt tgcgttgcgg cgaaccccg ttcgaatccc gtactcgggc	10980
cggccggacc cgcggctaag gtgttgatt ggcctcccc tcgtataaag accccgcttg	11040
cggattgact ccggacacgg ggacgagccc cttttatttt tgctttccc agatgcatcc	11100

ggtgctgcgg cagatgcgcc ccccgcccca gcagcagcaa caacaccagc aagagcggca	11160
gcaacagcag cgggagtcac gcagggccccc ctaccaccacc ctggcggggc cggccacctc	11220
ggcgtccgcg gccgtgtctg gcgcctgcgg cggcgggcggg gggccggctg acgaccccga	11280
ggagcccccg cggcgagggg ccagacacta cctggacctg gaggagggcg agggcctggc	11340
gcggctgggg gcgccgtctc ccgagcgcca cccgcgggtg cagctgaagc gcgactcgcg	11400
cgaggcgtag gtgcctcggc agaacctgtt cagggaccgc gcggcgagg agcccagga	11460
gatgcgggac aggaggttca gcgcagggcg ggagctgcgg caggggctga accgcgagcg	11520
gctgctgcgc gaggaggact ttgagcccga cgcgcggacg gggatcagcc ccgcgcgcgc	11580
gcacgtggcg gccgccgacc tggtagcggc gtacgagcag acggtgaacc aggagatcaa	11640
cttccaaaag agtttcaaca accacgtgcg cagctggtg gcgcgcgagg aggtgacct	11700
cgggctgatg cacctgtggg actttgtaag cgcgtggtg cagaaccca acagcaagcc	11760
tctgacggcg cagctgttcc tgatagtga gcacagcagg gacaacgagg cgtttaggga	11820
cgcgtgctg aacatcaccg agcccaggg tcggtggctg ctggacctga ttaacatcct	11880
gcagagcata gtggtgcagg agcgcagcct gaggctggcc gacaaggtgg cggccatcaa	11940
ctactcgatg ctgagcctgg gcaagtttta cgcgcgcaag atctaccaga cccgtacgt	12000
gcccatagac aaggaggatga agatcgacgg tttttacatg cgcatggcg tgaaggctg	12060
cacctgagc gacgacctgg gcgtgtaccg caacgagcgc atccacaagg ccgtgagcgt	12120
gagccggcgg cgcgagctga gcgaccgca gctgatgcac agcctgcagc gggcgctggc	12180
gggcgcggcg agcggcgaca gggaggcgga gtccctacttc gatgcggggg cggacctgcg	12240
ctgggcgccc agccggcggg ccctggaggc cgcgggggtc cgcgaggact atgacgagga	12300
cggcgaggag gatgaggagt acgagctaga ggaggcgag tacctggact aaaccgcggg	12360
tggtgtttcc ggtagatgca agaccgaac gtggtggacc cggcgctgcg ggcggtctg	12420
cagagccagc cgtccggcct taactcctca gacgactggc gacaggtcat ggaccgcatc	12480
atgtcgtga cggcgctaa cccggacgcg ttccggcagc agcccgagc caacaggctc	12540
tccgcatcc tggaggcggg ggtgcctgcg cgtcgaacc ccacgcacga gaaggctgctg	12600
gccatagtga acgcgtggc cgagaacagg gccatccgcc cggacgaggc cgggctgggtg	12660
tacgacgcg tctgcagcg cgtggccgc tacaacagcg gcaacgtgca gaccaacctg	12720
gaccggctgg tgggggacgt gcgcgaggcg gtggcgagc gcgagcgcg ggatcggcag	12780
ggcaacctgg gctccatggt ggcgtgaat gccttcctga gcacgcagcc ggccaacctg	12840
ccgcgggggc aggaagacta caccaacttt gtgagcgcg tgccgctgat ggtgaccgag	12900
acccccaga gcgaggtgta ccagtcgggc cgggactact tcttcagac cagcagacag	12960

ggcctgcaga cggatgaacct gagccaggct ttcaagaacc tgcgggggct gtggggcgtg	13020
aaggcgccca cggcgaccg ggcgacgtg tccagcctgc tgacgcccac ctgcgcctg	13080
ctgctgctgc tgatcgccg gttcacggac agcggcagcg tgtcccggga cacctacctg	13140
gggcacctgc tgacctgta ccgcgaggcc atcgggcagg cgcaggtgga cgagcacacc	13200
ttccaggaga tcaccagcgt gagccgcgcg ctggggcagg aggacacgag cagcctggag	13260
gcgactctga actacctgct gaccaaccgg cggcagaaga ttccctcgct gcacagcctg	13320
acctccgagg aggagcgcat cttgcgctac gtgcagcaga gcgtgagcct gaacctgatg	13380
cgcgacgggg tgacgccag cgtggcgctg gacatgaccg cgcgcaacat ggaaccgggc	13440
atgtacgccg cgcaccggcc ttacatcaac cgcctgatgg actacctgca tcgcgcggcg	13500
gccgtgaacc ccgagtactt taccaacgcc atcctgaacc cgcactggct cccgccgccc	13560
gggttctaca gcgggggctt cgaggtcccg gagaccaacg atggcttcct gtgggacgac	13620
atggacgaca gcgtgttctc cccgcggccg caggcgctgg cggaagcgtc cctgctgcgt	13680
cccaagaagg aggaggagga ggagcgagc cgcgcccgcg gcagcagcgg cgtggcttct	13740
ctgtccgagc tgggggcggc agccgcccgcg cgcgggggt cctggggcg cagccccctt	13800
ccgagcctgg tggggtctct gcacagcgag cgcaccaccc gccctcggct gctgggcgag	13860
gacgagtacc tgaataactc cctgctgcag ccggtgcggg agaaaaacct gcctcccgcc	13920
ttccccaaca acgggataga gagcctggtg gacaagatga gcagatggaa gacctatgcg	13980
caggagcaca gggacgcgcc tgcgctccgg ccgccacgc ggcgccagcg ccacgaccgg	14040
cagcgggggc tgggtgtgga tgacaggac tccgcggacg atagcagcgt gctggacctg	14100
ggaggggagcg gcaaccgtt cgcgcacctg cgcggccgccc tggggaggat gttttaaaaa	14160
aaaaaaaaaa aagcaagaag catgatgcaa aaattaaata aaactcacca aggccatggc	14220
gaccgagcgt tggtttcttg tgttcccttc agtatgcggc gcgcggcgat gtaccaggag	14280
ggacctctc cctcttacga gagcgtggtg ggcgcggcgg cggcggcgcc ctcttctccc	14340
tttgcgtcgc agctgctgga gccgccgtac gtgcctccgc gctacctgcg gcctacgggg	14400
gggagaaaca gcatccgtta ctcgagctg gcgcccctgt tcgacaccac ccgggtgtac	14460
ctggtggaca acaagtcggc ggacgtggcc tcctgaact accagaacga ccacagcaat	14520
tttttgacca cggctatcca gaacaatgac tacagcccg ggcaggccag caccagacc	14580
atcaatctgg atgaccggtc gcactggggc ggcgacctga aaaccatcct gcacaccaac	14640
atgccaacg tgaacgagtt catgttcacc aataagtca aggcgcgggt gatggtgtcg	14700
cgctcgaca ccaaggaaga ccgggtggag ctgaagtacg agtgggtgga gttcgagctg	14760
ccagagggca actactcca gaccatgacc attgacctga tgaacaacgc gatcgtggag	14820

cactatctga aagtgggcag gcagaacggg gtcctggaga gcgacatcgg ggtcaagttc	14880
gacaccagga acttccgcct ggggctggac cccgtgaccg ggctggttat gcccggggtg	14940
tacaccaacg aggccttcca tcccacatc atcctgctgc ccgctgcgg ggtggacttc	15000
acttacagcc gcctgagcaa cctcctgggc atccgcaagc ggcagccctt ccaggagggc	15060
ttcaggatca cctacgagga cctggagggg ggcaacatcc ccgctcct cgtgtggag	15120
gcctaccagg atagcttgaa ggaaaatgag gcgggacagg aggataccgc ccccgccgc	15180
tccgcccg ccgagcagg cgaggatgct gctgacaccg cggccgcgga cggggcagag	15240
gccgacccg ctatggtggt ggaggctccc gagcaggagg aggacatgaa tgacagtgcg	15300
gtgcgcggag acaccttct caccggggg gaggaagc aagcggaggc cgaggccgcg	15360
gccgaggaag agcaactggc ggcagcagc gcggcgccg cgttggccgc ggcggaggct	15420
gagcttgagg ggaccaagc gcgaaggag ccctgatta agccctgac cgaagatagc	15480
aagaagcgca gttacaacct gctcaaggac agcaccaaca ccgctaccg cagctggtac	15540
ctggcctaca actacggcga cccgtcgac ggggtgcgct cctggaccct gctgtgcacg	15600
ccggactga cctgcggctc ggagcaggtg tactggtcgc tgcccacat gatgcaagac	15660
cccgtgacct tccgtccac gcggcaggtc agcaacttc cgggtgtggg cgccgagctg	15720
ctgccgtgc actccaagag ctctacaac gaccaggccg tctactcca gtcacccg	15780
cagttcacct ctctgacca cgtgttcaat cgtttcttg agaaccagat tctggcgcg	15840
ccgccgccc ccacatcac caccgtcagt gaaaacgtt ctgctctac agatcacggg	15900
acgtaccgc tgcgaacag catcggagga gtccagcag tgaccgttac tgaccacaga	15960
cgccgacct gccctactt ttacaaggcc ttgggcatag tctcgccgc gtcctttcc	16020
agccgcatct tttagcaac accacatca gtccatct gatctaccc agcaataact	16080
ccggtgggg actgctgcgc gcgccagca agatgttcg agggcgagg aagcgttccg	16140
agcagcacc cgtgcgctg cggggacct tccgcgccc ctggggagcg cacaacgcg	16200
gccgcgggg gcgaccacc gtggacgac ccatcgactc ggtggtggag caggcgcgca	16260
actacaggcc cgcggtctt accgtggac cgccatcca gaccgtgtg cggggcgcg	16320
ggcgttacg caagctgaag agccgccga agcgcgtgg cgcgccac cgcccgac	16380
ccggggccgc cgcaaacgc gccgcggcg cctgtctcg cggggccaag cgcacgggc	16440
gccgcgccg catgagggcc gcgcgccgt tggccggcg catcacgcc gccacatgg	16500
cccccgta ccgaagacgc gcggccgccc cgccgccgc cgccatcgt gacatggcca	16560

gcaggcgccg gggcaacgtg tactgggtgc gcgactcggg gaccggcacg cgcgtgcccc	16620
tgcgttccg ccccccgcg acttagatg atgtgaaaaa acaacactga gtctcctgct	16680
gttgtgtgta tcccagcggc ggccgcgcg gcagcgtcat gtccaagcgc aaaatcaaag	16740
aagagatgct ccaggtcgtc gcgccggaga tctatgggcc cccgaagaag gaagagcagg	16800
attcgaagcc ccgaagata aagcgggtca aaaagaaaaa gaaagatgat gacgatgccg	16860
atggggaggt ggagtccctg cgcgccacgg cggccaggcg cccggtgcag tgggaaggcc	16920
ggcgcgtaaa gcgcgtcctg cgccccggca ccgcggtggt cttcacgccc ggcgagcgt	16980
ccaccggac tttcaagcgc gtctatgacg aggtgtacgg cgacgaagac ctgctggagc	17040
aggccaacga gcgcttcgga gagtttgcct acgggaagcg tcagcgggcg ctggggaagg	17100
aggacctgct ggcgctgccg ctggaccagg gcaacccac cccagtcctg aagcccgta	17160
ccctgcagca ggtgctgccg agcagcgcac cctccaggc gaagcggggt ctgaagcgcg	17220
agggcggcga cctggcgccc accgtgcagc tcatggtgcc caagcggcag aggctggagg	17280
atgtgctgga gaaaatgaaa gtagaccccg gtctgcagcc ggacatcagg gtccgcccc	17340
tcaagcaggt ggccggggc ctcggcgtgc agaccgtgga cgtggtcatc cccaccggca	17400
actccccgc cgcgccacc actaccgtg cctccacgga catggagaca cagaccgatc	17460
ccgccgcagc cgcagccga gccgccgcg cgacctctc ggccgaggtg cagacggacc	17520
cctggctgcc gccggcgatg tcagctcccc gcgcgcgtcg cgggcgcagg aagtacggcg	17580
ccgccaacgc gtctctgcc gagtacgct tgcaccttc catcgcccc accccggct	17640
accgaggeta tacctaccgc ccggaagag ccaagggttc caccgccgt ccccgccgac	17700
gcgccgccg caccaccgc cgccgccgc gcagaccca gcccgactg gctccagtct	17760
ccgtgaggaa agtggcgcg gacggacaca ccctggtgct gccaggcg cgctaccacc	17820
ccagcatcgt ttaaaagcct gttgtggttc ttgcagatat ggccctcact tgccgcctec	17880
gtttcccggt gccgggatac cgaggaggaa gatcgcccg caggagggt ctggccggcc	17940
gcggcctgag cggaggcagc cgccgcgcg accggcgcg acgcgccacc agccgacga	18000
tgcgcggcgg ggtgctgcc ctgttaatcc cctgatcgc cgcggcgatc ggcgccgtgc	18060
ccgggatcgc ctccgtggcc ttgcaagcgt ccagaggca ttgacagact tgcaaacttg	18120
caaatatgga aaaaaaac ccaataaaaa agtctagact ctcacgtcg cttggtcctg	18180
tgactat ttt gtagaatgga agacatcaac ttgctgcgc tggccccgcg tcacggctcg	18240
cgcccgcttc tgggacactg gaacgatac ggcaccagca acatgagcgg tggcgcttc	18300
agttggggct ctctgtggag cggcatataa agtatcgggt ctgccgttaa aaattacggc	18360
tccccggcct ggaacagcag caggggccag atgttagag acaagttgaa agagcagaac	18420

ttccagcaga aggtgggtgga gggcctggcc tccggcatca acgggggtggt ggacctggcc	18480
aaccaggccg tgcagaataa gatcaacagc agactggacc cccggccgcc ggtggaggag	18540
gtgccgccgg cgctggagac ggtgtccccc gatgggcgtg gcgagaagcg cccgcggccc	18600
gatagggaag agaccactct ggtcacgcag accgatgagc cgccccgta tgaggaggcc	18660
ctgaagcaag gtctgccac cagcggcccc atcgcgccca tggccaccgg ggtggtgggc	18720
cgccacaccc cggccacgct ggacttgctt cggcccgccg atgtgccga gcagcagaag	18780
gcggcacagc cgggccccgc cgcgaccgcc tcccgttctt cggccggtcc tctgcgccgc	18840
gcggccagcg gccccgcgg gggggtcgcg aggcacggca actggcagag cagctgaac	18900
agcatcgtgg gtctgggggt gcggtccgtg aagcgccgcc gatgctactg aatagcttag	18960
ctaacgtgtt gtatgtgtgt atgcgcccta tctcgccgcc agaggagctg ctgagtcgcc	19020
gccgttcgcg cgccccacc caccgccact cggccctca agatggcgac cccatcgatg	19080
atgccgcagt ggtcgtacat gcacatctcg ggccaggacg cctcgagta cctgagcccc	19140
gggctggtgc agttcgcccc cgccaccgag agctacttca gcctgagtaa caagtttagg	19200
aacccccagg tggcgccac gcacgatgtg accaccgacc ggtctcagcg cctgacgctg	19260
cggttcattc ccgtggaccg cgaggacacc gcgtactcgt acaaggcgcg gttcacctg	19320
gccgtgggcg acaaccgct gctggacatg gcctccacct actttgacat ccgcggggtg	19380
ctggaccggg gtcccacttt caagccctac tctggcaccg cctacaactc cctggcccc	19440
aaggcgctc ccaactcctg cgagtgggag caagaggaaa ctcaggcagt tgaagaagca	19500
gcagaagagg aagaagaaga tgctgacggt caagctgagg aagagcaagc agctacaaa	19560
aagactcatg tatatgtca ggctccctt tctggcga aaattagtaa agatggtctg	19620
caaataggaa cggacgctac agctacagaa caaaaaccta tttatgcaga ccctacattc	19680
cagccgaac ccaaatcgg ggagtcccag tggaatgagg cagatgctac agtcgccggc	19740
ggtagagtgc taaagaaatc tactcccatg aaacctgct atggttccta tgcaagaccc	19800
acaaatgcta atggaggta ggggtgacta acggcaaatg cccagggaca gctagaatct	19860
caggttgaaa tgcaattctt ttcaacttct gaaaacgccc gtaacgaggc taacaacatt	19920
cagcccaaat tgggtgtgta tagtgaggat gtgcacatgg agaccccgga tacgcacctt	19980
tcttacaagc ccgcaaaaag cgatgacaat tcaaaaatca tgctgggtca gcagtccatg	20040
ccaacagac ctaattacat cggcttcaga gacaacttta tcggcctcat gtattacaat	20100
agcactggca acatgggagt gcttgcaggc caggcctctc agttgaatgc agtgggtggac	20160
ttgaagaca gaaacacaga actgtcctac cagctcttgc ttgattccat ggggtgacaga	20220
accagatact ttccatgtg gaatcaggca gtggacagtt atgaccaga tgttagaatt	20280

attgaaaatc atggaactga agacgagctc cccaactatt gtttccctct gggtagcata	20340
ggggttaactg acacttacca ggctgttaaa accaacaatg gcaataacgg gggccaggtg	20400
acttggacaa aagatgaaac ttttcagat cgcaatgaaa taggggtggg aaacaatttc	20460
gctatggaga tcaacctcag tgccaacctg tggagaaact tcctgtactc caacgtggcg	20520
ctgtacctac cagacaagct taagtacaac ccttccaatg tggacatctc tgacaacccc	20580
aacacctacg attacatgaa caagcgagtg gtggccccgg ggctgggtgga ctgctacatc	20640
aacctgggcg cgcgtggtc gctggactac atggacaacg tcaacccctt caaccaccac	20700
cgcaatgcgg gcctgcgcta ccgtccatg ctctgggca acgggcgcta cgtgcccttc	20760
cacatccagg tgccccagaa gttctttgcc atcaagaacc tcctcctcct gccgggctcc	20820
tacacctacg agtggaaactt caggaaggat gtcaacatgg tcctccagag ctctctgggt	20880
aacgatctca gggtaggacg gggcagcatc aagttcgaga gcatctgcct ctacgccacc	20940
ttcttcccca tggcccacaa caggccctcc acgctcgagg ccatgctcag gaacgacacc	21000
aacgaccagt cttcaatga ctacctctcc gccgccaaca tgctctacce cataccgcc	21060
aacgccacca acgtcccat ctccatcccc tcgcgcaact gggcggcctt ccgcggctgg	21120
gccttcccc gcctcaagac caaggagacc cctccctgg gctcgggatt cgacccctac	21180
tacacctact cgggtccat tcctacctg gacggcacct tctacctcaa ccacactttc	21240
aagaaggctt cgggtcacctt cgactcctcg gtcagctggc cgggcaacga cgtctgctc	21300
acccccaacg agttcgagat caagcgctcg gtcgacgggg agggctacaa cgtggcccag	21360
tgcaacatga ccaaggactg gttcctggtc cagatgctgg ccaactacaa catcggtac	21420
cagggtctt acatcccaga gagctacaag gacaggatgt actccttctt caggaacttc	21480
cagcccatga gccggcaggt ggtggaccag accaagtaca aggactacca ggaggtgggc	21540
atcatccacc agcacaacaa ctcgggcttc gtgggctacc tcgccccac catgcgcgag	21600
ggacaggcct accccgcaa cttccctat ccgtcatag gcaagaccgc ggtcgacagc	21660
atcaccaga aaaagtctt ctgcgaccgc accctctggc gcatccctt ctccagcaac	21720
ttcatgtcca tgggtgcgct ctcgacctg ggccagaact tgctctacgc caactccgcc	21780
cacgccctcg acatgacctt cgaggtcgac cccatggacg agccaccct tctctatgtt	21840
ctgttcgaag tctttgactt ggtccgggtc caccagccgc accgcggcgt catcgagacc	21900
gtgtacctgc gtacgccctt ctcgccggc aacgccacca cctaaagaag caagccgag	21960
tcatcgccgc ctgcatgccg tcgggttcca ccgagcaaga gctcagggcc atcgtcagag	22020

acctgggatg cgggccctat tttttgggca ctttcgacaa gcgcttcctt ggctttgtct 22080
 cccacacaa gctggcctgc gccatcgtca acacggccgg ccgcgagacc gggggcgtgc 22140
 actggttggc cttgccttgg aaccgcgct ccaaaacatg cttcctcttt gacccttctg 22200
 gcttttcgga ccagcggctc aagcaaactc acgagttcga gtacgagggc ttgtgcgtc 22260
 gcagcgccat cgcctcctgc cccgaccgt gcgtcacct cgaagagtc acccagaccg 22320
 tgcaggggccc cgaactcgcc gcctcgggtc tcttctgtg catgtttctg cagcctttg 22380
 tgcactggcc tcagagtcac atggaccgca accccacat gaacttgctg acgggggtgc 22440

ccaactccat gctccagagc cccaggtcgc agccaccct gcgcccaac caggagcagc 22500
 tctacagctt cctggagcgc cactcgcctt acttcgccg ccacagcgca cagatcagga 22560
 gggccacctc cttctgccac ttgcaagaga tgcaagaagg gtaataacga tgtacacact 22620
 ttttttctca ataatggca tctttttatt tatacaagct cttcggggtt ttcatttccc 22680
 accaccaccg gccgttctgc ccatctggct ctatttagaa atcgaaaggg ttctgccggg 22740
 agtcgccgtg cggccagggc agggacacgt tgcgatactg gtagcgggtg cccacttga 22800
 actcggggcac caccaggcga ggcagctcgg ggaagttttc gctccacagg ctgcgggtca 22860

gcaccagcgc gttcatcagg tcgggcgccg agatcttgaa gtcgcagttg gggccgccgc 22920
 cctgcgcgcg cgagttgcgg tacaccgggt tgcagcactg gaacaccaac agcgcgggtt 22980
 gcttcacgct ggccagcagc ctgcggtcgg agatcagctc gggttcagg tcctcgcgt 23040
 tgctcagcgc gaacggggtc atcttgggca cttgccccc caggaagggc gcgtgccccg 23100
 gtttcgagtt gcagtcgag cgcagcggga tcagcaggtg cccgtgcccg gactcggcgt 23160
 tggggtacag cgcgcgcatg aaggcctgca tctggcggaa ggccatctgg gccttggcgc 23220
 cctccgagaa gaacatgccg caggacttgc ccgagaactg gtttcggggg cagctggcgt 23280

cgtgcaggca gcagcgcgcg tcggtgttgg cgatctgcac cacgttgcgc cccaccgggt 23340
 tcttcacgat ctggccttg gacgattgct ccttcagcgc gcgtgcccg ttctcgttgg 23400
 tcacatccat ctcgatcaca tgttcttgt tcaccatgct gctgccgtgc agacacttca 23460
 gctcgccctc cgtctcgggtg cagcgggtgt gccacagcgc gcagcccggt ggctcgaaag 23520
 acttgtaggt cacctccgcg aaggactgca ggtaccctg caaaaagcgg cccatcatgg 23580
 tcacgaaggc cttgttgcgt ctgaaggctc gctgcagccc gcggtgctcc tcgttcagcc 23640
 aggtcttgca cagggccgcc agcgcctcca cctggtcggg cagcatcttg aagttcacct 23700

tcagctcatt ctccacgtgg tacttgtcca tcagcgtgcg cgccgctcc atgcccttct 23760
 cccaggccga caccagcggc aggtctcagc ggttcttcac catcacctg gccgccgct 23820
 ccgccgcgt ttcgctttcc gccccgtgt tctcttctc ttcctctct tctcgcgcg 23880

cgcccactcg cagccccgcg accacggggt cgtcttcctg caggcgtgc accttgcgct	23940
tgccgttgcg cccctgcttg atgcgcacgg gcgggttgct gaagcccacc atcaccagcg	24000
cggcctcttc ttgctcgcc tcgctgtcca gaatgacctc cggggagggg gggttggtca	24060
tcctcagtag cgaggcacgc tcttttttct tcctgggggc gttcgccagc tccgcggctg	24120
cggccgtgc cgaggtcgaa ggccgagggc tgggcgtgcg cggcaccagc gcgtcctgcg	24180
agccgtcttc gtctcctcg gactcgagac ggaggcgggc ccgttcttc gggggcgcg	24240
ggggcggcgg aggcggcggc ggcgacggag acggggacga gacatcgcc aggggtgggtg	24300
gacggcgggc cgcgccgct ccgcgtcgg gggtggtctc gcgtggtcc tcttcccgac	24360
tggccatctc ccactgctcc ttctcctata ggcagaaaga gatcatggag tctctcatgc	24420
gagtcgagaa ggaggaggac agcctaaccg cccctctga gccctccacc accgcccca	24480
ccaccgcaa tgccgccgcg gacgacgcgc ccaccgagac caccgccagt accaccctc	24540
ccagcgacgc acccccgtc gagaatgaag tgctgatcga gcaggaccg ggttttgtga	24600
gcggagagga ggatgaggtg gatgagaagg agaaggagga ggtcgccgc tcagtgcga	24660
aagaggataa aaagcaagac caggacgacg cagataagga tgagacagca gtcggcggg	24720
ggaacggaag ccatgatgct gatgacggct acctagacgt gggagacgac gtgctgctta	24780
agcacctgca ccgccagtgc gtcatcgtct gcgacgcgt gcaggagcgc tgcgaagtgc	24840
ccctggacgt ggccggaggtc agccgcgcct acgagcggca cctcttcgag ccgcacgtgc	24900
ccccaagcg ccgggagaac ggcacctgcg agcccaacc gcgtctcaac ttctaccgg	24960
tcttcggtt acccgaggtg ctggccacct accacatctt tttccaaaac tgcaagatcc	25020
ccctctctg ccgcgccaac cgcacccgcg ccgacaaaac cctgaccctg cggcagggcg	25080
cccacatacc tgatategc tctctggagg aagtgcgcaa gatcttcgag ggtctcggtc	25140
gcgacgagaa acggcgggcg aacgtctgc acggagacag cgaacacgag agtcactcg	25200
gggtgctggt ggagctcgag ggcgacaacg cgcgcctggc cgtactcaag cgcagcatag	25260
aggtcaccca ctttgctac ccggcgctca acctgcccc caaggtcatg agtgtggtca	25320
tggcgagct catcatgcgc cgcgccagc cctggccgc ggatgcaaac ttgcaagagt	25380
cctccgagga aggcctgccc gcggtcagcg acgagcagct ggcgcgctgg ctggagacc	25440
gcgacccgc gcagctggag gagcgcgca agctcatgat ggccgcggtg ctggtcaccg	25500
tggagctcga gtgtctgcag cgcttcttcg cggacccga gatgcagcgc aagctcgagg	25560
agacctgca ctacacctc cgccagggt acgtgcgcca ggctgcaag atctccaacg	25620
tggagctctg caacctggc tcctacctgg gcatcctgca cgagaaccgc ctcgggcaga	25680
acgtcctgca ctccacctc aaaggggagg cgcgccgca ctacatccg gactgcgcct	25740

acctcttctt ctgctacacc tggcagacgg ccatgggggt ctggcagcag tgcctggagg	25800
agcgcaacct caaggagctg gaaaagctcc tcaagcgcac cctcaggac ctttgacgg	25860
gcttcaacga gcgtcgggtg gccgccgcgc tggcggacat catctttccc gagcgctgc	25920
tcaagacctt gcagcagggc ctgcccgaact tcaccagcca gagcatgctg cagaacttca	25980
ggactttcat cctggagcgc tgggcatcc tggcgccac ttgctgcgcg ctgcccagcg	26040
acttcgtgcc catcaagtac agggagtgcc cgccgcgct ctggggccac tgctacctct	26100
tccagctggc caactacctc gcctaccact cggacctcat ggaagacgtg agcggcgagg	26160
gcctgtctga gtgccactgc cgctgcaacc tctgcacgcc ccaccgtct ctagtctga	26220
acccgcagct gctcagcgag agtcagattt tcggtacctt cgagctgcag ggtccctcgc	26280
ctgacgagaa gtccgcggct ccagggtga aactactcc ggggctgtgg acttccgct	26340
acctacgcaa atttgtacct gaggactacc acgcccacga gatcaggttc tacgaagacc	26400
aatccgccc gcccaaggcg gagctcaccg cctgcgtcat caccagggg cacatcctgg	26460
gccaattgca agccatcaac aaagccgcc gagagttctt gctgaaaaag ggtcgggggg	26520
tgtacctgga ccccgatcc ggcgaggagc taaaccgct accccgcgc cgccccagc	26580
agcgggacct tgcttcccag gatggcacc agaaagaagc agcagccgc gccgcccgc	26640
cagccataca tgcttctgga ggaagaggag gaggactggg acagtcaggc agaggaggtt	26700
tcggacgagg agcaggagga gatgatggaa gactgggagg aggacagcag ctagacgag	26760
gaagcttcag aggccgaaga ggtggcagac gcaacacat cgccctcggt cgcagcccc	26820
tcgccggggc cctgaaatc ctccgaacc agcaccagcg ctataacctc cgctctcgc	26880
gcgccggcgc caccgcccc cagaccaac cgtagatggg acaccacagg aaccggggtc	26940
ggtaagtcca agtgcgcc gccgccacc cagcagcagc agcagcagc ccagggtac	27000
cgctcgtggc gcgggcacaa gaacccata gtgcctgct tgcaagactg cgggggcaac	27060
atctctttcg ccgcccgtt cctgtattc caccacgggg tcgctttcc ccgcaatgc	27120
ctgcattact accgtcatct ctacagcccc tactgcagcg gcgaccaga ggcggcagcg	27180
gcagccacag cggcgaccac cacctaggaa gatatctcc gcgggcaaga cagcggcagc	27240
agcggccagg agaccgcgg cagcagcggc gggagcgggt ggcgactgc gcctctcgc	27300
caacgaacc ctctgaccc gggagctcag acacaggatc ttccccactt tgtatgcat	27360
cttcaacag agcagaggcc aggagcagga gctgaaaata aaaaacagat ctctgcgctc	27420
cctcaccgc agctgtctgt atcacaaaag cgaagatcag cttcggcga cgctggagga	27480

cgcgaggca ctcttcagca aatactgcgc gtcactctt aaagactagc tccgcgccct	27540
tctcgaattt aggcgggaga aaactacgtc atcgccggcc gccgcccagc ccgcccagcc	27600
gagatgagca aagagattcc cagccatac atgtggagct accagccgca gatgggactc	27660
gcggcgggag cggcccagga ctactccacc cgcatagaact acatgagcgc gggacccac	27720
atgatctcac aggtcaacgg gatccgcgcc cagcgaacc aaatactgct ggaacaggcg	27780
gccatcaccg ccacgccccg ccataatctc aacccccgaa attggcccgc cgccctcgtg	27840
taccaggaaa cccctccgc caccaccgia ctacttccgc gtgacgcca ggccgaagtc	27900
cagatgacta actcaggggc gcagctcgcg ggcggtttc gtcacggggc gcggccgctc	27960
cgaccaggta taagacacct gatgatcaga ggccgaggta tccagctcaa cgacgagtcg	28020
gtgagctctt cgctcggctt ccgtccggac ggaactttcc agctcgcgg atccggccgc	28080
tcttcgttca cggcccga ggctacctg actctgcaga cctcgtctc ggagccccgc	28140
tccggcggca tcggaacct ccagttcgtg gaggagtctg tgcctcgggt ctacttaac	28200
cccttctcgg gacctccgg acgtacccc gaccagtca ttccgaactt tgacgcggtg	28260
aaggactcgg cggacggcta cgactgaatg tcagggtctg aggcagagca gcttcgcctg	28320
agacacctcg agcactgccg ccgccacaag tgcttcgccc gcggttctgg tgagtctgc	28380
tactttcagc taccgagga gcataccgag gggccggcgc acggcgtccg cctgaccacc	28440
cagggcgagg ttacctgtt cctcatccgg gaggtttacc tccgtccct gctagtggag	28500
cgggagcggg gtccctgtgt cctaactatc gcctgcaact gccctaacc tggattacat	28560
caagatcttt gctgtcatct ctgtctgag ttaataaac gctgagatca gaatctactg	28620
gggtcctgt cgccatcctg tgaacgccac cgttttacc caccgccacc agggccaggc	28680
gaacctcacc tgcggtctgc atcggagggc caagaagtac ctcacctggt acttcaacgg	28740
cacccccctt gtggtttaca acagcttga cggggacgga gtctccctga aagaccagct	28800
ctccggtctc agctactcca tcacaagaa caccacctc caactcttcc ctccctacct	28860
gccgggaacc tacgagtgcg tcaccggcgc ctgcacccac ctcacccgcc tgatcgtaaa	28920
ccagagcttt ccgggaacag ataactcct cttccccaga acaggagggtg agctcaggaa	28980
actccccggg gaccagggcg gagacgtacc ttcgacctt gtgggggttag gattttttat	29040
taccgggttg ctggctcttt taatcaaagt ttccttgaga tttgttctt cttctactg	29100
glatgaacac ctcaacctcc aataactcia cctttcttc ggaatcaggt gacttctctg	29160
aaatcgggct tgggtgtctg cttactctgt tgatttttt cttatcata ctcagccttc	29220
tgtgcctcag gctgcgccg tgctgcgcac acatctatat ctactgctgg ttgctcaagt	29280
gcaggggtcg ccaccaaga tgaacaggta catggtccta tcgatcctag gcctgctggc	29340

cctggcggcc tgcagcgccg ccaaaaaaga gattaccttt gaggagcccg cttgcaatgt	29400
aactttcaag cccgagggtg accaatgcac caccctcgtc aaatgcgtta ccaatcatga	29460
gaggctgcgc atcgactaca aaaacaaaac tggccagttt gcggtctata gtgtgtttac	29520
gcccggagac ccctctaact actctgtcac cgtcttccag ggcggacagt ctaagatatt	29580
caattacact ttcccttttt atgagttatg cgatgcggtc atgtacatgt caaaacagta	29640
caacctgtgg cctccctctc cccaggcggtg tgtggaaaat actgggtctt actgctgtat	29700
ggctttcgca atcactacgc tcgctctaata ctgcacgggtg ctatacataa aattcaggca	29760
gaggcgaatc tttatcgatg aaaagaaaat gccttgatcg ctaacaccgg ctttctatct	29820
gcagaatgaa tgcaatcacc tccctactaa tcaccaccac cctccttgcg attgcccattg	29880
ggttgacacg aatcgaagtg ccagtggggt ccaatgtcac catgggtggc cccgccggca	29940
attccaccct catgtgggaa aaatttgtcc gcaatcaatg gggttcatttc tgctctaacc	30000
gaatcagtat caagcccaga gccatctgcg atgggcaaaa tctaactctg atcaatgtgc	30060
aaatgatgga tgctgggtac tattacgggc agcggggaga aatcattaat tactggcgac	30120
cccacaagga ctacatgctg catgtagtgc aggcacttcc cactaccacc cccactacca	30180
cctctccac caccaccacc actactacta ctactactac tactactact actaccacta	30240
ccgtgcccc ccataccgc aaaagcacca tgattagcac aaagcccct cgtgctcact	30300
cccacgccg cgggcccac ggtgcgacct cagaaaccac cgagctttgc ttctgccaat	30360
gcactaacgc cagcgcctcat gaactgttcg acctggagaa tgaggatgtc cagcagagct	30420
ccgcttgccct gaccaggag gctgtggagc ccgttgccct gaagcagatc ggtgattcaa	30480
taattgactc ttcttctttt gccactcccg aataccctcc cgattctact ttccacatca	30540
cgggtaccaa agaccctaac ctctctttct acctgatgct gctgctctgt atctctgtgg	30600
ttcttccgc gctgatgtta ctggggatgt tctgtgcct gatctgccgc agaaagagaa	30660
aagctcgctc tcagggccaa ccactgatgc ccttcccta cccccggat ttgcagata	30720
acaagatatg agctcgctgc tgacactaac cgctttacta gcctgcgctc taacccttgt	30780
cgcttgccac tcgagattcc acaatgtcac agctgtggca ggagaaaatg ttactttcaa	30840
ctccacggcc gataccaggt ggtcgtggag tggtcaggt agctacttaa ctatctgcaa	30900
tagctccact tccccggca tatecccaac caagtaccaa tgcaatgcca gcctgttcac	30960
cctcatcaac gcttccacc tggacaatgg actctatgta ggctatgtac ctttgggtgg	31020
gcaaggaaag acccacgctt acaacctgga agttcgccag cccagaacca ctaccaagc	31080
ttctccacc accaccacca ccaccacat caccagcagc agcagcagca gcagccacag	31140
cagcagcagc agattattga ctttggtttt ggccagctca tctgccgcta cccaggccat	31200

ctacagctct gtgcccga aa ccactcagat ccaccgcca gaaacgacca cgcaccac	31260
cctacacacc tccagcagc agatgccgac caacatcacc ccttggctc ttcaaatggg	31320
acttacaagc cccactccaa aaccagtggg tggggccgag gtctccgcc tcgtcaatga	31380
ctgggcgggg ctgggaatgt ggtggttcgc cataggcatg atggcgctct gcctgcttct	31440
gctctggctc atctgctgcc tccaccgag gcgagccaga ccccccctct atagacccat	31500
cattgtcctg aaccccgata atgatgggat ccatagattg gatggcctga aaaacctact	31560
ttttctttt acagtatgat aaattgagac atgcctcgca tttcttgta catgttcctt	31620
ctcccactt tctggggtg ttctacgtg gccgctgtgt ctacactgga ggtagactgc	31680
ctctcacct tcaactgcta cctgctttac ggattggta cctcactct catctgcagc	31740
ctaatacag taatcatgc cttcatccag tgcattgatt acatctgtgt gcgcctcgca	31800
tacttcagac accaccgca gtaccgagac aggaacattg cccaacttct aagactgctc	31860
taatcatgca taagactgtg atctgccttc tgatcctctg catcctgccc acctcacct	31920
cctgccagta caccacaaa tctccgca aaagacatgc ctctgccgc ttcaccaac	31980
tgtggaatat acccaaatgc tacaacgaaa agagcgagct ctccgaagct tggctgtatg	32040
gggtcatctg tctcttagtt ttctgcagca ctgtctttgc cctcataatc taccctact	32100
ttgatttggg atggaacgag atcgatgcca tgaattacc cactttccc gcaccgaga	32160
taattccact gcgacaagtt gtaccggtg tcgttaatca acgccccca tcccctacgc	32220
ccactgaaat cagctacttt aacctaacag gcggagatga ctgacgcct agatctagaa	32280
atggacggca tcagtaccga gcagcgtctc ctgagaggc gcaggcaggc ggctgagcaa	32340
gagcgcctca atcaggagct ccgagatctc gttaacctgc accagtgcaa aagaggcatc	32400
ttttgtctgg taaagcaggc caaagtcacc tacgagaaga ccggaacag ccaccgctc	32460
agttacaat tgcacacca gcgcagaaag ctggtgtctc tgggtgggtga gaatccatc	32520
accgtcacc agcactcgt agagaccgag ggtgtctgc actccccctg tcggggtcca	32580
gaagacctt gcacctggt aaagacctg tgcggtctca gagatttagt ccccttaac	32640
taatcaaca ctggaatcaa taaaagaat cacttactta aaatcagaca gcaggctctt	32700
gtccagtta ttacagcga cctcctccc ctctcccaa ctctgttact ccaaagcct	32760
tctggcgga aacttctcc acacctgaa gggaatgtca gattcttct cctgtccctc	32820
cgcaccact atcttcatgt tgttcagat gaagcgacc aaaacgtctg acgagagctt	32880
caacccgtg taccctatg acacggaaag cggccctccc tccgtccctt tctcacccc	32940

tcccttcgtg tctcccgatg gattccaaga aagtcceccc ggggtcctgt ctctgaacct	33000
ggccgagccc ctggtcactt cccacggcat gctcgccctg aaaatgggaa gtggcctctc	33060
cctggacgac gctggcaacc tcacctctca agatatacacc accgctagcc ctccccctcaa	33120
aaaaaccaag accaacctca gcctagaaac ctcatceccc ctaactgtga gcacctcagg	33180
cgccttcacc gtagcagccg ccgctcccct ggcggtggcc ggcacctccc tcacatgca	33240
atcagaggcc cccctgacag tacaggatgc aaaactcacc ctggccacca aaggccccct	33300
gaccgtgtct gaaggcaaac tggccttgca aacatcggcc ccgctgacgg ccgctgacag	33360
cagcacctc acagtcagtg ccacaccacc ccttagcaca agcaatggca gcttgggtat	33420
tgacatgcaa gccccattt acaccaccaa tggaaaacta ggacttaact ttggcgctcc	33480
cctgcatgtg gtagacagcc taaatgcact gactgtagt actggccaag gtcttacgat	33540
aaacggaaca gccctacaaa ctagagtctc aggtgccctc aactatgaca catcaggaaa	33600
cctagaattg agagctgcag ggggtatgcg agttgatgca aatggtcaac ttatccttga	33660
tgtagcttac ccatttgatg cacaaaacaa tctcagcctt aggccttgac agggaccctt	33720
gtttgttaac tctgccaca acttggatgt taactacaac agaggcctct acctgttcac	33780
atctggaaat accaaaaagc tagaagttaa tatcaaaaca gccaaagggtc tcatttatga	33840
tgacactgct atagcaatca atgcgggtga tgggtacag tttgactcag gctcagatac	33900
aatccatta aaaactaaac ttggattagg actggattat gactccagca gagccataat	33960
tgctaaactg ggaactggcc taagctttga caacacaggt gccatcacag taggcaacaa	34020
aatgatgac aagcttacct tgtggaccac accagaccca tcccctaact gtagaatcta	34080
ttcagagaaa gatgctaaat tcacacttgt tttagactaaa tgcggcagtc aggtgttggc	34140
cagcgtttct gttttatctg taaaaggtag ccttgcgccc atcagtgga cagtaactag	34200
tgctcagatt gtctcagat ttgatgaaaa tggagtctta ctaagcaatt ctcccttga	34260
ccctcaatac tggaactaca gaaaagggtga ccttacagag ggcaactgcat ataccaacgc	34320
agtgggattt atgcccaccc tcacagcata cccaaaaaca cagagccaaa ctgctaaaag	34380
caacattgta agtcaggttt acttgaatgg ggacaaatcc aaacccatga ccctcaccat	34440
tacctcaat ggaactaatg aaacaggaga tgccacagta agcacttact ccatgtcatt	34500
ctcatggaac tggaatggaa gtaattacat taatgaaacg ttccaaacca actccttcac	34560
cttctcctac atcgcccaag aataaaaagc atgacgtgtg tgatttgatt caatgtgttt	34620
ctgttttatt ttcaagcaca acaaaatcat tcaagtcatt ctccatctt agcttaatat	34680
acacagtagc ttaatatgacc cagtagtgca aagccccatt ctagcttata gatcagacag	34740
tgataattaa ccaccaccac caccatacct ttgtattcag gaaatcatga tcacacagg	34800

atcctagtct tcaggccgcc cctccctcc caagacacag aatacacagt cctctcccc	34860
cgactggctt taaataacac catctggttg gtcacagaca tgttcttagg ggttatattc	34920
cacacggtct cctgccgcgc caggcgctcg tcggtgatgt tgataaactc tcccggcagc	34980
tcgtcaagt tcacgtcgct gtccagcggc tgaacctccg gctgacgcga taactgtgcg	35040
accggtgct ggacgaacgg aggccgcgcc tacaaggggg tagagtcata atcctcggtc	35100
aggatagggc ggtgatgcag cagcagcgag cgaacatct gctgccgcg ccgctccgtc	35160
cggcagga aa acaacacgcc ggtggtctcc tccgcgataa tccgcaccgc ccgcagcatc	35220
agttctctcg ttctccgcgc gcagcacctc acccttatct cgctcaaac ggccgagtag	35280
gtacagcaca gcaccacgat gttattcatg atcccacagt gcagggcgct gtatccaaag	35340
ctcatgccgg gaaccaccgc cccacgtgg ccatcgtaacc acaagcgac gtaaatcaag	35400
tgtcgacccc tcatgaacgc gctggacaca aacattactt ccttgggcat gttgtaattc	35460
accacctccc ggtaccagat aaacctctgg ttgaacaggg caccttcac caccatcctg	35520
aaccaagagg ccagaacctg cccaccggct atgcactgca gggaaccgg gttggaacaa	35580
tgacaatgca gactccaagg ctgtaaccg tggatcatcc ggctgctgaa ggcatcgatg	35640
ttggcacaac acagacacac gtgcatgcac ttctcatga ttagcagctc ttccctcgctc	35700
aggatcatat cccaaggaat aaccattct tgaatcaacg taaaaccac acagcaggga	35760
aggcctcgca cataactcac gttgtgcatg gtcagcgtgt tgcatccgg aaacagcgga	35820
tgatcctcca gtatcgagge gcgggtctcc ttctcacagg gagttaaagg gtccctgctg	35880
tacggactgc gccgggacga ccgagatcgt gttgagcgta gtgtcatgga aaagggaacg	35940
ccggacgtgg tcatacttct tgaagcagaa ccaggttcgc gcgtggcagg cctccttgcg	36000
tctgcggtct cgcgctctag ctgctccgt gtgatagttag tagtacagcc actcccgcag	36060
agcgtcgagg cgcacctgg ctcccgatc tatgtagact ccgtcttgca ccgcggccct	36120
gataatatcc accaccgtag aataagcaac accagccaa gcaatacact cgctctgcga	36180
gcggcagaca ggaggagcgg gcagagatgg gagaacctg ataaaaaact ttttttaag	36240
aatattttcc aattcttga aagtaagatc tatcaagtgg cagcgtccc ctccactggc	36300
gcggtcaaac tctacggcca aagcacagac aacggcattt ctaagatgtt ccttaatggc	36360
gtccaaaaga cacaccgtc tcaagttgca gtaaaactatg aatgaaaacc catccggctg	36420
attttccaat atagacgcgc cggcagcgtc caccaaacc agataatttt ctctctcca	36480
gcggtttacg atctgtctaa gcaaatccct tatatcaagt ccgaccatgc caaaaatctg	36540
ctcaagagcg cctccacct tcatgtacaa gcagcgcatc atgattgcaa aaattcaggt	36600
tcttcagaga cctgtataag attcaaaatg ggaacattaa caaaaattcc tctgtcgcgc	36660

agatcccttc gcagggcaag ctgaacataa tcagacaggt ccgaacggac cagtgaggcc	36720
aaatccccac caggaaccag atccagagac cctatactga ttatgacgcg catactcggg	36780
gctatgctga ccagcgtagc gccgatgtag gcgtgctgca tgggcggcga gataaaatgc	36840
aaagtgtcgg ttaaaaaatc aggcaaagcc tcgcgcaaaa aagctaacac atcataatca	36900
tgctcatgca ggtagttgca ggtaagctca ggaacaaaa cggaataaca cacgattttc	36960
ctctcaaaca tgacttcgcg gatactgcgt aaaacaaaa attataaata aaaaattaat	37020
taataaactt aaacattgga agcctgtctc acaacaggaa aaaccacttt aatcaacata	37080
agacgggcca cgggcatgcc ggcatagccg taaaaaatt ggtccccgtg attaacaagt	37140
accacagaca gctccccggt catgtcgggg gtcacatcatgt gagactctgt atacacgtct	37200
ggattgtgaa catcagacaa acaaagaaat cgagccacgt agcccggagg tataatcacc	37260
cgcagcgcca ggtacagcaa aacgaccccc ataggaggaa tcacaaaatt agtaggagaa	37320
aaaaatacat aaacaccaga aaaaccctgt tgctgaggca aaatagcgcc ctcccgatcc	37380
aaaacaacat aaagcgcttc cacaggagca gccataacaa agacccgagt cttaccagta	37440
aaagaaaaaa gatctctcaa cgcagcacca gcaccaacac ttcgcagtgt aaaaggccaa	37500
gtgccgagag agtatatata ggaataaaaa gtgacgtaaa cgggcaaagt ccaaaaaacg	37560
cccagaaaaa ccgcacgcga acctacgcc cgaacgaaa gccaaaaaac actagacact	37620
cccttcgggc gtcaacttcc gctttccac gctacgtcac ttccccgggt caaacaact	37680
acatacccc aacttcaag tcgccagcc caaacaccg cctacacctc cccgcccgc	37740
ggccccccc cggaaccgcc tcccccccg cgccgcccat ctcattatca tattggttc	37800
aatccaaat aaggtatatt attgatgatg	37830
<210> 2	
<211> 36571	
<212> DNA	
<213> Chimpanzee adenovirus	
<400> 2	
catcatcaat aatatactc aaacttttgg tgcgcgttaa tatgcaaatg agctgtttga	60
atttggggat gcggggcgct gattggctgc gggagcggcg accgttaggg gcggggcggg	120
tgacgttttg atgacgtggc cgtgaggcgg agccggtttg caagttctcg tgggaaaagt	180
gacgtcaaac gaggtgtggt ttgaacacgg aaatactcaa tttccccgcg ctctctgaca	240
ggaaatgagg tgtttctggg cgcatgcaag tgaacacggg ccattttcgc gcgaaaactg	300
aatgaggaag tgaaaatctg agtaatttcg cgtttatggc agggaggagt atttgccgag	360

ggccgagtag acittgaccg attacgtggg ggtttcgatt accgtatttt tcacctaaat	420
ttccgcgtac ggtgtcaaag tccggtgttt ttacgtaggc gtcagctgat cgccagggta	480
tttaaacctg cgtcactag tcaagaggcc actcttgagt gccagcgagt agagttttct	540
cctccgcgcc gcgagtcaga tctacacttt gaaagatgag gcacttgaga gacctgcccg	600
gtaatgtttt cctggctact gggaacgaga ttctggaatt ggtggtggac gccatgatgg	660
gtgacgacce tcccgagccc cctaccccat ttgaggcgcc ttcgctgtac gatttgtatg	720
atctggaggt ggatgtgccc gagaacgacc ccaacgagga ggcggtgaat gatttgttta	780
gcgatgccg gctgctggct gccgagcagg ctaatacgga ctttggctca gacagcgatt	840
cttctctcca taccgccaga cccggcagag gtgagaaaaa gatccccgag cttaaagggg	900
aagagctcga cctgcgctgc tatgaggaat gcttgccctc gagcgatgat gaggaggacg	960
aggaggcgat tcgagctgca gcgaaccagg gagtgaagc tgccggcgaa agctttagcc	1020
tggactgtcc tactctgccc ggacacggct gtaagtcttg tgaatttcat cgcataaata	1080
ctggagataa gaatgtgatg tgtgccctgt gctatatgag agcttacaac cattgtgttt	1140
acagtaagtg tgattaaact tagttgggaa ggcagagggt gactgggtgc tgactggttt	1200
atttatgtat atgtttttta tgtgtaggtc ccgtctctga cgcagatgag acccccactt	1260
cagagtgcac ttcatcacc ccagaaattg gcgaggaacc gcccgaagat attattcata	1320
gaccagttag agtgagagtc accgggcgga gagcagctgt ggagagtttg gatgacttgc	1380
tacagggtgg gcatgaacct ttggacttgt gtaccgggaa acgccccagg cactaagtgc	1440
cacacatgtg tgtttactta aggtgatgtc agtatttata ggggtgtggag tgcaataaaa	1500
tccgtgttga cttaagtgc gtggtttatg actcaggggt ggggactgtg ggtatataag	1560
caggtgcaga cctgtgtggt cagttcagag caggactcat ggagatctgg acggtcttgg	1620
aagactttca ccagactaga cagctgctag agaactcacc ggaggggagtc tcttacctgt	1680
ggagattctg cttcgggtggg cctctagcta agctagtcta tagggccaag caggattata	1740
aggatcaatt ttaggatatt ttgagagagt gtcttggtat ttttgactct ctcaacttgg	1800
gccatcagtc tcactttaac cagagtattc tgagagccct tgacttttcc actcctggca	1860
gaactaccgc cgcggtagcc tttttgcct ttatccttga caaatggagt caagaaaccc	1920
atttcagcag ggattaccgt ctggactgct tagcagtagc tttgtggaga acatggaggt	1980
gccagcgcc gaatgcaatc tccggctact tgccagtaca gccggtagac acgctgagga	2040
tcctgagtct ccagtcaccc caggaaacacc aacgccgcca gcagccgcag caggagcagc	2100

agcaagagga ggaccgagaa gagaacccga gagccggtct ggaccctccg gtggcggagg 2160

aggaggagta gctgacttgt ttcccagct gcgccgggtg ctgactaggt cttccagtgg 2220

acgggagagg gggattaagc gggagaggca tgaggagact agtcacagaa ctgaactgac 2280

tgtcagtctg atgagccgca ggcgcccaga atcgggtgtg tggcatgagg tgcagtcgca 2340

ggggatagat gaggtctcgg tgatgcatga gaaatatcc ctagaacaag tcaagacttg 2400

ttggttggag cctgaggatg attgggaggt agccatcagg aattatgcca agctagctct 2460

gaagccagac aagaagtaca agattaccaa actgattaat atcagaaatt cctgctacat 2520

ttcagggaat ggggccgagg tggagatcag taccaggag aggggtgcct tcagatgctg 2580

catgatgaat atgtaccgg ggggtgtggg catggaggga gtcaccttta tgaacgcgag 2640

gttcaggggc gatgggtata atggggtgtt ctttatggcc aacaccaagc tgacagtga 2700

cggatgctcc ttctttggt tcaataacat gtgcatcgag gcctggggca gtgtttcagt 2760

gaggggatgc agttttcag ccaactggat ggggtcgtg ggcagaacca agagcaaggt 2820

gtcagtgaag aaatgcctgt tcgagagggt ccacctgggg gtgatgagcg agggcgaagc 2880

caaagtcaaa cactgcgcct ctactgagac gggctgcttt gtgctgatca agggcaatgc 2940

ccaagtcaag cataacatga tctgtggggc ctcgatgag cgcggctacc agatgctgac 3000

ctgcgccgtt gggaacagcc atatgctggc caccgtgcat gtgacctgc acccccgcaa 3060

gacatggccc gagttcgagc acaacgtcat gaccgctgc aatgtgcacc tgggctcccg 3120

ccgaggcatg ttcatgcct accagtga caatgcaattt gtgaagggtc tgctggagcc 3180

cgatgccatg tcagagtga gcctgacggg ggtgtttgac atgaatgtgg agatgtggaa 3240

aattctgaga tatgatgaat ccaagaccag gtgccgggcc tgcgaatgcg gaggcaagca 3300

cgccaggctt cagccctgt gtgtggaggt gacggaggac ctgcgaccg atcatttggt 3360

gttgtcctgc aacgggacgg agttcggtc cagcggggaa gaatctgact agagtgagta 3420

gtgtttgggg gaggtggagg gcctggatga ggggcagaat gactaaaatc tgtgttttc 3480

tgcgcagcag catgagcga agcgcctcct ttgaggagg ggtattcagc cttatctga 3540

cggggcgtct cccctcctgg gcgggagtgc gtcagaatgt gatgggatcc acggtggacg 3600

gccggcccgt gcagcccgc aactcttcaa cctgaccta cgcgacctg agctcctct 3660

ccgtggacgc agctgccgc gcagctgtg ctccgccgc cagcgccgtg cgcggaatgg 3720

ccctgggcgc cggctactac agctctctgg tgcccaactc gagttccacc aataatccc 3780

ccagcctgaa cgaggagaag ctgctgctgc tgatggccca gctcgaggcc ctgaccagc 3840

gcctgggcga gctgaccag caggttgctc agctgcaggc ggagacgcgg gccgcggttg 3900
ccacggtgaa aaccaaataa aaaatgaatc aataaataaa cggagacggt tgttgatgtt 3960
aacacagagt cttgaatctt tatttgattt ttccgcgcgc gtaggccctg gaccaccggt 4020
ctcgaicatt gagcacccgg tggatctttt ccaggacccg gtagaggtgg gcttggaagt 4080
tgaggtacat gggcatgagc ccgtcccggg ggtggaggta gctccattgc agggcctcgt 4140
gctcgggggt ggtgttgtaa atcaccaggt catagcaggg gcgcaggcgg tgggtgctga 4200
cgatgtcctt gaggaggaga ctgatggcca cgggcagccc cttggtgtag gtgttgacga 4260

acctgttgag ctgggaggga tgcatacggg gggagatgag atgcatcttg gcctggatct 4320
tgagattggc gatgttcccg ccagatccc gccgggggtt catgttgtgc aggaccacca 4380
gcacggtgta tccggtgcac ttggggaatt tgcatacaa cttggaaggg aaggcgtgaa 4440
agaatttggg gacgcccttg tggccgcca ggttttccat gcactcatcc atgatgatgg 4500
cgatggggcc gtggcgccgg gcctgggcaa agacgtttcg ggggtcggac acatcgtagt 4560
tgtggtcctg ggtgagctcg tcataggcca tttaatgaa tttggggcgg aggggtccccg 4620
actgggggac gaaggtgccc tcgatcccg gggcgtagtt gccctgcag atctgcatct 4680

cccaggcctt gagctcggag ggggggatca tgtccactg cggggcgatg aaaaaacgg 4740
tttccggggc gggggagatg agctgcgccg aaagcaggtt ccggagcagc tgggacttgc 4800
cgcagccggt ggggccgtag atgacccga tgaccgctg caggtggtag ttgagggaga 4860
gacagctgcc gtctcgcgg aggagggggg ccacctcgtt catcatctcg cgcacatgca 4920
tgttctcgcg cagagttcc gccaggaggc gctcggccc cagcgagagg agctcttgca 4980
gcgaggcgaa gtttttcagc ggcttgagcc cgtcggccat gggcattttg gagagggtct 5040
gttgcaagag ttccagacgg tccagagct cggtagtggt ctctagggca tctgatcca 5100

gcagacctcc tcgtttcgcg ggttggggcg actgcgggag tagggcacca ggcgatgggc 5160
gtccagcgag gccagggtcc ggtccttcca ggttcgagg gtccgcgtca gcgtggtctc 5220
cgtcacggtg aagggttgcg gcgccggctg ggcgcttgcg aggggtgcgt tcaggtcat 5280
ccggttggtc gagaaccgt cccggtcggc gccctgtgcg tcggccaggt agcaattgag 5340
catgagttcg tagttgagcg cctcggccgc gtggcccttg gcgcggagct tacctttgga 5400
agtgtgtccg cagacgggac agaggaggga cttgaggcg tagagcttgg gggcgaggaa 5460
gacggactcg gggcgtagg cgtccgcgc gcagctggcg cagacggtct cgcactccac 5520

gagccagggt aggtcggggc ggtcggggtc aaaaacgagg tttcctccgt gctttttgat 5580
gcgtttctta cctctggtct ccatgagctc gtgtccccgc tgggtgacaa agaggtgtc 5640
cgtgtccccg tagaccgact ttatgggccg gtctcgagc ggggtgccgc ggtcctcgtc 5700

gtagaggaac cccgccact cccgagacgaa ggcccgggtc caggccagca cgaaggaggc 5760
 cacgtgggag gggtagcggg cgttgtccac cagcgggtcc accttctcca gggtatgcaa 5820
 gcacatgtcc cctcgtcca catccaggaa ggtgattggc ttgtaagtgt aggccacgtg 5880
 accgggggtc ccggccgggg gggtataaaa gggggcgggc cctgctcgt cctcactgtc 5940

 ttccgcatcg ctgtccagga gcgccagctg ttgggtagg tattccctct cgaaggcggg 6000
 catgacctcg gcactcaggt tgtcagtttc tagaaacgag gaggatttga tattgacggg 6060
 gccgttggag acgcctttca tgagccctc gtccatctgg tcagaaaaga cgatcttttt 6120
 gtgtcgcgc ttgttgccga aggagccgta gaggcggtg gagagcagct tggcgatgga 6180
 gcgcattggtc tggttctttt ccttgcggc gcgctccttg gcggcgatgt tgagctgcac 6240
 gtactcgcgc gccacgcaact tccattcggg gaagacgggtg gtgagctcgt cgggcacgat 6300
 tctgacccgc cagccgcggg tgtgcagggt gatgaggtcc acgctggtgg ccacctcgcc 6360

 gcgcaggggc tcgttgggtc agcagaggcg cccgcccttg cgcgagcaga aggggggcag 6420
 cgggtccagc atgagctcgt cgggggggtc ggcggtccacg gtgaagatgc cgggcaggag 6480
 ctgggggtcg aagtagctga tgcagggtgc cagatcgtcc agcgccgctt gccagtcgcg 6540
 cacggccagc gcgcgctcgt aggggctgag gggcggtccc cagggcagtg ggtgcgtgag 6600
 cgcgaggcg tacatgccgc agatgtcgt gacgtagagg ggctcctcga ggacgccgat 6660
 gtaggtgggg tagcagcgcc ccccgcggt gctggcgcgc acgtagctgt acagctcgtg 6720
 cgaggcgcg aggagccccg tgccgaggtt ggagcggtgc ggcttttcgg cgcggtagac 6780

 gatctggcgg aagatggcgt gggagttaga ggagatggtg ggctctgga agatgttgaa 6840
 gtggcggtg ggagggcca ccgagtcct gatgaagtgg gcgtaggagt cctgcagctt 6900
 ggcgacgagc tcggcggtga cgaggacgtc caggcgagc tagtcgaggg tctcttgat 6960
 gatgtcgtac ttgagctggc ccttctgctt ccacagctcg cggttgagaa ggaactcttc 7020
 gcggtccttc cagtactctt cgagggggaa cccgtcctga tcggcacggt aagagccac 7080
 catgtagaac tggttgacgg cctttaggc gcagcagccc ttctccacgg ggagggcgta 7140
 agcttgcgc gccttgcga gggaggtgtg ggtgagggcg aaggtgtcgc gcacatgac 7200

 tttgaggaac tgggtctga agtcagggtc gtcgcagccg cctgctccc agagttgaa 7260
 gtccgtgcgc ttctttagg cggggttggg caaagcgaat gtaacatcgt tgaagaggat 7320
 cttgcccgcg cggggcatga agttcgaggt gatgcgaaa ggctgggca cctcgccccg 7380
 gttgttgatg acctgggcgg cgaggacgat ctgctgaag ccgttgatgt tgtgcccac 7440
 gatgtagagt tccacgaatc gcgggcagcc cttgacgtgg ggcagcttct tgagctcgtc 7500
 gtaggtgagc tcggcggggt cgctgagccc gtgctgctcg agggcccagt cggcgacgtg 7560

ggggttggcg ctgaggaagg aagtccagag atccacggcc agggcggctc gcaagcggtc	7620
ccggtactga cggaactgct ggcccacggc cattttttcg ggggtgacgc agtagaaggt	7680
gcgggggtcg ccgtgccagc ggtccactt gagttggagg gcgaggtcgt gggcgagctc	7740
gacgagcggc gggccccgg agagtttcat gaccagcatg aaggggacga gctgcttgcc	7800
gaaggacccc atccaggtgt aggtttccac atcgtaggtg aggaagagcc ttccggtgcg	7860
aggatgcgag ccgatgggga agaactggat ctccctggcac cagttggagg aatggctgtt	7920
gatgtgatgg aagtagaaat gccgacggcg cgccgagcac tcgtgcttgt gttatacaa	7980
gcgtccgcag tgctcgcaac gctgcacggg atgcacgtgc tgcacgagct gtacctgggt	8040
tcctttgacg aggaatttca gtgggcagtg gagcgctggc ggctgcatct ggtgctgtac	8100
tacgtcctgg ccatcgcgct ggccatcgtc tgcctcgatg gtggcatgc tgacgagccc	8160
gcgcgggagg caggtccaga cctcggctcg gacgggtcgg agagcgagga cgaggcgcg	8220
caggccggag ctgtccaggg tcctgagacg ctgcggagtc aggtcagtgg gcagcggcgg	8280
cgcgcggttg acttgaggga gcttttccag ggcgcgcggg aggtccagat ggtacttgat	8340
ctccacggcg ccgttgggtg cgacgtccac ggcttgacagg gtcccggtgcc cctggggcgc	8400
caccaccgtg ccccgtttct tcttgggcgg cgccggctcc atgcttagaa gcggcggcga	8460
ggacgcgcgc cgggcggcag gggcggtcgc gggcccggag gcaggggcgg caggggcacg	8520
tcggcgccgc gcgcgggcag gttctggtac tgcgccgga gaagactggc gtgagcgacg	8580
acgcgacggt tgacgtcctg gatctgacgc ctctgggtga aggccacggg acccgtgagt	8640
ttgaacctga aagagagtic gacagaatca atttcggtat cgttgacggc ggcctgccgc	8700
aggatctctt gcacgtcgc cgagttgtcc tggtaggcga tctcggtcat gaactgctcg	8760
atctcctcct cctgaaggtc tccgcggcgg gcgcgctcga cgggtggcgc gaggtcgttg	8820
gagatcgggc ccatgagctg cgagaaggcg ttcattgccg cctcgttcca gacgcggctg	8880
tagaccacgg ctccgttggg gtgcgcgcgc cgcatgacca cctgggcgag gttaaactcg	8940
acgtggcgcg tgaagaccgc gtagttgcag aggcgctggt agaggtagtt gagcgtggtg	9000
gcgatgtgct cggtagacga gaagtiacatg atccagcggc ggagcggcat ctcgctgacg	9060
tcgccagggt cttccaagcg ctccatggtc tcgtagaagt ccacggcgaa gttgaaaaac	9120
tgggagttag gcgccgagac ggtcaactcc tcctccagaa gacggatgag ctcggcgatg	9180
gtggcgcgca cctcgcgctc gaaggccccg gggggctcct cttcttccat ctctcctcc	9240
tcttcctcct cactaacat ctcttctact tcctcctcag gaggcggcgg cgggggaggg	9300

gccctgcgtc gccggcgcg caccggcaga cggtcgatga agcgtcgtat ggtctccccg	9360
cgccggcgac gcatggtctc ggtgacggcg cggcgtcct cgccggggccg cagcgtgaag	9420
acgccgccgc gcatctccag gtggccgccc ggggggtctc cgttgggcag ggagaggcg	9480
ctgacgatgc atcttatcaa ttggcccgtt gggactccgc gcaaggacct gagcgtctcg	9540
agatccacgg gatccgaaaa ccgtgaacg aaggcttcga gccagtcgca gtcgcaaggt	9600
aggctgagcc cggtttcttg ttcttcgggt atttggtcgg gaggcggcg ggcgatgctg	9660
ctggtgatga agttgaagta ggcggtcctg agacggcgga tggtagcgag gagcaccagg	9720
tccttgggcc cggttgctg gatgcgcaga cggtcggcca tgccccaggc gtggtcctga	9780
cacctggcga ggtccttgta gtagtcctgc atgagccgct ctacgggcac gtcctcctcg	9840
cccgcgcggc cgtgcatgcg cgtgagcccc aacccgcgt gcggtggac gagcgccagg	9900
tcggcgacga cgcgtcggc gaggatggcc tgcctggtct gggtaggggt ggtctggaag	9960
tcgtcgaagt cgacgaagcg gtggtaggct ccggtgttga tggtagga gcagtggcc	10020
atgacggacc agttgacgg ctggtggccg gggcgacga gctcgtgta cttgaggcg	10080
gagtaggcgc gcgtgtcga gatgtagtcg ttgcaggtgc gcacaggta ctggtatccg	10140
acgaggaagt gcggcgcggt ctggcggtag agcggccatc gtcggtggc gggggcgccc	10200
ggcgcgaggt cctcgagcat gaggcggtgg tagccgtaga tgtacctgga catccaggtg	10260
atgccggcg cggtaggtga ggcgcgcggg aactcgcgga cgcggttcca gatgttcgc	10320
agcggcagga agtagttcat ggtggccggt gtcctggccc tgaggcgcg gcagtcgtgg	10380
atgctctaga catacgggca aaaacgaaag cggtcagcgg ctgcactccg tggcctggag	10440
gctaagcgaa cgggttgggc tgcgcgtgta ccccggttcg aatctcgaat caggctggag	10500
ccgcagctaa cgtggtactg gcactccgt ctcgacccaa gcctgctaac gaaacctcca	10560
ggatacggag gcgggtcgtt ttttggcctt ggtcgtggt catgaaaaac tagtaagcg	10620
ggaaagcggc cgcccgcat ggctcgtctc ctagtctgg agaaagaatc gccagggttg	10680
cgttgcggtg tgccccggtt cgagcctcag cgtcgggtgc cggccggatt ccgcgctaa	10740
cgtggcggtg gctgccccgt cgtttccaag accccttagc cagccgactt ctccagttac	10800
ggagcgagcc cctctttttc ttgtgttttt gccagatgca tcccgtactg cggcagatgc	10860
gccccacc tccaccaca ccgccctac cgcagcagca gcaacagccg gcgttctgc	10920
ccccgcccc gcagcagcag ccagccacta ccgcggcggc cgccgtgagc ggagccggcg	10980
ttcagtatga cctggccttg gaagaggcg aggggctggc gcggtgggg gcgtcgtcgc	11040
cggagcgga cccgcgcgtg cagatgaaaa gggacgtcg cgaggctac gtgccaagc	11100
agaacctgtt cagagacagg agcggcgagg agcccagga gatgcgcgc tcccgttcc	11160

acgcggggcg ggagctgcgg cgcggcctgg accgaaagcg ggtgctgagg gacgaggatt	11220
tcgaggcgga cgagctgacg gggatcagcc ccgcgcgcgc gcacgtggcc gcggccaacc	11280
tggtcacggc gtacgagcag accgtgaagg aggagagcaa ctttcaaaaa tccttcaaca	11340
accacgtgcg cacgctgacg gcgcgcgagg aggtgaccct gggcctgatg cacctgtggg	11400
acctgttgga ggccatcgtg cagaaccca cgagcaagcc gctgacggcg cagctgtttc	11460
tgggtgtgca gcacagtcgg gacaacgaga cgttcaggga ggctgtgtg aatatcacgc	11520
agcccagagg ccgctggctc ctggacctgg tgaacattct gcagagcatc gtggtgcagg	11580
agcgcgggct gccgtgtcc gagaagctgg cgcccatcaa cttctcgggt ctgagcctgg	11640
gcaagtacta cgctaggaag atctacaaga ccccgtagct gcccatagac aaggaggatga	11700
agatcgacgg gttttacatg cgcatgacct tgaaagtgt gacctgagc gacgatctgg	11760
gggtgtaccg caacgacagg atgcaccgcg cggtagcgc cagccgccgg cgcgagctga	11820
gcgaccagga gctgatgcac agcctgcagc gggccctgac cggggccggg accgaggggg	11880
agagctactt tgacatgggc gcggacctgc gctggcagcc cagccgccgg gccttggaag	11940
ctgccggcgg cgtgccctac gtggaggagg tggacgatga ggaggaggag ggcgagtacc	12000
tggaagactg atggcgacgc cgtatTTTTg ctagatgcag caacagccac cgccgcctcc	12060
tgatcccgcg atcgggcgg cgctgcagag ccagccgtcc ggcattaact cctcggaaga	12120
ttggaccag gccatgaac gcatcatggc gctgacgacc cgcaatccc aagccttag	12180
acagcgcct caggccaacc ggctctcggc catcctggag gccgtggtgc cctcgcgctc	12240
gaacccacg cagagaagg tgctggccat cgtgaacgcg ctggtggaga acaaggccat	12300
ccgcggcgac gaggccgggc tgggtgtaaa cgcgctgtg gagcgcgtgg cccgctaaaa	12360
cagcaccaac gtgcagaca acctggaccg catggtgacc gacgtgcgcg aggcggtgtc	12420
gcagcgcgag cggttcacc gcgagtcgaa cctgggctcc atggtggcgc tgaacgcctt	12480
cctgagcacg cagccccca acgtgccccg gggccaggag gactacacca acttcatcag	12540
cgcgctgcgg ctgatgtgtg ccgaggtgcc ccagagcgag gtgtaccagt cggggccgga	12600
ctacttcttc cagaccagtc gccagggttt gcagaccgtg aacctgagcc aggccttcaa	12660
gaacttgcag ggactgtggg gcgtgcaggc cccggtcggg gaccgcgcga cgggtgtcag	12720
cctgtgacg ccgaactcgc gcctgtgtg gctgtgtgtg gcgcccttca cggacagcgg	12780
cagcgtgagc cgcgactcgt acctgggcta cctgtttaac ctgtaccgcg aggcctcgg	12840
gcaggcgac gtggacgagc agacctacca ggagatcacc cacgtgagcc gcgcgtggg	12900
ccaggaggac cggggaacc tggaggccac cctgaacttc ctgtgacca accggtcgca	12960
gaagatccc cccagtagc cgctgagcac cgaggaggag cgcacctgc gctacgtgca	13020

gcagagcgtg gggctgttcc tgatgcagga gggggccacg cccagcgccg cgctcgacat	13080
gaccgcgcgc aacatggagc ccagcatgta cggccgcaac cggccgttca tcaataagct	13140
gatggactac ttgcatcggg cggccgccat gaactcggac tactttacca acgcatctt	13200
gaaccgcac tggctcccgc cgcccgggtt ctacacgggc gactacgaca tgcccgaccc	13260
caacgacggg ttctgtggg atgacgtgga cagcagcgtg ttctcgccgc gtcccaccac	13320
caccgtgtgg aagaaagg gcggggaccg gcggccgtcc tcggcgctgt ccggtcgcg	13380
gggtgtgtcc gcggcggtgc ccgaggccgc cagccccttt ccgagcctgc cttttcgt	13440
gaacagcgtg cgcagcagc agctgggtcg gctgacgcgg ccgcgctgc tggcgagga	13500
ggagtacctg aacgactcct tgttgaggcc cgagcgcgaa aagaacttcc ccaataacgg	13560
gatagagagc ctggtggaca agatgagccg ctggaagacg tacgcgcacg agcacaggga	13620
cgagccccga gctagcagc caggcacccg tagacgccag cggcacgaca ggagcgggg	13680
tctggtgtgg gacgatgagg attccgccga cgacagcagc gtgttgact tgggtgggag	13740
tgggtggtgt aaccgttcg ctacttgcg ccccgatc gggcgctga tgtaagaatc	13800
tgaaaaaataa aaaacggtac tcaccaaggc catggcgacc agcgtgcgtt cttctctgtt	13860
gttttagta gtatgatgag gcgcgtgtac ccggagggtc ctctccctc gtacgagagc	13920
gtgatgcagc agcggtggc ggcgcgatg cagccccgc tggaggcgcc ttacgtgcc	13980
ccgcggtacc tggcgctac ggaggggcgg aacagcattc gttactcgga gctggcacc	14040
ttgtacgata ccaccggtt gtacctgtg gacaacaagt cggcgacat cgcctcgctg	14100
aactaccaga acgaccag caacttctg accaccgtg tgcagaaca cgatttcacc	14160
cccacggagg ccagcacca gaccatcaac tttagcagc gctcgcgtg gggcgccag	14220
ctgaaaacca tcatgcac caacatgcc aacgtgaac agttcatgta cagcaacaag	14280
ttcaaggcgc ggtgatgtt ctgcgcaag accccaacg gggtcacagt aacagatgt	14340
agtacggagc agctgacct cagtggtg gagtttgagc tgcccagggg caacttctc	14400
gtgacctga ccatgatct gatgaacaac gccatcatc acaactactt ggcggtggg	14460
cggcagaacg ggtgtctgga gagcgacatc ggcgtgaagt tcgacacgc caacttcgg	14520
ctgggtggg acccgtgac cgagctgtg atccgggcg tgtacacaa cgaggccttc	14580
caccgcgaca tcttctgt gcccggctgc ggcgtggact tcaccgagag ccgcctcagc	14640
aacctgctgg gcatccgaa gcggcagccc ttccaggagg gcttcagat cctgtacgag	14700
gacctggagg ggggcaacat ccccgctc ttggtgtc aagcctacga gaaaagcaag	14760

gaggatagca ccgccgtggc taccgccgag actgtggcag atgccactgt caccaggggc	14820
gatacatcgc ccacccagcg ggaggaagca gccgccctag cggcgaccga tgatagtga	14880
agtaagatag ttatcaagcc ggtggagaag gacagcaagg acaggagcta caacgttcta	14940
tcggatggaa agaacaccgc ctaccgcagc tggtagctgg cctacaacta cggcgacccc	15000
gagaagggcg tgcgctcctg gacgctgctc accacctcgg acgtcacctg cggcgtggag	15060
caagtctact ggtcgtgccc cgacatgatg caagaccggg tcaccttcgg ctccacgcgt	15120
caagttagca actaccgggt ggtgggcgcc gagctcctgc ccgtctactc caagagcttc	15180
ttcaacgagc aggcgctcta ctgcgagcag ctgcgcgctt tcacctcgtt cagcacgctc	15240
ttcaaccgct tccccagaaa ccagatcctc gtccgcccgc ccgcgcccac cattaccacc	15300
gtcagtgaag acgttcctgc tctcacagat cacgggaccc tgccgctgcg cagcagtatc	15360
cggggagtcg agcgctgac cgtcactgac gccagacgcc gcacctgccc ctacgtctac	15420
aaggccctgg gcgtagtgc gccgcgctc ctctcgagcc gcaccttcta aaaaatgtcc	15480
attctcatct cggccagtaa taacaccggt tggggcctgc gcgcgcccag caagatgtac	15540
ggaggcgctc gccaacgctc cagcaaacac ccggtgcgcg tgcgcgggca ctccgcgct	15600
ccctggggcg ccctcaaggg tcgctgctgc tcgcgcacca ccgtcgacga cgtgatcgac	15660
caggtgggtg ccgacgcgcg caactacacg cccgccgccc cggccgctc caccgtggac	15720
gccgtcatcg acagcgtggt ggccgacgcg cggcggtacg cccgcgcca gagccggcgg	15780
cggcgcatcg cccggcgcca ccggagcacc cccgccatgc gcgcggcgcg agccttgctg	15840
cgcagggcca ggcgcacggg acgcagggcc atgctcaggg cggccagacg cgcggcctcc	15900
ggcagcagca gcgcggcgag gacccgcaga cgcgcggcca cggcgggcgc ggcgggcatc	15960
gccagcatgt cccgccgcg gcgcggcaac gtgtactggg tgcgcgacgc cgccaccggt	16020
gtgcgctgc ccgtgcgcac ccgccccct cgcacttgaa gatgtgact tcgcatgtt	16080
gatgtgtccc agcggcgagg aggatgtcca agcgcaata caaggaagag atgtccagg	16140
tcctcgcgcc tgagatctac ggcccccgcg cggcggtgaa ggaggaaaga aagccccga	16200
aactgaagcg ggtcaaaaag gacaaaaagg aggaggaaga tgtggacgga ctggtggagt	16260
ttgtgcgca gtgcgcccc cggcgggcgc tgcatggcg cggcgggaaa gtgaaaccgg	16320
tgctgcggcc cggcaccacg gtggtcttca cggcgggcga gcgttcggc tccgctcca	16380
agcgtccta cgacgaggtg tacggggacg aggcacacct cgagcaggcg gccgagcgtc	16440
tggcgaggtt tgcttacggc aagcgcagcc gccccgcgc cttgaaagag gaggcggtgt	16500
ccatcccgtt ggaccacggc aacccacgc cgagcctgaa gccggtgacc ctgcagcagg	16560
tgctgccgag cgcggcgccc cgccggggct tcaagcgca gggcgggcag gatctgtacc	16620

cgacatgca gctgatggtg cccaagcgcc agaagctgga ggacgtgctg gagcacatga	16680
aggtggagcc cgaggtgcag cccgaggtca aggtgcggcc catcaagcag gtggccccgg	16740
gcctgggcgt gcagaccgtg gacatcaaga tccccacgga gcccattgaa acgcagaccg	16800
agcccgtgaa gcccagcacc agcaccatgg aggtgcagac ggatccctgg atgccggcgc	16860
cggtttccac caccactcgc cgaagacgca agtacggcgc ggccagcctg ctgatgcccc	16920
actacgcgt gcatccttcc atcatcccca cgccgggcta ccgcggcacg cgctttctacc	16980
gcggctacag cagccggcgc aagaccacca cccgccggcg ccgtcgccgc acccgccgca	17040
gcaccaccgc gacttccgcc gccgccttgg tgcggagagt gtaccgcagc gggcgtgagc	17100
ctctgaccct gccgcgcgcg cgctaccacc cgagcatcgc catttaactc tgccgtcgcc	17160
tccttgacga tatggccctc acatgccgcc tccgcgtccc cattacgggc taccaggaa	17220
gaaagccgcg ccgtagaagg ctgacgggga acgggctgcg tcgccatcac caccggcggc	17280
ggcgcgccat cagcaagcgg ttggggggag gcttcctgcc cgcgtgatc cccatcatcg	17340
ccgcggcgat cggggcgatc cccggcatag ctccctggc ggtgcaggcc tctcagcgcc	17400
actgagacac agcttgaaa atttgtaata aaaaaatgga ctgacgtcc tggctctgtg	17460
atgtgtgttt ttagatggaa gacatcaatt ttctcctcc ggccaccgca caccggcacgc	17520
ggccgtttat gggcacctgg agcgacatcg gcaacagcca actgaacggg ggcgccttca	17580
attggagcag tctctggagc gggcttaaga atttcgggtc cacgtcaaa acctatggca	17640
acaaggcgtg gaacagcagc acagggcagg cgctgaggga aaagctgaaa gacgagaact	17700
tccagcagaa ggtggtcgat ggcctggcct cgggcatcaa cggggtggtg gacctggcca	17760
accaggccgt gcagaaacag atcaacagcc gcctggacgc ggtcccgccc gcggggtccg	17820
tggagatgcc ccaggtggag gaggagctgc ctcccctgga caagcgcgcc gacaagcgac	17880
cgcgtccga cgcggaggag acgtgctga cgcacacgga cgagccgccc ccgtacgagg	17940
aggcggtgaa actgggtctg cccaccacgc ggcccgtggc gcctctggcc accggggtgc	18000
tgaaaccag cagcagcagc agccagcccg cgacctgga ctgacctca cctcgccct	18060
ccacagtggc taagccctg ccgccggtgg ccgtcgctc gcgcgcccc cgaggccgcc	18120
cccaggcgaa ctggcagagc actctgaaca gcatcgtggg tctgggagtg cagagtgtga	18180
agcgccgccc ctgctattaa aagacactgt agcgcttaac ttgcttgtct gtgtgtatat	18240
glatgtccgc cgaccagaag gaggaggaag aggcgcgtcg ccgagttgca agatggccac	18300
cccatcgatg ctgccccagt gggcgtacat gcacatcgcc ggacaggacg cttcgagta	18360
cctgagtccg ggtctggtgc agttcgcccc cgccacagac acctacttca gtctggggaa	18420
caagtttagg aacccccagg tggcaccac gcacgatgtg accaccgacc gcagccagcg	18480

gctgacgctg cgcttcgtgc ccgtggaccg cgaggacaac acctactcgt acaaagtgcg	18540
ctacacgctg gccgtgggcg acaaccgcgt gctggacatg gccagcacct actttgacat	18600
ccgcggcgctg ctggatcggg gccccagctt caaacctac tccggcaccg cctacaacag	18660
cctggctccc aaggagagcg ccaacacctc acagtggata accaaagaca atggaactga	18720
taagacatac agttttggaa atgctccagt cagaggattg gacattacag aagagggtct	18780
ccaaatagga accgatgagt cagggggtga aagcaagaaa atttttgcag acaaaccta	18840
tcagcctgaa cctcagcttg gagatgagga atggcatgat actattggag ctgaagacaa	18900
gtatggaggc agagcgctta aacctgccac caacatgaaa ccctgctatg ggtctttcgc	18960
caagccaact aatgctaagg gaggtcaggc taaaagcaga accaaggacg atggcactac	19020
tgagcctgat attgacatgg ctttctttga cgatcgcagt cagcaagcta gtttcagtcc	19080
agaacttggt ttgtatactg agaatgtcga tctggacacc ccggataccc acattattta	19140
caaacctggc actgatgaaa caagtcttc tttcaacttg ggtcagcagt ccatgcccaa	19200
cagacccaac tacattggct tcagagacaa ctttatcggg ctcatgtact acaacagcac	19260
tggcaatatg ggtgtactgg ccggtcaggc ctcccagctg aatgctgtgg tggacttgca	19320
ggacagaaac actgaactgt cctaccagct ctgtcttgac tctctgggtg acagaaccag	19380
gtatttcagt atgtggaatc aggcgggtgga cagctatgac cccgatgtgc gcattattga	19440
aatcacggt gtggaggatg aactcccaa ctattgcttc cttttgaatg gtgtgggctt	19500
tacagataca ttccaggga ttaaggttaa aactacaaat aacggaacag caaatgctac	19560
agagtgggaa tctgatacct ctgtcaataa tgctaatgag attgccaagg gcaatccttt	19620
cgccatggag atcaacatcc aggccaacct gtggcggaac ttcctctacg cgaacgtggc	19680
gctgtacctg cccgactcct acaagtacac gccggccaac atcacgtgc ccaccaacac	19740
caacacctac gattacatga acggccgcgt ggtggcgccc tcgctggtgg acgcctacat	19800
caacatcggg gcgcgctggt cgctggacc ccatggacaac gtcaaccct tcaaccacca	19860
ccgcaacgcg ggctgcgt accgctccat gctcctgggc aacgggcgt acgtgccctt	19920
ccacatccag gtgccccaaa agtttttcgc catcaagagc ctctgtctcc tgcccgggtc	19980
ctacacctac gagtggaaact tccgcaagga cgtcaacatg atcctgcaga gctccctcg	20040
caacgacctg cgcacggagc gggcctccat cgccttcacc agcatcaacc tctacgccac	20100
cttcttcccc atggcgaca acaccgcctc cacgctcgag gccatgctgc gcaacgacac	20160
caacgaccag tccttcaacg actacctctc ggcgccaac atgctctacc ccatcccggc	20220

caacgccacc aacgtgccca tctccatccc ctgcgcgaac tgggccgcct tccgcggatg	20280
gtccttcacg cgctcaaga cccgcgagac gccctcgtc ggctccgggt tcgacccta	20340
cttcgtctac tggggtcca tccctacct cgacggcacc ttctacctca accacacctt	20400
caagaaggtc tccatcacct tcgactcctc cgtcagctgg cccggcaacg accgcctcct	20460
gacgccaac gagttcgaat tcaagcgac cgtcgacgga gaggggtaca acgtggccca	20520
gtgcaaatg accaaggact ggttcctggt ccagatgctg gccactaca acatcggcta	20580
ccagggttc tacgtgcccg agggctacaa ggaccgcatg tactccttct tccgcaactt	20640
ccagcccatg agccgccagg tcgtggacga ggtcaactac aaggactacc aggccgtcac	20700
cctggcctac cagcacaaca actcgggctt cgtcggctac ctgcgcacca ccatgcgcca	20760
gggccagccc taccgccca actaccccta cccgtcatc ggcaagagcg ccgtcgccag	20820
cgtcaccag aaaaagtcc tctgcgaccg ggtcatgtgg cgcacccct tctccagcaa	20880
cttcatgtc atggcgcgcg tcaccgacct cggccagaac atgctctac ccaactccgc	20940
ccacgcgcta gacatgaatt tcgaagtcga ccccatggat gattccacc ttctctatgt	21000
tgtcttcgaa gtcttcgacg tcgtccgagt gcaccagccc caccgcggcg tcatcgaggc	21060
cgtctacctg cgcacgcct tctcggccgg caacgccacc acctaacct cttgcttctt	21120
gcaagatgac ggctgtggc tccggcgagc aggagctcag ggccatctc cgcgacctgg	21180
gtcgcgggccc ctacttctg ggcaccttcg acaagcgctt cccgggattc atggccccgc	21240
acaagctggc ctgcgccatc gtcaacacgg ccggccgcga gaccgggggc gagcactggc	21300
tggccttcgc ctggaacccg cgcaccaca cctgtacct cttcgacccc ttcgggttct	21360
cggacgagcg cctcaagcag atctaccagt tcgagtacga gggcctgctg cggcgagcg	21420
ccctggccac cgaggaccgc tgcgtcacc tggaaaagtc caccagacc gtgcagggtc	21480
cgcgtcggc cgctgcggg ctcttctgt gcatgttct gcacgccttc gtgactggc	21540
ccgaccgcc catggacaag aacccacca tgaacttct gacgggggtg cccaacggca	21600
tgtccagtc gcccagggtg gaaccaccc tgcgccgcaa ccaggaggcg ctctaccgt	21660
tcctcaacgc cactccgcc tactttctgt cccaccgcgc gcgcatcgag aaggccaccg	21720
ccttcgaccg catgaatcaa gacatgtaa ctgtgtgtat gtgaatgctt tattcataat	21780
aaacagcaca tgtttatgcc accttctctg aggtctctgac ttattttaga aatcgaagg	21840
gttctgccgg ctctcggcgt gccccgcggg cagggtacg ttgcggaact ggtacttggg	21900
cagccacttg aactcgggga tcagcagctt cggcacgggg aggtcgggga acgagtcgt	21960
ccacagcttg cgcgtgagtt gcaggcgcc cagcaggtcg ggcgcggata tcttgaaatc	22020
acagtggga cccgcgttct gcgcgcgaga gttgcggtac acggggttgc agcactggaa	22080

caccatcagg gccgggtgct tcacgtcgc cagcaccgtc gcgtcggga tgccctccac	22140
gtccagatcc tggcggttgg ccatcccgaa gggggtcatc ttgcaggtct gccgccccat	22200
gctgggcacg cagccgggct tgtggttga atcgagtg caggggatca gcatcatctg	22260
ggcctgctcg gagctcatgc ccgggtacat ggctttcatg aaagcctcca gctggcgga	22320
ggcctgctgc gccttgccgc cctcggtgaa gaagaccccg caggacttgc tagagaactg	22380
gttgggtggc cagccggcgt cgtgcacgca gcagcgcg cgttgttgg ccagctgcac	22440
cacgtcgcg cccagcgggt tctgggtgat ctggcccg tgggggttct cttcagcgc	22500
gcgtgcccc ttctcgtcg ccacatccat ctcgatcgtg tgcctcttct ggatcatcac	22560
ggcctcgtgc aggcaccgca gcttccctc ggcttcgggt catccgtgca gccacagcg	22620
gcagccgggt cactccaggt tcttgtgggc gatctgggag tgcgagtgca cgaagcctg	22680
caggaagcgg cccatcatcg cggtcagggt ctgttctg gtgaaggtca gcgggatgcc	22740
gcggtgctcc tcttcacat acaggtggca gatgcggcg tacacctgc cctgctcggg	22800
catcagctgg aaggcggact tcaggtcgt ctccacggg taccgtcca tcagcagct	22860
catgacttcc atgccccct cccagggcga aacgatcggc aggtcaggg ggttcttcac	22920
cgttgcac ctagtcggc ccgcccagg cagggggtcg ttctcgtcca ggtctcaaa	22980
cactcgttg ccgtccttct cggatgatgc cacgggggga aagctgaag ccacggccgc	23040
cagctcctcc tggcctgcc ttctcctc gctgtcctgg ctgatgtctt gcaaaggcac	23100
atgcttggc ttgcggggtt tcttttggg cggcagaggc ggcgcgag acgtgctggg	23160
cgagcgcgag ttctcgtca ccacactat ttcttctt tggcgtcgt ccgagaccac	23220
gcggcggtag gcatgcctt tctggggcag aggcggaggc gacgggtct cgcggttcgg	23280
cggcggtg gcagagcccc ttccggttc gggggtgcg tctggcggc gctgcttga	23340
ctgacttct ccggcgccg ccatgtgtt ctctaggga gcaagcatgg agactcagcc	23400
atcgtcgca acatgccat ctgccccgc cgcgcccgc gagaaccagc agcagcagaa	23460
tgaagctta accgccccgc cgccagccc cactccgac gcccgggccc cagacatgca	23520
agagatggag gaatccatc agattgacct gggctacgtg acgcccgcg agcacgagga	23580
ggagctggca gcgcgtttt cagccccga agagaaccac caagagcagc cagagcagga	23640
agcagagagc gagcagagcc aggtggggt cgagcatgg gactacctga gcggggcaga	23700
ggacgtgct atcaagcatc tggcccgcca atgcatcatc gtcaaggatg cgtgctcga	23760
ccgcgccgag gtgccccca gcgtggcgga gctcagccgc gcctacgagc gcaacctctt	23820
ctgcgcgc gtgccccca agcgccagcc caacggcacc tgcgagccca accgcgcct	23880
caacttctac ccggtcttcg cgggtccccga ggccctggcc acctaccacc tcttttcaa	23940

gaaccaaagg atccccgtct cctgccgcgc caaccgcacc cgccgcgacg ccctgctcaa	24000
cctgggcccc ggccccgcc tacctgatat cgctccttg gaagaggttc ccaagatctt	24060
cgagggtctg ggccagcgacg agactcgggc cgcgaacgct ctgcaaggaa gcggagagga	24120
gcatgagcac cacagcgccc tggtaggagt ggaaggcgac aacgcgcgcc tggcggctct	24180
caagcgacg gtctgagctga cccacttcgc ctaccggcg ctcaacctgc cccccaaggt	24240
catgagcgcc gtcatggacc aggtgctcat caagcgcgcc tcgcccctct cggaggagga	24300
gatgcaggac cccgagagct cggacgaggg caagcccgctg gtccagcgacg agcagctggc	24360
gcgctggctg ggagcgagta gcacccccca gacccctgga gagcggcgca agctcatgat	24420
ggccgtggtc ctggtgaccg tggagctgga gtgtctgcgc cgcttcttcg ccgacgcgga	24480
gacctgcgc aaggtcgagg agaacctgca ctacctcttc aggcacgggt tcgtgcgcca	24540
ggcctgcaag atctccaacg tggagctgac caacctggtc tcctacatgg gcatcctgca	24600
cgagaaccgc ctggggcaga acgtgctgca caccacctg cgccgggagg cccgccgcga	24660
ctacatccgc gactgcgtct acctgtacct ctgccacacc tggcagacgg gcatgggcgt	24720
gtggcagcag tgcttgagg agcagaacct gaaagagctc tgcaagctcc tgcagaagaa	24780
cctgaaggcc ctgtggaccg ggttcgacga gcgcaccacc gcctcggacc tggccgacct	24840
catcttcccc gagcgctgc ggctgacgt gcgcaacggg ctgcccgaact ttatgagcca	24900
aagcatgttg caaaactttc gctctttcat cctcgaacgc tccgggatcc tgcccgcac	24960
ctgctccgcg ctgcccctcg acttctgtcc gctgaccttc cgcgagtgc ccccgccgt	25020
ctggagccac tctacctgc tgcgtctggc caactacctg gcctaccact cggacgtgat	25080
cgaggacgtc agcggcgagg gtctgctcga gtgccactgc cgctgcaacc tctgcacgcc	25140
gcaccgtcc ctggcctgca acccccagct gctgagcgag acccagatca tcggcacctt	25200
cgagttgcaa ggccccggcg aggagggcaa ggggggtctg aaactcacc cggggtgtg	25260
gacctcggcc tacttgcgca agttcgtgcc cgaggactac catcccttcg agatcaggtt	25320
ctacaggac caatcccagc gcaccaaggc cgagctgtcg gctcgtca tcaccaggg	25380
ggccatcctg gcccaattgc aagccatcca gaaatccgc caagaatttc tgctgaaaaa	25440
gggccacggg gtctacttgg acccccagac cggagaggag ctcaaccca gcttcccca	25500
ggatgccag aggaagcagc aagaagctga aagtggagct gccgtgccg ccggaggatt	25560
tggaggaaga ctgggagagc agtcaggcag aggaggagga gatggaagac tgggacagca	25620
ctcaggcaga ggaggacagc ctgcaagaca gtctggaaga cgaggtggag gaggaggcag	25680

aggaagaagc agccgccgcc agaccgtcgt cctcggcgga gaaagcaagc agcacggata	25740
ccatctccgc tccgggtcgg ggtctcggcg gccgggcccc cagtaggtgg gacgagaccg	25800
ggcgcttccc gaacccccacc acccagaccg gtaagaagga gcggcaggga tacaagtctt	25860
ggcgggggca caaaaacgcc atcgtctcct gcttgcaagc ctgcgggggc aacatctcct	25920
tcaccggcg ctacctgctc ttccaccgcg gggatgaactt cccccgaac atcttgcat	25980
actaccgtca cctccacagc ccctactact gtttccaaga agaggcagaa acccagcagc	26040
agcagaaaac cagcagcagc tagaaaatcc acagcggcgg cggcggcagg tggactgagg	26100
atcgcggcga acgagccggc gcagaccgg gagctgagga accggatctt tcccaccctc	26160
tatgccatct tccagcagag tcgggggcag gacgaggaac tgaaagtcaa gaaccgttct	26220
ctgcgtctgc tcaccgcag ttgtctgtat cacaagagcg aagaccaact tcagcgact	26280
ctcaggagcg ccgaggctct cttcaacaag tactgcgcgc tctctttaa agagtagccc	26340
gcgccccccc acacacggaa aaaggcggga attacgtcac cacctgcgcc cttcgccga	26400
ccatcatcat gagcaaagag attccacgc cttacatgtg gagctaccag cccagatgg	26460
gcctggccgc cggcgccgcc caggactact ccaccgcac gaactggctc agtgccgggc	26520
ccgcgatgat ctacgggtg aatgacatcc gcgcccccg aaaccagata ctctagaac	26580
agtcagcgat caccgccag ccccgccatc accttaatcc gcgtaattgg cccgccccc	26640
tggtgtacca ggaaattccc cagccacga ccgtactact tccgcgagac gccaggcgcg	26700
aagtccagct gactaactca ggtgtccagc tggccggcgg cggccctg tgtcgtcacc	26760
gccccgtca gggatataag cggctggtga tccgaggcag aggcacacag ctcaacgacg	26820
aggtggtgag ctcttcgtg ggtctgcgac ctgacggagt cttccaactc gccgatcgg	26880
ggagatcttc cttcacgct cgtcaggccg tctgacttt ggagagttcg tctcgcagc	26940
cccgtcggg tggcatcggc actctccagt tcgtggagga gttcactccc tcggtctact	27000
tcaacccctt ctccggtcc cccggccact acccgacga gttcatccg aacttcgacg	27060
ccatcagcga gtcggtggac ggctacgatt gaatgtcca tggtggcgcg gctgacctag	27120
ctcggttcg acacctggac cactgccgc gttccgctg cttcgctcgg gatctcgccg	27180
agtttgcta cttgagctg cccgaggagc accctcaggg cccggccac ggagtgcgga	27240
tcacgtcga agggggcctc gactccacc tgcttcggat cttcagccag cgtccgatec	27300
tggtcgagcg cgagcaagga cagaccgtc tgaccctgta ctgcatctgc aaccaccccg	27360
gcctgcatga aagtctttgt tgtctgtgt gtactgagta taataaaagc tgagatcagc	27420
gactactccg gacttcctg tgttctgaa tccatcaacc agtccctgtt cttcaccggg	27480
aacgagaccg agtccagct ccagtgtgaa cccacaaga agtacctcac ctggctgttc	27540

cagggtctccc cgatcgccgt tgtcaaccac tgcgacaacg acggagtcct gctgagcggc	27600
cctgccaacc ttactttttc caccgcaga agcaagctcc agctcttcca acccttcctc	27660
cccgggacct atcagtgcgt ctggggaccc tgccatcaca ccttccacct gatcccgat	27720
accacagcgt cgctccccgc tactaacaac caaactaccc accaacgcca cgtcgcgac	27780
ctttcctctg aatctaatac cactaccgga ggtgagctcc gaggtcgacc aacctctggg	27840
atttactacg gcccttggga ggtggtgggg ttaatagcgc taggcctagt tgtgggtggg	27900
cttttggctc tctgctacct atacctcct tgcgttctgt acttagtggt gctgtgttgc	27960
tggtttaaga aatggggcag atcaccttag tgagctgcgg tgtgctggtg gcggtggtgc	28020
tttcgattgt gggactgggc ggcgcggtgt tagtgaagga gaaggccgat ccctgcttgc	28080
atttcaatcc cgacaaatgc cagctgagtt ttccagccga tggcaatcgg tgcgcggtgc	28140
tgatcaagtg cggatgggaa tgcgagaacg tgagaatcga gtacaataac aagactcgga	28200
acaatactct cgcgtccgtg tggcagcccg gggaccccgga gtggtacacc gtctctgtcc	28260
ccggtgctga cggtccccg cgcaccgtga ataatacttt catTTTTgCG cacatgtgcg	28320
acacggtcat gtggatgagc aagcagtagc atatgtggcc cccacgaag gagaacatcg	28380
tggctcttctc catcgcttac agcctgtgca cgggtgcta caccgctatc gtgtgcctga	28440
gcattcacat gctcatcgct attcggccca gaaataatgc cgaaaaagag aaacagccat	28500
aacacgtttt ttcacacacc ttgtttttac agacaatgCG tctgttaaat tttttaaaca	28560
ttgtgctcag tattgcttat gcctctggct atgcaaacat acagaaaacc ctctatgtag	28620
gatctgatga tacactagag ggtacccaat cacaagctag ggtttcatgg tatTTTTata	28680
aaagctcaga taatcctatt actctttgca aagggtgatca ggggcggaca acaaagccgc	28740
ctatcacatt tagctgtacc agaacaatc tcacgctttt ctcaattaca aaacaatatg	28800
ctggtattta ttacagtaca aactttcata gtgggcaaga taaatattat actgttaagg	28860
tagaaaaatc taccactcct agaactacca ccaccaccac caccaccacc actactgcga	28920
agccactaa acctaaaact accaagaaaa cactgtgaa aactacaact agaaccacca	28980
caactacaga aaccaccacc agcacaacac ttgctgcaac tacacacaca cacactgagc	29040
taaccttaca gaccactaat gatttgatag cctgtttgca aaagggggat aacagcacca	29100
cttccaatga ggagataccc aaatccatga ttggcattat tgttgctgta gtggtgtgca	29160
tgttgatcat cgccttgtgc atgggtgact atgccttctg ctacagaaag cacagactga	29220
acgacaagct ggaacactta ctaagtgttg aattttaatt ttttagaacc atgaagatcc	29280
taggcctttt agttttttct atcattacct ctgctctatg caattctgac aatgaggacg	29340
ttactgtcgt tgtcgatca aattatacac tgaaaggtcc agcgaagggt atgctttcgt	29400

ggtattgctg gtttggaaact gacactgata aaactgagct ttgcaatgca atgaaaggtc	29460
aaataccaac ctcaaaaatt aaacataaat gcaatggtag tgacttagta ctactcaata	29520
tcacgaaatc atatgctggc agctattcat gccctggaga tgatgctgag aacatgattt	29580
tttaciaaagt aactgttgtt gatccactia ctccaccacc caccaccaca actactcaca	29640
ccacacacac agaacaaca ccagaggcag cagaagcaga gttggccttc caggttcacg	29700
gagattcctt tgctgtcaat accctacac ccgatcatcg gtgtccgggg ctgctagtca	29760
gcggcattgt cgggtgtgctt tcgggattag cagtcataat catctgcatg ttcatttttg	29820
cttgctgcta tagaaggctt taccgacaaa aatcagaccc actgctgaac ctctatgttt	29880
aattttttcc agagccatga aggcagtttag cgctctagtt tttgtttctt tgattggcat	29940
tgttttttgc aatcctatta ctagagtttag ctttattaaa gatgtgaatg ttactgaggg	30000
gggcaatgtg acactggtag gtgtagaggg tgctaaaaac accacctgga caaaatacca	30060
ccttgggtgg aaagatattt gcaattggag tgtcactgtg tacacatgtg agggagttaa	30120
tcttaccatt gtcaatgcca cctcagctca aaatggtaga attcaaggac aaagtgttag	30180
tgtgaccagt gatgggtatt ttaccaaca tacttttata tatgacgtta aagtcatacc	30240
actgcctacg cctagccccc ctagcaccac tacacaaaca acccacacta cacagacaac	30300
cacatacagt acatcaaac agcctaccac cactacagca gcagaggttg ccagctcgtc	30360
tggagttaaa gtggcatttt tgttgttgcc cccatctagc agtcccaactg ctattaccaa	30420
tgagcagact actgcatttt tgtccactgt cgagagccac accacagcta cctccagtgc	30480
cttctctagc accgccaatc tctctctgct ttctcttaca ccaatcagtc ccgctactac	30540
tactaccccc gctattcttc ccactccct gaagcaaca gacggcggca tgcaatggca	30600
gatcacctg ctcatgtga tcgggttggc catcctagcc gtgttgctct actacatctt	30660
ctgccgccgc attcccaacg cgcaccgcaa gccggtctac aagcccatca ttgtcgggca	30720
gccggagccg cttcagggtg aaggggtctt aaggaatctt ctcttctctt ttacagtatg	30780
gtgattgaac tatgattcct agacaattct tgatcactat tcttatctgc ctctccaag	30840
tctgtccac cctcgctctg gtggccaacg ccagtccaga ctgtattggg cccttcgcct	30900
cctacgtgct ctttgccttc atcacctgca tctgtgctg tagcatagtc tgctgtctta	30960
tcaccttctt ccagttcatt gactggatct ttgtgcgcat cgcctacctg cgccaccacc	31020
cccagtaccg cgaccagcga gtggcgagc tgctcaggct cctctgataa gcatgcgggc	31080
tctgtactt ctgcgcttc tgctgttagt gctccccctg cccgttgacc cccggccccc	31140

cactcagtc ccgaggagg tccgcaaatg caaattccaa gaaccctgga aattcctcaa	31200
atgctaccgc caaaaatcag acatgcatcc cagctggatc atgatcattg ggatcgtgaa	31260
cattctggcc tgcaccctca tctcctttgt gatttacccc tgctttgact ttggttgga	31320
ctcgccagag gcgtctatc tcccgctga acctgacaca ccaccacagc aacctcaggc	31380
acacgcacta ccaccaccac agcctaggcc acaatacatg cccatattag actatgaggc	31440
cgagccacag cgacccatgc tccccgctat tagttacttc aatctaaccg gcggagatga	31500
ctgacccact ggccaacaac aacgtcaacg accttctcct ggacatggac ggccgcgcct	31560
cggagcagcg actcgcccaa cttcgcatc gccagcagca ggagagagcc gtcaaggagc	31620
tgcaggacgg catagccatc caccagtga agaaaggcat cttctgcctg gtgaaacagg	31680
ccaagatctc ctacgaggtc acccagaccg accatgcct ctcctacgag ctctgcagc	31740
agcgccagaa gttcacctgc ctggctggag tcaaccccat cgtcatcacc cagcagtcgg	31800
gcgataccaa ggggtgcac cactgctcct gcgactcccc cgactgcgtc cacactctga	31860
tcaagacct ctgcggcctc cgcgacctcc tccccatgaa ctaatcacc acttatccag	31920
tgaaataaaa aaataatcat ttgatttgaa ataaagatac aatcataattg atgatttgag	31980
tttaacaaaa ataaagaatc acttacttga aatctgatac caggtctctg tccatatttt	32040
ctgccaacac cacctcactc cctcttccc agctctggta ctgcaggccc cggcgggctg	32100
caaacttctt ccacacgtg aaggggatgt caaattctc ctgccccca atcttcattt	32160
tatcttctat cagatgtcca aaaagcgcgt ccgggtggat gatgacttcg acccgtcta	32220
cccctacgat gcagacaacg caccgaccgt gcccttcac aacccccct tcgtctcttc	32280
agatggattc caagagaagc ccctgggggt gttgtccctg cgactggccg acccgtcac	32340
caccaagaac ggggaaatca ccctcaagct gggagagggg gtggacctcg actcctcggg	32400
aaaactcacc tccaacacgg ccaccaaggc cgtgcccct ctcagttttt ccaacaacac	32460
catttcctt aacatggatc acccctttta cactaaagat ggaaaattag cttacaagt	32520
ttctccacca ttaaataatc tgagaacaag cattctaaac aactagctt taggttttg	32580
atcaggttta ggactccgtg gctctgcctt ggcagtagag ttagtctctc cacttacatt	32640
tgatactgat ggaacataa agcttacctt agacagaggt ttgcatgtta caacaggaga	32700
tgcaattgaa agcaacataa gctgggctaa aggttttaaaa tttgaagatg gagccatagc	32760
aaccaacatt ggaaatgggt tagagtttg aagcagtagt acagaaacag gtgtcgatga	32820
tgcttaccca atccaagtta aacttggatc tggccttagc tttgacagta caggagccat	32880
aatggctggt aacaagaag acgataaact cactttgtgg acaacacctg atccatcacc	32940
aaactgtcaa atactcgcag aaaatgatgc aaaactaaca ctttgcttga ctaaatgtgg	33000

tagtcaaata ctggccactg tgtcagtcctt agttgtagga agtggaacc taaaccccat	33060
tactggcacc gtaagcagtg ctcaggtgtt tctacgtttt gatgcaaacg gtgttctttt	33120
aacagaacat tctacactaa aaaaatactg ggggtatagg caggagata gcatagatgg	33180
cactccatat gtcaatgctg taggattcat gcccaattta aaagcttatc caaagtcaca	33240
aagtcttact actaaaaata atatatagtagg gcaagtatac atgaatggag atgtttcaaa	33300
acctatgctt ctcactataa ccctcaatgg tactgatgac agcaacagta catattcaat	33360
gtcattttca tacacctgga ctaatggaag ctatgttggga gcaacatttg gagctaactc	33420
ttataacctc tctacatcg cccaagaatg aatactgtat cccacctgc atgcccaacc	33480
ctccccacc tctgtctata tggaaaactc tgaacacaa aataaaataa agttcaagt	33540
ttttattgat tcaacagttt tacaggattc gagcagttat ttttctcca ccctcccagg	33600
acatggaata caccaccctc tcccccgca cagccttgaa catctgaatg ccattggtga	33660
tggacatgct ttigtctcc acgttccaca cagtttcaga gcgagccagt ctcgggtcgg	33720
tcaggagat gaaacctcc gggcactccc gcatctgcac ctcacagctc aacagctgag	33780
gattgtctc ggtggtcggg atcacggtta tctggaagaa gcagaagagc ggcggtggga	33840
atcatagtcc gcgaacggga tcggccggtg gtgtcgcatc aggccccgca gcagtcgctg	33900
ccgccgccg tccgtcaagc tgctgctcag ggggtccggg tccagggact ccctcagcat	33960
gatgcccacg gccctcagca tcagtcgtct ggtgcggcgg gcgcagcagc gcatgcggat	34020
ctcgctcagg tcgtgcagt acgtgcaaca caggaccacc aggttgttca acagtcata	34080
gttcaacacg ctccagccga aactcatgc gggaaggatg ctaccacgt ggccgtcgta	34140
ccagatctc aggtaaatca agtggcgccc cctccagaac acgtgcca tgtacatgat	34200
ctccttgggc atgtggcgtt caccacctc ccggtaccac atcacctct ggttgaacat	34260
gcagccccgg atgatectgc ggaaccacag ggccagcacc gccccgccg ccatgcagcg	34320
aagagacccc ggggtccggc aatggcaatg gaggaccac cgctcgtacc cgtggatcat	34380
ctgggagctg aacaagtcta tgttggcaca gcacagcac acgtcatgc atctctcag	34440
cactctcagc tctcggggg tcaaaacat atcccaggc acgggaaact cttgcaggac	34500
agcgaagccc gcagaacagg gcaatcctcg cacataactt acattgtgca tggacagggt	34560
atcgcaatca ggcagcacc ggtgatectc caccagagaa gcgcgggtct cgggtctctc	34620
acagcgtggt aagggggccg gccgatacgg gtgatggcg gacgcggctg atcgtgttcg	34680
cgaccgtgtc atgatgcagt tgctttcgga cattttcgta cttgctgaag cagaacctgg	34740
tccggcgct gcacaccgat cgccggcggc ggtctcggcg cttggaacgc tcggtgttga	34800
agttgtaaaa cagccactct ctcagaccgt gcagcagatc tagggcctca ggagtgatga	34860

agatcccatc atgcctgatg gctctgatca catcgaccac cgtggaatgg gccagaccca	34920
gccagatgat gcaattttgt tgggtttcgg tgacggcggg ggaggggaaga acaggaagaa	34980
ccatgattaa cttttaatcc aaacggcttc ggagcacttc aaaatgaagg tcgcggagat	35040
ggcacctctc gccccgcgtg tgttggtgga aaataacagc caggicaaag gtgatacggg	35100
tctcgagatg ttccacgggtg gcttcagca aagcctccac gcgcacatcc agaaacaaga	35160
caatagcgaa agcgggaggg ttctetaatt cctcaatcat catgttacac tcctgcacca	35220
tccccagata attttcattt ttccagcctt gaatgattcg aactagtcc tgaggtaaat	35280
ccaagccagc catgataaag agctcgcgca gagcgccctc caccggcatt cttagcaca	35340
ccctcataat tccaagatat tctgctcctg gttcacctgc agcagattga caagcgggat	35400
atcaaaatct ctgcccgcat ccctgagctc ctccctcagc aataactgta agtactcttt	35460
catatcctct ccgaaatttt tagccatagg acccccagga ataagagaag ggcaagccac	35520
attacagata aaccgaagtc cccccagtg agcattgcca aatglaagat tgaaataagc	35580
atgctggcta gacccgggtga tatcttcag ataactggac agaaaatcgg gcaagcaatt	35640
tttaagaaaa tcaacaaaag aaaaatcttc cagggtgcagc tttagggcct cgggaacaac	35700
gatggagtaa gtgcaagggg tgcgttcag catggttagt tagctgatct gtaaaaaaac	35760
aaaaaataaa acattaaacc atgctagcct ggccaacagg tgggtaaatc gttctctcca	35820
gcaccaggca ggccacgggg tctccggcgc gaccctcgta aaaattgtcg ctatgattga	35880
aaaccatcac agagagacgt tcccgggtggc cggcgtgaat gattcgagaa gaagcataca	35940
cccccggaac attggagtcc gtgagtgaat aaaagcggcc gaggaagcaa tgaggcacta	36000
caacgtcac tctcaagtc agcaaagcga tgccatgcgg atgaagcaca aaattttcag	36060
gtgcgtaaaa aatgtaatta ctccctcct gcacagcag cgaagctccc gatccctcca	36120
gatacacata caaagcctca gcgtccatag cttaccgagc ggcagcagca gcggcacaca	36180
acaggcgcaa gattcagaga aaagactgag ctctaacctg tccgcccgt cttgtctcaa	36240
tatatagccc cagatctaca ctgacgtaaa ggccaaagtc taaaaatacc cgccaaataa	36300
tcacacacgc ccagcacag cccagaaacc ggtgacacac tcaaaaaaat acgcgcactt	36360
cctcaaagc ccaaactgcc gtcatctccg ggttcccag ctacgtcatc aaaacacgac	36420
tttcaaatc cgtcgaccgt taaaaacgtc acccgccccg ccctaacgg tcgccgtcc	36480
cgcagccaat cagcgccccg catcccaaaa ttcaaacagc tcatttgcat attaacgcgc	36540
acaaaaagtt tgaggatat 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 tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc	60
ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca	120
ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggtta aactgcccac ttggcagtac atcaagtgt	180
tcatatgcc agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg cctggcatta	240
tgccagtag atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtc	300
cgctattacc atggtcgagg tgagccccac gttctgttc actctccca tctcccccc	360
ctccccacc ccaattttgt atttatttat ttttaatta tttgtgcag cgatgggggc	420
gggggggggg gggggcgcg gccaggcggg gcggggcggg gcgaggggcg gggcggggcg	480
aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg tccgaaagt tcttttatg	540
gcgagggcg gcggcgcggc gccctataaa aagcgaagcg ctccctatca gtgatagaga	600
tctccctatc agtgatagag atcgtcgacg agctcgcggc gggcgggagt cgtcgcgcg	660
tgccttcgcc ccgtgccccg ctccgccgcc gcctcgcgcc gcccgcgccg gctctgactg	720
accgcgttac taaaacaggt aagtcgggc tccgcgccg gttttggcg cttccgcggg	780
cgccccctc ctacggcgga gcgtgccac gtcagacgaa gggcgacgc agcgtcctga	840
tccttcgcc cggacgtca ggacagcggc ccgtgtca taagactcgg ccttagaacc	900
ccagtatcag cagaaggaca ttttaggacg ggacttgggt gactctagg cactggttt	960
ctttccagag agcggaacag gcgaggaaaa gtagtcctt ctcggcgatt ctgcggagg	1020
atctccgtgg ggcgggaac gccgatgat cctctactaa ccatgttcat gttttcttt	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 cgttgatatcc atatcataat atgtacattt atattggctc atgtccaaca	60
ttaccgccat gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca	120
ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgct	180
ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta	240
acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacgta aactgcccac	300
ttggcagtac atcaagtga tcatatgcca agtacgccc ctattgacgt caatgacggt	360
aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgacctat gggactttcc tacttggcag	420
tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtgatgc ggttttggca gtacatcaat	480
gggcgtggat agcggtttga ctacagggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat	540
gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc	600
ccattgacgc aaatgggccc taggcgtgta cgggtggagg tctatataag gcgaagcgt	660
ccctatcagt gatagagatc tccctatcag tgatagagat cgtcgacgag ctgcggcg	720
gcgggagtcg ctgcgcgctg ccttcgccc gtgcccgcgt ccgccgccgc ctgcgccgc	780
ccgccccggc tctgactgac cgcgttacta aaacaggtaa gtccggcctc cgcgccgggt	840
tttggcgctt ccgcggggcg cccccctct cagggcgagc gctgccacgt cagacgaagg	900
gcgcagcgag cgtcctgac cttccgccc gacgtcagg acagcgccc gctgctcata	960
agactcggcc ttagaacccc agtatcagca gaaggacatt ttaggacggg acttgggtga	1020
ctctagggca ctggttttct ttccagagag cggaacaggc gaggaaaagt agtcccttct	1080
cggcgattct gcggagggat ctccgtgggg cggatgaacgc cgatgatgcc tctactaacc	1140
atgttcatgt tttctttttt tttctacagg tcctgggtga cgaacag	1187