



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006146665/13, 19.11.2004

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.11.2004(30) Конвенционный приоритет:
07.06.2004 CN 200410046237.X

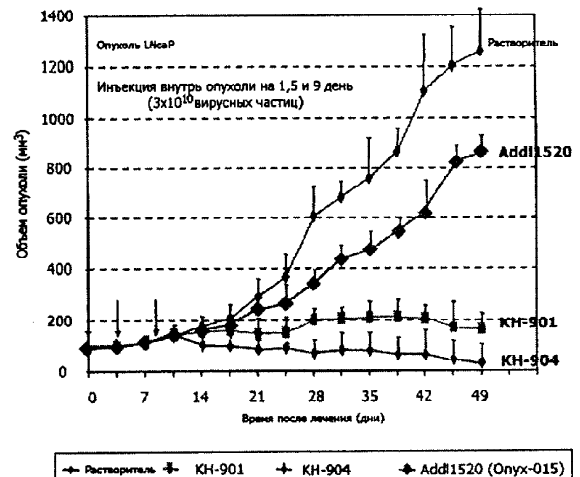
(43) Дата публикации заявки: 20.07.2008

(45) Опубликовано: 20.07.2009 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 02067861, 06.09.2002. US 2003050264,
13.03.2003. US 2002028785, 07.03.2002. CN
1381582, 27.11.2002. WO 9609399, 28.03.1996.(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: 09.01.2007(86) Заявка РСТ:
CN 2004/001321 (19.11.2004)(87) Публикация РСТ:
WO 2005/121343 (22.12.2005)Адрес для переписки:
103735, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент", пат.пов. А.Ю.Соболеву(72) Автор(ы):
КЕ Зунхонд (CN)(73) Патентообладатель(и):
ЧЭНГДУ КАНГХОНГ
БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ КО., ЛТД. (CN)(54) КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТА ОНКОЛИТИЧЕСКОГО АДЕНОВИРУСА,
СПЕЦИФИЧЕСКИ ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО ИММУНОМОДУЛЯТОРНЫЙ ФАКТОР GM-CSF
В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области генной инженерии, вирусологии и медицины. Условно реплицирующийся онколитический улучшенный рекомбинант аденовируса включает основной вирус, модифицированный промотор hTERT и иммунные регуляторные гены. Вирус предпочтительно экспрессирует иммуностимулирующий фактор GM-CSF в опухолевых клетках. Также раскрыт модифицированный промотор, фармацевтическая композиция, включающая вирус, способ получения вируса и его применение. Изобретение может быть использовано в медицине для лечения опухолей. 5 н. и 17 з.п. ф-лы, 13 ил., 2 табл.



Фиг. 10



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
A61K 39/235 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2006146665/13, 19.11.2004**
 (24) Effective date for property rights:
19.11.2004
 (30) Priority:
07.06.2004 CN 200410046237.X
 (43) Application published: **20.07.2008**
 (45) Date of publication: **20.07.2009 Bull. 20**
 (85) Commencement of national phase: **09.01.2007**
 (86) PCT application:
CN 2004/001321 (19.11.2004)
 (87) PCT publication:
WO 2005/121343 (22.12.2005)
 Mail address:
103735, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO
"Sojuzpatent", pat.pov. A.Ju.Sobolevu

(72) Inventor(s):
KE Zunkhond (CN)
 (73) Proprietor(s):
ChEhNGDU KANGKhONG
BAJOTEKNOLODZhIZ KO., LTD. (CN)

RU 2 361 611 C2

(54) **DESIGNING OF CARCINOLYTIC ADENOVIRUS RECOMBINANT, SPECIFICALLY EXPRESSING IMMUNOMODULATORY FACTOR GM-CSF IN TUMORAL CELLS AND ITS APPLICATION**

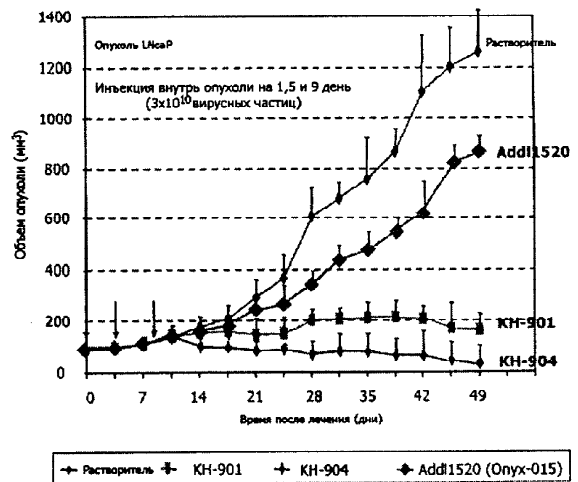
(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention concerns area of gene engineering, virology and medicine. Nominally replicating carcinolytic improved recombinant of the adenovirus includes the basic virus, the modified hTERT promotor and immune regulatory genes. The virus preferably expresses immunostimulating factor GM-CSF in tumoral cells. Also the modified promotor, the pharmaceutical composition including virus, the way of reception of virus and its application is revealed. The invention can be used in medicine for treatment of tumours.

EFFECT: development of a virus which preferably expresses immunostimulating factor GM-CSF in tumoral cells.

22 cl, 13 dwg, 2 tbl, 7 ex



Фиг. 10

RU 2 361 611 C2

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается генной терапии опухолей. Более точно, настоящее изобретение касается конструирования рекомбинантов онколитических аденовирусов, которые предпочтительно реплицируются в опухолевых клетках и экспрессируют
5 иммуностимулирующий фактор для индукции опухолеспецифического иммунного ответа в организме человека.

Уровень техники

Прошло уже более столетия с того момента, когда вирусы были использованы для лечения неопластических заболеваний. Врачи обратили внимание на то, что иногда
10 пациент выздоравливал после вирусной инфекции. Эта загадка была неразрешимой до начала 1920-х годов и с тех пор привлекает внимание ученых и врачей-клиницистов. Так было положено начало вирусной терапии (использованию вирусов для лечения рака). К 1950-м годам более 50 вирусов было протестировано на их
15 противоопухолевую активность у животных или человека (Mullen and Tanabe. (2002) The Oncologist 7:106-119; McCormick F. (2001) Nature Review Cancer 1:130-141). В 1956 году Др.Смит (Dr.Smith) и его коллеги обработали более 30 пациенток с раком шейки матки лизатом клеток HeLa или клеток KB, которые были инфицированы 10
серотипами аденовирусов дикого типа, путем инъекции в опухоль, инъекции в печеночную артерию или внутривенной инъекции. Серьезных побочных эффектов
20 обнаружено не было, за исключением симптомов гриппа у большинства пациенток; с другой стороны, опухоли у некоторых пациенток уменьшились в размерах и подверглись некрозу. К сожалению, из-за ограничений в производстве и очистке вирусов эта работа не имела своего продолжения. Работа Др.Смита была одобрена многими учеными, так как позволяла исследовать возможность использования
25 вирусов для лечения рака (Chiocca E.A. (2002) Nature Review Cancer 2: 938-950).

В связи с прогрессом в области молекулярной биологии и генетической инженерии, в частности в связи с лучшим пониманием взаимоотношений вируса и организма человека, ученые с конца прошлого столетия получили возможность генетически
30 манипулировать с геномом вирусов, что обеспечило успех в создании вирусных мутантов, которые могли специфически реплицироваться в опухолевых клетках (McCormick F. (2001) Nature Review Cancer 1:130-141). Например, глиома-специфичный мутант G207 вируса герпеса (Martuza et al. (1991) Science 252:854-856), аденовирус Add11520 (Опух-015), мутантный аденовирус, предпочтительно реплицирующийся в опухолевых клетках, дефектных по белку p53 (Bischoff et al.
35 (1996) Science 274:373-376), и CV706, мутантный аденовирус, специфичный к клеткам рака предстательной железы (Rodriguez et al. (1997) Cancer Research 57:2559-2563). Эти работы положили начало формированию новой области медицины - Вирусной Терапии Рака. В настоящее время более 20 вариантов вирусов проходит клинические
испытания (Mullen and Tanabe (2002) The Oncologist 7:106-119).

40 Существует несколько подходов для создания онколитических вирусов, специфичных к раковым клеткам. Один подход заключается в создании варианта вируса, который селективно реплицируется в опухолевых клетках, с использованием специфичных для опухолевых клеток регуляторных элементов, таких как промоторы и энхансеры, для контроля экспрессии основных вирусных генов, например генов
45 E1A, E1B, E2 и E4 аденовируса (DeWeese et al. (2001) Cancer Research 61:7464-7472). При использовании этого подхода основные вирусные гены и в конечном итоге репликация вируса будут находиться под контролем регуляторных элементов, специфичных для опухолевых клеток, такие регуляторные элементы включают промотор и энхансеры простата-специфичного антигена (PSA), промотор и энхансеры
50 альфа-фетопротейна (AFP), промотор E2F-1 человека и так далее (McCormick F. (2001) Nature Review Cancer 1:130-14).

Теломераза представляет собой очень важный фермент, который контролирует длину концов хромосом в клетках и может регулировать длину концов хромосом в

процессе клеточного деления. Теломераза состоит, главным образом, из трех частей, где РНК и ген обратной транскриптазы теломеразы (hTERT), которая является каталитически активной, контролируют активность теломеразы, а промотор hTERT определяет уровень экспрессии и активность теломеразы.

5 Дальнейшие исследования показали, что теломераза либо не активна, либо имеет очень низкую активность в нормальных взрослых клетках (Kim N. W. et al. Science. 1994 Dec. 23; 266 (5193):2011-5; Shay J. W. et al. European Journal of Cancer. 1997, 33; 271-282), но имеет высокий уровень доставки в более чем 90% опухолевых клеток ((Hahn and Weinberg (2002) Nature Review Cancer 2:331-341; Shay and Wright (1996) Current Opinion
10 Oncology 8:66-71). Основываясь на этих свойствах hTERT, ученые успешно создали несколько векторов, в которых промотор hTERT был включен в вирусный геном для доставки генов, включая недавно опубликованные работы, описывающие использование промотора hTERT для условно реплицирующихся онколитических аденовирусов (Lanson et al. (2003) Cancer Research 63:7936-7941; Kawashima et al. (2004)
15 Clinical Cancer Research. 10:285-292; Kim et al. (2003) Oncogene 22:370-380; Irving et al. (2004) Cancer Gene Therapy 11:174-185).

В геноме аденовирусов имеется несколько эндогенных регуляторных элементов, которые регулируют экспрессию вирусных генов, например промотор и энхансер гена E1A, и среди этих эндогенных регуляторных элементов последовательность энхансера
20 гена E1A перекрывается с сигналом вирусной сборки. Для того чтобы минимизировать вклад эндогенных регуляторных элементов в регуляцию гетерологичного промотора, ученые переставили сигнал вирусной сборки на правую сторону от нативного участка на левом конце вирусной ДНК (Bristol et al. (2003) Molecular Therapy 7 (6): 755-764; Jakubczak et al. (2003) Cancer Research 63:1490-1499). К
25 сожалению, такое перемещение сигнала сборки вируса из нативного участка на правый конец вирусной ДНК дестабилизировало вирусный геном, что привело к образованию множества вирусных мутантов (WO 02/067861; ASGT 2003 Annual Meeting, Molecular Therapy). Таким образом, названное выше перемещение сигнала вирусной сборки не является удачным подходом для минимизации вклада эндогенных
30 регуляторных элементов. Каким же образом можно минимизировать вклад эндогенных вирусных регуляторных элементов на гетерологичные регуляторные элементы и предотвратить нежелательное образование множества вирусных мутантов, сохранив при этом вирусный геном стабильным?

Принимая во внимание уровень экспрессии теломеразы у человека в период
35 эмбрионального развития и дифференциации, ученые также обнаружили, что определенный уровень теломеразной активности наблюдается в некоторых типах клеток, включая клетки шейки матки, недифференцированные клетки-предшественники и стволовые клетки (Wright et al. (1996) Development Genetics 18:173-179; Sharma et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:12343-12346; Kolquist et al.
40 (1996) British Journal of Cancer 80:1156-1161; Tahara et al. (1999) Oncogene 18:1561-1567; Tanaka et al. (1998) American Journal of Pathology 153:1985-1991). Низкий уровень экспрессии теломеразной активности заставил ученых быть осторожными, когда они использовали промотор hTERT для доставки терапевтического гена в вектор для
45 генной терапии или для создания онколитических аденовирусов, специфичных к опухолевым клеткам, путем контроля основных вирусных генов (Hahn WC (2004) Clinical Cancer Research 10:1203-1205). Из-за наличия низкого уровня экспрессии теломеразы в клетках, не являющихся мишенями, таких как недифференцированные клетки-предшественники, промотор hTERT, контролирующий онколитические аденовирусы, может в широком масштабе реплицироваться в
50 клетках-предшественниках, приводя к тяжелым побочным эффектам (Huang et al. (2004) Clinical Cancer Research. 10:1439-1445; Hahn W.C. (2004) Clinical Cancer Research 10: 1203-1205; Masutomi et al. (2003) Cell 114:241-253). Таким образом, увеличение специфичности промотора hTERT к опухолевым клеткам является одной из ключевых

задач в создании онколитических аденовирусов с использованием промотора hTERT.

Раскрытие изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает рекомбинант для контролирования экспрессии основных вирусных генов аденовируса человека, где рекомбинант получают путем включения специфических для опухолевых клеток регуляторных элементов в геном аденовируса.

С целью усовершенствования настоящего изобретения в другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает онколитические аденовирусы, специфичные к опухолевым клеткам, а также рекомбинанты, получаемые путем комбинирования онколитических аденовирусов с иммунными регуляторными элементами с помощью методов генетической инженерии. Рекомбинант конструируется путем включения специфического для опухолевых клеток промотора и иммунного регуляторного гена в геном аденовируса путем технологии клонирования ДНК; таким способом получается слитая последовательность, способная реплицироваться в опухолевых клетках и экспрессировать иммунный регуляторный ген в опухолевых клетках.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает рекомбинант онколитического вируса, специфичный к опухолевым клеткам, способный экспрессировать иммуностимулирующий фактор. Данный рекомбинант состоит, главным образом, из основного вирусного вектора, регуляторного элемента, специфического для опухолевых клеток, и иммуностимулирующего фактора.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения условно реплицирующегося рекомбинанта онколитического вируса.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение условно реплицирующегося рекомбинанта онколитического вируса для производства лекарственного средства для предотвращения и/или терапевтического лечения раковых заболеваний.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает лекарственное средство для предотвращения и/или терапевтического лечения раковых заболеваний, которое содержит в себе условно реплицирующийся рекомбинант онколитического вируса.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает промотор с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO. 2.

Рекомбинант согласно настоящему изобретению может быть использован для контроля аденовирусов до такой степени, что данные аденовирусы реплицируются только в опухолевых клетках. Путем генетической модификации промотора hTERT рекомбинант настоящего изобретения имеет значительно увеличенную специфичность промотора hTERT к опухолевым клеткам.

Способ получения рекомбинанта онколитического вируса, специфического к опухолевым клеткам, согласно настоящему изобретению включает стадию включения методами генетической инженерии гена иммуностимулирующего фактора, который способен индуцировать специфичный иммуностимулирующий ответ организма человека на опухолевые клетки, в вирусный геном, специфически реплицирующийся в опухолевых клетках. Получаемый рекомбинант вируса может избирательно реплицироваться в специфической популяции клеток и может реплицироваться и распространяться в опухолевых клетках и, следовательно, убивать опухолевые клетки, таким образом рекомбинант может применяться для лечения рака и предотвращения развития опухолей.

Настоящее изобретение также обеспечивает новый способ воспроизведения условно реплицирующегося рекомбинанта онколитического аденовируса, отличающийся от известных в данной области техники. Согласно современному уровню развития данной области конструирование и воспроизведение условно реплицирующегося рекомбинанта онколитического аденовируса или созданных методами генетической инженерии вирусных векторов требует использования генно-инженерных клеточных линий, таких как клеточная линия 293. Такая клеточная линия экспрессирует

аденовирусные E1-белки для обеспечения нормального функционирования репликационно-дефектного аденовирусного вектора с делетированным E1 геном или условно реплицирующегося рекомбинанта онколитического аденовируса, в котором ген E1 находится под контролем опухолевого клеточно-селективного регуляторного элемента. К сожалению, получаемый в такой клеточной линии рекомбинант обычно содержит определенное количество вируса дикого типа или рекомбинировавшего аденовируса (назван здесь как репликационно-компетентный аденовирус, RCA). Причина появления RCA в рекомбинантном продукте заключается в том, что в размножающихся клетках, таких как клетки линии 293, содержащих последовательности генов аденовируса, такие последовательности аденовируса «дикого типа» будут рекомбинировать в клетках с E1-делементированными или E1-усовершенствованными аденовирусами, приводя к возникновению аденовируса «дикого типа» или рекомбинантного аденовируса. Такой продукт может не удовлетворять требованиям, предъявляемым к нему, и может вызывать неожиданные побочные эффекты с небезопасными последствиями. Клетки, используемые для конструирования рекомбинанта согласно настоящему изобретению, не содержат последовательностей аденовирусных генов, и, таким образом, они позволяют избежать появления RCA и решить проблему безопасности, которая упоминалась выше.

Настоящее изобретение обеспечивает условно реплицирующийся рекомбинант онколитического аденовируса, в котором белок капсида улучшен для увеличения сродства к связыванию рекомбинанта с раковыми клетками, что приводит к увеличению инфекционной способности рекомбинанта в отношении опухолевых клеток. Во многих недавних исследованиях было показано, что в опухолевых клетках экспрессия рецептора 5 аденовируса (рецептор коксаки-вируса В и аденовируса, CAR) на низком уровне или отсутствует, однако все опухолевые клетки экспрессируют на высоком уровне белок CD46 (Shayakhmetov et al., 2002. Cancer Research 62:1063-1068). Дальнейшие исследования показали, что рецептором Аденовируса серотипа 35 является молекула белка CD46 (Sirena et al. (2004) Journal of Virology 78(9):4454-4462). Таким образом, мы предполагаем заменить последовательность, образующую булавовидный отросток, в последовательности белка аденовируса серотипа 5 вирусного рекомбинанта на соответствующую последовательность аденовируса серотипа 35, поскольку последний обеспечивает связывание с белковым рецептором CD46, в результате чего сконструировать рекомбинант, содержащий слитый аденовирус, способный связываться с рецептором. Можно надеяться, что такой рекомбинант будет обладать большей инфекционной активностью в отношении более широкого спектра опухолевых клеток.

Условно реплицирующийся онколитический вирус согласно настоящему изобретению может быть ДНК-содержащим вирусом или РНК-содержащим вирусом, может быть любым серотипом из серотипов аденовирусов, включая серотипы 5, 2, 35, 41 и т.д., предпочтительно серотипом 5 или улучшенным аденовирусом. Например, им может быть рекомбинантный аденовирус, у которого ген E1A и ген E1B связаны вместе сайтом внутреннего связывания рибосомы (internal ribosome entry site, IRES); рекомбинант аденовируса, в котором булавовидный отросток аденовируса типа 5 заменен на таковой аденовируса серотипа 35; рекомбинантный аденовирус, у которого последовательность терминации транскрипции вставлена ниже вирусного ITR и сайта упаковки, но выше гетерологичного промотора, такого как промотор hTERT; аденовирус, у которого удалены (делементированы) его кодирующие последовательности 10,4К, 14,5К и 14,7К в участке E3. Названная последовательность терминации транскрипции может терминировать транскрипцию генов, опосредуемую любой РНК-полимеразой; такой последовательностью может быть, например, SV40 ранняя поли(А) сигнальная последовательность; такой последовательностью может быть последовательность рекомбинанта аденовируса, в которой удалены

(делетированы) его кодирующие последовательности 10,4К, 14,5К и 14,7К в участке E3.

Названным генным регуляторным элементом, который является специфичным для опухолевых клеток, является любой промотор, энхансер, сайленсер или их комбинация, предпочтительно улучшенный промотор hTERT, как указано в SEQ. ID
5 No. 2, и данный промотор имеет участок связывания для фактора транскрипции E2F-1.

Названным иммунорегуляторным элементом могут быть любые гены или их варианты, которые способны стимулировать и индуцировать иммунный ответ, такие как IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, IL-24, IL-25, GM-CSF, G-CSF и INF-альфа, INF-бета и т.д., предпочтительно GM-CSF, включая его секретируемые и связанные с мембранами
10 формы, а также их варианты.

Предпочтительным рекомбинантом аденовируса согласно настоящему изобретению является такой рекомбинант, в котором основной вирусный вектор представляет собой улучшенный аденовирус, в котором в аденовирусной последовательности последовательность терминации транскрипции вставлена ниже
15 вирусного ITR и сайта упаковки, но выше гетерологичного промотора, и где специфичным к опухолевым клеткам регуляторным элементом является промотор hTERT с последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 2, и где иммуностимулирующим геном является GM-CSF, имеющий последовательность, показанную в SEQ ID NO. 3 (КН-901), или связанная с мембранами форма GM-CSF
20 (КН-902).

Другим предпочтительным рекомбинантом аденовируса согласно настоящему изобретению является такой рекомбинант, в котором основной вирусный вектор представляет собой улучшенный аденовирус, в котором в его последовательности вместо последовательности, кодирующей булавовидный отросток аденовируса
25 серотипа 5, вставлена последовательность, кодирующая булавовидный отросток аденовируса серотипа 35, и где специфичным к опухолевым клеткам регуляторным элементом является промотор hTERT с последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 2, и где иммуностимулирующим геном является GM-CSF (КН-904), предпочтительно связанная с мембранами форма GM-CSF (КН-905).

Гены E1A и E1B сцеплены вместе с помощью IRES, последовательность, кодирующая булавовидный отросток, является последовательностью, кодирующей отросток серотипа 35, элемент терминации транскрипции вставлен ниже ITR и сайта
30 упаковки и выше гетерологичного регуляторного элемента; селективный к опухолевым клеткам регуляторный элемент представляет собой промотор hTERT с последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 2, где иммуностимулирующим геном является GM-CSF, предпочтительно в его связанной с мембранами форме.

Другим предпочтительным рекомбинантом аденовируса согласно настоящему изобретению является такой рекомбинант, в котором основной вирусный вектор представляет собой улучшенный аденовирус, у которого в аденовирусной
40 последовательности последовательность терминации транскрипции вставлена ниже вирусного ITR и сайта упаковки, но выше гетерологичного промотора; аденовирус, у которого удалены (делетированы) его кодирующие последовательности 10,4К, 14,5К и 14,7К в участке E3; специфичный к опухолевым клеткам регуляторный элемент представляет собой промотор hTERT с последовательностью, показанной в SEQ ID
45 NO. 2, где иммуностимулирующим геном является GM-CSF, предпочтительно связанная с мембранами форма GM-CSF (КН-903).

Другим предпочтительным рекомбинантом аденовируса согласно настоящему изобретению является такой рекомбинант, в котором последовательность терминации транскрипции вставлена ниже вирусного ITR и сайта упаковки, но выше
50 гетерологичного промотора, и где аденовирусные гены E1A и E1B сцеплены вместе с помощью IRES, где специфичный к опухолевым клеткам регуляторный элемент представляет собой промотор hTERT с последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 2, и где иммуностимулирующим геном является GM-CSF (КН-906).

Рекомбинантные аденовирусы согласно настоящему изобретению включают, но ими не ограничиваются, КН-901, КН-902, КН-903, КН-904, КН-905 и КН-906; последовательность для КН-901 показана в SEQ ID NO. 3, где

- 1) 1-103: аденовирусная левая ITR {аденовирус серотипа 5 с последовательностью, показанной в Genbank No. BK000408};
- 2) 194-358: последовательность сборки аденовирусная и последовательность энхансера для E1;
- 3) 362-534: SV40 поли(A) сигнальная последовательность и линкер (последовательность аденовируса серотипа 5, из которой удалены пары нуклеотидов с 362 по 551);
- 4) 525-811: последовательность генетически улучшенного промотора hTERT и линкер;
- 5) от 812 в правую сторону: последовательность аденовируса, включающая E1A, E1B, E2 и т.д.;
- 6) 28995-29436: иммуностимулирующий ген GM-CSF;
- 7) от 29437 в правую сторону: последовательность гена E4 аденовируса и правый конец.

Последовательность КН-900 похожа на последовательность, показанную в SEQ ID NO. 3, хотя последовательность промотора hTERT в ней представляет собой последовательность дикого типа без трансверсии оснований (смотри последовательности SEQ ID NO. 1 и 2). В ней отсутствует SV40 поли(A) сигнальная последовательность между сайтом упаковки и промотором hTERT.

Последовательность КН-902 похожа на последовательность КН-901, но иммуностимулирующий ген GM-CSF заменен его мембранно-связанной формой с последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 4.

Последовательность КН-903 похожа на последовательность КН-901, за исключением того, что кодирующая последовательность для 10.4K, 14.5K и 14.7K делетирована, делетированная последовательность является частью генома аденовируса с 29804 п.н. до 30857 п.н. Белки, кодируемые этой последовательностью, ингибируют иммунный ответ, в частности иммунный ответ, опосредованный фактором некроза опухолей (tumor necrosis factor, TNF). Таким образом, делеция этих кодирующих участков будет усиливать направленный на опухоль иммунный ответ, индуцируемый условно реплицирующимися онколитическими аденовирусами.

Последовательность КН-904 похожа на последовательность КН-901, за исключением того, что последовательность, кодирующая булавовидный отросток аденовируса серотипа 5, заменена на таковую серотипа 35, последовательность показана в SEQ ID NO. 5. Последние исследования показывают, что многие опухолевые клетки не экспрессируют рецепторный белок CAR для аденовируса серотипа 5, но экспрессируют на высоком уровне молекулы CD46. Молекула белка CD46 является рецептором для аденовируса серотипа 35. Таким образом, наличие булавовидного отростка серотипа 35 у аденовируса будет увеличивать инфекционную способность условно реплицирующихся рекомбинантов онколитического аденовируса.

КН-905 похожа на КН-904, за исключением того, что иммуностимулирующий ген GM-CSF заменен в ней с секретрируемой формы на мембранно-связанную форму.

КН-906 получен из КН-901 посредством замещения эндогенного промотора E1B на сайт внутреннего связывания рабосомы (Li et al., (2001) Cancer Research 62; Zhang et al. (2002) Cancer Research 62:3743-3750).

Настоящее изобретение также обеспечивает последовательность улучшенного промотора hTERT, как показано в SEQ ID NO. 2, этот промотор имеет участок связывания для фактора транскрипции E2F-1.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ создания вышеназванного улучшенного промотора hTERT. а основе последовательности промотора hTERT,

показанной на Фигуре 1, были синтезированы два праймера:

А. 5'-GTCTGGATCCGCTAGCCCCACG-3';

В. 5'-CGACCGGTGATATCGTTTAATTCGC-3'.

Промотор hTERT был амплифицирован посредством ПЦР при использовании активированной геномной ДНК человека в качестве матрицы и праймеров, показанных выше. Условия для проведения реакции ПЦР были следующими: для первого цикла - денатурация при 94°C в течение 5 минут, отжиг при 81°C в течение 1 минуты, достраивание при 72°C в течение 2 минут. Для каждого из следующих 35 циклов: денатурация при 93°C в течение 1 минуты, отжиг при 68°C в течение 1 минуты, достраивание при 72°C в течение 2 минут. ПЦР-продукт анализировали в геле из агары и фрагмент промотора hTERT извлекали из геля для подтверждения последовательности методом секвенирования. Было подтверждено, что последовательность соответствует опубликованной последовательности (Фигура 1). Очищенный фрагмент ДНК, полученный в результате ПЦР, был клонирован в вектор pUC19. При использовании метода мутагенеза, описанного Stratagene (сайт-направленный мутагенез), последовательность промотора hTERT была изменена и получена последовательность, показанная на Фигуре 2.

Настоящее изобретение, таким образом, также обеспечивает улучшенный промотор hTERT с последовательностью, показанной SEQ ID NO. 2, которая может быть получена посредством способа, описанного выше.

В промоторе hTERT согласно настоящему изобретению отсутствуют консервативные ТАТА пары оснований, но имеются две последовательности, подобные Е-боксу CACGTG и 4 GC-богатых Sp-1-связывающий участка. Эти консервативные последовательности являются критическими для экспрессии теломеразы, так как транскрипция теломеразы регулируется промотором hTERT через C-Мус/Max и Sp-I (Cong et al. (1999) Human Molecular Genetics. 8(1): 137-142; Kyo et al. (2000) Nucleic Acids Research 28(3):669-677). Во многих исследованиях установлено, что Мус играет важную роль в пролиферации клеток и клеточном цикле, таким образом, вышеназванная модификация промотора hTERT будет вносить дополнительный вклад в транскрипцию и экспрессию теломеразы.

Для того чтобы свести к минимуму активность промотора hTERT в нормальных клетках, таких как клетки-предшественники, и для того, чтобы увеличить его селективность в отношении опухолевых клеток, мы провели детальный анализ участков связывания фактора транскрипции в промоторе hTERT посредством компьютерного моделирования. Основываясь на компьютерном моделировании, мы провели анализ мутантов после серий мутагенеза, среди них мы идентифицировали один мутант, у которого четвертый Sp-I был изменен на E2F-1-связывающий участок, последовательность изменилась с '...TTTCCGCGGCCCGGCC...' (Фигура 1) на '...TTTCCGCGCAACGCC...' (Фигура 2).

Исследование *in vitro* показало, что улучшенный промотор hTERT сохраняет свою активность в опухолевых клетках и значительно снижает «промоторную» активность в нормальных клетках. Таким образом, улучшенный промотор имеет значительно сниженную транскрипционную активность в нормальных клетках, включая клетки-предшественники. В эксперименте с временной трансфекцией с использованием репортерного гена было показано, что в опухолевых клетках улучшенный промотор hTERT обладал в около 5-10 раз большей активностью, чем промотор hTERT дикого типа, тогда как в нормальных клетках улучшенный промотор hTERT обладал значительно меньшей активностью (Фигура 6). После этого нами был сконструирован условно реплицирующийся онколитический аденовирус, основные гены которого были под контролем улучшенного промотора hTERT, полученный онколитический вирус был не токсичен в отношении стволовых клеток (Фигура 7); таким образом, полученный онколитический аденовирус обладал значительно улучшенной безопасностью для клинического применения.

Поскольку промотор E2F-1 является активным в опухолевых клетках, дефектных по pRb/E2F/p16 регуляторному пути, это широко используется в генной терапии, в частности при конструировании условно реплицирующихся онколитических аденовирусов (Parr et al. (1997) *Nature Medicine* 3(10):1145-1149; Jakubczak et al. (2003) *Cancer Research* 63:1490-1499; Bristol et al. (2003) *Molecule Therapy* 7(6):755-763). Улучшенный промотор hTERT имеет не только сайт связывания для факторов транскрипции E2F-1, но также участки связывания Sp-1 и NF-1, которые присутствуют в промоторе E2F-1, то есть улучшенный промотор hTERT является активным в опухолевых клетках, которые имеют повышенную активность теломеразы и нарушенный регуляторный путь Rb. Таким образом, улучшенный промотор hTERT является активным в этих двух типах опухолевых клеток, но неактивен в нормальных клетках, таких как стволовые клетки, что обеспечивает высокую специфичность к опухолевым клеткам.

В то же время настоящее изобретение обеспечивает условно реплицирующийся рекомбинант онколитического аденовируса, в котором ген E1A и ген E1B связаны внутренним сайтом посадки рибосомы (IRES), что обеспечивает транскрипцию двух важных генов E1A и E1B рекомбинанта аденовируса под контролем улучшенного промотора hTERT, такого как КН-906.

Настоящее изобретение обеспечивает рекомбинант онколитического аденовируса, в котором сигнал терминации транскрипции помещен ниже ITR и сайта упаковки вируса и выше специфичного для опухолевых клеток промотора, такого как промотор hTERT.

Сигнал терминации транскрипции, такой как SV40 ранняя поли(A) последовательность, может блокировать транскрипцию, опосредованную любой РНК-полимеразой. В опытах *in vitro* было показано, что присутствие сигнала терминации транскрипции, такого как SV40 ранняя поли(A) последовательность, ITR и последовательности, которая перекрывает сайт упаковки и может действовать как энхансер, оказывает только слабое влияние на промотор hTERT.

Рекомбинанты онколитического аденовируса согласно настоящему изобретению содержат иммуностимулирующие гены. В нескольких известных рекомбинантах онколитического аденовируса в качестве иммуностимулирующего гена был использован ген GM-CSF, рекомбинанты онколитического аденовируса настоящего изобретения также содержат ген GM-CSF в качестве иммуностимулирующего гена, хотя и не ограничиваются только геном GM-CSF, могут использоваться и другие иммуностимулирующие гены, такие как гены цитокинов. Однако GM-CSF является хорошо известным индуктором долгосрочных иммунных ответов (Dranoff et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3539-3543). Этот белок представляет собой секретируемый гликопротеин, который может стимулировать дифференцировку гранулоцитов, моноцитов, макрофагов и дендритных клеток и увеличивать экспрессию МНС и ко-стимулирующей молекулы B7 на антиген-представляющих клетках. GM-CSF может также усиливать инфильтрацию иммунных клеток в ткани и дифференцировку В-клеток. Благодаря описанным выше свойствам GM-CSF, ученые в последние годы используют GM-CSF в комбинации с химиотерапией для лечения рака. Множество антиопухолевых вакцин, состоящих из опухолевых клеток, способных экспрессировать GM-CSF, находится в настоящее время на стадии клинических испытаний (Annitage. (1998) *Blood* 92:4491-4508; Mach et al. (2000) *Cancer Research* 60:3239-3246; Gilboa. (2004) *Nature Reviews Cancer* 4:401-411). Условно реплицирующийся онколитический аденовирус, который экспрессирует GM-CSF, может не только убивать раковые клетки, но также экспрессировать GM-CSF в опухолевых клетках, чтобы индуцировать специфичные к опухолевым клеткам иммунные ответы, приводя к антираковым иммунотерапевтическим эффектам. Таким образом, данный способ создания аутологичной антиопухолевой вакцины не только устраняет сложности, связанные с приготовлением антиопухолевой вакцины, но также сохраняет высокую целостность опухолевых клеток без манипуляций *in vitro*, включая экспрессию

антигена, что делает антираковую вакцину более эффективной *in situ*. Таким образом, описанный выше онколитический вирус может убивать опухолевые клетки в том месте, куда доставляется вирус, и в то же время также убивать удаленные опухолевые клетки посредством опосредованного GM-CSF иммунного ответа. Способ согласно
5 настоящему изобретению представляет собой уникальный подход получения улучшенных онколитических вирусов.

Два рекомбинанта онколитического аденовируса среди других рекомбинантов согласно настоящему изобретению содержат и экспрессируют мембранно-связанный GM-CSF (mbGM-CSF). Предшествующие исследования
10 показали, что мембранно-связанный GM-CSF может усиливать взаимодействие с дендритными клетками и индуцировать лучшие иммунные ответы, чем секретируемый GM-CSF (Soo Hoo et al. (1999) *Journal of Immunology* 169:7343-7349; Yei et al. (2002) *Gene Therapy* 6:1302-1311). Также сообщалось, что мембранно-связанный GM-CSF экспрессируется в условно реплицирующемся рекомбинанте онколитического
15 аденовируса, что обеспечивает получение генетически рекомбинированного активного ингредиента.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ получения рекомбинантов онколитических вирусов, включающий следующие стадии:

- а) конструирование левого плеча аденовируса, которое содержит промотор hTERT;
- 20 б) конструирование правого плеча аденовируса, которое содержит иммуностимулирующий ген;
- в) котрансфекция плазмид, содержащих левое плечо и правое плечо аденовируса, в клетку 293, клетки HeLa, клетки HeLa-S3 или клетки A549, и получение рекомбинанта в результате гомологической рекомбинации.

Рекомбинант настоящего изобретения может быть получен посредством
25 следующих процедур: вирус-рекомбинант получается в клетках млекопитающих в результате гомологической рекомбинации. Во-первых, эндогенный промотор гена E1A делетируется из рХС.1 (плазида, содержащая левое плечо аденовируса серотипа 5, куплена у фирмы Microbix, Canada) и заменяется сигналом терминации SV40
30 поли(А) и улучшенным промотором hTERT с использованием общепринятых техник клонирования, в результате получают рКН-901а. Тем временем последовательность, кодирующая gp19К в рВНСЕ3 (плазида, содержащая правое плечо аденовируса, куплена у фирмы Microbix, Canada), заменяется геном GM-CSF, в результате чего получают плазмиду, названную рКН-901b.

Плазмидные ДНК рКН-901а и рКН-901b котрансфицируются в клетки HeLa, после
35 чего из бляшки отбирают одиночный клон, этот клон был назван КН-901. При использовании аналогичных процедур были сконструированы рекомбинанты КН-900, КН-902, КН-903, КН-904, КН-905 и КН-906.

Фактически, рекомбинанты могут быть получены в любых клетках
40 млекопитающих или не млекопитающих.

Следуя плану, приведенному выше, нуклеотидный фрагмент ДНК был амплифицирован посредством ПЦР с 362 до 551 нуклеотид рХС.1 соответственно с рестрикцией эндонуклеазами SspI и PinAI (AgeI). Фрагмент ДНК с промотором hTERT
45 был амплифицирован из геномной ДНК члелоека методом ПЦР и сцеплен с поли(А). К двум концам фрагмента ДНК были добавлены две рестрицирующие эндонуклеазы SspI и PinAI. Фрагмент ДНК расщепляли SspI и PinAI и лигировали в вектор рХС.1, который был расщеплен теми же ферментами. Лигазной смесью трансформировали клетки *E.coli* DH5-alpha (*hivitro gene*, USA). Десять колоний скальвали, культивировали в инкубаторе в течение 24 часов. ДНК экстрагировали и
50 анализировали, используя ферменты рестрикции, последовательность плазмиды была подтверждена секвенированием и плазида была названа рКН-901а.

Используя праймеры 5'-АТААССАТГТГГСТГС-3' и 5'-АААТТАСТССТГГАСТГГ-3', при проведении ПЦР с использованием в качестве

матрицы кДНК, экстрагированной из активированных макрофагов, был амплифицирован фрагмент ДНК, кодирующий GM-CSF. Полноразмерный ген GM-CSF

был клонирован в вектор pUC19, что было подтверждено секвенированием. Далее фрагмент кДНК гена GM-CSF был клонирован в pVHCE3 в участок,

5 кодирующий gp19k, и полученная плаزمида, названная KН901b, была секвенирована, и правильность конструкции была подтверждена рестриктным анализом.

Плазмидные ДНК pKН-901a и pKН-901b использовали для котрансфекции клеток HeLa для осуществления гомологической рекомбинации. Перед трансфекцией плазмидную ДНК линейаризовали, используя ClaI, и трансфицировали в клетки HeLa с использованием Lipofectin (USA Invitrogen), клетки собирали через 10 дней после трансфекции, проводили 3 цикла замораживания/оттаивания, отбирали 100 мкл для выявления лизирования клеток HeLa. Через восемь дней после начала эксперимента под агаром были видны отдельные зоны лизиса клеток. Были отобраны шесть зон лизиса, которые инокулировали в клетки HeLa. Клеточный лизат собирали через 4-6 15 дней после инокуляции. ДНК аденовируса экстрагировали из клеточного лизата (Qiagen's kit), и структуру вируса подтверждали рестриктазным анализом, методом ПЦР и Саузерн-блотт анализом. Полученный вирус был назван KН-901.

Согласно настоящему изобретению рекомбинантный вирус может применяться для приготовления фармацевтической композиции для лечения раковых заболеваний и/или 20 для предотвращения раковых заболеваний. Рекомбинантный вирус может применяться в комбинации с радио- и химиотерапией для достижения лучшего терапевтического эффекта.

Согласно настоящему изобретению рекомбинантный вирус может применяться в виде композиций для инъекций, предназначенных для внутривенного введения, 25 внутриопухолевой инъекции, внутримышечной инъекции, подкожной инъекции, внутриорганизменной инъекции, внутрибрюшинной инъекции и так далее.

Для крупномасштабного получения рекомбинантный вирус настоящего изобретения может быть приготовлен в клетках HeLa, в клетках HeLa-S3 или в клетках A549 посредством культивирования клеток, заражения вирусом, размножения, 30 концентрирования, очистки. Рекомбинантный вирус, приготовленный этим способом, может быть использован как исходный материал вместе с фармацевтически приемлемыми носителями для создания посредством стандартной техники композиции для инъекций, используемой в клинической практике.

Далее представлены эксперименты, демонстрирующие возможное применение и 35 благоприятные эффекты настоящего изобретения.

Эксперимент 1: Активность промотора hTERT и сравнение специфичности к опухолевым клеткам промотора дикого типа и улучшенного промотора hTERT

Для проверки специфичности улучшенной версии промотора hTERT промотор дикого типа hTERT (telo) и улучшенный промотор hTERT (Mtelo) были сцеплены с репортерным геном люциферазы (luc), полученные плазмиды были трансфицированы 40 в панель раковых клеток человека и нормальных клеток человека. Клетки собирали по прошествии 48 часов после трансфекции и лизаты клеток использовали для определения уровня экспрессии люциферазы. В ходе трансфекции вторичный репортерный ген LacZ репортерной плазмиды был использован для нормирования (стандартизации) эффективности трансфекции между разными типами клеток. 45

Результат, представленный на Фигуре 6, показал, что (1) в клетках опухоли улучшенный промотор Mtelo обеспечивал значительно более высокую люциферазную активность, чем промотор дикого типа hTERT (telo). Например, в клетках Hep3В (повышенная активность теломеразы и дефектный Rb-опосредованный путь) Mtelo 50 обеспечивал в 6 раз более высокую люциферазную активность, чем telo, и в клетках LNCaP (повышенная активность теломеразы и дефектный Rb-опосредованный путь) Mtelo обеспечивал в 18 раз большую люциферазную активность, чем промотор hTERT дикого типа; (2) в нормальных клетках человека промотор hTERT

telo дикого типа приводил к низкому уровню транскрипционной активности, в то время как улучшенный промотор hTERT Mtelo имел базальный уровень транскрипционной активности. Например, в клетках MRC-5 (отсутствие теломеразы и нормальный Rb-опосредованный путь) промотор Mtelo показал в 6 раз меньшую
 5 активность, чем промотор hTERT telo дикого типа. Этот результат показал, что добавление участков связывания E2F приводит к значительному увеличению селективности к опухолевым клеткам и транскрипционной способности hTERT.

Это заключение было дополнительно подтверждено посредством тестов, в которых повышенная селективность улучшенного промотора hTERT и транскрипционная
 10 активность промотора была определена в клетках, зараженных рекомбинантами, посредством измерения числа копий продукта гена E1A. Для исследования использовались четыре вируса: аденовирус дикого типа - в качестве положительного контроля, дефектный по репликации аденовирус dl312 (E1A делетированный) - в качестве отрицательного контроля, КН-900 (с промотором hTERT дикого типа) и
 15 КН-901 (с улучшенным промотором hTERT). Кератиноциты крайней плоти человека (hFKs) и hFKs-E6, клетки hFK, трансформированные геном E6 папилломы вируса человека типа 16 (HPV-16), были использованы для тестирования. Ранее было показано, что hFKs-E6 имеют повышенную активность теломеразы (Horikawa et al. (2001) Journal of Virology 75(9):4467-4472). Клетки инфицировали вирусами при
 20 множественности заражения (multiplicity of infection, MOI) из расчета 1 бляшкообразующая единица (pfU) на клетку, и число копий E1A мРНК определяли путем ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR). Результат, представленный на Фигуре 7, показал, что E1A мРНК не определялась в клетках hFKs и hFKs-E6, инфицированных вирусом dl312; примерно 4000 копий E1A мРНК было определено в
 25 инфицированных клетках Ad5 и не было обнаружено значительных различий в количестве копий мРНК между клетками hFKs и hFKs-E6. Однако при инфицировании клеток КН-900 было обнаружено всего несколько копий E1A мРНК в клетках hGKs, тогда как в клетках hFKs-E6 было обнаружено в 20 раз большее число копий E1A мРНК. Более интересно то, что в клетках hFKs-E6, инфицированных КН-901, было
 30 обнаружено более чем в 100 раз больше E1A мРНК, чем в клетках hFKs. В то же время число копий E1A мРНК в клетках hFKs, инфицированных КН-901, было даже ниже, чем в клетках hFKs, инфицированных КН-900. Взятые вместе, эти результаты показывают, что промотор Mtelo, соединенный с репортерным геном, имеет более
 35 высокий уровень активности и более высокую селективность по отношению к опухолевым клеткам, чем промотор telo; в то же время улучшенная селективность по отношению к опухолевым клеткам подтверждается, когда промотор встроен в геном аденовируса. Промотор Mtelo обладает лучшей специфичностью к опухолям, чем промотор дикого типа, когда он используется для контроля основных вирусных генов.

Эти результаты были дополнительно подтверждены в культуре клеток костного
 40 мозга человека. В анализе клеток на выживаемость КН-900 и КН-901 были использованы для инфицирования клеток 293 и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека (human bone marrow mesenchymal stem cells, hBMsc) при MOI, равном 1. Результат, представленный на Фигуре 8, показывает, что КН-901 убивал клетки так же эффективно, как и КН-900, однако КН-900 обладал определенной
 45 способностью убивать клетки hBMsc, тогда как КН901 совсем не убивал клетки.

Эксперимент 2: Сравнение способности убивать опухолевые клетки четырех условно реплицирующихся рекомбинантов онколитического аденовируса

Для сравнения способности убивать клетки четырех условно реплицирующихся рекомбинантов онколитического вируса была взята клеточная линия A549 рака
 50 легких. Клетки высевали в 6-см чашки Петри и заражали вирусом при MOI, равном 1, когда клетки достигали уровня 85% конфлюентности. Выживаемость клеток определяли в разные моменты времени после инфицирования (Hallenbeck et al. (1997) Human Gene Therapy 11:1172-1179). Результат, представленный на Фигуре 9, показал,

что КН-904 убивал клетки более эффективно, чем КН-901 и КН-902, в то время как КН-900 был самым слабым в этом отношении.

Этот результат показал, что улучшенный промотор hTERT обеспечивает более сильную активность, чем промотор hTERT дикого типа. Он также показал, что замена гена булавовидного отростка на серотип 35 обеспечивает более высокую инфекционную способность, чем в случае серотипа 5. Это заключение было подтверждено на панели раковых клеток и нормальных клеток человека (Таблица 1). Панель опухолевых и нормальных клеток человека была инфицирована различными вариантами аденовируса в течение 72 часов, и выживаемость клеток была определена, как указано выше. Значение EC50 было рассчитано по количеству вируса, необходимому для того, чтобы убить 50% клеток. Чем меньше значение EC50, тем более эффективно вирус убивает клетки. Результат, представленный в Таблице 1, показал, что (1) КН-901 убивал клетки опухоли более эффективно, чем КН-900, дополнительно подтверждая, что улучшенный промотор hTERT имеет лучшую специфичность к опухолевым клеткам; (2) КН-902 и КН-903 убивали клетки так же, как и КН-901, в то время как КН-904 был наиболее мощным. В противоположность этому вирусы, содержащие улучшенный промотор Mtelo (КН-901, КН-902, КН-903 и КН-904), убивали меньше нормальных клеток по сравнению с КН-900, вирусом, который имеет промотор hTERT дикого типа. Для КН-906, в котором вирусный ген E1B был связан с геном E1A через IRES, была обнаружена хорошая специфичность к опухолевым клеткам, хотя его способность убивать клетки была относительно более низкой.

Таблица 1 Экспрессия GM-CSF в клетках, инфицированных КН-901			
Клетка	КН-901 инфекционные единицы/клетка	ELISA (нг/10 ⁶ клеток/24 часа)	Биоанализ (нг/10 ⁶ клеток/24 часа)
LNCaP	10	231±21	195±34
LNCaP	1	30±9	15±4
Hep3B	10	422±13	355±44
Hep3B	1	94±6	85±12
SW680	10	527±19	325±44
SW680	1	214±4	135±21
A549	10	748±17	625±94
A549	1	83±2	55±24
HeLa	10	120±11	105±56
HeLa	1	9±1	2±0,3
hFKs	10	5±0,25	3,5±0,4
hFKs	1	не определяется	не определяется

Таблица 2 EC50 для КН-900, КН-901, КН-902, КН-903, КН-904 и КН906						
клетка	КН-900	КН-901	КН-902	КН-903	КН-904	КН-906
LoVo	1,25	0,92	0,85	0,97	0,35	1,01
A549	0,58	0,19	0,28	0,49	0,08	0,39
LNCaP	2,31	0,22	0,36	0,15	0,01	1,75
Hep3B	4,03	0,31	0,53	0,71	0,03	1,71
HeLa	3,85	0,62	0,55	0,73	0,25	0,89
SW620	2,04	0,20	0,34	0,23	0,04	2,53
CA-33	3,40	1,15	1,17	0,75	0,20	3,15
HepG2	0,91	0,37	0,41	0,97	0,21	1,17
SCC4	9,21	2,10	3,28	2,30	0,61	8,10
HUVEC	27,9	99,3	130,4	83,5	70,6	268,3
BJ	60,8	295,4	260,5	75,4	1801,8	435,4
RPE	35,4	231,7	295	431,7	295,3	531,7
WI38	46,5	92,33	79,5	82,33	69,2	192,33
MRC5	51,54	121,20	135,84	91,20	61,74	266,23

Более интересным является то, что в отношении нормальных клеток человека все вирусные рекомбинанты, которые были сконструированы с включением в них генетически улучшенного промотора Mtelo, включая НК-901, НК-902, НК-903,

НК-904, демонстрировали значительно более слабую способность убивать клетки (что видно из более высоких значений EC50), чем ПК-900, который был сконструирован с включением в него промотора hTERT дикого типа,

5 Кроме того, рекомбинанты аденовируса КН-906, в которых сайт внутреннего связывания рибосомы был вставлен между генами E1A и E1B, и, следовательно, транскрипция генов E1A и E1B находится под контролем улучшенного промотора Mtelo, демонстрировали более высокую селективность в отношении опухолевых клеток, чем другие вирусные рекомбинанты, даже хотя их способность убивать опухолевые клетки была слегка ниже, чем у других рекомбинантов.

10 Эксперимент 3: КН-901 обеспечивает высокий уровень биологически активного GM-CSF в клетках опухоли

Пять линий опухолевых клеток и одна линия нормальных клеток человека были инфицированы КН-901 при MOI, равном от 1 до 10. Через 48 часов после заражения клетки были собраны для определения концентрации GM-CSF методами ELISA и TF-1, как описано ранее (Li et al. (2001) Cancer Research 61:6428-6436). Результат, представленный на Фигуре 14, показал, что 5 линий опухолевых клеток, зараженных КН-901, продуцировали большое количество GM-CSF. Например, в клетках LNCaP, зараженных КН-901, количество GM-CSF, определенное в клетках, составляло 231 нг/10⁶ клеток/24 часа. В противоположность этому, в нормальных клетках человека, зараженных КН-901, наблюдался очень низкий уровень обнаруживаемого GM-CSF. Более того, биотест показал, что GM-CSF, экспрессируемый в опухолевых клетках, был биологически активным (пожалуйста, посмотрите Таблицу 2).

Эксперимент 4: Противоопухолевая эффективность рекомбинантов онколитического аденовируса в моделях опухолей

25 Противоопухолевая эффективность онколитических аденовирусов была определена в модели опухоли рака простаты LNCaP у голых (бесшерстных) мышей. Шесть миллионов клеток LNCaP вводили подкожно каждой голой мыши, и когда объем опухоли достигал размера 200 мм³ в течение 4 недель, вводили вирусы путем инъекции в опухоль три раза на 1, 5 и 9 день в дозе 3×10⁶ частиц разных вирусов (КН-901, КН-904 и Addl1520, онколитический аденовирус с делецией E1B-p55). Объем опухоли измеряли два раза в неделю, результаты представлены на Фигуре 10.

В данном тесте три рекомбинанта, а именно КН-901, КН-904 и КН-907 (не показано, такой же, как КН-901 но без гена GM-CSF), были использованы для инъекции в опухоль, а Addl520 был использован в качестве контроля.

35 Как видно из Фигуры 10, при применении плацебо опухоль росла очень быстро, и на 48 день объем опухоли достигал 1200% от исходного. В группе, обработанной КН-901, размер опухоли оставался на уровне базовой линии, тогда как опухоли, обработанные КН-904, уменьшались в объеме до 15% от базовой линии. За тот же период времени опухоли, обработанные Addl1520, выросли до 850% от базовой линии.

Эти результаты показывают, что КН-901 и КН-904 имеют более высокую противоопухолевую активность, чем Addl1520 (Опух-015). Интересно отметить, что, как показано в опытах *in vitro*, КН-904 имеет более высокую противоопухолевую эффективность, чем КН-901.

45 В этих же экспериментах была подтверждена экспрессия GM-CSF. У животных, обработанных КН-907 и Addl1520, не было обнаружено GM-CSF, тогда как у животных, обработанных КН-901 или КН-904, был обнаружен высокий уровень GM-CSF. Например, на 14 день количество GM-CSF у животных, обработанных КН-901 или КН-904, составило 2322 г/мл или 2776 г/мл соответственно. Этот результат позволяет заключить, что онколитический вирус КН-901 и подобные ему рекомбинанты продуцируют GM-CSF не только в опухолевых клетках, но также обеспечивают высокий уровень экспрессии *in vivo* в имеющих опухоли животных.

Результаты этих исследований демонстрируют репликацию КН-901 и подобных ему

рекомбинантов во множестве опухолевых клеток, поскольку после инъекции были зарегистрированы высокие уровни экспрессии GM-CSF.

Другие описанные выше онколитические аденовирусы были также охарактеризованы с использованием следующих аналогичных подходов и будут более
5 детально описаны в соответствующих примерах.

Рекомбинанты реплицирующихся онколитических аденовирусов, описанные в настоящем изобретении, имеют следующие свойства.

1. Структурные свойства

Эти рекомбинанты представляют собой живые вирусы и могут реплицироваться и
10 размножаться в клетках опухоли. Они отличаются от синтезированных и разработанных с использованием генетической инженерии медикаментов. Они способны воспроизводиться в опухолевых клетках, экспрессировать чужеродные гены и проявлять высокую биологическую активность, а также и противоопухолевую
15 активность. Эти рекомбинанты содержат иммуностимулирующие гены, следовательно, иммуностимулирующий ген может экспрессироваться в клетках, зараженных вирусом, и индуцировать специфичные по отношению к опухолевым клеткам иммунные ответы. Они являются безопасными, поскольку в них присутствует специфичный для опухолей регуляторный элемент.

2. Потенциальное применение

Специфичные для опухолей регуляторные элементы в рекомбинантных вирусах активны в более чем 90% опухолевых клеток, то есть в большинстве опухолевых
20 клеток критические гены этих рекомбинантных вирусов находятся под контролем специфичного для опухоли промотора, следовательно, такие рекомбинантные вирусы могут реплицироваться в большинстве опухолевых клеток и убивать их. Таким
25 образом, эти рекомбинантные вирусы имеют различные области для потенциального применения, включая лечение рака головы и шеи, рака легких, рака прямой кишки, рака простаты, рака мочевого пузыря, рака желудка, рака печени и т.д.

Поскольку эти рекомбинантные вирусы содержат иммуностимулирующий ген, как описано выше, вирусы будут обладать не только онколитическими эффектами, убивая
30 опухолевые клетки, но также будут стимулировать специфичные в отношении опухоли иммунные ответы, следующие за экспрессией цитокинов в опухолевых клетках. Таким образом, эти вирусы будут эффективны не только в отношении локальной опухоли, но также будут эффективны и в отношении удаленных опухолевых клеток (метастазов).

Рекомбинантные вирусы согласно настоящему изобретению имеют следующие
35 свойства: 1) они более специфичны в отношении опухолевых клеток, и не инфекционны в отношении нормальных соматических клеток, стволовых клеток; таким образом, эти вирусы могут иметь меньше побочных эффектов при клиническом применении; 2) они экспрессируют иммуностимулирующий ген, включая
40 секретлируемую и мембранно-связанную формы. Такой цитокин будет стимулировать специфичные в отношении опухоли иммунные ответы, то есть они могут быть также эффективны в отношении удаленных опухолей (метастазов); 3) за счет модификации вирусного капсида эти аденовирусы обладают улучшенной способностью
45 инфицировать клетки, следовательно, они могут иметь более высокую противоопухолевую активность.

Настоящее изобретение обеспечивает следующий вклад:

1) За счет модификации путем направленного мутагенеза специфичный в
отношении опухолей регуляторный элемент - промотор hTERT имеет более высокую
транскрипционную активность и специфичность в отношении опухолей, полученный
50 промотор имеет улучшенную селективность в отношении опухолей, имеет значительно сниженную транскрипционную активность сопряженного с ним гена в нормальных соматических клетках, особенно в половых клетках, клетках-предшественниках и стволовых клетках. Онколитические аденовирусы,

критические гены которых находятся под контролем улучшенного промотора hTERT, не реплицируются в клетках костного мозга, но обладают высокой активностью во многих опухолевых клетках.

2) Ген иммуностимулирующего белка GM-CSF был вставлен генно-инженерными методами в рекомбинантные аденовирусы таким образом, что GM-CSF будет экспрессироваться только в клетках, инфицированных вирусом. Такой вирус будет убивать раковые клетки за счет онколитического действия после его инъекции в опухоль, и в то же время, вслед за онколитическим лизисом, инфицированные вирусом клетки будут экспрессировать GM-CSF, который стимулирует сильный иммунный ответ против опухолевых клеток. Особенно важно, что экспрессирующий GM-CSF онколитический аденовирус будет также обладать профилактическим эффектом, поскольку вирус будет «обучать» иммунную систему пациента за счет комбинации онколитического действия (гибель клетки и презентация антигена) и иммунного ответа посредством «обучения» иммунных клеток пациента. Таким образом, такой вирус может быть способен предотвращать рецидивы опухолей у пациента.

3) За счет модификации капсида полученный рекомбинант онколитического аденовируса имеет улучшенную инфекционную активность в отношении опухолей. Поскольку экспрессия рецептора CAR аденовируса серотипа 5 отсутствует или является низкой, очень часто Ad5 не инфицирует опухолевые клетки. Однако, когда в геном Ad5 вставлен участок связывания и последовательность для рецептора аденовируса серотипа 35, инфекционная способность в отношении большинства опухолевых клеток может быть значительно увеличена. Это наблюдение подтверждено исследованиями *in vitro* и *in vivo*.

Описание последовательностей в перечне последовательностей
 SEQ ID NO. 1 представляет собой фрагмент, содержащий последовательности из промотора TERT человека, который имеет несколько участков связывания факторов транскрипции, включая SP-1 (OC-боксы), E-боксы (участок связывания для Muc), NF-1 (участок связывания для фактора NF).

SEQ ID NO. 2 представляет собой промотор TERT человека, улучшенный в результате мутагенеза, который имеет более высокую селективность к опухолевым клеткам и транскрипционную активность; E2F-1: участок связывания фактора транскрипции E2F.

SEQ ID NO. 3 является последовательностью из полноразмерной последовательности КН-901, в которой:

- 1) 1-103: левая ITR аденовируса {последовательность аденовируса серотипа 5, показанная в Genbank NO. BK000408};
- 2) 194-358: последовательность сигнала упаковки аденовируса и последовательность энхансера для E1;
- 3) 362-534: поли(A) сигнальная последовательность SV40 и линкер (последовательность аденовируса серотипа 5, из которой были делетированы 362-551 п.н.);
- 4) 525-811: последовательности улучшенного промотора hTERT и линкера;
- 5) от 812 направо: последовательность аденовируса, включающая E1A, E1B, E2 и так далее;
- 6) 28995-29436: иммуностимулирующий ген GM-CSF человека;
- 7) от 29437 направо: последовательность аденовируса, включающая ген E4 и правый конец;

SEQ ID NO. 4 является иммунорегуляторным элементом GM-CSF в мембранно-связанной форме (mbGM-CSF), содержащимся в геноме рекомбинанта.

SEQ ID NO. 5 является химерной последовательностью, кодирующей булавовидный отросток в геноме рекомбинанта КН-904, в котором последовательность, кодирующая булавовидный отросток в гене белка оболочки, взята из серотипа 35 аденовируса человека.

Когда в качестве матрицы использовали Pcmv/ZERO (Invitrogen, USA), условия для отжига в процессе проведения реакции ПЦР были такие же, как указано выше. Фрагмент, полученный в результате ПЦР, был очищен, и его последовательность была подтверждена секвенированием.

5 4. Очищенный фрагмент - промотор hTERT и фрагмент поли(A) ДНК вместе денатурировали при 95°C в течение 5 минут, охлаждали до комнатной температуры и использовали как матрицу. Фрагмент ДНК, включающий около 500 пар нуклеотидов, амплифицировали, используя праймеры A и D, очищенный и секвенированный ПЦР-фрагмент переваривали SspI и AgeI, и далее очищенный фрагмент, содержащий
10 сигнальную последовательность поли(A) и промотор hTERT, был использован для последующего процесса клонирования.

5. pXC.1 (получен из Microbix, Canada) использовали как матрицу, в этот вектор посредством мутагенеза были добавлены два сайта для ферментов рестрикции в положениях нуклеотидов 339 (SspI) и 551 (PnAI). Мутированный pXC.1
15 переваривали SspI и PnAI и очищали, предполагая использовать этот большой фрагмент в качестве вектора. Фрагмент poly(A)/hTERT, который представлял собой вставку, лидировали в вектор pXC.1 и трансформировали им клетки E.coli DH5, используя обычные техники клонирования через 20 часов. После инкубации при 4°C в течение 30 минут, теплового шока при 42°C в течение 30 секунд и дополнительной
20 инкубации при 4°C в течение 2 минут клетки затем выращивали при 37°C в течение 45 минут в 1 мл среды LB для культивирования клеток. Затем пробу наносили на чашку с агаризованной средой для выращивания, содержащей ампициллин, и культивировали в течение 24 часов; индивидуальные бактерии отбирали с использованием стерильной зубочистки и переносили в чистый культуральный флакон, который содержал 1 мл
25 среды LB, далее их инкубировали в течение 24 часов. Из выращенных клеток E.coli выделяли плазмидную ДНК и ее структуру подтверждали рестриктивным анализом, плазида была названа pKH-901a. Плазида содержит левый ITR, сигнал инициации сборки, последовательность poly(A), промотор hTERT (Mtelo), E1A и частично E1B.

6. Конструирование правого конца генома аденовируса

30 pGEM-7 вектор (доступный, производства компании Promega). Затем две пары праймеров были использованы для амплификации двух фрагментов ДНК:

E. 5'-AACCAAGGCGAACCTT-3¹;

F. 5'-CCACATGGTTATCTTGG-3';

G. 5'-CCAGTCCAGGAGTAATTTAC-3';

35 H. 5'-TGCGCTTTAGGCAGCAGATG-3';

Для клонирования гена GM-CSF были использованы следующие праймеры:

M. 5'-CCACCCAAGATAACCATGTGGCTGC-3';

N. 5'-AACTTAGTAAATTACTCCTGGACTGG-3'.

40 Большое количество фрагмента кДНК GM-CSF амплифицировали, используя в качестве матрицы кДНК, полученную из активированных макрофагов методом ПЦР при условиях амплификации, сходных с описанными выше. Последовательность кДНК была подтверждена секвенированием, проведенным после ее выделения, фрагмент кДНК смешивали с двумя фрагментами ДНК, амплифицированными при использовании pVHGE3 в качестве матрицы, для проведения последующей
45 амплификации методом ПЦР с праймерами E и H с целью получения большого фрагмента ДНК. Последовательность этого результирующего фрагмента ДНК была подтверждена секвенированием, и фрагмент ДНК клонировали в вектор pGEM-7 после расщепления рестриктазами BsiWI и NotI и затем дотирования в pVHGE3, в результате получили плазмиду pKH-901b. Этот левый конец содержит большую часть
50 гена E1B, полностью ген E2, полностью ген E3, ген GM-CSF и ген E4.

7. Конструирование рекомбинантного аденовируса KH-901

Плазмидные ДНК pKH-901a и pKH-901b были линейаризованы посредством расщепления их рестрицирующими эндонуклеазами NdeI и ClaI и были использованы

для котрансфекции клеток HeLa (с трансфертным производства фирмы Invitrogen), затем выделяли плазмидную ДНК. Клетки собирали после инкубации при 37°C в течение 10 дней. 100 мкл супернатанта брали для анализа колоний после 3 циклов замораживания/оттаивания. Одиночные бляшки лизиса были видны под
5 низкоплавким агаром через 8-12 дней после добавления супернатанта. 10 мкл жидкости под агаром отбирали при помощи автоматической пипетки на 10 мкл и добавляли к предварительно посеянным клеткам HeLa. Лизат клеток был виден и был собран через 4-8 дней после инокуляции. Для экстракции ДНК использовали 200 мкл клеточного лизата. Структуру вируса подтверждали методами ПЦР и
10 Саузерн-блоттинга. Индивидуальные колонии были далее очищены в клетках HeLa и наращивались в клетках HeLa для создания запаса вируса. Запас вируса хранили в морозильной камере при температуре -80°C. Аликвоту запасенного вируса отбирали для подтверждения структуры методом секвенирования, и вирус был назван КН-901.

Способ крупномасштабного получения КН-901 будет описан отдельно, однако,
15 коротко здесь, HeLa-S3 клетки (HeLa клетки были адаптированы к тому, чтобы расти в бессывороточной среде) культивировали в биореакторе объемом 3 литра, когда число клеток достигало 3 миллионов в литре, клетки инфицировали КН-901 и продолжали культивировать в течение 2-3 дней. Затем клетки собирали и вирус очищали в градиенте CsCl₂ или при помощи ионнообменной колонки. Очищенный вирус хранили
20 в подходящем буфере, таком как PBS, с глицерином.

Пример 2

КН-900 был сконструирован при проведении процедур, подобных тем, которые были проведены для получения КН-901, за исключением того, что плазида рКН-901a не содержала poly(A) и в фрагменте промотора hTERT не было мутаций and no mutant
25 in the hTERT промотор fragment; последовательность промотора представлена в SEQ. ID NO. 1. Полученная плазида названа рКН-900a; рКН-900a и рКН-901b были использованы для котрансфекции клеток HeLa для получения КН-900.

Пример 3

Для конструирования КН-902 кДНК GM-CSF в рКН-901b была заменена кДНК для
30 мембранно-связанной версии GM-CSF, как показано в SEQ ID NO. 4, в результате получена рКН-902b. рКН-901a и рКН-902b были использованы для котрансфекции клеток HeLa для получения КН-902.

Пример 4

Для получения КН-903 участки, кодирующие 10.4k, 14.5k and 14.7k в рКН-901b,
35 были делетированы посредством традиционных генно-инженерных методов, в результате была получена плазида, названная КН-903b. рКН-901a и рКН-903b были котрансфицированы в клетки HeLa для получения КН-903.

Пример 5

Для получения КН904 ген булавовидного отростка аденовируса серотипа 5 был
40 заменен геном булавовидного отростка из аденовируса серотипа 35, как показано в SEQ ID NO. 5, в результате была получена плазида, названная рКН-904b.

Пример 6

Для получения КН-905 кДНК гена GM-CSF в рКН-904b была заменена кДНК для
45 мембранно-связанной версии, как показано в SEQ ID NO. 4, в результате была получена плазида, названная рКН-905b. рКН-901a и рКН-905b были котрансфицированы в клетки HeLa для получения КН905. Структура вируса была подтверждена методом ПЦР и секвенированием.

Пример 7

Для создания КН-906 эндогенный промотор для E1B был заменен сигналом -
50 внутренним сайтом посадки рибосомы, в результате была получена плазида, названная рКН-906a. рКН-906a и рКН-901b были котрансфицированы в клетки HeLa для получения КН-906 (Li et al. (2001) Cancer Research 62:2667-2674). Структура вируса была подтверждена методом ПНР и секвенированием.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Chengdu Kanghong Biotechnologies CO., Ltd

5 <120> Construction of oncolytic adenovirus recombinant specifically
expressing immune modulatory factor GM-CSF in tumor cells and uses thereof

<130> PD0409023

<150> CN 200410046237. X

10 <151> 2004-06-07

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 252

15 <212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 1

20 ctagccccac gtggcggagg gactggggac ccgggcaccc gtcctgcccc ttcaccttcc 60
agctccgct cctccgcgcg gaccccgccc cgtcccgacc cctcccgggt ccccggccca 120
25 gccccctccg ggccctccca gccctcccc ttcctttccg cggccccgcc ctctcctcgc 180
ggcgcgagtt tcaggcagcg ctgcgtcctg ctgcgcacgt gggaagccct ggccccggcc 240
30 acccccgcga tg 252

<210> 2

<211> 253

<212> DNA

35 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Promoter

<400> 2

40 ctagccccac gtggcggagg gactggggac ccgggcaccc gtcctgcccc ttcaccttcc 60
agctccgct cctccgcgcg gaccccgccc cgtcccgacc cctcccgggt ccccggccca 120
45 gccccctccg ggccctccca gccctcccc ttcctttccg cggcaacgcc ctctccttgc 180
cggcgcgagt ttcaggcagc gctgcgtcct gctgcgcacg tgggaagccc tggccccggc 240
50

cacccccgcg atg

253

<210> 3

<211> 36152

5

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Recombinant

10

<400> 3

catcatcaat aatatacctt attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt 60

15

ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtggt gcggaagtgt 120

gatgttcaa ggtggcgga acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgtttttg 180

20

gtgtgcgccc gtgtacacag gaagtgaaa ttttcgccc gtttagggc gatgtttag 240

taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccattttcgc aggaaaactg aataagagga 300

25

agtgaaatct gaataatfff gtgttactca tagcgcgtaa tatttgccta gggcccgagg 360

ggatctctgc aggaatttga tatcaagctt atcgataccg tcgaaactg tttattgcag 420

30

cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaatff cacaaataaa gcattttttt 480

cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctggatcc 540

35

gctagcccca cgtggcggag ggactgggga cccgggcacc cgtcctgccc cttcaccttc 600

cagctccgcc tctccgccc ggaccccccc cctcccgac cctcccggg tccccggccc 660

agccccctcc gggccctccc agccccctcc cttcctttcc gcggcaacgc cctctccttc 720

40

gcggcgcgag tttcaggcag cgtcgcgtcc tgctgcgcac gtgggaagcc ctggccccgg 780

ccacccccgc gaattaaacg atatcaccgg tcgactgaaa atgagacata ttatctgcca 840

45

cggaggtggt attaccgaag aatggcccgc cagtcttttg gaccagctga tcgaagaggt 900

actggtgat aatcttcac ctctagcca ttttgaacca cctacccttc acgaactgta 960

50

tgatttagac gtgacggccc ccgaagatcc caacgaggag gcggtttcgc agatttttcc 1020

cgactctgta atgttggcgg tgcaggaagg gattgactta ctcacttttc cgccggcgcc 1080
cggttctccg gagccgcctc acctttcccg gcagcccgag cagccggagc agagagcctt 1140
5 ggggccggtt tctatgcaa accttgacc ggaggtgac gatcttacct gccacgagge 1200
tggtttcca cccagtgacg acgaggatga agagggtag gagtttgtt tagattatgt 1260
10 ggagcacccc gggcacggtt gcaggtcttg tcattatcac cggaggaata cgggggacce 1320
agatattatg tgttcgttt gctatatgag gacctgtggc atgtttgtct acagtaagtg 1380
15 aaaattatgg gcagtgggtg atagagtggg gggtttgggtg tggtaatfff ttttttaatt 1440
tttacagttt tgtggtttaa agaattttgt attgtgattt ttttaaagg tctgtgtct 1500
20 gaacctgagc ctgagcccg gccagaaccg gagcctgcaa gacctaccg ccgtcctaaa 1560
atggcgctg ctatcctgag acgcccgaca tcacctgtgt ctagagaatg caatagtagt 1620
acggatagct gtgactccgg tccttctaac acacctcctg agatacacc ggtggtcccc 1680
25 ctgtgcccc taaaccagt tgccgtgaga gttggtgggc gtcgccaggc tgtggaatgt 1740
atcgaggact tgettaacga gcctgggcaa ctttggact tgagctgtaa acgccccagg 1800
30 ccataagggtg taaacctgtg attgcgtgtg tggtaacgc ctttgtttgc tgaatgagtt 1860
gatgtaagtt taataaaggg tgagataatg ttttaactgc atggcgtgtt aatggggcg 1920
35 gggcttaaag ggtatataat gcgccgtggg ctaatcttgg ttacatctga cctcatggag 1980
gcttgggagt gtttgaaga tttttctgct gtgcgtaact tgctggaaca gagctctaac 2040
40 agtacctctt ggttttgag gtttctgtgg ggctcatccc aggcaaagt agtctgcaga 2100
attaaggagg attacaagt ggaattttaa gagcttttga aatcctgtgg tgagctgttt 2160
gattctttga atctgggtca ccaggcgctt ttccaagaga aggtcatcaa gactttgat 2220
45 tttccacac cggggcgccg tgcggctgct gttgcttttt tgagttttat aaaggataaa 2280
tgagcgaag aaacctatc gagcgggggg tacctgctgg attttctggc catgcatctg 2340
50

tggagagcgg ttgtgagaca caagaatcgc ctgctactgt tgtcttccgt ccgcccggcg 2400
ataataccga cggaggagca gcagcagcag caggaggaag ccaggcggcg gcggcaggag 2460
5 cagagcccag gaacccgaga gccggcctgg accctcggga atgaatgttg tacaggtggc 2520
tgaactgtat ccagaactga gacgcatttt gacaattaca gaggatgggc aggggctaaa 2580
10 gggggtaaag agggagcggg gggcttgtga ggctacagag gaggctagga atctagcttt 2640
tagcttaatg accagacacc gtctgagtg tattactttt caacagatca aggataattg 2700
15 cgctaatgag cttgatctgc tggcgcagaa gtattccata gacgagctga ccacttactg 2760
gctgcagcca ggggatgatt ttgaggagc tattaggta tatgcaaagg tggcacttag 2820
gccagattgc aagtacaaga tcagcaaaact tgtaaatac aggaattgtt gctacatttc 2880
20 tgggaacggg gccgaggtgg agatagatac ggaggatagg gtggccttta gatgtagcat 2940
gataaatatg tggccggggg gcttggcatg gacgggggtg ttattatgaa tgtaaggttt 3000
25 actggcccca attttagcgg tacggttttc ctggccaata ccaaccttat cctacacggt 3060
gtaagcttct atgggtttaa caatacctgt gtggaagcct ggaccgatgt aagggttcgg 3120
30 ggctgtgcct tttactgctg ctggaagggg gtggtgtgtc gccccaaaag cagggcttca 3180
attaagaaat gcctctttga aaggtgtacc ttgggtatcc tgtctgaggg taactccagg 3240
35 gtgcgccaca atgtggcctc cgactgtggt tgcttcatgc tagtgaagc cgtggctgtg 3300
attaagcata acatggtatg tggcaactgc gaggacaggg cctctcagat gctgacctgc 3360
40 tcggacggca actgtcacct gctgaagacc attcacgtag ccagccactc tcgcaaggcc 3420
tggccagtgt ttgagcataa catactgacc cgctgttctt tgcatttggg taacaggagg 3480
ggggtgttcc tacctacca atgcaattg agtcacacta agatattgct tgagcccag 3540
45 agcatgtcca aggtgaacct gaacgggggtg tttgacatga ccatgaagat ctggaaggtg 3600
ctgaggtacg atgagacccg caccaggtgc agaccctgcg agtgtggcgg taaacatatt 3660
50

aggaaccage ctgtgatgct ggatgtgacc gaggagctga ggcccgatca cttgggtgctg 3720
gcctgcaccc gcgctgagtt tgctcttagc gatgaagata cagattgagg tactgaaatg 3780
5 tgtgggcgtg gcttaagggt gggaaagaat atataagggt ggggtcttat gtagttttgt 3840
atctgttttg cagcagccgc cgcgccatg agcaccaact cgtttgatgg aagcattgtg 3900
10 agctcatatt tgacaacgcg catgccccca tgggccgggg tgcgtcagaa tgtgatgggc 3960
tccagcattg atggtcgccc cgtcctgccc gcaaacteta ctacctgac ctacgagacc 4020
15 gtgtctggaa cgccgttga gactgcagcc tccgccgccc cttcagccgc tgcagccacc 4080
gcccgcggga ttgtgactga ctttgccttc ctgagcccgc ttgcaagcag tgcagcttcc 4140
cgttcatccg cccgcgatga caagttgacg gctcttttgg cacaattgga ttctttgacc 4200
20 cggaactta atgtcgttcc tcagcagctg ttggatctgc gccagcaggt tctgcacctg 4260
aaggcttctt ccctcccaa tgcggtttaa aacataaata aaaaaccaga ctctgttttg 4320
25 atttgatca agcaagtgc ttgctgtctt tatttagggg ttttgcgcgc gcggtaggcc 4380
cgggaccage ggtctcggtc gttgagggtc ctgtgtattt tttccaggac gtggtaaagg 4440
30 tgactctgga tgttcagata catgggcata agcccgtctc tggggtggag gtagcaccac 4500
tgcagagctt catgctgccc ggtggtgttg tagatgatcc agtcgtagca ggagcgttg 4560
35 gcgtggtgcc taaaaatgc tttcagtagc aagctgattg ccaggggcag gcccttggtg 4620
taagtgttta caaagcgggt aagctgggat ggggtcatac gtggggatat gagatgcatc 4680
40 ttggactgta ttttaggtt ggctatgttc ccagccatat ccctccgggg attcatgttg 4740
tgcagaacca ccagcacagt gtatccggtg cacttgggaa atttgtcatg tagcttagaa 4800
ggaaatgcgt ggaagaactt ggagacccc ttgtgacctc caagatttcc catgcattcg 4860
45 tccataatga tggcaatggg cccacgggcg gcggcctggg cgaagatatt tctgggatca 4920
ctaactcat agttgtgttc caggatgaga tcgtcatagg ccatttttac aaagcgggg 4980
50

cggagggtgc cagactgcgg tataatggtt ccatccggcc caggggcgta gttaccctca 5040
cagatttgca tttcccacgc tttgagttca gatgggggga tcatgtctac ctgcggggcg 5100
5 atgaagaaaa cggtttccgg ggtaggggag atcagctggg aagaaagcag gttcctgagc 5160
agetgcgact taccgcagcc ggtgggccc taaatcacac ctattaccgg gtgcaactgg 5220
10 agttaagaga gctgcagctg ccgtcatccc tgagcagggg ggccaacttcg ttaagcatgt 5280
ccctgactcg atgttttccc tgaccaaatc cgccagaagg cgctcgcgc ccagcgatag 5340
15 cagttcttgc aaggaagcaa agtttttcaa cggtttgaga ccgtccgccc taggcatgct 5400
tttgagcgtt tgaccaagca gttccaggcg gtcccacagc tcggtcacct gctctacggc 5460
atctcgatcc agcatatctc ctctgttccg gggttggggc ggctttcgct gtacggcagt 5520
20 agtcggtgct cgtccagacg ggccagggtc atgtctttcc acgggcgcag ggtcctcgtc 5580
agcgtagtct ggttcacggt gaaggggtgc gctccgggct gcgcgctggc cagggtgccg 5640
25 ttgaggtgg tctgtctggt gctgaagcgc tgccggtctt cgcctcgcgc gtcggccagg 5700
tagcatttga ccatggtgct atagtccagc cctccgccc cgtggccctt ggcgcgagc 5760
30 ttgccottgg aggaggcgc gcacgagggg cagtgcagac ttttgagggc gtagagcttg 5820
ggcgcgagaa ataccgattc cggggagtag gcatccgcgc cgcaggcccc gcagacggtc 5880
35 tcgcattcca cgagccaggt gagctctggc cgttcggggc caaaaaccag gtttccccca 5940
tgctttttga tgcgtttctt acctctgggt tccatgagcc ggtgtccacg ctcggtgacg 6000
40 aaaaggctgt ccgtgtcccc gtatacagac ttgagaggcc tgtctcagag cgggtttccg 6060
cggctctcct cgtatagaaa ctccgaccac tctgagacaa aggctcgcgt ccaggccagc 6120
acgaaggagg ctaagtggga ggggtagcgg tcgttgcca ctagggggtc cactcgtcc 6180
45 aggggtgtaa gacacatgct gccctcttcg gcatcaagga aggtgattgg tttgtaggtg 6240
taggccacgt gaccgggtgt tctgaaggg gggctataaa aggggggtggg ggcgcgttcg 6300
50

tcctcactct cttccgcatc gctgtctgcg agggccagct gttggggtga gtactcctc 6360
tgaaaagcgg gcatgacttc tgcgctaaga ttgtcagttt ccaaaaacga ggaggatttg 6420
5 atattcacct ggccccgggt gatgcctttg aggggtggcg catccatctg gtcagaaaag 6480
acaatctttt tgttgtcaag cttggtggca aacgaccctg agagggcggt ggacagcaac 6540
10 ttggcgatgg agcgcagggt ttggtttttg tcgcatcgg cgcgctcctt ggccgcatg 6600
tttagctgca cgtattcgcg cgcaacgcac cgccattcgg gaaagacggt ggtgcgctcg 6660
15 cgggcaccag gtgcacgcgc caaccgggt tgtgcagggt gacaaggcca acgctggtgg 6720
ctacctctcc gcgtaggcgc tcgttggtcc agcagaggcg gccgcccttg cgcgagcaga 6780
atggcgtag ggggtctagc tgcgtctcgt ccggggggtc tgcgtccacg gtaaagacc 6840
20 cgggcagcag gcgcgcgctc aagtagtcta tcttgcaccc ttgcaagtct agcgcctgct 6900
gccatgcgcg ggcggcaagc gcgcgctcgt atgggttagg tgggggaccc catggcatgg 6960
25 ggtgggtgag cgcggaggcg tacatgccgc aatgtcgtg aacgtagagg ggctctctga 7020
gtattccaag atatgtaggg tagcatcttc caccgaggat gctggcgcgc acgtaatcgt 7080
30 atagttcgtg cgagggagcg aggaggtcgg gaccgagggt gctacgggcg ggctgctctg 7140
ctcgggaagac tatctgcctg aagatggcat gtgagttgga tgatatggtt ggacgctgga 7200
35 agacgttgaa gctggcgtct gtgagacctc ccgcgtcacg cacgaaggag gcgtaggagt 7260
cgcgcagctt gttgaccagc tcggcgggtg cctgcacgtc tagggcgcag tagtccaggg 7320
40 tttccttgat gatgtcatac ttatcctgtc cttttttttt ccacagctcg cggttgagga 7380
caaacctctc gcggtctttc cagtactctt ggatcggaac cccgtcggcc tccgaacggt 7440
aagagcctag catgtagaac tggttgacgg cctggtaggc gcagcatccc tttctacgg 7500
45 gtagecgcga tcctgcgcg gccttcggga gcgaggtgtg ggtgagcgca aaggtgtccc 7560
tgaccatgac tttgaggtac tggtatitga agtcagtgtc gtcgcatccg cctgctccc 7620
50

agagcaaaaa gtccgtgcgc tttttggaac gcggatttgg cagggcgaag gtgacatcgt 7680
tgaagagtat ctttcccgcg cgaggcataa agttgcgtgt gatgcggaag ggtcccggca 7740
5 cctcggaaac gttgttaatt acctgggcgg cgagcacgat ctcgtcaaag ccgttgatgt 7800
tgtgcccac aatgtaaagt tccaagaagc gcgggatgcc cttgatggaa ggcaattttt 7860
10 taagttcctc gtaggtgagc tcttcagggg agctgagccc gtgctctgaa agggcccagt 7920
ctgcaagatg agggttggaa gcgacgaatg agctccacag gtcacgggcc attagcattt 7980
15 gcaggtggtc gcgaaaggtc ctaaactggc gacctatggc cattttttct ggggtgatgc 8040
agtagaaggt aagcgggtct tgttcccagc ggtcccatcc aaggttcgcg gctaggtctc 8100
gcgcggcagt cactagaggc tcctctccgc cgaacttcat gaccagcatg aagggcacga 8160
20 gctgcttccc aaaggccccc atccaagtat aggtctctac atcgtaggtg acaaagagac 8220
gctcgggtgcg aggatgcgag ccgatcggga agaactggat ctcccgccac caattggagg 8280
25 agtggctatt gatgtggtga aagtagaagt ccttgcgacg ggccgaacac tcgtgctggc 8340
ttttgtaaaa acgtgcgcag tactggcagc ggtgcacggg ctgtacatcc tgcacgaggt 8400
30 tgacctgacg accgcgcaca aggaagcaga gtgggaattt gagcccctcg cctggcgggt 8460
ttggtggtg gtcttctact teggetgctt gtcttgacc gctggtctgc tcgaggggag 8520
35 ttacggtgga teggaccacc acgccgcgcg agcccaaagt ccagatgtcc gcgcgcggcg 8580
gtcggagctt gatgacaaca tcgcgcagat gggagctgtc catggtctgg agctcccgcg 8640
40 gcgtcaggtc aggcgggagc tcctgcaggt ttacctgca tagacgggtc agggcgcggg 8700
ctagatccag gtgataccta atttccaggg gctggttggg ggcggcgtcg atggcttgc 8760
agaggccgca tccccgcggc gcgactacgg taccgcgcgg cgggcggtgg gccgcggggg 8820
45 tgtccttggg tgatgcatct aaaagcggtg acgcgggcga gccccggag gtaggggggg 8880
ctccggacc gccgggagag ggggcagggg cacgtcggcg ccgcgcgcgg gcaggagctg 8940
50

gtgctgcgcg cgtaggttgc tggcgaacgc gacgacgcgg cggttgatct cctgaatctg 9000
gcgcctctgc gtgaagacga cgggcccggt gagcttgagc ctgaaagaga gttcgacaga 9060
5 atcaatttcg gtgtcgttga cggcggcctg gcgcaaatc tcctgcacgt ctctgagtt 9120
gtcttgatag gcgatctcgg ccatgaactg ctcgatctct tcctcctgga gatctccgcg 9180
10 tccggctcgc tccacggtgg cggcggagtc gttggaaatg cgggccatga gctgcgagaa 9240
ggcgttgagg cctccctcgt tccagacgcg gctgtagacc acgccccctt cggcatcgcg 9300
15 ggcgcgcatg accacctgcg cgagattgag ctccacgtgc cgggcgaaga cggcgtagtt 9360
tcgcaggcgc tgaagaggt agttgaggt ggtggcggtg tgttctgcca cgaagaagta 9420
cataaccag cgtcgcaacg tggattcgtt gatatcccc aaggcctcaa ggcgtccat 9480
20 ggctcgtag aagtccacgg cgaagttgaa aaactgggag ttgcgcgccg acacggttaa 9540
ctctctctcc agaagacgga tgagctcggc gacagtgtcg cgcacctcgc gctcaaaggc 9600
25 tacaggggccc tcttcttctt ctccaatctc ctcttcata agggcctccc cttcttcttc 9660
ttctggcggc ggtgggggag gggggacacg gcggcgacga cggcgcaccg ggaggcggtc 9720
30 gacaaagcgc tcatcatct ccccgcgcg acggcgcagtg gtctcgggtga cggcgcggcc 9780
gttctcgcgg gggcgcagtt ggaagacgcc gcccgtcag tcccggttat gggttggcgg 9840
35 ggggctgcca tgcggcaggg atacggcgt aacgatgcat ctcaacaatt gttgtgtagg 9900
tactccgccc ccgagggacc tgagcgagtc cgcacgcacc ggatcgaaa acctctcgag 9960
40 aaaggcgtct aaccagtcac agtcgcaagg taggctgagc accgtggcgg gcggcagcgg 10020
gcggcggctg gggttgtttc tggcggaggt gctgctgatg atgtaattaa agtaggcgg 10080
cttgagacgg cggatggctg acagaagcac catgtccttg ggtccggcct gctgaatgcg 10140
45 caggcggctg gccatgcccc aggtctcgtt ttgacatcgg cgcaggtctt thtagtagtc 10200
ttgcatgagc cttctaccg gcacttcttc ttctccttcc tcttgcctg catctcttgc 10260
50

atctatcgt cgggcggcgg cggagttgg ccgtaggtgg cgccctcttc ctcccatgcg 10320
tgtagcccc aagccctca tcggctgaag cagggttagg tcggcgaca cgcgctcggc 10380
5 taatatggcc tgctgcacct gcgtgagggt agactggaag tcatccatgt ccacaaagcg 10440
gtggtatgcg cccgtgttga tgggtgaagt gcagttggcc ataacggacc agttaacggt 10500
10 ctggtgacct ggctgcgaga gctcgggtga cctgagacgc gagtaagccc tcgagtcaaa 10560
tacgtagtcg ttgcaagtc gcaccaggta ctggtatccc accaaaaagt gcggcggcgg 10620
15 ctggcggtag aggggccagc gtagggtggc cggggctccg ggggcgagat cttccaacat 10680
aaggcgatga tatccgtaga tgtacctgga catccagggt atgccggcgg cggtgggtga 10740
ggcgcgcgga aagtcgcgga cgcggtcca gatgttgcgc agcggcaaaa agtgcctcat 10800
20 ggtcgggacg ctctggccgg tcaggcgcgc gcaatcgtt acgctctaga ccgtgcaaaa 10860
ggagagcctg taagcgggca ctctccgtg gtctggtgga taaattcga aggtatcat 10920
25 ggcggacgac cggggttcga gccccgtatc cggccgtccg ccgtgatcca tgcggttacc 10980
gcccgcgtgt cgaaccagg tgtgcgacgt cagacaacgg gggagtgtc cttttggctt 11040
30 ccttccaggc gcggcggtg ctgcgctagc tttttggcc actggccgcg cgcagcgtaa 11100
gcggttaggc tggaaagcga aagcattaag tggtcgtc cctgtagccg gagggttatt 11160
35 ttccaagggt tgagtcgagg gacccccggt tcgagtctcg gaccggccgg actgcggcga 11220
acggggggtt gctccccgt catgcaagac cccgcttga aattcctccg gaaacaggga 11280
40 cgagcccctt tttgctttt ccagatgca tccggtgctg cggcagatgc gccccctcc 11340
tcagcagcgg caagagcaag agcagcggca gacatgcagg gcaccctccc ctctcttac 11400
cgcgtcagga ggggcgacat ccgcggttga cgcggcagca gatggtgatt acgaaccccc 11460
45 gcggcgcgg gcccggcact acctggactt ggaggagggc gagggcctgg cgcggctagg 11520
agcgcctct cctgagcgg acccaagggt gcagctgaag cgtgatacgc gtgaggcgta 11580
50

cgtagccgagg cagaacctgt ttcgagaccg cgagggagag gagcccagg agatgaggga 11640
tcgaaagttc cacgcagggc gcgagctgcg gcatggcctg aatcgcgagc ggttgctgcg 11700
5 cgaggaggac tttagacccg acgcgcgaac cgggattagt cccgcgcgcg cacacgtggc 11760
ggccgcccac ctggtaacg catacagca gacggtgaac caggagatta actttcaaaa 11820
10 aagctttaac aaccacgtgc gtacgcttgt ggcgcgag gaggtggcta taggactgat 11880
gcatctgtgg gactttgtaa gcgcgctgga gcaaaacca aatagcaagc cgctcatggc 11940
15 gcagctgttc cttatagtgc agcacagcag ggacaacgag gcattcaggg atgcgctgct 12000
aaacatagta gagcccagg gccgctggct gctcgattg ataaacatcc tgcagagcat 12060
agtggtgcag gagcgcagct tgagcctggc tgacaagggt gccgcatca actattccat 12120
20 gcttagcctg ggcaagttt acgcccga gatataccat accccttacg ttccataga 12180
caaggaggta aagatcagg gtttctacat gcgcatggcg ctgaagggtc ttaccttgag 12240
25 cgacgacctg ggcgtttatc gcaacgagcg catccacaag gccgtgagcg tgagccggcg 12300
gcgcgagctc agcgaccgag agctgatgca cagcctgcaa agggccctgg ctggcacggg 12360
30 cagcggcgat agagaggccg agtctactt tgacgcgggc gctgacctgc gctgggcccc 12420
aagccgacgc gccctggagg cagctggggc cggacctggg ctggcggtgg caccgcgcg 12480
35 cgctggcaac gtcggcgcg tggaggaata tgacgaggac gatgagtac agccagagga 12540
cgcgagtac taagcgggta tgtttctgat cagatgatgc aagacgcaac ggaccggcg 12600
40 gtgcggcgcg cgctgcagag ccagccgtcc ggccttaact ccacggacga ctggcgccag 12660
gtcatggacc gcatcatgtc gctgactgcg cgcaatcctg acgcgttccg gcagcagccg 12720
caggccaacc ggctctccgc aattctgga gcggtgtcc cggcgcgcg aaacccccag 12780
45 cacgagaagg tgctggcgat cgtaaaccg ctggccgaaa acagggccat ccggcccagc 12840
gaggccggcc tggctctacga gcgctgctt cagcgcgtgg ctcgttaca cagcggcaac 12900
50

gtgcagacca acctggaccg gctggtgggg gatgtgcgcg aggccgtggc gcagcgtgag 12960
cgcgcgcagc agcagggcaa cctgggctcc atggttgac taaacgcctt cctgagtaca 13020
5 cagcccccca acgtgccgcg gggacaggag gactacacca actttgtgag cgcactgcgg 13080
ctaagtgtga ctgagacacc gcaaagtgag gtgtaccagt ctgggccaga ctatttttc 13140
10 cagaccagta gacaaggcct gcagaccgta aacctgagcc aggctttcaa aaacttgag 13200
gggctgtggg ggggtgcggc tcccacaggc gaccgcgcga ccgtgtctag cttgctgacg 13260
15 cccaactcgc gcctgttgcg gctgctaata gcgcccttca cggacagtgg cagcgtgtcc 13320
cgggacacat acctaggta cttgctgaca ctgtaccgcg aggccatagg tcaggcgcac 13380
gtggacgagc ataacttcca ggagattaca agtgtcagcc gcgcgctggg gcaggaggac 13440
20 acgggcagcc tggaggcaac cctaaactac ctgctgacca accggcggca gaagatcccc 13500
tcgttgaca gtttaaacag cgaggaggag cgcattttgc gctacgtgca gcagagcgtg 13560
25 agccttaacc tgatgcgcga cgggtaacg cccagcgtgg cgtggacat gaccgcgcgc 13620
aacatggaac cgggcatgta tgcctcaaac cggccgttta tcaaccgctt aatggactac 13680
30 ttgcatcgcg cggccgcggt gaaccccgag tatttcacca atgcatctt gaacccgcac 13740
tggctaccgc cccctggttt ctacaccggg ggattcgagg tgcccagggg taacgatgga 13800
35 ttctctggg acgacataga cgacagcgtg tttccccgc aaccgcagac cctgctagag 13860
ttcaacagc gcgagcagc agaggcggcg ctgcgaaagg aaagcttccg caggccaagc 13920
40 agcttgcgcg atctaggcgc tgcggccccg cggtcagatg ctagtagccc attccaagc 13980
ttgatagggt ctctaccag cactcgcacc accgccccgc gcctgctggg cgaggaggag 14040
tacctaaca actcgtctgt gcagccgcag cgcgaaaaaa acctgcctcc ggcatttccc 14100
45 aacaacggga tagagagcct agtgacaag atgagtagat ggaagacgta cgcgcaggag 14160
cacagggacg tgccaggccc gcgccccccc accgctcgtc aaaggcacga ccgtcagcgg 14220
50

ggtctggtgt gggaggacga tgactcggca gacgacagca gcgtcctgga ttgggagg 14280
agtggcaacc cgtttgcgca ctttcgcccc aggctgggga gaatgttta aaaaaaaaaa 14340
5 agcatgatgc aaaataaaaa actcaccaag gccatggcac cgagcgttg tttcttgta 14400
ttccccttag tatgcggcgc gcggcgatgt atgaggaagg tcctcctccc tctacgaga 14460
10 gtgtggtgag cgggcgcca gtggcggcgg cgctgggttc tcccttcgat gctcccctgg 14520
acccgccgtt tgtgcctccg cggtaacctgc ggctaccgg ggggagaaac agcatccgtt 14580
15 actctgagtt ggcaccccta ttcgacacca cccgtgtgta cctggtggac aacaagtcaa 14640
cggatgtggc atccctgaac taccagaacg accacagcaa ctttctgacc acggtcattc 14700
aaaacaatga ctacagcccg ggggaggcaa gcacacagac catcaatctt gacgaccggt 14760
20 cgcaactggg cggcgacctg aaaaccatcc tgcataccaa catgccaat gtgaacgagt 14820
tcatgtttac caataagttt aaggcgcggg tgatggtgtc gcgcttgctt actaaggaca 14880
25 atcaggtgga gctgaaatac gagggtggtg agttcacgct gcccgaggc aactactccg 14940
agaccatgac catagacctt atgaacaacg cgatcgtgga gcactacttg aaagtgggca 15000
30 gacagaacgg ggttctgga agcgacatcg gggtaaagtt tgacaccgc aacttcagac 15060
tggggttga ccccgctact ggtcttgtca tgctggggt atatacaaac gaagccttcc 15120
35 atccagacat cttttgctg ccaggatgcg ggggtgactt caccacagc cgctgagca 15180
acttgttggg catccgcaag eggcaacct tccaggagg ctttaggatc acctacgatg 15240
40 atctggaggg tgtaacatt cccgcaactg tggatgtgga cgctaccag gcgagcttga 15300
aagatgacac cgaacaggcg gggggtggcg caggcggcag caacagcagt ggcagcggcg 15360
cggaagagaa ctccaacgcg gcagccgcg caatgcagcc ggtggaggac atgaacgatc 15420
45 atgccattcg cggcgacacc ttgcccacac gggctgagga gaagcgcgct gaggccgaag 15480
cagcggccga agctgccgcc cccgctgcgc aaccgagggt cgagaagcct cagaagaaac 15540
50

cggtgatcaa acccctgaca gaggacagca agaaacgcag ttacaaccta ataagcaatg 15600
acagcacctt caccagctac cgcagctggt accttgcata caactacggc gaccctcaga 15660
5 ccggaatccg ctcatggacc ctgctttgca ctcttgacgt aacctgcggc tcggagcagg 15720
tctactggtc gttgccagac atgatgcaag acccctgac ctccgctcc acgcgccaga 15780
10 tcagcaactt tccggtgggt ggcgccgagc tgttgcccgt gcactccaag agctttctaca 15840
acgaccaggc cgtctactcc caactcatcc gccagtttac ctctctgacc cacgtgttca 15900
15 atcgctttcc cgagaaccag attttggcgc gccgccagc cccaccate accaccgtca 15960
gtgaaaacgt tcctgctctc acagatcacg ggacgctacc gctgcgcaac agcatcggag 16020
gagtccagcg agtgaccatt actgacgcca gacgccgac ctgccctac gttacaagg 16080
20 ccctgggcat agtctcgcg cgctcctat cgagccgac tttttgagca agcatgtcca 16140
tccttatatc gccagcaat aacacaggct ggggcctgcg ctcccaagc aagatgtttg 16200
25 gggggccaa gaagcgtcc gaccaacacc cagtgcgct gcgcgggcac taccgcgcg 16260
cctggggcgc gcacaaacgc ggccgactg ggcgcaccac cgtcgatgac gccatcgac 16320
30 cgggtgggga ggaggcgcgc aactacacgc ccacgccgc accagtgtcc acagtggac 16380
cgccattca gaccgtgggt cgcggagccc ggcgctatgc taaaatgaag agacggcgga 16440
35 ggcgcgtagc acgtgccac cgcgccgac ccggcactgc cgccaacgc gcggcgcg 16500
ccctgcitaa ccgcgcacgt cgcaccggcc gacggcggc catgcgggcc gtcgaaggc 16560
40 tggccgcggt tattgtcact gtgccccca ggtccaggcg acgagcggcc gccgcagcag 16620
ccgcggccat tagtgctatg actcagggtc gcaggggcaa cgtgtattgg gtgcgcgact 16680
cggttagcgg cctgcgcgtg cccgtgcga cccgcccc gcgcaactag attgcaagaa 16740
45 aaaactactt agactcgtac tgttgatgt atccagcggc ggcggcgcgc aacgaagcta 16800
tgtccaagcg caaatcaaa gaagagatgc tccaggtcat cgcgccggag atctatggcc 16860
50

ccccgaagaa ggaagagcag gattacaagc cccgaaagct aaagcgggtc aaaaagaaaa 16920
agaaagatga tgatgatgaa cttgacgacg aggtggaact gctgcacgct accgcgcca 16980
5 ggcgacgggt acagtggaaa ggtcgacgcg taaaacgtgt tttcgaccc ggcaccaccg 17040
tagtctttac gcccggtgag cgctccacc gcacctaca gcgcgtgtat gatgaggtgt 17100
10 acggcgacga ggacctgctt gacgaggcca acgagcgctt cggggagttt gcctacggaa 17160
agcggcataa ggacatgctg gcggtgccgc tggacgagg caaccaaca cctagcctaa 17220
15 agcccgtaac actgcagcag gtgctcccc gccttgacc gtccgaagaa aagcgcggcc 17280
taaagcgcga gtctggtgac ttggcaccca ccgtgcagct gatggtacc aagcgcagc 17340
gactggaaga tgtcttgaa aaaatgaccg tggaaactgg gctggagccc gaggtccgcg 17400
20 tgcggccaat caagcaggtg gcgccgggac tggcggtgca gaccgtggac gttcagatac 17460
ccactaccag tagcaccagt attgccaccg ccacagagg catggagaca caaacgtccc 17520
25 cggttgcctc agcggtgcg gatgcccgcg tgcaggcggt cgctcgggcc gctccaaga 17580
cctctacgga ggtgcaaacg gaccctgga tgttgcgt ttcagcccc cggcgccccg 17640
30 gcggttcgag gaagtacggc gccgccagcg cgctactgcc cgaatatgcc ctacatcctt 17700
ccattgcgcc tacccccggc tatcgtggct acacctaccg cccagaaga cgagcaacta 17760
35 cccgacgcc aaccaccact ggaaccgcc gccgccgtcg ccgtcgccag cccgtgctgg 17820
ccccgattc cgtgcgcagg gtggctcgc aaggaggcag gaccctggtg ctgccaacag 17880
40 cgcgctacca cccagcatc gtttaaagc cggctttgt ggttcttgca gatatggccc 17940
tcacctgcc cctccgtttc ccggtgccgg gattccgagg aagaatgcac cgtaggaggg 18000
gcatggccgg ccacggcctg acgggcgga tgcgtcgtgc gcaccaccgg cggcggcgcg 18060
45 cgtgcaccg tcgcatgcg ggcggtatcc tccccctct tattccactg atcgccggcg 18120
cgattggcg cgtccccgga attgcatccg tggccttgca ggcgagaga cactgattaa 18180
50

aaacaagttg catgtgaaa aatcaaaata aaaagtctgg actctcacgc tcgcttggtc 18240
ctgtaactat tttgtagaat ggaagacatc aactttgcgt ctctggcccc gcgacacggc 18300
5 tcgcgcccg tcatgggaaa ctggcaagat atcggcacca gcaatatgag cggtgggccc 18360
ttcagctggg gctcgtgtg gageggcatt aaaaatttcg gttccaccgt taagaactat 18420
10 ggcagcaagg cctggaacag cagcacaggc cagatgctga gggataagtt gaaagagcaa 18480
aattccaac aaaaggtggt agatggcctg gcctctggca ttagcggggt ggtggacctg 18540
15 gccaacagg cagtgcmeta taagattaac agtaagcttg atccccgcc tcccgtagag 18600
gagcctccac cggccgtgga gacagtgtct ccagaggggc gtggcgmeta gcgtccgcgc 18660
cccgacaggg aagaaactct ggtgacgcaa atagacgagc ctccctcgta cgaggaggca 18720
20 ctaaagcaag gcctgcccac caccgtccc atcgcgcca tggctaccgg agtctgggc 18780
cagcacacac ccgtaacgt ggacctgct cccccgccg acaccagca gaaacctgtg 18840
25 ctgccaggcc cgaccgctg tgttgtaacc cgtcctagcc gcgctcct gcgccgcgc 18900
gccagcggtc cgcgatggt gggcccgtg gccagtggca actggmeta cacactgaac 18960
30 agcatcgtgg gctgggggt gcaatccctg aagcggcgc gatgcttctg aatagctaac 19020
gtgtcgtatg tgttcatgt atgcgtccat gtcgcgcca gaggagctgc tgagccgcc 19080
35 cgcgcccgct ttccaagat gctaccctt cgatgatgcc gcagtggct tacatgcaca 19140
tctcggcca ggacgcctg gactacctga gccccgggct ggtgcagtt gcccgcca 19200
40 ccgagacgta cttcagcctg aataacaagt ttagaaacc cacggtggcg cctacgcacg 19260
acgtgaccac agaccgtcc cagcgttga cgctcgggt catcctgtg gaccgtgagg 19320
atactcgtgta ctctacaag gcgcggtca cctagctgt gggtgataac cgtgtgctgg 19380
45 acatggcttc cacgtacttt gacatccgc gcgtgctgga caggggccct actttaagc 19440
cctactctgg cactgcctac aacgccctg ctccaaggg tccccaaat ccttgcaat 19500
50

gggatgaagc tgctactgct cttgaaataa acctagaaga agaggacgat gacaacgaag 19560
acgaagtaga cgagcaagct gagcagcaaa aaactcacgt atttgggcag ggccttatt 19620
5 ctggtataaa tattacaaag gagggatttc aaataggtgt cgaaggtcaa acacctaaat 19680
atgccgataa aacatttcaa cctgaacctc aaataggaga atctcagtgg tacgaaactg 19740
10 aaattaatca tgcagctggg agagtcctta aaaagactac cccaatgaaa ccatgttacg 19800
gttcatatgc aaaaccaca aatgaaaatg gagggcaagg cattcttcta aagcaacaaa 19860
15 atggaaagct agaaagtcaa gtggaaatgc aatttttctc aactactgag ggcaccgcag 19920
gcaatggatg taacttgact cctaaagtgg tattgtacag tgaagatgta gatatagaaa 19980
20 ccccagacac tcatatttct tacatgccca ctattaagga aggtaactca cgagaactaa 20040
tggccaaca atctatgcc aacaggccta attacattgc ttttagggac aattttattg 20100
gtctaagtga ttacaacagc acgggtaata tgggtgttct ggcgggcaaa gcatcgcagt 20160
25 tgaatgctgt ttagatttg caagacagaa acacagagct ttcataccag cttttgcttg 20220
attccattgg tgatagaacc aggtactttt ctatgtgga tcaggctgtt gacagctatg 20280
30 atccagatgt tagaattatt gaaaatcatg gaactgaaga tgaacttcca aattactgct 20340
ttccactggg aggtgtgatt aatacagaga ctcttaccac ggtaaaacct aaaacaggtc 20400
35 aggaaaatgg atgggaaaaa gatgctacag aattttcaga taaaaatgaa ataagagttg 20460
gaaataattt tgccatggaa atcaatctaa atgcccaacct gtggagaaat ttcctgtact 20520
40 ccaacatagc gctgtatttg cccgacaagc taaagtacag tccttccaac gtaaaaattt 20580
ctgataacc aaacacctac gactacatga acaagcgagt ggtggctccc gggttagtgg 20640
actgctacat taaccttga gcacgctggc cccttgacta tatggacaac gtcaacccat 20700
45 ttaaccacca ccgcaatgct ggctgcgct accgctcaat gttgctgggc aatggctgct 20760
atgtgccctt ccacatccag gtgcctcaga agttctttgc cattaaaaac ctcttctcc 20820
50

tgccgggctc atacacctac gagtggaact tcaggaagga tgtaacatg gttctgcaga 20880
gctccctagg aatgaccta agggttgacg gagccagcat taagttgat agcatttgc 20940
5 tttacgccac cttcttcccc atgcccaca acaccgctc cacgcttgag gccatgcttg 21000
aaacgacacc aacgaccagt cctttaacga ctatctctcc gccgccaaca tgctctaccc 21060
10 tatacccgcc aacgtacca acgtgcccac atccatcccc tcccgcaact gggeggcttt 21120
ccgcggtgg gccttcacgc gccttaagac taaggaaacc ccatcactgg gctcgggcta 21180
15 cgacccttat tacacctact ctggctctat acctaccta gatggaacct tttacctca 21240
ccacaccttt aagaaggtgg ccattacctt tgactcttct gtcagctggc ctggcaatga 21300
ccgcctgctt accccaacg agtttgaat taagcgctca gttgacgggg agggttaca 21360
20 cgttgcccag tgtaacatga ccaagactg gttcctggta caaatgctag ctaactaca 21420
cattggctac cagggttct atateccaga gagctacaag gaccgcatgt actccttctt 21480
25 tagaaacttc cagcccatga gccgtcaggt ggtggatgat actaaataca aggactacca 21540
acaggtgggc atctacacc aacacaaca ctctggattt gttggctacc ttgccccac 21600
30 catgcgcgaa ggacaggcct acctgctaa cttcccctat ccgcttatag gcaagaccgc 21660
agttgacagc attaccaga aaaagtttct ttgcgatgc accttttggc gcatccatt 21720
35 ctccagtaac tttatgtcca tgggcgcaact cacagacctg ggccaaaacc ttctctacgc 21780
caactccgcc cacgcgctag acatgacttt tgaggtggat cccatggacg agcccacct 21840
40 tctttatgtt ttgttgaag tctttgacgt ggtccgtgtg caccggccgc accgcggcgt 21900
catcgaacc gtgtacctgc gcacgccctt ctggccggc aacgccaca cataaagaag 21960
caagcaacat caacaacagc tgccgcatg ggctccagt agcaggaact gaaagccatt 22020
45 gtcaaagatc ttggttggg gccatattt ttgggcacct atgacaagcg ctttccaggc 22080
ttgtttctc cacacaagct cgctgcgcc atagtcaata cggccggtcg cgagactggg 22140
50

ggcgtacact ggatggcctt tgcttgaac cgcactcaa aaacatgcta cctctttgag 22200
ccctttggct tttctgacca gcgactcaag caggtttacc agtttgagta cgagtcactc 22260
5 ctgcgccgta ggcattgc ttcttcccc gaccgctgta taacgctgga aaagtccacc 22320
caaagcgtac aggggccccaa ctgcgccgcc tgtggactat tctgctgcat gttctccac 22380
10 gcctttgcca actggcccc aactcccatg gatcacaacc ccacatgaa cttattacc 22440
gggtaccaca actccatgct caacagtccc caggtagcgc ccacctgcg tcgcaaccag 22500
15 gaacagctct acagcttctt ggagcggcac tcgccctact tccgcagcca cagtgcgcag 22560
attaggagcg ccacttcttt ttgtcacttg aaaaacatgt aaaaataatg tactagagac 22620
actttcaata aaggcaaatg cttttatttg tacactctcg ggtgattatt taccaccacc 22680
20 cttgccgtct ggcgcgttta aaaatcaaag gggttctgcc gcgcatcgt atgcgccact 22740
ggcagggaca cgttgcgata ctggtgttta gtgtccact taaactcagg cacaaccatc 22800
25 cgcggcagct cgtgaagtt ttcactccac aggtcgcgca ccatcacaa cgcgtttagc 22860
aggtcgggcg ccgatatctt gaagtcgcag ttggggctc cgcctgcgc gcgagattg 22920
30 cgatacacag ggttgcagca ctggaacact atcagcggcg ggtggtgac gctggccagc 22980
acgctcttgt cggagatcag atccgcgtcc aggtcctccg cgttgctcag ggcgaacgga 23040
35 gtcaactttg gtagctgcct tcccataaag ggcgcgtgcc caggctttga gttgactcg 23100
caccgtagtg gcatcaaaag gtgaccgtgc ccggtctggg cgttaggata cagcgcctgc 23160
40 ataaaagcct tgatctgctt aaaagccacc tgagcctttg cgccttcaga gaagaacatg 23220
ccgcaagact tgccgaaaa ctgattggcc ggacaggccg cgtcgtgac gcagcacctt 23280
45 gcgtcgggtg tggagatctg caccacattt cggccccacc ggttcttcac gatcttgcc 23340
ttgctagact gctccttcag cgcgcgtgc ccgttttgc tcgtcacatc catttcaatc 23400
acgtgctctt tattatcat aatgcttccg ttagacact taagctcgc ttcgatctca 23460
50

gcgcagcggg gcagccacaa cgcgcagccc gtgggctcgt gatgcttgta ggtcacctct 23520
gcaaacgact gcaggtacgc ctgcaggaat cgccccatca tcgtcacaaa ggtcttggtg 23580
5 ctggtgaagg tcagctgcaa cccgcgggtc tctcgttca gccaggtctt gcatacggcc 23640
gccagagctt ccacttggtc aggcagtagt ttgaagtctg cctttagatc gttatccacg 23700
10 tggtaacttg ccatcagcgc gcgcgcagcc tccatgccct tctcccacgc agacacgatc 23760
ggcacactca gcgggttcat caccgtaatt tcactttccg cttegtggtg ctcttctctt 23820
15 tcctcttgcg tccgcatacc acgcgccact gggctcgtctt cattcagccg ccgcactgtg 23880
cgcttacctc ctttgccatg cttgattagc accgggtgggt tgctgaaacc caccatttgt 23940
20 agcgcacat ctctcttctt ttctcgtctg tccacgatta cctctggtga tggcggggcg 24000
tcgggcttgg gagaagggcg ctctcttctt ttcttgggcg caatggccaa atccgccgcc 24060
gaggtcogat gcgcgggct ggggtgtgcg ggcaccagcg cgtcttgta tgagtcttcc 24120
25 tcgtcctcgg actcgatacg ccgctcctc cgcttttttg ggggcgcccg gggaggcggc 24180
ggcgacgggg acggggacga cacgtcctcc atggttgggg gacgtcgcgc cgcaccgcgt 24240
30 ccgcgctcgg ggggtggttc gcgctgctcc tctcccgcac tggccatttc ctctcctat 24300
aggcagaaaa agatcatgga gtcagtcgag aagaaggaca gcctaaccgc cccctctgag 24360
35 ttcgccacca ccgctccac cgatgccgcc aacgcgcta ccaccttccc cgtcaggca 24420
ccccgcttg aggaggagga agtgattatc gagcaggacc caggttttgt aagcgaagac 24480
40 gacgaggacc gctcagtacc aacagaggat aaaaagcaag accaggacaa cgcagaggca 24540
aacgaggaac aagtcgggcg gggggacgaa aggcatggcg actacctaga tgtgggagac 24600
45 gacgtgctgt tgaagcatct gcagcggcag tgcgccatta tctgcgacgc gttgcaagag 24660
cgcagcgatg tgcccctcgc catageggat gtcagccttg cctacgaacg ccacctattc 24720
tcaccgcgcg taccocccaa acgccaagaa aacggcacat gcgagcccaa cccgcgctc 24780
50

aacttctacc ccgtatttgc cgtgccagag gtgcttgcca cctatcacat ctttttccaa 24840
aactgcaaga taccctatc ctgccgtgcc aaccgcagcc gagcggacaa gcagctggcc 24900
5 ttgcggcagg gcgctgtcat acctgatata gcctcgtca acgaagtgcc aaaaatcttt 24960
gagggtcttg gacgcgacga gaagcgcgcg gcaaacgctc tgcaacagga aaacagcga 25020
10 aatgaaagtc actctggagt gttggtgga ctcgagggtg acaacgcgcg cctagccgta 25080
ctaaaacgca gcatcgaggt caccacttt gcctaccgg cacttaacct accccccaag 25140
15 gtcatgagca cagtcagag tgagctgac gtgcgccgtg cgcagcccct ggagagggat 25200
gcaaatttgc aagaacaac agaggagggc ctaccgcag ttggcgacga gcagctagcg 25260
cgctggcttc aaacgcgcga gcctccgac ttggaggagc gacgcaact aatgatggcc 25320
20 gcagtgtctg ttaccgtgga gcttgagtgc atgcagcgt tctttgtga cccggagatg 25380
cagcgaagc tagaggaaac attgcactac accttgcac agggctacgt acgccaggcc 25440
25 tgcaagatct ccaacgtgga gctctgcaac ctggtctct accttggat tttgcacga 25500
aaccgccttg ggcaaacgt gcttcattcc acgtcaagg gcgagcgcg ccgcgactac 25560
30 gtccgcgact gcgtttactt atttctatgc tacacctggc agacggccat gggcgtttgg 25620
cagcagtgtc tggaggagt caacctcaag gagctgcaga aactgctaaa gcaaaacttg 25680
35 aaggacctat ggacggcctt caacgagcgc tccgtggccg cgcacctggc ggacatcatt 25740
ttcccgaac gcctgcttaa aacctgcaa cagggtctgc cagacttac cagtcaaagc 25800
40 atgttcaga acttaggaa ctttatccta gacgctcag gaatcttgc cgccacctgc 25860
tgtgcacttc ctagcgactt tgtgccatt aagtaccgg aatgcctcc gccgctttgg 25920
ggccactgct accttctgca gctagccaac taccttgct accactctga cataatgga 25980
45 gacgtgagcg gtgacggtct actggagtgt cactgtcgt gcaacctatg cccccgcac 26040
cgctccctgg tttcaattc gcagctgctt aacgaaagtc aaattatcg tacctttgag 26100
50

ctgcagggtc cctcgcctga cgaaaagtc gcggtccgg ggttgaact cactccgggg 26160
ctgtggacgt cggcttacct tcgcaattt gtacctgagg actaccacgc ccacgagatt 26220
5 aggttctacg aagaccaatc ccgcccgcc aatgcggagc ttaccgctg cgtcattacc 26280
cagggccaca ttcttgcca attgcaagcc atcaacaaag cccgccaaga gtttctgcta 26340
10 cgaaagggac ggggggttta cttggacccc cagtccggcg aggagctcaa cccaatcccc 26400
ccgccccgc agccctatca gcagcagccg cgggcccttg cttcccagga tggcacccaa 26460
15 aaagaagctg cagctgccgc cgccaccac ggacgaggag gaatactggg acagtcaggc 26520
agaggaggtt ttggacgagg aggaggagga catgatggaa gactgggaga gcctagacga 26580
ggaagcttcc gaggtcgaag aggtgtcaga cgaaacaccg tcaccctcgg tcgcattccc 26640
20 ctcgccggcg cccagaaat cggcaaccgg ttccagcatg gctacaacct ccgctcctca 26700
ggcgccgccg gcactgccg ttcgccgacc caaccgtaga tgggacacca ctggaaccag 26760
25 ggccggtaag tccaagcagc cgccgccgtt agcccaagag caacaacagc gccaaggcta 26820
ccgctcatgg cgcgggcaca agaacccat agttgcttgc ttgcaagact gtgggggcaa 26880
30 catctccttc gcccgccgt tttctcteta ccatcacggc gtggccttcc cccgtaacat 26940
cctgcattac tacgctcacc tctacagccc atactgcacc ggccggcagc gcagcggcag 27000
35 caacagcagc gccacacag aagcaaagc gaccggatag caagactctg acaaagccca 27060
agaaatccac agcggcggca gcagcaggag gaggagcgt cgtctggcg cccaacgaac 27120
40 ccgtatcgac ccgcgagctt agaaacagga ttttccac tctgtatgct atatttcaac 27180
agagcagggg ccaagaaca gagctgaaa taaaaaacag gtctctgcga tcctcacc 27240
gcagctgcct gtatcacaag agcgaagatc agcttcggcg cacgctggaa gacgcggag 27300
45 ctctctcag taaatactgc gcgctgactc ttaaggacta gtttcgcgc ctttctcaaa 27360
ttaagcgcg aaaactacgt catctccagc gccacaccc ggccagca cctgtcgtca 27420
50

gcgccattat gagcaaggaa attcccacgc cctacatgtg gagttaccag ccacaaatgg 27480
gacttgcggc tggagctgcc caagactact caaccggaat aactacatg agcgcgggac 27540
5 cccacatgat atcccgggtc aacggaatcc gcgccaccg aaaccgaatt ctcttggaac 27600
aggcggctat taccaccaca cctcgtata accttaatcc ccgtagttgg cccgctgccc 27660
10 tgggtgtacca ggaaagtccc gctcccacca ctgtgttact tcccagagac gccagggcgg 27720
aagttcagat gactaactca ggggcgcagc ttgcggcgg ctttcgtcac aggggtcggg 27780
15 cgcccgggca ggggtataact cacctgacaa tcagagggcg aggtattcag ctcaacgacg 27840
agtccgtgag ctctctgctt ggtctccgtc cggacgggac attcagatc ggcggcggc 27900
20 gccgctcttc attcacgctt cgtcaggcaa tctaactct gcagacctc tcctctgagc 27960
cgcgctctgg aggcattgga actctgcaat ttattgagga gtttgtcca tcggtctact 28020
ttaaccctt ctcgggacct cccggccact atccgatca atttattct aactttgacg 28080
25 cggtaaagga ctcggcggac ggctacgact gaatgttaag tggagaggca gagcaactgc 28140
gcctgaaaca cctggtccac tgtcgccgc acaagtgtt tgcccgcgac tccggtgagt 28200
30 tttgctactt tgaattgcc gaggatcata tcgagggccc ggcgcacggc gtccggctta 28260
ccgccaggg agagcttgcc cgtagcctga ttccggagt taccagcgc ccctgctag 28320
35 ttgagcggga caggggacce tgtgttctca ctgtgattg caactgtct aaccttgat 28380
tacatcaaga tctttgttgc catctctgtg ctgagtataa taaatacaga aattaaata 28440
40 tactggggct cctatcgcca tctgtaac gccaccgtct tcaccgccc aagcaaacca 28500
aggcgaacct tacctgtac ttttaacatc tctccctctg tgatttaca cagtttcaac 28560
45 ccagacggag tgagtctac agagaacctc tccgagctca gctactccat cagaaaaaac 28620
accaccctcc ttacctgccc ggaacgtac agtgcgtcac cggccgctgc accacaccta 28680
ccgctgacc gtaaaccaga cttttccgg acagacctca ataactctgt ttaccagaac 28740
50

aggaggtgag cttagaaaac ccttagggta ttaggcaaaa ggcgcagcta ctgtgggggt 28800
tatgaacaat tcaagcaact ctacgggcta ttctaattca ggtttctcta gaatcgggggt 28860
5 tggggttatt ctctgtcttg tgattctctt tattcttata ctaacgcttc tctgcctaag 28920
gctcgccgcc tgctgtgtgc acatttgcac ttattgtcag ctttttaaac gctggggctg 28980
10 ccaccaaga taacctatg gctgcagagc ctgctgctct tgggcactgt ggccctgcagc 29040
atctctgcac ccgcccgtc gccagcccc agcacgcagc cctgggagca tgtgaatgcc 29100
15 atccaggagg cccggcgtct cctgaacctg agtagagaca ctgctgctga gatgaatgaa 29160
acagtagaag tcatctcaga aatgtttgac ctccaggagc cgacctgcct acagaccgc 29220
ctggagctgt acaagcaggc cctgcggggc agcctcacca agctcaaggc ccccttgacc 29280
20 atgatggcca gccactacaa gcagcactgc cctccaacc cggaacttc ctgtgcaacc 29340
cagactatca cctttgaaag tttcaagag aacctgaagg actttctgct tgcaccccc 29400
25 tttgactgct gggagccagt ccaggagtaa ttactaagt tacaagcta atgacccac 29460
taactgcttt acccgctgct tgcaaaacaa attcaaaaag ttagcattat aattagaata 29520
30 ggatttaaac cccccgtca tttctgctc aataccattc ccctgaacaa ttgactctat 29580
gtgggatatg ctccagcgt acaacctga agtcaggctt cctggatgtc agcatctgac 29640
35 tttggccagc acctgtcccg cggatttggt ccagccaac tacagcgacc caccctaaca 29700
gagatgacca acacaaccaa cgcggccgcc gctaccggac ttacatctac cacaataca 29760
40 cccaagttt ctgcctttgt caataactgg gataacttgg gcatgtggtg gttctccata 29820
gcgcttatgt ttgtatgcct tattattatg tggctcatct gctgcctaaa gcgcaaacgc 29880
gcccgaccac ccatctatag tccatcatt gtgctacacc caacaatga tggaatccat 29940
45 agattggacg gactgaacaa catgttcttt tctcttacag tatgattaaa tgagacatga 30000
ttctcagat tttatatta ctgacccttg ttgcctttt ttgtgcgtgc tccacattgg 30060
50

ctgcggttc tcacatcga gtagactgca ttccagcctt cacagtctat ttgctttacg 30120
gatttgcac cctcacgctc atctgcagcc tcatcactgt ggtcaccgcc tttatccagt 30180
5 gcattgactg ggtctgtgtg cgctttgcat atctcagaca ccatccccag tacagggaca 30240
ggactatagc tgagcttctt agaattcttt aattatgaaa tttactgtga cttttctgct 30300
10 gattatttgc accctatctg cgttttgttc cccgacctcc aagcctcaaa gacatatatc 30360
atgcagattc actcgtatat ggaatattcc aagttgctac aatgaaaaaa gcgatctttc 30420
15 cgaagcctgg ttatatgcaa tcatctctgt tatggtgttc tgcagtacca tcttagccct 30480
agctatatat ccctaccttg acattggctg gaaacgaata gatgccatga accacccaac 30540
20 tttccccggc cccgctatgc ttccactgca acaagttggt gccggcggct ttgtcccagc 30600
caatcagcct cgccccactt ctcccacccc cactgaaatc agctacttta atctaacagc 30660
aggagatgac tgacacccta gatctagaaa tggacggaat tattacagag cagcgcctgc 30720
25 tagaaagaag cagggcagcg gccgagcaac agcgcgatga tcaagagctc caagacatgg 30780
ttaacttgca ccagtcaaaa aggggtatct tttgtctggt aaagcaggcc aaagtcacct 30840
30 acgacagtaa taccaccgga caccgcctta gctacaagtt gccaaccaag cgtcagaat 30900
tggtggtcat ggtgggagaa aagccatta ccataactca gcaactcgta gaaaccgaag 30960
35 gctgcattca ctcacctgt caaggacctg aggatctctg cacccttatt aagaccctgt 31020
gcggtctcaa agatcttatt ccctttaact aataaaaaaa aataataaag catcacttac 31080
40 ttaaaatcag ttagcaaat tctgtccagt ttattcagca gcacctcctt gccctcctcc 31140
cagctctggt attgcagctt cctcctggct gcaactttc tccacaatct aatggaatg 31200
tcagtttct cctgttctg tccatccgca cccactatct tcatgttggt gcagatgaag 31260
45 cgcgcaagac cgtctgaaga taccttaac cccgtgtatc catatgacac ggaaccggt 31320
cctccaactg tgcctttct tactcctccc tttgtatccc ccaatgggtt tcaagagagt 31380
50

ccccctgggg tactctcttg cgcctatccg aacctctagt tacctccaat ggcatgcttg 31440
cgctcaaaat gggcaacggc ctctctctgg acgaggccgg caaccttacc tcccaaaatg 31500
5 taaccactgt gagcccacct ctcaaaaaaa ccaagtcaaa cataaacctg gaaatatctg 31560
caccctcac agttacctca gaagccctaa ctgtggctgc cgccgcacct ctaatggtcg 31620
10 cgggcaacac actcaccatg caatcacagg ccccgctaac cgtgcacgac tccaaactta 31680
gcattgccac ccaaggaccc ctcacagtgt cagaaggaaa gctagccctg caaacatcag 31740
15 gccccctcac caccaccgat agcagtaccc ttactatcac tgccctaccc cctctaacta 31800
ctgccactgg tagcttgggc attgacttga aagagcccat ttatacaca aatggaaaac 31860
taggactaaa gtacggggct cctttgcatg taacagacga cctaaacact ttgaccgtag 31920
20 caactggtcc aggtgtgact attaataata cttccttga aactaaagt actggagcct 31980
tggttttga ttcacaaggc aatatgcaac ttaatgtagc aggaggacta aggattgatt 32040
25 ctcaaaacag acgccttata cttgatgta gttatccgtt tgatgctcaa aaccaactaa 32100
atctaagact aggacagggc cctcttttta taaactcagc ccacaacttg gatattaact 32160
30 acaacaaagg cctttacttg ttacagctt caaacaattc caaaaagctt gaggttaacc 32220
taagcactgc caaggggttg atgtttgacg ctacagccat agccattaat gcaggagatg 32280
35 ggcttgaatt tggttcacct aatgcaccaa acacaaatcc cctcaaaaaca aaaattggcc 32340
atggcctaga atttgattca aacaaggcta tggttcctaa actaggaact ggccttagtt 32400
40 ttgacagcac aggtgccatt acagtaggaa acaaaaataa tgataagcta actttgtgga 32460
ccacaccagc tccatctcct aactgtagac taaatgcaga gaaagatgct aaactcactt 32520
tggtcttaac aaaatgtggc agtcaaatac ttgctacagt ttcagttttg gctgttaaag 32580
45 gcagtttggc tccaatatct ggaacagttc aaagtgtca tcttattata agatttgacg 32640
aaaatggagt gctactaac aattccttcc tggaccaga atattggaac tttagaaatg 32700
50

gagatcittac tgaaggcaca gcctatacaa acgctgttgg atttatgcct aacctatcag 32760
cttatccaaa atctcacggt aaaactgcc aagtaacat tgcagtcaa gtttacttaa 32820
5 acggagacaa aactaacct gtaacactaa ccattacact aaacgtaca caggaaacag 32880
gagacacaac tccaagtgea tactctatgt cattttcatg ggactggctt gccacaact 32940
10 acattaatga aatatttggc acatctcttt acactttttc atacattgcc caagaataaa 33000
gaatcgtttg tgttatgttt caacgtgttt atttttcaat tgcagaaaat ttcaagtcat 33060
15 ttttcattca gtagtatagc cccaccacca catagcttat acagatcacc gtaccttaat 33120
caactcaca gaaccctagt attcaacctg ccacctcct cccaacacac agagtacaca 33180
20 gtcttttctc cccggctggc cttaaaaagc atcatatcat ggtaacaga catattctta 33240
gggtttatat tccacacggt ttctgtcga gccaaacgct catcagtgat attaataaac 33300
tccccgggca gctcacttaa gttcatgtcg ctgtccagct gctgagccac aggctgctgt 33360
25 ccaacttggg gttgcttaac gggcgcgcaa ggagaagtcc acgcctacat ggggtagag 33420
tcataatcgt gcatcaggat agggcggtgg tgcctcagca gcgcgcaat aaactgctgc 33480
30 cgcccgcgct cgtcctgca ggaatacaac atggcagtgg tctcctcagc gatgattcgc 33540
accgcccgca gcataaggcg ccttgtcttc cgggcacagc agcgaccct gatctcactt 33600
35 aaatcagcac agtaactgca gcacagcacc acaatattgt tcaaaatccc acagtgaag 33660
gcgctgtatc caaagctcat ggcggggacc acagaacca cgtggccatc ataccacaag 33720
40 cgcaggtaga ttaagtggcg acccctcata aacacgctgg acataaacat tacctctttt 33780
ggcatgttgt aattcaccac ctcccgtac catataaac tctgattaaa catggcgcca 33840
tccaccacca tcctaaacca gctggccaaa acctgcccgc cggctataca ctgcagggaa 33900
45 cgggactgg aacaatgaca gtggagagcc caggactcgt aacctggat catcatgctc 33960
gtcatgatat caatgttggc acaacacagg cacacgtgca tacacttctt caggattaca 34020
50

agctcctccc gcgtagaac catatcccag ggaacaacc attcctgaat cagcgtaaat 34080
cccacactgc agggaagacc tcgcacgtaa ctcacgttgt gcattgtcaa agtgttacat 34140
5 tcgggcagca gcggatgac ctccagtatg gtagcgcggg tttctgtctc aaaaggaggt 34200
agacgatccc tactgtacgg agtgcgccga gacaaccgag atcgtgttgg tcgtagtgtc 34260
10 atgccaaatg gaacgccgga cgtagtcata tttcctgaag caaaaccagg tgcgggcgtg 34320
acaaacagat ctgcgtctcc ggtctcgcg cttagatcgc tctgtgtagt agttgtagta 34380
15 tatccactct ctcaaagcat cagggcccc ctggcttcgg gttctatgta aactccttca 34440
tgcgccgctg ccctgataac atccaccacc gcagaataag ccacaccag ccaacctaca 34500
cattcgttct gcgagtcaca cacgggagga gcgggaagag ctggaagaac catgtttttt 34560
20 tttttattcc aaaagattat ccaaaacctc aaaatgaaga tctattaagt gaacgcgctc 34620
ccctccggtg gcgtgggtcaa actctacagc caaagaacag ataatggcat ttgtaagatg 34680
25 ttgcacaatg gttccaaaa ggcaaacggc ctcacgtcc aagtggacgt aaaggctaaa 34740
cccttcaggg tgaatctct ctataaacat tccagacct tcaacctgc ccaaataatt 34800
30 ctcatctgc caccttctca atatatctct aagcaaatcc cgaatattaa gtccggccat 34860
tgtaaaaatc tgcctcagag cgccctccac cttcagctc aagcagcgaa tcatgattgc 34920
35 aaaaattcag gttcctcaca gacctgtata agattcaaaa gcggaacatt acaaaaaata 34980
ccgcgatccc gtaggtccct tcgcagggcc agctgaacat aatcgtgcag gtctgcacgg 35040
40 accagcgcgg ccacttcccc gccaggaacc ttgacaaaag aaccacact gattatgaca 35100
cgcactactg gagctatgct aaccagcgta gccccgatgt aagctttggt gcatgggcgg 35160
cgatataaaa tgcaaggtgc tgctcaaaaa atcaggcaaa gcctcgcgca aaaaagaaag 35220
45 cacatcgtag tcatgctcat gcagataaag gcaggtaac tccggaacca ccacagaaaa 35280
agacaccatt tttctctcaa acatgtctgc gggtttctgc ataacacaa aataaaataa 35340
50

caaaaaaca tttaaacatt agaagcctgt cttacaacag gaaaaacaac ccttataagc 35400
 ataagacgga ctacggccat gccggcgtga ccgtaaaaaa actggtcacc gtgattaana 35460
 5 agcaccaccg acagctcctc ggtcatgtcc ggagtcataa tgtaagactc ggtaaacaca 35520
 tcaggttgat tcatcggtea gtgctaaaaa gcgaccgaaa tagccccggg gaatacatac 35580
 10 ccgcaggcgt agagacaaca ttacagcccc cataggaggt ataacaaaat taataggaga 35640
 gaaaaacaca taaacacctg aaaaaccctc ctgcctagc aaaatagcac cctcccctc 35700
 15 cagaacaaca tacagcgtt ccacagcggc agccataaca gtcagcctta ccagtaaaaa 35760
 agaaaaccta ttaaaaaaac accactcgac acggcaccag ctcaatcagt cacagtgtaa 35820
 20 aaaagggcc agtgcagagc gagtatatat aggactaaaa aatgacgtaa cggttaaagt 35880
 ccacaaaaaa caccagaaa accgcacgag aacctagcc cagaaacgaa agccaaaaaa 35940
 cccacaactt cctcaaatcgc tcacttccgt tttcccagc tacgtcactt ccatittaa 36000
 25 ttaagaaaac tacaattccc aacacataca agttactccg ccctaaaacc tacgtcacc 36060
 gccccgtcc cagccccgc gccacgtcac aaactccacc cctcattat catattggct 36120
 30 tcaatccaaa ataaggtata ttattgatga tg 36152

<210> 4

<211> 582

35 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<230> Recombinant

40 <400> 4

atgtggtcgc agagcctgct gctcttgggc actgtggcct gcagcatctc tgcaccgcc 60
 45 cgctcgccca gccccagcac gcagccctgg gagcatgtga atgcatcca ggaggcccgg 120
 cgctcctga acctgagtag agacactgct gctgagatga atgaaacagt agaagtcac 180
 50

tcagaaatgt ttgacctcca ggagccgacc tgcctacaga cccgcctgga gctgtacaag 240
 cagggcctgc ggggcagcct caccaagctc aagggeccct tgaccatgat ggccagccac 300
 5 tacaagcagc actgcctccc aaccccggaa acttcctgtg caaccagac taccaccttt 360
 gaaagtttca aagagaacct gaaggacttt ctgcttgta tccccttga ctgctgggag 420
 10 ccagtccagg aggctgtggg ccaggacacg caggaggtca tcgtggtgcc aactccttg 480
 cccttaagg tgggtgat ctcagccatc ctggccctgg tgggtctcac catcatctcc 540
 15 cttatcatcc tcatcatgct ttggcagaag aagccacgtt ag 582

<210> 5

<211> 1772

<212> DNA

20 <213> Artificial Sequence

<220>

<230> Recombinant

<400> 5

25

atgaagcgcg caagaccgtc tgaagatacc ttcaaccccg tgtatcctat gacacggaaa 60
 30 ccggtcctcc aactgtgctt tttcttactc ctcccttgt atccccaat gggtttcaag 120
 agagtcccc tgggttactc tctttgccc tatccgaacc tctagttacc tccaatggca 180
 35 tgcttgcgct caaaatgggc aacggcctct ctctggacga ggccggcaac cttacctccc 240
 aaaatgtaac cactgtgagc ccacctctca aaaaaacca gtcaaacata aacctggaaa 300
 tatctgcacc cctcacagtt acctcagaag ccctaactgt ggctgccgcc gcacctctaa 360
 40 tggctcgcgg caacacactc accatgcaat cacaggcccc gctaaccgtg cactactcca 420
 aacttagcat tgccaccaa ggaccctca cagtgtcaga aggaaagcta gccctgcaaa 480
 45 catcaggccc cctcaccacc accgatagca gtacccttac tactactgcc tccccctc 540
 taactactgc cactggtagc ttgggcattg acttgaaaga gccatttat acacaaatg 600
 50 gaaaactagg actaaagtac ggggtcctt tgcattgtaac agacgacctc aacactttga 660

ccgtagcaac tgggccaggt gtgactatta ataatacttc cttgcaaact aaagttactg 720
 gagccttggg ttttgattca caaggcaata tgcaacttaa tgtagcagga ggactaagga 780
 5 ttgattctca aaacagacgc cttatacttg atgtagtta tccgtttgat gctcaaaacc 840
 aactaaatct aagactagga cagggccctc tttttataaa ctcagcccac aacttgata 900
 10 ttaactacaa caaaggcctt tacttgttta cagcttcaaa caattccaaa aagcttgagg 960
 ttaacctaaг cactgccaag gggttgatgt ttgacgctac agccatagcc attaatgcag 1020
 15 gagatgggct tgaatttggт tcacctaatg caccaaacac aaatcccctc aaaacaaaaa 1080
 ttggccatgg cctagaattt gattcaaaca aggetatggt tcctaaacta ggaactggcc 1140
 ttagttttga cagcacaggt gccattacag taggaaacaa aaataatgat aagctaacct 1200
 20 tatggactgg aataaacctt ccacctact gtcaaattgt ggaaaacact aatacaaatg 1260
 atggcaaacт tactttagta ttagtaaaaa atggagggct tgттаатggc tacgtgtctc 1320
 25 tagttgggtg atcagacact gtgaaccaaа tgttcacaca aaagacagca aacatccaat 1380
 taagattata tttgactct tctggaaatc таттаactga ggaatcagac ттаааааттс 1440
 30 cacttaaaaa тaaatcttct acagcgacca gtgaaactgt agccagcagc aaagccttta 1500
 tgccaagtac tacagcttat ccttcaaca ccactactag ggatagtгaa aactacattc 1560
 35 atggaatatg ttactacatg actagttatg atagaagtct atttccttg aacatttcta 1620
 таатгстааа сagccgatg атттсттсса атгттгсста тгссатасаа тттгаатгга 1680
 40 atctaaatgc aagtгаатсt ccagaaagca acatagctac gctgaccaca тccccctttt 1740
 тсттттсста саттасagaa гacгсacaact aa 1772

Формула изобретения

- 45 1. Условно реплицирующийся онколитический рекомбинант вируса, где названный рекомбинант включает основной вирус, промотор hTERT, как указано в SEQ ID NO:2, и иммунные регуляторные гены, и где названный основной вирус является аденовирусом или генетически улучшенным вариантом аденовируса.
- 50 2. Рекомбинант по п.1, где аденовирус выбирают из группы, включающей серотипы аденовирусов: Ad2, Ad5, Ad35 и Ad41.
3. Рекомбинант по п.1, где улучшенный вариант аденовируса является таким аденовирусом, у которого его гены E1A и E1B связаны вместе внутренним сайтом связывания рибосомы (internal ribosome entry site, IRES).

4. Рекомбинант по п.1, где улучшенный вариант аденовируса является таким аденовирусом, у которого его булавовидный отросток аденовируса серотипа 5 заменен на булавовидный отросток аденовируса серотипа 35.

5. Рекомбинант по п.1, где улучшенный вариант аденовируса является таким аденовирусом, у которого элемент терминации транскрипции вставлен ниже ITR и сайта упаковки, но выше гетерологичного промотора.

6. Рекомбинант по п.2, где улучшенный вариант аденовируса является таким аденовирусом, в котором делетированы его кодирующие последовательности для 10,4К, 14,5К и 14,7К в участке E3 аденовируса.

10. 7. Рекомбинант по п.1, где улучшенный вариант аденовируса является таким аденовирусом, у которого его гены E1A и E1B связаны вместе внутренним сайтом связывания рибосомы (IRES), и его последовательность, кодирующая булавовидный отросток аденовируса серотипа 5, заменена на последовательность, кодирующую булавовидный отросток аденовируса серотипа 35, и элемент терминации транскрипции вставлен ниже ITR и сайта упаковки, но выше гетерологичного промотора.

8. Рекомбинант по п.5, где названным элементом терминации транскрипции является ранняя поли-(A) сигнальная последовательность SV40.

20. 9. Рекомбинант по п.1, где иммунорегуляторным геном является любой ген клеточного фактора, который способен улучшить иммунный ответ человека, и клеточный фактор выбирают из группы, включающей IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, IL-24, IL-25, GM-CSF, G-CSF, INF-альфа, INF-бета и их мутанты.

10. Рекомбинант по п.9, где клеточным фактором, способным улучшить иммунный ответ человека, является GM-CSF человека.

25. 11. Рекомбинант по п.10, где названный GM-CSF находится в связанной с мембранами форме.

12. Рекомбинант по п.1, где основной вирус является таким улучшенным аденовирусом, у которого в его последовательности гены E1A и E1B связаны посредством внутреннего сайта связывания рибосомы (IRES), и его последовательность, кодирующая булавовидный отросток аденовируса серотипа 5, заменена на последовательность, кодирующую булавовидный отросток аденовируса серотипа 35, и элемент терминации транскрипции вставлен ниже ITR и сайта упаковки и выше гетерологичного промотора, и где специфичным к опухолевым клеткам регуляторным элементом является промотор hTERT с последовательностью, показанной в SEQ ID NO:2, и иммунорегуляторным геном является ген GM-CSF.

30. 13. Рекомбинант по п.1, где основной вирус является таким улучшенным аденовирусом, у которого в его последовательности элемент терминации транскрипции вставлен ниже ITR и сайта упаковки и выше гетерологичного промотора, причем специфичным к опухолевым клеткам регуляторным элементом является промотор hTERT с последовательностью, показанной в SEQ ID NO:2, и иммунорегуляторным геном является ген GM-CSF с последовательностью его ДНК, показанной в SEQ ID NO:3.

40. 14. Рекомбинант по п.1, где основной вирус является таким улучшенным аденовирусом, у которого в его последовательности последовательность, кодирующая булавовидный отросток аденовируса серотипа 5, заменена на последовательность, кодирующую булавовидный отросток аденовируса серотипа 35, и специфичным к опухолевым клеткам регуляторным элементом является промотор hTERT с последовательностью, показанной в SEQ ID NO:2, и иммунорегуляторным геном является ген GM-CSF.

50. 15. Рекомбинант по п.1, где основной вирус является таким улучшенным аденовирусом, у которого в его последовательности элемент терминации транскрипции вставлен ниже ITR и сайта упаковки и выше гетерологичного промотора, причем кодирующие последовательности для 10,4К, 14,5К и 14,7К в

участке E3 аденовируса делетированы, и специфичным к опухолевым клеткам регуляторным элементом является промотор hTERT с последовательностью, показанной в SEQ ID NO:2, и иммунорегуляторным геном является ген GM-CSF.

5 16. Рекомбинант по любому из пп.12-15, где иммунорегуляторным геном является ген GM-CSF в его мембранно-связанной форме.

17. Промотор, имеющий последовательность, показанную в SEQ ID NO:2.

18. Фармацевтическая композиция для предупреждения и/или терапевтического лечения опухоли, включающая любой из рекомбинантов по пп.1-16.

10 19. Фармацевтическая композиция по п.18, которая составлена для инъекционного введения.

20. Фармацевтическая композиция по п.18, где композицию применяют вместе с химиотерапией и радиационной терапией.

21. Применение рекомбинанта по п.1 для изготовления медикамента для предупреждения и/или лечения опухоли.

15 22. Способ получения рекомбинанта по п.1, включающий следующие стадии:

а) создание левого плеча аденовируса, которое содержит последовательность промотора hTERT;

б) создание правого плеча аденовируса, которое содержит иммуностимулирующий ген;

20 в) котрансфекция плазмидных ДНК, содержащих правое плечо и левое плечо аденовируса, в клетки 293, HeLa, HeLa-S3 или A549, и получение рекомбинанта, описанного в п.1, в результате гомологической рекомбинации.

25

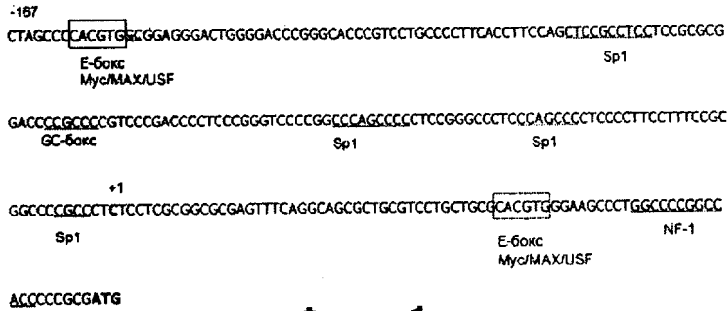
30

35

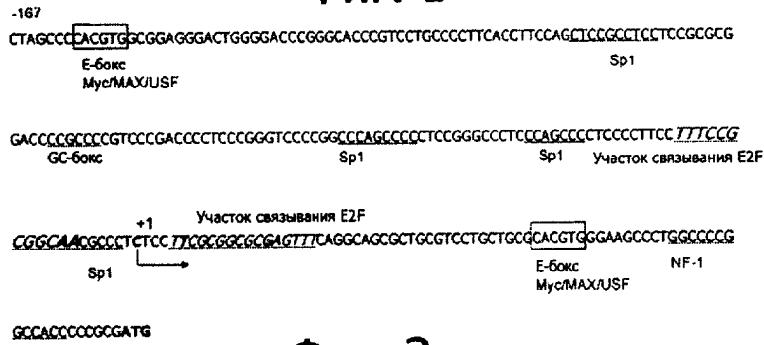
40

45

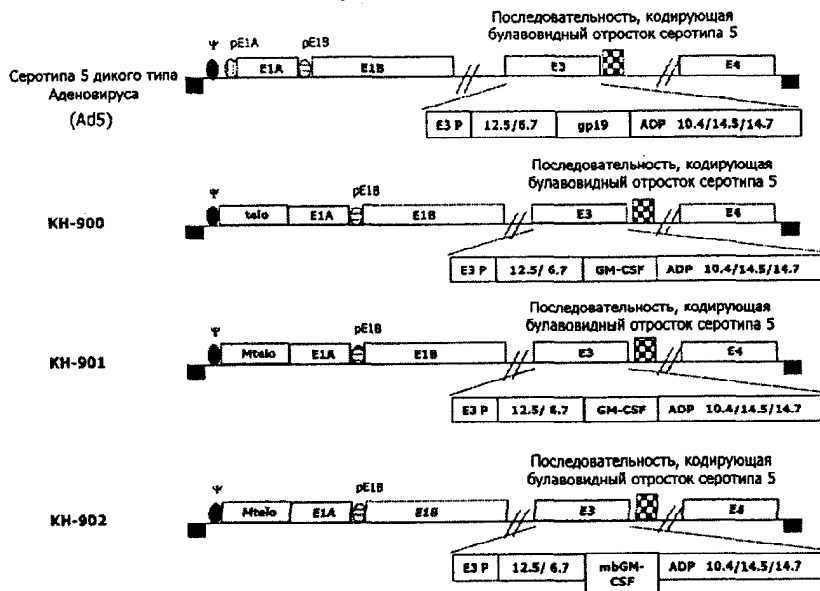
50



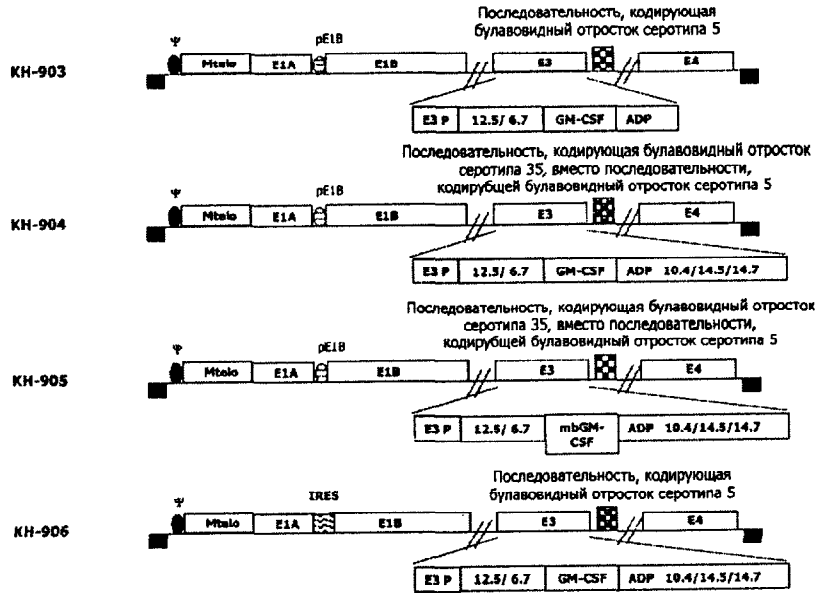
Фиг. 1



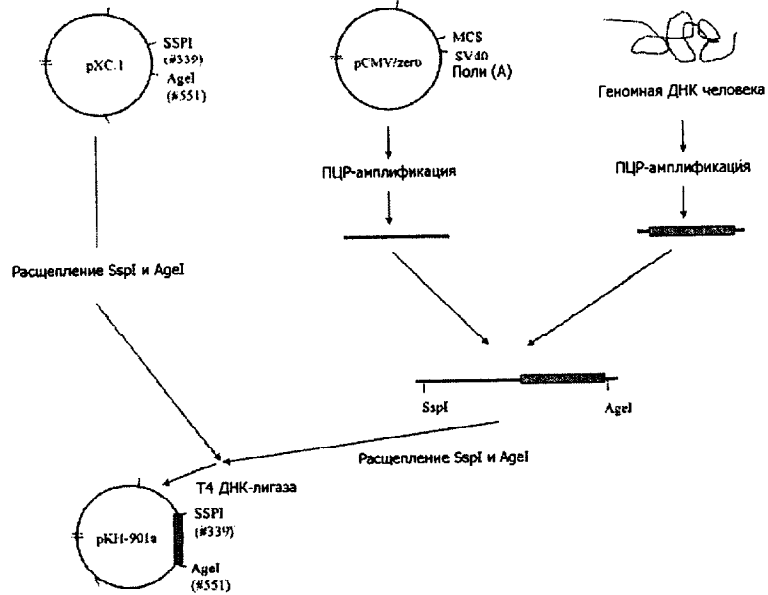
Фиг. 2



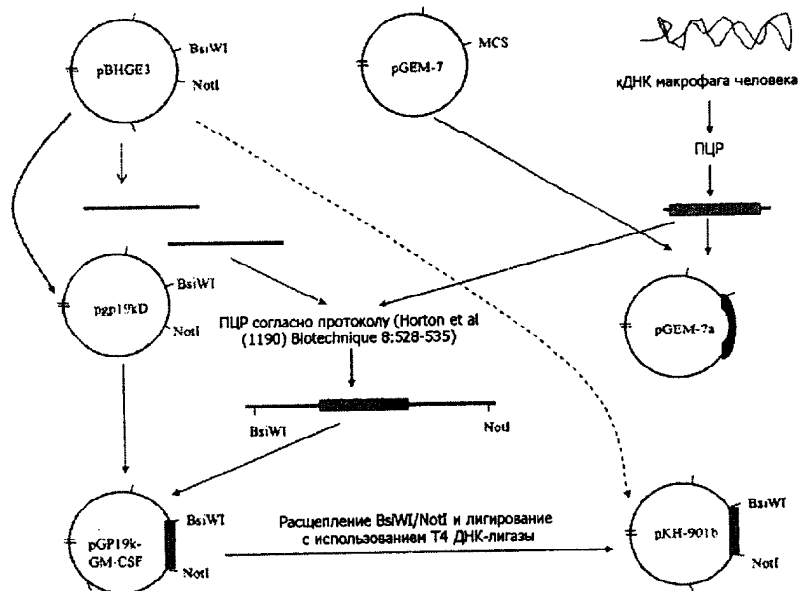
Фиг. 3-1



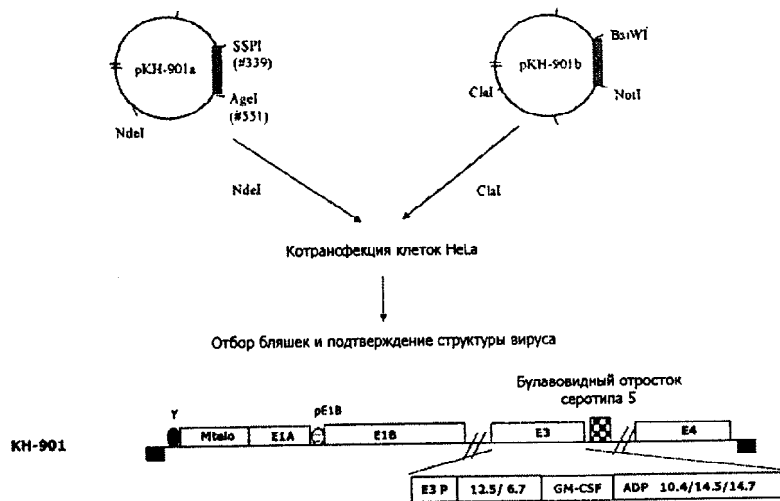
ФИГ. 3-2



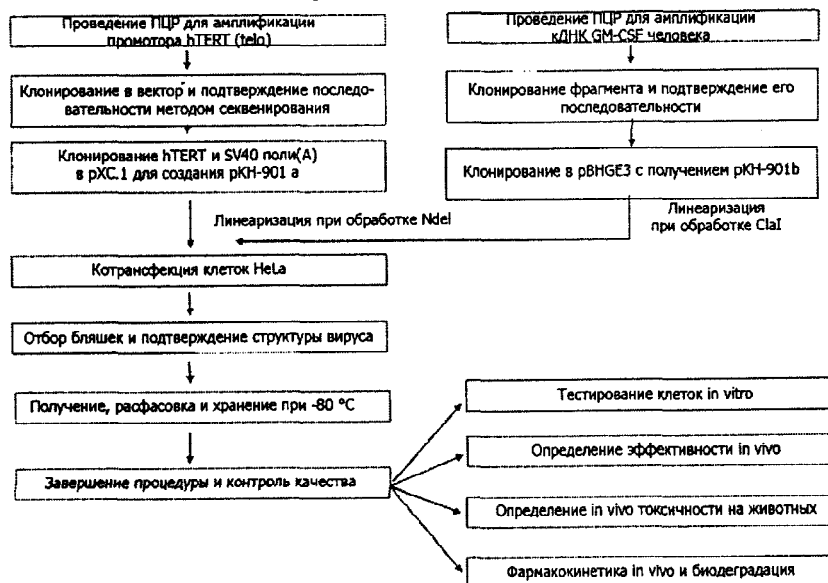
ФИГ. 4-1



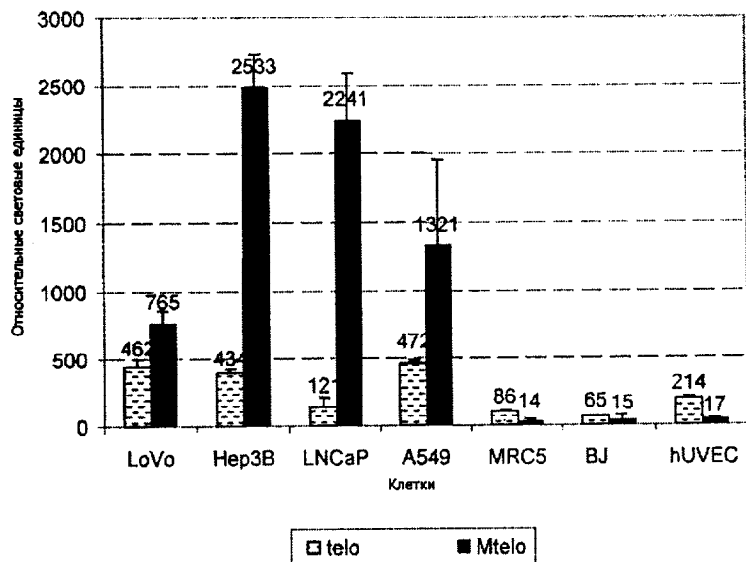
ФИГ. 4-2



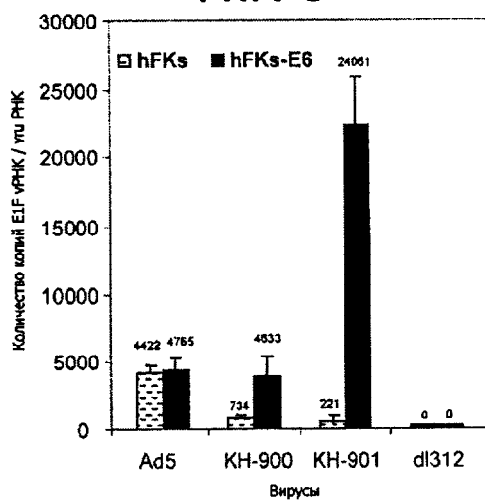
ФИГ. 4-3



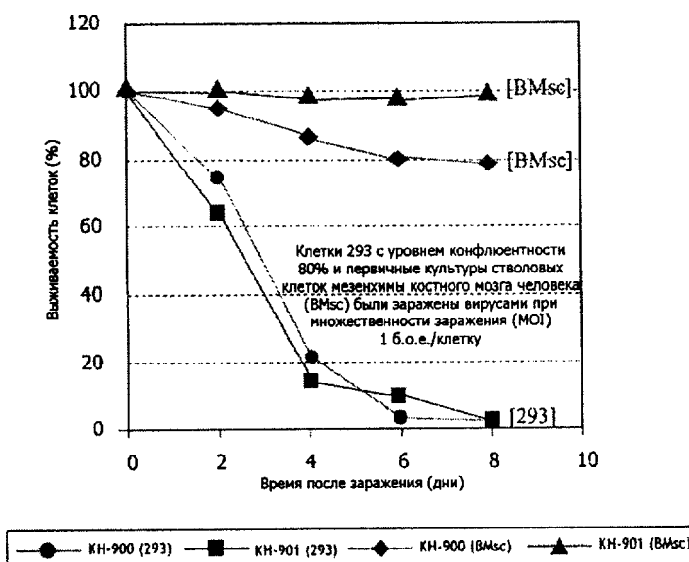
ФИГ. 5



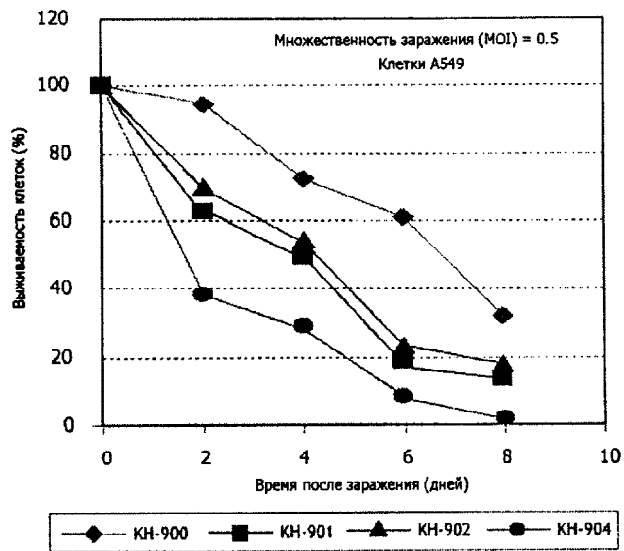
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



ФИГ. 9