



УКРАЇНА

(19) UA (11) 89957 (13) C2
(51) МПК (2009)
C12N 15/861
C12N 7/01
C12N 7/02
A61K 48/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ХИМЕРНІ АДЕНОВІРУСИ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЗЛОЯКІСНОГО НОВОУТВОРЕННЯ

1

2

(21) а200613678

(22) 24.05.2005

(24) 25.03.2010

(86) PCT/US2005/018301, 24.05.2005

(31) 60/574,851

(32) 26.05.2004

(33) US

(46) 25.03.2010, Бюл.№ 6, 2010 р.

(72) ХАРДЕН ПОЛ, US, ХЕРМИСТОН ТЕРПИ, US,
КУН ІРЕНЕ, US

(73) ШЕРІНГ АКЦІОНГЕЗЕЛЬШАФТ, DE

(56) MEI Y.-F. ET AL: "Comparative analysis of the genome organization of human adenovirus 11, a member of the human adenovirus species B, and the commonly used human adenovirus 5 vector, a member of species C" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, SPENCERS WOOD, GB, vol. 84, no. PART 8, August 2003 (2003-08), pages 2061-2071.

YAN WEN ET AL: "Developing novel oncolytic adenoviruses through bioselection." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 77, no. 4, February 2003 (2003-02), pages 2640-2650.

HERMISTON T. W. ET AL: "Armed therapeutic viruses: Strategies and challenges to arming oncolytic viruses with therapeutic genes" CANCER GENE THERAPY 01 DEC 2002 UNITED STATES, vol. 9, no. 12, 1 December 2002 (2002-12-01), pages 1022-1035.

STONE D. et al: "THE COMPLETE NUCLEOTIDE SEQUENCE, GENOME ORGANIZATION, AND ORIGIN OF HUMAN ADENOVIRUS TYPE 11" VIROLOGY, RAVEN PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 309, no. 1, 25 April 2003 (2003-04-25), pages 152-165 (abstract).

(57) 1. Рекомбінантний химерний аденовірус або його варіант або похідне, який має геном, що містить ділянку E2B,

де вказана ділянка E2B містить нуклеотидну послідовність, яка має походження від першого аденовірусного серотипу, і нуклеотидну послідовність,

яка має походження від другого аденовірусного серотипу;

де вказані перший і другий серотипи кожний вибирають із підгруп аденовірусів B, C, D, E або F, і вони відрізняються один від одного; і де вказаний химерний аденовірус є онколітичним і проявляє підвищений терапевтичний індекс у пухлинній клітині.

2. Аденовірус за пунктом 1, який додатково містить ділянки, які кодують фібрилярні, гексонові й пентонові білки, де нуклеїнова кислота, яка кодує фібрилярні, гексонові й пентонові білки вказаного аденовірусу, отримана з того самого аденовірусного серотипу.

3. Аденовірус за пунктом 1, який додатково містить модифіковану ділянку E3.

4. Аденовірус за пунктом 1, який додатково містить модифіковану ділянку E4.

5. Аденовірус за пунктом 1, у якому вказана пухлинна клітина являє собою пухлинну клітину ободової кишки, молочної залози, підшлункової залози, легень, передміхурової залози, яєчника або пухлинну кровотворну клітину.

6. Аденовірус за пунктом 5, у якому вказана пухлинна клітина являє собою пухлинну клітину ободової кишки.

7. Аденовірус за пунктом 1, у якому нуклеотидна послідовність ділянки E2B вказаного аденовірусу містить SEQ ID NO: 3 або її частину.

8. Аденовірус за пунктом 1, у якому нуклеотидна послідовність вказаного аденовірусу містить SEQ ID NO: 1.

9. Рекомбінантний химерний аденовірус або його варіант або похідне, який має геном, що містить ділянку E2B,

де вказана ділянка E2B містить нуклеотидну послідовність, яка має походження від першого аденовірусного серотипу, і нуклеотидну послідовність, яка має походження від другого аденовірусного серотипу;

де вказані перший і другий аденовірусні серотипи кожний вибирають із підгруп аденовірусів B, C, D, E або F, і вони відрізняються один від одного;

(19) UA (11) 89957 (13) C2

а вказаний химерний аденовірус є онколітичним і проявляє підвищений терапевтичний індекс у пухлинній клітині; і

де вказаному химерному аденовірусу надавали недостатність реплікації шляхом видалення однієї або більше аденовірусних ділянок, які кодують білки, залучені в реплікацію аденовірусу, вибрані із групи, яка включає E1, E2, E3 або E4.

10. Аденовірус із недостатністю реплікації за пунктом 9, у якому ділянки E1 і E3 вилучені.

11. Аденовірус із недостатністю реплікації за пунктом 10, який додатково включає делецію ділянки E4.

12. Аденовірус за пунктом 1 або 9, який додатково містить гетерологічний ген, де вказаний гетерологічний ген експресується в клітині, інфікованій вказаним аденовірусом.

13. Аденовірус за пунктом 12, де вказаний гетерологічний ген являє собою тимідинкіназу.

14. Аденовірус за пунктом 12, де вказаний гетерологічний ген кодує терапевтичний білок, вибраний із групи, яка включає цитокіни й хемокіни, антитіла, ферменти, які перетворюють проліки, і імунорегуляторні білки.

15. Спосіб інгібування росту злоякісної клітини, який включає інфікування вказаної злоякісної клітини аденовірусом за пунктом 1.

16. Спосіб за пунктом 15, у якому вказана злоякісна клітина являє собою ракову клітину ободової кишки.

17. Спосіб за пунктом 16, у якому нуклеотидна послідовність вказаного аденовірусу містить SEQ ID NO: 1.

18. Спосіб доставки терапевтичного білка в клітину, який передбачає інфікування клітини аденовірусом за пунктом 14.

19. Спосіб виділення аденовірусу за пунктом 1, який передбачає

а) об'єднання аденовірусних серотипів, які представляють підгрупи аденовірусів B-F, у такий спосіб одержуючи суміш аденовірусів;

б) пасивування об'єднаної суміші аденовірусів зі стадії (а) в активно зростаючій культурі пухлинних клітин при співвідношенні частинок на клітину, достатньо великому для стимуляції рекомбінації між серотипами, але не настільки великому, щоб викликати передчасну загибель клітин;

в) збір супернатанту зі стадії (б);

г) інфікування спочиваючої культури пухлинних клітин супернатантом, зібраним на стадії (в);

д) збір супернатанту клітинної культури зі стадії (г) до появи будь-яких ознак CPE;

е) інфікування спочиваючої культури пухлинних клітин супернатантом, зібраним на стадії (д); і

є) виділення вірусу за пунктом 1 із супернатанту, зібраного на стадії (е), шляхом очищення бляшки.

20. Спосіб за пунктом 19, у якому стадію (б) здійснюють два рази перед збиранням супернатанту на стадії (в).

21. Спосіб за пунктом 19, у якому стадії (д) і (е) повторюють аж до 20 разів перед стадією (є).

22. Спосіб за пунктом 19, у якому другий цикл очищення бляшки здійснюють після етапу (є).

23. Спосіб за пунктом 19, у якому пухлинна клітина являє собою пухлинну клітину ободової кишки, молочної залози, підшлункової залози, легень, передміхурової залози, яєчника або пухлинну кровотворну клітину.

24. Рекombінантний химерний аденовірус або його варіант або похідне, який має геном, що містить ділянку E2B,

де вказана ділянка E2B містить нуклеотидну послідовність, яка має походження від першого аденовірусного серотипу, і нуклеотидну послідовність, яка має походження від другого аденовірусного серотипу;

де вказані перший і другий аденовірусні серотипи кожний вибирають із підгруп аденовірусів B, C, D, E або F, і вони відрізняються один від одного; і де вказаний химерний аденовірус є онколітичним і проявляє підвищений терапевтичний індекс у пухлинній клітині;

отриманий способом

а) об'єднання аденовірусних серотипів, які представляють підгрупи аденовірусів B-F, у такий спосіб одержуючи суміш аденовірусів;

б) пасивування об'єднаної суміші аденовірусів зі стадії (а) в активно зростаючій культурі пухлинних клітин при співвідношенні частинок на клітину, достатньо великому для стимуляції рекомбінації між серотипами, але не настільки великому, щоб викликати передчасну загибель клітин;

в) збору супернатанту зі стадії (б);

г) інфікування спочиваючої культури пухлинних клітин супернатантом, зібраним на стадії (в);

д) збору супернатанту клітинної культури зі стадії (г) до появи будь-яких ознак CPE;

е) інфікування спочиваючої культури пухлинних клітин супернатантом, зібраним на стадії (д); і

є) виділення вказаного химерного аденовірусу із супернатанту, зібраного на стадії (е), шляхом очищення бляшки.

25. Спосіб за пунктом 24, у якому стадію (б) здійснюють два рази перед збиранням супернатанту на стадії (в).

26. Спосіб за пунктом 24, у якому стадії (д) і (е) повторюють аж до 20 разів перед стадією (є).

27. Спосіб за пунктом 24, у якому другий цикл очищення бляшки здійснюють після етапу (є).

Даний винахід має пріоритет попередньої заявки на патент US 60/574,851, поданої 26 травня 2004 року, яка повністю включена в даний опис як посилання.

Винахід, описаний у даній заявці, у цілому стосується молекулярної біології, і, зокрема, онколі-

тичних аденовірусів, які мають терапевтичні застосування.

Злоякісні новоутворення є основною причиною смертності як у США, так і в інших країнах світу. Залежно від типу злоякісного новоутворення, для лікування звичайно застосовують хірургічні методи, хіміотерапію та/або променеву терапію. Часто

ці методи є неефективними й, отже, існує необхідність нових видів лікування, які можуть використовуватися окремо або в комбінації із класичними методами.

Одним з підходів є застосування аденовірусів, окремо або як векторів, здатних доставляти протираккові терапевтичні білки до пухлинних клітин. Аденовіруси являють собою безоболонкові ікосаедричні віруси із дволанцюговою молекулою ДНК, лінійний геном яких містить близько 36 тис. пар основ. На кожному кінці вірусного геному присутня коротка послідовність, відома як інвертований кінцевий повтор (або ITR), яка необхідна для реплікації вірусу. Геноми всіх аденовірусів людини, досліджених дотепер, мають однакову загальну організацію; тобто гени, які кодують специфічні функції, розташовані в тому самому положенні вірусного геному. Вірусний геном містить п'ять ранніх одиниць транскрипції (E1A, E1B, E2, E3 і E4), дві відстрочені-ранні одиниці (IX і Iva2), і одну пізню одиницю (головну пізню), що приводить до утворення п'яти сімейств пізніх мРНК (L1-L5). Білки, кодовані ранніми генами, залучені в реплікацію, тоді як пізні гени кодують вірусні структурні білки. Частини вірусного геному легко можуть бути заміщені за допомогою ДНК чужорідного походження й такі рекомбінантні аденовіруси є структурно стабільними, а властивості, які набуваються такими вірусами, потенційно роблять їх придатними для генної терапії (див. Jolly, D. (1994) *Cancer Gene Therapy* 1: 51-64).

У даний час спроби дослідників одержати аденовіруси, придатні для лікування, зосереджені на серотипі аденовірусу Ad5. Генетика цього аденовірусу людини добре вивчена, також описані системи для його молекулярної маніпуляції. Для підтримання клінічного застосування розроблені високоефективні способи одержання й доступні деякі дослідні використання цього агента в клініці. Див., Jolly, D. (1994) *Cancer Gene Therapy*, 1: 51-64. Дослідження, які стосуються застосування аденовірусів людини (Ad) для лікування злоякісного новоутворення, сконцентровані на розробці аденовірусів на основі Ad5, які є особливо ефективними в, або переважно націлені на, специфічні типи пухлинних клітин і існує потреба одержання більш ефективних онколітичних вірусів, для того, щоб лікування за допомогою аденовірусів знайшло практичне застосування в клінічних умовах.

Ad5 є тільки одним з 51 відомих зараз аденовірусних серотипів, які поділяються на підгрупи A-F на основі різних характерних ознак, включаючи їх гемаглютуючі властивості ((див., Shenk, "Adenoviridae: The Viruses and Their Replication," в *Fields Virology*, том 2, 4-е видання, Knipe, ea., Lippincott, Williams & Wilkins, стор.2265-2267 (2001)). Ці серотипи відрізняються на різних рівнях, наприклад, патологією, яку вони викликають в людей і гризунів, клітинними рецепторами, використовуваними для прикріплення, але ці відмінності в значній мірі ігноруються як ефективні засоби розвитку більш сильнодіючих онколітичних аденовірусів (за винятком змін волокон, див. Stevenson і ін. (1997) *J.Virol.* 71: 4782-4790; Krasnykh і ін. (1996) *J. Virol.* 70: 6839-6846; Wickham і ін. (1997)

J.Virol. 71: 8221-8229; Legrand і ін. (2002) *Curr. Gene Ther.* 2: 323-329; Bamett і ін. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* 1-3: 1-14; заявка на патент US 2003/0017138).

Використання відмінностей між серотипами аденовірусів може забезпечувати джерело більш ефективних лікарських засобів на основі аденовірусів при використанні нових аденовірусів з підвищеною селективністю й активністю. Існує потреба в такому поліпшеному лікуванні на основі аденовірусів.

Даний винахід забезпечує нові химерні аденовіруси або їх варіанти або похідні, придатні для лікування з використанням вірусів. Зокрема, винахід забезпечує химерні аденовіруси або їх варіанти або похідні, які мають геном, що містить ділянку E2B,

де вказана ділянка E2B містить нуклеотидну послідовність, яка має походження від першого аденовірусного серотипу, і нуклеотидну послідовність, яка має походження від другого аденовірусного серотипу;

де вказані перший і другий аденовірусні серотипи кожний вибирають із підгруп аденовірусів B, C, D, E, або F і відрізняються один від одного; і

де вказаний химерний аденовірус є онколітичним і проявляє підвищений терапевтичний індекс у пухлинній клітині.

В одному варіанті здійснення винаходу, химерний аденовірус додатково містить ділянки, які кодують фібрилярні, гексонові й пентонові білки, де нуклеїнові кислоти, які кодують вказані білки, усі отримані з одного й того аденовірусного серотипу. В іншому варіанті здійснення винаходу, химерний аденовірус за винаходом містить модифіковану ділянку E3 або E4.

В іншому варіанті здійснення винаходу, химерний аденовірус проявляє підвищений терапевтичний індекс у пухлинних клітинах ободової кишки, молочної залози, підшлункової залози, легень, передміхурової залози, яєчника або пухлинних кровотворних клітин. У більш переважному варіанті здійснення винаходу, химерний аденовірус проявляє підвищений терапевтичний індекс у пухлинних клітинах ободової кишки.

У переважному варіанті здійснення винаходу, ділянка E2B химерного аденовірусу містить SEQ ID NO: 3. У більш переважному варіанті здійснення винаходу, химерний аденовірус містить SEQ ID NO: 1.

Даний винахід забезпечує рекомбінантний химерний аденовірус або його варіант або похідне, що має геном, що містить ділянку E2B

де вказана ділянка E2B містить нуклеотидну послідовність, які мають походження від першого аденовірусного серотипу, і другу нуклеотидну послідовність, яка має походження від другого аденовірусного серотипу;

де вказані перший і другий аденовірусні серотипи кожний вибирають із підгруп аденовірусів B, C, D, E, або F і відрізняються один від одного;

а вказаний химерний аденовірус є онколітичним і проявляє підвищений терапевтичний індекс у пухлинній клітині; і

де вказаному химерному аденовірусу надавали недостатність реплікації шляхом видалення однієї або більше аденовірусних ділянок, які кодуєть білки, залучені в реплікацію аденовірусу, вибрані із групи, які включає E1, E2, E3 або E4.

В одному варіанті здійснення винаходу, химерний аденовірус за винаходом додатково містить гетерологічний ген, який кодує терапевтичний білок, де вказаний гетерологічний ген експресується в клітині, інфікованій вказаним аденовірусом. У переважному варіанті здійснення винаходу, терапевтичний білок вибирають із групи, які включає цитокіни й хемокіни, антитіла, ферменти, які перетворюють проліки, і імунорегуляторні білки.

Даний винахід забезпечує способи застосування химерних аденовірусів за винаходом для терапевтичних цілей. В одному варіанті здійснення винаходу, химерні аденовіруси можуть застосовуватися для інгібування росту злоякісних клітин. У переважному варіанті здійснення винаходу, химерний аденовірус, який містить SEQ ID NO: 1, придатний для інгібування росту злоякісних клітин ободової кишки.

В іншому варіанті здійснення винаходу, аденовіруси за винаходом придатні як вектори для доставки терапевтичних білків у клітини.

Даний винахід забезпечує спосіб одержання химерних аденовірусів за винаходом, який передбачає

а) об'єднання аденовірусних серотипів, які представляють підгрупи аденовірусів B-F, у такий спосіб одержуючи суміш аденовірусів;

б) пасивування об'єднаної суміші аденовірусів зі стадії (а) в активно зростаючій культурі пухлинних клітин при співвідношенні частинок на клітину, достатньо великому для стимуляції рекомбінації між серотипами, але не настільки великому, щоб викликати передчасну загибель клітин;

в) збір супернатанту зі стадії (б);

г) інфікування спочиваючої культури пухлинних клітин супернатантом, зібраним на стадії (в);

д) збір супернатанту клітинної культури зі стадії (г) до появи будь-яких ознак CPE; е) інфікування спочиваючої культури пухлинних клітин супернатантом, зібраним на стадії (д); і

е) виділення химерного аденовірусу із супернатанту, зібраного на стадії (е), шляхом очищення бляшки.

Фіг.1. Профілі часу утримання Ad на ВЕРХ-колонці ТМАЕ. А) Профілі утримання для окремих серотипів Ad, використовуваних для одержання оригінального вихідного вірусного пула. Б) Профілі утримання пулів 20 пасажу, які мають походження від клітинних ліній HT-29, Рапс-1, MDA-231 і PC-3, відповідно.

Фіг.2. Цитолітична активність окремих вірусних пулів. А) HT-29, Б) MDA-231, В) Рапс-1 і Г) PC-3 клітини інфікували їх відповідними вірусними пулами при VP на співвідношення клітин від 100 до 0,01. У різні дні після інфікування проводили MTS-дослідження (як вказано), залежно від клітинної лінії. Кожна точка даних на панелі являє собою дослідження, здійснене в чотирьох повторях, результати виражали у вигляді середніх значень \pm СВ. На панелі наведений один характерний приклад і всі вірусні пули досліджували принаймні три незалежних рази на цільовій клітинній пухлинній лінії. (Позначення на фігурі: —●— Ad5; —□— вихідний вірусний пул; —■— пул, який має походження від специфічних клітин, пасаж 20).

Фіг.3. Цитолітична активність ColoAd1 і Ad5 на клітинних лініях пухлин людини. MTS-аналіз здійснювали на А) широкої панелі клітинних ліній пухлин людини й Б) на панелі клітинних ліній раку ободової кишки людини для визначення можливої специфічної активності. MTS-аналіз здійснювали в різні дні залежно від клітинної лінії. Кожна панель представляє собою типовий експеримент, який повторювали принаймні три рази. Кожна точка даних на панелі являє собою дослідження, здійснене в чотирьох повторях, результати виражали у вигляді середніх значень \pm СВ (Позначення на фігурі: —●— Ad5; —□— ColoAd1).

Фіг.4. Цитолітична активність ColoAd1 і Ad5 на панелі нормальних клітин. Клітини HS-27, HUVEC і SAEC (первинні фібробласти, ендотеліальні й епітеліальні клітини, відповідно) інфікували ColoAd1 і Ad5 при VP на співвідношення клітин від 100 до 0,01. MTS-аналіз здійснювали в різні дні залежно від клітини й кожна панель представляє собою типовий експеримент, який повторювали принаймні три рази. Кожна точка даних на панелі являє собою дослідження, здійснене в чотирьох повторях, результати виражали у вигляді середніх значень \pm СВ (Позначення на фігурі: —●— Ad5; —□— ColoAd1).

Фіг.5. Цитолітична активність ColoAd1, Ad5 і ONYX-015 на первинних нормальних ендотеліальних клітинах (HUVEC) і клітинній лінії пухлини ободової кишки (HT-29). Кожна панель представляє собою типовий експеримент, який повторювали принаймні три рази. Кожна точка даних на панелі являє собою дослідження, здійснене в чотирьох повторях, результати виражали у вигляді середніх значень \pm СВ (Позначення на фігурі: —●— Ad5; —□— ColoAd1; —■— Onyx-015).

Фіг.6. Цитолітична активність ColoAd1, Ad11p і Ad5 на нормальній епітеліальній клітинній лінії (SAEC) і клітинній лінії раку ободової кишки людини (HT-29). Кожна панель представляє собою типовий експеримент, який повторювали принаймні три рази. Кожна точка даних на панелі являє собою дослідження, здійснене в чотирьох повторях, результати виражали у вигляді середніх значень \pm СВ (Позначення на фігурі: —●— Ad5; —□— Ad11p; —■— ColoAd1).

Фіг.7. Цитолітична активність рекомбінантних вірусів. Конструювали рекомбінантні віруси, які представляють чотири вірусні популяції (Adp11, ColoAd1, лівий кінець Ad11p/правий кінець ColoAd1 (ColoAd1.1) і лівий кінець ColoAd1/правий кінець Ad11p (ColoAd1.2)), як описано в прикладі 6. Визначали цитолітичну активність кожної популяції в HT29 клітинах, як було описано раніше. (Позначення на фігурі: —●— Ad5; —□— Ad11p; —■— ColoAd1; —▤— ColoAd1.1; —▲— ColoAd1.2).

Всі публікації, включаючи патенти й патентні заявки, згадані в даному описі, включені в даний винахід як посилання в такому обсязі, якби кожна

окрема публікація була специфічно й окремо повністю включена як посилання.

Визначення

Якщо спеціально не вказано інакше, то всі технічні й наукові терміни, використовувані в даному винаході, мають такі ж значення, що звичайно мають на увазі середнім фахівцем в галузі техніки, до якої належить даний винахід. Як правило, номенклатура, використовувана в даному винаході, і лабораторні методики, описані нижче, є добре відомими й звичайно використовуваними в даній галузі.

Як використовується в даному винаході, термін "аденовірус", "серотип" або "аденовірусний серотип" стосується кожного з 51 аденовірусних серотипів людини, відомих у цей час або виділених у майбутньому. Див., наприклад, Strauss, "Adenovirus infections in humans," в The Adenoviruses, Ginsberg, ea., Plenum Press, Нью-Йорк, NY, сс.451-596 (1984). Ці серотипи класифікують на підгрупи A-F (див., Shenk, "Adenoviridae: The Viruses and Their Replication," в Fields Virology, том 2, 4-ої видання, Knipe, ea., Lippincott Williams & Wilkins, стор.2265-2267 (2001), як показано в таблиці.

Таблиця

Підгрупа	Аденовірусний серотип
A	12, 18, 31
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 51
C	1, 2, 5, 6
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 50
E	4
F	40, 41

Як використовується в даному винаході, "хиמרний аденовірус" стосується аденовірусу, нуклеотидна послідовність якого містить нуклеотидні послідовності принаймні двох аденовірусних серотипів, описаних вище.

Як використовується в даному винаході, "батьківський аденовірусний серотип" стосується аденовірусного серотипу, який представляє собою серотип, з якого має походження більшість геному химерного аденовірусу.

Як використовується в даному винаході, термін "гомологічна рекомбінація" стосується двох молекул нуклеїнової кислоти, кожна з яких має гомологічні послідовності, де дві молекули нуклеїнової кислоти піддаються кросинговеру або рекомбінації в ділянці гомології.

Як використовується в даному винаході, термін "ефективність" стосується літичного потенціалу вірусу й характеризує його здатність до реплікації, лізису й поширенню. Для цілей даного винаходу, ефективність являє собою величину, за допомогою якої порівнюється цитолітична активність даного аденовірусу за винаходом з такою Ad5 в аналогічній клітинній лінії, тобто ефективність = $IC_{50}Ad/IC_{50}Ad5$, де X являє собою певний аденовірусний серотип, який піддається дослідженню, і де для ефективності Ad5 заданим значенням є 1.

Як використовується в даному винаході, термін "онколітичний вірус" стосується вірусу, який переважно вбиває ракові клітини в порівнянні з нормальними клітинами.

Як використовується в даному винаході, термін "терапевтичний індекс" або "терапевтичне вікно" стосується числа, яке вказує онколітичний потенціал даного аденовірусу, і визначається шляхом ділення ефективності аденовірусу в лінії ракових клітин на ефективність того ж самого аденовірусу у звичайній (тобто не злоякісній) клітинній лінії.

Як використовується в даному винаході, термін "модифікована" стосується молекули нуклеотидної або амінокислотної послідовності, які відрізняються від нуклеотидної або амінокислотної послідовності, яка зустрічається в природних умовах, наприклад, дикого типу. Модифікована молекула може зберігати функцію або активність молекули дикого типу, тобто модифікований аденовірус може зберігати свою онколітичну активність. Модифікації включають мутації нуклеїнових кислот, як описано нижче.

Як використовується в даному винаході, "мутація" стосовно полінуклеотиду або поліпептиду, стосується природної, синтетичної, рекомбінантної або хімічної зміни або відмінності первинної, вторинної або третинної структури полінуклеотиду або поліпептиду, у порівнянні з полінуклеотидом або поліпептидом відповідно, з яким проводять порівняння (наприклад, у порівнянні з полінуклеотидом або поліпептидом дикого типу). Мутації включають такі зміни, як, наприклад, делеції, вставки або заміни. Полінуклеотиди й поліпептиди, які мають такі мутації, можуть бути виділені або отримані за допомогою способів, добре відомих у даній галузі.

Як використовується в даному винаході, "делеція" визначається як зміна в полінуклеотидних або в амінокислотних послідовностях, при якому один або декілька полінуклеотидів або амінокислотних залишків, відповідно, відсутні.

Як використовується в даному винаході, "інсерція" або "додавання" являє собою таку зміну в полінуклеотидній або в амінокислотній послідовності, яка приводить до додавання одного або декількох полінуклеотидів або амінокислотних залишків, відповідно, у порівнянні із полінуклеотидною або амінокислотою послідовністю, яка зустрічається в природних умовах.

Як використовується в даному винаході, "заміна" є наслідком заміни одного(ой) або декількох полінуклеотидів або амінокислот іншими полінуклеотидами або амінокислотами, відповідно.

Як використовується в даному винаході, термін "похідне аденовірусу" стосується аденовірусу за винаходом, який модифікований таким чином, що здійснено додавання, делеція або заміна до або у вірусному геномі, при цьому отримане похідне аденовірусу проявляє ефективність і/або терапевтичний індекс, що перевищує такий у батьківського аденовірусу, або в інших аспектах є більш терапевтично придатним (тобто менший імуногенний, з поліпшеним профілем виведення). Наприклад, похідне аденовірусу за винаходом може ма-

ти делецію в одному з ранніх генів вірусного геному, включаючи, але не обмежуючись тільки ними, ділянка E1A або E2B вірусного геному.

Як використовується в даному винаході, "варіант" стосовно полінуклеотиду або поліпептиду, стосується полінуклеотиду або поліпептиду, які можуть відрізнятися за первинною, вторинною або третинною структурою, у порівнянні з полінуклеотидом або поліпептидом відповідно, з яким проводять порівняння (наприклад, у порівнянні з полінуклеотидом або поліпептидом дикого типу). Наприклад, амінокислотна або нуклеотидна послідовність може містити мутацію або модифікацію, що відрізняється від амінокислотної або нуклеотидної послідовності, з якою проводять порівняння. У деяких варіантах здійснення винаходу аденовірусний варіант може відрізнятися ізоформою або поліморфізмом. Варіанти можуть являти собою природні, синтетичні, рекомбінантні або хімічно модифіковані полінуклеотиди або поліпептиди, виділені або отримані за допомогою способів, відомих у даній галузі. Зміни у варіантах полінуклеотидної послідовності можуть бути мовчазними. Це відбувається в тому випадку, якщо вони не змінюють амінокислотну послідовність, яка кодується полінуклеотидом. Якщо варіації обмежені мовчазними змінами цього типу, то такий варіант буде кодувати поліпептид, який має амінокислотну послідовність, ідентичну до послідовності, з якою проводять порівняння. Альтернативно, такі зміни в полінуклеотидній послідовності варіанта можуть змінювати амінокислотну послідовність поліпептиду, який кодується полінуклеотидом, з яким проводять порівняння, що приводить до консервативних або неконсервативних змін амінокислот, як описано нижче. Такі зміни в полінуклеотиді можуть приводити до амінокислотних заміни, додавань, делецій, злиття і усикання амінокислот у поліпептиді, який кодується послідовністю, з якою проводять порівняння. Для оптимізації клонування в плазміді і або вірусному векторі або експресування в конкретній прокариотичній або еукаріотичній системі можуть здійснюватися різні зміни кодонів, такі як, мовчазні зміни, які утворюють різні рестрикційні ділянки.

Як використовується в даному винаході, "аденовірусний варіант" стосується аденовірусу, полінуклеотидна послідовність якого відрізняється від полінуклеотиду, з яким проводять порівняння, наприклад, аденовірусу дикого типу, як описано вище. Відмінності можуть бути обмежені таким чином, що батьківська полінуклеотидна послідовність і полінуклеотидна послідовність варіанта є в цілому подібними й, у більшості ділянок, ідентичними. Як використовується в даному винаході, перша нуклеотидна або амінокислотна послідовність є подібною до другої послідовності, якщо при порівнянні двох послідовностей виявлено, що вони можуть мати декілька відмінностей у послідовності (тобто перша й друга послідовності є практично ідентичними). Як використовується в даному винаході, розходження полінуклеотидної послідовності в аденовірусного варіанта й аденовірусу, з яким проводять порівняння, не приводять

до відмінностей в ефективності та/або терапевтичному індексі.

Як використовується в даному винаході, термін "консервативний" стосується заміни амінокислотного залишку на інший амінокислотний залишок, що має подібні хімічні властивості. Консервативні амінокислотні заміни включають заміну лейцину на ізолейцин або валін, аспартату на глутамат, або треоніну на серин. Вставки або делеції звичайно перебувають у діапазоні приблизно 1-5 амінокислот.

Як використовується в даному винаході, термін "неконсервативний" стосується заміни амінокислотного залишку на інший амінокислотний залишок, який має інші хімічні властивості. Неконсервативні заміни включають, але не обмежуючись тільки ними, заміну аспарагінової кислоти (D) на гліцин (G); аспарагіну (N) на лізин (K); або аланіна (A) на аргінін (R).

Однобуквенний код для амінокислотних залишків включає наступні позначення: A= аланін, R= аргінін, N= аспарагін, D= аспарагінова кислота, C= цистеїн, Q= глутамін, E= глутамінова кислота, G= гліцин, H= гістидин, I= ізолейцин, L= лейцин, K= лізин, M= метіонін, F= фенілаланін, P= пролін, S= серин, T= треонін, W= триптофан, Y= тирозин, V= валін.

Варто взяти до уваги, що поліпептиди часто містять амінокислоти, які відрізняються від тих 20-ти амінокислот, які звичайно позначають як 20 амінокислот, які зустрічаються в природних умовах, і що в даному поліпептиді багато амінокислот, включаючи кінцеві амінокислоти, можуть бути модифіковані або в результаті здійснення природних процесів, таких як глікозилювання й інші посттрансляційні модифікації, або за допомогою методик хімічної модифікації, які добре відомі в даній галузі техніки. Навіть загальновідомих модифікацій, які відбуваються в поліпептидах, що зустрічаються в природних умовах, дуже багато, і перелічити їх тут повністю неможливо, але вони докладно описані в основних посібниках і більш докладних монографіях, а також у великій дослідницькій літературі, і вони добре відомі фахівцям в даній галузі. Серед відомих модифікацій, які можуть бути присутні у поліпептидах згідно із даним винаходом, можна згадати, але тільки як ілюстрація, ацетилювання, ацилювання, АДФ-рибозилювання, амідування, ковалентне приєднання флавіну, ковалентне приєднання молекули гему, ковалентне приєднання полінуклеотиду або похідного полінуклеотиду, ковалентне приєднання ліпиду або похідного ліпиду, ковалентне приєднання фосфотидилінозитолу, поперечне зшивання, циклізація, утворення дисульфідного зв'язку, деметилювання, утворення ковалентних поперечних зв'язків, утворення цистину, утворення піроглутамату, форматування, гамма-карбоксилювання, гліцирування, глікозилювання, утворення GPI-якоря, гідроксилювання, йодування, метилювання, міристоїлювання, окислення, протектична обробка, фосфорилування, пренілювання, рацемізація, селеноїлювання, сульфатування, опосередковане tPHK додавання амінокислот до білків, таке як аргінінування й убіквітинізація.

Такі модифікації добре відомі фахівцям в даній галузі й дуже докладно описані в науковій літературі. Деякі переважні поширені модифікації, глікозилювання, приєднання ліпідів, сульфатування, гамма-карбоксилювання залишків глютамінової кислоти, гідроксилювання й АДФ-рибозилювання, описані, наприклад, у більшості основних посібників, таких як, наприклад, I. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, 2-е вид., W.H. Freeman & Company, Нью-Йорк, 1993. По даному питанню доступні різні докладні огляди, такі як, наприклад, підготовлені Wold, F., в *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, по ред. B. C. Johnson, Academic Press, New York, стор.1-12, 1983; Seifter і ін., *Meth. Enzymol.* 182: 626-646, 1990 і Rattan і ін., *Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48-62, 1992.

Також варто взяти до уваги, як добре відомо й описано вище, що поліпептиди не заведи є повністю лінійними. Наприклад, поліпептиди можуть бути розгалуженими внаслідок убіквітинізації, і вони можуть бути кільцевими з розгалуженнями або без них, звичайно внаслідок пострасляційних впливів, включаючи впливи, які зустрічаються в природних умовах, і впливи, здійснювані людьми, які не відбуваються в природних умовах. Кільцеві, розгалужені й розгалужені кільцеві поліпептиди можуть бути синтезовані за допомогою нетрансляційних природних процесів, а також за допомогою повністю синтетичних способів.

Модифікації можуть здійснюватися в будь-якій ділянці поліпептиду, включаючи скелет пептиду, бокові ланцюги амінокислот і аміно- або карбоксильні кінцеві ділянки. У дійсності найбільш частими модифікаціями, які звичайно зустрічаються в природних умовах або при синтезі поліпептидів, є блокування аміногрупи або карбоксильної групи поліпептиду, або обох цих груп шляхом ковалентної модифікації, і такі модифікації можуть бути присутнім у поліпептидах згідно із даним винаходом. Наприклад, амінокінцевий залишок поліпептидів, отриманих з *E. coli*, перед протеолітичною обробкою практично завжди являють собою N-формілметіонін.

Модифікації, які відбуваються в поліпептиді, дуже часто будуть залежати від того, яким чином він був отриманий. Для поліпептидів, одержуваних шляхом експресування клонованого гена в організмі-хазяїні, наприклад, природа й ступінь модифікацій в основному буде визначатися здатністю клітини хазяїна до пострасляційних модифікацій і модифікацій сигнальної послідовності, яка міститься в амінокислотній послідовності поліпептиду. Наприклад, добре відомо, що в бактеріальних клітинах-хазяїнах, таких як *E. coli*, глікозилювання дуже часто не здійснюється. Отже, якщо бажано одержати глікозилований поліпептид, то такий поліпептид необхідно експресувати у хазяїн і, здатному здійснювати глікозилювання, звичайно в еукаріотичній клітині. Клітини комах дуже часто забезпечують таке ж пострасляційне глікозилювання, як і клітини ссавців, тому, зокрема, для ефективної експресії білків ссавців, що мають природні схеми глікозилювання, розвиваються експресійні системи на основі клітин комах. Аналогічні міркування застосовуються й для інших модифікацій.

Також варто взяти до уваги, що аналогічний тип модифікацій може мати місце в однаковому або різному ступені у декількох сайтах даного поліпептиду. Також даний поліпептид може містити модифікації різних типів.

Як використовується в даному винаході, для опису співвідношень послідовностей між двома або більше полінуклеотидними або амінокислотними послідовностями використовують наступні терміни: "послідовність, з якою проводять порівняння", "вікно порівняння", "ідентичність послідовностей", "відсоток ідентичності послідовностей", "практично ідентична", "подібність" і "гомологічність". Під "послідовністю, з якою проводять порівняння", розуміють послідовність, використовувану як основу для порівнюваної послідовності; послідовність, з якою проводять порівняння, може являти собою підмножину більш довгої послідовності, наприклад, сегмент повнорозмірної кДНК або послідовності гена, наведених у переліку послідовностей, або вона може включати повну кДНК або послідовність гена. Як правило, послідовність, з якою проводять порівняння, містить принаймні 18 нуклеотидів або 6 амінокислот, часто принаймні 24 нуклеотиди або 8 амінокислот, більш переважно 48 нуклеотидів або 16 амінокислот. Оскільки кожна із двох полінуклеотидних або амінокислотних послідовностей містить (1) послідовність (тобто частину повної полінуклеотидної або амінокислотної послідовності), яка є подібною для двох молекул, і (2) може містити додаткову послідовність, яка відрізняється у двох полінуклеотидних або амінокислотних послідовностей, то порівняння послідовностей двох (або більше) молекул звичайно здійснюють шляхом порівняння послідовностей двох молекул в "вікні порівняння", ідентифікуючи й порівнюючи локальні ділянки подібних послідовностей. Термін "вікно порівняння", як він використовується в даному описі, стосується абстрактного сегмента, який включає принаймні 18 суміжних нуклеотидів або 6 амінокислот, де полінуклеотидна послідовність або амінокислотна послідовність може бути порівняна з послідовністю, з якою проводять порівняння, що складається принаймні з 18 суміжних нуклеотидів або 6 амінокислот, і де ділянка полінуклеотидної послідовності у вікні порівняння може включати 20% або менше вставок, делецій, замін і т.п. (тобто проломів), відносно послідовності, з якою проводять порівняння (яка не має вставок або делецій) для оптимального суміщення двох послідовностей. Оптимальне суміщення послідовностей для суміщення вікна порівняння можна здійснювати, наприклад, за допомогою алгоритму локальної гомології Smith і Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), за допомогою алгоритму збігу гомологи Needleman і Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), за допомогою методу пошуку подібності Pearson і Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85:2444 (1988), за допомогою комп'ютерних реалізацій цих алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA і TFASTA, що входять у пакет програм Wisconsin Genetics, версія 7,0, (Genetics

Computer Group, 575 Science Dr., Медисон, Вісконсин), VectorNTI від Informatix, Geneworks, або програмного забезпечення MacVector), або шляхом перевірки, і вибирають найбільш переважне суміщення (тобто, що дає в результаті найвищий відсоток гомології у вікні порівняння), отримане при здійсненні різних способів.

Як використовується в даному винаході, термін "ідентичність послідовностей" означає, що дві полінуклеотидні або амінокислотні послідовності є ідентичними (тобто за своїми послідовно розташованим нуклеотидам або амінокислотним залишкам) у вікні порівняння. "Відсоток ідентичності послідовностей" розраховують шляхом порівняння двох оптимально суміщених послідовностей у вікні порівняння, визначаючи кількість положень, у яких ідентичні основи нуклеїнових кислот (наприклад, А, Т, С, G, U або I) або амінокислотні залишки зустрічаються в обох послідовностях, у результаті чого одержують кількість співпадаючих положень, ділення кількості положень, що збіглися, на загальну кількість положень у вікні порівняння (тобто на розмір вікна), і множення результату на 100 для одержання відсотка ідентичності послідовностей. Термін "практично ідентична", як він використовується в даному винаході, стосується характеристики полінуклеотидної або амінокислотної послідовності й означає, що полінуклеотидна або амінокислотна послідовність має послідовність, яка принаймні на 85%, переважно принаймні на 90-95%, більш переважно принаймні на 99% ідентична до послідовності, з якою проводять порівняння, у вікні порівняння, що включає принаймні 18 положень нуклеотидів (6 амінокислот), часто у вікні порівняння, що включає принаймні 24-48 положень нуклеотидів (8-16 амінокислот), де відсоток ідентичності послідовностей розраховують шляхом порівняння послідовності, з якою проводять порівняння, з послідовністю, яка може включати делеції або вставки, що становлять у цілому 20% або менше послідовності, з якою проводять порівняння, у вікні порівняння. Послідовність, з якою проводять порівняння, може являти собою підмножину більш довгої послідовності. Термін "подібність", коли він застосовується для позначення поліпептиду, визначається шляхом порівняння амінокислотної послідовності й консервативних амінокислотних замін одного поліпептиду з послідовністю другого поліпептиду. Термін "гомологічний", коли він використовується для опису полінуклеотиду, вказує на те, що дві полінуклеотиди або їх позначені послідовності при оптимальному збігу й порівнянні є ідентичними з відповідними вставками або делеціями нуклеотидів принаймні для 70% нуклеотидів, звичайно приблизно для 75%-99% і найбільше переважно принаймні для 98-99% нуклеотидів.

Як використовується в даному винаході, "гомологічний", коли він використовується для опису полінуклеотиду, вказує на те, що два полінуклеотиди або їх позначені послідовності при оптимальному збігу й порівнянні є ідентичними з відповідними вставками або делеціями нуклеотидів принаймні для 70% нуклеотидів, звичайно прибли-

зно для 75%-99% і найбільш переважно принаймні для 98-99% нуклеотидів.

Як використовується в даному винаході, "полімеразна ланцюгова реакція" або "ПЛР" стосується методики ампліфікації специфічних ділянок ДНК, як описано в патенті US 4,683,195. Як правило, необхідна наявність інформації про кінцеві послідовності фрагмента поліпептиду, що представляє інтерес, або про послідовності, розташовані далі, з використанням таких відомостей можуть бути створені олігонуклеотидні праймери; потім ці праймери направляють друг до друга й ампліфікують ідентичні або подібні послідовності в протилежних ланцюгах матриці. 5'-Кінцеві нуклеотиди двох праймерів сполучають із кінцями ампліфікованої речовини. ПЛР може використовуватися для ампліфікації специфічних послідовностей ДНК із загальної геномної ДНК, кДНК, транскрибованої із загальної клітинної РНК, плазмідних послідовностей і т.д. (більш докладно див. Mullis і ін., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263, 1987; під ред. Erlich, PCR Technology, Stockton Press, Нью-Йорк, 1989).

Як використовується в даному винаході, "строгість" звичайно спостерігається в інтервалі приблизно від $T_{пл}$ (температура плавлення) $-5^{\circ}C$ ($5^{\circ}C$ нижче $T_{пл}$ зонда) приблизно до $20^{\circ}C$ - $25^{\circ}C$ нижче $T_{м}$. Як очевидно для фахівця в даній галузі, строга гібридизація може застосовуватися для ідентифікації або визначення ідентичних полінуклеотидних послідовностей або для ідентифікації або визначення подібних або споріднених полінуклеотидних послідовностей. Як використовується в даному винаході, термін "строгі умови" означає, що гібридизація відбувається тільки при наявності принаймні 95% і переважно принаймні 97% ідентичності між послідовностями.

Як використовується в даному винаході, термін "гібридизація", як він використовується в даному винаході, включає "будь-який процес, за допомогою якого полінуклеотидний ланцюг з'єднується з комплементарним ланцюгом шляхом спарювання основ" (Coombs, J., Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, Нью-Йорк, N.Y., 1994).

Як використовується в даному винаході, "терапевтично ефективна доза" або "ефективна кількість" стосується кількості аденовірусу, яка зменшує інтенсивність симптомів або полегшує хворобливий стан. Доза є терапевтично ефективною дозою для лікування раку або його метастаз, якщо ріст пухлини або метастаз уповільнюється або зупиняється, або якщо виявляється зменшення розміру пухлини або метастаз, що приводить до збільшення тривалості життя суб'єкта.

Аденовіруси за винаходом

Даний винахід забезпечує химерні аденовіруси або їх варіанти або похідні, які мають геном, у якому нуклеотидна послідовність ділянки E2B химерного аденовірусу містить нуклеотидну послідовність, яка має походження від принаймні двох аденовірусних серотипів, кожний з яких вибирають із підгруп аденовірусів В, С, D, Е і F і відрізняються один від одного. Химерний аденовірус за винаходом є онколітичним і проявляє підвищений терапевтичний індекс у пухлинній клітині.

Виділення химерних аденовірусів

Химерні аденовіруси за винаходом або їх варіанти або похідні можуть бути отримані за допомогою модифікації методики, на яку тут посиляються як "біоселекція", відповідно до якої аденовірус із необхідними властивостями, такими як збільшена онкогенність або специфічність до типу клітин, одержують шляхом застосування генетичної селекції в контрольованих умовах (Yan і ін. (2003) *J. Virol.* 77: 2640-2650).

У даному винаході, суміш аденовірусів різних серотипів об'єднують і пасивують, переважно принаймні два рази, у субконфлюентній культурі пухлинних клітин при співвідношенні частинок на клітину, достатньо великому для стимуляції рекомбінації між серотипами, але не настільки великому, щоб викликати передчасну загибель клітин. Переважно співвідношення частинок на клітину становить приблизно 500 частинок на клітину й легко може бути визначено фахівцем у даній галузі. Як використовується в даному винаході, "субконфлюентна культура" клітин стосується моношарової або суспензійної культури, у якій клітини активно ростуть. Для росту клітин у вигляді моношару, прикладом може бути культура, у якій близько 50%-80% площі, доступної для росту клітин, покрито клітинами. Переважною є культура, у якій близько 75% ростової площі покрито клітинами.

У переважному варіанті здійснення винаходу, сумішню аденовірусів є суміш, яка включає аденовірусні серотипи, що представляють аденовірусні підгрупи В, С, D, Е і F. Група аденовірусів А не включена в суміш, тому що вони зв'язані з утворенням пухлин у гризунів. Переважними лініями пухлинних клітин, придатними для біоселекції, є, але не обмежуючись тільки ними, ті, які мають походження від молочної залози, ободової кишки, підшлункової залози, легені й передміхурової залози. Деякими прикладами клітинних ліній солідних пухлин, придатних для "біоселективного" пасивування суміші аденовірусів включають, але не обмежуючись тільки ними, клітини MDA231, HT29, PAN-1 і PC-3. Гемопоетичні клітинні лінії включають, але не обмежуючись тільки ними, В-лімфоїдні клітини Raji і Daudi, еритробластоїдні клітини K562, мієлоєдні клітини U937 і Т-лімфоїдні клітини HSB2.

Аденовіруси, одержувані при таких вихідних пасажах, використовують для інфікування спочиваючих пухлинних клітин при співвідношенні частинок на клітину, нижче необхідного для можливості інфікування клітини, але не більше ніж один аденовірус. Після здійснення аж до 20 пасажів у цих умовах, супернатант із останнього пасажу збирають до видимої цитопатичної дії (CPE, див. Fields *Virology*, том 2, четверте вид., Knipe, et al., Lippincott Williams & Wilkins, стор.135-136) для підвищення селекції сильнодіючих вірусів. Зібраний супернатант може бути концентрований за допомогою методик, добре відомих фахівцям у даній галузі. Переважним способом одержання спочиваючих клітин, тобто таких, у яких зупинений активний ріст клітин, у моношаровій культурі є надання можливості культурі рости протягом 3 днів з на-

ступним злиттям, де злиття означає, що вся площа, доступна для росту клітин, зайнята (покрита клітинами). Подібним чином, суспензійні культури можуть рости до щільностей, які характеризують відсутність активного росту клітин.

Профіль серотипу концентрованого супернатанту, що містить біоселектований аденовірусний пул, можна досліджувати шляхом вимірювання часу утримання зібраного вірусного пулу на аніонообмінній колонці, де відомо, що різні аденовірусні серотипи мають характерні часи утримання (Blanche і ін. (2000) *Gene Therapy* 7: 1055-1062); див. приклад 3, фігури 1А і В. Аденовіруси за винаходом можуть бути виділені з концентрованого супернатанту шляхом розведення й очищення бляшок або інших методик, добре відомих у даній галузі, і росту для подальшої характеристики. Добре відомі в даній галузі методики застосовуються для визначення послідовностей виділених химерних аденовірусів (див. приклад 5).

Прикладом химерного аденовірусу за винаходом є химерний аденовірус ColoAd1, який виділений за допомогою клітин ободової кишки HT29 у спосіб біоселекції. ColoAd1 має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1. Більша частина нуклеотидної послідовності ColoAd1 ідентична до нуклеотидної послідовності серотипу Ad11 (SEQ ID NO: 2) (Stone і ін. (2003) *Virology* 309:152-165; Mei і ін. (2003) *J. Gen. Virology* 84: 2061-2071). У нуклеотидній послідовності ColoAd1 присутні дві делеції в порівнянні з Ad11, перша довжиною 2444 пар основ у межах ділянки одиниці транскрипції E3 геному (пари основ 27979-30423 SEQ ID NO: 2) і друга, менша делеція, довжиною 25 пар основ (пари основ 33164-33189 SEQ ID NO: 2), у межах гена E4orf4. Ділянка одиниці транскрипції E2B (SEQ ID NO: 3) ColoAd1, яка кодує аденовірусні білки ДНК-полімеразу й термінальний білок, розташована між парами основ 5067 і 10354 SEQ ID NO: 1, і являє собою ділянку гомологічної рекомбінації між серотипами Ad 11 і Ad3. У межах цієї ділянки ColoAd1 присутня зміна 198 пар основ у порівнянні з послідовністю Ad11 (SEQ ID NO: 1). Зміни приводять до подовження нуклеотидів у межах ділянки E2B ColoAd1, які є гомологічними до частини ділянки E2B Ad3 (SEQ ID NO: 8), з найбільшим подовженням гомології між ColoAd1 і Ad3, що має довжину 414 по. Ділянка E2B ColoAd1 (SEQ ID NO: 3) надає збільшену ефективність аденовірусу ColoAd1 у порівнянні з немодифікованим аденовірусом Ad11 (див. приклад 6; Фіг.7). В інших варіантах здійснення винаходу, химерний аденовірус за винаходом може містити нуклеотидні послідовності більш ніж із двох аденовірусних серотипів.

Химерний аденовірус за винаходом або його варіант або похідне може бути досліджений відносно його селективності в характерному типі пухлини шляхом оцінки його літичного потенціалу на панелі пухлинних клітин, які мають походження від однієї й тієї ж тканини, де аденовірусний пул був підданий вихідному пасивуванню. Наприклад, химерний аденовірус ColoAd1 (SEQ ID NO: 1), який початково мав походження від аденовірусного пула, пасивованого на клітинних лініях пухлини ободової кишки HT-29, повторно досліджували як

на клітинах HT-29, так і на панелі інших клітинних ліній, які мають походження від пухлини ободової кишки, включаючи DLD-1, LS174T, LS1034, SW403, HCT116, SW48 і Colo320DM (див. Фіг.3Б). Будь-які доступні клітинні лінії пухлини ободової кишки так само можуть бути придатними для такої оцінки. Аденовірусні клони, виділені з аденовірусних пупів, вибраних на клітинних лініях пухлин інших типів, аналогічно можна тестувати на підходящій панелі пухлинних клітин, включаючи, але не обмежуючись тільки ними, клітинні лінії передміхурової залози (наприклад, клітинні лінії DU145 і PC-3); клітинні лінії підшлункової залози (наприклад, клітинна лінія Папс-1); клітинні лінії пухлин молочної залози (наприклад, клітинна лінія MDA231) і клітинні лінії яєчників (наприклад, клітинна лінія OVCAR-3). Інші доступні клітинні лінії пухлин так само придатні для виділення й ідентифікації аденовірусів за винаходом.

Химерні аденовіруси за винаходом мають підвищений терапевтичний індекс у порівнянні з аденовірусними серотипами, похідними яких вони є (див. Фіг.6, де порівнюється цитолітична активність химерного аденовірусу ColoAd1 з Ad11p).

Винахід також охоплює химерні аденовіруси, які сконструйовані за допомогою рекомбінантних методик, добре відомих фахівцям в даній галузі. Такі химерні аденовіруси містять ділянку нуклеотидної послідовності, яка має походження від одного аденовірусного серотипу, що вбудований за допомогою рекомбінантних методик у геном другого аденовірусного серотипу. Вбудована послідовність надає батьківському аденовірусному серотипу властивість, наприклад, пухлинну специфічність або підвищену ефективність. Наприклад, ділянка E2B ColoAd1 (SEQ ID NO: 3) може бути вбудована у геном Ad35 або Ad9.

Похідні аденовіруси

Винахід також охоплює химерний аденовірус за винаходом, який модифікований для забезпечення інших терапевтично придатних химерних аденовірусів. Модифікації включають, але не обмежуючись тільки ними, ті, які описані нижче.

Однією з модифікацій є одержання похідних химерного аденовірусу за винаходом з по суті відсутньою здатністю зв'язувати p53, у результаті мутації в аденовірусному гені, який кодує білок E1B-55K. У таких вірусах, як правило, вилучені деякі або всі ділянки E1B-55K. (см. патент US 5,677,178). У патенті US 6,080,578 описані, зокрема, Ad5 мутанти, які мають делеції в ділянці білка E1B-55K, яка відповідає за зв'язування p53. Іншими переважними модифікаціями химерних аденовірусів згідно із даним винаходом є мутації в ділянці E1A, як описано в патентах US 5,801,029 і 5,972,706. Ці типи модифікацій забезпечують похідні химерних аденовірусів за винаходом зі збільшеною селективністю до пухлинних клітин.

Іншим прикладом модифікації, яка підпадає під обсяг винаходу, є химерний аденовірус, який має підвищений ступінь тканинної специфічності завдяки розміщенню реплікації вірусу під контролем тканинносpezifичного промотору, як описано в патенті US 5,998,205. Реплікація химерного аде-

новірусу за винаходом також може знаходитися під контролем чутливого елемента E2F, як описано в заявці на патент US 09/714,409. Ця модифікація забезпечує контрольований механізм реплікації вірусу, ґрунтуючись на присутності E2F, що приводить до підвищеної специфічності до пухлинної тканини й відрізняється від контролю, здійснюваної тканинносpezifичним промотором. У цих обох варіантах здійснення винаходу тканинносpezifичний промотор і чутливий елемент E2F функціонально зв'язані з аденовірусним геном, необхідним для реплікації аденовірусу.

Іншою модифікацією, яка підпадає під обсяг винаходу, є застосування химерного аденовірусу за винаходом, наприклад ColoAd1, як основи одержання нових аденовірусних векторів з недостатністю реплікації. Як описано в Lai і ін. ((2002) DNA Cell Bio. 21:895-913), аденовірусні вектори з недостатністю реплікації можуть використовуватися для доставки й експресії терапевтичних генів. Перше покоління (у якому вилучені ділянки E1 і E3) і друге покоління (у якому додатково вилучена ділянка E4) аденовірусних векторів, які мають походження від химерних аденовірусів за винаходом, обидва забезпечуються даним винаходом. Такі вектори легко одержують за допомогою методик, добре відомих фахівцям в даній галузі (див. Imperiale і Kochanek (2004) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 273: 335-357; Vogels і ін. (2003) J. Virol. 77: 8263-8271).

Подальшою модифікацією, яка підпадає під обсяг винаходу, є вставка гетерологічного гена, придатного як маркер або репортер для відстеження ефективності інфікування вірусом. Одним варіантом здійснення цього типу модифікації є вставка гена тимідинкінази (ТК). Експресія ТК в інфікованих клітинах може використовуватися для відстеження рівня вірусів, які залишилися в клітинах, після інфікування вірусом, за допомогою радіоактивно мічених субстратів ТК реакції (Sangro і ін. (2002) Mol. Imaging Biol. 4: 27-33).

Способи конструювання модифікованих химерних аденовірусів добре відомі в даній галузі. Див., Mittal, S. K. (1993) Virus Res. 28: 67-90 і Hermiston, T. і ін. (1999) Methods in Molecular Medicine: Adenovirus Methods and Protocols, під ред. W.S.M. Wold., Humana Press. У стандартних методиках використовують методи рекомбінантної нуклеїнової кислоти, синтез полінуклеотидів і культивування й трансформацію мікроорганізмів (наприклад, електропорацію, ліпофекцію). Звичайно ферментативні реакції й етапи очищення здійснюють відповідно до рекомендацій виробника. Техніки й методи здійснюють відповідно до методів, загальноприйнятих у даній галузі, різним поширенням посиленням (див. в основному, Sambrook і ін., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2-е вид. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), які описані в цьому джерелі. Номенклатура, використовувана в даному описі, і лабораторні методики аналітичної хімії, хімії органічного синтезу й приготування лікарських засобів, є добре відомими й звичайно використовуються в даній галузі.

Визначення терапевтичного потенціалу

Химерні аденовіруси за винаходом або їх варіанти або похідні можуть бути оцінені щодо їх терапевтичної корисності шляхом визначення їх літичного потенціалу на пухлинних клітинах, які мають походження від терапевтичних мішеней, що представляють інтерес. Лінії пухлинних клітин, придатні для тестування таких аденовірусів, включають, але не обмежуючись тільки ними, клітинні лінії ободової кишки, включаючи, але не обмежуючись тільки ними, клітинні лінії DLD-1, HCT116, HT29, LS1034 і SW48; клітинні лінії передміхурової залози, включаючи, але не обмежуючись тільки ними, клітинні лінії OU145 і PC-3; клітинні лінії підшлункової залози, включаючи, але не обмежуючись тільки ними, клітинну лінію Panc-1; клітинні лінії пухлин молочної залози, включаючи, але не обмежуючись тільки ними, клітинну лінію MDA231, і клітинні лінії яєчника, включаючи, але не обмежуючись тільки ними, клітинну лінію OVCAR-3. Гемопоетичні клітинні лінії включають, але не обмежуючись тільки ними, клітини В-лімфоїдні клітини Raji і Daudi, еритробластоїдні клітини K562, мієлоєдні клітини U937 і Т-лімфоїдні клітини HSB2. Інші доступні клітинні лінії пухлин так само придатні для виділення й ідентифікації аденовірусів за винаходом для застосування для лікування новоутворення.

Цитолітична активність аденовірусів за винаходом може бути визначена в характерних пухлинних клітинних лініях і отримані при вимірюванні дані перетворені в ефективність, використовуючи як стандарт аденовірус, який належить до підгрупи С, переважно Ad5 (тобто дана ефективність дорівнює 1). Переважним способом визначення цитолітичної активності є MTS-аналіз (див. приклад 4, Фіг.2).

Терапевтичний індекс аденовірусу за винаходом в конкретній пухлинній клітинній лінії може бути визначений шляхом порівняння ефективності даного аденовірусу в пухлинній клітинній лінії з ефективністю цього ж аденовірусу в незлоякісній клітинній лінії. Переважними незлоякісними клітинними лініями є клітини SAEC (епітеліального походження) і клітини HUVEC (ендотеліального походження) (див. Фіг.4). Ці два типи клітин представляють нормальні клітини, які мають походження від органів і судинної сітки, відповідно, і характеризують імовірні ділянки токсичності при здійсненні аденовірусної терапії, залежно від способу доставки аденовірусу. Проте, практичне здійснення за винаходом не обмежується застосуванням цих клітин, також можна використовувати інші незлоякісні клітинні лінії (наприклад, В-клітини, Т-клітини, макрофаги, моноцити, фібробласти).

Химерні аденовіруси за винаходом додатково можуть бути оцінені щодо їх здатності націлювати ріст пухлинних клітин (тобто ракових) за їх здатністю зменшувати пухлиноутворення або навантаження пухлинними клітинами в безшерстих мишей, що несуть трансплантовані пухлинні клітини в порівнянні з мишами, що несуть пухлинні клітини в еквівалентному навантаженні, але не одержують лікування (див. приклад 7).

Оцінку аденовірусів за винаходом також можна здійснювати за допомогою первинних експлантатів пухлин людини (Lam і ін. (2003) *Cancer Gene Therapy*; Grill і ін. (2003) *Mol. Therapy* 6: 609-614), які забезпечують тестовані умови, які присутні у пухлині, що звичайно не можуть бути отримані при дослідженні ксенотрансплантованих пухлин.

Корисність для лікування

Даний винахід забезпечує застосування химерних аденовірусів за винаходом для інгібування росту пухлинних клітин, а також застосування аденовірусних векторів, які мають походження від цих химерних аденовірусів, для доставки терапевтично корисних білків, придатних для лікування новоутворів і інших хворобливих станів.

Фармацевтичні композиції й введення

Даний винахід також стосується фармацевтичних композицій, які містять химерні аденовіруси за винаходом, включаючи їх варіанти й похідні, приготувані для терапевтичного введення пацієнтам. Для терапевтичного застосування стерильну композицію, яка містить фармакологічно ефективну дозу аденовірусу, вводять людині або у ветеринарії пацієнтам, крім людини, для лікування, наприклад, новоутворення. Звичайно композиція буде містити близько 10^{11} або більше частинок аденовірусу в одній суспензії. Часто в таких стерильних умовах використовують фармацевтично прийнятний носій або наповнювач. Можна використовувати різні водні розчини, наприклад, воду, буферизовану воду, 0,4% сольовий розчин, 0,3% гліцин і подібні. Ці розчини є стерильними й практично вільні від інших частинок, що не представляють собою необхідний аденовірусний вектор. Композиції можуть містити фармацевтично прийнятні допоміжні речовини, необхідні для підтримання фізіологічних умов, такі як речовини для встановлення значення рН і буферні речовини, речовини, які регулюють токсичність, і подібні, наприклад, ацетат натрію, хлорид натрію, хлорид калію, хлорид кальцію, лактат натрію й т.д. Можна включати наповнювачі, які підвищують інфікованість клітин аденовірусом (див. патент US6,392,069).

Аденовіруси за винаходом також можуть доставляти до пухлинних клітин за допомогою ліпосом або імуноліпосом, така доставка може бути селективно націлена на пухлинні клітини на основі властивостей клітинної поверхні, присутніх у популяції пухлинних клітин (наприклад, присутність білка клітинної поверхні, який зв'язується з імунглобуліном на ліпосомі). Звичайно водну суспензію, яка містить віріони, інкапсулюють у ліпосомі або імуноліпосомі. Наприклад, суспензія аденовірусних віріонів може бути інкапсульована в міцели з утворенням ліпосом за допомогою загальноприйнятих способів (патент US 5,043,164, патент US 4,957,735, патент US 4,925,661; Connor і Huang, (1985) *J. Cell Biol.* 101: 581; Lasic D.D. (1992) *Nature* 355: 279; Novel Drug Delivery (під ред. Prescott і Nimmo, Wiley, Нью-Йорк, 1989); Reddy і ін. (1992) *J. Immunol.* 148: 1585). Імуноліпосомі, що містять антитіло, які специфічно зв'язується з антигеном злоякісної клітини (наприклад, CALLA, CEA), який знаходиться на злоякісних клітинах

пацієнта, можна використовувати для націлювання віріонів на ці клітини (Fisher (2001) *Gene Therapy* 8: 341-348).

Для подальшого підвищення ефективності аденовірусів за винаходом їх можна модифікувати для прояву підвищеного тропізму до переважних типів пухлинних клітин. Наприклад, як показано в заявці PCT/US98/04964, протеїн на зовнішній оболонці аденовірусу можна модифікувати для виявлення хімічного агента, переважно поліпептиду, який зв'язується з рецептором, що знаходиться на пухлинних клітинах, більшою мірою, ніж з нормальними клітинами (див. також патенти US 5,770,442 і 5,712,136). Поліпептид може являти собою антитіло, переважним є одноланцюгове антитіло.

Лікування за допомогою аденовірусів

Аденовіруси за винаходом або їх фармацевтичних композиціях можуть вводитися для терапевтичного лікування пухлинного захворювання або злоякісного новоутворення. Для терапевтичних показань композиції вводять пацієнтові, у якого вже розвинулося пухлинне захворювання, у кількості, достатній для лікування або принаймні частково купірування стану і його ускладнень. Кількість, достатня для здійснення такої дії, визначається згідно із даним винаходом як "терапевтично ефективна доза" або "діюча доза". Кількість, ефективна для такого застосування, буде залежати від тяжкості стану, загального стану пацієнта й шляху введення.

Як приклад, але не обмежуючись тільки ним, людину або ссавця, який відрізняється від людини, що має солідне або гематологічне пухлинне захворювання, (наприклад, рак підшлункової залози, ободової кишки, яєчників, легень або молочної залози, лейкоз або множинну мієлому) можна піддавати лікуванню шляхом введення терапевтично ефективної дози підходящого аденовірусу за винаходом, тобто такого аденовірусу, який проявляє поліпшений терапевтичний індекс для цього типу тканини. Наприклад, переважним химерним аденовірусом для лікування раку ободової кишки буде аденовірус ColoAd1 (SEQ ID NO: 1). Суспензії інфікуючих частинок аденовірусу можуть доставлятися до пухлинної тканини різними шляхами, включаючи внутрішньовенний, внутрішньоочеревинний, внутрішньом'язовий, підшкірний і місцевий. Аденовірусна суспензія, яка містить близько 10^3 - 10^{12} або більше частинок віріону на мл може вводитися шляхом інфузії (наприклад, у порожнину очеревини для лікування раку яєчника, у ворітну вену для лікування гепатокарциноми або метастаз у печінці з інших первинних пухлин непечінкового походження) або іншим підходящим шляхом, включаючи пряму ін'єкцію в пухлинне утворення (наприклад, пухлина молочної залози), клізми (наприклад, рак ободової кишки) або катетер (наприклад, рак сечового міхура). Інші шляхи введення будуть підходящими для карцином іншого походження, тобто інгаляції у вигляді аерозолу (наприклад, для доставки в легені при раку бронха, дрібноклітинному раку легені, недрібноклітинному раку легені, аденокарциномі легені або раку гортані) або безпосереднього введення в пухлинну

ділянку (наприклад, рак бронха, рак носоглотки, рак гортані, рак шийки матки).

Аденовірусну терапію із застосуванням аденовірусів за даним винаходом можна комбінувати з іншими протипухлинними протоколами, такими як загальноприйнята хіміотерапія або променева терапія, для лікування конкретного злоякісного новоутворення. Лікування може бути одночасним або послідовним. Переважним хіміотерапевтичним засобом є цисплатин, і переважна доза може бути вибрана лікарем, виходячи із природи злоякісного новоутворення, яке піддається лікуванню, і інших факторів, які звичайно беруть до уваги при призначенні цисплатину. Переважно, цисплатин вводять внутрішньовенно в дозі 50-120 мг/м² протягом 3-6 годин. Більш переважно його вводять внутрішньовенно в дозі 80 мг/м² протягом 4 годин. Іншим переважним хіміотерапевтичним засобом є 5-фторурацил, який часто вводять у комбінації із цисплатином. Переважна доза 5-фторурацилу становить 800-1200 мг/м² на добу протягом 5 послідовних днів.

Аденовірусну терапію із застосуванням аденовірусів за даним винаходом як аденовірусних векторів також можна комбінувати з іншими генами, для яких відома корисність для лікування при генній терапії. Див. патент US 5,648,478. У таких випадках, химерний аденовірус додатково містить гетерологічний ген, який кодує терапевтичний білок, вбудований у вірусний геном, таким чином, що гетерологічний ген експресується в інфікованій клітині. Терапевтичний білок, як використовується в даному винаході, стосується білка, який, як припускають, буде забезпечувати деякі терапевтичні переваги при експресії в даній клітині.

В одному варіанті здійснення винаходу, гетерологічний ген являє собою проліки гена-активатора, такий як дезаміназа цитозину (CD) (див. патенти US 5,631,236; 5,358,866 і 5,677,178). В інших варіантах здійснення винаходу, гетерологічний ген відомий як індуктор клітинної загибелі, наприклад, апоптин або аденовірусний протеїн загибелі (ADP), або злитий білок, наприклад, злитий мембранний глікопротеїн (Danen-Van Oorschot і ін. (1997) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94: 5843-5847; Tollefson і ін. (1996) *J. Virol.* 70: 2296-2306; Fu і ін. (2003) *Mol. Therapy* 7: 48-754, 2003; Ahmed і ін. (2003) *Gene Therapy* 10: 1663-1671; Galanis і ін. (2001) *Human Gene Therapy* 12(7): 811-821).

Подальшими прикладами гетерологічних генів або їхніх фрагментів є ті, які кодують імуномодуючі білки, такі як цитокіни або хемокини. Прикладами є інтерлейкін 2, патенти US 4,738,927 або 5,641,665; інтерлейкін 7, патенти US 4,965,195 або 5,328,988; і інтерлейкін 12, патент US 5,457,038; фактор некрозу пухлини альфа, патент US 4,677,063 або 5,773,582; гамма-інтерферон, патент US 4,727,138 або 4,762,791; або GM-CSF, патент US 5,393,870 або 5,391,485, Mackensen і ін. (1997) *Cytokine Growth Factor Rev.* 8: 119-128). Додаткові імуномодуляторні білки, крім того, включають макрофагові запальні білки, включаючи MIP-3. Також можна використовувати моноцитний хемотоксичний білок (MCP-3 альфа); переважним варіантом здійснення гетерологічного гена є химерний ген, який складається з гена, що кодує білок,

який проходить клітинні мембрани, наприклад, VP22 або TAT, злитого з геном, який кодує білок, переважно токсичний по відношенню до ракових, але не нормальних клітин.

Химерні аденовіруси за винаходом також можна використовувати як вектори для доставки генів, які кодують терапевтично придатні молекули РНК, тобто міРНК (Dorsett і Tuschl (2004) *Nature Rev Drug Disc* 3: 318-329).

В деяких випадках, гени можна вбудовувати в химерний аденовірус за винаходом для додаткового посилення здатності онколітичного вірусу знищувати пухлину, хоча він не має прямий вплив на саму пухлину - такий варіант включає гени, що кодують білки, які порушують презентацію МНСІ класу (Hewitt і ін. (2003; *Immunology* 110: 163-169), блокують комплемент, інгібують інтерферони й механізми, індуковані інтерфероном, хемокіни й цитокіни, загибель на основі NK клітин (Orange і ін., (2002) *Nature Immunol.* 3: 1006-1012; Mireille і ін. (2002) *Immunogenetics* 54: 527-542; Alcamí (2003) *Nature Rev. Immunol.* 3: 36-50; знижують відповідну імунну реакцію (наприклад IL-10, TGF-бета, Khong і Restifo (2002) *Nature Immunol.* 3: 999-1005; 2002) і металопротеази, які можуть руйнувати позаклітинний матрикс і підсилювати поширення вірусів у пухлині (Bosman і Stamenkovic (2003) *J. Pathol.* 2000: 423-428; Visse і Nagase (2003) *Circulation Res.* 92: 827-839).

Набори

Винахід також стосується фармацевтичних упаковок і наборів, які складаються з одного або декількох контейнерів, заповнених одним або декількома компонентами вказаних вище композицій, запропонованих у винаході. Такий(і) контейнер(и) повинен(ні) бути мати вкладиш у формі, встановлений урядовим органом, відповідальним за виробництво, застосування або продаж фармацевтичних або біологічних продуктів, у якому вказаний дозвіл цього органа на виробництво, застосування або продаж продукту для введення людині.

Надалі даний винахід описаний за допомогою наступних прикладів, які ілюструють специфічні варіанти здійснення винаходу і їх різні застосування. Ці наведені приклади, які ілюструють окремі специфічні варіанти здійснення винаходу, не можуть розглядатися як такі, які яким-небудь чином обмежують обсяг розкритого винаходу.

Якщо спеціально не вказано інакше, при практичному здійсненні винаходу використовують загальноприйняті техніки культури клітин, молекулярної біології, мікробіології, методики рекомбінантної ДНК, імунології, які знаходяться в компетенції середнього фахівця в даній галузі. Такі методики докладно пояснюються в літературі. Див., наприклад *Cell Biology: a Laboratory Handbook*: J. Celis (ред.). Academic Press. N.Y. (1996); Graham, F.L. і Prevec, L *Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines*. В: *Vaccines: New Approaches to Immunological Problems*. R.W. Ellis (ред.) Butterworth. стор.363-390; Graham and Prevec *Manipulation of adenovirus vectors*. В: *Methods in Molecular Biology*, том 7: *Gene Transfer and Expression Techniques*. E.J. Murray і J.M. Walker (ред.) Humana Press Inc.,

Clifton, N.J. стор.109-128, 1991; Sambrook і ін. (1989), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2-е вид., Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook і ін. (1989), і Ausubel і ін. (1995), *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons.

Приклади

Методи

Стандартні методики використовуються для методів рекомбінантної нуклеїнової кислоти, синтезу полінуклеотидів і культивування й трансформації мікроорганізмів (наприклад, електропорація, ліпофекція). Звичайно ферментативні реакції й етапи очищення здійснюють відповідно до рекомендацій виробника. Техніки й методики здійснюють відповідно до методів, загальноприйнятих у даній галузі, різним розповсюдженням посиланням (див., в основному, Sambrook і ін., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2-е видання (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), які описані в цьому джерелі. Номенклатура, використовувана в даному описі, і лабораторні методики аналітичної хімії, хімії органічного синтезу й приготування лікарських засобів і доставки й лікування пацієнтів. Способи конструювання мутантів аденовірусів добре відомі в даній галузі. See, Mittal, S. K., *Virus Res.*, 1993, том 28, стор.67-90; і Hermiston, T. і ін., *Methods in Molecular Medicine: Adenovirus Methods and Protocols*, під ред. W.S.M. Wold., Humana Press, 1999. Крім того, геном аденовірусу 5 зареєстрований у банку генів 10 під №M73260, і вірус доступний з Американської колекції типових культур, Rockville, Maryland, USA, під реєстраційним номером VR-5.

Віруси й клітинні лінії

Серотипи Ad Ad3 (штам GB), Ad4 (штам RI-67), Ad5 (штам Adenoid 75), Ad9 (штам Hicks), Ad11p (штам Slobitski), Ad16 (штам Ch.79) і всі клітинні лінії, за винятком наступних, одержували з ATCC: MDA231-mt1 (похідне, виділене Dr. Deb Zajchowski зі швидко зростаючих підшкірно ксенотрансплантованих клітин MDA231) і Pane1-set (отриманих Dr. Sandra Biroc зі швидко зростаючих підшкірно ксенотрансплантованих клітин Pane1), HUVEC (Vec Technologies, Rensselaer, NY), і SAEC (Clonetics, Walkersville, MD) Ad40 був люб'язно наданий Dr. William S.M. Wold із Сент-Луїського університету.

Приклад 1 - Очищення й кількісний аналіз вірусів

Маточні вірусні розчини розмножували на клітинах 293 і очищали на градієнтах CsCl (Hawkins і ін., 2001). Спосіб, використовуваний для кількісного аналізу вірусів, ґрунтувався на способі Shabram і ін. (1997) *Human Gene Therapy* 8: 453-465, за винятком того, що аніонообмінний TMAE Fractogel використовували замість Resource Q. Коротко, колонку 1,25л завантажували Fractogel EMD TMAE-650 (S) (кат. №116887-7 EM Science, Gibbstown, NJ 08027). Здійснювали ВЕРХ-розділення на Agilent HP 1100 ВЕРХ у наступних умовах: буфер А=50мМ HEPES, рН7,5; буфер В=1,0М NaCl у буфері А; швидкість потоку 1мл/хв. Після зрівноважування колонки протягом не менше 30 хвилин у буфері А, приблизно 10^9 - 10^{11} вірусних частинок зразка завантажували на колонку в 10-100мкл об'єму, потім завантажували 4 об'єми

колонки буфером А. Використовували лінійний градієнт, який простирається на 16 об'єми колонки, і завершували 100% буфером В.

За витікаючими потоками із колонки спостерігали при А260 і А280нм, площі піків підраховували й визначали співвідношення 260 до 280нм. Вірусні піки ідентифікували як піки, що мають співвідношення А260/А280, близьке до 1,33. У кожну серію зразків включали вірусний стандарт. Кількість вірусних частинок на мл стандарту визначали за допомогою способу Lehmborg і ін. (1999) J. Chrom. B, 732: 411-423}. У діапазоні використовуваних вірусних концентрацій, площа піка при А260нм кожного зразка була прямо пропорційна до кількості вірусних частинок у зразку. Кількість вірусних частинок на мл у кожному тестованому зразку розраховували шляхом множення відомої кількості вірусних частинок на мл у стандарті на співвідношення площі вірусного піка зразка при А260нм до площі вірусного піка стандарту при А260нм.

Колонку регенерували після градієнта кожного зразка шляхом промивання двома об'ємами колонки 0,5н. NaOH, потім двома об'ємами колонки 100% буфером А, 3 об'ємами колонки 100% буфером В, і після цього 4 об'ємами колонки 100% буфером А.

Приклад 2 - Біоселекція

Вірусні серотипи, які представляють підгрупи Ads B-F, об'єднували й пасивували на субконфлюентних культурах цільових пухлинних клітинних ліній при високому співвідношенні частинок на клітину протягом двох циклів для сприяння здійснення рекомбінації між серотипами. Потім супернатант (1,0; 0,1; 0,01; 0,001мл) із другого циклу інфікування при високому співвідношенні вірусних частинок на клітину, субконфлюентні культури, використовували для інфікування серій понадконфлюентних колб пухлинної культури T-75 цільових пухлинних клітинних ліній PC-3, HT-29, Panc-1 і MDA-231 Для досягнення понадконфлюентності кожну клітинну лінію висівали при співвідношеннях розщеплення, що дозволяють досягти конфлюентності клітинними лініями протягом 24-40 годин після висівання, і клітини залишали рости в цілому протягом 72 годин після висівання перед інфікуванням. Це здійснювали для максимізування конфлюентності клітин для відтворення умов росту солідних пухлин у людей.

Супернатант клітинної культури збирали з першої колби в серіях з 10-ти кратним розведенням, які не проявляли ніяких ознак CPE на 3-й або 4-й день після інфікування (у випадку HT-29 і PC-3, їх модифікували для пасажів 10-20 для збору із другої колби, тобто збирали при 100-кратному розведенням нижче розведення, при якому виявляється CPE на 3-й день після інфікування). Кожний збір служив як вихідний матеріал для наступного пасажу вірусу. Цей процес повторювали до тих пір, поки вірусний пул не досягав 20 біоселективних пасажів.

Характерні віруси для кожного біоселектованого пулу виділяли шляхом здійснення очищення бляшок у два етапи на клітинах A549 за допомогою стандартних способів (Tollefson, A., Hermiston, T.W., і Wold, W.S.M.; "Preparation and Titration of

CsCl-banded Adenovirus Stock" в Adenovirus Methods and Protocols. Humana Press, 1999, стор. 1-10, під ред. W.S.M. Wold). Коротко, для інфікування клітин A549 використовували розведення супернатанту, зібраного з 20-ого пасажу, на кожній цільовій пухлинній клітинній лінії в стандартному аналізі бляшкоутворення. Добре видимі бляшки збирали й аналогічний метод бляшкоутворення використовували для одержання другого циклу характерних бляшок із цих зборів. Ретельно виділені бляшки із другого циклу очищення бляшок вважали чистими, інфіковані культури готували за допомогою цих очищених бляшок, і визначали онколітичну ефективність цих культуральних супернатантів за допомогою MTS-аналізу, як описано.

Приклад 3 - Характеристика серотипу

Батьківські аденовірусні серотипи, які містять вірусні пули або виділений аденовірус ColoAd1, ідентифікували за допомогою аніонообмінної хроматографії аналогічно до описаного в Shabram і ін. (1997) Human Gene Therapy 8 453:465, за винятком того, що використовували аніонообмінне середовище TMAE Fractogel (EM Industries, Gibbstown, NJ) замість Resource Q, як описано в прикладі 1 (див. Фіг.1).

Аденовірус 5 типу елюювався приблизно при 60% буфері В при градієнті. Інші серотипи (3, 4, 9, 11p, 16, 35, і 40) кожний елюювався при характерному часі утримання, що відповідає часам утримання на Q Sepharose XL, опублікованим Blanche і ін. (2000) Gene Therapy 7: 1055-1062.

Приклад 4 - Цитолітичний аналіз

Літичну здатність вірусів визначали за допомогою модифікованого МТТ-аналізу (Shen і ін., 2001). Коротко, МТS-аналіз (Promega, CellTiter 96® водний нерадіоактивний аналіз проліферації клітин) використовували замість МТТ-аналізу, тому що перетворення клітинами МТS у водному, розчинному формазані зменшує час і дозволяє уникнути використання летучого органічного розчинника, пов'язаного з МТТ-аналізом.

Для здійснення цього дослідження клітини висівали при заданій щільності для кожної пухлинної клітинної лінії таким чином, щоб одержати моношар протягом 24 годин. Цим щільно висіяним клітинам дозволяли рости додатково протягом 2 днів перед обробкою тестованим (йми) вірусом (ами). Інфікування як пухлинних, так і первинних нормальних клітин здійснювали в чотирьох повторях при серійних трикратних розведеннях вірусів, починаючи зі співвідношення частинок на клітину 100 і закінчуючи співвідношенням частинок на клітину 0,005. Інфіковані клітини інкубували при 37°C і здійснювали МТS-аналіз у моменти часу, вказані для конкретних ліній первинних або пухлинних клітин. Несправжньо-інфіковані клітини були негативним контролем і встановлювали точку 100% виживання в даному дослідженні.

Приклад 5 - Секвенування ДНК

Секвенування ДНК Ad11p (SEQ ID NO: 2) і Colo Ad 1 (SEQ ID NO: 1) геномних ДНК здійснювали в такий спосіб. Коротко, очищену кДНК аденовірусу з ColoAd1 і Ad11p частково розщеплювали за допомогою рестрикційної ендонуклеази Sau3A1 і зроблений навмання фрагмент клону вал

и в плазмідному векторі pBluescript II (Stratagene, La Jolla, CA). Позитивні клони розмножували й секвенували за допомогою праймерів M13R і KS (Stratagene, La Jolla, CA). Окремі послідовності реакцій обрізали, відкоригували й збирали за допомогою Sequencher[™] (Gene Codes Corp., Ann Arbor, Мічиган). Проломи в покритті ампліфікували за допомогою звичайних олігонуклеотидних праймерів і секвенували. Кінці вірусних геномів відсеквеноували безпосередньо з аденовірусної ДНК. У підсумку, кожний геном секвенували при 3X+ покриття й 431 основ при 2X покритті.

Для визначення початку E2B ділянки ColoAd1 одержували два набори праймерів, один до гена рTP E2B (п.о.9115, S'GGGAGTTTCGCGCGGACACGGS' (SEQ ID NO: 4) і п.о. 9350, 5' GCGCCGCCGCCGCGGAGAGGT3' (SEQ ID NO: 5)) і один до гена ДНК-полімерази (п.о. 7520 5'CGAGAGCCCCATTCGTGCAGGTGAG3' (SEQ ID NO: 6) і по 7982, 5'GCTGCGACTACTGCGGCCGTCTGT3' (SEQ ID NO: 7) і використовували ПЛР для виділення фрагментів ДНК із різних серотипів (Ad3,4,5,9,11p,16 і 40), застосовуючи реагенти із ПЛР-набору Advantage 2 PCR (Clonetics, Walkersville, MD; кат. №K1910-Y) і проганяючи в термоциклі PTC-200 від MJ Research (Watertown, MA). Потім ці фрагменти секвенували вздовж послідовності ДНК Ad3, використовуючи барвник термінатора секвенування на генетичному аналізаторі ABI 3100.

Ділянку E2B Ad3 секвенували за допомогою виділеної ДНК Ad3 і праймерів, які перекриваються.

Інформацію, отриману при секвенуванні, аналізували за допомогою програми Vector NTI (Informatics).

Приклад 6 - Конструювання рекомбінантних вірусів

Геномні ДНК Ad11p (SEQ ID NO: 2) і ColoAd1 (SEQ ID NO: 1) очищали від вірусних частинок у стрічковому градієнті CsCl. Геномні ДНК розщеплювали за допомогою PacI, що розрізає кожну молекулу тільки один раз у межах вірусного гена. Розрізання PacI відбувається на основі 18141 у нуклеотидній послідовності ColoAd1 (SEQ ID NO: 1) і на основі 18140 у нуклеотидній послідовності Ad11 (SEQ ID NO: 2). Розщеплені ДНК змішували в рівних кількостях і лігували в присутності ДНК-лігази T4 при 16°C протягом ночі. Цю лігуючу суміш трансфектували в клітини A549 за допомогою CaPO₄ набору для трансфекції від Invitrogen, Carlsbad, CA (кат.

№K2780-01). Виділені бляшки знімали й скринували шляхом розщеплення рестрикційним ферментом і аналізували за допомогою ПЛР для розрізання чотирьох вірусних популяцій (Ad11p, ColoAd1, лівий кінець AdHp/правий кінець ColoAd1 (ColoAd1.1) і лівий кінець ColoAd1/правий кінець Ad11p(ColoAd1.2)).

Літичну здатність вірусів кожної популяції визначали в декількох клітинних лініях, включаючи клітинні лінії HT29 і HUVES, як описано в прикладі 3. Отримані результати свідчать про наявність діапазону ефективності, від найменш сильнодіючих до найбільш сильнодіючих, як Ad11p, ColoAd1.2, ColoAd1.1, ColoAd1 (див. Фіг.7 для результатів у клітинах HT29).

Також конструювали химерні аденовіруси рСЛ44 і рСJ146, що містять повнорозмірний геном ColoAd1, у якому відновлювали ділянки дикого типу Ad11 р E3 і E4, відповідно. Ці модифікації вносили шляхом гомологічної рекомбінації в BJ5183 E. Coli (Chartier і ін. (1996) J. Virol. 70: 4805-4810). Обидва ці химерні аденовірусу демонстрували зменшену літичну активність у клітинах HT29 і HUVES у порівнянні з ColoAd1 або ColoAd1.2.

Приклад 7 - Ефективність аденовірусів в умовах in vivo

У характерному дослідженні на ксенотрансплантованої пухлини людини в безшерстих мишей, тварин інфікували шляхом підшкірного введення мишам 5×10⁶ клітин у задній бік. При досягненні пухлинами розміру 100-200 мкл їм вводили наповнювач (ФСБР) або вірус у кількості 2×10¹⁰ частинок протягом п'яти послідовних днів (усього 1×10¹¹ частинок). Слід відзначити зменшення розміру пухлини відносно ФСБР контролю й додаткових контрольних вірусів (Ad5, ONYX-015).

Приклад 8 - Селективність ColoAd1 на первинних експлантатах пухлини людини

Зразки тканини, вилучені при хірургічному втручанні з колоректальних пухлин і сусідніх нормальних тканин, поміщали в культуральне середовище й інфікували однаковою кількістю вірусів ColoAd1 або Ad5. Через 24 години після інфікування збирали культуральні супернатанти й визначали утворену кількість вірусних частинок. ColoAd1 утворювали більшу кількість вірусних частинок відносно введених частинок, ніж Ad5, у тканині пухлини, але меншу кількість частинок відносно введених частинок, ніж Ad5, у нормальній тканині.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Harden, Paul
Hermiston, Terry
Kuhn, Irene

<120> Химерні аденовіруси для застосування для лікування злоякісного новоутворення

<130> 53183AUSM1

<150> US 60/574,851

<151> 2004-05-26

<160> 8

<170> PatentIn версія 3,2

<210> 1

<211> 32325

<212> ДНК

<213> Аденовірус

<400> 1

```

ctatctatat aatatacctt atagatggaa tgggtgccaat atgtaaatga ggtgatttta      60
aaaagtgtgg atcgtgtggt gattggctgt ggggttaacg gctaaaagg gcggtgcgac      120
cgtgggaaaa tgacgttttg tgggggtgga gtttttttgc aagttgtcgc gggaaatgtg      180
acgcataaaa aggctttttt ctcacggaac tacttagttt tcccacggta tttaacagga      240
aatgaggtag ttttgaccgg atgcaagtga aaattgttga ttttcgcgcg aaaactgaat      300
gaggaagtgt ttttctgaat aatgtggtat ttatggcagg gtggagtatt tgttcagggc      360
caggtagact ttgaccatt acgtggaggt ttcgattacc gtgtttttta cctgaatttc      420
cgcgtaccgt gtcaaagtct tctgttttta cgtaggtgtc agctgatcgc tagggtatTT      480
atacctcagg gtttgtgtca agaggccact cttgagtgcc agcgagaaga gttttctcct      540
ctgcgcgggc agtttaataa taaaaaatg agagatttgc gatttctgcc tcaggaaata      600
atctctgctg agactggaaa tgaaatattg gagcttgtgg tgcacgccct gatgggagac      660
gatccggagc cacctgtgca gctttttgag cctcctacgc ttcaggaact gtatgattta      720
gaggtagagg gatcggagga ttctaattgag gaagctgtaa atggcttttt taccgattct      780
atgcttttag ctgctaataga agggtagaa ttagatccgc ctttggacac ttttgatact      840
ccaggggtaa ttgtggaaag cggtagaggt gtaagaaaat tacctgattt gagttccgtg      900
gactgtgatt tgcactgcta tgaagacggg tttcctccga gtgatgagga ggaccatgaa      960
aaggagcagt ccatgcagac tgcagcgggt gagggagtga aggctgcaa tgttggtttt     1020
cagttggatt gcccgagct tcctggacat ggctgtaagt cttgtgaatt tcacaggaaa     1080
aatactggag taaaggaact gttatgttcg ctttgttata tgagaacgca ctgccacttt     1140
atttacagta agtgtgttta agttaaaatt taaaggaata tgctgttttt cacatgtata     1200

```

ttgagtgtga gttttgtgct tcttattata ggtcctgtgt ctgatgctga tgaatcacca	1260
tctcctgatt ctactacctc acctcctgag attcaagcac ctgttcctgt ggacgtgctc	1320
aagcccatc ctgtgaagct taagcctggg aaacgtccag cagtggaaaa acttgaggac	1380
ttgttacagg gtggggacgg acctttggac ttgagtacac ggaaacgtcc aagacaataa	1440
gtgttcata tccgtgttta cttaaggtga cgtcaatatt tgtgtgacag tgcaatgtaa	1500
taaaaatatg ttaactgttc actgggtttt attgcttttt gggcggggac tcaggtatat	1560
aagtagaagc agacctgtgt ggtagctca taggagctgg ctttcatcca tggaggtttg	1620
ggccattttg gaagacctta ggaagactag gcaactgtta gagaacgtt cggacggagt	1680
ctccggtttt tggagattct ggtagctag tgaattagct agggtagttt ttaggataaa	1740
acaggactat aaacaagaat ttgaaaagt gttggtagat tgcccaggac tttttgaagc	1800
tcttaatttg ggccatcagg ttcactttaa agaaaaagtt ttatcagttt tagacttttc	1860
aaccccaggt agaactgctg ctgctgtggc ttttcttact tttatattag ataaatggat	1920
cccgagact catttcagca ggggatacgt tttggatttc atagccacag cattgtggag	1980
aacatggaag gttcgcaaga tgaggacaat cttaggttac tggccagtgc agcctttggg	2040
tgtagcggga atcctgaggc atccaccggc catgccagcg gttctggagg aggaacagca	2100
agaggacaac ccgagagccg gcctggaccc tccagtggag gaggcggagt agctgacttg	2160
tctcctgaac tgcaacgggt gcttactgga tctacgtcca ctggacggga tagggcggtt	2220
aagagggaga gggcatctag tggtagctg gctagatctg agttggcttt aagttaaatg	2280
agtcgcagac gtcctgaaac catttggtgg catgaggttc agaaagaggg aagggatgaa	2340
gtttctgtat tgcaggagaa atattcactg gaacagggtga aaacatgttg gttggagcct	2400
gaggatgatt gggaggtggc cattaataat tatgccaaaga tagctttgag gcctgataaa	2460
cagtataaga ttactagacg gattaatatc cggaatgctt gttacatatc tggaaatggg	2520
gctgaggtgg taatagatac tcaagacaag gcagttatta gatgctgcat gatggatatg	2580
tggcctgggg tagtcggtat ggaagcagta acttttgtaa atgttaagtt taggggagat	2640
ggttataatg gaatagtgtt tatggccaat accaaactta tattgcatgg ttgtagcttt	2700
tttggtttca acaatacctg tgtagatgcc tggggacagg ttagtgtacg gggatgtagt	2760
ttctatgctt gttggattgc cacagctggc agaaccaaga gtcaattgtc tctgaagaaa	2820
tgcataattc aaagatgtaa cctgggcatt ctgaatgaag gcgaagcaag ggtccgccac	2880
tgcgcttcta cagatactgg atgttttatt ttgattaagg gaaatgccag cgtaaagcat	2940
aacatgattt gcggtgcttc cgatgagagg ccttatcaaa tgctcacttg tgctggtggg	3000
cattgtaata tgctggctac tgtgcatatt gtttccatc aacgcaaaaa atggcctgtt	3060
tttgatcaca atgtgatgac gaagtgtacc atgcatgcag gtgggcgtag aggaatgttt	3120

atgccttacc	agtgtaacat	gaatcatgtg	aaagtgttgt	tggaaccaga	tgcccttttcc	3180
agaatgagcc	taacaggaat	ttttgacatg	aacatgcaaa	tctggaagat	cctgaggtat	3240
gatgatacga	gatcgagggt	acgcgcacatgc	gaatgcggag	gcaagcatgc	caggttccag	3300
ccggtgtgtg	tagatgtgac	tgaagatctc	agaccggatc	atttggttat	tgcccgact	3360
ggagcagagt	tccgatccag	tggaagaaga	actgactaag	gtgagtattg	ggaaaacttt	3420
ggggtgggat	tttcagatgg	acagattgag	taaaaatttg	ttttttctgt	cttgacagctg	3480
tcatgagtgg	aaacgcttct	tttaaggggg	gagtcctcag	cccttatctg	acagggcgctc	3540
tcccatcctg	ggcaggagtt	cgtcagaatg	ttatgggatc	tactgtggat	ggaagaccg	3600
tccaaccg	caattcttca	acgctgacct	atgctacttt	aagttcttca	cctttggacg	3660
cagctgcagc	tgccgcccgc	gcttctgttg	ccgctaacac	tgtgcttggg	atgggttact	3720
atggaagcat	catggcta	tccacttcc	ctaataacc	ttctaccctg	actcaggaca	3780
agttacttgt	ccttttggcc	cagctggagg	ccttgaccca	acgtctgggt	gaactttctc	3840
agcaggtgg	cgagttgcga	gtacaaactg	agtctgctgt	cggcacggca	aagtctaaat	3900
aaaaaaatcc	cagaatcaat	gaataaataa	acaagcttgt	tgttgattta	aaatcaagt	3960
tttttatattc	atttttcgcg	cacggtatgc	cctagaccac	cgatctctat	cattgagaac	4020
tcggtggatt	ttttccagga	tcctatagag	gtgggattga	atgttttagat	acatgggcat	4080
taggccgtct	ttggggtgga	gatagctcca	ttgaagggat	tcatgctccg	gggtagtgtt	4140
gtaaatcacc	cagtcataac	aaggctgcag	tgcattggtg	tgacacaat	cttttagaag	4200
taggctgatt	gccacagata	agcccttgg	gtagggtgtt	acaaaccgg	tgagctggga	4260
tgggtgcatt	cggggtgaaa	ttatgtgcat	tttggttgg	atttttaagt	tggaatatt	4320
gccgccaaga	tccgctcttg	ggttcattgt	atgaaggacc	accaagacgg	tgtatccggt	4380
acatttagga	aatttatcgt	gcagcttgg	tggaagagc	tggaagaa	tgagacacc	4440
cttgtgtcct	ccaagatttt	ccatgcactc	atccatgata	atagcaatgg	ggccgtgggc	4500
agcggcgcg	gcaaacacgt	tccgtgggtc	tgacacatca	tagttatgtt	cctgagttaa	4560
atcatcataa	gccattttta	tgaatttggg	gcggagagta	ccagattggg	gtatgaatgt	4620
tccttcgggc	cccggagcat	agttccctc	acagatttgc	atttcccaag	ctttcagttc	4680
cgagggtgga	atcatgtcca	cctggggggc	tatgaaaaac	accgtttctg	ggcggggggt	4740
gattaattgt	gatgatagca	aatttctgag	caattgagat	ttgccacatc	cgggtggggc	4800
ataaatgatt	ccgattacgg	gttgcaggtg	gtagttagg	gaacggcaac	tgccgtcttc	4860
tcgaagcaag	ggggccacct	cgttcacatc	ttcccttaca	tgcatatttt	cccgcaccaa	4920
atccattagg	aggcgctctc	ctcctagtga	tagaagttct	tgtagtgagg	aaaagttttt	4980
cagcggtttc	agaccgtcag	ccatgggcat	tttgagagag	gtttgctgca	aaagttctag	5040

tctgttccac agttcagtga tgtgttctat ggcattctcga tccagcagac ctccctcgttt	5100
cgcggggtttg gacggctcct ggaatagggg atgagacgat gggcggtccag cgtggtccagg	5160
gttcgggtcct tccaggggtct cagtgttcga gtcaggggttg tttccgtcac agtgaagggg	5220
tgtgcgcctg cttgggcgct tgccaggggtg cgcttcagac tcatcctgct ggtcgaaaac	5280
ttctgtcgct tggcgccctg tatgtcggcc aagtagcagt ttaccatgag ttcgtagtgtg	5340
agcgccctcg ctgctgtggc tttggcgcg agcttacctt tggaggtttt cttgcatacc	5400
gggcagtata ggcattttcag cgcatacaac ttgggcgcaa ggaaaacgga ttctggggag	5460
tatgcatctg cgccgcagga ggcgcaaaca gtttcacatt ccaccagcca ggttaaattcc	5520
ggttcattgg ggtcaaaaac aagttttccg ccatattttt tgatgcgttt cttacctttg	5580
gtctccatga gttcgtgtcc tcgttgagtg acaaacaggc tgtccgtgtc ccgtagact	5640
gattttacag gctcttctc cagtggagtg cctcggtctt ctctgtacag gaactctgac	5700
cactctgata caaaggcgcg cgtccaggcc agcacaagg aggctatgtg ggaggggtag	5760
cgatcgttgt caaccagggg gtccacctt tccaaagtat gcaaacacat gtcacctct	5820
tcaacatcca ggaatgtgat tggctttag gtgtatttca cgtgacctg ggtccccgt	5880
gggggggtat aaaagggggc ggttctttgc tcttcctcac tgtcttccg atcgctgtcc	5940
aggaacgtca gctgttgggg taggtattcc ctctcgaagg cgggcatgac ctctgcactc	6000
aggttgtcag tttctaagaa cgaggaggat ttgatattga cagtgccggt tgagatgcct	6060
ttcatgaggt tttcgtccat ctggtcagaa aacacaattt ttttattgtc aagtttgggtg	6120
gcaaattgat catacagggc gttggataaa agtttgcaa tggatcgcat ggtttggttc	6180
ttttccttgt ccgcgcgctc tttggcgcg atgttgagtt ggacatactc gcgtgccagg	6240
cacttccatt cggggaagat agttgttaat tcatctggca cgattctcac ttgccacct	6300
cgattatgca aggttaattaa atccacactg gtggccacct cgctcgaag gggttcattg	6360
gtccaacaga gcctacctcc tttcctagaa cagaaagggg gaagtgggtc tagcataagt	6420
tcatcgggag ggtctgcac catggtaaaag attcccgga gtaaatcctt atcaaaatag	6480
ctgatgggag tgggggtcac taaggccatt tgccattctc gagctgccag tgcgcgctca	6540
tatgggttaa ggggactgcc ccatggcatg ggatgggtga gtgcagaggc atacatgcca	6600
cagatgtcat agacgtagat gggatcctca aagatgccta tgtaggttg atagcatcgc	6660
ccccctctga tacttgctcg cacatagtca tatagttcat gtgatggcg tagcagcccc	6720
ggaccaagt tgggtgcgatt gggtttttct gttctgtaga cgatctggcg aaagatggcg	6780
tgagaattgg aagagatggg gggctcttga aaaatgttga aatgggcatg aggttagacct	6840
acagagtctc tgacaaagtg ggcataagat tcttgaagct tggttaccag ttcggcggtg	6900
acaagtacgt ctagggcgca gtagtcaagt gtttcttgaa tgatgtcata acctgggttg	6960

tttttctttt	cccacagttc	gcggttgaga	aggtattctt	cgcgatcctt	ccagtactct	7020
tctagcggaa	acccgtcttt	gtctgcacgg	taagatccta	gcatgtagaa	ctgattaact	7080
gccttgtaag	ggcagcagcc	cttctctacg	ggtagagagt	atgcttgagc	agcttttcgt	7140
agcgaagcgt	gagtaagggc	aaaggtgtct	ctgaccatga	ctttgaggaa	ttggtatttg	7200
aagtcgatgt	cgtcacaggc	tccctgttcc	cagagttgga	agtctacccg	tttcttgtag	7260
gcgggggttg	gcaaagcgaa	agtaacatca	ttgaagagaa	tcttgccggc	cctgggcatg	7320
aaattgcgag	tgatgcgaaa	aggctgtggt	acttccgctc	ggttattgat	aacctgggca	7380
gctaggacga	tctcgtcgaa	accgttgatg	ttgtgtccta	cgatgtataa	ttctatgaaa	7440
cgcggcgtgc	ctctgacgtg	aggtagctta	ctgagctcat	caaagggttag	gtctgtgggg	7500
tcagataagg	cgtagtgttc	gagagcccat	tcgtgcagggt	gaggattcgc	tttaaggaaag	7560
gaggaccaga	ggtccactgc	cagtgtctgt	tgttaactggt	ccgggtactg	acgaaaatgc	7620
cgtccgactg	ccattttttc	tggggtgacg	caatagaagg	tttgggggtc	ctgccgccag	7680
cgatccact	tgagttttat	ggcgaggcca	taggcgatgt	tgacgagccg	ctggtctcca	7740
gagagtttca	tgaccagcat	gaaggggatt	agctgcttgc	caaaggaccc	catccagggtg	7800
taggtttcca	catcgtaggt	gagaaagagc	ctttctgtgc	gaggatgaga	gccaatcggg	7860
aagaactgga	tctcctgcca	ccagttggag	gaatggctgt	tgatgtgatg	gaagtagaac	7920
tccctgcgac	gcgccgagca	ttcatgcttg	tgttggtaca	gacggccgca	gtagtgcgag	7980
cgttgccacgg	gttgatatctc	gtgaatgagt	tgtacctggc	ttcccttgac	gagaaatttc	8040
agtgggaagc	cgaggcctgg	cgattgtatc	tcgtgcttta	ctatgttgtc	tgcatcggcc	8100
tgttcacctt	ctgtctcgat	ggtggtcacg	ctgacgagcc	ctcgcgggag	gcaagtccag	8160
acctcggcgc	ggcagggggc	gagctcgagg	acgagagcgc	gcaggctgga	gctgtccagg	8220
gtcctgagac	gctgcggact	caggttagta	ggcagtgcca	ggagattaac	ttgcatgatc	8280
ttttggaggg	cgtgcgggag	gttcagatag	tacttgatct	caacgggtcc	gttgggtggag	8340
atgtcgatgg	cttgccaggg	tccgtgtccc	ttgggcgcta	ccaccgtgcc	cttggtttttc	8400
attttggaag	gcgggtggctc	tgttgcttct	tgcatgttta	gaagcgggtg	cgagggcgcg	8460
caccgggcgg	caggggcggc	tcgggacccg	gcggcatggc	tggcagtggt	acgtcggcgc	8520
cgcgcgcggg	taggttctgg	tactgcgccc	tgagaagact	cgcattgcgc	acgacgcggc	8580
ggttgacatc	ctggatctga	cgcctctggg	tgaaagctac	cggccccgtg	agcttgaacc	8640
tgaaagagag	ttcaacagaa	tcaatctcgg	tatcgttgac	ggcggcttgc	ctaaggattt	8700
cttgccacgtc	accagagttg	tcttggtagg	cgatctccgc	catgaactgc	tcgatctctt	8760
cctcttgaag	atctccgcgg	cccgtctctc	cgacgggtggc	cgcgaggtcg	ttggagatgc	8820
gcccattgag	ttgagagaat	gcattcatgc	ccgcctcgtt	ccagacgcgg	ctgtagacca	8880

cgccccccac	gggatctctc	gcgcgcatga	ccacctgggc	gaggttgagc	tccacgtggc	8940
gggtgaagac	cgcatagttg	cataggcgct	ggaaaaggta	gttgagtgtg	gtggcgatgt	9000
gctcggtgac	gaagaaatac	atgatccatc	gtctcagcgg	catctcgctg	acatcgccca	9060
gagcttccaa	gcgctccatg	gcctcgtaga	agtccacggc	aaaattaaaa	aactgggagt	9120
ttcgcgcgga	cacgggtcaac	tcctcttcca	gaagacggat	aagttcggcg	atggtggtgc	9180
gcacctcgcg	ctcgaaagcc	cctgggattt	cttcctcaat	ctcttcttct	tccactaaca	9240
tctcttctc	ttcaggtggg	gctgcaggag	gagggggaac	gcggcgacgc	cggcggcgca	9300
cgggcagacg	gtcgatgaat	ctttcaatga	cctctccgcg	gcggcggcgc	atggtttcag	9360
tgacggcgcg	gccgttctcg	cgcggtcgca	gagtaaaaac	accgccgcgc	atctccttaa	9420
agtggtgact	gggaggttct	ccgtttggga	gggagagggc	gctgattata	cattttatta	9480
attggcccg	agggactgca	cgcagagatc	tgatcgtgtc	aagatccacg	ggatctgaaa	9540
acctttcgac	gaaagcgtct	aaccagtcac	agtcacaagg	taggctgagt	acggcttctt	9600
gtgggcgggg	gtggttatgt	gttcggtctg	ggtcttctgt	ttcttcttca	tctcggaag	9660
gtgagacgat	gctgctggtg	atgaaattaa	agtaggcagt	tctaagacgg	cggatggtgg	9720
cgaggagcac	caggtctttg	ggtccggctt	gctggatacg	caggcgattg	gccattcccc	9780
aagcattatc	ctgacatcta	gcaagatctt	tgtagtagtc	ttgcatgagc	cgttctacgg	9840
gcacttcttc	ctcaccctgt	ctgccatgca	tacgtgtgag	tccaaatccg	cgcattgggt	9900
gtaccagtgc	caagtcagct	acgactcttt	cggcgaggat	ggcttgctgt	acttgggtaa	9960
gggtggcttg	aaagtcatca	aaatccacaa	agcggtggtg	agctcctgta	ttaatggtgt	10020
aagcacagtt	ggccatgact	gaccagttaa	ctgtctggtg	accagggcgc	acgagctcgg	10080
tgtattttaag	gcgcgaatag	gcgcgggtgt	caaagatgta	atcgttgcag	gtgcgcacca	10140
gatactggta	ccctataaga	aaatgcggcg	gtggttggcg	gtagagaggc	catcgttctg	10200
tagctggagc	gccaggggcg	aggtcttcca	acataaggcg	gtgatagccg	tagatgtacc	10260
tggacatcca	ggtgattcct	gcggcggtag	tagaagcccc	aggaaactcg	cgtacgcggt	10320
tccaaatgtt	gcgtagcggc	atgaagtagt	tcattgtagg	cacggtttga	ccagtgaggc	10380
gcgcgcagtc	attgatgctc	tatagacacg	gagaaaatga	aagcgttcag	cgactcgact	10440
ccgtagcctg	gaggaacgtg	aacgggttgg	gtcgcgggtg	accccggttc	gagacttgta	10500
ctcgagccgg	ccggagccgc	ggctaacgtg	gtattggcac	tcccgctctg	accagccta	10560
caaaaatcca	ggatacggaa	tcgagtcgtt	ttgctggttt	ccgaatggca	gggaagtgag	10620
tcctatTTTT	TTTTTTTgcc	gctcagatgc	atcccgctgt	gcgacagatg	cgccccaac	10680
aacagcccc	ctcgcagcag	cagcagcagc	aatcacaaaa	ggctgtccct	gcaactactg	10740
caactgccgc	cgtgagcgg	gcgggacagc	ccgcctatga	tctggacttg	gaagagggcg	10800

aaggactggc acgtctaggt ggccttcac ccgagcggca tccgcgagtt caactgaaaa 10860
aagattctcg cgaggcgat gtgccccaac agaacctatt tagagacaga agcggcgagg 10920
agccggagga gatgcgagct tcccgttta acgcggtcg tgagctgct caccggttgg 10980
accgaagacg agtggtgcg gacgaggatt tcgaagttga tgaaatgaca gggatcagtc 11040
ctgccagggc acacgtggct gcagccaacc ttgtatcggc ttacgagcag acagtaaagg 11100
aagagcgtaa cttccaaaag tcttttaata atcatgtgcg aacctgatt gcccggaag 11160
aagttaccct tgggttgatg catttggtgg atttgatgga agctatcatt cagaacccta 11220
ctagcaaac tctgaccgcc cagctgtttc tgggtggtgca acacagcaga gacaatgagg 11280
ctttcagaga ggcgctgctg aacatcacgc aaccgaggg gagatggtt tatgatctta 11340
tcaacattct acagagtatc atagtgcagg agcggagcct gggcctggcc gagaagggtg 11400
ctgccatcaa ttactcggtt ttgagcttgg gaaaatatta cgctcgcaa atctacaaga 11460
ctccatacgt tcccatagac aaggaggtga agatagatgg gttctacatg cgcagcgc 11520
tcaaggctct gaccctgagc gatgatcttg ggggtgatcg caatgacaga atgcatcgcg 11580
cggttagcgc cagcaggagg cgcgagttaa gcgacaggga actgatgcac agtttgcaa 11640
gagctctgac tggagctgga accgagggtg agaattactt cgacatggga gctgacttgc 11700
agtggcagcc tagtcgcagg gctctgagcg ccgcgacggc aggatgtgag cttccttaca 11760
tagaagaggc ggatgaaggc gaggaggaag agggcgagta cttggaagac tgatggcaca 11820
acccgtgttt tttgctagat ggaacagcaa gcaccggatc ccgcaatgcg ggcggcgctg 11880
cagagccagc cgtccggcat taactcctcg gacgattgga ccaggccat gcaacgtatc 11940
atggcggtga cgactcgcaa cccgaagcc tttagacagc aaccgaggc caaccgtcta 12000
tcggccatca tggaagctgt agtgccctcc cgctctaata ccactcatga gaaggctctg 12060
gccatcgtga acgcgttggt ggagaacaaa gctattcgtc cagatgaggc cggactggta 12120
tacaacgctc tcttagaacg cgtggctcgc tacaacagta gcaatgtgca aaccaatttg 12180
gaccgtatga taacagatgt acgcgaagcc gtgtctcagc gcgaaagggt ccagcgtgat 12240
gccaacctgg gttcgctggg ggcgttaaata gctttcttga gtactcagcc tgctaattgtg 12300
ccgcgtggtc aacaggatta tactaacttt ttaagtgtt tgagactgat ggtatcagaa 12360
gtacctcaga gcgaagtgt tcagtcggg cctgattact tctttcagac tagcagacag 12420
ggcttgacga cggtaaactc gagccaagct tttaaaaacc tttaaagggt tgtggggagt 12480
gcatgccccg gtaggagaaa gagcaaccgt gtctagcttg ttaactccga actccgcct 12540
attattactg ttggtagctc ctttcaccga cagcggtagc atcgaccgta attcctattt 12600
gggttaccta ctaaactgt atcggaagc catagggcaa agtcagggtg acgagcagac 12660
ctatcaagaa attaccaag tcagtcgcgc tttgggacag gaagacactg gcagtttggg 12720

agccactctg aacttcttgc ttaccaatcg gtctcaaaag atccctcctc aatatgctct 12780
 tactgaggag gaggagagga tccttagata tgtgcagcag agcgtgggat tgtttctgat 12840
 gcaagagggg gcaactccga ctgcagcact ggacatgaca gcgcgaaata tggagcccag 12900
 catgtatgcc agtaaccgac ctttcattaa caaactgctg gactacttgc acagagctgc 12960
 cgctatgaac tctgattatt tcaccaatgc catcttaaac ccgactggc tgccccacc 13020
 tggtttctac acgggcgaat atgacatgcc cgacccta at gacggatttc tgtgggacga 13080
 cgtggacagc gatgtttttt cacctctttc tgatcatcgc acgtggaaaa aggaaggcgg 13140
 cgatagaatg cattcttctg catcgctgtc cggggctcatg ggtgctaccg cggctgagcc 13200
 cgagtctgca agtccttttc ctagtctacc cttttctcta cacagtgtac gtagcagcga 13260
 agtgggtaga ataagtcgcc cgagttaaat gggcgaagag gagtatctaa acgattcctt 13320
 gctcagaccg gcaagagaaa aaaatttccc aaacaatgga atagaaagt tgggtggataa 13380
 aatgagtaga tggaagactt atgctcagga tcacagagac gagcctggga tcatggggat 13440
 tacaagtaga gcgagccgta gacgccagcg ccatgacaga cagaggggtc ttgtgtggga 13500
 cgatgaggat tcggccgatg atagcagcgt gctggacttg ggtgggagag gaaggggcaa 13560
 cccgtttgct cttttgcgcc ctgcttggg tggatgttg taaaaaaaaa taaaaaaaaa 13620
 actcaccaag gccatggcga cgagcgtacg ttcgttcttc tttattatct gtgtctagta 13680
 taatgaggcg agtcgtgcta ggcggagcgg tgggtgatcc ggagggtcct cctccttctg 13740
 acgagagcgt gatgcagcag cagcaggcga cggcgggtgat gcaatcccca ctggaggctc 13800
 cctttgtgcc tccgcgatac ctggcaccta cggagggcag aaacagcatt cgttattcgg 13860
 aactggcacc tcagtacgat accaccagg tgtatctggt ggacaacaag tcggcggaca 13920
 ttgcttctct gaactatcag aatgaccaca gcaacttctt gaccacggtg gtgcaaaaca 13980
 atgactttac ccctacggaa gccagacccc agaccattaa ctttgatgaa cgatcgcgg 14040
 ggggcggtca gctaaagacc atcatgcata ctaacatgcc aaacgtgaac gagtatatgt 14100
 ttagtaacaa gttcaaagcg cgtgtgatgg tgtccagaaa acctcccgac ggtgtgcag 14160
 ttggggatac ttatgatcac aagcaggata ttttgaaata tgagtgggtc gagtttactt 14220
 tgccagaagg caacttttca gttactatga ctattgattt gatgaacaat gccatcatag 14280
 ataattactt gaaagtgggt agacagaatg gagtgcttga aagtacatt ggtgttaagt 14340
 tcgacaccag gaacttcaag ctgggatggg atcccgaaac caagttgatc atgcctggag 14400
 tgtatacgta tgaagccttc catcctgaca ttgtcttact gcctggctgc ggagtggatt 14460
 ttaccgagag tcgtttgagc aaccttcttg gtatcagaaa aaaacagcca tttcaagagg 14520
 gttttaagat tttgtatgaa gatttagaag gtggtaatat tccggccctc ttggatgtag 14580
 atgcctatga gaacagtaag aaagaacaaa aagccaaaat agaagctgct acagctgctg 14640

cagaagctaa ggcaaacata gttgccagcg actctacaag ggttgctaac gctggagagg 14700
 tcagaggaga caatthttgcy ccaacacctg ttccgactgc agaataatta ttggccgatg 14760
 tgtctgaagg aacggacgtg aaactcacta ttcaacctgt agaaaaagat agtaagaata 14820
 gaagctataa tgtgttgga gacaaaatca acacagccta tcgcagttgg tatctttcgt 14880
 acaattatgg cgatcccgaa aaaggagtgc gttcctggac attgctcacc acctcagatg 14940
 tcacctgcgg agcagagcag gtctactggg cgcttcacga catgatgaag gatcctgtca 15000
 ctttcgcgtc cactagacaa gtcagtaact accctgtggg ggggtgcagag cttatgcccc 15060
 tcttctcaaa gagcttctac aacgaacaag ctgtgtactc ccagcagctc cgccagtcca 15120
 cctcgcttac gcacgtcttc aaccgctttc ctgagaacca gattttaatc cgtccgccc 15180
 cgccaccat taccacgtc agtgaaaacg ttctgctct cacagatcac gggaccctgc 15240
 cgtgcgagc cagtatccgg ggagccaac gtgtgaccgt tactgacgcc agacgccga 15300
 cctgtcccta cgtgtacaag gcaactgggca tagtcgcacc gcgcgtcctt tcaagccga 15360
 ctttctaaaa aaaaaaaaaa tgtccattct tatctcgccc agtaataaca ccggttgggg 15420
 tctgcgcgct ccaagcaaga gtacggagg cgacgcaaa cgttctaccc aacatcctgt 15480
 ccgtgttcgc ggacattttc gcgtccatg gggcgccctc aagggccga ctcgcgttcg 15540
 aaccacgtc gatgatgtaa tcgatcaggg ggttgccgac gcccgtaatt atactctac 15600
 tgcgccata tctactgtgg atgcagttat tgacagtga gtggctgacg ctcgcaacta 15660
 tgctcgacgt aagagccggc gaaggcgcat tgccagacgc caccagccta ccactgcat 15720
 gcgagccga agagctctgc tacgaagagc tagacgcgtg gggcgaagag ccactgcttag 15780
 ggcggccaga cgtgcagctt cgggcgccag cgccggcagg tcccgaggc aagcagccgc 15840
 tgtcgacgc gcgactattg ccgacatggc ccaatcgca agaggcaatg tatactgggt 15900
 gcgtgacgt gccaccgtc aacgtgtacc cgtgcgcacc cgtccccctc gcacttagaa 15960
 gatactgac agtctccgat gttgtgtccc agcggcgagg atgtccaagc gcaaatacaa 16020
 ggaagaaatg ctgcaggta tcgcacctga agtctacggc caaccgttga aggatgaaaa 16080
 aaaacccgc aaaatcaagc ggggttaaaa ggacaaaaa gaagaggaag atggcgatga 16140
 tgggctggcg gagtttgtgc gcgagttgtc ccacggcga cgcgtgcaat ggcgtggggc 16200
 caaagttcga catgtgttga gacctggaac ttcggtggtc ttacacccg gcgagcgttc 16260
 aagcgctact ttaagcgtt cctatgatga ggtgtacggg gatgatgata ttcttgagca 16320
 ggcggctgac cgattaggcg agtttgctta tggcaagcgt agtagaataa cttccaagga 16380
 tgagacagt tcgataccct tggatcatgg aaatccacc cctagtctta aaccggtcac 16440
 tttgcagcaa gtgttaccgc taactccgcg aacaggtgtt aaacgcgaag gtgaagattt 16500
 gtatccact atgcaactga tggtaaccaa acgcagaag ttggaggacg ttttggagaa 16560

agtaaaagtg gatccagata ttcaacctga ggtaaagtg agaccatta agcaggtagc 16620
 gcctgggtctg ggggtacaaa ctgtagacat taagattccc actgaaagta tggaagtgc 16680
 aactgaaccc gcaaagccta ctgccacctc cactgaagtg caaacggatc catggatgcc 16740
 catgcctatt acaactgacg ccgccggtcc cactcgaaga tcccgcgaa agtacgggtcc 16800
 agcaagtctg ttgatgccc attatgttgt acacccatct attattccta ctctgggtta 16860
 ccgaggcact cgctactatc gcagccgaaa cagtacctcc cgccgtcgcc gcaagacacc 16920
 tgcaaatcgc agtcgtcgcc gtagacgcac aagcaaaccg actcccggcg ccctgggtgcg 16980
 gcaagtgtac cgcaatggta gtgcggaacc tttgacactg ccgcgtgcgc gttaccatcc 17040
 gagtatcatc acttaataca tgttgccgct gcctccttgc agatatggcc ctcaattgtc 17100
 gccttcgctg tcccatcact ggttaccgag gaagaaactc gcgccgtaga agagggatgt 17160
 tgggacgcgg aatgcgacgc tacaggcgac ggcgtgctat ccgcaagcaa ttgcgggggtg 17220
 gttttttacc agccttaatt ccaattatcg ctgctgcaat tggcgcgata ccaggcatag 17280
 ctccgtggc gggttcaggcc tcgcaacgac attgacattg gaaaaaacg tataataaaa 17340
 aaaaaaaaaa tacaatggac tctgacactc ctggtcctgt gactatgttt tcttagagat 17400
 ggaagacatc aatttttcat ccttggctcc gcgacacggc acgaagccgt acatgggcac 17460
 ctggagcgac atcggcacga gccaaactgaa cgggggcgcc ttcaattgga gcagtatctg 17520
 gagcgggctt aaaaattttg gctcaaccat aaaaacatac gggaacaaag cttggaacag 17580
 cagtacagga caggcgctta gaaataaact taaagaccag aacttccaac aaaaagtagt 17640
 cgatgggata gcttccggca tcaatggagt ggtagatttg gctaaccagg ctgtgcagaa 17700
 aaagataaac agtcgttttg acccgccgcc agcaaccca ggtgaaatgc aagtggagga 17760
 agaaattcct ccgccagaaa aacgaggcga caagcgtccg cgtcccatt tggaagagac 17820
 gctggtagac cgcgtagatg aaccgccttc ttataggaa gcaacgaagc ttggaatgcc 17880
 caccactaga ccgatagccc caatggccac cggggtgatg aaaccttctc agttgcatcg 17940
 acccgtcacc ttggatttgc cccctcccc tgctgtact gctgtaccg cttctaagcc 18000
 tgtcgtgcc ccgaaaccag tcgccgtagc caggtcacgt cccggggcg ctctcgtcc 18060
 aaatgcgcac tggcaaaata ctctgaacag catcgtgggt ctaggcgtgc aaagtgtaaa 18120
 acgcgctgc tgcttttaat taaatatgga gtagcgctta acttgcctat ctgtgtatat 18180
 gtgtcattac acgccgtcac agcagcagag gaaaaaagga agaggctgtg cgtcgacgct 18240
 gagttacttt caagatggcc accccatcga tgctgcccc atgggcatac atgcacatcg 18300
 ccggacagga tgcttcggag tacctgagtc cgggtctggt gcagttcgcc cgcgccacag 18360
 acacctactt caatctggga aataagttta gaaatccac cgtagcgccg acccacgatg 18420
 tgaccaccga ccgtagccag cggctcatgt tgcgcttctg gcccggtgac cgggaggaca 18480

atacatactc ttacaaagtg cggtagacccc tggccgtggg cgacaacaga gtgctggata 18540
 tggccagcac gttctttgac attaggggtg tgttgacag aggtcccagt ttcaaaccct 18600
 attctggtac ggcttacaac tccctggctc ctaaaggcgc tccaaatata tctcagtggg 18660
 ttgcagaagg tgtaaaaaat acaactgggtg aggaacacgt aacagaagag gaaaccaata 18720
 ctactactta cacttttggc aatgctcctg taaaagctga agctgaaatt acaaaagaag 18780
 gactcccagt aggttttgaa gtttcagatg aagaaagtaa accgatttat gctgataaaa 18840
 catatcagcc agaacctcag ctgggagatg aaacttggac tgaccttgat ggaaaaaccg 18900
 aaaagtatgg aggcagggct ctcaaaccgc atactaagat gaaaccatgc tacgggtcct 18960
 ttgccaaacc tactaatgtg aaaggcggctc aggcataaaca aaaaacaacg gagcagccaa 19020
 atcagaaagt cgaatatgat atcgacatgg agttttttga tgcggcatcg cagaaaacaa 19080
 acttaagtcc taaaattgtc atgtatgcag aaaatgtaaa tttggaaact ccagacactc 19140
 atgtagtgta caaacctgga acagaagaca caagttccga agctaatttg ggacaacaat 19200
 ctatgcccaa cagacccaac tacattggct tcagagataa ctttattgga cttatgtact 19260
 ataacagtac tggtaacatg ggggtgctgg ctggtcaagc gtctcagtta aatgcagtgg 19320
 ttgacttgca ggacagaaac acagaacttt cttaccaact cttgcttgac tctctgggcg 19380
 acagaaccag atactttagc atgtggaatc aggtctgga cagttatgat cctgatgtac 19440
 gtgttattga aaatcatggt gtggaagatg aacttcccaa ctactgtttt cactggacg 19500
 gcataggtgt tccaacaacc agttacaaat caatagttcc aaatggagac aatgcgccta 19560
 attggaagga acctgaagta aatggaacaa gtgagatcgg acagggtaat ttgtttgcca 19620
 tggaaattaa ccttcaagcc aatctatggc gaagtttcct ttattccaat gtggctctat 19680
 atctcccaga ctctgtaaaa tacaccccgt ccaatgtcac tcttccagaa aacaaaaaca 19740
 cctacgacta catgaacggg cgggtgggtg cgccatctct agtagacacc tatgtgaaca 19800
 ttggtgccag gtggtctctg gatgccatgg acaatgtcaa ccattcaac caccaccgta 19860
 acgtgggctt gcgttaccga tccatgcttc tgggtaacgg acgttatgtg cctttccaca 19920
 tacaagtgcc tcaaaaattc ttcgctgtta aaaacctgct gcttctccca ggctcctaca 19980
 cttatgagtg gaactttagg aaggatgtga acatgggtct acagagttcc ctcggtaacg 20040
 acctgcggtt agatggcgcc agcatcagtt tcacgagcat caacctctat gctacttttt 20100
 tccccatggc tcacaacacc gcttccaccc ttgaagccat gctgcggaat gacaccaatg 20160
 atcagtcatt caacgactac ctatctgcag ctaacatgct ctacccatt cctgccaatg 20220
 caaccaatat tcccatttcc attccttctc gcaactgggc ggctttcaga ggctgggtcat 20280
 ttaccagact gaaaaccaa gaaactccct ctttgggggtc tggatttgac ccctactttg 20340
 tctattctgg ttctattccc tacctggatg gtaccttcta cctgaaccac acttttaaga 20400

aggtttccat catgtttgac tcttcagtga gctggcctgg aaatgacagg ttactatctc 20460
 ctaacgaatt tgaaataaag cgcactgtgg atggcggaagg ctacaacgta gcccaatgca 20520
 acatgaccaa agactgggttc ttggtacaga tgctcgccaa ctacaacatc ggctatcagg 20580
 gcttctacat tccagaagga tacaaagatc gcatgtattc atttttcaga aacttccagc 20640
 ccatgagcag gcaggtgggt gatgaggtca attacaaaga cttcaaggcc gtcgccatac 20700
 cctaccaaca caacaactct ggctttgtgg gttacatggc tccgaccatg cgccaaggtc 20760
 aacctatcc cgctaactat ccctatccac tcattggaac aactgccgta aatagtgtta 20820
 cgagaaaaa gttcttgtgt gacagaacca tgtggcgcac accgttctcg agcaacttca 20880
 tgtctatggg ggcccttaca gacttgggac agaatatgct ctatgccaac tcagctcatg 20940
 ctctggacat gacctttgag gtggatccca tggatgagcc caccctgctt tatcttctct 21000
 tcgaagtttt cgacgtggtc agagtgcac agccacaccg cggcatcatc gaggcagtct 21060
 acctgcgtac accgttctcg gccggtaacg ctaccacgta agaagcttct tgcttcttgc 21120
 aaatagcagc tgcaaccatg gcctgcggat cccaaaacgg ctccagcgag caagagctca 21180
 gagccattgt ccaagacctg gggtgcggac cctatttttt gggaacctac gataagcgct 21240
 tcccggggtt catggcccc gataagctcg cctgtgccat tgtaaatacg gccggacgtg 21300
 agacgggggg agagcactgg ttggctttcg gttggaacc acgttctaac acctgctacc 21360
 tttttgatcc ttttggattc tcggatgatc gtctcaaaca gatttaccag tttgaatatg 21420
 aggttctcct gcgccgcagc gctcttgcta ccaaggaccg ctgtattacg ctggaaaaat 21480
 ctaccagac cgtgcagggt ccccgttctg ccgctgcgg acttttctgc tgcattgtcc 21540
 ttcacgcctt tgtgactgg cctgaccgtc ccatggacgg aaacccacc atgaaattgc 21600
 taactggagt gccaaacaac atgcttcatt ctctaaagt ccagccacc ctgtgtgaca 21660
 atcaaaaagc actctaccat tttcttaata cccattcgcc ttattttcgc tcccatcgta 21720
 cacacatcga aaggccact gcgttcgacc gtatggatgt tcaataatga ctcatgtaaa 21780
 caacgtgttc aataaacatc actttatttt ttacatgta tcaaggctct gcattactta 21840
 tttatttaca agtcgaatgg gttctgacga gaatcagaat gaccgcagg cagtgatagc 21900
 ttgcggaact gatacttggg ttgccacttg aattcgggaa tcaccaactt gggaaccggt 21960
 atatcgggca ggatgtcact ccacagcttt ctggtcagct gcaaagctcc aagcaggcca 22020
 ggagccgaaa tcttgaaatc acaattagga ccagtgttt gagcgcgaga gttgcggtac 22080
 accggattgc agcactgaaa caccatcagc gacggatgtc tcacgcttgc cagcacggtg 22140
 ggatctgcaa tcatgccac atccagatct tcagcattgg caatgctgaa cggggtcac 22200
 ttgcaggctc gcctacccat ggcgggcacc caattaggct tgtggttgca atcgcagtgc 22260
 agggggatca gtatcatctt ggctgatcc tgtctgattc ctggatacac ggctctcatg 22320

aaagcatcat attgcttgaa agcctgctgg gctttactac cctcgggtata aaacatcccc 22380
 caggacctgc tcgaaaactg gttagctgca cagccggcat cattcacaca gcagcggggc 22440
 tcattgttag ctatttgac cacacttctg cccagcggg tttgggtgat tttgggtcgc 22500
 tcgggattct cctttaaggc tcgttgctcc ttctcgtgg ccacatccat ctcgataatc 22560
 tgctccttct gaatcataat attgccatgc aggcacttca gcttgccctc ataatacattg 22620
 cagccatgag gccacaacgc acagcctgta cattcccaat tatgggtggg gatctgagaa 22680
 aaagaatgta tcattccctg cagaaatctt cccatcatcg tgctcagtgt cttgtgacta 22740
 gtgaaagtta actggatgcc tcggtgctcc tcgtttacgt actggtgaca gatgcgcttg 22800
 tattgttcgt gttgctcagg cattagtta aaagagggtc taagtctgtt atccagcctg 22860
 tacttctcca tcagcagaca catcacttcc atgcctttct cccaagcaga caccaggggc 22920
 aagctaactc gattcttaac agtgcaggca gcagctcctt tagccagagg gtcactctta 22980
 gcgatcttct caatgcttct tttgccatcc ttctcaacga tgcgcacggg cgggtagctg 23040
 aaaccactg ctacaagttg cgctcttct ctttcttctt cgctgtcttg actgatgtct 23100
 tgcattggga tatgtttggg cttccttggc ttctttttgg ggggtatcgg aggaggagga 23160
 ctgtcgtctc gttccggaga caggaggat tgtgacgttt cgctcaccat taccaactga 23220
 ctgtcggtag aagaacctga cccacacgg cgacagggtt ttctcttcgg gggcagagg 23280
 ggaggcgatt gcgaagggtc gcggtccgac ctggaaggcg gatgactggc agaaccctt 23340
 ccgcttcgg ggggtgtgct cctgtggcgg tcgcttaact gatttcttc gcggctggcc 23400
 attgtgttct cctaggcaga gaaacaacag acatggaaac tcagccattg ctgtcaacat 23460
 cgccacgagt gccatcacat ctctcctca gcgacgagga aaaggagcag agcttaagca 23520
 ttccaccgcc cagtcttgc accacctcta ccctagaaga taaggagggt gacgcatctc 23580
 atgacatgca gaataaaaaa gcgaaagagt ctgagacaga catcgagcaa gaccgggct 23640
 atgtgacacc ggtggaacac gaggaagagt tgaaacgctt tctagagaga gaggatgaaa 23700
 actgccccaa acaacgagca gataactatc accaagatgc tggaaatagg gatcagaaca 23760
 ccgactacct catagggctt gacggggaag acgcgctcct taaacatcta gcaagacagt 23820
 cgctcatagt caaggatgca ttattggaca gaactgaagt gcccacagt gtggaagagc 23880
 tcagccgcgc ctacgagctt aacctctttt cacctcgtac tcccccaaa cgtcagccaa 23940
 acggcacctg cgagccaaat cctcgcttaa acttttatcc agcttttgct gtgccagaag 24000
 tactggctac ctatcacatc ttttttaaaa atcaaaaaat tccagtctcc tgccgcgcta 24060
 atgcacccg cgccgatgcc ctactcaatc tgggacctgg ttcacgctta cctgatatag 24120
 cttccttggg agaggttcca aagatcttcg agggctctgg caataatgag actcggggccg 24180
 caaatgctct gcaaaaggga gaaaatggca tggatgagca tcacagcgtt ctggtggaat 24240

tggaaggcga	taatgccaga	ctcgagtagc	tcaagcgaag	catcgaggtc	acacacttcg	24300
catatcccgc	tgtcaacctg	ccccctaaag	tcatgacggc	ggatcatggac	cagttactca	24360
ttaagcgcgc	aagtcccctt	tcagaagaca	tgcagacccc	agatgcctgt	gatgagggtg	24420
aaccagtggg	cagtgatgag	cagctaaccc	gatggctggg	caccgactct	cccagggatt	24480
tggaagagcg	tcgcaagctt	atgatggccg	tgggtgctgg	taccgtagaa	ctagagtgtc	24540
tccgacgttt	ctttaccgat	tcagaaacct	tgcgcaaact	cgaagagaat	ctgcactaca	24600
cttttagaca	cggctttgtg	cggcaggcat	gcaagatatc	taacgtggaa	ctcaccaacc	24660
tggtttctta	catgggtatt	ctgcatgaga	atcgccatag	acaaagcgtg	ctgcacagca	24720
ccctgaaggg	ggaagcccgc	cgtgattaca	tccgcgattg	tgtctatctg	tacctgtgcc	24780
acacgtggca	aaccggcatg	ggtgtatggc	agcaatgttt	agaagaacag	aacttgaaa	24840
agcttgacaa	gctcttacag	aaatctctta	aggttctgtg	gacaggggtc	gacgagcgca	24900
ccgtcgcttc	cgacctggca	gacctcatct	tcccagagcg	tctcaggggt	actttgcgaa	24960
acggattgcc	tgactttatg	agccagagca	tgcttaacaa	ttttcgctct	ttcatcctgg	25020
aacgctccgg	tatcctgccc	gccacctgct	gcgcactgcc	ctccgacttt	gtgcctctca	25080
cctaccgcga	gtgccccccg	ccgctatgga	gtcactgcta	cctgttccgt	ctggccaact	25140
atctctccta	ccactcggat	gtgatcgagg	atgtgagcgg	agacggcttg	ctggagtgtc	25200
actgccgctg	caatctgtgc	acgccccacc	ggtccttagc	ttgcaacccc	cagttgatga	25260
gcgaaacca	gataataggc	acctttgaat	tgcaaggccc	cagcagccaa	ggcgatgggt	25320
cttctcctgg	gcaaagttaa	aaactgaccc	cgggactgtg	gacctccgcc	tacttgcgca	25380
agtttgctcc	ggaagattac	caccctatg	aatcaagtt	ctatgaggac	caatcacagc	25440
ctccaaaggc	cgaactttcg	gcctgcgtca	tcaccaggg	ggcaattctg	gccaattgca	25500
aagccatcca	aaaatcccgc	caagaatttc	tactgaaaaa	gggtaagggg	gtctaccttg	25560
acccccagac	cggcgaggaa	ctcaacacaa	ggttccctca	ggatgtccca	acgacgagaa	25620
aacaagaagt	tgaaggtgca	gccgcccgc	ccagaagata	tggaggaaga	ttgggacagt	25680
caggcagagg	aggcgaggga	ggacagtctg	gaggacagtc	tggaggaaga	cagtttgag	25740
gaggaaaacg	aggaggcaga	ggaggtggaa	gaagtaaccg	ccgacaaaca	gttatcctcg	25800
gctgcggaga	caagcaacag	cgctaccatc	tccgctccga	gtcgaggaac	ccggcggcgt	25860
cccagcagta	gatgggacga	gaccggacgc	ttcccgaaac	caaccagcgc	ttccaagacc	25920
ggtaagaagg	atcggcaggg	atacaagtcc	tggcgggggc	ataagaatgc	catcatctcc	25980
tgcttgcatg	agtgcggggg	caacatatcc	ttcacgcggc	gctacttgct	attccaccat	26040
ggggtgaaact	ttccgcgcaa	tgttttgcat	tactaccgtc	acctccacag	cccctactat	26100
agccagcaaa	tcccggcagt	ctcgacagat	aaagacagcg	gcggcgacct	ccaacagaaa	26160

accagcagcg gcagttagaa aatacacaac aagtgcagca acaggaggat taaagattac 26220
 agccaacgag ccagcgcaaa cccgagagtt aagaaatcgg atctttccaa ccctgtatgc 26280
 catcttccag cagagtcggg gtcaagagca ggaactgaaa ataaaaaacc gatctctgcg 26340
 ttcgctcacc agaagttgtt tgtatcacia gagcgaagat caacttcage gcactctcga 26400
 ggacgcccag gctctcttca acaagtactg cgcgctgact cttaaagagt aggcagcgac 26460
 cgcgcttatt caaaaaaggc gggaattaca tcactctcga catgagtaaa gaaattccca 26520
 cgccttacat gtggagttat caaccccaaa tgggattggc ggacggcgcc tcccaggact 26580
 actccacccg catgaattgg ctacgagccg ggccttctat gatttctcga gttaattgata 26640
 tacgcgcta ccgaaaccaa atacttttgg aacagtcage tcttaccacc acgccccgcc 26700
 aacaccttaa tcccagaaat tggcccgccg ccctagtgtt ccaggaaagt cccgctccca 26760
 ccactgtatt acttctcga gacgcccagg ccgaagtcca aatgactaat gcaggtgcgc 26820
 agttagctgg cggctccacc ctatgtcgtc acaggcctcg gcataatata aaacgcctga 26880
 tgatcagagg ccgaggtatc cagctcaacg acgagtcggt gagctctccg cttggtctac 26940
 gaccagacgg aatctttcag attgccggct gcgggagatc ttccttcacc cctcgtcagg 27000
 ctgttctgac tttggaaagt tcgtcttcgc aaccccgctc gggcggaatc gggaccgttc 27060
 aatttgtgga ggagtttact ccctctgtct acttcaacc cttctccgga tctcctgggc 27120
 attacccgga cgagttcata ccgaacttcg acgcgattag cgagtcagtg gacggctacg 27180
 attgatgtct ggtgacgcgg ctgagctatc tcggctgcga catctagacc actgccgccg 27240
 ctttctgtgc tttgcccggg aactcattga gttcatctac ttcgaactcc ccaaggatca 27300
 ccctcaaggc ccggccacg gagtgcggat ttctatcgaa ggcaaaatag actctcgcct 27360
 gcaacgaatt ttctcccage ggcccggtgt gatcgagcga gaccagggaa acaccacggc 27420
 ttccatctac tgcatttgta atcaccocgg attgcatgaa agcctttgct gtcttatgtg 27480
 tactgagttt aataaaaact gaattaagac tctctacgg actgccgctt cttcaaccgc 27540
 gattttacia ccagaagaac gaaacttttc ctgtcgtcca ggactctggt aacttcacct 27600
 ttctactca caaactagaa gctcaacgac tacaccgctt ttccagaagc attttcccta 27660
 ctaatactac tttcaaaacc ggaggtgagc tccaaggctt tcctacagaa aacccttggg 27720
 tggaagcggg ccttgtagtg ctaggaaatc ttgcgggtgg gcttggtgatt attctttgct 27780
 acctatacac accttgcttc actttcttag tgggtgtgtg gtattggttt aaaaaatggg 27840
 gccatacta gtcttgcttg ttttactttc gcttttggaa ccgggttctg ccaattacga 27900
 tccatgtcta gacttcgacc cagaaaactg cacacttact ttgcacccg acacaagccg 27960
 catctgtgga gttcatcgcc tctcttacga acttggcccc caacgacaaa aatttacctg 28020
 catggtggga atcaacccca tagttatcac ccagcaaagt ggagatacta agggttgcat 28080

tcactgctcc	tgcgattcca	tcgagtgcac	ctacaccctg	ctgaagaccc	tatgcggcct	28140
aagagacctg	ctaccaatga	attaaaaaat	gattaataaa	aatcactta	cttgaaatca	28200
gcaataaggt	ctctgttgaa	atcttctccc	agcagcacct	cacttccctc	ttcccaactc	28260
tgggtattcta	aaccccgttc	agcggcatac	tttctccata	ctttaaagg	gatgtcaa	28320
tttagctcct	ctcctgtacc	cacaatcttc	atgtctttct	tcccagatga	ccaagagagt	28380
ccggtcagtc	gactccttca	accctgtcta	cccctatgaa	gatgaaagca	cctcccaaca	28440
cccctttata	aaccaggggt	ttatttcccc	aatggcttc	acacaaagcc	caaacggagt	28500
tcttacttta	aatgttttaa	cccactaac	aaccacaggc	ggatctctac	agctaaaagt	28560
gggaggggga	cttacagtgg	atgacaccaa	cggttttttg	aaagaaaaca	taagtgccac	28620
cacaccactc	gttaagactg	gtcactctat	aggtttacca	ctaggagccg	gattgggaac	28680
gaatgaaaat	aaactttgta	tcaaattagg	acaaggactt	acattcaatt	caaacaacat	28740
ttgcattgat	gacaatatta	acaccttatg	gacaggagtc	aacccaccg	aagccaactg	28800
tcaaatacatg	aactccagtg	aatctaata	ttgcaaatta	attctaacac	tagttaaaac	28860
tggagcacta	gtcactgcat	ttgtttatgt	tataggagta	tctaacaatt	ttaatatgct	28920
aactacacac	agaaatataa	atcttactgc	agagctgttt	ttcgattcta	ctggtaattt	28980
actaactaga	ctctcatccc	tcaaaactcc	acttaatacat	aatcaggac	aaaacatggc	29040
tactgggtgcc	attactaatg	ctaaagggtt	catgcccagc	acgactgcct	atcctttcaa	29100
tgataattct	agagaaaaag	aaaactacat	ttacggaact	tgttactaca	cagctagtga	29160
tcgcactgct	tttcccattg	acatatctgt	catgcttaac	cgaagagcaa	taaatgacga	29220
gacatcatat	tgtattcgta	taacttggtc	ctggaacaca	ggagatgccc	cagaggtgca	29280
aacctctgct	acaaccctag	tcacctcccc	atttaccttt	tactacatca	gagaagacga	29340
ctgacaaata	aagtttaact	tgtttatttg	aaaatcaatt	cacaaaatcc	gagtagttat	29400
tttgctccc	ccttcccatt	taacagaata	caccaatctc	tccccacgca	cagctttaaa	29460
catttgata	ccattagata	tagacatggt	tttagattcc	acattccaaa	cagtttcaga	29520
gcgagccaat	ctggggtcag	tgatagataa	aatccatcg	ggatagtctt	ttaaagcgct	29580
ttcacagtcc	aactgctgcg	gatgcgactc	cggagtctgg	atcacggtca	tctggaagaa	29640
gaacgatggg	aatcataatc	cgaaaacggt	atcggacgat	tgtgtctcat	caaaccacaa	29700
agcagccgct	gtctgcgtcg	ctccgtgcga	ctgctgttta	tgggatcagg	gtccacagtg	29760
tcctgaagca	tgattttaat	agcccttaac	atcaactttc	tgggtcgatg	cgcgcagcaa	29820
cgcattctga	tttactcaa	atctttgcag	taggtacaac	acattattac	aatattgttt	29880
aataaaccat	aattaaaagc	gtccagcca	aaactcatat	ctgatataat	cgcacctgca	29940
tgaccatcat	accaaagttt	aatataaatt	aatgacgtt	ccctcaaaaa	cacactaccc	30000

acatacatga tctcttttgg catgtgcata ttaacaatct gtctgtacca tggacaacgt 30060
 tggttaatca tgcaacccaa tataaccttc cggaaccaca ctgccaacac cgctcccca 30120
 gccatgcatt gaagtgaacc ctgctgatta caatgacaat gaagaacca attctctcga 30180
 ccgtgaatca cttgagaatg aaaaatatct atagtggcac aacatagaca taaatgcatg 30240
 catctttctca taatttttaa ctctcagga tttagaaaca tatcccaggg aataggaagc 30300
 tcttgcagaa cagtaaagct ggcagaacaa ggaagaccac gaacacaact tacactatgc 30360
 atagtcatag tatcacaatc tggcaacagc ggggtggtctt cagtcataga agctcgggtt 30420
 tcattttcct cacaacgtgg taactgggct ctggtgtaag ggtgatgtct ggcgcatgat 30480
 gtcgagcgtg cgcgcaacct tgtcataatg gagttgcttc ctgacattct cgtattttgt 30540
 atagcaaaac ggggccctgg cagaacacac tcttcttcgc cttctatcct gccgcttagc 30600
 gtgttcctg tgatagttca agtacaacca cactcttaag ttggtcaaaa gaatgctggc 30660
 ttcagttgta atcaaaactc catcgcatct aatcgttctg aggaaatcat ccaagcaatg 30720
 caactggatt gtgtttcaag caggagagga gaggggaagag acggaagaac catgttaatt 30780
 tttattccaa acgatctcgc agtacttcaa attgtagatc gcgcagatgg catctctcgc 30840
 cccactgtg ttggtgaaaa agcacagcta gatcaaaaaga aatgcgattt tcaagggtgct 30900
 caacggtggc ttccagcaaa gcctccacgc gcacatccaa gaacaaaaga atacaaaag 30960
 aaggagcatt ttctaactcc tcaatcatca tattacattc ctgcaccatt cccagataat 31020
 tttcagcttt ccagccttga attattcgtg tcagttcttg tggtaaato c aatccacaca 31080
 ttacaaacag gtcccgagg ggcacctcca ccaccattct taaacacacc ctcataatga 31140
 caaaatatct tgctcctgtg tcacctgtag cgaattgaga atggcaacat caattgacat 31200
 gcccttggt ctaagttctt ctttaagttc tagttgtaaa aactctctca tattatcacc 31260
 aaactgctta gccagaagcc ccccggaac aagagcaggg gacgctacag tgcagtacaa 31320
 gcgcagacct cccaattgg ctccagcaaa aacaagattg gaataagcat attgggaacc 31380
 gccagtaata tcatcgaagt tgctggaaat ataatcaggc agagtttctt gtaaaaattg 31440
 aataaaagaa aaatttgcca aaaaaacatt caaacctct gggatgcaaa tgcaataggt 31500
 taccgcgtg cgctccaaca ttgttagttt tgaattagtc tgcaaaaata aaaaaaaaaa 31560
 caagcgtcat atcatagtag cctgacgaac agatggataa atcagtcttt ccatcacaag 31620
 acaagccaca gggctctccag ctgcacctc gtaaacctg tcatcatgat taaacaacag 31680
 caccgaaagt tcctcgcggt gaccagcatg aataattctt gatgaagcat acaatccaga 31740
 catgttagca tcagttaacg agaaaaaaca gccaacatag cctttgggta taattatgct 31800
 taatcgtaag tatagcaaag ccacctctc cgatacaaaa gtaaaaggca caggagaata 31860
 aaaaatataa ttatttctct gctgctgttc aggcaacgtc gccccggtc cctctaaata 31920

cacatacaaa gcctcatcag ccatggctta ccagacaaag tacagcgggc acacaaagca 31980
 caagctctaa agtgactctc caacctctcc acaatatata tatacacaag ccctaaactg 32040
 acgtaatggg agtaaagtgt aaaaaatccc gccaaacca acacacaccg cgaaactgcg 32100
 tcaccaggga aaagtacagt ttcacttccg caatcccaac aggcgtaact tcctctttct 32160
 cacggtacgt gatatcccac taacttgcaa cgtcattttc ccacggtcgc accgcccctt 32220
 ttagccgtta accccacagc caatcaccac acgatccaca ctttttaaaa tcacctcatt 32280
 tacatattgg caccattcca tctataaggt atattatata gatag 32325

<210> 2

<211> 34794

<212> ДНК

<213> Аденовирус

<400> 2

ctatctatat aatatacctt atagatggaa tgggtccaat atgtaaata ggtgatttta 60
 aaaagtgtgg atcgtgtggt gattggctgt ggggttaacg gctaaaagg gcggtgcgac 120
 cgtgggaaaa tgacgttttg tgggggtgga gtttttttgc aagttgtcgc gggaaatgtg 180
 acgcataaaa aggcctttttt ctcacggaac tacttagttt tcccacggta tttaacagga 240
 aatgaggtag ttttgaccgg atgcaagtga aaattgttga ttttcgcgcg aaaactgaat 300
 gaggaagtgt ttttctgaat aatgtggtat ttatggcagg gtggagtatt tgttcagggc 360
 caggtagact ttgaccatt acgtggaggt ttcgattacc gtgtttttta cctgaatttc 420
 cgcgtaccgt gtcaaagtct tctgttttta cgtagggtgc agctgatcgc tagggatttt 480
 atacctcagg gtttgtgtca agaggccact cttgagtgcc agcgagaaga gttttctcct 540
 ctgcgcgggc agtttaataa taaaaaatg agagatttgc gatttctgcc tcaggaaata 600
 atctctgctg agactggaaa tgaaatattg gagcttgtgg tgcacgccct gatgggagac 660
 gatccggagc cacctgtgca gctttttgag cctcctacgc ttcaggaact gtatgattta 720
 gaggtagagg gatcggagga ttctaattgag gaagctgtaa atggcttttt taccgattct 780
 atgcttttag ctgctaata agggtttaga ttagatccgc ctttgacac ttttgatact 840
 ccaggggtaa ttgtggaaag cggtagaggt gtaagaaaat tacctgattt gagttccgtg 900
 gactgtgatt tgcactgcta tgaagacggg tttcctccga gtgatgagga ggaccatgaa 960
 aaggagcagt ccatgcagac tgcagcgggt gagggagtga aggctgcaa tgttggtttt 1020
 cagttggatt gcccgagct tcctggacat ggctgtaagt cttgtgaatt tcacaggaaa 1080
 aatactggag taaaggaact gttatgttcg ctttgttata tgagaacgca ctgccacttt 1140
 atttacagta agtgtgttta agttaaaatt taaaggaata tgctgttttt cacatgtata 1200
 ttgagtgtga gttttgtgct tcttattata ggtcctgtgt ctgatgctga tgaatcacca 1260
 tctcctgatt ctactacctc acctcctgag attcaagcac ctgttcctgt ggacgtgcgc 1320

aagcccatc	ctgtgaagct	taagcctggg	aaacgtccag	cagtggaaaa	acttgaggac	1380
ttgttacagg	gtggggacgg	acctttggac	ttgagtacac	ggaaacgtcc	aagacaataa	1440
gtgttccata	tccgtgttta	cttaaggtga	cgtcaatatt	tgtgtgacag	tgcaatgtaa	1500
taaaaatatg	ttaactgttc	actgggtttt	attgcttttt	gggcggggac	tcaggatat	1560
aagtagaagc	agacctgtgt	ggttagctca	taggagctgg	ctttcatcca	tggagggttg	1620
ggccattttg	gaagacctta	ggaagactag	gcaactgtta	gagaacgctt	cggacggagt	1680
ctccggtttt	tggagattct	ggttcgctag	tgaattagct	agggtagttt	ttaggataaa	1740
acaggactat	aaacaagaat	ttgaaaagtt	gttggttagat	tgcccaggac	tttttgaagc	1800
tcttaatttg	ggccatcagg	ttcactttaa	agaaaaagtt	ttatcagttt	tagacttttc	1860
aaccccaggt	agaactgctg	ctgctgtggc	ttttcttact	tttatattag	ataaatggat	1920
cccgacagact	catttcagca	ggggatacgt	tttgattttc	atagccacag	cattgtggag	1980
aacatggaag	gttcgcaaga	tgaggacaat	cttaggttac	tggccagtgc	agcctttggg	2040
tgtagcggga	atcctgaggc	atccaccggg	catgccagcg	gttctggagg	aggaacagca	2100
agaggacaac	ccgagagccg	gcctggaccc	tccagtggag	gaggcggagt	agctgacttg	2160
tctcctgaac	tgcaacgggt	gcttactgga	tctacgtcca	ctggacggga	taggggcgtt	2220
aagagggaga	gggcatctag	tggtagctgat	gctagatctg	agttggcttt	aagtttaatg	2280
agtcgcagac	gtcctgaaac	catttggttg	catgaggttc	agaaagaggg	aagggatgaa	2340
gtttctgtat	tgcaggagaa	atattcactg	gaacaggtga	aaacatgttg	gttggagcct	2400
gaggatgatt	gggaggtggc	cattaataat	tatgccaaag	tagctttgag	gcctgataaa	2460
cagtataaga	ttactagacg	gattaatatc	cggaatgctt	gttacatatc	tggaaatggg	2520
gctgaggttg	taatagatac	tcaagacaag	gcagttatta	gatgctgcat	gatggatatg	2580
tggcctgggg	tagtcggtat	ggaagcagta	acttttgtaa	atgttaagtt	taggggagat	2640
ggttataatg	gaatagtgtt	tatggccaat	accaaactta	tattgcatgg	ttgtagcttt	2700
tttggtttca	acaatacctg	tgtagatgcc	tggggacagg	ttagtgtacg	gggatgtagt	2760
ttctatgctg	gttggattgc	cacagctggc	agaaccaaga	gtcaattgtc	tctgaagaaa	2820
tgcatatttc	aaagatgtaa	cctgggcatt	ctgaatgaag	gcgaagcaag	ggcccgccac	2880
tgcgcttcta	cagatactgg	atgttttatt	ttgattaagg	gaaatgccag	cgtaaagcat	2940
aacatgattt	gcggtgcttc	cgatgagagg	ccttatcaaa	tgctcacttg	tgctgggtggg	3000
cattgtaata	tgctggctac	tgtgcatatt	gtttcccatc	aacgcaaaaa	atggcctgtt	3060
tttgatcaca	atgtgatgac	gaagtgtacc	atgcatgcag	gtgggcgtag	aggaatgttt	3120
atgccttacc	agtgtaacat	gaatcatgtg	aaagtgttgt	tgggaaccaga	tgccctttcc	3180
agaatgagcc	taacaggaat	ttttgacatg	aacatgcaaa	tctggaagat	cctgaggtat	3240

gatgatacga gatcgaggggt acgcgcacatgc gaatgcggag gcaagcatgc caggttccag	3300
ccggtgtgtg tagatgtgac tgaagatctc agaccggatc atttggttat tgcccgcact	3360
ggagcagagt tcggatccag tggagaagaa actgactaag gtgagtattg ggaaaacttt	3420
ggggtgggat tttcagatgg acagattgag taaaaatttg ttttttctgt cttgcagctg	3480
tcatgagtgg aaacgcttct ttttaagggg gagtcttcag cccttatctg acagggcgctc	3540
tcccatcctg ggcaggagtt cgtcagaatg ttatgggatc tactgtggat ggaagacccg	3600
tccaacccgc caattcttca acgctgacct atgctacttt aagttcttca cctttggacg	3660
cagctgcagc tgccgcgcgc gcttctgttg ccgctaacac tgtgcttgga atgggttact	3720
atggaagcat catggctaatt tccacttcct ctaataaccc ttctaccctg actcaggaca	3780
agttacttgt ccttttggcc cagctggagg ctttgaccca acgtctgggt gaactttctc	3840
agcaggtggg cgagttgcga gtacaaactg agtctgctgt cggcacggca aagtctaaat	3900
aaaaaatcc cagaatcaat gaataaataa acaagcttgt tgttgattta aaatcaagt	3960
tttttatttc atttttcgcg cacggtatgc cctagaccac cgatctctat cattgagaac	4020
tcggtggatt ttttccagga tcctatagag gtgggattga atgtttagat acatgggcat	4080
taggccgtct ttggggtgga gatagctcca ttgaagggat tcatgctccg gggtagtggt	4140
gtaaatcacc cagtcataac aaggtcgcag tgcattggtg tgcacaatat cttttagaag	4200
taggctgatt gccacagata agcccttggg ttaggtgttt acaaaccggg tgagctggga	4260
tgggtgcatt cggggtgaaa ttatgtgcat tttggattgg atttttaagt tggcaatatt	4320
gccgcccaaga tcccgtcttg gggtcatgtt atgaaggacc accaagacgg tgtatccggg	4380
acatttagga aatttatcgt gcagcttgga tggaaaagcg tggaaaaatt tggagacacc	4440
cttgtgtcct ccaagatttt ccatgcactc atccatgata atagcaatgg ggccgtgggc	4500
agcggcgcg gcaaacacgt tccgtgggtc tgacacatca tagttatgtt cctgagttaa	4560
atcatcataa gccattttta tgaatttggg gcggagagta ccagattggg gtatgaatgt	4620
tccttcgggc cccggagcat agttccctc acagatttgc atttcccaag ctttcagttc	4680
cgagggtgga atcatgtcca cctggggggc tatgaaaaac accgtttctg gggcgggggg	4740
gattaattgt gatgatagca aatttctgag caattgagat ttgccacatc cgggtggggc	4800
ataaatgatt ccgattacgg gttgcagggt gtagtttagg gaacggcaac tgccgtcttc	4860
tcgaagcaag gggggcacct cgttcacatc ttcccttaca tgcatatttt cccgcaccaa	4920
atccattagg aggcgtctc ctcctagtga tagaagttct ttagtgagg aaaagttttt	4980
cagcggtttc agaccgtcag ccatgggcat tttggagaga gtttgctgca aaagtctag	5040
tctgttccac agttcagtga tgtgttctat ggcactctga tccagcagac ctccctcgttt	5100
cgcgggtttg gacggctcct ggaatagggt atgagacgat gggcgtccag cgctgccagg	5160

gtccggtcct tccagggctc cagtgttcga gtcaggggtg tttccgtcac agtgaagggg 5220
 tgtgcgcctg cttgggcgct tgccaggggt cgcttcagac tcatcctgct ggtcgaaaac 5280
 ttctgtcgct tggcgccctg tatgtcggcc aagtagcagt ttaccatgag ttcgtagttg 5340
 agcgccctcg ctgcgtggcc tttggcgcg agcttacctt tggaagtttt cttgcatacc 5400
 gggcagttata ggcattttcag cgcatacaac ttggggcgcaa ggaaaacgga ttctggggag 5460
 tatgcatctg cgccgcagga ggcgcaaaca gtttcacatt ccaccagcca ggttaaatcc 5520
 gggttcattgg ggtcaaaaac aagttttccg ccatattttt tgatgcgttt cttacctttg 5580
 gtctccatga gttcgtgtcc tggttgagt acaaacaggc tgtccgtgtc cccgtagact 5640
 gattttacag gcctcttctc cagtggagt cctcgtctt cttcgtacag gaactctgac 5700
 cactctgata caaaggcgcg cgtccaggcc agcacaagg aggcctatgt ggaggggtag 5760
 cgatcgttgt caaccagggg gtccacctt tccaaagtat gcaaacacat gtcaccctct 5820
 tcaacatcca ggaatgtgat tggctttag gtgtatttca cgtgacctgg ggtccccgct 5880
 ggggggggtat aaaagggggc ggttctttgc tcttcctcac tgtcttcgg atcgtgtcc 5940
 aggaacgtca gctgttgggg taggtattcc ctctcgaagg cgggcatgac ctctgcactc 6000
 aggttgtcag tttctaagaa cgaggaggat ttgatattga cagtgccgtg tgagatgcct 6060
 ttcatgaggt tttcgtccat ttggtcagaa aacacaattt ttttattgtc aagtttgggtg 6120
 gcaaattgat catacagggc gttggataaa agtttggcaa tggatcgcat ggtttggttc 6180
 ttttcttgt cgcgcgctc tttggcgcg atgttgagtt ggacatactc gcgtgccagg 6240
 cacttccatt cggggaagat agttgttaat tcatctggca cgattctcac ttgccacct 6300
 cgattatgca aggttaattaa atccacactg gtggccacct cgcctcgaag gggttcattg 6360
 gtccaacaga gcctacctcc tttcctagaa cagaaagggg gaagtgggtc tagcataagt 6420
 tcatcgggag ggtctgcatc catggtaaag attcccggaa gtaaattcct atcaaaatag 6480
 ctgatgggag tggggtcac taaggccatt tgccattctc gagctgccag tgcgcgtca 6540
 tatgggttaa ggggactgcc ccatggcatg ggatgggtga gtgcagaggc atacatgcca 6600
 cagatgtcat agacgtagat gggatcctca aagatgccta ttaggttg atagcatcgc 6660
 cccctctga tacttgctcg cacatagtca tatagttcat gtgatggcg tagcagcccc 6720
 ggacccaagt tgggtcgatt ggggttttct gttctgtaga cgatctggcg aaagatggcg 6780
 tgagaattgg aagagatgg gggcttttga aaaatgttga aatgggcatg aggtagacct 6840
 acagagtctc tgacaaagtg ggcataagat tcttgaagct tggttaccag ttcggcggtg 6900
 acaagtacgt ctaggcgca gtagtcaagt gtttcttgaa tgatgtcata acctgggttg 6960
 ttttctttt cccacagttc gcggttgaga aggtattctt cgcgatcctt ccagtactct 7020
 tctagcggaa acccgtctt gtctgcacgg taagatccta gcatgtagaa ctgattaact 7080

gccttgtaag ggcagcagcc cttctctacg ggtagagagt atgcttgagc agcttttcgt 7140
 agcgaagcgt gagtaagggc aaagggtgtct ctgacatga ctttgagaaa ttggtatttg 7200
 aagtcgatgt cgtcacaggc tccctgttcc cagagttgga agtctacccg tttcttgtag 7260
 gcgggggttg gcaaagcgaa agtaacatca ttgaagagaa tcttaccggc tctgggcata 7320
 aaattgagag tgatgcgaaa aggtgtggt acttccgctc gattgttgat cacctgggca 7380
 gctaggacga tctcgtcgaa accgttgatg ttgtgtccta cgatgtataa ttctatgaaa 7440
 cgcggcgtgc ctctgacgtg aggtagctta ctgagctcat caaaggtag gtctgtgggg 7500
 tcagataagg cgtagtgttc gagagcccat tcgtgcaggt gaggatttgc atgtaggaaat 7560
 gatgacaaa gatctaccgc cagtgtgtt tgtaactggt cccgatactg acgaaaatgc 7620
 cggccaattg ccattttttc tggagtgcga cagtagaagg ttctggggtc ttgttgccat 7680
 cgatcccact tgagtttaat ggctagatcg tgggccatgt tgacgagacg ctcttctcct 7740
 gagagtttca tgaccagcat gaaaggaact agttgtttgc caaaggatcc catccagggtg 7800
 taagtttcca catcgtaggt caggaagagt ctttctgtgc gaggatgaga gccgatcggg 7860
 aagaactgga tttcctgccca ccagttggag gattggctgt tgatgtgatg gaagtagaag 7920
 tttctgcggc gcgccgagca ttcgtgtttg tgcttgata gacggccgca gtagtcgcag 7980
 cgttgacagg gttgtatctc gtgaatgagt tgtacctggc ttccttgac gagaaatttc 8040
 agtgggaagc cgaggcctgg cgattgtatc tcgtgtctct ctatattcgc tgtatcggcc 8100
 tgttcattct ctgtttcgat ggtggtcatg ctgacgagcc cccgcgggag gcaagtccag 8160
 acctcggcgc gggagggggc gagctgaagg acgagagcgc gcaggctgga gctgtccaga 8220
 gtctgagac gctgcggact caggtagta ggtagggaca gaagattaac ttgcatgac 8280
 ttttccaggc cgtgcgggag gttcagatgg tacttgattt ccacaggttc gtttgtagag 8340
 acgtcaatgg cttgcagggt tccgtgtcct ttgggcgcca ctaccgtacc tttgtttttt 8400
 cttttgatcg gtggtggctc tottgcttct tgcattgctc gaagcgtga cggggacgcg 8460
 cgccgggagg cagcgggtgt tccggaccgc agggcatggc tggtagtggc acgtcggcgc 8520
 cgcgcacggg caggttctgg tactgcgctc tgagaagact tgcgtgcgcc accacgcgctc 8580
 gattgacgtc ttgtatctga cgtctctggg tgaaagctac cggccccgtg agcttgaacc 8640
 tgaaagagag ttcaacagaa tcaatttcgg tatcgtaac ggcagcttgt ctcatgtttt 8700
 cttgtacgtc accagagttg tctggtagg cgatctccgc catgaactgc tcgatttctt 8760
 cctcctgaag atctccgca cccgctcttt cgacggtggc cgcgagggtc ttggagatac 8820
 ggcccatgag ttgggagaat gcattcatgc ccgcctcgtt ccagacgcgg ctgtaaacca 8880
 cggccccctc ggagtctctt gcgcgcatca ccacctgagc gaggttaagc tccacgtgtc 8940
 tggatgaagc cgcatagttg cataggcgtt gaaaaaggta gttgagtgtg gtggcaatgt 9000

gttcggcgac gaagaaatac atgatccatc gtctcagcgg catttcgcta acatcgccca 9060
 gagcttccaa gcgctccatg gcctcgtaga agtccacggc aaaattaaaa aactgggagt 9120
 ttcgcgcgga cacgggtcaat tcctcctcga gaagacggat gagttcggct atggtggccc 9180
 gtacttcgcg ttcgaaggct cccgggatct cttcttcctc ttctatctct tcttcacta 9240
 acatctcttc ttcgtcttca ggcgggggcg gagggggcac gcggcgacgt cgacggcgca 9300
 cgggcaaacg gtcgatgaat cgttcaatga cctctccgcg gcggcgggcg atggtttcag 9360
 tgacggcgcg gccgttctcg cgcggtcgca gagtaaaac accgccgcgc atctccttaa 9420
 agtggtgact gggaggttct cgttttggga gggagagggc gctgattata cattttatta 9480
 attggcccgt agggactgca cgcagagatc tgatcgtgtc aagatccacg ggatctgaaa 9540
 accttcgac gaaagcgtct aaccagtcac agtcacaagg taggtgagt acggcttctt 9600
 gtgggcgggg gtggttatgt gttcggctcg ggtcttctgt ttcttcttca tctcggaag 9660
 gtgagacgat gctgctggtg atgaaattaa agtaggcagt tctaagacgg cggatggtgg 9720
 cgaggagcac caggtctttg ggtccggctt gctggatacg caggcgattg gccattcccc 9780
 aagcattatc ctgacatcta gcaagatctt tgtagtagtc ttgcatgagc cgttctacgg 9840
 gcacttcttc ctacccgtt ctgccatgca tacgtgtgag tccaaatccg cgcattgggt 9900
 gtaccagtgc caagtcagct acgactcttt cggcgaggat ggcttgctgt acttgggtaa 9960
 ggggtggctt aaagtcatca aaatccacaa agcggtggtg agtcctgta ttaatgggtg 10020
 aagcacagtt ggccatgact gaccagttaa ctgtctggtg accagggcg cagagctcgg 10080
 tgtatttaag gcgcgaatag gcgcgggtgt caaagatgta atcgttgtag gtgcgcacca 10140
 gatactggta ccctataaga aaatgcggcg gtggttggcg gtagagaggc catcgttctg 10200
 tagctggagc gccagggggcg aggtcttcca acataaggcg gtgatagccg tagatgtacc 10260
 tggacatcca ggtgattcct gcggcggtag tagaagccc aggaaactcg cgtacgggt 10320
 tccaaatgtt gcgtagcggc atgaagtagt tcattgtagg cacggtttga ccagtgaggc 10380
 gcgcgcagtc attgatgctc tatagacacg gaaaaatga aagcgttcag cgactcgact 10440
 ccgtagcctg gaggaacgtg aacgggttg gtcgcggtgt accccgggtc gagacttgta 10500
 ctcgagccgg ccggagccgc ggctaacgtg gtattggcac tcccgctcgc acccagccta 10560
 caaaaatcca ggatacggaa tcgagtcgtt ttgctggttt ccgaatggca gggaagtgag 10620
 tcctatTTTT tttttttgcc gctcagatgc atcccgctgt gcgacagatg cggcccaac 10680
 aacagcccc ctcgcagcag cagcagcagc aatcacaaaa ggctgtccct gcaactactg 10740
 caactgccgc cgtgagcggg gcgggacagc ccgcctatga tctggacttg gaagagggcg 10800
 aaggactggc acgtctaggt gcgccttcac ccgagcggca tccgcgagtt caactgaaaa 10860
 aagattctcg cgaggcgtat gtgccccaac agaacctatt tagagacaga agcggcgagg 10920

agccggagga gatgcgagct tcccgttta acgcggtcg tgagctgcgt cacggtttg 10980
 accgaagacg agtggtgcgg gacgaggatt tcgaagttga tgaaatgaca gggatcagtc 11040
 ctgccagggc acacgtgtct gcagccaacc ttgtatcggc ttacgagcag acagtaaagg 11100
 aagagcgtaa cttccaaaag tcttttaata atcatgtgcg aacctgatt gcccggaag 11160
 aagttaccct tggtttgatg cttttgtggg atttgatgga agctatcatt cagaacccta 11220
 ctagcaaacc tctgaccgcc cagctgtttc tgggtgtgca acacagcaga gacaatgagg 11280
 ctttcagaga ggcgctgctg aacatcaccg aacccgaggg gagatggttg tatgatctta 11340
 tcaacattct acagagtatc atagtgcagg agcggagcct gggcctggcc gagaaggtag 11400
 ctgccatcaa ttactcgggtt ttgagcttgg gaaaatatta cgctcgcaa atctacaaga 11460
 ctccatacgt tcccatagac aaggaggtga agatagatgg gttctacatg cgcagcagc 11520
 tcaaggtctt gaccctgagc gatgatcttg ggggtgtatc caatgacaga atgcacgcg 11580
 cggttagcgc cagcaggagg cgcgagttaa gcgacagga actgatgcac agtttgcaa 11640
 gagctctgac tggagctgga accgaggggtg agaattactt cgacatggga gctgacttgc 11700
 agtggcagcc tagtcgcagg gctctgagcg ccgcgacggc aggatgtgag cttccttaca 11760
 tagaagaggc ggatgaaggc gaggaggaag agggcgagta cttggaagac tgatggcaca 11820
 acccgtgttt tttgctagat ggaacagcaa gcaccggatc ccgcaatgcg ggcggcgctg 11880
 cagagccagc cgtccggcat taactcctcg gacgattgga cccaggccat gcaacgtatc 11940
 atggcggtga cgactcgcaa cccgaagcc tttagacagc aacccagggc caaccgtcta 12000
 tcggccatca tggaagctgt agtgccttcc cgctctaata ccactcatga gaaggtcctg 12060
 gccatcgtga acgcgttggt ggagaacaaa gctattcgtc cagatgaggc cggactggta 12120
 tacaacgctc tcttagaacg cgtggctcgc tacaacagta gcaatgtgca aaccaatttg 12180
 gaccgtatga taacagatgt acggaagcc gtgtctcagc gcgaaagggt ccagcgtgat 12240
 gccaacctgg gttcgctggg ggcgttaaata gctttcttga gtactcagcc tgctaatttg 12300
 ccgcgtggtc aacaggatta tactaacttt ttaagtgtt tgagactgat ggtatcagaa 12360
 gtacctcaga gcgaagtgt tcagtccggc cctgattact tctttcagac tagcagacag 12420
 ggcttgca ga cggtaaatct gagccaagct tttaaaaacc ttaaagggtt gtggggagtg 12480
 catgccccgg taggagaaag agcaaccgtg tctagcttgt taactccgaa cttccgccta 12540
 ttattactgt tggtagctcc tttcaccgac agcggtagca tcgaccgtaa ttcctatctg 12600
 ggttacctac taaacctgta tcggaagcc atagggcaa gtcagggtga cgagcagacc 12660
 tatcaagaaa ttaccaagt cagtcgcgct ttgggacagg aagacactgg cagtttgaa 12720
 gccactctga acttcttgc tactaatcgg tctcaaaaga tccctcctca atatgctctt 12780
 actgcggagg aggagaggat ccttagatat gtgcagcaga gcgtgggatt gtttctgatg 12840

caagaggggg caactccgac tgcagcactg gacatgacag cgcgaaatat ggagcccagc 12900
 atgtatgcc a gtaaccgacc tttcattaac aaactgctgg actacttgca cagagctgcc 12960
 gctatgaact ctgattatct caccaatgcc atcttaaacc cgcactggct gccccacct 13020
 ggtttctaca cggggaata tgacatgccc gaccctaatac acggatttct gtgggacgac 13080
 gtggacagcg atgttttttc acctctttct gatcatcgca cgtggaaaaa ggaaggcggc 13140
 gatagaatgc attcttctgc atcgctgtcc ggggtcatgg gtgctaccgc ggctgagccc 13200
 gagtctgcaa gtccttttcc tagtctaccc ttttctctac acagtgtacg tagcagcgaa 13260
 gtgggtagaa taagtcgccc gagtttaatg ggcgaagagg agtatctaaa cgattccttg 13320
 ctcagaccgg caagagaaaa aaatttccca aacaatggaa tagaaagttt ggtggataaa 13380
 atgagtagat ggaagactta tgctcaggat cacagagacg agcctgggat catggggatt 13440
 acaagtagag cgagccgtag acgccagcgc catgacagac agaggggtct tgtgtgggac 13500
 gatgaggatt cggccgatga tagcagcgtg ctggacttgg gtgggagagg aaggggcaac 13560
 cggtttctc atttgccccc tcgcttgggt ggtatgttgt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 13620
 ctcaccaagg ccatggcgac gagcgtacgt tcgttcttct ttattatctg tgtctagtat 13680
 aatgaggcga gtcgtgctag gcggagcggg ggtgtatccg gagggtcctc ctccttcgta 13740
 cgagagcgtg atgcagcagc agcaggcgac ggcgggtgat caatccccac tggaggctcc 13800
 ctttgtgcct ccgcgatacc tggcacctac ggagggcaga aacagcattc gttattcgga 13860
 actggcacct cagtacgata ccaccaggtt gtatctggtg gacaacaagt cggcggacat 13920
 tgcttctctg aactatcaga atgaccacag caacttcttg accacggtgg tgcaaaacaa 13980
 tgactttacc cctacggaag ccagcaccca gaccattaac tttgatgaac gatcgcggtg 14040
 gggcgggtcag ctaaagacca tcatgcatac taacatgcc aacgtgaacg agtatatgtt 14100
 tagtaacaag ttcaaagcgc gtgtgatggg gtccagaaaa cctcccgacg gtgctgcagt 14160
 tggggatact tatgatcaca agcaggatat tttgaaatat gagggttcg agtttacttt 14220
 gccagaaggc aacttttcag ttactatgac tattgatttg atgaacaatg ccatcataga 14280
 taattacttg aaagtgggta gacagaatgg agtgcttgaa agtgacattg gtgttaagtt 14340
 cgacaccagg aacttcaagc tgggatggga tcccgaaacc aagttgatca tgcttgaggt 14400
 gtatacgtat gaagccttcc atcctgacat tgtcttactg cctggctgag gagggtttt 14460
 taccgagagt cgtttgagca accttcttgg tatcagaaaa aaacagccat ttcaagaggg 14520
 ttttaagatt ttgtatgaag atttagaagg tggtaatat cgggccctct tggatgtaga 14580
 tgcctatgag aacagtaaga aagaacaaaa agccaaaata gaagctgcta cagctgctgc 14640
 agaagctaag gcaaacatag ttgccagcga ctctacaagg gttgctaacg ctggagaggt 14700
 cagaggagac aattttgcgc caacacctgt tccgactgca gaatcattat tggccgatgt 14760

gtctgaagga acggacgtga aactcactat tcaacctgta gaaaaagata gtaagaatag 14820
 aagctataat gtgttggaag acaaaatcaa cacagcctat cgcagttggt atctttcgta 14880
 caattatggc gatcccgaaa aaggagtgcg ttcctggaca ttgctcacca cctcagatgt 14940
 cacctgcgga gcagagcagg tctactggtc gcttccagac atgatgaagg atcctgtcac 15000
 tttccgctcc actagacaag tcagtaacta ccctgtgggt ggtgcagagc ttatgcccgt 15060
 cttctcaaag agcttctaca acgaacaagc tgtgtactcc cagcagctcc gccagtccac 15120
 ctgccttacg cacgtcttca accgctttcc tgagaaccag attttaatcc gtccgccggc 15180
 gccaccatt accaccgtca gtgaaaacgt tcctgtcttc acagatcacg ggaccctgcc 15240
 gttgcgcagc agtatccggg gagtccaacg tgtgaccgtt actgacgcca gacgccgcac 15300
 ctgtccctac gtgtacaagg cactgggcat agtcgcaccg cgcgtccttt caagccgcac 15360
 tttctaaaaa aaaaaaaaaat gtccattctt atctcgccca gtaataacac cggttgggggt 15420
 ctgcgcgtc caagcaagat gtacggaggc gcacgcaaac gttctacca acatcctgtc 15480
 cgtgttcgcg gacattttcg cgtccatgg ggccctca agggccgcac tcgcgttcga 15540
 accaccgtcg atgatgtaat cgatcagggt gttgccgacg cccgtaatta tactcctact 15600
 gcgcctacat ctactgtgga tgcagttatt gacagtgtag tggctgacgc tcgcaactat 15660
 gctcgacgta agagccggcg aaggcgcat gccagacgcc accgagctac cactgccatg 15720
 cgagccgcaa gagctctgct acgaagagct agacgcgtgg ggcaagagc catgcttagg 15780
 gcggccagac gtgcagcttc gggcgccagc gccggcagggt cccgcaggca agcagccgct 15840
 gtgcgacgg cgactattgc cgacatggcc caatcgcgaa gaggcaatgt atactgggtg 15900
 cgtgacgctg ccaccgggtca acgtgtaccc gtgcgcaccc gtccccctcg cacttagaag 15960
 atactgagca gtctccgatg ttgtgtccca gcggcgagga tgtccaagcg caaatacaag 16020
 gaagaaatgc tgcaggttat cgcacctgaa gtctacggcc aaccgttgaa ggatgaaaaa 16080
 aaaccccgca aatcaagcg ggttaaaaag gacaaaaaag aagaggaaga tggcgatgat 16140
 gggctggcgg agtttgtgcg cgagtttgcc ccacggcgac gcgtgcaatg gcgtgggcgc 16200
 aaagttcgac atgtgttgag acctggaact tcggtgtct ttacaccgg cgagcgttca 16260
 agcgtactt ttaagcgttc ctatgatgag gtgtacgggg atgatgatat tcttgagcag 16320
 gcggctgacc gattaggcga gtttgcctt ggcaagcgta gtagaataac ttccaaggat 16380
 gagacagtgt cgataccctt ggatcatgga aatcccaccc ctagtcttaa accggtcact 16440
 ttgcagcaag tgttaccctt aactccgca acaggtgtta aacgcgaagg tgaagatttg 16500
 tatccacta tgcaactgat ggtacccaaa cgccagaagt tggaggacgt tttggagaaa 16560
 gtaaaagtgg atccagatat tcaacctgag gttaaagtga gaccattaa gcaggtagcg 16620
 cctggtctgg ggtacaaac tgtagacatt aagattccca ctgaaagtat ggaagtgcaa 16680

actgaacccg caaagcctac tgccacctcc actgaagtgc aaacggatcc atggatgccc 16740
 atgcctatta caactgacgc cgccggtccc actcgaagat cccgacgaaa gtacgggtcca 16800
 gcaagtctgt tgatgcccac ttatgttgta caccatctta ttattcctac tcctgggttac 16860
 cgaggcactc gctactatcg cagccgaaac agtacctccc gccgtcgccg caagacacct 16920
 gcaaactcga gtcgtcgccg tagacgcaca agcaaaccga ctcccggcgc cctgggtgcgg 16980
 caagtgtacc gcaatggtag tgcggaacct ttgacactgc cgctgctcgc ttaccatccg 17040
 agtatcatca cttaatcaat gttgccgctg cctccttgca gatatggccc tcacttgctg 17100
 ccttcgcgtt cccatcactg gttaccgagg aagaaactcg cgccgtagaa gagggatgtt 17160
 gggacgcgga atgcgacgct acaggcgacg gcgtgctatc cgcaagcaat tgcgggggtgg 17220
 ttttttacca gccttaattc caattatcgc tgctgcaatt ggcgcgatac caggcatagc 17280
 ttccgtggcg gttcaggcct cgcaacgaca ttgacattgg aaaaaaacgt ataaataaaa 17340
 aaaaaaaaaat acaatggact ctgacactcc tggctcctgtg actatgtttt cttagagatg 17400
 gaagacatca atttttcatc cttggctccg cgacacggca cgaagccgta catgggcacc 17460
 tggagcgaca tcggcacgag ccaactgaac ggggggcgct tcaattggag cagtatctgg 17520
 agcgggctta aaaattttgg ctcaaccata aaaacatacg ggaacaaagc ttggaacagc 17580
 agtacaggac aggcgcttag aaataaactt aaagaccaga acttccaaca aaaagtagtc 17640
 gatgggatag cttccggcat caatggagtg gtagatttgg ctaaccaggc tgtgcagaaa 17700
 aagataaaca gtcgttttga cccgccgcca gcaacccag gtgaaatgca agtggaggaa 17760
 gaaattcctc cgccagaaaa acgaggcgac aagcgtccgc gtcccgattt ggaagagacg 17820
 ctggtgacgc gcgtagatga accgccttct tatgaggaag caacgaagct tggaatgccc 17880
 accactagac cgatagcccc aatggccacc ggggtgatga aaccttctca gttgcatcga 17940
 ccggtcacct tggatttgcc ccctccccct gctgctactg ctgtaccgcg ttctaagcct 18000
 gtcgctgccc cgaaaccagt cgccgtagcc aggtcacgtc ccgggggcgc tcctcgtcca 18060
 aatgcgcact ggcaaaatac tctgaacagc atcgtgggtc taggcgtgca aagtgtaaaa 18120
 cgccgtcgct gcttttaatt aaatatggag tagcgttaa cttgcctatc tgtgtatatg 18180
 tgtcattaca cgccgtcaca gcagcagagg aaaaaaggaa gaggtcgtgc gtcgacgctg 18240
 agttactttc aagatggcca cccatcgat gctgccccaa tgggcataca tgcacatcgc 18300
 cggacaggat gcttcggagt acctgagtcc ggggtctggtg cagttcgccc gcgccacaga 18360
 cacctacttc aatctgggaa ataagtttag aaatcccacc gtagcgccga cccacgatgt 18420
 gaccaccgac cgtagccagc ggctcatgtt gcgcttcgtg cccgttgacc gggaggacaa 18480
 tacatactct taaaaagtgc ggtacaccct ggccgtgggc gacaacagag tgctggatat 18540
 ggccagcacg ttctttgaca ttaggggtgt gttggacaga ggtcccagtt tcaaacccta 18600

ttcttggtacg gcttacaact ccctggctcc taaaggcgct ccaaatacat ctcaagtggat 18660
 tgcagaaggt gtaaaaaata caactgggtga ggaacacgta acagaagagg aaaccaatac 18720
 tactacttac acttttggca atgctcctgt aaaagctgaa gctgaaatta caaaagaagg 18780
 actcccagta ggtttgaag tttcagatga agaaagtaaa ccgatttatg ctgataaaac 18840
 atatcagcca gaacctcagc tgggagatga aacttggact gaccttgatg gaaaaaccga 18900
 aaagtatgga ggcagggtc tcaaaccgca tactaagatg aaaccatgct acgggtcctt 18960
 tgccaaacct actaatgtga aaggcgggtca ggcaaaacaa aaaacaacgg agcagccaaa 19020
 tcagaaagtc gaatatgata tcgacatgga gttttttgat gcggcatcgc agaaaacaaa 19080
 cttaagtcct aaaattgtca tgtatgcaga aaatgtaaat ttggaaactc cagacactca 19140
 tgtagtgtac aaacctggaa cagaagacac aagttccgaa gctaatttgg gacaacaatc 19200
 tatgccaac agaccact acattggctt cagagataac tttattggac ttatgtacta 19260
 taacagtact ggtaacatgg ggggtgctggc tgggtcaagcg tctcagttaa atgcagtgg 19320
 tgacttgacg gacagaaaca cagaactttc ttaccaactc ttgcttgact ctctgggcga 19380
 cagaaccaga tacttttagca tgtggaatca ggctgtggac agttatgatc ctgatgtacg 19440
 tgttattgaa aatcatgggtg tggaagatga acttcccaac tactgttttc cactggacgg 19500
 cataggtgtt ccaacaacca gttacaaatc aatagttcca aatggagaca atgcgcctaa 19560
 ttggaaggaa cctgaagtaa atggaacaag tgagatcgga cagggttaatt tgtttgccat 19620
 ggaaattaac cttcaagcca atctatggcg aagtttcctt tattccaatg tggctctata 19680
 tctccagac tcgtacaaat acaccccgtc caatgtcact cttccagaaa acaaaaaacac 19740
 ctacgactac atgaacgggc ggggtgggtgcc gccatctcta gtagacacct atgtgaacat 19800
 tgggtgccagg tgggtctctgg atgccatgga caatgtcaac ccattcaacc accaccgtaa 19860
 cgctggcttg cgttaccgat ccattgcttct gggtaacgga cgttatgtgc ctttccacat 19920
 acaagtgcct caaaaattct tcgctgttaa aaacctgctg cttctcccag gctcctacac 19980
 ttatgagtgg aacttttagga aggatgtgaa catggttcta cagagttccc tcggtaacga 20040
 cctgcgggta gatggcgcca gcatcagttt cagagcatc aacctctatg ctactttttt 20100
 ccccatggct cacaacaccg cttccaccct tgaagccatg ctgcggaatg acaccaatga 20160
 tcagtcattc aacgactacc tatctgcagc taacatgctc taccatctc ctgccaatgc 20220
 aaccaatatt cccatttcca ttccttctcg caactgggag gctttcagag gctggtcatt 20280
 taccagactg aaaaccaaag aaactccctc tttgggggtc ggatttgacc cctactttgt 20340
 ctattctggt tctattccct acctggatgg taccttctac ctgaaccaca cttttaagaa 20400
 ggtttccatc atgtttgact cttcagttag ctggcctgga aatgacagg tactatctcc 20460
 taacgaattt gaaataaagc gcactgtgga tggcgaaggc tacaacgtag cccaatgcaa 20520

catgaccaaa gactggttct tggtagagat gctcgccaac tacaacatcg gctatcaggg 20580
cttctacatt ccagaaggat acaaagatcg catgtattca tttttcagaa acttccagcc 20640
catgagcagg caggtggttg atgaggtcaa ttacaaagac ttcaaggccg tcgccataacc 20700
ctaccaacac aacaactctg gctttgtggg ttacatggct ccgaccatgc gccaaaggtca 20760
accctatccc gctaactatc cctatccact cattggaaca actgccgtaa atagtgttac 20820
gcagaaaaag ttcttgtgtg acagaaccat gtggcgcata ccgttctcga gcaacttcat 20880
gtctatgggg gcccttacag acttgggaca gaatatgctc tatgccaaact cagctcatgc 20940
tctggacatg acccttgagg tggatcccat ggatgagccc accctgcttt atcttctctt 21000
cgaagttttc gacgtggtea gagtgcata gccacaccgc ggcatcatcg aggcagtcta 21060
cctgcgtaca ccgttctcgg ccggtaacgc taccacgtaa gaagcttctt gcttcttgca 21120
aatagcagct gcaaccatgg cctgcggatc ccaaaacggc tccagcgagc aagagctcag 21180
agccattgtc caagacctgg gttgcggacc ctatcttttg ggaacctacg ataagcgctt 21240
cccgggggtc atggcccccg ataagctcgc ctgtgccatt gtaaatacgg ccggacgtga 21300
gacgggggga gagcactggg tggctttcgg ttggaaccca cggttctaaca cctgctacct 21360
ttttgatcct tttggattct cggatgatcg tctcaaacag atttaccagt ttgaatatga 21420
gggtctcttg cgccgcagcg ctcttgctac caaggaccgc tgtattacgc tggaaaaatc 21480
taccagacc gtgcagggtc ccggttctgc cgctgcgga cttttctgct gcatgttctt 21540
tcacgccttt gtgcactggc ctgaccgtcc catggacgga aacccaccca tgaaattgct 21600
aactggagtg ccaaacaaca tgcttcattc tcctaaagtc cagcccaccc tgtgtgacaa 21660
tcaaaaagca ctctaccatt ttcttaatac ccattcgctt tattttcgct cccatcgta 21720
acacatcgaa agggccactg cgctcgaccg tatggatgtt caataatgac tcatgtaaac 21780
aacgtgttca ataaacatca ctttattttt ttacatgtat caaggctctg cttacttat 21840
ttatttacia gtcgaaatgg ttctgacgag aatcagaatg acccgagggc agtgatacgt 21900
tgcggaactg atacttgggt tgccacttga attcggaat caccaacttg ggaaccggta 21960
tatcgggcag gatgtcactc cacagcttct tggtagctg caaagctcca agcaggtcag 22020
gagccgaaat cttgaaatca caattaggac cagtgtcttg agcgcgagag ttgcggtaca 22080
ccgatttga gactgaaac accatcagcg acggatgtct cacgcttgcc agcacgggtg 22140
gatctgcaat catgcccaca tccagatctt cagcattggc aatgctgaac ggggtcatct 22200
tgcaggtctg cctacccatg gggggcacc aattaggctt gtggttgcaa tcgcagtga 22260
gggggatcag tatcatcttg gctgatcct gtctgattcc tggatacacg gctctcatga 22320
aagcatcata ttgcttgaag gctgctggg ctttactacc ctcggtataa aacatccgc 22380
aggacctgct cgaaaactgg ttagctgcac agccggcatc attcacacag cagcgggct 22440

cattgttagc tatttgcacc acacttctgc cccagcgggt ttgggtgatt ttggttcgct 22500
cgggattctc ctttaaggct cgttgtccgt tctcgtggc cacatccatc tcgataatct 22560
gctccttctg aatcataata ttgcatgca ggcacttcag cttgccctca taatcattgc 22620
agccatgagg ccacaacgca cagcctgtac attcccaatt atgggtgggcg atctgagaaa 22680
aagaatgtat cattccctgc agaaatcttc ccatcatcgt gctcagtgtc ttgtgactag 22740
tgaaagttaa ctggatgcct cgggtgtcct cgtttacgta ctggtgacag atgcgcttgt 22800
attgttcgtg ttgtcaggc attagtttaa aagaggttct aagttcgta tccagcctgt 22860
acttctccat cagcagacac atcacttcca tgcctttctc ccaagcagac accaggggca 22920
agctaatecg attcttaaca gtgcaggcag cagctccttt agccagaggg tcatctttag 22980
cgatcttctc aatgcttctt ttgccatcct tctcaacgat gcgcacgggc gggtagctga 23040
aaccactgc tacaagttgc gcctcttctc tttcttcttc gctgtcttga ctgatgtctt 23100
gcatggggat atgtttggc ttccttggc tctttttggg gggatcggg ggaggaggac 23160
tgtcgtccg ttccggagac agggaggatt gtgacgttcc gctcaccatt accaactgac 23220
tgtcggtaga agaacctgac cccacacggc gacagggtgt tctcttcggg ggcagagggtg 23280
gaggcgattg cgaagggtc cgggtccgacc tggaaggcgg atgactggca gaacccttc 23340
cgcgttcggg ggtgtgctcc ctgtggcggc cgcttaactg atttctctcg cggctggcca 23400
ttgtgttctc ctaggcagag aaacaacaga catggaaact cagccattgc tgtcaacatc 23460
gccacgagtg ccatcacatc tcgtcctcag cgacgaggaa aaggagcaga gcttaagcat 23520
tccaccgccc agtcttgcca ccacctctac cctagaagat aaggaggctc acgcatctca 23580
tgacatgcag aataaaaaag cgaaagagtc tgagacagac atcgagcaag acccgggcta 23640
tgtgacaccg gtggaacacg aggaagagtt gaaacgcttt ctagagagag aggatgaaaa 23700
ctgccccaaa caacgagcag ataactatca ccaagatgct ggaaataggg atcagaacac 23760
cgactacctc atagggttg acggggaaga cgcgtctctt aaacatctag caagacagtc 23820
gctcatagtc aaggatgcat tattggacag aactgaagtg cccatcagtg tggaagagct 23880
cagccgcgcc tacgagctta acctcttttc acctcgtact cccccaaac gtcagccaaa 23940
cggcacctgc gagccaaatc ctgcgttaa cttttatcca gcttttctg tgccagaagt 24000
actggctacc tatcacatct tttttaaaaa tcaaaaaatt ccagtctcct gccgcgctaa 24060
tcgcaccgc gccgatgccc tactcaatct gggacctggc tcacgcttac ctgatatagc 24120
ttccttggaa gaggttccaa agatcttcga gggctctggc aataatgaga ctcgggccgc 24180
aatgctctg caaaaggag aaaatggcat ggatgagcat cacagcgttc tgggtgaatt 24240
ggaaggcgat aatgccagac tcgcagtact caagcgaagc atcgaggta cacacttcgc 24300
atatcccgct gtcaacctgc cccctaaagt catgacggcg gtcatggacc agttactcat 24360

taagcgcgca	agcccccttt	cagaagacat	gcatgaccca	gatgcctgtg	atgagggtaa	24420
accagtggtc	agtgatgagc	agctaaccgc	atggctgggc	accgactctc	ccagggatct	24480
ggaagagcgt	cgcaagctta	tgatggccgt	ggtgctgggt	accgtagaac	tagagtgtct	24540
ccgacgtttc	tttaccgatt	cagaaacctt	gcgcaaactc	gaagagaatc	tgcactacac	24600
tttttagacac	ggctttgtgc	ggcaggcatg	caagatatct	aacgtggaac	tcaccaacct	24660
ggtttcctac	atgggtattc	tgcattgagaa	tgccttagga	caaagcgtgc	tgcacagcac	24720
cctgaagggg	gaagcccgcc	gtgattacat	ccgcgattgt	gtctatctgt	acctgtgcca	24780
cacgtggcaa	accggcatgg	gtgtatggca	gcaatgttta	gaagaacaga	acttgaaaga	24840
gcttgacaag	ctcttacaga	aatctcttaa	ggttctgtgg	acagggttcg	acgagcgcac	24900
cgctcgcttc	gacctggcag	acctcatctt	cccagagcgt	ctcagggtta	ctttgcgaaa	24960
cggattgcct	gactttatga	gccagagcat	gcttaacaat	tttcgctctt	tcactcctgga	25020
acgctccggt	atcctgcccc	ccacctgctg	cgcactgccc	tccgactttg	tgcctctcac	25080
ctaccgcgag	tgccccccgc	cgctatggag	tcactgctac	ctgttcgctc	tggccaacta	25140
tctctcctac	cactcggatg	tgatcgagga	tgtgagcgga	gacggcttgc	tggagtgtca	25200
ctgccgctgc	aatctgtgca	cgccccaccg	gtccctagct	tgcaaccccc	agttgatgag	25260
cgaaaccag	ataataggca	cctttgaatt	gcaaggcccc	agcagccaag	gcgatgggtc	25320
ttctcctggg	caaagtttaa	aactgacccc	gggactgtgg	acctccgcct	acttgcgcaa	25380
gtttgctccg	gaagattacc	accctatga	aatcaagttc	tatgaggacc	aatcacagcc	25440
tccaaaggcc	gaactttcgg	cctgcgtcat	caccagggg	gcaattctgg	cccaattgca	25500
agccatccaa	aaatcccgcc	aagaatttct	actgaaaaag	ggtaaggggg	tctaccttga	25560
ccccagacc	ggcgaggaac	tcaacacaag	gttcctcag	gatgtcccaa	cgacgagaaa	25620
acaagaagtt	gaaggtgcag	ccgccgcccc	cagaagatat	ggaggaagat	tgggacagtc	25680
aggcagagga	ggcggaggag	gacagtctgg	aggacagtct	ggaggaagac	agtttgagg	25740
aggaaaacga	ggaggcagag	gaggtggaag	aagtaaccgc	cgacaaacag	ttatcctcgg	25800
ctgcggagac	aagcaacagc	gctaccatct	ccgctccgag	tcgaggaacc	cgcgccgctc	25860
ccagcagtag	atgggacgag	accggacgct	tcccgaaccc	aaccagcgct	tccaagaccg	25920
gtaagaagga	tcggcaggga	tacaagtcct	ggcgggggca	taagaatgcc	atcatctcct	25980
gcttgcatga	gtgcgggggc	aacatatcct	tcacgcggcg	ctacttgcta	ttccaccatg	26040
gggtgaactt	tccgcgcaat	gttttgcat	actaccgtca	cctccacagc	ccctactata	26100
gccagcaaat	cccggcagtc	tcgacagata	aagacagcgg	cggcgacctc	caacagaaaa	26160
ccagcagcgg	cagttagaaa	atacacaaca	agtcagcaa	caggaggatt	aaagattaca	26220
gccaacgagc	cagcgdaaac	ccgagagtta	agaaatcgga	tctttccaac	cctgtatgcc	26280

atcttccagc agagtcgggg tcaagagcag gaactgaaaa taaaaaacccg atctctgcgt 26340
 tcgctcacca gaagttgttt gtatcacaag agcgaagatc aacttcagcg cactctcgag 26400
 gacgccgagg ctctcttcaa caagtactgc gcgctgactc ttaaagagta ggcagcgacc 26460
 gcgcttattc aaaaaaggcg ggaattacat catcctcgac atgagtaaag aaattcccac 26520
 gccttacatg tggagttatc aaccccaa at gggattggcg gcaggcgccct cccaggacta 26580
 ctccaccgc atgaattggc tcagcgcccg gccttctatg atttctcgag ttaatgatat 26640
 acgcgcctac cgaaaccaa tacttttggg acagtcagct cttaccacca cgccccgcca 26700
 acaccttaat cccagaaatt ggcccgccgc cctagtgtac caggaaagtc ccgctcccac 26760
 cactgtatta ctctctcgag acgccagcg cgaagtccaa atgactaatg cagggtgcgca 26820
 gttagctggc ggctccacc tatgtcgtca caggcctcgg cataatataa aacgcctgat 26880
 gatcagaggc cgaggtatcc agctcaacga cgagtcggtg agctctccgc ttggtctacg 26940
 accagacgga atctttcaga ttgccggctg cgggagatct tccttcacc ctcgtcaggc 27000
 tgttctgact ttggaaagt cgtcttcgca accccgctcg ggcggaatcg ggaccgttca 27060
 atttgtggag gagtttactc cctctgtcta cttcaacccc ttctccggat ctctgggca 27120
 ttaccggac gagttcatac cgaacttga cgcgattagc gagtcagtgg acggctacga 27180
 ttgatgtctg gtgacgcggc tgagctatct cggctgcgac atctagacca ctgccgcgc 27240
 tttcgtgct ttgccggga actcattgag ttcattctact tcgaactccc caaggatcac 27300
 cctcaaggtc cgccccacgg agtgcggtt tctatcgaag gcaaaataga ctctgcctg 27360
 caacgaattt tctccagcg gcccgctg atcgagcgag accagggaaa caccacgggt 27420
 tccatctact gcatttgtaa tcaccccgga ttgcatgaaa gcctttgctg tcttatgtgt 27480
 actgagttta ataaaaactg aattaagact ctctacgga ctgccgcttc ttcaaccgg 27540
 attttacaac cagaagaacg aaacttttcc tgcgtccag gactctgtta acttcacct 27600
 tctactcac aaactagaag ctcaacgact acaccgcttt tccagaagca ttttccctac 27660
 taatactact ttcaaacccg gaggtgagct ccaaggctct cctacagaaa acccttgggt 27720
 ggaagcgggc cttgtagtgc taggaattct tgcgggtggg cttgtgatta ttctttgcta 27780
 cctatacaca ccttgcttca ctttcttagt ggtgttgtgg tattggttta aaaaatgggg 27840
 ccatactag tcttgcttgt tttactttcg cttttggaac cgggttctgc caattacgat 27900
 ccatgtctag acttcgacc agaaaactgc acacttactt ttgcaccga cacaagccgc 27960
 atctgtggag ttcttattaa gtgcggatgg gaatgcaggc ccgttgaaat tacacacaat 28020
 aacaaaacct ggaacaatac cttatccacc acatgggagc caggagtcc cgagtggtag 28080
 actgtctctg tccgaggtcc tgacgggtcc atccgcatta gtaacaacac tttcattttt 28140
 tctgaaatgt gcgatctggc catgttcatg agcaaacagt attctctatg gcctcctagc 28200

aaggacaaca tcgtaacgtt ctccattgct tattgcttgt gcgcttgccct tcttactgct 28260
ttactgtgcg tatgcataca cctgcttgta accactcgca tcaaaaacgc caataacaaa 28320
gaaaaaatgc cttaacctct ttctgtttac agacatggct tctcttacat ctctcatatt 28380
tgtcagcatt gtcactgccg ctcatggaca aacagtcgtc tctatccctc taggacataa 28440
ttacactctc ataggacccc caatcacttc agaggctcatc tggaccaaac tgggaagcgt 28500
tgattacttt gatataatct gcaacaaaac aaaaccaata atagtaactt gcaacataca 28560
aaatcttaca ttgattaatg ttagcaaagt ttacagcggg tactattatg gttatgacag 28620
atacagtagt caatatagaa attacttggg tcgtgttacc cagttgaaaa ccacgaaaat 28680
gccaaatatg gcaaagattc gatccgatga caattctcta gaaactttta catctccac 28740
cacacccgac gaaaaaaaca tcccagattc aatgattgca attgttgacg cgggtggcagt 28800
ggatgatggca ctaataataa tatgcatgct tttatatgct tgcgctaca aaaagtttca 28860
tcctaaaaaa caagatctcc tactaaggct taacatttaa tttcttttta tacagccatg 28920
gtttccacta ccacattcct tatgcttact agtctcgcaa ctctgacttc tgctcgctca 28980
cacctcactg taactatagg ctcaaactgc aactaaaag gacctcaagg tggatcatgtc 29040
ttttgggtga gaatatatga caatggatgg ttacaaaac catgtgacca acctggtaga 29100
tttttctgca acggcgagaga cctaaccatt atcaacgtga cagcaaatga caaaggcttc 29160
tattatggaa ccgactataa aagtagttta gattataaca ttattgtact gccatctacc 29220
actccagcac cccgcacaac tactttctct agcagcagtg tcgctaacaa tacaatttcc 29280
aatccaacct ttgccgcgct tttaaaacgc actgtgaata attctacaac ttcacataca 29340
acaattttca cttcaacaat cagcattatc gctgcagtga caattggaat atctattctt 29400
gtttttacca taacctacta cgctgctgc tatagaaaag acaaacataa aggtgatcca 29460
ttacttagat ttgatattta atttgttctt ttttttttta tttacagtat ggtgaacacc 29520
aatcatggta cctagaaatt tcttcttcac catactcatt tgtgcattta atgtttgccc 29580
tactttcaca gcagtagcca cagcaacccc agactgtata ggagcatttg cttcctatgc 29640
actttttgct tttgttactt gcactctgct atgtagcata gtctgcctgg ttattaattt 29700
ttccaactt atagactgga tccttgctgc aattgcctac ctgcgccacc atccgaata 29760
ccgcaaccaa aatatcgcgg cacttcttag actcatctaa aacctgcag gctatactac 29820
caatattttt gcttctattg cttccctacg ctgtctcaac ccagctgcc tatagtactc 29880
caccagaaca ccttagaaaa tgcaaatcc aacaaccgtg gtcatttctt gcttgctatc 29940
gagaaaaatc agaaattccc ccaaatttaa taatgattgc tggataaatt aatataatct 30000
gttgaccat aatttcattt ttgatatacc ccctatttga ttttggtggg aatgctcca 30060
atgcacatga tcacccacaa gaccagagg aacacattcc cctacaaaac atgcaacatc 30120

caatagcgct aatagattac gaaagtgaac cacaaccccc actactccct gctattagtt 30180
 acttcaacct aaccggcgga gatgactgaa acactcacca cctccaattc cgccgaggat 30240
 ctgctcgata tggacggccg cgtctcagaa cagcgactcg cccaactacg catccgccag 30300
 cagcaggaac gcgcggccaa agagctcaga gatgtcatcc aaattcacca atgcaaaaaa 30360
 ggcatattct gtttggtaaa acaagccaag atatcctacg agatcacccg tactgaccat 30420
 cgctctctt acgaacttgg cccccaacga caaaaattta cctgcatggg gggaatcaac 30480
 cccatagtta tcaccagca aagtggagat actaagggtt gcattcactg ctctgcgat 30540
 tccatcgagt gcacctacac cctgctgaag accctatgcg gcctaagaga cctgctacca 30600
 atgaattaaa aaatgattaa taaaaaatca cttacttgaa atcagcaata aggtctctgt 30660
 tgaaattttc tcccagcagc acctcacttc cctcttccca actctgggtat tctaaacccc 30720
 gttcagcggc atactttctc catactttaa aggggatgtc aaatttttagc tcctctcctg 30780
 taccacaat ctcatgtct ttcttcccag atgaccaaga gagtccggct cagtgactcc 30840
 ttcaaccctg tctacccta tgaagatgaa agcacctccc aacaccctt tataaaccca 30900
 gggtttattt ccccaaattg cttcacacaa agcccaaacg gagttcttac tttaaaatgt 30960
 ttaacccac taacaaccac aggcggatct ctacagctaa aagtgggagg gggacttaca 31020
 gtggatgaca ccaacggttt ttgaaagaa aacataagtg ccaccacacc actcgttaag 31080
 actggtcact ctataggttt accactagga gccggattgg gaacgaatga aaataaactt 31140
 tgtatcaaat taggacaagg acttacattc aattcaaaca acatttgcac tgatgacaat 31200
 attaacacct tatggacagg agtcaacccc accgaagcca actgtcaaact catgaactcc 31260
 agtgaatcta atgattgcaa attaatctta acactagtta aaactggagc actagtcact 31320
 gcatttgttt atgttatagg agtatctaac aattttaata tgctaactac acacagaaat 31380
 ataaatttta ctgcagagct gtttttcgat tctactggta atttactaac tagactctca 31440
 tccctcaaaa ctccacttaa tcataaatca ggacaaaaca tggctactgg tgccattact 31500
 aatgctaaag gtttcatgcc cagcacgact gcctatcctt tcaatgataa ttctagagaa 31560
 aaagaaaact acatttacgg aacttgttac tacacagcta gtgatcgac tgcttttccc 31620
 attgacatat ctgtcatgct taaccgaaga gcaataaatg acgagacatc atattgtatt 31680
 cgtataactt ggtcctggaa cacaggagat gcccagagg tgcaaacctc tgctacaacc 31740
 ctagtcacct cccattttac cttttactac atcagagaag acgactgaca aataaagttt 31800
 aacttgttta ttgaaaatc aattcacaaa atccgagtag ttattttgcc tcccccttc 31860
 catttaacag aatacaccaa tctctcccca cgcacagctt taaacatttg gataccatta 31920
 gatatagaca tggttttaga ttccacattc caaacagttt cagagcgagc caatctgggg 31980
 tcagtgatag ataaaaatcc atcgggatag tcttttaaag cgctttcaca gtccaactgc 32040

tgcggatgcg actccggagt ctggatcacg gtcattctgga agaagaacga tgggaatcat 32100
 aatccgaaaa cggtatcgga cgattgtgtc tcatcaaacc cacaagcagc cgctgtctgc 32160
 gtcgctccgt gcgactgctg tttatgggat cagggtccac agtgtcctga agcatgattt 32220
 taatagccct taacatcaac tttctggtgc gatgcgcgca gcaacgcatt ctgatttcac 32280
 tcaaattctt gcagtaggta caacacatta ttacaatatt gtttaataaa ccataattaa 32340
 aagcgctcca gccaaaactc atatctgata taatcgcccc tgcattgacca tcataccaaa 32400
 gtttaataata aattaaatga cgttccctca aaaacacact acccacatac atgatctctt 32460
 ttggcatgtg catattaaca atctgtctgt accatggaca acgttggtta atcatgcaac 32520
 ccaatataac ctcccggaac cacactgcc aacccgctcc cccagccatg cattgaagtg 32580
 aaccctgctg attacaatga caatgaagaa cccaattctc tcgaccgtga atcacttgag 32640
 aatgaaaaat atctatagtg gcacaacata gacataaatg catgcatctt ctcataattt 32700
 ttaactctc aggatttaga aacatatccc agggaaatagg aagctcttgc agaacagtaa 32760
 agctggcaga acaaggaaga ccacgaacac aacttacact atgcatagtc atagtatcac 32820
 aatctggcaa cagcgggttg tcttcagtca tagaagctcg ggtttcattt tcctcacaac 32880
 gtggttaactg ggctctggtg taagggtgat gtctggcgca tgatgtcgag cgtgcgcgca 32940
 accttgatcat aatggagttg ctccctgaca ttctcgtatt ttgtatagca aaacgcggcc 33000
 ctggcagaac acactcttct tcgcttcta tcctgccgt tagcgtgttc cgtgtgatag 33060
 ttcaagtaca accacactct taagttggtc aaaagaatgc tggcttcagt tgtaatcaaa 33120
 actccatcgc atctaactgt tctgaggaaa tcattccagg tagcatatgc aaatcccaac 33180
 caagcaatgc aactggattg tgtttcaagc aggagaggag agggagaga cggaagaacc 33240
 atgttaattt ttattccaaa cgatctcgca gtacttcaaa ttgtatagtc cgcagatggc 33300
 atctctcgcc cccactgtgt tgggtgaaaa gcacagctag atcaaaagaa atgcgatttt 33360
 caaggtgctc aacgggtggc tcagcaaaag cctccacgcg cacatccaag aacaaaagaa 33420
 taccaaaaga aggagcattt tctaactcct caatcatcat attacattcc tgcaccattc 33480
 ccagataatt ttcagcttcc cagccttgaa ttattcgtgt cagttcttgt ggtaaatcca 33540
 atccacacat tacaacagc tcccggaggc cgccctccac caccattctt aaacacaccc 33600
 tcataatgac aaaatatctt gctcctgtgt cacctgtagc gaattgagaa tggcaacatc 33660
 aattgacatg cccttggtc taagttcttc ttttaagttc agttgtaaaa actctctcat 33720
 attatcacca aactgcttag ccagaagccc cccgggaaca agagcagggg acgctacagt 33780
 gcagtacaag cgcagacctc cccaattggc tcagcaaaa acaagattgg aataagcata 33840
 ttgggaaccg ccagtaatat catcgaagtt gctggaaata taatcaggca gagtttcttg 33900
 taaaaattga ataaaagaaa aatttgccaa aaaaacattc aaaacctctg ggatgcaaat 33960

101

89957

102

gcaataggtt accgcgctgc gctccaacat tgttagtttt gaattagtct gcaaaaataa 34020
aaaaaaaaac aagcgtcata tcatagtagc ctgacgaaca gatggataaa tcagtctttc 34080
catcacaaga caagccacag ggtctccagc tcgaccctcg taaaacctgt catcatgatt 34140
aaacaacagc accgaaagtt cctcgcggtg accagcatga ataattcttg atgaagcata 34200
caatccagac atgttagcat cagttaacga gaaaaaacag ccaacatagc ctttgggtat 34260
aattatgctt aatcgtaagt atagcaaagc caccctctgc ggatacaaag taaaaggcac 34320
aggagaataa aaaatataat tttttctctg ctgctgttca ggcaacgtcg cccccggtcc 34380
ctctaaatac acatacaaag cctcatcagc catggcttac cagacaaagt acagcgggca 34440
caciaagcac aagctctaaa gtgactctcc aacctctcca caatatatat atacacaagc 34500
cctaaactga cgtaatggga gtaaagtgtg aaaaatcccg ccaaacccaa cacacacccc 34560
gaaactgctt caccagggaa aagtacagtt tcaactccgc aatcccaaca ggcgtaactt 34620
cctctttctc acggtacgtg atatccact aacttgcaac gtcattttcc cacggctcga 34680
ccgccccctt tagccgttaa cccacagcc aatcaccaca cgatccacac tttttaaaat 34740
cacctcattt acatattggc accattccat ctataaggta tattatatag atag 34794

<210> 3

<211> 5287

<212> ДНК

<213> Аденовирус

<400> 3

ctatggcatc tcgatccagc agacctctc gtttcgctggg tttggacggc tcctggaata 60
gggtatgaga cgatgggctt ccagcgctgc cagggttcgg tccttccagg gtctcagtgt 120
tcgagtcagg gttgtttccg tcacagtga ggggtgtgcg cctgcttggg cgcttgccag 180
ggtgcgcttc agactcatcc tgctggtcga aaacttctgt cgcttggcgc cctgtatgtc 240
ggccaagtag cagtttacca tgagttcgta gttgagcgcc tcggctgcgt ggcctttggc 300
gcggagctta cctttggaag ttttcttgca taccgggcag tataggcatt tcagcgcata 360
caacttgggc gcaaggaaaa cggattctgg ggagtatgca tctgcgccgc aggaggcgca 420
aacagtttca cattccacca gccagggtta atccgggtca ttgggggtcaa aaacaagttt 480
tccgccatat tttttgatgc gtttcttacc tttgggtctc atgagttcgt gtcctcgttg 540
agtgacaaac aggtgtccg tgtccccgta gactgatttt acaggcctct tctccagtgg 600
agtgcctcgg tcttcttcgt acaggaactc tgaccactct gatacaaagg cgcgcgtcca 660
ggccagcaca aaggaggcta tgtgggaggg gtagcgatcg ttgtcaacca ggggggtccac 720
cttttccaaa gtatgcaaac acatgtcacc ctcttcaaca tccaggaatg tgattggctt 780
gtagggtgat ttcacgtgac ctgggggtccc cgctgggggg gtataaaagg gggcggttct 840

ttgctcttcc	tactgtctt	ccggatcgct	gtccaggaac	gtcagctgtt	ggggtaggt	900
ttccctctcg	aaggcgggca	tgacctctgc	actcaggttg	tcagtttcta	agaacgagga	960
ggatttgata	ttgacagtgc	cggttgagat	gcctttcatg	aggttttcgt	ccatctggtc	1020
agaaaacaca	atTTTTTtat	tgtcaagttt	ggtggcaa	gatccataca	gggcgttgga	1080
taaaagtttg	gcaatggatc	gcatggtttg	gttcttttcc	ttgtccgcgc	gctctttggc	1140
ggcgatgttg	agttggacat	actcgcgtgc	caggcacttc	cattcgggga	agatagtgtg	1200
taattcatct	ggcacgattc	tacttgcca	ccctcgatta	tgcaaggtaa	ttaaaccac	1260
actggtggcc	acctgcctc	gaaggggttc	attggtcaa	cagagcctac	ctccttccct	1320
agaacagaaa	gggggaagtg	ggtctagcat	aagttcatcg	ggagggctctg	catccatggt	1380
aaagattccc	ggaagtaa	ccttatcaaa	atagctgatg	ggagtggggt	catctaaggc	1440
catttgccat	tctcgagctg	ccagtgcgcg	ctcatatggg	ttaaggggac	tgccccatgg	1500
catgggatgg	gtgagtgcag	aggcatacat	gccacagatg	tcatagacgt	agatgggatc	1560
ctcaaagatg	cctatgtagg	ttggatagca	tgcctccctc	ctgatacttg	ctcgcacata	1620
gtcatatagt	tcatgtgatg	gcgctagcag	ccccggaccc	aagttggtgc	gattgggttt	1680
ttctgttctg	tagacgatct	ggcgaaagat	ggcgtgagaa	ttggaagaga	tgggtgggtct	1740
ttgaaaaatg	ttgaaatggg	catgaggtag	acctacagag	tctctgacaa	agtgggcata	1800
agattcttga	agcttggtta	ccagttcggc	ggtgacaagt	acgtctaggg	cgcagtagtc	1860
aagtgtttct	tgaatgatgt	cataacctgg	ttggtttttc	ttttccaca	gttcgcggtt	1920
gagaaggtat	tcttcgcgat	ccttccagta	ctcttctagc	ggaaaccgt	ctttgtctgc	1980
acggtgaagat	cctagcatgt	agaactgatt	aactgccttg	taagggcagc	agcccttctc	2040
tacgggtaga	gagtatgctt	gagcagcttt	tcgtagcgaa	gcgtgagtaa	gggcaaagg	2100
gtctctgacc	atgactttga	ggaattggta	tttgaagtcg	atgtcgtcac	aggctccctg	2160
ttcccagagt	tggaagtcta	cccgtttctt	gtaggcgggg	ttgggcaaag	cgaaagtaac	2220
atcattgaag	agaatcttgc	cggccctggg	catgaaattg	cgagtgatgc	gaaaaggctg	2280
tgggtacttcc	gctcgggttat	tgataacctg	ggcagctagg	acgatctcgt	cgaaaccgtt	2340
gatgttgtgt	cctacgatgt	ataattctat	gaaacgcggc	gtgcctctga	cgtgaggtag	2400
cttactgagc	tcatcaaagg	ttaggtctgt	ggggtcagat	aaggcgtagt	gttcgagagc	2460
ccattcgtgc	aggtgaggat	tgcctttaag	gaaggaggac	cagaggtcca	ctgccagtgc	2520
tgtttgtaac	tggteccggg	actgacgaaa	atgccgtccg	actgccattt	tttctggggg	2580
gacgcaatag	aaggtttggg	ggtcctgccc	ccagcgatcc	cacttgagtt	ttatggcgag	2640
gtcataggcg	atgttgacga	gccgctggtc	tccagagagt	ttcatgacca	gcatgaaggg	2700
gattagctgc	ttgccaagg	accccatcca	ggtgtaggtt	tccacatcgt	aggtgagaaa	2760

gagcctttct	gtgcgaggat	gagagccaat	cggaagaac	tggatctcct	gccaccagtt	2820
ggaggaatgg	ctgttgatgt	gatggaagta	gaactccctg	cgacgcgccg	agcattcatg	2880
cttgtgcttg	tacagacggc	cgcagtagtc	gcagcgttgc	acgggttgta	tctcgtgaat	2940
gagttgtacc	tggtttccct	tgacgagaaa	tttcagtggg	aagccgaggc	ctggcgattg	3000
tatctcgtgc	tttactatgt	tgtctgcata	ggcctgttca	tcttctgtct	cgatggtggt	3060
catgctgacg	agccctcgcg	ggaggcaagt	ccagacctcg	gcgcggcagg	ggcggagctc	3120
gaggacgaga	gcgcgcaggc	tggagctgtc	cagggctcctg	agacgctgcg	gactcaggtt	3180
agtaggcagt	gtcaggagat	taacttgcata	gatcttttgg	agggcgctgcg	ggaggttcag	3240
atagtacttg	atctcaacgg	gtccgttggt	ggagatgtcg	atggcttgca	gggttccgtg	3300
tcccttgggc	gctaccaccg	tgcccttggt	tttcattttg	gacggcggtg	gctctgttgc	3360
ttcttgcatg	tttagaagcg	gtgtcgaggg	cgcgaccggg	gcggcagggg	cggctcggga	3420
cccgccggca	tggttgccag	tggtacgtcg	gcgcgcgcgc	cgggtagggt	ctggtactgc	3480
gccctgagaa	gactcgcatg	cgcgacgacg	cggcggttga	catcctggat	ctgacgcctc	3540
tgggtgaaag	ctaccggccc	cgtgagcttg	aacctgaaag	agagttcaac	agaatcaatc	3600
tcggtatcgt	tgacggcggc	ttgcctaagg	atttcttgca	cgtcaccaga	gttgtcctgg	3660
taggcgatct	ccgccatgaa	ctgctcgatc	tcttctctct	gaagatctcc	gcggcccgtc	3720
ctctcgacgg	tgcccgcgag	gtcgttgagg	atgcgcccaa	tgagttgaga	gaatgcattc	3780
atgccgcctc	cgttccagac	gcccgtgtag	accacggccc	ccacgggatc	tctcgcgcg	3840
atgaccacct	gggcgaggtt	gagctccacg	tggcgggtga	agaccgcata	gttgcatagg	3900
cgttggaata	ggtagttgag	tgtggtggcg	atgtgctcgg	tgacgaagaa	atacatgata	3960
catcgtctca	gcggcatctc	gctgacatcg	cccagagctt	ccaagcgctc	catggcctcg	4020
tagaagtcca	cggcaaaatt	aaaaaactgg	gagtttcgcg	cggacacggg	caactcctct	4080
tccagaagac	ggataagttc	ggcgatggtg	gtgcgcacct	cgcgctcgaa	agcccttggg	4140
atttcttctc	caatctcttc	ttcttccact	aacatctctt	cctcttcagg	tggggctgca	4200
ggaggagggg	gaacgcggcg	acgcggcgcg	cgcacgggca	gacggtcgat	gaatctttca	4260
atgacctctc	cgcgggcgcg	gcgcattggt	tcagtgcagg	cgcggccggt	ctcgcgcggt	4320
cgcagagtaa	aaacaccgcc	gcgcattctc	ttaaagtggg	gactgggagg	ttctccgttt	4380
gggagggaga	gggcgctgat	tatacatttt	attaattggc	ccgtagggac	tgacgcgaga	4440
gatctgatcg	tgtcaagatc	cacgggatct	gaaaaccttt	cgacgaaagc	gtctaaccag	4500
tcacagtcac	aaggtaggct	gagtacggct	tcttggtggc	gggggtgggt	atgtgttcgg	4560
tctgggtctt	ctgtttcttc	ttcatctcgg	gaagggtgaga	cgatgctgct	ggtgatgaaa	4620
ttaaagtagg	cagttctaag	acggcggatg	gtggcgaggga	gcaccaggtc	tttgggtccg	4680

107	89957	108	
gcttgctgga tacgcaggcg attggccatt ccccaagcat tatcctgaca tctagcaaga			4740
tctttgtagt agtcttgcac gagccgttct acgggcactt ctctctcacc cgttctgcca			4800
tgcatacgtg tgagtcacaaa tccgcgcatt gggtgtacca gtgccaagtc agctacgact			4860
ctttcggcga ggatggcttg ctgtacttgg gtaagggtgg cttgaaagtc atcaaaatcc			4920
acaaagcggg ggtaagctcc tgtattaatg gtgtaagcac agttggccat gactgaccag			4980
ttaactgtct ggtgaccagg gcgcacgagc tcggtgtatt taaggcgcga ataggcgcgg			5040
gtgtcaaaga tgtaatcggt gcagggtgcgc accagatact ggtacctat aagaaaatgc			5100
ggcgggtggt ggcggtagag aggccatcgt tctgtagctg gagcgccagg ggcgaggtct			5160
tccaacataa ggcggtgata gccgtagatg tacctggaca tccaggtgat tcctgcggcg			5220
gtagtagaag cccgaggaaa ctgcgtacg cggttccaaa tgttgcgtag cggcatgaag			5280
tagttca			5287

<210> 4
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> праймер

<400> 4
 gggagtttcg cgcggacacg g 21

<210> 5
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> праймер

<400> 5
 gcgcgcgcgc cgcggagagg t 21

<210> 6
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> праймер

<400> 6
 cgaagcccca ttcgtgcagg tgag 24

<210> 7
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

<400> 7

gctgcgacta ctgcgggcgt ctgt

24

<210> 8

<211> 4195

<212> ДНК

<213> Аденовирус

<400> 8

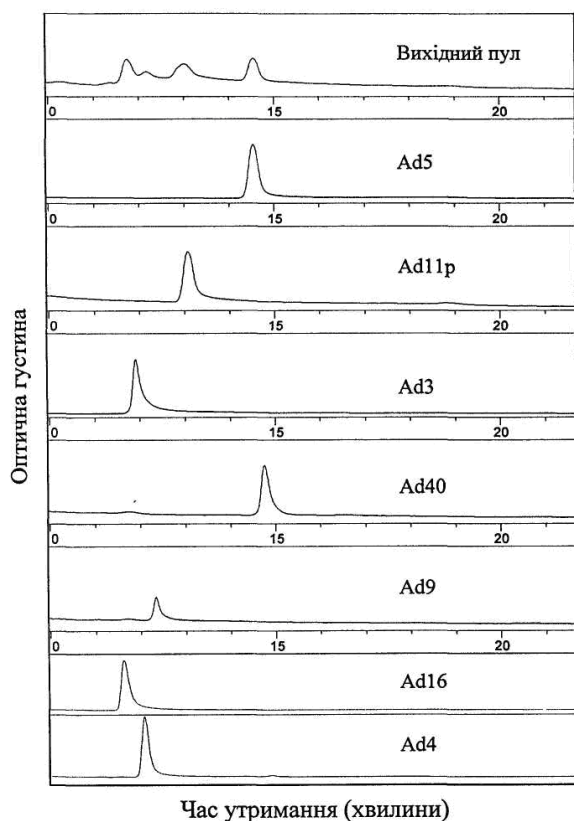
tcataagact ctcgtccatc tggtcagaaa acacaatctt cttgttgtcc agcttgggtg	60
caaatgatcc atagagggca ttggatagaa gcttggcgat ggagcgcag gtttggttct	120
tttccttgtc cgcgcgctcc ttggcgggtga tgttaagctg gacgtactcg cgcgccacac	180
atttcatttc aggaagatg gttgtcagtt catccggaac tattctgatt cgccatcccc	240
tattgtgcag gggtatcaga tccacactgg tggccacctc gctcggagg ggctcattgg	300
tccagcagag tcgacctcct tttcttgaac agaaaggggg gaggggggtct agcatgaact	360
catcaggggg gtccgcatct atggtaaata ttcccggtag caaatctttg tcaaaatagc	420
tgatggtggc gggatcatcc aaggatcatc gccattctcg aactgccagc gcgcgctcat	480
aggggttaag aggggtgccc cagggcatgg ggtgggtgag cgcggaggca tacatgccac	540
agatatcgta gacatagagg ggctcttcga ggatgccgat gtaagtggga taacatcgcc	600
ccccctgat gcttgctcgc acatagtcag agagttcatg tgagggggca agaagacccg	660
ggcccagatt ggtgcggttg ggtttttccg ccctgtaaac gatctggcga aagatggcat	720
gggaattgga agagatagta ggtctctgga atatgttaaa atgggcatga ggtaagccta	780
cagagtcctt tatgaagtgg gcatatgact cttgcagctt ggctaccagc tcggcgggtga	840
tgagtacatc cagggcacag tagtcgagag tttcctggat gatgtcataa cgcggttggc	900
ttttcttttc ccacagctcg cgggtgagaa ggtattcttc gtgatccttc cagtactctt	960
cgaggggaaa cccgtctttt tctgcacggt aagagccaa catgtagaac tgattgactg	1020
ccttgtaggg acagcatccc ttctccactg ggagagagta tgcttgggct gcattgcgca	1080
gcgaggtatg agtgagggca aaagtgtccc tgaccatgac tttgaggaat tgatacttga	1140
agtcgatgtc atcacaggcc ccctgttccc agagttggaa gtccaccgc ttctttagg	1200
cggggttggg caaagcgaaa gtaacatcat tgaagaggat cttgccggcc ctgggcatga	1260
aatttcgggt gattttgaaa ggctgaggaa cctctgctcg gttattgata acctgagcgg	1320
ccaagacgat ctcacaaag ccattgatgt tgtgccccac tatgtacagt tctaagaatc	1380
gaggggtgcc cctgacatga ggcagcttct tgagttcttc aaaagtgaga tctgtaggg	1440
cagtgagagc atagtgttcg agggccatt cgtgcacgtg agggttcgct ttaaggaagg	1500
aggaccagag gtccactgcc agtgctgttt gtaactggtc ccggtactga cgaaaatgct	1560

gtccgactgc	catcttttct	ggggtgacgc	aatagaaggt	ttgggggtcc	tgccgccagc	1620
gatcccaactt	gagttttatg	gcgagggtcat	aggcgatggt	gacgagccgc	tggtctccag	1680
agagtttcat	gaccagcatg	aaggggatta	gctgcttgcc	aaaggacccc	atccaggtgt	1740
aggttttccac	atcgtaggtg	agaaagagcc	tttctgtgcg	aggatgagag	ccaatcggga	1800
agaactggat	ctcctgccac	cagttggagg	aatggctggt	gatgtgatgg	aagtagaact	1860
ccctgcgacg	cgccgagcat	tcatgcttgt	gcttgtagag	acggccgcag	tactcgcagc	1920
gattcacggg	atgcacctta	tgaatgagtt	gtacctgact	tcctttgacg	agaaatttca	1980
gtggaaaatt	gaggcctggc	gcttgtagct	cgcgctttac	tatgttgtct	gcatcggcat	2040
gaccatcttc	tgtctcgatg	gtggatcatg	tgacgagccc	tcgctgggag	caagtccaga	2100
cctcggcgcg	gcaggggagg	agctcgagga	cgagagcgcg	caggccggag	ctgtccaggg	2160
tcctgagacg	ctgcggagtc	aggttagtag	gcagtgtcag	gagattaact	tgcatgatct	2220
tttgaggggc	gtgaggggag	ttcagatagt	acttgatctc	aacgggtccg	ttggtggaga	2280
tgatgatggc	ttgcaggggt	ccgtgtccct	tgggcgctac	caccgtgccc	ttgtttttca	2340
ttttggacgg	cggtggctct	gttgcttctt	gcatgtttag	aagcgggtgc	gagggcgcg	2400
accggggggc	agggggggct	cgggacccgg	cggcatggct	ggcagtggtg	cgtcggcgcc	2460
gcgcgcgggt	aggttctggt	actgcgcctt	gagaagactc	gcatgcgcga	cgacgcggcg	2520
gttgacatcc	tgatctgac	gcctctgggt	gaaagctacc	ggccccgtga	gcttgaacct	2580
gaaagagagt	tcaacagaat	caatctcggt	atcgtagacg	gcggcttgcc	taaggatttc	2640
ttgcacgtcg	ccagagttgt	cctggtaggc	gatctcgccc	atgaactgct	cgatctcttc	2700
ctcttgaaga	tctccgcgcc	ccgtctcttc	gacgggtggc	gcgaggtcgt	tggagatgcg	2760
cccaatgagt	tgagagaatg	cattcatgcc	cgcctcgctc	cagacgcggc	tgtagaccac	2820
agccccacg	ggatctctcg	cgcgcatgac	cacctgggcg	aggttgagct	ccacgtggcg	2880
ggatgaagacc	gcatagttgc	ataggcgctg	gaaaaggtag	ttgagtgtgg	tggcgatgtg	2940
ctcggtagacg	aagaaataca	tgatccatcg	tctcagcgcc	atctcgctga	catcgcccag	3000
cgcttccaag	cgctccatgg	cctcgtagaa	gtccacggca	aagttaaaaa	actgggagtt	3060
acgcgcggac	acggtcaact	cctcttccag	aagacggata	agttcggcga	tggttggtgcg	3120
cacctcgcg	tcgaaagccc	ctgggatttc	ttctcctaatc	tcttcttctt	ccactaacat	3180
ctcttctctt	tcagggtggg	ctgcaggagg	agggggaacg	cggcgacgcc	ggcggcgcac	3240
gggcagacgg	tcgatgaatc	tttcaatgac	ctctccgcgg	cggcggcgca	tggtctcggt	3300
gacggcacga	ccgttctccc	tgggtctcag	agtgaagacg	cctccgcgca	tctccctgaa	3360
gtggtgactg	ggaggctctc	cggtgggcag	ggacaccgcg	ctgattatgc	atcttatcaa	3420
ttgccccgta	ggtactccgc	gcaaggacct	gatcgtctca	agatccacgg	gatctgaaaa	3480

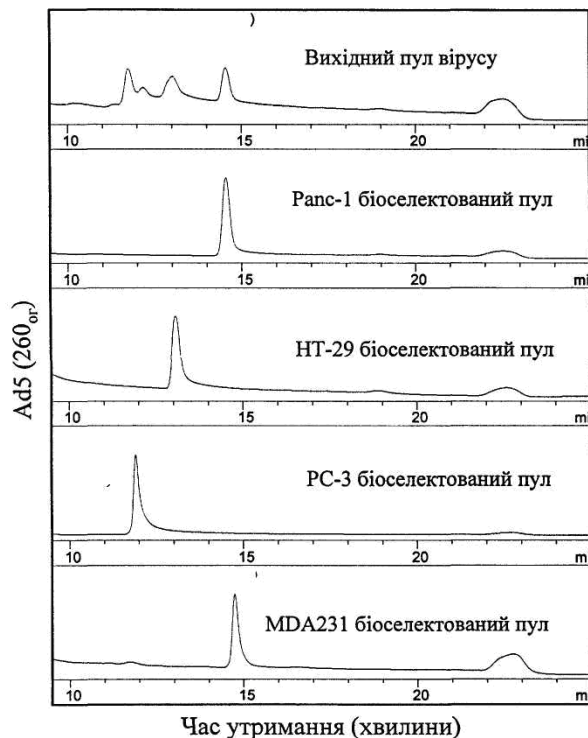

```

cctttcgacg aaagcgtcta accagtcgca atcgcaaggt aggctgagca ctgtttcttg 3540
cgggcggggg cggttagacg ctcggtcggg gttctctctt tcttctcctt cctcctcttg 3600
ggaggggtgag acgatgctgc tggatgatgaa attaaaatag gcagttttga gacggcggat 3660
ggtggcgagg agcaccagggt ctttgggtcc ggcttggtgg atacgcaggc gatgagccat 3720
tccccaagca ttatcctgac atctggccag atctttatag tagtcttgca tgagtcgttc 3780
cacgggcact tcttcttcgc ccgctctgcc atgcatgcga gtgatcccga acccgcgcat 3840
gggctggaca agtgccagggt ccgctacaac cctttcggcg aggatggctt gctgcacctg 3900
ggtgaggggtg gcttggaagt cgtcaaagtc cacgaagcgg tggtagggcc cggtgttgat 3960
tgtgtaggag cagttggcca tgactgacca gttgactgtc tggtgcccag ggcgcacgag 4020
ctcgggtgtac ttgaggcgcg agtatgcgcg ggtgtcaaag atgtaatcgt tgcagggtgcg 4080
caccaggtagc tggtagccaa tgagaaagtg tggcgggtggc tggcgggtaca ggggccatcg 4140
ctctgtagcc ggggctcccg gggcgaggtc ttccagcatg aggcgggtgg agccg 4195

```

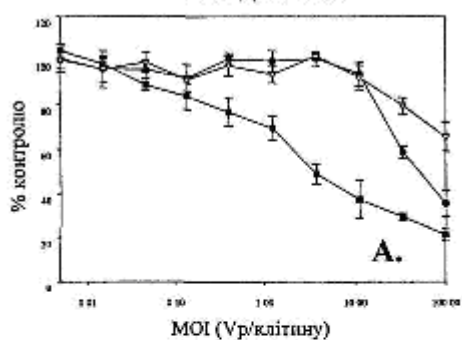


Фіг. 1А

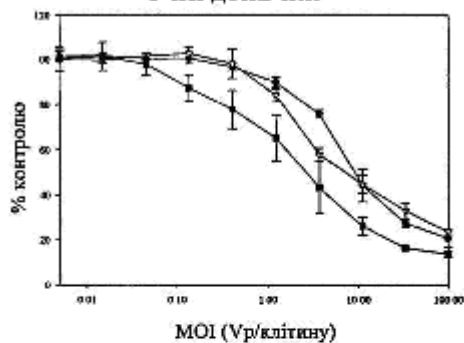


Фіг. 1Б

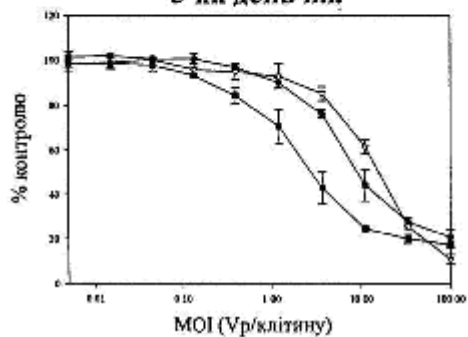
А. HT-29 клітини
4-ий день п.і.



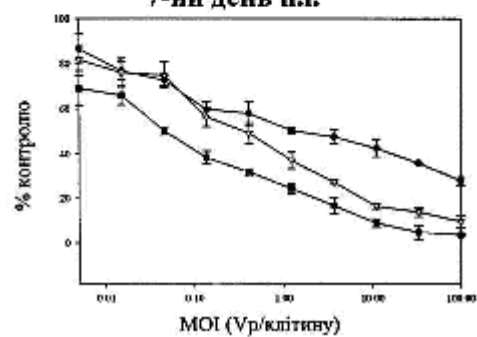
Б. MDA231 клітини
6-ий день п.і.



В. Рапс-1 клітини
5-ий день п.і.

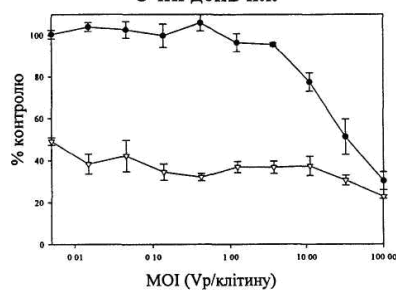


Г. РС-3 клітини
7-ий день п.і.

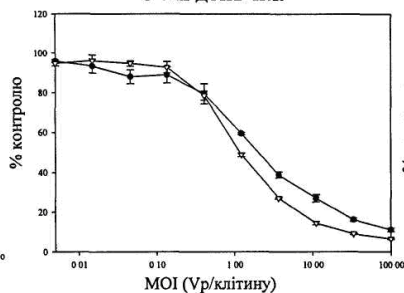


Фіг.2

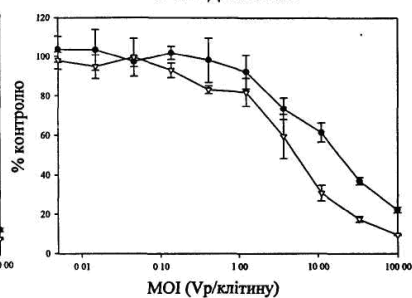
HT-29 клітини
5-ий день п.і.



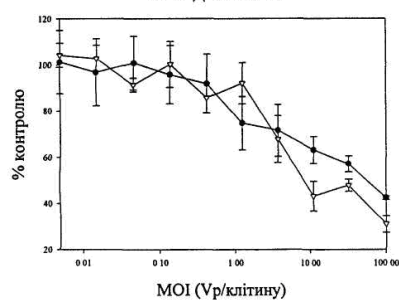
DU145 клітини
5-ий день п.і.



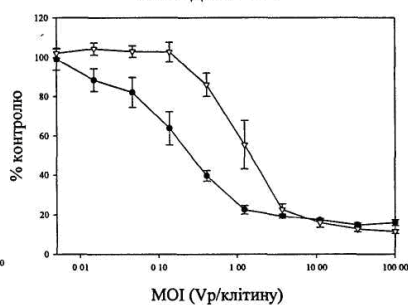
MDA231 клітини
8-ий день п.і.



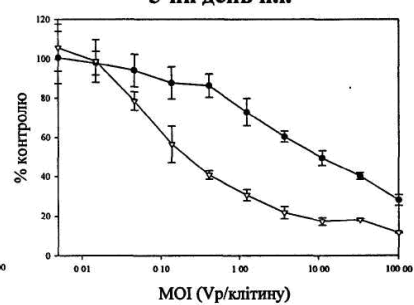
OVCAR-3 клітини
7-ий день п.і.



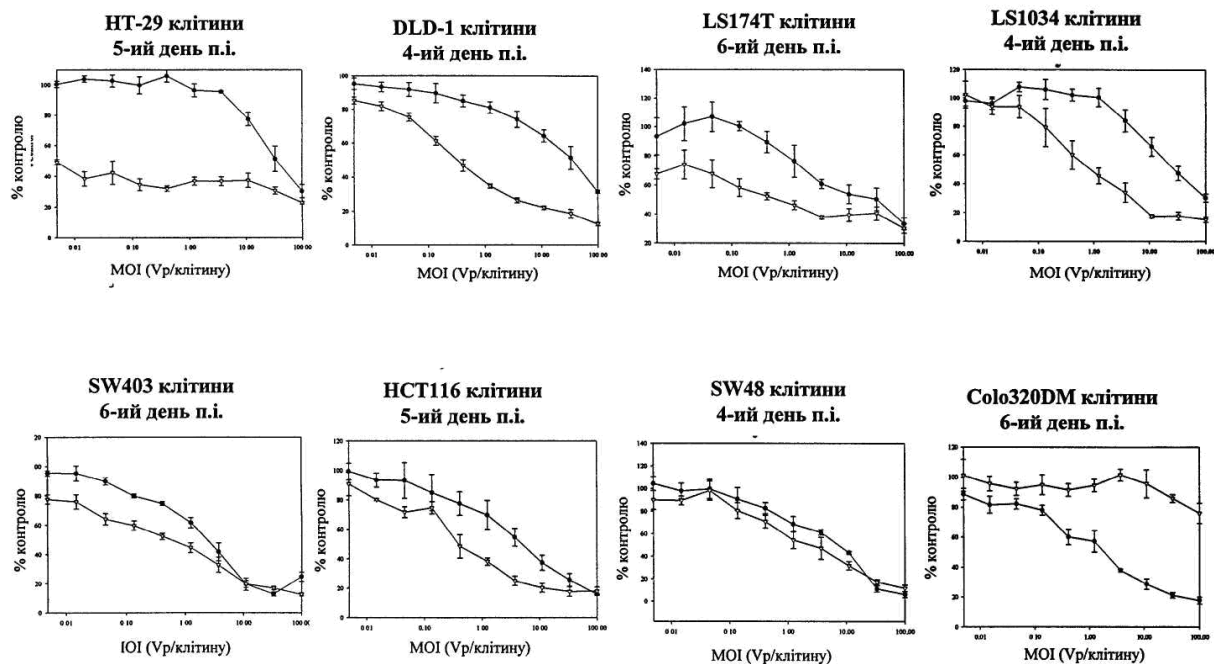
Рапс-1 клітини
6-ий день п.і.



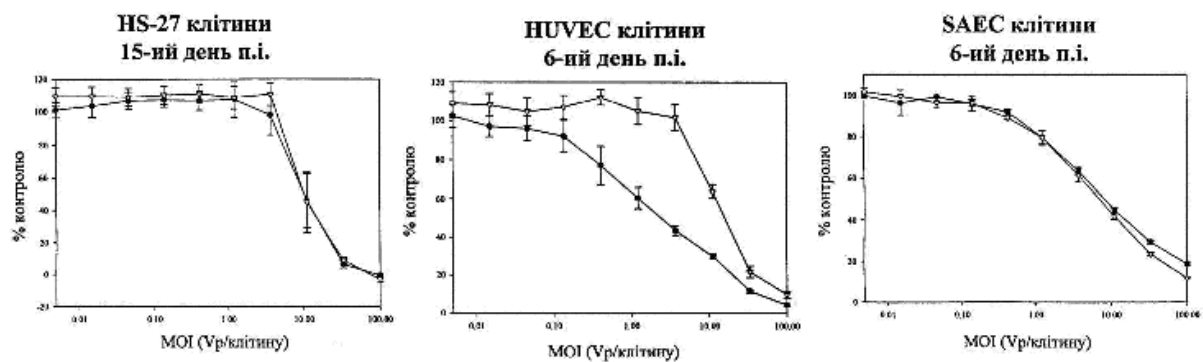
РС-3 клітини
5-ий день п.і.



Фіг.3А

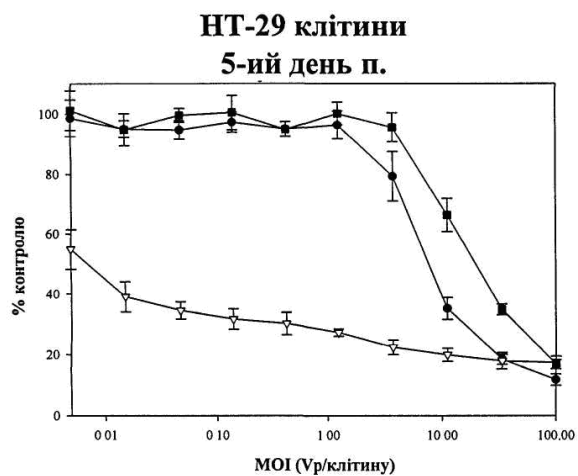


Фіг.3Б

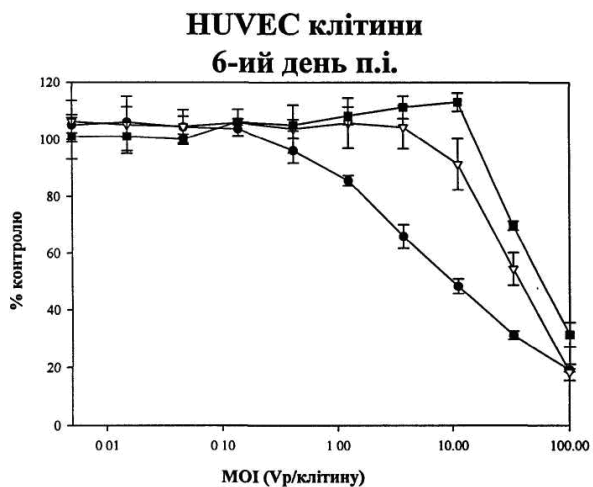


Фіг.4

А.



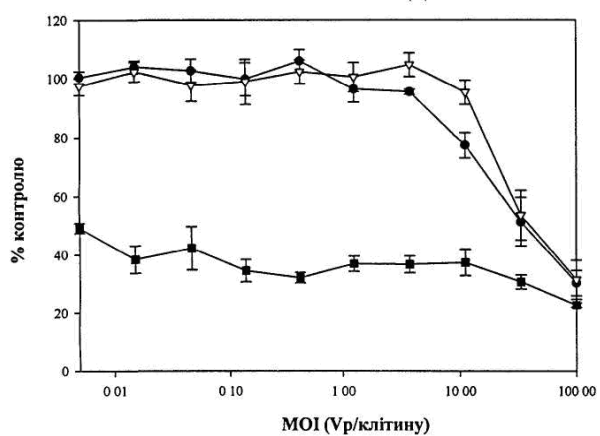
Б.



Фіг.5

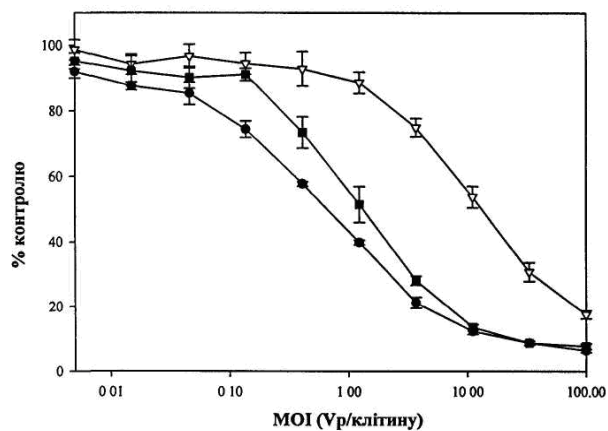
А.

НТ-29 клітини 5-ий день п.і.

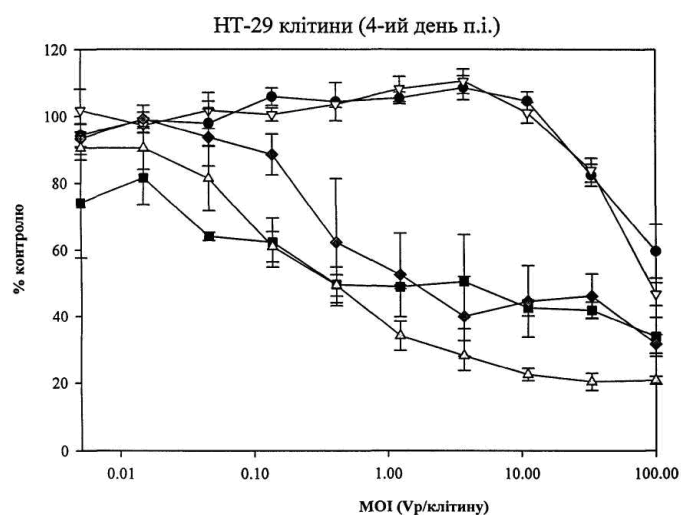


Б.

SAEC клітини 7-ий день п.і.



Фіг.6



Фіг.7