



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК  
*C12N 15/861* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21), (22) Заявка: **2006145306/13**, **18.05.2005**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**18.05.2005**

(30) Конвенционный приоритет:  
**20.05.2004 ES P200401219**

(43) Дата публикации заявки: **27.06.2008**

(45) Опубликовано: **10.07.2010** Бюл. № 19

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: **ES 2156958, 01.08.2001. WO 9815636,**  
**16.04.1998. WO 9822143, 28.05.1998.**

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную  
фазу: **20.12.2006**

(86) Заявка РСТ:  
**ES 2005/000277 (18.05.2005)**

(87) Публикация РСТ:  
**WO 2005/112541 (01.12.2005)**

Адрес для переписки:  
**129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,**  
**ООО "Юридическая фирма Городисский и**  
**Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517**

(72) Автор(ы):

**ЦЯНЬ ЧЭН (ES),**  
**ГУАНЬ МИНЬ (ES),**  
**СМЕРДОУ ПИКАЗО Кристиан (ES),**  
**ПРЬЕТО Вальтуэнья Хесус (ES)**

(73) Патентообладатель(и):

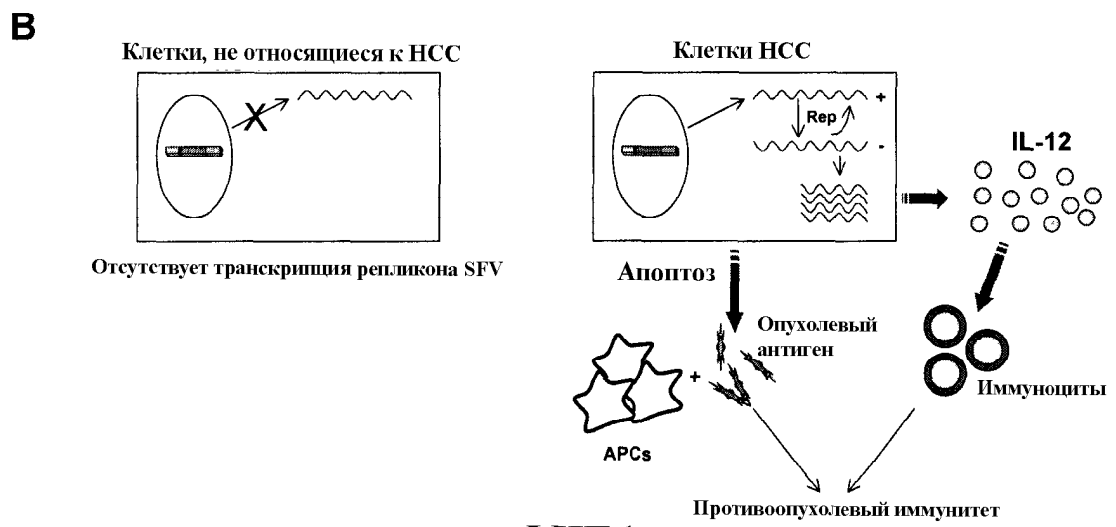
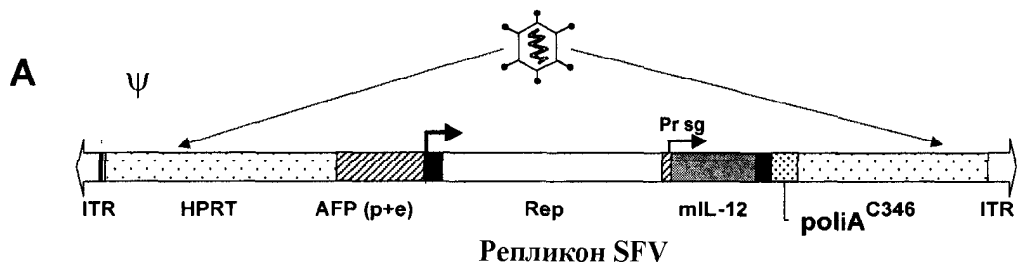
**ПРОЕКТО ДЕ БИОМЕДИЦИНА СИМА,**  
**С.Л. (ES)**

**(54) АДЕНОВИРУСНЫЙ/АЛЬФА-ВИРУСНЫЙ ГИБРИДНЫЙ ВЕКТОР ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО ВВЕДЕНИЯ И ЭКСПРЕССИИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ГЕНОВ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, генной инженерии и медицины. Аденовирусный гибридный вектор содержит первую цепь из аденовируса, содержащую последовательность первого инвертированного концевого повтора (ITR) и сигнальную последовательность для упаковки аденовируса; первую некодирующую последовательность наполнителя; последовательность, соответствующую тканеспецифическому промотору; цепь кДНК, полученную из альфавируса, последовательность которой частично комплементарна РНК альфавируса, включающую, последовательность,

кодирующую, один интересующий экзогенный ген; последовательность полиаденилирования; и последовательность второго инвертированного концевого повтора (ITR). Раскрыты также фармацевтические композиции, содержащие такой аденовирусный гибридный вектор, и их применение. Заявляемая группа изобретений может быть использована в способе переноса генетического материала в клетку, в частности, опухолевую клетку, которая предпочтительно экспрессирует альфа-фетопротейн (AFP), и к его применению для индукции иммунного ответа против чужеродных антигенов. 8 н. и 30 з.п. ф-лы, 16 ил.



**ФИГ.1**

RU 2394104 C2

RU 2394104 C2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.  
**C12N 15/861** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2006145306/13, 18.05.2005**  
(24) Effective date for property rights:  
**18.05.2005**  
(30) Priority:  
**20.05.2004 ES P200401219**  
(43) Application published: **27.06.2008**  
(45) Date of publication: **10.07.2010 Bull. 19**  
(85) Commencement of national phase: **20.12.2006**  
(86) PCT application:  
**ES 2005/000277 (18.05.2005)**  
(87) PCT publication:  
**WO 2005/112541 (01.12.2005)**  
Mail address:  
**129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO**  
**"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",**  
**pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517**

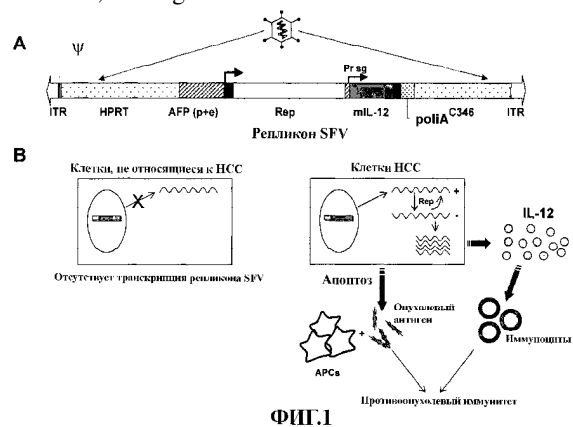
(72) Inventor(s):  
**TsJaN' Chehn (ES),**  
**GUAN' Min' (ES),**  
**SMERDOU PIKAZO Kristian (ES),**  
**PR'ETO Val'tuehn'ja Khesus (ES)**  
(73) Proprietor(s):  
**PROEKTO DE BIOMEDISINA SIMA, S.L. (ES)**

(54) **ADENOVIRUS/ALFAVIRUS HYBRID VECTOR FOR EFFECTIVE ADMINISTRATION AND EXPRESSION OF THERAPEUTIC GENES IN TUMOR CELLS**

(57) Abstract:  
FIELD: medicine.  
SUBSTANCE: adenoviral hybrid vector contains the first chain of adenovirus containing sequence of the first inverted terminal repeat (ITR) and signal sequence for packaging of adenovirus, the first non-coding sequence of the filler; sequence corresponding to tissue-specific promoter; chain of cDNA derived from alphavirus, which sequence is partially complementary to alphavirus RNA, including encoding sequence, an exogenous gene under interest; polyadenylation sequence and sequence of the second inverted terminal repeat (ITR). Pharmaceutical compositions containing such adenoviral vector hybrid and their application are revealed as well. The declared group of inventions can be used in the method of transfer of genetic material into cell, in particular into tumor cell which preferably expresses

alpha-fetoprotein (AFP), and its application for induction of immune response against foreign antigens.  
EFFECT: increasing of efficiency of therapeutic genes administration.

38 cl, 17 dwg



RU 2 394 104 C2

RU 2 394 104 C2

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к векторам для экспрессии гена, полученным из аденовирусов, для получения терапевтических продуктов.

Уровень техники

5 Одной из основных проблем, с которыми сталкивается обычная противоопухолевая терапия, является отсутствие специфичности к опухолям, ситуация, которая часто приводит к проявлению тяжелых побочных эффектов и ограничивает применяемую терапевтическую дозу. Несмотря на то, что генная  
10 терапия остается многообещающей для лечения злокачественных опухолей, для нее также характерна проблема специфичности: целенаправленная трансгенная экспрессия в области опухоли. На основании результатов ряда исследований можно предположить, что когда вирусные векторы вводят в область поражения, несмотря  
15 на то, что трансгенная экспрессия в основном ограничена областью, смежной с ходом иглы, такая экспрессия также может иметь место в других тканях. Следовательно, важной целью генной терапии по отношению к злокачественным опухолям является направление экспрессии терапевтического гена к опухолям посредством специфического введения в ткань новообразований («тканевая цель») и/или специфической активации («транскрипционная цель») в ткани новообразований  
20 без влияния на здоровые клетки. «Тканевой цели» можно достичь созданием направленного вектора посредством модификаций взаимодействия рецептор-лиганд, что позволяет инфицировать клетки, которые экспрессируют специфический рецептор. «Транскрипционной цели» можно достичь при использовании  
25 опухолеспецифического промотора для контроля трансгенной экспрессии. В предшествующих исследованиях использовались различные опухолеспецифические промоторы. Однако таковые представляют серьезное ограничение в том плане, что они не приводят к экспрессии на высоком уровне, в результате чего  
30 противоопухолевая активность ограничивается.

Обзор самых последних достижений в разработке вирусных векторов для генной терапии можно найти у Lundstrom K. «Latest development in viral vectors for gene therapy»; Trends in Biotechnology, 2003, 21, 118-122.

Используемые в настоящее время вирусные векторы включают альфавирусы.  
35 Альфавирусы представляют вирусы с оболочкой, которые содержат простую «плюс-цепь» РНК в качестве генома. Были сконструированы и разработаны экспрессирующие векторы, полученные из альфавирусов, вируса Синдбай (SIN), вируса леса Семлики (SFV) и вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEE).  
40 Альфавирусные векторы основаны на применении самореплицирующихся молекул РНК, полученной из геномов альфавирусов, в которой сохраняются 5'- и 3'-последовательности, необходимые для репликации, и ген репликазы (Rep), в то время как гены, кодирующие вирусные структурные белки, подвергаются делеции и замещаются трансгеном. После трансфекции клеток данными векторами Rep  
45 транслируется, и РНК-вектор копируется в «минус-цепь» РНК, которая будет использоваться в качестве матрицы для амплификации РНК-вектора. Rep также может узнавать субгеномный промотор в «минус-цепи» РНК, из которой синтезируется меньший субгеномный сегмент РНК, который, в свою очередь, может  
50 транслироваться с продукцией гетерологичных белков на высоком уровне. Альфавирусные векторы можно непосредственно использовать в качестве РНК при транскрипции в условиях *in vitro* от прокариотического промотора, такого как SP6 или E7, или в качестве ДНК, когда последовательность репликона расположена

ниже эукариотического промотора, такого как CMV. РНК-вектор может быть упакован в вирусные частицы посредством котрансфекции в клетки вместе с одной или более «хелперной» РНК, которая кодирует вирусные структурные белки. Альфавирусные векторы обладают рядом свойств, которые делают их привлекательными для генной терапии: очень высокий тропизм, низкая иммуногенность и экспрессия гетерологичных белков на высоком уровне. Однако такая экспрессия является временной за счет индукции апоптоза клеток, в которых происходит репликация. В статье Rayner J.O., Dryga S.A., Kamrud K.I. «Alphavirus vectors and vaccination»; Rev. Med. Virol. 2002; 12, 279-296, описывается разработка экспрессирующих векторов на основе альфавирусов для применения в области вакцин.

Другие группы вирусных векторов основаны на аденовирусах. Имеется большое количество литературы по применению аденовирусов, которые были разработаны для преодоления некоторых недостатков генной терапии, и в качестве источника для создания экспрессирующих векторов. Статья о самых последних достижениях в области аденовирусных векторов опубликована Volpers C., Kochanek S. «Adenoviral vectors for gene transfer and therapy»; J. Gene. Med. 2004; 6: S164-S171. Аденовирусы обладают преимуществом достижения высокой эффективности трансдукции и способностью сохраняться в эпизомальной форме. Однако экспрессия аденовирусных белков вызывает сильные иммунные ответные реакции, которые ограничивают продолжительность трансгенной экспрессии и вызывают токсичность в клетках, инфицированных вектором. Для решения данных проблем были получены аденовирусы «с усеченным геномом» («gutless adenoviruses»). Данные аденовирусы «с усеченным геномом» лишены всех соответствующих аденовирусных генов (сохраняются только последовательности, представляющие собой последовательности двух инвертированных концевых повторов и сигналы для упаковки), следовательно, трансдуцированные клетки не экспрессируют аденовирусного продукта и не индуцируют иммунного ответа на вектор. Кратко, элиминация всех аденовирусных генов оставляет достаточное пространство для размещения крупных экспрессирующих кассет и по этой причине аденовирусы «с усеченным геномом» также называют аденовирусными векторами с высокой емкостью. Опубликована статья, описывающая конкретные аспекты аденовирусных векторов, относящаяся к делеции всех последовательностей, кодирующих вирусные белки, Morsy M.A. et al. «An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene»; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95: 7866-7871. В статье, опубликованной Schiedner G. et al., «Variables affecting in vivo performance of high-capacity adenovirus vectors»; J. Virol. 2002, 76: 1600-1609, описывается применение «лишней» ДНК в экспрессирующих векторах на основе аденовирусов «с усеченным геномом», показывая, что наличие такой «лишней» ДНК важно для достижения значительного усиления экспрессии гена и что, в основном, конструирование векторов на основе аденовируса («с усеченным геномом») с высокой емкостью может существенно модифицировать степень и продолжительность экспрессии гена.

С другой стороны, в патенте США № 5981225 описывается вектор для переноса гена на основе аденовирусов, который включает последовательности инвертированного концевого повтора (ITR), по меньшей мере, одну последовательность сигнала для упаковки и аденовирусный ген VAI и/или аденовирусный ген VAII; и включает ген, являющийся чужеродным для аденовируса,

функционально связанный с функциональным промотором в клетках-мишенях для аденовируса.

В патенте США № 5985846 описывается вектор для переноса гена, включающий последовательности инвертированного концевой повтора (ITR) аденовируса и рекомбинантные частицы аденовируса, содержащие данные последовательности.

В патенте США № 6566093 описываются векторы кДНК, полученные из альфавирусов, которые состоят из ДНК, комплементарной, по меньшей мере, в отношении части РНК альфавируса, необходимой для репликации альфавируса, и гетерологичную кДНК, например кДНК, кодирующую желаемое соединение. Последнее может представлять собой биологически активный белок или полипептид, а также иммуногенный или антигенный белок или полипептид, терапевтически активный белок или полипептид, или терапевтически активную РНК.

Целью настоящего изобретения является повышение трансгенной экспрессии и индукции апоптоза опухолевых клеток, опосредуемое гибридными векторами в условиях *in vitro* и *in vivo*. Дополнительной целью является повышение эффективности терапии опухолей на моделях на животных с помощью гибридных векторов.

Дополнительной целью также является разработка способа генной терапии, в частности, для лечения злокачественных опухолей с помощью применения гибридных векторов.

Цели настоящего изобретения достигаются объединением следующего в одном векторе:

- высокой инфицирующей способности путем использования системы высвобождения аденовируса,
- высокой трансгенной экспрессии и индукции апоптоза путем использования вектора, полученного из альфавируса, такого как SFV, и
- специфичности к опухолям путем использования опухолеспецифического промотора.

#### Сущность изобретения

Настоящее изобретение, во-первых, относится к аденовирусному гибриднему вектору для экспрессии гена, отличающемуся тем, что он содержит, по меньшей мере, следующие элементы, ориентированные в направлении от 5' к 3':

- i) первую цепь из аденовируса, содержащую последовательность первого инвертированного концевой повтора (ITR) и сигнальную последовательность для упаковки аденовируса;
- ii) первую некодирующую «лишнюю» последовательность;
- iii) последовательность, соответствующую тканеспецифическому промотору;
- iv) цепь кДНК, полученную из альфавируса, последовательность которой частично комплементарна РНК альфавируса, включающую, по меньшей мере, последовательность, кодирующую, по меньшей мере, один интересующий экзогенный ген;
- v) последовательность полиаденилирования; и
- vi) последовательность второго инвертированного концевой повтора аденовируса (ITR).

Конкретнее, настоящее изобретение относится к конструкции аденовирусного гибридного вектора, содержащей в качестве элемента iv цепь кДНК, полученной из альфавируса, соответствующую последовательности рекомбинантного репликона SFV под контролем транскрипции опухолеспецифического промотора

(элемента iii), который представляет собой промотор альфа-фетопротейна (AFP). В данной конструкции трансген можно вставить в репликон SFV, управляемый субгеномным промотором SFV. После инфицирования опухолевых клеток данным гибридным вектором мРНК репликона SFV транскрибируется от  
 5 опухолеспецифического промотора, и неструктурные белки - nsP, которые составляют ген репликазы SFV, транслируются из указанной мРНК репликона SFV. Данные белки nsP вирусной репликазы инициируют репликацию мРНК репликона SFV с получением субгеномной РНК SFV. Следовательно, трансген  
 10 можно экспрессировать на высоком уровне из субгеномной РНК SFV. Данный общий процесс репликации вируса будет приводить к апоптозу инфицированных клеток. В том случае, когда данный гибрид заражает неопухолевые клетки, мРНК SFV не будет транскрибироваться под действием опухолеспецифического промотора, который не будет активным в данных клетках. Таким образом, трансген  
 15 не будет экспрессироваться, и апоптоз будет отсутствовать в нормальных клетках, инфицированных гибридным вектором.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения указанного аденовирусного гибридного вектора, предусматривающему сборку  
 20 элементов i-vi аденовирусного гибридного вектора, определенного выше, с помощью методов генной инженерии.

Также настоящее изобретение относится к применению указанного гибридного вектора для переноса генетического материала в клетку, и конкретнее, для введения  
 25 и экспрессии чужеродных генов в эукариотических клетках, которые могут представлять собой клетки-мишени для аденовируса.

Перенос генетического материала предпочтительно приводит к индукции иммунного ответа против чужеродных антигенов в указанной клетке.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции,  
 30 содержащей указанный аденовирусный/альфавирусный гибридный вектор, и ее применению в терапевтическом лечении злокачественной опухоли, предусматривающему введение указанной фармацевтической композиции субъекту.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения злокачественной опухоли с помощью применения определенного выше гибридного вектора,  
 35 предусматривающему введение указанного гибридного вектора субъекту.

Настоящее изобретение относится аденовирусному гибриднему вектору для экспрессии гена, отличающемуся тем, что он содержит, по меньшей мере, следующие элементы, ориентированные в направлении от 5' к 3':

- 40 i) первую цепь из аденовируса, содержащую последовательность первого инвертированного концевого повтора (ITR) и сигнальную последовательность для упаковки аденовируса;
- ii) первую некодирующую «лишнюю» последовательность;
- iii) последовательность, соответствующую тканеспецифическому промотору;
- 45 iv) цепь кДНК, полученную из альфавируса, последовательность которой частично комплементарна РНК альфавируса, включающую, по меньшей мере, последовательность, кодирующую, по меньшей мере, один интересующий экзогенный ген;
- 50 v) последовательность полиаденилирования; и
- vi) последовательность второго инвертированного концевого повтора аденовируса (ITR).

Происхождение элемента i в альфавирусном/аденовирусном гибридном векторе

по настоящему изобретению, т.е. происхождение цепи из аденовируса, содержащей последовательность первого инвертированного концевого повтора (ITR) и сигнальную последовательность для упаковки ( $\psi$ ) аденовируса, не является критическим аспектом для настоящего изобретения, и он может происходить из аденовируса любого серотипа. Указанные серотипы хорошо известны в данной области и включают, например, Ad12 (подрод А), Ad3 и Ad7 (подрод В), Ad2 и Ad5 (подрод С), Ad8 (подрод D), Ad4 (подрод Е), Ad40 (подрод F) и другие известные не относящиеся к человеческим аденовирусы, которые могут происходить от таких видов, как свиньи, овцы, коровы и птицы. Следовательно, данная последовательность первого инвертированного концевого повтора, которая может содержать примерно от 100 до 500 п.н. в длину, может варьировать в зависимости от используемого серотипа аденовируса. Аналогично сигнальная последовательность для упаковки аденовируса может варьировать в зависимости от используемого серотипа аденовируса.

По предпочтительному конкретному варианту осуществления изобретения указанный аденовирусный вектор для экспрессии гена содержит элемент *i*, имеющий последовательность SEQ ID № 1 или какую-либо другую последовательность, обладающую достаточной гомологией с SEQ ID № 1, для выполнения такой же функции.

Происхождение элемента *ii* в аденовирусном гибридном векторе по настоящему изобретению не является его критическим аспектом. Указанный элемент *ii*, функция которого заключается в увеличении общего размера конструкции, может представлять любую некодирующую «лишнюю» последовательность. Указанная последовательность предпочтительно является некодирующей последовательностью человека. Даже более предпочтительно, когда данная некодирующая «лишняя» последовательность представляет собой область интрона человеческой геномной гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT).

Предпочтительно определенный аденовирусный гибридный вектор также содержит элемент *vii*, который представляет вторую некодирующую «лишнюю» последовательность, расположенную между элементом *v* и элементом *vi*, определенными выше.

Происхождение элемента *iii* в аденовирусном гибридном векторе по настоящему изобретению не является его критическим аспектом. Тканеспецифический промотор *iii* предпочтительно представляет опухолеспецифический промотор. Примеры опухолеспецифических промоторов включают промоторы AFP, теломеразы TERT, PAP (связанный с поджелудочной железой протеин), E2F и HIF.

По предпочтительному конкретному варианту осуществления изобретения опухолеспецифический промотор имеет последовательность SEQ ID №7, соответствующую промотору/энхансеру AFP (AFP p+e), или последовательность SEQ ID № 15, соответствующую теломеразе TERT, или любую другую последовательность, обладающую достаточной гомологией соответственно с последовательностью SEQ ID №7 или с последовательностью SEQ ID № 15, для выполнения такой же функции.

Происхождение элемента *iv* в аденовирусном гибридном векторе по настоящему изобретению не является его критическим аспектом. Альфавирусные последовательности элемента *iv* предпочтительно происходят из вируса леса Семлики (SFV). Однако возможно использовать другие альфавирусные последовательности, полученные из любых видов, относящихся к



семейству *Togaviridae*, например, SIN, RRV и VEE.

Указанная цепь *iv* кДНК, полученная из альфавируса, последовательность которой частично комплементарна РНК альфавируса, предпочтительно содержит (в дополнении к последовательности, кодирующей, по меньшей мере, один

интересующий экзогенный ген):

а) 5'-последовательность, необходимую для репликации альфавируса,

б) последовательность, кодирующую неструктурные белки, необходимые для репликации РНК альфавируса,

с) по меньшей мере, один субгеномный промотор альфавируса, и

д) 3'-последовательность, необходимую для репликации альфавируса.

Элемент *iv* предпочтительно образует репликон, функционально контролируемый промотором *iii*, и где, в свою очередь, альфавирусный субгеномный промотор, входящий в состав *iv* с), функционально контролирует экспрессию интересующего экзогенного гена.

По предпочтительному конкретному варианту осуществления изобретения последовательности а) - с) элемента *iv* в целом имеют последовательность, выбранную из SEQ ID № 3 (SFV 5'-rep-Psg), или любую другую последовательность, обладающую достаточной гомологией с SEQ ID № 3 для выполнения такой же функции, и последовательность SEQ ID № 4 (SFV 5'-rep-Psg-enh) или любую другую последовательность, обладающую достаточной гомологией с SEQ ID № 4, для выполнения такой же функции.

По особо предпочтительному конкретному варианту осуществления изобретения элемент *iv* д) имеет последовательность SEQ ID № 5 (SFV3') или любую другую последовательность, обладающую достаточной гомологией с SEQ ID № 5, для выполнения такой же функции.

В элементе *iv* альфавирусного-аденовирусного гибридного вектора по настоящему изобретению интересующий экзогенный ген предпочтительно представляет собой терапевтический ген или ген-репортер или комбинацию обоих. Без рассмотрения в качестве ограничения, терапевтический ген предпочтительно выбран из генов интерлейкина млекопитающих IL-12, колониестимулирующего фактора GM-CSF, альфа-интерферона и тимидинкиназы вируса герпеса простого.

Интересующий экзогенный ген в элементе *iv* дополнительно может быть геном-репортером. Без рассмотрения в качестве ограничения, ген-репортер может быть выбран из генов LacZ, люциферазы, tk и GFP.

Терапевтический ген особо предпочтительно представляет ген интерлейкина IL-12 и даже более предпочтительно терапевтический ген является геном человеческого интерлейкина hIL-12.

Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена может включать в элементе *iv* одну или нескольких подгрупп (субгеномный промотор + интересующий экзогенный ген).

Происхождение элемента *v* в аденовирусном гибридном векторе по настоящему изобретению не является его критическим аспектом. Элемент *v* предпочтительно представляет последовательность полиаденилирования SV40. Указанная последовательность полиаденилирования SV40 особо предпочтительно является последовательностью SEQ ID № 6 или любой другой последовательностью, обладающей достаточной гомологией с SEQ ID № 6, для выполнения такой же функции.

Происхождение элемента *vi* в аденовирусном гибридном векторе по настоящему

изобретению не является его критическим аспектом. По предпочтительному варианту осуществления указанный аденовирусный вектор для экспрессии гена содержит последовательность инвертированного концевой повтора (ITR) в качестве элемента vi, который имеет последовательность SEQ ID № 2 или любую другую последовательность, обладающую достаточной гомологией с SEQ ID № 2, способную выполнять такую же функцию.

Происхождение элемента vii в аденовирусном гибридном векторе по настоящему изобретению не является его критическим аспектом. Вторая некодирующая «лишняя» последовательность может представлять любую такую последовательность. Предпочтительно это некодирующая последовательность человека и особо предпочтительно это последовательность из человеческой космиды С346.

Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по настоящему изобретению может иметь различную длину, и предпочтительно его длина находится в пределах от 27 до 38 т.п.н.

По предпочтительному конкретному варианту осуществления изобретения аденовирусный гибридный вектор содержит ITR 5' в качестве последовательности первого инвертированного концевой повтора; HPRT, область интрона человеческой геномной гипоксантинфосфорибозилтрансферазы в качестве первой «лишней» последовательности; AFP (p+e), опухолеспецифический промотор; последовательность репликона SFV, содержащую mIL-12, мышинный интерлейкин-12; полиА SV40, последовательность полиаденилирования SV40; С346, человеческую геномную космиду С346 в качестве второй «лишней» последовательности и ITR 3' в качестве последовательности второго инвертированного концевой повтора.

По дополнительному предпочтительному конкретному варианту осуществления изобретения аденовирусный гибридный вектор содержит ITR 5' в качестве последовательности первого инвертированного концевой повтора; HPRT, область интрона человеческой геномной гипоксантинфосфорибозилтрансферазы в качестве первой «лишней» последовательности; AFP (p+e), опухолеспецифический промотор; последовательность репликона SFV, содержащую LacZ; полиА SV40, последовательность полиаденилирования SV40; С346, человеческую геномную космиду С346 в качестве второй «лишней» последовательности и ITR 3' в качестве последовательности второго инвертированного концевой повтора.

По дополнительному предпочтительному конкретному варианту осуществления изобретения аденовирусный гибридный вектор содержит ITR 5' в качестве последовательности первого инвертированного концевой повтора; HPRT, область интрона человеческой геномной гипоксантинфосфорибозилтрансферазы в качестве первой «лишней» последовательности; AFP (p+e), опухолеспецифический промотор; последовательность репликона SFV, содержащую hIL-12, человеческий интерлейкин-12; полиА SV40, последовательность полиаденилирования SV40; С346, человеческую космиду С346 в качестве второй «лишней» последовательности и ITR 3' в качестве последовательности второго инвертированного концевой повтора.

По предпочтительному конкретному варианту осуществления изобретения аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена имеет последовательность SEQ ID № 8 или любую другую последовательность, обладающую достаточной гомологией с SEQ ID № 8, для выполнения такой же функции.

По дополнительному предпочтительному конкретному варианту осуществления

изобретения аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена имеет последовательность SEQ ID № 9 или любую другую последовательность, обладающую достаточной гомологией с SEQ ID № 9, для выполнения такой же функции.

5 По дополнительному предпочтительному конкретному варианту осуществления изобретения аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена имеет последовательность SEQ ID № 10 или любую другую последовательность, обладающую достаточной гомологией с SEQ ID № 10, для выполнения такой же функции.

10 Настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения указанного аденовирусного гибридного вектора, включающему сборку элементов i-vi или i-vii аденовирусного гибридного вектора, определенного выше, с помощью методов генной инженерии.

15 Также настоящее изобретение относится к применению указанного гибридного вектора для переноса генетического материала в клетку, и конкретнее, для введения и экспрессии чужеродных генов в эукариотических клетках, которые могут представлять собой клетки-мишени для аденовирусов. Указанное применение предусматривает введение указанного гибридного вектора субъекту.

20 Инфицирование опухолевых клеток аденовирусным гибридным вектором по изобретению приводит к транскрипции мРНК репликона альфавируса SFV от опухолеспецифического промотора, следовательно, ген Rep будет транслироваться, и РНК SFV будет амплифицироваться. Rep также продуцирует субгеномную РНК SFV, из которой будут экспрессироваться на высоких уровнях терапевтический или ген-репортер. Продукт терапевтического гена, секретируемый инфицированными клетками, будет активировать иммунциты в области заражения. Репликация SFV будет дополнительно индуцировать апоптоз инфицированных клеток, приводя к высвобождению опухолевых антигенов из клеток, подвергшихся апоптозу; которые могут захватываться антигенпредставляющими клетками (АПК), тем самым активируя иммунный ответ, направленный против опухоли. Однако если данный гибридный вектор инфицирует неопухолевые клетки, то мРНК репликона SFV не будет транскрибироваться, следовательно, трансгенная экспрессия или апоптоз будут отсутствовать.

35 Опухолевые клетки предпочтительно инфицируются аденовирусным гибридным вектором по изобретению таким образом, что мРНК репликона SFV транскрибируется от опухолеспецифического промотора, следовательно, ген Rep будет транслироваться, и РНК SFV будет амплифицироваться. Rep также будет продуцировать субгеномную РНК SFV, из которой будут экспрессироваться на высоких уровнях mIL-12 или hIL-12. Секретируемые инфицированными клетками mIL-12 или hIL-12 будут активировать иммунциты в области заражения. Репликация SFV будет дополнительно индуцировать апоптоз инфицированных клеток, приводя к высвобождению опухолевых антигенов из клеток, подвергшихся апоптозу; которые могут захватываться антигенпредставляющими клетками (АПК), тем самым активируя иммунный ответ, направленный против опухоли. Однако если данный гибридный вектор инфицирует неопухолевые клетки, то мРНК репликона SFV не будет транскрибироваться, следовательно, трансгенная экспрессия или апоптоз будут отсутствовать.

50 Дополнительным предметом настоящего изобретения является применение аденовирусного гибридного вектора, определенного ранее, в способе переноса

генетического материала в клетку, предпочтительно опухолевую клетку, который включает введение указанного гибридного вектора субъекту. Еще более предпочтительно указанная клетка представляет собой опухолевую клетку, которая экспрессирует AFP.

5       Дополнительным предметом настоящего изобретения является применение определенного аденовирусного гибридного вектора для получения эффективного лекарственного препарата при лечении опухолей, и его применение для индукции иммунного ответа против чужеродных антигенов. Указанное применение  
10       предусматривает введение указанного лекарственного препарата субъекту.

      Дополнительным предметом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая, по меньшей мере, аденовирусный гибридный вектор, определенный по настоящему изобретению, и ее применение в способе лечения  
15       опухолей или индукции иммунного ответа против чужеродных антигенов.

      Указанная фармацевтическая композиция предпочтительно содержит аденовирусный гибридный вектор по настоящему изобретению, в котором интересующий экзогенный ген представляет ген интерлейкина млекопитающих, IL-  
20       12, предпочтительно человеческого интерлейкина hIL-12. Указанное применение предусматривает введение фармацевтической композиции, содержащей указанный гибридный вектор субъекту.

      Настоящее изобретение также относится к способу лечения злокачественной опухоли с помощью применения гибридного вектора по настоящему изобретению, где указанный способ включает введение указанного гибридного вектора субъекту.

25       Следовательно, по предпочтительным вариантам осуществления настоящего изобретения AFP (p+e) выбран в качестве опухолеспецифического промотора, было сконструировано два аденовирусных гибридных вектора, в которых репликация SFV контролируется промотором AFP, и ген-репортер LacZ и терапевтический ген IL-12  
30       вставлены под контролем субгеномного промотора SFV, соответственно - Ad/AFP-SFV-LacZ и Ad/AFP-SFV-mIL-12 и два аденовирусных вектора «с усеченным геномом», несущих LacZ и IL-12 от мышей, непосредственно контролируемых промотором AFP - Ad/AFP-LacZ и Ad/AFP-mIL-12 в качестве контрольных векторов. Было показано, что гибридный вектор по настоящему изобретению функционирует  
35       более эффективно по сравнению с контрольными векторами, использованными до настоящего времени.

      По настоящему изобретению было показано, что вектор Ad/AFP-SFV-mIL-12 может быть пригодным вектором в лечении опухолей НСС (гепатокарцином),  
40       экспрессирующих AFP.

      Также было показано, что применение других опухолевых промоторов, таких как промотор теломеразы, TERT, который находится в высоко активном состоянии в  
45       большинстве злокачественных опухолей, для контроля SFV, может превратить применение гибридного вектора, такого как по настоящему изобретению, в общую стратегию лечения всех злокачественных опухолей.

      Дополнительно и преимущественно, гибридный вектор по настоящему изобретению избирательно функционирует с опухолевыми клетками и разрушает  
50       опухолевые клетки без необходимости включения терапевтического гена. Кроме того, было показано, что гибридный вектор по настоящему изобретению преимущественно индуцирует высокую противоопухолевую активность, когда он включает терапевтический ген, такой как ген IL-12.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 (А): представлена схема гибридного вектора по варианту осуществления изобретения, Ad/SFV, содержащего аденовирусную последовательность «с усеченным геномом», в которой репликон SFV вставлен под контролем промотора/энхансера AFP (AFP (p+e)), и содержащего гетерологичный ген mIL-12, который помещен под контролем субгеномного промотора SFV (Pr sg). На фиг. 1 (В) показана противоопухолевая активность гибридного вектора по настоящему изобретению: после инфицирования опухолевых клеток НСС данным гибридным вектором (справа), благодаря наличию в гибридном векторе репликона SFV, включающего mIL-12, имеет место экспрессия mIL-12 на высоком уровне, который будет активировать иммунциты в области заражения. Затем репликация SFV будет индуцировать апоптоз инфицированных клеток. Однако если данный гибридный вектор инфицирует неопухолевые клетки, то мРНК репликона SFV не будет транскрибироваться и, следовательно, будут отсутствовать трансгенная экспрессия или апоптоз. На данной фигуре:

- ITR, последовательности аденовирусного инвертированного концевых повтора;
- $\psi$ , аденовирусный сигнал упаковки;
- HPRT и C346, последовательности «лишней» ДНК соответственно из области интрона человеческой геномной гипоксантин-фосфори-бозил-трансферазы или из человеческой космиды C346;
- ПолиА, сигнал полиаденилирования (например, из SV40);
- APC, антигенпрезентирующие клетки.

На фиг. 2 представлено строение аденовирусных гибридных векторов «с усеченным геномом» и аденовирусных векторов «с усеченным геномом». AFP-SFV-LacZ и AFP-SFV-mIL-12 являются гибридными аденовирусными векторами, в которых последовательность репликона SFV находится под контролем промотора/энхансера AFP (AFP (p+e)), и гетерологичные гены LacZ или mIL-12 клонированы соответственно под контролем субгеномного промотора SFV (Pr sg). AFP-lacZ и AFP-mIL-12 представляют аденовирусные векторы, содержащие LacZ или mIL-12, непосредственно контролируемые AFP (p+e). SFV nsp1-4, неструктурные белки SFV.

На фиг. 3 показана специфическая экспрессия mIL-12 в условиях *in vitro* в клетках гепатокарциномы, экспрессирующих AFP, НСС (А), и в клетках, полученных не из НСС (В), после заражения гибридными векторами Ad-SFV: AFP-mIL-12 (AFP-12), AFP-SFV-mIL-12 (AFP-SFV-12) или контрольным вектором AdCMVmIL-12 (CMV-12). Тестировали различные множественности заражения «moi» (10, 100 и 1000). Hep3B, Huh-7, HepG2 и PLC/PRF/5: клеточные линии НСС; Hela, A549, MHC1, SK-Hep-1 и Clone 9: линии, полученные не из НСС. На фиг. 3В показана только экспрессия, соответствующая moi, равной 1000.

На фиг. 4 показана специфическая экспрессия  $\beta$ -gal в 4 клеточных линиях НСС: (Hep3B, Huh-7, HepG2 и PLC/PRF/5) после инфицирования в условиях *in vitro* гибридным вектором AFP-SFV-lacZ или контрольным вектором AFP-LacZ при различных значениях «moi» (10, 100 и 1000).

На фиг. 5 представлен анализ экспрессии  $\beta$ -gal в клеточных линиях НСС, инфицированных AFP-LacZ и AFP-SFV-LacZ. Микрофотографии клеток, инфицированных AFP-LacZ (А-С) или AFP-SFV-LacZ (D-F) и окрашенных X-Gal. А и D, Hep3B; В и E, Huh-7; С и F, HepG2.

На фиг. 6 представлена кинетика экспрессии IL-12 в клеточных линиях НСС Hep3B (А) и Huh-7 (В), инфицированных в условиях *in vitro* аденовирусными векторами AFP-

mIL-12 (AFP-12) или AFP-SFV-mIL-12 (AFP-SFV-12) при значении «moi», равном 1000.

На фиг. 7 показана индукция гибели клеток после инфицирования в условиях *in vitro* клеточных линий НСС - Hep3B (А) и McA-RH7777 (В)- векторами AFP-IL-12 (AFP-12), AFP-SFV-IL-12 (AFP-SFV-12), AFP-LacZ, AFP-SFV-LacZ или контрольным вектором Ad/CMV-mIL-12 (CMV-12). Выживаемость клеток представлена в виде процента живых клеток в зараженных лунках по сравнению с живыми клетками в незараженных контрольных лунках.

На фиг. 8 представлена экспрессия Rep SFV в клетках НСС - Hep3B (А-Д) и Huh-7 (Е и F) - после инфицирования векторами AFP-mIL-12 (А и В) или AFP-SFV-mIL-12 (С и F) при значении «moi», равном 1000. Через 2 суток после инфицирования клетки фиксировали и анализировали иммунофлуоресценцией со специфическим антителом против Rep. Клетки, экспрессирующие Rep, визуализировали под флуоресцентным микроскопом с фильтром FITC (А, С и Е), в то время как ядра, окрашенные DAPI во всех клетках, визуализировали с использованием Уф фильтра (В, D и F).

На фиг. 9 представлен перенос гена с помощью гибридных векторов «с усеченным геномом» в условиях *in vivo*, (А-Д), эффективность переноса гена и индукция апоптоза в опухолях Huh-7. Человеческие опухоли Huh-7, прижившиеся у голых мышей с иммунодефицитом, обрабатывали инъекцией в опухоль векторов AFP-LacZ (n=4) или AFP-SFV-LacZ (n=4) из расчета  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц/животное. Через 3 суток после введения вируса мышью умерщвляли и анализировали срезы опухоли для оценки экспрессии трансгена окрашиванием X-Gal (А-В) или для оценки индукции апоптоза с помощью TUNEL (С-Д). А, С; Микрофотографии опухолей, получивших AFP-LacZ. В, D. Микрофотографии опухолей, получивших AFP-SFV-LacZ. (Е-Г). Специфичность экспрессии гена с гибридными векторами «с усеченным геномом». Здоровым мышам Balb/c вводили внутривенно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц векторов AFP-LacZ (Е), AFP-SFV-LacZ (F) или Ad/CMV-LacZ (G). Представлены микрофотографии срезов ткани печени, отобранной через 3 суток после заражения, и окрашенной X-Gal.

На фиг. 10 показана обработка опухолей НСС гибридными векторами. Ортотопические опухоли НСС вводили имплантацией клеток McH-RH7777 в печень крыс. Когда опухоли достигали размера 7-10 мм в диаметре, животных обрабатывали  $10^{11}$  (А-С) или  $2 \times 10^{11}$  (D-G) вирусных частиц AFP-mIL-12, AFP-SFV-mIL-12 или физиологическим раствором в качестве контроля. Размер опухолей определяли на 15 и 30 сутки после введения физиологического раствора (А и Е), AFP-mIL-12 (В и F) или AFP-SFV-mIL-12 (С и G). G; выживаемость животных.

На фиг. 11 представлены результаты токсикологического исследования на крысах, которым вводили векторы, экспрессирующие IL-12. Определяли уровень трансаминаз (GPT, GOLT и GGTL) (А) или IL-12 (В) в сыворотке крови крыс с опухолями НСС в печени, которым вводили в опухоль аденовирусные векторы AFP-SFV-IL-12, AFP-SFV-mIL-12, альфавирусный вектор SFV-IL-12 или физиологический раствор. Определение проводили на 4 и 8 сутки после обработки.

На фиг. 12 показаны результаты окрашивания гематоксилин/эозином срезов печени крыс, обработанных аденовирусными гибридными векторами. Крыс с опухолями НСС обрабатывали инъекцией в опухоль физиологическим раствором (А), аденовирусными векторами AFP-IL-12 (В), AFP-SFV-IL-12 (С) или вирусными частицами SFV-IL-12 (D). Через 3 суток после обработки животных умерщвляли, печени удаляли и фиксировали в формалине, делали срезы и окрашивали гематоксилин/эозином. Черные стрелки указывают зоны с эозинофильными

гепатоцитами.

На фиг. 13А и 13В представлены рестрикационные карты соответственно плазмид рGL3/AFP и рBS/mIL-12.

5 На фиг. 14А и 14В представлены рестрикационные карты соответственно плазмид рTGC3001 и рTGC3011.

На фиг. 15А и 15В представлены рестрикационные карты соответственно плазмид рTGC3012 и рTGC3013.

На фиг. 16 представлена рестрикационная карта плазмиды рTGC3014.

10 Описание предпочтительных вариантов осуществления

Плазмиды

рGEM-T «легкую» и рCMVb получали от Promega, USA, и рBS-SK+ от Stratagene, USA. рSTK120 была предоставлена Dr. Kochanek (University of Ulm, Германия). рBK-SFV-1 и рBK-SFV-3 были описаны Berglund P. et al. «Enhancing immune responses using suicidal DNA vaccines». Nature Biotechnology 1998, 16: 562-565. рGL3/AFP и рBS/mIL-12 (Yonglian Sun, Cheng Qian, Dacheng Peng and Jesus Prieto. 2000. Gene transfer to liver cancer cells of B7-1 in addition to IL-12 changes immunoeffector mechanisms and supresses Th1 cytokine production induced by IL-12 alone. Human Gene Therapy 11: 127-138) получали в лаборатории заявителей.

Для конструирования рGL3/AFP получали области промотора/энхансера AFP (р+е) амплификацией ПЦР человеческой геномной ДНК. Праймеры, использованные для амплификации промотора AFP (AFP pro), представляли собой СТСТАГАТТТТСТGCCCAAAGAGCTC  
25 и CGGGATCCTGTTATTGGCAGTGGTGGAA. Праймеры, использованные для амплификации энхансера AFP, представляли собой CGGAATTCGCCTGTCATACAGСТААТАА и СТСТАГАСТGTCAAАТАAGTGGCCTGG. Последовательности промотора (217 пар нуклеотидов) и энхансера (785 пар нуклеотидов) клонировали в плазмиды рGEM-T. Затем проводили подтверждение амплифицированных фрагментов секвенированием. Промотор AFP вырезали из плазмиды рGEM-T/AFP-р рестрикцией XbaI/BamHI и вставляли лигированием по тупым концам в рGL3-основную плазмиду, расщепленную Sma I. Таким образом, получали плазмиду рGEM/AFP-р.  
35 Энхансер AFP вырезали из плазмиды рGEM-T/AFP-е рестрикцией Xba I/Eco RI и вставляли лигированием по тупым концам в плазмиду рGL3/ AFP-р, расщепленную Nhe I, с получением в конце плазмиды рGL3/AFP.

Клеточные линии и культуры тканей

40 Человеческие клеточные линии HCC Hep3B, PLC/PRF/5, HepG2 и SK-Hep-1, клеточную линию человеческой эпителиальной аденокарциномы шейки матки HeLa, клеточную линию человеческой карциномы легких A549, клеточную линию эмбриональных почечных клеток 293, крысиные клетки HCC McA-RH7777, MHC1 и Clone 9 нормальных крысиных гепатоцитов и клеточную линию крысиных HCC  
45 Hepa1-6 получали из ATCC. Клетки 293, экспрессирующие рекомбиназу Cre (293Cre4) получали от Merck Research Laboratories. Клетки Hep3B, PLC/PRF/5, HeLa, SK-Hep-1, Clone 9, Huh-7 и Hepa1-6 культивировали в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), инактивированной тепловой обработкой, и пенициллина/стрептомицина. Клетки HepG2 и A549 культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), инактивированной тепловой обработкой, и пенициллина/стрептомицина. Клетки McA-RH7777 и MHC1 культивировали в среде DMEM с добавлением 20% лошадиной сыворотки и 5% FBS.

Клетки 293Cre4 культивировали в среде DMEM с добавлением 10% FBS и 0,4 мг/мл G418.

#### Животные

5 Голых мышей-самок с иммунодефицитом BALB/c в возрасте 7 недель получали из Charles Rivers laboratories (Barcelona, Испания). Крыс-самцов Буффало в возрасте 4-6 недель получали из CIFA (Animal Installations of the University of Navarra). Мышей и крыс содержали в обычных условиях в CIFA. Голые мыши получали обработанный облучением корм с автоклавированной питьевой водой. Манипуляции с голыми  
10 мышами всегда проводили в ламинарной камере. Все процедуры с животными проводили согласно стандартным рекомендациям и протоколам по уходу и использованию лабораторных животных.

#### Конструирование векторов

##### Конструирование экспрессирующих каскет AFP-SFV

15 5'-концевую последовательность SFV (1-292 нт) амплифицировали ПЦР с использованием плазмиды рВК-SFV-1 (содержащей полноразмерную последовательность репликаона SFV) в качестве матрицы. Праймер 1 содержал сайт рестрикции Spe I в 5'-конце (подчеркнут), за которым следовали 50 нт  
20 последовательности промотора AFP и первые 20 нт последовательности SFV (курсивом): 5'-ACT AGTTAA CAG GCA TTG CCT GAA AAG AGT ATA AAA GAA TTTCAG CAT GAT TTT CCA TGG CGG ATG GAC ATA C-3'. Праймер 2 содержал сайт рестрикции Xho I (подчеркнут), за которым следовали 19 нт последовательности SFV (курсивом): 5'-CTC GAG GAT ATC CAA GAT GAG TGT GT-3'. Фрагмент ДНК  
25 размером 342 п.н. получали ПЦР и непосредственно клонировали в плазмиду рGEM-T-«легкую» с получением плазмиды рGEM-Te-SFV-1. Отсутствие ошибок ПЦР в данной плазмиде подтверждали секвенированием. Фрагмент размером 342 п.н. вырезали из плазмиды рGEM-Te-SFV-1 расщеплением Spe I и Xho I и клонировали в  
30 плазмиду рGL3/AFP, расщепленную теми же ферментами, с получением плазмиды рGL3/AFP-SFV-1, которая содержит полный промотор AFP (217 п.н.) и энхансер (785 п.н.), за которыми следует 5'-концевая последовательность SFV (SFV, включающая 292 п.н.). Кассету AFP-SFV-1 (1342 п.н.) получали из рGL3/AFP-SFV-1 расщеплением Mlu I/Xho I, обрабатывали фрагментом Кленова и клонировали в рBS-  
35 SK+, расщепленную EcoR V, с получением рBS/AFP-SFV-1. Позднюю полиА SV40 (262 п.н.) вырезали из рGL3/AFP расщеплением Xho I/VamH I, затупляли фрагментом Кленова и вставляли в сайт Sal I в рGL3/AFP-SFV-1, также затупляли фрагментом Кленова с получением таким образом рBS /AFP-SFV-1-рА. Полилинкер, содержащий  
40 оба уникальных сайта Ara I и Nru I, вставляли между сайтами VamH I и Xma I в рBS /AFP-SFV-1-рА. 3'-концевую последовательность SFV, включающую 7985 п.н., вырезали из рВК-SFV-1 расщеплением Spe I/EcoR V, затупляли фрагментом Кленова и вставляли в положение EcoR V в рBS /AFP-SFV-1-рА с получением рBS /AFP-SFV-рА.

45 Ген-репортер LacZ получали из рCMVb расщеплением not I, обрабатывали фрагментом Кленова и вставляли в сайт VamH I в рBS /AFP-SFV-рА, обработанной фрагментом Кленова, с получением рBS /AFP-SFV-LacZ-рА. Кассету mIL-12, содержащую гены, кодирующие субъединицы р35 и р40, связанные с внутренним сайтом входа рибосомы (IRES) отделяли от рBS/mIL-12 расщеплением Spe I/Xho I,  
50 обрабатывали фрагментом Кленова и вставляли в положение VamH I в рBS/AFP-SFV-mIL-12-рА, также затупляли фрагментом Кленова, получали плазмиду рBS/AFP-SFV-mIL-12-рА.



Конструирование гибридных аденовирусных векторов «с усеченным геномом»

Конструировали четыре аденовирусных вектора «с усеченным геномом», представленных на фиг. 2. AFP-SFV-lacZ и AFP-SFV-mIL-12 включали последовательность рекомбинантного репликона SFV, контролируемого промотором и энхансером AFP. В данных векторах ген-репортер LacZ или терапевтический ген mIL-12 клонировали соответственно под контролем субгеномного промотора SFV. AFP-lacZ и AFP-mIL-12 также представляют аденовирусные векторы «с усеченным геномом», которые включают гены LacZ и mIL-12, непосредственно контролируемые соответственно промотором/энхансером AFP. Способ конструирования данных векторов описан ниже. Для получения аденовирусного вектора с достаточной клонирующей емкостью для расположения экспрессирующей кассеты AFP-SFV-IL-12 модифицировали плазмиду pSTK120, содержащую последовательность аденовируса «с усеченным геномом». В конце элиминировали фрагмент размером 9 т.п.н. из плазмиды pSTK120 расщеплением Ara I. Кроме того, полилинкер, содержащий сайты Asc I и Sbf I, вставляли в данную новую плазмиду, получая pTGC3001. Данная плазида содержала левый ITR, сигнал упаковки, «лишнюю» ДНК из HPRT и C346, и правый ITR. Кассету AFP-SFV-LacZ вырезали расщеплением Ara I из pBS/AFP-SFV-lacZ-pA и вставляли в сайт Ara I в pTGC3001 с получением pTGC3011. Аналогично кассету AFP-SFV-mIL-12 вырезали из pBS/AFP-SFV-mIL-12-pA расщеплением BssH II, обрабатывали фрагментом Кленова и вставляли в сайт Asc I в pTGC3001, также обрабатывали фрагментом Кленова с получением pTGC3012.

Конструирование контрольных векторовКонструирование аденовирусного вектора «с усеченным геномом» AFP-LacZ

Последовательность энхансера/промотора AFP (AFP p+e) вырезали из pGL3/AFP расщеплением Mlu I/Xho I, обрабатывали фрагментом Кленова и вставляли в pCMVb, которую ранее расщепляли EcoR I/Xho I и обрабатывали фрагментом Кленова. При этом сильный ранний промотор CMV вырезали из pCMVb и замещали на AFP p+e с получением pAFPb. Затем кассету AFP-LacZ (5077 т.п.н.) вырезали из pAFPb расщеплением Xba I/Nar I, обрабатывали фрагментом Кленова и вставляли в сайт Swa I в pSTK120, также затупляли фрагментом Кленова с получением плазмиды pTGC3013.

Конструирование аденовирусного вектора «с усеченным геномом» AFP-mIL-12

Кассету mIL-12 вырезали из pBS/mIL-12 расщеплением Xho I/Spe I и вставляли в pGL3/AFP, которую ранее расщепляли Xho I/Xba I, в результате чего ген люциферазы удалялся из данной последней плазмиды и получали pAFP-mIL-12. Кассету AFP-mIL-12 (3760 т.п.н.) вырезали из pAFP-mIL-12 расщеплением Bam I/Sca I, обрабатывали фрагментом Кленова и вставляли в pSTK120, расщепленной Swa I, и аналогично обрабатывали фрагментом Кленова с получением pTGC3014.

«Спасение» аденовирусных векторов «с усеченным геномом»

После расщепления Pme I, экстракции фенолом/хлороформом и осаждения этанолом 2 мкг ДНК pTGC3011, pTGC3012, pTGC3013 и pTGC3014 трансфектировали соответственно в клетки 293Cre4. После трансфекции клетки инфицировали вирусом-помощником AdLC8cluc. Последующую крупномасштабную амплификацию и получение проводили, как описано ранее (Philip Ng., Robin J. Parks and Frank L. Graham. Preparation of helper-dependent adenoviral vectors. Methods in Molecular Medicine, Vol. 69, Gene Therapy Protocols, 2<sup>nd</sup>. Ed. 69, 371-88, 2002; H. Zhou, L. Pastore, A.L. Beaudet. Helper-dependent adenoviral vectors. Methods in Enzymology, Vol. 346, 177-198, 2002; Hillgenberg

M., et al. System for efficient helper-dependent minimal adenovirus constructions and rescue. Hum. Gene Ther., 12, 643-657, 2001). Все векторные препараты дважды очищали центрифугированием в градиенте CsCl. Очищенные ДНК-векторы анализировали расщеплением рестриктазами, и не было обнаружено реаранжировки последовательностей. Титрование загрязнения аденовируса «с усеченным геномом» и вируса-помощника оценивали с использованием количественной ПЦР. Соотношение вирусных частиц к инфекционным единицам (iu) составляло 20:1. Загрязнение частицами вируса-помощника равнялось примерно 0,5-1%.

#### Количественная ПЦР

Для определения степени загрязнения вирусом-помощником конструировали зонд и праймеры для постановки количественной ПЦР области Ad5 E4 с использованием программы TaqMan (TaqMan Probe #2) и синтезировали в Sigma-Genosys Ltd. (праймер) и Applied Biosystems (зонд). Для определения титра аденовирусов «с усеченным геномом» конструировали зонды и праймеры для количественной ПЦР последовательностей LacZ и mIL-12 от мышей с использованием программы TaqMan (TaqMan Probe #2) и синтезировали в Sigma-Genosys Ltd. (праймер) и Applied Biosystems (зонд). Для определения загрязнения диким типом Ad конструировали зонды и праймеры для постановки количественной ПЦР области Ad5 E1 с использованием программы TaqMan (TaqMan Probe #2) и синтезировали в Sigma-Genosys Ltd. (праймер) и Applied Biosystems (зонд).

#### Опыты в условиях in vitro

Трансгенная экспрессия в клетках, инфицированных аденовирусными векторами «с усеченным геномом»

Клеточные линии, производные НСС (Hep3B, Huh-7, HepG2 и PLC/PRF/5) и клеточные линии, не относящиеся к НСС (A549, HeLa, MHC1 и Clone 9), или клеточные линии, производные НСС, но не экспрессирующие AFP (SK-Hep-1), заражали каждым из четырех аденовирусных векторов «с усеченным геномом» (AFP-LacZ, AFP-SFV-LacZ, AFP-mIL-12 или AFP-SFV-mIL-12) при значении «moi», соответственно равном 1000, 100 или 10 (частиц/клетку). Три первых поколения аденовирусов (Ad/CMV-mIL-12, Ad/CMV-LacZ, Ad/AFP-LacZ) использовали в качестве контроля. Собирали супернатанты из клеток, инфицированных векторами mIL-12, и лизаты из клеток, инфицированных векторами LacZ, в двойных параллелях из лунок для определения концентрации соответственно mIL-12 и  $\beta$ -галактозидазы ( $\beta$ -gal). Клетки, инфицированные векторами LacZ, также окрашивали X-gal. Концентрацию mIL-12 (p70) определяли с помощью набора для постановки ELISA (Pharmingen, San Diego, CF). Уровень  $\beta$ -gal определяли с использованием набора для ELISA (Roche, Швейцария). Продолжительность экспрессии mIL-12 определяли на клетках НСС (Hep3B, Huh-7) после их инфицирования AFP-mIL-12, AFP-SFV-mIL-12 или контрольным вектором Ad/CMV-mIL-12 при значении «moi», равном 1000. Ежедневно собирали супернатанты до 5 суток после заражения.

Анализ специфичности трансгенной экспрессии с использованием гибридных векторов Ad-SFV в условиях in vitro

Для оценки специфичности трансгенной экспрессии с использованием ранее описанных рекомбинантных векторов, четыре человеческие клеточные линии НСС (Hep3B, HepG2, Huh-7 и PLC/PRF/5) и две человеческие клеточные линии, не относящиеся к НСС (HeLa и A549), или которые являются производными НСС, но не экспрессируют AFP (SK-Hep-1), инфицировали AFP-mIL-12, AFP-SFV-mIL-12 или Ad-

CMV-mIL-12 в качестве положительного контроля при различных значениях «moi» (10, 100 или 1000). Через 2 суток после заражения собирали супернатанты и определяли содержание в них mIL-12. Результаты приведены на фиг. 3 (А) и (В). Не было отмечено экспрессии mIL-12 в человеческих клетках НСС после

5 инфицирования AFP-mIL-12 при значениях «moi», равных 10 или 100, и только при «moi», равном 1000, обнаруживали небольшую концентрацию mIL-12 в некоторых клеточных линиях (фиг. 3А). В противоположность инфицирование данных

10 клеток AFP-SFV-mIL-12 при «moi», равном 10, 100 или 1000, приводило к экспрессии mIL-12 в зависимости от дозы (фиг. 3А). Уровень экспрессии mIL-12 в клетках, инфицированных AFP-SFV-mIL-12, при значении «moi», равном 10, был сравним с уровнем, полученным в клетках, зараженных AFP-mIL-12, при «moi», равном 1000. Кроме того, концентрация mIL-12 в клетках НСС,

15 инфицированных AFP-SFV-mIL-12 при различных значениях «moi», была сравнима с таковой, полученной с контрольным вектором Ad-CMV-mIL-12. Однако заражение клеток AFP-mIL-12 или AFP-SFV-mIL-12, которые не экспрессируют AFP, не приводило к детектируемым уровням mIL-12 даже при использовании наиболее

20 высокого значения «moi» (1000) (фиг. 3В). В данных клетках только контрольный вектор Ad-CMV-mIL-12 был способен приводить к экспрессии mIL-12 на высоком уровне.

С другой стороны, четыре клеточные линии НСС (Hep3В, Huh-7, HepG2 и PLC/PRF/5) инфицировали гибридными векторами LacZ-AFP-lacZ или AFP-SFV-lacZ при различных значениях «moi» (10, 100 или 1000) и обнаруживали специфическую

25 экспрессию  $\beta$ -gal. В данном случае были получены аналогичные данные, и эти результаты приведены на фиг. 4.

На фиг. 5 представлены микрофотографии клеток НСС, инфицированных аденовирусными векторами «с усеченным геномом» AFP-lacZ и AFP-SFV-lacZ, с

30 последующим окрашиванием X-gal. Заражение клеток НСС AFP-lacZ приводило к низкой экспрессии в инфицированных клетках, которые окрашивались очень слабо. В противоположность, заражение клеток НСС AFP-SFV-lacZ давало экспрессию  $\beta$ -gal на высоком уровне, о чем судили по интенсивному окрашиванию с помощью X-gal. Эти данные указывают на то, что гибридный вектор Ad-SFV, содержащий

35 репликон SFV под контролем промотора AFP, может привести к высокому уровню интенсивной трансгенной экспрессии в опухолевых клетках, экспрессирующих AFP.

#### Продолжительность экспрессии mIL-12 в клетках НСС в условиях in vitro

Для оценки продукции mIL-12 в различные периоды времени после

40 инфицирования гибридными векторами Ad-SFV две клеточные линии НСС (Hep3В и Huh-7) инфицировали AFP-mIL-12 или AFP-SFV-mIL-12, и ежедневно собирали супернатанты до 5 суток после заражения. На фиг. 6 приведены результаты оценки трансгенной экспрессии, полученные после заражения указанных клеток. Указанные

45 результаты свидетельствуют о постоянном увеличении экспрессии mIL-12 с 1 по 4 сутки после инфицирования в клетках, зараженных AFP-SFV-mIL-12 (фиг. 6). Однако на 5 сутки после заражения концентрация mIL-12 несколько снижалась. В клетках, инфицированных AFP-mIL-12, уровень экспрессии был очень низким, и только незначительное повышение продукции mIL-12 отмечали с течением времени.

#### Тестирование цитотоксичности - оценка пролиферации клеток по включению МТТ

Клеточные линии (Hep3В, Huh-7, МСН-RH7777, Hep1-6) инфицировали AFP-LacZ, AFP-SFV-LacZ, AFP-mIL-12, AFP-SFV-mIL-12 или Ad-CMV-mIL-12 при значении «moi», равном 1000. Через 5 суток после заражения определяли выживаемость

клеток с помощью теста МТТ (3-(4,5-диметилтиазолил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) Mosmann, T. (1983) J. Immunol. Meth. 65, 55-63; Tada, H. et al. (1986) J. Immunol. Meth. 93, 157-65. Кратко, клетки промывали один раз PBS и в лунку вносили 200 мкл свежеприготовленного раствора краски МТТ (в 48-луночных планшетах). Затем

5 клетки культивировали в течение 3-4 ч с последующим добавлением 500 мкл буфера для солиubilизации. Отбирали 100 мкл каждой пробы для определения поглощения на спектрофотометре при длине волны 570 нм.

#### Индукция гибели клеток после инфицирования клеток НСС гибридными векторами Ad-SFV в условиях in vitro

10 Как уже указывалось, репликация векторов SFV индуцирует гибель клеток, опосредованную апоптозом, в большинстве клеток позвоночных. Для оценки того, насколько это также имеет место в случае клеток НСС, инфицированных гибридными векторами Ad-SFV, клетки Нер3В и Нuh-7 заражали данными векторами

15 и определяли выживаемость клеток на 5 сутки после заражения. Как следует из данных фиг. 7, выживаемость на данной временной точке после заражения составляла менее 20% для клеток, инфицированных AFP-SFV-mIL-12 или AFP-SFV-lacZ. Однако инфицирование этих же клеток AFP-mIL-12 или AFP-lacZ или

20 контрольным вектором Ad-CMV-mIL-12 не оказывало влияния на выживаемость клеток. Данные результаты указывают на то, что SFV реплицируется в клетках, инфицированных векторами AFP-SFV.

#### Детектирование Rep SFV иммунофлуоресценцией

25 Клетки НСС (Нер3В, Нuh-7, МСН-RH7777) высевали на стеклянные покровные стекла в 6-луночных планшетах ( $1 \times 10^5$  клеток/лунку) и инфицировали AFP-mIL-12, AFP-SFV-mIL-12 или Ad-CMV-mIL-12 при значении «moi», равном 1000. Через 2 суток после заражения покровные стекла дважды промывали PBS и клетки фиксировали в метаноле при  $-20^\circ\text{C}$  в течение 6 мин. Планшеты вновь промывали три раза PBS и

30 инкубировали при комнатной температуре (RT) в течение 30 мин с PBS, содержащим 0,5% желатина и 0,25% BSA, для блокирования неспецифического связывания. Затем блокирующий буфер заменяли на первичные антитела (антирепликазные MAб) в разведении 1:10 в блокирующем буфере и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Клетки вновь промывали три раза PBS-

35 0,25% BSA и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре со вторичными антителами (антимышинная кроличья сыворотка, конъюгированная с FITC, Sigma) в разведении 1:250 в блокирующем буфере. Наконец, клетки промывали три раза PBS-0,25% BSA, один раз водой и помещали на предметные

40 стекла с использованием щитка Vesta с  $D_{ap}$  для окрашивания клеточных ядер.

#### Экспрессия Rep SFV в клетках НСС, инфицированных гибридными векторами Ad-SFV в условиях in vitro

45 Экспрессию Rep SFV оценивали в клетках НСС, инфицированных гибридными векторами Ad-SFV, иммунофлуоресценцией с использованием специфических моноклональных антител к данному белку. На фиг. 8 показано, что цитоплазма клеток НСС, инфицированных AFP-SFV-mIL-12 или AFP-SFV-lacZ, была положительной на Rep. В противоположность, клетки, инфицированные AFP-mIL-12 или AFP-lacZ, не были окрашены.

#### Опыты в условиях in vivo

#### Индукция ксенотрансплантатов НСС и исследование в условиях in vivo эффективности и специфичности переноса гена

50 Клетки Нuh-7 собирали и дважды промывали не содержащей сыворотку средой.

$2 \times 10^6$  клеток ресуспендировали в 100 мкл физиологического раствора и вводили подкожно (п/к) в правый бок голых мышей BALB/c. Через 4 недели после перевивки клеток и когда размер опухолевых узелков достигал 6-8 мм в диаметре,  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц AFP-LacZ (n=4) или AFP-SFV-LacZ (n=4), разведенные в 80 мкл физиологического раствора, вводили в опухоль. Контрольным животным (n=3) вводили в опухоль 80 мкл физиологического раствора. Мышей умерщвляли на 3 или 6 сутки после заражения. В это время у каждого животного извлекали опухоли и печень, заливали в О.С.Т. (Sakura, Голландия) и замораживали при  $-80^\circ\text{C}$ . Делали срезы замороженных тканей и помещали на предметные стекла для окрашивания X-gal или анализа с помощью TUNEL. Для исследования специфичности инфицирования гибридным вектором в условиях *in vivo* нормальным мышам BALB/c вводили внутривенно AFP-LacZ (n=4), AFP-SFV-LacZ (n=4) или Ad/CMV-LacZ в дозе  $10^{10}$  вирусных частиц/мышь. Животных умерщвляли на 3 сутки после заражения и отбирали основные органы для анализа экспрессии LacZ с помощью окрашивания X-gal.

#### Эффективность переноса гена гибридных векторов Ad-SFV в человеческие ксенотрансплантаты НСС у голых мышей с иммунодефицитом

Для оценки эффективности трансдукции гибридных векторов «с усеченным геномом» в условиях *in vivo* использовали человеческую модель НСС на основе клеток Huh-7, способных экспрессировать AFP. Клетки Huh-7 вводили подкожно голым мышам BALB/c иммунодефицитом и после получения опухолевых узелков через 30 суток животным вводили в опухоли  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц AFP-SFV-LacZ или AFP-LacZ в качестве контроля. Мышей умерщвляли на 3 или 6 сутки после введения вируса, извлекали опухоли и печень и исследовали окрашиванием X-gal. Как следует из данных, представленных на фиг. 9А, имела место слабая трансгенная экспрессия в срезах опухолей у животных, которым вводили AFP-LacZ. В противоположность, имела место интенсивная экспрессия LacZ в срезах опухолей у животных, которые получали AFP-SFV-LacZ (фиг. 9В). Трансгенная экспрессия отсутствовала в срезах печени животных, которым вводили AFP-LacZ или AFP-SFV-LacZ, данный факт указывает на то, что расположение векторов, вероятно, было ограничено местом введения (данные не представлены). С целью исследования того, насколько гибридные векторы Ad-SFV индуцируют апоптоз в инфицированных опухолевых клетках, срезы обработанных опухолевых клеток анализировали методом TUNEL. В пробах от мышей, которых заражали AFP-LacZ, апоптоз не наблюдали (фиг. 9С). Однако большое количество подвергшихся апоптозу клеток отмечали в опухолях мышей, которым вводили AFP-SFV-LacZ (фиг. 9D). Эти данные указывают на то, что гибридные векторы Ad-SFV не только индуцируют экспрессию гена избирательно в опухолях, но также они избирательно индуцируют гибель клеток в результате апоптоза в этих же клетках.

#### Специфичность гибридных векторов Ad-SFV в условиях *in vivo*

Для демонстрации специфичности гибридных векторов  $10^{10}$  вирусных частиц AFP-LacZ, AFP-SFV-LacZ или контрольного вектора Ad/CMV-LacZ вводили внутривенно мышам BALB/c. Через 3 суток после введения векторов анализировали экспрессию  $\beta$ -галактозидазы в печени. Как представлено на фиг. 9 (E-F) ни AFP-LacZ, ни AFP-SFV-LacZ не были способны индуцировать детектируемую экспрессию трансгена в печени. Однако большое количество положительных на  $\beta$ -галактозидазу клеток в срезах ткани печени обнаруживали у тех животных, которым вводили Ad/CMV-LacZ (фиг. 9G). Данные факты подтверждают то, что экспрессия, опосредуемая

гибридными векторами, является специфической для опухолевых клеток.

#### Индукция ортотопических НСС и генная терапия в условиях in vivo

5  $5 \times 10^5$  клеток McA-RH7777 вводили в левую долю печени крыс Буффало. Через 10 суток после перевивки опухолевых клеток у каждого животного отмечали появление  
одного опухолевого узелка размером 7-10 мм в диаметре. Опухоли обрабатывали  
10  $10^{11}$  или  $2 \times 10^{11}$  вирусных частиц AFP-mIL-12, AFP-SFV-mIL-12 или физиологическим раствором в качестве контроля. Через 2 и 4 недели после обработки животных подвергали анестезии и проводили лапаротомию для оценки роста опухоли. Также анализировали выживаемость животных. Размер опухолей оценивали по определению длины и ширины каждого узелка и данные обрабатывали по формуле: объем опухоли=(длина в мм)×(ширина в мм)×0,5236 (Janic et al., 1975).

#### Эффективность обработки ортотопических НСС у крыс Буффало

15 Для оценки противоопухолевой эффективности гибридных векторов Ad-SFV, содержащих IL-12, ортотопические опухоли НСС получали у крыс имплантацией крысиных клеток McA-RH7777 в печень. Данную модель выбрали ввиду того, что на ней была показана экспрессия AFP клетками McA-RH7777. В первом опыте животных обрабатывали одной инъекцией в опухоль  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц AFP-  
20 mIL-12, AFP-SFV-mIL-12 или физиологическим раствором в качестве контроля (фиг. 10А-С). У животных, получивших AFP-mIL-12, наблюдали уменьшенные размеры опухолей по сравнению с контрольными животными, у которых имело место постоянное увеличение размера опухолей в течение опыта (фиг. 10А-В). Однако  
25 обработка AFP-SFV-mIL-12 приводила к полной регрессии опухоли у 1 из 4 крыс, подвергшихся обработке, стабилизации заболевания у 2 крыс и отсутствию ответной реакции у 1 животного (фиг. 10С). Для исследования того, насколько более высокие дозы гибридного вектора могли повысить противоопухолевый эффект, проводили  
30 второй опыт, в котором животных обрабатывали инъекцией в опухоль  $2 \times 10^{11}$  вирусных частиц AFP-mIL-12, AFP-SFV-mIL-12 или физиологического раствора в качестве контроля (фиг. 10D-G). Как и в предыдущем опыте, у животных, которые получали вектор AFP/IL-12, наблюдали только слабую противоопухолевую  
35 ответную реакцию, которая выражалась только в одной полной ремиссии, у 4 животных рост опухолей замедлялся по сравнению с контролем и у 7 животных ответная реакция отсутствовала в целом из 12 обработанных животных (фиг. 10Е). Однако обработка вектором AFP-SFV-IL-12 имела более высокий эффект, приводя к  
40 полной регрессии опухолей у 4 животных (33%), частичной регрессии у 6 животных (50%), замедленному росту опухолей у 2 животных (16%), и ответная реакция отсутствовала у 2 животных (16%) в целом из 12, подвергшихся обработке животных (фиг. 10F). В данном втором опыте вектор AFP-SFV-IL-12 позволил достигнуть выживаемости 50% обработанных животных против 0% выживаемости у  
45 животных, обработанных AFP-IL-12 или физиологическим раствором (фиг. 10G).

#### Опыт по определению токсичности в условиях in vivo: определение уровней сывороточных трансаминаз и IL-12, и гистологическое исследование печени

Отбирали пробы крови у крыс, обработанных инъекцией в опухоль аденовирусными векторами AFP-SFV-IL-12 или AFP-IL-12 в дозе  $2 \times 10^{11}$  частиц или физиологическим раствором, через 4 и 8 суток после заражения. В данном опыте  
50 также участвовали крысы, которым вводили  $10^8$  частиц альфавируса SFV-IL-12. Сыворотку отделяли от крови центрифугированием при 2000 об/мин в течение 15 мин. Уровень трансаминаз определяли на автоматическом анализаторе Hitachi 911

(Boehringer Mannheim, Германия). Концентрацию IL-12 определяли с помощью ELISA. Гистологическое исследование проводили при извлечении печени у зараженных животных через 3 суток после обработки. Орган фиксировали в формалине, заливали в парафин и на микротоме делали срезы с толщиной 6 микрон. Затем  
5 данные срезы окрашивали гематоксилин/эозином.

#### Определение токсичности гибридных векторов Ad-SFV у крыс

Для оценки токсичности, связанной с введением гибридного вектора AFP-SFV-IL-12 определяли уровень трансаминаз (GOT, GPT и GGTL) в сыворотке крови крыс,  
10 которым вводили в опухоль  $2 \times 10^{11}$  вирусных частиц различных векторов (см. предыдущий раздел). Данное исследование также включало группу крыс, которым в опухоль вводили  $10^8$  вирусных частиц альфавирусного вектора SFV-IL-12 (фиг. 11A). У крыс, получивших аденовирусные векторы AFP-SFV-IL-12 или AFP-IL-12,  
15 определяли очень низкие уровни трансаминаз, значения которой были очень близки уровням у контрольных животных, которым вводили физиологический раствор. Однако уровни трансаминаз у животных, обработанных частицами SFV-IL-12, была достоверно выше по сравнению с другими группами ( $p < 0,05$ ). В данном опыте также проводили определение уровня IL-12 в сыворотке крови животных в те же  
20 временные точки. IL-12 не определяли в сыворотке крови животных, которым вводили Ad векторы AFP-SFV-IL-12 или AFP-IL-12 или физиологический раствор (фиг. 11B), указывая на то, что экспрессия трансгена в данных векторах ограничена опухолями, на основании чего можно предположить, что токсичность гибридных  
25 векторов Ad-SFV является очень низкой. Однако обработка вирусными частицами SFV-IL-12 повышала уровни IL-12 в сыворотке крови после короткого периода времени создавалась ситуация, которая могла вызвать токсичность для печени. Наконец, опыт по токсичности завершали гистологическим исследованием срезов печени, окрашенных гематоксилин/эозином, от крыс, обработанных  
30 введением в опухоль тех же векторов и в тех же дозах, которые уже описаны (фиг. 12). В данном исследовании не было выявлено гистологических различий у крыс, получивших физиологический раствор и аденовирусные векторы AFP-SFV-IL-12 или AFP-IL-12. Однако в срезах печени от крыс, обработанных вирусными  
35 частицами SFV-IL-12, наблюдали зоны с эозинофильными гепатоцитами, а также слияние данных гепатоцитов, что указывает на некоторую степень токсичности (черные стрелки, фиг. 12D).

40

45

50

## Список последовательностей

5	<110> Proyecto de Biomedicina CIMA S.L.	
	<120> Аденовирусный/альфавирусный гибридный вектор для эффективного введения и экспрессии терапевтических генов в опухолевых клетках	
	<160> 15	
10	<170> PatentIn version 3.3	
	<210> 1	
	<211> 438	
	<212> ДНК	
	<213> Аденовирус	
15	<400> 1	
	aaacatcatc aataatatac cttatTTTTgG attgaagcca atatgataat gaggggggtgg	60
	agtttGtgac gtggcgcggg gCGTgggaac ggggcgggtg acgtagtagt gtggcggaag	120
20	tgtgatgttg caagtgtggc ggaacacatg taagcgacgg atgtggcaaa agtgacgttt	180
	ttggtgtgCG cCGgtgtaca caggaagtga caatTTTcgc gCGgtTTtag gCGgatgttg	240
	tagtaaattt gggcgtaacc gagtaagatt tggcatttt cgcgggaaaa ctgaataaga	300
25	ggaagtgaaa tctgaataat tttgtgttac tcatagcgcg taatatttgt ctagggccgc	360
	ggggactttg accgTTTtag tggagactcg cccaggtgtt tttctcaggt gTTTTcgcg	420
	ttccgggtca aagttggc	438
30	<210> 2	
	<211> 161	
	<212> ДНК	
	<213> Аденовирус	
35	<400> 2	
	caagcttatc gataccgtcg agacctcgag ggggggcatc actccgccct aaaacctacg	60
	tcacccgccc cgttcccacg ccccgcgcca cgtcacaaac tccaccccct cattatcata	120
	ttggcttcaa tccaaaataa ggtatattat tgatgatgtt t	161
40	<210> 3	
	<211> 7412	
	<212> ДНК	
	<213> Вирус леса Семлики (SFV)	
45	<400> 3	
	gatggcggat gtgtgacata cacgacgcca aaagattttg ttccagctcc tgccacctcc	60
	gctacgcgag agattaacca cccacgatgg cgcctaaagt gcatgttgat attgaggctg	120
50	acagcccatt catcaagtct ttgcagaagg catttccgtc gttcgaggtg gagtcattgc	180
	aggtcacacc aaatgaccat gcaaatgcca gagcattttc gcacctggct accaaattga	240



	tcgagcagga gactgacaaa gacacactca tcttgatata cggcagtgcg ccttccagga	300
	gaatgatgtc tacgcacaaa taccactgcg tatgcectat gcgcagcgca gaagaccccg	360
5	aaaggctcga tagctacgca aagaaactgg cagcggcctc cgggaagggtg ctggatagag	420
	agatcgcagg aaaaatcacc gacctgcaga ccgtcatggc tacgccagac gctgaatctc	480
	ctaccttttg cctgcataca gacgtcacgt gtcgtacggc agccgaagtg gccgtatacc	540
10	aggacgtgta tgctgtacat gcaccaacat cgctgtacca tcaggcgatg aaagggtgtca	600
	gaacggcgta ttggattggg tttgacacca ccccgtttat gtttgacgcg ctagcaggcg	660
	cgtatccaac ctacgccaca aactgggccc acgagcaggt gttacaggcc aggaacatag	720
15	gactgtgtgc agcatccttg actgagggaa gactcggcaa actgtccatt ctccgcaaga	780
	agcaattgaa accttgcgac acagtcatgt tctcggtagg atctacattg taaactgaga	840
	gcagaaagct actgaggagc tggcacttac cctccgtatt ccacctgaaa ggtaaacaat	900
20	cctttacctg taggtgcgat accatcgtat catgtgaagg gtacgtagtt aagaaaatca	960
	ctatgtgccc cggcctgtac ggtaaaacgg tagggtagcg cgtgacgtat cacgcggagg	1020
	gattcctagt gtgcaagacc acagacactg tcaaaggaga aagagtctca ttccctgtat	1080
25	gcacctacgt cccctcaacc atctgtgatc aaatgactgg catactagcg accgacgtca	1140
	caccggagga cgcacagaag ttgttagtgg gattgaatca gaggatagtt gtgaacggaa	1200
	gaacacagcg aaacactaac acgatgaaga actatctgct tccgattgtg gccgtcgcac	1260
30	ttagcaagtg ggcgagggaa tacaaggcag accttgatga tgaaaaacct ctgggtgtcc	1320
	gagagaggtc acttacttgc tgctgcttgt gggcatttaa aacgaggaag atgcacacca	1380
	tgtacaagaa accagacacc cagacaatag tgaagggtgc ttacagagttt aactcgttcg	1440
35	tcatcccagc cctatggtct acaggcctcg caatcccagt cagatcacgc attaagatgc	1500
	ttttggccaa gaagaccaag cgagagttaa tacctgttct cgacgcgtcg tcagccaggg	1560
	atgctgaaca agaggagaag gagaggttgg aggccgagct gactagagaa gccttaccac	1620
40	ccctcgtccc catcgcgccg gcggagacgg gagtcgtcga cgtcgacggt gaagaactag	1680
	agtatcacgc aggtgcaggg gtcgtggaaa cacctcgcag cgcgttgaaa gtcaccgcac	1740
	agccgaacga cgtactacta ggaaattacg tagttctgtc cccgcagacc gtgctcaaga	1800
45	gctccaagtt ggccccctg caccctctag cagagcaggt gaaaataata acacataacg	1860
	ggagggcccg ccggtaccag gtcgacggat atgacggcag ggtcctacta ccatgtggat	1920
	cggccattcc ggtccctgag tttcaagctt tgagcgagag cgcactatg gtgtacaacg	1980
50	aaagggagtt cgtcaacagg aaactatacc atattgccgt tcacggaccg tcgctgaaca	2040

cgcacgagga gaactacgag aaagtcagag ctgaaagaac tgacgccgag tacgtgttcg 2100  
 acgtagataa aaaatgctgc gtcaagagag aggaagcgtc gggtttggtg ttggtgggag 2160  
 5 agctaaccaa cccccgttc catgaattcg cctacgaagg gctgaagatc aggccgtcgg 2220  
 caccatataa gactacagta gtaggagtct ttggggttcc gggatcaggc aagtctgcta 2280  
 ttattaagag cctcgtgacc aaacacgatac tggtcaccag cggcaagaag gagaactgcc 2340  
 10 aggaaatagt taacgacgtg aagaagcacc gcgggaaggg gacaagtagg gaaaacagtg 2400  
 actccatcct gctaaacggg tgtcgtcgtg ccgtggacat cctatatgtg gacgaggctt 2460  
 togettgeca ttccggtact ctgctggccc taattgctct tgttaaactc cggagcaaag 2520  
 15 tgggtgttatg cggagacccc aagcaatgag gattcttcaa tatgatgcag ctttaaggatga 2580  
 acttcaacca caacatctgc actgaagtat gtcataaaag tatatccaga cgttgcacgc 2640  
 gtccagtcac ggccatcgtg tctacgttgc actacggagg caagatgcgc acgaccaacc 2700  
 20 cgtgcaacaa acccataatc atagacacca caggacagac caagcccaag ccaggagaca 2760  
 tcgtgttaac atgcttccga ggctgggcaa agcagctgca gttggactac cgtggacacg 2820  
 aagtcattgac agcagcagca tctcagggcc tcacccgcaa aggggtatac gccgtaaggc 2880  
 25 agaaggtgaa tgaaaatccc ttgtatgccc ctgcgtcggg gcacgtgaat gtactgctga 2940  
 cgcgcactga ggataggctg gtgtggaaaa cgctggccgg cgatccctgg attaaggctc 3000  
 tatcaaacat tccacagggc aactttacgg ccacattgga agaattggcaa gaagaacacg 3060  
 30 acaaaataat gaaggtgatt gaaggaccgg ctgcgcctgt ggacgcgttc cagaacaaag 3120  
 cgaacgtgtg ttgggcgaaa agcctgggtg ctgtcctgga cactgccgga atcagattga 3180  
 cagcagagga gtggagcacc ataattacag catttaagga ggacagagct tactctccag 3240  
 35 tgggtggcctt gaatgaaatt tgcaccaagt actatggagt tgacctggac agtggcctgt 3300  
 tttctgcccc gaaggtgtcc ctgtattacg agaacaacca ctgggataac agacctggtg 3360  
 gaaggatgta tggattcaat gccgcaacag ctgccaggct ggaagctaga cataccttcc 3420  
 40 tgaaggggca gtggcatacg ggcaagcagg cagttatcgc agaaagaaaa atccaaccgc 3480  
 tttctgtgct ggacaatgta attcctatca accgcaggct gccgcacgcc ctgggtggctg 3540  
 agtacaagac ggttaaaggc agtagggttg agtggctggt caataaagta agaggggtacc 3600  
 45 acgtcctgct ggtgagtgag tacaacctgg ctttgctcgc acgcagggtc acttggttgt 3660  
 caccgctgaa tgtcacaggc gccgataggt gctacgacct aagtttagga ctgccggctg 3720  
 acgccggcag gttcgaactg gtctttgtga acattcacac ggaattcaga atccaccact 3780  
 50 accagcagtg tgtcgaccac gccatgaagc tgcagatgct tgggggagat gcgctacgac 3840

	tgctaaaacc	cgggcggcagc	ctcttgatga	gagcttacgg	atacgccgat	aaaatcagcg	3900
	aagcogttgt	ttcctcctta	agcagaaagt	tctcgtctgc	aagagtgttg	cgccccgatt	3960
5	gtgtcaccag	caatacagaa	gtgttcttgc	tgttctccaa	ctttgacaac	ggaaagagac	4020
	cctctacgct	acaccagatg	aataccaagc	tgagtgcctg	gtatgccgga	gaagccatgc	4080
	acacggcccg	gtgtgcacca	tcctacagag	ttaagagagc	agacatagcc	acgtgcacag	4140
10	aagcggctgt	ggttaacgca	gctaaccgcc	gtggaactgt	aggggatggc	gtatgcaggg	4200
	ccgtggcgaa	gaaatggccg	tcagccttta	agggagaagc	aacaccagtg	ggcacaatta	4260
	aaacagtcac	gtgcggctcg	taccccgtca	tccacgctgt	agcgcctaat	ttctctgcca	4320
15	cgactgaagc	ggaaggggac	cgcgaattgg	ccgctgteta	ccgggcagtg	gccgccgaag	4380
	taaacagact	gtcactgagc	agcgtagcca	tcccgtgct	gtccacagga	gtgttcagcg	4440
	gcggaagaga	taggctgcag	caatccctca	accatctatt	cacagcaatg	gacgccacgg	4500
20	acgctgacgt	gaccatctac	tgcagagaca	aaagttggga	gaagaaaatc	caggaagcca	4560
	tagacatgag	gacggctgtg	gagttgctca	atgatgacgt	ggagctgacc	acagacttgg	4620
	tgagagtgca	cccggacagc	agcctggtgg	gtcgtaaagg	ctacagtacc	actgacgggt	4680
25	cgctgtactc	gtactttgaa	ggtacgaaat	tcaaccaggc	tgctattgat	atggcagaga	4740
	tactgacgtt	gtggcccaga	ctgcaagagg	caaacgaaca	gatatgccta	tacgcgctgg	4800
	gcgaaacaat	ggacaacatc	agatccaaat	gtccggtgaa	cgattccgat	tcatcaaac	4860
30	ctcccaggac	agtgccctgc	ctgtgccgct	acgcaatgac	agcagaacgg	atcggcccgc	4920
	ttaggtcaca	ccaagttaaa	agcatggtgg	tttgctcatc	ttttcccctc	ccgaaatacc	4980
	atgtagatgg	ggtgcagaag	gtaaagtgcg	agaaggttct	cctgttcgac	ccgacggtac	5040
35	cttcagtggc	tagtccgcgg	aagtatgccg	catctacgac	ggaccactca	gatcggctgt	5100
	tacgaggggt	tgacttggac	tggaccaccg	actcgtcttc	cactgccagc	gataccatgt	5160
	cgctaccag	tttgacgtcg	tgtgacatcg	actcgatcta	cgagccaatg	gctcccatag	5220
40	tagtgacggc	tgacgtacac	cctgaaccgc	caggcatcgc	ggacctggcg	gcagatgtgc	5280
	accctgaacc	cgcagacat	gtggacctcg	agaaccgat	tcctccaccg	cgcccgaaga	5340
	gagctgcata	ccttgccctc	cgcgcgccgg	agcgaccggt	gccggcgccg	agaaagccga	5400
45	cgctgcccc	aaggactgcg	tttaggaaca	agctgccttt	gacgttcggc	gactttgacg	5460
	agcacgaggt	cgatgcgctg	gcctccggga	ttactttcgg	agacttcgac	gacgtcctgc	5520
	gactaggccg	cgcggggtgca	tatatcttct	cctcggacac	tggcagcggga	catttacaac	5580
50	aaaaatccgt	taggcagcac	aatctccagt	gcgcacaact	ggatgcggtc	caggaggaga	5640

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50

aaatgtaccc gccaaaattg gatactgaga gggagaagct gttgctgctg aaaatgcaga 5700  
 tgcacccatc ggaggctaata aagagtcgat accagttctcg caaagtggag aacatgaaag 5760  
 ccacggtggt ggacaggctc acatcggggg ccagattgta cacgggagcg gacgtaggcc 5820  
 gcataccaac atacgcggtt cggtagccccc gccccgtgta ctcccctacc gtgatcgaaa 5880  
 gattctcaag ccccgatgta gcaatcgcag cgtgcaacga atacctatcc agaaattacc 5940  
 caacagtggc gtcgtaccag ataacagatg aatacgacgc atacttggac atgggtgacg 6000  
 ggtcggatag ttgcttggac agagcgacat tctgcccggc gaagctccgg tgctaccgga 6060  
 aacatcatgc gtaccaccag ccgactgtac gcagtgcctt cccgtcacc tttcagaaca 6120  
 cactacagaa cgtgctagcg gccgccacca agagaaactg caacgtcacg caaatgcgag 6180  
 aactaccac catggactcg gcagtgttca acgtggagtg cttcaagcgc tatgcttctg 6240  
 ccggagaata ttgggaagaa tatgctaaac aacctatccg gataaccact gagaacatca 6300  
 ctacctatgt gaccaaattg aaaggcccga aagctgctgc cttgttctgct aagaccaca 6360  
 acttggttcc gctgcaggag gttcccatgg acagattcac ggtcgcacatg aaacgagatg 6420  
 tcaaagtcac tccagggacg aaacacacag aggaaagacc caaagtccag gtaattcaag 6480  
 cagcggagcc attggcgacc gcttacctgt gcggcatcca caggaatta gtaaggagac 6540  
 taaatgctgt gttacgcctt aacgtgcaca cattgtttga tatgtcggcc gaagactttg 6600  
 acgcatcat cgcctctcac ttccaccag gagaccggg tctagagacg gacattgcat 6660  
 cattcgaaa aagccaggac gactccttgg ctcttacagg tttaatgatc ctccaagatc 6720  
 taggggtgga tcagtacctg ctggacttga tcgaggcagc ctttggggaa atatccagct 6780  
 gtcacctacc aactggcacg cgcttcaagt tcggagctat gatgaaatcg ggcatgtttc 6840  
 tgactttggt tattaacact gttttgaaca tcacctagc aagcagggtg ctggagcaga 6900  
 gactcactga ctccgcctgt gcggccttca tcggcgacga caacatcgtt cacggagtga 6960  
 tctccgaaa gctgatggcg gagaggtgcg cgtcgtgggt caacatggag gtgaagatca 7020  
 ttgacgctgt catgggcgaa aaacccccat atttttgtgg gggattcata gtttttgaca 7080  
 gcgtcacaca gaccgcctgc cgtgtttcag acccacttaa gcgcctgttc aagttgggta 7140  
 agccgctaac agctgaagac aagcaggacg aagacaggcg acgagcactg agtgacgagg 7200  
 ttagcaagtg gttccggaca ggcttggggg ccgaactgga ggtggcacta acatctaggt 7260  
 atgaggtaga gggctgcaaa agtatcctca tagccatggc caccttggcg agggacatta 7320  
 aggcgtttaa gaaattgaga ggacctgta tacacctta cggcgtcct agattggtgc 7380  
 gtttaatacac agaattctga ttggatcccc gg 7412

<210> 4  
 <211> 7521  
 <212> ДНК  
 <213> Вирус леса Семлики (SFV)

5 <400> 4  
 gatggcggat gtgtgacata cacgacgcca aaagattttg ttccagctcc tgccacctcc 60  
 gctacgcgag agattaacca cccacgatgg ccgccaaagt gcatgttgat attgaggctg 120  
 10 acagcccatt catcaagtct ttgcagaagg catttccgtc gttcgaggtg gagtcattgc 180  
 aggtcacacc aatgaccat gcaaatgcc a gagcattttc gcacctggct accaaattga 240  
 tcgagcagga gactgacaaa gacacactca tcttgatat cggcagtgcg ccttcagga 300  
 15 gaatgatgtc tacgcacaaa taccactgcg tatgocctat gcgcagcgca gaagaccccg 360  
 aaaggctcga tagctacgca aagaaactgg cagcggcctc cgggaaggtg ctggatagag 420  
 agatcgcagg aaaaatcacc gacctgcaga ccgtcatggc tacgccagac gctgaatctc 480  
 ctaccttttg cctgcataca gacgtcacgt gtcgtacggc agccgaagtg gccgtatacc 540  
 20 aggacgtgta tgctgtacat gcaccaacat cgctgtacca tcaggcgatg aaagggtgca 600  
 gaacggcgta ttggattggg tttgacacca ccccgtttat gtttgacgcy ctagcaggcg 660  
 cgtatccaac ctacgccaca aactgggccc acgagcaggt gttacaggcc aggaacatag 720  
 25 gactgtgtgc agcatccttg actgagggaa gactcggcaa actgtccatt ctccgcaaga 780  
 agcaattgaa accttgcgac acagtcatgt tctcggtagg atctacattg taccactgaga 840  
 gcagaaagct actgaggagc tggcacttac cctccgtatt ccacctgaaa ggtaaacaat 900  
 30 cctttacctg taggtgcgat accatcgtat catgtgaagg gtacgtagtt aagaaaatca 960  
 ctatgtgcc cggcctgtac ggtaaaacgg tagggtagc cgtgacgtat cacgcggagg 1020  
 gattcctagt gtgcaagacc acagacactg tcaaaggaga aagagtctca ttccctgtat 1080  
 35 gcacctacgt cccctcaacc atctgtgatc aaatgactgg catactagcg accgacgtca 1140  
 caccggagga cgcacagaag ttgttagtgg gattgaatca gaggatagtt gtgaacggaa 1200  
 gaacacagcy aaacactaac acgatgaaga actatctgct tccgatttgcy gccgtcgcat 1260  
 40 ttagcaagtg ggcgagggaa tacaaggcag accttgatga tgaaaaacct ctgggtgtcc 1320  
 gagagaggtc acttacttgc tgctgcttgt gggcatttaa aacgaggaag atgcacacca 1380  
 tgtacaagaa accagacacc cagacaatag tgaagggtcc ttcagagttt aactcgttcg 1440  
 45 tcatcccgag cctatggtct acaggcctcg caatcccagt cagatcacgc attaagatgc 1500  
 ttttggccaa gaagaccaag cgagagttaa tacctgttct cgacgcgctc tcaaccaggg 1560

50

	atgctgaaca agaggagaag gagaggttgg aggccgagct gactagagaa gccttaccac	1620
	ccctcgtccc catcgcgccg gcggagacgg gagtcgtcga cgtcgcgctt gaagaactag	1680
5	agtatcacgc aggtgcaggg gtcgtggaaa cacctcgcag cgcgctgaaa gtcaccgcac	1740
	agccgaacga cgtactacta ggaaattacg tagttctgtc cccgcagacc gtgctcaaga	1800
	gctccaagtt ggccccctg caccctctag cagagcaggt gaaaataata acacataacg	1860
10	ggagggccgg cggttaccag gtcgcagggat atgacggcag ggtcctacta ccatgtggat	1920
	cggccattcc ggtccctgag tttcaagctt tgagcgagag cgccactatg gtgtacaacg	1980
	aaagggagtt cgtcaacagg aaactatacc atattgccgt tcacggaccg tcgctgaaca	2040
15	ccgacgagga gaactacgag aaagtcagag ctgaaagaac tgacgccgag tacgtgttcg	2100
	acgtagataa aaaatgctgc gtcaagagag aggaagcgtc gggtttggtg ttggtgggag	2160
	agctaacca cccccgttc catgaattcg cctacgaagg gctgaagatc aggccgtcgg	2220
20	caccatataa gactacagta gtaggagtct ttggggttcc gggatcaggc aagtctgcta	2280
	ttattaagag cctcgtgacc aaacacgatc tggtcaccag cggcaagaag gagaactgcc	2340
	aggaaatagt taacgacgtg aagaagcacc gcgggaaggg gacaagtagg gaaaacagtg	2400
25	actccatcct gctaaacggg tgtcgtcgtg ccgtggacat cctatatgtg gacgaggctt	2460
	tcgcttgcca ttccggtact ctgctggccc taattgctct tgttaaactc cggagcaaag	2520
	tggtgttatg cggagacccc aagcaatgcg gattcttcaa tatgatgcag cttaagggtga	2580
30	acttcaacca caacatctgc actgaagtat gtcataaaag tatatccaga cgttgcacgc	2640
	gtccagtcac ggccatcgtg tctacgttgc actacggagg caagatgcmc acgaccaacc	2700
	cgtgcaacaa acccataatc atagacacca caggacagac caagcccaag ccaggagaca	2760
35	tcggtgtaac atgcttccga ggctgggcaa agcagctgca gttggactac cgtggacacg	2820
	aagtcatgac agcagcagca tctcagggcc tcacccgcaa aggggtatac gccgtaaggc	2880
	agaaggtgaa tgaaaatccc ttgtatgccc ctgcgtcggg gcacgtgaat gtactgctga	2940
40	cgcgcactga ggataggctg gtgtggaaaa cgctggccgg cgatccctgg attaagggtcc	3000
	tatcaaacat tccacaggtt aactttacgg ccacattgga agaattggcaa gaagaacacg	3060
	acaaaataat gaaggtgatt gaaggaccgg ctgcmcctgt ggacgcgctt cagaacaaag	3120
45	cgaacgtgtg ttgggcgaaa agcctgggtc ctgtcctgga cactgccgga atcagattga	3180
	cagcagagga gtggagcacc ataattacag catttaagga ggacagagct tactctccag	3240
	tggtggcctt gaatgaaatt tgcaccaagt actatggagt tgacctggac agtggcctgt	3300
50	tttctgcccc gaaggtgtcc ctgtattacg agaacaacca ctgggataac agacctgggtg	3360

gaaggatgta tggattcaat gccgcaacag ctgccaggct ggaagctaga cataccttcc 3420  
 tgaaggggca gtggcatacg ggcaagcagg cagttatcgc agaaagaaaa atccaaccgc 3480  
 5 tttctgtgct ggacaatgta attcctatca accgcaggct gccgcacgcc ctggtggctg 3540  
 agtacaagac ggttaaaggc agtagggttg agtggctggt caataaagta agaggggtacc 3600  
 acgtcctgct ggtgagtgag tacaacctgg ctttgcctcg acgcagggtc acttggttgt 3660  
 10 caccgctgaa tgtcacaggc gccgataggt gctacgacct aagtttagga ctgccggctg 3720  
 acgcggcag gttogacttg gtctttgtga acattcacac ggaattcaga atccaccact 3780  
 accagcagtg tgtogaccac gccatgaagc tgcagatgct tgggggagat gcgctacgac 3840  
 15 tgctaaaacc cggcggcatc ttgatgagag cttacggata cgccgataaa atcagcgaag 3900  
 ccgttgtttc ctcttaagc agaaagttct cgtctgcaag agtgttgcgc ccggattgtg 3960  
 tcaccagcaa tacagaagtg ttcttctgtg tctccaactt tgacaacgga aagagacct 4020  
 20 ctacgctaca ccagatgaat accaagctga gtgccgtgta tgccggagaa gccatgcaca 4080  
 cggccgggtg tgcaccatcc tacagagtta agagagcaga catagccacg tgcacagaag 4140  
 cggctgtggt taacgcagct aacgcccgtg gaactgtagg ggatggcgta tgcagggccg 4200  
 25 tggcgaagaa atggccgtca gcctttaagg gagcagcaac accagtgggc acaattaaaa 4260  
 cagtcatgtg cggctcgtac cccgtcatcc acgctgtagc gcctaatttc tctgccacga 4320  
 ctgaagcgggaggggaccgc gaattggccg ctgtctaccg ggcagtggcc gccgaagtaa 4380  
 30 acagactgtc actgagcagc gtagccatcc cgctgctgtc cacaggagtg ttcagcggcg 4440  
 gaagagatag gctgcagcaa tccctcaacc atctattcac agcaatggac gccacggacg 4500  
 ctgacgtgac catctactgc agagacaaaa gttgggagaa gaaaatccag gaagccattg 4560  
 35 acatgaggac ggctgtggag ttgctcaatg atgacgtgga gctgaccaca gacttgggtga 4620  
 gagtgcaccc ggacagcagc ctggtgggtc gtaagggcta cagtaccact gacgggtcgc 4680  
 tgtactcgta ctttgaaggt acgaaattca accaggctgc tattgatatg gcagagatac 4740  
 40 tgacgttgtg gcccagactg caagaggcaa acgaacagat atgcctatac gcgctgggcg 4800  
 aaacaatgga caacatcaga tccaaatgtc cggatgaacga ttccgattca tcaacacctc 4860  
 ccaggacagt gccctgcctg tgccgctacg caatgacagc agaacggatc gcccgctta 4920  
 45 ggtcacacca agttaaagc atgggtggtt gctcatcttt tcccctcccg aaataccatg 4980  
 tagatggggt gcagaaggta aagtgcgaga aggttctcct gttcgacctg acggtacctt 5040  
 cagtgggttag tccgcggaag tatgccgat ctacgacgga cactcagat cggctcgttac 5100  
 50 gagggtttga cttggactgg accaccgact cgtcttccac tgccagcgat accatgtcgc 5160

taccagttt gcagtcgtgt gacatcgact cgatctacga gccaatggct cccatagtag 5220  
 tgacggctga cgtacacct gaaccgcag gcatcgcgga cctggcggca gatgtgcacc 5280  
 5 ctgaaccgc agaccatgtg gacctcgaga acccgattcc tccaccgcgc ccgaagagag 5340  
 ctgcatacct tgcctccgc gcggcgagc gaccggtgcc ggcccgaga aagccgacgc 5400  
 ctgccccaaag gactgcgttt aggaacaagc tgcctttgac gttcggcgac tttgacgagc 5460  
 10 acgaggctga tgcgttggcc tccgggatta ctttcggaga cttcgacgac gtctcgacgac 5520  
 taggcgcgc ggggtgcatat atttctcct cggacactgg cagcggacat ttacaacaaa 5580  
 aatccgttag gcagcacaat ctccagtgcg cacaactgga tgcggtccag gaggagaaaa 5640  
 15 tgtaccgcgc aaaattggat actgagaggg agaagctggt gctgctgaaa atgcagatgc 5700  
 acccatcggg ggctaataag agtcgatacc agtctcgcaa agtggagaac atgaaagcca 5760  
 cgggtggtgga caggctcaca tccggggcca gattgtacac gggagcggac gtaggcgca 5820  
 20 tacciaacata cgcggttcgg taccctccgc ccgtgtactc ccctaccgtg atcgaaagat 5880  
 tctcaagccc cgatgtagca atcgcagcgt gcaacgaata cctatccaga aattacccaa 5940  
 cagtggcgtc gtaccagata acagatgaat acgacgata cttggacatg gttgacgggt 6000  
 25 cggatagttg cttggacaga gcgacattct gcccgcgaa gctccggtgc taccgaaac 6060  
 atcatgcgta ccaccagccg actgtacgca gtgccgtccc gtcacccttt cagaacacac 6120  
 tacagaacgt gctagcggcc gccaccaaga gaaactgcaa cgtcacgcaa atgcgagaac 6180  
 30 taccacccat ggactcggca gtgttcaacg tggagtgttt caagcgctat gcctgctccg 6240  
 gagaatattg ggaagaatat gctaaacaac ctatccggat aaccactgag aacatcacta 6300  
 cctatgtgac caaattgaaa ggcccgaag ctgctgcctt gttcgctaag acccacaact 6360  
 35 tggttccgct gcaggagggt cccatggaca gattcacggg cgacatgaaa cgagatgtca 6420  
 aagtcactcc agggacgaaa cacacagagg aaagaccaa agtccaggta attcaagcag 6480  
 cggagccatt ggcgaccgct tacctgtgcg gcatccacag ggaattagta aggagactaa 6540  
 40 atgctgtggt acgcccctaac gtgcacacat tgtttgatat gtcggccgaa gactttgacg 6600  
 cgatcatcgc ctctcacttc caccaggag acccggttct agagacggac attgcatcat 6660  
 tcgacaaaag ccaggacgac tccttggtc ttacaggttt aatgatcctc gaagatctag 6720  
 45 ggggtggatca gtacctgctg gacttgatcg aggcagcctt tggggaaata tccagctgct 6780  
 acctaccaac tggcacgcgc ttcaagtctg gagctatgat gaaatcgggc atgtttctga 6840  
 ctttgtttat taacactggt ttgaacatca ccatagcaag cagggtactg gagcagagac 6900  
 50 tcaactgactc cgctgtgcg gccttcactg gcgacgaaa catcgttcac ggagtgatct 6960



cgcacaagct gatggcggag aggtgcgcgt cgtgggtcaa catggagggtg aagatcattg 7020  
 acgctgtcat gggcgaaaaa ccccatatt tttgtggggg attcatagtt tttgacagcg 7080  
 5 tcacacagac cgctgcccgt gtttcagacc cacttaagcg cctgttcaag ttgggtaagc 7140  
 cgctaacagc tgaagacaag caggacgaag acaggcgacg agcactgagt gacgaggtta 7200  
 gcaagtgggt ccggacagggc ttggggggccg aactggagggt ggactaaca tctaggtatg 7260  
 10 aggtagaggg ctgcaaaagt atcctcatag ccatggccac cttggcgagg gacattaagg 7320  
 cgtttaagaa attgagagga cctgttatac acctctacgg cggtcctaga ttggtgctgt 7380  
 aatacacaga attctgatta tagcgcacta ttatagcacc atgaattaca tcctacgca 7440  
 15 aacgttttac ggcgcgggt ggcgcccgcg cccggcggcc cgtccttggc cgttgcaggc 7500  
 cactccggtg gctcccgtcg t 7521

<210> 5  
 <211> 841  
 20 <212> ДНК  
 <213> Вирус леса Семлики (SFV)

<400> 5  
 attacatccc tacgcaaacg ttttacggcc gccgggtggcg cccgcgcccg gcggcccgtc 60  
 25 cttggccggt gcaggccact ccgggtggctc ccgtcgtccc cgacttccag gccagcaga 120  
 tgcagcaact catcagcgcc gtaaatgcmc tgacaatgag acagaacgca attgctcctg 180  
 ctaggcctcc caaaccaag aagaagaaga caaccaaacc aaagccgaaa acgcagccca 240  
 30 agaagatcaa cggaaaaacg cagcagcaaa agaagaaga caagcaagcc gacaagaaga 300  
 agaagaacc cggaaaaaga gaaagaatgt gcatgaagat tgaaaatgac tgtatcttcg 360  
 tatgcggcta gccacagtaa cgtagtgttt ccagacatgt cgggcaccgc actatcatgg 420  
 35 gtgcagaaaa tctcgggtgg tctggggggcc ttcgcaatcg gcgctatcct ggtgctgggt 480  
 gtggtcactt gcattgggct ccgcagataa gttagggtag gcaatggcat tgatatagca 540  
 agaaaattga aaacagaaaa agttagggtg agcaatggca tataaccata actgtataac 600  
 40 ttgtaacaaa gcgcaacaag acctgcgcaa ttggccccgt ggtccgcctc acggaaactc 660  
 ggggcaactc atattgacac attaattggc aataattgga agcttacata agcttaattc 720  
 gacgaataat tggatTTTTA ttttattttg caattggttt ttaatatTTTc caaaaaaaaa 780  
 45 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 840  
 a 841

<210> 6  
 50 <211> 260

<212> ДНК  
<213> Вирус SV40

<400> 6  
 5 agagtcgggg cggccggccg cttcgagcag acatgataag atacattgat gagtttggac 60  
 aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaaat gctttatttg tgaatttgt gatgctattg 120  
 ctttatttgt aaccattata agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt 180  
 10 ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca 240  
 aatgtggtaa aatcgataag 260

<210> 7  
 15 <211> 940  
 <212> ДНК  
 <213> ЧЕЛОВЕК

<400> 7  
 20 aattcgcttg tcatacagct aataattgac cataagacaa ttagatttaa attagttttg 60  
 aatctttcta ataccaaagt tcagtttact gttccatggt gcttctgagt ggcttcacag 120  
 acttatgaaa aagtaaacgg aatcagaatt acatcaatgc aaaagcattg ctgtgaactc 180  
 tgtacttagg actaaacttt gagcaataac acacatagat tgaggattgt ttgctgttag 240  
 25 catacaaact ctggttcaaa gctcctcttt attgcttgtc ttggaaaatt tgctgttctt 300  
 catggtttct cttttcactg ctatctattt ttctcaacca ctcacatggc tacaataact 360  
 gtctgcaagc ttatgattcc caaatatcta tctctagcct caatcttggt ccagaagata 420  
 30 aaaagtagta ttcaaagca catcaacgtc tccacttgga gggcttaaag acgtttcaac 480  
 atacaaaacc gggagttttg cctggaatgt ttcctaaaat gtgtcctgta gcacataggg 540  
 tctccttggt ccttaaaatc taattacttt tagcccagtg ctcacccac ctatggggag 600  
 35 atgagagtga aaagggagcc tgattaataa ttacactaag tcaataggca tagagccagg 660  
 actgtttggg taaactggtc actttatctt aaactaaata tatccaaaac tgaacatgta 720  
 cttagttact aagtctttga ctttatctca ttcataccac tcagctttat ccaggccact 780  
 40 tatttgacag tctagctagc ccctagattt tctgccccaa agagctctgt gtccttgaac 840  
 ataaaataca aataaccgct atgctgttaa ttattggcaa atgtcccatt ttcaacctaa 900  
 ggaaatacca taaagtaaca gatataccaa caaaaggtta 940

45 <210> 8  
 <211> 28892  
 <212> ДНК  
 <213> Химерная

50

<220>  
 <221> 5' ITR  
 <222> (1) .. (438)  
 <223> Последовательность первого инвертированного концевго повтора и сигнальная  
 5 последовательность для упаковки  
  
 <220>  
 <221> «лишняя»  
 <222> (439) .. (10990)  
 <223> Первая некодирующая «лишняя» последовательность  
  
 10 <220>  
 <221> AFP (p+e)  
 <222> (10991) .. (11930)  
 <223> Промотор альфа-фетопротеина (AFP). Включает проморную область  
 (p) и энхансерную область (e)  
  
 15 <220>  
 <221> SFV  
 <222> (12257) .. (19366)  
 <223> Участок последовательности репликона SFV  
  
 20 <220>  
 <221> mIL-12  
 <222> (19389) .. (21722)  
 <223> Последовательность гена мышиноного интерлейкина-12 (IL-12) экзогенный ген,  
  
 <220>  
 <221> Поли-А  
 25 <222> (22621) .. (22880)  
 <223> Последовательность полиаденилирования, полученная из SV40  
  
 <220>  
 <221> «лишняя»  
 <222> (22881) .. (28731)  
 30 <223> Вторая некодирующая «лишняя» последовательность  
  
 <220>  
 <221> 3' ITR  
 <222> (28732) .. (28892)  
 <223> Последовательность второго инвертированного концевго повтора  
 35  
 <400> 8  
 aaacatcatc aataatatac cttattttgg attgaagcca atatgataat gaggggggtgg 60  
 agttttgtgac gtggcgcggg gcggtgggaac ggggcggggtg acgtagtagt gtggcggaag 120  
 40 tgtgatgttg caagtgtggc ggaacacatg taagcgacgg atgtggcaaa agtgacgttt 180  
 ttgggtgtgcg ccggtgtaca caggaagtga caattttcgc gcggttttag gcggatgttg 240  
 tagtaaattt gggcgtaacc gagtaagatt tggccathtt cgcgggaaaa ctgaataaga 300  
 45 ggaagtgaaa tctgaataat tttgtgttac tcatagcgcg taatatttgt ctagggccgc 360  
 ggggactttg accgtttacg tggagactcg cccagggtgtt tttctcaggt gttttccgcg 420  
 ttccgggtca aagttggcgt tttgatatca agcttatcga taccgtcaaa caagtcttta 480  
 50 attcaagcaa gactttaaca agttaaagg agcttatggg taggaagtag tgttatgatg 540

	tatgggcata aagggtttta atgggatagt gaaaatgtct ataataatac ttaaattggct	600
	gcccacatcac ctacaggatt gatgtaaaca tggaaaaggt caaaaacttg ggtcactaaa	660
5	atagatgatt aatggagagg atgaggttga tagttaaatg tagataagtg gtcttattct	720
	caataaaaaat gtgaacataa ggcgagtttc tacaagatg gacaggactc attcatgaaa	780
	cagcaaaaaac tggacatttg ttctaactct tgaagagtat gaaaaattcc tattttaaag	840
10	gtaaaacagt aactcacagg aaataccaac ccaacataaa atcagaaaca atagtctaaa	900
	gtaataaaaa tcaaacgttt gcacgatcaa attatgaatg aaattcacta ctaaaattca	960
	cactgatttt gtttcatcca cagtgtcaat gttgtgatgc atttcaattg tgtgacacag	1020
15	gcagactgtg gatcaaaaagt ggtttctggt gcgacttact ctcttgagta tacctgcagt	1080
	cccctttctt aagtgtgtta aaaaaaagg gggatttctt caattcgcca atactctagc	1140
	tctccatgtg ctttctagga aacaagtgtt aaccacctt atttgcataa cctagctcca	1200
20	aaggactttt gactccccac aaaccgatgt agctcaagag agggtatctg tcaccagtat	1260
	gtatagtgaa aaaagtatcc caagtcccaa cagcaattcc taaaaggagt ttatttaaaa	1320
	aaccacacac acctgtaaaa taagtatata tcctccaagg tgactagttt taaaaaaca	1380
25	gtattggctt tgatgtaaag tactagtgaa tatgttagaa aaatctcact gtaaccaagt	1440
	gaaatgaaag caagtatggt ttgcagagat tcaaagaaaa tataagaaaa cctactgttg	1500
	ccactaaaaa gaatcatata ttaaataac tcaacaata gctcttcagt ctgataaaat	1560
30	ctacagtcac aggaatggat ctatcactat ttctattcag tgctttgatg taatccagca	1620
	ggtcagcaaa gaatttatag cccccctga gcacacagag ggctacaatg tgatggcctc	1680
	ccatctcctt catcacatct cgagcaagac gttcagtcct acagaaataa aatcaggaat	1740
35	ttaatagaaa gtttcataca ttaaacttta taacaaacac ctcttagtca ttaaacttcc	1800
	acaccaacct gggcaatata gtgagacccc atgcctgcaa aaaaaaaaaa attagccagg	1860
	catggtagca tgtacctgta gtcccagcta cttgagaggt gaggtgggaa aatcacttta	1920
40	gtgcaggatg ttgaggctgg agtgaactgt gattgtgcca ctgcactcca gcctggacaa	1980
	tagagcaaga cttgtctca aaaaaatgca ttaaaaattt tttttaaadc ttccacgtat	2040
	cacatccttt gccctcatgt ttcataaggt aaaaaatttg ataccttcaa aaaaaccaag	2100
45	cataccacta tcataatttt ttttaaagtc aaataaaaac aagataccat tttcacctat	2160
	cagactggca ggttctgatt aaatgaaatt ttctggataa tatacaatat taagagagac	2220
	tgtagaaact gggccagtgg ctcatgcctg taatcccagc actttgggag gctgggtaac	2280
50	atggcgaaacc ctgtttctac aaaataaaaa tattagctgg gagtggtggc gcacacctat	2340

agtcccagct actcaggagg ctgaggtgga aggatcgctt gaaccaggga ggttgagact 2400  
 gcagtgaact gtgatcattc tgctgcactg cccccagcc tgggcaacag agacctgtc 2460  
 5 tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gacaaattgt gaagagaaaag gtactctcat ataacatcag 2520  
 gagtataaaa tgattcaact tcttagagga aaatttggca ataccaaat attcaataaa 2580  
 ctctttcccc ttgaccagga aattccactt gaataaagct gaacaagtac caaacatgta 2640  
 10 aaagaatggt tcttctagta cagtcggtaa gaacaaaata gtgtctatca atagtggact 2700  
 ggttaaatca gttatggtat ctccataaga cagaatgcta tgcaacctt aaaatatatt 2760  
 agatagctct agacacacta atattaaaag tgtccaataa catttaaac tatactcata 2820  
 15 cgttaaaata taaatgtata tatgtacttt tgcatatagt atacatgcat aggccagtgc 2880  
 ttgagaagaa atgtgtacag aaggctgaaa ggagagaact ttagtcttct tgtttatggc 2940  
 ctccatagtt agaataattt ataacacaaa tattttgata ttataatttt aaaataaaaa 3000  
 20 cacagaatag ccagacatac aatgcaagca ttcaatacca ggtaagggtt ttcactgtaa 3060  
 ttgacttaac agaaaatttt caagctagat gtgcataata ataaaaatct gaccttgct 3120  
 tcatgtgatt cagccccagt ccattaccct gtttaggact gagaaatgca agactctggc 3180  
 25 tagagttcct tcttccatct ccttcaatg tttactttgt tctggtcctt acagagtccc 3240  
 actataccac aactgatact aagtaattag taaggccctc ctcttttatt ttaataaaag 3300  
 aagattttag aaagcatcag ttatttaata agttggccta gtttatgttc aaatagcaag 3360  
 30 tactcagaac agctgctgat gtttgaaatt aacacaagaa aaagtaaaaa acctcatttt 3420  
 aagatcttac ttacctgtcc ataattagtc catgaggaat aaacacctt tccaaatcct 3480  
 cagcataatg attaggtatg caaaataaat caaggtcata acctggttca tcatcactaa 3540  
 35 tctgaaaaag aaatatagct gtttcaatga gagcattaca ggatacaaac atttgattgg 3600  
 attaagatgt taaaaataa ccttagtcta tcagagaaat ttaggtgtaa gatgatatta 3660  
 gtaactgtta actttgtagg tatgataatg aattatgtaa gaaaacaaca ggccgggagg 3720  
 40 gttggttcac acgtgtaatc ccagcacttt gggaggctga ggcaggcaga ctgcctgagc 3780  
 tcaggagttc gagaccagcc tgggcaacac ggtgaaatcc cgtctctact aaaaatacaa 3840  
 aaaaattagc cgggtgtggt gacacatgcc tgtagtocca gctacttggg aggctgaggc 3900  
 45 aggagaatca cttgaacctg ggaggtgaag gttgcagtga gccaaagatgg caccacttca 3960  
 ctccagcctg ggaaacagag caagactctg tctctgagct gagatggcac cacttactc 4020  
 cagcctggga aacagagcaa gactctgtct caaaaaaac aaaacacaca acaaaaaaaa 4080  
 50 caggctgggc gcggtggctc acgcctgtaa tcccagcact ttgggaggcc gaggcgggtg 4140

gatcacctga ggtcaggagt tccagaccag ccttgtcaac atgggtgaaac ctccccccgc 4200  
cgtctctact aaaaatacaa aaattagcca ggcgtggtgg caggagcctg taatcccagc 4260  
5 tacttgggag gctgaggcag gagaatcgct tgtaccaga aggcagaggt tgcactgagc 4320  
tgagatggca ccattgcact ccagcctggg ggacaagagc gagatttcgt ctttaaaaaa 4380  
caaaaaaaa acaaaaaacc atgtaactat atgtcttagt catcttagtc aagaatgtag 4440  
10 aagtaaagtg ataagatatg gaatttcctt taggtcacia agagaaaaag aaaaatttta 4500  
aagagctaag acaaacgcag caaatcttt atatttaata atattctaaa catgggtgat 4560  
gaacatacgg gtattcatta tactattctc tccacttttg agtatgtttg aaaatttagt 4620  
15 aaaacaagtt ttaacacact gtagtctaac aagataaaat atcacactga acaggaaaaa 4680  
ctggcatggg gtgggtggctc acacttgtaa tcccagtgtc ttgggaggct gagacaggag 4740  
agttgcttga ggccaggagt tcaagaccga catggggaat gtagcaagac cccgtcccta 4800  
20 caaaaaactt tgtaaaaatt tgccaggat ggtgggtgcat acctgtagtc ccagctactc 4860  
gggagggcga ggcagaagga atcacttgag cccaggagtt tgaggctgca gtgagctacg 4920  
atcataccac agcactccag cgtggacaac agagtaagac cctatctcaa aaacaaaaca 4980  
25 aaacaaaaca aacaaaaaaa accacaagaa aaactgctgg ctgatgcagc ggctcatgcc 5040  
tgtaatccca gtattttggg aggccaggt gggcgtatca cctgaggcca ggagttagag 5100  
accagcctgg ccaacatggg gaaaccccat ctctactaaa aatacaaat tagccaggca 5160  
30 tgtggcacgc gcctgtagtc ccagttactg ggaggctgaa gcaggaggat cacctgagcc 5220  
cgggaggtgg aggttgagc gagccgagat cacaccactg cactccagcc tgggtgacac 5280  
agcaataccc tacctcaaaa taaaaaagaa aaagaaaaga aaagttgctg tccccgctac 5340  
35 cccaatccca aatccaaaca gcctctctca tctcacagta agggggaaaa atcacccaaa 5400  
aaagctaagt gatcttttga aaacccaaac tcttagaagt ctaagattat tatagtcaac 5460  
tcatgaagtg tcatcataaa agatactcta atattattta agtagaacca catattgggt 5520  
40 gtcttgggtat gtctagcccc tggcatacaa aatatttaaat aacctgata tggtagctgt 5580  
gatgtgaaaa tgtactatga gtacagcttt ataaatacta tatatgtacc tatatacaga 5640  
aaaaaataca acaaaatcat aaaagcactt atctttgaaa gaggagttac agcaatttta 5700  
45 tttagttctt tattgctttg ctatatatc taaatttttt tcaatgaata tatatcactt 5760  
ttaaaaaaat tcaatggtct ttcttataaa ttatctttgg cagcatgcgt ttttatatat 5820  
acataaaaaa tgtatgggaa atttttaaag gatacatata ataaagcaa aatatacaaaa 5880  
50 caaaaaatca gaatacaaaa agataaaaag attgggaagg gagggaggga gtaaggagga 5940

aggggtgggtg ggtatagaga aatataccaa ataatggtaa gaagtgggggt cttgacactt 6000  
 tctacacttt ttttaaataa aaaaaatfff tttctctctc tttttttttt ttagagacga 6060  
 5 agtctcgcta tgttgcccag gctgggtcttg aactcctggg atcaagagat cctcctgcct 6120  
 cagcctccca aggtgcttgg attacaggtg tgagccacca cgcttgggtca ctttctacac 6180  
 tttaatatat atattttttc attttcaatg tcatttttat tagttaattt ataataccca 6240  
 10 ttcaccatta tattcaaagt ctatttgaag aaataaacca gaaagaatga aatactctag 6300  
 ctacatgct attcaatact aaattacctt tcaaatcaca ttcaagaagc tgatgattta 6360  
 agctttggcg gtttccaata aatattggtc aaaccataat taaatctcaa tatatcagtt 6420  
 15 agtacctatt gagcatctcc ttttacaacc taagcattgt attaggtgct taaatacaag 6480  
 cagcttgact ttttaatacat ttaaaaatac atatttaaga cttaaaatct tatttatgga 6540  
 attcagttat attttgaggt ttccagtgc gagaaatttg aggtttgtgc tgtctttcag 6600  
 20 tccccaaagc tcagttctga gttctcagac tttgggtggaa cttcatgtat tgtcaggttg 6660  
 gcccgtaata cctgtgggac aacttcagcc cctgtgcaca tggccaggag gctgggtgca 6720  
 aacatfffca ggtaggtgga ccaggacatg cccctgggtca tggccagggtg gaggcatagt 6780  
 25 gctatacagc aggcagaagt caatattgat ttgtttttaa agaaacatgt actactttca 6840  
 taagcagaaa aaatffctat tcttggggga aaagattatg ccagatcctc taggattaaa 6900  
 tgctgatgca tctgctaaac cttcacatat cagaacatat ttactataga aagaatgaaa 6960  
 30 atgggacatt tgtgtgtcac ctatgtgaac attccaaaaa tattttacaa caactaagta 7020  
 ttttataaat tttatgaact gaaatffagt tcaagttcta ggaaaatata aaccttgcta 7080  
 gatattataa aaatgatata atatatattc atffcaggct catcagaata tatctgttat 7140  
 35 cacttgacaa gaatgaaaat gcaccatfff gtagtgctff aaaatcagga agatccagag 7200  
 tactaaaaat gactffctcc ttgaagctta ctcaccaact tctctccagt tactcactgc 7260  
 ttctgccaca agcataaaact aggacccagc cagaactccc ttgaaatata cacttgcaac 7320  
 40 gattactgca tctatcaaaa tggttcagtg cctggctaca ggttctgcag atcgactaag 7380  
 aatffgaaaa gtcttgffta tttcaaagga agcccatgtg aatffctgccc agagffctac 7440  
 ccagatatgc agtctaagaa tacagacaga tcagcagaga tgtattctaa aacaggaatt 7500  
 45 ctggcaatat aacaaattga tttccaatca aaacagatff acataccata cttatgtcaa 7560  
 gaagffgfff tgtffftattg catcctagat tttatfffff tgatfftatgg tffactffta 7620  
 gcataaaaaa tffgtcaata caactcttcc caaaaggcat aaacaaaaat tcataaaact 7680  
 50 tgcactactt gagatacttc aggtatgaat tcacaactff gttacaactt actatatata 7740

tgcacacata tatatatatt tgggtatatt ggggggggttc taatttaaga aatgcataat 7800  
 tggctataga cagacagttg tcagaacttg gcaatgggta cgtgcaggtt cattatacca 7860  
 5 agtctacttg tagttgttca aaatgtatca taatacaagg cggggcgagg tcgtcacgcc 7920  
 tgtaatccca gcattttggg aggctaaggc aggaggattg cttgaggcca ggagtttgtg 7980  
 accagcctgg gcaacagagc aagaccctgt ctccaaaaag aaaaaaata attttttaca 8040  
 10 aaataaaaaac aaaatgtatc atcagacgaa attaaataag aggcaattca tttaaagtac 8100  
 aacttttccc agcttgacat ttaacaaaaa gtctaagtcc tcttaattca tatttaatga 8160  
 tcaaatatca aataactaatt tttttttttt tttttttttt gagacggagt ctcgctctgt 8220  
 15 cgcccaggct ggagtgacgt gggcgcatcc tggctcactg caagctccgc ctcccgggtt 8280  
 cagccoatc tctgcctca gcctcccgag tagctgggat tacagacatg cgccaccacg 8340  
 cccggetaat tttgtatttt tagtagagat ggggtttctc catgttggtc aggetggtct 8400  
 20 tgaatttccc acctcaggtg atctgcctgc ctcagcctca caaagcagta gctgggacta 8460  
 caggcaccca ccaccacact tggttaattc tttgtattt tttttgtaa gacgggattt 8520  
 caccatgtta gccaggatgg tctcgatctc ctgatctcat gatccgcccg cctcagcctc 8580  
 25 ccaaagtgct gggattacag gcgtgagcca ccccgcccgg ccatcaaata ctaattctta 8640  
 aatggtaagg acccactatt cagaacctgt atccttatca ctaatatgca aatatttatt 8700  
 gaatacttac tatgtcatgc atactagaga gagttagata aatttgatac agctaccctc 8760  
 30 acagaactta cagtgttaata gatggcatga catgtacatg agtaactgtg aacagtgtta 8820  
 aattgctatt taaaaaaaaa gacggctggg cgctgtggct catgcctgta atcccagcac 8880  
 tttgggaggc caaggcaagt tgatcgctcg aggtcaagag ttcgagacca gcctggccaa 8940  
 35 cgtggtaaaa ccccgctctc actaaaaata caaaaaaaaa attagccagg catggtggca 9000  
 caggcctgta atcccagcta ctagggaggc tgagacatgg agaactgctt gaatccagga 9060  
 ggcagaggtt acagtgagcc gagatcatac cactacactc cagcctgagt gacagagcga 9120  
 40 gactcctgtc taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagatacagg ttaagtgtta tggtagttga 9180  
 agagagaact caaactctgt ctcagaagcc tcacttgcat gtggaccact gatatgaaat 9240  
 aatataaata ggtataattc aataaatagg aacttcagtt ttaatcatcc caaacaccaa 9300  
 45 aacttcoctat caaacaggtc caataaactc aatctctata agagctagac agaaatctac 9360  
 ttggtggcct ataactttat tagcccttac ttgtcccatc tgatattaat taaccccatc 9420  
 taatatggat tagttaacaa tccagtggct gctttgacag gaacagttgg agagagttgg 9480  
 50 ggattgcaac atattcaatt atacaaaaat gcattcagca tctaccttga ttaaggcagt 9540



gtgcaacaga atttgcagga gagtaaaaga atgattataa atttacaacc cttaaagagc 9600  
 tatagctggg cgtggtggct catgcctgta aatcccagca ctttgggagg ctgaggcggg 9660  
 5 tggatcacct gaggccagaa gttcaagacc agcctagcca acatggcgaa accctgtctc 9720  
 tacaaaaaat acaaaaatta gccgggtgtg gtggcacgtg cctgtagtcc cagttacttg 9780  
 ggaggccgag gcaggagaat cgcttgaacc taggaggtgg aggctgcagt gagccgagat 9840  
 10 tgtgccactg cactccactt cagcctgggc gacaagagca agactccgtc acaaaaaaaaa 9900  
 aaaaaaaaaa aaagcttaaa atctagtggg aaaggcatat atacatacaa ctaactgtat 9960  
 agcataataa agctcataat ctgtaacaaa atctaattcg acaagcccag aaacttgtga 10020  
 15 tttaccaaaa acagttatat atacacaaaa agtaaaccta gaacccaaag ttaccagca 10080  
 ccaatgattc tctccctaag cagtatcaag tttaaagcag tgattacatt ctactgccta 10140  
 gattgtaaac tgagtaaagg agaccagcac ctttctgcta ctgaactagc acagccgtgt 10200  
 20 aaaccaacaa ggcaatggca gtgcccaact ttctgtatga atataagtta catctgtttt 10260  
 attatttgtg acttgggtgtt gcatgtggtt attatcaaca ctttctgaaa gaacaactac 10320  
 ctgctcaggc tgccataaca aaataccaca gactgagtga cttaacagaa acttatttct 10380  
 25 cacagttttg gaggctggga agtccaaaat taaggtagct gcaaggtagg tttcaatctc 10440  
 aggctcttc tttggcttga aggtcttcta actgtgtgct cacatgacct cttctaacaa 10500  
 gctctctggt gtctcttttt tttttttttt cttttttgag acagagtctc actctgtcac 10560  
 30 ccaggctgga gtacagtggc acaatctggg ctcaactgcaa cctccaactc ccgggttcaa 10620  
 gtgattctca tgccctaccc tcccagtag ctgggatgac aggagcccgc taccacaccc 10680  
 agctaatttt tgtattttta gtagagatgg tgtttcacta cattggccag gctggtctca 10740  
 35 aactcctgac ctctgatcc acccaccttg gcctcccaaa gtgctgggat tacagggtgtg 10800  
 agccactgcy cccgtcctgg tgtcttttca tataagggca ctaatccaat cagacctggg 10860  
 cccggcgcgc aattaacct cactaaaggg aacaaaagct ggagctccac cgcggtggcg 10920  
 40 gccgctctag aactagtgga tcgggcccga gctctcgca ccgggctgca ggaattcgat 10980  
 cgcgtgctag aattgcctg tcatacagct aataattgac cataagacaa ttagatttaa 11040  
 attagttttg aatctttcta ataccaaagt tcagtttact gttccatggt gcttctgagt 11100  
 45 ggcttcacag acttatgaaa aagtaaacgg aatcagaatt acatcaatgc aaaagcattg 11160  
 ctgtgaactc tgtaactagg actaaacttt gagcaataac acacatagat tgaggattgt 11220  
 ttgctgttag catacaaact ctggttcaaa gctcctcttt attgcttgtc ttggaaaatt 11280  
 50 tgetgttctt catggtttct cttttcactg ctatctattt ttctcaacca ctcacatggc 11340

tacaataact gtctgcaagc ttatgattcc caaatatcta tctctagcct caatcttggt 11400  
 ccagaagata aaaagtagta ttcaaatgca catcaacgtc tccacttgga gggcttaaag 11460  
 5 acgtttcaac atacaaaccg gggagttttg cctggaatgt ttcctaaaat gtgtcctgta 11520  
 gcacataggg tctcttggt ccttaaaatc taattacttt tagcccagtg ctcatccac 11580  
 ctatggggag atgagagtga aaagggagcc tgattaataa ttactactaag tcaataggca 11640  
 10 tagagccagg actgtttggg taaactggtc actttatctt aaactaaata tatccaaaac 11700  
 tgaacatgta cttagttact aagtctttga ctttatctca ttcataccac tcagctttat 11760  
 ccaggccact tatttgacag tctagctagc ccctagattt tctgcccaca agagctctgt 11820  
 15 gtccttgaac ataaaataca aataaccgct atgctgttaa ttattggcaa atgtcccatt 11880  
 ttcaacctaa ggaaatacca taaagtaaca gatataccaa caaaagggtta ctagttaaca 11940  
 ggcattgcct gaaaagagta taaaagaatt tcagcatgat tttccatggc ggatgtgtga 12000  
 20 catacacgac gccaaaagat tttgttccag ctctgcccac ctccgctacg cgagagatta 12060  
 accaccacg atggccgcca aagtgcattg tgatattgag gctgacagcc cattcatcaa 12120  
 gtctttgacg aaggcatttc cgtcgttcga ggtggagtca ttgcaggta caccaaatga 12180  
 25 ccatgcaaat gccagagcat tttcgcacct ggctaccaa ttgatcgagc aggagactga 12240  
 caaagacaca ctcatcttgg atactggcag tgcgccttcc aggagaatga tgtctacgca 12300  
 caaataccac tgcgtatgcc ctatgctcag cgcagaagac cccgaaaggc tcgtatgcta 12360  
 cgcaaagaaa ctggcagcgg cctccgggaa ggtgctggat agagagatcg caggaaaaat 12420  
 30 caccgacctg cagaccgtca tggctacgcc agacgctgaa tctcctacct tttgacctgca 12480  
 tacagacgtc acgtgtcgta cggcagccga agtggccgta taccaggacg tgtatgctgt 12540  
 acatgcacca acatcgctgt accatcaggc gatgaaaggc gtcagaacgg cgtattggat 12600  
 35 tgggtttgac accacccgt ttatgtttga cgcgctagca ggcgctatc caacctacgc 12660  
 cacaaactgg gccgacgagc aggtgttaca ggccaggaac ataggactgt gtgcagcatc 12720  
 cttgactgag ggaagactcg gcaaactgtc cattctccgc aagaagcaat tgaaccttg 12780  
 40 cgacacagtc atgttctcgg taggatctac attgtacact gagagcagaa agctactgag 12840  
 gagctggcac ttaccctcgg tattccacct gaaaggtaaa caatccttta cctgtaggtg 12900  
 cgataccatc gtatcatgtg aagggtagct agttaagaaa atcactatgt gccccggcct 12960  
 45 gtacggtaaa acggtaggt acgccgtgac gtatcacgcy gagggattcc tagtgtgcaa 13020  
 gaccacagac actgtcaaag gagaaagagt ctattccct gtatgcacct acgtcccctc 13080  
 aaccatctgt gatcaaatga ctggcactac agcgaccgac gtcacaccgg aggacgcaca 13140  
 50

gaagttgtta gtgggattga atcagaggat agttgtgaac ggaagaacac agcgaaacac 13200  
 taacacgatg aagaactatc tgcttccgat tgtggccgtc gcatttagca agtgggcgag 13260  
 5 ggaatacaag gcagacctg atgatgaaaa acctctgggt gtccgagaga ggtcacttac 13320  
 ttgctgctgc ttgtgggcat ttaaaacgag gaagatgcac accatgtaca agaaaccaga 13380  
 caccagaca atagtgaagg tgcttcaga gtttaactcg ttcgtcatcc cgagcctatg 13440  
 10 gtctacaggc ctcgcaatcc cagtcagatc acgcattaag atgcttttgg ccaagaagac 13500  
 caagcgagag ttaataacctg ttctcgacgc gtcgtcagcc agggatgctg aacaagagga 13560  
 gaaggagagg ttggaggccg agctgactag agaagcetta ccaccctcg tccccatcgc 13620  
 15 gccggcggag acgggagtcg tcgacgtcga cgttgaagaa ctagagtatc acgcagggtgc 13680  
 aggggtcgtg gaaacacctc gcagcgcggt gaaagtcacc gcacagccga acgacgtact 13740  
 actaggaaat tacgtagttc tgtccccgca gaccgtgctc aagagctcca agttggcccc 13800  
 20 cgtgcaccct ctagcagagc aggtgaaaat aataacacat aacgggaggg ccggcggtta 13860  
 ccaggctgac ggatatgacg gcagggctct actaccatgt ggatcggcca ttccggctcc 13920  
 tgagtttcaa gctttgagcg agagcgccac tatggtgtac aacgaaaggg agttcgtcaa 13980  
 25 caggaaacta taccatattg ccgttcacgg accgtcgtg aacaccgacg aggagaacta 14040  
 cgagaaagtc agagctgaaa gaactgacgc cgagtacgtg ttcgacgtag ataaaaaatg 14100  
 ctgctcaag agagaggaag cgtcggggtt ggtgttgggt ggagagctaa ccaaccccc 14160  
 30 gttccatgaa ttgcctacg aagggtgaa gatcaggccg tcggcaccat ataagactac 14220  
 agtagtagga gtctttgggg ttccgggatc aggcaagtct gctattatta agagcctcgt 14280  
 gaccaaacac gatctggtca ccagcggcaa gaaggagaac tgccaggaaa tagttaacga 14340  
 35 cgtgaagaag caccgcggga aggggacaag tagggaaaac agtgactcca tctgctaaa 14400  
 cgggtgtcgt cgtgcogtg acatcctata tgtggacgag gctttcgtt gccattccgg 14460  
 tactctgctg gccctaattg ctcttgtaa acctcggagc aaagtgggtg tatgaggaga 14520  
 40 ccccaagcaa tgcggattct tcaatatgat gcagcttaag gtgaacttca accacaacat 14580  
 ctgcactgaa gtatgtcata aaagtatata cagacgttgc acgcgtccag tcacggccat 14640  
 cgtgtctacg ttgcactacg gaggcaagat gcgcacgacc aaccctgca acaaaccat 14700  
 45 aatcatagac accacaggac agaccaagcc caagccagga gacatcgtgt taacatgctt 14760  
 ccgaggctgg gcaaagcagc tgcagttgga ctaccgtgga cacgaagtca tgacagcagc 14820  
 agcatctcag ggcctcacc gcaaaggggt atacgccgta aggcagaagg tgaatgaaaa 14880  
 50 tcccttgat gccctcgt cggagcacgt gaatgtacty ctgacgcgca ctgaggatag 14940

gctggtgtgg aaaacgctgg ccggcgatcc ctggattaag gtcctatcaa acattccaca 15000  
 gggtaacttt acggccacat tggagaatg gcaagaagaa cacgacaaaa taatgaaggt 15060  
 5 gattgaagga ccggctgcg cctgtggacgc gttccagaac aaagcgaacg tgtgttgggc 15120  
 gaaaagcctg gtgcctgtcc tggacactgc cggaatcaga ttgacagcag aggagtggag 15180  
 caccataatt acagcattta aggaggacag agcttactct ccagtgggtg ccttgaatga 15240  
 10 aatttgacc aagtactatg gagttgacct ggacagtggc ctgttttctg cccogaaggt 15300  
 gtccctgtat tacgagaaca accactggga taacagacct ggtggaagga tgtatggatt 15360  
 caatgccgca acagctgcca ggctggaagc tagacatacc ttctgaagg ggcagtggca 15420  
 15 tacgggcaag caggcagtta tcgcagaaag aaaaatccaa ccgctttctg tgctggacaa 15480  
 tgtaattcct atcaaccgca ggctgccgca cgccctgggtg gctgagtaca agacggttaa 15540  
 aggcagtagg gttgagtggc tggcaataa agtaagaggg taccacgtcc tgctggtgag 15600  
 20 tgagtacaac ctggctttgc ctcgacgcag ggtcacttgg ttgtcaccgc tgaatgtcac 15660  
 aggcgccgat aggtgctacg acctaagttt aggactgccg gctgacgccg gcaggttcga 15720  
 cttggtcttt gtgaacattc acacggaatt cagaatccac cactaccagc agtgtgtcga 15780  
 25 ccacgccatg aagctgcaga tgcttggggg agatgcgcta cgactgctaa aaccggcggg 15840  
 catcttgatg agagcttacg gatacgccga taaaatcagc gaagcogttg tttcctcctt 15900  
 aagcagaaag ttctcgtctg caagagtgtt gcgcccggat tgtgtcacca gcaatacaga 15960  
 30 agtgttcttg ctgttctcca actttgacaa cggaaagaga ccctctacgc tacaccagat 16020  
 gaataccaag ctgagtgccg tgtatgccgg agaagccatg cacacggccg ggtgtgcacc 16080  
 atcctacaga gttaagagag cagacatagc cacgtgcaca gaagcggctg tggttaacgc 16140  
 35 agctaacgcc cgtggaactg taggggatgg cgtatgcagg gccgtggcga agaaatggcc 16200  
 gtcagccttt aaggagcag caacaccagt gggcacaatt aaaacagtca tgtgcccgtc 16260  
 gtaccccgtc atccacgctg tagcgcctaa tttctctgcc acgactgaag cgggaagggga 16320  
 40 ccgcgaattg gccgctgtct accgggcagt ggccgcccga gtaaacagac tgtcactgag 16380  
 cagcgtagcc atcccgtgc tgtccacagg agtgttcagc ggcggaagag ataggctgca 16440  
 gcaatccctc aaccatctat tcacagcaat ggacgccacg gacgctgacg tgaccatcta 16500  
 45 ctgcagagac aaaagttggg agaagaaaat ccaggaagcc attgacatga ggacggctgt 16560  
 ggagttgctc aatgatgacg tggagctgac cacagacttg gtgagagtgc acccggacag 16620  
 cagcctgggtg ggtcgtaagg gctacagtac cactgacggg tcgctgtact cgtactttga 16680  
 50 aggtacgaaa ttcaaccagg ctgctattga tatggcagag atactgacgt tgtggcccag 16740

actgcaagag gcaaacgaac agatatgcct atacgcgctg ggcgaaacaa tggacaacat 16800  
 cagatccaaa tgtccggtga acgattccga ttcatacaaca cctcccagga cagtgccttg 16860  
 5 cctgtgccgc tacgcaatga cagcagaacg gatcgcccgc cttagggtcac accaagttaa 16920  
 aagcatgggtg gtttgctcat cttttcccct cccgaaatac catgtagatg ggggtgcagaa 16980  
 ggtaaagtgc gagaagggttc tcctgttcga cccgacggta ccttcagtgg ttagtccgcy 17040  
 10 gaagtatgcc gcatctacga cggaccactc agatcgggtc ttacgagggt ttgacttgga 17100  
 ctggaccacc gactcgtctt ccactgccag cgataccatg tcgctacca gtttgcagtc 17160  
 gtgtgacatc gactcgatct acgagccaat ggctcccata gtagtgacgg ctgacgtaca 17220  
 15 ccctgaaccc gcaggcatcg cggacctggc ggcagatgtg caccctgaac ccgcagacca 17280  
 tgtggacctc gagaaccoga ttccctccacc gcgcccgaag agagctgcat accttgccctc 17340  
 ccgcgcggcg gagcgaccgg tgccggcgcc gagaaagccg acgcctgcc caaggactgc 17400  
 20 gtttaggaac aagctgcctt tgacgttcgg cgactttgac gagcacgagg tcgatgcgtt 17460  
 ggccctccggg attactttcg gagacttcga cgacgtcctg cgactaggcc gcgcgggtgc 17520  
 atatattttc tcctcggaca ctggcagcgg acatttaca caaaaatccg ttaggcagca 17580  
 25 caatctccag tgcgcacaac tggatgcggc ccaggaggag aaaatgtacc cgccaaaatt 17640  
 ggatactgag agggagaagc tgttgctgct gaaaatgcag atgcacccat cggaggctaa 17700  
 taagagtcga taccagtctc gcaaagtgga gaacatgaaa gccacgggtg tggacaggct 17760  
 30 cacatcgggg gccagattgt acacgggagc ggacgtaggc cgcataccaa catacgcggt 17820  
 tcggtacccc cgccccgtgt actcccctac cgtgatcgaa agattctcaa gccccgatgt 17880  
 agcaatcgca gcgtgcaacg aatacctatc cagaaattac ccaacagtgg cgtcgtacca 17940  
 35 gataacagat gaatacgacg catacttggc catgggtgac gggtcggata gttgcttggc 18000  
 cagagcgaca ttctgcccgg cgaagctccg gtgctaccgg aaacatcatg cgtaccacca 18060  
 gccgactgta cgcagtgccg tcccgtcacc ctttcagaac aactacaga acgtgctagc 18120  
 40 ggccgccacc aagagaaaact gcaacgtcac gcaaatgcga gaactacca ccatggactc 18180  
 ggcagtgttc aacgtggagt gcttcaagcg ctatgcctgc tccggagaat attgggaaga 18240  
 atatgctaaa caacctatcc ggataaccac tgagaacatc actacctatg tgaccaaatt 18300  
 45 gaaaggcccg aaagctgctg ccttgttcgc taagaccac aacttggttc cgctgcagga 18360  
 ggttcccatg gacagattca cggtcgacat gaaacgagat gtcaaagtca ctccaggac 18420  
 gaaacacaca gaggaaagac ccaaagtcca ggtaattcaa gcagcggagc cattggcgac 18480  
 50 cgcttacctg tgcggcatcc acaggggaatt agtaaggaga ctaaagtctg tgttacgcc 18540

taacgtgcac acattgtttg atatgtcggc cgaagacttt gacgcgatca tcgcctctca 18600  
 cttccacca ggagaccggg ttctagagac ggacattgca tcattcgaca aaagccagga 18660  
 5 cgactccttg gctcttacag gtttaatgat cctcgaagat ctaggggtgg atcagtacct 18720  
 gctggacttg atcgaggcag cctttgggga aatatccagc tgtcacctac caactggcac 18780  
 gcgcttcaag ttcggagcta tgatgaaatc gggcatgttt ctgactttgt ttattaacac 18840  
 10 tgttttgaac atcaccatag caagcagggt actggagcag agactcactg actccgcctg 18900  
 tgcggccttc atcggcgacg acaacatcgt tcacggagtg atctccgaca agctgatggc 18960  
 ggagagggtg gcgtcgtggg tcaacatgga ggtgaagatc attgacgctg tcatgggcga 19020  
 15 aaaaccccca tatttttgtg ggggattcat agtttttgac agcgtcacac agaccgcctg 19080  
 ccgtgtttca gaccactta agcgcctggt caagttgggt aagccgctaa cagctgaaga 19140  
 caagcaggac gaagacaggc gacgagcact gagtgacgag gttagcaagt ggttccggac 19200  
 20 aggcttgggg gccgaactgg aggtggcact aacatctagg tatgaggtag agggctgcaa 19260  
 aagtatcctc atagccatgg ccaccttggc gagggacatt aaggcgttta agaaattgag 19320  
 aggacctgtt atacacctct acggcgggtc tagattgggtg cgtaataca cagaattctg 19380  
 25 attggatctc gaggtcgacg gtatcgataa gcttgggctg caggtcgatc gactctagag 19440  
 gatcgatccc caccatgggt caatcacgct acctcctctt tttggccacc cttgcctcc 19500  
 taaaccacct cagtttggcc aggtcattc cagtctctgg acctgccagg tgtcttagcc 19560  
 30 agtcccgaaa cctgctgaag accacagatg acatggtgaa gacggccaga gaaaaactga 19620  
 aacattattc ctgcactgct gaagacatcg atcatgaaga catcacacgg gaccaaacca 19680  
 gcacattgaa gacctgttta cactggaac tacacaagaa cgagagttgc ctggctacta 19740  
 gagagacttc ttccacaaca agaggagct gctgcccc acagaagacg tctttgatga 19800  
 35 tgacctgtg ccttggtagc atctatgagg acttgaagat gtaccagaca gagttccagg 19860  
 ccatcaacgc agcacttcag aatcacaacc atcagcagat cattctagac aagggcatgc 19920  
 40 tgggtggccat cgatgagctg atgcagtctc tgaatcataa tggcgagact ctgcgccaga 19980  
 aacctcctgt gggagaagca gacccttaca gagtgaaaat gaagctctgc atcctgcttc 20040  
 acgccttcag caccgcgctc gtgaccatca acagggtgat gggctatctg agctccgcct 20100  
 gagaattccg cccctctccc tcccccccc ctaacgttac tggccgaagc cgcttggaat 20160  
 45 aaggccggtg tgcgtttgtc tatatgttat tttccaccat attgccgtct tttggcaatg 20220  
 tgagggcccg gaaacctggc cctgtcttct tgacgagcat tcctaggggt ctttcccctc 20280  
 50 tcgccaagg aatgcaaggc ctggtgaaatg tcgtgaagga agcagttcct ctggaagctt 20340

cttgaagaca aacaacgtct gtagcgacce tttgcaggca gcggaacccc ccacctggcg 20400  
 acaggtgcoct ctgcggccaa aagccacgtg tataagatac acctgcaaag gcggcacaac 20460  
 5 cccagtgcc a cgttgtgagt tggatagttg tggaaagagt caaatggctc tcctcaagcg 20520  
 tattcaacaa ggggctgaag gatgccaga aggtacccca ttgtatggga tctgatctgg 20580  
 ggcctcggtg cacatgcttt acatgtgttt agtcgaggtt aaaaaacgtc taggcccccc 20640  
 10 gaaccacggg gacgtggttt tcctttgaaa aacacgatga taatatggcc acaaccatgg 20700  
 gtcctcagaa gctaaccatc tcctggtttg ccatcgtttt gctgggtgtct ccactcatgg 20760  
 ccatgtggga gctggagaaa gacgtttatg ttgtagaggt ggactggact cccgatgccc 20820  
 15 ctggagaaa ac agtgaacctc acctgtgaca cgcctgaaga agatgacatc acctggacct 20880  
 cagaccagag acatggagtc ataggctctg gaaagacctt gaccatcact gtcaaagagt 20940  
 ttctagatgc tggccagtac acctgccaca aaggaggcga gactctgagc cactcacatc 21000  
 20 tgctgctcca caagaaggaa aatggaattt ggtccactga aattttaaaa aattttcaaaa 21060  
 acaagacttt cctgaagtgt gaagcaccaa attactccgg acggttcacg tgctcatggc 21120  
 tgggtgcaaag aaacatggac ttgaagttca acatcaagag cagtagcagt tcccctgact 21180  
 25 ctcgggcagt gacatgtgga atggcgtctc tgtctgcaga gaaggtcaca ctggaccaaa 21240  
 gggactatga gaagtattca gtgtcctgcc aggaggatgt cacctgccca actgccgagg 21300  
 agaccctgcc cattgaactg gcgttggaag cacggcagca gaataaatat gagaactaca 21360  
 30 gcaccagctt cttcatcagg gacatcatca aaccagacct gcccaagaac ttgcagatga 21420  
 agcctttgaa gaactcacag gtggagggtca gctgggagta ccctgactcc tggagcactc 21480  
 cccattccta cttctccctc aagttctttg ttcgaatcca gcgcaagaaa gaaaagatga 21540  
 35 aggagacaga ggaggggtgt aaccagaaa agtgcgttcct cgtagagaag acatctaccg 21600  
 aagtccaatg caaaggcggg aatgtctgcg tgcaagctca ggatcgctat tacaattcct 21660  
 catgcagcaa gtgggcatgt gttccctgca gggtcgatc ctagaattca ttgatccact 21720  
 40 aggatcccgg gtaattaatt gaattacatc cctacgcaaa cgttttacgg ccgccgggtgg 21780  
 cgcccgcgcc cggcgccccg tccttgcccg ttgcaggcca ctccgggtggc tcccgtcgtc 21840  
 cccgacttcc aggcccagca gatgcagcaa ctcatcagcg ccgtaaatgc gctgacaatg 21900  
 45 agacagaacg caattgctcc tgctaggcct cccaaaccaa agaagaagaa gacaaccaaa 21960  
 ccaaagccga aaacgcagcc caagaagatc aacggaaaaa cgcagcagca aaagaagaaa 22020  
 gacaagcaag ccgacaagaa gaagaagaaa cccggaaaaa gagaaagaat gtgcatgaag 22080  
 50 attgaaaatg actgtatctt cgtatgcggc tagccacagt aacgtagtgt ttccagacat 22140

gtcgggcacc gcactatcat ggggtgcagaa aatctcgggt ggtctggggg ccttcgcaat 22200  
 cggcgctatc ctgggtgctgg ttgtgggtcac ttgcattggg ctccgcagat aagttagggg 22260  
 5 aggcaatggc attgatatag caagaaaatt gaaaacagaa aaagttaggg taagcaatgg 22320  
 catataacca taactgtata acttgtaaca aagcgcaaca agacctgcgc aattggcccc 22380  
 gtggtccgcc tcacggaaac tcggggcaac tcatattgac acattaattg gcaataattg 22440  
 10 gaagcttaca taagcttaat tcgacgaata attggatttt tattttattt tgcaattggg 22500  
 ttttaatat tccaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 22560  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaactagatc ctogaatcaa gcttatcgat accgtcgact 22620  
 15 agagtcgggg cggccggccg cttcgagcag acatgataag atacattgat gagtttgac 22680  
 aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaaaa gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg 22740  
 ctttatttgt aaccattata agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt 22800  
 20 ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca 22860  
 aatgtggtaa aatcgataag gatctcgacc tcgagggggg gcccggtacc caattcgccc 22920  
 tatagtgagt cgtattacgc gcgcccctgc agggggccct gtaccgggct ctgcctgagg 22980  
 25 ctctggctgc ccagcaggct gaagctgggg ttgttgcca ggggcacttg tgttcccatc 23040  
 gcagcgggca cttgtgcctc ccaatcagat ggcctctgaa ggcaggcctg gccagaaggt 23100  
 gagtgctgct gaacgctatt atccacttgg ctgaggggtg ttttccccga aactgctgtg 23160  
 30 gtcacagctg ctgccgctgt gacctatgca gcattgttga acgcagtggg cattcttggc 23220  
 aactagggc gtctgagctg gtggggactc aaggactggg tgcccagggg gctgggacag 23280  
 aaccagggca ggggcacttc tgggtgggtg gccttggggc tctgcatatg ctggcagaca 23340  
 35 gagtcaagtc tgcccagggg agtctggcct gagtgtgaga ggatgggaca ctgggggctg 23400  
 gaggtgaaaa ttccctgccg ctccccaga gttggtgaga tcaactccat gccctcgag 23460  
 ctctggtgcc tggtgagtgg gatcattcct ggactcagat tgttctgaag aagcccagtt 23520  
 40 ctgggtggca tcaagtgctt gotagatggg gggcttgcct tgatccggct aacttggag 23580  
 gtgacttgtt cttggacggc tacatacaga aagagagaag tggggatgag ttccaaggc 23640  
 atcctcgact tcggctgtgg ccaccggagg gtagctcctg gcccaacacg gacttctcac 23700  
 45 ctcccgcctc ttgctctcta ctgagctccc cctgctccc caattcctcg ccattcccct 23760  
 catttctctg cctcagcct ggactgcagt tcttctggga agctgcccc aactcctagg 23820  
 tctgtgctca ccaagagcag atcacactgg actgaaatgc cagctgattt gtctcttcaa 23880  
 50 gaaaattgga agctcctgga ggtcagggtc catgtctgct tttacactca gtgctctgta 23940



tgcaggcctg gcaactgceca ccctttgaca ggtggtgcat attttgtaga aggaaggaag 24000  
 gggccagggtg ggggtgggctg ggctgggtggc gggagctagc tcagcctctt agattctcta 24060  
 5 cccgatggat gtgacctggg acagcaagtg agtgtggtga gtgagtgcag acggtgcttt 24120  
 gttccccctct tgtctcatag cctagatggc ctctgagccc agatctgggg ctgagacaac 24180  
 atttgttcaa ctgaacggta atgggtttcc tttctgaagg ctgaaatctg ggagctgaca 24240  
 10 ttctggactc cctgagttct gaagagcctg gggatggaga gacacggagc agaagatgga 24300  
 aggtagagtc ccagggtgctt aagatgggga atacatctcc cctcattgtc atgagagtcc 24360  
 actctagctg atatctactg tggccaatat ctaccggtagc ttttttgggg tggacactga 24420  
 15 gtcattgcagc agtcttatgg tttacccaag gtcaggtagg ggagacagtg cagtcagagc 24480  
 acaagcccag tgtgtctgac ccaccaaga atccatgctc gtatctacaa aatgatttt 24540  
 ttctcttgta atgggtgcta ggttctttta ttatcatggc atgtgtatgt ttttcaacta 24600  
 20 gggttacaatc tggccttata aggttaacct cctggaggcc accagccttc ctgaaacttg 24660  
 tctgtgctgt ccctgcaact ggagtgtgcc tgatgtggca ctccagcctg gacaagtggg 24720  
 acacagactc cgctgttatac aggcccaaag atgtcttcca taagaccaga agagcaatgg 24780  
 25 tgtagaggtg tcatgggcta caataaagat gctgacctcc tgtctgaggg caagcagcct 24840  
 cttctggccc tcagacaaat gctgagtgtt cccaagacta ccctcggcct ggtccaatct 24900  
 catcccactg gtgcgtaagg gttgctgaac tcatgacttc ttggctagcc tgcaacctcc 24960  
 30 acggagtggg aactacatca ggcattttgc taactgctgt atcctaggcc aataaatggt 25020  
 gatcacattt atagctgcca tggtaggggtg gggaccctg ctatctatct gtggaggctc 25080  
 tgggagcccc tgacacaaac tttctgaagc agagcctccc caacccttt tccattccct 25140  
 35 atacctgaca gatggcccag gaaccatta gaaatggaag gtcactgcag cagtatgtga 25200  
 atgtgctgtg gggagaaggg caggatcaga gccctggggg tgtggcagcc cccaagtgat 25260  
 tctaatecag atcctagggg tgtttccctg tcccattgaa atagctgctt taaggggcct 25320  
 40 gactcagggg aatcagtctc ttgaattaag tggtgatttt ggagtcattt agaccaggcc 25380  
 ttcaattggg atcctgctct tagagttgga tgaattatth aactgatttt cagatctctc 25440  
 ctttctcaat gctttcagaa gcacagtaac tgcttactct gaaatgaatt ctccccccac 25500  
 45 ttccacatat gcacccttg cccaccctt tgggaacact ggccttaact gcttaccttc 25560  
 aatggactc atctgttggg agatatatgc attctgccgt tcaggggtca ttgccataag 25620  
 acctgatctc tgttctctt gctaaacaga agatgaaaa gacaaatag attacagcta 25680  
 50 ccaattaata attagcctta ggatcgctgc gtggggacct aggacttggc tttggtgcag 25740

cagaaagcat gaataaacac accagcatac actcgcgatgc atgccccacc ctctcgagca 25800  
 aaattccaca ggtataaata aagtaagatt ctgcacctgg gttaaaaaca caactgcaac 25860  
 5 agcatagaat ggggcaggag agacagaact taatagcaag agcacacaga aaaaagtttt 25920  
 aggcattttg gatgtccatc tgctcaggat gggtcagcag tgagatgcyg tcacccaaaag 25980  
 aacaaatgta acattaggct gcattaatag aagcagagta tgtagaagga gggagggtgac 26040  
 10 agtcctatgc taactctgcc ttggccagac tatacccaca ggagtctggg catgccagtc 26100  
 tcagggagac ccagacagac tggctgcatt cagaggatgg taagtaatga gagtggggat 26160  
 tggacttcaa actaccacaga caaagaatgg ctgagcaagc caaggatgct gtggctgggg 26220  
 15 cagagcagac tgtgggctat gtagtgggtg atacctagcc tctgcagggc tgtcataggg 26280  
 aaaggacatt gagaagagga ctgaggcttg ttcttggtgg tcttgccatg aacggccaga 26340  
 tgatcacatg gtcaggtgga cacagtctcc aacactggga gtagccaaac acttactgcc 26400  
 20 aacctcccgc ccttctcctg actagttgca gcataggcaa ttgggaggag cttctctgtc 26460  
 ccatctgaaa gctggctggg tgggcagggg gaggagcgag ccaagtttca aggccgcagt 26520  
 ttcagcactc agtctgggat cggctcaagg agcaaagggg aagaacatag ccaggagggg 26580  
 25 ataacatgaa ggccccacaga cccagaaaag gcatgacttg ctctgagacc ctcagccggt 26640  
 tgggtgacag ttgtgactcg gatccaggtc tgactcccag tccagtgctt gaagcctcac 26700  
 cccacacagt gaggggagcc cggccatctc tgctcaactg ctgccatctc tctccccttc 26760  
 30 tcaaccacca aggcagctct gtctgggagc acaagctcca agtccacttt ctggctctgtg 26820  
 tcccccccaa gatgccagag gaacttgctc tacaacacgg gctgcccgtg cagtgcctgc 26880  
 ttttccagca aagggttctt gggaaacctt ctctgcactc agtggggctg gtgggagtgg 26940  
 35 ggcgggtag cgaccagtg cttgggactg tgcccagctc tcaggcctgg cagcagttcc 27000  
 tggccttggg tcttgccaag gcagagagga caaacacatg gcaccgggaa gactacacca 27060  
 gaagcgattc caccagactg gggtttgcct ttctatcccg ccottagcct gcttctctgc 27120  
 40 ctggtccctg cctccccctc cactggagct gccgtgtggg cagtgagggg ctgtttctca 27180  
 gctgccctat ggagctgccc tctccctgcc aaagcattgg caaggcggca aggggtgggg 27240  
 gtggggatgg ggggtgggat ctgccttctc aagctctcat tatactgagc acgtctcacc 27300  
 45 cattatttta tgatcatctag caacacccca tgtggacact gaggagcatg ggggtccat 27360  
 gaccactgcc caaggccaca ccatccggat ctgcctgaga tggtcagggg tggcagccat 27420  
 ttctgaaggc agtcccttcg ctttggtctc tcttgtaaca gtctcaggac atcagggcag 27480  
 50 aagatctaca gtccccagct tactgatgtg acagcagagg ctcagagagg ttaaatgact 27540

tgcccaaggt gacacggcta agaagtacag tatctcctaa ctgcagacca ggtgcttctg 27600  
 ctgcttctgg ggacagattc ctgctgggct ggctaggtct aaacggtcct taactccatc 27660  
 5 cccaccgggt gctgcattag tttcatcaaa taacacagtt gtacagaggt aggggttcag 27720  
 gggcaggggc agatggaggc tggagagtgt gactaaggaa acagcagggg aagtgcggta 27780  
 aagtccgaag ggagggacgg aaagagaaaag ccaagcccag gggcgtgcca gacaaaagga 27840  
 10 aaggccacgc cggggcaggg caggcttcag cgggtgctgg ggcgtcttca tcccgggaag 27900  
 cacacattcc agaggacccc ggagtctaag ggaaaagctg gccagcctat cactatggaa 27960  
 actgccaaagg ccacacagcg ctgctgacac ccagcctggg tgccgggtggc cagctctgca 28020  
 15 ggatcttcaa gtctgggggtg ccaccagcaa gcgacggctc tccatgggct cttcacctta 28080  
 cggcagtgtc cagaggcacc gccagtcctc tgctcctatg ctggtcctgc tgtccctggc 28140  
 aaaaggagcc agagcattct ctccaggcct cccgaggagg ctgcttcctt tgttttgtag 28200  
 20 atggaggctc ccatcctttg ttctgaatca atgtgctcca aagataagcc ccaagaaaac 28260  
 agttgttgcc ttttgacact gacaattaga atcgttgaa aatggagaaa acaggaaatg 28320  
 gcaaattggtt tcagtgacca ggaggaaacc gtgctgaaa gttgctgctt agtgactggg 28380  
 25 aactcgcctt tctgctctct tatgaaggac agcctaggcc gtgtggcctt ttataaacia 28440  
 agctatgaag gggtcgtcaa attttctagg gctgcaactg tggcactacg tcctgttggtg 28500  
 ccaggtgaca ctgacaagca gcaactgagtt ctatgcaagc ccagggtgtc ttctctcatg 28560  
 30 gtgaccccca gagaactaag gccagctctt tcctctgtca caccctccc agccccact 28620  
 gtcagacaag ggaccacatt cacagacagt ctgagccaag atggcaacct tggaaatcct 28680  
 ggggatgctt ttctagaagc tcgctcccct aggggcccggc ctttaataaa tcaagcttat 28740  
 35 cgataccgtc gagacctcga gggggggcat cactccgccc taaaacctac gtcaccgccc 28800  
 ccgttcccac gccccgccc acgtcaciaa ctccacccc tcattatcat attggcttca 28860  
 atccaaaata aggtatatta ttgatgatgt tt 28892

40 <210> 9  
 <211> 29511  
 <212> ДНК  
 <213> Химерная

45 <220>  
 <221> 5' ITR  
 <222> (1) .. (438)  
 <223> Последовательность первого инвертированного концевго повтора и сигнальная  
 последовательность для упаковки

50

<220>  
 <221> «лишняя»  
 <222> (439) .. (10905)  
 <223> Первая некодирующая «лишняя» последовательность

5

<220>  
 <221> AFP (p+e)  
 <222> (10906) .. (11845)  
 <223> Промотор альфа-фетопротейна (AFP). Включает проморную область (p) и энхансерную область (e)

10

<220>  
 <221> SFV  
 <222> (12175) .. (19281)  
 <223> Участок последовательности репликона SFV

15

<220>  
 <221> LacZ  
 <222> (19325) .. (22397)  
 <223> Последовательность гена LacZ E. coli (экзогенный ген в виде гена-репортера)

20

<220>  
 <221> Поли-А  
 <222> (23295) .. (23554)  
 <223> Последовательность полиаденилирования, полученная из SV40

25

<220>  
 <221> Relleno  
 <222> (23555) .. (29350)  
 <223> Вторая некодирующая «лишняя» последовательность

30

<220>  
 <221> 3' ITR  
 <222> (29351) .. (29511)  
 <223> Последовательность второго инвертированного концевого повтора

<400> 9  
 aaacatcatc aataatatac cttattttgg attgaagcca atatgataat gaggggggtgg 60  
 agttttgtgac gtggcgcggg gcgtgggaac gggcggggtg acgtagtagt gtggcggaag 120  
 35 tgtgatgttg caagtgtggc ggaacacatg taagcgacgg atgtggcaaa agtgacgttt 180  
 ttggtgtgcg ccggtgtaca caggaagtga caattttcgc gcggttttag gcggatgttg 240  
 tagtaaattt gggcgtaacc gagtaagatt tggccatttt cgcgggaaaa ctgaataaga 300  
 40 ggaagtgaaa tctgaataat tttgtgttac tcatagcgcg taatatttgt ctagggccgc 360  
 ggggactttg accgtttacg tggagactcg cccagggtgtt tttctcaggt gttttccgcg 420  
 ttccgggtca aagttggcgt tttgatatca agcttatcga taccgtcaaa caagtcttta 480  
 45 attcaagcaa gactttaaca agttaaaggg agcttatggg taggaagtag tgttatgatg 540  
 tatgggcata aagggtttta atgggatagt gaaaatgtct ataataatac ttaaattggct 600  
 gcccaatcac ctacaggatt gatgtaaaca tggaaaaggt caaaaacttg ggtcactaaa 660  
 50

	atagatgatt	aatggagagg	atgaggttga	tagttaaatg	tagataagtg	gtcttattct	720
	caataaaaat	gtgaacataa	ggcgagtttc	tacaaagatg	gacaggactc	attcatgaaa	780
5	cagcaaaaac	tggacatttg	ttctaattct	tgaagagtat	gaaaaattcc	tattttaaag	840
	gtaaaacagt	aactcacagg	aaataccaac	ccaacataaa	atcagaaaca	atagtctaaa	900
	gtaataaaaa	tcaaacgttt	gcacgatcaa	attatgaatg	aaattcacta	ctaaaattca	960
10	cactgatfff	gtttcatcca	cagtgatcaat	gttgtgatgc	atttcaattg	tgtgacacag	1020
	gcagactgtg	gatcaaaaagt	ggtttctggt	gcgacttact	ctcttgagta	tacctgcagt	1080
	ccccfctct	aagtgtgtta	aaaaaaaaagg	gggatttctt	caattcgcca	atactctagc	1140
15	tctccatgtg	ctttctagga	aacaagtgtt	aaccacctt	atttgtcaaa	cctagctcca	1200
	aaggactfff	gactccccac	aaaccgatgt	agctcaagag	agggtatctg	tcaccagtat	1260
	gtatagtгаа	aaaagtatcc	caagtcccaa	cagcaattcc	taaaaggagt	ttatttaaaa	1320
20	aaccacacac	acctgtaaaa	taagtatata	tctccaagg	tgactagfff	taaaaaaca	1380
	gtattggctt	tgatgtaaag	tactagtгаа	tatgttagaa	aatctcact	gtaaccaagt	1440
	gaaatгааag	caagtatggt	ttgcagagat	tcaaagaaaa	tataagaaaa	cctactgttg	1500
25	ccactaaaaa	gaatcatata	ttaaatatac	tcacacaata	gctcttcagt	ctgataaaat	1560
	ctacagtcат	aggaatggat	ctatcactat	ttctattcag	tgctttgatg	taatccagca	1620
	ggtcagcaaa	gaatttatag	cccccttga	gcacacagag	ggctacaatg	tgatggcctc	1680
30	ccatctcctt	catcacatct	cgagcaagac	gttcagtcct	acagaaataa	aatcaggaat	1740
	ttaatagaaa	gtttcataca	ttaaacttta	taacaaacac	ctcttagtca	ttaaacttcc	1800
	acaccaacct	gggcaatata	gtgagacccc	atgcctgcaa	aaaaaaaaaa	attagccagg	1860
35	catggtagca	tgtacctgta	gtcccagcta	cttgagaggt	gaggtgggaa	aatcacttta	1920
	gtgcaggatg	ttgaggctgg	agtgaactgt	gattgtgcca	ctgcactcca	gcctggacaa	1980
	tagagcaaga	ccttgtctca	aaaaaatgca	ttaaaaattt	tttttaaate	ttccacgtat	2040
40	cacatccttt	gccctcatgt	ttcataaggt	aaaaaatftg	ataccttcaa	aaaaaccaag	2100
	cataccacta	tcataatfff	ttttaaatgc	aaataaaaac	aagataccat	tttcacctat	2160
	cagactggca	ggttctgatt	aatgaaatt	ttctggataa	tatacaatat	taagagagac	2220
45	tgtagaaaact	gggccagtgг	ctcatgcctg	taatcccagc	actttgggag	gctgggtaac	2280
	atggcgaaacc	ctgtttctac	aaaataaaaa	tattagctgg	gagtgggtggc	gcacacctat	2340
	agtcccagct	actcaggagg	ctgaggtgga	aggatcgctt	gaaccagga	ggttgagact	2400
50	gcagtgaact	gtgatcattc	tgctgcactg	caccccagcc	tgggcaacag	agaccttgtc	2460

	tcaaaaaaaaa	aaaaaaaaaga	gacaaattgt	gaagagaaag	gtactctcat	ataacatcag	2520
	gagtataaaa	tgattcaact	tcttagagga	aaatttggca	ataccaaaat	attcaataaa	2580
5	ctctttcccc	ttgaccaga	aattccactt	gaataaagct	gaacaagtac	caaacatgta	2640
	aaagaatggt	tcttctagta	cagtcggtaa	gaacaaaata	gtgtctatca	atagtggact	2700
	ggttaaatca	gttatggat	ctccataaga	cagaatgcta	tgcaaccttt	aaaatatatt	2760
10	agatagctct	agacacacta	atattaaaag	tgtccaataa	catttaaaac	tataactcata	2820
	cgttaaaata	taaagtata	tatgtacttt	tgcatatagt	atacatgcat	aggccagtgc	2880
	ttgagaagaa	atgtgtacag	aaggctgaaa	ggagagaact	ttagtcttct	tgtttatggc	2940
15	ctccatagtt	agaatatttt	ataacacaaa	tattttgata	ttataatttt	aaaataaaaa	3000
	cacagaatag	ccagacatac	aatgcaagca	ttcaatacca	ggtaagggtt	ttcactgtaa	3060
	ttgacttaac	agaaaatttt	caagctagat	gtgcataata	ataaaaatct	gaccttgctt	3120
20	tcatgtgatt	cagccccagt	ccattaccct	gtttaggact	gagaaatgca	agactctggc	3180
	tagagttcct	tcttccatct	cccttcaatg	tttactttgt	tctggtcctt	acagagtccc	3240
	actataccac	aactgatact	aagtaattag	taaggccctc	ctcttttatt	tttaataaag	3300
25	aagattttag	aaagcatcag	ttatttaata	agttggccta	gtttatgttc	aaatagcaag	3360
	tactcagaac	agctgctgat	gtttgaaatt	aacacaagaa	aaagtaaaaa	acctcatttt	3420
	aagatcttac	ttacctgtcc	ataattagtc	catgaggaat	aaacaccctt	tccaaatcct	3480
30	cagcataatg	attaggtatg	caaaataaat	caaggtcata	acctggttca	tcatcactaa	3540
	tctgaaaaag	aaatatagct	gtttcaatga	gagcattaca	ggatacaaac	atttgattgg	3600
	attaagatgt	taaaaaataa	ccttagtcta	tcagagaaat	ttaggtgtaa	gatgatatta	3660
35	gtaactgtta	actttgtagg	tatgataatg	aattatgtaa	gaaaacaaca	ggccgggagg	3720
	gttggttcac	acgtgtaatc	ccagcacttt	gggaggctga	ggcaggcaga	ctgcctgagc	3780
	tcaggagttc	gagaccagcc	tgggcaacac	ggtgaaatcc	cgtctctact	aaaaatacaa	3840
40	aaaaattagc	cgggtgtggt	gacacatgcc	tgtagtccca	gctacttggg	aggctgaggc	3900
	aggagaatca	cttgaacctg	ggaggtgaag	gttgcaatga	gccaagatgg	caccacttca	3960
	ctccagcctg	ggaacagag	caagactctg	tctctgagct	gagatggcac	cacttcactc	4020
45	cagcctggga	aacagagcaa	gactctgtct	caaaaaaac	aaaacacaca	aacaaaaaaa	4080
	caggctgggc	gcggtggctc	acgcctgtaa	tcccagcact	ttgggaggcc	gaggcgggtg	4140
	gatcacctga	ggtcaggagt	tccagaccag	ccttgtcaac	atggtgaaac	ctccccccgc	4200
50	cgtctctact	aaaaatacaa	aaattagcca	ggcgtgggtg	caggagcctg	taatcccagc	4260

tacttgggag gctgaggcag gagaatcgct tgtacccaga aggcagaggt tgcactgagc 4320  
 tgagatggca ccattgcact ccagcctggg ggacaagagc gagatttcgt ctttaaaaaa 4380  
 5 caaaaaaaa acaaaaaacc atgtaactat atgtcttagt catcttagtc aagaatgtag 4440  
 aagtaaagtg ataagatatg gaatttcctt taggtcacia agagaaaaag aaaaatttta 4500  
 aagagctaag acaaacgcag caaaatcttt atatttaata atattctaaa catgggtgat 4560  
 10 gaacatacgg gtattcatta tactattctc tccacttttg agtatgtttg aaaatttagt 4620  
 aaaacaagtt ttaacacact gtagtctaac aagataaaat atcacactga acaggaaaaa 4680  
 ctggcatggt gtggtggctc acacttgtaa tcccagtgct ttgggaggct gagacaggag 4740  
 15 agttgcttga ggccaggagt tcaagaccga catggggaat gtagcaagac cccgtcccta 4800  
 caaaaaactt tgtaaaaatt tgccaggat ggtggtgcat acctgtagtc ccagctactc 4860  
 gggaggcgga ggcagaagga atcacttgag cccaggagtt tgaggctgca gtgagctacg 4920  
 20 atcataccac agcactccag cgtggacaac agagtaagac cctatctcaa aaacaaaaca 4980  
 aaacaaaaca aacaaaaaaaa accacaagaa aaactgctgg ctgatgcagc ggctcatgcc 5040  
 tgtaatccca gtattttggg aggccagggt gggcgtatca cctgagggtca ggagttagag 5100  
 25 accagcctgg ccaacatggt gaaaccccat ctctactaaa aatacaaaat tagccaggca 5160  
 tgtggcacgc gcctgtagtc ccagttactg ggaggctgaa gcaggaggat cacctgagcc 5220  
 cgggaggtgg aggttgcaat gagccgagat cacaccactg cactccagcc tgggtgacac 5280  
 30 agcaataccc tacctcaaaa taaaaaagaa aaagaaaaga aaagttgctg tccccgtac 5340  
 cccaatccca aatccaaaca gcctctctca tctcacagta agggggaaaa atcacccaaa 5400  
 aaagctaagt gatcttttga aaacccaaac tcttagaagt ctaagattat tatagtcaac 5460  
 35 tcatgaagtg tcatcataaa agatactcta atattattta agtagaacca catattggtt 5520  
 gtcttgggtat gtctagcccc tggcatacaa aatatttaat aacactgata tggtagctgt 5580  
 gatgtgaaaa tgtactatga gtacagcttt ataaatacta tatatgtacc tatatacaga 5640  
 40 aaaaaataca acaaaatcat aaaagcactt atctttgaaa gaggagttac agcaatttta 5700  
 tttagttctt tattgctttg ctatatatct taaatTTTTT tcaatgaata tatatcactt 5760  
 ttaaaaaaat tcaatggtct ttcttataaa ttatctttgg cagcatgcgt ttttatatat 5820  
 45 acatataaaa tgtatgggaa atttttaaaag gatacattaa attaaagcaa aatatacaaa 5880  
 caaaaaatca gaatacaaaa agataaaaag attggaagg gagggaggga gtaaggagga 5940  
 aggggtgggtg ggtatagaga aatataccaa ataatggtaa gaagtggggt cttgacactt 6000  
 50 tctacacttt ttttaataaa aaaaaatttt tttctctctc tttttttttt ttagagacga 6060

agtctcgcta tgttgcccag gctggtcttg aactcctggg atcaagagat cctcctgcct 6120  
 cagcctccca aggtgcttgg attacaggtg tgagccacca cgcctgggtca ctttctacac 6180  
 5 tttaatatat atattttttc attttcaatg tcattttttat tagttaattt ataataccca 6240  
 ttcaccatta tattcaaagt ctatttgaag aaataaacca gaaagaatga aatactctag 6300  
 ctcacatgct attcaatact aaattacctt tcaaatcaca ttcaagaagc tgatgattta 6360  
 10 agctttggcg gtttccaata aatattgggtc aaaccataat taaatctcaa tatatcagtt 6420  
 agtaoctatt gagcatctcc ttttacaacc taagcattgt attaggtgct taaatacaag 6480  
 cagcttgact ttttaatacat ttaaaaatac atattttaaga cttaaaatct tatttatgga 6540  
 15 attcagttat attttgaggt ttccagtgct gagaaatttg aggtttgtgc tgtctttcag 6600  
 tccccaaagc tcagttctga gttctcagac tttgggtgaa cttcatgtat tgtcaggttg 6660  
 gcccgtaata cctgtgggac aacttcagcc cctgtgcaca tggccaggag gctggttgca 6720  
 aacatthttca ggtaggtgga ccaggacatg ccctgggtca tggccagggtg gaggcatagt 6780  
 20 gctatacagc aggcagaagt caatattgat ttgtttttaa agaacatgt actactttca 6840  
 taagcagaaa aaatttctat tcttggggga aaagattatg ccagatcctc taggattaaa 6900  
 25 tgctgatgca tctgctaaac cttcacatat cagaacatat ttactataga aagaatgaaa 6960  
 atgggacatt tgtgtgtcac ctatgtgaac attccaaaaa tattttacaa caactaagta 7020  
 ttttataaat tttatgaact gaaatthagt tcaagttcta ggaaaataca aaccttgcta 7080  
 gatattataa aatgatata atatatattc atttcaggct catcagaata tatctgttat 7140  
 30 cacttgacaa gaatgaaaat gcaccattht gtagtgcttht aaaatcagga agatccagag 7200  
 tactaaaaat gacttcttcc ttgaagctta ctcaccaact tctctccagt tactcactgc 7260  
 ttctgccaca agcataaact aggaccagc cagaactccc ttgaaatata cacttgcaac 7320  
 35 gattactgca tctatcaaaa tggttcagtg cctggctaca ggttctgcag atcgactaag 7380  
 aatttgaaaa gtcttgthta tttcaaagga agcccatgtg aattctgcc agagthcatc 7440  
 ccagatatgc agtctaagaa tacagacaga tcagcagaga tgtattctaa aacaggaatt 7500  
 40 ctggcaatat aacaaattga tttccaatca aaacagattt acataccata cttatgtcaa 7560  
 gaagttgtht tgtthtattg catcctagat thtattthtt tgatttatgg thtactthta 7620  
 gcataaaaaa thtgtcaata caactcttcc caaaaggcat aaacaaaaat tcataaaact 7680  
 45 tgcatcactt gagatacttc aggtatgaat tcacaactth gttacaactt actatatata 7740  
 tgcacacata tatatatatt tgggtatatt ggggggtht taatttaaga aatgcataat 7800  
 50 tggctataga cagacagtht tcagaacttg gcaatgggta cgtgcagtht cattatacca 7860



agtctacttg tagttgttca aaatgtatca taatacaagg cggggcgagg tcgtcacgcc 7920  
 tgtaatccca gcattttggg aggctaaggc aggaggattg cttgagggtca ggagtttgtg 7980  
 5 accagcctgg gcaacagagc aagaccctgt ctccaaaaag aaaaaaata attttttaca 8040  
 aaataaaaaac aaaatgtatc atcagacgaa attaaataag aggcaattca tttaaatgac 8100  
 aacttttccc agcttgacat ttaacaaaaa gtctaagtcc tcttaattca tatttaatga 8160  
 10 tcaaatatca aataactaatt tttttttttt tttttttttt gagacggagt ctcgctctgt 8220  
 cgcccaggct ggagtgacgt ggcgcgatcc tggctcactg caagctccgc ctcccgggtt 8280  
 cacgccatlc tectgectca gcctcccagag tagctgggat tacagacatg cgcaccacg 8340  
 15 cccggctaata tttgtatfff tagtagagat ggggtttctc catgttggtc aggctggctc 8400  
 tgaatfffcc acctcaggtg atctgcctgc ctcagcctca caaagcagta gctgggacta 8460  
 caggcaccca ccaccacact tggttaattc ttttgtatff tttttgtaaa gacgggattt 8520  
 20 caccatgtta gccaggatgg tctcgatctc ctgatctcat gatccgcccg cctcagcctc 8580  
 ccaaagtgct gggattacag gcgtgagcca ccccgcccgg ccatcaaata ctaattctta 8640  
 aatggtaagg acccactatt cagaacctgt atccttatca ctaatatgca aatatttatt 8700  
 25 gaatacttac tatgtcatgc atactagaga gagttagata aatttgatac agctaccctc 8760  
 acagaactta cagtgtaata gatggcatga catgtacatg agtaactgtg aacagtgtta 8820  
 aattgctatt taaaaaaaaa gacggctggg cgctgtggct catgcctgta atcccagcac 8880  
 30 tttgggaggg caaggcaagt tgatcgctcg aggtcaagag ttcgagacca gcctggccaa 8940  
 cgtggtaaaa ccccgctctc actaaaaata caaaaaaaaa attagccagg catggtggca 9000  
 caggcctgta atcccagcta ctagggaggg tgagacatgg agaactgctt gaatccagga 9060  
 35 ggcagagggt acagtgagcc gagatcatac cactacactc cagcctgagt gacagagcga 9120  
 gactcctgtc taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagatacagg ttaagtgtta tggtagttga 9180  
 agagagaact caaactctgt ctcagaagcc tcacttgcat gtggaccact gatatgaaat 9240  
 40 aatataaata ggtataattc aataaatagg aacttcagtt ttaatcatcc caaacaccaa 9300  
 aacttcctat caaacaggtc caataaactc aatctctata agagctagac agaaatctac 9360  
 ttggtggcct ataatcttat tagcccttac ttgtcccacg tgatattaat taaccccatc 9420  
 45 taatatggat tagttaacaa tccagtggtc gctttgacag gaacagttgg agagagttgg 9480  
 ggattgcaac atattcaatt atacaaaaat gcattcagca tctaccttga ttaaggcagt 9540  
 gtgcaacaga atttgcagga gagtaaaaga atgattataa atttacaacc cttaaagagc 9600  
 50 tatagctggg cgtgggtggct catgcctgta aatcccagca ctttgggagg ctgaggcggg 9660

tggatcacct gaggccagaa gttcaagacc agcctagcca acatggcgaa accctgtctc 9720  
 tacaanaaat acaanaatta gccgggtgtg gtggcacgtg cctgtagtcc cagttacttg 9780  
 5 ggaggccgag gcaggagaat cgcttgaacc taggaggtgg aggctgcagt gagccgagat 9840  
 tgtgccactg cactccactt cagcctgggc gacaagagca agactccgtc acaaaaaaaaa 9900  
 aaaaaaaaaa aaagcttaaa atctagtggg aaaggcatat atacatacaa ctaactgtat 9960  
 10 agcataataa agctcataat ctgtaacaaa atctaattcg acaagcccag aaacttgtga 10020  
 tttaccaaaa acagttatat atacacaaaa agtaaaccta gaacccaaag ttaccagca 10080  
 ccaatgattc tctccctaag cagtatcaag tttaaagcag tgattacatt ctactgcta 10140  
 15 gattgtaaac tgagtaaagg agaccagcac ctttctgcta ctgaactagc acagccgtgt 10200  
 aaaccaacaa ggcaatggca gtgcccaact ttctgtatga atataagtta catctgtttt 10260  
 attatgtgtg acttgggtgtt gcatgtgggtt attatcaaca ctttctgaaa gaacaactac 10320  
 20 ctgctcaggc tgccataaca aaataccaca gactgagtga cttaacagaa acttatttct 10380  
 cacagttttg gaggctggga agtccaaaat taaggtacct gcaaggtagg tttcaatctc 10440  
 aggcctcttc tttggcttga aggtcttcta actgtgtgct cacatgacct cttetaacaa 10500  
 25 gctctctggg gtctcttttt tttttttttt cttttttgag acagagtctc actctgtcac 10560  
 ccaggctgga gtacagtggc acaatctggg ctactgcaa cctccaactc ccggytcaa 10620  
 gtgattctca tgcctcacc tcccagtag ctgggatgac aggagcccgc taccacacc 10680  
 30 agctaatttt tgtattttta gtagagatgg tgtttcacta cattggccag gctggtctca 10740  
 aactcctgac ctctgtatcc acccaccttg gcctccaaa gtgctgggat tacaggtgtg 10800  
 agccactgcg cccgtcctgg tgtcttttca tataagggca ctaatccaat cagacctggg 10860  
 35 cccgagctct cgcgaccggg ctgcaggaat tcgatcgcgt gctagaattc gcctgtcata 10920  
 cagctaataa ttgaccataa gacaattaga tttaaattag ttttgaatct ttctaatacc 10980  
 aaagttcagt ttactgttcc atgttgcttc tgagtggctt cacagactta tgaaaaagta 11040  
 40 aacggaatca gaattacatc aatgcaaaag cattgctgtg aactctgtac ttaggactaa 11100  
 actttgagca ataacacaca tagattgagg attgtttgct gttagcatac aaactctggg 11160  
 tcaaagctcc tctttattgc ttgtcttga aaatttgctg ttcttcatgg tttctctttt 11220  
 cactgctatc tatttttctc aaccactcac atggctacaa taactgtctg caagcttatg 11280  
 45 attcccaaat atctatctct agcctcaatc ttgttcaga agataaaaag tagtattcaa 11340  
 atgcacatca acgtctccac ttggagggtc taaagacgtt tcaacataca aaccggggag 11400  
 50 tttgctgag aatgtttcct aaaatgtgtc ctgtagcaca tagggtcctc ttgttcctta 11460

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50

aaatctaatt acttttagcc cagtgtcat cccacctatg gggagatgag agtgaaaagg 11520  
 gagcctgatt aataattaca ctaagtcaat aggcatagag ccaggactgt ttgggtaaac 11580  
 tggtcacttt atcttaaact aaatatatcc aaaactgaac atgtacttag ttactaagtc 11640  
 tttgacttta tctcattcat accactcagc tttatccagg ccacttattt gacagtctag 11700  
 ctagccccta gattttctgc cccaaagagc tctgtgtcct tgaacataaa atacaaataa 11760  
 ccgctatgct gttaattatt ggcaaagtgc ccattttcaa cctaaggaaa taccataaag 11820  
 taacagatat accaacaanaa ggttactagt taacaggcat tgccctgaaaa gagtataaaa 11880  
 gaatttcagc atgattttcc atggcggatg tgtgacatac acgacgcaa aagattttgt 11940  
 tccagctcct gccacctccg ctacgcgaga gattaaccac ccacgatggc cgccaaagtg 12000  
 catgttgata ttgaggctga cagcccattc atcaagtctt tgcagaaggc atttccgctc 12060  
 ttcgaggtgg agtcattgca ggtcacacca aatgaccatg caaatgccag agcattttcg 12120  
 cacctggcta ccaaattgat cgagcaggag actgacaaag acacactcat cttggatatac 12180  
 ggcagtgcgc cttccaggag aatgatgtct acgcacaaat accactgcgt atgccctatg 12240  
 cgcagcgcag aagaccccga aaggctcgta tgctacgcaa agaaactggc agcggcctcc 12300  
 gggaaaggtg tgatagaga gatcgcagga aaaatcaccg acctgcagac cgtcatggct 12360  
 acgccagacg ctgaatctcc taccttttgc ctgcatacag acgtcacgtg tcgtacggca 12420  
 gccgaagtgg ccgtatacca ggacgtgat gctgtacatg caccaacatc gctgtaccat 12480  
 caggcgatga aagggtgcag aacggcgtat tggattgggt ttgacaccac cccgtttatg 12540  
 tttgacgcgc tagcaggcgc gtatccaacc tacgccacaa actgggcca cgcagcaggtg 12600  
 ttacaggcca ggaacatagg actgtgtgca gcatccttga ctgaggggaa actcggcaaa 12660  
 ctgtccattc tccgcaagaa gcaattgaaa ccttgcgaca cagtcatggt ctcggttagga 12720  
 tctacattgt aactgagag cagaaagcta ctgaggagct ggcacttacc ctccgtattc 12780  
 cacctgaaag gtaaaccaatc ctttacctgt aggtgcgata ccatcgtatc atgtgaaggg 12840  
 tacgtagtta agaaaatcac tatgtgcccc ggccctgtacg gtaaaaacggg agggtagccc 12900  
 gtgacgtatc acgcggaggg attcctagtg tgcaagacca cagacactgt caaaggagaa 12960  
 agagtctcat tccctgtatg cacctaogtc cctcaacca tctgtgatca aatgactggc 13020  
 atactagcga ccgacgtcac accggaggac gcacagaagt tgttagtggg attgaatcag 13080  
 aggatagttg tgaacggaag aacacagcga aacactaaca cgatgaagaa ctatctgctt 13140  
 ccgattgtgg ccgtcgcatt tagcaagtgg gcgaggggaa acaaggcaga ccttgatgat 13200  
 gaaaaacctc tgggtgtccg agagaggtca ottacttgcg gctgcttctg ggcatttaaa 13260

acgaggaaga tgcacacccat gtacaagaaa ccagacacccc agacaatagt gaaggtgcct 13320  
 tcagagttta actcgttcgt catccccgagc ctatggtcta caggcctcgc aatcccagtc 13380  
 5 agatcacgca ttaagatgct tttggccaag aagaccaagc gagagttaat acctgttctc 13440  
 gacgcgtcgt cagccagggga tgctgaacaa gaggagaagg agaggttggga ggccgagctg 13500  
 actagagaag ccttaccacc cctcgtcccc atcgcgccgg cggagacggg agtcgtcgac 13560  
 10 gtcgacgttg aagaactaga gtatcacgca ggtgcagggg tcgtggaaac acctcgcagc 13620  
 gcgttgaaag tcaccgcaca gccgaacgac gtactactag gaaattacgt agttctgtcc 13680  
 ccgcagaccg tgctcaagag ctccaagtgt gccccgtgc accctctagc agagcaggtg 13740  
 15 aaaataataa cacataacgg gagggccggc ggttaccagg tcgacggata tgacggcagg 13800  
 gtccactac catgtggatc ggccattccg gtccctgagt ttcaagcttt gagcgcagagc 13860  
 gccactatgg tgtacaacga aaggggagttc gtcaacagga aactatacca tattgccgtt 13920  
 20 cacggaccgt cgctgaacac cgacgaggag aactacgaga aagtcagagc tgaaagaact 13980  
 gacgccgagt acgtgttcga cgtagataaa aaatgctgcg tcaagagaga ggaagcgtcg 14040  
 ggtttggtgt tgggtgggaga gctaaccaac cccccgttcc atgaattcgc ctacgaaggg 14100  
 25 ctgaagatca ggccgtcggc accatataag actacagtag taggagtctt tggggttccg 14160  
 ggatcaggca agtctgctat tattaagagc ctcgtgacca aacacgatct ggtcaccagc 14220  
 ggcaagaagg agaactgcca ggaaatagtt aacgacgtga agaagcaccg cgggaagggg 14280  
 30 acaagtaggg aaaacagtga ctccatcctg ctaaacgggt gtcgtcgtgc cgtggacatc 14340  
 ctatatgtgg acgaggcttt cgcttgccat tccggtactc tgctggccct aattgctctt 14400  
 gttaaaccctc ggagcaaagt ggtgttatgc ggagacccca agcaatgcgg attcttcaat 14460  
 35 atgatgcagc ttaaggtgaa cttcaaccac aacatctgca ctgaagtatg tcataaaagt 14520  
 atatccagac gttgcacgcg tccagtcacg gccatcgtgt ctacgttgca ctacggaggc 14580  
 aagatgcgca cgaccaaccc gtgcaacaaa ccataatca tagacaccac aggacagacc 14640  
 40 aagcccaagc caggagacat cgtgttaaca tgcttccgag gctgggcaaa gcagctgcag 14700  
 ttggactacc gtggacacga agtcatgaca gcagcagcat ctcagggcct caccgcgaaa 14760  
 ggggtatacy ccgtaaggca gaaggtgaat gaaaatccct tgtatgcccc tgcgtcggag 14820  
 45 cacgtgaatg tactgctgac gcgcactgag gataggctgg tgtggaaaac gctggccggc 14880  
 gatccctgga ttaaggtcct atcaaacatt ccacagggta actttacggc cacattggaa 14940  
 gaatggcaag aagaacacga caaaataatg aaggtgattg aaggaccggc tgcgcctgtg 15000  
 50 gacgcgttcc agaacaaagc gaacgtgtgt tgggcgaaaa gcctggtgcc tgcctggac 15060

actgccggaa tcagattgac agcagaggag tggagcacca taattacagc atttaaggag 15120  
 gacagagctt actctccagt ggtggccttg aatgaaattt gcaccaagta ctatggagtt 15180  
 5 gacctggaca gtggcctggt ttctgccccg aagggtgtccc tgtattacga gaacaaccac 15240  
 tgggataaca gacctggtgg aaggatgtat ggattcaatg ccgcaacagc tgccaggctg 15300  
 gaagctagac ataccttctt gaaggggcag tggcatacgg gcaagcaggc agttatcgca 15360  
 10 gaaagaaaaa tccaaccgct ttctgtgctg gacaatgtaa ttctatcaa ccgcaggctg 15420  
 ccgcacgccc tgggtggctga gtacaagacg gttaaaggca gtagggttga gtggctggtc 15480  
 aataaagtaa gagggtacca cgtectgctg gtgagtgagt acaacctggc tttgctcga 15540  
 15 cgcaggggtca cttggttgtc accgctgaat gtcacaggcg ccgatagggtg ctacgaccta 15600  
 agtttaggac tgccggctga cgcggcagg ttcgacttgg tctttgtgaa cattcacacg 15660  
 gaattcagaa tccaccacta ccagcagtgt gtcgaccacg ccatgaagct gcagatgctt 15720  
 20 gggggagatg cgctacgact gctaaaacc ggcgcatct tgatgagagc ttacggatac 15780  
 gccgataaaa tcagcgaagc cgttgtttcc tccttaagca gaaagtctc gtctgcaaga 15840  
 gtggtgcgcc cggatttgtt caccagcaat acagaagtgt tcttgctgtt ctccaacttt 15900  
 25 gacaacggaa agagaccctc tacgctacac cagatgaata ccaagctgag tgccgtgtat 15960  
 gccggagaag ccatgcacac ggccgggtgt gcaccatcct acagagtaa gagagcagac 16020  
 atagccacgt gcacagaagc ggctgtggtt aacgcagcta acgcccgtgg aactgtaggg 16080  
 gatggcgtat gcagggccgt ggcgaaagaaa tggccgtcag cctttaaggg agcagcaaca 16140  
 30 ccagtgggca caattaaac agtcatgtgc ggctcgtacc ccgtcatcca cgctgtagcg 16200  
 cctaatttct ctgccacgac tgaagcggaa ggggaccgcy aattggccgc tgtctaccgg 16260  
 gcagtggccg ccgaagtaaa cagactgtca ctgagcagcg tagccatccc gctgctgtcc 16320  
 35 acaggagtgt tcagcggcgg aagagatagg ctgcagcaat ccctcaacca tctattcaca 16380  
 gcaatggacg ccacggacgc tgacgtgacc atctactgca gagacaaaag ttgggagaag 16440  
 40 aaaatccagg aagccattga catgaggacg gctgtggagt tgctcaatga tgacgtggag 16500  
 ctgaccacag acttgggtgag agtgcacccg gacagcagcc tgggtgggtcg taagggtac 16560  
 agtaccactg acgggtcgtt gtactcgtac tttgaaggta cgaaattcaa ccaggctgct 16620  
 attgatatgg cagagatact gacgttgtgg ccagactgc aagaggcaaa cgaacagata 16680  
 45 tgctatacgc cgctgggcga aacaatggac aacatcagat ccaaagtcc ggtgaacgat 16740  
 tccgattcat caacacctc caggacagtg ccctgctgt gccgctacgc aatgacagca 16800  
 50 gaacggatcg cccgccttag gtcacaccaa gttaaaagca tgggtggttg ctcatctttt 16860

cccctcccga aataccatgt agatgggggtg cagaaggtaa agtgcgagaa ggttctcctg 16920  
 ttcgacccga cggtagcttc agtggttagt ccgcggaagt atgccgcatac tacgacggac 16980  
 5 cactcagatc ggtcgttacg agggtttgac ttggactgga ccaccgactc gtcttccact 17040  
 gccagcgata ccatgtcgct acccagtttg cagtcgtgtg acatcgactc gatctacgag 17100  
 ccaatggctc ccatagtagt gacggctgac gtacaccctg aaccgcgagg catcgcgagac 17160  
 10 ctggcggcag atgtgcaccc tgaaccgcga gaccatgtgg acctcgagaa cccgattcct 17220  
 ccaccgcgcc cgaagagagc tgcatacctt gcctcccgcg cggcggagcg accggtgccg 17280  
 gcgcccagaa agccgacgcc tgcccgaagg actgcgttta ggaacaagct gcctttgacg 17340  
 15 ttggcgact ttgacgagca cgaggctgat gcgttggcct ccgggattac tttcggagac 17400  
 ttcgacgacg tcctgcgact aggcgcgcgc ggtgcatata tttctcctc ggacactggc 17460  
 agcggacatt tacaacaaaa atccgttagg cagcacaatc tccagtgcgc acaactggat 17520  
 20 gcggtccagg aggagaaaat gtaccgcga aaattggata ctgagagga gaagctggtg 17580  
 ctgctgaaaa tgcagatgca cccatcggag gctaataaga gtcgatacca gtctcgaaa 17640  
 gtggagaaca tgaaagccac ggtgggtggac aggctcacat cgggggcccag attgtacacg 17700  
 25 ggagcggacg taggcgcgat accaacatac gcggttcggt accccgccc cgtgtactcc 17760  
 cctaccgtga tcgaaagatt ctcaagcccc gatgtagcaa tcgcagcgtg caacgaatac 17820  
 ctatccagaa attaccacac agtggcgtcg taccagataa cagatgaata cgacgcatac 17880  
 30 ttggacatgg ttgacgggtc ggatagttgc ttggacagag cgacattctg cccggcgaag 17940  
 ctccggtgct acccgaaaca tcatgcgtac caccagccga ctgtacgcag tgccgtcccg 18000  
 tcaccctttc agaacacact acagaacgtg ctagcggccg ccaccaagag aaactgcaac 18060  
 35 gtcacgcaaa tgcgagaact acccaccatg gactcggcag tgttcaacgt ggagtgcctc 18120  
 aagcgtatg cctgctccgg agaattattg gaagaatag ctaaacaacc tatccggata 18180  
 accactgaga acatcactac ctatgtgacc aaattgaaag gcccgaaagc tgctgccttg 18240  
 40 ttcgctaaga cccacaactt ggttccgctg caggaggttc ccatggacag attcacggtc 18300  
 gacatgaaac gagatgtcaa agtcactcca gggacgaaac acacagagga aagacccaaa 18360  
 gtccaggtaa ttcaagcagc ggagccattg gcgaccgctt acctgtgcgg catccacagg 18420  
 45 gaattagtaa ggagactaaa tgctgtgta cgccctaacg tgcacacatt gtttgatag 18480  
 tcggccgaag actttgacgc gatcatcgcc tctcacttcc acccaggaga cccggttcta 18540  
 gagacggaca ttgcatcatt cgacaaaagc caggacgact ccttggtctt tacaggttta 18600  
 50 atgatcctcg aagatctagg ggtggatcag tacctgctgg acttgatcga ggcagccttt 18660

ggggaaatat ccagctgtca cctaccaact ggcacgcgct tcaagttcgg agctatgatg 18720  
 aaatcgggca tgtttctgac tttgtttatt aacactgttt tgaacatcac catagcaagc 18780  
 5 agggactgag agcagagact cactgactcc gcctgtgcgg ccttcatecg cgacgacaac 18840  
 atcgttcacg gagtgatctc cgacaagctg atggcggaga ggtgcgcgtc gtgggtcaac 18900  
 atggaggtga agatcattga cgctgtcatg ggcgaaaaac ccccatatth ttgtggggga 18960  
 10 ttcatagttt ttgacagcgt cacacagacc gcctgccgtg tttcagaccc acttaagcgc 19020  
 ctgttcaagt tgggtaagcc gctaacagct gaagacaagc aggacgaaga caggcgacga 19080  
 gcactgagtg acgaggttag caagtggttc cggacaggct tgggggccga actggaggtg 19140  
 15 gcactaacat ctaggtatga ggtagagggc tgcaaaagta tcctcatagc catggccacc 19200  
 ttggcgaggg acattaaggg gtttaagaaa ttgagaggac ctgttataca cctctacggc 19260  
 ggtcctagat tgggtgcgta atacacagaa ttctgattat agcgcactat tatatagcac 19320  
 20 catggatccc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgta cccaacttaa 19380  
 tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga 19440  
 tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg cgctttgcct ggtttccggc 19500  
 25 accagaagcg gtgccggaag gctggctgga gtgcgatctt cctgaggccg atactgtcgt 19560  
 cgtccccctca aactggcaga tgcacggtta cgatgcgccc atctacacca acgtaaccta 19620  
 tcccattacg gtcaatccgc cgtttgttcc cacggagaat cgcacgggtt gttactcgtc 19680  
 30 cacatttaat gttgatgaaa gctggctaca ggaaggccag acgcgaatta tttttgatgg 19740  
 cgttaactcg gcgtttcatc tgtgggtgca cgggcgctgg gtcggttacg gccaggacag 19800  
 tcgtttgccg tctgaatttg acctgagcgc atttttacgc gccggagaaa accgcctcgc 19860  
 35 ggtgatggtg ctgcgttgga gtgacggcag ttatctggaa gatcaggata tgtggcggat 19920  
 gageggcatt ttccgtgacg tctcgttgct gcataaacgg actacacaaa tcagcgtatt 19980  
 ccatggtgcc actcgcctta atgatgattt cagccgcgct gtactggagg ctgaagttca 20040  
 40 gatgtgcggc gagttgcgty actacctacg ggtaacagtt tctttatggc agggtgaaac 20100  
 gcaggtcgcc agcggcaccg cgcctttcgg cggtgaaatt atcgatgagc gtgggtggta 20160  
 tgccgatcgc gtcacactac gtctgaacgt cgaaaacccg aaactgtgga gcgccgaaat 20220  
 45 cccgaatctc tategtgcgg tggttgaact gcacaccgcc gacggcacgc tgattgaagc 20280  
 agaagcctgc gatgtcggtt tccgcgaggt gcggattgaa aatggctctgc tgctgctgaa 20340  
 cggcaagccg ttgctgattc gaggcgttaa ccgtcacgag catcatctc tgcatggtca 20400  
 50 ggtcatggat gagcagacga tgggtgcagga tatcctgctg atgaagcaga acaactttaa 20460

cgccgtgcmc tgttcgcatt atccgaacca tccgctgtgg tacacgctgt gcgaccgcta 20520  
 cggcctgtat gtgggtgatg aagccaatat tgaaacccac ggcatgggtgc caatgaatcg 20580  
 5 tctgaccgat gatccgcgct ggctaccggc gatgagcga cgcgtaacgc gaatgggtgca 20640  
 gcgcatcgt aatcacccga gtgtgatcat ctggctcgtg gggaatgaat caggccacgg 20700  
 cgctaatac gacgcgctgt atcgctggat caaatctgtc gatccttccc gcccggtgca 20760  
 10 gtatgaaggc ggcggagccg acaccacggc caccgatatt atttgcccga tgtacgcgcy 20820  
 cgtggatgaa gaccagccct tcccggctgt gccgaaatgg tccatcaaaa aatggctttc 20880  
 gctacctgga gagacgcgcc cgctgatcct ttgcgaatac gcccacgcga tgggtaacag 20940  
 15 tcttggcggc ttcgctaaat actggcaggc gtttcgctag tatccccgtt tacagggcgg 21000  
 cttcgtctgg gactgggtgg atcagtcgct gattaaatat gatgaaaacg gcaaccctgt 21060  
 gtcggcttac ggcggtgatt ttggcgatac gccgaacgat cgcagttct gtatgaacgg 21120  
 20 tctggctctt gccgaccgca cgccgcatcc agcgtgacg gaagcaaac accagcagca 21180  
 gtttttccag ttccgtttat cggggcaaac catcgaagt accagcgaat acctgttccg 21240  
 tcatagcgt aacgagctcc tgcactggat ggtggcgctg gatggtaagc cgctggcaag 21300  
 25 cgggtaagt cctctggatg tcgctccaca aggtaaacag ttgattgaac tgctgaact 21360  
 accgcagccg gagagcgccg ggcaactctg gctcacagta cgcgtagtgc aaccgaacgc 21420  
 gaccgatgg tcagaagccg ggcacatcag cgcctggcag cagtggcgtc tggcgaaaa 21480  
 30 cctcagtgtg acgctccccg ccgctccca cgccatcccg catctgacca ccagcgaat 21540  
 ggatttttgc atcgagctgg gtaataagcg ttggcaattt aaccgccagt caggctttct 21600  
 ttcacagatg tggattggcg ataaaaaaca actgctgacg ccgctgcgcy atcagttcac 21660  
 35 ccgtgcaccg ctggataacg acattggcgt aagtgaagcg acccgattg accctaacgc 21720  
 ctgggtcga cgcctggaag cggcgggcca ttaccaggcc gaagcagcgt tgttgagtg 21780  
 cacggcagat aacttgctg atgcggtgct gattacgacc gctcacgcgt ggcagcatca 21840  
 40 ggggaaaacc ttatttatca gccgaaaac ctaccggatt gatggtagtg gtcaaatggc 21900  
 gattaccgtt gatgttgaag tggcgagcga tacaccgcat ccggcgcgga ttggcctgaa 21960  
 ctgccagctg gcgaggtag cagagcgggt aaactggctc ggattagggc cgcaagaaaa 22020  
 45 ctatcccgac cgccttactg ccgctgttt tgaccgctgg gatctgcat tgcagacat 22080  
 gtataccccg tacgtcttcc cgagcgaaaa cggctcgcgc tgcgggacgc gcgaattgaa 22140  
 ttatggcca caccagtggc gcggcgactt ccagttcaac atcagccgct acagtcaaca 22200  
 50 gcaactgatg gaaaccagcc atcgccatct gctgcacgcg gaagaaggca catggctgaa 22260



tatcgacggt ttccatatgg ggattggtgg cgacgactcc tggagcccgt cagtatcggc 22320  
 ggaattccag ctgagcgccg gtcgctacca ttaccagttg gtctggtgtc aaaaataata 22380  
 5 ataaccgggc aggggggatc cggggaatt aattgaatta catccctacg caaacgtttt 22440  
 acggccgccc gtggcgcccg cgcccggcgg cccgtccttg gccgttgacg gccactccgg 22500  
 tggctcccgt cgtccccgac ttccaggccc agcagatgca gcaactcatc agcgccgtaa 22560  
 10 atgcgctgac aatgagacag aacgcaattg ctctgctag gcctcccaa ccaaagaaga 22620  
 agaagacaac caaaccaaag ccgaaaacgc agcccaagaa gatcaacgga aaaacgcagc 22680  
 agcaaaaagaa gaaagacaag caagccgaca agaagaagaa gaaacccgga aaaagagaaa 22740  
 15 gaatgtgcat gaagattgaa aatgactgta tcttcgtatg cggctagcca cagtaacgta 22800  
 gtgtttccag acatgtcggg caccgcacta tcatgggtgc agaaaatctc ggggtgtctg 22860  
 ggggccttcg caatcggcgc tatcctggtg ctggttggtg tcaactgcat tgggctccgc 22920  
 20 agataagtta gggtaggcaa tggcattgat atagcaagaa aattgaaaac agaaaaagtt 22980  
 agggtaagca atggcatata accataactg tataacttgt aacaaagcgc aacaagacct 23040  
 gcgcaattgg ccccggtggtc cgcctcacgg aaactcgggg caactcatat tgacacatta 23100  
 25 attggcaata attggaagct tacataagct taattcgacg aataattgga tttttatttt 23160  
 attttgcaat tggtttttaa tttttccaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 23220  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaacta gatcctcgaa tcaagcttat 23280  
 30 cgataccgtc gactagagtc gggcgggccc gccgcttcga gcagacatga taagatacat 23340  
 tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta tttgtgaaat 23400  
 ttgtgatgct attgctttat ttgtaacct tataagctgc aataaacaag ttaacaacaa 23460  
 35 caattgcatt cttttatgt ttcaggttca gggggaggtg tgggaggttt tttaaagcaa 23520  
 gtaaacctc tacaatgtg gtaaatcga taaggatctc gacctcgagg gggggccctg 23580  
 taccgggctc tgctgaggc tctggctgcc cagcaggctg aagctggggt tgttggccag 23640  
 40 gggcacttgt gttcccatcg cagcgggcac ttgtgcctcc caatcagatg gcctctgaag 23700  
 gcaggcctgg ccagaagggt agtgctgctg aacgctatta tccacttggc tgaggggtgt 23760  
 tttccccgaa actgctgtgg tcacagctgc tgccgctgtg acccatgcag cattgttgaa 23820  
 45 cgcagtgggc attcttggca cactaggccg tctgagctgg tggggactca aggactgggt 23880  
 gccagggag ctgggacaga acccaggcag gggcacttct ggtgggggtg ccttggggct 23940  
 ctgcatatgc tggcagacag agtcaagtct gccagggga gtctggcctg agtgtgagag 24000  
 50 gatgggacac tgggggctgg aggtgaaaat tccttgccgc tttcccagag ttggtgagat 24060

cactcccatg ccctcgcagc tctgggtgect ggtgagtggg atcattcctg gactcagatt 24120  
 gttctgaaga agcccagttc tgggtggcat caagtgcttg ctagatgggg ggcttgcect 24180  
 5 gatccggcta cacttggagg tgacttgttc ttggacggct acatacagaa agagagaagt 24240  
 ggggatgagt tccaaaggca tcctcgactt cggctgtggc caccggaggg tagctcctgg 24300  
 cccaacagg actttctacc tcccgcctt ggctctctac tgagctcccc cctgctcccc 24360  
 10 aattcctcgc cattccccctc atttctctgc cctcagcctg gactgcagtt cttctgggaa 24420  
 gctgceccaa ctccctaggt ctgtgctcac caagagcaga tcacactgga ctgaaatgcc 24480  
 agctgatttg tctcttcaag aaaattggaa gctcctggag gtcaggggcc atgtctgctt 24540  
 15 ttacaactcag tgetctgtat gcaggcctgg cactgcccac cctttgacag gtgggtgcata 24600  
 ttttgtagaa ggaaggaagg ggccagggtg ggtgggctgg gctgggtggcg ggagctagct 24660  
 cagcctctta gattctctac ccgatggatg tgacctggga cagcaagtga gtgtggtgag 24720  
 20 tgagtgcaga cgggtgcttg tccccctctt gtctcatagc ctagatggcc tctgagccca 24780  
 gatctggggc tcagacaaca tttgttcaac tgaacggtaa tgggtttcct ttctgaaggc 24840  
 tgaaatctgg gagctgacat tctggactcc ctgagttctg aagagcctgg ggatggagag 24900  
 25 acacggagca gaagatggaa ggtagagtcc cagggtccta agatggggaa tacatctccc 24960  
 ctcatgtca tgagagtcca ctctagctga tatctactgt ggccaatac taccggtact 25020  
 tttttggggg ggacactgag tcatgcagca gtcttatggt ttaccaagg tcaggtaggg 25080  
 30 gagacagtgc agtcagagca caagcccagt gtgtctgacc cacccaagaa tccatgctcg 25140  
 tatctacaaa aatgattttt tctcttgtaa tgggtgctag gttcttttat tatcatggca 25200  
 tgtgtatggt tttcaactag gttacaatct ggcctataa ggttaacctc ctggaggcca 25260  
 35 ccagccttcc tgaaacttgt ctgtgctgtc cctgcaactg gagtgtgcct gatgtggcac 25320  
 tccagcctgg acaagtggga cacagactcc gctgttatca ggcccaaaga tgtcttccat 25380  
 aagaccagaa gagcaatggt gtagaggtgt catgggctac aataaagatg ctgacctcct 25440  
 40 gtctgagggc aagcagcctc ttctggccct cagacaaatg ctgagtgttc ccaagactac 25500  
 cctcggcctg gtccaatctc atcccactgg tgcgtaaggg ttgctgaact catgacttct 25560  
 tggctagcct gcaacctcca cggagtggga actacatcag gcattttgct aactgctgta 25620  
 45 tcctaggcca ataaatggtg atcacattta tagctgcat ggtaggggtg ggaccctgc 25680  
 tatctatctg tggaggctct gggagcccct gacacaaact ttctgaagca gagcctcccc 25740  
 aaccctttt ccattccta tacctgacag atggcccagg aaccattag aaatggaagg 25800  
 50 tcaactgcagc agtatgtgaa tgtgcgtgtg ggagaagggc aggatcagag ccctgggggt 25860

gtggcagccc ccaagtgatt ctaatccaga tcctaggggt gtttcctgt cccattgaaa 25920  
 tagctgcttt aaggggcctg actcagggaa atcagtctct tgaattaagt ggtgattttg 25980  
 5 gagtcattta gaccaggcct tcaattggga tcctgctctt agagttggat gaattattta 26040  
 actgattttc agatctctc tttctcaatg ctttcagaag cacagtaact gcttactctg 26100  
 aatgaattc tcaccccact tccacatatg cacccttgc ccacccttt gggaaactg 26160  
 10 gccttaactg cttacctca aatggactca tctggtggga gatatatgca ttctgccgtt 26220  
 caggggtcat tgccataaga cctgatctct gttcctcttg ctaaacagaa gatgaaaaag 26280  
 acaaattaga ttacagctac caattaataa ttagccttag gatcgctgcg tggggaccta 26340  
 15 ggacttggct ttggtgcagc agaaagcatg aataaacaca ccagcataca ctcgcatgca 26400  
 tgccccacc tctcgagcaa aattccacag gtataaataa agtaagattc tgcacctggg 26460  
 ttaaaaacac aactgcaaca gcatagaatg gggcaggaga gacagaactt aatagcaaga 26520  
 20 gcacacagaa aaaagtttta ggcatttttg atgtccatct gctcaggatg ggtcagcagt 26580  
 gagatgcggt caccaaaaga acaaatgtaa cattaggctg cattaataga agcagagtat 26640  
 gtagaaggag ggaggtgaca gtcctatgct aactctgct tggccagact ataccacag 26700  
 25 gagtctgggc atgccagtct cagggagacc cagacagact ggctgcattc agaggatgg 26760  
 aagtaatgag agtggggatt ggacttcaaa ctaccagac aaagaatggc tgagcaagcc 26820  
 aaggatgctg tggctggggc agagcagact gtgggctatg tagtggtgga tacctagcct 26880  
 30 ctgcagggct gtcatagga aaggacattg agaagaggac tgaggcttgt tcctggtggt 26940  
 cctggcatga acggccagat gatcacatgg tcaggtggac acagtctcca aactgggag 27000  
 tagccaaaca cttactgcca acctcccgcc cttctctga ctagttgcag cataggcaat 27060  
 35 tgggaggagc ttctgtctc catctgaaag ctggctgggt gggcaggggg aggagcgagc 27120  
 caagtttcaa ggccgcagtt tcagcactca gtctgggatc ggctcaagga gcaaggggga 27180  
 agaacatagc caggagggaa taacatgaag gccccagac ccagaaaagg catgacttgc 27240  
 40 tctgagacc tcagccggtt ggtgtcaggt tgtgactcgg atccaggctc gactcccagt 27300  
 ccagtgcttg aagcctcacc ccacacagtg aggggagccc ggccatctct gctcaactgc 27360  
 tgccatctct ctccccttct caaccaccaa ggcagctctg tctgggagca caagctcaa 27420  
 45 gtccactttc tggctctgtt ccccccaag atgccagagg acttgcctct acaacacggg 27480  
 ctgcccgtgc agtgctgct tttccagcaa agggcttctg ggaaccctc tctgactca 27540  
 gtggggctgg tgggagtggg gcggggtagc gaccagtgct ttgggactgt gccagctct 27600  
 50 caggcctggc agcagttcct ggccttgggt cctgccaagg cagagaggac aaacacatgg 27660

caccgggaag actacaccag aagcgattcc accagactgg ggtttgcttt tctatcccgc 27720  
 ccttagcctg cttcctgtcc tggtcctcgc ctccccctcc actggagctg ccggtggggc 27780  
 5 agtgaggggc tgtttctcag ctgcctatg gagctgcctt ctccctgcca aagcattggc 27840  
 aaggcggcaa ggggtggggg tggggatggg ggggaggatc tgccttctca agctctcatt 27900  
 atactgagca cgtctcacc cttattttat gtcacttagc aacaccccat gtggacactg 27960  
 10 aggagcatgg gggtcacatg accactgccc aaggccacac catccggatc tgcctgagat 28020  
 ggtcaggggt ggcagccatt tctgaaggca gtcctttcgc tttggctctt cttgtaccag 28080  
 tctcaggaca tcagggcaga agatctacag tccccagctt actgatgtga cagcagaggc 28140  
 tcagagaggt taaatgactt gcccaagggtg acacggctaa gaagtacagt atctcctaac 28200  
 15 tgcagaccag gtgcttctgc tgcttctggg gacagattcc tgcgtggctg gctaggctca 28260  
 aacggctcct aactccatcc ccaccggttg ctgcattagt ttcacaaat aacacagttg 28320  
 tacagaggta ggggttcagg ggcaggggca gatggaggct ggagagtgtg actaaggaaa 28380  
 20 cagcagggga agtgcggtaa agtccgaagg gagggacgga aagagaaagc caagcccagg 28440  
 ggcgtgccag acaaaaggaa aggccacgcc ggggcagggc aggcttcagc ggggtgctggg 28500  
 gcgctctcat cccgggaagc acacattcca gaggaccccg gagtctaag gaaaagctgg 28560  
 25 ccagcctatc actatggaaa ctgccaaaggc cacacagcgc tgctgacacc cagcctgggt 28620  
 gccgggtggc agctctgcag gatcttcaag tctgggggtgc caccagcaag cgacggctct 28680  
 ccatgggctc ttcaccttac ggcagtgtcc agaggaccg ccagtcctct gctcctatgc 28740  
 30 tggtcctgct gtccctggca aaaggagcca gagcattctc tccaggcctc ccgaggaggc 28800  
 tgcttccttt gttttgcaga tggaggctcc catcctttgt tctgaatcaa tgtgctccaa 28860  
 agataagccc caagaaaaca gttggtgcct tttgacactg acaattagaa tcggttgaaa 28920  
 35 atggagaaaa caggaaatgg caaatggttt cagtgaccag gaggaaaccg tgcctgaaag 28980  
 ttgctgctta gtgactggga cactcgcttt ctgctctctt atgaaggaca gcctaggccg 29040  
 tgtggccttt tataaaciaa gctatgaagg ggtcgtcaaa ttttctaggg ctgcaactgt 29100  
 40 ggcactacgt cctgttgtgc caggtgacac tgacaagcag cactgagttc tatgcaagcc 29160  
 cagggtgtgct tctctcatgg tgacccccag agaactaagg ccagctctt cctctgtcac 29220  
 acccctccca gccccactg tcagacaagg gaccacattc acagacagtc tcagccaaga 29280  
 45 tggcaacctt ggaagtctg gggatgcctt tctagaagct cgcgccccta ggggccggcc 29340  
 ttaattaaat caagcttctc gataccgtcg agacctcgag ggggggcac actccgcctt 29400  
 aaaacctacg tcacccgccc cgttcccacg ccccgcgcca cgtcaciaaac tccaccccct 29460  
 50

cattatcata ttggcttcaa tccaaaataa ggtatattat tgatgatggt t

29511

5 <210> 10  
 <211> 28191  
 <212> ДНК  
 <213> Химерная

10 <220>  
 <221> 5' ITR  
 <222> (1) .. (438)  
 <223> Последовательность первого инвертированного концевго повтора и сигнальная последовательность для упаковки

15 <220>  
 <221> «лишняя»  
 <222> (439) .. (10990)  
 <223> Первая некодирующая «лишняя» последовательность

20 <220>  
 <221> TERT  
 <222> (10991) .. (11285)  
 <223> Промотор теломеразы (TERT)

25 <220>  
 <221> SFV  
 <222> (11556) .. (18665)  
 <223> Участок последовательности репликона SFV

30 <220>  
 <221> mIL-12  
 <222> (18688) .. (21021)  
 <223> Последовательность гена мышиноного интерлейкина-12 (IL-12) (экзогенный ген)

35 <220>  
 <221> Поли-А  
 <222> (21920) .. (22179)  
 <223> Последовательность полиаденилирования, полученная из SV40

40 <220>  
 <221> «лишняя»  
 <222> (22180) .. (28030)  
 <223> Вторая некодирующая «лишняя» последовательность

45 <220>  
 <221> 3' ITR  
 <222> (28031) .. (28191)  
 <223> Последовательность первого инвертированного концевго повтора

50 <400> 10  
 aaacatcatc aataatatac cttatTTTTgG attgaagcca atatgataat gaggggggtgg 60  
 agttttgtgac gtggcgcgggg gcgTgggaac ggggcgggtg acgtagtagt gtggcggaag 120  
 tgtgatgTtg caagtgtggc ggaacacatg taagcgacgg atgtggcaaa agtgacgttt 180  
 ttggtgtgcg ccgggtgtaca caggaagtga caatTTTTcgC gcggttttag gcggatgTtg 240  
 tagtaaattt gggcgtaacc gagtaagatt tggccatttt cgcgggaaaa ctgaataaga 300

ggaagtgaaa tctgaataat tttgtgttac tcatagcgcg taatatttgt ctagggccgc 360  
 ggggactttg accgtttacg tggagactcg cccaggtggt tttctcaggt gttttccgcg 420  
 5 ttcgggtca aagttggcgt tttgatatca agcttatoga taccgtcaaa caagtcttta 480  
 attcaagcaa gactttaaca agttaaagg agcttatggg taggaagtag tgttatgatg 540  
 tatgggcata aagggtttta atgggatagt gaaaatgtct ataataatac ttaaatggct 600  
 10 gcccaatcac ctacaggatt gatgtaaaca tggaaaagggt caaaaacttg ggtcactaaa 660  
 atagatgatt aatggagagg atgaggttga tagttaaatg tagataagtg gtcttattct 720  
 caataaaaaat gtgaacataa ggcgagtttc tacaagatg gacaggactc attcatgaaa 780  
 15 cagcaaaaac tggacatttg ttctaattct tgaagagtat gaaaaattcc tattttaaag 840  
 gtaaaacagt aactcacagg aaataccaac ccaacataaa atcagaaaca atagtctaaa 900  
 gtaataaaaa tcaaacgttt gcacgatcaa attatgaatg aaattcacta ctaaaattca 960  
 20 cactgatttt gtttcatcca cagtgatcaat gttgtgatgc atttcaattg tgtgacacag 1020  
 gcagactgtg gatcaaaagt ggtttctggt gcgacttact ctcttgagta tacctgcagt 1080  
 cccctttctt aagtgtgtta aaaaaaagg gggatttctt caattcgcca atactctagc 1140  
 25 tctccatgtg ctttctagga aacaagtgtt aaccacott atttgtcaaa cctagctcca 1200  
 aaggactttt gactccccac aaaccgatgt agctcaagag agggtatctg tcaccagtat 1260  
 gtatagttaa aaaagtatcc caagtcccaa cagcaattcc taaaaggagt ttatttaaaa 1320  
 30 aaccacacac acctgtaaaa taagtatata tctccaagg tgactagttt taaaaaaca 1380  
 gtattggctt tgatgtaaag tactagttaa tatgttagaa aaatctcact gtaaccaagt 1440  
 gaaatgaaag caagtatggt ttgcagagat tcaaagaaaa tataagaaaa cctactgttg 1500  
 35 ccactaaaaa gaatcatata ttaaataac tcacacaata gctcttcagt ctgataaaat 1560  
 ctacagtcac aggaatggat ctatcactat ttctattcag tgctttgatg taatccagca 1620  
 ggtcagcaaa gaatttatag cccccottga gcacacagag ggctacaatg tgatggcctc 1680  
 40 ccatctcctt catcacatct cgagcaagac gttcagtcct acagaaataa aatcaggaat 1740  
 ttaatagaaa gtttcataca ttaaacttta taacaaacac ctcttagtca ttaaacttcc 1800  
 acaccaacct gggcaatata gtgagacccc atgcctgcaa aaaaaaaaaa attagccagg 1860  
 45 catggtagca tgtacctgta gtcccagcta cttgagaggt gaggtgggaa aatcacttta 1920  
 gtgcaggatg ttgaggctgg agtgaactgt gattgtgcca ctgcactcca gcctggacaa 1980  
 tagagcaaga ccttgtctca aaaaaatgca ttaaaaattt tttttaatc ttccacgtat 2040  
 50 cacatccttt gccctcatgt ttcataagggt aaaaaatttg ataccttcaa aaaaaccaag 2100

cataccacta tcataatfff ttttaaatgc aaataaaaac aagataccat tttcacctat 2160  
 cagactggca ggttctgatt aaatgaaatt ttctggataa tatacaatat taagagagac 2220  
 5 tgtagaaact gggccagtgg ctcatgcctg taatcccagc actttgggag gctgggtaac 2280  
 atggcgaacc ctgtttctac aaaataaaaa tattagctgg gagtgggtggc gcacacctat 2340  
 agtcccagct actcaggagg ctgaggtgga aggatcgctt gaaccagga ggttgagact 2400  
 10 gcagtgaact gtgatcattc tgctgcactg cccccagcc tgggcaacag agacctgtc 2460  
 tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gacaaattgt gaagagaaag gtactctcat ataacatcag 2520  
 gagtataaaa tgattcaact tcttagagga aaatttggca ataccaaat attcaataaa 2580  
 15 ctctttcccc ttgaccagaa aattccactt gaataaagct gaacaagtac caaacatgta 2640  
 aaagaatggt tcttctagta cagtcggtaa gaacaaaata gtgtctatca atagtggact 2700  
 ggttaaataca gttatggtat ctccataaga cagaatgcta tgcaaccttt aaaatatatt 2760  
 20 agatagctct agacacacta atattaaag tgtccaataa catttaaac tatactcata 2820  
 cgttaaaata taaatgtata tatgtacttt tgcatatagt atacatgcat aggccagtgc 2880  
 ttgagaagaa atgtgtacag aaggctgaaa ggagagaact ttagtcttct tgtttatggc 2940  
 25 ctccatagtt agaataatfff ataacacaaa tattttgata ttataatfff aaaataaaaa 3000  
 cacagaatag ccagacatac aatgcaagca ttcaatacca ggtaagggttt ttcactgtaa 3060  
 ttgacttaac agaaaatfff caagctagat gtgcataata ataaaaatct gaccttgcct 3120  
 30 tcatgtgatt cagccccagt ccattaccct gtttaggact gagaaatgca agactctggc 3180  
 tagagttcct tcttccatct ccttcaatg tttactttgt tctggctcct acagagtccc 3240  
 actataccac aactgatact aagtaattag taaggccctc ctcttttatt ttttaataaag 3300  
 35 aagattttag aaagcatcag ttatttaata agttggccta gtttatgttc aaatagcaag 3360  
 tactcagaac agctgctgat gtttgaaatt aacacaagaa aaagtaaaaa acctcatttt 3420  
 aagatcttac ttacctgtcc ataattagtc catgaggaat aaacaccctt tccaaatcct 3480  
 40 cagcataatg attaggtatg caaaataaat caaggtcata acctggttca tcatcactaa 3540  
 tctgaaaaag aaatatagct gtttcaatga gagcattaca ggatacaaac atttgattgg 3600  
 attaagatgt taaaaataa ccttagtcta tcagagaaat ttaggtgtaa gatgatatta 3660  
 45 gtaactgtta actttgtagg tatgataatg aattatgtaa gaaaacaaca ggccgggagg 3720  
 gttggttcac acgtgtaatc ccagcacttt gggaggctga ggcaggcaga ctgcctgagc 3780  
 tcaggagttc gagaccagcc tgggcaacac ggtgaaatcc cgtctctact aaaaatacaa 3840  
 50 aaaaattagc cgggtgtggt gacacatgcc tgtagtccca gctacttggg aggctgagge 3900

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50

aggagaatca cttgaacctg ggaggtgaag gttgcagtga gccaaagatgg caccacttca 3960  
 ctccagcctg ggaaacagag caagactctg tctctgagct gagatggcac cacttcactc 4020  
 cagcctggga aacagagcaa gactctgtct caaaaaaaaaac aaaacacaca aacaaaaaaaa 4080  
 caggctgggc gcggtggctc acgcctgtaa tcccagcact ttgggaggcc gaggcgggtg 4140  
 gatcacctga ggtcaggagt tccagaccag ccttgtcaac atggtgaaac ctccccccgc 4200  
 cgtctctact aaaaatacaa aaattagcca ggcgtgggtg caggagcctg taatcccagc 4260  
 tacttgggag gctgaggcag gagaatcgct tgtaccaga aggcagaggt tgcactgagc 4320  
 tgagatggca ccattgcact ccagcctggg ggacaagagc gagatttcgt ctttaaaaaa 4380  
 caaaaaacaaa acaaaaaaac atgtaactat atgtottagt catottagtc aagaatgtag 4440  
 aagtaaagtg ataagatatg gaatttcctt taggtcacia agagaaaaag aaaaatttta 4500  
 aagagctaag acaaacgcag caaaatcttt atatttaata atattctaaa catgggtgat 4560  
 gaacatacgg gtattcatta tactattctc tccacttttg agtatgtttg aaaatttagt 4620  
 aaaacaagtt ttaacacact gtagtctaac aagataaaat atcacactga acaggaaaaa 4680  
 ctggcatggt gtggtggctc acacttgtaa tcccagtgtc ttgggaggct gagacaggag 4740  
 agttgcttga ggccaggagt tcaagaccga catggggaat gtagcaagac cccgtcccta 4800  
 caaaaaactt tgtaaaaatt tgccaggat ggtggtgcat acctgtagtc ccagctactc 4860  
 gggaggcgga ggcagaagga atcacttgag cccaggagtt tgaggctgca gtgagctacg 4920  
 atcataccac agcactccag cgtggacaac agagtaagac cctatctcaa aaacaaaaca 4980  
 aaacaaaaca aacaaaaaaaa accacaagaa aaactgctgg ctgatgcagc ggctcatgcc 5040  
 tgtaatccca gtattttggg aggcccaggt gggcgatca cctgaggtca ggagttagag 5100  
 accagcctgg ccaacatggt gaaaccccat ctctactaaa aatacaaaat tagccaggca 5160  
 tgtggcacgc gcctgtagtc ccagttactg ggaggctgaa gcaggaggat cacctgagcc 5220  
 cgggaggtgg aggttgcagt gagccgagat cacaccactg cactccagcc tgggtgacac 5280  
 agcaataccc tacctcaaaa taaaaaagaa aaagaaaaga aaagttgctg tccccgctac 5340  
 cccaatocca aatocaaaca gcctctctca tctcacagta agggggaaaa atcacccaaa 5400  
 aaagctaagt gatcttttga aaacccaaac tcttagaagt ctaagattat tatagtcaac 5460  
 tcatgaagtg tcatcataaa agatactcta atattattta agtagaacca catattggtt 5520  
 gtcttgggtat gtctagcccc tggcatacaa aatatttaat aacactgata tggtagctgt 5580  
 gatgtgaaaa tgtactatga gtacagcttt ataaatacta tatatgtacc tatatacaga 5640  
 aaaaaataca acaaaatcat aaaagcactt atctttgaaa gaggagttac agcaatttta 5700



tttagttctt tattgctttg ctatatattc taaatTTTTt tcaatgaata tatatcactt 5760  
 ttaaaaaaat tcaatggtct ttcttataaa ttatctttgg cagcatgCGT ttttatatat 5820  
 5 acatataaaa tgtatgggaa atTTTTaaag gatacattaa attaaagcaa aatatacaaa 5880  
 caaaaaatca gaatacaaaa agataaaaag attgggaagg gagggaggga gtaaggagga 5940  
 agggTgggtg ggtatagaga aatataccaa ataatggtaa gaagtggggT ctTgacactt 6000  
 10 tctacacttt ttttaataaa aaaaaatttt tttctctctc tttttttttt ttagagacga 6060  
 agtctcgcta tgttgcccag gctggTcttg aactcctggg atcaagagat cctcctgcct 6120  
 cagcctccca aggtgctTgg attacaggtg tgagccacca cgctggTca ctttctacac 6180  
 15 ttttaatatat atatTTTTtc attttcaatg tcattttttat tagttaattt ataataccca 6240  
 ttcaccatta tattcaaagt ctatttgaag aaataaacca gaaagaatga aatactctag 6300  
 ctcacatgct attcaatact aaattacctt tcaaatcaca ttcaagaagc tgatgattta 6360  
 20 agctttggcg gtttccaata aatattggTc aaaccataat taaatctcaa tatatcagtt 6420  
 agtacctatt gagcatctcc ttttacaacc taagcattgt attaggtgct taaatacaag 6480  
 cagcttgact ttttaatacat ttaaaaatac atatttaaga cttaaaatct tatttatgga 6540  
 25 attcagttat attttgaggt ttccagTgct gagaaatttg aggtttgtgc tgtctttcag 6600  
 tccccaaagc tcagttctga gttctcagac tttggTggaa ctTcatgtat tgtcaggttg 6660  
 gcccgtaata cctgtgggac aacttcagcc cctgtgcaca tggccaggag gctggTtgca 6720  
 30 aacatTTTca ggtaggtgga ccaggacatg ccctggTca tggccaggTg gaggcatagt 6780  
 gctatacagc aggcagaagt caatattgat ttgtTTTTaa agaaacatgt actactttca 6840  
 taagcagaaa aaatttctat tcttggggga aaagattatg ccagatcctc taggattaaa 6900  
 35 tgctgatgca tctgctaaac ctTcacatat cagaacatat ttactataga aagaatgaaa 6960  
 atgggacatt tgtgtgtcac ctatgtgaac attccaaaaa tattttacaa caactaagta 7020  
 ttttataaat tttatgaact gaaatttagt tcaagttcta ggaaaataca aaccttgcta 7080  
 gatattataa aatgataca atatatattc atttcaggct catcagaata tatctgttat 7140  
 40 cacttgacaa gaatgaaaat gcaccatttt gtagtgcttt aaaatcagga agatccagag 7200  
 tactaaaaat gacttcttcc ttgaagctta ctcaccaact tcctcccagt tactcactgc 7260  
 ttctgccaca agcataaact aggaccagc cagaactccc ttgaaatata cacttgcaac 7320  
 45 gattactgca tctatcaaaa tggttcagTg cctggctaca ggttctgcag atcgactaag 7380  
 aatttgaaaa gtcttgTTta tttcaaagga agcccatgtg aattctgccc agagttcatc 7440  
 50 ccagatatgc agtctaagaa tacagacaga tcagcagaga tgtattctaa aacaggaatt 7500

ctggcaatat aacaaattga tttccaatca aaacagattt acataccata cttatgtcaa 7560  
 gaagttgttt tgttttattg catcctagat tttatTTTTT tgatttatgg tttactttaa 7620  
 5 gcataaaaaa tttgtcaata caactcttcc caaaaggcat aaacaaaaat tcataaaaact 7680  
 tgcatcactt gagatacttc aggtatgaat tcacaacttt gttacaactt actatatata 7740  
 tgcacacata tatatatatt tgggtatatt ggggggggtc taatttaaga aatgcataat 7800  
 10 tggctataga cagacagttg tcagaacttg gcaatgggta cgtgcagggt cattatacca 7860  
 agtctacttg tagttgttca aaatgtatca taatacaagg ccgggcgagg tcgtcacgcc 7920  
 tgtaatccca gcattttggg aggctaaggc aggaggattg cttgagggtca ggagtttgtg 7980  
 15 accagcctgg gcaacagagc aagaccctgt ctccaaaaag aaaaaaaata attttttaca 8040  
 aaataaaaaac aaaatgtatc atcagacgaa attaaataag aggcaattca tttaaatgac 8100  
 aacttttccc agcttgacat ttaacaaaaa gtctaagtcc tcttaattca tatttaatga 8160  
 20 tcaaataatca aataactaatt tttttttttt tttttttttt gagacggagt ctcgctctgt 8220  
 cgcccaggct ggagtgagc ggcgcatcc tggctcactg caagctccgc ctcccgggtt 8280  
 cacgccattc tcctgcctca gcctcccag tagctgggat tacagacatg cgccaccag 8340  
 25 cccggctaatt tttgtattt tagtagagat ggggtttctc catgttggtc aggctggctt 8400  
 tgaatttccc acctcaggtg atctgcctgc ctcagcctca caaagcagta gctgggacta 8460  
 caggcaccca ccaccacact tggttaattc ttttgtattt tttttgtaa gacgggattt 8520  
 30 caccatgta gccaggatgg tctcgatctc ctgatctcat gatccgccg cctcagcctc 8580  
 ccaaagtgct gggattacag gcgtgagcca ccccgcccgg ccatcaaata ctaattctta 8640  
 aatggtaagg acccactatt cagaacctgt atccttatca ctaatatgca aatatttatt 8700  
 35 gaatacttac tatgtcatgc atactagaga gagttagata aatttgatac agctaccctc 8760  
 acagaactta cagtgaata gatggcatga catgtacatg agtaactgtg aacagtgtta 8820  
 aattgctatt taaaaaaaaa gacggctggg cgctgtggct catgcctgta atcccagcac 8880  
 40 tttgggaggc caaggcaagt tgatcgctcg aggtcaagag ttcgagacca gcctggccaa 8940  
 cgtggtaaaa ccccgctctc actaaaaata caaaaaaaaaa attagccagg catgggtggca 9000  
 caggcctgta atcccagcta ctaggaggc tgagacatgg agaactgctt gaatccagga 9060  
 45 ggagaggtt acagtgagcc gagatcatac cactacactc cagcctgagt gacagagcga 9120  
 gactcctgtc taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagatacagg ttaagtgtta tggtagttga 9180  
 agagagaact caaactctgt ctcagaagcc tcacttgcac gtggaccact gatatgaaat 9240  
 50 aatataaata ggtataattc aataaatagg aacttcagtt ttaatcatcc caaacaccaa 9300

	aacttcctat	caaacaggtc	caataaactc	aatctctata	agagctagac	agaaatctac	9360
	ttggtggcct	ataatcttat	tagcccttac	ttgtcccatc	tgatattaat	taaccccatc	9420
5	taatatggat	tagttaacaa	tccagtggtc	gctttgacag	gaacagttgg	agagagttgg	9480
	ggattgcaac	atattcaatt	atacaaaaat	gcattcagca	tctaccttga	ttaaggcagt	9540
	gtgcaacaga	atgtgcagga	gagtaaaaga	atgattataa	atttacaacc	cttaaagagc	9600
10	tatagctggg	cgtgggtggc	catgcctgta	aatcccagca	ctttgggagg	ctgaggcggg	9660
	tggatcacct	gaggccagaa	gttcaagacc	agcctagcca	acatggcgaa	accctgtctc	9720
	tacaaaaaat	acaaaaatta	gccgggtgtg	gtggcacgtg	cctgtagtcc	cagttacttg	9780
15	ggaggccgag	gcaggagaat	cgcttgaacc	taggaggtgg	aggctgcagt	gagccgagat	9840
	tgtgccactg	cactccactt	cagcctgggc	gacaagagca	agactccgtc	acaaaaaaaa	9900
	aaaaaaaaaa	aaagcttaaa	atctagtggg	aaaggcatat	atacatacaa	ctaactgtat	9960
20	agcataataa	agctcataat	ctgtaacaaa	atctaattcg	acaagcccag	aaacttgtga	10020
	tttaccacaaa	acagttatat	atacacacaaa	agtaaaccta	gaacccaaag	ttaccagca	10080
	ccaatgattc	tctccctaag	cagtatcaag	tttaaagcag	tgattacatt	ctactgccta	10140
25	gattgtaaac	tgagtaaagg	agaccagcac	ctttctgcta	ctgaactagc	acagccgtgt	10200
	aaaccaacaa	ggcaatggca	gtgcccaact	ttctgtatga	atataagtta	catctgtttt	10260
	attatttgtg	acttgggtgt	gcatgtggtt	attatcaaca	ccttctgaaa	gaacaactac	10320
30	ctgctcaggc	tgccataaca	aaataccaca	gactgagtga	cttaacagaa	acttatttct	10380
	cacagttttg	gaggctggga	agtccaaaat	taaggtacct	gcaaggtagg	tttcaatctc	10440
	aggcctcttc	tttggcttga	aggtcttcta	actgtgtgct	cacatgacct	cttctaacaa	10500
35	gctctctggt	gtctcttttt	tttttttttt	cttttttgag	acagagtctc	actctgtcac	10560
	ccaggctgga	gtacagtggc	acaatctggg	ctcactgcaa	cctccaactc	ccgggttcaa	10620
	gtgattctca	tgctcacc	tcccagtag	cttggatgac	aggagcccgc	taccacacc	10680
40	agctaatttt	tgtattttta	gtagagatgg	tgtttacta	cattggccag	gctggtctca	10740
	aactcctgac	ctcgtgatcc	accaccttg	gcctcccaaa	gtgctgggat	tacaggtgtg	10800
	agccactgcg	cccgtcctgg	tgtcttttca	tataagggca	ctaaccaat	cagacctggg	10860
45	cccggcgcgc	aattaaccct	cactaaaggg	aacaaaagct	ggagctccac	cgcggtggcg	10920
	gccgctctag	aactagtgga	tcgggcccga	gctctcgcga	ccgggctgca	ggaattcgat	10980
	cgcgctctag	ctgcgctgtc	ggggccaggc	cgggctccca	gtggattcgc	gggcacagac	11040
50	gcccaggacc	gcgcttccca	cgtggcggag	ggactgggga	cccgggcacc	cgctctgccc	11100

5 cttcaccttc cagctccgcc tcctccgcgc ggaccccgcc ccgtcccgcac cectcccggg 11160  
 tccccggccc agccccctcc gggccctccc agccccctccc cttectttcc gcggccccgc 11220  
 cctctcctcg cggcgcgagt ttcaggcagc gctgctcct gctgctcagc tgggaagccc 11280  
 tggcctggcg gatgtgtgac atacacgacg ccaaaagatt ttgttcagc tcctgccacc 11340  
 tccgctacgc gagagattaa ccaccacga tggccgcaa agtgcattgt gatattgagg 11400  
 10 ctgacagccc attcatcaag tctttgcaga aggcatttcc gtcgttcgag gtggagtcat 11460  
 tgcaggtcac accaaatgac catgcaaatg ccagagcatt ttcgcacctg gctaccaaat 11520  
 tgatcgagca ggagactgac aaagacacac tcatcttggga tatcggcagt gcgccttcca 11580  
 15 ggagaatgat gtctacgcac aaataccact gcgtatgccc tatgctcagc gcagaagacc 11640  
 ccgaaaggct cgtatgctac gcaaagaaac tggcagcggc ctccgggaag gtgctggata 11700  
 gagagatcgc aggaaaaatc accgacctgc agaccgtcat ggctacgcca gacgctgaat 11760  
 20 ctctacctt ttgcctgcat acagacgtca cgtgtcgtac ggcagccgaa gtggccgtat 11820  
 accaggacgt gtatgctgta catgcaccaa catcgtgta ccatcaggcg atgaaagggtg 11880  
 tcagaacggc gtattggatt gggtttgaca ccaccctgtt tatgtttgac gcgctagcag 11940  
 25 gcgcgtatcc aacctacgcc aaaaactggg ccgacgagca ggtgttacag gccaggaaca 12000  
 taggactgtg tgcagcatcc ttgactgagg gaagactcgg caaactgtcc attctccgca 12060  
 agaagcaatt gaaaccttgc gacacagtca tgttctcggg aggatctaca ttgtactctg 12120  
 30 agagcagaaa gctactgagg agctggcact taccctcgt attccacctg aaaggtaaac 12180  
 aatcctttac ctgtaggtgc gataccatcg tatcatgtga agggtagcgt gtttaaaaa 12240  
 tcaactatgtg ccccgccctg tacggtaaaa cggtagggta cgccgtgacg tatcacgcgg 12300  
 35 agggattcct agtgtgcaag accacagaca ctgtcaaagg agaaagagtc tcattccctg 12360  
 tatgcacctc cgtcccctca accatctgtg atcaaatgac tggcactacta gcgaccgacg 12420  
 tcacaccgga ggacgcacag aagttgttag tgggattgaa tcagaggata gttgtgaacg 12480  
 40 gaagaacaca gcgaaacact aacacgatga agaactatct gcttccgatt gtggccgtcg 12540  
 catttagcaa gtgggcgagg gaatacaagg cagaccttga tgatgaaaaa cctctgggtg 12600  
 tccgagagag gtcacttact tgctgctgct tgtgggcatt taaaacgagg aagatgcaca 12660  
 45 ccatgtacaa gaaaccagac acccagacaa tagtgaagg gccttcagag tttactcgt 12720  
 tcgtcatccc gagcctatgg tctacaggcc tcgcaatccc agtcagatca cgcattaaga 12780  
 tgcttttggc caagaagacc aagcgagagt taatacctgt tctcagcgcg tcgtcagcca 12840  
 50 gggatgctga acaagaggag aaggagagg tggaggccga gctgactaga gaagccttac 12900

caccctcgt ccccatcgcg ccggcggaga cgggagtcgt cgacgtcgac gttgaagaac 12960  
 tagagtatca cgcaggtgca ggggtcgtgg aaacacctcg cagcgcgttg aaagtcaccg 13020  
 5 cacagccgaa cgacgtacta ctaggaaatt acgtagttct gtccccgcag accgtgctca 13080  
 agagctccaa gttggcccc gtgcaccctc tagcagagca ggtgaaaata ataacacata 13140  
 acgggagggc gggcggttac caggtcgacg gatatgacgg cagggtccta ctaccatgtg 13200  
 10 gatcggccat tccggtccct gagtttcaag ctttgagcga gagcgccact atgggtgtaca 13260  
 acgaaagggg gttcgtcaac aggaaactat accatattgc cgttcacgga ccgtogctga 13320  
 acaccgacga ggagaactac gagaaagtca gagctgaaag aactgacgcc gagtacgtgt 13380  
 15 tcgacgtaga taaaaaatgc tgcgtcaaga gagaggaagc gtcgggtttg gtggtggtgg 13440  
 gagagctaac caacccccg ttccatgaat tcgcctacga agggctgaag atcaggccgt 13500  
 cggcaccata taagactaca gtagtaggag tctttggggg tccgggatca ggcaagtctg 13560  
 20 ctattattaa gagcctcgtg accaaacacg atctggtcac cagcggcaag aaggagaact 13620  
 gccaggaaat agttaacgac gtgaagaagc accgcgggaa ggggacaagt agggaaaaca 13680  
 gtgactccat cctgctaaac ggggtgctgc gtgccgtgga catcctatat gtggacgagg 13740  
 25 ctttcgcttg ccattccggt actctgctgg ccctaattgc tcttggtaaa cctcggagca 13800  
 aagtgggtgt atgcggagac cccaagcaat gcggattctt caatatgatg cagcttaagg 13860  
 tgaacttcaa ccacaacatc tgcaactgaag tatgtcataa aagtatatcc agacgttgca 13920  
 30 cggtccagt cacggccatc gtgtctacgt tgcaactacgg aggcaagatg cgcacgacca 13980  
 acccgtgcaa caaacccata atcatagaca ccacaggaca gaccaagccc aagccaggag 14040  
 acatcgtgtt aacatgcttc cgaggctggg caaagcagct gcagttggac taccgtggac 14100  
 35 acgaagtcac gacagcagca gcatctcagg gcctcaccocg caaaggggta tacgccgtaa 14160  
 ggcagaaggt gaatgaaaat cccttgatg cccctgcgtc ggagcacgtg aatgtactgc 14220  
 tgacgcgcac tgaggatagg ctggtgtgga aaacgctggc cggcgatccc tggattaagg 14280  
 40 tcctatcaaa cattccacag ggtaacttta cggccacatt ggaagaatgg caagaagaac 14340  
 acgacaaaat aatgaaggtg attgaaggac cggctgcgcc tgtggacgcg ttccagaaca 14400  
 aagcgaacgt gtggtgggcg aaaagcctgg tgccctgctc ggacactgcc ggaatcagat 14460  
 tgacagcaga ggagtggagc accataatta cagcatttaa ggaggacaga gcttactctc 14520  
 45 cagtgggtggc cttgaatgaa atttgcacca agtactatgg agttgacctg gacagtggcc 14580  
 tgttttctgc cccgaaggtg tccctgtatt acgagaacaa ccaactgggat aacagacctg 14640  
 gtggaaggat gtatggattc aatgcccga cagctgccag gctggaagct agacatacct 14700  
 50

tcctgaaggg gcagtggcat acgggcaagc aggcagttat cgcagaaaga aaaatccaac 14760  
 cgctttctgt gctggacaat gtaattccta tcaaccgcag gctgccgcac gccctgggtg 14820  
 5 ctgagtacaa gacggttaa ggcagtaggg ttgagtggct ggtcaataaa gtaagaggg 14880  
 accacgtcct gctggtgagt gagtacaacc tggctttgcc tcgacgcagg gtcacttgg 14940  
 tgtcaccgct gaatgtcaca ggcgccgata ggtgctacga cctaagtta ggactgccg 15000  
 10 ctgacgccgg caggttcgac ttggtctttg tgaacattca cacggaattc agaatccacc 15060  
 actaccagca gtgtgtcgac cacgccatga agctgcagat gcttggggga gatgcgctac 15120  
 gactgctaaa acccggcggc atcttgatga gagcttacgg atacgccgat aaaatcagcg 15180  
 15 aagccgttgt ttctctctta agcagaaagt tctcgtctgc aagagtgttg cggccggatt 15240  
 gtgtcaccag caatacagaa gtgttcttgc tgttctccaa ctttgacaac ggaaagagac 15300  
 cctctacgct acaccagatg aataccaagc tgagtgccgt gtatgccgga gaagccatgc 15360  
 20 acacggccgg gtgtgcacca tcctacagag ttaagagagc agacatagcc acgtgcacag 15420  
 aagcggctgt ggttaacgca gctaaccgcc gtggaactgt aggggatggc gtatgcaggg 15480  
 ccgtggcgaa gaaatggccg tcagccttta agggagcagc aacaccagtg ggcacaatta 15540  
 25 aaacagtcac gtgcggctcg taccctctca tccacgctgt agcgcctaat ttctctgcca 15600  
 cgactgaagc ggaaggggac cgcgaattgg ccgctgtcta ccgggcagtg gccgccgaag 15660  
 taaacagact gtcactgagc agcgtagcca tcccgctgct gtccacagga gtgttcagcg 15720  
 30 gcggaagaga taggctgcag caatccctca accatctatt cacagcaatg gacgccacgg 15780  
 acgctgacgt gaccatctac tgcagagaca aaagttggga gaagaaaatc caggaagcca 15840  
 ttgacatgag gacggctgtg gagttgctca atgatgacgt ggagctgacc acagacttgg 15900  
 35 tgagagtgca cccggacagc agcctgggtg gtcgtaaggg ctacagtacc actgacgggt 15960  
 cgctgtactc gtactttgaa ggtacgaaat tcaaccaggc tgctattgat atggcagaga 16020  
 tactgacgtt gtggcccaga ctgcaagagg caaacgaaca gatatgcta tacgcgctgg 16080  
 40 gcgaaacaat ggacaacatc agatccaaat gtccggtgaa cgattccgat tcatcaacac 16140  
 ctcccaggac agtgccctgc ctgtgccgct acgcaatgac agcagaacgg atcggccgcc 16200  
 ttaggtcaca ccaagttaa agcatgggtg tttgctcate ttttcccctc ccgaaatacc 16260  
 45 atgtagatgg ggtgcagaag gtaaagtgcg agaaggttct cctgttcgac ccgacggtac 16320  
 cttcagtgg tagtccgcgg aagtatgcc catctacgac ggaccactca gatcggctgt 16380  
 tacgaggggt tgacttggac tggaccaccg actcgtcttc cactgccagc gataccatgt 16440  
 50 cgctaccagc tttgcagtcg tgtgacatcg actcgatcta cgagccaatg gctcccatag 16500

tagtgacggc tgacgtacac cctgaacccg caggcatcgc ggacctggcg gcagatgtgc 16560  
accctgaacc cgcagaccat gtggacctcg agaaccgat tcctccaccg cgcccgaaga 16620  
5 gagctgcata ccttgccctc cgcgcggcgg agcgaccggt gccggcgccg agaaagccga 16680  
cgctgcccc aaggactgcg tttaggaaca agctgccttt gacgttcggc gactttgacg 16740  
agcacgaggt cgatgcggtg gcctccggga ttactttcgg agacttcgac gacgtcctgc 16800  
10 gactaggccg cgcgggtgca tatattttct cctcggacac tggcagcggga catttacaac 16860  
aaaaatccgt taggcagcac aatctccagt ggcacaaact ggatgcggtc caggaggaga 16920  
aaatgtaccc gccaaaattg gatactgaga gggagaagct gttgctgctg aaaatgcaga 16980  
15 tgcacccatc ggaggctaata aagagtcgat accagtcctc caaagtggag aacatgaaag 17040  
ccacggtggt ggacaggctc acatcggggg ccagattgta cacgggagcg gacgtaggcc 17100  
gcataccaac atacgcggtt cggtaacccc gccccgtgta ctcccctacc gtgatcgaaa 17160  
20 gattctcaag ccccgatgta gcaatcgcag cgtgcaacga atacctatcc agaaattacc 17220  
caacagtggc gtcgtaccag ataacagatg aatacgcgc atacttgac atggttgacg 17280  
ggtcggatag ttgcttgac agagcgacat tctgccggc gaagctccgg tgctaccga 17340  
25 aacatcatgc gtaccaccag ccgactgtac gcagtgcgt cccgtcacc tttcagaaca 17400  
cactacagaa cgtgctagcg gccgccacca agagaaactg caacgtcacg caaatgcgag 17460  
aactaccac catggactcg gcagtgttca acgtggagt cttcaagcgc tatgcctgct 17520  
30 ccggagaata ttgggaagaa tatgctaaac aacctatccg gataaccact gagaacatca 17580  
ctacctatgt gaccaaattg aaaggcccga aagctgctgc cttgttcgct aagaccaca 17640  
acttggttcc gctgcaggag gttcccatgg acagattcac ggtcgacatg aaacgagatg 17700  
35 tcaaagtcac tccagggacg aaacacacag aggaaagacc caaagtccag gtaattcaag 17760  
cagcggagcc attggcgacc gcttacctgt gcggcatcca cagggaatta gtaaggagac 17820  
taaatgctgt gttacgcct aacgtgcaca cattgtttga tatgtcggcc gaagactttg 17880  
40 acgcgatcat cgctctcac ttccaccag gagaccggt tctagagacg gacattgcat 17940  
cattcgaaa aagccaggac gactccttgg ctcttacagg tttaatgatc ctcgaagatc 18000  
taggggtgga tcagtacctg ctggacttga tcgaggcagc ctttggggaa atatccagct 18060  
45 gtcacctacc aactggcacg cgcttcaagt tcggagctat gatgaaatcg ggcattgttc 18120  
tgactttggt tattaacact gttttgaaca tcaccatagc aagcagggta ctggagcaga 18180  
gactcactga ctccgcctgt gggccttca tcggcgacga caacatcgtt cacggagtga 18240  
50 tctccgaaa gctgatggcg gagaggtgcg cgtcgtgggt caacatggag gtgaagatca 18300

ttgacgctgt catgggcgaa aaacccccat atttttgtgg gggattcata gtttttgaca 18360  
 gcgtcacaca gaccgcctgc cgtgtttcag acccacttaa gcgcctgttc aagttgggta 18420  
 5 agccgctaac agctgaagac aagcaggacg aagacaggcg acgagcactg agtgacgagg 18480  
 ttagcaagtg gttccggaca ggcttggggg ccgaactgga ggtggcacta acatctaggt 18540  
 atgaggtaga gggctgcaaa agtatcctca tagccatggc caccttggcg agggacatta 18600  
 10 aggcgtttaa gaaattgaga ggacctgtta tacaccteta cggcggtcct agattggtgc 18660  
 gttaatacac agaattctga ttggatctcg aggtcgacgg tatcgataag cttgggctgc 18720  
 aggtcgatcg actctagagg atcgatcccc accatgggtc aatcacgcta cctcctcttt 18780  
 15 ttggccaccc ttgcctcct aaaccacctc agtttggcca gggtcattcc agtctctgga 18840  
 cctgccaggt gtcttagcca gtcccgaaac ctgctgaaga ccacagatga catggtgaag 18900  
 acggccagag aaaaactgaa acattattcc tgcactgctg aagacatcga tcatgaagac 18960  
 20 atcacacggg accaaaccag cacattgaag acctgtttac cactggaact acacaagaac 19020  
 gagagttgcc tggctactag agagacttct tccacaacaa gagggagctg cctgccccca 19080  
 cagaagacgt ctttgatgat gaccctgtgc cttggtagca tctatgagga cttgaagatg 19140  
 25 taccagacag agttccaggc catcaacgca gcacttcaga atcacaacca tcagcagatc 19200  
 attctagaca agggcatgct ggtggccatc gatgagctga tgcagtctct gaatcataat 19260  
 ggcgagactc tgcgccagaa acctcctgtg ggagaagcag acccttacag agtgaaaatg 19320  
 30 aagctctgca tcttgcttca cgccttcagc acccgcgtcg tgaccatcaa cagggtgatg 19380  
 ggctatctga gctccgctg agaattccgc cctctcct ccccccccc taacgttact 19440  
 ggccgaagcc gcttgaata aggccggtgt gcgtttgtct atatgttatt ttccaccata 19500  
 35 ttgccgtctt ttggcaatgt gagggcccgg aaacctggcc ctgtcttctt gacgagcatt 19560  
 cctaggggtc tttcccctct cgccaaagga atgcaaggtc tgttgaatgt cgtgaaggaa 19620  
 gcagttcctc tggaagcttc ttgaagacaa acaacgtctg tagcgaccct ttgcaggcag 19680  
 40 cggaaccccc cacctggcga cagggtgctc tgcggccaaa agccacgtgt ataagataca 19740  
 cctgcaaagg cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt ggatagttgt ggaaagagtc 19800  
 aatggctct cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgccagaa ggtacccat 19860  
 45 tgtatgggat ctgatctggg gcctcgggtc acatgcttta catgtgttta gtcgaggta 19920  
 aaaaacgtct aggcccccg aaccacgggg acgtggtttt cctttgaaaa acacgatgat 19980  
 aatatggcca caacctagg tcctcagaag ctaaccatct cctggtttgc catcgttttg 20040  
 50 ctggtgtctc cactcatggc catgtgggag ctggagaaag acgtttatgt tgtagagggtg 20100



gactggactc ccgatgcccc tggagaaaca gtgaacctca cctgtgacac gcctgaagaa 20160  
 gatgacatca cctggacctc agaccagaga catggagtca taggctctgg aaagacctg 20220  
 5 accatcactg tcaaagagtt tctagatgct ggccagtaca cctgccacaa aggaggcgag 20280  
 actctgagcc actcacatct gctgctccac aagaaggaaa atggaatttg gtccactgaa 20340  
 attttaaaaa atttcaaaaa caagactttc ctgaagtgtg aagcaccaaa ttactccgga 20400  
 10 cggttcacgt gctcatggct ggtgcaaaga aacatggact tgaagttcaa catcaagagc 20460  
 agtagcagtt ccctgactc tcgggcagtg acatgtggaa tggcgtctct gtctgcagag 20520  
 aaggtcacac tggaccaaag ggactatgag aagtattcag tgtcctgcca ggaggatgtc 20580  
 15 acctgcccaa ctgccgagga gaccctgcc attgaactgg cgttggaagc acggcagcag 20640  
 aataaatatg agaactacag caccagcttc ttcacaggg acatcatcaa accagacctg 20700  
 cccaagaact tgcagatgaa gcctttgaag aactcacagg tggaggtcag ctgggagtac 20760  
 20 cctgactoct ggagcactcc ccattcctac ttctccctca agttctttgt tcgaatccag 20820  
 cgcaagaaag aaaagatgaa ggagacagag gagggggtgta accagaaagg tgcgttctc 20880  
 gtagagaaga catctaccga agtccaatgc aaaggcggga atgtctgcgt gcaagctcag 20940  
 25 gatcgctatt acaattcctc atgcagcaag tgggcatgtg ttccctgcag ggtccgatcc 21000  
 tagaattcat tgatccaacta ggatcccggg taattaattg aattacatcc ctacgcaaac 21060  
 gttttacggc cgccgggtggc gcccgcgccc ggcggcccgt ccttggccgt tgcaggccac 21120  
 30 tccggtggct ccgctcgtcc ccgacttcca ggcccagcag atgcagcaac tcatcagcgc 21180  
 cgtaaatgcy ctgacaatga gacagaacgc aattgctcct gctaggcctc ccaaaccaaa 21240  
 gaagaagaag acaaccaaac caaagccgaa aacgcagccc aagaagatca acggaaaaac 21300  
 35 gcagcagcaa aagaagaaag acaagcaagc cgacaagaag aagaagaaac ccggaaaaag 21360  
 agaaagaatg tgcatgaaga ttgaaaatga ctgtatcttc gtatgaggct agccacagta 21420  
 acgtagtggt tccagacatg tcgggcaccg cactatcatg ggtgcagaaa atctcgggtg 21480  
 40 gtctgggggc cttcgcaatc ggcgctatcc tgggtgctggt tgtggtcact tgcattgggc 21540  
 tccgcagata agttagggtg ggcaatggca ttgatatagc aagaaaattg aaaacagaaa 21600  
 aagttagggt aagcaatggc atataaccat aactgtataa cttgtaacaa agcgcaacaa 21660  
 45 gacctgcgca attggccccg tggtcgcct cacggaaact cggggcaact catattgaca 21720  
 cattaattgg caataattgg aagcttacat aagcttaatt cgacgaataa ttggatTTTT 21780  
 attttatttt gcaattgggt tttaatattt ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 21840  
 50 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aactagatcc tcgaatcaag 21900

cttatcgata ccgtcgacta gagtcggggc ggccggccgc ttcgagcaga catgataaga 21960  
 tacattgatg agtttgaca aaccacaact agaatgcagt gaaaaaatg ctttatttgt 22020  
 5 gaaatttgtg atgctattgc tttatttgt accattataa gctgcaataa acaagttaac 22080  
 aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg aggtgtggga ggttttttaa 22140  
 agcaagtaaa acctctacaa atgtggtaaa atcgataagg atctcgacct cgaggggggg 22200  
 10 cccggtagcc aattcgcct atagtgagtc gtattacgag cgcccctgca gggggccctg 22260  
 taccgggctc tgcctgaggc tctggctgcc cagcaggctg aagctggggg tgttggccag 22320  
 gggcacttgt gttcccatcg cagcgggac ttgtgcctcc caatcagatg gcctctgaag 22380  
 gcaggcctgg ccagaagggt agtgctgctg aacgctatta tccacttggc tgaggggtgt 22440  
 15 tttccccgaa actgctgtgg tcacagctgc tgccgctgtg acccatgcag cattgttgaa 22500  
 cgcagtgggc attcttggca cactaggccg tctgagctgg tggggactca aggactgggt 22560  
 gccaggagg ctgggacaga acccaggcag gggcacttct ggtgggggtg ccttggggct 22620  
 20 ctgcatatgc tggcagacag agtcaagtct gcccagggga gtctggcctg agtgtgagag 22680  
 gatgggacac tgggggctgg aggtgaaaat tccttgccgc tccccagag ttggtgagat 22740  
 cactcccatg ccctcgcagc tctggctgct ggtgagtggg atcattcctg gactcagatt 22800  
 25 gttctgaaga agcccagttc tgggtggcat caagtgctg ctagatgggg ggcttgcctt 22860  
 gatccggcta cacttggagg tgacttgctc ttggacggct acatacagaa agagagaagt 22920  
 ggggatgagt tccaaaggca tcctcgactt cggctgtggc caccggaggg tagctcctgg 22980  
 30 cccaacacgg acttctcacc tcccgcctt ggctctctac tgagctcccc cctgctcccc 23040  
 aattcctcgc cattcccctc atttctctgc cctcagcctg gactgcagtt cttctgggaa 23100  
 gctgccccaa ctccctaggt ctgtgctcac caagagcaga tcacactgga ctgaaatgcc 23160  
 35 agctgatttg tctctcaag aaaattggaa gctcctggag gtcaggggtc atgtctgctt 23220  
 ttacactcag tgctctgtat gcaggcctgg cactgcccac cctttgacag gtggtgcata 23280  
 tttttagtaa ggaaggaagg ggccagggtg ggtgggctgg gctgggtggc ggagctagct 23340  
 40 cagcctctta gattctctac ccgatggatg tgacctggga cagcaagtga gtgtggtgag 23400  
 tgagtgcaga cggctcttg tccccctct gtctcatagc ctagatggcc tctgagccca 23460  
 gatctggggc tcagacaaca tttgttcaac tgaacggtaa tgggtttcct ttctgaaggc 23520  
 45 tgaaatctgg gagctgacat tctggactcc ctgagttctg aagagcctgg ggatggagag 23580  
 acacggagca gaagatggaa ggtagagtcc caggtgccta agatggggaa tacatctccc 23640  
 50 ctcatgtca tgagagtcca ctctagctga tatctactgt ggccaatata taccgggtact 23700

tttttggggt ggacactgag tcatgcagca gtcttatggt ttaccaagg tcaggtaggg 23760  
 gagacagtgc agtcagagca caagcccagt gtgtctgacc cacccaagaa tccatgctcg 23820  
 5 tatctacaaa aatgattttt tctcttgtaa tgggtgcctag gttcttttat tatcatggca 23880  
 tgtgtatggt tttcaactag gttacaatct ggccttataa ggttaacctc ctggaggcca 23940  
 ccagccttcc tgaaaacttg ctgtgctgtc cctgcaactg gagtgtgcct gatgtggcac 24000  
 10 tccagcctgg acaagtggga cacagactcc gctgttatca ggcccaaaga tgtcttccat 24060  
 aagaccagaa gagcaatggt gtagagggtg catgggctac aataaagatg ctgacctcct 24120  
 gtctgagggc aagcagcctc ttctggccct cagacaaatg ctgagtgttc ccaagactac 24180  
 15 cctgggctg gtccaatctc atcccactgg tgcgtaaggg ttgctgaact catgacttct 24240  
 tggctagcct gcaacctcca cggagtggga actacatcag gcattttgct aactgctgta 24300  
 tcctaggcca ataaatgttg atcacattta tagctgccat ggtaggggtg ggacctctgc 24360  
 20 tatctatctg tggaggctct gggagccct gacacaaact ttctgaagca gaggctcccc 24420  
 aaccctttt ccattcccta tacctgacag atggcccagg aaccattag aaatggaagg 24480  
 tcactgcagc agtatgtgaa tgtgcgtgtg ggagaagggc aggatcagag ccctgggggt 24540  
 25 gtggcagccc ccaagtgatt ctaatocaga tcctaggggt gtttccctgt ccattgaaa 24600  
 tagctgcttt aaggggctg actcagggaa atcagtctct tgaattaagt ggtgattttg 24660  
 gagtcattta gaccaggcct tcaattggga tcctgctctt agagttggat gaattattta 24720  
 30 actgattttc agatctctc tttctcaatg ctttcagaag cacagtaact gcttactctg 24780  
 aatgaattc tcaccccact tccacatatg cacccttgc ccacccttt gggaactg 24840  
 gccttaactg cttacctca aatggactca tctgttggga gatatatgca ttctgccgtt 24900  
 35 caggggtcat tgccataaga cctgatctct gttcctcttg ctaaacagaa gatgaaaaag 24960  
 acaaattaga ttacagctac caattaataa ttagccttag gatcgctgcg tggggacct 25020  
 ggacttggct ttggtgcagc agaaagcatg aataaacaca ccagcataca ctcgcatgca 25080  
 40 tgccccaccc tctcgagcaa aattccacag gtataaataa agtaagattc tgcacctggg 25140  
 ttaaaaacac aactgcaaca gcatagaatg gggcaggaga gacagaactt aatagcaaga 25200  
 gcacacagaa aaaagtttta ggcattttgg atgtccatct gctcaggatg ggtcagcagt 25260  
 45 gagatgcggt caccaaaaga acaaatgtaa cattaggctg cattaataga agcagagtat 25320  
 gtagaaggag ggaggtgaca gtcctatgct aactctgcct tggccagact ataccacag 25380  
 gagtctgggc atgccagtct cagggagacc cagacagact ggctgcattc agaggatggt 25440  
 50 aagtaatgag agtggggatt ggacttcaaa ctaccagac aaagaatggc tgagcaagcc 25500

aaggatgctg tggctggggc agagcagact gtgggctatg tagtgggtgga tacctagcct 25560  
ctgcagggct gtcataggga aaggacattg agaagaggac tgaggcttgt tccctgggtgt 25620  
5 cctggcatga acggccagat gatcacatgg tcaggtggac acagtctcca aactggggag 25680  
tagccaaaca cttactgcca acctcccgcc cttctcctga ctagttgcag cataggcaat 25740  
tgggaggagc ttccctgtctc catctgaaag ctggctgggt gggcaggggg aggagcgagc 25800  
10 caagtttcaa ggccgcagtt tcagcactca gtctgggatc ggctcaagga gcaaagggga 25860  
agaacatagc caggagggaa taacatgaag gccccagac ccagaaaagg catgacttgc 25920  
tctgagacce tcagccggtt ggtgtcaggt tgtgactcgg atccaggtct gactcccagt 25980  
15 ccagtgettg aagcctcacc ccacacagtg aggggagccc ggccatctct gctcaactgc 26040  
tgccatctct ctccccttct caaccaccaa ggcagctctg tctgggagca caagctccaa 26100  
gtccacttctc tggctctgtgt ccccccaag atgccagagg acttgectct acaacacggg 26160  
20 ctgcccgtgc agtgccctgct tttccagcaa agggcttctg ggaacccttc tctgactca 26220  
gtggggctgg tgggagtggg gcggggtagc gaccagtgct ttgggactgt gccagctct 26280  
caggcctggc agcagttcct ggccttgggt cctgccaaagg cagagaggac aaacacatgg 26340  
25 caccgggaag actacaccag aagcgattcc accagactgg ggtttgcttt tctatcccgc 26400  
ccttagcctg cttcctgtcc tggctcctgc ctcccctcc actggagctg ccgtgtgggc 26460  
agtgaggggc tgtttctcag ctgccctatg gagctgccct ctccctgcca aagcattggc 26520  
30 aaggcggcaa ggggtggggg tggggatggg ggggtgggatc tgccttctca agctctcatt 26580  
atactgagca cgtctcacc cttatatttat gtcacttagc aacaccccat gtggactctg 26640  
aggagcatgg gggtcacatg accactgccc aaggccacac catccggatc tgcctgagat 26700  
35 ggtcaggggt ggcagccatt tctgaaggca gtccttctgc tttggctctt cttgtaccag 26760  
tctcaggaca tcagggcaga agatctacag tcccagctt actgatgtga cagcagaggc 26820  
tcagagaggt taaatgactt gcccaaggtg acacggctaa gaagtacagt atctcctaac 26880  
40 tgcagaccag gtgcttctgc tgettctggg gacagattcc tgcgtggctg gctaggtcta 26940  
aacggctcct aactccatcc ccaccggtt ctgcattagt ttcacaaat aacacagttg 27000  
tacagaggta ggggttcagg ggcaggggca gatggaggct ggagagtgtg actaaggaaa 27060  
45 cagcagggga agtgcggtaa agtccgaagg gagggacgga aagagaaagc caagcccagg 27120  
ggcgtgccag acaaaaggaa aggccacgcc ggggcagggc aggcttcagc ggggtgctggg 27180  
gcgctctcat cccgggaagc acacattcca gaggacccc gagtctaag gaaaagctgg 27240  
50 ccagcctatc actatggaaa ctgccaaagg cacacagcgc tgctgacacc cagcctgggt 27300

gcccgggtggcc agctctgcag gatcttcaag tctgggggtgc caccagcaag cgacggctct 27360  
 ccatggggctc ttcaccttac ggcagtgctc agaggcaccg ccagtcctct gctcctatgc 27420  
 5 tggctctgct gtcacctggca aaaggagcca gagcattctc tccaggcctc ccgaggaggc 27480  
 tgcttccttt gttttgcaga tggaggctcc catcctttgt tctgaatcaa tgtgctccaa 27540  
 agataagccc caagaaaaca gttggttgct tttgacactg acaattagaa tcggttgaaa 27600  
 10 atggagaaaa caggaaatgg caaatggttt cagtgaccag gaggaaaccg tgcctgaaag 27660  
 ttgctgctta gtgactggga cactcgcttt ctgctctctt atgaaggaca gcctaggccg 27720  
 tgtggccttt tataaacaata gctatgaagg ggtcgtcaaa ttttctaggg ctgcaactgt 27780  
 15 ggcactacgt cctggttgctc cagggtgacac tgacaagcag cactgagttc tatgcaagcc 27840  
 cagggtgtgct tctctcatgg tgacccccag agaactaagg cccagctctt cctctgtcac 27900  
 acccctccca gccccactg tcagacaagg gaccacattc acagacagtc tcagccaaga 27960  
 20 tggcaacctt ggaagtctct gggatgcctt tctagaagct cgcgccccta ggggccggcc 28020  
 ttaattaaat caagcttctc gataccgtcg agacctcgag ggggggcatc actccgcctt 28080  
 aaaactacg tcacccgccc cgttcccacg ccccgcgcca cgtcacaac tccacccctt 28140  
 25 cattatcata ttggcttcaa tccaaaataa ggtatattat tgatgatggt t 28191

30 <210> 11  
 <211> 5844  
 <212> ДНК  
 <213> Плазмида

35 <220>  
 <221> MCS  
 <222> (1) .. (25)  
 <223> Сайт множественного клонирования

40 <220>  
 <221> Энкхансер APF  
 <222> (26) .. (820)  
 <223> Энкхансер APF

45 <220>  
 <221> AFP pro  
 <222> (828) .. (1054)  
 <223> Промотор AFP

50 <400> 11  
 ggtaccgagc tcttacgctg gctagaattc gcctgtcata cagctaataa ttgaccataa 60  
 gacaattaga tttaaattag ttttgaatct ttctaatacc aaagtccagt ttactgttcc 120  
 atggttgcttc tgagtggctt cacagactta tgaaaaagta aacggaatca gaattacatc 180

aatgcaaaag cattgctgtg aactctgtac ttaggactaa actttgagca ataacacaca 240  
tagattgagg attgtttgct gtttagcatac aaactctggt tcaaagctcc tctttattgc 300  
5 ttgtcttgga aaatttgctg ttcttcatgg tttctctttt cactgctatc tatttttctc 360  
aaccactcac atggctacaa taactgtctg caagcttatg attcccaa atctatctct 420  
agcctcaatc ttgttccaga agataaaaag tagtattcaa atgcacatca acgtctccac 480  
10 ttggagggct taaagacgtt tcaacatata aaccggggag ttttgccctgg aatgtttctc 540  
aaaatgtgtc ctgtagcaca tagggctctc ttgttccctta aaatctaatt acttttagcc 600  
cagtgtcat cccacctatg gggagatgag agtgaaaagg gagcctgatt aataattaca 660  
15 ctaagtcaat aggcatagag ccaggactgt ttgggtaaac tggtcacttt atcttaaact 720  
aaatatatcc aaaactgaac atgtacttag ttactaagtc tttgacttta tctcattcat 780  
accactcagc tttatccagg ccacttattt gacagtctag ctagccccta gattttctgc 840  
cccaaagagc tctgtgtcct tgaacataaa atacaaataa ccgctatgct gttaattatt 900  
20 ggcaaatgtc ccattttcaa cctaaggaaa taccataaag taacagatat accaacaaaa 960  
ggttactagt taacaggcat tgcctgaaaa gagtataaaa gaatttcagc atgattttcc 1020  
atattgtgct tccaccactg ccaataacag gatcgggctc gagatctgcg atctaagtaa 1080  
25 gcttggcatt ccggtactgt tggtaaagcc accatggaag acgcaaaaa cataaagaaa 1140  
ggcccggcgc cattctatcc gctggaagat ggaaccgctg gagagcaact gcataaggct 1200  
atgaagagat acgccctggt tcctggaaca attgctttta cagatgcaca tatcgagggtg 1260  
30 gacatcactt acgctgagta cttcgaaatg tccgttcggg tggcagaagc tatgaaacga 1320  
tatgggctga atacaaatca cagaatcgtc gtatgcagtg aaaactctct tcaattcttt 1380  
atgccgggtg tgggcgcggt atttatcgga gttgcagttg cggccgcaa cgacatttat 1440  
35 aatgaacgtg aattgctcaa cagtatggc atttcgcagc ctaccgtggg gttcgtttcc 1500  
aaaaaggggt tgcaaaaaat tttgaacgtg caaaaaaagc tcccaatcat ccaaaaaatt 1560  
attatcatgg attctaaaac ggattaccag ggatttcagt cgatgtacac gttcgtcaca 1620  
40 tctcatctac ctcccgttt taatgaatac gattttgtgc cagagtcctt cgatagggac 1680  
aagacaattg cactgatcat gaactcctct ggatctactg gtctgcctaa aggtgtcgct 1740  
ctgcctcata gaactgcctg cgtgagattc tcgcatgcca gagatcctat ttttggaat 1800  
45 caaatcattc cggatactgc gattttaagt gttgttccat tccatcacgg ttttggaatg 1860  
tttactacac tcggatattt gatatgtgga tttcgagtcg tcttaatgta tagatttgaa 1920  
gaagagctgt ttctgaggag ccttcaggat tacaagattc aaagtgcgct gctgggtgcca 1980  
50

	accctattct	ccttcttcgc	caaaagcact	ctgattgaca	aatacgattt	atctaattta	2040
	cacgaaattg	cttctggtgg	cgctcccctc	tctaaggaag	tcggggaagc	ggttgccaag	2100
5	aggttccatc	tgccaggtat	caggcaagga	tatgggctca	ctgagactac	atcagctatt	2160
	ctgattacac	ccgaggggga	tgataaaccg	ggcgcggtcg	gtaaagttgt	tccatttttt	2220
	gaagcgaagg	ttgtggatct	ggataccggg	aaaacgctgg	gcgttaatca	aagaggcgaa	2280
10	ctgtgtgtga	gaggtcctat	gattatgtcc	ggttatgtaa	acaatccgga	agcgaccaac	2340
	gccttgattg	acaaggatgg	atggctacat	tctggagaca	tagcttactg	ggacgaagac	2400
	gaacacttct	tcategttga	ccgcctgaag	tctctgatta	agtacaaaag	ctatcagggtg	2460
15	gctcccgetg	aattggaatc	catcttgctc	caacacccca	acatcttcga	cgcagggtgc	2520
	gcaggctctc	ccgacgatga	cgccggtgaa	cttcccgcg	ccgttgttgt	tttgaggcac	2580
	ggaaagacga	tgacggaaaa	agagatcgtg	gattacgtcg	ccagtcaagt	aacaaccgcg	2640
20	aaaaagttgc	gcgaggaggt	tgtgtttgtg	gacgaagtac	cgaaaggtct	taccggaaaa	2700
	ctcgacgcaa	gaaaaatcag	agagatcctc	ataaaggcca	agaagggcgg	aaagatcgcc	2760
	gtgtaattct	agagtcgggg	cggccggccg	cttcgagcag	acatgataag	atacattgat	2820
25	gagtttgac	aaaccacaac	tagaatgcag	tgaaaaaaaa	gctttatttg	tgaaatttgt	2880
	gatgctattg	ctttatttgt	aaccattata	agctgcaata	aacaagttaa	caacaacaat	2940
	tgcattcatt	ttatgtttca	ggttcagggg	gaggtgtggg	aggtttttta	aagcaagtaa	3000
30	aacctctaca	aatgtggtaa	aatcgataag	gatccgtcga	ccgatgccct	tgagagcctt	3060
	caaccagtc	agctccttcc	ggtgggcgcg	gggcatgact	atcgtcgccg	cacttatgac	3120
	tgtcttcttt	atcatgcaac	tcgtaggaca	ggtgccggca	gcgctcttcc	gcttcctcgc	3180
35	tcactgactc	gctgcgctcg	gtcgttcggc	tgcggcgagc	ggtatcagct	cactcaaagg	3240
	cggtaatacg	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaaag	3300
	gccagcaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	cataggctcc	3360
40	gccccctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	aacccgacag	3420
	gactataaag	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	cctgttccga	3480
	ccctgccgct	taccggatac	ctgtccgcct	ttctcccttc	gggaagcgtg	gcgctttctc	3540
45	aatgctcacg	ctgtaggtat	ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tcgctccaag	ctgggctgtg	3600
	tgcacgaacc	ccccgttcag	cccgaccgct	gcgccttatc	cggtaaactat	cgtcttgagt	3660
	ccaaccggt	aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	3720
50	gagcgaggta	tgtaggcggt	gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	3780

	ctagaaggac	agtatttggc	atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	3840
	ttggtagctc	ttgatccggc	aaacaaacca	ccgctggtag	cggtgggttt	tttgtttgca	3900
5	agcagcagat	tacgcgcaga	aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	ttttctacgg	3960
	ggctctgacgc	tcagtggaac	gaaaactcac	gttaagggat	tttggctcatg	agattatcaa	4020
	aaaggatctt	cacctagatc	cttttaaat	aaaaatgaag	ttttaaatca	atctaaagta	4080
10	tatatgagta	aacttggctc	gacagttacc	aatgcttaat	cagtgaggca	cctatctcag	4140
	cgatctgtct	atttcgttca	tccatagttg	cctgactccc	cgctcgtgtag	ataactacga	4200
	tacgggaggg	cttaccatct	ggccccagtg	ctgcaatgat	accgcgagac	ccacgctcac	4260
15	cggtccaga	tttatcagca	ataaaccagc	cagccggaag	ggccgagcgc	agaagtggtc	4320
	ctgcaacttt	atccgcctcc	atccagtcta	ttaattggtg	ccgggaagct	agagtaagta	4380
	gttcgccagt	taatagtttg	cgcaacgttg	ttgccattgc	tacaggcatc	gtggtgtcac	4440
20	gctcgtcgtt	tggtatggct	tcattcagct	ccggttccca	acgatcaagg	cgagttacat	4500
	gatcccccat	gttgtgcaaa	aaagcggtta	gctccttcgg	tcctccgatc	gttgtcagaa	4560
	gtaagttggc	cgcagtgta	tcactcatgg	ttatggcagc	actgcataat	tctcttactg	4620
25	tcatgccatc	cgtaagatgc	ttttctgtga	ctggtgagta	ctcaaccaag	tcattctgag	4680
	aatagtgtat	gcggcgaccg	agttgctctt	gcccggcgctc	aatacgggat	aataccgctc	4740
	cacatagcag	aactttaaaa	gtgctcatca	ttggaaaacg	ttcttcgggg	cgaaaactct	4800
30	caaggatctt	accgctggtg	agatccagtt	cgatgtaacc	cactcgtgca	cccaactgat	4860
	cttcagcatc	ttttactttc	accagcgttt	ctgggtgagc	aaaaacagga	aggcaaaatg	4920
	ccgcaaaaaa	gggaataagg	gcgacacgga	aatggtgaat	actcactctc	ttcctttttc	4980
35	aatattattg	aagcatttat	cagggttatt	gtctcatgag	cggatacata	tttgaatgta	5040
	tttagaaaaa	taaacaaata	ggggttccgc	gcacatttcc	ccgaaaagtg	ccacctgacg	5100
	cgccctgtag	cgccgcatta	agcgcggcgg	gtgtggtggt	tacgcgcagc	gtgaccgcta	5160
40	cacttgccag	cgccctagcg	cccgcctcctt	tcgctttctt	cccttccttt	ctcgccacgt	5220
	tcgcccggctt	tccccgtcaa	gctctaaatc	gggggctccc	tttagggttc	cgatttagtg	5280
	ctttacggca	cctcgacccc	aaaaaacttg	attagggatg	tggttcacgt	agtgggcat	5340
45	cgccctgata	gacgggtttt	cgccctttga	cgttggagtc	cacgttcttt	aatagtggac	5400
	tcttgttcca	aactggaaca	acactcaacc	ctatctcggg	ctattctttt	gatttataag	5460
	ggattttgcc	gatttcggcc	tattggttaa	aaaatgagct	gatttaacaa	aaatttaacg	5520
50	cgaattttaa	caaaatatta	acgtttacaa	tttccattc	gccattcagg	ctgcgcaact	5580



gttgggaagg gcgatcggtg cgggcctctt cgctattacg ccagcccaag ctacatgat 5640  
 aagtaagtaa tattaaggta cgggaggtac ttggagcggc cgcaataaaa tatctttatt 5700  
 5 ttcattacat ctgtgtggtg gttttttgtg tgaatcgata gtactaacat acgctctcca 5760  
 tcaaaacaaa acgaaacaaa acaaactagc aaaataggct gtccccagtg caagtgcagg 5820  
 tgccagaaca tttctctatc gata 5844  
  
 10 <210> 12  
 <211> 2334  
 <212> ДНК  
 <213> Mus musculus  
  
 15 <400> 12  
 tcgaggtcga cggtatcgat aagcttgggc tgcaggtcga tcgactctag aggatcgatc 60  
 cccaccatgg gtcaatcacg ctacctctc tttttggcca cccttgccct cctaaaccac 120  
 ctcagtttg ccagggatc tccagtctct ggacctgcca ggtgtcttag ccagtccega 180  
 20 aacctgctga agaccacaga tgacatggtg aagacggcca gagaaaaact gaaacattat 240  
 tcctgcactg ctgaagacat cgatcatgaa gacatcacac gggaccaaac cagcacattg 300  
 aagacctggt taccactgga actacacaag aacgagagtt gcctggctac tagagagact 360  
 25 tcttccacaa caagagggag ctgcctgccc ccacagaaga cgtctttgat gatgaccctg 420  
 tgccttggtg gcatctatga ggacttgaag atgtaccaga cagagttcca ggccatcaac 480  
 gcagcacttc agaatcacia ccatcagcag atcattctag acaagggcat gctggtggcc 540  
 30 atcgatgagc tgatgcagtc tctgaatcat aatggcgaga ctctgcgcca gaaacctcct 600  
 gtgggagaag cagaccctta cagagtgaat atgaagctct gcatcctgct tcacgccttc 660  
 agcaccgcg tcgtgaccat caacagggtg atgggctatc tgagctccgc ctgagaattc 720  
 35 cgccccctc cctccccccc ccctaacgtt actggccgaa gccgcttggg ataaggccgg 780  
 tgtgcgtttg tctatatggt attttccacc atattgccgt cttttggcaa tgtgagggcc 840  
 cggaaacctg gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg gtctttccc tctcgccaaa 900  
 40 ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc ttcttgaaga 960  
 caaacaacgt ctgtagcgac cttttgcagg cagcgggaacc cccacctgg cgacaggtgc 1020  
 ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa aggcggcaca accccagtgc 1080  
 45 cacgttgtga gttggatagt tgtggaaaga gtcaaatggc tctcctcaag cgtattcaac 1140  
 aaggggctga aggatgccc gaaggtacc cattgtatgg gatctgatct ggggcctcgg 1200  
 tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg 1260  
 50 gggacgtggt tttcctttga aaaacacgat gataatatgg ccacaacat gggtcctcag 1320

aagctaacca tctcctgggt tgccatcggt ttgctgggtg ctccactcat ggccatgtgg 1380  
 gagctggaga aagacgttta tgttgtagag gtggactgga ctcccgatgc ccctggagaa 1440  
 5 acagtgaacc tcacctgtga cacgcctgaa gaagatgaca tcacctggac ctgagaccag 1500  
 agacatggag tcataggctc tggaaagacc ctgacatca ctgtcaaaga gtttctagat 1560  
 gctggccagt acacctgcca caaaggaggc gagactctga gccactcaca tctgctgctc 1620  
 10 cacaagaagg aaaatggaat ttggtccact gaaattttaa aaaatttcaa aaacaagact 1680  
 ttctgaagt gtgaagcacc aaattactcc ggacggttca cgtgctcatg gctggtgcaa 1740  
 agaaacatgg acttgaagtt caacatcaag agcagtagca gttcccctga ctctcgggca 1800  
 15 gtgacatgtg gaatggcgtc tctgtctgca gagaaggtea cactggacca aagggactat 1860  
 gagaagtatt cagtgtcctg ccaggaggat gtcacctgcc caactgccga ggagaccctg 1920  
 cccattgaac tggcgttggg agcacggcag cagaataaat atgagaacta cagcaccagc 1980  
 20 ttcttcatca gggacatcat caaaccagac ccgcccaaga acttgcatga gaagcctttg 2040  
 aagaactcac aggtggaggt cagctgggag taccctgact cctggagcac tccccattcc 2100  
 tacttctccc tcaagttctt tgttcgaatc cagcgcaaga aagaaaagat gaaggagaca 2160  
 25 gaggaggggt gtaaccagaa aggtgcggtc ctgtagaga agacatctac cgaagtccaa 2220  
 tgcaaaggcg ggaatgtctg cgtgcaagct caggatcgct attacaattc ctcatgcagc 2280  
 aagtgggcat gtgttcctg cagggtccga tcctagaatt cattgatcca ctag 2334  
 30 <210> 13  
 <211> 2336  
 <212> ДНК  
 <213> ЧЕЛОВЕК  
 35 <400> 13  
 ctgcagacca tgggtccagc gcgcagcctc ctcttgtgg ctaccctggg cctcctggac 60  
 cacctcagtt tggccagaaa cctccccgtg gccactccag acccaggaat gttcccatgc 120  
 cttcaccact cccaaaacct gctgagggcc gtcagcaaca tgctccagaa ggccagacaa 180  
 40 actctagaat tttacccttg cacttctgaa gagattgatc atgaagatat cacaaaagat 240  
 aaaaccagca cagtggaggc ctgtttacca ttggagttaa ccaagaatga gagttgccta 300  
 aattccagag agacctcttt cataactaat gggagttgcc tggcctccag aaagacctct 360  
 45 tttatgatgg ccctgtgcct tagtagtatt tatgaagact tgaagatgta ccaggtggag 420  
 ttcaagacca tgaatgcaaa gcttctgatg gatcctaaga ggcagatctt tctagatcaa 480  
 aacatgctgg cagttattga tgagctgatg caggccctga atttcaacag tgagactgtg 540  
 50

	ccacaaaaat cctcccttga agaaccggat ttttataaaa ctaaaatcaa gctctgcata	600
	cttcttcatg ctttcagaat tggggcagtg actattgata gaggacgag ctatctgaat	660
5	gcttccctaac tgcagaaggg cgaattccag cacactggcg gccgttacta ggggctgcag	720
	gaattccgcc cccccctctc cctccccccc ccctaacggt actggccgaa gccgcttgga	780
	ataaggccgg tgtgcggttg tctatatggt attttccacc atattgccgt cttttggcaa	840
10	tgtgagggcc cggaaacctg gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg gtctttcccc	900
	tctcgccaaa ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc	960
	ttcttgaaga caaacaacgt ctgtagcgac cctttgcagg cagcggaaacc ccccacctgg	1020
15	cgacaggtgc ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa agcggcacia	1080
	ccccagtgcc acgttgtgag ttggatagtt gtggaaagag tcaaatggct ctctcaagc	1140
	gtattcaaca aggggctgaa ggatgccag aaggtagccc attgtatggg atctgatctg	1200
20	gggcctcggg gcacatgctt tacatgtggt tagtcgaggt taaaaaacg tctaggcccc	1260
	ccgaaccacg gggacgtggt tttcctttga aaaacacgat gataatatgg ccacaacat	1320
	gggtcaccag cagttggtca tctcttggtt ttccctgggt tttctggcat ctcccctcgt	1380
25	ggccatatgg gaactgaaga aagatgttta tgtcgtagaa ttggattggt atccggatgc	1440
	ccctggagaa atggtggtcc tcacctgtga caccctgaa gaagatggtc tcacctggac	1500
	cttgaccag agcagtgagg tcttaggctc tggcaaaacc ctgaccatcc aagtcaaaga	1560
30	gtttggagat gctggccagt acacctgtca caaaggaggc gaggttctaa gccattcgtc	1620
	cctgctgctt cacaaaaagg aagatggaat ttggtccact gatattttaa aggaccagaa	1680
	agaacccaaa aataagacct ttctaagatg cgaggccaag aattattctg gacgtttcac	1740
35	ctgctggtgg ctgacgacia tcagtactga tttgacattc agtgtcaaaa gcagcagagg	1800
	ctcttctgac cccaagggg tgacgtgagg agctgctaca ctctctgcag agagagtcag	1860
	aggggacaac aaggagtatg agtactcagt ggagtgccag gaggacagtg cctgcccagc	1920
40	tgctgaggag agtctgccc ttgaggtcat ggtggatgcc gttcacaagc tcaagtatga	1980
	aaactacacc agcagcttct tcatcagggc catcatcaaa cctgaccac ccaagaactt	2040
	gcagctgaag ccattaaaga attctcggca ggtggaggtc agctgggagt accctgacac	2100
45	ctggagtact ccacattcct acttctccct gacattctgc gttcagggtc agggcaagag	2160
	caagagagaa aagaaagata gagtcttcac ggacaagacc tcagccacgg tcatctgccg	2220
	caaaaatgcc agcattagcg tgcgggccc ggaccgctac tatagctcat cttggagcga	2280
50	atgggcatct gtgcctgca gttagatata aagcttatcg ataccgtcga cctcga	2336

<210> 14  
 <211> 3057  
 <212> ДНК  
 <213> Escherichia coli

5 <400> 14  
 atggatcccg tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgttac ccaacttaat 60  
 cgccttgag cacatcccc ttctgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat 120  
 10 cgccttccc aacagttgag cagcctgaat ggcgaatggc gctttgcctg gtttccggca 180  
 ccagaagcgg tgccggaaag ctggctggag tgcgatcttc ctgaggccga tactgtcgtc 240  
 gtcccccaa actggcagat gcacggttac gatgcgccca tctacaccaa cgtaacctat 300  
 15 cccattacgg tcaatccgcc gtttgttccc acggagaatc cgacggggtg ttactcgtc 360  
 acatttaatg ttgatgaaag ctggctacag gaaggccaga cgcgaattat ttttgatggc 420  
 gttaaactcg cgtttcatct gtggtgcaac gggcgctggg tcggttacgg ccaggacagt 480  
 20 cgtttgccgt ctgaatttga cctgagcgc tttttacgag ccggagaaaa ccgcctcgcg 540  
 gtgatggtgc tgcgttgag tgacggcagt tatctggaag atcaggatat gtggcggatg 600  
 agcggcattt tccgtgacgt ctcgttgcct cataaaccga ctacacaaat cagcgatttc 660  
 25 catgttgcca ctgcctttaa tgatgatttc agccgcgctg tactggaggc tgaagttcag 720  
 atgtgcggcg agttgcgtga ctacctacgg gtaacagttt ctttatggca gggtgaaacg 780  
 caggtcgcca gcggcaccgc gcctttcggc ggtgaaatta tcgatgagcg tgggtggttat 840  
 30 gccgatcgcg tcacactacg tctgaacgtc gaaaaccgga aactgtggag ccccgaaatc 900  
 ccgaatctct atcgtgcggg ggttgaactg cacaccgccg acggcacgct gattgaagca 960  
 gaagcctgag atgtcggttt ccgcgaggtg cggattgaaa atggtctgct gctgctgaac 1020  
 35 ggcaagccgt tgctgattcg aggcgttaac cgtcacgagc atcatcctct gcatggtcag 1080  
 gtcattgatg agcagacgat ggtgcaggat atcctgctga tgaagcagaa caactttaac 1140  
 gccgtgcgct gttcgcatta tccgaacct ccgctgtggt acacgctgtg cgaccgctac 1200  
 40 ggcctgtatg tgggtgatga agccaatatt gaaaccacg gcatggtgcc aatgaatcgt 1260  
 ctgaccgatg atccgcgctg gctaccggcg atgagcgaac gcgtaacgag aatggtgcag 1320  
 cgcgatcgtg atcaccgag tgtgatcctc tggctcgtgg ggaatgaatc aggccacggc 1380  
 gctaatcacg acgcgctgta tcgctggatc aaatctgtcg atccttccc cccggtgcag 1440  
 45 tatgaaggcg gcggagccga caccacggcc accgatatta tttgcccgat gtacgcgcgc 1500  
 gtggatgaag accagccctt cccggctgtg ccgaaatggt ccatcaaaaa atggctttcg 1560  
 ctacctggag agacgcgccc gctgatcctt tgcgaatag cccacgcgat gggtaacagt 1620  
 50

cttggcggtt tcgctaaata ctggcaggcg tttcgtcagt atccccgttt acagggcggc 1680  
 ttcgtctggg actgggtgga tcagtcgctg attaaatag atgaaaacgg caaccctggg 1740  
 5 tcggcttacg gcggtgattt tggcgatacg ccgaacgatc gccagttctg tatgaacggt 1800  
 ctgggtctttg ccgaccgcac gccgcatcca gcgctgacgg aagcaaaaaca ccagcagcag 1860  
 tttttccagt tccgtttatc cgggcaaacc atcgaagtga ccagcgaata cctgttccgt 1920  
 10 catagcgata acgagctcct gcaactggatg gtggcgctgg atggttaagcc gctggcaagc 1980  
 ggtgaagtgc ctctggatgt cgctccacaa ggtaaacagt tgattgaact gcctgaacta 2040  
 ccgcagccgg agagcgccgg gcaactctgg ctcacagtac gcgtagtgca accgaacgcg 2100  
 15 accgcatggt cagaagccgg gcacatcagc gcctggcagc agtggcgtct ggcggaaaac 2160  
 ctcagtgatga cgctccccgc cgcgtccac gccatccccg atctgaccac cagcgaatg 2220  
 gatttttgca tcgagctggg taataagcgt tggcaattta accgccagtc aggttttctt 2280  
 20 tcacagatgt ggattggcga taaaaaaca ctgctgacgc cgctgcgcga tcagttcacc 2340  
 cgtgcaccgc tggataacga cattggcgta agtgaagcga cccgcattga ccctaacgcc 2400  
 tgggtcgaac gctggaaggc ggcgggcat taccaggccg aagcagcgtt gttgcagtgc 2460  
 25 acggcagata cacttgctga tgcggtgctg attacgaccg ctcacgcgtg gcagcatcag 2520  
 gggaaaacct tatttatcag ccgaaaacc taccggattg atggtagtgg tcaaatggcg 2580  
 attacggtt atgttgaagt ggcgagcgat acaccgcac cggcgcggat tggcctgaac 2640  
 30 tgccagctgg cgcaggtagc agagcgggta aactggctcg gattagggcc gcaagaaaac 2700  
 tatccccgacc gccttactgc cgctgtttt gaccgctggg atctgccatt gtcagacatg 2760  
 tataccccgt acgtcttccc gagcgaaaaac ggtctgcgct gcgggacgcg cgaattgaat 2820  
 35 tatggcccac accagtggcg cggcgacttc cagttcaaca tcagccgcta cagtcaacag 2880  
 caactgatgg aaaccagcca tcgccatctg ctgcacgcgg aagaaggcac atggctgaat 2940  
 atcgacggtt tccatatggg gattggtggc gacgactcct ggagcccgtc agtatcggcg 3000  
 40 gaattccagc tgagcgccgg tcgctacat taccagttgg tctggtgtca aaaataa 3057  
  
 <210> 15  
 <211> 336  
 <212> ДНК  
 <213> Человек  
 45  
 <400> 15  
 ctgcgctgtc ggggccaggc cgggctccca gtggattcgc gggcacagac gcccaggacc 60  
 gcgcttccca cgtggcggag ggactgggga cccgggcacc cgtcctgccc cttcaccttc 120  
 50

	cagctccgcc tcctccgcgc ggaccccgcc ccgtcccgac ccctcccggg tccccggccc	180
	agccccctcc gggccctccc agccccctccc ctctctttcc ggggccccgc cctctctcg	240
5	cgggcgcgagt ttcaggcagc gctgcgctct gctgcgcacg tgggaagccc tggccgatgg	300
	gctcgacgca cgtgggcgca cgtgggcgca cgtggg	336

### Формула изобретения

10 1. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена, отличающийся тем, что он содержит, по меньшей мере, следующие элементы, ориентированные в направлении от 5' к 3':

15 i. первую цепь из аденовируса, содержащую последовательность первого инвертированного концевой повтора (ITR) и сигнальную последовательность для упаковки аденовируса;

ii. первую некодирующую последовательность наполнителя;

iii. последовательность, соответствующую тканеспецифическому промотору;

20 iv. цепь кДНК, полученную из альфа-вируса, последовательность которой частично комплементарна РНК альфа-вируса, включающую, по меньшей мере, последовательность, кодирующую, по меньшей мере, один интересующий экзогенный ген;

v. последовательность полиаденилирования и

25 vi. последовательность второго аденовирусного инвертированного концевой повтора (ITR).

2. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.1, отличающийся тем, что он дополнительно содержит элемент vii, который представляет вторую некодирующую последовательность наполнителя между элементом v и элементом vi.

30 3. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.1, отличающийся тем, что элемент ii представляет человеческую некодирующую последовательность наполнителя.

4. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.1 или 3, отличающийся тем, что элемент ii представляет собой область интрона человеческой 35 геномной гипоксантинфосфорибозилтрансферазы, HPRT.

5. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.1, отличающийся тем, что элемент i имеет последовательность SEQ ID №1.

6. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.1, отличающийся тем, что элемент iii представляет опухолеспецифический промотор.

40 7. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.6, отличающийся тем, что элемент iii представляет опухолеспецифический промотор, выбранный из AFP, теломеразы TERT, PAP, E2F и HIF.

8. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.1, отличающийся 45 тем, что элемент iii представляет опухолеспецифический промотор, имеющий последовательность, выбранную из SEQ ID №7, соответствующую AFP p+e, и SEQ ID №15, соответствующей теломеразе TERT.

9. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.1, отличающийся 50 тем, что элемент iv содержит последовательность, полученную из вируса леса Семлики (SFV).

10. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.1, отличающийся тем, что указанная цепь iv кДНК, полученная из альфа-вируса, последовательность которой частично комплементарна РНК альфа-вируса, содержит, по меньшей мере,

одну последовательность, кодирующую, по меньшей мере, один интересующий экзогенный ген, и которая также содержит:

- а) 5'-последовательность, необходимую для репликации альфа-вируса,
- б) последовательность, кодирующую неструктурные белки, необходимые для репликации РНК альфа-вируса,
- в) по меньшей мере, один субгеномный промотор альфа-вируса и
- г) 3'-последовательность, необходимую для репликации альфа-вируса.

11. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.10, отличающийся тем, что последовательности а)-в) элемента iv в целом имеют последовательность, выбранную из SEQ ID №3 и SEQ ID №4.

12. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.10, отличающийся тем, что элемент iv г) имеет последовательность SEQ ID №5.

13. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.1, отличающийся тем, что интересующий экзогенный ген выбран из одного или нескольких терапевтических генов, одного или нескольких генов-репортеров и их комбинаций.

14. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.13, отличающийся тем, что интересующий экзогенный ген является терапевтическим геном интерлейкина IL-12 млекопитающих.

15. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.13, отличающийся тем, что интересующий экзогенный ген является терапевтическим геном человеческого интерлейкина IL-12.

16. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.13, отличающийся тем, что интересующий экзогенный ген является терапевтическим геном, выбранным из генов колониестимулирующего фактора (GM-CSF), альфа-интерферона, тимидинкиназы вируса герпеса простого (HSV-TK).

17. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.11, отличающийся тем, что элемент iv содержит одну или несколько последовательно соединенных подгрупп (субгеномный промотор+интересующий экзогенный ген).

18. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.13, отличающийся тем, что интересующий экзогенный ген является геном-репортером, выбранным из генов LacZ, люциферазы, тимидинкиназы вируса герпеса простого (HSV-TK) и GFP.

19. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по пп.9-18, отличающийся тем, что элемент iv образует репликон, функционально контролируемый промотором iii, и тем, что альфа-вирусный субгеномный промотор, входящий в состав iv в), функционально контролирует экспрессию интересующего экзогенного гена.

20. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.1, отличающийся тем, что элемент v представляет последовательность полиаденилирования из SV40.

21. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.1, отличающийся тем, что элемент v имеет последовательность SEQ ID №6.

22. Аденовирусный вектор для экспрессии гена по п.2, отличающийся тем, что вторая не кодирующая последовательность наполнителя представляет собой С346.

23. Аденовирусный вектор для экспрессии гена по п.1, отличающийся тем, что элемент vi имеет последовательность SEQ ID №2.

24. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.1, отличающийся тем, что он содержит:

- i. первую цепь из аденовируса, содержащую последовательность первого инвертированного концевой повтора (ITR) и сигнальную последовательность для

упаковки аденовируса;

ii. первую некодирующую последовательность наполнителя, которая представляет собой область интрона человеческой геномной гипоксантинфосфорибозилтрансферазы(HPRT);

5 iii. последовательность, соответствующую тканеспецифическому промотору, который представляет собой промотор AFP;

iv. цепь кДНК, полученную из альфа-вируса, последовательность которой частично комплементарна РНК альфа-вируса, полученной из вируса SFV, которая  
10 включает последовательность, кодирующую интересующий экзогенный ген, который представляет собой hIL-12;

v. последовательность полиаденилирования из SV40;

vi. последовательность второго инвертированного концевго повтора (ITR) и

15 vii. вторую некодирующую последовательность наполнителя, которая представляет собой человеческую геномную C346, расположенную между элементом v и элементом vi.

25. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.1, отличающийся тем, что он содержит:

20 i. первую цепь из аденовируса, содержащую последовательность первого инвертированного концевго повтора (ITR) и сигнальную последовательность для упаковки аденовируса;

ii. первую некодирующую последовательность наполнителя, которая представляет собой область интрона человеческой геномной  
25 гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT);

iii. последовательность, соответствующую тканеспецифическому промотору, который представляет собой промотор AFP;

iv. цепь кДНК, полученную из альфа-вируса, последовательность которой  
30 частично комплементарна РНК альфа-вируса, полученной из вируса SFV, которая включает последовательность, кодирующую интересующий экзогенный ген, выбранный из mIL-12 и LacZ;

v. последовательность полиаденилирования из SV40;

vi. последовательность второго инвертированного концевго повтора (ITR) и

35 vii. вторую некодирующую последовательность наполнителя, которая представляет собой человеческую геномную C346, расположенную между элементом v и элементом vi.

40 26. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.1, отличающийся тем, что он имеет длину от 27 до 38 т.п.н.

27. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.1, отличающийся тем, что он имеет последовательность SEQ ID №8.

28. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.1, отличающийся тем, что он имеет последовательность SEQ ID №9.

45 29. Аденовирусный гибридный вектор для экспрессии гена по п.1, отличающийся тем, что он имеет последовательность SEQ ID №10.

30. Применение аденовирусного гибридного вектора по любому из предшествующих пунктов в способе переноса генетического материала в клетку.

50 31. Применение по п.30, в котором указанная клетка представляет собой опухолевую клетку.

32. Применение по п.31, в котором указанная клетка представляет собой опухолевую клетку, экспрессирующую AFP.



33. Применение аденовирусного гибридного вектора, определенного по любому из пп.1-29, для получения эффективного лекарственного препарата при лечении опухолей.

5 34. Применение аденовирусного гибридного вектора, определенного по любому из пп.1-29 для индукции иммунного ответа против чужеродных антигенов.

35. Фармацевтическая композиция для лечения опухоли, содержащая, по меньшей мере, аденовирусный гибридный вектор по любому из пп.1-29 и фармацевтически приемлемый носитель.

10 36. Фармацевтическая композиция для лечения опухолей, отличающаяся тем, что она содержит, по меньшей мере, один аденовирусный гибридный вектор, определенный по любому из пп.1-29, где интересующим экзогенным геном является hIL-12, и фармацевтически приемлемый носитель.

15 37. Фармацевтическая композиция для индукции иммунного ответа против чужеродного антигена, содержащая, по меньшей мере, аденовирусный гибридный вектор по любому из пп.1-29 и фармацевтически приемлемый носитель.

38. Применение фармацевтической композиции по п.37 в способе индукции иммунного ответа против чужеродных антигенов.

20

25

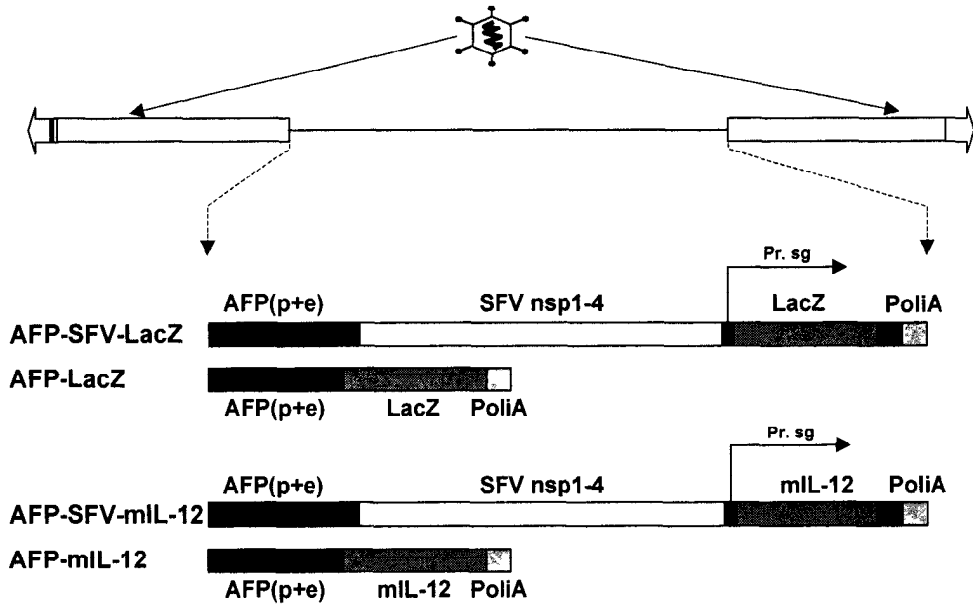
30

35

40

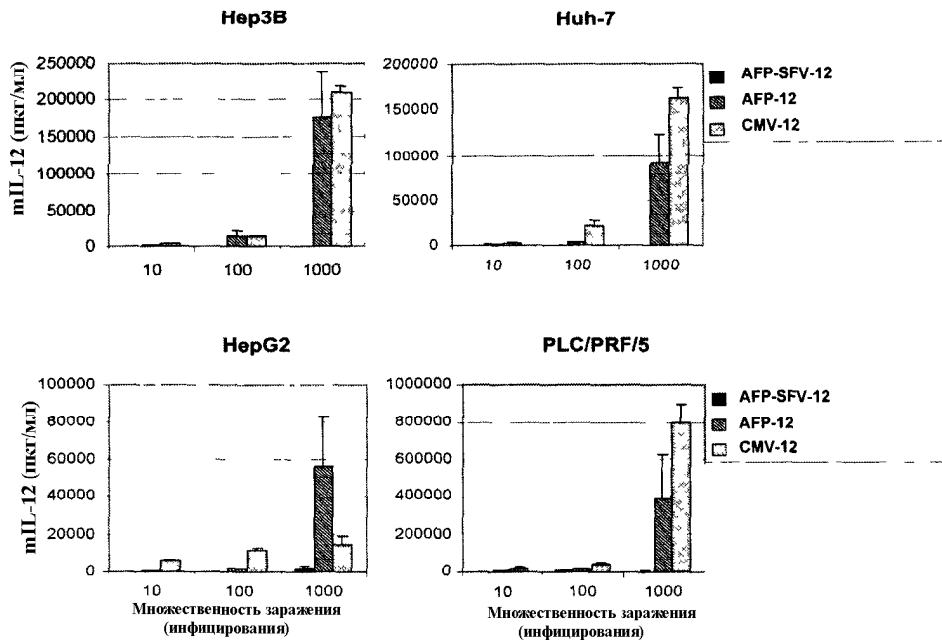
45

50

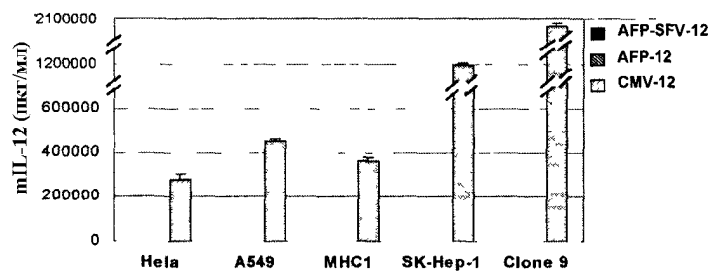


ФИГ.2

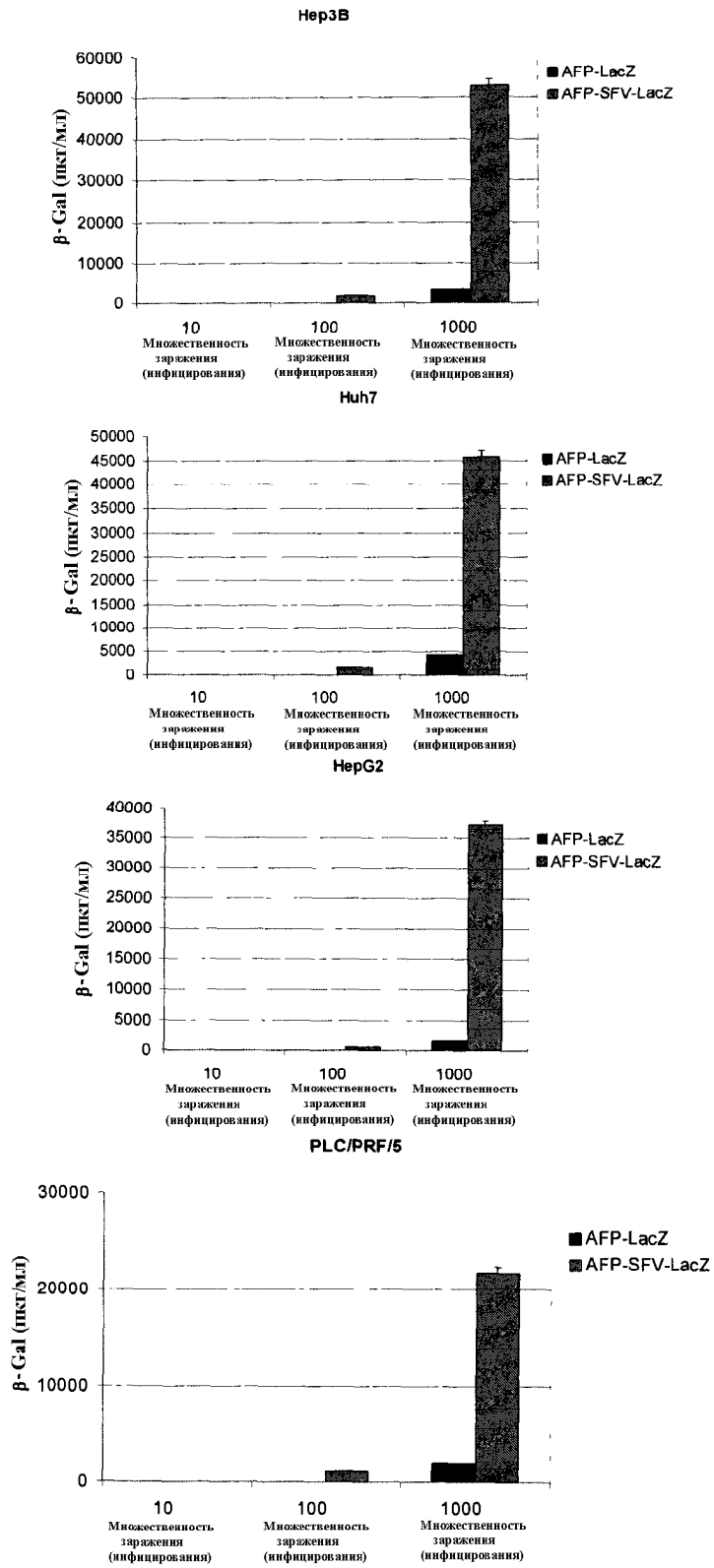
A



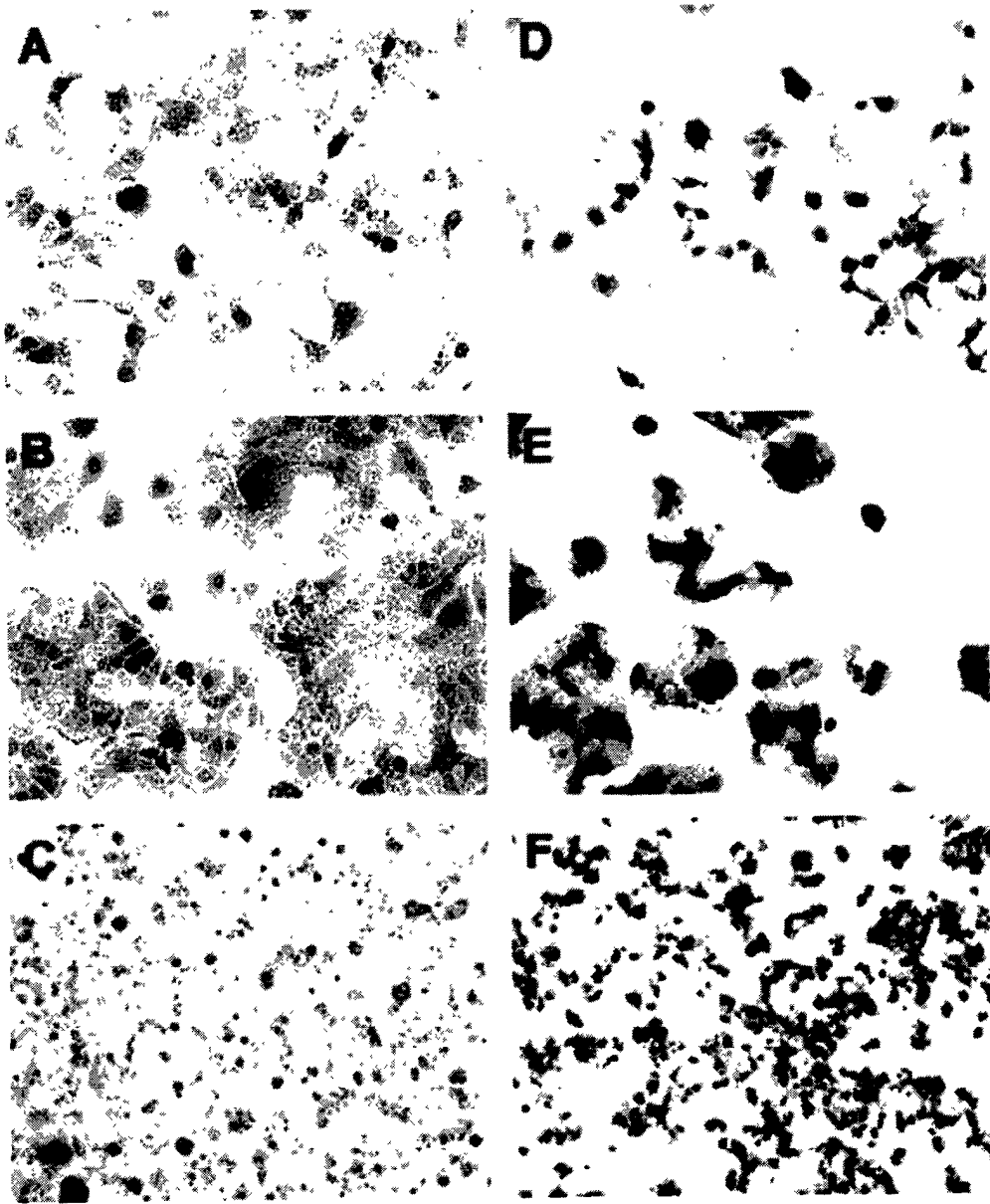
B



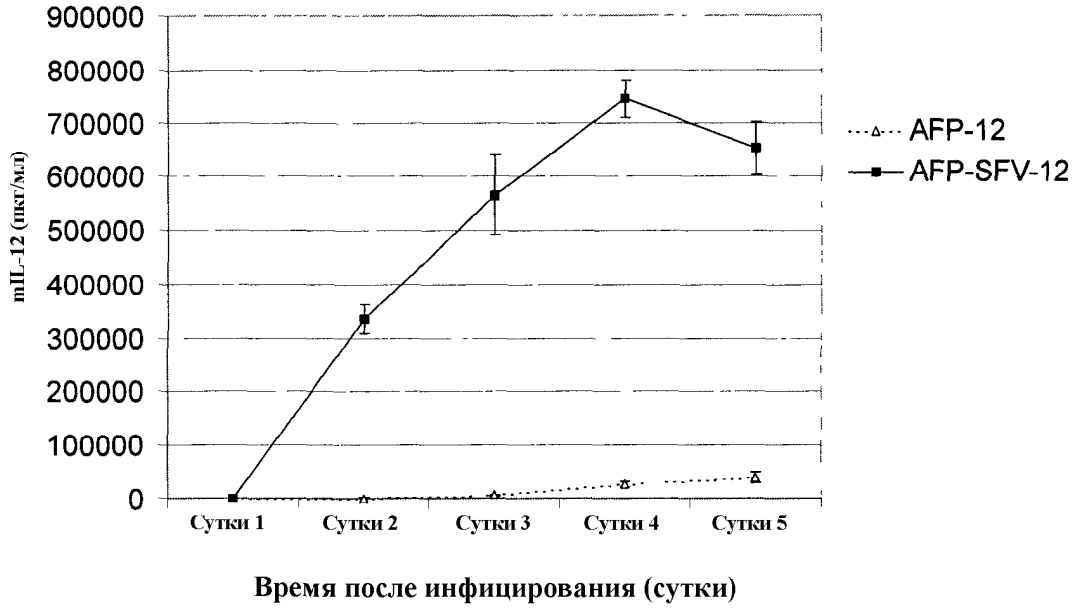
ФИГ.3



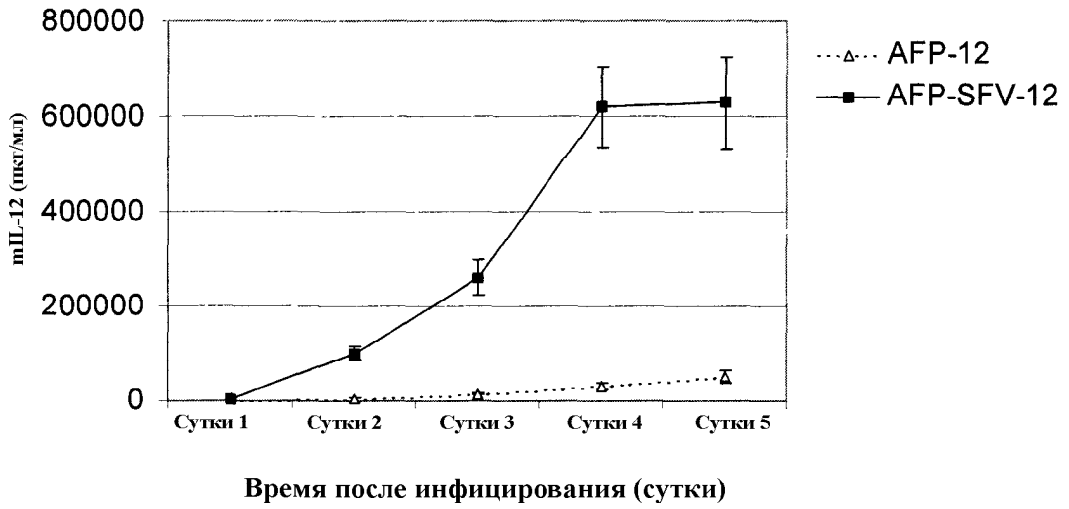
**ФИГ.4**



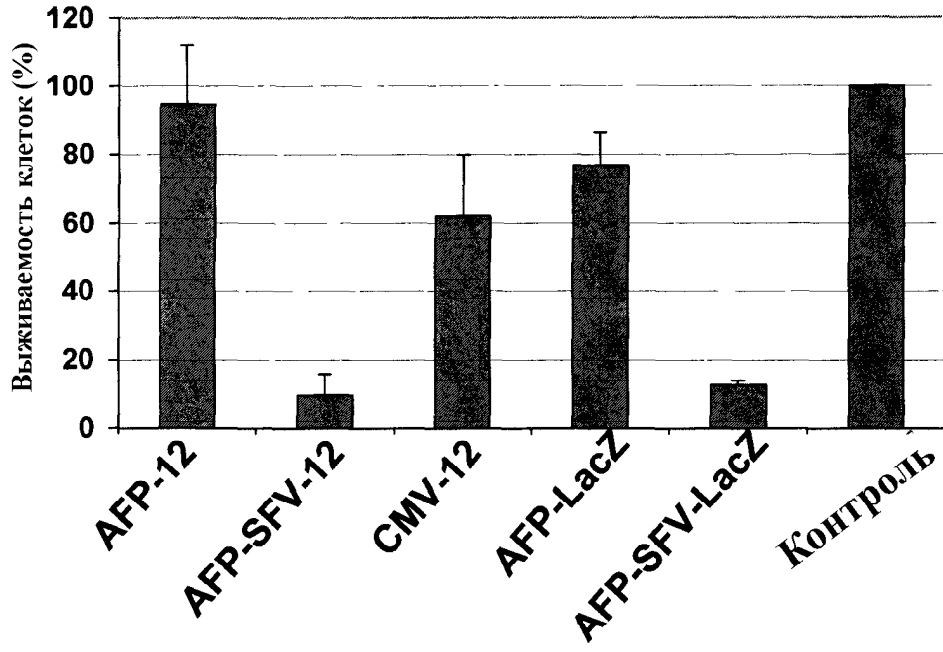
ФИГ.5



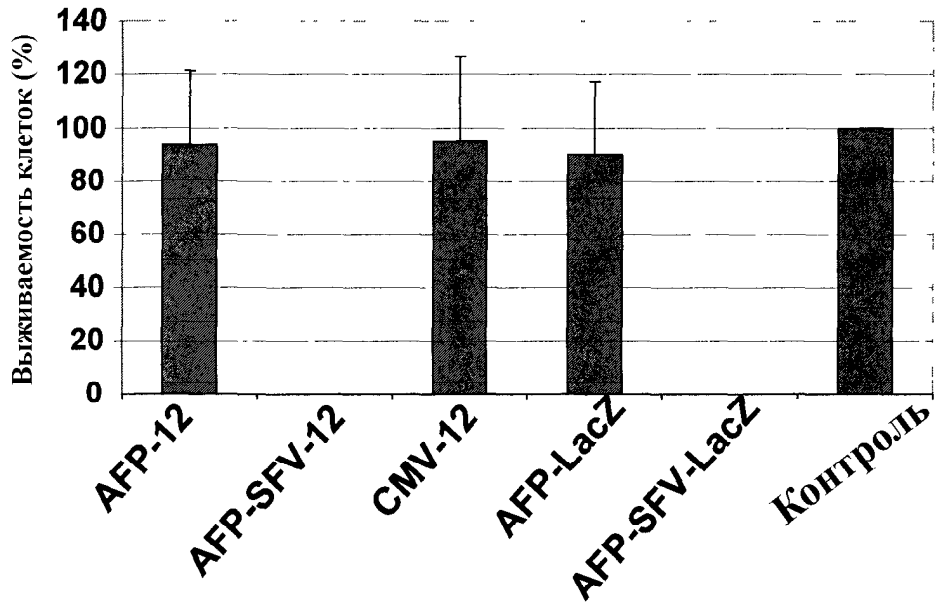
**ФИГ.6А**



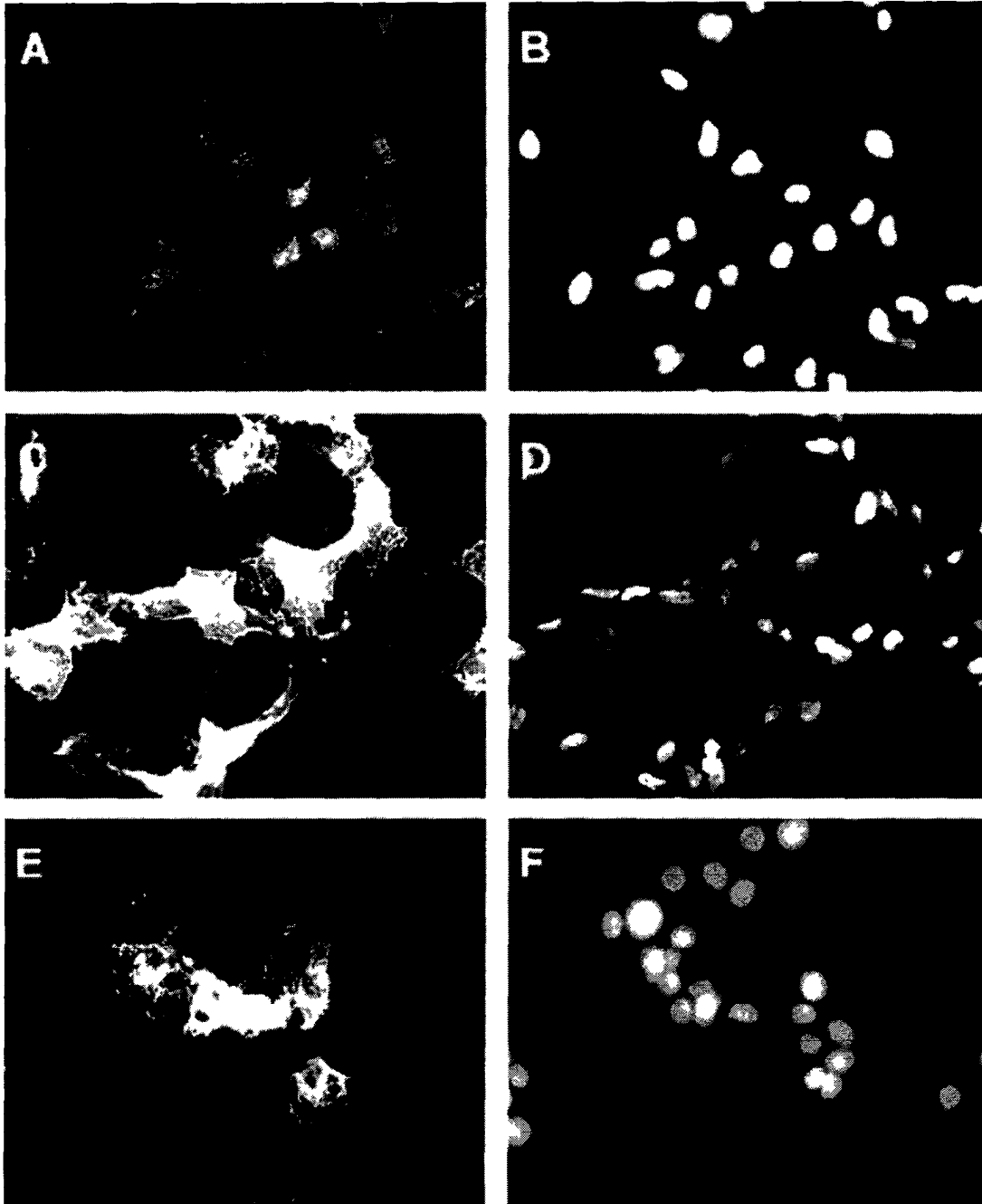
**ФИГ.6В**



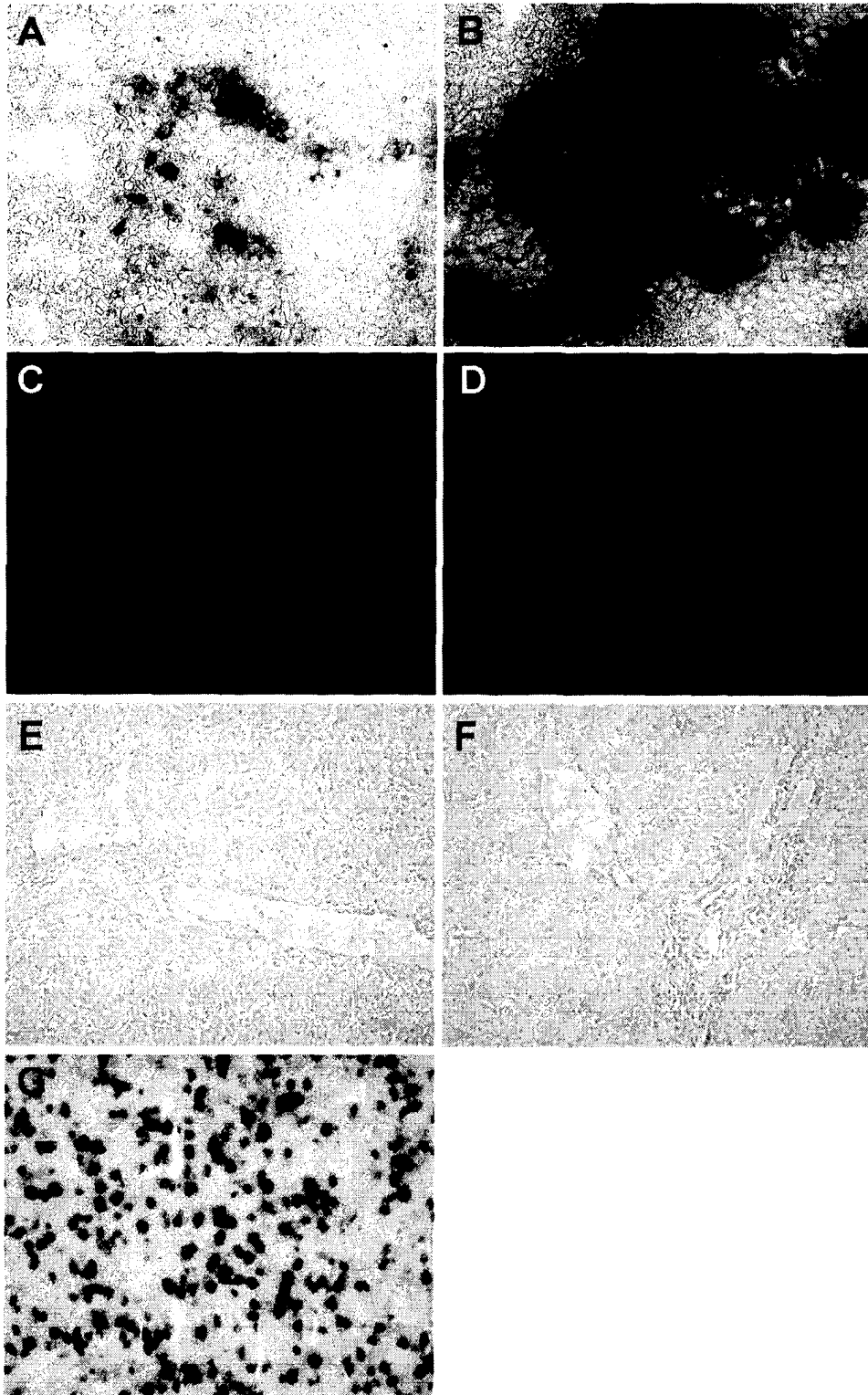
ФИГ.7А



ФИГ.7В

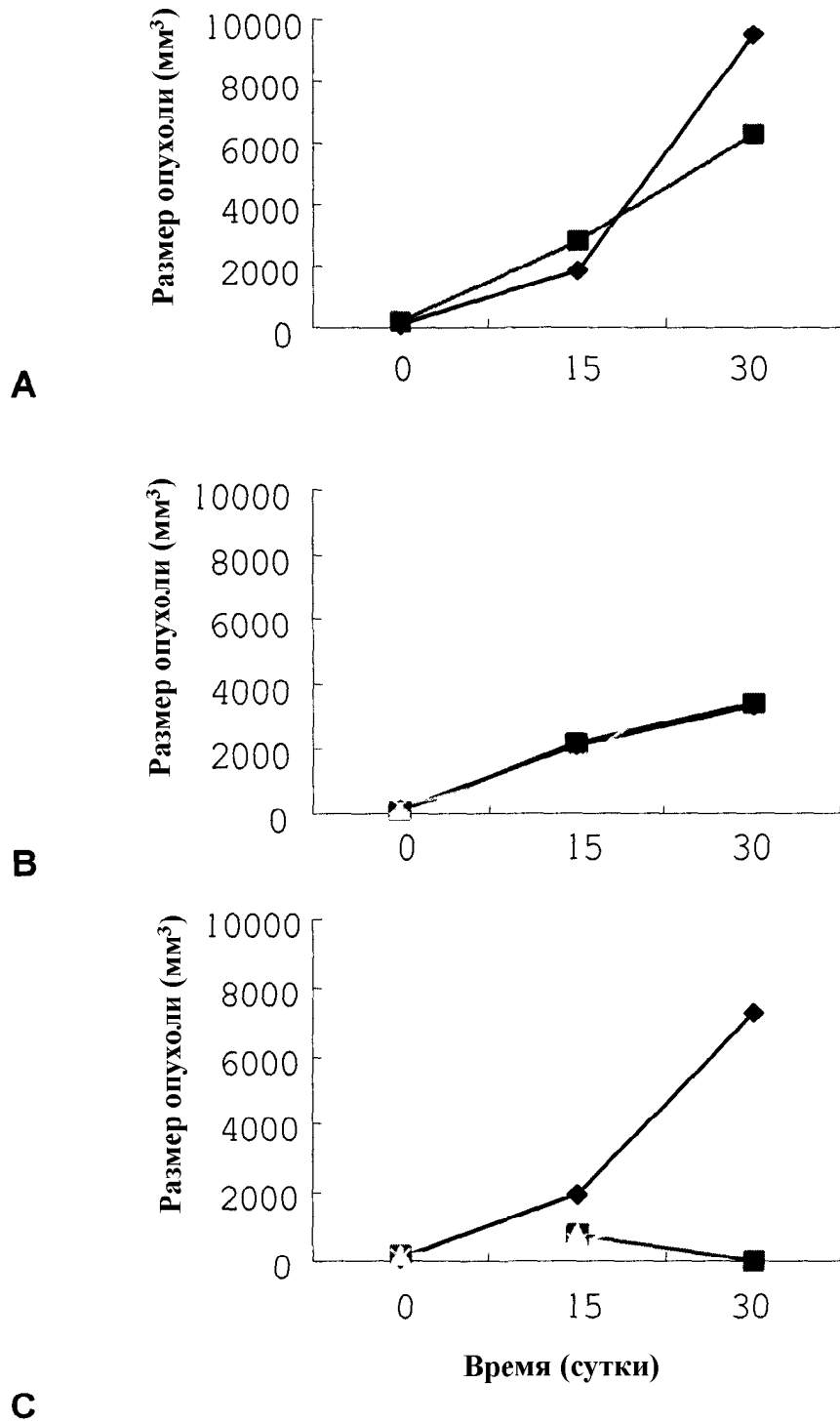


**ФИГ.8**

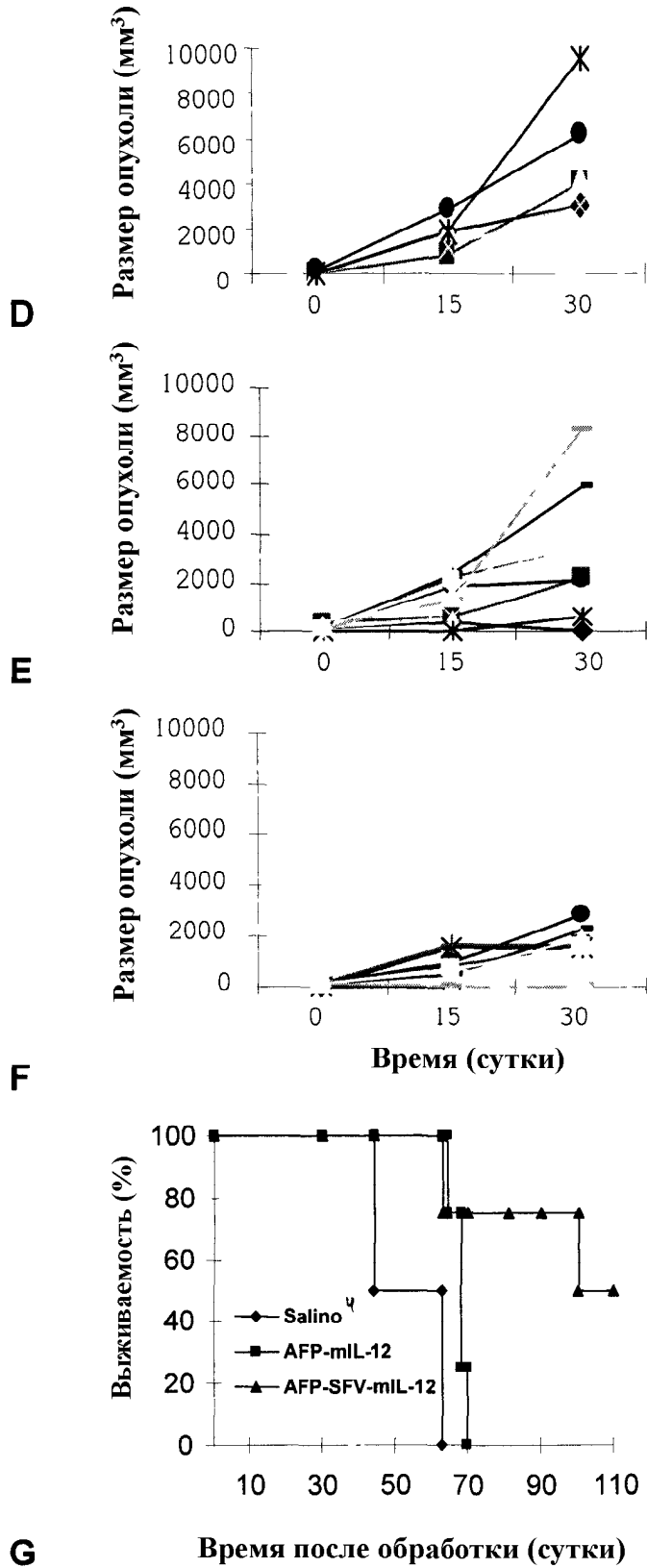


ФИГ.9

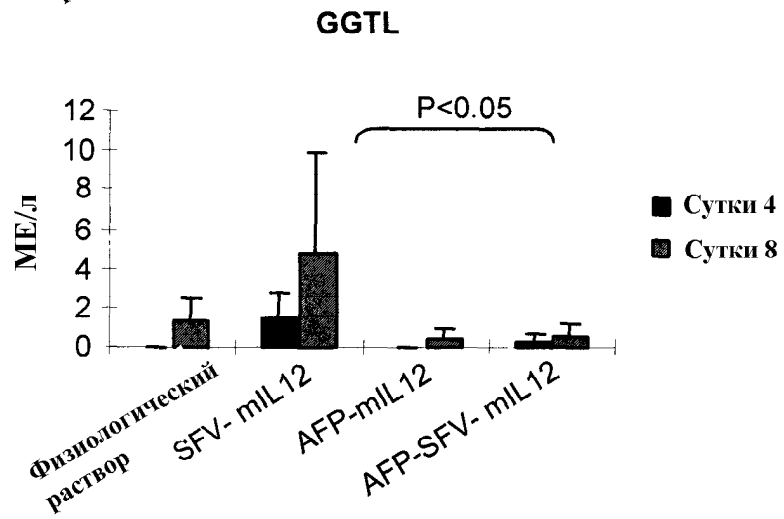
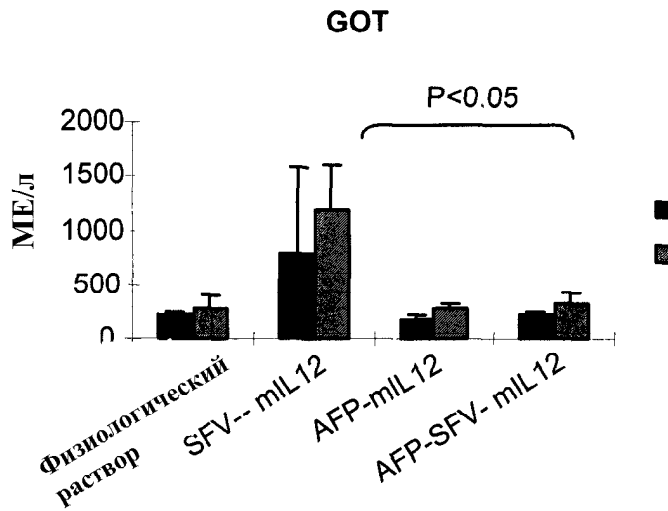
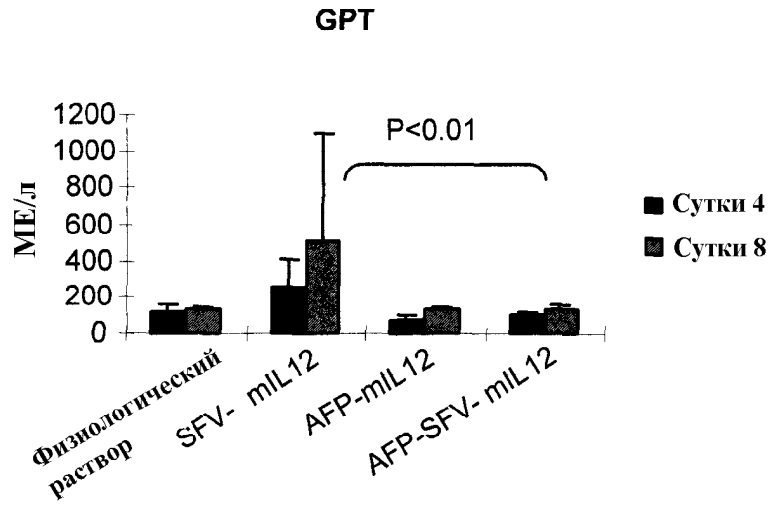




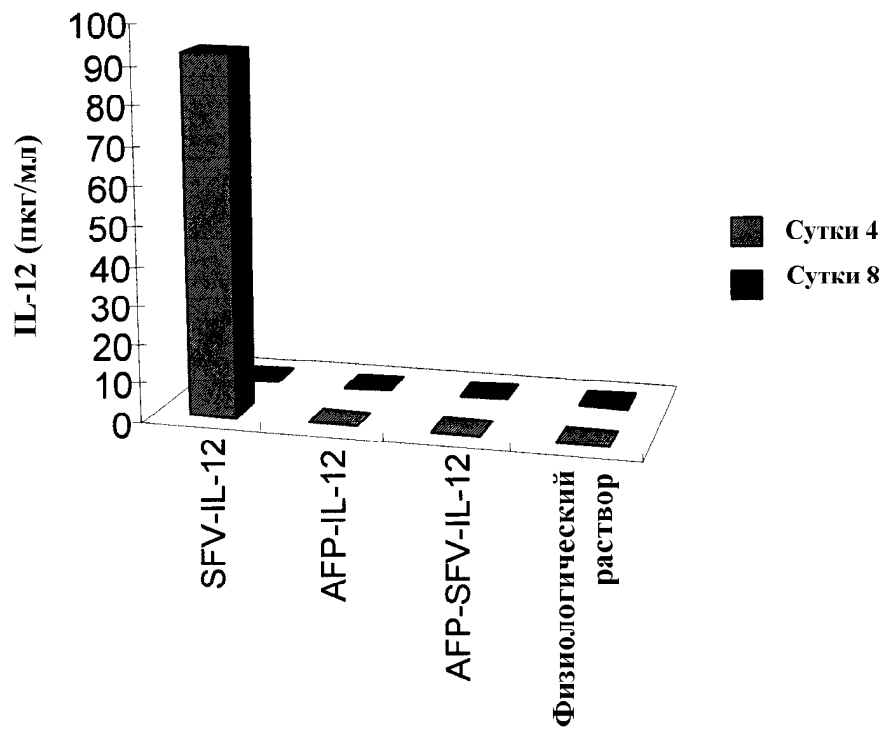
**ФИГ.10 : 10<sup>11</sup>**



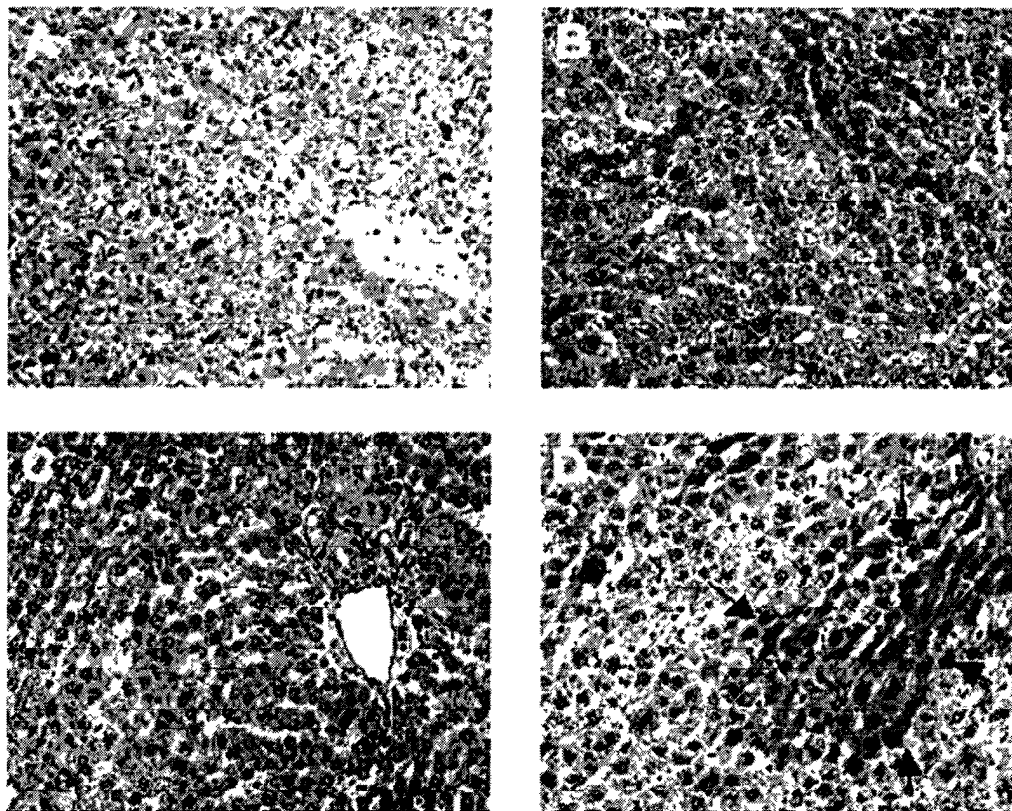
ФИГ.10 :  $2 \times 10^{11}$



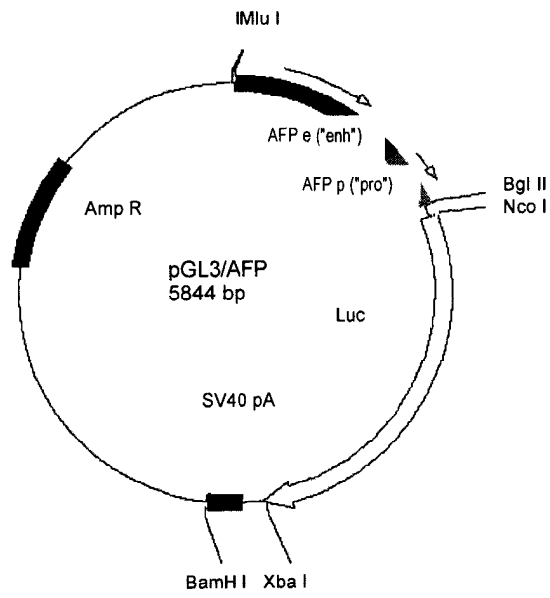
**ФИГ.11А**



ФИГ.11В

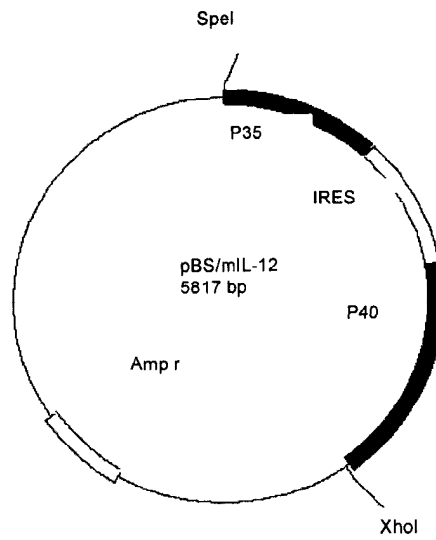


ФИГ.12



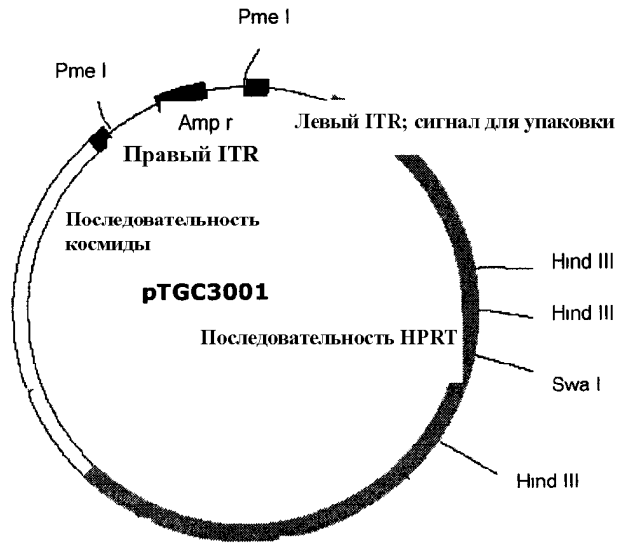
pGL3/AFP

**ФИГ.13А**



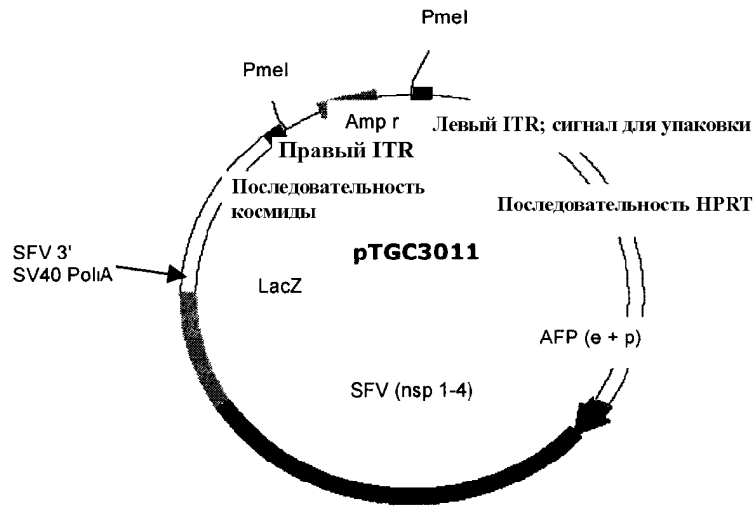
pBS/mIL-12

**ФИГ.13В**



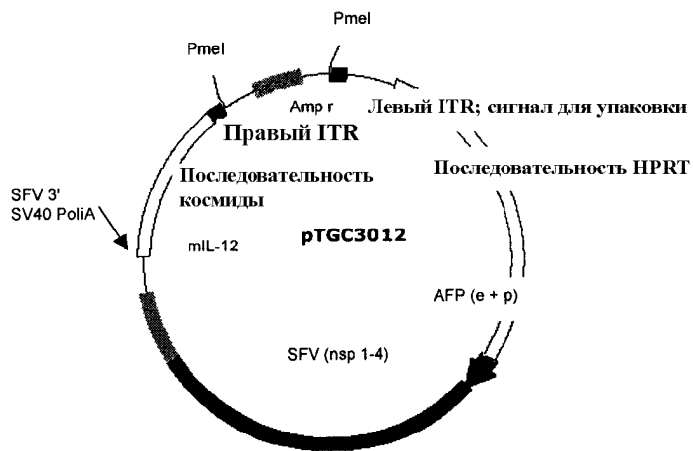
pTGC3001

**ФИГ.14А**



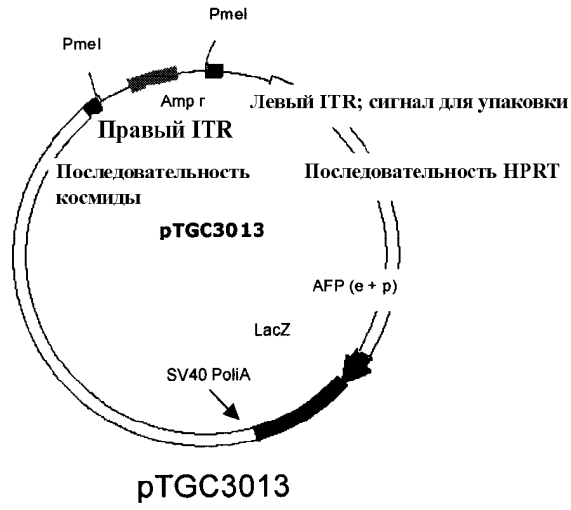
pTGC3011

**ФИГ.14В**

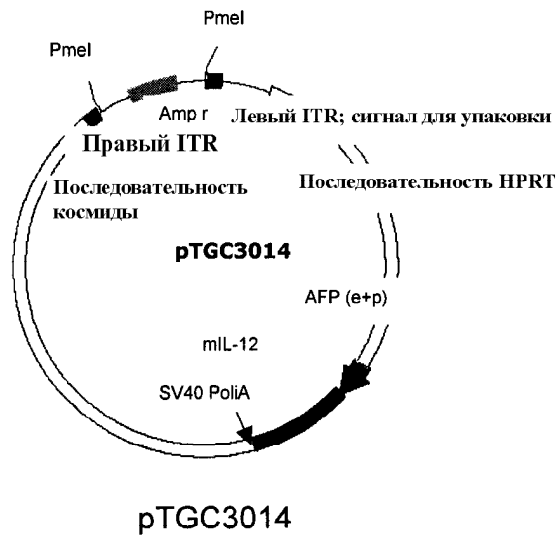


pTGC3012

**ФИГ.15А**



**ФИГ.15В**



**ФИГ.16**