



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 34 166 T2 2006.03.09**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 787 200 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 34 166.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/14017**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 942 839.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/013597**

(86) PCT-Anmeldetag: **27.10.1995**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **09.05.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.08.1997**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **20.04.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.03.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/86 (2006.01)**

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/88 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

331381 28.10.1994 US

(73) Patentinhaber:

**Trustees of the University of Pennsylvania,
Philadelphia, Pa., US**

(74) Vertreter:

v. Fünér Ebbinghaus Finck Hano, 81541 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,
MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**WILSON, M., James, Gladwyne, US; FISHER, J.,
Krishna, Philadelphia, US; CHEN, Shu-Jen,
Philadelphia, US; WEITZMAN, Matthew,
Philadelphia, US**

(54) Bezeichnung: **REKOMBINANTER ADENOVIRUS UND METHODEN ZU DESSEN VERWENDUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung wurde durch das „National Institute of Health Grant No. P30 DK 477,57“ unterstützt. Die Regierung der Vereinigten Staaten ist an der vorliegenden Erfindung rechtsbeteiligt.

Gebiet der Erfindung

[0002] Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet von zur somatischen Gentherapie geeigneten Vektoren sowie die Herstellung davon.

Hintergrund der Erfindung

[0003] Bei der menschlichen Gentherapie handelt es sich um einen Ansatz zur Behandlung von Erkrankungen des Menschen, der auf der Modifikation der Genexpression in Zellen des Patienten beruht. Es hat sich im Verlauf des letzten Jahrzehnts herausgestellt, daß das größte Hindernis für den Erfolg der Gentherapie als Strategie zur Behandlung von Erbkrankheiten, Krebs und anderen genetischen Fehlfunktionen in der Entwicklung geeigneter Gentransfervehikel besteht. Eukaryontische Viren wurde bereits als Vehikel für die somatische Gentherapie eingesetzt. Unter den Virusvektoren, die in der Gentherapieforschung häufig zitiert wurden, befinden sich die Adenoviren.

[0004] Bei den Adenoviren handelt es um eukaryontische DNA-Viren, die sich zur effizienten Zuführung eines therapeutischen oder Report-Transgens an verschiedene Zellarten modifizieren lassen. Die rekombinanten Adenoviren vom Typ 2 und 5 (Ad2 bzw. Ad5) die beim Menschen eine Erkrankung der Atemwege verursachen, werden zur Zeit für die Gentherapie weiterentwickelt. Sowohl Ad2 als auch Ad5 gehören zu einer Unterklasse von Adenoviren, die nicht mit menschlichen Malignomen assoziiert sind. Rekombinante Adenoviren sind dazu in der Lage, äußerst hohe Niveaus der Zuführung von Transgenen an praktisch alle Zellarten, unabhängig vom Mitosestatus, zu liefern. Hohe Titer (10^{13} plaque forming units [Plaque-bildende Einheiten]/ml) an rekombinanten Virus lassen sich leicht in 293-Zellen (dem Adenovirus-Äquivalent zu Retrovirus-Verpackungszelllinien) erzeugen und über ausgedehnte Zeiträume ohne ersichtliche Verluste tiefgefroren aufbewahren. Die Wirksamkeit dieses Systems bei der Zuführung eines therapeutischen Transgens, das ein genetisches Ungleichgewicht komplementiert, in vivo konnte in Tiermodellen für verschiedene Erkrankungen demonstriert werden [Y. Watanabe, *Atherosclerosis*, 36: 261–268 (1986); K. Tanzawa et al, *FEBS Letters*, 118(1): 81–84 (1980); J. L. Golastan et al, *New Engl. J. Med.*, 309 (11983): 288–296 (1983); S. Ishibashi et al, *J. Clin. Invest.*, 92: 883–893 (1993); und S. Ishibashi et al, *J. Clin. Invest.*, 93: 1885–1893 (1994)]. Tatsächlich wurde ein rekombinantes, replikationsdefektes Adenovirus, das eine cDNA für CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) codiert, zum Einsatz in wenigstens zwei klinischen Studien an menschlichem CF zugelassen [siehe z.B. J. Wilson, *Nature*, 365: 691–692 (21. Okt. 1993)]. Die Sicherheit rekombinanter Adenoviren für die Gentherapie wird durch die ausgiebige Erfahrung mit Adenovirus-Lebensimpfstoffen in Bevölkerungsgruppen weiter untermauert.

[0005] Menschliche Adenoviren bestehen aus einem linearen, ungefähr 36 kb großen doppelsträngigen DNA-Genom, das sich in 100 m.u. (map units) [= Karteneinheiten] einteilen läßt, die jeweils eine Länge von 360 bp aufweisen. Die DNA enthält an beiden Enden des Genoms kurze inverse terminale Wiederholungen (inverted terminal repeats, ITR), die für die Replikation der viralen DNA benötigt werden. Dabei sind die Genprodukte aufgrund der Expression vor oder nach der Initiation der viralen DNA-Synthese in Form von frühen (E1 bis E4) und späten (L1 bis L5) Bereichen organisiert [siehe z.B. Horwitz, *Virology*, 2. Auflage, Hrsg. B. N. Fields, Raven Press, Ltd., New York (1990)].

[0006] Die rekombinanten, replikationsdefekten Adenoviren der ersten Generation, die für die Gentherapie entwickelt wurden, enthalten Deletionen des gesamten E1a-Bereichs und eines Teils des E1b-Bereichs. Dieses replikationsdefekte Virus wird auf einer mit Adenovirus transformierten, menschlichen embryonalen Komplementationsnierenzelllinie, die ein funktionelles adenovirales E1a-Gen, durch das ein transwirkendes E1a-Protein bereitgestellt wird, enthält; der 293-Zelle [ATCC CRL1573], kultiviert. Viren mit deletiertem E1 können in den 293-Zellen, die die Genprodukte des E1a- und E1b-Bereichs in trans bereitstellen, replizieren und infektiöses Virus produzieren. Das erhaltene Virus ist in der Lage, viele Zellarten zu infizieren, und kann das eingeführte Gen (unter der Voraussetzung, daß dieses seinen eigenen Promotor trägt) exprimieren, kann jedoch in einer Zelle, die keine DNA des E1-Bereichs trägt, nichts replizieren, außer wenn die Zelle mit einer sehr hohen „multiplicity of infection“ infiziert wird.

[0007] Es konnte jedoch in In-vivo-Untersuchungen gezeigt werden, daß die Transgenexpression in diesen Vektoren mit deletiertem E1 transient war und ausnahmslos mit der Entwicklung einer starken Entzündung an

der Zielstelle des Vektors assoziiert war [S. Ishibashi et al, J. Clin. Invest., 93: 1885–1893 (1994); J. M. Wilson et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85: 4421–4424 (1988) J. M. Wilson et al, Clin. Bio., 3: 21–26 (1991); M. Grossman et al, Som. Cell. and Mol. Gen., 17: 601–607 (1991)]. Als eine Erklärung für diesen Befund wurde vorgeschlagen, daß rekombinante Adenoviren der ersten Generation trotz der Deletion von E1-Genen niedrige Niveaus anderer Virusproteine exprimieren. Dies könnte an einer Basalexpression von den nichtstimulierten Viruspromotoren oder einer Transaktivierung durch zelluläre Faktoren liegen. Die Expression viraler Proteine führt zu zellulären Immunreaktionen gegenüber den genetisch veränderten Zellen, was zu deren Zerstörung und Austausch gegen Zellen, die kein Transgen enthalten, führt.

[0008] Es besteht weiterhin ein Bedarf im Fachgebiet an der Entwicklung zusätzlicher Adenovirus-Vektorkonstrukte für die Gentherapie.

Kurze Beschreibung der Erfindung

[0009] In einem Aspekt werden durch die Erfindung die Komponenten eines neuartigen rekombinanten Adenovirus-Produktionssystems bereitgestellt. Bei einer dieser Komponenten handelt es sich um ein Shuttle-Plasmid, pAdΔ, das die für die Replikation und Virioncapsidierung notwendigen adenoviralen cis-Elemente umfaßt und in dem alle Virusgene deletiert sind. Dieser Vektor trägt ein ausgewähltes Transgen unter der Kontrolle eines ausgewählten Promotors und weiterer herkömmlicher Vektor/Plasmid-Regulationskomponenten. Bei der anderen Komponente handelt es sich um ein Helfer-Adenovirus, das allein oder zusammen mit einer Verpackungszelllinie eine ausreichende Menge an für eine produktive Virusinfektion notwendigen Gensequenzen liefert. In einer bevorzugten Ausführungsform wurde das Helfervirus so verändert, daß es Modifikationen der nativen Gensequenzen, die die effiziente Verpackung steuern, enthält, um so die Verpackungsfunktion des Helfervirus oder seine Fähigkeit zur Replikation weitgehend auszuschalten oder zu „lähmen“.

[0010] In einem weiteren Aspekt wird durch die vorliegende Erfindung ein einzigartiges rekombinantes Adenovirus, ein AdΔ-Virus, das unter Verwendung der obigen Komponenten produziert wurde, bereitgestellt. Dieses rekombinante Virus umfaßt ein adenovirales Capsid, für die Replikation und Virioncapsidierung notwendige adenovirale cis-Elemente, es sind jedoch alle Virusgene (d.h. alle viralen offenen Leseraster) deletiert. Dieses Viruspartikel trägt ein ausgewähltes Transgen unter der Kontrolle eines ausgewählten Promotors und weiterer herkömmlicher Vektorregulationskomponenten. Dieses rekombinante AdΔ-Virus ist durch eine Zuführung mit hohem Titer eines Transgens an eine Wirtszelle sowie die Fähigkeit zur stabilen Integration des Transgens in das Chromosom der Wirtszelle gekennzeichnet. In einer Ausführungsform trägt das Virus als Transgen ein Reporter-gen. Eine weitere Ausführungsform des rekombinanten Virus enthält ein therapeutisches Transgen.

[0011] In einem weiteren Aspekt wird durch die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung des oben beschriebenen rekombinanten AdΔ-Virus durch Kotransfektion einer Zelllinie (entweder einer Verpackungszelllinie oder Nicht-Verpackungszelllinie) mit einem Shuttle-Vektor oder -Plasmid und einem Helfer-Adenovirus wie oben beschrieben bereitgestellt, wobei die transfizierte Zelle das AdΔ-Virus erzeugt. Das AdΔ-Virus wird anschließend daraus isoliert und gereinigt.

[0012] In noch einem weiteren Aspekt wird durch die Erfindung eines Verfahren zur Zuführung eines ausgewählten Gens an eine Wirtszelle zur Expression in dieser Zelle durch Verabreichung einer wirksamen Menge eines ein therapeutisches Transgen enthaltenden rekombinanten AdΔ-Virus an einen Patienten zur Behandlung oder Korrektur einer genetisch bedingten Störung oder Krankheit bereitgestellt.

[0013] Weitere Aspekte und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden weiter in der folgenden ausführlichen Beschreibung der diesbezüglichen bevorzugten Ausführungsformen beschrieben.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0014] Bei [Fig. 1A](#) handelt es sich um eine schematische Darstellung der Organisation der Hauptfunktionselemente, die den 5'-Terminus von Ad5 definieren, einschließlich einer inversen terminalen Wiederholung (ITR) und einer Verpackungs-/Enhancer-Domäne. Die TATA-Box des E1-Promotors (schwarzes Kästchen) und die E1A-Transkriptionsstartstelle (Pfeil) sind ebenfalls gezeigt.

[0015] Bei [Fig. 1B](#) handelt es sich um eine vergrößerte schematische Darstellung des Verpackungs-/Enhancer-Bereichs von [Fig. 1A](#), wobei die fünf Verpackungs (PAC)-Domänen (A-Wiederholungen), I bis V, angedeutet sind. Die Pfeile bezeichnen die Lage der PCR-Primer, auf die in [Fig. 9A](#) und [Fig. 9B](#) unten verwiesen wird.

[0016] Bei [Fig. 2A](#) handelt es sich um eine schematische Darstellung des Shuttle-Vektors pAdΔ.CMVLacZ, der 5'-ITR aus AdS, gefolgt von einem CMV-Promotor/Enhancer, einem LacZ-Gen, einem 3'-ITR aus Ad5, enthält, wobei die restliche Plasmidsequenz aus dem Grundgerüst des Plasmids pSP72 stammt. Die Restriktionsendonucleaseenzyme sind mit den herkömmlichen Bezeichnungen in den Plasmidkonstrukten dargestellt.

[0017] Bei [Fig. 2B](#) handelt es sich um eine schematische Darstellung des mit EcoRI zur Freisetzung des modifizierten AdΔ-Genoms aus dem pSP72-Plasmidgrundgerüst verdauten Shuttle-Vektors.

[0018] Bei [Fig. 2C](#) handelt es sich um eine schematische Darstellung der Funktion des Vektorsystems. In Gegenwart eines Helfervirus mit E1-Deletion, helper virus Ad.CBhpAp, der ein Reporter-Minigen für alkalische Phosphatase aus menschlicher Plazenta (hpAP) codiert, wird das AdΔ.CMVLacZ-Genom in vorgeformte Virioncapside verpackt, die sich von den Helfer-Virionen durch das Vorhandensein des LacZ-Gens unterscheiden.

[0019] In den [Fig. 3A](#) bis [Fig. 3F](#) [SEQ ID NO: 1] ist der obere DNA-Strang des doppelsträngigen Plasmids pAdΔ.CMVLacZ dargestellt. Die komplementäre Sequenz kann vom Fachmann leicht gewonnen werden. Die Sequenz enthält die folgenden Komponenten: 3'-Ad-ITR (Nukleotide 607–28 der SEQ ID NO: 1); 5'-Ad-ITR (Nukleotide 5496–5144 der SEQ ID NO: 1); CMV-Promotor/Enhancer (Nukleotide 5117–4524 der SEQ ID NO: 1); SD/SA-Sequenz (Nukleotide 4507–4376 der SEQ ID NO: 1); LacZ-Gen (Nukleotide 4320–845 der SEQ ID NO: 1); und eine Poly-A-Sequenz (Nukleotide 837–639 der SEQ ID NO: 1).

[0020] Bei [Fig. 4A](#) handelt es sich um eine schematische Darstellung des Shuttle-Vektors pAdΔc.CMVLacZ, der Ad5-5'-ITR und 3'-ITR in Kopf/Schwanz-Anordnung, wobei der 5'-ITR unmittelbar ein CMV-Enhancer/Promotor-LacZ-Minigen folgt, gefolgt von einem Grundgerüst des Plasmids pSP72 (Promega), enthält. Restriktionsendonucleaseenzyme sind mit den herkömmlichen Bezeichnungen in den Plasmidkonstrukten dargestellt.

[0021] Bei [Fig. 4B](#) handelt es sich um eine schematische Darstellung der Funktion des Vektorsystems aus [Fig. 4A](#). In Gegenwart des Helfervirus Ad.CBhpAP wird die zirkuläre pADΔc.CMVLacZ-Shuttle-Vektorsequenz in Virionköpfe verpackt, die sich von den Helfervirionen durch das Vorhandensein des LacZ-Gens unterscheiden.

[0022] In den [Fig. 5A](#) bis [Fig. 5F](#) [SEQ ID NO: 2] ist der obere DNA-Strang des doppelsträngigen Vektors padΔc.CMVLacZ dargestellt. Die komplementäre Sequenz kann vom Fachmann leicht gewonnen werden. Die Sequenz enthält die folgenden Komponenten: 5'-Ad-ITR (Nukleotide 600–958 der SEQ ID NO: 2); CMV-Promotor/Enhancer (Nukleotide 969–1563 der SEQ ID NO: 2); SD/SA-Sequenz (Nukleotide 1579–1711); LacZ-Gen (Nukleotide 1762–5236 der SEQ ID NO: 2); Poly-A-Sequenz (Nukleotide 5245–5443 der SEQ ID NO: 2); und 3'-Ad-ITR (Nukleotide 16–596 der SEQ ID NO: 2).

[0023] Bei [Fig. 6](#) handelt es sich um eine schematische Darstellung des Shuttle-Vektors pAdΔ.CBCFTR, der 5'-ITR aus AdS, gefolgt von einem chimären CMV-Enhancer/β-Actin-Promotor-Enhancer, einem CFTR-Gen, einer Poly-A-Sequenz, einer 3'-ITR aus Ad5, enthält, wobei die restliche Plasmidsequenz aus dem Rückgrat des Plasmids pSL1180 (Pharmacia) stammt. Restriktionsendonucleasenenzyme sind mit herkömmlichen Bezeichnungen in den Plasmidkonstrukten dargestellt.

[0024] In den [Fig. 7A](#) bis [Fig. 7H](#) [SEQ ID NO: 3] ist der obige DNA-Strang des doppelsträngigen Plasmids pAdΔ.CBCFTR dargestellt. Die komplementäre Sequenz kann vom Fachmann leicht gewonnen werden. Die Sequenz enthält die folgenden Komponenten: 5'-Ad-ITR (Nukleotide 9611–9254 der SEQ ID NO: 3); chimärer CMV-Enhancer/β-Actin-Promotor (Nukleotide 9241–8684 der SEQ ID NO: 3); CFTR-Gen (Nukleotide 8622–4065 der SEQ ID NO: 3); Poly-A-Sequenz (Nukleotide 3887–3684 der SEQ ID NO: 3); und 3'-Ad-ITR (Nukleotide 3652–3073 der SEQ ID NO: 3). Das restliche Plasmidgrundgerüst wird aus pSL1180 (Pharmacia) erhalten.

[0025] In [Fig. 8A](#) ist die Erzeugung der adenoviralen 5'-terminalen Sequenz, die die PAC-Domänen I und II enthält, mittels PCR veranschaulicht. Siehe Pfeile in [Fig. 1B](#) zur Bezeichnung der rechten und linken (PAC II)-PCR-Sonden.

[0026] In [Fig. 8B](#) ist die Erzeugung der 5'-terminalen Sequenz, die die PAC-Domänen I, II, III und IV enthält, mittels PCR veranschaulicht. Siehe Pfeile in [Fig. 1B](#) zur Bezeichnung der rechten und linken (PAC II)-PCR-Sonden.

[0027] [Fig. 8C](#) zeigt die in die Multiklonierungsstelle von pAd.Link.1 (IHGT Vector Core) unter Erhalt von

pAd.PACII (Domänen I und II) bzw. pAd.PACIV (Domänen I, II, III und IV) subklonierten Amplifikationsprodukte, wodurch gelähmte Helferviren, Ad.PACII bzw. Ad.PACIV, mit modifizierten Verpackungssignalen (PAC-Signalen) erhalten werden.

[0028] Bei [Fig. 9A](#) handelt es sich um eine schematische Darstellung der Subklonierung eines Reporter-Minigenes der alkalischen Phosphatase aus menschlicher Plazenta, das den sehr frühen [immediate early] CMV-Enhancer/Promotor (CMV), die cDNA der alkalischen Phosphatase aus menschlicher Plazenta (hpAP) sowie das SV40-Polyadenylierungssignal (pA) enthält, in pAd.PACII unter Erhalt des gelähmten Helfer-Virusvektors pAdΔ.PACII.CMVhpAP. Restriktionsendonucleaseenzyme sind mit herkömmlichen Bezeichnungen in den Plasmidkonstrukten dargestellt.

[0029] Bei [Fig. 9B](#) handelt es sich um eine schematische Darstellung der Subklonierung des gleichen Minigens aus [Fig. 9A](#) in pAd.PACIV unter Erhalt des gelähmten Helfer-Virusvektors pAd.PACIV.CMV.hpAP.

[0030] Bei [Fig. 10](#) handelt es sich um ein Fließdiagramm, in dem die Synthese eines Polycation-Helfervirus-Konjugats auf Adenovirusbasis und dessen Kombination mit einem pAdΔ-Shuttle-Vektor unter Erhalt eines neuartigen Viruspartikelkomplexes zusammengefaßt ist. CsCl-Banden gereinigtes Helfer-Adenovirus wurde mit dem heterobifunktionellen Quervernetzer Sulfo-SMCC umgesetzt, wobei die Capsid-Proteinfaser mit der nukleophilen Maleimidgruppierung markiert wird. Freie Sulfhydryle wurden unter Verwendung von 2-Iminoethanol-HCl auf Poly-L-Lysin eingeführt und mit dem markierten Adenovirus gemischt, wodurch das Helfervirus-Konjugat Ad-pLys erhalten wurde. Ein einzigartiges Partikel auf Adenovirusbasis wird erzeugt, in dem man das Ad-pLys-Konjugat zur Abtrennung von nicht eingebautem Poly-L-Lysin über einen CsCl-Gradienten reinigt, anschließend ausgiebig dialysiert, Shuttle-Plasmid-DNAs zu Ad-pLys zugibt und den durch das Shuttle-Plasmid umhüllende Shuttle-Plasmid gebildeten Komplex entwickeln läßt.

[0031] Bei [Fig. 11](#) handelt es sich um ein schematisches Diagramm von pCCL-DMD, das ausführlich in Beispiel 9 unten beschrieben ist.

[0032] In [Fig. 12A](#) bis [Fig. 12P](#) ist die durchgehende DNA-Sequenz von pAdΔ.CMVmDys [SEQ ID NO: 10] gezeigt.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0033] Durch die vorliegende Erfindung werden ein einzigartiges rekombinantes Adenovirus, das zur Zuführung von Transgenen an Zielzellen in der Lage ist, ebenso wie die Komponenten für die Herstellung des einzigartigen Virus sowie Verfahren zur Verwendung des Virus zur Behandlung verschiedener genetischer Störungen bereitgestellt.

[0034] Bei dem AdΔ-Virus der vorliegenden Erfindung handelt es sich um ein Viruspartikel, das lediglich die für die Replikation und Virioncapsidierung notwendigen adenoviralen cis-Elemente (d.h. ITRs und Verpackungssequenzen) enthält, in dem jedoch andererseits alle Adenovirusgene (d.h. alle viralen offenen Leseraster) deletiert sind. Dieses Virus trägt ein ausgewähltes Transgen unter der Kontrolle eines ausgewählten Promotors und weiterer herkömmlicher Regulationskomponenten, wie z.B. eines Poly-A-Signals. Das AdΔ-Virus ist durch eine verbesserte Beständigkeit der Vektor-DNA in den Wirtszellen, eine reduzierte Antigenität/Immunogenität und somit durch eine verbesserte Leistung als Zufuhrungsvehikel gekennzeichnet. Ein zusätzlicher Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß das AdΔ-Virus die Verpackung sehr großer Transgene, wie z.B. einer Vollängen-Dystrophin-cDNA zur Behandlung des für die Duchenne-Muskel-Dystrophie (DMD) charakteristischen fortschreitenden Abbaus von Muskelgewebe, gestattet.

[0035] Dieses neuartige rekombinante Virus wird unter Verwendung eines auf Adenovirus beruhenden Vektor-Produktionssystems hergestellt, das zwei Komponenten enthält: 1) einen Shuttle-Vektor, der für die Replikation und Virioncapsidierung notwendige adenovirale cis-Elemente umfaßt und in dem alle Virusgene deletiert sind und der ein Reporter- oder therapeutisches Minigen trägt, sowie 2) ein Helfer-Adenovirus, das allein oder zusammen mit einer Verpackungszelllinie dazu in der Lage ist, alle für eine produktive Virusinfektion notwendigen viralen Genprodukte bereitzustellen, wenn es mit dem Shuttle-Vektor cotransfiziert wird. Vorzugsweise ist das Helfervirus so modifiziert, daß es sich selbst nicht effizient verpacken kann. In dieser Situation wird es wünschenswerterweise zusammen mit einer Verpackungszelllinie verwendet, die adenovirale Gene stabil exprimiert. Zu den Verfahren zur Herstellung dieses Virusvektors aus diesen Komponenten gehören sowohl ein neuartiges Mittel zur Verpackung eines adenoviralen/transgenhaltigen Vektors in ein Virus als auch ein neuartiges Verfahren zur anschließenden Trennung des Helfervirus von dem neugebildeten rekombinanten Virus.

I. Der Shuttle-Vektor

[0036] Der Shuttle-Vektor, mit pAdΔ bezeichnet, setzt sich aus adenoviralen Sequenzen und Transgen-Sequenzen, einschließlich Vektorregulationskontrollsequenzen, zusammen.

A. Die adenoviralen Sequenzen

[0037] Die adenoviralen Nukleinsäuresequenzen des Shuttle-Vektors stellen die minimalen adenoviralen Sequenzen bereit, die die Herstellung eines Viruspartikels mit Hilfe eines Helfervirus ermöglichen. Diese Sequenzen helfen bei der Zuführung eines rekombinanten Transgen-Genoms an eine Zielzelle mittels des erhaltenen rekombinanten Virus.

[0038] Die DNA-Sequenzen einer Reihe von Adenovirustypen sind von GenBank erhältlich, einschließlich Typ Ad5 [GenBank Zugangs-Nr. M73260]. Die adenoviralen Sequenzen können von einem beliebigen bekannten adenoviralen Serotyp, wie z.B. 2, 3, 4, 7, 12 und 40 gewonnen werden und dabei weiterhin einen beliebigen der zur Zeit identifizierten 41 menschlichen Typen [siehe z.B. Horwitz, oben zitiert] beinhalten. In ähnlicher Weise können auch Adenoviren, von denen bekannt ist, daß sie andere Tiere infizieren, ebenso in den Vektorkonstrukten der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden. Dabei wird erwartet, daß die Auswahl des Adenovirustyps die folgende Erfindung nicht beschränkt. Verschiedene Adenovirusstämme können von der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland bezogen werden oder sind auf Anfrage bei verschiedenen kommerziellen und institutionellen Quellen erhältlich. Im folgenden Ausführungsbeispiel wird aus Gründen der Zweckmäßigkeit ein Adenovirus Typ 5 (Ad5) verwendet.

[0039] Es ist jedoch wünschenswert, verschiedene pAdΔ-Shuttle-Vektoren zu beziehen, die auf unterschiedlichen menschlichen adenoviralen Serotypen beruhen. Dabei wird erwartet, daß eine Bibliothek solcher Plasmide sowie die daraus erhaltenen AdΔ-Virusvektoren für ein therapeutisches Regime zur Umgehung der zellulären, sowie möglicherweise der humoralen Immunität sowie zur Verlängerung der Dauer der Transgenexpression, ebenso wie zur Verbesserung des Erfolgs wiederholter therapeutischer Behandlungen geeignet sein könnten. Darüber hinaus wird angenommen, daß die Verwendung verschiedener Serotypen zur Bildung rekombinanter Viren mit unterschiedlichen Zielgewebespezifitäten führt. Es wird erwartet, daß das Fehlen von adenoviralen Genen im AdΔ-Virusvektor eine negative CTL-Antwort, die normalerweise zur Zerstörung von rekombinanten Adenoviren, in denen lediglich das E1-Gen deletiert ist, führt, vermindert oder beseitigt.

[0040] Insbesondere handelt es sich bei den im pAdΔ-Shuttle-Vektor der vorliegenden Erfindung eingesetzten adenoviralen Nukleinsäuresequenzen um genomische Adenovirussequenzen, bei denen alle Virusgene deletiert sind. Ganz besonders handelt es sich bei den verwendeten Adenovirussequenzen um die cis-wirkenden 5'- und 3'-inversen terminalen Wiederholungssequenzen (ITR-Sequenzen) eines Adenovirus (die als Replikationsursprünge dienen) sowie die native 5'-Verpackungs/Enhancer-Domäne, die zur Verpackung linearer Ad-Genome notwendige Sequenzen sowie Enhancer-Elemente für den E1-Promotor enthält. Dies sind die für die Replikation und Virioncapsidierung notwendigen Sequenzen. Siehe z.B. P. Hearing et al, J. Virol., 61(8): 2555–2558 (1987); M. Grable und P. Hearing, J. Virol., 64(5): 2047–2056 (1990); und M. Grable und P. Hearing, J. Virol., 66(2): 723–731 (1992).

[0041] Gemäß der vorliegenden Erfindung läßt sich die gesamte, den 5'-ITR- und den Verpackungs-/Enhancerbereich enthaltende adenovirale 5'-Sequenz als 5'-Adenovirussequenz im pAdΔ-Shuttle-Vektor einsetzen. Diese linke terminale (5'-) Sequenz des erfindungsgemäß geeigneten Ad5-Genoms reicht von Bp1 bis etwa 360 des üblichen Adenovirusgenoms, auch als Karteneinheiten 0–1 des Virusgenoms bezeichnet. Diese Sequenz wird hier in Form der Nukleotide 5496–5144 der SEQ ID NO: 1, Nukleotide 600–958 der SEQ ID NO: 2; und Nukleotide 9611–9254 der SEQ ID NO: 3 bereitgestellt und weist im allgemeinen eine Länge von etwa 353 bis etwa 360 Nukleotide auf. Zu dieser Sequenz gehören der 5'-ITR (Bp 1–103 des Adenovirusgenoms) sowie die Verpackungs-/Enhancer-Domäne (Bp 194–358 des Adenovirusgenoms). Siehe [Fig. 1A](#), 3, 5 und 7.

[0042] Vorzugsweise wird dieser native adenovirale 5'-Bereich im Shuttle-Vektor in nichtmodifizierter Form eingesetzt. Dennoch sind einige Modifikationen, einschließlich Deletionen, Substitutionen und Additionen, an dieser Sequenz erlaubt, die keinen negativen Effekt auf ihre biologische Funktion ausüben. Siehe z.B. WO 93/24641, veröffentlicht am 9. Dezember 1993. Die Fähigkeit zur Modifizierung dieser ITR-Sequenzen liegt im Bereich des fachmännischen Könnens. Siehe z.B. Texte wie etwa Sambrook et al, „Molecular Cloning. A Laboratory Manual.“, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989).

[0043] Zu den adenoviralen 3'-Sequenzen des Shuttle-Vektors gehören die rechte terminale (3'-) ITR-Se-

quenz des Adenovirusgenoms, die von etwa Bp 35.353 – Ende des Adenovirusgenoms, bzw. Karteneinheiten 98.4–100, reicht. Diese Sequenz wird hier in Form der Nukleotide 607–28 der SEQ ID NO: 1, Nukleotide 16–596 der SEQ ID NO: 2 und Nukleotide 3652–3073 der SEQ ID NO: 3 bereitgestellt und weist im allgemeinen eine Länge von etwa 580 Nukleotiden auf. Diese gesamte Sequenz wird wünschenerweise als die 3'-Sequenz eines pAdΔ-Shuttle-Vektors verwendet. Vorzugsweise wird der native adenovirale 3'-Bereich im Shuttle-Vektor in nichtmodifizierter Form eingesetzt. Dennoch sind einige Modifikationen an dieser Sequenz, die keinen negativen Effekt auf ihre biologische Funktion ausüben, erlaubt.

[0044] Ein beispielhafter pAdΔ-Shuttle-Vektor der vorliegenden Erfindung, der unten und in [Fig. 2A](#) beschrieben ist, enthält nur diejenigen Adenovirussequenzen, die zur Verpackung von genomischer Adenovirus-DNA in einen vorgeformten Capsidkopf benötigt werden. Der pAdΔ-Vektor enthält die 5'-terminalen- und 3'-terminalen Sequenzen (identifiziert in der Beschreibung zu [Fig. 3](#)) codierenden Ad5-Sequenzen ebenso wie die unten beschriebenen Transgensequenzen.

[0045] Aus den vorstehenden Angaben darf man erwarten, daß ein Fachmann andere äquivalente Adenovirussequenzen zur Verwendung in den AdΔ-Vektoren der vorliegenden Erfindung einsetzen kann. Zu diesen Sequenzen können weitere Adenovirusstämme oder die oben erwähnten cis-wirkenden Sequenzen mit kleineren Modifikationen gehören.

B. Das Transgen

[0046] Bei der Transgensequenz des Vektors und des rekombinanten Virus handelt es sich um eine Nukleinsäuresequenz oder ein zur Adenovirussequenz heterologes reverses Transkript davon, die bzw. das ein interessierendes Polypeptid oder Protein codiert. Das Transgen ist mit den Regulationskomponenten auf eine Weise operativ verknüpft, die die Transkription der Transgene gestattet.

[0047] Die Zusammensetzung der Transgensequenz hängt von der Verwendung, die für das entstandene Virus vorgesehen ist, ab. Beispielsweise umfaßt eine Art von Transgensequenz eine Reporter-Sequenz, die bei der Expression ein nachweisbares Signal produziert. Zu solchen Reporter-Sequenzen gehören, ohne darauf beschränkt zu sein, eine cDNA der Beta-Galactosidase (LacZ) aus *E. coli*, ein Gen für alkalische Phosphatase aus menschlicher Plazenta sowie ein Gen für das „green fluorescent protein“. Sind diese Sequenzen mit Regulationselementen, die ihre Expression steuern, assoziiert, so liefern sie Signale, die mit herkömmlichen Mitteln, z.B. Absorption im Ultraviolettbereich, erkennbare Farbänderung, usw. nachweisbar sind.

[0048] Zu einer weiteren Art von Transgensequenz gehört ein therapeutisches Gen, das ein gewünschtes Genprodukt in einer Wirtszelle exprimiert. Diese therapeutischen Nukleinsäuresequenzen codieren typischerweise Produkte zur Verabreichung und Expression in einem Patienten in vivo oder ex vivo, um einen vererbten oder nicht vererbten genetischen Defekt zu ersetzen oder zu korrigieren oder eine epigenetische Störung oder Krankheit zu behandeln. Zu derartigen therapeutischen Genen, die zur Durchführung der Gentherapie wünschenswert sind, gehören, ohne darauf beschränkt zu sein, ein normales Gen des transmembranen Regulators der cystischen Fibrose (CFTR) (siehe [Fig. 7](#)), ein LDL- (low density lipoprotein)-Gen [T. Yamamoto et al, *Cell*, 39: 27–28 (November 1984)] eine DMD-cDNA-Sequenz [Teilsequenz erhältlich von GenBank, Zugangs-Nr. M36673, M36671, [A. P. Monaco et al, *Nature*, 323: 646–650 (1986)] und L06900, [Roberts et al, *Hum. Mutat.*, 2: 293–299 (1993)]] (GenBank), sowie eine Reihe von Genen, die vom Fachmann leicht ausgewählt werden können. Die Auswahl des Transgens wird nicht als Beschränkung der vorliegenden Erfindung betrachtet, da eine solche Auswahl im Bereich des Fachwissens liegt.

C. Regulationselemente

[0049] Zusätzlich zu den oben identifizierten Hauptelementen für den pAdΔ-Shuttle-Vektor, d.h. den Adenovirussequenzen sowie dem Transgen, beinhaltet der Vektor auch herkömmliche, zur Steuerung der Expression des Transgens in einer mit dem pAdΔ-Vektor transfizierten Zelle notwendige Regulationselemente. So enthält der Vektor einen ausgewählten Promotor, der mit dem Transgen verknüpft und zusammen mit dem Transgen zwischen den Adenovirussequenzen des Vektors lokalisiert ist.

[0050] Bei der Auswahl des Promotors handelt es sich um einen Routinevorgang, der keine Beschränkung für den pAdΔ-Vektor selbst darstellt. Als mögliche Promotoren kommen konstitutive Promotoren oder regulierte (induzierbare) Promotoren, die eine Kontrolle der Menge des zu exprimierenden Transgens erlauben, in Frage. Ein wünschenswerter Promotor ist beispielsweise der des sehr frühen Promotors/Enhancers aus Cytomegalovirus [siehe z.B. Boshart et al, *Cell*, 41: 521–530 (1985)]. Dieser Promotor findet sich bei den Nukleotiden

5117–4524 der SEQ ID NO: 1 sowie den Nukleotiden 969–1563 der SEQ ID NO: 2. Ein weiterer Promotor ist der CMV-Enhancer/Hühner- β -Actin-Promotor (Nukleotide 9241–8684 der SEQ ID NO: 3). Ein weiterer wünschenswerter Promotor umfaßt auch, ohne darauf beschränkt zu sein, den LTR-Promotor/Enhancer aus dem Rous-sarcoma-Virus. Noch weitere Promotor-/Enhancer-Sequenzen können vom Fachmann ausgewählt werden.

[0051] Die Shuttle-Vektoren enthalten ebenso wünschenswerterweise zu den Adenovirussequenzen heterologe Nukleinsäuresequenzen, einschließlich Sequenzen, die für eine effiziente Polyadenylierung des Transkripts benötigte Signale liefern, sowie Introns mit funktionellen Spleiß-Donor- und -Akzeptorstellen (SD/SA). Eine übliche, in den beispielhaften Vektoren der vorliegenden Erfindung eingesetzte Poly-A-Sequenz ist diejenige, die sich vom Papovavirus SV-40 ableitet [siehe z.B. Nukleotide 837–639 der SEQ ID NO: 1; 5245–5443 der SEQ ID NO: 2; und 3887–3684 der SEQ ID NO: 3]. Die Poly-A-Sequenz wird im allgemeinen im Vektor nach den Transgensequenzen und vor den 3'-Adenovirussequenzen eingefügt. Eine übliche Intronsequenz leitet sich ebenso von SV-40 ab und wird als SV-40-T-Intronsequenz bezeichnet [siehe z.B. Nukleotide 4507–4376 der SEQ ID NO: 1 und 1579–1711 der SEQ ID NO: 2]. Ein pAd Δ -Shuttle-Vektor der vorliegenden Erfindung kann ebenso ein solches Intron enthalten, das wünschenswerterweise zwischen der Promotor-/Enhancer-Sequenz und dem Transgen lokalisiert ist. Die Auswahl dieser und weiterer üblicher Vektorelemente ist allgemein bekannt, und viele solcher Sequenzen sind erhältlich [siehe z.B. Sambrook et al sowie darin zitierte Literaturangaben]. Beispiele für solche Regulationssequenzen für die obigen Sequenzen sind in den Plasmidsequenzen der Fig. 3, 5 und 7 angegeben.

[0052] Die Kombination aus dem Transgen, dem Promotor/Enhancer sowie den anderen regulatorischen Vektorelementen wird hier zur erleichterten Bezugnahme als „Minigen“ bezeichnet. Das Minigen ist vorzugsweise von den oben beschriebenen cis-wirkenden adenoviralen 5'- und 3'-Sequenzen flankiert. Ein derartiges Minigen kann eine Größe im Bereich von mehreren 100 Basenpaaren bis zu etwa 30 kb liegen, was auf das Fehlen der frühen und späten adenoviralen Gensequenzen im Vektor zurückzuführen ist. Somit erlaubt dieses Ad Δ -Vektorsystem in Bezug auf die Größe eine große Bandbreite bei der Auswahl der verschiedenen Komponenten des Minigens, insbesondere des ausgewählten Transgens. Ausgestattet mit den Lehren der vorliegenden Erfindung läßt sich die Konstruktion eines solchen Minigens durch Zurückgreifen auf herkömmliche Techniken bewerkstelligen.

II. Das Helfervirus

[0053] Aufgrund der begrenzten Menge im Ad Δ -Shuttle-Vektor vorliegender Adenovirussequenz muß ein Helfer-Adenovirus der vorliegenden Erfindung allein oder im Zusammenspiel mit einer Verpackungszelllinie eine hinreichende Menge an für eine produktive Virusinfektion notwendigen adenoviralen Gensequenzen bereitstellen. Erfindungsgemäß geeignete Helferviren enthalten somit ausgewählte adenovirale Gensequenzen und gegebenenfalls ein zweites Reporter-Minigen.

[0054] Normalerweise führt die Produktion eines rekombinanten Adenovirus, bei Verwendung eines ein volles Komplement an adenoviralen Genen enthaltenden Helfer-Adenovirus zu einem mit einer Überschußproduktion an Helfervirus verunreinigten rekombinanten Virus. Somit ist eine ausgiebige Reinigung des Virusvektors vom verunreinigenden Helfervirus erforderlich. In der vorliegenden Erfindung wird jedoch ein Weg zur Erleichterung der Reinigung und Verringerung der Verunreinigung durch Lähmung des Helfervirus bereitgestellt.

[0055] Eine bevorzugte Ausführungsform eines Helfervirus der vorliegenden Erfindung enthält somit drei Komponenten (A) Modifikationen oder Deletionen der nativen adenoviralen Gensequenzen, die die effiziente Verpackung steuern, so daß die Verpackungsfunktion des Helfervirus oder seine Fähigkeit zur Replikation weitgehend ausgeschaltet oder „gelähmt“ wird, (B) ausgewählte Adenovirusgene und (C) gegebenenfalls ein Reporter-Minigen. Diese „gelähmten“ Helferviren können auch als Polykations-Konjugaten ausgebildet werden, wie unten beschrieben.

[0056] Die das Helfervirus bildenden adenoviralen Sequenzen können aus den oben bei der Diskussion des Shuttle-Vektors identifizierten Quellen erhalten werden. Die Verwendung unterschiedlicher Ad-Serotypen als Helferviren ermöglicht die Produktion von rekombinanten Viren, die die Δ Ad-(Serotyp-5)-Shuttle-Vektorsequenzen in einem von dem anderen adenoviralen Serotyp gebildeten Capsid enthalten. Diese rekombinanten Viren sind beim Abzielen auf unterschiedliche Gewebe oder bei der Umgehung einer Immunreaktion gegenüber den Δ Ad-Sequenzen mit einem Serotyp-5-Capsid wünschenswert. Die Verwendung dieser unterschiedlichen Ad-Serotyp-Helferviren kann auch Vorteile hinsichtlich Produktion, Stabilität und besserer Verpackung des rekombinanten Virus zeigen.

A. Die lähmenden Modifikationen

[0057] Ein zur Produktion des Adenovirusvektors der vorliegenden Erfindung verwendetes wünschenswertes Helfervirus wird in seiner oben identifizierten 5'-ITR-Verpackungs-/Enhancer-Domäne modifiziert (oder gelähmt). Wie oben angegeben enthält der Verpackungs/Enhancer-Bereich für die Verpackung linearer Adenovirusgenome notwendige Sequenzen („PAC“-Sequenzen). Insbesondere enthält diese Sequenz wenigstens sieben verschiedene, aber dennoch funktionell redundante Domänen, die für eine effiziente Capsidierung der replizierten Virus-DNA benötigt werden.

[0058] Fünf dieser sogenannten A-Wiederholungen oder PAC-Sequenzen sind innerhalb eines Nukleotidsequenzabschnitts von Bp 194–358 des Ad5-Genoms lokalisiert (siehe [Fig. 1B](#)). PAC I ist bei Bp 241–248 des Adenovirusgenoms (auf dem zu den Nukleotiden 5259–5246 der SEQ ID NO: 1 komplementären Strang) lokalisiert. PAC II ist bei Bp 262–269 des Adenovirusgenoms (auf dem zu den Nukleotiden 5238–5225 der SEQ ID NO: 1 komplementären Strang) lokalisiert. PAC III ist bei Bp 304–311 des Adenovirusgenoms (auf dem zu den Nukleotiden 5196–5183 der SEQ ID NO: 1 komplementären Strang) lokalisiert. PAC IV ist bei Bp 314–321 des Adenovirus (auf dem zu den Nukleotiden 5186–5172 der SEQ ID NO: 1 komplementären Strang) lokalisiert. PAC V ist bei Bp 339–346 des Adenovirus (auf dem zu den Nukleotiden 5171–5147 der SEQ ID NO: 1 komplementären Strang) lokalisiert.

[0059] Entsprechende Sequenzen lassen sich aus den SEQ ID NO: 2 und 3 erhalten. PAC I ist bei den Nukleotiden 837–851 der SEQ ID NO: 2 sowie auf dem zu den Nukleotiden 9374–9360 der SEQ ID NO: 3 komplementären Strang lokalisiert. PAC II ist bei den Nukleotiden 859–863 der SEQ ID NO: 2 sowie auf dem zu den Nukleotiden 9353–9340 der SEQ ID NO: 3 komplementären Strang lokalisiert. PAC III ist bei den Nukleotiden 901–916 der SEQ ID NO: 2 sowie auf dem zu den Nukleotiden 9311–9298 der SEQ ID NO: 3 komplementären Strang lokalisiert. PAC IV ist bei den Nukleotiden 911–924 der SEQ ID NO: 2 sowie auf dem zu den Nukleotiden 9301–9288 der SEQ ID NO: 3 komplementären Strang lokalisiert. PAC V ist bei den Nukleotiden 936–949 der SEQ ID NO: 2 sowie auf dem zu den Nukleotiden 9276–9263 der SEQ ID NO: 3 komplementären Strang lokalisiert.

[0060] In der folgenden Tabelle 1 sind diese fünf nativen Ad5-Sequenzen sowie eine auf den Ähnlichkeiten zwischen einem acht Nukleinsäuren langen Abschnitt innerhalb der fünf Sequenzen beruhende PAC-Konsensus-Sequenz aufgeführt. Die Konsensus-Sequenz enthält zwei Positionen, an denen die Nukleinsäure A oder T (A/T) sein kann. Für die Nukleinsäuren werden die herkömmlichen Ein-Buchstaben-Bezeichnungen verwendet, wie im Fachbereich bekannt ist.

Tabelle 1

<u>A-Wiederholung</u>	Adenovirusgenom		
	Basenpaar-Nr. &	Nukleotidsequenz	
	241	248	
I	TAG TAAATTTG	GGC	[SEQ ID NO: 4]
	262	269	
II	AGT AAGATTTG	GCC	[SEQ ID NO: 5]
	304	311	
III	AGT GAAATCTG	AAT	[SEQ ID NO: 6]
	314	321	
IV	GAA TAATTTTG	TGT	[SEQ ID NO: 7]
	339	346	
V	CGT AATATTTG	TCT	[SEQ ID NO: 8]
Konsensus 5'		(A/T)AN(A/T)TTTG 3'	[SEQ ID NO: 9]

[0061] Gemäß der vorliegenden Erfindung können an einer oder mehreren dieser PAC-Sequenzen Mutationen oder Deletionen vorgenommen werden, um wünschenswerte gelähmte Helferviren zu erzeugen. Eine Deletionsanalyse der Verpackungsdomäne zeigte eine positive Korrelation zwischen der Capsidierungseffizienz und der Anzahl an A-Verpackungswiederholungen, die am 5'-Ende des Genoms vorhanden waren. Zu möglichen Modifikationen dieser Domäne zählen 5'-Adenovirussequenzen, die weniger als alle fünf der PAC-Sequenzen der Tabelle 1 enthalten. Beispielsweise können im gelähmten Virus nur zwei PAC-Sequenzen vorhanden sein, z.B. PAC I und PAC II, PAC III und PAC IV usw. Deletionen ausgewählter PAC-Sequenzen können die Deletion zusammenhängender oder nicht zusammenhängender Sequenzen beinhalten. So können beispielsweise PAC II und PAC IV deletiert werden, wodurch PAC I, III und IV in der 5'-Sequenz zurückbleiben. Eine alternative Modifikation kann auch der Austausch einer oder mehrerer der nativen PAC-Sequenzen gegen eine oder mehrere Wiederholungen der Konsensus-Sequenz der Tabelle 1 darstellen. Als Alternative kann dieser Adenovirusbereich modifiziert werden, indem absichtlich Mutationen eingefügt werden, die eine oder mehrere der nativen PAC-Sequenzen unterbrechen. Ein Fachmann kann die PAC-Sequenzen weiter manipulieren, so daß in ähnlicher Weise der Effekt einer Verminderung der Helfervirus-Verpackungseffizienz auf ein gewünschtes Niveau erreicht wird.

[0062] Beispielhafte Helferviren, bei denen die Manipulation der oben beschriebenen PAC-Sequenzen vorgenommen wird, sind in Beispiel 7 unten offenbart. Kurz gesagt enthält, wie in dem Beispiel beschrieben, ein Helfervirus anstelle des nativen 5'-ITR-Bereichs (Adenovirusgenom Bp 1–360), eine Bp 1–269 des Adenovirusgenoms umspannende 5'-Adenovirussequenz, die lediglich die 5'-ITR- sowie die PAC I- und PAC II-Sequenzen enthält und den Adenovirusbereich Bp 270–360 deletiert.

[0063] Ein weiteres in der PAC-Sequenz modifiziertes Helfervirus enthält nur die 5'-AdS-Sequenz des ITR und PAC I bis PAC IV (Ad Bp 1–321), wobei PAC V und weitere Sequenzen im Ad-Bereich Bp 322–360 deletiert sind.

[0064] Diese modifizierten Helferviren sind durch eine verminderte Effizienz der Helferviruscapsidierung gekennzeichnet. Diese Helferviren mit den spezifischen Modifikationen der mit der Verpackungseffizienz verbundenen Sequenzen liefern eine Verpackungseffizienz, die hoch genug ist, um Produktionsmengen des Helfer-

virus zu erzeugen, aber dennoch niedrig genug ist, daß sie das Erreichen höherer Ausbeuten an Ad Δ -transduzierenden Viruspartikeln gemäß der vorliegenden Erfindung gestattet.

B. Die ausgewählten Adenovirusgene

[0065] Erfindungsgemäße Helferviren, gleichgültig ob sie die oben beschriebenen „lähmenden“ Modifikationen enthalten oder nicht, enthalten je nach der Zelllinie, die mit dem Helfervirus und dem Shuttle-Vektor transfiziert wird, ausgewählte adenovirale Gensequenzen. Ein bevorzugtes Helfervirus enthält verschiedene Adenovirusgene zusätzlich zu den oben beschriebenen modifizierten Sequenzen.

[0066] Beispielsweise kann es sich bei dem Helfervirus um ein Wildtyp-Ad-Virus handeln, falls es sich bei der zur Produktion des rekombinanten Virus verwendeten Zelllinie nicht um eine Verpackungszelllinie handelt. Somit liefert das Helfervirus die notwendigen frühen Adenovirusgene E1, E2, E4 sowie alle übrigen späten, intermediären, Struktur- und Nichtstrukturgene des Adenovirusgenoms. Bei diesem Helfervirus kann es sich durch den Einbau von Modifikationen in seiner nativen 5'-Verpackungs-/Enhancer-Domäne um ein gelähmtes Helfervirus handeln.

[0067] Ein wünschenswertes Helfervirus ist replikationsdefekt, wobei ihm alle oder ein hinreichender Anteil der adenoviralen frühen Gene, nämlich dem sehr frühen Gen E1a (das von μ 1.3 bis 4.5 reicht) sowie des spätfürhen [delayed early] Gens E1b (das von μ 4.6 bis 11.2 reicht), fehlen, um ihre normalen biologischen Funktionen auszuschalten. Solche replikationsdefekten Viren können auch lähmende Modifikationen in der Verpackungs-/Enhancer-Domäne aufweisen. Aufgrund der Schwierigkeit im Zusammenhang mit dem vollständigen Abtrennen von Adenovirus aus Ad Δ -Präparationen, die durch CsCl-Auftriebsdichtezentrifugation angereichert wurden, wird durch Verwendung eines replikationsdefekten Helfer-Adenovirus die Einführung von infektiösem Adenovirus für in vivo-Untersuchungen an Tieren vermieden. Dieses Helfervirus wird zusammen mit einer Verpackungszelllinie eingesetzt, die die fehlenden E1-Proteine liefert, wie z.B. die Zelllinie 293.

[0068] Darüber hinaus kann das gesamte oder ein Teil des adenoviralen späten-frühen Gens E3 (das von μ 76.6 bis 86.2 reicht) aus der Adenovirussequenz, die einen Teil der erfindungsgemäß geeigneten Helferviren bildet, entfernt werden, ohne dabei die Funktion des Helfervirus negativ zu beeinflussen, da dieses Genprodukt für die Bildung eines funktionierenden Virus nicht notwendig ist.

[0069] In Gegenwart anderer Verpackungszelllinien, die in der Lage sind, adenovirale Proteine zusätzlich zu E1 zu liefern, können dementsprechend die diese adenoviralen Proteine codierenden Gene in dem Helfervirus deletiert sein. Solche Helferviren mit zusätzlichen Deletionen können wünschenswerterweise auch lähmende Modifikationen, wie oben beschrieben, enthalten.

C. Ein Reporter-Minigen

[0070] Ebenso ist es wünschenswert, daß das Helfervirus ein Reporter-Minigen enthält, wobei sich das Reporter-gen wünschenswerterweise von dem im Shuttle-Vektor enthaltenen Reportertransgen unterscheidet. Eine Reihe solcher Reporter gene sind bekannt, wie oben ausgeführt. Das Vorhandensein eines Reporter gens auf dem Helfervirus, das sich von dem Reporter gen auf dem pAd Δ unterscheidet, gestattet die unabhängige Überwachung sowohl des rekombinanten Ad Δ -Virus als auch des Helfervirus. So ermöglicht beispielsweise die Expression rekombinanter alkalischer Phosphatase die Überwachung von Restmengen an verunreinigendem Adenovirus, unabhängig von dem von einem pAd Δ -Shuttle-Vektor oder einem Ad Δ -Virus exprimierten rekombinanten LacZ.

D. Helfervirus-Polykationen-Konjugate

[0071] Noch ein weiteres Verfahren zur Verringerung der Verunreinigung von Helfervirus beinhaltet die Bildung von Polykatione-Helfervirus-Konjugaten, die mit einem andere, nicht im Helfervirus vorhandene adenovirale Gene enthaltenden Plasmid assoziiert sein können. Die oben beschriebenen Helferviren können weiterhin durch Zurückgreifen auf die Adenovirus-Polylysin-Konjugat-Technologie modifiziert werden (siehe z.B. Wu et al, J. Biol. Chem., 264: 16985–16987 (1989); und K. J. Fisher und J. M. Wilson, Biochem. J., 299: 49 (1. April 1994), die hiermit durch Bezugnahme aufgenommen sind.

[0072] Mit dieser Technologie wird ein vorzugsweise die späten adenoviralen Gene enthaltendes Helfervirus durch Zugabe einer um das Capsid des Helfervirus verteilten Polykationen-Sequenz modifiziert. Vorzugsweise handelt sich bei dem Polykation um Polylysin, das unter Bildung einer externen positiven Ladung um den ne-

gativ geladenen Vektor herum bindet. Danach wird ein Plasmid konstruiert, um diejenigen adenoviralen Gene, die nicht im Helfervirus vorhanden sind, beispielsweise die Gene E1, E2 und/oder E4, zu exprimieren. Das Plasmid lagert sich an das Helfervirus-Konjugat über die Ladungen auf der Polylysinsequenz an. Diese Modifikation wird wünschenswerterweise auch an einem erfindungsgemäßen lähmenden Helfervirus ausgeführt. Dieses Konjugat (auch als Trans-Infektionspartikel bezeichnet) gestattet die Entfernung zusätzlicher Adenovirusgene aus dem Helfervirus und deren Vorhandensein auf einem Plasmid, das während der Produktion des rekombinanten Virusvektors nicht in das Virus eingebaut wird. Somit wird die Auswirkung einer Verunreinigung beträchtlich vermindert.

III. Zusammenbau von Shuttle-Vektor, Helfervirus und Produktion von rekombinantem Virus

[0073] Das Material, aus dem die im pAd Δ -Shuttle-Vektor und den Helferviren verwendeten Sequenzen stammen, wird ebenso wie die unterschiedlichen Vektorkomponenten und die bei der Konstruktion der Shuttle-Vektoren, Helferviren und Ad Δ -Viren der vorliegenden Erfindung verwendeten Sequenzen aus kommerziellen oder akademischen Quellen auf der Grundlage von bereits veröffentlichtem und beschriebenen Materialien bezogen. Diese Materialien können auch aus einem individuellen Patienten erhalten oder unter Verwendung von dem Fachmann bekannten und vom Fachmann praktizierten Standardtechniken der Rekombination und molekularen Clonierung erzeugt und ausgewählt werden. Alle Modifikationen von die Vektoren und Viren bildenden existierenden Nukleinsäuresequenzen, einschließlich Sequenzdeletionen, -Insertionen, sowie weitere Mutationen werden ebenso unter Verwendung von Standardtechniken erzeugt.

[0074] Der Zusammenbau der ausgewählten DNA-Sequenzen des Adenovirus sowie der Reportergene oder therapeutischen Gene und anderen Vektorelementen in den pAd Δ -Shuttle-Vektor unter Verwendung herkömmlicher Techniken ist im Beispiel 1 unten beschrieben. Zu solchen Techniken gehören herkömmliche cDNA-Clonierungstechniken, wie z.B. die in Lehrbüchern [Sambrook et al, oben zitiert] beschriebenen, die Verwendung überlappender Oligonukleotidsequenzen der Adenovirusgenome, die Polymerasekettenreaktion sowie alle zur Bereitstellung der gewünschten Nukleotidsequenz geeigneten Verfahren. Es werden Standard-Transfektions- und Cotransfektionstechniken eingesetzt, z.B. CaPO₄-Transfektionstechniken unter Verwendung der Zelllinie HEK 293. Zu weiteren in der vorliegenden Erfindung eingesetzten herkömmlichen Verfahren gehören die homologe Rekombination der Virusgenome, die Plaquebildung von Viren in übergeschichtetem Agar, Verfahren zur Messung einer Signalerzeugung u.ä. Der Zusammenbau eines beliebigen gewünschten Ad Δ -Vektors oder Helfervirus der vorliegenden Erfindung liegt im Bereich des fachmännischen Könnens auf Grundlage der Lehren der vorliegenden Erfindung.

A. Shuttle-Vektor

[0075] Wie ausführlich in Beispiel 1 unten beschrieben und unter Zurückgreifen auf [Fig. 2A](#) und die DNA-Sequenz des in [Fig. 3](#) angegebenen Plasmids, wird ein einzigartiger pAd Δ -Shuttle-Vektor der vorliegenden Erfindung, pAd Δ .CMVLacZ, erzeugt. pAd Δ .CMVLacZ enthält Ad5-Sequenzen, die das 5'-Ende codieren, gefolgt von einem CMV-Promotor/Enhancer, einer Spleißdonor-/Spleißakzeptorsequenz, einem bakteriellen Beta-Galactosidasegen (LacZ), einer SV-40-Poly-A-Sequenz (pA), einem 3'-ITR aus Ad5 sowie der restlichen Plasmidsequenz aus dem Grundgerüst des Plasmids pSP72 (Promega).

[0076] Zur Erzeugung des Ad Δ -Genoms, das in den Vektor eingebaut wird, muß zur Freisetzung des Ad Δ .CMVLacZ-Genoms das Plasmid pAd Δ .CMVLacZ mit EcoRI verdaut werden, wobei die adenoviralen ITRs freigesetzt und als Ziele für die Replikation verfügbar gemacht werden. Somit ist die Herstellung des Vektors „restriktionsabhängig“, d.h. sie erfordert die Rettung der Replikationsmatrize durch Restriktionsendonukleasen. Siehe [Fig. 2B](#).

[0077] Es wurde eine zweite Art von pAd Δ -Plasmid konstruiert, bei der die 3'-terminale Ad-Sequenz in einer Kopf/Schwanz-Anordnung relativ zur 5'-terminalen Sequenz vorliegt. Wie in Beispiel 1 und [Fig. 4A](#) beschrieben und unter Zurückgreifen auf die DNA-Sequenz des in [Fig. 5](#) angegebenen Plasmids, wird eine zweite einzigartige Ad Δ -Vektorsequenz der vorliegenden Erfindung, Ad Δ c.CMVLacZ, aus dem Shuttle-Plasmid pAd Δ c.CMVLacZ erzeugt, die eine Ad5-5'-ITR-Sequenz und eine Ad5-3'-ITR-Sequenz in Kopf/Schwanz-Anordnung, gefolgt von einem CMV-Enhancer/Promotor, einer SD/SA-Sequenz, dem LacZ-Gen und der pA-Sequenz, in einem Grundgerüst des Plasmids pSP72 (Promega) enthält. Wie in Beispiel 1B beschrieben, gestattet dieses „restriktionsunabhängige“ Plasmid die Replikation des Ad Δ -Genoms und seine Rettung aus dem Plasmidgrundgerüst, ohne daß dabei eine Endonukleasebehandlung erfolgt (siehe [Fig. 4B](#)).

B. Helfer-Virus

[0078] Wie ausführlich in Beispiel 2 beschrieben, handelt es sich bei einem herkömmlichen adenoviralen Helfervirus mit E1-Deletion beispielsweise um das Virus Ad.CBhpAP, das eine 5'-Adenovirussequenz von mu 0–1, eine alkalische Phosphatase aus menschlicher Plazenta (hpAP) enthaltendes Reporter-Minigen unter der Transkriptionskontrolle des β -Actin-Promotors aus Huhn, gefolgt von einer Poly-A-Sequenz aus SV40, gefolgt von Adenovirussequenzen von 9.2 bis 78.4 und 86 bis 100, enthält. Dieser Helfer enthielt Deletionen von mu 1.0 bis 9.2 und 78.4 bis 86, durch die der E1-Bereich sowie der E3-Bereich des Virus weitgehend entfernt werden. Dieses Virus kann wünschenswerterweise durch Modifikationen an seiner Verpackungs-Enhancer-Domäne erfindungsgemäß gelähmt sein.

[0079] Beispielhafte gelähmte Helferviren der vorliegenden Erfindung werden unter Verwendung der in Beispiel 7 beschriebenen Techniken beschrieben und enthalten die modifizierten 5'-PAC-Sequenzen, d.h. Adenovirusgenom Bp 1–269; m.u. 0–0.75 oder Adenovirusgenom Bp 1–321; m.u. 0–9.89. Kurz gesagt werden die 5'-Sequenzen durch PCR modifiziert und mittels herkömmlicher Techniken in ein herkömmliches Plasmid auf Adenovirusbasis kloniert. Ein hpAP-Minigen wird in das Plasmid eingebaut und danach durch homologe Rekombination mit einem Adenovirus mit E3-Deletion, d17001, unter Erhalt der modifizierten Vektoren so verändert, daß das Reporter-Minigen an seinem 3'-Ende mit den Adenovirussequenzen mu 9.6 bis 78.3 und 87 bis 100 gefolgt wird.

[0080] Die Erzeugung eines poly-L-Lysin-Konjugat-Helfervirus wurde im wesentlichen wie ausführlich in Beispiel 5 unten und [Fig. 10](#) beschrieben demonstriert, indem poly-L-Lysin an das Ad.CBhpAP-Virioncapsid gekuppelt wurde. Als Alternative kann die gleiche Vorgehensweise bei den mit der PAC-Sequenz modifizierten Helferviren der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

C. Rekombinantes Ad Δ -Virus

[0081] Wie oben angegeben, gestattet ein pAd Δ -Shuttle-Vektor in Gegenwart eines Helfervirus und/oder einer Verpackungszelllinie die Replikation der adenoviralen Transgen-Sequenzen in den Shuttle-Vektor und deren Verpackung in Virioncapside, wodurch das rekombinante Ad Δ -Virus gebildet wird. Das derzeitige Verfahren zur Produktion eines solchen Ad Δ -Virus beruht auf Transfektion und ist ausführlich in Beispiel 3 beschrieben. Kurz gesagt wird dabei das Helfervirus zur Infektion von Zellen, wie z.B. der menschlichen Verpackungszelllinie HEK 293, verwendet, wobei die Zellen dann anschließend mit einem pAd Δ -Shuttle-Vektor, der ein ausgewähltes Transgen enthält, mittels herkömmlicher Verfahren transfiziert werden. Mindestens 30 Stunden nach der Posttransfektion werden die Zellen geerntet und ein Extrakt präpariert. Das Ad Δ -Virusgenom wird in Virionen verpackt, die in Cäsiumgradienten bei einer niedrigeren Dichte als das Helfervirus sedimentieren. Somit wird das ein ausgewähltes Transgen enthaltende rekombinante Ad Δ -Virus vom Großteil des Helfervirus durch Reinigung über Auftriebsdichte-Ultrazentrifugation in einem CsCl-Gradienten getrennt.

[0082] Die Ausbeute des Ad Δ -transduzierenden Virus hängt weitgehend von der Anzahl der Zellen ab, die mit dem pAd Δ -Shuttle-Plasmid transfiziert werden, was die Verwendung eines Transfektionsprotokolls mit hoher Effizienz wünschenswert macht. Eines dieser Verfahren beinhaltet die Verwendung eines wie oben beschriebenen poly-L-lysinieren Helfers-Adenovirus. Ein wie oben beschriebenes, das gewünschte Transgen unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors enthaltendes pAd Δ -Shuttle-Plasmid wird dann direkt mit dem positiv geladenen Helferviruscapsid komplexiert, was zur Bildung eines einzigen Transfektionspartikels führt, das den pAd Δ -Shuttle-Vektor sowie die Helferfunktionen des Helfervirus enthält.

[0083] Dabei besteht das zugrundeliegende Prinzip darin, daß das mit pAd Δ -Plasmid-DNA beschichtete Helfer-Adenovirus die darin gebundene Nukleinsäure durch die Zellmembran hindurch und in das Zytoplasma gemäß seinem normalen Zelleintrittsmechanismus cotransportiert. Daher übernimmt das mit poly-L-Lysin modifizierte Helfer-Adenovirus mehrere Rollen im Zusammenhang mit einem auf Ad Δ beruhenden Komplex. Erstens bildet es die strukturelle Grundlage, auf der Plasmid-DNA binden kann, wodurch die wirksame Konzentration erhöht wird. Zweitens liefert die rezeptorvermittelte Endozytose des Virus das Vehikel für die zelluläre Aufnahme der Plasmid-DNA. Drittens erleichtert die mit einer Adenovirusinfektion assoziierte endosomalytische Aktivität die Freisetzung von internalisiertem Plasmid in das Zytoplasma. Und das Adenovirus steuert trans-Helferfunktionen bei, von denen das rekombinante Ad Δ -Virus hinsichtlich der Replikation und Verpackung transduzierender Viruspartikel abhängt. Das auf Ad beruhende Transfektionsverfahren unter Verwendung eines pAd Δ -Shuttle-Vektors und eines Polykationen-Helfer-Konjugats ist in Beispiel 6 ausführlich dargestellt. Darüber hinaus kann, wie bereits beschrieben, das Helfervirus-Plasmid-Konjugat eine weitere Form der Zuführung der weggelassenen, nicht im pAd Δ -Vektor vorhandenen Adenovirusgene durch das Helfervirus dar-

stellen. Eine solche Struktur ermöglicht die Aufteilung der restlichen benötigten Adenovirusgene zwischen dem Plasmid und dem Helfervirus, womit die Selbstreplikationseffizienz des Helfervirus reduziert wird.

[0084] Ein gegenwärtig bevorzugtes Verfahren zur Produktion des rekombinanten Ad Δ -Virus der vorliegenden Erfindung beinhaltet die Ausführung der oben beschriebenen Transfektion mit dem gelähmten Helfervirus oder gelähmten Helfervirus-Konjugat, wie oben beschrieben. Ein „gelähmtes“ Helfervirus der vorliegenden Erfindung ist nicht dazu in der Lage, sich selbst effizient zu verpacken und gestattet daher die leichte Trennung des Helfervirus von dem neuverpackten Ad Δ -Vektor der vorliegenden Erfindung mittels Auftriebsdichte-Ultrazentrifugation in einem CsCl-Gradienten, wie in den Beispielen unten beschrieben ist.

IV. Funktion des rekombinanten Ad Δ -Virus

[0085] Sobald das Ad Δ -Virus der vorliegenden Erfindung durch Zusammenwirken des Shuttle-Vektors und des Helfervirus produziert wird, kann das Ad Δ -Virus auf eine ausgewählte Zielzelle gelenkt und von dieser aufgenommen werden. Die Auswahl der Zielzelle hängt auch von der Verwendung des rekombinanten Virus ab, d.h. ob das Transgen in vitro oder ex vivo zur Produktion in einer gewünschten Zellart zur Rückführung in einen Patienten oder in vivo zur Zuführung an eine bestimmte Zellart oder ein bestimmtes Zellgewebe repliziert werden soll oder nicht. Bei den Zielzellen kann es sich um beliebige Säugerzellen (vorzugsweise menschliche Zellen) handeln. Beispielsweise kann bei der in-vivo-Verwendung das rekombinante Virus auf eine beliebige, normalerweise je nach Verabreichungsweg mit Adenovirus infizierte Zellart gelenkt werden, d.h. es kann, ohne darauf beschränkt zu sein, auf Neuronen, Hepatozyten, Epithelzellen, u.ä. abzielen. Die Helfer-Adenovirussequenzen liefern die notwendigen Sequenzen, um die Aufnahme des Virus durch das Ad Δ zu gestatten.

[0086] Sobald das rekombinante Virus von einer Zelle aufgenommen wurde, wird das adenoviral flankierte Transgen aus dem adenoviralen Ausgangsgrundgerüst mittels der Maschinerie der infizierten Zelle, wie bei anderen rekombinanten Adenoviren, gerettet. Sobald das rekombinante Minigen aus dem Genom des Ad Δ -Virus ausgekoppelt (gerettet) ist, sucht es eine Integrationsstelle im Wirtschromatin und wird darin integriert, und zwar entweder transient oder stabil, was zur Expression des begleitenden Transgens in der Wirtszelle führt.

V. Verwendung der Ad Δ -Viren in der Gentherapie

[0087] Durch die neuartigen rekombinanten Viren und Viruskonjugate der vorliegenden Erfindung werden wirksame Gentransfervehikel für die somatische Gentherapie bereitgestellt. Diese Viren werden so hergestellt, daß sie ein therapeutisches Gen anstelle des in den beispielhaften Viren und Vektoren dargestellten LacZ-Reporter-Transgens enthalten. Durch Verwendung der therapeutische Transgene enthaltenden Ad Δ -Viren können diese Transgene einem Patienten in vivo oder ex vivo zugeführt werden, um so für die Integration des gewünschten Gens in eine Zielzelle zu sorgen. Somit lassen sich diese Viren zur Korrektur genetischer Mängel oder Defekte einsetzen. Als Beispiel ist die Erzeugung eines Ad Δ -Gentransfervehikels zur Behandlung der cystischen Fibrose in Beispiel 4 unten beschrieben. Einem Fachmann ist es möglich, eine beliebige Anzahl anderer Gentransfervehikel unter Einschluß eines ausgewählten Transgens zur Behandlung anderer Erkrankungen zu erzeugen.

[0088] Die rekombinanten Viren der vorliegenden Erfindung können einem Patienten vorzugsweise als Suspension in einer biologisch verträglichen Lösung oder einem pharmazeutisch unbedenklichen Zuführungsvehikel verabreicht werden. Als Vehikel ist unter anderem sterile Kochsalzlösung geeignet. Für diesen Zweck können auch andere wäßrige und nicht wäßrige isotonische sterile Injektionslösungen sowie wäßrige und nicht wäßrige sterile Suspensionen eingesetzt werden, die als pharmazeutisch unbedenkliche Träger bekannt und dem Fachmann allgemein bekannt sind.

[0089] Die rekombinanten Viren der vorliegenden Erfindung können in zur Transfektion der gewünschten Zellen und zur Bereitstellung ausreichend hoher Niveaus der Integration und Expression des ausgewählten Transgens hinreichenden Mengen verabreicht werden, so daß ein therapeutischer Vorteil ohne unnötige negative Effekte oder mit medizinisch unbedenklichen physiologischen Effekten, die sich vom Fachmann auf dem Gebiet der Medizin bestimmen lassen, bereitgestellt wird. Zu den herkömmlichen und pharmazeutisch unbedenklichen parenteralen Verabreichungswegen gehören die direkte Zuführung an das Zielorgan, das Zielgewebe oder die Zielstelle, die intranasale, intravenöse, intramuskuläre, subkutane, intradermale und orale Verabreichung, falls gewünscht, können die Verabreichungswege miteinander kombiniert werden.

[0090] Die Dosierungen des rekombinanten Virus hängen in erster Linie von Faktoren, wie z.B. dem behandelten Leiden, dem ausgewählten Gen, dem Alter, Gewicht und der Gesundheit des Patienten, ab und können

daher zwischen Patienten variieren. Man nimmt an, daß eine therapeutisch wirksame Dosierung der Viren der vorliegenden Erfindung für den Menschen im Bereich von etwa 20 bis 50 ml Kochsalzlösung mit Konzentrationen von 1×10^7 bis 1×10^{10} pfu/ml Virus der vorliegenden Erfindung liegt. Eine bevorzugte Dosierung für den Menschen beträgt etwa 20 ml Kochsalzlösung bei den obigen Konzentrationen. Die Dosierung wird so eingestellt, daß dadurch der therapeutische Vorteil gegen mögliche Nebenwirkungen aufgewogen wird. Die Expressionsniveaus des ausgewählten Gens lassen sich zur Auswahl, Einstellung oder Häufigkeit der Verabreichung der Dosierung überwachen.

[0091] In den folgenden Beispielen werden die Konstruktion der pAd Δ -Shuttle-Vektoren, Helferviren und rekombinanten Ad Δ -Viren der vorliegenden Erfindung sowie deren Verwendung in der Gentherapie veranschaulicht. Diese Beispiele dienen lediglich der Veranschaulichung und stellen keine Beschränkung des Umfangs der vorliegenden Erfindung dar.

Beispiel 1 – Produktion der Shuttle-Vektoren pAd Δ .CMVLacZ und pAd Δ c.CMVLacZ

A. pAd Δ .CMVLacZ

[0092] Eine Sequenz des menschlichen Adenovirus Ad5 wurde so modifiziert, daß sie eine Deletion im E1a-Bereich [Karteneinheiten 1 bis 9.2], die unmittelbar auf den Ad-5'-Bereich (Bp 1–360) folgt, enthält (dargestellt in [Fig. 1A](#)). Somit enthält das Plasmid die 5'-ITR-Sequenz (BP 1–103), die nativen Verpackungs/Enhancer-Sequenzen sowie die TATA-Box für den E1a-Bereich (Bp 104–360). Ein Minigen, das den sehr frühen CMV-Enhancer/Promotor, eine SD/SA-Sequenz, ein zytoplasmatisches lacZ-Gen sowie SV40-Poly-A (pA) enthält, wurde an der Stelle der E1a-Deletion eingeführt. Dieses Konstrukt wurde weiter modifiziert, so daß auf das Minigen die 3'-ITR-Sequenzen (Bp 35.353-Ende) folgen. Die DNA-Sequenzen für diese Komponenten sind in [Fig. 3](#) und SEQ ID NO: 1 aufgeführt (siehe auch die kurze Beschreibung dieser Figur).

[0093] Dieses Konstrukt wurde dann mit herkömmlichen Techniken in ein Grundgerüst des pSP72-Vektors (Promega) unter Erhalt des zirkulären Shuttle-Vektors pAd Δ .CMVLacZ kloniert. Siehe die schematische Darstellung in [Fig. 2A](#). Dieses Konstrukt wurde mit die 5'- und 3'-Ad5-ITR-Sequenzen flankierenden EcoRI-Stellen konstruiert. pAd Δ .CMVLacZ wurde danach einer enzymatischen Verdauung mit EcoRI unterzogen, wobei ein lineares Fragment des Vektors freigesetzt wurde, das vom terminalen Ende der Ad-5'-ITR-Sequenz bis zum Terminalende der 3'-ITR-Sequenz aus dem Plasmidgrundgerüst reicht. Siehe [Fig. 2B](#).

B. pAd Δ c.CMVLacZ

[0094] Der Shuttle-Vektor pAd Δ c.CMVLacZ ([Fig. 4A](#) und 5) wurde unter Verwendung eines Grundgerüsts von pSP72 (Promega) konstruiert, so daß die Ad5 5'-ITR und 3'-ITR in einer Kopf/Schwanz-Anordnung zueinander vorlagen. Die Organisation der Ad5-ITRs beruht auf Berichten, die vermuten lassen, daß zirkuläre Ad-Genome, bei denen die terminalen Enden in einer Kopf/Schwanz-Anordnung zusammenfusioniert sind, Infektionsniveaus aufweisen, die mit denen linearer Ad-Genome vergleichbar sind. Ein für den CMV-Enhancer, eine SD/SA-Sequenz, das LacZ-Gen und die Poly-A-Sequenz kodierendes Minigen wurde unmittelbar hinter den 5'-ITR eingefügt. Die DNA-Sequenz des erhaltenen Plasmids sowie die Sequenzen der einzelnen Komponenten sind in [Fig. 5](#) und SEQ ID NO: 2 angegeben (siehe auch die kurze Beschreibung zu [Fig. 5](#)). Dieses Plasmid benötigt keine enzymatische Verdauung vor seiner Verwendung zur Bildung der Viruspartikel (siehe Beispiel 3). Dieser Vektor wurde konstruiert, um eine restriktionsunabhängige Produktion von LacZ-Ad Δ -Vektoren zu ermöglichen.

Beispiel 2 – Konstruktion eines Helfervirus

[0095] Bei dem Helfervirus Ad.CBhpAP [K. Kozarsky et al, Som. Cell Mol. Genet., 19(5): 449–458 (1993)] handelt es sich um ein replikationsdefizientes Adenovirus, das ein Minigen für alkalische Phosphatase enthält. An seiner Konstruktion waren herkömmliche Clonierungs- und homologe Rekombinationstechniken beteiligt. Das adenovirale DNA-Substrat wurde aus CsCl-gereinigten d17001-Virionen, einer Ad5-Variante (Serotyp-Untergruppe C), die eine 3 kb große Deletion zwischen mu 78.4 bis 86 im nichtessentiellen E3-Bereich trägt (von Dr. William Wold, Washington University, St. Louis, Missouri zur Verfügung gestellt), extrahiert. Virale DNA wurde zur Kotransfektion durch Verdauung mit Clal hergestellt (Bp-Position 917 des Adenovirusgenoms), wodurch der linke Arm des Genoms, umfassend die Adenovirus-Karteneinheiten 0–2.5, entfernt wurde. Siehe unteres Diagramm der [Fig. 1B](#).

[0096] Es wurde ein Ausgangsklonierungsvektor, pAd.BgIII, konstruiert. Er enthält zwei Segmente des Wild-

typ-Ad5-Genoms (d.h. Karteneinheiten 0–1 und 9–16.1), die durch eine einmal vorkommende BglII-Clonierungsstelle zur Insertion heterologer Sequenzen getrennt sind. Die fehlenden Ad5-Sequenzen zwischen den beiden Domänen (Adenovirusgenom Bp 361–3327) führen zur Deletion von E1a und dem Großteil von E1b nach Rekombination mit viraler DNA.

[0097] Ein rekombinantes hpAP-Minigen wurde konstruiert und die BglII-Stelle von pAd.BglII eingefügt, so daß das komplementierende Plasmid pAdCBhpAP erzeugt wurde. Die lineare Anordnung dieses Minigens umfaßt:

- (a) den zytoplasmatischen β -Actin-Promotor aus Huhn [Nukleotide +1 bis +275, wie in T.A. Kost et al, Nucl. Acids Res., 11(23): 8287 (1983) beschrieben; Nukleotide 9241–8684 in Fig. 7];
- (b) ein SV40-Intron (z.B. Nukleotide 1579–1711 der SEQ ID NO: 2),
- (c) die Sequenz für alkalische Phosphatase aus menschlicher Plazenta (erhältlich von GenBank) und
- (d) ein SV40-Polyadenylierungssignal (ein 237 großes Bam HI-BclI-Restriktionsfragment, das die Spaltungs-/Poly-A-Signale sowohl der frühen als auch der späten Transkriptionseinheiten enthält; z.B. Nukleotide 837–639 der SEQ ID NO: 1).

[0098] Das erhaltene komplementierende Plasmid, pAdCBhpAP, enthielt eine einzige Kopie des rekombinanten hpAP-Minigens, die von den Adenoviruskoordinaten 0–1 auf der einen Seite und 9.2–16.1 auf der anderen Seite flankiert wurde.

[0099] Die Plasmid-DNA wurde unter Verwendung einer einmal vorkommenden NheI-Stelle unmittelbar 5' von der Adenovirus-Karteneinheit Null (0) linearisiert, und das oben identifizierte Adenovirussubstrat sowie die komplementierenden Plasmid-DNAs wurden unter Verwendung eines Standard-Calciumphosphat-Transfektionsverfahrens in 293-Zellen [ATCC CRL1573] transfiziert [siehe z.B. Sambrook et al, oben zitiert]. Das Endergebnis der homologen Rekombination mit Beteiligung von Sequenzen, die sich auf die Adenovirus-Karteneinheiten 9–16.1 kartieren lassen, ist ein Hybrid-Ad.CBhpAP-Helfervirus, das die Adenoviruskarteneinheiten 0–1 enthält, wobei anstelle der E1a- und E1b-codierenden Bereiche aus dem d17001-Adenovirussubstrat das hpAP-Minigen aus dem Plasmid, gefolgt von den Ad-Sequenzen 9 bis 100, mit einer Deletion in den E3-Bereichen (78.4–86 mu), vorliegt.

Beispiel 3 – Produktion des rekombinanten Ad Δ -Virus

[0100] Das rekombinante Ad Δ -Virus der vorliegenden Erfindung wird durch Kotransfektion eines Shuttle-Vektors mit dem Helfervirus in einer ausgewählten Verpackungs- oder Nicht-Verpackungszelllinie erzeugt.

[0101] Wie ausführlich unten beschrieben, wird das in Beispiel 1A bereit gestellte lineare Fragment oder das LacZ tragende zirkuläre Ad Δ -Gen aus Beispiel 1B in das Ad.CBhpAP-Helfervirus (Beispiel 2), durch das ein leerer Capsidkopf bereitgestellt wird, unter Verwendung herkömmlicher Techniken verpackt, wie in Fig. 2C dargestellt. Diejenigen Viruspartikel, von denen das pAd Δ -Shuttle-Genom erfolgreich in den Capsidkopf aufgenommen wurde, lassen sich von denjenigen, die das hpAP-Gen tragen, aufgrund der unterschiedlichen Expression von LacZ und hpAP unterscheiden.

[0102] Ausführlicher gesagt wurden 293-Zellen (4×10^7 pfu 293-Zellen/150-mm-Schale) wurden ausgesät und mit dem (wie in Beispiel 2 beschrieben produziertem) Helfervirus Ad.CBhpAP mit einer MOI von 5 in 20 ml (DMEM/2% fötalem Rinderserum (fetal bovine serum, FBS) infiziert. Dieser helferspezifische Marker ist zur Überwachung des Niveaus der Helfervirus-Verunreinigung in Ad Δ -Präparationen vor und nach der Reinigung kritisch. Durch das Helfervirus werden in trans die für die Synthese und Verpackung des Ad Δ CMVLacZ-Genoms notwendigen Helferfunktionen bereitgestellt.

[0103] Zwei Stunden nach der Infektion mit entweder dem restriktionsabhängigen Shuttle-Vektor oder dem restriktionsunabhängigen Shuttle-Vektor wurde zu den Zellen das (EcoRI verdaute) Plasmid pAd Δ .CMVLacZ oder pAd Δ c.CMVLacZ-DNA, jeweils ein LacZ-Minigen tragend, mittels einem Kalziumphosphatprecipitat (2,5 ml Kalziumphosphat-Transfektionscocktail mit 50 μ g Plasmid-DNA) gegeben.

[0104] Dreißig bis vierzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, in 10 mM Tris-Cl (pH 8,0) (0,5 ml/150-mm-Platte) suspendiert und bei -80°C eingefroren. Die gefrorenen Zellsuspensionen wurden dreimal einem Zyklus aus Einfrieren (Ethanol-Trockeneis) und Auftauen (37°C) unterzogen, um die Virioncapside freizusetzen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10 Minuten bei $5.000\times g$) abgetrennt und danach der geklärte Überstand auf einen CsCl-Gradienten aufgetragen, um rekombinantes Virus vom Fehlvirus wie folgt zu trennen.

[0105] Die auf den diskontinuierlichen CsCl-Gradienten (zusammengesetzt aus gleichen Volumen an CsCl mit 1,2 g/ml, 1,36 g/ml und 1,45 g/ml 10 mM Tris-Cl (pH 8,0)) aufgetragenen Überstände (10 ml) wurden 8 Stunden bei 72.128×g zentrifugiert, wodurch infektiöses Helfervirus von unvollständigen Virionen getrennt wurden. Die Fraktionen wurden aus der Zwischenphase zwischen den Helfer- und oberen Komponenten gesammelt und durch Southern-Blot-Hybridisierung oder auf das Vorhandensein von LacZ-transduzierenden Partikeln hin analysiert. Für eine Funktionsanalyse wurden Portionen (2,0 ml von jeder Probe) der gleichen Fraktionen auf Einfachschichten von 293-Zellen (in 35-mm-Vertiefungen) gegeben und die Expression der rekombinanten β -Galactosidase 24 Stunden später bestimmt. Insbesondere wurden Einfachschichten geerntet, in 0,3 ml 10 mM Tris-Cl-(pH 8,0)-Puffer suspendiert und ein Extrakt durch drei Zyklen aus Einfrieren und Auftauen präpariert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand gemäß den in J. Price et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84: 156–160 (1987) beschriebenen Verfahren auf β -Galactosidaseaktivität (LacZ-Aktivität) getestet. Die spezifische Aktivität (Milliunits [Millieinheiten] β -Galactosidase/mg Protein oder Reporter-Enzyme) wurde von Indikatorzellen aus gemessen. Für das rekombinante Virus betrug die spezifische Aktivität 116.

[0106] Fraktionen mit β -Galactosidaseaktivität aus dem diskontinuierlichen Gradienten wurden über einen Cäsium-Gleichgewichtsgradienten sedimentiert, um die Präparation für das Ad Δ -Virus weiter anzureichern. Dabei wurde ein linearer Gradient mit Dichten von 1,29 bis 1,34 gm/ml in der Zone des rekombinanten Virus erzeugt. Ein scharfer Peak des rekombinanten Virus, der als das Auftreten der β -Gal-Aktivität in infizierten 293-Zellen nachgewiesen wurde, eluierte zwischen 1,31 und 1,33 gm/dl. Dieser Peak an rekombinanten Virus lag zwischen zwei Hauptpeaks der Absorption A_{260} nm und in einer Zone des Gradienten, wo das Helfervirus sehr stark abfiel. Durch den Gleichgewichtssedimentationsgradienten wurde eine weitere 102- bis 103fache Aufreinigung des rekombinanten Virus vom Helfervirus erzielt. Die Ausbeute an aus einer 50-Platten-Präparation nach 2 Sedimentationen gewonnenen rekombinanten Ad Δ .CMVLacZ-Virus reichte von 107 bis 108 transduzierenden Partikeln.

[0107] Die Analyse von Lysaten von mit dem rekombinanten Vektor transfizierten und mit dem Helfer infizierten Zellen zeigte, daß Virionen zur Transduktion des im Vektor enthaltenen rekombinanten Minigens fähig waren. Bei Durchführung einer Southern-Analyse von Portionen der Fraktionen unter Verwendung von für das rekombinante Virus oder das Helfervirus spezifischen Sonden wurde die Verpackung mehrerer molekularer Formen von vektorabgeleiteter Sequenz aufgezeigt. Die vorwiegende Form des deletierten Virusgenoms bestand in der Größe (~5,5 kb) des entsprechenden doppelsträngigen DNA-Monomers (Ad Δ .CMVLacZ), wobei auch weniger häufige, jedoch eigenständige Spezies mit höherem Molekulargewicht (~10 kb bzw. ~15 kb) vorhanden waren. Die Gesamtlänge des Helfervirus beträgt 35 kb. Wichtig dabei ist, daß der Peak der Vektortransduktionsaktivität mit der größtmolekularen Form des deletierten Virus übereinstimmt. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, daß ITRs und eine durchgehende Verpackungssequenz die einzigen für den Einbau in Virionen notwendigen Elemente darstellen. Eine scheinbar geordnete oder bevorzugte Anordnung des rekombinanten Ad-Monomergenoms führt zu einem biologisch aktiveren Molekül. Die Tatsache, daß höhermolekulare Spezies des deletierten Genoms 2× bzw. 3× größer sind als das monomere deletierte Virusgenom läßt darauf schließen, daß die Umordnungen eine sequentielle Verdopplung des ursprünglichen Genoms beinhalten können.

[0108] Diese gleichen Verfahren können zur Produktion eines rekombinanten Ad Δ -Virus unter Verwendung eines gelähmten Helferviurs oder Helferviurs-Konjugats, wie bereits beschrieben, adaptiert werden.

Beispiel 4 – Rekombinantes Ad Δ -Virus mit einem therapeutischen Minigen

[0109] Um die Vielseitigkeit des rekombinanten Ad Δ -Virussystems zu testen, wurde das aus pAd Δ CMVLacZ erhaltene Reporter-LacZ-Minigen als Kasette durch ein CFTR-codierendes therapeutisches Minigen ersetzt.

[0110] Das Minigen enthielt menschliche CFTR-cDNA [Riordan et al, Science, 245: 1066–1073 (1989) Nukleotide 8622–4065 der SEQ ID NO: 3] unter der Transkriptionskontrolle eines chimären CMV-Enhancer/Hühner- β -Actin-Promotorelements (Nukleotide +1 bis +275, wie in T.A. Kost et al, Nucl. Acids Res., 11(23) 8287 (1983) beschrieben; Nukleotide 9241–8684 der SEQ ID NO: 3, **Fig. 7**); und gefolgt von einer SV-40-Poly-A-Sequenz (Nukleotide 3887–3684 der SEQ ID NO: 3, **Fig. 7**).

[0111] Das CFTR-Minigen wurde in die E1-Deletionsstelle eines Ad5-Virus (pAd.E1 Δ genannt), das eine Deletion in E1a von mu 1–9.2 und eine Deletion in E3 von mu 78,4–86 enthält, inseriert.

[0112] Der erhaltene, pAd Δ .CBCFTR genannte Shuttle-Vektor (siehe **Fig. 6** und die DNA-Sequenz in **Fig. 7**

[SEQ ID NO: 3]) verwendete die gleichen Ad-ITRs von pAd Δ CMVLacZ, jedoch endeten die Ad5-Sequenzen mit NheI-Stellen anstelle von EcoRI. Daher wurde die Freisetzung des Minigens aus dem Plasmid durch Verdauung mit NheI bewerkstelligt.

[0113] Das in Beispiel 3 beschriebene Vektorproduktionssystem wurde unter Verwendung des Helfervirus Ad.CBhpAP (Beispiel 2) eingesetzt. Einfachschichten aus 293-Zellen, die bis 80–90% Konfluenz in 150-mm-Kulturschalen bewachsen waren, wurden mit dem Helfervirus bei einer MOI von 5 infiziert. Die Infektionen wurden in mit 2% FBS supplementiertem DMEM bei 20 ml medium/150-mm-Platte durchgeführt. Zwei Stunden nach der Infektion wurden 50 μ g Plasmid-DNA in 2,5 ml Transfektionscocktail zu jeder Platte gegeben und gleichmäßig verteilt.

[0114] Die Zuführung des pAd Δ .CBCFTR-Plasmids an 293-Zellen wurde durch Bildung eines Kalziumphosphatprecipitats vermittelt, und das Ad Δ .CBCFTR-Virus wurde vom Ad.CBhpAP-Helfervirus mittels CsCl-Auftriebsdichte-Ultrazentrifugation wie folgt getrennt:

Zellen wurden 10–14 h in diesem Zustand gelassen, wonach das Infektions-/Transfektionsmedium durch 20 ml frisches DMEDM/2% FBS ersetzt wurde. Ungefähr 30 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, in 10 mM Tris-Cl (pH 8,0)-Puffer (0,5 ml/150-mm-Platte) suspendiert und bei -80°C gelagert.

[0115] Gefrorene Zellsuspensionen wurden durch drei aufeinanderfolgende Runden von Einfrieren (Ethanol-Trockeneis) und Auftauen (37°C) lysiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10 min bei $5.000 \times g$) entfernt, und 10 ml geklärter Extrakt wurde auf einen CsCl-Stufengradienten, der sich aus drei Lagen von jeweils 9,0 ml mit Dichten von 1,45 g/ml, 1,36 g/ml und 1,20 g/ml CsCl in 10 mM Tris-Cl-(pH 8,0)-Puffer zusammensetzte, geschichtet. Die Zentrifugation wurde 8 h bei 4°C in einem Beckmann SW-28-Rotor bei 20.000 UpM durchgeführt. Fraktionen (1,0 ml) wurden vom Boden des Zentrifugenröhrchens gesammelt und auf rAd transduzierende Vektoren analysiert. Peakfraktionen wurden vereinigt und unter Bandenbildung bis zum Gleichgewicht zentrifugiert. Transduzierende Virionen enthaltende Fraktionen wurden gegen 20 mM HEPES (pH 7,8)/150 mM NaCl (HBS) dialysiert und eingefroren bei -80°C in Gegenwart von 10% Glycerin oder als flüssige Stammlösung bei -20°C (HBS + 40% Glycerin) gelagert.

[0116] Nach der Ultrazentrifugation gesammelte Fraktionen wurden auf Transgenexpression und Vektor-DNA analysiert. Für die lacZ- Δ -rAd-Vektoren wurden Portionen von jeweils 2 μ l zu in 35-mm-Kulturschalenvertiefungen ausgesäten Einzelschichten von 293-Zellen gegeben. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Zellen geerntet, in 0,3 ml 10 mM Tris-Cl-(pH 8,0)-Puffer suspendiert und durch drei Runden aus Einfrieren/Auftauen lysiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10 min bei $15.000 \times g$) entfernt und auf Gesamtprotein [Bradford, (1976)] sowie β -Galactosidaseaktivität [Sambrook et al, (1989)] mit ONPG (o-Nitrophenyl β -D-galactopyranosid) als Substrat getestet.

[0117] Die Expression des CFTR-Proteins vom Ad Δ .CBCFTR-Vektor wurde durch Immunfluoreszenzlokalisierung bestimmt. Portionen von Rd Δ .CBCFTR, angereichert durch zwei Runden Ultrazentrifugation und gegen HBS-Lagerungspuffer ausgetauscht, wurden zu Primärkulturen von Luftwegeepithelzellen, die aus den Lungen von CF-Transplantatempfängern gewonnen wurden, gegeben. Vierundzwanzig Stunden nach Zugabe des Vektors wurden die Zellen geerntet und unter Zentrifugalkraft (Cytospin 3, Shandon Scientific Limited) auf Glasobjektträger fixiert. Die Zellen wurden mit frisch präpariertem 3% Paraformaldehyd in PBS (1,4 mM KH_2PO_4 , 4,3 mM Na_2HPO_4 , 2,7 mM KCl und 137 mM NaCl) 15 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert, zweimal in PBS gewaschen und mit 0,05 NP-40 10 min bei RT permeabilisiert. Das Immunfluoreszenzverfahren begann mit einem Blockierungsschritt in 10% Ziegen Serum (PBS/GS) für 1 h bei RT mit anschließender Bindung des primären monoklonalen Maus-Anti-Mensch-CFTR-Antikörpers (R-Domäne-spezifisch) (Genyme), 1:500 verdünnt in PBS/GS, für 2 h bei RT. Die Zellen wurden ausgiebig in PBS/GS gewaschen und 1 h bei RT mit einem Esel-Anti-Maus-IgG-(H + L)-FITC-konjugierten Antikörper (Jackson ImmunoResearch Laboratories), 1:100 verdünnt in PBS/GS, inkubiert.

[0118] Zur Southern-Analyse der Vektor-DNA wurden Portionen von jeweils 5 μ l direkt von CsCl-Fractionen abgenommen und mit 20 μ l Capsid-Verdauungspuffer (50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 1,0 mM EDTA, pH 8,0; 0,5% SDS und 1,0 mg/ml 1 h bei 50°C inkubiert. Man ließ die Reaktionen auf RT abkühlen, wonach Ladefarbstoff zugegeben wurde und eine Elektrophorese durch ein 1,2% Agarosegel durchgeführt wurde. Die aufgetrennten DNAs wurden durch Elektrophoretik auf eine Nylonmembran (Hybond-N) übertragen und mit einem ^{32}P markierten Restriktionsfragment hybridisiert. Die Blots wurden durch Autoradiographie oder Scanning auf einem Phosphorimager 445 SI (Molecular Dynamics) analysiert.

[0119] Die aus der Southern-Blot-Analyse der Gradientenfraktionen erhaltenen Ergebnisse zeigten eine auf-

fällige Virusbande, die schneller als die Ad.CBhpAP-Helfer-DNA wanderte. Die höchsten Virustiter ergaben sich für die Fraktionen 3 und 4. Eine Quantifizierung der Banden in Fraktion 4 deutete an, daß der Titer von Ad.CBhpAP ungefähr 1,5× größer war als der von AdΔCBCFTR. Berücksichtigt man jedoch den Größenunterschied zwischen den beiden Viren (Ad.CBhpAP = 35 kb; AdΔCBCFTR = 6,2 kb), so ist der Virustiter (bei dem 1 Partikel = 1 DNA-Molekül ist) von AdΔCB.CFTR wenigstens 4mal größer als der Virustiter von Ad.CBhpAP.

[0120] Während die Southern-Blot-Analyse der Gradientenfraktionen zur Darstellung der Produktion der AdΔ-Viruspartikel nützlich war, wurde dadurch auch der Nutzen der Ultrazentrifugation zur Reinigung von AdΔ-Viren demonstriert. Im Hinblick auf den letzteren dieser Punkte bildeten sowohl LacZ als auch CFTR transduzierende Viren in CsCl Banden bei einer mittleren Dichte, die zwischen dem infektiösem Adenovirus-Helferviren (1,34 g/ml) und unvollständigen Capsiden (1,31 g/ml) lag. Die geringere Dichte im Vergleich zum Helfervirus wird wahrscheinlich durch das von den AdΔ-Viren getragene kleinere Genom verursacht. Dies läßt weiterhin vermuten, daß Änderungen der Virusgröße die Dichte und Reinigung AdΔ-Virus beeinflussen. Nichtsdestotrotz ist die Fähigkeit zur Trennung des AdΔ-Virus vom Helfervirus eine wichtige Beobachtung und läßt vermuten, daß eine weitere Reinigung durch aufeinanderfolgende Runden der Bandenbildung mittels Zentrifugation durch CsCl erreicht werden.

[0121] Dieses rekombinante Virus eignet sich für die Gentherapie entweder allein oder vorzugsweise in Form eines wie hier beschrieben hergestellten Konjugats.

Beispiel 5 – Korrektur eines genetischen Defekts in CF-Luftwegepithelzellen mit AdΔCB.CFTR

[0122] Die Behandlung der cystischen Fibrose unter Nutzung des oben bereitgestellten rekombinanten Virus ist besonders geeignet für die lungengerichtete Gentherapie in vivo. Luftwegepithelzellen sind die wünschenswertesten Ziele für den Gentransfer, da die Komplikationen der CF im Zusammenhang mit der Lunge normalerweise die größten pathologischen und lebens einschränkenden Folgen darstellt.

[0123] Das rekombinante AdΔCB.CFTR-Virus wurde auf nacheinander durchgeführten CsCl-Gradienten aufgetrennt, und CFTR-haltige Fraktionen, die zwischen den oben beschriebenen Adenovirusfraktionen und Fraktionen der oberen Komponenten wandern, wurden zur Infektion von Primärkulturen menschlicher Luftwegsepithelzellen, die aus den Lungen eines CF-Patienten stammten, verwendet. Die Kulturen wurden anschließend auf Expression des CFTR-Proteins mittels Immunocytochemie analysiert. Der Immunfluoreszenznachweis mit Maus-Anti-Mensch-CFTR-Antikörper (R-Domäne-spezifisch) wurde 24 Stunden nach Zugabe des rekombinanten Virus durchgeführt. Die Analyse von scheininfizierten CF-Zellen zeigte keine signifikante Bindung an den R-Domäne-spezifischen CFTR-Antikörper. Dem rekombinanten Virus ausgesetzte Luftwegsepithel-Primärkulturen zeigten hohe Niveaus an CFTR-Protein in 10–20% der Zellen.

[0124] Somit kann das das CFTR-Gen enthaltende erfindungsgemäße rekombinante Virus direkt in die Luftwege eingeführt werden, indem beispielsweise das obige Virus in eine Präparation, die inhaliert werden kann, formuliert wird. Beispielsweise wird das das CFTR-Gen enthaltende erfindungsgemäße rekombinante Virus oder Konjugat in 0,25 molarem Natriumchlorid suspendiert. Das Virus oder Konjugat wird von den Atemwegzellen aufgenommen und das Gen exprimiert.

[0125] Als Alternative können das Virus oder die Konjugate der vorliegenden Erfindung mit anderen geeigneten Mitteln zugeführt werden, einschließlich stellengerichteter Injektion des das CFTR-Gen tragenden Virus. Im Fall einer CFTR-Gen-Zuführung sind als Lösungen für die Bronchialinstillation sterile Kochsalzlösungen, die das Virus der vorliegenden Erfindung im Bereich von etwa 1×10^7 bis 1×10^{10} pfu/ml, insbesondere im Bereich von etwa 1×10^8 bis 1×10^9 pfu/ml enthalten, bevorzugt.

[0126] Weitere geeignete Verfahren zur Behandlung der cystischen Fibrose durch Verwendung von gentherapeutischen rekombinanten Viren der vorliegenden Erfindung lassen sich den Fachdiskussionen über weitere Arten von Gentherapievektoren für CF entnehmen. Siehe z.B. US-Patent Nr. 5,240,846, hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

Beispiel 6 – Synthese des Polykationen-Helfervirus-Konjugats

[0127] Eine weitere Version des Helfervirus der vorliegenden Erfindung besteht in einem Polylysinkonjugat, das die direkte Komplexierung des pAdΔ-Shuttle-Plasmids mit dem Helferviruscapsid ermöglicht. Dieses Konjugat gestattet eine effiziente Zuführung des Shuttle-Plasmid-pAdΔ-Shuttle-Vektors gemeinsam mit dem Helfervirus, wodurch die Notwendigkeit für einen getrennten Transfektionsschritt entfällt. Siehe [Fig. 10](#) für eine

schematische Skizze in dieser Konstruktion. Andererseits wird durch ein solches Konjugat mit einem eine Ad-Gene liefernden Plasmid und dem die restlichen, zur Produktion des Ad Δ -Virusvektors notwendigen Gene liefernden Helfer ein neuartiger Weg zur Verringerung des Helfervirus, wie oben diskutiert, bereitgestellt.

[0128] Gereinigte Stammlösungen einer Ad.CBhpAP-Expansion im Großmaßstab wurden im wesentlichen wie von K. J. Fisher und J. M. Wilson, *Biochem. J.*, 299: 49–58 (1994), beschrieben durch Kupplung von Poly-L-Lysin an das Virioncapsid modifiziert, was zu einem Ad.CBhpAP-(Lys)_n-Konjugat führt. Das Verfahren beinhaltet drei Schritte.

[0129] Erstens wurde das CsCl-Banden-gereinigte Helfervirus Ad.CBhpAP mit dem heterobifunktionellen Quervernetzer Sulfo-SMCC [Sulfo-(N-succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat] (Pierce) umgesetzt. Die Konjugationsreaktion, die 0,5 mg (375 nmol) Sulfo-SMCC sowie 6×10^{12} A₂₆₀-Helferviruspartikel in 3,0 ml HBS enthielt, wurde 45 Minuten unter konstantem leichtem Schütteln bei 30°C inkubiert. Bei diesem Schritt wird eine Peptidbindung zwischen dem aktiven N-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester) des Sulfo-SMCC und einem freien Amin (z.B. Lysin), das von einer adenoviralen Proteinsequenz (Capsidprotein) im Vektor beigesteuert wird, ausgebildet, wodurch ein maleimidaktiviertes Viruspartikel erhalten wird. Das aktivierte Adenovirus ist in [Fig. 10](#) gezeigt, wobei die Capsidproteinfaser mit der nukleophilen Maleimidgruppierung markiert ist. In der Praxis dienen auch andere Capsid-Polypeptide, einschließlich Hexon- und Pentonbasen, als Ziele.

[0130] Nicht eingebauter, nicht umgesetzter Quervernetzer wurde durch Gelfiltration auf einer 1 cm × 15 cm großen und mit 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,0 und 150 mM NaCl equilibrierten Bio-Gel-Säule P-6DG (Bio-Rad Laboratories) abgetrennt. A₂₆₀-Peak-Fractionen, die das maleimidaktivierte Helfervirus enthielten, wurden vereinigt und auf Eis gestellt.

[0131] Zweitens wurde Poly-L-Lysin mit einer Molmasse von 58 kDa bei 10 mg/ml in 50 mM Triethanolaminpuffer (pH 8,0), 150 mM NaCl und 1 mM EDTA mit 2-Imminothiolan/HCl (Traut-Reagenz; Pierce) auf ein Molverhältnis von 2 Mol SH/Mol Polylysins unter N₂ thioiliert; das cyclische Thioimidat reagiert mit den primären Aminen des Poly-(L-Lysins) was zu einer thioilierten Polykation führt. Nach einer 45minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion auf eine 1 cm × 15 cm große, mit 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,0), 150 mM NaCl und 2 mM EDTA equilibrierte Bio-Gel-P6DG-Säule aufgetragen, um nicht eingebautes Traut-Reagenz abzutrennen.

[0132] Die Quantifizierung der freien Thiolgruppen erfolgte mit Ellmann-Reagenz [5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)], was ungefähr 3–4 Mol -SH/Mol Poly-L-Lysin ergab. Die Kupplungsreaktion wurde durch Zugabe von 1×10^{12} A₂₆₀-Partikeln von maleimidaktiviertem Helfervirus/mg thioiliertes Poly-L-Lysin und Inkubation des Gemischs auf Eis für 15 Stunden bei 4°C unter Argon gestartet. Bei Beendigung der Reaktion wurde das Gemisch mit 2-Mercaptoethylamin versetzt und bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubiert, um nicht umgesetzte Maleimidstellen zu blockieren.

[0133] Viruspolylysins-Konjugate, Ad.CPAP-p(Lys)_n, wurden entfernt vom, nicht-konjugierten Poly-L-Lysin mittels Ultrazentrifugation durch ein CsCl-Stufengradienten mit einer Anfangszusammensetzung aus gleichen Volumen an 1,45 g/ml (untere Stufe) und 1,2 g/ml (obere Stufe) CsCl in 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) gereinigt. Die Zentrifugation wurde 2 Stunden bei 90.000 g und 5°C durchgeführt. Das Endprodukt wurde gegen 20 mM Hepes-Puffer (pH 7,8) mit 150 mM NaCl (HBS) dialysiert.

Beispiel 7 – Bildung des Ad Δ /Helfer-pLys-Viruspartikels

[0134] Die Bildung des Ad.CBhpAP-pLys/pad Δ .CMVLacZ-Partikels wird durch Zugabe von 20 μ g pAd Δ .CMVLacZ-Plasmid-DNAs zu 1.2×10^{12} A₂₆₀-Partikel Ad.CBhpAP-pLys in einem Endvolumen von 0,2 ml DMEM gestartet, wobei man den Komplex zwischen 10–15 Minuten bei Raumtemperatur entwickeln lässt. Dieses Verhältnis gibt typischerweise die Plasmid-DNA-Bindungs Kapazität einer Standardcharge des Adenovirus-pLys-Konjugats wieder und ergibt die höchsten Niveaus an Plasmid-Transgenexpression.

[0135] Das erhaltende Trans-Infektionspartikel wird auf 293-Zellen (4×10^7 Zellen, ausgesät auf einer 150-mm-Schale) transfiziert. Dreißig Stunden nach der Transfektion werden die Partikel isoliert und zur Gewinnung eines Extrakts einer Einfrieren/Auftauen-Technik ausgesetzt. Der Extrakt wird auf einem CsCl-Stufengradienten mit Gradienten bei 1,20 g/ml, 1,36 g/ml und 1,45 g/ml gereinigt. Nach 8 Stunden Zentrifugation bei $90.000 \times g$ wurden die Ad Δ -Vektoren aus einer Fraktion unterhalb der oberen Komponenten, wie sie durch das Vorhandensein von LacZ identifiziert wurde, erhalten, wobei das Helfervirus aus einer kleineren, dichteren

Fraktion, wie sie durch das Vorhandensein von hpAP identifiziert wurde, erhalten wurde.

Beispiel 8 – Konstruktion modifizierter Helferviren mit gelähmten Verpackungssequenzen (PAC-Sequenzen)

[0136] Dieses Beispiel bezieht sich auf [Fig. 9A](#) bis 9C, 10A und 10B bei der Konstruktion der modifizierten Helferviren der vorliegenden Erfindung.

[0137] Ad5'-terminale Sequenzen, die die PAC-Domänen I und II ([Fig. 8A](#)) oder die PAC-Domänen I, II, III und IV ([Fig. 8B](#)) wurden mittels PCR aus dem in [Fig. 1B](#) dargestellten Wildtyp Ad5-5'-Genom unter Verwendung von durch die Pfeile in [Fig. 1B](#) angezeigten PCR-Clonen erzeugt. Die Sequenzen der erhaltenen Amplifikationsprodukte ([Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#)) unterschieden sich vom Wildtyp Ad5'-Genom in der Anzahl an A-Wiederholungen, die vom linken (5'-)Ende getragen wurden.

[0138] Wie in [Fig. 8C](#) dargestellt, wurden diese Amplifikationsprodukte in die Mehrfachklonierstelle von pAd.Link.1 (IHGT Vector Core) subkloniert. Bei pAd.Link.1 handelt es sich um ein Plasmid auf Adenovirusbasis, das Adenovirus m.u. 9.6 bis 16.1 enthält. Die Insertion der modifizierten PAC-Bereiche in pAd.Link.1 erzeugte zwei Vektoren, pAd.PACII (enthaltend die PAC-Domänen I und II) und pAd.PACIV (enthaltend die PAC-Domänen I, II, III und IV). Danach wurde, wie in [Fig. 10A](#) und [10B](#) dargestellt, für jedes dieser Plasmide jeweils ein Reporter-Minigen der alkalischen Phosphatase aus menschlicher Plazenta, das den sehr frühen CMV-Enhancer/Promotor (CMV), cDNA der alkalischen Phosphatase aus menschlicher Plazenta (hpAP) sowie das SV40-Polyadenylierungssignal (pA) enthielt, in jedem PAC-Vektor subkloniert, wodurch pAd.PACII.CMVhpAP bzw. pAd.PACIV.CMVhpAP erzeugt wurden.

[0139] Diese Plasmide wurden dann als Substrate für die homologe Rekombination mit dem oben beschriebenen Virus d17001 durch Kotransfektion in 293-Zellen verwendet. Die homologe Rekombination fand zwischen den Adenovirus-Karteneinheiten 9–16 des Plasmids und des gelähmten Ad5-Virus statt. Die Ergebnisse der homologen Rekombination bestanden in Helferviren, die Ad5-5'-terminalen Sequenzen mit den PAC-Domänen I und II bzw. den PAC Domänen I, II, III und IV, gefolgt vom Minigen und Ad5-3'-Sequenzen 9.6–78.3 und 87–100, enthielten. Somit sind in diesen gelähmten Viren das E1-Gen sowie das E3-Gen deletiert.

[0140] Die Plaquebildungscharakteristika der PAC-Helferviren stellten ein unmittelbares Anzeichen dafür dar, daß die PAC-Modifikationen die Geschwindigkeit und das Ausmaß des Wachstums verminderten. Insbesondere entwickelten sich keine PAC-Helfervirenplaques bis zum Tag 14–21 nach der Transfektion, wobei die Plaques nach der Reifung klein blieben. Aus vorhergehender Erfahrung sollte ein Standard-Ad.CBhpAP-Helfervirus der ersten Generation mit einer vollständigen linken terminalen Sequenz bis Tag 7 sich zu entwickeln beginnen und bis Tag 10 gereift sein.

[0141] Virusplaques wurden gepickt und in 0,5 ml DMEM-Medium suspendiert. Eine kleine Portion der Virusstammlösung wurde zur Infektion einer frischen Einfachschicht aus 293-Zellen verwendet und auf rekombinante alkalische Phosphataseaktivität 24 Stunden nach der Infektion histochemisch angefärbt. Sechs der acht (die A-Wiederholungen I–IV codierenden) Ad.PACIV.CMVhpAP-Klone, die auf Transgenexpression überprüft wurden, waren positiv, während alle drei Ad.PACII.CMVhpAP-Clone, die ausgewählt wurden, ein positives Ergebnis zeigten. Die Klone untergingen zwei Runden Plaquereinigung und werden zur Zeit expandiert, um eine Arbeitsstammlösung zu erzeugen.

[0142] Diese gelähmten Helferviren sind bei der Produktion der Ad Δ -Viruspartikel gemäß den in Beispiel 3 beschriebenen Verfahren geeignet. Sie sind dadurch gekennzeichnet, daß sie eine ausreichende Menge von Adenovirusgenen enthalten, um die Verpackung des Shuttle-Vektorgenoms zu gestatten, doch wird ihre Effizienz zur Selbstcapsidierung aufgrund ihrer gelähmten PAC-Sequenzen vermindert. Somit werden weniger Helferviren zu Gunsten einer größeren Menge an rekombinanten Ad Δ -Viren produziert. Die Reinigung der Ad Δ -Viruspartikel von den Helferviren wird im CsCl-Gradienten erleichtert, der auf dem Gewicht der jeweiligen Viruspartikel beruht. Diese Erleichterung der Reinigung ist ein entscheidender Vorteil der Ad Δ -Vektoren der vorliegenden Erfindung im Gegensatz zu den Adenovirusvektoren, die nur eine E1-Deletion oder kleinere Deletionen aufweisen. Die Ad Δ -Vektoren weisen selbst mit Minigenen von bis zu 15 kb einen signifikanten Gewichtsunterschied gegenüber Wildtyp- oder anderen Helfer-Adenoviren, die viele adenovirale Gene enthalten, auf.

Beispiel 9 – Ad Δ -Vektor mit einem Vollängen-Dystrophin transgen

[0143] Bei der Duchenne'schen Muskeldystrophie (DMD) handelt es sich um eine häufige X-Chromosomen-verknüpfte Erbkrankheit, die durch das Fehlen von Dystrophin, einem von einem 14 Kilobasen großen

Transkript codierten 427K großen Protein, verursacht wird. Das Fehlen dieses wichtigen Sarcolemmalproteins führt zu fortschreitendem Muskelabbau, Schwäche und Tod. Ein gegenwärtiger Ansatz zur Behandlung dieser tödlichen Erkrankung besteht in der Übertragung einer funktionsfähigen Kopie des Dystrophingens in die betroffenen Muskeln. Für den Skelettmuskel stellt ein replikationsdefektes Adenovirus ein effizientes Zuführungssystem dar.

[0144] Gemäß der vorliegenden Erfindung wurde ein rekombinantes Plasmid pAdΔ.CMVdys, geschaffen, das nur die Ad5-cis-Elemente (d.h. ITRs und zusammenhängende Verpackungssequenzen) enthält und das vom CMV-Promotor gesteuerte Vollängen-Dystrophingen der Maus trägt. Dieses Plasmid wurde wie folgt erzeugt.

[0145] pSL1180 [Pharmacia Biotech] wurde mit Not I geschnitten, durch Klenow aufgefüllt und religiert, womit die Not-I-Stelle im Plasmid entfernt wurde. Das erhaltene Plasmid wird mit pSL1180NN bezeichnet und trägt einen bakteriellen Ori und das Amp-Restistenzgen.

[0146] pAdΔ.CMVLacZ aus Beispiel 1 wurde mit EcoRI geschnitten, mit Klenow behandelt und mit dem ApaI-geschnittenen pSL1180NN unter Bildung von pAdΔ.CMVLacZ (ApaI) ligiert.

[0147] Die 14 kb große Maus-Dystrophin-cDNA [Sequenzen angegeben in C. C. Lee et al, Nature, 349: 334–336 (1991)] wurde in zwei großen Fragmenten unter Verwendung eines Lambda-ZAP-Clonierungsvektors (Stratagene) kloniert und anschließend in den Bluescript-Vektor pSK kloniert, wodurch das Plasmid pC-CL-DMD entstand. Ein schematisches Diagramm dieses Vektors ist in [Fig. 11](#) angegeben, bei dem die Restriktionsenzymstellen dargestellt sind.

[0148] pAdΔ.CMVLacZ (ApaI) wurde mit NotI geschnitten und das große Fragment wurde von der lacZ-cDNA über ein Gel isoliert. pCCL-DMD wurde ebenfalls mit NotI geschnitten, über ein Gel isoliert und anschließend mit dem großen Not-I-Fragment des mit NotI verdauten pAdΔ.CMVLacZ (ApaI) migiert. Die Sequenzen des erhaltenen Vektors, pAdΔ.CMVmdys, sind in **Fig. 12A-12P** [SEQ ID NO: 10] angegeben.

[0149] Dieses Plasmid enthält Sequenzen aus dem linken Ende des AdS, umfassend Bp 1–360 (5'-ITR), ein Maus-Dystrophin-Minigen unter der Kontrolle des CMV-Promotors sowie eine Sequenz vom rechten Ende des Ad5, das vom Bp 35353 bis zum Ende des Genoms reicht (3'-ITR). Auf das Minigen folgt eine SV-40-Poly-A-Sequenz, ähnlich zu der für die oben beschriebenen Plasmide beschriebenen Sequenz.

[0150] Es wird das hier beschriebene Vektorproduktionssystem eingesetzt. Zehn 150-mm-293-Platten werden bei etwa 90% Konfluenz mit einem rekombinanten Reporter-Virus mit E1-Deletion, Ad.CBhpAP, mit einer MOI von 5 60 Minuten bei 37°C infiziert. Diese Zellen werden mit pAdΔ.CMVmDys durch Kalziumphosphat-Koprecipitation unter Verwendung von 50 µg linerisierter DNA/Schale etwa 12–16 Stunden bei 37°C transfiziert. Medium wird durch DMEM + 10% fötales Rinderserum ersetzt.

[0151] Man beobachtet den vollen cytopathischen Effekt, und es wird ein Zelllysat hergestellt, indem man das Zellpellet dreimal einem Einfrieren/Auftauen-Verfahren aussetzt. Die Zellen werden 2 Stunden einem dreilagigen CsCl-Gradienten im SW41 ausgesetzt, wobei eine zwischen dem Helfer-Adenovirus und unvollständigen Virus wandernde Bande nachgewiesen wird.

[0152] Fraktionen werden auf einer 6-Loch-Platte, die mit 5 µl der Fraktion 16–20 Stunden in DMEM + 2% FBS infizierte 293-Zellen enthält, getestet. Die Zellen werden gesammelt, mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen und in 2 ml PBS (phosphatgepufferter Kochsalzlösung) resuspendiert. 200 µl der 2 ml-Zellfraktionen werden durch Cytozentrifugation auf einen Objektträger aufgetragen.

[0153] Die Zellen werden einer Immunfluoreszenz für Dystrophin wie folgt ausgesetzt. Die Zellen wurden in 10N McOH bei –20°C fixiert. Die Zellen wurden einem monoklonalen Antikörper, der für den Carboxyterminus des menschlichen Dystrophins spezifisch ist [NCL-DYS2; Novocastra Laboratories Ltd., UK], ausgesetzt. Die Zellen wurden danach dreimal gewaschen und einem sekundären Antikörper, d.h. 1:200 Ziege-Anti-Maus-IgG in FITC, ausgesetzt.

[0154] Der Titer/Fraktion für sieben Fraktionen, die sich aus den Immunfluoreszenzfärbungen ergaben, wurde mit der folgenden Formel berechnet und in Tabelle 2 unten aufgeführt.

[0155] $DFU/Feld = (DFU/200 \mu l \text{ Zellen}) \times 10 = DFU/10^6 \text{ Zellen} = (DFU/5 \mu l \text{ Virusfraktion}) \times 20 = DFU/100 \mu l \text{ Fraktion.}$

Tabelle 2

Fraktion	DFU/100 μ l
1	--
2	--
3	6×10^3
4	$1,8 \times 10^4$
5	$9,6 \times 10^3$
6	200
7	200

[0156] Ein zur Transduktion des Dystrophin-Minigens fähiges Virus wird als „positive“ (d.h. grünfluoreszierende) Zelle nachgewiesen. Die Ergebnisse der IF veranschaulichen, daß wärmebehandelte Fraktionen keine positive Immunfluoreszenz zeigen. Southern-Blot-Daten lassen auf eine Spezies mit derselben Größe wie die Ausgangs-DNA, mit Helfervirus-Verunreinigung, schließen.

[0157] Das rekombinante Virus läßt sich anschließend vom Großteil des Helfervirus mittels Sedimentation durch Cäsiumgradienten trennen. Erste Untersuchungen zeigen, daß die funktionellen AdCMV Δ mDys-Viren zwar produziert werden, jedoch mit Helfervirus verunreinigt sind. Eine erfolgreiche Reinigung würde Ad Δ -Viren ergeben, die keine Virusproteine codieren können, aber zur Transduktion von Maus-Skelettmuskel fähig sind.

Beispiel 10 – Pseudotypisierung

[0158] Durch das folgende Experiment wird ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen rekombinanten Ad Δ bereitgestellt, wobei Helferviren von Serotypen verwendet werden, die sich von denen des pAd Δ im Transfektions-/Infektionsprotokoll unterscheiden. Dabei wird nicht erwartet, daß die ITRs sowie die Verpackungssequenz von Ad5 in ein Virion eines anderen Serotyps eingebaut werden könnte.

A. Protokoll

[0159] Der grundlegende Ansatz besteht darin, das rekombinante Ad Δ .CMVlacZ-Virus (Ad5) in 293-Zellen zu transfizieren und anschließend die Zelle mit dem von verschiedenen Ad-Serotypen (2, 3, 4, 5, 7, 8, 12 und 40) abgeleiteten Helfervirus zu infizieren. Bei Erreichen der CPE wird das Lysat geerntet und unter Bandenbildung durch zwei Cäsiumgradienten zentrifugiert.

[0160] Insbesondere wurde das auf Ad5 beruhende Plasmid pAd Δ .CMVlacZ aus Beispiel 1 mit EcoRI linearisiert. Die linearisierten Plasmide wurden dann in zehn 150-mm-Schalen mit 293-Zellen unter Verwendung der Kalziumphosphat-Koprecipitation transfiziert. 10–15 Stunden nach der Transfektion wurden Wildtyp-Adenoviren (eines der folgenden Serotypen: 2, 3, 4, 5, 7, 12, 40) zur Infektion der Zellen mit einer MOI von 5 verwendet. Die Zellen wurden dann bei voller CPE geerntet und mittels drei Runden von Einfrieren und Auftauen lysiert. Das Pellet wird in 4 mL Tris-HCl resuspendiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt, und eine Teilreinigung des Ad5 Δ .CMVlacZ von Helfervirus wurde mit 2 Runden CsCl-Gradientenzentrifugation (SW41-Säule, 35.000 UpM, 2 Stunden) erzielt. Fraktionen wurden vom Röhrchenboden gesammelt (Fraktion Nr. 1) und auf lacZ-transduzierende Viren auf 293-Zielzellen durch histochemische Anfärbung (bei 20 h PI) analysiert. Verunreinigende Helferviren wurden mittels Plaque-Assay quantifiziert.

[0161] Mit Ausnahme des Adenovirus Typ 3 konnten durch Infektion mit den Ad-Serotypen 2, 4, 5, 7, 12 und 40 lacZ-transduzierende Viren produziert werden. Der Peak der β -Galactosidaseaktivität wurde zwischen den beiden A_{260} -Hauptabsorptionspeaks, wo die meisten Helferviren Banden bildeten (Daten nicht gezeigt), nachgewiesen. Die Menge an von 10 Platten gewonnenem lacZ-Virus lag je nach dem Serotyp des Helfers in einem Bereich von 10^9 bis 10^8 transduzierenden Partikeln. Wie erwartet produzierten Ad2 und Ad5 den höchsten Titer an lacZ-transduzierenden Viren (Tabelle 3). Die Verunreinigung mit Wildtyp lag im allgemeinen um 10^2 – 10^3 log höher als der entsprechende lacZ-Titer, außer im Fall von Ad40.

B. Ergebnisse

[0162] In Tabelle 3 sind die Wachstumseigenschaften der Wildtyp-Adenoviren, wie sie anhand der Vermehrung in 293-Zellen beurteilt wurden, zusammengefaßt. Dadurch wurde die Möglichkeit zur Nutzung dieser Helferviren zur Infektion der Zelllinie, die mit dem Ad5-Deletionsvirus transfiziert wurde, demonstriert.

Tabelle 3

Adenovirus-Serotypen	p/ml	pfu/ml	p:pfu
2	5×10^{12}	$2,5 \times 10^{11}$	20:01
3	1×10^{12}	$6,25 \times 10^9$	160:1
4	3×10^{12}	2×10^9	150:1
5	1×10^{12}	5×10^{10}	20:01
7a	5×10^{12}	1×10^{11}	50:1
12	6×10^{11}	4×10^9	150:1
35	$1,2 \times 10^{12}$		
40	$2,2 \times 10^{12}$	$4,4 \times 10^8$	5000:1

[0163] In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der endgültigen gereinigten Fraktionen zusammengefaßt. Die mittlere Spalte mit der Bezeichnung LFU/ μ l zeigt die Quantifizierung der Produktion von lacZ-bildenden Einheiten, die ein direktes Maß für die Verpackung und Vermehrung von pseudotypisiertem rekombinanten Ad Δ -Virus ist. Bei dem pfu/ μ l-Titer handelt es sich um eine Abschätzung des verunreinigenden Wildtyp-Virus. Es wurde mit allen adenoviralen Stämmen pseudotypisiertes Ad Δ -Virus erzeugt, außer Ad3. Die Titer liegen im Bereich von 10^7 – 10^9 .

Tabelle 4

Serotypen	LFU/ml	PFU/ml
2	$4,6 \times 10^7$	$1,8 \times 10^9$
3	0	NA
4	$6,7 \times 10^6$	$9,3 \times 10^7$
5	$6,3 \times 10^7$	$1,9 \times 10^9$
7a	3×10^6	$1,8 \times 10^8$
12	$1,2 \times 10^5$	$3,3 \times 10^8$
40	$9,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$

[0164] Tabelle 5A–5D zeigt eine ausführlichere Analyse der Fraktionen von der zweiten Reinigung für jedes der in Tabelle 4 zusammengefaßten Experimente. Dabei handelt es sich wiederum bei LFU/ μ l um die Menge an gewonnenen Ad Δ -Viren, wohingegen pfu/ μ l die Menge an gewonnenem Helfervirus darstellt.

Tabelle 5A

Ad2-			
Fraktions-Nr.	Volumen/ul	LFU/ul	PFU/ul
1	120	9532	8×10^6
2	100	$5,8 \times 10^4$	3×10^6
3	100	$8,24 \times 10^4$	6×10^5
4	100	$9,47 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$
5	100	6×10^4	8×10^4
6	100	2×10^4	6×10^4
7	100	5434	5×10^4
Gesamt/10 pH		$3,32 \times 10^7$	$1,35 \times 10^9$

Tabelle 5B

Ad4-			
Fraktions-Nr.	Volumen/ul	LFU/ul	PFU/ul
1	100	1000	$1,75 \times 10^5$
2	100	$1,79 \times 10^4$	$2,8 \times 10^5$
3	100	$1,8 \times 10^4$	$5,5 \times 10^4$
4	100	2909	$1,25 \times 10^4$
5	100	920	4×10^4
6	100	153	3×10^3
Gesamt/10 pH		4×10^6	$5,6 \times 10^7$

Ad5-			
Fraktions-Nr.	Volumen/ul	LFU/ul	PFU/ul
1	120	$1,98 \times 10^4$	6×10^6
2	100	$5,8 \times 10^4$	3×10^6
3	100	$1,2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$
4	100	1×10^5	$1,4 \times 10^5$
5	100	$7,96 \times 10^4$	8×10^4
6	100	6860	6×10^4
Gesamt/10 pH		$3,88 \times 10^7$	$1,2 \times 10^9$

Tabelle 5C

Ad7-			
Fraktions-Nr.	Volumen/ul	LFU/ul	PFU/ul
1	100	1225	5×10^5
2	100	5550	4×10^5
3	100	4938	2×10^5
4	100	3866	8×10^4
5	100	4134	6×10^4
6	100	995	7×10^4
7	100	230	6×10^3
Gesamt/10 pH		$2,09 \times 10^6$	$1,3 \times 10^8$

Ad12-			
Fraktions-Nr.	Volumen/ul	LFU/ul	PFU/ul
1	100	31	5×10^5
2	80	169	$8,5 \times 10^5$
3	80	245	$1,8 \times 10^5$
4	110	161	$1,1 \times 10^5$
5	120	62	7×10^3
Gesamt/10 pH		$6,14 \times 10^4$	$1,65 \times 10^8$

Tabelle 5D

Ad40-			
Fraktions-Nr.	Volumen/ul	LFU/ul	PFU/ul
1	80	61	5
2	80	184	3
3	80	199	3
4	80	168	1
5	80	122	
6	100	46	
7	100	22	
Gesamt/10 pH		$6,65 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$

C. Charakterisierung der Struktur der verpackten Viren

[0165] Portionen aufeinanderfolgender Fraktion wurden mittels Southern-Blots mit lacZ als Sonde analysiert. Im Fall von Ad2 und 5 wurde nicht nur das linearisierte Monomer verpackt, sondern es wurden auch mehrere Formen von rekombinantem Virus mit unterschiedlichen Größen gefunden. Diese Formen korrelierten gut mit den Größen von Dimeren, Trimeren und anderen höher molekularen Concatameren. Die Peaks der linearisierten Monomere lagen näher am oberen Ende des Röhrchens (Bande des defekten Adenovirus) als die anderen Formen. Wurden diese Formen mit lacZ-Aktivität korreliert, so wurde eine bessere Korrelation zwischen den höher molekularen Formen als zwischen den Monomeren gefunden. Bei der Pseudotypisierung von Ad4 und Ad7 wurden keine linearisierten Monomeren verpackt und lediglich höher molekulare Formen gefunden.

[0166] Diese Daten demonstrieren definitiv die Produktion und Charakterisierung des Δ -Virus und der unterschiedlichen Pseudotypen. Dieses Beispiel veranschaulicht einen sehr einfachen Weg zur Erzeugung von Pseudotyp-Viren.

Beispiel 11 – Ad Δ -Vektor mit einem FH-Gen

[0167] Bei der familiären Hypercholesterinämie (FH) handelt es sich um eine autosomale dominante Erkrankung die durch Anomalien (Mängel) der Funktion oder Expression von LDL-Rezeptoren verursacht wird [M. S. Brown und J. L. Goldstein, *Science*, 232(4746): 34–37 (1986); J. L. Goldstein und M. S. Brown, „Familial hypercholesterolemia“ in *Metabolic Basis of Inherited Disease*, Hrsg. C. R. Scriver et al, McGraw Hill, New York, S. 1215–1250 (1989).] Patienten mit einem vererbtem abnormalen Allel weisen mäßig erhöhte Plasma-LDL-Werte auf und leiden an vorzeitiger lebensbedrohender koronarer Herzkrankheit (coronary artery disease, CAD). Homozygote Patienten leiden an schwerer Hypercholesterinämie und lebensbedrohender CAD im Kindesalter. Es wird ein FH enthaltender erfindungsgemäßer Vektor konstruiert, indem das lacZ-Minigen im pAd Δ c.CMVlacZ-Vektor durch ein das LDL-Rezeptorgen enthaltendes Minigen [T. Yamamoto et al, *Cell*, 39: 27–38 (1984)] unter Verwendung bekannter Techniken und wie zuvor in analoger Weise für das Dystrophingen und CFTR in den vorhergehenden Beispielen beschrieben ersetzt wird. Das LDL-Rezeptorgen tragende Vektoren lassen sich leicht gemäß der vorliegenden Erfindung konstruieren. Das erhaltene Plasmid wird mit pAd Δ c.CMV-LDL bezeichnet.

[0168] Dieses Plasmid eignet sich für die Gentherapie von FH allein oder vorzugsweise in Form eines wie hier beschrieben hergestellten Konjugats zur Substitution des für das Gen verantwortlichen abnormalen Allels mit einem normalen LDL-Gen.

A. Ex-vivo-Gentherapie

[0169] Eine Gentherapie läßt sich ex vivo durchführen, indem eine Primärkultur von Hepatocyten aus einem Patienten gewonnen und etabliert wird. Damit können zur Isolierung und Transduktion der Hepatocyten mit dem (den) obigen, das (die) LDL-Rezeptorgen(e) tragenden Vektor(en) verwendet werden. So lassen sich beispielsweise für Kaninchenleber entwickelte Kollagenase-Perfusionstechniken an menschliches Gewebe anpassen und bei der Transduktion verwenden. Nach der Transduktion werden die Hepatocyten den Gewebekulturplatten entnommen und mit bekannten Techniken, z.B. über einen in die untere Mesenterialvene eingesetzten Katheter, wieder in den Patienten eingeführt.

B. In-vivo-Gentherapie

[0170] Wünschenswerterweise erfolgt der in-vivo-Ansatz zur Gentherapie, z.B. auf die Leber gerichtet, unter Verwendung der oben beschriebenen Vektoren und Vektorkonjugate. Bei einer bevorzugten Behandlung wird ein Vektor-LDL-Konjugat der vorliegenden Erfindung in den peripheren Kreislauf des Patienten eingeführt. Der Patient wird dann auf eine Änderung in den Serumlipiden und Lebergeweben hin analysiert.

[0171] Das Virus oder Konjugat läßt sich zur Infektion von Hepatocyten in vivo durch direkte Injektion in eine periphere Vene oder Pfortader (10^7 – 10^8 pfu/kg) oder retrograd in den Gallengang (gleiche Dosis) verwenden. Dadurch wird der Gentransfer in die Mehrzahl der Hepatocyten bewirkt.

[0172] Die Behandlungen werden nach Bedarf, beispielsweise wöchentlich, wiederholt. Dabei wird angenommen, daß die Verabreichung einer Virusdosis, die einer MOI von ungefähr 20 (d.h. 20 pfu/Hepatocyt) entspricht, zu einer Genexpression auf hohem Niveau in der Mehrzahl der Hepatocyten führt.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) NAME DES ANMELDERS: Trustees of the University
of Pennsylvania
Wilson, James M.
Fisher, Krishna J.
Chen, Shu-Jen
Weitzman, Matthew

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Rekombinanter
Adenovirus und
Methoden zu dessen
Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 10

(iv) ANSCHRIFT:

(A) ADRESSAT: Howson und Howson
(B) STRASSE: Spring House Corporate Cntr, PO
Box 457
(C) ORT: Spring House
(D) BUNDESSTAAT: Pennsylvania
(E) LAND: USA
(F) POSTLEITZAHL: 19477

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) DATENTRÄGER: Diskette
(B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version
#1.30

(vi) VORLIEGENDE PATENTANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER:
(B) ANMELDETAG.
(C) KLASSIFIZIERUNG:

(vii) FRÜHERE PATENTANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: US 08/331,381

(B) ANMELDETAG: 28. Okt. 1994

(viii) ANGABEN ZUM PATENTANWALT:

(A) NAME: Bak, Mary E.

(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 31,215

(C) REFERENZ/LISTENNUMMER: GNVPN.008PCT

(ix) ANGABEN ZUR TELEKOMMUNIKATION:

(A) TELEFON: 215-540-9200

(B) TELEFAX: 215-540-5818

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 7897 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAACTCGAGC AGCTGAAGCT TGAATCCAT CATCAATAAT ATACCTTATT	50
TTGGATTGAA GCCAATATGA TAATGAGGGG GTGGAGTTTG TGACGTGGCG	100
CGGGGCGTGG GAACGGGGCG GGTGACGTAG GTTTTAGGGC GGAGTAACTT	150
GTATGTGTTG GGAATTGTAG TTTTCTTAAA ATGGGAAGTT ACGTAACGTG	200
GGAAAACGGA AGTGACGATT TGAGGAAGTT GTGGGTTTTT TGGCTTTCGT	250
TTCTGGGCGT AGGTTGCGGT GCGGTTTTCT GGGTGTTTTT TGTGGACTTT	300
AACCGTTACG TCATTTTTTA GTCCTATATA TACTCGCTCT GCACTTGGCC	350
CTTTTTTACA CTGTGACTGA TTGAGCTGGT GCCGTGTCGA GTGGTGTTTT	400
TTTAATAGGT TTTCTTTTTT ACTGGTAAGG CTGACTGTTA GGCTGCCGCT	450
GTGAAGCGCT GTATGTTGTT CTGGAGCGGG AGGGTGCTAT TTTGCCTAGG	500
CAGGAGGTT TTTCAGGTGT TTATGTGTTT TTCTCTCCTA TTAATTTTGT	550
TATACCTCCT ATGGGGGCTG TAATGTTGTC TCTACGCCTG CGGGTATGTA	600
TTCCCCCAA GCTTGCATGC CTGCAGGTCG ACTCTAGAGG ATCCGAAAAA	650
ACCTCCCACA CCTCCCCCTG AACCTGAAAC ATAAAATGAA TGCAATTGTT	700
GTTGTAACT TGTTTATTGC AGCTTATAAT GGTTACAAAT AAAGCAATAG	750
CATCACAAAT TTCACAAATA AAGCATTTTT TTCACTGCAT TCTAGTTGTG	800
GTTTGTCCAA ACTCATCAAT GTATCTTATC ATGTCTGGAT CCCC GCGGCC	850
GCCTAGAGTC GAGGCCGAGT TTGTCAGAAA GCAGACCAA CAGCGTTGG	900
AATAATAGCG AGAACAGAGA AATAGCGGCA AAAATAATAC CCGTATCACT	950
TTTGCTGATA TGGTTGATGT CATGTAGCCA AATCGGGAAA AACGGGAAGT	1000

AGGCTCCCAT	GATAAAAAAG	TAAAAGAAAA	AGAATAAACC	GAACATCCAA	1050
AAGTTTGTGT	TTTTTAAATA	GTACATAATG	GATTTTCCTTA	CGCGAAATAC	1100
GGGCAGACAT	GGCCTGCCCG	GTTATTATTA	TTTTTGACAC	CAGACCAACT	1150
GGTAATGGTA	GCGACCGGCG	CTCAGCTGTA	A.TCCGCCGA	TACTGACGGG	1200
CTCCAGGAGT	CGTCGCCACC	AATCCCCATA	TGGAAACCGT	CGATATTCAG	1250
CCATGTGCCT	TCTTCCGCGT	GCAGCAGATG	GCGATGGCTG	CTTTCCATCA	1300
GTTGCTGTTG	ACTGTAGCGG	CTGATGTTGA	ACTGGAAGTC	GCCGCGCCAC	1350
TGGTGTGGGC	CATAATTCAA	TTCGCGCGTC	CCGCAGCGCA	GACCGTTTTC	1400
GCTCGGGAAG	ACGTACGGGG	TATACATGTC	TGACAATGGC	AGATCCCAGC	1450
GGTCAAACA	GGCGGCAGTA	AGGCGGTCCG	GATAGTTTTC	TTGCGGCCCT	1500
AATCCGAGCC	AGTTTACCCG	CTCTGCTACC	TGCGCCAGCT	GGCAGTTCAG	1550
GCCAATCCGC	GCCGGATGCG	GTGTATCGCT	CGCCACTTCA	ACATCAACGG	1600
TAATCGCCAT	TTGACCACTA	CCATCAATCC	GGTAGGTTTT	CCGGCTGATA	1650
AATAAGGTTT	TCCCCTGATG	CTGCCACGCG	TGAGCGGTG	TAATCAGCAC	1700
CGCATCAGCA	AGTGTATCTG	CCGTGCACTG	CAACAACGCT	GCTTCGGCCT	1750
GGTAATGGCC	CGCCGCCITC	CAGCGTTCEA	CCCAGGCGTT	AGGGTCAATG	1800
CGGGTCGCTT	CACTTACGCC	AATGTCGTTA	TCCAGCGGTG	CACGGGTGAA	1850
CTGATCGCGC	AGCGGCGTCA	GCAGTTGTTT	TTTATCGCCA	ATCCACATCT	1900
GTGAAAGAAA	GCCTGACTGG	CGGTTAAATT	GCCAACGCTT	ATTACCCAGC	1950
TCGATGCAAA	AATCCATTTT	GCTGGTGGTC	AGATGCGGGA	TGGCGTGGGA	2000
CGCGGCGGGG	AGCGTCACAC	TGAGGTTTTT	CGCCAGACGC	CACTGCTGCC	2050
AGGCGCTGAT	GTGCCC GGCT	TCTGACCATG	CGGTCCGCTT	CGGTTGCACT	2100
ACGCGTACTG	TGAGCCAGAG	TTGCCCGGCG	CTCTCCGGCT	GCGGTAGTTC	2150
AGGCAGTTCA	ATCAACTGTT	TACCTTGTGG	AGCGACATCC	AGAGGCACTT	2200
CACCGCTTGC	CAGCGGCTTA	CCATCCAGCG	CCACCATCCA	GTGCAGGAGC	2250
TCGTTATCGC	TATGACGGAA	CAGGTATTCC	CTGGTCACTT	CGATGGTTTG	2300

CCCGGATAAA	CGGAACTGGA	AAAACCTGCTG	CTGGTGTTTT	GCTTCCGTCA	2350
GCGCTGGATG	CGGCGTGCGG	TCGGCAAAGA	CCAGACCGTT	CATACAGAAC	2400
TGGCGATCGT	TCGGCGTATC	GCCAAAATCA	CCGCCGTAAG	CCGACCACGG	2450
GTTGCCGTTT	TCATCATATT	TAATCAGCGA	CTATCCACC	CAGTCCCAGA	2500
CGAAGCCGCC	CTGTAAACGG	GGATACTGAC	GAAACGCCTG	CCAGTATTTA	2550
GCGAAACCGC	CAAGACTGTT	ACCCATCGCG	TGGGCGTATT	CGCAAAGGAT	2600
CAGCGGGCGC	GTCTCTCCAG	GTAGCGAAAG	CCATTTTTTTG	ATGGACCATT	2650
TCGGCACAGC	CGGGAAGGGC	TGGTCTTCAT	CCACGCGCGC	GTACATCGGG	2700
CAAATAATAT	CGGTGSCCGT	GGTGTCCGGT	CCGCCGCCTT	CATACTGCAC	2750
CGGGCGGGAA	GGATCGACAG	ATTTGATCCA	GCGATACAGC	GCGTCGTGAT	2800
TAGCGCCGTG	GCCTGATTCA	TTCCCCAGCG	ACCAGATGAT	CACACTCGGG	2850
TGATTACGAT	CGCGCTGCAC	CATTGCGGTT	ACGCGTTCGC	TCATCGCCGG	2900
TAGCCAGCGC	GGATCATCGG	TCAGACGATT	CATTGGCACC	ATGCCGTGGG	2950
TTTCAATATT	GGCTTCATCC	ACCACATACA	GGCCGTAGCG	GTCGCACAGC	3000
GTGTACCACA	GCGGATGGTT	CGGATAATGC	GAACAGCGCA	CGGCGTTAAA	3050
GTTGTTCTGC	TTCATCAGCA	GGATATCCTG	CACCATCGTC	TGCTCATCCA	3100
TGACCTGACC	ATGCAGAGGA	TGATGCTCGT	GACGGTTAAC	GCCTCGAATC	3150
AGCAACGGCT	TGCCGTTCCAG	CAGCAGCAGA	CCATTTTCAA	TCCGCACCTC	3200
GCGGAAACCG	ACATCGCAGG	CTTCTGCTTC	AATCAGCGTG	CCGTCGGCGG	3250
TGTGCAGTTC	AACCACCGCA	CGATAGAGAT	TCGGGATTTT	GGCGCTCCAC	3300
AGTTTCGGGT	TTTCGACGTT	CAGACGTAGT	GTGACGCGAT	CGGCATAACC	3350
ACCACGCTCA	TCGATAATTT	CACCGCCGAA	AGGCGCGGTG	CCGCTGGCGA	3400
CCTGCGTTTC	ACCCTGCCAT	AAAGAAACTG	TTACCCGTAG	GTAGTCAGGC	3450
AACTCGCCGC	ACATCTGAAC	TTCAGCCTCC	AGTACAGCGC	GGCTGAAATC	3500
ATCATTAAG	CGAGTGCGAA	CATGGAAATC	GCTGATTTGT	GTAGTCGGTT	3550
TATGCAGCAA	CGAGACGTCA	CGGAAAATGC	CGCTCATCCG	CCACATATCC	3600

TGATCTTCCA	GATAACTGCC	GTCACTCCAA	CGCAGCACCA	TCACCGCGAG	3650
GCGGTTTTCT	CCGGCGCGTA	AAAATGCGCT	CAGGTCAAAT	TCAGACGGCA	3700
AACGACTGTC	CTGGCCGTAA	CCGACCCAGC	GCCCCGTTGCA	CCACAGATGA	3750
AACGCCGAGT	TAACGCCATC	AAAAATAAAT	CLCGTCTGGC	CTTCCTGTAG	3800
CCAGCTTTCA	TCAACATTAA	ATGTGAGCGA	GTAACAACCC	GTCGGATTCT	3850
CCGTGGGAAC	AAACGGCGGA	TTGACCGTAA	TGGGATAGGT	TACGTTGGTG	3900
TAGATGGGCG	CATCGTAACC	GTGCATCTGC	CAGTTTGAGG	GGACGACGAC	3950
AGTATCGGCC	TCAGGAAGAT	CGCACTCCAG	CCAGCTTTCC	GGCACCCTT	4000
CTGGTGCCGG	AAACCAGGCA	AAGCGCCATT	CGCCATTCAG	GCTGCGCAAC	4050
TGTTGGGAAG	GGCGATCGGT	GCGGGCCTCT	TCGCTATTAC	GCCAGCTGGC	4100
CAAAGGGGGA	TGTGCTGCAA	GGCGATTAAG	TTGGGTAACG	CCAGGGTTTT	4150
CCCAGTCACG	ACGTTGTAAA	ACGACGGGAT	CGCGCTTGAG	CAGCTCCTTG	4200
CTGGTGTCCA	GACCAATGCC	TCCAGACCG	GCAACGAAAA	TCACGTTCTT	4250
GTTGGTCAA	GTAAACGACA	TGGTGACTTC	TTTTTTGCTT	TAGCAGGCTC	4300
TTTCGATCCC	CGGGAATTGC	GGCCGCGGGT	ACAATTCCGC	AGCTTTTAGA	4350
GCAGAAGTAA	CACTTCCGTA	CAGGCCTAGA	AGTAAAGGCA	ACATCCACTG	4400
AGGAGCAGTT	CTTTGATTTG	CACCACCACC	GGATCCGGGA	CCTGAAATAA	4450
AAGACAAAA	GACTAAACTT	ACCAGTTAAC	TTTCTGGTTT	TTCAGTTCCT	4500
CGAGTACCGG	ATCCTCTAGA	GTCCGGAGGC	TGGATCGGTC	CCGGTCTCTT	4550
CTATGGAGGT	CAAAACAGCG	TGGATGGCGT	CTCCAGGCGA	TCTGACGGTT	4600
CACTAAACGA	GCTCTGCTTA	TATAGACCTC	CCACCGTACA	CGCCTACCGC	4650
CCATTTGCGT	CAATGGGGCG	GAGTTGTTAC	GACATTTTGG	AAAGTCCCGT	4700
TGATTTTGGT	GCCAAAACAA	ACTCCCATTG	ACGTCAATGG	GGTGGAGACT	4750
TGGAAATCCC	CGTGAGTCAA	ACCGCTATCC	ACGCCCATTG	ATGTA CTGCC	4800
AAAACCGCAT	CACCATGGTA	ATAGCGATGA	CTAATACGTA	GATGTA CTGC	4850
CAAGTAGGAA	AGTCCCATAA	GGTCATGTAC	TGGGCATAAT	GCCAGGCGGG	4900

CCATTACCG	TCATTGACGT	CAATAGGGGG	CGTACTTGGC	ATATGATACA	4950
CTTGATGTAC	TGCCAAGTGG	GCAGTTTACC	GTAAATACTC	CACCCATTGA	5000
CGTCAATGGA	AAGTCCCTAT	TGGCGTTACT	ATGGGAACAT	ACGTCATTAT	5050
TGACGTCAAT	GGGCGGGGT	CGTTGGGCGG	TCAGCCAGGC	GGGCCATTTA	5100
CCGTAAGTTA	TGTAACGACC	TGCAGGTCGA	CTCTAGAGGA	TCTCCCTAGA	5150
CAAATATTAC	GCGCTATGAG	TAAACAAAA	TPATTCAGAT	TTCACCTCCT	5200
CTTATTCAGT	TTTCCCGCGA	AAATGGCCAA	ATCTTACTCG	GTTACGCCCA	5250
AATTTACTAC	AACATCCGCC	TAAAACCGCG	CGAAAATTGT	CACTTCCTGT	5300
GTACACCGGC	GCACACAAA	AACGTCACCT	TTGCCACATC	CGTCGCTTAC	5350
ATGTGTTCCG	CCACACTTGC	AACATCACAC	TTCCGCCACA	CTACTACGTC	5400
ACCCGCCCGG	TTCCCAGGCC	CCGCGCCACG	TCACAAACTC	CACCCCCTCA	5450
TTATCATATT	GGCTTCAATC	CAAATAAGG	TATATTATTG	ATGATGCTAG	5500
CGAATTCATC	GATGATATCA	GATCTGCCGG	TCTCCCTATA	GTGAGTCGTA	5550
TTAATTTCGA	TAAGCCAGGT	TAACCTGCAT	TAATGAATCG	GCCAACGCGC	5600
GGGGAGAGGC	GGTTTGCCTA	TTGGGCGCTC	TTCCGCTTCC	TCGCTCACTG	5650
ACTCGCTGCG	CTCGGTGCTT	CGGCTGCCGC	GAGCGGTATC	AGCTCACTCA	5700
AAGGCGGTAA	TACGGTTATC	CACAGAATCA	GGGGATAACG	CAGGAAAGAA	5750
CATGTGAGCA	AAAGGCCAGC	AAAAGGCCAG	GAACCGTAAA	AAGGCCGGGT	5800
TGCTGGCGTT	TTTCCATAGG	CTCCGCCCCC	CTGACGAGCA	TCACAAAAAT	5850
CGACGCTCAA	GTCAGAGGTG	GCGAAACCCG	ACAGGACTAT	AAAGATACCA	5900
GGCGTTTCCC	CCTGGAAGCT	CCCTCGTGCG	CTCTCCTGTT	CCGACCCTGC	5950
CGCTTACCGG	ATACCTGTCC	GCCTTTCTCC	CTTCGGGAAG	CGTGGCGCTT	6000
TCTCAATGCT	CACGCTGTAG	GTATCTCAGT	TCGGTGTAGG	TCGTTGCTC	6050
CAAGCTGGGC	TGTGTGCACG	AACCCCCCGT	TCAGCCCCGAC	CGCTGCGCCT	6100
TATCCGGTAA	CTATCGTCTT	GAGTCCAACC	CGGTAAGACA	CGACTTATCG	6150
CCACTGGCAG	CAGCCACTGG	TAAACAGGATT	AGCAGAGCGA	GGTATGTAGG	6200

CGGTGCTACA	GAGTTCTTGA	AGTGGTGGCC	TAACACGGC	TACACTAGAA	6250
GGACAGTATT	TGGTATCTGC	GCTCTGCTGA	AGCCAGTTAC	CTTCGGAAAA	6300
AGAGTTGGTA	GCTCTTGATC	CGGCAAACAA	ACCACCGCTG	CTAGCGGTGG	6350
TTTTTTTGTT	TGCAAGCAGC	AGATTACGGC	CAGAAAAAAA	GGATCTCAAG	6400
AAGATCCTTT	GATCTTTTCT	ACGGGGTCTG	ACGCTCAGTG	GAACGAAAAC	6450
TCACGTTAAG	GGATTTTGGT	CATGAGATTA	TCAAAAAGGA	TCTTCACCTA	6500
GATCCTTTTA	AATTA AAAAT	GAAGTTTTAA	ATCAATCTAA	AGTATATATG	6550
AGTAAACTTG	GTCTGACAGT	TACCAATGCT	TAATCAGTGA	GGCACCTATC	6600
TCAGCGATCT	GTCTATTTTCG	TTTATCCATA	GTTGCCCTGAC	TCCCCGTCGT	6650
GTAGATAACT	ACGATACGGG	AGGGCTTACC	ATCTGGCCCC	AGTGCTGCAA	6700
TGATACCGCG	AGACCCACGC	TCACCGGCTC	CAGATTTATC	AGCAATAAAC	6750
CAGCCAGCCG	GAAGGGCCGA	GCGCAGAAGT	GGTCCTGCAA	CTTTATCCGC	6800
CTCCATCCAG	TCTATTAATT	GTTGCCGGGA	AGCTAGAGTA	AGTAGTTCGC	6850
CAGTTAATAG	TTTGCGCAAC	GTTGTTGCCA	TGCTACAGG	CATCGTGGTG	6900
TCACGCTCGT	CGTTTGGTAT	GGCTTCATTC	AGCTCCGGTT	CCCAACGATC	6950
AAGGCGAGTT	ACATGATCCC	CCATGTTGTG	CAAAAAGCG	GTTAGCTCCT	7000
TCGGTCCTCC	GATCGTTGTC	AGAAGTAAGT	TGGCCGCAGT	GTTATCACTC	7050
ATGGTIATGG	CAGCACTGCA	TAATCTCTT	ACTGTCATGC	CATCCGTAAG	7100
ATGCTTTTCT	GTGACTGGTG	AGTACTCAAC	CAAGTCATTC	TGAGAATAGT	7150
GTATGCGGGC	ACCGAGTTGC	TCTTGCCCCG	CGTCAATACG	GGATAATACC	7200
GCGCCACATA	GCAGAACTTT	AAAAGTGCTC	ATCATTGGAA	AACGTTCTTC	7250
GGGGCGAAAA	CTCTCAAGGA	TCTTACCGCT	GTTGAGATCC	AGTTCGATGT	7300
AACCCACTCG	TGCACCCAAC	TGATCTTCAG	CATCTTTTAC	TTTCACCAGC	7350
GTTTCTGGGT	GAGCAAAAAC	AGGAAGGCAA	AATGCCGCAA	AAAAGGGAAT	7400
AAGGGCGACA	CGGAAATGTT	GAATACTCAT	ACTCTTCCTT	TTTCAATATT	7450
ATTGAAGCAT	TTATCAGGGT	TATTGTCTCA	TGAGCGGATA	CATATTTGAA	7500

TGTATTTAGA AAAATAAACF AATAGGGGTT CCGCGCACAT TTCCCCGAAA	7550
AGTGCCACCT GACGTCTAAG AAACCATTAT TATCATGACA TTAACCTATA	7600
AAAATAGGCG TATCACGAGG CCCTTTCGTC TCGCGCGTTT CCGTGATGAC	7650
GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAJACGGTCA CAGCTTGTCT	7700
GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG	7750
TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA	7800
CTGAGAGTGC ACCATATGGA CATATTGTGG TTAGAACGCG GCTACAATTA	7850
ATACATAACC TTATGTATCA TACACATACG ATTTAGGTGA CACTATA	7897

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 7852 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GAATTCGCTA GCTAGCGGGG GAATACATAC CCGCAGGCGT AGAGACAACA	50
TTACAGCCCC CATAGGAGGT ATAACAAAAT TAATAGGAGA GAAAAACACA	100
TAAACACCTG AAAAACCCCTC CTGCCTAGGC AAAATAGCAC CCTCCCGCTC	150
CAGAACAACA TACAGCGCTT CACAGCGGCA GCCTAACAGT CAGCCTTACC	200
AGTAAAAAAG AAAACCTATT AAAAAAACAC CACTCGACAC GGCACCAGCT	250
CAATCAGTCA CAGTGTAATA AAGGSCCAAG TGCAGAGCGA GTATATATAG	300
GACTAAAAAA TGACGTAACG GTTAAAGTCC ACAAAAAACA CCCAGAAAAC	350
CGCAGCGGAA CCTACGCCCA GAAACGAAAG CCAAAAAACC CACAACCTCC	400
TCAAATCGTC ACTTCCGTTT TCCCACGTTA CGTAACTTCC CATTTTAAGA	450
AAACTACAAT TCCCAACACA TACAAGTTAC TCCGCCCTAA AACCTACGTC	500
ACCCGCCCCG TTCCCACGCC CCGCGCCACG TCACAAACTC CACCCCCTCA	550

TTATCATATT	GGCTTCAATC	CAAATAAGG	TATATTATTG	ATGATGCTAG	600
CATCATCAAT	AATATACCTT	ATTTTGGATT	GAAGCCAATA	TGATAATGAG	650
GGGGTGGAGT	TTGTGACGTG	GCGCGGGGCG	TGGGAACGGG	GCGGGTGACG	700
TAGTAGTGTG	GCGGAAGTGT	GATGTTGCAA	G'GTGGCGGA	ACACATGTAA	750
GCGACGGATG	TGGCAAAGT	GACGTTTTTG	GTGTGCGCCG	GTGTACACAG	800
GAAGTGACAA	TTTTCGCGCG	GTTTTAGGCG	GATGTTGTAG	TAAATTTGGG	850
CGTAACCGAG	TAAGATTTGG	CCATTTTCGC	GGGAAAACG	AATAAGAGGA	900
AGTGAAATCT	GAATAATTTT	GTGTTACTCA	TAGCGCGTAA	TATTTGTCTA	950
GGGAGATCAG	CCTGCAGGTC	GTTACATAAC	TTACGGTAAA	TGGCCCGCCT	1000
GGCTGACCGC	CCAACGACCC	CCGCCCATG	ACGTCAATAA	TGACGTATGT	1050
TCCCATAGTA	ACGCCAATAG	GGACTTTCCA	TTGACGTCAA	TGGGTGGAGT	1100
ATTTACGGTA	AACTGCCCAC	TTGGCAGTAC	ATCAAGTGTA	TCATATGCCA	1150
AGTACGCCCC	CTATTGACGT	CAATGACGGT	AAATGGCCCG	CCTGGCATT	1200
TGCCCCAGTAC	ATGACCTTAT	GGGACTTTCC	TACTTGGCAG	TACATCTACG	1250
TATTAGTCAT	CGCTATTACC	ATGGTGATGC	GGTTTTGGCA	GTACATCAAT	1300
GGGCGTGGAT	AGCGGTTTGA	CTCACGGGGA	TTTCCAAGTC	TCCACCCCAT	1350
TGACGTCAAT	GGGAGTTTGT	TTTGGCACCA	AAATCAACGG	GACTTTCCAA	1400
AATGTCGTAA	CAACTCCGCC	CCATTGACGC	AAATGGGCGG	TAGGCGTGTA	1450
CGTGGGAGG	TCTATATAAG	CAGAGCTCGT	TTAGTGAACC	GTCAGATCGC	1500
CTGGAGACGC	CATCCACGCT	GTTTTGACCT	CCATAGAAGA	CACCGGGACC	1550
GATCCAGCCT	CCGGACTCTA	GAGGATCCGG	TACTCGAGGA	ACTGAAAAAC	1600
CAGAAAGTTA	ACTGGTAAGT	TTAGTCTTTT	TGTCTTTTAT	TTCAGGTCCC	1650
GGATCCGGTG	GTGGTGCAAA	TCAAAGAACT	GCTCCTCAGT	GGATGTTGCC	1700
TTTACTTCTA	GGCCTGTACG	GAAGTGTTAC	TTCTGCTCTA	AAAGCTGCGG	1750
AATTGTACCC	GCGGCCGCAA	TTCCCGGGGA	TCGAAAGAGC	CTGCTAAAGC	1800
AAAAAAGAAG	TCACCATGTC	GTTTACTTTG	ACCAACAAGA	ACGTGATTTT	1850

CGTTGCCGGT CTGGGAGGC\	TTGGTCTGGA CACCAGCAAG GAGCTGCTCA	1900
AGCGCGATCC CGTCGTTTTA	CAACGTCGTG ACTGGGAAAA CCCTGGCGTT	1950
ACCCAACCTA ATCGCCTTGC	AGCACATCCC CCTTTCGCCA GCTGGCGTAA	2000
TAGCGAAGAG GCCCGCACCG	ATCGCCCTTC CCACAGTTG CGCAGCCTGA	2050
ATGGCGAATG GCGCTTTGCC	TGGTTTCCGG CACCAGAAGC GGTGCCGGAA	2100
AGCTGGCTGG AGTGCGATCT	TCCTGAGGCC GATACTGTCTG TCGTCCCCTC	2150
AAACTGGCAG ATGCACGGTT	ACGATGCGCC CATCTACACC AACGTAACCT	2200
ATCCCATTAC GGTCAATCCG	CCGTTTGTTC CCACGGAGAA TCCGACGGGT	2250
TGTTACTCGC TCACATTTAA	TGTTGATGAA AGCTGGCTAC AGGAAGGCCA	2300
GACGCGAATT ATTTTTGATG	GCGTTAACTC GCGTTCAT CTCTGGTGCA	2350
ACGGGCGCTG GGTGCGTTAC	GGCCAGGACA GTCGTTGCC GTCTGAATTT	2400
GACCTGAGCG CATTTTTACG	CGCCGGAGAA AACCGCCTCG CGGTGATGGT	2450
GCTGCGTTGG AGTGACGGCA	GTTATCTGGA AGATCAGGAT ATGTGGCGGA	2500
TGAGCGGCAT TTTCCGTGAC	GTCTCGTTGC TGCATAAACC GACTACACAA	2550
ATCAGCGATT TCCATGTTGC	CACTCGCTTT AATGATGATT TCAGCCGCGC	2600
TGTACTGGAG GCTGAAGTTC	AGATGTGCGG CGAGTTGCGT GACTACCTAC	2650
GGTAACAGT TTCTTTATGG	CAGGGTGAAA CGCAGGTGCG CAGCGGCACC	2700
GCGCCTTTTCG GCGGTGAAAT	TATCGATGAG CGTGGTGGTT ATGCCGATCG	2750
CGTCACACTA CGTCTGAACG	TCGAAAACCC GAAACTGTGG AGCGCCGAAA	2800
TCCCGAATCT CTATCGTGCG	GTGGTTGAAC TGCACACCGC CGACGGCACG	2850
CTGATTGAAG CAGAAGCCTG	CGATGTCGGT TTCCGCGAGG TCGCGATTGA	2900
AAATGGTCTG CTGCTGCTGA	ACGGCAAGCC GTTGCTGATT CGAGGCGTTA	2950
ACCGTCACGA GCATCATCCT	CTGCATGGTC AGGTCATGGA TGAGCAGACC	3000
ATGGTGCAAG ATATCCTGCT	GATGAAGCAG AACAACTTTA ACGCCGTGGG	3050
CTGTTTCGCAT TATCCGAACC	ATCCGCTGTG GTACACGCTG TGCGACCGCT	3100
ACGGCCTGTA TGTGGTGGAT	GAAGCCAATA TTGAAACCCA CGGCATGGTG	3150

CCAATGAATC	GTCTGACCGA	TGATCCGCGC	TGGCTACCGG	CGATGAGCGA	3200
ACGCGTAACG	CGAATGGTGC	AGCGCGATCG	TAATCACCCG	AGTGTGATCA	3250
TCTGCTCGCT	GGGGAATGAA	TCAGGCCACG	GCGCTAATCA	CGACGCGCTG	3300
TATCGCTGGA	TCAAATCTGT	CGATCCTTCC	CGCCCGGTGC	AGTATGAAGG	3350
CGGCGGAGCC	GACACCACGG	CCACCGATAT	TATTTGCCCG	ATGTACGCGC	3400
GCGTGGATGA	AGACCAGCCC	TTCCCGGCTG	TGCCGAAATG	GTCCATCAAA	3450
AAATGGCTTT	CGCTACCTGG	AGAGACGCGC	CCGCTGATCC	TTTGCGAATA	3500
CGCCACGCG	ATGGGTAACA	GTCTTGGCGG	TTTCGCTAAA	TACTGGCAGG	3550
CGTTTCGTCA	GTATCCCCGT	TTACAGGGCG	GCTTCGTCTG	GGACTGGGTG	3600
GATCAGTCGC	TGATTAAATA	TGATGAAAAC	GGCAACCCGT	GGTCGGCTTA	3650
CGGCGGTGAT	TTTGGCGATA	CGCCGAACGA	TCGCCAGTTC	TGTATGAACG	3700
GTCTGGTCTT	TGCCGACCGC	ACGCCGCATC	CAGCGCTGAC	GGAAGCAAAA	3750
CACCAGCAGC	AGTTTTTCCA	GTTCCGTTTA	TCCGGGCAAA	CCATCGAAGT	3800
GACCAGCGAA	TACCTGTTCC	GTCATAGCGA	TAACGAGCTC	CTGCACTGGA	3850
TGGTGGCGCT	GGATGGTAAG	CCGCTGGCAA	GCGGTGAAGT	GCCTCTGGAT	3900
GTCGCTCCAC	AAGGTAAACA	GTTGATTGAA	CTGCCTGAAC	TACCGCAGCC	3950
GGAGAGCGCC	GGGCAACTCT	GGCTCACAGT	ACGCGTAGTG	CAACCGAACG	4000
CGACCGCATG	GTCAGAAGCC	GGGCACATCA	GCGCCTGGCA	GCAGTGGCGT	4050
CTGGCGGAAA	ACCTCAGTGT	GACGCTCCCC	GCCGCGTCCC	ACGCCATCCC	4100
GCATCTGACC	ACCAGCGAAA	TGGATTTTTG	CATCGAGCTG	GGTAATAAGC	4150
GTTGGCAATT	TAACCGCCAG	TCAGGCTTTC	TTTCACAGAT	GTGGATTGGC	4200
GATAAAAAAC	AACTGCTGAC	GCCGCTGCGC	GATCAGTTCA	CCCGTGCACC	4250
GCTGGATAAC	GACATTGGCG	TAAGTGAAGC	GACCCGCATT	GACCCTAACG	4300
CCTGGGTCGA	ACGCTGGAAG	GCGGCGGGCC	ATTACCAGGC	CGAAGCAGCG	4350
TTGTTGCAGT	GCACGGCAGA	TACACTTGCT	GATGCGGTGC	TGATTACGAC	4400
CGCTCACGCG	TGGCAGCATC	AGGGGAAAAC	CTTATTTATC	AGCCGGAAAA	4450

CCTACCGGAT	TGATGGTAGT	GGTCAAATGG	CGATTACCGT	TGATGTTGAA	4500
GTGGCGAGCG	ATACACCGCA	TCCGGCGCGG	ATTGGCCTGA	ACTGCCAGCT	4550
GGCGCAGGTA	GCAGAGCGGG	TAAACTGGCT	CGGATTAGGG	CCGCAAGAAA	4600
ACTATCCCGA	CCGCCTTACT	GCCGCCTGTT	TTJACCGCTG	GGATCTGCCA	4650
TTGTCAGACA	TGTATACCCC	GTACGTCTTC	CCGAGCGAAA	ACGGTCTGCG	4700
CTGCGGGACG	CGCGAATTGA	ATTATGGCCC	ACACCAGTGG	CGCGGCGACT	4750
TCCAGTTCAA	CATCAGCCGC	TACAGTCAAC	AGCAACTGAT	GGAAACCAGC	4800
CATCGCCATC	TGCTGCACGC	GGAGAAGGC	ACATGGCTGA	ATATCGACGG	4850
TTTCCATATG	GGGATTGGTG	GCGACGACTC	CTGGAGCCCG	TCAGTATCGG	4900
CGGAATTACA	GCTGAGCGCC	GGTCGCTACC	ATTACCAGTT	GGTCTGGTGT	4950
CAAAAATAAT	AATAACCGGG	CAGGCCATGT	CTGCCCGTAT	TTCGCGTAAG	5000
GAAATCCATT	ATGTACTIONT	TAAAAACAC	AACTTTTTGG	ATGTTGCGTT	5050
TATTCCTTTTT	CTTTTACTTT	TTTATCATGG	GAGCCTACTT	CCCGTTTTTC	5100
CCGATTTGGC	TACATGACAT	CAACCATATC	AGCAAAAGTG	ATACGGGTAT	5150
TATTTTTGCC	GCTATTTCTC	TGTTCTCGCT	ATTATTCCAA	CCGCTGTTTG	5200
GTCTGCTTTC	TGACAAACTC	GGCCTCGACT	CTAGGCGGCC	GCGGGGATCC	5250
AGACATGATA	AGATACATTG	ATGAGTTTGG	ACAAACCACA	ACTAGAATGC	5300
AGTGAAAAAA	ATGCTTTTAT	TGTGAAATTT	GTGATGCTAT	TGCTTTATTT	5350
GTAACCATTA	TAAGCTGCAA	TAAACAAGTT	AACAACAACA	ATTGCATTCA	5400
TTTTATGTTT	CAGGTTTCCG	GGGAGGTGTG	GGAGGTTTTT	TCGGATCCTC	5450
TAGAGTCGAC	GACGCGAGGC	TGGATGGCCT	TCCCCATTAT	GATTCTTCTC	5500
GCTTCCGGCG	GCATCGGGAT	GCCCCGTTG	CAGGCCATGC	TGTCCAGGCA	5550
GGTAGATGAC	GACCATCAGG	GACAGCTTCA	AGGATCGCTC	GCGGCTCTTA	5600
CCAGCCTAAC	TTCGATCACT	GGACCGCTGA	TCGTCACGGC	GATTTATGCC	5650
GCCTCGGCGA	GCACATGGAA	CGGGTTGGCA	TGGATTGTAG	GCGCCGCCCT	5700
ATACCTTGTC	TGCCTCCCCG	CGTTGCCGTC	CGGTGCATGG	AGCCGGGCCA	5750

CCTCGACCTG	AATGGAAGCC	GGCGGCACCT	CGCTAACGGA	TTCACCACTC	5800
CAAGAATTGG	AGCCAATCAA	TTCTTGCGGA	GAAGTGTGAA	TGCGCAAACC	5850
AACCCTTGGC	AGAACATATC	CATCGCGTCC	GCCATCTCCA	GCAGCCGCAC	5900
GCGGCGCATC	TCGGGCAGCG	TTGGGTCTCTG	GJCACGGGTG	CGCATGATCG	5950
TGCTCCTGTC	GTTGAGGACC	CGGCTAGGCT	GGCGGGGTG	CCTTACTGGT	6000
TAGCAGAATG	AATCACCGAT	ACGCGAGCGA	ACGTGAAGCG	ACTGCTGCTG	6050
CAAAACGTCT	GCGACCTGAG	CAACAACATG	AATGGTCTTC	GGTTTCCGTG	6100
TTTCGTAAAG	TCTGGAAACG	CGGAAGTCAG	CGCCCTGCAC	CATTATGTTC	6150
CGGATCTGCA	TCGCAGGATG	CTGCTGGCTA	CCCTGTGGAA	CACCTACATC	6200
TGTATTAACG	AAGCCTTCT	CAATGCTCAC	GCTGTAGGTA	TCTCAGTTCG	6250
GTGTAGGTG	TTGCTCCAA	GCTGGGCTGT	GTGCACGAAC	CCCCCGTTCA	6300
GCCCGACCGC	TGCGCCTTAT	CCGTAACCTA	TCGTCTTGAG	TCCAACCCGG	6350
TAAGACACGA	CTTATCGCCA	CTGGCAGCAG	CCACTGGTAA	CAGGATTAGC	6400
AGAGCGAGGT	ATGTAGGCGG	TGCTACAGAG	TTCTTGAAGT	GGTGGCCTAA	6450
CTACGGCTAC	ACTAGAAGGA	CAGTATTTGG	TATCTGCGCT	CTGCTGAAGC	6500
CAGTTACCTT	CGGAAAAAGA	GTTGGTAGCT	CTTGATCCGG	CAAACAAACC	6550
ACCGCTGGTA	GCGGTGGTTT	TTTTGTTTGC	AAGCAGCAGA	TTACGCGCAG	6600
AAAAAAGGA	TCTCAAGAAG	ATCCTTTGAT	CTTTTCTACG	GGGTCTGACG	6650
CTCAGTGGAA	CGAAAACTCA	CGTTAAGGGA	TTTTGGTCAT	GAGATTATCA	6700
AAAAGGATCT	TCACCTAGAT	CCTTTTAAAT	TAAAAATGAA	GTTTTAAATC	6750
AATCTAAAGT	ATATATGAGT	AACTTGGTC	TGACAGTTAC	CAATGCTTAA	6800
TCAGTGAGGC	ACCTATCTCA	GCGATCTGTC	TATTTTCGTT	ATCCATAGTT	6850
GCCTGACTCC	CCGTCTGTGA	GATAACTACG	ATACGGGAGG	GCTTACCATC	6900
TGGCCCCAGT	GCTGCAATGA	TACCGCGAGA	CCCACGCTCA	CCGGCTCCAG	6950
ATTTATCAGC	AATAAACCAG	CCAGCCGGAA	GGGCCGAGCG	CAGAAGTGGT	7000
CCTGCAACTT	TATCCGCCTC	CATCCAGTCT	ATTAATTGTT	GCCGGGARGC	7050

TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG TTAATAGTTT GCGCAACGTT GTTGCCATTG	7100
CTGCAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTCGT TTGGTATGGC TTCATTCAGC	7150
TCCGGTTCCC AACGATCAAG GCGAGTTACA TCATCCCCCA TGTTGTGCAA	7200
AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCCTCCGAT CG.TGTCAGA AGTAAGTTGG	7250
CCGCAGTGTT ATCACTCATG GTTATGCCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT	7300
GTCATGCCAT CCGTAAGATG CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA	7350
GTCATTCTGA GAATAGTGTA TCGGGCGACC GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT	7400
CAACACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA CAACTTTAAA AGTGCTCATC	7450
ATTGGAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAAC TC AAGGATCT TACCGCTGTT	7500
GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT	7550
CTTTTACTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAACAGG AAGGCAAAAT	7600
GCCGCAAAA AGGGAATAAG GCCGACACGG AAATGTTGAA TACTCATACT	7650
CTTCCTTTTT CAATATTATT GAAGCATTTA TCAGGGTTAT TGTCTCATGA	7700
GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCCG	7750
CGCACATTC CCCGAAAAGT GCCACCTGAC GTCTAAGAAA CCATTATTAT	7800
CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCGTAT CACGAGGCC TTTCTCTTC	7850
AA	7852

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9972 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGA CTGCTG CGCTCGGTCG TTCGGCTGGG	50
GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT	100

CAGGGGATAA	CGCAGGAAAG	AACATGTGAG	CAAAAGGCCA	GCAAAGGCC	150
AGGAACCGTA	AAAAGGCCGC	GTTGCTGGCG	TTTTTCCATA	GGCTCCGCCC	200
CCCTGACGAG	CATCACAAAA	ATCGACGCTC	AAGTCAGAGG	TGGCGAAACC	250
CGACAGGACT	ATAAAGATAC	CAGGCGTTTC	CCCTGGAAG	CTCCCTCGTG	300
CGCTCTCCTG	TTCCGACCCT	GCCGCTTACC	GGATACCTGT	CCGCCTTTCT	350
CCCTTCGGGA	AGCGTGGCGC	TTTCTCATAG	CTCACGCTGT	AGGTATCTCA	400
GTTCCGGTGT	GGTCGTTCCG	TCCAAGCTGG	GCTGTGTGCA	CGAACCCCCC	450
GTTCCAGCCC	ACCGCTGCGC	CTTATCCGGT	AACTATCGTC	TTGAGTCCAA	500
CCCCGTAAGA	CACGACTTAT	CGCCACTGGC	AGCAGCCACT	GGTAACAGGA	550
TTAGCAGAGC	GAGGTATGTA	GGCGGTGCTA	CAGAGTTCTT	GAAGTGGTGG	600
CCTAACTACG	GCTACACTAG	AAGAACAGTA	TTTGGTATCT	GCGCTCTGCT	650
GAAGCCAGTT	ACCTTCGGAA	AAAGAGTTGG	TAGCTCTTGA	TCCGGCAAAC	700
AAACCACCGC	TGGTAGCGGT	GGTTTTTTTG	TTTGCAAGCA	GCAGATTACG	750
CGCAGAAAAA	AAGGATCTCA	AGAAGATCCT	TTGATCTTTT	CTACGGGGTC	800
TGACGCTCAG	TGGAACGAAA	ACTCACGTTA	AGGGATTTTG	GTCATGAGAT	850
TATCAAAAAG	GATCTTCACC	TAGATCCTTT	TAAATTAATA	ATGAAGTTTT	900
AAATCAATCT	AAAGTATATA	TGAGTAAACT	TGGTCTGACA	GTTACCAATG	950
CTTAATCAGT	GAGGCACCTA	TCTCAGCGAT	CTGTCTATTT	CGTTCATCCA	1000
TAGTTGCCTG	ACTCCCCGTC	GTGTAGATAA	CTACGATACG	GGAGGGCTTA	1050
CCATCTGGCC	CCAGTGCTGC	AATGATACCG	CCAGACCCAC	GCTCACCGGC	1100
TCCAGATTTA	TCAGCAATAA	ACCAGCCAGC	CGGAAGGGCC	GAGCGCAGAA	1150
GTGGTCCTGC	AACTTTATCC	GCCTCCATCC	AGTCTATTAA	TTGTTGCCGG	1200
GAAGCTAGAG	TAAGTAGTTC	GCCAGTTAAT	AGTTTGCGCA	ACGTTGTTGC	1250
CATTGCTACA	GGCATCGTGG	TGTCACGCTC	GTCGTTTGGT	ATGGCTTCAT	1300
TCAGCTCCGC	TTCCAACGA	TCAAGCGGAG	TTACATGATC	CCCCATGTTG	1350
TGCAAAAAG	CGGTTAGCTC	CTTCGGTCCT	CCGATCGTTG	TCAGAAGTAA	1400

GTTGGCCGCA	GTGTTATCAC	TCATGGTTAT	GGCAGCACTG	CATAATTCTC	1450
TTACTGTCAT	GCCATCCGTA	AGATGCTTTT	CTGTGACTGG	TGAGTACTCA	1500
ACCAAGTCAT	TCTGAGAATA	GTGTATGCGG	CGACCGAGTT	GCTCTTGCCC	1550
GGCGTCAATA	CGGGATAATA	CCGCGCCACA	TAGCAGAACT	TTAAAAGTGC	1600
TCATCATTGG	AAAACGTTCT	TCGGGGCGAA	AACTCTCAAG	GATCTTACCG	1650
CTGTTGAGAT	CCAGTTCGAT	GTAACCCACT	CGTGCACCCA	ACTGATCTTC	1700
AGCATCTTTT	ACTTTCACCA	GCGTTTCTGG	GTGAGCAAAA	ACAGGAAGGC	1750
AAAATGCCGC	AAAAAAGGGA	ATAAGGGCGA	CACGGAAATG	TTGAATACTC	1800
ATACTCTTCC	TTTTTCAATA	TTATTGAAGC	ATTTATCAGG	GTTATTGTCT	1850
CATGAGCGGA	TACATATTTG	AATGTATTTA	GAAAAATAAA	CAAATAGGGG	1900
TTCCGCGCAC	ATTTCCCCGA	AAAGTGCCAC	CTGACGTCTA	AGAAACCAAT	1950
ATTATCATGA	CATTAACCTA	TAAAAATAGG	CGTATCACGA	GGCCCTTTCG	2000
TCTCGCGCGT	TTCGGTGATG	ACGGTGAAAA	CCTCTGACAC	ATGCAGCTCC	2050
CGGAGACGGT	CACAGCTTGT	CTGTAAGCGG	ATGCCGGGAG	CAGACAAGCC	2100
CGTCAGGGCG	CGTCAGCGGG	TGTTGGCGGG	TGTCGGGGCT	GGCTTAACTA	2150
TGCGGCATCA	GAGCAGATTG	TACTGAGAGT	GCACCATAAA	ATTGTAAACG	2200
TTAATATTTT	GTTAAAATTC	GCGTTAAATT	TTTGTTAAAT	CAGCTCATTT	2250
TTTAACCAAT	AGGCCGAAAT	CGGCAAAATC	CCTTATAAAT	CAAAAGAATA	2300
GCCCGAGATA	GGGTTGAGTG	TTGTTCCAGT	TTGGAACAAG	AGTCCACTAT	2350
TAAAGAACGT	GGACTCCAAC	GTCAAAGGGC	GAAAAACCGT	CTATCAGGGC	2400
GATGGCCAC	TACGTGAACC	ATCACCCAAA	TCAAGTTTTT	TGGGGTCGAG	2450
GTGCCGTAAA	GCACTAAATC	GGAACCCTAA	AGGGAGCCCC	CGATTTAGAG	2500
CTTGACGGGG	AAAGCCGGCG	AACGTGGCGA	GAAAGGAAGG	GAAGAAAGCG	2550
AAAGGAGCGG	GCGCTAGGGC	GCTGGCAAGT	GTAGCGGTCA	CGCTGCGCGT	2600
AACCACCACA	CCCGCCGCGC	TTAATGCGCC	GCTACAGGGC	GCGTACTATG	2650
GTTGCTTTGA	CGTATGCGGT	GTGAAATACC	GCACAGATGC	GTAAGGAGAA	2700

AATACCGCAT	CAGGCGCCAT	TCGCCATTCA	GGCTGCGCAA	CTGTTGGGAA	2750
GGGCGATCGG	TGCGGGCCTC	TTCGCTATTA	CGCCAGCTGG	CGAAAGGGGG	2800
ATGTGCTGCA	AGGCGATTAA	GTTGGGTAAC	GCCAGGGTTT	TCCCAGTCAC	2850
GACGTTGTAA	AACGACGGCC	AGTGCCAAGC	TAAAGGTGCA	CGGCCCAGGT	2900
GGCCACTAGT	ACTTCTCGAG	CTCTGTACAT	GTCCGCGGTC	GCGACGTACG	2950
CGTATCGATG	GCGCCAGCTG	CAGGCGGCCG	CCATATGCAT	CCTAGGCCTA	3000
TTAATATTCC	GGAGTATACG	TAGCCGGCTA	ACGTTAACAA	CCGGTACCTC	3050
TAGAACTATA	GCTAGCCAAT	TCCATCATCA	ATAATATAACC	TTATTTTGGG	3100
TTGAAGCCAA	TATGATAATG	AGGGGGTGGG	GTTTGTGACG	TGGCGCGGGG	3150
CGTGGAACG	GGGCGGGTGA	CGTAGGTTTT	AGGGCGGAGT	AACTTGTATG	3200
TGTTGGGAAT	TGTAGTTTTC	TTAAAATGGG	AAGTTACGTA	ACGTGGGAAA	3250
ACGGAAGTGA	CGATTTGAGG	AAGTTGTGGG	TTTTTTGGCT	TTCGTTTCTC	3300
GGCGTAGGTT	CGCGTGCGGT	TTTCTGGGTG	TTTTTTGTGG	ACTTTAACCG	3350
TTACGTCATT	TTTTAGTCCT	ATATATACTC	GCTCTGCACT	TGGCCCTTTT	3400
TTACACTGTG	ACTGATTGAG	CTGGTGCCGT	GTCGAGTGGT	GTTTTTTTAA	3450
TAGGTTTTCT	TTTTTACTGG	TAAGGCTGAC	TGTTAGGCTG	CCGCTGTGAA	3500
GCGCTGTATG	TTGTTCTGGA	GCGGGAGGGT	GCTATTTTGC	CPAGGCAGGA	3550
GGGTTTTTCA	GGTGMTTATG	TGTTTTTCTC	TCCTATTAAT	TTTGTTATAC	3600
CTCCTATGGG	GGCTGTAATG	TTGTCTCTAC	GCCTGCGGGT	ATGTATTCCC	3650
CCCAAGCTTG	CATGCCTGCA	GGTCGACTCT	AGAGGATCCG	AAAAAACCTC	3700
CCACACCTCC	CCCTGAACCT	GAAACATAAA	ATGAATGCAA	TTGTTGTTGT	3750
TAACTTGTTT	ATTGCAGCTT	ATAATGGTTA	CAAATAAAGC	AATAGCATCA	3800
CAAATTTTAC	AAATAAAGCA	TTTTTTTTCAC	TGCATTCTAG	TTGTGGTTTG	3850
TCCAAACTCA	TCAATGTATC	TTATCATGTC	TGGATCCCCC	TAGCTTGCCA	3900
AACCTACAGG	TGGGGTCTTT	CATTCCCCCC	TTTTTCTGGA	GACTAAATAA	3950
AATCTTTTAT	TTTATCTATG	GCTCGTACTC	TATAGGCTTC	AGCTGGTGAT	4000

ATTGTTGAGT	CAAAACTAGA	GCCTGGACCA	CTGATATCCT	GTCTTTAACA	4050
AATTGGACTA	ATCGCGGGAT	CAGCCAATTC	CATGAGCAA	TGTCCCATGT	4100
CAACATTTAT	GCTGCTCTCT	AAAGCCTTGT	ATCTTGCATC	TCTTCTTCTG	4150
TCTCCTCTTT	CAGAGCAGCA	ATCTGGGGCT	TAJACTTGCA	CTTGCTTGAG	4200
TTCCGGTGGG	GAAAGAGCTT	CACCCTGTCC	GAGGGGCTGA	TGGCTTGCCG	4250
GAAGAGGCTC	CTCTCGTTCA	GCAGTTTCTG	GATGGAATCG	TACTGCCGCA	4300
CTTTGTTCTC	TTCTATGACC	AAAAATTGTT	GGCATTCCAG	CATTGCTTCT	4350
ATCCTGTGTT	CACAGAGAAT	TACTGTGCAA	TCAGCAAATG	CTTGTTTTAG	4400
AGTTCTTCTA	ATTATTTGGT	ATGTTACTGG	ATCCAAATGA	GCACTGGGTT	4450
CATCAAGCAG	CAAGATCTTC	GCCTTACTGA	GAACAGATCT	AGCCAAGCAC	4500
ATCAACTGCT	TGTGGCCATG	GCTTAGGACA	CAGCCCCCAT	CCACAAGGAC	4550
AAAGTCAAGC	TTCCAGGAA	ACTGTTCTAT	CACAGATCTG	AGCCCAACCT	4600
CATCTGCAAC	TTCCATATT	TCTTGATCAC	TCCACTGTTC	ATAGGGATCC	4650
AAGTTTTTTC	TAAATGTTCC	AGAAAAATA	AATACTTTCT	GTGGTATCAC	4700
TCCAAAGGCT	TTCTCCACT	GTTGCAAAGT	TATTGAATCC	CAAGACACAC	4750
CATCGATCTG	GATTTCTCCT	TCAGTGTTCA	GTAGTCTCAA	AAAAGCTGAT	4800
AACAAAGTAC	TCTTCCCTGA	TCCAGTTCTT	CCCAAGAGGC	CCACCCTCTG	4850
GCCAGGACTT	ATTGAGAAGG	AAATGTTCTC	TAATATGGCA	TTCCACCTT	4900
CTGTGTATTT	TGCTGTGAGA	TCTTTGACAG	TCATTTGGCC	CCCTGAGGGC	4950
CAGATGTCAT	CTTTCTTCAC	GTGTGAATTC	TCAATAATCA	TAACTTTCGA	5000
GAGTTGGCCA	TTCTTGATG	GTTTGGTTGA	CTTGGTAGGT	TTACCTTCTG	5050
TTGGCATGTC	AATGAACTTA	AAGACTCGGC	TCACAGATCG	CATCAAGCTA	5100
TCCACATCTA	TGCTGGAGTT	TACAGCCCAC	TGCAATGTAC	TCATGATATT	5150
CATGGCTAAA	GTCAGGATAA	TACCAACTCT	TCCTTCTCCT	TCTCCTGTTG	5200
TTAAAATGGA	AATGAAGGTA	ACAGCAATGA	AGAAGATGAC	AAAAATCATT	5250
TCTATTCTCA	TTTGAACCA	GCGCAGTGTT	GACAGGTACA	AGAACCAGTT	5300

GGCAGTATGT	AAATTCAGAG	CTTTGTGGAA	CAGAGTTTCA	AAGTAAGGCT	5350
GCCGTCCGAA	GGCACGAAGT	GTCCATAGTC	CTTTAAGCT	TGTAACAAGA	5400
TGAGTGAAAA	TTGGACTCCT	GCCTTCAGAT	TCCAGTTGTT	TGAGTTGCTG	5450
TGAGGTTTGG	AGGAAATATG	CTCTCAACAT	AATAAAAGCC	ACTATCACTG	5500
GCACGTGTC	AACAAAGATG	TAGGGTTGTA	AAACTGCGAC	AACTGCTATA	5550
GCTCCAATCA	CAATTAATAA	CAACTGGATG	AAGTCAAATA	TGGTAAGAGG	5600
CAGAAGGTCA	TCCAAAATTG	CTATATCTTT	GGAGAATCTA	TTAAGAATCC	5650
CACCTGCTTT	CAACGTGTTG	AGGGTTGACA	TAGGTGCTTG	AAGAACAGAA	5700
TGTAACATTT	TGTGGTGTA	AATTTTCGAC	ACTGTGATTA	GAGTATGCAC	5750
CAGTGGTAGA	CCTCTGAAGA	ATCCCATAGC	AAGCAAAGTG	TCGGCTACTC	5800
CCACGTAAT	GTAAAACACA	TAATACGAAC	TGGTGCTGGT	GATAATCACT	5850
GCATAGCTGT	TATTTCTACT	ATGAGTACTA	TTCCCTTGT	CTTGAAGAGG	5900
AGTGTTTCCA	AGGAGCCACA	GCACAACCAA	AGAAGCAGCC	ACCTCTGCCA	5950
GAAAATTAC	TAAGCACCAA	ATTAGCACAA	AAATTAAGCT	CTTGTGGACA	6000
GTAATATATC	GAAGGTATGT	GTTCCATGTA	GTCACGCTG	GTATGCTCTC	6050
CATATCATCA	AAAAAGCACT	CCTTTAAGTC	TTCTTCGTTA	ATTTCTTCAC	6100
TTATTTCCAA	GCCAGTTTCT	TGAGATAACC	TTCTTGAATA	TATATCCAGT	6150
TCAGTCAAGT	TTGCCTGAGG	GGCCAGTGAC	ACTTTTCGTG	TGGATGCTGT	6200
TGTCTTTCCG	TGAATGTTCT	GACCTTGGTT	AACTGAGTGT	GTCATCAGGT	6250
TCAGGACAGA	CTGCCTCCTT	CGTGCCTGAA	GCGTGGGGCC	AGTGCTGATC	6300
ACGCTGATGC	GAGGCAGTAT	CGCCTCTCCC	TGCTCAGAAT	CTGGTACTAA	6350
GGACAGCCTT	CTCTCTAAAG	GCTCATCAGA	ATCCTCTTCG	ATGCCATTCA	6400
TTTGTAAGGG	AGTCTTTTGC	ACAATGGAAA	ATTTTCGTAT	AGAGTTGATT	6450
GGATTGAGAA	TAGAATTCTT	CCTTTTTTCC	CCAAACTCTC	CAGTCTGTTT	6500
AAAAGATTGT	TTTTTTGTTT	CTGTCCAGGA	GACAGGAGCA	TCTCCTTCTA	6550
ATGAGAAACG	GTGTAAGGTC	TCAGTTAGGA	TTGAATTTCT	TCTTTCTGCA	6600

CTAAATTGGT	CGAAAGAATC	ACATCCCATG	AGTTTTGAGC	TAAAGTCTGG	6650
CTGTAGATTT	TGGAGTCTG	AAAATGTCCC	ATAAAAATAG	CTGCTACCTT	6700
CATGCAAAAT	TAATATTTTG	TCAGCTTTCT	TTAAATGTTC	CATTTTAGAA	6750
GTGACCAAAA	TCCTAGTTTT	GTTAGCCATC	AGTTTACAGA	CACAGCTTTC	6800
AAATATTTCT	TTTTCTGTTA	AAACATCTAG	GTATCCAAA	GGAGAGTCTA	6850
ATAAATACAA	ATCAGCATCT	TTGTATACTG	CTCTTGCTAA	AGAAATTCTT	6900
GCTCGTTGAC	CTCCACTCAG	TGTGATTCCA	CCTTCTCCAA	GAACTATATT	6950
GTCTTTCTCT	GCAAACCTGG	AGATGTCCCTC	TTCTAGTTGG	CATGCTTTGA	7000
TGACGCTTCT	GTATCTATAT	TCATCATAGG	AAACACCAA	GATGATATTT	7050
TCTTTAATGG	TGCCAGGCAT	AATCCAGGAA	AACTGAGAAC	AGAATGAAT	7100
TCTTCCACTG	TGCTTAATTT	TACCCTCTGA	AGGCTCCAGT	TCTCCATAA	7150
TCATCATTAG	AAGTGAAGTC	TTGCCTGCTC	CAGTGGATCC	AGCAACCGCC	7200
AACAACCTGTC	CTCTTTCTAT	CTTGAAATTA	ATATCTTTCA	GGACAGGAGT	7250
ACCAAGAAGT	GAGAAATTAC	TGAAGAAGAG	GCTGTCATCA	CCATTAGAAG	7300
TTTTTCTATT	GTTATTGTTT	TGTTTTGCTT	TCTCAAATA	TTCCCAAAT	7350
CCCTCCTCCC	AGAAGGCTGT	TACATTCCTC	ATCACTACTT	CTGTAGTGGT	7400
TAAGTTATAT	TCCAATGTCT	TATATTCCTG	CTTTTGTAAG	AAATCCTGTA	7450
TTTTGTTTAT	TGCTCCAAGA	GAGTCATACC	ATGTTTGAC	AGCCCAGGGA	7500
AATTGCCGAG	TGACCGCCAT	GCGCAGAACA	ATGCAGAATG	AGATGGTGGT	7550
GAATATTTTC	CGGAGGATGA	TTCCTTTGAT	TAGTGCATAG	GGAAGCACAG	7600
ATAAAAACAC	CACAAAGAAC	CCTGAGAAGA	AGAAGGCTGA	GCTATTGAAG	7650
TATCTCACAT	AGGCTGCCTT	CCGAGTCAGT	TTCAGTCTG	TTTGTCTTAA	7700
GTTTTCAATC	ATTTTTTCCA	TTGCTTCTTC	CCAGCAGTAT	GCCTTAACAG	7750
ATTGGATGTT	CTCGATCATT	TCTGAGGTAA	TCACAAGTCT	TTCAGTATC	7800
TTCCAGCTC	TCTGATCTCT	GTAATTCATC	ATCATTCTCC	CTAGCCAGC	7850
CTGAAAAGG	GCAAGGACTA	TCAGGAAACC	AAGTCCACAG	AAGGCAGAGG	7900

CCTGTAACAA	CTCCCAGATT	AGCCCCATGA	GGAGTGCCAC	TTGCAAAGGA	7950
GCGATCCACA	CGAAATGTGC	CAATGCAAGT	CCTTCATCAA	ATTTGTTTCAG	8000
GTTGTTGGAA	AGGAGACTAA	CAAGTTGTCC	AATACTTATT	TTATCTAGAA	8050
CACGGCTTGA	CAGCTTTAAA	GTCTTCTTAT	AAATCAAAC	AAACATAGCT	8100
ATTCTCATCT	GCATTCCAAT	GTGATGAAGG	CCAAAAATGG	CTGGGTGTAG	8150
GAGCAGTGTC	CTCACAATAA	AGAGAAGGCA	TAAGCCTATG	CCTAGATAAA	8200
TCGCGATAGA	GCGTTCCTCC	TTGTTATCCG	GGTCATAGGA	AGCTATGATT	8250
CCTCCCAGTA	AGAGAGGCTG	TACTGCTTTG	GTGACTTCCC	CTAAATATAA	8300
AAAGATTCCA	TAGAACATAA	ATCTCCAGAA	AAAACATCGC	CGAAGGGCAT	8350
TAATGAGTTT	AGGATTTTTTC	TTTGAAGCCA	GCTCTCTATC	CCATTCTCTT	8400
TCCAATTTTT	CAGATAGATT	GTCAGCAGAA	TCAACAGAAG	GGATTTGGTA	8450
TATGTCTGAC	AATTCAGGC	GCTGTCTGTA	TCCTTTCCTC	AAAATTGGTC	8500
TGGTCCAGCT	GAAAAAAGT	TTGGAGACAA	CGCTGGCCTT	TTCCAGAGGC	8550
GACCTCTGCA	TGGTCTCTCG	GCGCTGGGG	TCCCTGCTAG	GGCCGTCTGG	8600
GCTCAAGCTC	CTAATGCCAA	AGGAATTCCT	GCAGCCCGGG	GGATCCACTA	8650
GTTCTAGAGC	GGCCGCCACC	GCGGTGGCTG	ATCCCGCTCC	GGCCCGCCGC	8700
GCGCTTCGCT	TTTTATAGGG	CCGCCGCCGC	CGCCGCCTCG	CCATAAAAGG	8750
AAACTTTCGG	AGCGCGCCGC	TCTGATTGGC	TGCCGCCGCA	CCTCTCCGCC	8800
TCGCCCCGCC	CCGCCCTCG	CCCCGCCCG	CCCCGCCTGG	CGCGCGCCCC	8850
CCCCCCCCC	CCGCCCCAT	CGCTGCACAA	AATAATTAAA	AAATAAATAA	8900
ATACAAAATT	GGGGTGGGG	AGGGGGGGGA	GATGGGGAGA	GTGAAGCAGA	8950
ACGTGGCCTC	GAGTAGATGT	ACTGCCAAGT	AGGAAAGTCC	CATAAGGTCA	9000
TGTACTGGGC	ATAATGCCAG	GCGGGCCATT	TACCGTCATT	GACGTCAATA	9050
GGGGGCGTAC	TTGGCATATG	ATACACTTGA	TGTACTGCCA	AGTGGGCAGT	9100
TTACCGTAAA	TACTCCACCC	ATTGACGTCA	ATGGAAAGTC	CCTATTGGCG	9150
TTACTATGGG	AACATACGTC	ATTATTGACG	TCAATGGGCG	GGGGTCGTTG	9200

GGCGGTCAGC CAGGCGGGCC ATTTACCGTA AGTTATGTAA CGACCTGCAG	9250
GCTGATCTCC CTAGACAAAT ATTACGCGCT ATGAGTAACA CAAAATTATT	9300
CAGATTTAC TTCCTTTAT TCAGTTTTCC CGCGAAAATG GCCAAATCTT	9350
ACTCGGTTAC GCCCAAATTT ACTACAACAT CC.CCTAAA CCGCGCGAAA	9400
ATTGTCACTT CCTGTGTACA CCGGCGCACA CAAAAACGT CACTTTTGCC	9450
ACATCCGTCG CTTACATGTG TTCCGCCACA CTGCAACAT CACTTCCG	9500
CCACACTACT ACGTCACCCG CCCCCTTCCC ACGCCCCGG CCACGTCACA	9550
AACTCCACCC CCTCATTATC ATATTGGCTT CAATCCAAA TAAGGTATAT	9600
TATTGATGAT GCTAGCATGC GCAAATTTAA AGCGCTGATA TCGATCGCGC	9650
GCAGATCTGT CATGATGATC ATTGCAATTG GATCCATATA TAGGGCCCGG	9700
GTTATAATTA CCTCAGGTCG ACGTCCCATG GCCATTGAA TTCGTAATCA	9750
TGGTCATAGC TGTTTCCTGT GTGAAATTGT TATCCGCTCA CAATTCCACA	9800
CAACATACGA GCCGGAAGCA TAAAGTGTA AGCCTGGGGT GCCTAATGAG	9850
TGAGCTAACT CACATTAATT GCGTTGCGCT CACTGCCCGC TTTCCAGTCG	9900
GGAAACCTGT CGTGCCAGCT GCATTAATGA ATCGGCCAAC GCGCGGGGAG	9950
AGGCGGTTTG CGTATTGGGC GC	9972

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

TAGTAAATTT GGGC

14

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

AGTAAGATTT GGCC

14

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

AGTGAAATCT GAAT

14

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GAATAATTTT GTGT

14

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

CGTAATATTT GTCT

14

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

WANWTTTG

8

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19307 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CCAATTCCAT	CATCAATAAT	ATACCTTATT	TTGGATTGAA	GCCAATATGA	50
TAATGAGGGG	GTGGAGTTTG	TGACGTGGCG	CGGGGCGTGG	GAACGGGGCG	100
GGTGACGTAG	GTTTTAGGGC	GGAGTAACTT	GTATGTGTTG	GGAATTGTAG	150
TTTTCTTAAA	ATGGGAAGTT	ACGTAACGTG	GGAAAACGGA	AGTGACGATT	200
TGAGGAAGTT	GTGGGTTTTT	TGGCTTTCGT	TTCTGGGCGT	AGGTTCGCGT	250
GCGGTTTTCT	GGGTGTTTTT	TGTGGACTTT	AACCGTTAGG	TCATTTTTTA	300
GTCCTATATA	TACTCGCTCT	GCACTTGGCC	CTTTTTTACA	CTGTGACTGA	350
TTGAGCTGGT	GCCGTGTCGA	GTGGTGTITT	TTTAATAGGT	TTTCTTTTTT	400

ACTGGTAAGG	CTGACTGTTA	GGCTGCCGCT	GTGAAGCGCT	GTATGTTGTT	450
CTGGAGCGGG	AGGGTGCTAT	TTTGCCTAGG	CAGGAGGGTT	TTCAGGTGT	500
TTATGTGTTT	TTCTCTCCTA	TTAATTTTGT	TATACCTCCT	ATGGGGGCTG	550
TAATGTTGTC	TCTACGCCTG	CGGGTATGTA	T.CCCCCCAA	GCTTGCATGC	600
CTGCAGGTCG	ACTCTAGAGG	ATCCGAAAAA	ACCTCCCACA	CCTCCCCCTG	650
AACCTGAAAC	ATAAAATGAA	TGCAATTGTT	GTTGTAACT	TGTTTATTGC	700
AGCTTATAAT	GGTTACAAAT	AAAGCAATAG	CATCACAAAT	TTCACAAATA	750
AAGCATTTTT	TTCACTGCAT	TCTAGTTGTG	GTTTGTCCAA	ACTCATCAAT	800
GTATCTTATC	ATGTCTGGAT	CCCCGCGGCC	GCTCTAGAAC	TAGTGGATCC	850
CCCCGGGCTGC	AGGAATTCCG	TAACATAACT	GCGTGCTTTA	TTGAGATACA	900
CAGTAAAGCA	GTAATATAAT	ACAATAGTAA	GGCATATATT	TGGTGAAATC	950
TGATATGTTG	TGAAAATGCA	GTAAAACCTGA	AGTTTAAAAA	AATAATTAGT	1000
AAATGTTACA	GTGTTGGTGT	TAAAACACAA	TCTATTATGA	TACTCAAGTA	1050
AGAGTCCAGT	ACCTGGAGAC	AATGATGATA	CATGCCATGT	GATGATTATG	1100
CTTCAGTTAC	ACTGATTATG	ATTTACACTT	TAATACTTGA	TGGTTATAAA	1150
GAACATGAAA	TGATGTCCAA	ATTATGCTTA	AAATCAGCAA	TAAAGCTCTC	1200
AGTTTTTTATT	CAAATATTTT	GATAGATTCA	CTCCAGAACT	AATATCTAAA	1250
AGATAAAACG	AAAAGATTAA	AACAAAACCTA	TGCACTCTAT	CTACCCTGGA	1300
TTTTAGAATG	AAACTTAAAA	CTTCTTAGTA	GGAAAGGAAC	CCCTTGTTTT	1350
AAATCTTGGT	GAAAACAAAT	CCTTGATAA	AGAAAATGCC	CAGTGCCACA	1400
TAAAGGAGAG	AGAGAGAGAA	AAGCAAGACC	AGAACCAAAT	TTCAATTTGT	1450
TATCTTAGAG	CTTTGGGTTT	TCTTTTGGAA	ATTATAAATG	AAAAAAGGAA	1500
ACTGGTGTCC	ACACAACAGA	CAAGTGGTGA	AGTTGTGAAA	TTAGGTGTGC	1550
ACAATTACTA	GAAACACCCC	AAAACCAAAG	TGAGGTAGAA	ATAGCATGAG	1600
AAGCTGTGTT	TGATGTTAAT	TACAATTAAT	AATGGACAAA	ACCCACTCGC	1650
TAGAAGTTAA	TTACACTTGA	CGTTAGAGGT	AACAGATTTG	CAAAATGATA	1700

GGACAGTGAT	TTCTATTGAG	AGAATGCTCT	TTAAATGCTA	AGAAGAAGAA	1750
ACTGGCATGA	GAGGAGTAAA	GCTCTTCCTA	GCAGTCCTTA	GCTTTCTGTT	1800
GCACTTTTTC	TCCTGGTTCA	ATGACTTGCA	TTTGTTTAGA	CATTTTCAGCC	1850
CGTCAACTAG	ACCAGAGAGT	TTGGAGACGC	TTTGCTCTC	AAAACTTTCC	1900
AACCACTGTG	CCTTCTCACC	CACAATCCTG	TGTGGAGTTA	CTTGCAGGGA	1950
AACCAATGCA	AAGGAGACAA	ATGCAGTTCA	TGGGCTTCTG	GA CTGATATT	2000
CACCAGGGTC	ACAATGTGAT	TGGGTTACTT	TCTTAACAGT	AATCCTAAGT	2050
CTTGCAGCAT	TAAAAAAAAA	AATCATCACA	ATGAAGAAA	AAAAACCCAA	2100
AAAATCTAAA	ATCTAAAATT	CATCATCATC	ATCAACAACA	ACAACAACAA	2150
CAACAACAAA	ACCACCCACT	TCAGGTTGAG	TTTATGAAGA	GGGCAGAACA	2200
ATTTAGTTGT	AATTATAGAG	ATGTTTATAT	GTATAGTTGT	AAATATTCAT	2250
CCATTCTTTT	ACAGAGTTGT	TGCTCCCCTC	ATATAAATTG	ACTGAGGAGC	2300
CGCAACCTTT	AGCTCCTACC	ATCTTCCTCC	TACTGTCTGG	GAGTTAAAAA	2350
TGTCATCTGA	TGTTCTATTG	CAGAAACATC	ATTAAATATA	ACCCAACAGT	2400
AGGAAGTTGA	ATATATCAGC	CAACAAATTA	CTATGATAGT	AAGTCCTGTG	2450
TATTCATTCTG	CATGTTCCCT	GAAAAAATG	AATCCTCTAG	CTCTCAGTGG	2500
AAAGTTTAAA	ACTAGAAAACA	TCTGGAGCCC	TAGACAATAT	TTTAGTGTGG	2550
CGGTAGTCTC	CTGGCTTTGG	GCTCCAGGGA	AAATTCACTC	TTGCCCAAGC	2600
AGATAAGCCC	AGATGACTAG	AAGCAATTC	CATTAGGAAG	TGGCAAGAAC	2650
ATTTGAAGAA	GTAAC TTCAT	ATCTATTTAT	CTATATACCT	ATAGTATTTA	2700
TATACTTGTA	GACATATAGA	TGTATAAAAT	GAAAGCCCAT	AGCCAGCCCC	2750
ACTCAGTCAA	CAATTCTCAA	AAGAGCAATA	TGAAGCAGTC	ATTTGGTGGG	2800
GTTTCGTATGC	AAGAAAATAA	AAAAACGTCA	TGAATTCAT	ATGAATACCA	2850
CGCTAAAGTA	ATGCAAAAACA	ATGTGCTGCC	TCAGTGTGTG	TGTGTGTGTG	2900
TGTGTGTGTG	GTGGGTTTCGT	GCATGTATGT	GTGCGTGTGT	GTGTGTGTGT	2950
GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGC	GTGTGTGTTT	GTTTAGGGGT	TTTTATAAAC	3000

AACTTTTTTT	ATAAAGCAC	CTTTAGTTTA	CAATCTCTCT	TTATAACTGT	3050
TATAAATTTT	TAAACAACCC	AAAATGCGTT	CCATATAAAG	AAATGGCAAG	3100
TTATTTAGCT	ATCAAGATT	TACATGTTTT	CTTTTAACTT	TTTTGTACAA	3150
TTGCATAGAC	GTGTAAAACC	TGCCATTGTT	AAJAAAACAA	TAACAGACTT	3200
AGAAACTACT	GAAATCTACA	GTATAGTACC	ACTACCCTTC	ACAAAAATAT	3250
AGATTTTATT	TCTTGTAAC	TCTTACTGTC	TAATCCTCTT	TGTTGTACGA	3300
ATATTATAAA	AACCATGCGG	GAATCAGGAG	TTGTAAAACA	TTTATTCTGC	3350
TCCTTCTTCA	TCTGTCATGA	CTGAAACTAA	GGACTCCATC	GCTCTGCCCA	3400
AATCATCTGC	CATGTGGAAA	AGGCTTCCTA	CATTGTGTCC	TCTCTCATTG	3450
GCTTTCCGGG	GGCATTCTT	CCTCTTGAAC	TAGGGAAGGA	GTTGTTGAGT	3500
TGCTCCATCA	CTTCTTCTAA	CCCTGTGCTT	GTGTCCFGGG	GAGGACTCAG	3550
AAGATCTTCC	TCACCCATAG	ATTCTGAAGT	TTGACTGCCA	ACCACTCGGA	3600
GCAGCATAGG	CTGACTGCTA	TCTGACCTCT	GCAGAGAGGT	GGAAGGAGAG	3650
GACACCGTGG	TGCCATTAC	CTTAGCTTCA	GCCTGGGGCT	GCTCCAGGAG	3700
CTGTCTCAGT	CTATGTAAC	GAGACTCCAG	CTGTTTATTG	TGGTCTTCCA	3750
GGATTTGCAT	CCTGGCTTCC	AGGCGTCCTT	TGTGTTGGCG	CAGTAGCTTA	3800
GCCTCAGCAA	TGAGCTCAGC	ATCCCTGGGA	CTCTGAGGAG	AGGTGGGCAT	3850
CATCTCAGGA	GGAGATGGCA	GTGGAGACAG	GCCTTTATGC	TCATGCTGCT	3900
GCTTCAGGCG	ATCATATTCT	GCTTGCAGAT	TCTGTTTTTC	TTCCTCAAGA	3950
TCTGCTAGGA	TTCTCTCTAG	CTCCCCCTCT	TCCCTACTCT	CTAAGGAAAT	4000
CAAGATCTGG	GCAGGACTAC	GAGGCTGGCT	CAGGGGGGAG	TCCTGGTTCA	4050
AACTTTGGCA	GTAATGCTGG	ATTAACAAAT	GTTCATCATC	TATGCTCTCA	4100
TTAGGAGAGA	TGCTATCATT	TAGATAAGAT	CCATTGCTGT	TTTCCATTTC	4150
TGCTAGCCTG	CTAGCATAAT	GTTCAATGCG	TGAATGAGTA	TCATCGTGTG	4200
AAAGCTGGGG	GGACGAGGCA	GGCGCAGAAT	CTACTGGCCA	GAAGTTGATC	4250
AGAGTAACGG	GAGTTTCCAT	GTTGTCCCCC	TCTAACACAG	TCTGCACFGG	4300

CAGGTAGCCC	ATTCGGGGAT	GCTTCGCAA	ATACCTTTTG	GTTGAAAT	4350
TGTTTTTTAG	TACCTTGGCG	AAGTCGCGAA	CATCTTCTCC	GGATGTAGTC	4400
GGAGTGCAAT	ACTCTACCAT	GGGTAGTGC	ATTTTATGGC	CCTTTGCAAC	4450
TCGGCCAGAA	AAAAAGCAAC	TTTGGCAGAT	GTATAATTA	AAATGCTTTA	4500
GGCTTCTGTA	CCTGAATCCA	ATGATTGGAC	ACTCCTTACA	GATGTTACAC	4550
TTGGCTTGAT	GCTTGGCAGT	TTCAGCAGCA	GCCACTCTGT	GCAAGACGGG	4600
CAGCCACACC	ATAGACTGGG	GTTCCAGGCG	CATCCAGTCA	AGGAAGAGAG	4650
CAGCTTCAAT	CTCAGGTTTA	TTATTGGCAA	ATTGGAAGCA	GCTCCTGACA	4700
CTCGGCTCAA	TGTTACTGCC	CCCAAAGGAA	GCAACTTCAC	CCAAGTGTCT	4750
TGGGATTTGA	ATAGAATCAT	GCAGAAGAAG	ACCCAGCCTA	CGCTGGTCAC	4800
AAAAGCCAGT	TGAACTTGCC	ACTTGCTTGA	AAAGGTATCT	GTACTTGTCT	4850
TCCAAGTGTG	CTTTACACAG	AGAAATGATG	CCAGTTTTAA	AAGACAGGAC	4900
ACGGATCCTC	CCTGTTGCTC	CCGTATCATA	AACATTGAGA	AGCCAGTTGA	4950
GACACATATC	CACACAGAGA	GGGACATTGA	CCAGATTGTT	GTGCTCTTGC	5000
TCCAGACGAT	CATAAATTGT	AGTCAAACAG	TTAATTATCT	GCAGGATATC	5050
CATGGGCTGG	TCATTTTGCT	TGAGGTTGTG	CTGGTCCAGG	GCATCACATG	5100
CAGCTGACAG	GCTCAAGAGA	TCCAAGCAA	GGGCCTTCTG	GAGCCTTCTG	5150
AGCTTCATGG	CAGTCCTATA	CGCGGAGAAC	CTGACATTAT	TCAGGTCAGC	5200
TAAAGACTGG	TAGAGCTCTG	TCATTTTGGG	GTGGTCCCAA	CAAGTGGTTT	5250
GGGTCTCGTG	GTGATATAG	TAGGGCACTT	TGTTTGGTGA	GATGGCTCTC	5300
TCCCAGGGAC	CCTGAACTGA	AGTGGAAGG	AAGTGCTGGG	ATGCAGGACC	5350
AAAGTCCCTG	TGGGCTTCAT	GCAGCTGTCT	GACACGGTCC	TCCACAGCCA	5400
CCTGTAGAAG	CCTCCATCTG	GTATTCAGAT	CTTCAAAGT	GCTGAGGTTA	5450
TAAGGTGAGA	GCTGAATGCC	CAGTGTGGTC	AGCTGATGTG	CAAGGTCATT	5500
GACACGATTG	ACATTCTCTT	TAAGAGGTGC	AATTTCTCCC	CGAAGTGCCT	5550
TGACTTTTTC	AAGGTGATCT	TGCAGAGAGT	CAATGAGGAG	ATCCCCCACT	5600

GGCTGCCAGG	ATCCCTTGAT	CACCTCAGCT	TGGCGCAACT	TGAGGTCCAG	5650
TTCATCGGCA	GCTTCCTGAA	GTTCCCTGGAG	TCTTTCAAGA	GCTTCATCTA	5700
TTTTTCTCTG	CCAATCAGCT	GAGCGCAGGT	TCAATTTGTC	CCATTCAGCG	5750
TTGACCTCTT	CAGCCTGCTT	TCGTAGGAGC	CLAGTGACAT	TCTGAGCTCT	5800
TTCTTCAGGA	GGCAGTTCTC	TGGGCTCCTG	GTAGAGTTTC	TCTAGTCCTT	5850
CCAAAGGCTG	CTCTGTCAGA	AATATTCTCA	CAGTCTCCAG	AGTACTCATG	5900
ATTACAGGTT	CTTTAGTTTT	CAATTC CCTC	TTGAAGGCCC	TATGTATATC	5950
ATTCTGCTTC	TGAACTGCTG	GGAAATCACC	ACCGATGGGT	GCCTGACGGC	6000
TCAGTTCATC	ATCTTTCAGC	TGTAGCCAAA	CAAGAAGTTC	CTGAAGAGAA	6050
AGATGCAAAC	GCTTCCACTG	GTCAGAACTT	GCTTCCAAAT	GGGACCTAAT	6100
GTTGAGAGAC	TTTTTCTGAA	GTTCACTCCA	CTTGAAATTC	ATGTTATCCA	6150
AACGTCTTTG	TAACAGGGGT	GCTTCATCCG	AACCTTCCAG	GGATCTCAGG	6200
ATTTTTTGGC	CATTTTCATC	AAGATTGTGA	TAGATATCTG	TGTGAGTTTC	6250
AATTTCTCCT	TGGAGATCTT	GCCATGGTTT	CATCAGCTCT	CTGACTCCCC	6300
TGGAGTCTTC	TAGGAGCTTC	TCCTTACGGG	AAGCGTCCTG	TAGGACATTG	6350
GCAGTTGTTT	CTGCTTCCGT	AATCCAGGAA	AGAACTTCT	CCAGGTCCAG	6400
AGGGA ACTGC	TGCAGTAATC	TATGAGTTTC	TTCCAAAGCA	GCCTCTTGCT	6450
CACCTACTCT	TTTATGAATG	TTTCCCCAAG	AAGTATTGAT	ATTCTCTGTT	6500
ATCATGTGTA	CTTTTCTGGT	ATCATCAGCA	GAATAGTCCC	GAAGAAGTTT	6550
CAGTGCCAAA	TCATTTGCCA	CGTCTACACT	TATCTGCCGT	TGACGGAGGT	6600
CTTTGGCCAA	CTGCTTGGTT	TCTGTGATCT	TCTTTTGGAT	TGCATCTACT	6650
GTGTGAGGAC	CTTCTTTCCA	TGAGTCAAGC	TTGCCTCTGA	CCTGTCCTAT	6700
GACCTGTTTCG	GCTTCTTCCT	TAGCTTCCAG	CCATTGTGTT	GAATCCTTTA	6750
ACATTTCATT	CAACTGTTGT	CTCCTGTTCT	GCAGCTGTTT	TTGAACCTCA	6800
TCCC ACTGAA	TCTGAATTCT	TTCAATTCGA	TCAGTAATGA	TTGTTCTAGC	6850
TTCTTGATTG	CTGGTTTGT	TTTTCAAATT	CTGGGCAGCA	GTAATGAGTT	6900

CTTCCAATTG	GGGGCGTCTC	TGTTCCAAAT	CTTGCAAGTGT	TGCCTTCTGT	6950
TTGATGATCA	TTTCATTGAT	GTCTTCCAGA	TCACCCACCA	TCACTCTCTG	7000
TGATTTTATA	ACTCGATCAA	GCAGAGACAG	CCAGTCTGTA	AGTTCTGTCC	7050
AAGCTCGGTT	GAAGTCTGCC	AGTGCAGGTA	CC.CCAACAG	CAAAGAAGAT	7100
GGCATTCTTA	GTTTGGAGAT	GACAGTTTCC	TTAGTAACCA	CAGATTGTGT	7150
CACTAGAGTA	ACAGTCTGAC	TGGCAGAGGC	TCCAGTAGTG	CTCAGTCCAG	7200
GGGCACGGTC	AGGCTGCTTT	GTCCTCAGCT	CCCGAAGTAA	ATGGTTTACA	7250
GCCTCCCACT	CAGACCTCAG	ATCTTCTAAC	TTCCTCTTCA	CTGGCTGAGT	7300
GCTTGGTTTT	TCCTTATACA	AATGCTGCCC	TTTCGACAAA	AGCCTTTCCA	7350
CATCCGCTTG	TTTACCGTGA	ACTGTTACTT	CAATCTCCTT	TATGTCAAAC	7400
GGTCCTGCCT	GACTTGGTTG	GTTATAAATT	TCCAACGGT	TTCTAATAGG	7450
AGAGACCCAC	AGAAGCAGGT	GATCCAGCTG	CTCTTCAAGC	TGCCTAAAAT	7500
CTTTTAAGTG	AACCTCAAGC	TCTCCTTGTT	TCTCAGGTAA	AGCTCTGGAG	7550
ACCTTIATCC	ACTGGAGATT	TGTCGTGTTG	AGCTTCTTTT	CAAGTTTATC	7600
TTGCTCTTCT	GGCCTTATGG	GAGCACTTAC	AAGTACTGCT	CCTCCTGTTT	7650
CATTTAATTG	TTTTAGAATT	CCCTGGCGCA	GGGGCAACTC	TTCTGCCAGT	7700
AACTTGACTT	GTTCAAGTTG	TTCTTTTAGC	TGCTGCTCAT	CTCCAAGTGG	7750
AGTAATAGCA	ATGTTATCTG	CTTCTTCCAG	CCACAAAACA	AATTCATTTA	7800
AATCTCTTTG	AAATTCTGAC	AAGACATTCT	TTTGTTCCTC	AATCCTCTTT	7850
CTCCTTTCTG	CCAGCTCTTT	GCAGATGTCG	TGCCACCGCA	GACTCAAGCT	7900
TCCTAATTTT	TCTTGTAGAA	TATTGACATC	TGTTTTTGAA	GACTGTTGAA	7950
TTATTTCTTC	CCCAGTTGCA	TTCAAGTCTC	TGACAACAGC	TTGACGCTGC	8000
CCAATGCCAT	CCTGGAGTTC	CPTAAGATAC	CATTTGTATT	TAGCATGTTT	8050
CCAGTTTTCA	GGATTTTGTG	TCTTTTTGAA	AAACTGTTC	ACTTCATTCA	8100
GCCATTGATT	AAATACCTTC	ATATCATAAT	GAAAGTGTTC	CCATTTTTCA	8150
ACTGATCTGT	CGAATCGCCC	TTGTCGTTCC	TTGTACATTC	TATGAAGTTT	8200

TTCCCCCTGG	AAATCCATCT	GTGCCACGGC	TTCCTGTACT	TTCACCTTTT	8250
CCATGGAGGT	GGCACTTTGC	AAGGCTGCTG	TCTTCTTCTT	GTGAATAATA	8300
TCAATCCGAC	CTGAGATTTG	TTGCAAATFG	TCTTTTATAT	TCTTAAGAGA	8350
CTCCTCTTGC	TTAAAAAGAT	CTTCAAAATC	T TAGCACAG	AGTTCAGGAG	8400
TATTTAGAAG	ATGATCAACT	TCTGAAAGAG	CTTGTAAGAT	ATGACTGATC	8450
TCGGTCAAAT	AAGTAGAAGG	CACATAAGAA	ACATCCAAAG	GCATATCTTC	8500
AGTCGCTACT	ACCATAGTTT	CTTCATGGAG	AGTGTGAATT	TGTGCAAAGT	8550
TGAGTCTTCG	AAACTGAGCA	AAATFGCTCT	CAATTTGCCG	CCAGCGCTTG	8600
CTGAGCTGGA	TCTGAGTTGG	CTCCACTGCC	ATPGCGGCC	CATTCTCAGA	8650
CAAGCCCTCA	GCTTGCCCTGC	GCACTGCATT	CAGCTCCTCT	TTCTTCTTCT	8700
GCAATTCACG	ATCAATTTCC	TTTAATTTTC	TTTCATCTCT	GGGTTCAGGT	8750
AGGCTGGCTA	ATTTTTTTTC	AATTCATCC	AAGCATTTC	GGAGATCATC	8800
AGCCTGCCTC	TTGTAAGTAT	ACCACTGGTG	AGAAATTTCT	AGGGCCTTTT	8850
TTCTTCTTTG	AGACCTCAA	TCCITGAGAG	CATTATGTTT	TGTCTGTAAC	8900
AGCTGCTGTT	TTATCTTTAT	TTCCCTCTCGC	TTCTCTCAT	CTGTGATTCT	8950
TTGTTGTAAG	TTGTCTCCTC	TTTGCAACAA	TTCAATTTACA	GTACCCTCAT	9000
TGTCTTCACT	CATATCTTTA	TTGAAGTCTT	CCTCTTTCAG	ATTCACCCCC	9050
TGCTGAATTT	CAGCCTCCAG	TGGTTCAAGC	AATTTTTGTA	TATCTGAGTT	9100
AAACTGCTCC	AATTCCTTCA	AAGGAATGGA	GGCCTTTCCA	GTCTTAATTC	9150
TGTGAGAAAT	AGCTGCAAAT	CGACGGTTGA	GCTCAGAGAT	TTGGGGCTCT	9200
ACTACTTTCC	TGCAGTGGTC	ACCGCGGTTT	GCCATCAATT	TTGCTGCTTG	9250
GTCACGTGTG	GAGTCCACCT	TTGGGCGCAT	GTCATTCATT	TCAGCCTTTA	9300
AACGCTTAAG	AATGTCTTCC	TTTTGTTGTG	GTTTCTTCTT	TTCAGACTCA	9350
TCTAAAAGTT	CATCTGCATG	AATGATCCAC	TTTGTGATTT	GTTCTATGTT	9400
CTGATCAAAG	GTTTCCATGT	GTTTCTGGTA	TTCCAACAAA	AGATTTAGCC	9450
ATTCTTCTAC	TCTGGAGGTG	ACAGCTATCC	AGTTACTGTT	CAGAAGACTC	9500

AGTTTATCTT	CTACCAAGGT	TTCTTTCTTG	CCCAACACCA	TTTTCAAAGA	9550
CTCTCCTAAT	TCTGTAACAC	TCTTCAAGTG	AGCCTTCTGT	TTCTCAATCT	9600
CTTTTTGAGT	AGCCTTTCCC	CAGGCAACTT	CAGAATCCAA	ATTACTTGGC	9650
ATTCCTTCAA	CTGCTGATCT	CTTCGTCAAT	TCATCTCTG	TTGCTGCCAG	9700
CCATTCTGTT	AAGACATTCA	TTTCCTTTCT	CATCTTACGG	GACAACTTCA	9750
AGCATTTCTC	CAACTGTTGC	TTTCTCTCTG	TTACCTTCGC	ACCCAACTCA	9800
TTGTAATGCA	ATTTCAAAGC	TGTTACTCGT	TCATCAAGCT	CTTTGGGATT	9850
TTCTGTCTGC	TTTTTCTGTA	CAATTTGACG	TCCGGTTTTA	ATCACCATTT	9900
CCACTTCAGA	CTTGACTTCA	CTCAGGCTTT	TATACAAGTT	CACACAATGA	9950
CTTAGTTGTG	ACTGAATTAC	TTCCGTTC	ACACTCTTGG	TTTCCAATGC	10000
AGGCAAATGC	ATCTTGACTT	CATCTAAAAT	CATCTTACTT	TCCTCTAGAC	10050
GTTGTTCAAA	ATTGGCTGGT	TTTTGGAATA	ATCGAAATTT	CATGGAGACA	10100
TCTTGTAATT	TTTTTCTGTG	AACATCAATT	TGTGAAAGAA	CCCTTTGGTT	10150
GGCATCCTTC	CCCTGGTTAT	GTTTCTTCAT	TTCTTCTAAA	CTTATCTCAT	10200
GACTTGTC	ATCTGATTGG	ATTTTCTGGG	CTTCCTGAGG	CATTTGAGCT	10250
GCATCCACCT	TGTCAGTGAT	ATAAGCTGCC	AACTGCTTGT	CAATGAATTC	10300
AAGCGACTCC	TGAATTAAGT	GCAAGGACTT	TTCAATTTCC	TGGGCAGACT	10350
GGATACTCTG	TTCAAGCAAC	TTTTGTTTCC	TCACAGCCTC	TTCATGTAGT	10400
TCCCTCCAAC	GAGAATTAAA	CGTCTCAAGC	TCCTCATTGA	TCAGTTCATC	10450
CATGACTCCT	CCATCTGTAA	GAGTCTGTGC	CAATAGACGA	ATCTGATTTG	10500
GGTTCTCCTC	TGAATGATGC	ATCAGATTTT	CAAGAGATTC	TAGCACTTCA	10550
GTGATTTCCT	CAGGTCTGTC	AGGAACATTT	TCCATGGTTT	TAAGTTTCAA	10600
TTCTACTTCA	TTGAGCCACT	TGTTTGCTTT	CTCTAAATAT	GACAATAACT	10650
CATGCCAACA	TGCCCAAAC	TCTTCCAAG	TTTTGCATTT	TCCATTCAGC	10700
CTGGTGACA	GCCATTGGTA	GTTGGTGTC	AGAGTTTCAA	GTTCCTTTTT	10750
TAAGGCCTCT	TGTGCTGAGG	GTGGAGCGTG	AGCTATTACA	CTATTTACAG	10800

TCTCAGTAAG GAGTTTCACT TTAGTTTCTT TTTGTAGTGC CTCTTCTTTA 10850
GCTCTCTTCA TTTCTTCAAC AGCAGTCTGT AATTCATCTG GAGTTTTATA 10900
TTCAAAATCT CTCTCTAGAT ATTCTTCTTC AGCTTGTGTC ATCCACTCAT 10950
GCATCTCTGA TAGATCTTTT TGGAGGCTTA CGJTTTTATC CAAACCTGCC 11000
TTTAAGGCTT CCTTTCTGGT GTAGACCTGG CGGCATATGT GATCCCACTG 11050
AGTGTTAAGC TCTCTAAGTT CTGTCTCCAG TCTGGATGCA AACTCAAGTT 11100
CAGCTTCACT CTTTATCTTC TGCCACCTT CATTAACACT ATTTAAACTG 11150
GGCTGAATTG TTTGAATATC ACCAACTAAA AGTCTGCATT GTTTGAGCTG 11200
TTTTTTCAGG ATTTCAGCAT CCCCCAGGGC AGGCCATTCC TCTTTCAGGA 11250
AAACATCAAC TTCAGCCATC CATTTCTGTA AGGTTTTTAT GTGATTCTGA 11300
AATTTTCGAA GTTTATTCAT ATGTTCTTCT AGCTTTTGGC AGCTTTCCAC 11350
CAACTGGGAG GAAAGTTTCT TCCAGTGCCC CTCAATCTCT TCAAATTCTG 11400
ACAGATATTT CTGGCATATT TCTGAAGGTG CTTTCTTGGC CATCTCCTTC 11450
ACAGTGTAC TCAGATAGTT GAAGCCATTT TGTGCTCTT TCAAAGAACT 11500
TTGCAGAGCC TGTAATTTCC CGAGTCTCTC CTCCATTATT TCATATTCAG 11550
TAACACTAAG ATAAGGTACA GAGAGTTTGC TTTCTGACTG CTGGATCCAC 11600
GTCCTGATGC TACTCATTGT CTCCGATAG CGCATTGGTG GTAAAGTGTC 11650
AAAAATTGTC TGTAGCTCTT TCTCTTTGGC CCTCACACCA TCAAAGATGT 11700
GGTTAAAATG ATTAGTAAAG GCCACAAAGT CTGCATCCAG AAACATTGGC 11750
CCCTGTCCCT TTTCTTTCAG TTGTAGACTC TGAATTTTTA ATTGCTCAAT 11800
TTGAGGCTGA AGAGCTGACA ATCTGTTGAC TTCATCCTTA CAAATTTTTA 11850
ACTGGCTTTT AATTGCTGTT GGCTCTGATA GGGTGGTAGA CTGGGTTTTT 11900
AACAAATTTT CGGCAGTAGT TGTCATCTGT TCCAATTGTT GTAGCTGATT 11950
ATAAAAGGTA ATGATGTTGG TTTGATACTC TAGCCAGTTA ACTCTCTCAC 12000
TCAGCAATTG GCAGAATTCT GTCCACCGGC TGTTCAAGTT TTCTGAAGCT 12050
TGTCTGATAC TTTCAGCATT AACACCCTCA TTTGCCATCT GTTCCACCAG 12100

GGCCTGAGCT GATCTGCTGG CATCTGCGAG TTTTCTGAAC TTCTCTGCTT 12150
TTTCTCGTGC TATGGCATTG ACTTTTTCTT GCAAGTCTGA GATGTTGCCT 12200
TCTTTTCGAT AGACTGCAAA TTCAGAATC TGTAATACAG CTTCTGAACG 12250
AGTAATCCAA CTGTGAAGTT CAGTTATATC GALATCCAAC CTTTTCTGA 12300
GTTCAGAATC CACAGTTATC TGCCTCTTCT TTTGAGGAGG TGGTGGTGG 12350
AGTTCCTCTT GGGCATGTTT TACCATGATT TGTTCCCTTG TGGTCACCAT 12400
AGTTACCGTT TCCATTACAG TTGTCTGTGT TAGGGATGGT TGAGTGGTGG 12450
TGACAGCCTG TGAAATTTGT GCTGAACTCT TTTCAAGTTT TTGGGTAAA 12500
TTGTCCCAAC GTTGTGCAAA GTTTTCCATC CAGATTTCCA TCTTTTGAGT 12550
CACTGACTTA TTTTTCAGTG CCGAAAAGTAG ATCTTGATTG AGTGAACCTA 12600
GTTTTTCCAT GGTGGCTTT TTTCTTTCTA GATCTATTTT TAAAGTAGAT 12650
ATTTTGTGAA GACTTGACAT CATTTCATTT TGATCTTAA AGCCACTTGT 12700
CTGAATGTTT TTCATTGCAT CTTCTTTTTT TGAAAGCCAT GTACTAAAA 12750
GGCACTGTTT TTCAGTAAAA TGCTGCCATT TTAGAAGAAT ATCTTGATA 12800
ACAATCCAGC GGTCTTCAGT CCATCTGCAG ATATTTGCC ATCGATCTCC 12850
CAGTACCTTA AGTTGTTCTT CCAAAGCAGC TGTTGCATGA TCACCGCTGG 12900
ATTCATCAAC CACTACTACC ATGTGAGTGA GCGAGTTGAC CCTGACCTGC 12950
TCCTGTTCTA GATCTTCTTG AAGCACCTTA TGTTGTTGTA CTTGGCATTT 13000
TAGATCTTCA AGATCAGGTC CAAAGGGCTC TTCTCCATT TTCTTAGTTC 13050
TCTCTTCAGT TTTTGTTAAC CAGTCATCTA GTTCTTTTAA TTTCTGATTC 13100
TGGAGATCCA TTAGAACTTT GTGTAATTTG CTTTGTTTTT CCATGCTAGC 13150
TACCCTGAGA CATTCCCATC TTGAATTTAG GAGATTCATT TGTTCTTGCA 13200
CTTCAGCTTC TTCATCTTCT GATAATTTCC CTTTTCCAAC TAGTTGACTT 13250
CCTAACTGTA GAACATTACC AACAAGTCCT TGATGAGATG TCAGATCCAT 13300
CATGAATCCC TCATGAGCAT GAAACTGTTT TTTCACTTCT TCAACATCAT 13350
TTGAAATCTC TCCTTGTGCT CGCAATGTAT CCTCGGCAGA AAGAAGCCAT 13400

GAAAGTACTT CTTCTAAAGC AGTTTGGTAA CTATCCAGAT TTACTIONCCGT 13450
 CTCCATCAAT GAACTGTCAA GTGACTTGTG TCTGGGAGCT TCCAAATGCT 13500
 GTGAAGGATA GGGGCTCTGT GTGGAATCAG AGGTGGCAAC ATAAGCAGCC 13550
 TGTGTGAAGG CATAACTCTT GAATCGAGGC TTAGGAGATG AAGAAGTTTG 13600
 TTCATAGCCC TGTGCTAGAC TGACTIONGTGAT CTGTTGAGAG TAATGCATCT 13650
 GGTGATGTAA TTGAAAATGT TCTTCTCTAG TTACTIONTTTGA AGATGTCCTG 13700
 GGCAACATTT CCACTIONTCTTG AATGGCTTCA ATGCTCACTIONT GTTGTGGCAA 13750
 AACTTGAAG AGTGATGTGA TGTACATTAA GATGGACTIONT TGTCTGGAT 13800
 AAGTGGTAGC AACACTIONTCA GGATCAAGAA GTTTTTCTAT GCCTACTIONTGG 13850
 CTTTTTGCAA TGTGGAAGGC ATGTTCCAGT CTTTTGGGTGG CTGAGTGTCTG 13900
 TGAAACCACA CTATTCCAAT CAAACAGGTC GGGCCTGTGA CTATGGATAA 13950
 GAGCACTIONTCAA AGCCAACCCG TCGGACCAGC TAGAGGTGAA GTTGTGACG 14000
 TTAACCTGTG GATAATTACG TGTGACTIONT CGAACCCAGC TCAGAAGAAT 14050
 CTTTTCACTIONT TTGGTTTTGCT GCAATCCAGC CATGATAGTT TTCATCACAT 14100
 TTTTGACCTG CCAGTGGAGG ATTATATTCC AAATCAAACC AAGAGTGAAT 14150
 TTATGATTTC CATCACTIONTAT GTCAGTGTCT CCTATATTCA CTAAATCAAC 14200
 ATTATTTTTTC TGTAAGACCC GCAGTGCCTT GTTGACTIONT TTCAGGGCAT 14250
 GAACTIONTCTGT AGATCCCTTT TCTTTTTGGCA GTTTTTGCCC TGTAAGGCCT 14300
 TCCAAGAGGT CTAGGAGGCG TTTTCCATCC TGCAGGTCAC TGAAGAGGTT 14350
 GTCTATGTGT TGCTTTCCAA ACTIONTAGAAA TTGTGCATT ATCCATTTTG 14400
 TGAATGTTTT CTTTTGAACA TCTTCTCTT CATAACAGTC CTCACTIONTCT 14450
 TCCCACCAA GCATTTGGAA GAAAAAGTAT ATATCAAGC AGGGATAAAA 14500
 ATCTTGGTAA AAGTTTCTCC CAGTTTTATT GCTCCAGGAG GCTTAGGTAC 14550
 GATGAGAAGC CAATAACTIONT CAGCAGCCTT GACAAAAAAA AAAAAAAAAA 14600
 TAGCACTIONTCA AGTCTTCCTA TTCGTTTTTT CTATAAAGCT ATTGCCTTCA 14650
 AGAGCGGAAT TCCTGCAGCC CGGGGGATCC ACTIONTCTA GAGCGGCCGC 14700

GGGTACAATT	CCGCAGCTTT	TAGAGCAGAA	GTAACACTTC	CGTACAGGCC	14750
TAGAAGTAAA	GGCAACATCC	ACTGAGGAGC	AGTTCTTTGA	TTTGCACCAC	14800
CACCGGATCC	GGGACCTGAA	ATAAAAGACA	AAAAGACTAA	ACTTACCAGT	14850
TAACFTTCTG	GTTTTTCAGT	TCCTCGAGTA	CCGJATCCTC	TAGAGTCCGG	14900
AGGCTGGATC	GGTCCCAGTG	TCTTCTATGG	AGGTCAAAAC	AGCGTGGATG	14950
GCGTCTCCAG	GCGATCTGAC	GGTTCACTAA	ACGAGCTCTG	CTTATATAGA	15000
CCTCCCACCG	TACACGCCTA	CCGCCCATTT	GCGTCAATGG	GGCGGAGTTG	15050
TTACGACATT	TTGGAAAGTC	CCGTTGATTT	TGGTGCCAAA	ACAAACTCCC	15100
ATTGACGTCA	ATGGGGTGGG	GACTTGGAAA	TCCCCGTGAG	TCAAACCGCT	15150
ATCCACGCCC	ATTGATGTAC	TGCCAAAACC	GCATCACCAT	GGTAATAGCG	15200
ATGACTAATA	CGTAGATGTA	CTGCCAAGTA	GGAAAGTCCC	ATAAGGTCAT	15250
GTACTGGGCA	TAATGCCAGG	CGGGCCATTT	ACCGTCATTG	ACGTCAATAG	15300
GGGGCGTACT	TGGCATATGA	TACACTTGAT	GTACTGCCAA	GTGGGCAGTT	15350
TACCGTAAAT	ACTCCACCCA	TTGACGTCAA	TGGAAAGTCC	CTATTGGCGT	15400
TACTATGGGA	ACATACGTCA	TTATTGACGT	CAATGGGCGG	GGGTTCGTTGG	15450
GCGGTCAGCC	AGGCGGGCCA	TTTACCGTAA	GTTATGTAAC	GACCTGCAGG	15500
TCGACTCTAG	AGGATCTCCC	TAGACAAATA	TTACGCGCTA	TGAGTAACAC	15550
AAAATTATTC	AGATTTCACT	TCCTCTTATT	CAGTTTTCCC	GCGAAAATGG	15600
CCAAATCTTA	CTCGGTACG	CCCAAATTTA	CTACAACATC	CGCCTAAAAC	15650
CGCGCGAAAA	TTGTCACTTC	CTGTGTACAC	CGGCGCACAC	CAAAAACGTC	15700
ACTTTTGCCA	CATCCGTCGC	TTACATGTGT	TCCGCCACAC	TTGCAACATC	15750
ACACTTCCGC	CACACTACTA	CGTCACCCGC	CCCGTTCCCA	CGCCCCGEGC	15800
CACGTCACAA	ACTCCACCCC	CTCATTATCA	TATTGGCTTC	AATCCAAAAT	15850
AAGGTATATT	ATTGATGATG	CTAGCGGGGC	CCTATATATG	GATCCAATFG	15900
CAATGATCAT	CATGACAGAT	CTGCGCGCGA	TCGATATCAG	CGCTTTAAAT	15950
TTGCGCATGC	TAGCTATAGT	TCTAGAGGTA	CCGGTTGTTA	ACGTTAGCCG	16000

GCTACGTATA CTCCGGAATA TTAATAGGCC TAGGATGCAT ATGGCGGCCG 16050
GCCGCCTGCA GCTGGCGCCA TCGATACGCG TACGTGCGGA CCGCGGACAT 16100
GTACAGAGCT CGAGAAGTAC TAGTGGCCAC GTGGGCCGTG CACCTTAAGC 16150
TTGGCACTGG CCGTCGTTTT ACAACGTCGT GALTGGGAAA ACCCTGGCGT 16200
TACCCAACCTT AATCGCCTTG CAGCACATCC CCCTTTCGCC AGCTGGCGTA 16250
ATAGCGAAGA GGCCCGCACC GATCGCCCTT CCCAACAGTT GCGCAGCCTG 16300
AATGGCGAAT GCGCGCTGAT GCGGTATTTT CTCCTTACGC ATCTGTGCGG 16350
TATTTACACAC CGCATACTGC AAAGCAACCA TAGTACGCGC CCTGTAGCGG 16400
CGCATTAAAGC GCGGCGGGTG TGGTGGTTAC GCGCAGCGTG ACCGCTACAC 16450
TTGCCAGCGC CCTAGCGCCC GCTCCTTTCG CTTTCTTCCC TTCCTTTCTC 16500
GCCACGTTTCG CCGGCTTTCC CCGTCAAGCT CTAAATCGGG GGCTCCCTTT 16550
AGGGTTCCGA TTTAGTGCTT TACGGCACCT CGACCCCAA AACTTGATT 16600
TGGGTGATGG TTCACGTAGT GGGCCATCGC CCTGATAGAC GGTTTTTTCGC 16650
CCTTTGACGT TGGAGTCCAC GTTCTTTAAT AGTGGACTCT GTTCCAAAC 16700
TGGAACAACA CTCAACCCTA TCTCGGGCTA TTCTTTTGAT TTATAAGGGA 16750
TTTTGCCGAT TTCGGCCTAT TGGTTAAAAA ATGAGCTGAT TTAACAAAA 16800
TTTAACGCGA ATTTTAACAA AATATTAACG TTTACAATTT TATGGTGCAC 16850
TCTCAGTACA ATCTGCTCTG ATGCCGCATA GTTAAGCCAG CCCCACACC 16900
CGCCAACACC CGCTGACGCG CCCTGACGGG CTTGTCTGCT CCCGGCATCC 16950
GCTTACAGAC AAGCTGTGAC CGTCTCCGGG AGCTGCATGT GTCAGAGGTT 17000
TTCACCGTCA TCACCGAAAC GCGCGAGACG AAAGGGCCTC GTGATACGCC 17050
TATTTTTATA GGTAAATGTC ATGATAATAA TGGTTTCTTA GACGTCAGGT 17100
GGCACTTTTC GGGGAAATGT GCGCGGAACC CCTATTTGTT TATTTTTCTA 17150
AATACATTCA AATATGTATC CGCTCATGAG ACAATAACCC TGATAAATGC 17200
TTCAATAATA TTGAAAAAGG AAGAGTATGA GTATTCAACA TTTCCGTGTC 17250
GCCCTTATTC CCTTTTTTGC GGCATTTTGC CTTCTGTTT TTGCTCAGCC 17300

AGAAACGCTG GTGAAAGTAA AAGATGCTGA AGATCAGTTG GGTGCACGAG 17350
TGGGTTACAT CGAACTGGAT CTCAACAGCG GTAAGATCCT TGAGAGTTTT 17400
CGCCCCGAAG AACGTTTTCC AATGATGAGC ACTTTTAAAG TTCTGCTATG 17450
TGGCGCGGTA TTATCCCGTA TTGACGCCGG GCALGAGCAA CTCGGTCGCC 17500
GCATACACTA TTCTCAGAAT GACTTGGTTG AGTACTCACC AGTCACAGAA 17550
AAGCATCTTA CGGATGGCAT GACAGTAAGA GAATTATGCA GTGCTGCCAT 17600
AACCATGAGT GATAAACTG CGGCCAACTT ACTTCTGACA ACGATCGGAG 17650
GACCGAAGGA GCTAACCGCT TTTTTCGACA ACATGGGGGA TCATGTA ACT 17700
CGCCTTGATC GTTGGGAACC GGAGCTGAAT GAAGCCATAC CAAACGACGA 17750
GCGTGACACC ACGATGCCTG TAGCAATGGC AACACGTTG CGCAA ACTAT 17800
TAACTGGCGA ACTACTTACT CTAGCTTCCC GGCAACAATT AATAGACTGG 17850
ATGGAGGCGG ATAAAGTTGC AGGACCACTT CTGCGCTCGG CCCTTCCGGC 17900
TGGCTGGTTT ATTGCTGATA AATCTGGAGC CGGTGAGCGT GGGTCTCGCG 17950
GTATCATTCG AGCACTGGGG CCAGATGGTA AGCCCTCCCG TATCGTAGTT 18000
ATCTACACGA CGGGGAGTCA GGCAACTATG GATGAACGAA ATAGACAGAT 18050
CGCTGAGATA GGTGCCTCAC TGATTAAGCA TTGGTAACTG TCAGACCAAG 18100
TTTACTCATA TATACTTTAG ATTGATTTAA AACTTCATTT TTAATTTAAA 18150
AGGATCTAGG TGAAGATCCT TTTTGATAAT CTCATGACCA AAATCCCTTA 18200
ACGTGAGTTT TCGTTCCACT GAGCGTCAGA CCCCCTAGAA AAGATCAAAG 18250
GATCTTCTTG AGATCCTTTT TTTCTGCGCG TAATCTGCTG CTTGCAAACA 18300
AAAAAACCAC CGCTACCAGC GGTGGTTTGT TTGCCGGATC AAGAGCTACC 18350
AACTCTTTTT CCGAAGGTAA CTGGCTTCAG CAGAGCGCAG ATACCAAATA 18400
CTGTTCTTCT AGTGTAGCCG TAGTTAGGCC ACCACTTCAA GAACTCTGTA 18450
GCACCGCCTA CATACTCGC TCTGCTAATC CTGTTACCAG TGGCTGCTGC 18500
CAGTGGCGAT AAGTCGTGTC TTACCGGGTT GGA CTCAAGA CGATAGTTAC 18550
CGGATAAGGC GCAGCGGTCG GGCTGAACGG GGGGTTCTGT CACACAGCCC 18600

AGCTTGGAGC GAACGACCTT CACCGAACTG AGATACCTAC AGCGTGAGCT	18650
ATGAGAAAAGC GCCACGCTTC CCGAAGGGAG AAAGGCCGGAC AGGTATCCGG	18700
TAAGCGGCAG GGTCCGAACA GGAGAGCGCA CGAGGGAGCT TCCAGGGGGA	18750
AACGCCTGGT ATCTTTATAG TCCTGTCCGG TTTCGCCACC TCTGACTTGA	18800
GCGTCGATTT TTGTGATGCT CGTCAGGGGG GCGGAGCCTA TGGAAAAACG	18850
CCAGCAACGC GGCCFTTTTA CGGTTCCCTGG CCTTTTGCTG GCCTTTTGCT	18900
CACATGTTCT TTCCTGCGTT ATCCCCTGAT TCTGTGGATA ACCGTATTAC	18950
CGCCTTTGAG TGAGCTGATA CCGCTCGCCG CAGCCGAACG ACCGAGCGCA	19000
GCGAGTCAGT GAGCGAGGAA GCGGAAGAGC GCCCAATACG CAAACCGCCT	19050
CTCCCCGCGC GTTGGCCGAT TCATTAATGC AGCTGGCAGC ACAGGTTTCC	19100
CGACTGGAAA GCGGGCAGTG AGCGCAACGC AATTAATGTG AGTTAGCTCA	19150
CTCATTAGGC ACCCCAGGCT TTACACTTTA TGCTTCCGGC TCGTATGTTG	19200
TGTGGAATTG TGAGCGGATA ACAATTTTAC ACAGGAAACA GCTATGACCA	19250
TGATTACGAA TTCGAATGGC CATGGGACGT CGACCTGAGG TAATTATAAC	19300
CCGGGCC	19307

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines pseudotypisierten Adenovirus, wobei man:
 - (a) in eine ausgewählte Wirtszelle:
 - (i) einen rekombinanten Shuttle-Vektor, der Adenovirus-Nukleinsäuresequenzen sowie ein Minigen umfaßt, wobei die Adenovirussequenzen zu einem ersten Serotyp gehören und aus den für die Replikation und Virioncapsidierung notwendigen adenoviralen 5'- und 3'-cis-Elementen bestehen; und wobei das Minigen ein ausgewähltes Gen umfaßt, das mit Regulationssequenzen, die die Expression des ausgewählten Gens in einer Zielzelle steuern, operativ verknüpft ist, wobei die adenoviralen cis-Elemente das Minigen flankieren, und
 - (ii) ein Helfervirus, das die für eine Adenovirusinfektion notwendigen adenoviralen Gensequenzen umfaßt und ein adenovirales Capsid eines zweiten Serotyps, der sich von dem Serotyp des Adenovirus aus (i) unterscheidet, codiert, einführt;
 - (b) die den Shuttle-Vektor und das Helfervirus enthaltende Wirtszelle kultiviert, um so die Bildung eines pseudotypisierten Adenovirus, das die Adenovirus-Nukleinsäuresequenzen und das Minigen des Shuttle-Vektors (i) in einem adenoviralen Capsid eines zweiten Serotyps, der sich von dem ersten Serotyp unterscheidet, umfaßt, zu gestatten.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei dem Helfervirus alle oder ein hinreichender Anteil der adenoviralen E1- und/oder E3-Gene fehlen, um so deren biologische Funktion zu beseitigen.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der erste und der zweite Serotyp unabhängig ausgewählt sind aus einem Adenovirus-Serotyp der Gruppe bestehend aus 2, 4, 5, 7, 12 und 40.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei man in weiteren Schritten das pseudotypisierte Adenovirus aus der Wirtszelle oder der diese enthaltenden Zellkultur isoliert.
5. Verfahren zur Herstellung eines pseudotypisierten Adenovirus, wobei man:
 - (a) in eine ausgewählte Wirtszelle:
 - (i) einen rekombinanten Shuttle-Vektor, der Adenovirus-Nukleinsäuresequenzen sowie ein Minigen umfaßt, wobei die Adenovirussequenzen zu einem ersten Serotyp gehören und aus den für die Replikation und Virioncapsidierung notwendigen adenoviralen 5'- und 3'-cis-Elementen bestehen; und wobei das Minigen ein ausgewähltes Gen umfaßt, das mit Regulationssequenzen, die die Expression des ausgewählten Gens in einer Zielzelle steuern, operativ verknüpft ist, wobei die adenoviralen cis-Elemente das Minigen flankieren, und
 - (ii) ein Helfervirus, das adenovirale Gensequenzen eines zweiten Serotyps, der sich von dem Serotyp der Adenovirussequenzen aus (i) unterscheidet, umfaßt, einführt; und

(b) die den Shuttle-Vektor und das Helfervirus enthaltende Wirtszelle kultiviert, wobei das Helfervirus und die Wirtszelle die Adenovirusgene enthalten, die für die Adenovirusinfektion notwendig sind und die die Bildung eines pseudotypisierten Adenovirus, das die Adenovirus-Nukleinsäuresequenzen und das Minigen des Shuttle-Vektors (i) in einem adenoviralen Capsid eines zweiten Serotyps, der sich von dem ersten Serotyp unterscheidet, umfaßt, gestatten.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der erste und der zweite Serotyp unabhängig ausgewählt sind aus einem Adenovirus-Serotyp der Gruppe bestehend aus 2, 4, 5, 7, 12 und 40.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, wobei man in weiteren Schritten das pseudotypisierte Adenovirus aus der Wirtszelle oder der diese enthaltenden Zellkultur isoliert.

8. Pseudotypisiertes Adenovirus, umfassend:

(a) Adenovirus-Nukleinsäuresequenzen und ein Minigen, wobei die Adenovirus-Nukleinsäuresequenzen die für die Replikation und Virioncapsidierung notwendigen adenoviralen 5'- und 3'-cis-Elemente umfassen; wobei das Minigen ein ausgewähltes Gen umfaßt, das mit Regulationssequenzen, die die Expression des ausgewählten Gens in einer Zielzelle steuern, operativ verknüpft ist, und wobei die adenoviralen cis-Elemente zu einem ersten Serotyp gehören und das Minigen flankieren; und

(b) ein Capsid eines zweiten Adenovirus-Serotyps, der sich von dem ersten Serotyp unterscheidet und die Adenovirus-Nukleinsäuresequenzen sowie das Minigen aus (a) capsidiert.

9. Pseudotypisiertes Adenovirus nach Anspruch 8, wobei der erste und der zweite Serotyp unabhängig ausgewählt sind aus einem Adenovirus-Serotyp der Gruppe bestehend aus 2, 4, 5, 7, 12 und 40.

10. Pseudotypisiertes Adenovirus nach Anspruch 8 oder 9, wobei die adenoviralen 5'-cis-Elemente native adenovirale 5'-inverse terminale Wiederholungen (inverted terminal repeats, ITRs) und Verpackungssequenzen umfassen.

11. Pseudotypisiertes Adenovirus nach einem der Ansprüche 8 bis 10, wobei die 3'-cis-Elemente die nativen adenoviralen 3'-inversen terminalen Wiederholungen (ITRs) umfassen.

12. Pseudotypisiertes Adenovirus nach einem der Ansprüche 8 bis 11, wobei es sich bei dem ausgewählten Gen um ein Reporter-gen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Genen, die β -Galactosidase, alkalische Phosphatase und Green Fluorescent Protein codieren, handelt.

13. Pseudotypisiertes Adenovirus nach einem der Ansprüche 8 bis 12, wobei es sich bei dem ausgewählten Gen um ein therapeutisches Gen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem normalen CFTR-Gen, einem DMD-Becker-Allel und einem normalen LDL-Rezeptor-Gen, handelt.

14. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein pseudotypisiertes Adenovirus nach einem der Ansprüche 8 bis 13 und ein pharmazeutisch unbedenkliches Vehikel.

15. Verwendung eines pseudotypisierten Adenovirus nach einem der Ansprüche 8 bis 13 bei der Herstellung eines Arzneimittels.

Es folgen 45 Blatt Zeichnungen



FIG. IA

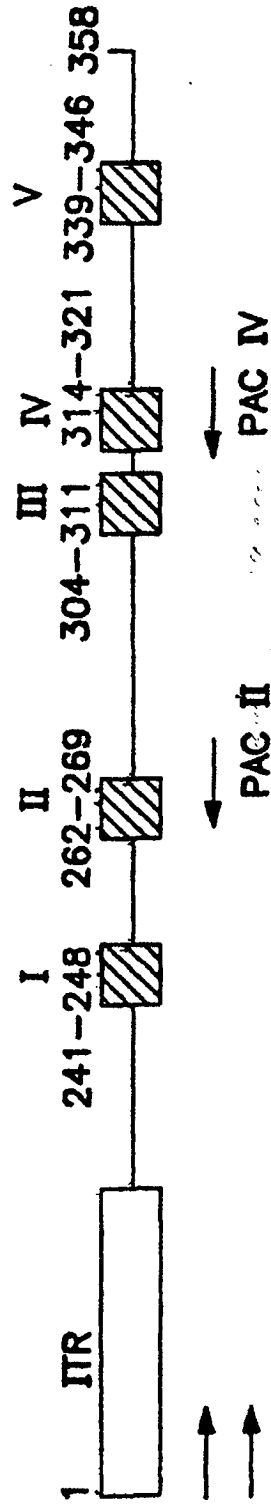


FIG. IB

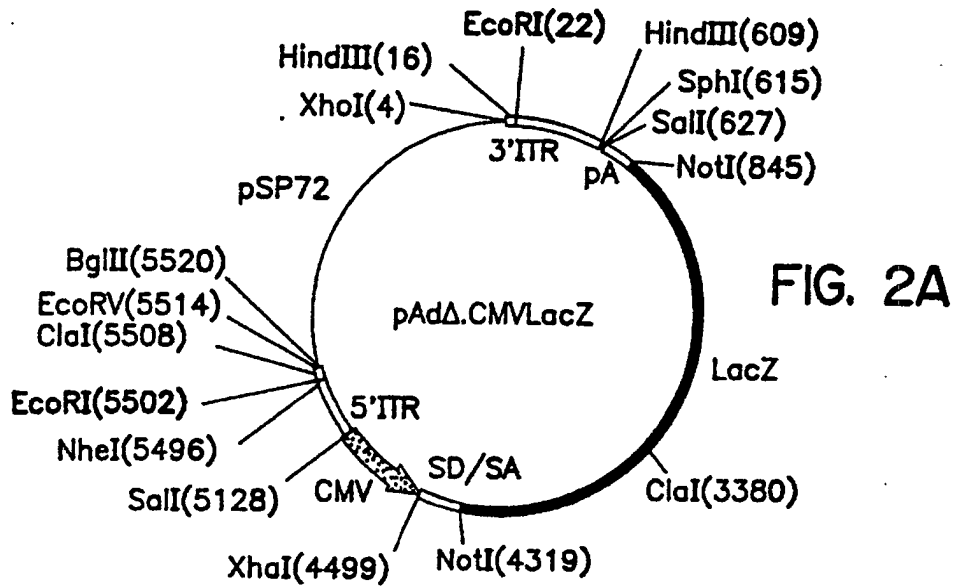


FIG. 2A

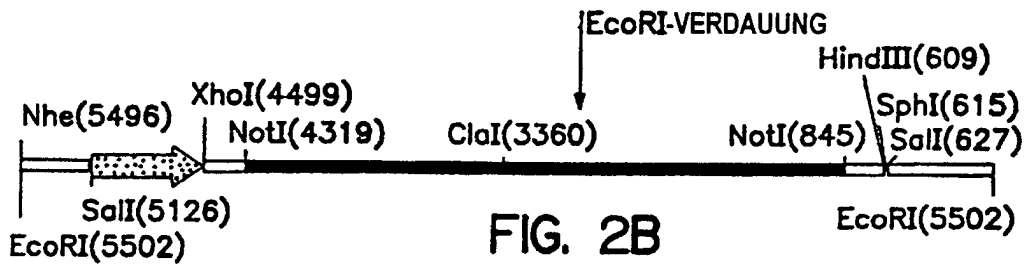


FIG. 2B

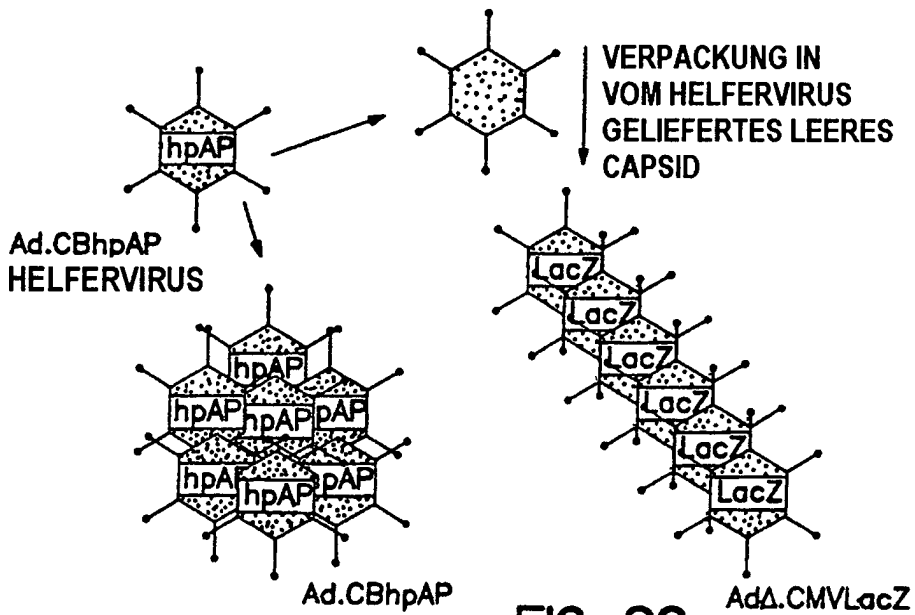


FIG. 2C

FIGURE 3A

GAACTCGAGC	AGCTGAAGCT	TGAATTCCAT	CATCAATAAT	ATACCTTATT	50
TTGGATTGAA	GCCAATATGA	TAATGAGGGG	GTGGAGTTTG	TGACGTGGCG	100
CGGGGCGTGG	GAACGGGGCG	GGTGACGTAG	GTTTTAGGGC	GGAGTAACTT	150
GTATGTGTTG	GGAATTGTAG	TTTTCTTAAA	ATGGGAAGTT	ACGTAACGTG	200
GGAAAACGGA	AGTGACGATT	TGAGGAAGTT	GTGGGTTTTT	TGGCTTTCGT	250
TTCTGGGCGT	AGGTTGCGCT	GCGGTTTTCT	GGGTGTTTTT	TGTGGACTTT	300
AACCGTTACG	TCATTTTTTA	GTCCTATATA	TACTCGCTCT	GCACTTGGCC	350
CTTTTTTACA	CTGTGACTGA	TTGAGCTGGT	GCCGTGTCGA	GTGGTGTTTT	400
TTTAATAGGT	TTTCTTTTTT	ACTGGTAAGG	CTGACTGTTA	GGCTGCCGCT	450
GTGAAGCGCT	GTATGTTGTT	CTGGAGCGGG	AGGGTGCTAT	TTTGCCTAGG	500
CAGGAGGGTT	TTTCAGGTGT	TTATGTGTTT	TTCTCTCCTA	TTAATTTTGT	550
TATACCTCCT	ATGGGGGCTG	TAATGTTGTC	TCTACGCCCTG	CGGGTATGTA	600
TTCCCCCAA	GCTTGCATGC	CTGCAGGTCG	ACTCTAGAGG	ATCCGAAAAA	650
ACCTCCCACA	CCTCCCCCTG	AACCTGAAAC	ATAAAAATGAA	TGCAATTGTT	700
GTTGTAACT	TGTTTATTGC	AGCTTATAAT	GGTTACAAAT	AAAGCAATAG	750
CATCACAAAT	TTCACAAATA	AAGCATTTTT	TTCACTGCAT	TCTAGTTGTG	800
GTTTGTCCAA	ACTCATCAAT	GSTATCTTATC	ATGTCTGGAT	CCCCGCGGCC	850
GCCTAGAGTC	GAGGCCGAGT	TTGTCAGAAA	GCAGACCAA	CAGCGGTTGG	900
AATAATAGCG	AGAACAGAGA	AATAGCGGCA	AAAATAATAC	CCGTATCACT	950
TTTGCTGATA	TGGTTGATGT	CATGTAGCCA	AATCGGGAAA	AACGGGAAGT	1000
AGGCTCCCAT	GATAAAAAAG	TAAAAGAAAA	AGAATAAACC	GAACATCCAA	1050
AAGTTTGTGT	TTTTTAAATA	GTACATAATG	GATTTCCCTA	CGCGAAATAC	1100
GGGCAGACAT	GGCCTGCCCC	GTTATTATTA	TTTTTGACAC	CAGACCAACT	1150
GGTAATGGTA	GCGACCGGCG	CTCAGCTGTA	ATTCCGCCGA	TACTGACGGG	1200
CTCCAGGAGT	CGTCGCCACC	AATCCCCATA	TGGAAACCGT	CGATATTCAG	1250
CCATGTGCCT	TCTTCCGCGT	GCAGCAGATG	GCGATGGCTG	CTTCCATCA	1300
GTTGCTGTTG	ACTGTAGCGG	CTGATGTTGA	ACTGGAAGTC	GCCGCGCCAC	1350

FIGUR : 3B

TGGTGTGGGC	CATAATTCAA	TTCGCGCGTC	CCGCAGCGCA	GACCGTTTTC	1400
GCTCGGGAAG	ACGTACGGGG	TATACATGTC	TGACAATGGC	AGATCCCAGC	1450
GGTCAAAACA	GGCGGCAGTA	AGGCGGTCCG	GATAGTTTTC	TTGCGGCCCT	1500
AATCCGAGCC	AGTTTACCCG	CTCTGCTACC	TGCGCCAGCT	GGCAGTTCAG	1550
GCCAATCCGC	GCCGGATGCG	GTGTATCGCT	CGCCACTTCA	ACATCAACGG	1600
TAATCGCCAT	TTGACCACTA	CCATCAATCC	GGTAGGTTTT	CCGGCTGATA	1650
AATAAGGTTT	TCCCCTGATG	CTGCCACCGG	TGAGCGGTCG	TAATCAGCAC	1700
CGCATCAGCA	AGTGTATCTG	CCGTGCACTG	CAACAACGCT	GCTTCGGCCT	1750
GGTAATGGCC	CGCCGCCTTC	CAGCGTTCGA	CCCAGGCGTT	AGGGTCAATG	1800
CGGGTCGCTT	CACTTACGCC	AATGTCGTTA	TCCAGCGGTG	CACGGGTGAA	1850
CTGATCGCGC	AGCGGCGTCA	GCAGTTGTTT	TTTATCGCCA	ATCCACATCT	1900
GTGAAAGAAA	GCCTGACTGG	CGGTTAAATT	GCCAACGCTT	ATTACCCAGC	1950
TCGATGCAAA	AATCCATTTT	GCTGGTGGTC	AGATGCGGGA	TGGCGTGGGA	2000
CGCGGCGGGG	AGCGTCACAC	TGAGGTTTTT	CGCCAGACGC	CACTGCTGCC	2050
AGGCGCTGAT	GTGCCCGGCT	TCTGACCATG	CGGTGCGGTT	CGGTTGCACT	2100
ACGCGTACTG	TGAGCCAGAG	TTGCCCGGCG	CTCTCCGGCT	GCGGTAGTTC	2150
AGGCAGTTCA	ATCAACTGTT	TACCTTGTGG	AGCGACATCC	AGAGGCACTT	2200
CACCGCTTGC	CAGCGGCTTA	CCATCCAGCG	CCACCATCCA	GTGCAGGAGC	2250
TCGTTATCGC	TATGACGGAA	CAGGTATTCG	CTGGTCACTT	CGATGGTTTG	2300
CCCGGATAAA	CGGAACTGGA	AAAAGTCTG	CTGGTGTFFF	GCTTCCGTCA	2350
GCGCTGGATG	CGGCGTGC GG	TCGGCAAAGA	CCAGACCGTT	CATACAGAAC	2400
TGGCGATCGT	TCGGCGTATC	GCCAAAATCA	CCGCCGTAAG	CCGACCACGG	2450
GTTGCCGTTT	TCATCATATT	TAATCAGCGA	CTGATCCACC	CAGTCCCAGA	2500
CGAAGCCGCC	CTGTAAACGG	GGATACTGAC	GAAACGCCTG	CCAGTATTTA	2550
GCGAAACCGC	CAAGACTGTT	ACCCATCGCG	TGGGCGTATT	CGCAAAGGAT	2600
CAGCGGGCGC	GTCTCTCCAG	GTAGCGAAAG	CCATTTTTTG	ATGGACCATT	2650

FIGUR 3C

TCGGCACAGC	CGGGAAGGGC	TGGTCTTCAT	CCACGCGCGC	GTACATCGGG	2700
CAAATAATAT	CGGTGGCCGT	GGTGTCCGGT	CCGCCGCCTT	CATACTGCAC	2750
CGGGCGGGAA	GGATCGACAG	ATTTGATCCA	GCGATACAGC	GCGTCGTGAT	2800
TAGCGCCGTG	GCCTGATTCA	TTCCCCAGCG	ACCAGATGAT	CACACTCGGG	2850
TGATTACGAT	CGCGCTGCAC	CATTCGCGTT	ACGCGTTCGC	TCATCGCCGG	2900
TAGCCAGCGC	GGATCATCGG	TCAGACGATT	CATTGGCACC	ATGCCGTGGG	2950
TTTCAATATT	GGCTTCATCC	ACCACATACA	GGCCGTAGCG	GTCGCACAGC	3000
GTGTACCACA	GCGGATGGTT	CGGATAATGC	GAACAGCGCA	CGGCGTTAAA	3050
GTTGTTCTGC	TTCATCAGCA	GGATATCCTG	CACCATCGTC	TGCTCATCCA	3100
TGACCTGACC	ATGCAGAGGA	TGATGCTCGT	GACGGTTAAC	GCCTCGAATC	3150
AGCAACGGCT	TGCCGTTTCAG	CAGCAGCAGA	CCATTTTCAA	TCCGCACCTC	3200
GCGGAAACCG	ACATCGCAGG	CTTCTGCTTC	AATCAGCGTG	CCGTCGGCGG	3250
TGTGCAGTTC	AACCACCGCA	CGATAGAGAT	TCGGGATTTT	GGCGCTCCAC	3300
AGTTTCGGGT	TTTCGACGTT	CAGACGTAGT	GTGACGCGAT	CGGCATAACC	3350
ACCACGCTCA	TCGATAATTT	CACCGCCGAA	AGGCGCGGTG	CCGCTGGCGA	3400
CCTGCGTTTC	ACCCTGCCAT	AAAGAACTG	TTACCCGTAG	GTAGTCAGGC	3450
AACTCGCCGC	ACATCTGAAC	TTCAGCCTCC	AGTACAGCGC	GGCTGAAATC	3500
ATCATTAAAG	CGAGTGGCAA	CATGGAAATC	GCTGATTTGT	GTAGTCGGTT	3550
TATGCAGCAA	CGAGACGTCA	CGGAAAATGC	CGCTCATCCG	CCACATATCC	3600
TGATCTTCCA	GATAACTGCC	GTCACTCCAA	CGCAGCACCA	TCACCGCGAG	3650
GCGGTTTTCT	CCGGCGCGTA	AAAATGCGCT	CAGGTCAAAT	TCAGACGGCA	3700
AACGACTGTC	CTGGCCGTAA	CCGACCCAGC	GCCCGTTGCA	CCACAGATGA	3750
AACGCCGAGT	TAACGCCATC	AAAAATAATT	CGCGTCTGGC	CTTCCTGTAG	3800
CCAGCTTTCA	TCAACATTAA	ATGTGAGCGA	GTAACAACCC	GTCGGATTCT	3850
CCGTGGGAAC	AAACGGCGGA	TTGACCGTAA	TGGGATAGGT	TACGTTGGTG	3900
TAGATGGGCG	CATCGTAACC	GTGCATCTGC	CAGTTTGAGG	GGACGACGAC	3950

FIGUR 3D

AGTATCGGCC	TCAGGAAGAT	CGCACTCCAG	CCAGCTTTCC	GGCACCGCTT	4000
CTGGTGCCGG	AAACCAGGCA	AAGCGCCATT	CGCCATTCAG	GCTGCGCAAC	4050
TGTTGGGAAG	GGCGATCGGT	GCGGGCCTCT	TCCTATTAC	GCCAGCTGGC	4100
CAAAGGGGGA	TGTGCTGCAA	GGCGATTAAG	TTGGGTAACG	CCAGGGTTTT	4150
CCCAGTCACG	ACGTTGTAAA	ACGACGGGAT	CGCGCTTGAG	CAGCTCCTTG	4200
CTGGTGTCCA	GACCAATGCC	TCCCAGACCG	GCAACGAAAA	TCACGTTCTT	4250
GTTGGTCAAA	GTAAACGACA	TGGTGACTTC	TTTTTTGCTT	TAGCAGGCTC	4300
TTTCGATCCC	CGGGAATTGC	GGCCGCGGGT	ACAATTCCGC	AGCTTTTAGA	4350
GCAGAAGTAA	CACTTCCGTA	CAGGCCTAGA	AGTAAAGGCA	ACATCCACTG	4400
AGGAGCAGTT	CTTTGATTTG	CACCACCACC	GGATCCGGGA	CCTGAAATAA	4450
AAGACAAAA	GACTAAACTT	ACCAGTTAAC	TTTCTGGTTF	TTCAGTTCCT	4500
CGAGTACCGG	ATCCTCTAGA	GTCCGGAGGC	TGGATCGGTC	CCGGTCTCTT	4550
CTATGGAGGT	CAAAACAGCG	TGGATGGCGT	CTCCAGGCGA	TCTGACGGTT	4600
CACTAAACGA	GCTCTGCTTA	TATAGACCTC	CCACCGTACA	CGCCTACCGC	4650
CCATTTGCGT	CAATGGGGCG	GAGTTGTTAC	GACATTTTGG	AAAGTCCCGT	4700
TGATTTTGGT	GCCAAAACAA	ACTCCCATTG	ACGTCAATGG	GGTGGAGACT	4750
TGGAAATCCC	CGTGAGTCAA	ACCGCTATCC	ACGCCATTG	ATGTACTGCC	4800
AAAACCGCAT	CACCATGGTA	ATAGCGATGA	CTAATACGTA	GATGTACTGC	4850
CAAGTAGGAA	AGTCCCATAA	GGTCATGTAC	TGGGCATAAT	GCCAGGCGGG	4900
CCATTTACCG	TCATTGACGT	CAATAGGGGG	CGTACTTGGC	ATATGATACA	4950
CITGATGTAC	TGCCAAGTGG	GCAGTTTACC	GTAAATACTC	CACCCATTGA	5000
CGTCAATGGA	AAGTCCCTAT	TGGCGTTACT	ATGGGAACAT	ACGTCATTAT	5050
TGACGTCAAT	GGGCGGGGGT	CGTTGGGGCG	TCAGCCAGGC	GGGCCATTTA	5100
CCGTAAGTTA	TGTAACGACC	TGCAGGTCGA	CTCTAGAGGA	TCTCCCTAGA	5150
CAAATATTAC	GCGCTATGAG	TAACACAAAA	TTATTCAGAT	TTCAC TTCCT	5200
CTTATTCAGT	TTTCCCGCGA	AAATGGCCAA	ATCTTACTPG	GTTAGGEC CA	5250

FIGUR 3E

AATTTACTAC	AACATCCGCC	TAAAACCGCG	CGAAAATTGT	CACTTCCTGT	5300
GTACACCGGC	GCACACCAA	AACGTCACCT	TTGCCACATC	CGTCGCTTAC	5350
ATGTGTTCCG	CCACACTTGC	AACATCACAC	TTCCGCCACA	CTACTACGTC	5400
ACCCGCCCCG	TTCCCACGCC	CCGCGCCACG	TCACAAACTC	CACCCCCTCA	5450
TTATCATATT	GGCTTCAATC	CAAAATAAGG	TATATTATTG	ATGATGCTAG	5500
CGAATTCATC	GATGATATCA	GATCTGCCGG	TCTCCCTATA	GTGAGTCGTA	5550
TTAATTTCGA	TAAGCCAGGT	TAACCTGCAT	TAATGAATCG	GCCAACGCCG	5600
GGGAGAGGC	GGTTTGCFTA	TTGGGCGCTC	TTCCGCTTCC	TCGCTCACTG	5650
ACTCGCTGCG	CTCGGTGCTT	CGGCTGCCGG	GAGCGGTATC	AGCTCACTCA	5700
AAGGCGGTAA	TACGGTTATC	CACAGAATCA	GGGGATAACG	CAGGAAAGAA	5750
CATGTGAGCA	AAAGGCCAGC	AAAAGGCCAG	GAACCGTAAA	AAGGCCGCGT	5800
TGCTGGCGTT	TTCCATAGG	CTCCGCCCCC	CTGACGAGCA	TCACAAAAT	5850
CGACGCTCAA	GTCAGAGGTG	GCGAAACCCG	ACAGGACTAT	AAAGATACCA	5900
GGCGTTTCCC	CCTGGAAGCT	CCCTCGTGCG	CTCTCCTGTT	CCGACCCTGC	5950
CGCTTACCGG	ATACCTGTCC	GCCTTTCTCC	CTTCGGGAAG	CGTGGCGCTT	6000
TCTCAATGCT	CACGCTGTAG	GSTATCTCAGT	TCGGTGTAGG	TCGTTGCTC	6050
CAAGCTGGGC	TGTGTGCACG	AACCCCCCGT	TCAGCCCGAC	CGCTGCGCCT	6100
TATCCGGTAA	CTATCGTCTT	GAGTCCAACC	CGGTAAGACA	CGACTTATGG	6150
CCACTGGCAG	CAGCCACTGG	TAACAGGATT	AGCAGAGCGA	GGTATGTAGG	6200
CGGTGCTACA	GAGTTCTTGA	AGTGGTGGCC	TAACACGGC	TACACTAGAA	6250
GGACAGTATT	TGGTATCTGC	GCTCTGCTGA	AGCCAGTTAC	CTTCGGAAAA	6300
AGAGTTGGTA	GCTCTTGATC	CGGCAAACAA	ACCACCGCTG	CTAGCGGTGG	6350
TTTTTTTGTT	TGCAAGCAGC	AGATTACGCG	CAGAAAAAAA	GGATCTCAAG	6400
AAGATCCTTT	GATCTTTTCT	ACGGGGTCTG	ACGCTCAGTG	GAACGAAAAAC	6450
TCACGTTAAG	GGATTTTGGT	CATGAGATTA	TCAAAAAGGA	TCTTCACCTA	6500
GATCCTTTTA	AATTAAAAAT	GAAGTTTAA	ATCAATCTAA	AGTATATATG	6550

FIGUR 3F

AGTAAACTTG	GTCTGACAGT	TACCAATGCT	TAATCAGTGA	GGCACCTATC	6600
TCAGCGATCT	GTCTATTTTCG	TTCATCCATA	GTTGCCTGAC	TCCCCGTCGT	6650
GTAGATAACT	ACGATACGGG	AGGGCTTACC	ATCTGGCCCC	AGTGCTGCAA	6700
TGATACCGCG	AGACCCACGC	TCACCGGCTC	CAATTTTATC	AGCAATAAAC	6750
CAGCCAGCCG	GAAGGGCCGA	GCGCAGAAGT	GGTCCTGCAA	CTTTATCGGC	6800
CTCCATCCAG	TCTATTAATT	GTTGCCGGGA	AGCTAGAGTA	AGTAGTTCGC	6850
CAGTTAATAG	TTTGCGCAAC	GTTGTTGCCA	TTGCTACAGG	CATCGTGGTG	6900
TCACGCTCGT	CGTTTGGTAT	GGCTTCATTC	AGCTCCGGTT	CCCAACGATC	6950
AAGGCGAGTT	ACATGATCCC	CCATGTTGTG	CAAAAAAGCG	GTTAGCTCCT	7000
TCGGTCCTCC	GATCGTTGTC	AGAAGTAAGT	TGGCCGCAGT	GTTATCACTC	7050
ATGGTTATGG	CAGCACTGCA	TAATTCTCTT	ACTGTCATGC	CATCCGTAAG	7100
ATGCTTTTCT	GTGACTGGTG	AGTACTCAAC	CAAGTCATTC	TGAGAATAGT	7150
GTATGCGGCG	ACCGAGTTGC	TCTTGCCCCG	CGTCAATACG	GGATAATACC	7200
GCGCCACATA	GCAGAACTTT	AAAAGTGCTC	ATCATTGGAA	AACGTTCTTC	7250
GGGGCGAAA	CTCTCAAGGA	TCTTACCGCT	GTTGAGATCC	AGTTCGATGT	7300
AACCCACTCG	TGCACCCAAC	TGATCTTCAG	CATCTTTTAC	TTTCACCAGC	7350
GTTTCTGGGT	GAGCAAAAAC	AGGAAGGCAA	AATGCCGCAA	AAAAGGGAAT	7400
AAGGGCGACA	CGGAAATGTT	GAATACTCAT	ACTCTTCCTT	TTTCAATATT	7450
ATTGAAGCAT	TTATCAGGGT	TATTGTCTCA	TGAGCGGATA	CATATTTGAA	7500
TGTATTTAGA	AAAATAAACA	AATAGGGGTT	CCGCGCACAT	TCCCCCGAAA	7550
AGTGCCACCT	GACGTCTAAG	AAACCATTAT	TATCATGACA	TTAACCTATA	7600
AAAATAGGCG	TATCACGAGG	CCCTTTCGTC	TCGCGCGTTF	CGGTGATGAC	7650
GGTGAAAACC	TCTGACACAT	GCAGCTCCCC	GAGACGGTCA	CAGCTTGTCT	7700
GTAAGCGGAT	GCCGGGAGCA	GACAAGCCCC	TCAGGGCGCG	TCAGCGGGTG	7750
TTGGCGGGTG	TCGGGGCTGG	CTTAACTATG	CGGCATCAGA	GCAGATTGTA	7800
CTGAGAGTGC	ACCATATGGA	CATATTGTCT	TTAGAACGCG	GCTACAATTA	7850
ATACATAACC	TTATGTATCA	TACACATACG	ATTTAGGTGA	CACTATA	7897

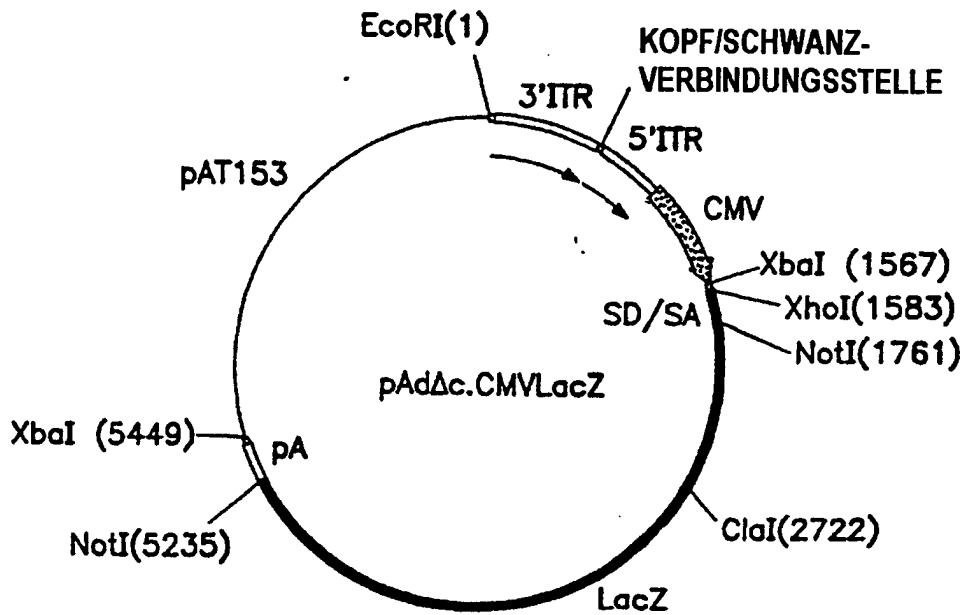


FIG. 4A

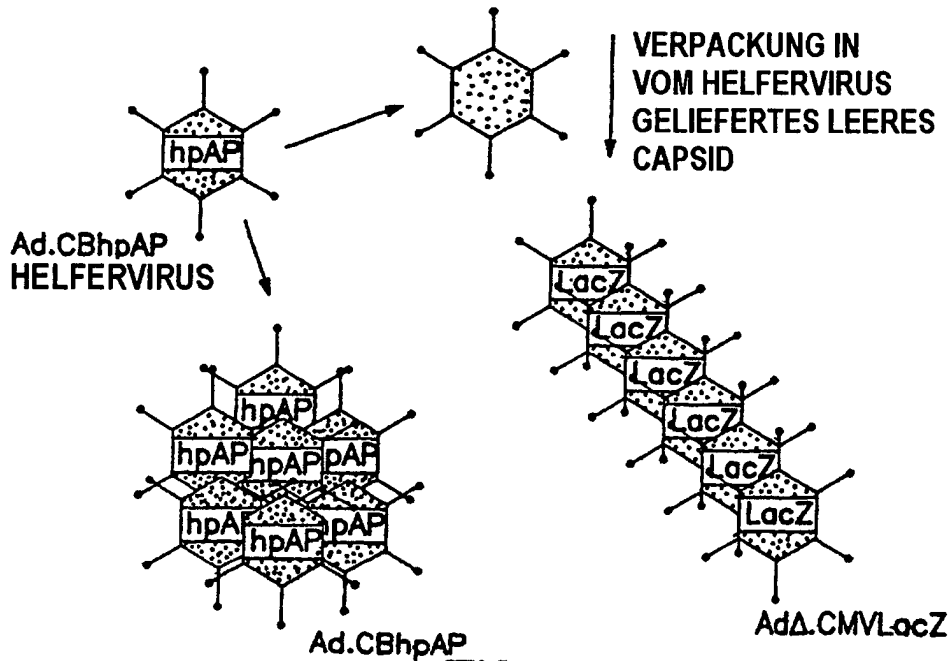


FIG. 4B



FIGUR 5A

GAATTCGCTA	GCTAGCGGGG	GAATACATAC	CCGCAGGCGT	AGAGACAACA	50
TTACAGCCCC	CATAGGAGGT	ATAACAAAAT	TAATAGGAGA	GAAAAACACA	100
TAAACACCTG	AAAAACCCTC	CTGCCTAGGC	AAAATAGCAC	CCTCCCGCTC	150
CAGAACAACA	TACAGCGCTT	CACAGCGGCA	GCCTAACAGT	CAGCCTTACC	200
AGTAAAAAAG	AAAACCTATT	AAAAAAACAC	CACTCGACAC	GGCACCAGCT	250
CAATCAGTCA	CAGTGTA AAA	AAGGGCCAAG	TGCAGAGCGA	GTATATATAG	300
GACTAAAAAA	TGACGTAACG	GTAAAGTCC	ACAAAAACA	CCCAGAAAAC	350
CGCACGCGAA	CCTACGCCCA	GAAACGAAAG	CCAAAAACC	CACAACTTCC	400
TCAAATCGTC	ACTTCCGTTT	TCCCACGTTA	CGTAACTTCC	CATTTTAAGA	450
AAACTACAAT	TCCCAACACA	TACAAGTTAC	TCCGCCCTAA	AACCTACGTC	500
ACCCGCCCCG	TTCCCACGCC	CCGCGCCACG	TCACAAACTC	CACCCCCTCA	550
TTATCATATT	GGCTTCAATC	CAAATAAGG	TATATTATTG	ATGATGCTAG	600
CATCATCAAT	AATATACCTT	ATTTTGGATT	GAAGCCAATA	TGATAATGAG	650
GGGGTGGAGT	TTGTGACGTG	GCGCGGGGCG	TGGGAACGGG	GCGGGTGACG	700
TAGTAGTGTG	GCGGAAGTGT	GATGTTGCAA	GTGTGGCGGA	ACACATGTAA	750
GCGACGGATG	TGGCAAAGT	GACGTTTTTG	GTGTGCGCCG	GTGTACACAG	800
GAAGTGACAA	TTTTCGCGCG	GTTTTAGGCG	GATGTTGTAG	TAAATTTGGG	850
CGTAACCGAG	TAAGATTTGG	CCATTTTCGC	GGGAAAAC TG	AATAAGAGGA	900
AGTGAATCT	GAATAATTTT	GTGTTACTCA	TAGCGCGTAA	TATTTGTCTA	950
GGGAGATCAG	CCTGCAGGTC	GTTACATAAC	TTACGGTAAA	TGGCCCCCCT	1000
GGCTGACCCG	CCAACGACCC	CCGCCATTG	ACGTCAATAA	TGACGTATGT	1050
TCCCATAGTA	ACGCCAATAG	GGACTTTCCA	TTGACGTCAA	TGGGTGGAGT	1100
ATTTACGGTA	AACTGCCAC	TTGGCAGTAC	ATCAAGTGTA	TCATATGCCA	1150
AGTACGCCCC	CTATTGACGT	CAATGACGGT	AAATGGCCCCG	CCTGGCATT A	1200
TGCCCAGTAC	ATGACCTTAT	GGGACTTTCC	TACTTGGCAG	TACATCTACG	1250
TATTAGTCAT	CGCTATTACC	ATGGTGATGC	GGTTTTGGCA	GTACATCAAT	1300

FIGUR 5B

GGGCGTGGAT	AGCGGTTTGA	CTCACGGGGA	TTTCCAAGTC	TCCACCCCAT	1350
TGACGTCAAT	GGGAGTTTGT	TTTGGCACCA	AAATCAACGG	GACTTTCCAA	1400
AATGTCGTAA	CAACTCCGCC	CCATTGACGC	AAATGGGCGG	TAGGCGTGTA	1450
CGGTGGGAGG	TCTATATAAG	CAGAGCTCGT	TTAGTGAACC	GTCAGATCGC	1500
CTGGAGACGC	CATCCACGCT	GTTTTGACCT	CCATAGAAGA	CACCGGGACC	1550
GATCCAGCCT	CCGGACTCTA	GAGGATCCGG	TACTCGAGGA	ACTGAAAAAC	1600
CAGAAAGTTA	ACTGGTAAGT	TTAGTCTTTT	TGTCTTTTAT	TTCAGGTCCC	1650
GGATCCGGTG	GTGGTGCAA	TCAAAGAACT	CCTCCTCAGT	GGATGTTGCC	1700
TTTACTTCTA	GGCCTGTACG	GAAGTGTTAC	TTCTGCTCTA	AAAGCTGCGG	1750
AATTGTACCC	GCGGCCGCA	TCGCCGGGA	TCGAAAGAGC	CTGCTAAAGC	1800
AAAAAAGAAG	TCACCATGTC	GTTTACTTTG	ACCAACAAGA	ACGTGATTTT	1850
CGTTCGGGT	CTGGGAGGCA	TTGGTCTGGA	CACCAGCAAG	GAGCTGCTCA	1900
AGCGCGATCC	CGTCGTTTTA	CAACGTCGTG	ACTGGGAAAA	CCCTGGCGTT	1950
ACCCAACCTA	ATCGCCTTGC	AGCACATCCC	CCTTTCGCCA	GCTGGCGTAA	2000
TAGCGAAGAG	GCCCCACCG	ATCGCCCTTC	CCAACAGTTG	CGCAGCCTGA	2050
ATGGCGAATG	GCGCTTTGCC	TGGTTCCGG	CACCAGAAGC	GGTGCCGGAA	2100
AGCTGGCTGG	AGTGCGATCT	TCCTGAGGCC	GATACTGTGG	TCGTCCCCCTC	2150
AAACTGGCAG	ATGCACGGTT	ACGATGCGCC	CATCTACACC	AACGTAAGCT	2200
ATCCCATTAC	GGTCAATCCG	CCGTTTGTTT	CCACGGAGAA	TCCGACGGGT	2250
TGTTACTCGC	TCACATTTAA	TGTTGATGAA	AGCTGGCTAC	AGGAAGGCCA	2300
GACGCGAATT	ATTTTTGATG	GCGTTAACTC	GGCGTTTCAT	CTCTGGTGCA	2350
ACGGGCGCTG	GGTCGGTTAC	GGCCAGGACA	GTCGTTTGCC	GTCTGAATTT	2400
GACCTGAGCG	CATTTTTACG	CGCCGGAGAA	AACCGCCTCG	CGGTGATGGT	2450
GCTGCGTTGG	AGTGACGGCA	GTTATCTGGA	AGATCAGGAT	ATGTGGCGGA	2500
TGAGCGGCAT	TTTCCGTGAC	GTCTCGTTGC	TGCATAAACC	GACTACACAA	2550
ATCAGCGATT	TCCATGTTGC	CACTCGCTTT	AATGATGATT	TCAGCCGCGC	2600

FIGUR 5C

TGTACTGGAG	GCTGAAGTTC	AGATGTGCGG	CGAGTTGCGT	GACTIONCTAC	2650
GGGTAACAGT	TTCTTTATGG	CAGGGTGAAA	CGCAGGTCCG	CAGCGGCACC	2700
GCGCCTTTCG	GCGGTGAAAT	TATCGATGAG	CGTGGTGGTT	ATGCCGATCG	2750
CGTCACACTA	CGTCTGAACG	TCGAAAACCC	GAAACTGTGG	AGCGCCGAAA	2800
TCCCGAATCT	CTATCGTGCG	GTGGTTGAAC	TGCACACCGC	CGACGGCACC	2850
CTGATTGAAG	CAGAAGCCTG	CGATGTCGGT	TTCCGCGAGG	TGCGGATTGA	2900
AAATGGTCTG	CTGCTGCTGA	ACGGCAAGCC	GTTGCTGATT	CGAGGCGTTA	2950
ACCGTCACGA	GCATCATCCT	CTGCATGGTC	AGGTCATGGA	TGAGCAGACC	3000
ATGGTGCAGG	ATATCCTGCT	GATGAAGCAG	AACAACCTTA	ACGCCGTGCG	3050
CTGTTCCGAT	TATCCGAACC	ATCCGCTGTG	GTACACGCTG	TGCGACCGCT	3100
ACGGCCTGTA	TGTGGTGGAT	GAAGCCAATA	TTGAAACCCA	CGGCATGGTG	3150
CCAATGAATC	GTCTGACCGA	TGATCCGCGC	TGGCTACCGG	CGATGAGCGA	3200
ACGCGTAACG	CGAATGGTGC	AGCGCGATCG	TAATCACCCG	AGTGTGATCA	3250
TCTGCTCGCT	GGGGAATGAA	TCAGGCCACG	GCGCTAATCA	CGACGCGCTG	3300
TATCGCTGGA	TCAAATCTGT	CGATCCCTCC	CGCCCGGTGC	AGTATGAAGG	3350
CGGCGGAGCC	GACACCACGG	CCACCGATAT	TATTTGCCCG	ATGTACGCGC	3400
GCGTGGATGA	AGACCAGCCC	TTCCCGGCTG	TGCCGAAATG	GTCCATCAAA	3450
AAATGGCTTT	CGCTACCTGG	AGAGACGCGC	CCGCTGATCC	TTTGCGAATA	3500
CGCCCACGCG	ATGGGTAAACA	GTCTTGGCGG	TTTCGCTAAA	TACTGGCAGG	3550
CGTTTCGTCA	GTATCCCCGT	TTACAGGGCG	GCTTCGTCTG	GGACTGGGTG	3600
GATCAGTCGC	TGATTAAATA	TGATGAAAAC	GGCAACCCGT	GGTCGGCTTA	3650
CGGCGGTGAT	TTTGGCGATA	CGCCGAACGA	TCGCCAGTTC	TGTATGAAGG	3700
GTCTGGTCTT	TGCCGACCGC	ACGCCGCATC	CAGCGCTGAC	GGAAGCAAAA	3750
CACCAGCAGC	AGTTTTTCCA	GTTCCGTTTA	TCCGGGCAA	CCATCGAAGT	3800
GACCAGCGAA	TACCTGTTCC	GTCATAGCGA	TAACGAGCTC	CTGCACTGGA	3850
TGGTGGCGCT	GGATGGTAAG	CCGCTGGCAA	GCGGTGAAGT	GCCTCTGGAT	3900

FIGURE 5D

GTCGCTCCAC	AAGGTAAACA	GTTGATTGAA	CTGCCTGAAC	TACCGCAGCC	3950
GGAGAGCGCC	GGGCAACTCT	GGCTCACAGT	ACGCGTAGTG	CAACCGAACG	4000
CGACCGCATG	GTCAGAAGCC	GGGCACATCA	GCGCCTGGCA	GCAGTGGCGT	4050
CTGGCGGAAA	ACCTCAGTGT	GACGCTCCCC	GCTCGTCCC	ACGCCATCCC	4100
GCATCTGACC	ACCAGCGAAA	TGGATTTTTG	CATCGAGCTG	GGTAATAAGC	4150
GTTGGCAATT	TAACCGCCAG	TCAGGCTTTC	TTTCACAGAT	GTGGATTGGC	4200
GATAAAAAAC	AACTGCTGAC	GCCGCTGCGC	GATCAGTTCA	CCCGTGCACC	4250
GCTGGATAAC	GACATTGGCG	TAAGTGAAGC	GACCCGCATT	GACCCTAACG	4300
CCTGGGTCCA	ACGCTGGAAG	GCGGCGGGCC	ATTACCAGGC	CGAAGCAGCG	4350
TTGTTGCAGT	GCACGGCAGA	TACACTTGCT	GATGCGGTGC	TGATTACGAC	4400
CGCTCACGCG	TGGCAGCATC	AGGGGAAAAC	CTTATTTATC	AGCCGGAAAA	4450
CCTACCGGAT	TGATGGTAGT	GGTCAAATGG	CGATTACCGT	TGATGTTGAA	4500
GTGGCGAGCG	ATACACCGCA	TCCGGCGCGG	ATTGGCCTGA	ACTGCCAGCT	4550
GGCGCAGGTA	GCAGAGCGGG	TAAACTGGCT	CGGATTAGGG	CCGCAAGAAA	4600
ACTATCCCGA	CCGCCTTACT	GCCGCCTGTT	TTGACCGCTG	GGATCTGCCA	4650
TTGTCAGACA	TGTATACCCC	GTACGTCTTC	CCGAGCGAAA	ACGGTCTGCG	4700
CTGCGGGACG	CGCGAATTGA	ATTATGGCCC	ACACCAGTGG	CGCGGGCGACT	4750
TCCAGTTCAA	CATCAGCCGC	TACAGTCAAC	AGCAACTGAT	GGAACCAGC	4800
CATCGCCATC	TGCTGCACGC	GGAAGAAGGC	ACATGGCTGA	ATATCGACGG	4850
TTTCCATATG	GGGATTGGTG	GCGACGACTC	CTGGAGCCCG	TCAGTATCGG	4900
CGGAATTACA	GCTGAGCGCC	GGTCGCTACC	ATTACCAGTT	GGTCTGGTGT	4950
CAAAAATAAT	AATAACCGGG	CAGGCCATGT	CTGCCCGTAT	TTCGCGTAAG	5000
GAAATCCATT	ATGTACTION	TAAAAACAC	AACTTTTTGG	ATGTTCCGGT	5050
TATTCTTTTT	CTTTTACTTT	TTTATCATGG	GAGCCTACTT	CCCGTTTTTC	5100
CCGATTTGGC	TACATGACAT	CAACCATATC	AGCAAAAGTG	ATACGGGTAT	5150
TATTTTTGCC	GCTATTTCTC	TGTTCTCGCT	ATTATTCCAA	CCGCTGTTTG	5200
GTCTGCTTTC	TGACAAACTC	GCCCTCGACT	CTAGGCGGCC	GCGGGGATCC	5250

FIGUR 5E

AGACATGATA	AGATACATTG	ATGAGTTTGG	ACAAACCACA	ACTAGAATGC	5300
AGTGAAAAAA	ATGCTTTATT	TGTGAAATTT	GTGATGCTAT	TGCTTTATTT	5350
GTAACCATTA	TAAGCTGCAA	TAAACAAGTT	AACAACAACA	ATTGCATTCA	5400
TTTTATGTTT	CAGGTTCAGG	GGGAGGTGTG	GGAGGTTTTT	TCGGATCCTC	5450
TAGAGTCGAC	GACGCGAGGC	TGGATGGCCT	TCCCCATTAT	GATTCTTCTC	5500
GCTTCCGGCG	GCATCGGGAT	GCCCCGCTG	CAGGCCATGC	TGTCCAGGCA	5550
GGTAGATGAC	GACCATCAGG	GACAGCTTCA	AGGATCGCTC	GCGGCTCTTA	5600
CCAGCCTAAC	TTGATCACT	GGACCGCTGA	TCGTACGGC	GATTTATGCC	5650
GCCTCGGCCA	GCACATGGAA	CGGGTTGGCA	TGGATTGTAG	GCGCCGCCCT	5700
ATACCTTGTC	TGCCTCCCCG	CGTTGCGTCG	CGGTGCATGG	AGCCGGGCCA	5750
CCTCGACCTG	AATGGAAGCC	GGCGGCACCT	CGCTAACGGA	TTCACCACTC	5800
CAAGAATTGG	AGCCAATCAA	TTCTTGCGGA	GAAGTGTGAA	TGCGCAAACC	5850
AACCCTTGGC	AGAACATATC	CATCGCGTCC	GCCATCTCCA	GCAGCCGCAC	5900
GCGGCGCATC	TCGGGCAGCG	TTGGGTCCCTG	GCCACGGGTG	CGCATGATCG	5950
TGCTCCTGTC	GTTGAGGACC	CGGCTAGGCT	GGCGGGGTTG	CCTTACTGGT	6000
TAGCAGAATG	AATCACCGAT	ACGCGAGCGA	ACGTGAAGGG	ACTGCTGCTG	6050
CAAAACGTCT	GCGACCTGAG	CAACAACATG	AATGGTCTTC	GGTTTCCGTC	6100
TTTCGTAAAG	TCTGGAAACG	CGGAAGTCAG	CGCCCTGCAC	CATTATGTTC	6150
CGGATCTGCA	TCGCAGGATG	CTGCTGGCTA	CCCTGTGGAA	CACCTACATC	6200
TGTATTAACG	AAGCCTTTCT	CAATGCTCAC	GCTGTAGGTA	TCTCAGTTGG	6250
GTGTAGGTCG	TTGCTCCAA	GCTGGGCTGT	GTGCACGAAC	CCCCCGTTCA	6300
GCCCCGACCGC	TGCGCCTTAT	CCGGTAACTA	TCGTCTTGAG	TCCAACCEGG	6350
TAAGACACGA	CTTATCGCCA	CTGGCAGCAG	CCACTGGTAA	CAGGATTAGC	6400
AGAGCGAGGT	ATGTAGGCGG	TGCTACAGAG	TTCTTGAAGT	GGTGGCCTAA	6450
CTACGGCTAC	ACTAGAAGGA	CAGTATTTGG	TATCTGCGCT	CTGCTGAAGC	6500
CAGTTACCTT	CGGAAAAGA	GTTGGTAGCT	CTTGATCGGG	CAAACAAACC	6550

FIGUR 5F

ACCGCTGGTA	GCGGTGGTTF	TTTTGTTTGC	AAGCAGCAGA	TTACGCGCAG	6600
AAAAAAGGA	TCTCAAGAAG	ATCCTTTGAT	CTTTTCTACG	GGGTCTGACG	6650
CTCAGTGGAA	CGAAAACCTCA	CGTTAAGGGA	TTTTGGTCAT	GAGATTATCA	6700
AAAAGGATCT	TCACCTAGAT	CCTTTTAAAT	TJ AAAATGAA	GTTTTAAATC	6750
AATCTAAAGT	ATATATGAGT	AAACTTGGTC	TGACAGTTAC	CAATGCTTAA	6800
TCAGTGAGGC	ACCTATCTCA	GCGATCTGTC	TATTTGCTTC	ATCCATAGTT	6850
GCCTGACTCC	CCGTGCTGTA	GATAACTACG	ATACGGGAGG	GCTTACCATC	6900
TGGCCCCAGT	GCTGCAATGA	TACCGCGAGA	CCCACGCTCA	CCGGCTCCAG	6950
ATTTATCAGC	AATAAACCCAG	CCAGCCGGAA	GGGCCGAGCG	CAGAAGTGGT	7000
CCTGCAACTT	TATCCGCCTC	CATCCAGTCT	ATTAATTGTT	GCCGGGAAGC	7050
TAGAGTAAAGT	AGTTGCGCCAG	TAAATAGTTT	GCGCAACGTT	GTTGCCATTG	7100
CTGCAGGCAT	CGTGGTGTC	CGCTCGTCTG	TTGGTATGGC	TTCATTGAGC	7150
TCCGGTTCCC	AACGATCAAG	GCGAGTTACA	TCATCCCCCA	TGTTGTGCAA	7200
AAAAGCGGTT	AGCTCCTTCG	GTCCTCCGAT	CGTTGTCAGA	AGTAAAGTTGG	7250
CCGCAGTGTT	ATCACTCATG	GTTATGCCAG	CACTGCATAA	TTCTCTTACT	7300
GTCATGCCAT	CCGTAAGATG	CTTTTCTGTG	ACTGGTGAGT	ACTCAACCAA	7350
GTCATTCTGA	GAATAGTGTA	TGCGGCGACC	GAGTTGCTCT	TGCCCGGCGT	7400
CAACACGGGA	TAATACCGCG	CCACATAGCA	CAACTTTAAA	AGTGCTCATC	7450
ATTGGAAAAC	GTTCTTCGGG	GCGAAAACCTC	TCAAGGATCT	TACCGCTGTT	7500
GAGATCCAGT	TCGATGTAAAC	CCACTCGTGC	ACCCAACTGA	TCTTCAGCAT	7550
CTTTTACTTT	CACCAGCGTT	TCTGGGTGAG	CAAAAACAGG	AAGGCAAAAT	7600
GCCGCAAAAA	AGGGAATAAG	GGCGACACGG	AAATGTTGAA	TACTCATACT	7650
CTTCCTTTTT	CAATATTATT	GAAGCATTTA	TCAGGGTTAT	TGTCTCATGA	7700
GCGGATACAT	ATTTGAATGT	ATTTAGAAAA	ATAAACAAAT	AGGGGTTCCG	7750
CGCACATTTT	CCCGAAAAGT	GCCACCTGAC	GTCTAAGAAA	CCATTATTAT	7800
CATGACATTA	ACCTATAAAA	ATAGGCGTAT	CACGAGGCC	TTTCGTCTTC	7850
AA					7852

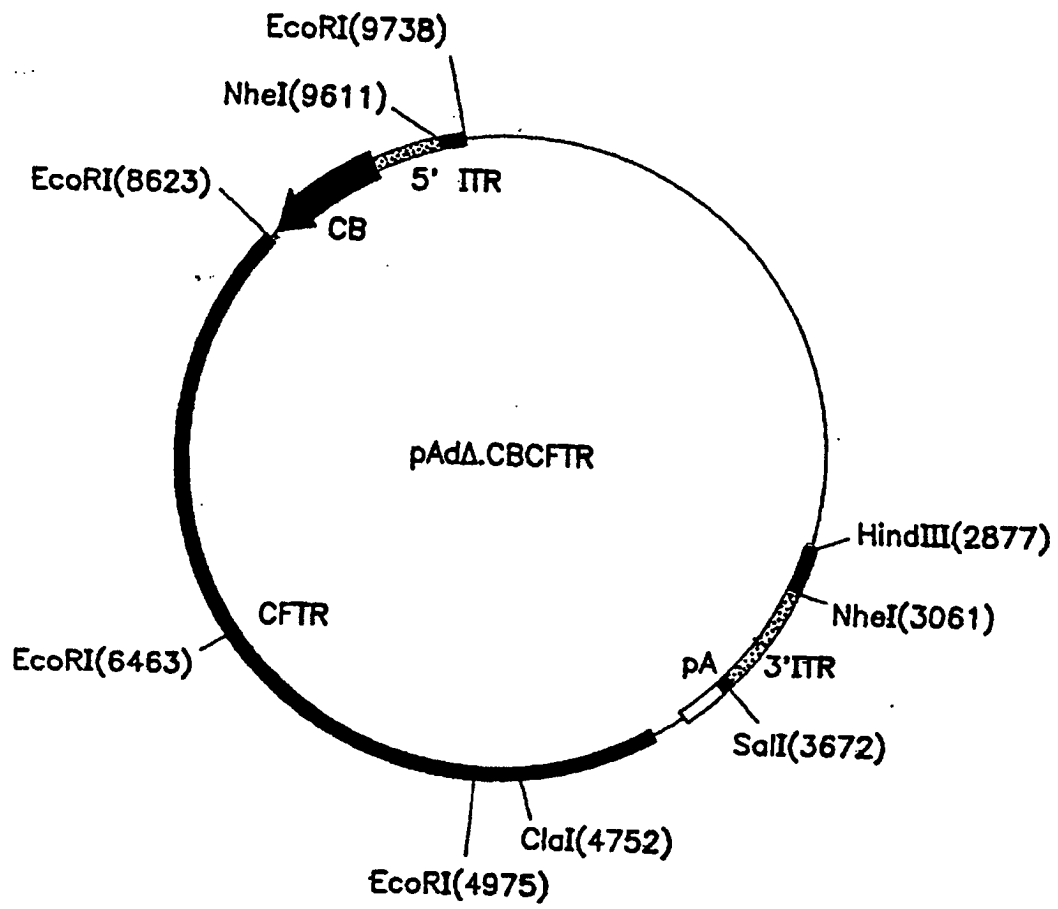


FIG. 6

FIGUR 7A

TCTTCCGCTT	CCTCGCTCAC	TGACTCGCTG	CGCTCGGTCG	TTCGGCTGCG	50
GCGAGCGGTA	TCAGCTCACT	CAAAGGCGGT	AATACGGTTA	TCCACAGAAT	100
CAGGGGATAA	CGCAGGAAAG	AACATGTGAG	CAAAGGCCA	GCAAAAGGCC	150
AGGAACCGTA	AAAAGGCCGC	GTTGCTGGCG	TTTTTCCATA	GGCTCCGCC	200
CCCTGACGAG	CATCACAAA	ATCGACGCTC	AAGTCAGAGG	TGGCGAAACC	250
CGACAGGACT	ATAAAGATAC	CAGGCGTTTC	CCCCTGGAAG	CTCCCTCGTG	300
CGCTCTCCTG	TTCCGACCCT	GCCGCTTACC	GGATACCTGT	CCGCCTTTCT	350
CCCTTCGGGA	AGCGTGGCGC	TTTCTCATAG	CTCACGCTGT	AGGTATCTCA	400
GTTTCGGTGT	GGTCGTTTCG	TCCAAGCTGG	GCTGTGTGCA	CGAACCCCC	450
GTTTCAGCCCG	ACCGCTGCGC	CTTATCCGGT	AACTATCGTC	TTGAGTCCAA	500
CCCGGTAAGA	CACGACTTAT	CGCCACTGGC	AGCAGCCACT	GGTAACAGGA	550
TTAGCAGAGC	GAGGTATGTA	GGCGGTGCTA	CAGAGTTCTT	GAAGTGGTGG	600
CCTAACTACG	GCTACACTAG	AAGAACAGTA	TTGGTATCT	GCGCTCTGCT	650
GAAGCCAGTT	ACCTTCGGAA	AAAGAGTTGG	TAGCTCTTGA	TCCGGCAAAC	700
AAACCACCGC	TGGTAGCGGT	GGTTTTTTTG	TTTGCAAGCA	GCAGATTACG	750
CGCAGAAAAA	AAGGATCTCA	AGAAGATCCT	TTGATCTTTT	CTACGGGGTC	800
TGACGCTCAG	TGGAACGAAA	ACTCACGTTA	AGGGATTTTG	GTCATGAGAT	850
TATCAAAAAG	GATCTTCACC	TAGATCCTTT	TAAATTAAAA	ATGAAGTTTT	900
AAATCAATCT	AAAGTATATA	TGAGTAAACT	TGGTCTGACA	GTTACCAATG	950
CTTAATCAGT	GAGGCACCTA	TCTCAGCGAT	CTGTCTATTT	CGTTCATCCA	1000
TAGTTGCCTG	ACTCCCCGTC	GTGTAGATAA	CTACGATACG	GGAGGGCTTA	1050
CCATCTGGCC	CCAGTGCTGC	AATGATACCG	CCAGACCCAC	GCTCACCOCG	1100
TCCAGATTTA	TCAGCAATAA	ACCAGCCAGC	CGGAAGGGCC	GAGCGCAGAA	1150
GTGGTCTGTC	AACTTTATCC	GCCTCCATCC	AGTCTATTAA	TGTTGCOGG	1200
GAAGCTAGAG	TAAGTAGTTC	GCCAGTTAAT	AGTTTGCGCA	ACGTTGTTGC	1250
CATTGCTACA	GSCATCGTGG	TGTCACGCTC	GTCGTTTGGT	ATGGCTTCAT	1300

FIGUR 7B

TCAGCTCCGC	TTCCCAACGA	TCAAGGCGAG	TTACATGATC	CCCCATGTTG	1350
TGCAAAAAG	CGGTTAGCTC	CTTCGGTCCT	CCGATCGTTG	TCAGAAGTAA	1400
GTTGGCCGCA	GTGTTATCAC	TCATGGTTAT	GGCAGCACTG	CATAATTCTC	1450
TTACTGTTCAT	GCCATCCGTA	AGATGCTTTT	CTGTGACTGG	TGAGTACTCA	1500
ACCAAGTCAT	TCTGAGAATA	GTGTATGCGG	CGACCGAGTT	GCTCTTGCCC	1550
GGCGTCAATA	CGGGATAATA	CCGCGCCACA	TAGCAGAACT	TTAAAAGTGC	1600
TCATCATTGG	AAAACGTTCT	TCGGGGCGAA	AACTCTCAAG	GATCTTACGG	1650
CTGTTGAGAT	CCAGTTCGAT	GTAACCCACT	CGTGCACCCA	ACTGATCTTC	1700
AGCATCTTTT	ACTTTCACCA	GCGTTTCTGG	GTGAGCAAAA	ACAGGAAGGC	1750
AAAATGCCGC	AAAAAAGGGA	ATAAGGGCGA	CACGGAAATG	TTGAATACTC	1800
ATACTCTTCC	TTTTTCAATA	TTATTGAAGC	ATTTATCAGG	GTTATTGTCT	1850
CATGAGCGGA	TACATATTTG	AATGTATTTA	GAAAAATAAA	CAATAGGGG	1900
TTCCGCGCAC	ATTTCCCCGA	AAAGTGCCAC	CTGACGTCTA	AGAAACCATT	1950
ATTATCATGA	CATTAACCTA	TAAAAATAGG	CGTATCACGA	GGCCCTTTCG	2000
TCTCGCGCGT	TTCCGGTGATG	ACGGTGAAAA	CCTCTGACAC	ATGCAGCTCC	2050
CGGAGACGGT	CACAGCTTGT	CTGTAAGCGG	ATGCCGGGAG	CAGACAAGCC	2100
CGTCAGGGCG	CGTCAGCGGG	TGTTGGCGGG	TGTCGGGGCT	GGCTTAACTA	2150
TGCGGCATCA	GAGCAGATTG	TACTGAGAGT	GCACCATAAA	ATTGTAAACG	2200
TTAATATTTT	GTTAAAATTC	GCGTTAAATT	TTTGTTAAAT	CAGCTCATTT	2250
TTTAACCAAT	AGGCCGAAAT	CGGCAAAATC	CCTTATAAAT	CAAAAAGAATA	2300
GCCCGAGATA	GGGTTGAGTG	TTGTTCCAGT	TTGGAACAAG	AGTCCACTAT	2350
TAAAGAACGT	GGACTCCAAC	GTCAAAGGGC	GAAAAACCGT	CTATCAGGGC	2400
GATGGCCCAC	TACGTGAACC	ATCACCCAAA	TCAAGTTTTT	TGGGGTTCGAG	2450
GTGCCGTAAA	GCACTAAATC	GGAACCCTAA	AGGGAGCCCC	CGATTTAGAG	2500
CTTGACGGGG	AAAGCCGGCG	AACGTGGCGA	GAAAGGAAGG	GAAGAAAGCG	2550
AAAGGAGCGG	GCGCTAGGGC	GCTGGCAAGT	GTAGCGGTCA	CGCTGCGGGT	2600

FIGUR 7C

AACCACCACA	CCCGCCGCGC	TTAATGCGCC	GCTACAGGGC	GCGTACTATG	2650
GTTGCTTTGA	CGTATGCGGT	GTGAAATACC	GCACAGATGC	GTAAGGAGAA	2700
AATACCGCAT	CAGGCGCCAT	TCGCCATTCA	GGCTGCGCAA	CTGTTGGGAA	2750
GGGCGATCGG	TGCGGGCCTC	TTCGCTATTA	CGCCAGCTGG	CGAAAGGGGG	2800
ATGTGCTGCA	AGGCGATTAA	GTTGGGTAAC	GCCAGGGTTT	TCCCAGTCAC	2850
GACGTTGTAA	AACGACGGCC	AGTGCCAAGC	TTAAGGTGCA	CGGCCCCACGT	2900
GGCCACTAGT	ACTTCTCGAG	CTCTGTACAT	GTCCGCGGTC	GCGACGTACG	2950
CGTATCGATG	GCGCCAGCTG	CAGGCGGCCG	CCATATGCAT	CCTAGGCCTA	3000
TTAATATTCC	GGAGTATACG	TAGCCGGCTA	ACGTTAACAA	CCGGTACCTC	3050
TAGAACTATA	GCTAGCCAAT	TCCATCATCA	ATAATATACC	TTATTTTGGAA	3100
TTGAAGCCAA	TATGATAATG	AGGGGGTGGA	GTTTGTGACG	TGGCGCGGGG	3150
CGTGGGAACG	GGGCGGGTGA	CGTAGGTTTT	AGGGCGGAGT	AACTTGTATG	3200
TGTTGGGAAT	TGTAGTTTTC	TTAAAATGGG	AAGTTACGTA	ACGTGGGAAA	3250
ACGGAAGTGA	CGATTTGAGG	AAGTTGTGGG	TTTTTTGGCT	TTCGTTTTCTC	3300
GGCGTAGGTT	CGCGTGCGGT	TTTCTGGGTG	TTTTTTGTGG	ACTTTAACCG	3350
TTACGTCATT	TTTTAGTCCT	ATATATACTC	GCTCTGCACT	TGGCCCTTTT	3400
TTACACTGTG	ACTGATTGAG	CTGGTGCCGT	GTCGAGTGGT	GTTTTTTTAA	3450
TAGGTTTTCT	TTTTTACTGG	TAAGGCTGAC	TGTTAGGCTG	CCGCTGTGAA	3500
GCGCTGTATG	TTGTTCTGGA	GCGGGAGGGT	GCTATTTTGC	CTAGGCAGGA	3550
GGGTTTTTCA	GGTGTTTATG	TGTTTTTCTC	TCCTATTAAT	TTTGTTATAC	3600
CTCCTATGGG	GGCTGTAATG	TTGTCTCTAC	GCCTGCGGGT	ATGTATTCCC	3650
CCCAAGCTTG	CATGCCTGCA	GGTCGACTCT	AGAGGATCCG	AAAAAACCTC	3700
CCACACCTCC	CCCTGAACCT	GAAACATAAA	ATGAATGCAA	TTGTTGTTGT	3750
TAACTTGTTT	ATTGCAGCTT	ATAATGGTTA	CAAATAAAGC	AATAGCATCA	3800
CAAATTCAC	AAATAAAGCA	TTTTTTTCAC	TGCATTCTAG	TTGTGGTTTG	3850
TCCAAACTCA	TCAATGTATC	TTATCATGTC	TGGATCCCCC	TAGCTTGCCA	3900

FIGUR 7D

AACCTACAGG	TGGGGTCTTT	CATTCCCCC	TTTTTCTGGA	GACTAAATAA	3950
AATCTTTTAT	TTTATCTATG	GCTCGTACTC	TATAGGCTTC	AGCTGGTGAT	4000
ATTGTTGAGT	CAAACTAGA	GCCTGGACCA	CTGATATCCT	GTCTTTAACA	4050
AATTGGACTA	ATCGCGGGAT	CAGCCAATTC	CATGAGCAA	TGTCCCATGT	4100
CAACATTTAT	GCTGCTCTCT	AAAGCCTTGT	ATCTTGCATC	TCTTCTTCTG	4150
TCTCCTCTTT	CAGAGCAGCA	ATCTGGGGCT	TAGACTTGCA	CTTGCTTGAG	4200
TTCCGGTGGG	GAAAGAGCTT	CACCCTGTCTG	GAGGGGCTGA	TGGCTTGCCG	4250
GAAGAGGCTC	CTCTCGTTCA	GCAGTTTCTG	GATGGAATCG	TACTGCCGCA	4300
CTTTGTTCTC	TTCTATGACC	AAAAATTGTT	GGCATTCCAG	CATTGCTTCT	4350
ATCCTGTGTT	CACAGAGAAT	TACTGTGCAA	TCAGCAAATG	CTTGTTTTAG	4400
AGTTCTTCTA	ATTATTTGGT	ATGTTACTGG	ATCCAAATGA	GCACTGGGTT	4450
CATCAAGCAG	CAAGATCTTC	GCCTTACTGA	GAACAGATCT	AGCCAAGCAC	4500
ATCAACTGCT	TGTGGCCATG	GCTTAGGACA	CAGCCCCCAT	CCACAAGGAC	4550
AAAGTCAAGC	TTCCCAGGAA	ACTGTTCTAT	CACAGATCTG	AGCCCAACCT	4600
CATCTGCAAC	TTTCCATATT	TCTTGATCAC	TCCACTGTTC	ATAGGGATCC	4650
AAGTTTTTTC	TAAATGTTCC	AGAAAAATA	AATACTTTCT	GTGGTATCAC	4700
TCCAAAGGCT	TTCTCCACT	GTTGCAAAGT	TATTGAATCC	CAAGACACAC	4750
CATCGATCTG	GATTTCTCCT	TCAGTGTTCA	GTAGTCTCAA	AAAAGCTGAT	4800
AACAAAGTAC	TCTTCCCTGA	TCCAGTTCTT	CCCAAGAGGC	CCACCCTCTG	4850
GCCAGGACTT	ATTGAGAAGG	AAATGTTCTC	TAATATGGCA	TTTCCACCTT	4900
CTGTGTATTT	TGCTGTGAGA	TCTTTGACAG	TCATTTGGCC	CCCTGAGGGC	4950
CAGATGTCAT	CTTCTTCAC	GTGTGAATTC	TCAATAATCA	TAACTTTGGA	5000
GAGTTGGCCA	TTCTTGATG	GTTTGGTTGA	CTTGGTAGGT	TTACCTTCTG	5050
TTGGCATGTC	AATGAACTTA	AAGACTCGGC	TCACAGATCG	CATCAAGCTA	5100
TCCACATCTA	TGCTGGAGTT	TACAGCCCAC	TGCAATGTAC	TCATGATATT	5150
CATGGCTAAA	GTCAGGATAA	TACCAACTCT	TCCTTCTCCT	TCTCCTGTTG	5200

FIGUR 7E

TTAAATGGA AATGAAGGTÀ ACAGCAATGA AGAAGATGAC AAAAATCATT 5250
 TCTATTCTCA TTTGGAACCA GCGCAGTGTT GACAGGTACA AGAACCAGTT 5300
 GGCAGTATGT AAATTCAGAG CTTTGTGGAA CAGAGTTTCA AAGTAAGGCT 5350
 GCCGTCCGAA GGCACGAAGT GTCCATAGTC CTTTTAAGCT TGTAACAAGA 5400
 TGAGTGAAAA TTGGACTCCT GCCTTCAGAT TCCAGTTGTT TGAGTTGCTG 5450
 TGAGGTTTGG AGGAAATATG CTCTCAACAT AATAAAAGCC ACTATCACTG 5500
 GCACTGTTGC AACAAAGATG TAGGGTTGTA AACTGCGAC AACTGCTATA 5550
 GCTCCAATCA CAATTAATAA CAACTGGATG AAGTCAAATA TGGTAAGAGG 5600
 CAGAAGGTCA TCCAAAATTG CTATATCTTT GGAGAATCTA TTAAGAATCC 5650
 CACCTGCTTT CAACGTGTTG AGGGTTGACA TAGGTGCTTG AAGAACAGAA 5700
 TGTAACATTT TGTGGTGTA AATTTTCGAC ACTGTGATTA GAGTATGCAC 5750
 CAGTGGTAGA CCTCTGAAGA ATCCCATAGC AAGCAAAGTG TCGGCTACTC 5800
 CCACGTAAAT GTAAAACACA TAATACGAAC TGGTGCTGGT GATAATCACT 5850
 GCATAGCTGT TATTTCTACT ATGAGTACTA TTCCCTTTGT CTTGAAGAGG 5900
 AGTGTTTCCA AGGAGCCACA GCACAACCAA AGAAGCAGCC ACCTCTGCCA 5950
 GAAAAATTAC TAAGCACCAA ATTAGCACAA AAATTAAGCT CTTGTGGACA 6000
 GTAATATATC GAAGGTATGT GTTCCATGTA GTCAGTCTG GTATGCTCTC 6050
 CATATCATCA AAAAAGCACT CCTTTAAGTC TTCTTCGTTA ATTTCTTCAC 6100
 TTATTTCCAA GCCAGTTTCT TGAGATAACC TTCTTGAATA TATATCCAGT 6150
 TCAGTCAAGT TTGCCTGAGG GGCCAGTGAC ACTTTTCGTG TGGATGCTGT 6200
 TGTCTTTCCG TGAATGTTCT GACCTTGGTT AACTGAGTGT GTCATCAGGT 6250
 TCAGGACAGA CTGCCTCCTT CGTGCCTGAA GCGTGGGGCC AGTGCTGATC 6300
 ACGCTGATGC GAGGCAGTAT CGCCTCTCCC TGCTCAGAAT CTGGTACTAA 6350
 GGACAGCCTT CTCTCTAAAG GCTCATCAGA ATCCTCTTCG ATGCCATPCA 6400
 TTTGTAAGGG AGTCTTTTGC ACAATGGAAA ATTTTCGTAT AGAGTTGATT 6450
 GGATTGAGAA TAGAATTCCT CCTTTTTTCC CCAAACCTCTC CAGTCTGTTT 6500

FIGUR 7F

AAAAGATTGT	TTTTTTGTTT	CTGTCCAGGA	GACAGGAGCA	TCTCCTTCTA	6550
ATGAGAAACG	GTGTAAGGTC	TCAGTTAGGA	TTGAATTTCT	TCTTTCTGCA	6600
CTAAATTGGT	CGAAAGAATC	ACATCCCATG	AGTTTTGAGC	TAAAGTCTGG	6650
CTGTAGATTT	TGGAGTTCTG	AAAATGTCCC	ATAAAAATAG	CTGCTACCTT	6700
CATGCAAAAT	TAATATTTTG	TCAGCTTTCT	TTAAATGTTC	CATTTTAGAA	6750
GTGACCAAAA	TCCTAGTTTT	GTTAGCCATC	AGTTTACAGA	CACAGCTTTC	6800
AAATATTTCT	TTTTCTGTTA	AAACATCTAG	GTATCCAAAA	GGAGAGTCTA	6850
ATAAATACAA	ATCAGCATCT	TTGTATACTG	CTCTTGCTAA	AGAAATTCTT	6900
GCTCGTTGAC	CTCCACTCAG	TGTGATTCCA	CCTTCTCCAA	GAACTATATT	6950
GTCTTTCTCT	GCAAACCTGG	AGATGTCCTC	TTCTAGTTGG	CATGCTTTGA	7000
TGACGCTTCT	GSTATCTATAT	TCATCATAGG	AAACACCAAA	GATGATATTT	7050
TCTTTAATGG	TGCCAGGCAT	AATCCAGGAA	AACTGAGAAC	AGAATGAAAT	7100
TCTTCCACTG	TGCTTAATTT	TACCCTCTGA	AGGCTCCAGT	TCTCCATAA	7150
TCATCATTAG	AAGTGAAGTC	TTGCCTGCTC	CAGTGGATCC	AGCAACCGCC	7200
AACAACCTGTC	CTCTTCTAT	CTTGAAATTA	ATATCTTTCA	GGACAGGAGT	7250
ACCAAGAAGT	GAGAAATTAC	TGAAGAAGAG	GCTGTCATCA	CCATTAGAAG	7300
TTTTTCTATT	GTTATTGTTT	TGTTTTGCTT	TCTCAAATAA	TTCCCCAAT	7350
CCCTCCTCCC	AGAAGGCTGT	TACATTCTCC	ATCACTACTT	CTGTAGTCGT	7400
TAAGTTATAT	TCCAATGTCT	TATATTCTTG	CTTTTGTAAG	AAATCCTGTA	7450
TTTTGTTTAT	TGCTCCAAGA	GAGTCATACC	ATGTTTGAC	AGCCCAGGGA	7500
AATTGCCGAG	TGACCGCCAT	GCGCAGAACA	ATGCAGAATG	AGATGGTGGT	7550
GAATATTTTC	CGGAGGATGA	TTCCTTTGAT	TAGTGATAG	GGAAGCACAG	7600
ATAAAAACAC	CACAAAGAAC	CCTGAGAAGA	AGAAGGCTGA	GCTATTGAAG	7650
TATCTCACAT	AGGCTGCCTT	CCGAGTCAGT	TTCAGTTCTG	TTTGTCTTAA	7700
GTTTTCAATC	ATTTTTTCCA	TTGCTTCTTC	CCAGCAGTAT	GCCTTAACAG	7750
ATTGGATGTT	CTCGATCATT	TCGAGGTAA	TCACAAGTCT	TTCACTGATC	7800

FIGUR 7G

TTCCCAGCTC	TCTGATCTCT	GTACTTCATC	ATCATTCTCC	CTAGCCCAGC	7850
CTGAAAAGG	GCAAGGACTA	TCAGGAAACC	AAGTCCACAG	AAGGCAGACG	7900
CCTGTAACAA	CTCCCAGATT	AGCCCCATGA	GGAGTGCCAC	TGCAAAGGA	7950
GCGATCCACA	CGAAATGTGC	CAATGCAAGT	CCTTCATCAA	ATTTGTTCAG	8000
GTTGTTGGAA	AGGAGACTAA	CAAGTTGTCC	AATACTTATT	TTATCTAGAA	8050
CACGGCTTGA	CAGCTTTAAA	GTCTTCTTAT	AAATCAAAC	AAACATAGCT	8100
ATTCTCATCT	GCATTCCAAT	GTGATGAAGG	CCAAAAATGG	CTGGGTGTAG	8150
GAGCAGTGTC	CTCACAATAA	AGAGAAGGCA	TAAGCCTATG	CCTAGATAAA	8200
TCGCGATAGA	GCGTTCCTCC	TTGTTATCCG	GGTCATAGGA	AGCTATGATT	8250
CTTCCCAGTA	AGAGAGGCTG	TACTGCTTTG	GTGACTTCCC	CTAAATATAA	8300
AAAGATTCCA	TAGAACATAA	ATCTCCAGAA	AAAACATCGC	CGAAGGGCAT	8350
TAATGAGTTT	AGGATTTTTC	TTTGAAGCCA	GCTCTCTATC	CCATTCTCTT	8400
TCCAATTTTT	CAGATAGATT	GTCAGCAGAA	TCAACAGAAG	GGATTTGGTA	8450
TATGTCTGAC	AATTCCAGGC	GCTGTCTGTA	TCCTTTCCTC	AAAATTGGTC	8500
TGGTCCAGCT	GAAAAAAGT	TTGGAGACAA	CGCTGGCCTT	TTCCAGAGGC	8550
GACCTCTGCA	TGGTCTCTCG	GGCGCTGGGG	TCCCTGCTAG	GGCCGTCTGG	8600
GCTCAAGCTC	CTAATGCCAA	AGGAATTCC	GCAGCCCGGG	GGATCCACTA	8650
GTTCTAGAGC	GGCCGCCACC	GCGGTGGCTG	ATCCCGCTCC	CGCCCGCGGC	8700
GCGCTTCGCT	TTTTATAGGG	CCGCCGCCGC	CGCCGCCTCG	CCATAAAAGG	8750
AACTTTCGG	AGCGCGCCGC	TCTGATTGGC	TGCCCGCCGA	CCTCTCCGCC	8800
TCGCCCCGCC	CCGCCCCCTG	CCCCGCCCCG	CCCCGCCTGG	CGCGCGCCCC	8850
CCCCCCCCC	CCGCCCCCAT	CGCTGCACAA	AATAATTAAA	AAATAAATAA	8900
ATACAAAATT	GGGGGTGGGG	AGGGGGGGGA	GATGGGGAGA	GTGAAGCAGA	8950
ACGTGGCCTC	GAGTAGATGT	ACTGCCAAGT	AGGAAAGTCC	CATAAGGTCA	9000
TGTACTGGGC	ATAATGCCAG	GCGGGCCATT	TACCGTCATT	GACGTCAATA	9050
GGGGCGTAC	TTGGCATATG	ATACACTTGA	TGTACTGCCA	AGTGGGCAGT	9100

FIGUR 7H

TTACCGTAAA TACTCCACCC	ATTGACGTCA ATGGAAAGTC	CCTATTGGCG	9150
TTACTATGGG AACATACGTC	ATTATTGACG TCAATGGGCG	GGGGTCGTTG	9200
GGCGGTCAGC CAGGCGGGCC	ATTTACCGTA AGTTATGTAA	CGACCTGCAG	9250
GCTGATCTCC CTAGACAAAT	ATTACGCGCT ATGAGTAACA	CAAAATTATT	9300
CAGATTTAC TTCCTCTTAT	TCAGTTTCC CGCGAAAATG	GCCAAATCTT	9350
ACTCGGTTAC GCCCAAATTT	ACTACAACAT CCGCCTAAAA	CCGCGCGAAA	9400
ATTGTCACTT CCTGTGTACA	CCGGCGCACA CCAAAAACGT	CACTTTTGCC	9450
ACATCCGTCG CTTACATGTG	TTCCGCCACA CTTGCAACAT	CACACTTCCG	9500
CCACACTACT ACGTCACCCG	CCCCGTTCCC ACGCCCCGCG	CCACGTCACA	9550
AACTCCACCC CCTCATTATC	ATATTGGCTT CAATCCAAAA	TAAGGTATAT	9600
TATTGATGAT GCTAGCATGC	GCAAATTTAA AGCGCTGATA	TCGATCGCGC	9650
GCAGATCTGT CATGATGATC	ATTGCAATTG GATCCATATA	TAGGGCCCGG	9700
GTTATAATTA CCTCAGGTCG	ACGTCCCATG GCCATTGAA	TTCGTAATCA	9750
TGGTCATAGC TGTTTCCTGT	GTGAAATTGT TATCCGCTCA	CAATTCACA	9800
CAACATACGA GCCGGAAGCA	TAAAGTGTA AGCCTGGGGT	GCCTAATGAG	9850
TGAGCTAACT CACATTAATT	GCGTTGCGCT CACTGCCCCG	TTCCAGTCG	9900
GGAAACCTGT CGTGCCAGCT	GCATTAATGA ATCGGCCAAC	GCGCGGGGAG	9950
AGGCGGTTG CGTATTGGGC	GC		9972

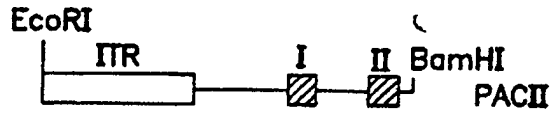


FIG. 8A

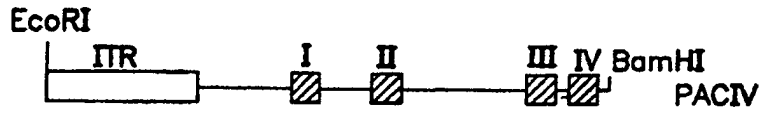


FIG. 8B

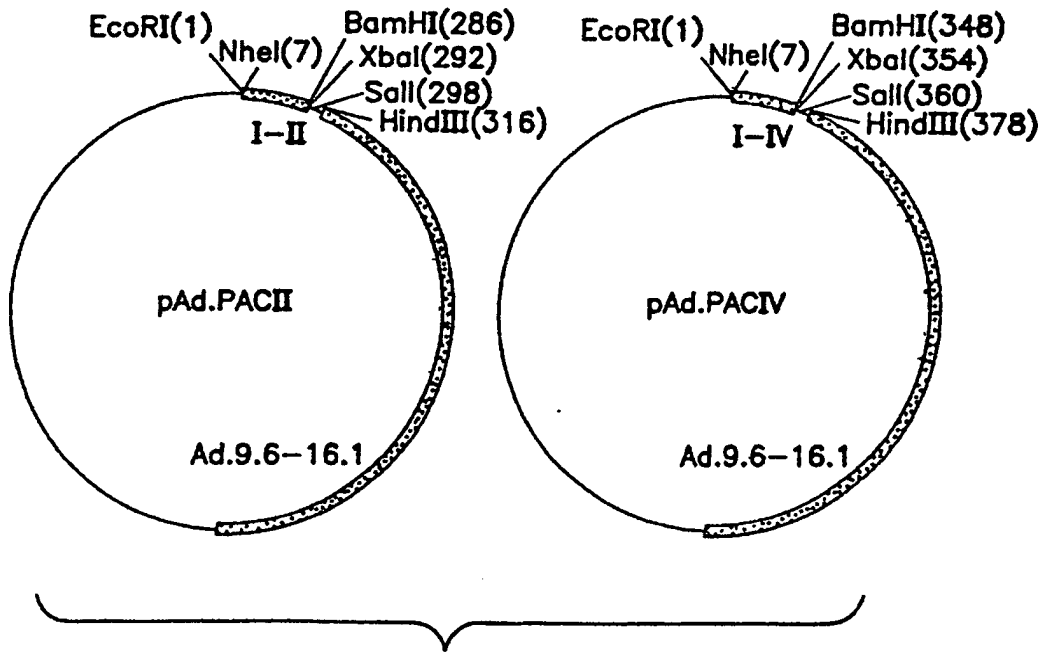
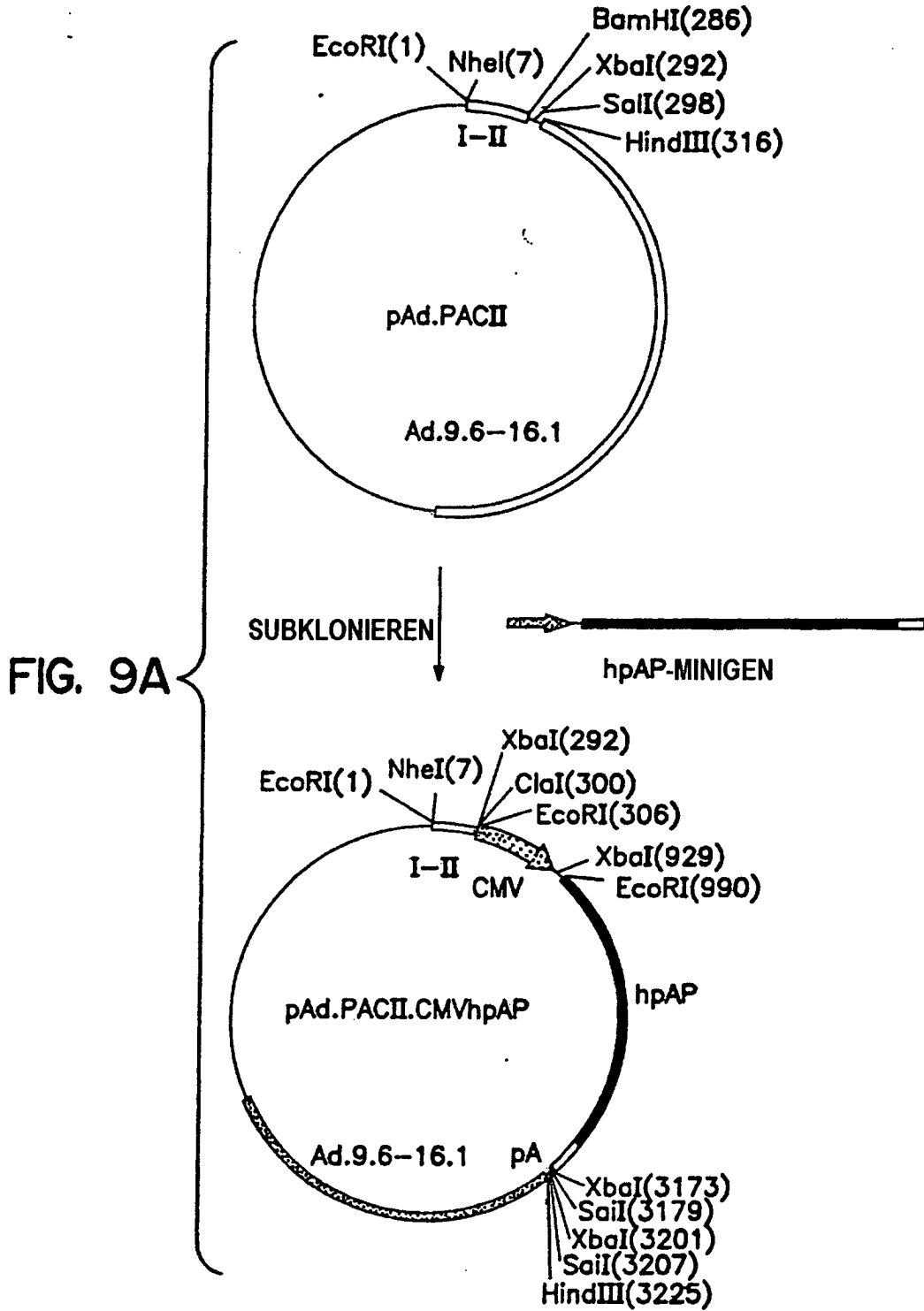


FIG. 8C



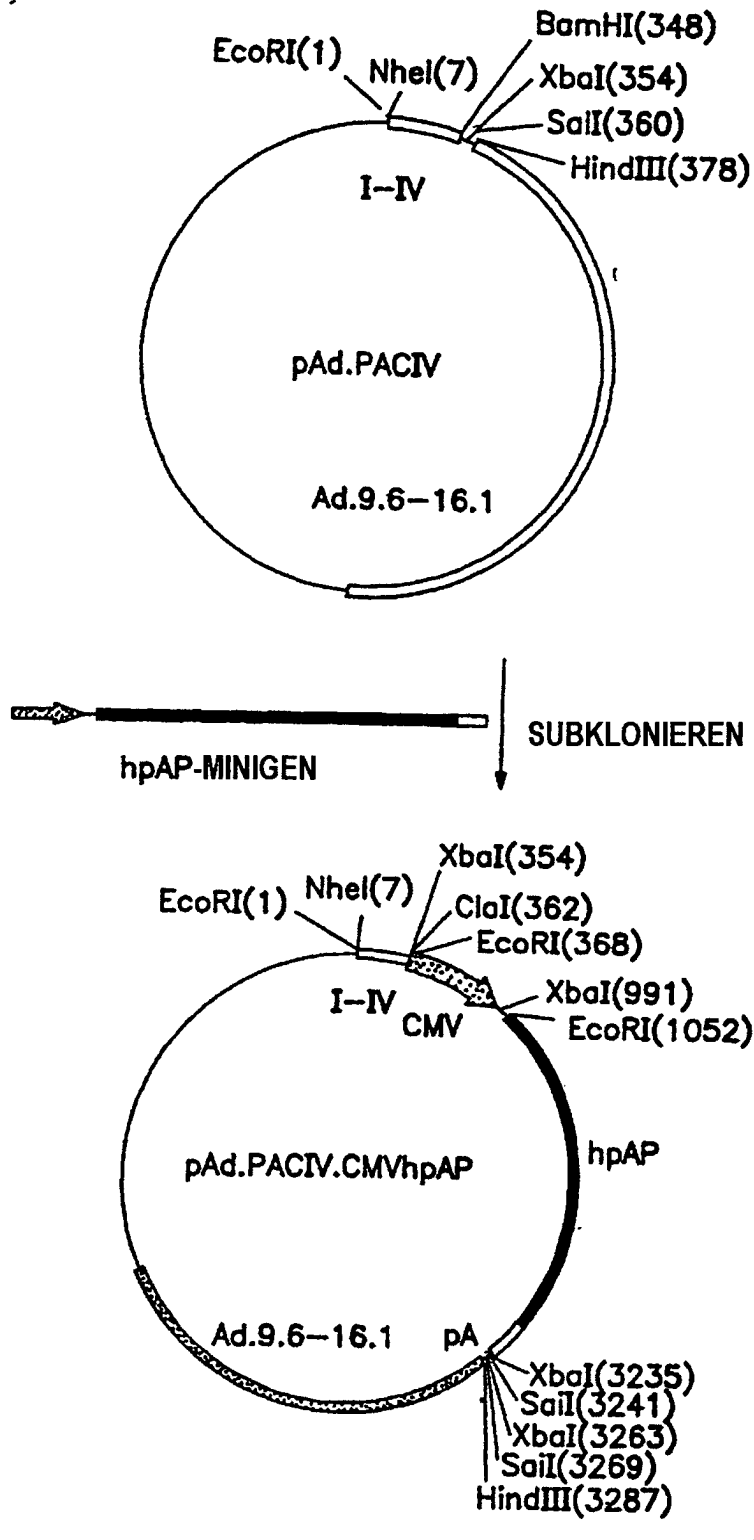
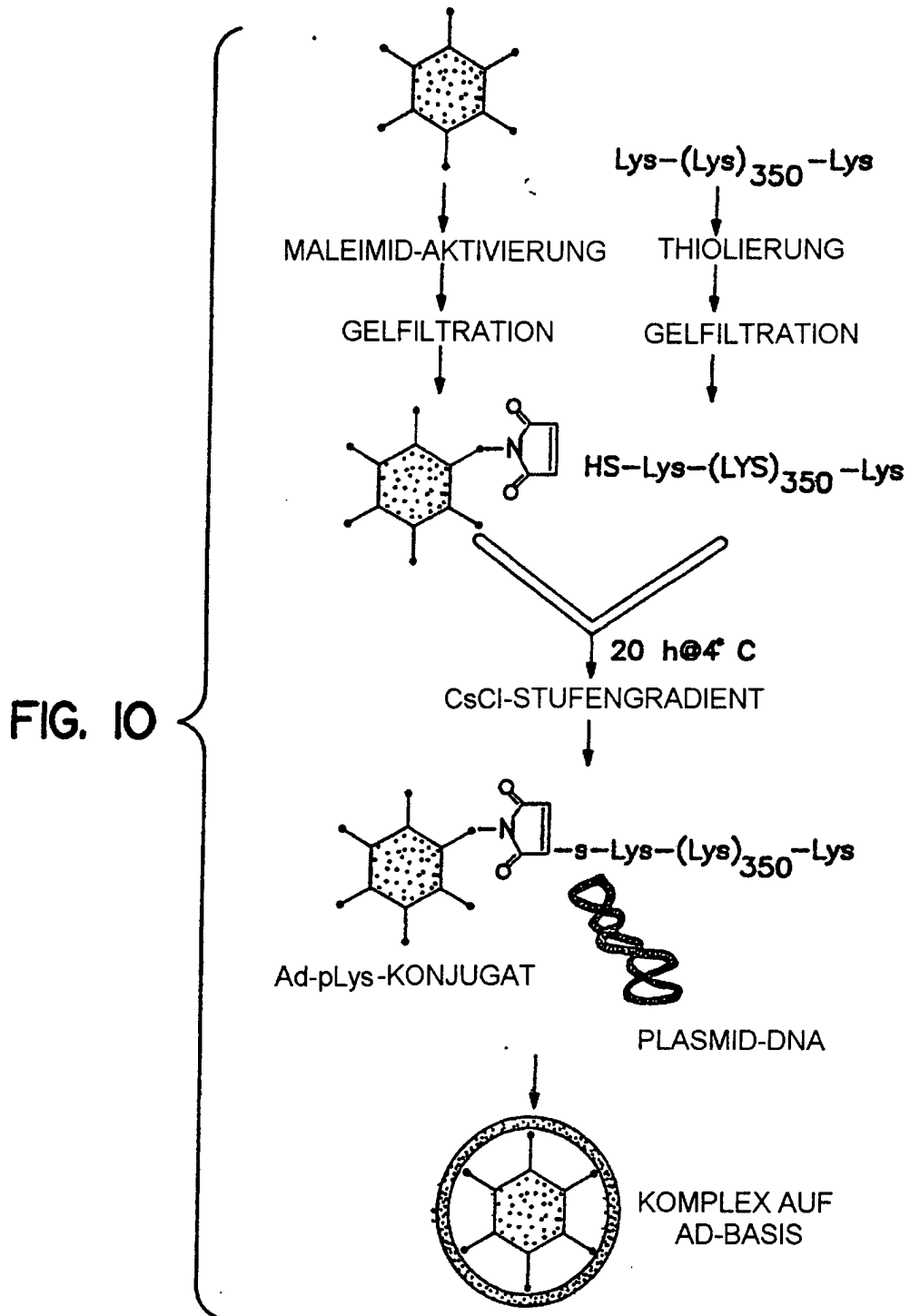


FIG. 9B



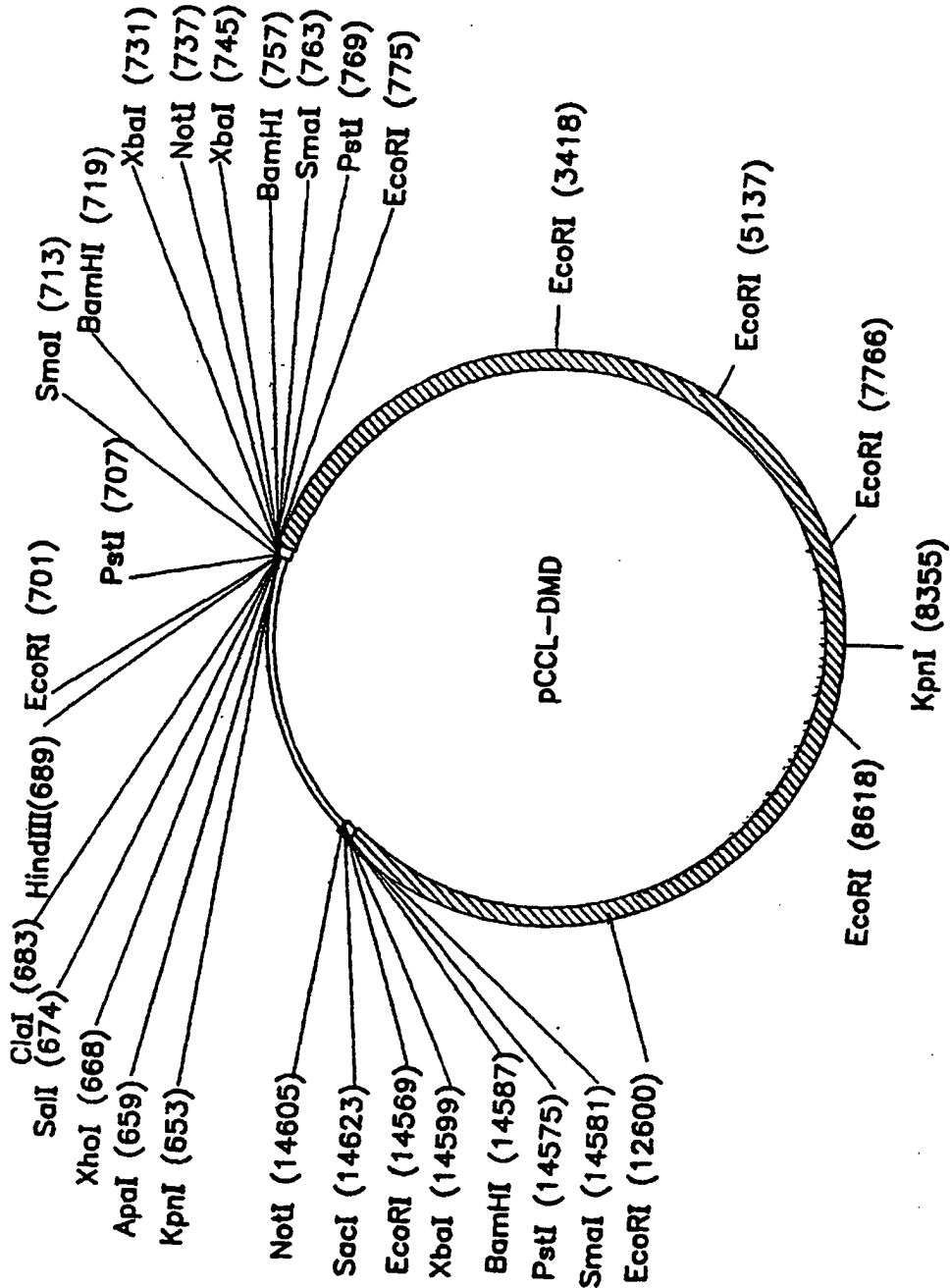


FIG. 11

FIGUR 12A

CCAATCCAT CATCAATAAT ATACCTTATT TTGGATTGAA GCCAATATGA	50
TAATGAGGGG GTGGAGTTTG TGACGTGGCG CGGGGCGTGG GAACGGGGCG	100
GGTGACGTAG GTTTTAGGGC GGAGTAACTT GTATGTGTTG GGAATTGTAG	150
TTTTCTTAAA ATGGGAAGTT ACGTAACGTG GGAAAACGGA AGTGACCATT	200
TGAGGAAGTT GTGGGTTTTT TGGCTTTCGT TTCTGGGCGT AGGTTCCGCT	250
GCGGTTTTCT GGGTGTTTTT TGTGGACTTT AACCGTTACG TCATTTTTTA	300
GTCCTATATA TACTCGCTCT GCACTTGGCC CTTTTTACA CTGTGACTGA	350
TTGAGCTGGT GCCGTGTCGA GTGGTGTFFF TTTAATAGGT TTTCTTTTTT	400
ACTGGTAAGG CTGACTGTTA GGCTGCCGCT GTGAAGCGCT GTATGTTGTT	450
CTGGAGCGGG AGGGTGCTAT TTTGCCTAGG CAGGAGGGTT TTTCAGGTGT	500
TTATGTGTTT TTCTCTCCTA TTAATTTTGT TATACCTCCT ATGGGGGCTG	550
TAATGTTGTC TCTACGCCTG CGGGTATGTA TTCCCCCAA GCTTGCATGC	600
CTGCAGGTCG ACTCTAGAGG ATCCGAAAA ACCTCCCACA CCTCCCCCTG	650
AACCTGAAAC ATAAAAAGAA TGCAATTGTT GTTGTTAACT TGTTTATGTC	700
AGCTTATAAT GGTTACAAAT AAAGCAATAG CATCACAAAT TTCACAAATA	750
AAGCATTTTT TTCACTGCAT TCTAGTTGTG GTTTGTCCAA ACTCATCAAT	800
GTATCTTATC ATGTCTGGAT CCCCGGGCC GCTCTAGAAC TAGTGGATCC	850
CCCCGGCTGC AGGAATCCG TAACATAACT GCGTGCTTTA TTGAGATACA	900
CAGTAAAGCA GTAATATAAT ACAATAGTAA GGCATATATT TGGTGAAATC	950
TGATATGTTG TGAAAATGCA GTAAAACCTGA AGTTTAAAAA AATAATTAGT	1000
AAATGTTACA GTGTTGGTGT TAAAACACAA TCTATTATGA TACTCAAGTA	1050
AGAGTCCAGT ACCTGGAGAC AATGATGATA CATGCCATGT GATGATTATG	1100
CTTCAGTTAC ACTGATTATG ATTTACACTT TAATACTTGA TGGTTATAAA	1150
GAACATGAAA TGATGTCCAA ATTATGCTTA AAATCAGCAA TAAAGCTCTC	1200
AGTTTTTATT CAAATATTTT GATAGATTCA CTCCAGAACT AATATCTAAA	1250

FIGUR 12B

AGATAAAACG	AAAAGATTAA	AACAAAATA	TGCACTCTAT	CTACCTTGGA	1300
TTTTAGAATG	AAACTTAAA	CTTCTTAGTA	GGAAAGGAAC	CCCTTGTTTT	1350
AAATCTTGGT	GAAAACAAAT	CCTTGGATAA	AGAAAATGCC	CAGTGCCACA	1400
TAAAGGAGAG	AGAGAGAGAA	AAGCAAGACC	AGAACCAAAT	TTCAATTTGT	1450
TATCTTAGAG	CTTTGGGTTT	TCTTTTGGAA	ATTATAAATG	AAAAAAGGAA	1500
ACTGGTGTCC	ACACAACAGA	CAAGTGGTGA	AGTTGTGAAA	TTAGGTGTGC	1550
ACAATTACTA	GAAACACCCC	AAAACCAAAG	TGAGGTAGAA	ATAGCATGAG	1600
AAGCTGTGTT	TGATGTTAAT	TACAATTAAT	AATGGACAAA	ACCCACTCGC	1650
TAGAAGTTAA	TTACACTTGA	CGTTAGAGGT	AACAGATTTG	CAAAATGATA	1700
GGACAGTGAT	TTCTATTGAG	AGAATGCTCT	TTAAATGCTA	AGAAGAAGAA	1750
ACTGGCATGA	GAGGAGTAAA	GCTCTTCCTA	GCAGTCCTTA	GCTTTCTGTT	1800
GCACTTTTTC	TCCTGGTTCA	ATGACTTGCA	TTTGTTTAGA	CATTCAGCC	1850
CGTCAACTAG	ACCAGAGAGT	TTGGAGACGC	TTTTGCTCTC	AAAACTTTCC	1900
AACCACTGTG	CCTTCTCACC	CACAATCCTG	TGTGGAGTTA	CTTGCAGGGA	1950
AACCAATGCA	AAGGAGACAA	ATGCAGTTCA	TGGGCTTCTG	GACTGATATT	2000
CACCAGGGTC	ACAATGTGAT	TGGGTTACTT	TCTTAACAGT	AATCCTAAGT	2050
CTTGCAGCAT	TAAAAAAAAA	AATCATCACA	ATGAAGAAAA	AAAAACCCAA	2100
AAAATCTAAA	ATCTAAAATT	CATCATCATC	ATCAACAACA	ACAACAACAA	2150
CAACAACAAA	ACCACCCACT	TCAGGTTGAG	TTTATGAAGA	GGGCAGAACA	2200
ATTTAGTTGT	AATTATAGAG	ATGTTTATAT	GTATAGTTGT	AAATATTCAT	2250
CCATTCTTTT	ACAGAGTTGT	TGCTCCCCTC	ATATAAATTG	ACTGAGGAGC	2300
CGCAACCTTT	AGCTCCTACC	ATCTTCCTCC	TACTGTCTGG	GAGTTAAAAA	2350
TGTCATCTGA	TGTTCTATTG	CAGAAACATC	ATTAAATATA	ACCCAACAGT	2400
AGGAAGTTGA	ATATATCAGC	CAACAAATTA	CTATGATAGT	AAGTCCTGTG	2450
TATTCATTCC	CATGTTCCCT	GAAAAAATG	AATCCTCTAG	CTCTCAGTGG	2500

FIGUR 12C

AAAGTTTAAA	ACTAGAAACA	TCTGGAGCCC	TAGACAATAT	TTTAGTGTGG	2550
CGGTAGTCTC	CTGGCTTTGG	GCTCCAGGGA	AAATTCACCTC	TTGCCCAAGC	2600
AGATAAGCCC	AGATGACTAG	AAGCAATTTT	CTTAGGAAG	TGGCAAGAAC	2650
ATTTGAAGAA	GTAACCTTCAT	ATCTATTTAT	CTATATACCT	ATAGTATTTA	2700
TATACTTGTA	GACATATAGA	TGTATAAAAT	GAAAGCCCAT	AGCCAGCCCC	2750
ACTCAGTCAA	CAATTCTCAA	AAGAGCAATA	TGAAGCAGTC	ATTTGGTGGG	2800
GTTCGTATGC	AAGAAAATAA	AAAAACGTCA	TGAATTCCAT	ATGAATACCA	2850
CGCTAAAGTA	ATGCAAAACA	ATGTGCTGCC	TCAGTGTGTG	TGTGTGTGTG	2900
TGTGTGTGTG	GTGGGTTCGT	GCATGTATGT	GTGCGTGTGT	GTGTGTGTGT	2950
GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGC	GTGTGTGTTT	GTTTAGGGGT	TTTTATAAAC	3000
AACTTTTTTT	ATAAAGCACA	CTTTAGTTTA	CAATCTCTCT	TTATAACTGT	3050
TATAAATTTT	TAAACAACCC	AAAATGCGTT	CCATATAAAG	AAATGGCAAG	3100
TTATTTAGCT	ATCAAGATTT	TACATGTTTT	CTTTAACTT	TTTTGTACAA	3150
TTGCATAGAC	GTGTAAAACC	TGCCATTGTT	AACAAAACAA	TAACAGACTT	3200
AGAAACTACT	GAAATCTACA	GTATAGTACC	ACTACCCTTC	ACAAAAATAT	3250
AGATTTTATT	TCTTGTAAC	TCTTACTGTC	TAATCCTCTT	TGTTGTACGA	3300
ATATTATAAA	AACCATGCGG	GAATCAGGAG	TTGTAAAACA	TTTATTCTGC	3350
TCCTTCTTCA	TCTGTATGA	CTGAACTAA	GGACTCCATC	GCTCTGCCCA	3400
AATCATCTGC	CATGTGGAAA	AGGCTTCCTA	CATTGTGTCC	TCTCTCATTG	3450
GCTTTCGGG	GGCATTTCCT	CCTCTGAAAC	TAGGGAAGGA	GTTGTTGAGT	3500
TGCTCCATCA	CTTCTTCTAA	CCCTGTGCTT	GTGTCCTGGG	GAGGACTCAG	3550
AAGATCTTCC	TCACCCATAG	ATTCTGAAGT	TTGACTGCCA	ACCACTCGGA	3600
GCAGCATAGG	CTGACTGCTA	TCTGACCTCT	GCAGAGAGGT	GGAAGGAGAG	3650
GACACCGTGG	TGCCATTAC	CTTAGCTTCA	GCCTGGGGCT	GCTCCAGGAG	3700
CTGTCTCAGT	CTATGTAAC	GAGACTCCAG	CTGTTTATTG	TGGTCTTCCA	3750

FIGUR 12D

GGATTTGCAT CCTGGCTTC AGGCGTCCTT TGTGTGGCG CAGTAGCTTA	3800
GCCTCAGCAA TGAGCTCAGC ATCCCTGGGA CTCGAGGAG AGGTGGGCAT	3850
CATCTCAGGA GGAGATGGCA GTGGAGACAG GCCTTTATGC TCATGCTGCT	3900
GCTTCAGGCG ATCATATTCT GCTTGCAGAT TCCTGTTTTC TTCCTCAAGA	3950
TCTGCTAGGA TTCTCTCTAG CTCCCTCTT TCCTCACTCT CTAAGGAAAT	4000
CAAGATCTGG GCAGGACTAC GAGGCTGGCT CAGGGGGGAG TCCTGGTTCA	4050
AACTTTGGCA GTAATGCTGG ATTAACAAAT GTTCATCATC TATGCTCTCA	4100
TTAGGAGAGA TGCTATCATT TAGATAAGAT CCATTGCTGT TTTCCATTTC	4150
TGCTAGCCTG CTAGCATAAT GTTCAATGCG TGAATGAGTA TCATCGTGTG	4200
AAAGCTGGGG GGACGAGGCA GCGCGAGAAT CTA CTGGCCA GAAGTTGATC	4250
AGAGTAACGG GAGTTTCCAT GTTGTCCCC TCTAACACAG TCTGCACTGG	4300
CAGGTAGCCC ATTCGGGGAT GCTTCGCAA ATACCTTTTG GTTCGAAATT	4350
TGTTTTTTAG TACCTTGGCG AAGTCGCGAA CATCTTCTCC GGATGTAGTC	4400
GGAGTGCAAT ACTCTACCAT GGGGTAGTGC ATTTTATGGC CCTTTGCAAC	4450
TCGGCCAGAA AAAAAGCAAC TTTGGCAGAT GTCATAATTA AAATGCTTTA	4500
GGCTTCTGTA CCTGAATCCA ATGATTGGAC ACTCCTTACA GATGTTACAC	4550
TTGGCTTGAT GCTTGGCAGT TTCAGCAGCA GCCACTCTGT GCAAGACGGG	4600
CAGCCACACC ATAGACTGGG GTTCCAGGCG CATCCAGTCA AGGAAGAGAG	4650
CAGCTTCAAT CTCAGGTTTA TTATTGGCAA ATTGGAAGCA GCTCCTGACA	4700
CTCGGCTCAA TGTTACTGCC CCCAAAGGAA GCAACTTCAC CCAACTGTCT	4750
TGGGATTTGA ATAGAATCAT GCAGAAGAAG ACCCAGCCTA CGCTGGTCAC	4800
AAAAGCCAGT TGAAC TTGCC ACTTGCTTGA AAAGGTATCT GTACTTGTCT	4850
TCCAAGTGTG CTTTACACAG AGAAATGATG CCAGTTTTAA AAGACAGGAC	4900
ACGGATCCTC CCTGTTCGTC CCGTATCATA AACATTGAGA AGCCAGTTGA	4950
GACACATATC CACACAGAGA GGGACATTGA CCAGATTGTT GTGCTCTTGC	5000
TCCAGACGAT CATAAATTGT AGTCAAACAG TTAATTATCT GCAGGATATC	5050

FIGUR 12E

CATGGGCTGG	TCATTTTGCT	TGAGGTTGTG	CTGGTCCAGG	GCATCACATG	5100
CAGCTGACAG	GCTCAAGAGA	TCCAAGCAAA	GGGCCTTCTG	GAGCCTTCTG	5150
AGCTTCATGG	CAGTCCTATA	CGCGGAGAAC	CTGACATTAT	TCAGGTCAGC	5200
TAAAGACTGG	TAGAGCTCTG	TCATTTTGGG	GTGGTCCCAA	CAAGTGGTTT	5250
GGGTCTCGTG	GTTGATATAG	TAGGGCACTT	TGTTTGGTGA	GATGGCTCTC	5300
TCCCAGGGAC	CCTGAACTGA	AGTGGAAAGG	AAGTGCTGGG	ATGCAGGACC	5350
AAAGTCCCTG	TGGGCTTCAT	GCAGCTGTCT	GACACGGTCC	TCCACAGCCA	5400
CCTGTAGAAG	CCTCCATCTG	GTATTCAGAT	CTTCCAAAGT	GCTGAGGTTA	5450
TAAGGTGAGA	GCTGAATGCC	CAGTGTGGTC	AGCTGATGTG	CAAGGTCATT	5500
GACACGATTG	ACATTCTCTT	TAAGAGGTGC	AATTTCTCCC	CGAAGTGCCT	5550
TGACTTTTTC	AAGGTGATCT	TGCAGAGAGT	CAATGAGGAG	ATCCCCCACT	5600
GGCTGCCAGG	ATCCCTTGAT	CACCTCAGCT	TGGCGCAACT	TGAGGTCCAG	5650
TTCATCGGCA	GCTTCCTGAA	GTTCTGGAG	TCTTTCAAGA	GCTTCATCTA	5700
TTTTTCTCTG	CCAATCAGCT	GAGCGCAGGT	TCAATTTGTC	CCATTCAGCG	5750
TTGACCTCTT	CAGCCTGCTT	TCGTAGGAGC	CGAGTGACAT	TCTGAGCTCT	5800
TTCTTCAGGA	GGCAGTTCTC	TGGGCTCCTG	GTAGAGTTTC	TCTAGTCCTT	5850
CCAAAGGCTG	CTCTGTGAGA	AATATTCTCA	CAGTCTCCAG	AGTACTCATG	5900
ATTACAGGTT	CTTTAGTTTT	CAATTCCTTC	TTGAAGGCCC	TATGTATATC	5950
ATTCTGCTTC	TGAACTGCTG	GGAAATCACC	ACCGATGGGT	GCCTGACGGC	6000
TCAGTTCATC	ATCTTTCAGC	TGTAGCCAAA	CAAGAAGTTC	CTGAAGAGAA	6050
AGATGCAAAC	GCTTCCACTG	GTCAGAACTT	GCTTCCAAAT	GGGACCTAAT	6100
GTTGAGAGAC	TTTTTCTGAA	GTTCACTCCA	CTTGAATTC	ATGTTATCCA	6150
AACGTCTTTG	TAACAGGGGT	GCTTCATCCG	AACCTTCCAG	GGATCTCAGG	6200
ATTTTTTGGC	CATTTTCATC	AAGATTGTGA	TAGATATCTG	TGTGAGTTTC	6250
AATTTCTCCT	TGGAGATCTT	GCCATGGTTT	CATCAGCTCT	CTGACTCCCC	6300
TGGAGTCTTC	TAGGAGCTTC	TCCTTACGGG	AAGCGTCCTG	TAGGACATTG	6350

FIGUR 12F

GCAGTTGTTT CTGCTPCCGT AATCCAGGAA AGAAACTTCT CCAGGTCCAG	6400
AGGGAAGTGC TGCAGTAATC TATGAGTTTC TTCCAAAGCA GCCTCTTGCT	6450
CACTTACTCT TTTATGAATG TTTCCCAAG AAGTATTGAT ATTCTCTGTT	6500
ATCATGTGTA CTTTTCTGGT ATCATCAGCA GAATAGTCCC GAAGAAGTTT	6550
CAGTGCCAAA TCATTTGCCA CGTCTACACT TATCTGCCGT TGACGGAGGT	6600
CTTTGGCCAA CTGCTTGGTT TCTGTGATCT TCTTTTGGAT TGCATCTACT	6650
GTGTGAGGAC CTTCTTTCCA TGAGTCAAGC TTGCCTCTGA CCTGTCTAT	6700
GACCTGTTCG GCTTCTTCCT TAGCTTCCAG CCATTGTGTT GAATCCTTTA	6750
ACATTTCAAT CAACTGTTGT CTCCTGTTCT GCAGCTGTTT TTGAACCTCA	6800
TCCCAGTCAA TCTGAATTCT TTCAATTCCA TCAGTAATGA TTGTTCTAGC	6850
TTCTTGATTG CTGGTTTTGT TTTTCAAATT CTGGGCAGCA GTAATGAGTT	6900
CFTCCAATTG GGGGCGTCTC TGTTCCAAAT CTTGCAGTGT TGCCTTCTGT	6950
TTGATGATCA TTTCATTGAT GTCTTCCAGA TCACCCACCA TCACTCTCTG	7000
TGATTTTATA ACTCGATCAA GCAGAGACAG CCAGTCTGTA AGTTCTGTCC	7050
AAGCTCGGTT GAAGTCTGCC AGTGCAGGTA CCTCCAACAG CAAAGAAGAT	7100
GGCATTCTTA GTTTGGAGAT GACAGTTTCC TTAGTAACCA CAGATTGPGT	7150
CACTAGAGTA ACAGTCTGAC TGGCAGAGGC TCCAGTAGTG CTCAGTCCAG	7200
GGGCACGGTC AGGCTGCTTT GTCCTCAGCT CCCGAAGTAA ATGGTTTACA	7250
GCCTCCCACT CAGACCTCAG ATCTTCTAAC TTCCTCTTCA CTGGCTGAGT	7300
GCTTGGTTTT TCCTTATACA AATGCTGCCC TTTGACAAA AGCCTTTCCA	7350
CATCCGCTTG TTTACCGTGA ACTGTTACTT CAATCTCCTT TATGTCAAAC	7400
GGTCTGCCTT GACTTGGTTG GTTATAAATT TCCAAGTGGT TTCTAATAGG	7450
AGAGACCCAC AGAAGCAGGT GATCCAGCTG CTCTTCAAGC TGCCTAAAAT	7500
CTTTTAAGTG AACCTCAAGC TCTCCTTGT TCTCAGGTAA AGCTCTGGAG	7550
ACCTTTATCC ACTGGAGATT TGTCTGTTTG AGCTTCTTTT CAAGTTTATC	7600

FIGUR 12G

TTGCTCTTCT	GGCCTTATGG	GAGCACTTAC	AAGTACTGCT	CCTCCTGTTT	7650
CATTTAATG	TTTTAGAATT	CCCTGGCGCA	GGGGCAACTC	TTCTGCCAGT	7700
AACTTGACTT	GTTCAAGTTG	TTCTTTTAGC	TGCTGCTCAT	CTCCAAGTGG	7750
AGTAATAGCA	ATGTTATCTG	CTTCTTCCAG	CCACAAAACA	AATTCATTTA	7800
AATCTCTTTG	AAATCTGAC	AAGACATTCT	TTTGTCTTTC	AATCCTCTTT	7850
CTCCTTTCTG	CCAGCTCTTT	GCAGATGTCG	TGCCACCGCA	GACTCAAGCT	7900
TCCTAATTTT	TCTTGTAGAA	TATTGACATC	TGTTTTTGAA	GACTGTTGAA	7950
TTATTTCTTC	CCCAGTTGCA	TTCAGTGTTC	TGACAACAGC	TTGACGCTGC	8000
CCAATGCCAT	CCTGGAGTTC	CTTAAGATAC	CATTTGTATT	TAGCATGTTC	8050
CCAGTTTCA	GGATTTTGTG	TCTTTTTGAA	AAACTGTTCA	ACTTCATTCA	8100
GCCATTGATT	AAATACCTTC	ATATCATAAT	GAAAGTGTCC	CCATTTTTCA	8150
ACTGATCTGT	CGAATCGCCC	TTGTCGTTCC	TTGTACATTC	TATGAAGTTT	8200
TTCCCCCTGG	AAATCCATCT	GTGCCACGGC	TTCCTGTAAT	TTCACCTTTT	8250
CCATGGAGGT	GGCACTTTGC	AAGGCTGCTG	TCTTCTTCTT	GTGAATAATA	8300
TCAATCCGAC	CTGAGATTTG	TTGCAAATG	TCTTTTATAT	TCTTAAGAGA	8350
CTCCTCTTGC	TTAAAAAGAT	CTTCAAATC	TTTAGCACAG	AGTTCAGGAG	8400
TATTTAGAAG	ATGATCAACT	TCTGAAAGAG	CTTGTAAGAT	ATGACTGATC	8450
TCGGTCAAAT	AAGTAGAAGG	CACATAAGAA	ACATCCAAAG	GCATATCTTC	8500
AGTCGTCACT	ACCATAGTTT	CTTCATGGAG	AGTGTGAATT	TGTGCAAAGT	8550
TGAGTCTTCG	AAACTGAGCA	AAATTGCTCT	CAATTTGCCG	CCAGCGCTTG	8600
CTGAGCTGGA	TCTGAGTTGG	CTCCACTGCC	ATTGCGGCCC	CATTTCTCAGA	8650
CAAGCCCTCA	GCTTGCCTGC	GCACTGCATT	CAGCTCCTCT	TTCTTCTTCT	8700
GCAATTCACG	ATCAATTTCC	TTTAATTTTC	TTTCATCTCT	EGGTTTCAGGT	8750
AGGCTGGCTA	ATTTTTTTTC	AATTTTCATCC	AAGCATTTCA	GGAGATCATC	8800
AGCCTGCCTC	TTGTAAGTAT	ACCACTGGTG	AGAAATTTCT	AGGGCCTTTT	8850

FIGUR 12H

TTCTTCTTTG	AGACCTCAA	TCCTTGAGAG	CATTATGTTT	TGTCTGTAAC	8900
AGCTGCTGTT	TTATCTTTAT	TTCCTCTCGC	TTTCTCTCAT	CTGTGATTCT	8950
TTGTTGTAAG	TTGTCTCCTC	TTTGCAACAA	TTCATTTACA	GTACCCTCAT	9000
TGTCTTCACT	CATATCTTTA	TTGAAGTCTT	CCTCTTTCAG	ATTCACCCCC	9050
TGCTGAATTT	CAGCCTCCAG	TGGTTCAAGC	AATTTTTGTA	TATCTGAGTT	9100
AAACTGCTCC	AATTCCTTCA	AAGGAATGGA	GGCCTTCCA	GTCTTAATTC	9150
TGTGAGAAAT	AGCTGCAAAT	CGACGGTTGA	GCTCAGAGAT	TGGGGCTCT	9200
ACTACTTTCC	TGCAGTGGTC	ACCGCGGTTT	GCCATCAATT	TGCTGCTTG	9250
GTCACGTGTG	GAGTCCACCT	TTGGGCGCAT	GTCATTCATT	TCAGCCTTTA	9300
AACGCTTAAG	AATGTCTTCC	TTTTGTTGTG	GTTTCTTCTT	TTCAGACTCA	9350
TCTAAAAGTT	CATCTGCATG	AATGATCCAC	TTTGTGATTT	GTTCTATGTT	9400
CTGATCAAAG	GTTTCCATGT	GTTTCTGGTA	TTCCAACAAA	AGATTTAGCC	9450
ATTCTTCTAC	TCTGGAGGTG	ACAGCTATCC	AGTTACTGTT	CAGAAGACTC	9500
AGTTTATCTT	CTACCAAGGT	TTCTTTCTTG	CCCAACACCA	TTTTCAAAGA	9550
CTCTCCTAAT	TCTGTAACAC	TCTTCAAGTG	AGCCTTCTGT	TTCTCAATCT	9600
CTTTTTGAGT	AGCCTTTCCC	CAGGCAACTT	CAGAATCCAA	ATTACTTGGC	9650
ATTCCITCAA	CTGCTGATCT	CTTCGTCAAT	TCTGTATCTG	TGCTGCCAG	9700
CCATTCTGTT	AAGACATTCA	TTTCCTTCT	CATCTTACGG	GACAACTTCA	9750
AGCATTCTC	CAACTGTTGC	TTTCTCTCTG	TTACCCTCGC	ACCCAATCA	9800
TTGTAATGCA	ATTTCAAAGC	TGTTACTCGT	TCATCAAGCT	CTTTGGGATT	9850
TTCTGTCTGC	TTTTTCTGTA	CAATTGACG	TCCGGTTTTA	ATCACCATTT	9900
CCACTTCAGA	CTTGACTTCA	CTCAGGCTTT	TATACAAGTT	CACACAATGA	9950
CTTAGTTGTG	ACTGAATTAC	TTCCTGTTCA	ACACTCTTGG	TTTCCAATGC	10000
AGGCAAATGC	ATCTTGACTT	CATCTAAAAT	CATCTTACTT	TCCTCTAGAC	10050
GTTGTTCAA	ATTGGCTGGT	TTTTGGAATA	ATCGAAATTT	CATGGAGACA	10100
TCTTGTAAAT	TTTTCTGTGC	AACATCAATT	TGTGAAAGAA	CCCTTTGGTT	10150

FIGUR 12I

GGCATCCTTC	CCCTGGTTAT	GTTTCTTCAT	TTCTTCTAAA	CTTATCTCAT	10200
GACTTGTCAA	ATCTGATTGG	ATTTTCTGGG	CTTCCTGAGG	CATTTGAGCT	10250
GCATCCACCT	TGTCAGTGAT	ATAAGCTGCC	AACTGCTTGT	CAATGAATTC	10300
AAGCGACTCC	TGAATTAAGT	GCAAGGACTT	TTCAATTTCC	TGGGCAGACT	10350
GGATACTCTG	TTCAAGCAAC	TTTTGTTTTCC	TCACAGCCTC	TTCATGTAGT	10400
TCCCTCCAAC	GAGAATTAAA	CGTCTCAAGC	TCCTCATTGA	TCAGTTCATC	10450
CATGACTCCT	CCATCTGTAA	GAGTCTGTGC	CAATAGACGA	ATCTGATTTG	10500
GGTTCCTCCTC	TGAATGATGC	ATCAGATTTT	CAAGAGATTC	TAGCACTTCA	10550
GTGATTTCTC	CAGGTCCTGC	AGGAACATTT	TCCATGGTTT	TAAGTTTCAA	10600
TTCTACTTCA	TTGAGCCACT	TGTTTGCTTT	CTCTAAATAT	GACAATAACT	10650
CATGCCAACA	TGCCCAAAC	TCTTCCAAAG	TTTTGCATTT	TCCATTCAGC	10700
CTGGTGACCA	GCCATTGGTA	GTTGGTGGTC	AGAGTTTCAA	GTTCTTTTTT	10750
TAAGGCCTCT	TGTGCTGAGG	GTGGAGCGTG	AGCTATTACA	CTATTTACAG	10800
TCTCAGTAAG	GAGTTTCACT	TTAGTTTCTT	TTTGTAGTGC	CTCTTCTTTA	10850
GCTCTCTTCA	TTTCTTCAAC	AGCAGTCTGT	AATTCATCTG	GAGTTTTATA	10900
TTCAAAATCT	CTCTCTAGAT	ATTCTTCTTC	AGCTTGTGTC	ATCCACTCAT	10950
GCATCTCTGA	TAGATCTTTT	TGGAGGCTTA	CGGTTTTATC	CAAACCTGCC	11000
TTTAAGGCTT	CCTTTCTGGT	GTAGACCTGG	CGGCATATGT	GATCCCACTG	11050
AGTGTTAAGC	TCTCTAAGTT	CTGTCTCCAG	TCTGGATGCA	AACTCAAGTT	11100
CAGCTTCACT	CTTTATCTTC	TGCCCCACCTT	CATTAACACT	ATTTAAACTG	11150
GGCTGAATTG	TTTGAATATC	ACCAACTAAA	AGTCTGCATT	GTTTGAGCTG	11200
TTTTTTCAGG	ATTTCAGCAT	CCCCAGGGC	AGGCCATTEC	TCTTTCAGGA	11250
AAACATCAAC	TTCAGCCATC	CATTTCTGTA	AGGTTTTTAT	GTGATTTCTGA	11300
AATTTTCGAA	GTTTATTCAT	ATGTTCTTCT	AGCTTTTGGC	AGCTTTCCAC	11350
CAACTGGGAG	GAAAGTTTCT	TCCAGTGCCC	CTCAATCTCT	TCAAATTCGT	11400

FIGUR 12J

ACAGATATTT	CTGGCATATT	TCTGAAGGTG	CTTTCTTGGC	CATCTCCTTC	11450
ACAGTGTAC	TCAGATAGTT	GAAGCCATTT	TGTTGCTCTT	TCAAAGAACT	11500
TTGAGAGCC	TGTAATTTCC	CGAGTCTCTC	CTCCATTATT	TCATATTCAG	11550
TAACACTAAG	ATAAGGTACA	GAGAGTTTGC	TTTCTGACTG	CTGGATCCAC	11600
GTCCTGATGC	TACTCATTGT	CTCCTGATAG	CGCATTGGTG	GTAAAGTGTC	11650
AAAAATTGTC	TGTAGCTCTT	TCTCTTTGGC	CCTCACACCA	TCAAAGATGT	11700
GGTTAAAATG	ATTAGTAAAG	GCCACAAAGT	CTGCATCCAG	AAACATGGC	11750
CCCTGTCCCT	TTTCTTTTCCAG	TTGTAGACTC	TGAATTTTTA	ATRGCTCAAT	11800
TTGAGGCTGA	AGAGCTGACA	ATCTGTTGAC	TTCATCCTTA	CAAATTTTTA	11850
ACTGGCTTTT	AATTGCTGTT	GGCTCTGATA	GGGTGGTAGA	CTGGGTTTTC	11900
AACAAGTTTT	CGGCAGTAGT	TGTCATCTGT	TCCAATTGTT	GTAGCTGATT	11950
ATAAAAGGTA	ATGATGTTGG	TTTGATACTC	TAGCCAGTTA	ACTCTCTCAC	12000
TCAGCAATTG	GCAGAATTCT	GTCCACCGGC	TGTTCAGTTG	TCTGAAAGCT	12050
TGTCTGATAC	TTTCAGCATT	AACACCCTCA	TTTGCCATCT	GTFCCACCAG	12100
GGCCTGAGCT	GATCTGCTGG	CATCTTGACG	TTTTCTGAAC	TTCTCTGCTT	12150
TTTCTCGTGC	TATGGCATTG	ACTTTTTCTT	GCAAGTCTGA	GATGTTGCCT	12200
TCTTTTCGAT	AGACTGCAA	TTCAGAACTC	TGTAATACAG	CTTCTGAACG	12250
AGTAATCCAA	CTGTGAAGTT	CAGTTATATC	GACATCCAAC	CTTTTCTTGA	12300
GTTCAGAATC	CACAGTTATC	TGCCTCTTCT	TTGAGGAGG	TGGTGGTGGG	12350
AGTTCCTCTT	GGGCATGTTT	TACCATGATT	TGTTCCCTTG	TGGTCACCAT	12400
AGTTACCGTT	TCCATTACAG	TTGTCTGTGT	TAGGGATGGT	TGAGTGGTGG	12450
TGACAGCCTG	TGAAATTTGT	GCTGAACTCT	TTTCAAGTTT	TTGGGTAAAA	12500
TTGTCCCAAC	GTTGTGCAA	GTTTTCCATC	CAGATTTCCA	TCTTTTGAGT	12550
CACTGACTTA	TTTTTCAGTG	CCGAAAGTAG	ATCTTGATTG	AGTGAACTTA	12600
GTTTTTCCAT	GGTTGGCTTT	TTCTTTTCTA	GATCTATTTT	TAAAGTAGAT	12650

FIGUR 12K

ATTTTGTGAA	GACTTGACAT	CATTTTCATTT	TGATCTTTAA	AGCCACTTGT	12700
CTGAATGTTT	TTCATTGCAT	CTTCTTTTTT	TGAAAGCCAT	GTAATAAAAA	12750
GGCACTGTTT	TTCAGTAAAA	TGCTGCCATT	TTAGAAGAAT	ATCTTGATAA	12800
ACAATCCAGC	GGTCTTCAGT	CCATCTGCAG	ATATTTGCCC	ATCGATCTCC	12850
CAGTACCTTA	AGTTGTTCTT	CCAAAGCAGC	TGTTGCATGA	TCACCGCTGG	12900
ATTCATCAAC	CACTACTACC	ATGTGAGTGA	GCGAGTTGAC	CCTGACCTGC	12950
TCCTGTTCTA	GATCTTCTTG	AAGCACCTTA	TGTTGTTGTA	CTTGGCATTT	13000
TAGATCTTCA	AGATCAGGTC	CAAAGGGCTC	TTCTCCATT	TTCTTAGTTC	13050
TCTCTTCAGT	TTTTGTTAAC	CAGTCATCTA	GTTCTTTTAA	TTTCTGATTC	13100
TGGAGATCCA	TTAGAACTTT	GTGTAATTTG	CTTTGTTTTT	CCATGCTAGC	13150
TACCCTGAGA	CATTCCCATC	TTGAATTTAG	GAGATTCATT	TGTTCTTGCA	13200
CTTCAGCTTC	TTCATCTTCT	GATAATTTCC	CTTTTCCAAC	TAGTTGACTT	13250
CCTAACTGTA	GAACATTACC	AACAAGTCCT	TGATGAGATG	TCAGATCCAT	13300
CATGAATCCC	TCATGAGCAT	GAAACTGTTT	TTTCACTTCT	TCAACATCAT	13350
TTGAAATCTC	TCCTTGTGCT	CGCAATGTAT	CCTCGGCAGA	AAGAAGCCAT	13400
GAAAGTACTT	CTTCTAAAGC	AGTTTGGTAA	CTATCCAGAT	TTACTTCCGT	13450
CTCCATCAAT	GAACGTGCAA	GTGACTTGTC	TCTGGGAGCT	TCCAAATGCT	13500
GTGAAGGATA	GGGGCTCTGT	GTGGAATCAG	AGGTGGCAAC	ATAAGCAGCC	13550
TGTGTGAAGG	CATAACTCTT	GAATCGAGGC	TTAGGAGATG	AAGAAGTTTG	13600
TTCATAGCCC	TGTGCTAGAC	TGACTGTGAT	CTGTTGAGAG	TAATGCATCT	13650
GGTGATGTAA	TTGAAAATGT	TCTTCTCTAG	TTACTTTTGA	AGATGTCCTG	13700
GGCAACATTT	CCACTTCTTG	AATGGCTTCA	ATGCTCACTT	GTTGTGGCAA	13750
AACTTGAAAG	AGTGATGTGA	TGTACATFAA	GATGGACTTC	TTGTCTGGAT	13800
AAGTGGTAGC	AACATCTTCA	GGATCAAGAA	GTTTTTCTAT	GCCTAACTGG	13850
CATTTTGCAA	TGTTGAAGGC	ATGTTCCAGT	CTTTGGGTGG	CTGAGTGCTG	13900

FIGUR 12L

TGAAACCACA	CTATTCCAAT	CAAACAGGTC	GGGCCTGTGA	CTATGGATAA	13950
GAGCATTCAA	AGCCAACCCG	TCGGACCAGC	TAGAGGTGAA	GTTGATGACG	14000
TTAACCTGTG	GATAATTACG	TGTTGACTGT	CGAACCCAGC	TCAGAAGAAT	14050
CTTTTCACTG	TTGGTTTGCT	GCAATCCAGC	CTGATAGTT	TTCATCACAT	14100
TTTTGACCTG	CCAGTGGAGG	ATTATATTCC	AAATCAAACC	AAGAGTGAGT	14150
TTATGATTTT	CATCCACTAT	GTCAGTGCTT	CCTATATTCA	CTAAATCAAC	14200
ATTATTTTTT	TGTAAGACCC	GCAGTGCCTT	GTTGACATTG	TTCAGGGCAT	14250
GAACTCTTGT	AGATCCCTTT	TCTTTTGGCA	GTTTTTGCCC	TGTAAGGCCT	14300
TCCAAGAGGT	CTAGGAGGCG	TTTTCCATCC	TGCAGGTAC	TGAAGAGGTT	14350
GTCTATGTGT	TGCTTTCCAA	ACTTAGAAAA	TTGTGCATTT	ATCCATTTTG	14400
TGAATGTTTT	CTTTTGAACA	TCTTCTCTTT	CATAACAGTC	CTCTACTTCT	14450
TCCCACAAA	GCATTTGGAA	GAAAAAGTAT	ATATCAAGGC	AGGGATAAAA	14500
ATCTTGGTAA	AAGTTTCTCC	CAGTTTTATT	GCTCCAGGAG	GCTTAGGTAC	14550
GATGAGAAGC	CAATAAACTT	CAGCAGCCTT	GACAAAAAAA	AAAAAAAAAA	14600
TAGCACTTCA	AGTCTTCCTA	TTCGTTTTTT	CTATAAAGCT	ATTGCCCTCA	14650
AGAGCGGAAT	TCCTGCAGCC	CGGGGGATCC	ACTAGTTCTA	GAGCGGCCGC	14700
GGGTACAATT	CCGCAGCTTT	TAGAGCAGAA	GTAACACTTC	CGTACAGGCC	14750
TAGAAGTAAA	GGCAACATCC	ACTGAGGAGC	AGTTCTTTGA	TTTGCACCAC	14800
CACCGGATCC	GGGACCTGAA	ATAAAAGACA	AAAAGACTAA	ACTTACCAGT	14850
TAACTTTCTG	GTTTTTCAGT	TCCTCGAGTA	CCGGATCCCT	TAGAGTCCGG	14900
AGGCTGGATC	GGTCCCGGTG	TCTTCTATGG	AGGTCAAAC	AGCGTGGATG	14950
GCGTCTCCAG	GCGATCTGAC	GGTTCACTAA	ACGAGCTCTG	CTTATATAGA	15000
CCTCCCACCG	TACACGCCTA	CCGCCCATTT	GCGTCAATGG	GGCGGAGTGG	15050
TTACGACATT	TTGGAAAGTC	CCGTTGATTT	TGGTGCCAAA	ACAAACTGCC	15100
ATTGACGTCA	ATGGGGTGGG	GACTTGGAAA	TCCCCGTGAG	TCAAACCGCT	15150
ATCCACGCCC	ATTGATGTAC	TGCCAAAACC	GCATCACCAT	GGTAATAGGG	15200

FIGUR 12M

ATGACTAATA	CGTAGATGTA	CTGCCAAGTA	GGAAAGTCCC	ATAAGGTCAT	15250
GTACTGGGCA	TAATGCCAGG	CGGGCCATTT	ACCGTCATTG	ACGTCAATAG	15300
GGGGCGTACT	TGGCATATGA	TACACTTGAT	GTACTGCCAA	GTGGGCAGTT	15350
TACCGTAAAT	ACTCCACCCA	TTGACGTCAA	TGGAAAGTCC	CTATTGGCGT	15400
TACTATGGGA	ACATACGTCA	TTATTGACGT	CAATGGGCGG	GGGTCGTTGG	15450
GCGGTCAGCC	AGGCGGGCCA	TTTACCGTAA	GTTATGTAAAC	GACCTGCAGG	15500
TCGACTCTAG	AGGATCTCCC	TAGACAAATA	TTACGCGCTA	TGAGTAAACAC	15550
AAAATTATTC	AGATTCACT	TCCTCTTATT	CAGTTTTCCC	GCGAAAATGG	15600
CCAAATCTTA	CTCGGTTACG	CCCAAATTTA	CTACAACATC	CGCCTAAAAC	15650
CGCGCGAAAA	TTGTCACTTC	CTGTGTACAC	CGGCGCACAC	CAAAAACGTC	15700
ACTTTTGCCA	CATCCGTCGC	TTACATGTGT	TCCGCCACAC	TTGCAACATC	15750
ACACTTCCGC	CACACTACTA	CGTCACCCGC	CCCGTTCCCA	CGCCCCGCGC	15800
CACGTCACAA	ACTCCACCCC	CTCATTATCA	TATTGGCTTC	AATCCAAAAT	15850
AAGGTATATT	ATTGATGATG	CTAGCGGGGC	CCTATATATG	GATCCAATFG	15900
CAATGATCAT	CATGACAGAT	CTGCGCGCGA	TCGATATCAG	CGCTTTAAAT	15950
TTGCGCATGC	TAGCTATAGT	TCTAGAGGTA	CCGGTTGTTA	ACGTTAGCCG	16000
GCTACGTATA	CTCCGGAATA	TTAATAGGCC	TAGGATGCAT	ATGGCGGCGG	16050
GCCGCCTGCA	GCTGGCGCCA	TCGATACGCG	TACGTGCGGA	CCGCGGACAT	16100
GTACAGAGCT	CGAGAAGTAC	TAGTGGCCAC	GTGGGCCGTG	CACCTTAAGC	16150
TTGGCACTGG	CCGTCGTTTT	ACAACGTCGT	GACTGGGAAA	ACCCTGGCGT	16200
TACCCAACCTT	AATCGCCTTG	CAGCACATCC	CCCTTTCGCC	AGCTGGCGTA	16250
ATAGCGAAGA	GGCCCGCACC	GATCGCCCTT	CCCAACAGTT	GCGCAGCCFG	16300
AATGGCGAAT	GGCGCCTGAT	GCGGTATTTT	CTCCTTACGC	ATCTGTGCGG	16350
TATTTACACAC	CGCATACGTC	AAAGCAACCA	TAGTACGCGC	CCTGTAGCGG	16400
CGCATTAAAGC	GCGGCGGGTG	TGGTGGTTAC	GCGCAGCGTG	ACCGCTACAC	16450

FIGUR 12N

TTGCCAGCGC	CCTAGCGCCC	GCTCCTTTCG	CTTTCTTCCC	TTCCTTTCTC	16500
GCCACGTTTCG	CCGGCTTTCC	CCGTCAAGCT	CTAAATCGGG	GGCTCCCTTT	16550
AGGGTTCCGA	TTTAGTGCTT	TACGGCACCT	CGACCCCAA	AAACTTGATT	16600
TGGGTGATGG	TTCACGTAGT	GGGCCATCGC	CCTGATAGAC	GGTTTTTCGC	16650
CCTTTGACGT	TGGAGTCCAC	GTTCTTTAAT	AGTGGACTCT	TGTTCCAAAC	16700
TGGAACAACA	CTCAACCCTA	TCTCGGGCTA	TTCTTTTGAT	TTATAAGGGA	16750
TTTTGCCGAT	TTCGGCCTAT	TGGTTAAAA	ATGAGCTGAT	TTAACAAAA	16800
TTTAACGCGA	ATTTTAACAA	AATATTAACG	TTTACAATTT	TATGGTGCAC	16850
TCTCAGTACA	ATCTGCTCTG	ATGCCGCATA	GTTAAGCCAG	CCCCGACACC	16900
CGCCAACACC	CGCTGACCGG	CCCTGACGGG	CTTGTCTGCT	CCCGGCATCC	16950
GCTTACAGAC	AAGCTGTGAC	CGTCTCCGGG	AGCTGCATGT	GTCAGAGGTT	17000
TTCACCGTCA	TCACCGAAAC	GCGCGAGACG	AAAGGGCCTC	GTGATACGCC	17050
TATTTTTATA	GGTTAATGTC	ATGATAATAA	TGGTTTCTTA	GACGTCAGGT	17100
GGCACTTTTC	GGGAAATGT	GCGCGGAACC	CCTATTTGTT	TATTTTTCTA	17150
AATACATTCA	AATATGTATC	CGCTCATGAG	ACAATAACCC	TGATAAATGC	17200
TTCAATAATA	TTGAAAAGG	AAGAGTATGA	GTATTCAACA	TTTCCGTGTC	17250
GCCCTTATTC	CCTTTTTTGC	GGCATTPTGC	CTTCTGTTT	TTGCTCACCC	17300
AGAAACGCTG	GTGAAAGTAA	AAGATGCTGA	AGATCAGTTG	GGTGCACGAG	17350
TGGGTTACAT	CGAACTGGAT	CTCAACAGCG	GTAAGATCCT	TGAGAGTTTT	17400
CGCCCCGAAG	AACGTTTTTC	AATGATGAGC	ACTTTTAAAG	TTCTGCTATG	17450
TGGCGCGGTA	TTATCCCGTA	TGACGCCGG	GCAAGAGCAA	CTCGGTGCGC	17500
GCATACACTA	TTCTCAGAAT	GACTTGGTTG	AGTACTCACC	AGTCACAGAA	17550
AAGCATCTTA	CGGATGGCAT	GACAGTAAGA	GAATTATGCA	GTGCTGCCAT	17600
AACCATGAGT	GATAACACTG	CGGCCAACTT	ACTTCTGACA	ACGATCGGAG	17650
GACCGAAGGA	GCTAACCCTT	TTTTTGACAA	ACATGGGGGA	TCATGTAACT	17700

FIGUR 120

CGCCTTGATC	GTTGGGAACC	GGAGCTGAAT	GAAGCCATAC	CAAACGACGA	17750
GCGTGACACC	ACGATGCCTG	TAGCAATGGC	AACAACGTTG	CGCAAACCTAT	17800
TAACTGGCGA	ACTACTTACT	CTAGCTTCCC	GGCAACAATT	AATAGACTGG	17850
ATGGAGGCGG	ATAAAGTTGC	AGGACCACTT	CTGCGCTCGG	CCCTTCCGGC	17900
TGGCTGGTTT	ATTGCTGATA	AATCTGGAGC	CGGTGAGCGT	GGGTCTCGCG	17950
GTATCATTGC	AGCACTGGGG	CCAGATGGTA	AGCCCTCCCG	TATCGTAGTT	18000
ATCTACACGA	CGGGGAGTCA	GGCAACTATG	GATGAACGAA	ATAGACAGAT	18050
CGCTGAGATA	GGTGCCTCAC	TGATTAAGCA	TTGGTAACTG	TCAGACCAAG	18100
TTTACTCATA	TATACPTTAG	ATTGATTTAA	AACTTCATTT	TTAATTTAAA	18150
AGGATCTAGG	TGAAGATCCT	TTTTGATAAT	CTCATGACCA	AAATCCCTTA	18200
ACGTGAGTTT	TCGTTCCACT	GAGCGTCAGA	CCCCGTAGAA	AAGATCAAAG	18250
GATCTTCTTG	AGATCCTTTT	TTTCTGCGCG	TAATCTGCTG	CTTGCAAACA	18300
AAAAAACCAC	CGCTACCAGC	GGTGGTTTTGT	TTGCCGGATC	AAGAGCTACC	18350
AACTCTTTTT	CCGAAGGTAA	CTGGCTTCAG	CAGAGCGCAG	ATACCAAATA	18400
CTGTTCTTCT	AGTGTAGCCG	TAGTTAGGCC	ACCACTTCAA	GAACTCTGTA	18450
GCACCGCCTA	CATACCTCGC	TCTGCTAATC	CTGTTACCAG	TGGCTGCTGC	18500
CAGTGGCGAT	AAGTCGTGTC	TTACCGGGTT	GGACTCAAGA	CGATAGTTAC	18550
CGGATAAGGC	GCAGCGGTCG	GGCTGAACGG	GGGGTTCGTG	CACACAGCCC	18600
AGCTTGGAGC	GAACGACCTA	CACCGAAGTG	AGATACCTAC	AGCGTGAGCT	18650
ATGAGAAAGC	GCCACGCTTC	CCGAAGGGAG	AAAGGCGGAC	AGGTATCCGG	18700
TAAGCGGCAG	GGTCGGAACA	GGAGAGCGCA	CGAGGGAGCT	TCCAGGGGGA	18750
AACGCCTGGT	ATCTTTATAG	TCCTGTGCGG	TTTCGCCACC	TCTGACTTGA	18800
GCGTCGATTT	TTGTGATGCT	CGTCAGGGG	GCGGAGCCTA	TGGAAAACGG	18850
CCAGCAACGC	GGCCTTTTTA	CGGTTCCCTGG	CCTTTTGCTG	GCCTTTTGCT	18900
CACATGTTCT	TTCCCTGCGTT	ATCCCCTGAT	TCTGTGGATA	ACCGTATTAC	18950

FIGUR 12P

CGCCTTTGAG	TGAGCTGATA	CCGCTCGCCG	CAGCCGAACG	ACCGAGCGCA	19000
GCGAGTCAGT	GAGCGAGGAA	GCGGAAGAGC	GCCCAATACG	CAAACCGCCT	19050
CTCCCCGCGC	GTTGGCCGAT	TCATTAATGC	AGCTGGCACG	ACAGGTTTCC	19100
CGACTGGAAA	GCGGGCAGTG	AGCGCAACGC	AATTAATGTG	AGTTAGCTCA	19150
CTCATTAGGC	ACCCAGGCT	TTACACTTTA	TGCTTCCGGC	TCGTATGTTG	19200
TGTGGAATTG	TGAGCGGATA	ACAATTPCAC	ACAGGAAACA	GCTATGACCA	19250
TGATTACGAA	TTCGAATGGC	CATGGGACGT	CGACCTGAGG	TAATTATAAC	19300
CCGGGCC					19307