

B.T



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

06-127751

**SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION**

**TITULO: ADENOVIRUS QUIMÉRICOS PARA USO EN EL TRATAMIENTO DEL
CANCER.**

SOLICITANTE: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT

DIRECCIÓN: Mullerstrasse 178, 13353, Berlin Alemania

APODERADO: J. IAN RAISBECK

BOGOTÁ 20 de diciembre d: 2006

P200600024

OLARTERAISBECK


Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
 Rad: 06-127751- -00000-0000
 Tel: 2008-12-20 18:00 / Dep. 2020 NUEVEHECHONES
 Tel. 11 PATENTISTA
 Evg: 370 PASADONAL
 Act 411 PRESENTACION Form: 107

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

①

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)Nombre: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFTDirección: Möllerstrasse 178, 13353, Berlin
AlemaniaNacionalidad o Domicilio: ALEMANALugar de Constitución: ALEMANIA

Teléfono: _____ Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓNC.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO.Nombre: J. IAN RAISBECKDirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799E-mail: office@olarteraisbeck.com**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.376.996 Bta
TP 135.799

④

INVENTOR (ES)
(72)Nombre: VER PAGINA ADJUNTADirección: VER PAGINA ADJUNTANacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

⑤

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/US2005/018301Fecha Mayo 24, 2005Publicación Internacional No. WO 2005/118825Fecha Diciembre 15, 2005

⑥

Título (54): ADENOVIRUS QUIMÉRICOS PARA USO EN EL TRATAMIENTO DEL
CÁNCER

⑦

Clasificación Internacional (51) C12N 15/861, 7/01, 7/02, A61K 48/00.

⑧

PrioridadSI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Mayo 26, 2004

(31) Número de Solicitud

60/574.851

⑨

Comprobante de pago No. 06 - 94.431**Fecha** Diciembre 12, 2006

10

ANEXOS☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. Ver expediente No. 05-119.657. Adjunto copia simple.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar Internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud Internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: J. IAN RAISBECK

FIRMA:

C.C. 79.376.996 Btá T.P. 135.799

LISTA DE INVENTORES PCT/US2005/018301

HARDEN, Paul
879 Larkspur CT
Brentwood, CA 94513,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

HERMISTON, Terry
9 Seamast Passage
Corte Madera, CA 94925,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

KUHN, Irene
5647 San Jose Avenue
Richmond, CA 94804,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 08-12/751- -00000-0000
Loc: 2008-12-20 18:40:01 Dep. 2008 NUEVEHECILLONES
Tel: 11 PATENTEYU
Evo: 378 HASENALUMALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 147

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176689-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 94,431
FECHA : DICIEMBRE 12 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

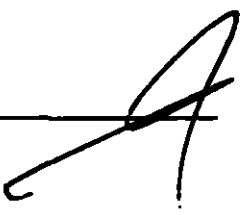
DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BLARTE RAISDEGR	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	32747904	11/12/2006	7,734,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____



RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



ACTUACION NOTARIAL



N-004947041

1 FOLIO 189.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NÚMERO: CUARENTA Y
 2 CINCO.- SUSTITUCIÓN PARCIAL DE PODER: MESSERER, Gerardo a
 3 favor de OLARTE, Carlos Reinaldo y otro.- En la Ciudad Autónoma de Buenos
 4 Aires, Capital de la República Argentina, el día VEINTITRES de JUNIO del año
 5 DOS MIL CINCO, ante mi María Silvina Lasarte, Escribana Autorizada, titular del
 6 Registro Notarial número 1788, COMPARECE: Gerardo MESSERER, argentino,
 7 mayor de edad, casado en primeras nupcias con Karina Ana Reynolds, titular del
 8 Documento Nacional de Identidad número 13.782.654, con domicilio especial en la
 9 Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º, de esta Ciudad, persona capaz y de mi
 10 conocimiento personal, doy fe.- INTERVIENE: por su propio derecho.- Y
 11 EXPRESA: PRIMERO: Que la Sociedad "SCHERING
 12 AKTIENGESELLSCHAFT", con domicilio en Müllerstraße 178, 13153 Berlín,
 13 Alemania, le confirió el día 7 de Abril de 2.005 en dicho país, un Poder, el cual
 14 mediante escritura número 44, de fecha 22 de Junio de 2.005, otorgada ante mí, al
 15 folio 186, protocolo corriente, de este Registro Notarial a mi cargo, fue incorporado y
 16 transcrito al mismo, cuya primera copia tengo para este acto a la vista, doy fe y en lo
 17 pertinente transcribiré en la presente.- SEGUNDO: Manifiesta bajo juramento que el
 18 referido poder invocado se encuentra plenamente vigente en virtud de no haberle sido
 19 revocado, suspendido ni limitado en ninguna de sus partes.- TERCERO: En
 20 consecuencia DICE: Que en uso de la facultad conferida SUSTITUYE
 21 PARCIALMENTE el poder mencionado a favor de CARLOS REINALDO
 22 OLARTE y/o JAMES IAN RAISBECK, al solo y único objeto de que en nombre y
 23 representación de la Sociedad "SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT" y
 24 actuando en forma individual, indistinta y/o alternadamente, se presenten
 25 exclusivamente ante las autoridades de COLOMBIA que correspondan y realicen los



11 004947041

actos enumerados en el citado poder y con las facultades que surgen del mismo, el que
transcripto en lo pertinente dice: "FOLIO 186.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA
NÚMERO CUARENTA Y CUATRO.-- En la Ciudad Autónoma de Buenos
Aires, Capital de la República Argentina, el día VEINTIDÓS de JUNIO del año DOS
MIL CINCO, ante mí ..., Escribana Autorizante, ..., COMPARACE: Gerardo
MESSERER, argentino, mayor de edad, casado en primeras nupcias con Karina Ann
Reynolds, titular del Documento Nacional de Identidad número 13.782.654, con
domicilio especial en la Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º, de esta Ciudad,
persona capaz y de mi conocimiento personal, doy fe.- INTERVIENE: por su propio
derecho. Y EXPRESA: Que a los efectos que hubiere lugar, solicita de mí, la
Autorizante, LA INCORPORACIÓN y TRANSCRIPCIÓN en este protocolo, del
PODER que le fuera conferido a su favor el día 7 de abril de 2.005, en Berlín,
Alemania, por la Sociedad "SCHERING AKTIENGESSELLSCHAFT", con domicilio
en Müllerstraße 178, 13353 Berlín, Alemania, sobre cuya plena vigencia responde el
requiriente bajo juramento.- Yo, la Autorizante, hago constar: a) Que el instrumento de
poder cuya incorporación y transcripción a este protocolo solicita el compareciente, se
encuentra extendido en idioma castellano, certificadas las firmas por notario en
idioma alemán, legalizado en idioma alemán (Sello de Apostilla de la Convención de
La Haya del 5 de octubre de 1961) y traducido en lo pertinente al idioma nacional por
la Traductora Pública Laura Thieberger.- b) Que el requirente tiene interés legítimo en
su solicitud.- En consecuencia, me hace entrega en este acto del original del
instrumento de poder relacionado con su respectiva traducción al idioma nacional, el
que agrego a la presente y transcripto dice: "MOELLER & CO (sigue texto en idioma
extranjero).- Poder Los abajo firmante/s Schering Aktiengesellschaft Müllerstraße 178
13353 Berlín, Germany domiciliados en declaran por el presente otorgar a



ACTUACION NOTARIAL



[Handwritten signature]

11004947042

1 GERARDO MESSERER poder general amplio y suficiente para recabar de las
 2 autoridades ..., sud y centroamericanas ... que correspondan, la obtención de patentes
 3 de invención, el registro y la renovación de marcas y modelos y/o derechos de
 4 propiedad intelectual y/o nombres de dominio, a cuyo efecto lo faculta para llevar a
 5 cabo ante dichas autoridades todas las gestiones necesarias al objeto indicado,
 6 presentar solicitudes, formular descripciones, oposiciones, protestos, declaraciones,
 7 apelaciones y reclamos, oblar impuestos, justificar explotaciones, solicitar
 8 testimonios, aceptar transferencias, recibir documentos y valores, percibir y hacer
 9 cuanto fuere necesario ante las autoridades administrativas de cualquier orden. Por
 10 otra parte, le confiere mandato para que en su nombre y representación puedan iniciar
 11 y proseguir cualquier juicio que actualmente los que suscriben tengan o en el futuro
 12 tuvieran en ..., en Sudamerica, Centroamérica ..., con motivo de su nombre, marcas
 13 de fábrica o de comercio, patentes de invención y modelos y/o de sus derechos de
 14 propiedad intelectual que actualmente posean o adquieran en lo sucesivo, promover
 15 juicios de cualquier jurisdicción, criminales, correccionales, civiles o comerciales,
 16 contra los falsificadores, usurpadores o imitadores y contra los tenedores de artículos
 17 que infrinjan su nombre, marcas o patentes de invención, seguir los juicios por
 18 oposición u otros en que fueran parte como actores o demandados, defender el
 19 nombre, las marcas, patentes y modelos y/o de derechos de propiedad intelectual y/o
 20 nombres de dominio, haciendo las protestas del caso o diciendo de nulidad. Al efecto,
 21 podrá presentarse con escritos, querellas, pedidos, y lo que fuere necesario ante
 22 cualquier autoridad judicial, presentar testigos, documentos y demás justificativos,
 23 rendir pruebas de cualquier especie, pedir nombramientos de peritos, pedir y absolver
 24 posiciones, asistir a juicios verbales, declinar y prorrogar de jurisdicción, inchar,
 25 recusar, apelar, transar, someter a arbitraje o mediación, hacer renunciias, exigir y dar



N. 004947042

cauciones, pedir embargos preventivos, definitivos o inhibiciones y su levantamiento, 29
pedir la venta de los bienes de los deudores, solicitar y obtener el cumplimiento de 30
sentencias, prestar juramentos, decir de nulidad, desistir, percibir, otorgar recibos y en 31
general practicar todos los actos y diligencias que sean precisos al desempeño de este 32
mandato. Podrá asimismo substituir el presente poder en todo o en parte. Dado y 33
firmado en Berlin, 2005-04-07 Schering Aktiengesellschaft Corporate Patents ppa. 34
ppa. Hay dos firmas ilegibles Dr. Thomas Seuß Dr. Walter Klose".- ES COPIA FIEL, 35
doy fe.- En hoja adjunta consta la certificación notarial de las firmas obrantes en el 36
poder, en idioma alemán, efectuada por el Notario de Alemania, Dimitri Rempen y en 37
hoja siguiente consta la legalización de la firma y sello del mencionado notario, en 38
idioma alemán (Sello de Apostilla de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 39
1961) doy fe.- A continuación sigue la referida traducción de lo pertinente al idioma 40
nacional la que transcrita textualmente dice: "TRADUCCION PUBLICA (A 41
continuacion de un PODER otorgado en idioma nacional por la Sociedad "Schering 42
Aktiengesellschaft", de Berlin, Alemania, redactado en idioma nacional, aparecen los 43
siguientes textos que traducidos dicen:).- La versión en inglés es para su información 44
únicamente.- Registro de Actus N° R. 142/2005 - He advertido sobre la prohibición de 45
colaboracion según el Artículo 3, Párrafo 1, N° 7, de la Ley de Certificaciones. Mi 46
pregunta de que si existe alguna disposición previa en el sentido de dicha Norma, fue 47
contestada negativamente.- Certifico la autenticidad de las firmas trazadas ante mí por 48
los siguientes:- Dr. Walter Klose, que nació el 26 de diciembre de 1952, y del Dr. 49
Thomas Seußs, que nació el 17 de setiembre de 1963, ambos de mi personal 50
conocimiento- ambos con domicilio comercial en 13353 Berlin, Müllerstrasse 178.-
Al mismo tiempo doy fe, en base a que tuve a la vista en el día de hoy las Actas del
Registro de Comercio del Tribunal de Primera Instancia de Charlottenburg, N° de



ASOCIACION NOTARIAL

N 004947043

1 Acta HR D 283, que el Dr. Klose y el Dr. Seuss están autorizados en su carácter de
2 Mandatarios a representar a la Sociedad "Schering Aktiengesellschaft" de Berlín.-
3 Berlín, 7 de abril de 2005.- (Firma ilegible del Escribano, liquidación de derechos y
4 sello en oblea aplicado sobre precinto:) TRIBUNAL DE PRIMERA INSTANCIA DE
5 CHARLOTTENBURG - BERLÍN.- APOSTILLA- (Convención de La Haya del 5 de
6 octubre de 1961)- País: República Federal de Alemania.- Este Instrumento público fue
7 firmado por Dimitri Rempen, actuando en carácter de Escribano y lleva el sello del
8 Escribano.-Certificado en Berlín, el 28 de abril de 2005 por el Presidente del Tribunal
9 Regional de Berlín con el N° 9101 a E- F 1927/2005 - Sello (Hay un sello en oblea
10 sobre precinto:) PRESIDENTE DEL TRIBUNAL REGIONAL DE BERLIN- El
11 Funcionario autorizado (Firmado y aclarado:) Bünning - Juez Principal del Tribunal
12 Regional.- ES TRADUCCION FIEL de las partes pertinentes del documento de
13 referencia, que en los idiomas alemán e inglés, he tenido y he vertido al idioma
14 nacional, en Buenos Aires, el 19 de mayo de 2005.- Hay una firma ilegible y un sello
15 que dice: "Laura Thieberger Matrícula de Traductores. Alemán- Francés. Tomo II
16 Folio 254 (Cap.) Tomo III - 98- (La Plata). Inglés. Tomo III - Folio 14 (Cap.) Tomo
17 III - Folio 329 (La Plata) Colegio Traductores Públicos N° 173."- ES COPIA FIEL,
18 doy fe.- A continuación hay un sello que dice: "COLEGIO DE TRADUCTORES
19 PUBLICOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES Corresponde a la Legalización
20 N° T5-3258/05. Hay una firma ilegible y aclarada: Gustavo Adrián SIGALOFF".- En
21 el margen superior derecho hay un sello timbrador que dice: "COLEGIO DE
22 TRADUCTORES PÚBLICOS 24.5.05. LEGALIZACIONES \$20.00. CTPBA.
23 UNIDAD N° 2." A continuación sigue la legalización de la firma de la nombrada
24 traductora, ..., que dice: "N° 00824188. COLEGIO DE TRADUCTORES PÚBLICOS
25 DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES. República Argentina. Ley 20.305.



N 004947043

LEGALIZACIÓN. Por la presente el COLEGIO DE TRADUCTORES PÚBLICOS
DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES, en virtud de la facultad que le confiere el
artículo 10, inc. d) de la Ley 20.305, certifica únicamente que la firma y sello que
aparecen en la traducción adjunta, concuerdan con los correspondientes al Traductor
Público: THIEDERGER, LAURA que obran en los registros de esta institución en el
folio tomo ALEMAN 254 2 INGLES 14 3 Buenos Aires, Legalización Número:
3258/2005/T5 Fecha: 24/05/05.- Hay una firma ilegible. Hay un sello que dice
Marcelo F. Sigaloff Encargado Dto. de Legalizaciones Colegio de Traductores
Públicos de la Ciudad de Buenos Aires.....- ES COPIA FIEL, doy fe.- En este estado
el compareciente expresa que en la forma expresada deja INCORPORADO y
TRANSCRIPTO en este Protocolo el Poder que agrego a la presente, solicitando de
mí, la Escribana Autorizante, expida primera copia de la presente para el nombrado
apoderado -....- LEO está escritura al compareciente, quien así la otorga y en prueba
de conformidad, la firma ante mí, doy fe.- GERARDO MESSERER. Ante mí:
MARIA SILVINA LASARTE. Escribana. Está mi sello. CONCUERDA con su
escritura matriz que pasó ante mí, al folio 186 del Registro Notarial número 1788, a
mi cargo. PARA EL APODERADO expido la presente PRIMERA COPIA en tres (3)
sellos de actuación notarial numerados correlativamente desde el número
N004823958 al presente inclusive, que sello y firmo en la fecha y lugar de su
otorgamiento, doy fe.". Sigue una firma y un sello: María Silvina Lasarte. Escribana
Mat. 4413."- ES COPIA FIEL, de las partes pertinentes de la escritura de referencia,
doy fe.- CUARTO: Finalmente el compareciente expresa: a) Que el presente
otorgamiento no significa renunciar al ejercicio de las facultades sustituidas; y b) Que
los nombrados apoderados sustitutos NO podrán sustituir el presente poder en ninguna
de sus partes.- Yo, la Autorizante advierto al compareciente, a tenor de lo dispuesto en

[Handwritten signature]



ACTUACION NOTARIAL

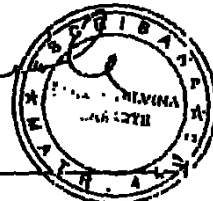


N004947044

1 el artículo 77 inciso h) de la Ley Orgánica Notarial Número 404, respecto de los
2 alcances de las cláusulas contenidas en la presente escritura y del derecho de leer por
3 sí este instrumento.- LEO esta escritura al compareciente, quien así la otorga y en
4 prueba de conformidad la firma ante mí, doy fe.- GERARDO MESSERER. Ante mí:
5 MARIA SILVINA LASARTE. Escribana. Está mi sello. CONCUERDA con su
6 escritura matriz que pasó ante mí, al folio 189 del Registro Notarial número 1788, a
7 mi cargo. PARA EL PODERDANTE. expido la presente PRIMERA COPIA en
8 cuatro (4) sellos de actuación notarial numerados correlativamente desde el número
9 N004947041 al presente inclusive, que sello y firmo en la fecha y lugar de su
10 otorgamiento, doy fe.-

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

[Handwritten signature]



LEGALIZATION

050623226358



38/98/2075

\$311.00

14:48:41

050623035431



23/08/2013

639. 00

14:49:49



004947044

ES de A
BUEN

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

9

APOSTILLE

REPUBLICA
ARGENTINA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

A 00037959

1. PAÍS: REPUBLICA ARGENTINA

El presente documento público

2. Ha sido firmado por NESTOR ESTEBAN AZLOR

3. Quien actúa en calidad de LEGALIZADOR

4. Lleva el sello / timbre de COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS

AIRES

BAÑOS

CIUDAD de

de Aires

LA CIUDAD DE BUENOS AIRES

6. El día 23/06/2005

7. Por EL COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

(Convenio 02/09/2003)

8. Bajo el número: 050623035431

9. Sello / Timbre



10. Firma

MSC. ALBERTO J. S. RIVERO
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO



LEGALIZACION



1 006549405

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley vigente, LEGALIZA la firma

y sello del escribano MARIA SILVINA LASARTE

presentes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo

el N° 050623226358/6

La presente legalización se funda sobre

el contenido y forma del documento.



Buenos Aires, Jueves 23 de Junio de 2015

ESC. NESTOR ESTEBAN AZLOR
COLEGIO DE ESCRIBANOS
LEGALIZADOR

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 December 2005 (15.12.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/118825 A2

(51) International Patent Classification: C12N 15/861, 7/01, 7/02, A61K 48/00

(21) International Application Number:
PCT/US2005/018301

(22) International Filing Date: 24 May 2005 (24.05.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Date:
60/574,851 26 May 2004 (26.05.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Muellerstrasse 178, 13353 Berlin (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): HARDEN, Paul [US/US]; 879 Larkspur CT, Brentwood, CA 94513 (US). HERMISTON, Terry [US/US]; 9 Seasmart Passage, Corte Madera, CA 94925 (US). KUHN, Irene [US/US]; 5647 San Jose Avenue, Richmond, CA 94804 (US).

(74) Agent: WASHTEEN, Wendy, L.; Berlex Biosciences, 2600 Hilltop Drive, P.O. Box 4099, Richmond, CA 94804 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: CHIMERIC ADENOVIRUSES FOR USE IN CANCER TREATMENT

(57) Abstract: The present invention relates to oncolytic adenoviruses having therapeutic applications. Recombinant chimeric adenoviruses, and methods to produce them are provided. The chimeric adenoviruses of the invention comprise nucleic acid sequences derived from adenoviral serotypes classified within the subgroups B through F and demonstrate an enhanced therapeutic index.

WO 2005/118825 A2

CHIMERIC ADENOVIRUSES FOR USE IN CANCER TREATMENT

This application claims the benefit of U.S. Provisional Application Serial No. 60/574,851, filed
5 on May 26, 2004, which is incorporated herein by reference.

FIELD OF THE INVENTION

The invention described herein relates generally to the field of molecular biology, and more
10 specifically to oncolytic adenoviruses having therapeutic applications.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Cancer is a leading cause of death in the United States and elsewhere. Depending on the
type of cancer, it is typically treated with surgery, chemotherapy, and/or radiation. These treatments
15 often fail, and it is clear that new therapies are necessary, to be used alone or in combination with
classical techniques.

One approach has been the use of adenoviruses, either alone or as vectors able to deliver
anti-cancer therapeutic proteins to tumor cells. Adenoviruses are non-enveloped icosahedral
double-stranded DNA viruses with a linear genome of approximately 36 kilobase pairs. Each end of
20 the viral genome has a short sequence known as the inverted terminal repeat (or ITR), which is
required for viral replication. All human adenovirus genomes examined to date have the same
general organization; that is, the genes encoding specific functions are located at the same position
on the viral genome. The viral genome contains five early transcription units (E1A, E1B, E2, E3, and
E4), two delayed early units (IX and Iva2), and one late unit (major late) that is processed to
25 generate five families of late mRNAs (L1-L5). Proteins encoded by the early genes are involved in
replication, whereas the late genes encode viral structural proteins. Portions of the viral genome can
be readily substituted with DNA of foreign origin and recombinant adenoviruses are structurally
stable; properties that make these viruses potentially useful for gene therapy (see Jolly, D. (1994)
Cancer Gene Therapy 1:51-84).

30 Currently, the research efforts to produce clinically useful adenoviral therapy have focused
on the adenoviral serotype, Ad5. The genetics of this human adenovirus are well-characterized and
systems are well described for its molecular manipulation. High capacity production methods have
been developed to support clinical applications, and some clinical experience with the agent is
available. See, Jolly, D. (1994) *Cancer Gene Therapy*, 1:51-84. Research related to the use of
35 human adenoviruses (Ad) in cancer treatment has focused on the development of Ad5-based
adenoviruses that have a higher potency in, or are preferentially targeted to, specific tumor cell types
and there exists a need for generation of more potent oncolytic viruses if adenoviral therapy is to find
practical application in a clinical setting.

-2-

Ad5 is only one of 51 currently known adenoviral serotypes, which are classified into subgroups A-F, based on various attributes including their hemagglutination properties ((see, Shenk, "Adenoviridae: The Viruses and Their Replication," in Fields Virology, Vol.2, Fourth Edition, Knipe, ed., Lippincott, Williams & Wilkins, pp. 2265-2267 (2001)). These serotypes differ at a variety of levels, e.g. pathology in humans and rodents, cell receptors used for attachment, but these differences have been largely ignored as potential means to develop more potent oncolytic adenoviruses (with the exception of fiber alterations, see Stevenson et al. (1997) *J. Virol.* 71:4782-4790; Krasnykh et al. (1996) *J. Virol.* 70:6839-6846; Wickham et al. (1997) *J. Virol.* 71:8221-8229; Legrand et al. (2002) *Curr. Gene Ther.* 2:323-329; Barnett et al. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* 1-3:1-14; US Patent Application 2003/0017138).

Exploitation of differences among adenoviral serotypes may provide a source of more effective adenoviral-based therapeutics, using novel adenoviruses with increased selectivity and potency. There is a need for such improved adenoviral-based therapies.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides novel chimeric adenoviruses, or variants or derivatives thereof, useful for viral-based therapy. In particular, the invention provides for chimeric adenoviruses; or variants or derivatives thereof, having a genome comprising an E2B region wherein said E2B region comprises a nucleic acid sequence derived from a first adenoviral serotype and a nucleic acid sequence derived from a second adenoviral serotype; wherein said first and second adenoviral serotypes are each selected from the adenoviral subgroups B, C, D, E, or F and are distinct from each other, and wherein said chimeric adenovirus is oncolytic and demonstrates an enhanced therapeutic index for a tumor cell.

In one embodiment, the chimeric adenovirus further comprises regions encoding fiber, hexon, and penton proteins, wherein the nucleic acids encoding said proteins are all from the same adenoviral serotype. In another embodiment, the chimeric adenovirus of the invention comprises a modified E3 or E4 region.

In another embodiment, the chimeric adenovirus demonstrates an enhanced therapeutic index in a colon, breast, pancreas, lung, prostate, ovarian or hemopoietic tumor cell. In a particularly preferred embodiment, the chimeric adenovirus displays an enhanced therapeutic index in colon tumor cells.

In a preferred embodiment, the E2B region of the chimeric adenovirus comprises SEQ ID

-3-

NO: 3. In a particularly preferred embodiment, the chimeric adenovirus comprises SEQ ID NO: 1.

The present invention provides for a recombinant chimeric adenovirus, or a variant or derivative thereof, having a genome comprising an E2B region

5 wherein said E2B region comprises a nucleic acid sequences derived from a first adenoviral serotype and a nucleic acid second derived from a second adenoviral serotype; wherein said first and second adenoviral serotypes are each selected from the adenoviral subgroups B, C, D, E, or F and are distinct from each other; wherein said chimeric adenovirus is oncolytic and demonstrates an enhanced therapeutic
10 index for a tumor cell; and wherein said chimeric adenovirus has been rendered replication deficient through deletion of one or more adenoviral regions encoding proteins involved in adenoviral replication selected from the group consisting of E1, E2, E3 or E4.

15 In one embodiment, the chimeric adenovirus of the invention further comprises a heterologous gene that encodes a therapeutic protein, wherein said heterologous gene is expressed within a cell infected with said adenovirus. In a preferred embodiment, the therapeutic protein is selected from the group consisting of cytokines and chemokines, antibodies, pro-drug converting enzymes, and immunoregulatory proteins.

20 The present invention provides methods for using the chimeric adenoviruses of the invention for therapeutic purposes. In one embodiment, the chimeric adenoviruses can be used to inhibit the growth of cancer cells. In a particular embodiment, a chimeric adenovirus comprising SEQ ID NO: 1 is useful for inhibiting the growth of colon cancer cells.

25 In another embodiment, the adenoviruses of the invention are useful as vectors to deliver therapeutic proteins to cells.

The present invention provides a method for production of the chimeric adenoviruses of the invention, wherein the method comprises

- 30 a) pooling of adenoviral serotypes representing adenoviral subgroups B-F, thereby creating an adenoviral mixture;
- b) passaging the pooled adenoviral mixture from step (a) on an actively growing culture of tumor cells at a particle per cell ratio high enough to encourage recombination between
35 serotypes, but not so high as to produce premature cell death;
- c) harvesting the supernatant from step (b);
- d) infecting a quiescent culture of tumor cells with the supernatant harvested in step (c);
- e) harvesting the cell culture supernatant from step (d) prior to any sign of CPE;

- f) infecting a quiescent culture of tumor cells with the supernatant harvested in step (e); and
- g) isolating the chimeric adenovirus from the supernatant harvested in step (f) by plaque purification.

5

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1. Ad retention time profiles on a TMAE HPLC column. A) Retention profiles for the individual Ad serotypes that were used to generate the original starting viral pool. B) Retention profiles of the passage 20 pools derived from HT-29, Panc-1, MDA-231, and PC-3 cell lines, respectively.

Figure 2. Cytolytic activity of the individual virus pools. A) HT-29, B) MDA-231, C) Panc-1 and D) PC-3 cells were infected with their respective viral pools at VP per cell ratios from 100 to 0.01. MTS assays were performed on differing days post infection (as indicated) dependent upon the cell line. Each data point in the panel represents an assay done in quadruplicate and the results are expressed as the means $\pm$ SD. The panel depicts one representative experiment and all viral pools were assayed at least three independent times on the target tumor cell line (Figure Legend: $\bullet$ —Ad5; $\square$ —initial viral pool; $\blacksquare$ —specific cell derived pool, passage 20).

20

Figure 3. Cytolytic activity of ColoAd1 and Ad5 on human tumor cell lines. An MTS assay was performed on A) a broad panel of human tumor cell lines and B) on a panel of human colon cancer cell lines to determine its potential potency specificity. The MTS assay was performed on differing days dependent upon the cell line. Each panel is a representative experiment that has been repeated at least three times. Each data point in the panel represents an assay done in quadruplicate and the results are expressed as the means $\pm$ SD (Figure Legend: $\bullet$ —Ad5; $\square$ —ColoAd1).

25

Figure 4. Cytolytic activity of ColoAd1 and Ad5 on a panel of normal cells. HS-27, HUVEC and SAEC cells (primary fibroblast, endothelial, and epithelial cells, respectively) were infected with ColoAd1 and Ad5 at VP per cell ratios from 100 to 0.01. MTS assay was performed on differing days post infection dependent upon the cell and each panel is a representative experiment that has been repeated at least three times. Each data point in the panel represents an assay done in quadruplicate and the results are expressed as the means $\pm$ SD (Figure Legend: $\bullet$ —Ad5; $\square$ —ColoAd1).

30

Figure 5. Cytolytic activity of ColoAd1, Ad5 and ONYX-015 on primary normal endothelial cells (HUVEC) and a colon tumor cell line (HT-29). Each panel is a representative experiment that has

35

-5-

been repeated at least three times. Each data point in the panel represents an assay done in quadruplicate and the results are expressed as the means $\pm$ SD (Figure Legend: $\bullet$ —Ad5; $\square$ —ColoAd1; $\blacksquare$ —Onyx-015).

5 Figure 6. Cytolytic activity of ColoAd1, Ad11p and Ad5 on a normal epithelial cell line (SAEC) and a human colon cancer cell line (HT-29). Each panel is a representative experiment that has been repeated at least three times. Each data point in the panel represents an assay done in quadruplicate and the results are expressed as the means $\pm$ SD (Figure Legend: $\bullet$ —Ad5; $\square$ —Ad11p; $\blacksquare$ —ColoAd1).

10 Figure 7. Cytolytic activity of Recombinant Viruses. Recombinant viruses representing four viral populations (Adp11, ColoAd1, left end Ad11p/right end ColoAd1(ColoAd1.1) and left end ColoAd1/right end Ad11p(ColoAd1.2)) were constructed as described in Example 6. Cytolytic activity of each population in HT29 cells was determined as previously described. (Figure Legend: $\bullet$ —Ad5; $\square$ —Ad11p; $\blacksquare$ —ColoAd1; $\cup$ —ColoAd1.1; $\blacktriangle$ —ColoAd1.2).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

20 All publications, including patents and patent applications, mentioned in this specification are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication was specifically and individually indicated to be incorporated by reference in its entirety.

25 Definitions

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Generally, the nomenclature used herein and the laboratory procedures described below are those well known and commonly employed in the art.

30 As used herein, the term "adenovirus", "serotype" or "adenoviral serotype" refers to any of the 51 human adenoviral serotypes currently known, or isolated in the future. See, for example, Strauss, "Adenovirus infections in humans," in *The Adenoviruses*, Ginsberg, ed., Plenum Press, New York, NY, pp. 451-596 (1984). These serotypes are classified in the subgroups A-F (see, Shenk, "Adenoviridae: The Viruses and Their Replication," in *Fields Virology*, Vol.2, Fourth Edition, Knipe, ed., Lippincott Williams & Wilkins, pp. 2265-2267 (2001), as shown in Table 1.

Table 1

SubGroup	Adenoviral Serotype
A	12, 18, 31
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 51
C	1, 2, 5, 6
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22- 30, 32, 33, 38-39, 42-49, 50
E	4
F	40, 41

As used herein, "chimeric adenovirus" refers to an adenovirus whose nucleic acid sequence is comprised of the nucleic acid sequences of at least two of the adenoviral serotypes described above.

As used herein, "parent adenoviral serotype" refers to the adenoviral serotype which represents the serotype from which the majority of the genome of the chimeric adenovirus is derived.

As used herein, the term "homologous recombination" refers to two nucleic acid molecules, each having homologous sequences, where the two nucleic acid molecules cross over or undergo recombination in the region of homology.

As used herein, the term "potency" refers to the lytic potential of a virus and represents its ability to replicate, lyse, and spread. For the purposes of the instant invention, potency is a value which compares the cytolytic activity of a given adenovirus of the invention to that of Ad5 in the same cell line, i.e. $\text{potency} = \text{IC}_{50} \text{ of AdX} / \text{IC}_{50} \text{ of Ad5}$, where X is the particular adenoviral serotype being examined and wherein the potency of Ad5 is given a value of 1.

As used herein, the term "oncolytic virus" refers to a virus that preferentially kills cancer cells as compared with normal cells.

As used herein, the term "therapeutic index" or "therapeutic window" refers to a number indicating the oncolytic potential of a given adenovirus and is determined by dividing the potency of the adenovirus in a cancer cell line by the potency of the same adenovirus in a normal (i.e. non-cancerous) cell line.

As used herein, the term "modified" refers to a molecule with a nucleotide or amino acid sequence differing from a naturally-occurring, e.g. a wild-type nucleotide or amino acid sequence. A modified molecule can retain the function or activity of a wild-type molecule, i.e. a modified adenovirus may retain its oncolytic activity. Modifications include mutations to nucleic acids as described below.

As used herein, "mutation" with reference to a polynucleotide or polypeptide, refers to a naturally-occurring, synthetic, recombinant, or chemical change or difference to the primary, secondary, or tertiary structure of a polynucleotide or polypeptide, as compared to a reference polynucleotide or polypeptide, respectively (e.g., as compared to a wild-type polynucleotide or polypeptide). Mutations include such changes as, for example, deletions, insertions, or substitutions.

-7-

Polynucleotides and polypeptides having such mutations can be isolated or generated using methods well known in the art.

As used herein, "deletion" is defined as a change in either polynucleotide or amino acid sequences in which one or more polynucleotides or amino acid residues, respectively, are absent.

5 As used herein, "insertion" or "addition" is that change in a polynucleotide or amino acid sequence which has resulted in the addition of one or more polynucleotides or amino acid residues, respectively, as compared to the naturally occurring polynucleotide or amino acid sequence.

As used herein, "substitution" results from the replacement of one or more polynucleotides or amino acids by different polynucleotides or amino acids, respectively.

10 As used herein, the term "adenoviral derivative" refers to an adenovirus of the invention that has been modified such that an addition, deletion or substitution has been made to or in the viral genome, such that the resulting adenoviral derivative exhibits a potency and/or therapeutic index greater than that of the parent adenovirus, or in some other way is more therapeutically useful (i.e., less immunogenic, improved clearance profile). For example, a derivative of an adenovirus of the
15 invention may have a deletion in one of the early genes of the viral genome, including, but not limited to, the E1A or E2B region of the viral genome.

As used herein, "variant" with reference to a polynucleotide or polypeptide, refers to a polynucleotide or polypeptide that may vary in primary, secondary, or tertiary structure, as compared to a reference polynucleotide or polypeptide, respectively (e.g., as compared to a wild-type
20 polynucleotide or polypeptide). For example, the amino acid or nucleic acid sequence may contain a mutation or modification that differs from a reference amino acid or nucleic acid sequence. In some embodiments, an adenoviral variant may be a different isoform or polymorphism. Variants can be naturally occurring, synthetic, recombinant, or chemically modified polynucleotides or polypeptides isolated or generated using methods well known in the art. Changes in the polynucleotide sequence
25 of the variant may be silent. That is, they may not alter the amino acids encoded by the polynucleotide. Where alterations are limited to silent changes of this type, a variant will encode a polypeptide with the same amino acid sequence as the reference. Alternatively, such changes in the polynucleotide sequence of the variant may alter the amino acid sequence of a polypeptide encoded by the reference polynucleotide, resulting in conservative or non-conservative amino acid changes,
30 as described below. Such polynucleotide changes may result in amino acid substitutions, additions, deletions, fusions and truncations in the polypeptide encoded by the reference sequence. Various codon substitutions, such as the silent changes that produce various restriction sites, may be introduced to optimize cloning into a plasmid or viral vector or expression in a particular prokaryotic or eukaryotic system.

35 As used herein, an "adenoviral variant" refers to an adenovirus whose polynucleotide sequence differs from a reference polynucleotide, e.g. a wild-type adenovirus, as described above. The differences are limited so that the polynucleotide sequences of the parent and the variant are similar overall and, in most regions, identical. As used herein, a first nucleotide or amino acid

-8-

sequence is said to be "similar" to a second sequence when a comparison of the two sequences shows that they have few sequence differences (i.e., the first and second sequences are nearly identical). As used herein, the polynucleotide sequence differences present between the adenoviral variant and the reference adenovirus do not result in a difference in the potency and/or therapeutic index.

As used herein, the term "conservative" refers to substitution of an amino acid residue for a different amino acid residue that has similar chemical properties. Conservative amino acid substitutions include replacement of a leucine with an isoleucine or valine, an aspartate with a glutamate, or a threonine with a serine. Insertions or deletions are typically in the range of about 1 to 5 amino acids.

As used herein, the term "nonconservative" refers to substituting an amino acid residue for a different amino acid residue that has different chemical properties. The nonconservative substitutions include, but are not limited to aspartic acid (D) being replaced with glycine (G); asparagine (N) being replaced with lysine (K); or alanine (A) being replaced with arginine (R).

The single-letter codes for amino acid residues include the following: A = alanine, R = arginine, N = asparagine, D = aspartic acid, C = cysteine, Q = Glutamine, E = Glutamic acid, = glycine, H = histidine, I = isoleucine, L = leucine, K = lysine, M = methionine, F = phenylalanine, P = proline, S = serine, T = threonine, W = tryptophan, Y = tyrosine, V = valine.

It will be appreciated that polypeptides often contain amino acids other than the 20 amino acids commonly referred to as the 20 naturally occurring amino acids, and that many amino acids, including the terminal amino acids, may be modified in a given polypeptide, either by natural processes such as glycosylation and other post-translational modifications, or by chemical modification techniques which are well known in the art. Even the common modifications that occur naturally in polypeptides are too numerous to list exhaustively here, but they are well described in basic texts and in more detailed monographs, as well as in a voluminous research literature, and they are well-known to those of skill in the art. Among the known modifications which may be present in polypeptides of the present invention are, to name an illustrative few, acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, covalent attachment of flavin, covalent attachment of a heme moiety, covalent attachment of a polynucleotide or polynucleotide derivative, covalent attachment of a lipid or lipid derivative, covalent attachment of phosphatidylinositol, cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, formation of covalent cross-links, formation of cystine, formation of pyroglutamate, formylation, gamma-carboxylation, glycation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, racemization, selenoylation, sulfation, transfer-RNA mediated addition of amino acids to proteins such as arginylation, and ubiquitination.

Such modifications are well known to those of skill and have been described in great detail in the scientific literature. Several particularly common modifications, glycosylation, lipid attachment, sulfation, gamma-carboxylation of glutamic acid residues, hydroxylation and ADP-ribosylation, for

-9-

instance, are described in most basic texts, such as, for instance, I. E. Creighton, *Proteins-Structure and Molecular Properties*, 2nd Ed., W.H. Freeman and Company, New York, 1993. Many detailed reviews are available on this subject, such as, for example, those provided by Wold, F., in *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp 1-12, 1983; Selter et al., *Meth. Enzymol.* 182: 626-646, 1990 and Rattan et al., *Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48-62, 1992.

It will be appreciated, as is well known and as noted above, that polypeptides are not always entirely linear. For instance, polypeptides may be branched as a result of ubiquitination, and they may be circular, with or without branching, generally as a result of posttranslational events, including natural processing events and events brought about by human manipulation which do not occur naturally. Circular, branched and branched circular polypeptides may be synthesized by non-translational natural processes and by entirely synthetic methods, as well.

Modifications can occur anywhere in a polypeptide, including the peptide backbone, the amino acid side-chains and the amino or carboxyl termini. In fact, blockage of the amino or carboxyl group in a polypeptide, or both, by a covalent modification, is common in naturally occurring and synthetic polypeptides and such modifications may be present in polypeptides of the present invention, as well. For instance, the amino terminal residue of polypeptides made in *E. coli*, prior to proteolytic processing, almost invariably will be N-formylmethionine.

The modifications that occur in a polypeptide often will be a function of how it is made. For polypeptides made by expressing a cloned gene in a host, for instance, the nature and extent of the modifications in large part will be determined by the host cell posttranslational modification capacity and the modification signals present in the polypeptide amino acid sequence. For instance, as is well known, glycosylation often does not occur in bacterial hosts such as *E. coli*. Accordingly, when glycosylation is desired, a polypeptide should be expressed in a glycosylating host, generally a eukaryotic cell. Insect cells often carry out the same posttranslational glycosylations as mammalian cells and, for this reason, insect cell expression systems have been developed to efficiently express mammalian proteins having native patterns of glycosylation, *inter alia*. Similar considerations apply to other modifications.

It will be appreciated that the same type of modification may be present to the same or varying degree at several sites in a given polypeptide. Also, a given polypeptide may contain many types of modifications.

As used herein, the following terms are used to describe the sequence relationships between two or more polynucleotide or amino acid sequences: "reference sequence", "comparison window", "sequence identity", "percentage of sequence identity", "substantial identity", "similarity", and "homologous". A "reference sequence" is a defined sequence used as a basis for a sequence comparison; a reference sequence may be a subset of a larger sequence; for example, as a segment of a full-length cDNA or gene sequence given in a sequence listing or may comprise a complete cDNA or gene sequence. Generally, a reference sequence is at least 18 nucleotides or 8

-10-

amino acids in length, frequently at least 24 nucleotides or 8 amino acids in length, and often at least 48 nucleotides or 16 amino acids in length. Since two polynucleotides or amino acid sequences may each (1) comprise a sequence (i.e., a portion of the complete polynucleotide or amino acid sequence) that is similar between the two molecules, and (2) may further comprise a sequence that is divergent between the two polynucleotides or amino acid sequences, sequence comparisons between two (or more) molecules are typically performed by comparing sequences of the two molecules over a "comparison window" to identify and compare local regions of sequence similarity. A "comparison window", as used herein, refers to a conceptual segment of at least 18 contiguous nucleotide positions or 6 amino acids wherein a polynucleotide sequence or amino acid sequence may be compared to a reference sequence of at least 18 contiguous nucleotides or 6 amino acid sequences and wherein the portion of the polynucleotide sequence in the comparison window may comprise additions, deletions, substitutions, and the like (i.e., gaps) of 20 percent or less as compared to the reference sequence (which does not comprise additions or deletions) for optimal alignment of the two sequences. Optimal alignment of sequences for aligning a comparison window may be conducted, for example, by the local homology algorithm of Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), by the homology alignment algorithm of Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), by the search for similarity method of Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85:2444 (1988), by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), VectorNTI from Informatics, Geneworks, or MacVector software packages), or by inspection, and the best alignment (i.e., resulting in the highest percentage of homology over the comparison window) generated by the various methods is selected.

As used herein, the term "sequence identity" means that two polynucleotide or amino acid sequences are identical (i.e., on a nucleotide-by-nucleotide or residue-by-residue basis) over the comparison window. The term "percentage of sequence identity" is calculated by comparing two optimally aligned sequences over the window of comparison, determining the number of positions at which the identical nucleic acid base (e.g., A, T, C, G, U, or I) or residue occurs in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the total number of positions in the comparison window (i.e., the window size), and multiplying the result by 100 to yield the percentage of sequence identity. The terms "substantial identity" as used herein denotes a characteristic of a polynucleotide or amino acid sequence, wherein the polynucleotide or amino acid comprises a sequence that has at least 85 percent sequence identity, preferably at least 90 to 95 percent sequence identity, more usually at least 99 percent sequence identity as compared to a reference sequence over a comparison window of at least 18 nucleotide (6 amino acid) positions, frequently over a window of at least 24-48 nucleotide (8-16 amino acid) positions, wherein the percentage of sequence identity is calculated by comparing the reference sequence to the sequence which may include deletions or additions which total 20 percent or less of the reference sequence

over the comparison window. The reference sequence may be a subset of a larger sequence. The term "similarity", when used to describe a polypeptide, is determined by comparing the amino acid sequence and the conserved amino acid substitutes of one polypeptide to the sequence of a second polypeptide. The term "homologous", when used to describe a polynucleotide, indicates that two
 5 polynucleotides, or designated sequences thereof, when optimally aligned and compared, are identical, with appropriate nucleotide insertions or deletions, in at least 70% of the nucleotides, usually from about 75% to 99%, and more preferably at least about 98 to 99% of the nucleotides.

As used herein, "homologous", when used to describe a polynucleotide, indicates that two polynucleotides, or designated sequences thereof, when optimally aligned and compared, are identical,
 10 with appropriate nucleotide insertions or deletions, in at least 70% of the nucleotides, usually from about 75% to 99%, and more preferably at least about 98 to 99% of the nucleotides.

As used herein, "polymerase chain reaction" or "PCR" refers to a procedure wherein specific pieces of DNA are amplified as described in U.S. Pat. No. 4,883,195. Generally, sequence information from the ends of the polypeptide fragment of interest or beyond needs to be available,
 15 such that oligonucleotide primers can be designed; these primers will point towards one another, and will be identical or similar in sequence to opposite strands of the template to be amplified. The 5' terminal nucleotides of the two primers will coincide with the ends of the amplified material. PCR can be used to amplify specific DNA sequences from total genomic DNA, cDNA transcribed from total cellular RNA, plasmid sequences, etc. (See generally Mullis et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51: 263, 1987; Erlich, ed., *PCR Technology*, Stockton Press, NY, 1989).
 20

As used herein, "stringency" typically occurs in a range from about T_m (melting temperature)-5°C (5° below the T_m of the probe) to about 20°C to 25°C below T_m . As will be understood by those of skill in the art, a stringent hybridization can be used to identify or detect identical polynucleotide sequences or to identify or detect similar or related polynucleotide sequences. As herein used, the
 25 term "stringent conditions" means hybridization will occur only if there is at least 95% and preferably at least 97% identity between the sequences.

As used herein, "hybridization" as used herein, shall include "any process by which a polynucleotide strand joins with a complementary strand through base pairing" (Coombs, J., *Dictionary of Biotechnology*, Stockton Press, New York, N.Y., 1994).

As used herein, the term "therapeutically effective dose" or "effective amount" refers to that amount of adenovirus which ameliorates the symptoms or conditions of a disease. A dose is considered a therapeutically effective dose in the treatment of cancer or its metastasis when tumor or metastatic growth is slowed or stopped, or the tumor or metastasis is found to shrink in size, so as
 30 to lead to an extension in life-span for the subject.

Adenoviruses of the Invention

The present invention provides chimeric adenoviruses, or variants or derivatives thereof, having a genome in which the nucleotide sequence of the E2B region of the chimeric adenovirus comprises nucleic acid sequences derived from at least two adenoviral serotypes, which serotypes are each selected from the adenoviral subgroups B, C, D, E and F and are distinct from each other. A chimeric adenovirus of the invention is oncolytic and demonstrates an enhanced therapeutic index for a tumor cell.

Isolation of Chimeric Adenoviruses

The chimeric adenoviruses of the invention, or variants or derivatives thereof, can be produced using modification of a technique referred to as "bioreselection", in which an adenovirus with desired properties, such as enhanced oncogenicity or cell-type specificity, is generated through the use of genetic selection under controlled conditions (Yan et al. (2003) *J. Virol.* 77:2840-2850).

In the present invention, a mixture of adenoviruses of differing serotypes is pooled and is passaged, preferably at least twice, on a subconfluent culture of tumor cells at a particle per cell ratio high enough to encourage recombination between serotypes, but not so high as to produce premature cell death. A preferred particle per cell ratio is approximately 500 particles per cell, and is easily determined by one skilled in the art. As used herein, a "subconfluent culture" of cells refers to a monolayer or suspension culture in which the cells are actively growing. For cells grown as a monolayer, an example would be a culture where approximately 50% to 80% of the area available for cell growth is covered with cells. Preferred is a culture where approximately 75% of the growth area is covered with cells.

In a preferred embodiment, the adenoviral mixture is one that includes adenoviral serotypes representative of the adenoviral subgroups B, C, D, E and F. Group A adenoviruses are not included in the mixture as they are associated with tumor formation in rodents. Preferred tumor cell lines useful in the bioreselection process include, but are not limited to, those derived from breast, colon, pancreas, lung and prostate. Some examples of solid tumor cell lines useful for the "bioreselective" passaging of the adenoviral mixture include, but are not limited to, MDA231, HT29, PAN-1 and PC-3 cells. Hemopoietic cell lines include, but are not limited to, the Raji and Daudi B-lymphoid cells, K562 erythroblastoid cells, U937 myeloid cells, and HSB2 T-lymphoid cells.

Adenoviruses produced during these initial passages are used to infect quiescent tumor cells at a particle to cell ratio low enough to permit the infection of a cell by no more than one adenovirus. After up to 20 passages under these conditions, the supernatant from the last passage is harvested prior to visible cytopathic effect (CPE, see Fields Virology, Vol.2, Fourth Edition, Knipe, et al., Lippincott Williams & Wilkins, pp. 135-136) to increase selection of highly potent viruses. The harvested supernatant can be concentrated by techniques well known to those skilled in the art. A preferred method for attaining quiescent cells, i.e. ones in which active cell growth has stopped, in a

-13-

monolayer culture is to allow the culture to grow for 3 days following confluence; where confluence means that the entire area available for cell growth is occupied (covered with cells). Similarly, suspension cultures can be grown to densities characterized by the absence of active cell growth.

The serotype profile of the concentrated supernatant, which contains the bloselected adenoviral pool, can be examined by measuring the retention times of the harvested viral pool on an anion exchange column, where different adenoviral serotypes are known to have characteristic retention times (Blanche et al. (2000) *Gene Therapy* 7:1055-1062); see Example 3, Figures 1A and B. Adenoviruses of the invention can be isolated from the concentrated supernatant by dilution and plaque purification, or other techniques well known in the art, and grown for further characterization. Techniques well known in the art are used to determine the sequence of the isolated chimeric adenoviruses (see Example 5).

An example of a chimeric adenovirus of the invention is the chimeric adenovirus ColoAd1, which was isolated using HT29 colon cells in the bloselection process. ColoAd1 has the nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 1. The majority of the nucleotide sequence of ColoAd1 is identical to the nucleotide sequence of the Ad11 serotype (SEQ ID NO: 2) (Stone et al. (2003) *Virology* 309:152-165; Mel et al. (2003) *J. Gen. Virology* 84:2061-2071). There are two deletions in the ColoAd1 nucleotide sequence as compared with Ad11, one 2444 base pairs in length within the E3 transcription unit region of the genome (base pairs 27979 to 30423 of SEQ ID NO: 2) and a second, smaller deletion, 25 base pairs in length (base pairs 33164 to 33189 of SEQ ID NO: 2), within the E4orf4 gene. The E2B transcription unit region (SEQ ID NO: 3) of ColoAd1, which encodes the adenoviral proteins DNA polymerase and terminal protein, is located between base pairs 5067 and 10354 of SEQ ID NO: 1, and is an area of homologous recombination between the Ad11 and Ad3 serotypes. Within this region of ColoAd1, there are 198 base pair changes, as compared with the sequence of Ad11 (SEQ ID NO: 1). The changes result in stretches of nucleotides within the E2B region of ColoAd1 which are homologous to the sequence within a portion of the E2B region of Ad3 (SEQ ID NO: 8), with the longest stretch of homology between ColoAd1 and Ad3 being 414 bp in length. The E2B region of ColoAd1 (SEQ ID NO: 3) confers enhanced potency to the ColoAd1 adenovirus as compared to unmodified Ad11 adenovirus (see Example 6; Fig 7). In other embodiments, a chimeric adenovirus of the invention can comprise nucleic acid sequences from more than two adenoviral serotypes.

A chimeric adenovirus of the invention, or a variant or derivative thereof, can be evaluated for its selectivity in a specific tumor type by examination of its lytic potential in a panel of tumor cells derived from the same tissue upon which the adenoviral pool was initially passaged. For example, the chimeric adenovirus ColoAd1 (SEQ ID NO: 1), which was initially derived from an adenoviral pool passaged on HT-29 colon tumor cell lines; was re-examined both in HT-29 cells and in a panel of other colon-derived tumor cells lines, including DLD-1, LS174T, LS1034, SW403, HCT116, SW48, and Colo320DM (see Figure 3B). Any available colon tumor cell lines would be equally useful for such an evaluation. Isolated adenoviral clones from adenoviral pools selected on other tumor cell

types can be similarly tested in a suitable tumor cell panel, including, but not limited to, prostate cell lines (e.g. DU145 and PC-3 cell lines); pancreatic cell lines (e.g. the Panc-1 cell line); breast tumor cell lines (e.g. the MDA231 cell line) and ovarian cell lines (e.g. the OVCAR-3 cell line). Other available tumor cell lines are equally useful in isolating and identifying adenoviruses of the invention.

5 The chimeric adenoviruses of the invention have an enhanced therapeutic index as compared with the adenoviral serotypes from which it is derived. (see Figure 6, which compares the cytolytic activity of the chimeric adenovirus ColoAd1 with Ad11p).

 The invention also encompasses chimeric adenoviruses that are constructed using recombinant techniques well-known to those skilled in the art. Such chimeric adenoviruses comprise
10 a region of nucleotide sequence derived from one adenoviral serotype which is incorporated by recombinant techniques into the genome of a second adenoviral serotype. The incorporated sequence confers a property, e.g. tumor specificity or enhanced potency, to the parental adenoviral serotype. For example, the E2B region of ColoAd1 (SEQ ID NO: 3) can be incorporated into the genome of Ad35 or Ad9.

15 Adenoviral Derivatives

 The invention also encompasses a chimeric adenovirus of the invention that is modified to provide other therapeutically useful chimeric adenoviruses. Modifications include, but are not limited to, those described below.

20 One modification is production of derivatives of the chimeric adenovirus of the invention substantially lacking the ability to bind p53, as a result of a mutation in the adenoviral gene that encodes the E1B-55K protein. Such viruses generally have some, or all, of the E1B-55K region deleted. (see U.S. Patent No. 5,677,178). U.S. Patent No. 6,080,576 describes, among other things, Ad5 mutants that have deletions in the region of the E1B-55K protein that is responsible for binding
25 p53. Another preferred modification to the chimeric adenoviruses of the instant invention are mutations in the E1A region, as described in U.S. Patent Nos. 5,801,029 and 5,972,706. These types of modifications provide derivatives of the chimeric adenoviruses of the invention with greater selectivity for tumor cells.

 Another example of a modification encompassed by the invention is a chimeric adenovirus
30 which exhibits an enhanced degree of tissue specificity due to placement of viral replication under the control of a tissue specific promoter as described in U.S. Patent No. 5,998,205. Replication of a chimeric adenovirus of the invention can also be put under the control of an E2F responsive element as described in U.S. Patent Application No. 09/714,409. This modification affords a viral replication control mechanism based on the presence of E2F, resulting in enhanced tumor tissue specificity,
35 and is distinct from the control realized by a tissue specific promoter. In both of these embodiments, the tissue specific promoter and the E2F responsive element are operably linked to an adenoviral gene that is essential for the replication of the adenovirus.

-15-

Another modification encompassed by the invention is use of a chimeric adenovirus of the invention, e.g. ColoAd1, as the backbone for production of novel replication-deficient adenoviral vectors. As described in Lai et al. ((2002) *DNA Cell Bio.* 21:895-913), adenoviral vectors which are replication deficient can be used to deliver and express therapeutic genes. Both first generation (in which the E1 and E3-regions are deleted) and second generation (in which the E4 region is additionally deleted) adenoviral vectors derived from the chimeric adenoviruses of the invention are provided herein. Such vectors are easily produced using techniques well known to those skilled in the art (see Imperiale and Kochanek (2004) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 273:335-357; Vogels et al. (2003) *J. Virol.* 77:8263-8271).

A further modification encompassed by the invention is the insertion of a heterologous gene, useful as a marker or reporter for tracking the efficiency of viral infection. One embodiment of this type of modification is insertion of the thymidine kinase (TK) gene. The expression of TK within infected cells can be used to track the level of virus remaining in cells following viral infection, using radiolabeled substrates of the TK reaction (Sangro et al. (2002) *Mol. Imaging Biol.* 4:27-33).

Methods for the construction of the modified chimeric adenoviruses are generally known in the art. See: Mittal, S. K. (1993) *Virus Res.* 28:67-90 and Hermiston, T. et al. (1999) *Methods in Molecular Medicine: Adenovirus Methods and Protocols*, W.S.M. Wold, ed, Humana Press.

Standard techniques are used for recombinant nucleic acid methods, polynucleotide synthesis, and microbial culture and transformation (e.g., electroporation, lipofection). Generally, enzymatic

reactions and purification steps are performed according to the manufacturer's specifications. The techniques and procedures are generally performed according to conventional methods in the art and various general references (see generally, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) which are provided throughout this document. The nomenclature used herein and the laboratory procedures in analytical chemistry, organic synthetic chemistry, and pharmaceutical formulation described below are those well known and commonly employed in the art.

Determination of Therapeutic Potential

Chimeric adenoviruses of the invention, or variants or derivatives thereof, can be evaluated for their therapeutic utility by examination of their lytic potential in tumor cells derived from tissues of interest as therapeutic targets. Tumor cell lines useful for testing such adenoviruses include, but are not limited to, colon cell lines, including but not limited to, DLD-1, HCT116, HT29, LS1034 and SW48 cell lines; prostate cell lines, including but not limited to, DU145 and PC-3 cell lines; pancreatic cell lines, including but not limited to, the Panc-1 cell line; breast tumor cell lines, including but not limited to, the MDA231 cell line and ovarian cell lines, including but not limited to, the OVCAR-3 cell line. Hemopoietic cell lines include, but are not limited to, the Raji and Daudi B-lymphoid cells, K562 erythroid cells, U937 myeloid cells, and HSB2 T-lymphoid cells. Any other tumor cell lines

that are available can be used in evaluating and identifying adenoviruses of the invention for use in the treatment of neoplasia.

The cytolytic activity of adenoviruses of the invention can be determined in representative tumor cell lines and the data converted to a measurement of potency, with an adenovirus belonging to subgroup C, preferably Ad5, being used as a standard (i.e. given a potency of 1). A preferred method for determining cytolytic activity is an MTS assay (see Example 4, Figure 2).

The therapeutic index of an adenovirus of the invention in a particular tumor cell line can be calculated by comparison of the potency of the given adenovirus in a tumor cell line with the potency of that same adenovirus in a non-cancerous cell line. Preferred non-cancerous cell lines are SAEC cells, which are epithelial in origin, and HUVEC cells which are endothelial in origin (see Figure 4). These two cell types represent normal cells from which organs and vasculature, respectively, are derived, and are representative of likely sites of toxicity during adenoviral therapy, depending on the mode of delivery of the adenovirus. However, practice of the invention is not limited to the use of these cells, and other non-cancerous cell lines (e.g. B cells, T cells, macrophages, monocytes, fibroblasts) may also be used.

The chimeric adenoviruses of the invention can be further evaluated for their ability to target neoplastic cell growth (i.e. cancer) by their capacity to reduce tumorigenesis or neoplastic cell burden in nude mice harboring a transplant of neoplastic cells, as compared to untreated mice harboring an equivalent neoplastic cell burden (see Example 7).

Evaluation of the adenoviruses of the invention can also be performed using primary human tumor explants (Lam et al. (2003) *Cancer Gene Therapy*; Grill et al. (2003) *Mol. Therapy* 6:608-614), which provide test conditions present in tumors that cannot normally be produced using the tumor xenograft studies.

25 Therapeutic Utility

The present invention provides for the use of chimeric adenoviruses of the invention for the inhibition of tumor cell growth, as well as for the use of adenoviral vectors derived from these chimeric adenoviruses to deliver therapeutic proteins useful in the treatment of neoplasia and other disease states.

30 Pharmaceutical Compositions and Administration

The present invention also relates to pharmaceutical compositions which comprise the chimeric adenoviruses of the invention, including variants and derivatives thereof, formulated for therapeutic administration to a patient. For therapeutic use, a sterile composition containing a pharmacologically effective dosage of adenovirus is administered to a human patient or veterinary non-human patient for treatment, for example, of a neoplastic condition. Generally, the composition will comprise about 10^{11} or more adenovirus particles in an aqueous suspension. A pharmaceutically acceptable carrier or excipient is often employed in such sterile compositions. A

-17-

variety of aqueous solutions can be used, e.g. water, buffered water, 0.4% saline, 0.3% -glycine and the like. These solutions are sterile and generally free of particulate matter other than the desired adenoviral vector. The compositions may contain pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological conditions such as pH adjusting and buffering agents, toxicity adjusting agents and the like, e.g. sodium acetate, sodium chloride, potassium chloride, calcium chloride, sodium lactate, etc. Excipients which enhance infection of cells by adenovirus may be included. (see U.S. Patent No. 6,392,089)

Adenoviruses of the invention may also be delivered to neoplastic cells by liposome or immunoliposome delivery; such delivery may be selectively targeted to neoplastic cells on the basis of a cell surface property present on the neoplastic cell population (e.g., the presence of a cell surface protein which binds an immunoglobulin in an immunoliposome). Typically, an aqueous suspension containing the virions are encapsulated in liposomes or immunoliposomes. For example, a suspension of adenovirus virions can be encapsulated in micelles to form immunoliposomes by conventional methods (U.S. Patent No. 5,043,164, U.S. Patent No. 4,957,735, U.S. Patent No. 4,825,661; Connor and Huang, (1985) *J. Cell Biol.* 101: 581; Lasic D.D. (1992) *Nature* 355: 279; Novel Drug Delivery (eds. Prescott and Nimmo, Wiley, New York, 1989); Reddy et al. (1992) *J. Immunol.* 148:1585). Immunoliposomes comprising an antibody that binds specifically to a cancer cell antigen (e.g., CALLA, CEA) present on the cancer cells of the individual may be used to target virions to those cells (Fisher (2001) *Gene Therapy* 8:341-348).

To further increase the efficacy of the adenoviruses of the invention, they may be modified to exhibit enhanced tropism for particular tumor cell types. For example, as shown in PCT/US98/04984, a protein on the exterior coat of an adenovirus may be modified to display a chemical agent, preferably a polypeptide, that binds to a receptor present on tumor cells to a greater degree than normal cells. (See also, U. S. Patent Nos. 5,770,442 and 5,712,136). The polypeptide can be an antibody, and preferably is a single chain antibody.

Adenoviral Therapy

The adenoviruses of the invention, or pharmaceutical compositions thereof, can be administered for therapeutic treatment of neoplastic disease or cancer. In therapeutic applications, compositions are administered to a patient already affected by the particular neoplastic disease, in an amount sufficient to cure or at least partially arrest the condition and its complications. An amount adequate to accomplish this is defined as a "therapeutically effective dose" or "efficacious dose". Amounts effective for this use will depend upon the severity of the condition, the general state of the patient, and the route of administration.

For example, but not by way of limitation, a human patient or non-human mammal having a solid or haematologic neoplastic disease, (e.g. pancreatic, colon, ovarian, lung, or breast carcinoma, leukemia or multiple myeloma) may be treated by administering a therapeutically effective dosage of an appropriate adenovirus of the invention, i.e. one which has been shown to have an improved

therapeutic index for that tissue type. For example, a preferred chimeric adenovirus for the treatment of colon cancer would be the adenovirus ColoAd1 (SEQ ID NO: 1). Suspensions of infectious adenovirus particles may be delivered to neoplastic tissue by various routes, including intravenous, intraperitoneal, intramuscular, subdermal, and topical. An adenovirus suspension
5 containing about 10^9 to 10^{12} or more virion particles per ml may be administered by infusion (e.g., into the peritoneal cavity for treating ovarian cancer, into the portal vein for treating hepatocarcinoma or liver metastases from other non-hepatic primary tumors) or other suitable route, including direct injection into a tumor mass (e.g., a breast tumor), enema (e.g., colon cancer), or catheter (e.g., bladder cancer). Other routes of administration may be suitable for carcinomas of other origins, i.e.
10 Inhalation as a mist (e.g., for pulmonary delivery to treat bronchogenic carcinoma, small-cell lung carcinoma, non-small cell lung carcinoma, lung adenocarcinoma, or laryngeal cancer) or direct application to a tumor site (e.g., bronchogenic carcinoma, nasopharyngeal carcinoma, laryngeal carcinoma, cervical carcinoma).

Adenoviral therapy using the adenoviruses of the instant invention may be combined with
15 other antineoplastic protocols, such as conventional chemotherapy or x-ray therapy to treat a particular cancer. Treatment can be concurrent or sequential. A preferred chemotherapeutic agent is cisplatin, and the preferred dose may be chosen by the practitioner based on the nature of the cancer to be treated, and other factors routinely considered in administering cisplatin. Preferably, cisplatin will be administered intravenously at a dose of 50-120 mg/m² over 3-6 hours. More
20 preferably it is administered intravenously at a dose of 80 mg/m² over 4 hours. A second preferred chemotherapeutic agent is 5-fluorouracil, which is often administered in combination with cisplatin. The preferred dose of 5-fluorouracil is 800-1200 mg/m² per day for 5 consecutive days.

Adenoviral therapy using the adenoviruses of the instant invention as adenoviral vectors may also be combined with other genes known to be useful in viral based therapy. See U. S. Patent
25 No. 5,648,478. In such cases, the chimeric adenovirus further comprises a heterologous gene that encodes a therapeutic protein, incorporated within the viral genome, such that the heterologous gene is expressed within an infected cell. A therapeutic protein, as used herein, refers to a protein that would be expected to provide some therapeutic benefit when expressed in a given cell.

In one embodiment, the heterologous gene is a pro-drug activator gene, such as cytosine
30 deaminase (CD) (See, U.S. Patent Nos. 5,631,236; 5,358,866; and 5,677,178). In other embodiments, the heterologous gene is a known inducer of cell-death, e.g. apoptin or adenoviral death protein (ADP), or a fusion protein, e.g. fusogenic membrane glycoprotein (Danen-Van Oorschot et al. (1997) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94:5843-5847; Tollefson et al. (1996) *J. Virol.* 70:2296-2306; Fu et al. (2003) *Mol. Therapy* 7: 48-754; 2003; Ahmed et al. (2003) *Gene Therapy* 10:1663-1671; Galanis et al. (2001) *Human Gene Therapy* 12(7): 811-821).

Further examples of heterologous genes, or fragments thereof, include those that encode immunomodulatory proteins, such as cytokines or chemokines. Examples include interleukin 2, U.S. Patent Nos. 4,738,927 or 5,641,685; interleukin 7, U.S. Patent Nos. 4,965,195 or 5,328,986; and

interleukin 12, U. S. Patent No. 5,457,038; tumor necrosis factor alpha, U. S. Patent Nos. 4,677,063 or 5,773,582; interferon gamma, U.S. Patent Nos. 4,727,138 or 4,762,791; or GM-CSF, U.S. Patent Nos. 5,393,870 or 5,391,485, Mackensen et al. (1997) *Cytokine Growth Factor Rev.* 8:119-128). Additional immunomodulatory proteins further include macrophage inflammatory proteins, including
5 MIP-3. Monocyte chemoattractant protein (MCP-3 alpha) may also be used; a preferred embodiment of a heterologous gene is a chimeric gene consisting of a gene that encodes a protein that traverses cell membranes, for example, VP22 or TAT, fused to a gene that encodes a protein that is preferably toxic to cancer but not normal cells.

The chimeric adenoviruses of the invention can also be used as vectors to deliver genes
10 encoding therapeutically useful RNA molecules, i.e. siRNA (Dorsett and Tuschl (2004) *Nature Rev Drug Disc* 3:318-329).

In some cases, genes can be incorporated into a chimeric adenovirus of the invention to further enhance the ability of the oncolytic virus to eradicate the tumor, although not having any direct impact on the tumor itself - these include genes encoding proteins that compromise MHC class
15 presentation (Hewitt et al. (2003) *Immunology* 110: 163-169), block complement, inhibit IFNs and IFN-induced mechanisms, chemokines and cytokines, NK cell based killing (Orange et al., (2002) *Nature Immunol.* 3: 1006-1012; Mireille et al. (2002) *Immunogenetics* 54: 527-542; Alcamí (2003) *Nature Rev. Immunol.* 3: 36-50; down-regulate the immune response (e.g. IL-10, TGF- β , Khong and Restifo (2002) *Nature Immunol.* 3: 999-1005; 2002) and metalloproteases which can
20 breakdown the extracellular matrix and enhance spread of the virus within the tumor (Boorman and Stamenkovic (2003) *J. Pathol.* 2000: 423-428; Vase and Nagase (2003) *Circulation Res.* 92: 827-839).

Kits

25 The invention further relates to pharmaceutical packs and kits comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the aforementioned compositions of the invention. Associated with such container(s) can be a notice in the form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products, reflecting approval by the agency of the manufacture, use or sale of the product for human
30 administration.

The present invention is further described by the following examples, which are illustrative of specific embodiments of the invention; and various uses thereof. These exemplifications, which illustrating certain specific aspects of the invention; do not portray the limitations or circumscribe the scope of the disclosed invention.

35 Unless otherwise indicated, the practice of the present invention employs conventional techniques of cell culture, molecular biology, microbiology, recombinant DNA manipulation, immunology science, which are within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the

-20-

literature. See, e.g. *Cell Biology: a Laboratory Handbook*: J. Celis (Ed). Academic Press. N.Y. (1996); Graham, F.L. and Prevec, L. Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines. In: *Vaccines: New Approaches to Immunological Problems*. R.W. Ellis (ed) Butterworth. Pp 363-390; Graham and Prevec Manipulation of adenovirus vectors. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7: Gene Transfer and Expression Techniques. E.J. Murray and J.M. Walker (eds) Humana Press Inc., Clifton, N.J. pp 109-128, 1991; Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook et al. (1989), and Ausubel et al. (1995), *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons.

10

EXAMPLES

Methods

Standard techniques are used for recombinant nucleic acid methods, polynucleotide synthesis, and microbial culture and transformation (e.g., electroporation, lipofection). Generally, enzymatic reactions and purification steps are performed according to the manufacturer's specifications. The techniques and procedures are generally performed according to conventional methods in the art and various general references (see generally, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) which are provided throughout this document. The nomenclature used herein and the laboratory procedures in analytical chemistry, organic synthetic chemistry, and pharmaceutical formulation and delivery, and treatment of patients. Methods for the construction of adenoviral mutants are generally known in the art. See, Mittal, S. K., *Virus Res.*, 1993, vol: 28, pages 67-90; and Hermiston, T. et al., *Methods in Molecular Medicine: Adenovirus Methods and Protocols*, W.S.M. Wold, ed, Humana Press, 1999. Further, the adenovirus 5 genome is registered as Genbank 10 accession #M73260, and the virus is available from the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U. S. A., under accession number VR-5.

Viruses and Cell Lines

The Ad serotypes Ad3 (GB strain), Ad4 (RI-67 strain), Ad5 (Adenoid 75 strain), Ad9 (Hicks strain), Ad11p (Slobitaki strain), Ad16 (Ch. 79 strain) and all the cell lines, with the exception of the following were all purchased from the ATCC: MDA231-mt1 (a derivative isolated by Dr. Deb Zajchowski from a rapidly growing subcutaneous implanted xenograft of MDA231 cells) and Panc1-sct (derived by Dr. Sandra Biroc from a rapidly growing subcutaneous implanted xenograft of Panc1 cells), HUVEC (Vec Technologies, Rensselaer, NY), and SAEC (Clonetics, Walkersville, MD). Ad40 was a kind gift from Dr. William S.M. Wold at St. Louis University.

Example 1 - Viral Purification and Quantitation

Viral stocks were propagated on 293 cells and purified on CsCl gradients (Hawkins et al., 2001). The method used to quantitate viral particles is based on that of Shabram et al. (1997) *Human Gene Therapy* 8:453-465, with the exception that the anion-exchanger TMAE Fractogel was used instead of Resource Q. In brief, a 1.25 ml column was packed with Fractogel EMD TMAE-650 (S) (catalog # 116887-7 EM Science, Gibbstown, NJ 08027). HPLC separation was performed on an Agilent HP 1100 HPLC using the following conditions: Buffer A = 50 mM HEPES, pH 7.5; Buffer B = 1.0 M NaCl in Buffer A; flow rate of 1 ml per minute. After column equilibration for not less than 30 minutes in Buffer A, approximately 10^8 - 10^{11} viral particles of sample were loaded onto the column in 10-100 μ l volume, followed by 4 column volumes of Buffer A. A linear gradient extending over 16 column volumes and ending in 100% Buffer B was applied.

The column effluent was monitored at A260 and A280 nm, peak areas calculated, and the 260 to 280 nm ratio determined. Viral peaks were identified as those peaks having a A260/A280 ratio close to 1.33. A virus standard was included with each sample series. The number of viral particles per ml of the standard had been determined using the method of Lehnberg et al. (1999) *J. Chrom. B*, 732:411-423). In the viral concentration range used, the A260 nm peak area of each sample is directly proportional to the number of viral particles in the sample. The number of viral particles per ml in each test sample was calculated by multiplying the known number of viral particles per ml in the standard by the ratio of the A260 nm viral peak area of the sample to the A260 nm viral peak area of the standard.

The column was regenerated after each sample gradient by washing with two column volumes of 0.5 N NaOH followed by two column volumes of 100% Buffer A, 3 column volumes of 100% Buffer B, and then 4 column volumes of 100% Buffer A.

Example 2 - Biosselection

Viral serotypes representing subgroups Ads B-F were pooled and passaged on sub-confluent cultures of the target tumor cell lines at a high particle-per-cell ratio for two rounds to invite recombination to occur between serotypes. Supernatant (1.0, 0.1 0.01, 0.001 ml) from the second round of the high viral particle-per-cell infection, subconfluent cultures, was then used to infect a series of over-confluent T-75 tissue culture flasks of target tumor cell lines PC-3, HT-29, Pano-1 and MDA-231. To achieve over-confluency, each cell line was seeded at split ratios that allowed that cell line to reach confluency between 24 and 40 hours post seeding, and the cells were allowed to grow a total of 72 hours post seeding prior to infection. This was done to maximize the confluency of the cells to mimic growth conditions in human solid tumors.

-22-

Cell culture supernatant was harvested from the first flask in the 10-fold dilution series that did not show any sign of CPE at day 3 or 4 post-infection (in the case of HT-29 and PC-3, this was modified for passages 10-20 to harvest of the second flask, i.e. harvest 100-fold below the dilution in which CPE were detectable by day 3 post-infection). Each harvest served as the starting material for the successive passage of the virus. This process was repeated until the viral pool achieved 20 bioselective passages.

Individual viruses from each bioselected pool were isolated by two rounds of plaque purification on A549 cells using standard methods (Tollefson, A., Hermiston, T.W., and Wold, W.S.M., "Preparation and Titration of CsCl-banded Adenovirus Stock" in Adenovirus Methods and Protocols, Humana Press, 1999, pp 1-10, W.S.M. Wold, Ed). In brief, dilutions of the supernatant harvested from the 20th passage on each target tumor line were used to infect A549 cells in a standard plaque assay. Well-individuated plaques were harvested, and the same plaque assay method was used to generate a second round of individual plaques from these harvests. Well isolated plaques from the second round of plaque purification were deemed pure. Infected cultures were prepared using these purified plaques, and the oncolytic potency of these culture supernatants determined by MTS assay as described.

Example 3 - Serotype Characterization

The parental adenoviral serotypes comprising the viral pools or the isolated ColoAd1 adenovirus were identified using anion-exchange chromatography similar to that described in Shabram et al. (1997) *Human Gene Therapy* 8:453-465, with the exception that the anion-exchanger TMAE Fractogel media (EM Industries, Gibbstown, NJ) was used instead of Resource Q, as described in Example 1 (see Figure 1).

Adenovirus type 5 eluted at approximately 60% Buffer B during the gradient. The other serotypes (3,4, 9, 11p, 16, 35, and 40) each eluted at a characteristic retention time consistent with the retention times on Q Sepharose XL published by Blanche et al. (2000) *Gene Therapy* 7:1055-1062.

Example 4 - Cytolytic assay

The viral lytic capacity was measured by using a modification of the MTT assay (Shen et al., 2001). Briefly, the MTS assay (Promega, CellTiter 96[®] Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) was used in place of the MTT assay since conversion of MTS by cells into aqueous, soluble formazan reduces time and eliminates the use of a volatile organic solvent associated with the MTT assay.

-23-

To perform the assay, cells were seeded at a defined density for each tumor cell line that generated a confluent monolayer within 24 hr. These densely seeded cells were allowed to grow for 2 additional days prior to exposure to the test virus(es). Infections of both tumor and primary normal cells were carried out in quadruplicate with serial three fold dilutions of the viruses starting at a particle per cell ratio of 100 and ending at a particle per cell ratio of 0.005. Infected cells were incubated at 37° C and the MTS assay was performed at the time points indicated for the individual primary cells or tumor cell lines. Mock-infected cells served as negative controls and established the 100% survival point for the given assay.

10

Example 5 - DNA sequencing

DNA sequencing of the Ad11p (SEQ ID NO: 2) and ColoAd1 (SEQ ID NO: 1) genomic DNAs was performed as follows. Briefly, purified adenovirus DNA from ColoAd1 and Ad11p was partially digested with the restriction endonuclease *Sau3A1* and shotgun cloned into the plasmid vector pBluescript II (Stratagene, La Jolla, CA). Positive clones were propagated and sequenced using the primers M13R and KS (Stratagene, La Jolla, CA). Individual sequence reactions were trimmed, edited and assembled using Sequencher[™] (Gene Codes Corp., Ann Arbor, Michigan). Gaps in coverage were amplified with custom oligonucleotide primers and sequenced. The ends of the viral genomes were sequenced directly off the adenoviral DNA. In all, each genome was sequenced at 3X+ coverage and 431 bases at 2X coverage.

To determine the origin of the ColoAd1 E2B region, two primer sets were generated, one to the E2B pTP gene (bp91-15, 5'GGGAGTTTCGCGCGGACACGG3' (SEQ ID NO: 4) and bp 9350, 5' GCGCCGCGCCGCGGAGAGGT3' (SEQ ID NO: 5)) and one to the DNA polymerase gene (bp 7520 5'CGAGAGCCCATTCTGTCAGGTGAG3' (SEQ ID NO: 6) and bp 7982, 5'GCTGCGACTACTGCGGCCGTCTGT3' (SEQ ID NO: 7) and used to PCR isolate DNA fragments from the various serotypes (Ad3,4,5,9,11p,16 and 40) using reagents from the Advantage 2 PCR kit (Clontech, Walkersville, MD; Cat #K1910-Y) and run on a PTC-200 thermocycler from MJ Research (Watertown, MA). These fragments were subsequently sequenced along with the DNA sequence of Ad3 using dye terminator sequencing on an ABI 3100 genetic analyzer.

The E2B region of Ad3 was sequenced using isolated Ad3 DNA and overlapping primers. Sequence information was analyzed using the Vector NTI program (Informatix).

35

Example 6 - Construction of recombinant viruses

Genomic DNAs of Ad11p (SEQ ID NO: 2) and ColoAd1 (SEQ ID NO: 1) were purified from CsCl gradient-banded virus particles. The genomic DNAs were digested with *PacI* which cuts each

-24-

only once within the viral genome. The Pac1 cut occurs at base 18141 on ColoAd1 nucleotide sequence (SEQ ID NO: 1) and at base 18140 on the Ad11 nucleotide sequence (SEQ ID NO: 2). Digested DNAs were mixed in equal amounts and ligated in the presence of T4 DNA ligase at 16° C overnight. This ligation mixture was transfected into A549 cells using the CaPO₄ transfection kit from Invitrogen, Carlsbad, CA (Cat #K2780-01). Isolated plaques were picked and screened by restriction enzyme digestion and PCR analysis to distinguish the four viral populations (Ad11p, ColoAd1, left end Ad11p/right end ColoAd1 (ColoAd1.1) and left end ColoAd1/right end Ad11p(ColoAd1.2)).

The viral lytic capacity of each population was determined in several cell lines, including HT29 and HUVEC cell lines, as described in Example 3. The results demonstrated the order of potency, from least potent to most potent, as Ad11p, ColoAd1.2, ColoAd1.1, ColoAd1 (see Figure 7 for the results in HT29 cells).

Also constructed were chimeric adenoviruses pCJ144 and pCJ146, which contain the full-length ColoAd1 genome in which the wild-type Ad11p E3 and E4 region, respectively, has been restored. These modifications were introduced by homologous recombination into BJ5183 E. Coli (Chartier et al. (1996) *J. Virol.* 70:4805-4810). Both of these chimeric adenoviruses demonstrated reduced lytic capacity in HT29 and HUVEC cells compared to ColoAd1 or ColoAd1.2.

Example 7 - *In Vivo* Efficacy of Adenovirus

In a typical human tumor xenograft nude mouse experiment, animals are injected with 5×10^5 cells subcutaneously into the hind flank of the mouse. When the tumors reach 100-200 ul in size, they are injected with vehicle (PBS) or with virus at 2×10^{10} particles for five consecutive days (1×10^{11} particles total). A reduction in the size of the tumor would be noted relative to the PBS control and additional control viruses (Ad5, ONYX-015).

Example 8 - ColoAd1 Selectivity on Primary Human Tissue Explants

Tissue specimens from colorectal tumors and adjacent normal tissues removed during surgery were placed in culture media and infected with equal numbers of either ColoAd1 or Ad5 viruses. Culture supernatants were collected at 24 hours post infection and the number of virus particles produced was determined. ColoAd1 produced more virus particles per input particle than Ad5 on tumor tissue, while it produced fewer particles per input particle than Ad5 on normal tissue.

We claim:

- 5 1. A recombinant chimeric adenovirus, or a variant or derivative thereof, having a genome comprising an E2B region

wherein said E2B region comprises a nucleic acid sequence derived from a first adenoviral serotype and a nucleic acid sequence derived from a second adenoviral serotype;

- 10 wherein said first and second serotypes are each selected from the adenoviral subgroups B, C, D, E, or F and are distinct from each other; and

wherein said chimeric adenovirus is oncolytic and demonstrates an enhanced therapeutic index for a tumor cell.

- 15 2. The adenovirus of Claim 1 further comprising regions encoding fiber, hexon, and penton proteins, wherein the nucleic acid encoding the fiber, hexon, and penton proteins of said adenovirus are from the same adenoviral serotype.

- 20 3. The adenovirus of Claim 1 further comprising a modified E3 region.

4. The adenovirus of Claim 1 further comprising a modified E4 region.

- 25 5. The adenovirus of Claim 1, wherein said tumor cell is a colon, breast, pancreas, lung, prostate, ovarian, or hemopoietic tumor cell.

6. The adenovirus of Claim 5, wherein said tumor cell is a colon tumor cell.

- 30 7. The adenovirus of Claim 1, wherein the nucleotide sequence of the E2B region of said adenovirus comprises SEQ ID NO: 3, or a portion thereof.

8. The adenovirus of Claim 1, wherein the nucleotide sequence of said adenovirus comprises SEQ ID NO: 1.

- 35 9. A recombinant chimeric adenovirus, or a variant or derivative thereof, having a genome comprising an E2B region.

-26-

wherein said E2B region comprises a nucleic acid sequence derived from a first adenoviral serotype and a nucleic acid sequence derived from a second adenoviral serotype;

wherein said first and second adenoviral serotypes are each selected from the adenoviral subgroups B, C, D, E, or F and are distinct from each other;

wherein said chimeric adenovirus is oncolytic and demonstrates an enhanced therapeutic index for a tumor cell; and

wherein said chimeric adenovirus has been rendered replication deficient through deletion of one or more adenoviral regions encoding proteins involved in adenoviral replication selected from the group consisting of E1, E2, E3 or E4.

10. The replication deficient adenovirus of Claim 9, wherein the E1 and E3 regions have been deleted.

11. The replication deficient adenovirus of Claim 10, further comprising a deletion of the E4 region.

12. The adenovirus of Claim 1 or Claim 9, further comprising a heterologous gene, wherein said heterologous gene is expressed within a cell infected with said adenovirus.

13. The adenovirus of Claim 12, wherein said heterologous gene is thymidine kinase.

14. The adenovirus of Claim 12, wherein said heterologous gene encodes a therapeutic protein selected from the group consisting of cytokines and chemokines, antibodies, pro-drug converting enzymes, and immunoregulatory proteins.

15. A method of inhibiting growth of a cancer cell, comprising infecting said cancer cell with the adenovirus of Claim 1.

16. The method of Claim 15, wherein said cancer cell is a colon cancer cell.

17. The method of Claim 16, wherein the nucleotide sequence of said adenovirus comprises SEQ ID NO: 1.

18. A method of delivering a therapeutic protein to a cell, comprising infecting the cell with the adenovirus of Claim 14.

-27-

19. A method for isolating the adenovirus of Claim 1, wherein said method comprises

a) pooling of adenoviral serotypes representing adenoviral subgroups B-F, thereby creating an adenoviral mixture;

b) passaging the pooled adenoviral mixture from step (a) on an actively growing culture of tumor cells at a particle per cell ratio high enough to encourage recombination between serotypes, but not so high as to produce premature cell death;

c) harvesting the supernatant from step (b);

d) infecting a quiescent culture of tumor cells with the supernatant harvested in step (c);

e) harvesting the cell culture supernatant from step (d) prior to any sign of CPE;

f) infecting a quiescent culture of tumor cells with the supernatant harvested in step (e); and

g) isolating the virus of claim 1 from the supernatant harvested in step (f) by plaque purification.

20. The method of Claim 19, wherein step (b) is performed twice before harvesting the supernatant in step (c).

21. The method of Claim 19, wherein steps (e) and (f) are repeated up to 20 times prior to step (g).

22. The method of Claim 19, wherein a second round of plaque purification is performed following step (g).

23. The method of Claim 19, wherein the tumor cell is a colon, breast, pancreas, lung, prostate, ovarian, or hemopoietic tumor cell.

24. A recombinant chimeric adenovirus, or a variant or derivative thereof, having a genome comprising an E2B region

wherein said E2B region comprises a nucleic acid sequence derived from a first adenoviral serotype and a nucleic acid sequence derived from a second adenoviral serotype;

-28-

wherein said first and second adenoviral serotypes are each selected from the adenoviral subgroups B, C, D, E, or F and are distinct from each other; and

5 wherein said chimeric adenovirus is oncolytic and demonstrates an enhanced therapeutic index for a tumor cell;

produced by the method of

10 a) pooling of adenoviral serotypes representing adenoviral subgroups B-F, thereby creating an adenoviral mixture;

b) passaging the pooled adenoviral mixture from step (a) on an actively growing culture of tumor cells at a particle per cell ratio high enough to encourage recombination between serotypes, but not so high as to produce premature cell death;

15 c) harvesting the supernatant from step (b);

d) infecting a quiescent culture of tumor cells with the supernatant harvested in step (c);

20 e) harvesting the cell culture supernatant from step (d) prior to any sign of CPE;

f) infecting a quiescent culture of tumor cells with the supernatant harvested in step (e); and

25 g) isolating said chimeric adenovirus from the supernatant harvested in step (f) by plaque purification.

25. The method of Claim 24, wherein step (b) is performed twice before harvesting of the supernatant in step (c).

30 26. The method of Claim 24, wherein steps (e) and (f) are repeated up to 20 times prior to step (g).

27. The method of Claim 24, wherein a second round of plaque purification is performed following step (g).

Figure 1A

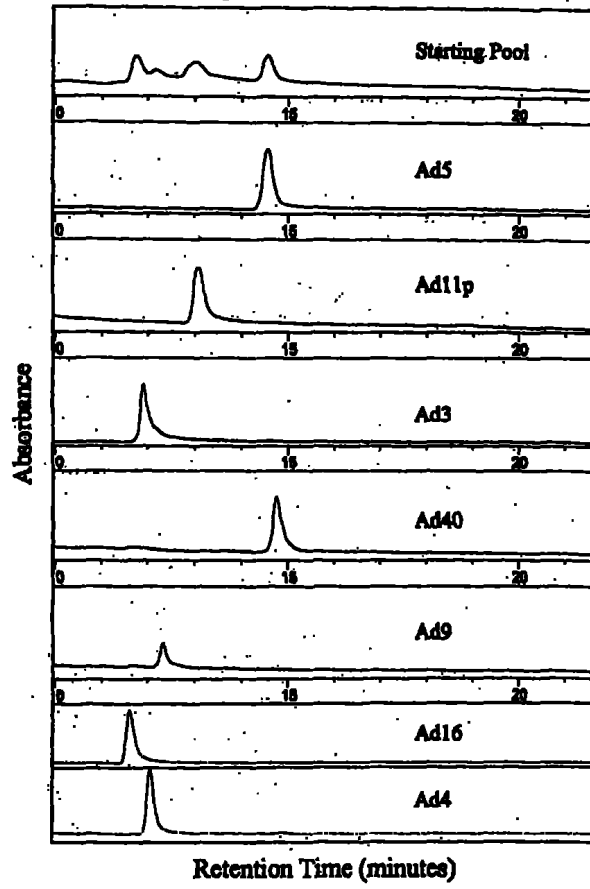


Figure 1B

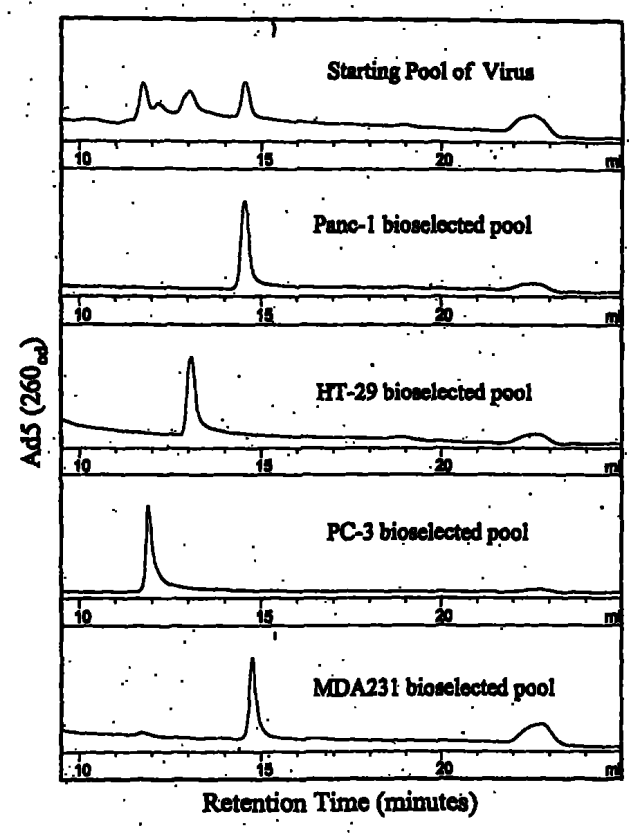


Figure 2

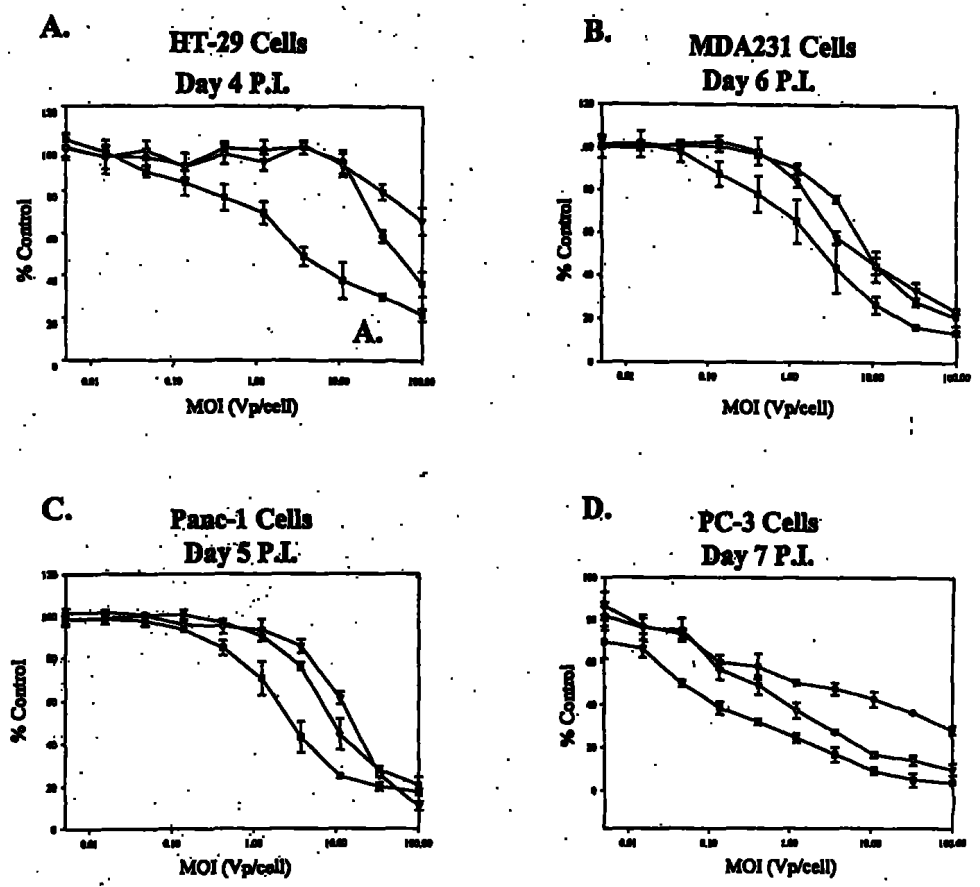


Figure 3A

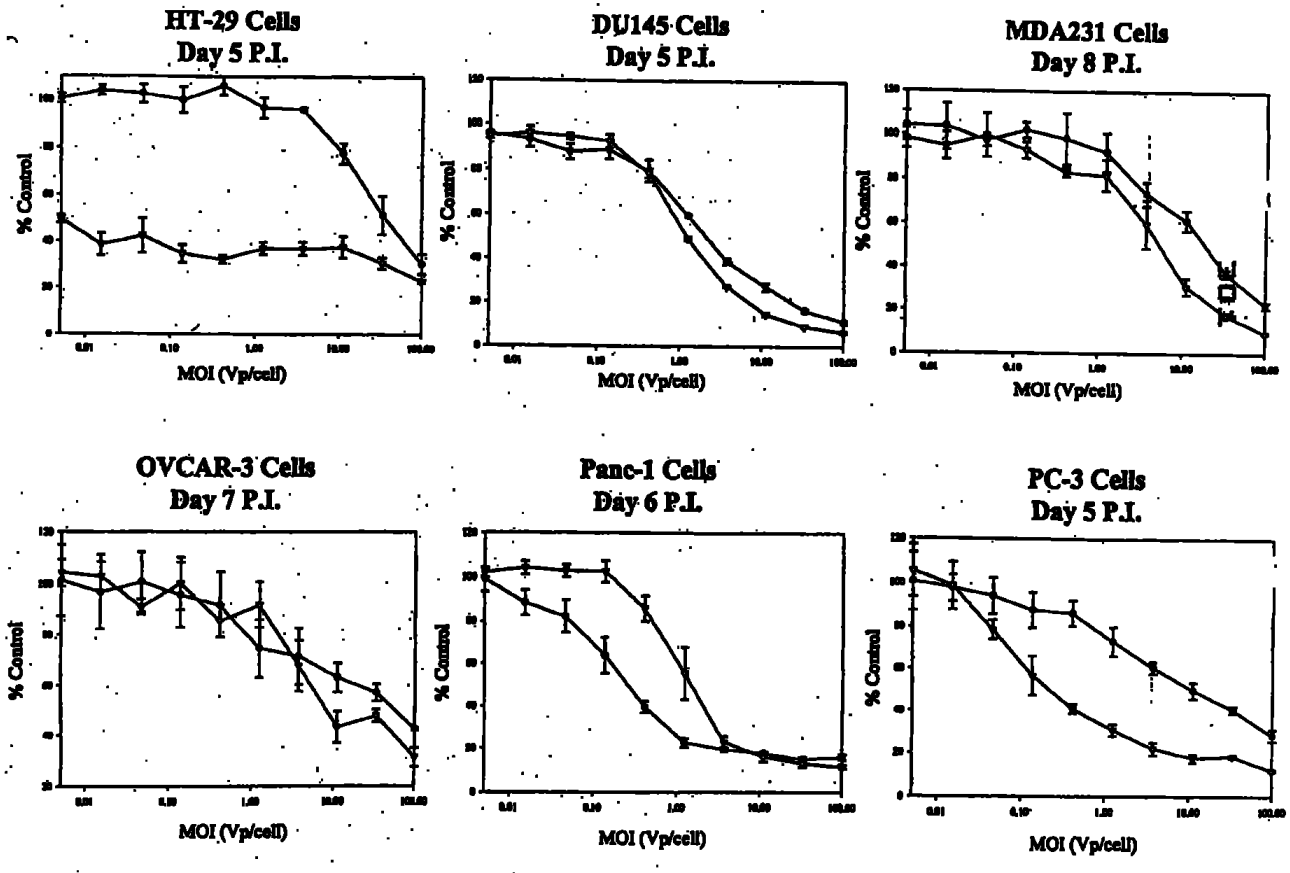


Figure 3B

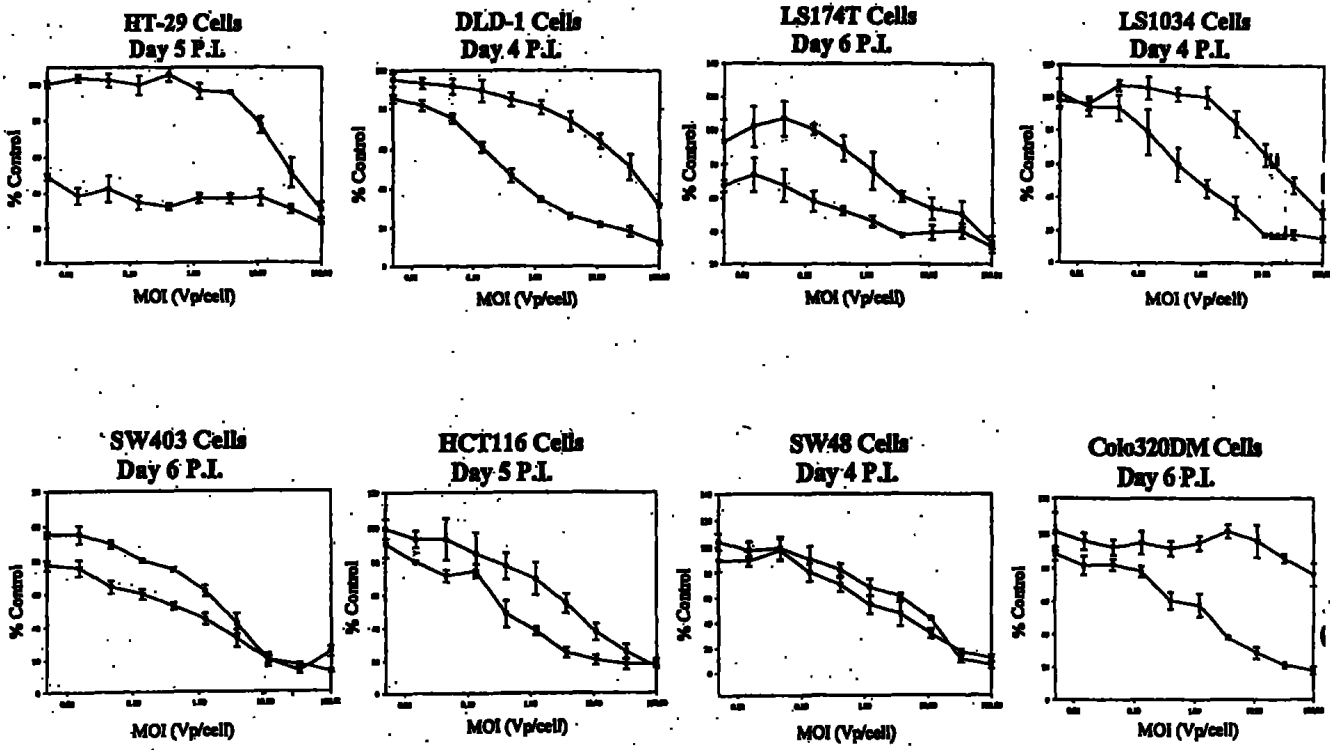


Figure 4

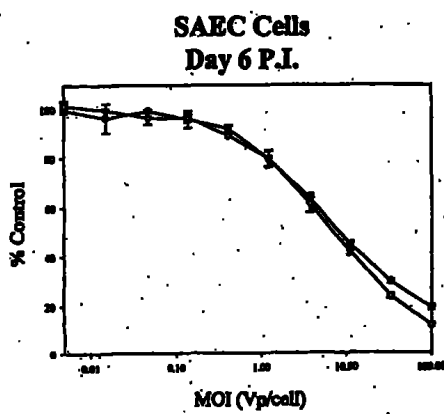
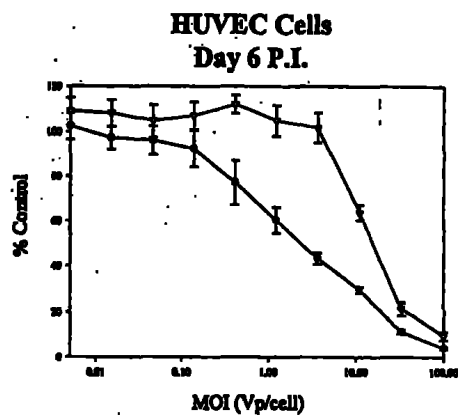
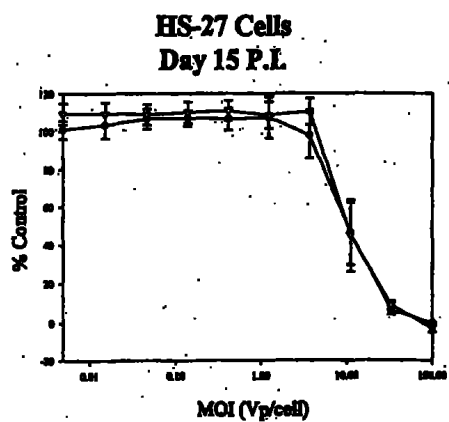
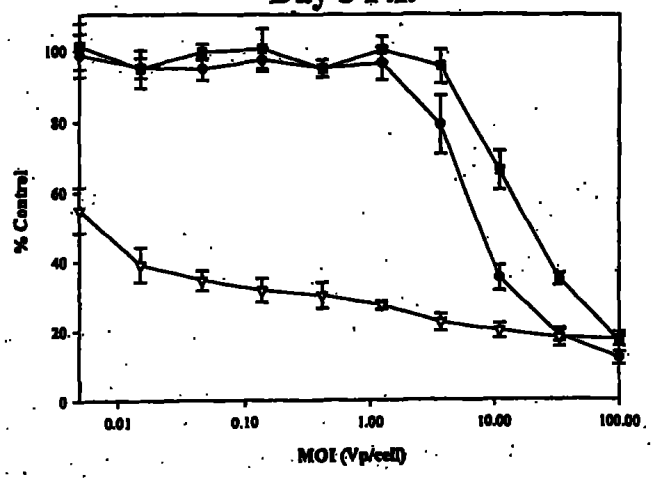


Figure 5

A.

HT-29 Cells
Day 5 P.I.



B.

HUVEC Cells
Day 6 P.I.

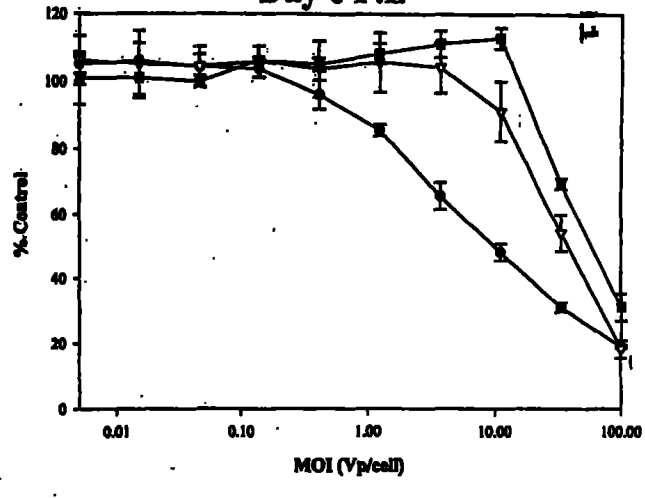
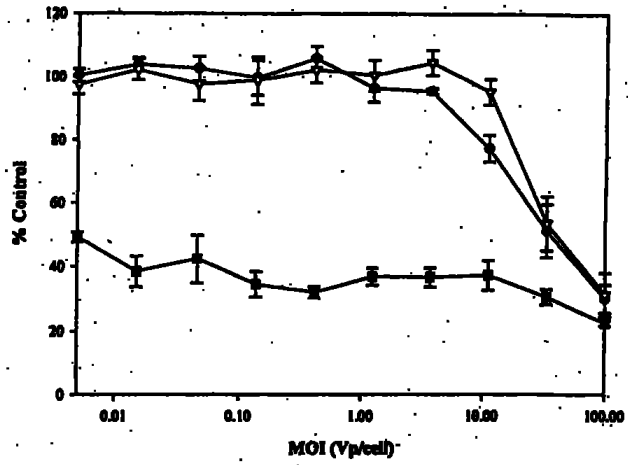


Figure 6

A.

HT-29 Cells Day 5 P.I.



B.

SAEC Cells Day 7 P.I.

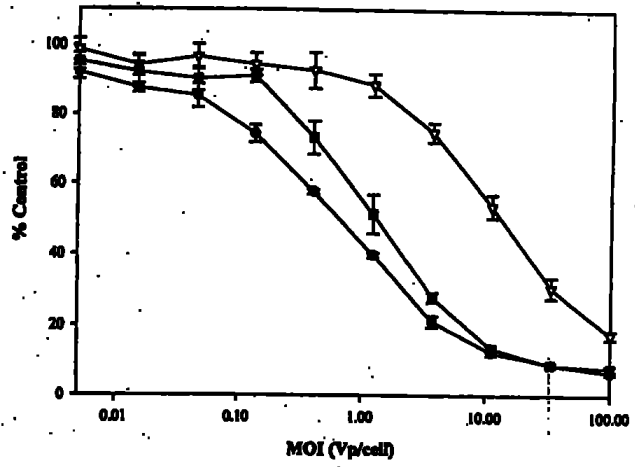
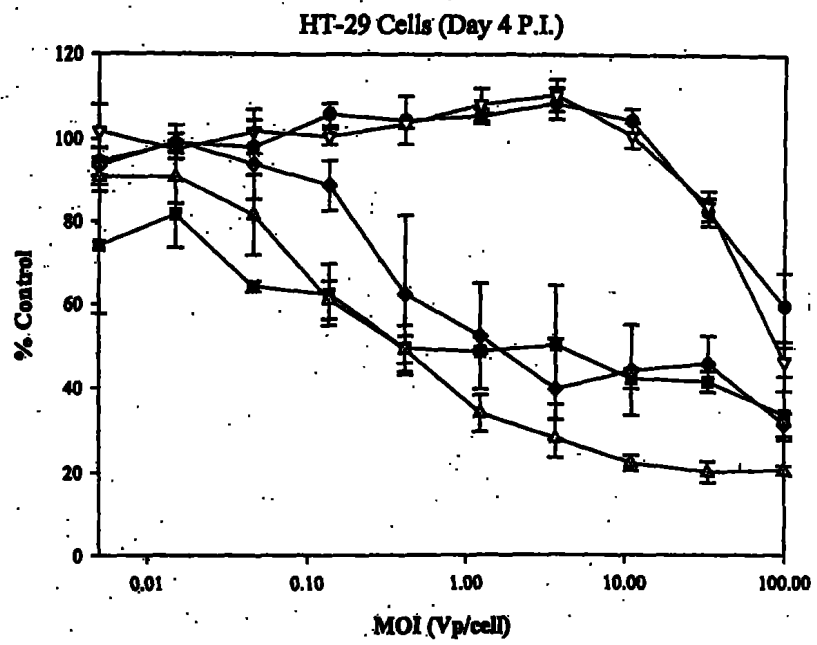


Figure 7



SEQUENCE LISTING

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

<120> Chimeric Adenoviruses for Use in Cancer Treatment

<130> 53183AWOM1

<150> US 60/574,851

<151> 2004-05-26

<160> 8

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 32325

<212> DNA

<213> Adenovirus

<400> 1

```

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

```

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

atgccttacc agtgtaacat gaatcatgtg aaagtgtgtg tggaaccaga tgccttttcc 3180
 agaatgagcc taacaggaat ttttgacatg aacatgcaa tctggaagat cctgaggtat 3240
 gatgatacga gatcgagggg acgcgcatgc gaatgcggag gcaagcatgc caggttccag 3300
 ccggtgtgtg tagatgtgac tgaagatctc agaccggatc atttggttat tgcccgcact 3360
 ggagcagagt tccgatccag tggagaagaa actgactaag gtgagtattg ggaaaacttt 3420
 ggggtgggat tttcagatgg acagattgag taaaaatttg ttttttctgt cttgcagctg 3480
 tcatgagtgg aaacgcttct ttttaaggggg gagtcttcag cccttatctg acagggcgtc 3540
 tcccatcctg ggcaggaggt cgtcagaatg ttatgggac tactgtggat ggaagacccg 3600
 tccaacccgc caattcttca acgctgacct atgctacttt aagttcttca ctttggacg 3660
 cagctgcagc tgccgccgcc gcttctgttg ccgctaacac tgtgcttggg atgggttact 3720
 atggaagcat catggctaata tccacttctt ctaataaccc ttctaccctg actcaggaca 3780
 agttacttgt ctttttggcc cagctggagg ctttgacca acgtctgggt gaactttctc 3840
 agcaggtggt cgagttgcga gtacaaactg agtctgctgt cggcacggca aagtctaaat 3900
 aaaaaaatcc cagaatcaat gaataaataa acaagcttgt tgttgattta aaatcaagt 3960
 tttttatttc atttttcgcg cacggtatgc cctagaccac cgtatcttat cattgagaac 4020
 tcggtggatt tttccagga tcctatagag gtgggattga atgtttagat acatgggcat 4080
 taggccgtct ttgggggtgga gatagctcca ttgaaggat tcatgctccg gggtagtggt 4140
 gtaaatcacc cagtcataac aaggtcgcag tgcattggtg tgcacaatat cttttagaag 4200
 taggctgatt gccacagata agcccttggt gtaggtgttt acaaaccggt tgagctggga 4260
 tgggtgcatt cggggtgaaa ttatgtgcat tttggattgg atttttaagt tggcaatatt 4320
 gccccaaga tcccgctctg ggttcattgt atgaaggacc accaagacgg tgtatccggt 4380
 acatttagga aatttatcgt gcagcttggg tggaaaagcg tggaaaaatt tggagacacc 4440
 cttgtgtcct ccaagatttt ccatgcactc atccatgata atagcaatgg ggccgtgggc 4500
 agcggcgcg gcaaacacgt tccgtgggtc tgacacatca tagttatgtt cctgagttaa 4560
 atcatcataa gccattttta tgaatttggg gcggagagta ccagattggg gtatgaatgt 4620
 tccttcgggc cccggagcat agttccctc acagatttgc atttccaag ctttcagttc 4680
 cgaggggtgga atcatgtcca cctggggggc tatgaaaaac accgtttctg gggcgggggt 4740
 gattaattgt gatgatagca aatttctgag caattgagat ttgccacatc cgtgggggc 4800
 ataaatgatt ccgattacgg gttgcaggtg gtagtttagg gaacggcaac tgccgtcttc 4860
 tcgaagcaag ggggccacct cgttcacat ttccttaca tgcattttt cccgcaccaa 4920
 atccattagg aggcgtctc ctctagtga tagaagttct tgtagtggg aaaagtttt 4980

cagcggtttc agaccgtcag ccatgggcat tttggagaga gtttgctgca aaagttctag 5040
tctgttccac agttcagtga tgtgttctat ggcattctga tccagcagac ctctcgttt 5100
cgcgggtttg gacggctcct ggaatagggg atgagacgat gggcgtccag cgctgccagg 5160
gttcggctect tccaggggtct cagtgttcga gtcaggggtg tttccgtcac agtgaagggg 5220
tgtgcgcctg cttgggcgct tgccagggg cgcttcagac tcatcctgct ggtcgaaaac 5280
ttctgtcgt tggcgccctg tatgtcggcc aagtagcagt ttacatgag ttcgtagtgtg 5340
agcgccctcg ctgcgtggcc tttggcgcg agcttacctt tggagtttt cttgcatacc 5400
gggcagtata ggcattttcag cgcatacaac ttgggcgcaa ggaaaacgga ttctggggag 5460
tatgcatctg cgccgcagga ggcgcaaaca gtttcacatt ccaccagcca ggttaaatcc 5520
ggttcattgg ggtcaaaaac aagttttccg ccatattttt tgatgcgttt cttacctttg 5580
gtctccatga gttcgtgtcc tcgttgagtg acaaacaggc tgtccgtgtc cccgtagact 5640
gattttacag gcctcttctc cagtggagtg cctcggctct cttcgtacag gaactctgac 5700
cactctgata caaaggcgcg cgtccaggcc agcacaagg aggctatgtg ggaggggtag 5760
cgatcgttgt caaccagggg gtccaccttt tccaaagtat gcaaacacat gtcacctct 5820
tcaacatcca ggaatgtgat tggcttgtag gtgtatttca cgtgacctg ggtccccgt 5880
gggggggtat aaaagggggc ggttctttgc tcttcctcac tgtcttcgg atcgtgtcc 5940
aggaacgtca gctgttgggg taggtattcc ctctcgaagg cgggcatgac ctctgcactc 6000
aggttgtcag tttctaagaa cgaggaggat ttgatattga cagtgccggt tgagatgcct 6060
ttcatgaggt tttcgtccat ctggtcagaa aacacaattt tttattgtc aagtttggtg 6120
gcaaattgat catcacgggc gttggataaa agtttggaag tggatcgcag ggtttggttc 6180
tttcccttgt ccgcgcgctc tttggcgcg atgttgagtt ggacatactc gcgtgccagg 6240
cacttccatt cggggaagat agttgttaat tcatctggca cgattctcac ttgccacct 6300
cgattatgca aggttaattaa atccacactg gtggccacct cgcctcgaag gggttcattg 6360
gtccaacaga gcctacctcc tttcctagaa cagaaagggg gaagtgggtc tagcataagt 6420
tcatcgggag ggtctgcac catggtaag attcccggaa gtaaatcctt atcaaaatag 6480
ctgatgggag tggggtcatc taaggccatt tgccattctc gagctgccag tgcgcgtca 6540
tatgggttaa ggggactgcc ccatggcatg ggatgggtga gtgcagaggc atacatgcc 6600
cagatgtcat agacgtagat gggatcctca aagatgccta tgtaggttgg atagcatcgc 6660
ccccctctga tacttgctcg cacatagtca tatagttcat gtgatggcg tagcagcccc 6720
ggaccaagt tgggtcgatt gggtttttct gttctgtaga cgatctggcg aaagatggcg 6780
tgagaattgg aagagatggg gggcttttga aaaatgttga aatgggcatg aggtagacct 6840
acagagtctc tgacaaagtg ggcataagat tcttgaagct tggttaccag ttcggcggtg 6900

acaagtacgt ctagggcgca gtagtcaagt gtttcttgaa tgatgtcata acctgggttg 6960
 tttttctttt cccacagttc gcggttgaga aggtattctt cgcgatcctt ccagtactct 7020
 tctagcggaa acccgtcttt gtctgcacgg taagatccta gcatgtagaa ctgattaact 7080
 gccttgtaag-ggcagcagcc cttctctacg ggtagagagt atgcttgagc agcttttcgt 7140
 agcgaagcgt gagtaagggc aaaggtgtct ctgaccatga ctttgaggaa ttggtatttg 7200
 aagtcgatgt cgtcacaggc tccctgttcc cagagttgga agtctacccg tttctttag 7260
 gcgggggttg gcaaagcgaa agtaacatca ttgaagagaa tcttgccggc cctgggcatg 7320
 aaattgcgag tgatgcgaaa aggcgtgtgt acttccgctc ggttattgat aacctgggca 7380
 gctaggacga tctcgtcgaa accgttgatg ttgtgtccta cgatgtataa ttctatgaaa 7440
 gcgggcgtgc ctctgacgtg aggtagctta ctgagctcat caaaggttag gtctgtgggg 7500
 tcagataagg cgtagtgttc gagagcccat tcgtgcaggt gaggattcgc ttttaaggaag 7560
 gaggaccaga ggtccactgc cagtgtgttt tgtaactggt cccggtactg acgaaaatgc 7620
 cgtccgactg ccattttttc tggggtgacg caatagaagg tttgggggtc ctgccgccag 7680
 cgatcccact tgagttttat ggcgaggtca taggcgatgt tgacgagccg ctggtctcca 7740
 gagagtttca tgaccagcat gaaggggatt agctgcttgc caaaggaccc catccagggtg 7800
 taggtttcca catcgtaggt gagaaagagc ctttctgtgc gaggatgaga gccaatcggg 7860
 aagaactgga tctcctgcc aagttggag gaatggctgt tgatgtgatg gaagtagaac 7920
 tccctgcgac gcgccgagca ttcattgttg tgcttgatac gacggccgca gtagtcgag 7980
 cgttgccagc gttgtatctc gtgaatgagt tgtacctggc ttcccttgac gagaaatttc 8040
 agtgggaagc cgaggcctgg cgattgtatc tcgtgcttta ctatgttgc tgcatcggcc 8100
 tgttcatctt ctgtctcgat ggtggtcag ctgacgagcc ctgcggggag gcaagtccag 8160
 acctcggcgc ggcaggggag gagctcgagg acgagagcgc gcaggctgga gctgtccagg 8220
 gtcttgagac gctgcggact caggttagta ggcagtgtca ggagattaac ttgcatgac 8280
 ttttgaggag cgtgcgggag gttcagatag tacttgatct caacgggtcc gttggtggag 8340
 atgtcgatgg cttgcagggt tccgtgtccc ttgggcgcta ceaccgtgcc ettgtttttc 8400
 attttgagc gcgggtggctc tgttgcttct tgcattgta gaagcgggtg cgagggcgcg 8460
 caccgggcgg caggggcggc tcgggacccg gcggcatggc tggcagtggt acgtcggcgc 8520
 cgcgcgcggg taggttcttg tactgcgccc tgagaagact cgcattgcgc acgacgcggc 8580
 ggttgacatc ctggatctga cgcctctggg tgaaagctac cggccccgtg agcttgaacc 8640
 tgaaagagag ttcaacagaa tcaatctcgg tatcgttgac ggcggcttgc ctaaggattt 8700
 cttgcacgtc accagagttg tcttggtagg cgatctccgc catgaactgc tcgatctctt 8760

cctcttgaag atctccgcgg cccgctctct cgacggtggc cgcgaggtcg ttggagatgc 8820
 gcccaatgag ttgagagaat gcattcatgc ccgctctgtt ccagacgcgg ctgtagacca 8880
 cggccccac gggatctctc gcgcgcatga ccacctgggc gaggttgagc tccacgtggc 8940
 ggggtgaagac cgcatagttg cataggcgct ggaaaaggta gttgagtgtg gtggcgatgt 9000
 gctcggtgac gaagaaatac atgatccatc gtctcagcgg catctcgctg acatcgccca 9060
 gagcttccaa gcgctccatg gcctcgtaga agtccacggc aaaattaaa aactgggagt 9120
 ttcgcgcgga cacggtcaac tcctcttcca gaagacggat aagttcggcg atggtggtgc 9180
 gcacctcgcg ctcgaaagcc cctgggattt ctctctcaat ctctcttctt tccactaaca 9240
 tctcttcctc ttcagggtggg gctgcaggag gagggggaac gcggcgacgc cggcggcgca 9300
 cgggcagacg gtcgatgaat ctttcaatga cctctccgcg gcggcggcg atggtttcag 9360
 tgacggcgcg gccgtttctc gcgggtcgca gagtaaaac accgccgcgc atctccttaa 9420
 agtggtgact gggagggttct ccgtttggga gggagagggc gctgattata cattttatta 9480
 attggcccgat agggactgca cgcagagatc tgatcgtgtc aagatccacg ggatctgaaa 9540
 acctttcgac gaaagcgtct aaccagtcac agtcacaagg taggctgagt acggcttctt 9600
 gtgggcgggg gtggttatgt gttcggctcg ggtcttctgt ttcttcttca tctcgggaag 9660
 gtgagacgat gctgctggtg atgaaattaa agtaggcagt tctaagacgg cggatggtgg 9720
 cgaggagcac caggtctttg ggtccggctt gctggatacg caggcgattg gccattcccc 9780
 aagcattatc ctgacatcta gcaagatctt tgtagtagtc ttgcatgagc cgttctacgg 9840
 gcacttcttc ctacccggtt ctgccatgca tacgtgtgag tccaaatccg cgcattgggt 9900
 gtaccagtgc caagtcagct acgactctt cggcgaggat ggcttgctgt acttgggtaa 9960
 ggggtggctg aaagtcatca aaatccacaa agcggtggtg agctcctgta ttaatggtgt 10020
 aagcacagtt ggcatgact gaccagttaa ctgtctggtg accagggcgc acgagctcgg 10080
 tgtatttaag gcgcgaatag gcgcgggtgt caaagatgta atcgttgagc gtgcgcacca 10140
 gatactggtg cctataaga aaatgcggcg gtggttggcg gtagagaggc catcgttctg 10200
 tagctggagc gccaggggcg aggtcttcca acataaggcg gtgatagccg tagatgtacc 10260
 tggacatcca ggtgattcct gcggcggtag tagaagcccg aggaaactcg cgtacgcggg 10320
 tccaaatggt gcgtagcggc atgaagtagt tcattgtagg cacggtttga ccagtgaggc 10380
 gcgcgcagtc attgatgctc tatagacacg gagaaaatga aagcgttcag cgactcgact 10440
 ccgtagcctg gaggaacgtg aacgggttgg gtcgcggtgt accccggtc gagacttgta 10500
 ctgagccgg ccggagccgc ggctaacgtg gtattggcac tcccgtctcg acccagccta 10560
 caaaaatcca ggatacggaa tcgagtcgtt ttgctggttt ccgaatggca gggaagtgag 10620
 tcctattttt tttttttgcc gtcagatgc atcccgtgct gcgacagatg cggcccaaac 10680

aacagcccc ctcgcagcag cagcagcagc aatcacaaaa ggctgtccct gcaactactg 10740
 caactgccgc cgtgagcggg gcgggacagc ccgcctatga tctggacttg gaagagggcg 10800
 aaggactggc acgtctaggt gcgccttcac ccgagcggca tccgcgagtt caactgaaaa 10860
 aagattctcg cgaggcgtat gtgccccaac agaactatt tagagacaga agcggcgagg 10920
 agccggagga gatgcgagct tcccgttta acgcgggtcg tgagctgcgt cacggtttgg 10980
 accgaagacg agtggtgcgg gacgaggatt tcgaagtga tgaaatgaca gggatcagtc 11040
 ctgccagggc acacgtggct gcagccaacc ttgtatcggc ttacgagcag acagtaaagg 11100
 aagagcgtaa cttccaaaag tcttttaata atcatgtgcg aaccctgatt gcccgcgaag 11160
 aagttaccct tggtttgatg catttggtgg atttgatgga agctatcatt cagaacccta 11220
 ctagcaaacc tctgaccgcc cagctgtttc tgggtggtgca acacagcaga gacaatgagg 11280
 ctttcagaga ggcgctgctg aacatcacgc aaccgcaggg gagatggttg tatgatctta 11340
 tcaacattct acagagtatc atagtgcagg agcggagcct gggcctggcc gagaagggtg 11400
 ctgccatcaa ttactcgggt ttgagcttgg gaaaatatta cgctcgcaa atctacaaga 11460
 ctecatacgt tcccatagac aaggaggtga agatagatgg gttctacatg ccgatgacgc 11520
 tcaaggtctt gaccctgagc gatgatcttg ggggtgatcg caatgacaga atgcatcgcg 11580
 cggttagcgc cagcaggagg cgcgagttaa gcgacagggg actgatgcac agtttgcaaa 11640
 gagctctgac tggagctgga accgaggggtg agaattactt cgacatggga gctgacttgc 11700
 agtggcagcc tagtcgcagg gctctgagcg ccgcgacggc aggatgtgag cttccttaca 11760
 tagaagaggc ggatgaaggc gaggaggaaag agggcgagta cttggaagac tgatggcaca 11820
 acccgtgttt ttgtctagat ggaacagcaa gcaccggatc ccgcaatgcg ggcggcgctg 11880
 cagagccagc cgtccggcat taactcctcg gacgattgga cccaggccat gcaacgtatc 11940
 atggcgttga cgactcgcaa cccgaagcc tttagacagc aaccccaggc caaccgtcta 12000
 tcggccatca tggaaagtgt agtgccttcc cgctctaate ccactcatga gaaggtcctg 12060
 gccatcgtga acgcgttggt ggagaacaaa gctattcgtc cagatgaggc cggactggtg 12120
 tacaacgctc tcttagaacg cgtggctcgc tacaacagta gcaatgtgca aaccaatttg 12180
 gaccgtatga taacagatgt acgcgaagcc gtgtctcagc gcgaaagggt ccagcgtgat 12240
 gccaacctgg gttcgctggt ggcgttaaat gctttcttga gtactcagcc tgctaattgtg 12300
 ccgcgtggtc aacaggatta tactaacttt ttaagtgtt tgagactgat ggtatcagaa 12360
 gtacctcaga gcgaagtgt tcagtcgggt cctgattact tctttcagac tagcagacag 12420
 ggcttgacga cggtaaactt gagccaagct tttaaaaacc tttaaagggt tgtggggagt 12480
 gcatgccccg gtaggagaaa gagcaaccgt gtctagcttg ttaactccga actcccgcct 12540

attattactg ttggtagctc ctttcaccga cagcggtagc atcgaccgta attcctatctt 12600
 gggttaccta ctaaacctgt atcgcgagc catagggcaa agtcagggtg acgagcagac 12660
 ctatcaagaa attaccaag tcagtcgcg ctttgggacag gaagacactg gcagtttgga 12720
 agccactctg aacttcttgc ttaccaatcg gtctcaaaag atccctcctc aatatgctct 12780
 tactgaggag gaggagagga tccttagata tgtgcagcag agcgtgggat tgtttctgat 12840
 gcaagagggg gcaactccga ctgcagcact ggacatgaca gcgcgaaata tggagcccag 12900
 catgtatgcc agtaaccgac ctttcattaa caaactgctg gactacttgc acagagctgc 12960
 cgctatgaac tctgattatt tcaccaatgc catcttaaac ccgactggc tgccccacc 13020
 tggtttctac acgggcgaat atgacatgcc cgaccctaag gacggatttc tgtgggacga 13080
 cgtggacagc gatgtttttt cacctctttc tgatcatcgc acgtggaaaa aggaaggcgg 13140
 cgatagaatg cattcttctg catcgctgtc cggggctcatg ggtgctaccg cggctgagcc 13200
 cgagtctgca agtccttttc ctagtctacc cttttctcta cacagtgtac gtagcagcga 13260
 agtgggtaga ataagtcgcc cgagtttaat gggcgagag gagtatctaa acgattcctt 13320
 gctcagaccg gcaagagaaa aaaatttccc aaacaatgga atagaaagtt tggtagataa 13380
 aatgagtaga tggaagactt atgctcagga tcacagagac gagcctggga tcatggggat 13440
 tacaagtaga gcgagccgta gacgccagcg ccatgacaga cagaggggtc ttgtgtggga 13500
 cgatgaggat tcggccgatg atagcagcgt gctggacttg ggtgggagag gaaggggcaa 13560
 cccgtttgct catttgccg ctcgcttggg tggtagttg taaaaaaaaa taaaaaaaaa 13620
 actaccaag gccatggcga cgagcgtacg ttcgttcttc ttattatct gtgtctagta 13680
 taatgaggcg agtcgtgcta ggcggagcgg tggtagatcc ggagggtcct cctccttcgt 13740
 acgagagcgt gatgcagcag cagcaggcga cggcggtagt gcaatcccca ctggaggctc 13800
 cctttgtgcc tccgcgatac ctggcaccta cggagggcag aaacagcatt cgttattcgg 13860
 aactggcacc tcagtacgat accaccagggt tgtatctggt ggacaacaag tcggcggaca 13920
 ttgcttctct gaactatcag aatgaccaca gcaacttctt gaccacggtg gtgcaaaaca 13980
 atgactttac ccctacgga gccagcacc agaccattaa ctttgatgaa cgatcgcggt 14040
 ggggcggcta gctaaagacc atcatgcata ctaacatgcc aaacgtgaac gagtatatgt 14100
 ttagtaacaa gttcaaagcg cgtgtgatgg tgtccagaaa acctcccgac ggtgctgcag 14160
 ttggggatac ttatgatcac aagcaggata ttttgaaata tgagtgggtc gagtttactt 14220
 tgccagaagg caacttttca gttactatga ctattgattt gatgaacaat gccatcatag 14280
 ataattactt gaaagtgggt agacagaatg gagtgcttga aagtgcatt ggtgttaagt 14340
 tcgacaccag gaacttcaag ctgggatggg atcccgaac caagttgatc atgcctggag 14400
 tgtatacgta tgaagcctc catcctgaca ttgtcttact gcctggctgc ggagtggatt 14460

ttaccgagag tcgtttgagc aaccttcttg gtatcagaaa aaaacagcca tttcaagagg 14520
 gttttaagat tttgtatgaa gatttagaag gtggtaatat tccggccctc ttggatgtag 14580
 atgcctatga gaacagtaag aaagaacaaa aagccaaaat agaagctgct acagctgctg 14640
 cagaagctaa ggcaaacata gttgccagcg actctacaag ggttgctaac-gctggagagg 14700
 tcagaggaga caattttgcg ccaacacctg ttccgactgc agaatcatta ttggccgatg 14760
 tgtctgaagg aacggacgtg aaactcacta ttcaacctgt agaaaaagat agtaagaata 14820
 gaagctataa tgtgttgga gacaaaatca acacagccta tcgcagttgg tatctttcgt 14880
 acaattatgg cgatcccgaa aaaggagtgc gttcctggac attgctcacc acctcagatg 14940
 tcacctgcgg agcagagcag gtctactggt cgcttcaga catgatgaag gatcctgtca 15000
 ctttccgctc cactagacaa gtcagtaact accctgtggt ggggtgcagag cttatgcccc 15060
 tcttctcaaa gagcttctac aacgaacaag ctgtgtactc ccagcagctc cgccagtcca 15120
 cctcgcttac gcacgtcttc aaccgctttc ctgagaacca gattttaatc cgtccgccgg 15180
 cgcccacat taccaccgtc agtgaaaacg ttctgtctt cacagatcac gggaccctgc 15240
 cgttgccgag cagtatccgg ggagtccaac gtgtgaccgt tactgacgcc agacgccgca 15300
 cctgtcccta cgtgtacaag gcactgggca tagtcgcacc gcgcgtcctt tcaagccgca 15360
 ctttctaaaa aaaaaaaaaa tgtccattct tatctcgccc agtaataaca ccggttgggg 15420
 tctgcgcgt ccaagcaaga tgtacggagg cgcacgcaaa cgttctaccc aacatcctgt 15480
 ccgtgttcgc ggacattttc gcgctccatg gggcgccctc aagggccgca ctgcggttcg 15540
 aaccaccgtc gatgatgtaa tcgatcaggt ggttgccgac gcccgtaatt atactcctac 15600
 tgcgctaca tctactgtgg atgcagttat tgacagtgtg gtggctgacg ctgcgaacta 15660
 tgctcgacgt aagagccggc gaaggcgcgt tgccagacgc caccgagcta cactgecat 15720
 gcgagccgca agagctctgc tacgaagagc tagacgcgtg gggcgaagag ccatgcttag 15780
 ggcggccaga cgtgcagctt cgggcgccag cgccggcagg tcccgcaggc aagcagccgc 15840
 tgctgcagcg gcgactattg ccgacatggc ccaatcgca agaggcaatg tatactgggt 15900
 gcgtgacgt gccaccggtc aacgtgtacc cgtgcgcacc cgtccccctc gcacttagaa 15960
 gatactgagc agtctccgat gttgtgtccc agcggcgagg atgtccaagc gcaaatacaa 16020
 ggaagaaatg ctgcaggtta tcgcacctga agtctacggc caaccgttga aggatgaaaa 16080
 aaaacccgc aaaatcaagc gggttaaaaa ggacaaaaaa gaagaggaag atgbcgatga 16140
 tgggctggcg gagtttgtgc gcgagtttgc cccacggcga cgcgtgcaat ggcgtgggcg 16200
 caaagttcga catgtgttga gacctggaac ttcggtggtc tttacaccg gcgagcgttc 16260
 aagcgctact ttttaagcgtt cctatgatga ggtgtacggg gatgatgata ttcttgagca 16320

ggcggctgac cgattagggc agtttgctta tggcaagcgt agtagaataa cttccaagga 16380
tgagacagtg tcgataccct tggatcatgg aaatcccacc cctagtctta aaccggtcac 16440
tttgacgcaa gtgttaccct taactccgcg aacaggtgtt aaacgcgaag gtgaagattt 16500
gtatcccact atgcaactga tggtagccaa acgccagaag ttggaggacg ttttgagaa 16560
agtaaaagtg gatccagata ttcaacctga ggtaaagtg agaccatta agcaggtagc 16620
gcctgggtctg ggggtacaaa ctgtagacat taagattccc actgaaagta tggaaagtgc 16680
aactgaaccc gcaagccta ctgccacct cactgaagtg caaacggatc catggatgcc 16740
catgcctatt acaactgacg ccgccggtcc cactcgaaga tcccgacgaa agtacgggcc 16800
agcaagtctg ttgatgcccc attatgttgt acacccatct attattccta ctctgggta 16860
ccgaggcact cgctactatc gcagccgaaa cagtacctcc cgccgtcgcc gcaagacacc 16920
tgcaaatcgc agtcgtcgcc gtagacgcac aagcaaaccg actcccggcg ccctgggtgcg 16980
gcaagtgtac cgcaatggta gtgcggaacc tttagactg ccgctgctgc gttaccatcc 17040
gagtatcatc acttaatcaa tgttgccgt gcctccttg agatatggcc ctcaattgtc 17100
gccttcgctg tcccatcact ggtagccgag gaagaaactc gcgccgtaga agagggatgt 17160
tgggacgcgg aatgcgacgc tacaggcgac ggcgtgctat ccgcaagcaa ttgcggggtg 17220
gttttttacc agccttaatt ccaattatcg ctgctgcaat tggcgcgata ccaggcatag 17280
cttccgtggc gggttcaggcc tcgcaacgac attgacattg gaaaaaacg tataaataaa 17340
aaaaaaaaa tacaatggac tctgacactc ctggtcctgt gactatgttt tcttagagat 17400
ggaagacatc aatttttcat ccttggctcc gcgacacggc acgaagccgt acatgggcac 17460
ctggagcgac atcggcacga gccaaactgaa cggggggcgcc ttcaattgga gcagtatctg 17520
gagcgggctt aaaaattttg gctcaaccat aaaaacatac ggggaacaaag cttggaacag 17580
cagtacagga caggcgctta gaaataaact taaagaccag aacttccaac aaaaagtagt 17640
cgatgggata gcttccggca tcaatggagt ggtagatttg gctaaccagg ctgtgcagaa 17700
aaagataaac agtcgttttg acccgccgcc agcaacccca ggtgaaatgc aagtggagga 17760
agaaattcct ccgccagaaa aacgaggcga caagcgtccg cgtcccgtatt tggagagac 17820
gctggtgacg cgcgtagatg aaccgcctt ttatgaggaa gcaacgaagc ttggaatgcc 17880
caccactaga ccgatagccc caatggccac cgggggtgatg aaaccttctc agttgcatcg 17940
acccgtcacc ttggatttgc cccctcccc tgctgtact gctgtacctg cttctaagcc 18000
tgtcgtgcc ccgaaaccag tcgccgtagc caggtcacgt cccggggggcg ctctcgtcc 18060
aatgcgcac tggcaaaata ctctgaacag catcgtgggt ctaggcgtgc aaagtgtaaa 18120
acgccgtcgc tgcttttaat taaatatgga gtagcgctta acttgccctat ctgtgtatat 18180
gtgtcattac acgccgtcac agcagcagag gaaaaagga agaggctgtg cgtcgacgct 18240

gagttacttt caagatggcc accccatcga tgctgcccc atgggcatac atgcacatcg 18300
 ccggacagga tgcttcggag tacctgagtc cgggtctggt gcagttcgcc cgcgccacag 18360
 acacctactt caatctggga aataagtta gaaatccac cgtagcgccg acccacgatg 18420
 tgaccaccga ccgtagccag cggctcatgt tgcgcttcgt gcccgttgac cgggaggara 18480
 atacatactt ttacaaagtg cgggtacacc tggccgtggg cgacaacaga gtgctggata 18540
 tggccagcac gttctttgac attaggggtg tgttgacag aggtcccagt ttcaaaccct 18600
 attctggtac ggcttacaac tccctggctc cttaaaggcg tccaaatata tctcagtga 18660
 ttgcagaagg tgtaaaaaat acaactggtg aggaacacgt aacagaagag gaaaccaata 18720
 ctactactta cacttttggc aatgctcctg taaaagctga agctgaaatt acaaaagaag 18780
 gactcccagt aggtttggaa gtttcagatg aagaaagtaa accgatttat gctgataaaa 18840
 catatcagcc agaacctcag ctgggagatg aaacttggac tgaccttgat ggaaaaaccg 18900
 aaaagtatgg aggcagggct ctcaaaccg atactaagat gaaaccatgc tacgggtcct 18960
 ttgccaaacc tactaatgtg aaaggcggc aggcacaaaca aaaaacaacg gagcagccaa 19020
 atcagaaagt cgaatatgat atcgacatgg agttttttga tgcggcatcg cagaaaacaa 19080
 acttaagtcc taaaattgtc atgtatgcag aaaatgtaa tttggaaact ccagacactc 19140
 atgtagtgt caaacctgga acagaagaca caagttccga agctaatttg ggacaacaat 19200
 ctatgccaa cagacccaac tacattggct tcagagataa ctttattgga cttatgtact 19260
 ataacagtac tggtaacatg ggggtgctgg ctggtcaagc gtctcagtta aatgcagtgg 19320
 ttgacttgca ggacagaaac acagaacttt cttaccaact cttgcttgac tctctgggag 19380
 acagaaccag atacttttagc atgtggaatc aggtgtgga cagttatgat cctgatgtac 19440
 gtgttattga aaatcatggt gtggaagatg aacttcccaa ctactgtttt ccactggacg 19500
 gcataggtgt tccaacaacc agttacaaat caatagttcc aaatggagac aatgcgccta 19560
 attggaagga acctgaagta aatggaacaa gtgagatcgg acagggtaat ttgtttgcca 19620
 tggaaattaa cttcaagcc aatctatggc gaagtttcct ttattccaat gtggctctat 19680
 atctcccaga ctcgtacaaa tacacccgt ccaatgtcac tctccagaa aacaaaaaca 19740
 cctacgacta catgaacggg cgggtggtgc cgccatctct agtagacacc tatgtgaaca 19800
 ttggtgccag gtggtctctg gatgccatgg acaatgtcaa cccattcaac caccaccgta 19860
 acgtggctt gcgttacga tccatgctt tgggtaacgg acgttatgtg cttttccaca 19920
 tacaagtgc tcaaaaattc ttcgtgtta aaaacctgct gcttctccca ggctcctaca 19980
 cttatgagtg gaactttagg aaggatgtga acatggttct acagagttcc ctcggtaacg 20040
 acctgcgggt agatggcgcc agcatcagtt tcacgagcat caacctctat gctacttttt 20100

tcccatggc tcacaacacc gcttccaccc ttgaagccat gctgcggaat gacaccaatg 20160
atcagtcatt caacgactac ctatctgcag ctaacatgct ctacccatt cctgccaatg 20220
caaccaatat tccattttcc attccttctc gcaactgggc ggctttcaga ggctpgtcat 20280
ttaccagact gaaaaccaa gaaactccct ctttggggtc tggatttgac ccctactttg 20340
tctattctgg ttctattccc tacctggatg gtaccttcta cctgaaccac acttttaaga 20400
aggtttccat catgtttgac tcttcagtga gctggcctgg aaatgacagg ttactatctc 20460
ctaacgaatt tgaaataaag cgcactgtgg atggcgagg ctacaacgta gcccaatgca 20520
acatgaccaa agactgggtc ttggtacaga tgctcgcaa ctacaacatc ggctatcagg 20580
gcttctacat tccagaagga tacaagatc gcatgtattc atttttcaga aacttccagc 20640
ccatgagcag gcaggtgggt gatgaggtca attacaaaga cttcaaggcc gtcgccatac 20700
cctaccaaca caacaactct ggctttgtgg gttacatggc tccgaccatg cgccaaggtc 20760
aaccctatcc cgctaactat ccctatccac tcattggaac aactgccgta aatagtgtta 20820
cgcagaaaaa gttcttgtgt gacagaacca tgtggcgcat accgttctcg agcaacttca 20880
tgtctatggg ggcccttaca gacttgggac agaatatgct ctatgccaac tcagctcatg 20940
ctctggacat gacctttgag gtggatccca tggatgagcc caccctgctt tatcttctct 21000
tcgaagtttt cgacgtggtc agagtgcac agccacaccg cggcatcatc gaggcagtct 21060
acctgcgtac accgttctcg gccggtaacg ctaccacgta agaagcttct tgccttctgc 21120
aatagcagc tgcaaccatg gcttgcggat cccaaaacgg ctccagcgag caagagctca 21180
gagccattgt ccaagacctg ggttgcggac cctatttttt gggaacctac gataagcgct 21240
tccgggggtt catggccccc gataagctcg cctgtgccat tgtaaatacg gccggacgtg 21300
agacgggggg agagcactgg ttggctttcg gttggaaccc acgttctaac acctgctacc 21360
ttttgatcc ttttggattc tcggatgatc gtctcaaaca gatttaccag tttgaatatg 21420
aggtctctct gcgccgcagc gctcttgcta ccaaggaccg ctgtattacg ctggaaaaat 21480
ctaccagac cgtgcagggt ccccgttctg ccgcctgcgg acttttctgc tgcattgtcc 21540
ttcacgcctt tgtgcactgg cctgaccgtc ccatggacgg aaacccacc atgaaattgc 21600
taactggagt gccaaacaac atgcttcatt ctctaaagt ccagccacc ctgtgtgaca 21660
atcaaaaagc actctaccat tttcttaata ccattcgc ttattttcgc tcccatcgta 21720
cacacatcga aaggccact gcgttcgacc gtatggatgt tcaataatga ctcatgtaa 21780
caacgtgttc aataaacatc actttatttt ttacatgta tcaaggctct gcattactta 21840
tttatttaca agtcgaatgg gttctgacga gaatcagaat gaccgcagg cagtgatacg 21900
ttgcggaact gatacttggg ttgccacttg aattcgggaa tcaccaactt ggaaccgg 21960
atatcgggca ggaatgtcact ccacagcttt ctggtcagct gcaaagctcc aagcaggica 22020

ggagccgaaa tcttgaaatc acaattagga ccagtgcctt gagcgcgaga gttgcggtac 22080
 accggattgc agcactgaaa caccatcagc gacggatgtc tcacgcttgc cagcacggtg 22140
 ggatctgcaa tcatgcccac atccagatct tcagcattgg caatgctgaa cgggggtcatc 22200
 ttgcaggtct gcctacccat ggcgggcacc caattaggct tgtggttgea-atcgcagtgc 22260
 agggggatca gtatcatctt ggcctgatcc tgtctgattc ctggatacac ggctctcatg 22320
 aaagcatcat attgcttgaa agcctgctgg gctttactac cctcgggtata aaacatcccg 22380
 caggacctgc tcgaaaactg gttagctgca cagccggcat cattcacaca gcagcgggcg 22440
 tcattgttag ctatttgcac cacacttctg cccagcpgt tttgggtgat tttgggttcgc 22500
 tcgggattct cctttaaggc tcgttgctcg ttctcgttgg ccacatccat ctcgataatc 22560
 tgctccttct gaatcataat attgccatgc aggcacttca gcttgccctc ataactattg 22620
 cagccatpag gccacaacgc acagcctgta cattcccaat tatggtgggc gatctgagaa 22680
 aaagaatgta tcattccctg cagaaatctt cccatcatcg tgctcagtgt cttgtgacta 22740
 gtgaaagtta actggatgcc tcggtgctcc tcgtttacgt actggtgaca gatgcgcttg 22800
 tattgttcgt gttgctcagg cattagtta aaagaggttc taagttcgtt atccagcctg 22860
 tacttctcca tcagcagaca catcacttcc atgcctttct cccaagcaga caccaggggc 22920
 aagctaactg gattcttaac agtgcaggca gcagctcctt tagccagagg gtcactctta 22980
 gcgatcttct caatgcttct tttgccatcc ttctcaacga tgcgcacggg cgggtagctg 23040
 aaacccactg ctacaagttg cgcctcttct etttcttctt cgctgtcttg actgatgtct 23100
 tgcatgggga tatgtttggt cttccttggc ttcttttttg ggggtatcgg aggaggagga 23160
 ctgtcgtctc gttccggaga caggaggat tgtgacgtt cgctcaccat taccaactga 23220
 ctgtcggtag aagaacctga cccacacgg cgacaggtgt ttctcttcgg gggcagaggt 23280
 ggaggcgatt gcgaagggtc gcggtccgac ctggaaggcg gatgactggc agaaccctt 23340
 ccgcgttcgg ggggtgtctc cctgtggcgg tcgcttaact gatttccttc gcggtggcc 23400
 attgtgttct cctaggcaga gaaacaacag acatggaac tcagccattg ctgtcaacat 23460
 cgccacgagt gccatcacat ctctcctca gcgacgagga aaaggagcag agcttaagca 23520
 ttccaccgcc cagtcctgcc accacctcta ccctagaaga taaggaggtc gacgcatctc 23580
 atgacatgca gaataaaaa gcgaaagagt ctgagacaga catcgagcaa gaccgggct 23640
 atgtgacacc ggtggaacac gaggaagagt tgaaacgctt tctagagaga gaggatgaaa 23700
 actgccaaa acaacgagca gataactatc accaagatgc tggaaatagg gatcagaaca 23760
 ccgactacct catagggctt gacggggaag acgcgtcctt taaacatcta gcaagacagt 23820
 cgctcatagt caaggatgca ttattggaca gaactgaagt gccatcagt gtggaagagc 23880

tcagccgcgc ctacgagctt aacctctttt cacctcgtag tccccccaaa cgtcagccaa 23940
acggcacctg cgagccaaat cctcgcttaa acttttatcc agcttttgct gtgccagaag 24000
tactggctac ctatcacatc ttttttaaaa atcaaaaaat tccagtcctc tgccgcgcta 24060
atcgaccccg cgccgatgcc ctactcaatc tgggacctgg ttcacgctta cctgatatag 24120
cttccttgga agaggttcca aagatcttcg agggctctgg caataatgag actcgggccc 24180
caaatgctct gcaaaagggg gaaaatggca tggatgagca tcacagcggt ctggtggaat 24240
tggaaggcga taatgccaga ctgcgagtag tcaagcgaag catcgaggtc acacacttcg 24300
catatcccg cgtcaacctg ccccttaaag tcatgacggc ggtcatggac cagttactca 24360
ttaagcgcgc aagtccccct tcagaagaca tgcagaccc agatgcctgt gatgagggtg 24420
aaccagtggc cagtgatgag cagctaaccg gatggctggg caccgactct cccagggatt 24480
tggaagagcg tcgcaagctt atgatggccg tggctgctgt tactgtagaa ctagagtgtc 24540
tccgacgttt ctttaccgat tcagaaacct tgcgcaaact cgaagagaat ctgcactaca 24600
cttttagaca cggctttgtg cggcaggcat gcaagatc taacgtggaa ctaccaacc 24660
tggtttccta catgggtatt ctgcatgaga atcgccctagg acaaagcgtg ctgcacagca 24720
ccctgaaggg ggaagcccg cgtgattaca tccgcgattg tgtctatctg tacctgtgcc 24780
acacgtggca aaccggcatg ggtgtatggc agcaatgttt agaagaacag aacttgaaag 24840
agcttgacaa gctcttacag aaatctctta aggttctgtg gacaggggtc gacgagcgca 24900
ccgtcgcttc cgacctggca gacctcatct tcccagagcg tctcaggggt actttgcgaa 24960
acggattgcc tgactttatg agccagagca tgcttaacaa ttttcgctct tcatcctgg 25020
aacgctccgg tatcctgccc gccacctgct gcgactgcc ctccgacttt gtgcctctca 25080
cctaccgca gtgcccccg ccgctatgga gtcactgcta cctgttccgt ctggccaact 25140
atctctccta cactcggat gtgatcgagg atgtgagcgg agacggcttg ctggagtgtc 25200
actgccgctg caatctgtgc acgceccacc ggtccctagc ttgcaacccc cagttgatga 25260
gcgaaaccca gataataggc acctttgaat tgcaaggccc cagcagccaa ggcgatgggt 25320
cttctcctgg gcaaagtta aaactgacct cgggactgtg gacctccgcc tacttgcgca 25380
agtttgctcc ggaagattac caccctatg aaatcaagtt ctatgaggac caatcacagc 25440
ctccaaaggc cgaactttcg gcctgcgtca tcaccaggg ggcaattctg gcccaattgc 25500
aagccatcca aaaatcccg caagaatttc tactgaaaaa gggtaagggg gtctaccttg 25560
acccccagac cggcgaggaa ctcaacacaa ggttccctca ggatgtccca acgacgagaa 25620
aacaagaagt tgaagggtgca gccgcccgc ccagaagata tggaggaaga ttgggacagt 25680
caggcagagg aggcggagga ggacagtctg gaggacagtc tggaggaaga cagtttgag 25740
gaggaaaacg aggaggcaga ggagggtgaa gaagtaaccg ccgacaaaca gttatcctcg 25800

gctgcggaga caagcaacag cgctaccatc tccgctccga gtcgaggaac ccggcggcgt 25860
 cccagcagta gatgggacga gaccggacgc ttcccgaacc caaccagcgc ttccaagacc 25920
 ggtaagaagg atcggcaggg atacaagtcc tggcgggggc ataagaatgc catcatctcc 25980
 tgcttgcatg agtgcggggg caacatatcc ttcacgcggc gctacttgct attccaccat 26040
 ggggtgaact ttccgcgcaa tgttttgcat tactaccgtc acctccacag cccctactat 26100
 agccagcaaa tcccggcagt ctcgacagat aaagacagcg gcggcgacct ccaacagaaa 26160
 accagcagcg gcagttagaa aatacacaac aagtgcagca acaggaggat taaagattac 26220
 agccaacgag ccagcgcaaa cccgagagtt aagaaatcgg atctttccaa ccctgtatgc 26280
 catcttccag cagagtcggg gtcaagagca ggaactgaaa ataaaaaacc gatctctgcg 26340
 ttcgctcacc agaagttgtt tgtatcacaag gagcgaagat caacttcagc gcactctcga 26400
 ggacgccgag gctctcttca acaagtactg cgcgctgact cttaaagagt aggcagcgac 26460
 cgcgcttatt caaaaaggc ggaattaca tcactctcga catgagtaaa gaaattccca 26520
 cgccttacat gtggagttat caaccccaaa tgggattggc ggcagggcgc tcccaggact 26580
 actccacccg catgaattgg ctcagcgccg ggccttctat gatttctcga gttaatgata 26640
 tacgcgccta ccgaaaccaa atacttttgg aacagtcagc tcttaccacc acgccccgcc 26700
 aacaccttaa tcccagaaat tggcccgccg ccctagtgtg ccaggaaagt cccgctccca 26760
 ccactgtatt acttctctga gacgcccagg ccgaagtcca aatgactaat gcagggtgcg 26820
 agttagctgg cggctcacc ctatgtcgtc acaggcctcg gcataatata aaacgcctga 26880
 tgatcagagg ccgaggtatc cagctcaacg acgagtcggt gagctctccg cttggtctac 26940
 gaccagacgg aatctttcag attgccggct gcgggagatc ttccttcacc cctcgtcagg 27000
 ctgttctgac tttgaaagt tegtcttcgc aaccccgctc gggcggaatc gggacegttc 27060
 aatttggtga ggagtttact cctctgtctt acttcaaccc ctctcggga tctcctgggc 27120
 attacccgga cgagttcata ccgaacttcg acgcgattag cgagtcagtg gacggctacg 27180
 attgatgtct ggtgacgcgg ctgagctatc tcggctgcga catctagacc actgccgccc 27240
 ctttcgctgc tttgccggg aactcattga gttcatctac ttcgaactcc ccaaggatca 27300
 cctcaagggt ccggccacg gagtgcggat ttctatcgaa ggcaaatag actctcgctt 27360
 gcaacgaatt ttctccagc ggcccgctgt gatcgagcga gaccagggaa acaccacggt 27420
 ttccatctac tgcatttgta atcaccgccg attgcatgaa agcctttgct gtcttatgtg 27480
 tactgagttt aataaaaact gaattaagac tctctacgg actgccgctt ttcaacccg 27540
 gattttacaa ccagaagaac gaaacttttc ctgtcgtcca ggactctgtt aacttcacct 27600
 ttctactca caaactagaa gctcaacgac tacaccgctt ttccagaagc attttcccta 27660

ctaatactac tttcaaaacc ggaggtgagc tccaaggtct tcctacagaa aacccttggg 27720
tggaagcggg ccttgtagt ctaggaattc ttgcgggtgg gcttgtgatt attccttgc 27780
acctatacac accttgcttc actttcttag tgggtgttggt gtattgggtt aaaaaatggg 27840
gcccatacta gtcttgcttg ttttactttc gcttttggaa ccgggttctg ccaattacga 27900
tccatgtcta gacttcgacc cagaaaactg cacacttact ttgcacccg acacaagccg 27960
catctgtgga gttcatcgcc tctcttacga acttggcccc caacgacaaa aatttacctg 28020
catggtggga atcaacccca tagttatcac ccagcaaagt ggagatacta aggggtgcat 28080
tcaactgtcc tgcgattcca tcgagtgcac ctacaccctg ctgaagaccc tatgcggcct 28140
aagagacctg ctaccaatga attaaaaaat gattaataaa aaatcactta cttgaaatca 28200
gcaataaggc ctctgttgaa attttctccc agcagcacct cacttccctc ttcccaactc 28260
tggatttcta aaccccgctc agcggcctac tttctccata ctttaaaggg gatgtcaaat 28320
tttagctcct ctctgtacc cacaatcttc atgtctttct tcccagatga ccaagagagt 28380
ccggctcagt gactccttca acctgtcta cccctatgaa gatgaaagca cctcccaaca 28440
cccctttata aaccagggtt ttatttcccc aaatggcttc acacaaagcc caaacggagt 28500
tcttacttta aaatgttta cccactaac aaccacaggc ggatctctac agctaaaagt 28560
gggaggggga cttacagtgg atgacaccaa cggttttttg aaagaaaaca taagtgccac 28620
cacaccactc gttaagactg gtcactctat aggtttacca ctaggagccg gattgggaac 28680
gaatgaaaat aaactttgta tcaaattagg acaaggactt acattcaatt caaacaacat 28740
ttgcattgat gacaatatta acaccttatg gacaggagtc aacccaccg aagccaactg 28800
tcaaactcat aactccagt aatctaata ttgcaaatta attctaacac tagttaaac 28860
tggagcacta gtcactgcat ttgtttatgt tataggagta tctaacaatt ttaatatgct 28920
aactacacac agaaatataa attttactgc agagctgttt ttcgattcta ctggttaattt 28980
actaactaga ctctcatccc tcaaaactcc acttaatcat aaatcaggac aaaacatggc 29040
tactggtgcc attactaatg ctaaagggtt catgcccagc acgactgcct atcctttcaa 29100
tgataattct agagaaaaag aaaactacat ttacgggaact tgttactaca cagctagtga 29160
tcgactgct tttccattg acatatctgt catgcttaac cgaagagcaa taaatgacga 29220
gacatcatat tgtattcgta taacttggc ctggaacaca ggagatgcc cagaggtgca 29280
aacctctgct acaaccctag tcacctccc atttaccttt tactacatca gagaagacga 29340
ctgacaaata aagtttaact tgtttatttg aaaatcaatt cacaaaatcc gagtagttat 29400
tttgccctcc ctttccatt taacagaata caccaatctc tccccacgca cagctttaa 29460
catttggata ccattagata tagacatgg ttagattcc acattccaaa cagtttcaga 29520
gcgagccaat ctggggtcag tgatagataa aaatccatcg ggatagtctt ttaaagcgct 29580

ttcacagtcc aactgctgcg gatgcgactc cggagtctgg atcacgggtca tctggaagaa 29640
 gaacgatggg aatcataatc cgaaaacggg atcggacgat tgtgtctcat caaaccacaca 29700
 agcagccgct gtctgctgctg ctccgtgcga ctgctgttta tgggatcagg gtccacagtg 29760
 tcctgaagca tgattttaat agcccttaac atcaactttc tgggtgcgatg cgcgcagcaa 29820
 cgcattctga ttctactcaa atctttgcag taggtacaac acattattac aatattgttt 29880
 aataaaccat aattaaaagc gctccagcca aaactcatat ctgatataat cggccctgca 29940
 tgaccatcat accaaagttt aatataaatt aaatgacgtt cctcaaaaa cacactaccc 30000
 acatacatga tctcttttgg catgtgcata ttaacaatct gtctgtacca tggacaacgt 30060
 tggttaatca tgcaacccaa tataaccttc cggaaaccaca ctgccaacac cgctccccc 30120
 gccatgcatt gaagtgaacc ctgctgatta caatgacaat gaagaaccca attctctcga 30180
 ccgtgaatca ctigagaatg aaaaatatct atagtggcac aacatagaca taaatgcatg 30240
 catcttctca taatttttaa ctctcagga ttagaaaca tatcccaggg aataggaagc 30300
 tcttgcaaaa cagtaaaagt ggcagaacaa ggaagaccac gaacacaact tacactatgc 30360
 atagtcatag tatcacaatc tggcaacagc ggggtggtctt cagtcataga agctcgggtt 30420
 tcattttcct cacaacgtgg taactgggct ctggtgtaag ggtgatgtct ggccgatgat 30480
 gtcgagcgtg cgcgcaacct tgtcataatg gagttgcttc ctgacattct cgtattttgt 30540
 atagcaaaac gcggccctgg cagaacacac tcttcttcgc ctctatctct gccgcttagc 30600
 gtgttccgtg tgatagttca agtacaacca cactcttaag ttggtcaaaa gaatgctggc 30660
 ttcagttgta atcaaaactc catcgcatct aatcgttctg aggaaatcat tcaagcaatg 30720
 caactggatt gtgtttcaag caggagagga gaggaagag acggaagaac catgttaatt 30780
 tttattccaa acgatctcgc agtacttcaa attgtagatc gcgcagatgg catctctcgc 30840
 cccactgtg ttggtgaaaa agcacagcta gatcaaaaga aatgcgattt tcaaggtgct 30900
 caacgggtggc ttccagcaaa gccctccagc gcacatecaa gaacaaaaga ataecaaaag 30960
 aaggagcatt ttctaactec tcaateatca tattacatte ctgcaccatt cccagataat 31020
 tttcagcttt ccagccttga attattcgtg tcagttcttg tggtaaatec aatccacaca 31080
 ttacaaacag gtcccgagg ggcgccctcca ccaccattct taaacacacc ctcataatga 31140
 caaaatatct tgctcctgtg tcacctgtag cgaattgaga atggcaacat caattgacat 31200
 gcccttggct ctaagttctt ctttaagttc tagttgtaaa aactctctca tattatcacc 31260
 aaactgctta gccagaagcc ccccggaac aagagcaggg gacgctacag tgcagtacaa 31320
 gcgcagacct cccaattgg ctccagcaaa aacaagattg gaataagcat attgggaacc 31380
 gccagtaata tcategaagt tgctggaaat ataatcaggc agagtttctt gtaaaaattg 31440

aataaaagaa aaatttgcca aaaaaacatt caaaacctct gggatgcaaa tgcaataggt 31500
 taccgcgctg cgctccaaca ttgttagttt tgaattagtc tgcaaaaata aaaaaaaaaa 31560
 caagcgtcat atcatagtag cctgacgaac agatggataa atcagtcctt ccatcacaag 31620
 acaagccaca gggctctccag ctcgaccctc gtaaacctg tcatcatgat taaacaacag 31680
 caccgaaagt tcctcgcggt gaccagcatg aataattctt gatgaagcat acaatccaga 31740
 catgttagca tcagttaacg agaaaaaaca gccaacatag cctttgggta taattatgct 31800
 taatcgtaag tatagcaaag ccaccctcgc cggtatacaa gtaaaaggca caggagaata 31860
 aaaaatataa ttatttctct gctgctgttc aggcaacgtc gcccccggtc cctctaaata 31920
 cacatacaaa gcctcatcag ccatggctta ccagacaaag tacagcgggc acacaaagca 31980
 caagctctaa agtgactctc caacctctcc acaatatata tatacacaag ccctaaactg 32040
 acgtaatggg agtaaagtgt aaaaaatccc gccaaacca acacacaccc cgaaactgcg 32100
 tcaccagggg aaagtacagt ttcaactcgc caatcccaac aggcgtaact tcctctttct 32160
 cacggtacgt gatatccac taacttgcaa cgtcattttc ccacggtcgc accgcccctt 32220
 ttagccgtta accccacagc caatcaccac acgatccaca ctttttaaa tcacctcatt 32280
 tacatattgg caccattcca tctataaggt atattatata gatag 32325

<210> 2
 <211> 34794
 <212> DNA
 <213> Adenovirus

<400> 2
 ctatctatat aatatacctt atagatggaa tgggtccaat atgtaaatga ggtgatttta 60
 aaaagtgtgg atcgtgtggt gattggctgt ggggttaacg gctaaaaggg gcggtgcgac 120
 cgtgggaaaa tgacgttttg tgggggtgga gtttttttgc aagtgtgcgc gggaaatgtg 180
 acgcataaaa aggccttttt ctcacggaac tacttagttt tccacggta tttaaeagga 240
 aatgaggtag ttttgaccgg atgcaagtga aaattgttga ttttcgcgcg aaaactgaat 300
 gaggaagtgt ttttctgaat aatgtggtat ttatggcagg gtggagtatt tgttcagggc 360
 caggtagact ttgagccatt acgtggaggt ttcgattacc gtgtttttta cctgaatttc 420
 cgcgtaccgt gtcaaagtct tctgttttta cgtagggtgc agctgatcgc tagggatttt 480
 atacctcagg gtttgtgtca agaggccact cttgagtgc agcgagaaga gttttctcct 540
 ctgcgccggc agtttaataa taaaaaatg agagatttgc gatttctgcc tcaggaaata 600
 atctctgctg agactggaaa tgaaatattg gagcttgtgg tgcacgcct gatgggagac 660
 gatccggagc cacctgtgca gctttttgag cctcctacgc ttcaggaact gtatgattta 720
 gaggtagagg gatcggagga ttctaattgag gaagctgtaa atggcctttt taccgattct 780

atgcttttag ctgctaataga aggggtagaa ttagatccgc ctttggacac ttttgatact	840
ccaggggtaa ttgtggaaag cggtagaggt gtaagaaat tacctgattt gagttccgtg	900
gactgtgatt tgcactgcta tgaagacggg ttctctccga gtgatgagga ggacctgaa	960
aaggagcagt ccatgcagac tgcagcgggt gagggagtga aggctgccaa tgttggtttt	1020
cagttggatt gccccgagct tcctggacat ggctgtaagt cttgtgaatt tcacaggaaa	1080
aatactggag taaaggaact gttatgttcg ctttggtata tgagaacgca ctgccacttt	1140
atttacagta agtgtgttta agttaaatt taaaggaata tgctgttttt cacatgtata	1200
ttgagtgtga gttttgtgct tcttattata ggtcctgtgt ctgatgctga tgaatcacca	1260
tctcctgatt ctactacctc acctcctgag attcaagcac ctgttcctgt ggacgtgcgc	1320
aagcccatte ctgtgaagct taagcctggg aaacgtccag cagtggaaa acttgaggac	1380
ttgttacagg gtggggacgg acctttggac ttgagtacac ggaaacgtcc aagacaataa	1440
gtgttccata tccgtgttta cttaagggtga cgtcaatatt tgtgtgacag tgcaatgtaa	1500
taaaaatatg ttaactgttc actggttttt attgcttttt gggcggggac tcaggatat	1560
aagtagaagc agacctgtgt ggtagctca taggagctgg ctttcatcca tggaggtttg	1620
ggccattttg gaagacctta ggaagactag gcaactgtta gagaacgctt cggacggagt	1680
ctccggtttt tggagattct ggttcgctag tgaattagct agggtagttt ttaggataaa	1740
acaggactat aaacaagaat ttgaaaagt gttagtagat tgcccaggac tttttgaagc	1800
tcttaatttg ggccatcagg ttactttta agaaaaagt ttatcagttt tagacttttc	1860
aaccccaggt agaactgctg ctgctgtggc tttcttact tttatattag ataatggat	1920
cccgcagact catttcagca ggggatacgt tttggatttc atagccacag cattgtggag	1980
aacatggaag gttcgcaaga tgaggacaat cttaggttac tggccagtgc agcctttggg	2040
tgtagcggga atcctgaggg atccaccggt catgccagcg gttctggagg aggaacagca	2100
agaggacaac ccgagagccg gcctggaccc tccagtggag gaggcggagt agctgacttg	2160
tctcctgaac tgcaacgggt gcttactgga tctacgtcca ctggacggga taggggcgtt	2220
aagagggaga gggcatctag tggtagtgat gctagatctg agttggcttt aagttaaatg	2280
agtegcagac gtctgaaac catttggtgg catgaggttc agaaagaggg aagggatgaa	2340
gtttctgtat tgcaggagaa atattcactg gaacagggtga aaacatgttg gttggagcct	2400
gaggatgatt gggagggtgg cattaaaaat tatgccaaga tagctttgag gcctgataaa	2460
cagtataaga ttactagacg gattaatatc cggaatgctt gttacatatc tggaaatggg	2520
gctgagggtg taatagatac tcaagacaag gcagttatta gatgctgcat gatggatatg	2580
tggcctgggg tagtcggtat ggaagcagta acttttgtaa atgttaagtt taggggagat	2640
ggttataatg gaatagtgtt tatggccaat accaaactta tattgcatgg ttgtagcttt	2700

tttggtttca acaataacctg tgtagatgcc tggggacagg ttagtgtagc gggatgtagt	2760
ttctatgcgt gttggattgc cacagctggc agaaccaaga gtcaattgtc tctgaagaaa	2820
tgcatatttc aaagatgtaa cctgggcatt ctgaatgaag gcgaagcaag ggtccgccac	2880
tgcgcttcta cagatactgg atgttttatt ttgattaagg gaaatgccag cgtaaagcat	2940
aacatgattt gcggtgcttc cgatgagagg ccttatcaaa tgctcacttg tgctgggtggg	3000
cattgtaata tgctggctac tgtgcatatt gtttcccatc aacgcaaaaa atggcctgtt	3060
tttgatcaca atgtgatgac gaagtgtacc atgcatgcag gtgggcgtag aggaatgttt	3120
atgcccttacc agtgtaacat gaatcatgtg aaagtgttgt tggaaaccaga tgccttttcc	3180
agaatgagcc taacaggaat ttttgacatg aacatgcaaa tctggaagat cctgaggtat	3240
gatgatacga gatcgagggt acgcgcatgc gaatgcggag gcaagcatgc caggttccag	3300
ccggtgtgtg tagatgtgac tgaagatctc agaccggatc atttggttat tgcccgcact	3360
ggagcagagt tcggatccag tggagaagaa actgactaag gtgagtattg ggaaaacttt	3420
gggggtgggat tticagatgg acagattgag taaaaatttg ttttttctgt cttgcagctg	3480
tcatgagtgg aaacgcttct ttttaagggg gagtcttcag cccttatctg acagggcgtc	3540
tcccatcctg ggcaggagtt cgtcagaatg ttatgggatc tactgtggat ggaagaccg	3600
tccaacccgc caattcttca acgctgacct atgctacttt aagtcttca cctttggacg	3660
cagctgcagc tgccgcccgc gcttctgttg ccgctaacac tgtgcttggg atgggttact	3720
atggaagcat catggctaatt tccacttct ctaataacct ttctaccctg actcaggaca	3780
agttacttgt ccttttggcc cagctggagg ctttgaccca acgtctgggt gaactttctc	3840
agcaggtggt cgagttgcga gtacaaactg agtctgctgt cggcacggca aagtctaaat	3900
aaaaaaatcc cagaatcaat gaataaataa acaagcttgt tgttgattta aatcaagtg	3960
tttttatttc atttttcgcg cacggtatgc cctagaccac cgatctctat cattgagaac	4020
tcggtggatt ttttccagga tcctatagag gtgggattga atgttttagat acatgggcat	4080
taggccgtct ttgggggtgga gatagctcca ttgaagggat tcatgctccg gggtagtggt	4140
gtaaatcacc cagtcataac aaggctcgag tgcattggtg tgcacaatat cttttagaag	4200
taggctgatt gccacagata agcccttggg ttaggtgttt acaaaccggg tgagctggga	4260
tgggtgcatt cgggggtgaaa ttatgtgcat tttggattgg atttttaagt tggcaatatt	4320
gccgccaaga tcccgtcttg ggttcatgtt atgaaggacc accaagacgg tgtatccgg	4380
acatttagga aatttatcgt gcagcttggg tggaaaagcg tggaaaaatt tggagacacc	4440
cttgtgtcct ccaagatttt ccatgcactc atccatgata atagcaatgg ggccgtgggc	4500
agcggcgcg gcaaacacgt tccgtgggtc tgacacatca tagttatgtt cctgagttaa	4560

atcatcataa gccatttttaa tgaatttggg gcgagagta ccagattggg gtatgaatgt 4620
 tccttcpggc cccggagcat agttcccctc acagatttgc atttcccaag ctttcagttc 4680
 cgaggggtga atcatgtcca cctggggggc tatgaaaaac accgtttctg gggcgggggt 4740
 gattaattgt gatgatagca aatttctgag caattgagat ttgccacatc cgggtggggcc 4800
 ataaatgatt ccgattacgg gttgcaggtg gtagtttagg gaacggcaac tgccgtcttc 4860
 tcgaagcaag ggggccacct cgttcatcat ttcccttaca tgcataatttt cccgcaccaa 4920
 atccattagg aggcgtcttc ctctagtga tagaagttct tgtagtgagg aaaagttttt 4980
 cagcggtttc agaccgtcag ccatgggcat tttggagaga gtttgctgca aaagtcttag 5040
 tctgtccac agttcagtga tgtgttctat ggcattctga tccagcagac ctctcgttt 5100
 cgcggtttg gacggctcct ggaatagggt atgagacgat gggcgtccag cgctgccagg 5160
 gttcggctct tccaggggtc cagtgttcca gtcagggttg ttccgtcac agtgaagggg 5220
 tgtgcgctg cttgggcgct tgccaggggt cgcttcagac tcattctgct ggtcgaaaac 5280
 ttctgtcgt tggcgccctg tatgtcggcc aagtagcagt ttaccatgag ttcgtagttg 5340
 agcgcctcgg ctgcgtggcc tttggcgcg agcttacctt tggaagtatt cttgcatacc 5400
 gggcagtata ggcatttcag cgcatacaac ttgggcgcaa ggaaaacgga ttctggggag 5460
 tatgcatctg cgccgcagga ggcgcaaca gtttcacatt ccaccagcca ggttaaattc 5520
 ggttcattgg ggtcaaaaac aagttttccg ccatattttt tgatgcgttt cttacctttg 5580
 gtctccatga gttcgtgtcc tcgttgagt acaaacaggc tgtccgtgtc cccgtagact 5640
 gattttacag gcctctcttc cagtggagt cctcgggtct cttcgtacag gaactctgac 5700
 cactctgata caaaggcgcg egtccaggcc agcacaaggg aggttatgtg ggaggggtag 5760
 cgatcgttgt caaccagggg gtccaccttt tccaaagtat gcaaacacat gtcaccctct 5820
 tcaacatcca ggaatgtgat tggctttag gtgtatttca cgtgacctgg ggtccccgct 5880
 ggggggggtat aaaagggggc ggttctttgc tcttctcac tgtcttcgg atcgtgtcc 5940
 aggaacgtca gctgttgggg taggtattcc ctctcgaagg cgggcatgac ctctgcactc 6000
 aggttgtcag tttctaagaa cgaggaggat ttgatattga cagtgccggg tgagatgcct 6060
 ttcatgaggt tttcgtccat ttggtcagaa aacacaattt ttttattgtc aagtttgggtg 6120
 gcaaatgata cctacagggc gttggataaa agtttggcaa tggatcgcag ggtttggttc 6180
 ttttcttgt ccgcgcgtc tttggcgcg atgttgagtt ggacataatt gcgtgccagg 6240
 cacttccatt cggggaagat agttgttaat tcattctgga cgattctcac ttgccacct 6300
 cgattatgca aggttaattaa atccacactg gtggccacct cgcctcgaag gggttcattg 6360
 gtccaacaga gcttacctcc tttctagaa cagaaagggg gaagtgggtc tagcataagt 6420
 tcatcgggag ggtctgcac catggttaaag attcccggaa gtaaatcctt atcaaatag 6480

ctgatgggag tgggggtcatc taaggccatt tgccattctc gagctgccag tgcgcgctca	6540
tatgggttaa ggggactgcc ccatggcatg ggatgggtga gtgcagaggc atacatgcca	6600
cagatgtcat agacgtagat gggatcctca aagatgccta tgtaggttgg atagcatcgc	6660
ccccctctga tacttgctcg cacatagtca tatagttcat gtgatggcgc tagcagcccc	6720
ggacccaagt tgggtgcgatt ggggttttct gttctgtaga cgatctggcg aaagatggcg	6780
tgagaattgg aagagatggg ggggtcttga aaaatgttga aatgggcatg aggtagacct	6840
acagagtctc tgacaaagtg ggcataagat tcttgaagct tggttaccag ttcggcggtg	6900
acaagtacgt ctagggcgca gtagtcaagt gtttcttgaa tgatgtcata acctggttg	6960
ttttctttt ccacagttc gcggttgaga aggtattctt cgcgatcctt ccagtactct	7020
tctagcggaa acccgtcttt gtctgcacgg taagatccta gcatgtagaa ctgattaact	7080
gccttgtaag ggcagcagcc cttctctacg ggtagagagt atgcttgagc agcttttctg	7140
agcgaagcgt gagtaagggc aaagggtgtc ctgaccatga ctttgagaaa ttggattttg	7200
aagtccgatg cgtcacaggc tccctgttcc cagagttgga agtctacccg tttctttag	7260
gcgggggttg gcaaagcgaa agtaacatca ttgaagagaa tcttaccggc tctgggcata	7320
aaattgcgag tgatgcgaaa aggctgtggg acttccgctc gattgttgat cacctgggca	7380
gctaggacga tctcgtcgaa accgttgatg ttgtgtccta cgatgtataa ttctatgaaa	7440
cgcggcgtgc ctctgacgtg aggtagctta ctgagctcat caaagggttag gtctgtgggg	7500
tcagataagg cgtagtgttc gagagcccat tcgtgcagggt gaggatttgc atgtaggaat	7560
gatgaccaa gatctaccgc cagtgtgtt tgtaactggg cccgatactg acgaaaatgc	7620
cggccaattg ccattttttc tggagtga ca gtagaagg ttctggggtc ttgttgccat	7680
cgatcccact tgagtttaat ggctagatcg tgggcatgt tgacgagacg ctcttctcct	7740
gagagtttca tgaccagcat gaaaggaact agttgtttgc caaaggatcc catccagggtg	7800
taagtttcca catcgtaggt caggaagagt ctttctgtgc gaggatgaga gccgatcggg	7860
aagaactgga tttcctgcc caagtggag gattggctgt tgatgtgat gaagtagaag	7920
tttctgcggc gcgcgagca ttcgtgtttg tgcttgata gacggccgca gtagtcgag	7980
cgttgcacgg gttgtatctc gtgaatgagt tgtacctggc ttcccttgac gagaaatttc	8040
agtgggaagc cgaggcctgg cgattgtatc tcgtgtctt ctatattcgc tgtatcggcc	8100
tgttcatctt ctgtttcgat ggtggtcatg ctgacgagcc cccgcgggag gcaagtccag	8160
acctcggcg gggaggggag gagctgaagg acgagagcg gcaggctgga gctgtccaga	8220
gtcctgagac gctgcggact caggtagta ggtagggaca gaagattaac ttgcatgatc	8280
ttttccaggg cgtgcgggag gttcagatgg tacttgattt ccacaggttc gttttagag	8340

acgtcaatgg cttgcagggg tccgtgtcct ttgggcgcca ctaccgtacc tttgtttttt 8400
 cttttgatcg gtgggtggctc tcttgcttct tgcatgctca gaagcgggtga cgggggacgcg 8460
 cgccgggacgg cagcggttgt tccggacccg agggcatggc tggtagtggc acgtcggcgc 8520
 cgcgcacggg caggttcttg tactgcgctc tgagaagact tgcgtgcgcc accacgcgtc 8580
 gattgacgtc ttgtatctga cgtctctggg tgaaagctac cggccccgtg agcttgaacc 8640
 tgaaagagag ttcaacagaa tcaatttcgg tatcgttaac ggcagcttgt ctcagtattt 8700
 cttgtacgtc accagagttg tcctggtagg cgatctccgc catgaactgc tcgatttctt 8760
 cctcctgaag atctccgcga cccgctcttt cgacgggtggc cgcgaggtca ttggagatac 8820
 ggcccatgag ttgggagaat gcattcatgc ccgcctcgtt ccagacgcgg ctgtaaacca 8880
 cggccccctc ggagctctct gcgcgcatca ccacctgagc gaggttaagc tccacgtgtc 8940
 tggggaagac cgcatagttg cataggcgct gaaaaaggta gttgagtgtg gtggcaatgt 9000
 gttcggcgac gaagaaatac atgatccatc gtctcagcgg catttcgcta acatcgccca 9060
 gagcttccaa gcgctccatg gcctcgtaga agtccacggc aaaattaaaa aactgggagt 9120
 ttcgcgcgga cacgggtcaat tcctctcga gaagacggat gagttcggct atggtggccc 9180
 gtacttcgcy ttcgaaggct cccgggatct cttctctctc ttctatctct tcttccacta 9240
 acatctcttc ttcgtcttca ggccggggcg gagggggcac gcggcgacgt cgacggcgca 9300
 cgggcaaacy gtcgatgaat cgttcaatga cctctccgcg gcggcgggcg atggtttcag 9360
 tgacggcgcy gccgttctcg cgcggtcgca gagtaaaaac accgcccgcg atctccttaa 9420
 agtgggtgact gggaggttct ccgtttggga gggagagggc gctgattata cattttatta 9480
 attggcccgt agggactgca cgcagagatc tgatcgtgtc aagatccacg ggatctgaaa 9540
 acctttcgac gaaagcgtct aaccagtcac agtcacaagg taggctgagt acggcttctt 9600
 gtgggcgggg gtgggtatgt gttcgggtct ggtcttctgt ttcttcttca tctcgggaag 9660
 gtgagacgat gctgctggtg atgaaattaa agtaggcagt tctaagacgg cggatgggtg 9720
 cgaggagcac caggtctttg ggtccggctt gctggatacg caggcgattg gccattcccc 9780
 aagcattatc ctgacatcta gcaagatctt tgtagtagtc ttgcatgagc cgttctacgg 9840
 gcacttcttc ctacccgtt ctgccatgca tacgtgtgag tccaaatccg cgcattgggt 9900
 gtaccagtg ccaagtcagt acgactctt cggcgaggat ggcttgctgt acttgggtaa 9960
 ggggtggctt aaagtcacaa aaatccacaa agcgggtggta agctcctgta ttaatgggtg 10020
 aagcacagtt ggccatgaet gaccagttaa ctgtctggtg accagggcg cagagctcgg 10080
 tgtatttaag gcgcgaatag gcgcgggtgt caaagatgta atcgttgcag gtgcgcacca 10140
 gatactggtg cctataaga aaatgcggcg gtgggtggcg gtagagaggc catcgttctg 10200
 tagctggagc gccagggggc aggtcttcca acataaggcg gtgatagccg tagatgtacc 10260

tggacatcca ggtgattcct gcggcggttag tagaagcccg aggaaactcg cgtacgcggt 10320
tccaaatggt gcgtagcggc atgaagtagt tcattgtagg cacggtttga ccagtgaggc 10380
gcgcgcagtc attgatgctc tatagacacg gagaaaatga aagcgttcag cgactcgact 10440
ccgtagcctg gaggaacgtg aacggggttg gtcgcggtgt accccggttc gagacttgta 10500
ctcgagccgg ccggagccgc ggctaacgtg gtattggcac tcccgtctcg acccagccta 10560
caaaaatcca ggatacggaa tcgagtcgtt ttgctgggtt ccgaatggca gggaaagtga 10620
tcctatTTTT tttttttgcc gctcagatgc atcccgtgct gcgacagatg cgtccccaac 10680
aacagcccc ctcgcagcag cagcagcagc aatcacaaaa ggctgtccct gcaactactg 10740
caactgccgc cgtgagcggg gcgggacagc ccgcctatga tctggacttg gaagagggcg 10800
aaggactggc acgtctaggt gcgccttcac ccgagcggca tccgcgagtt caactpaaaa 10860
aagattctcg cgaggcgtat gtgccccaac agaacctatt tagagacaga agcggcgagg 10920
agccggagga gatgcgagct tcccgttta acgcgggtcg tgagctgct caccggtttg 10980
accgaagacg agtgttgccg gacgaggatt tcgaagtga tgaaatgaca gggatcagtc 11040
ctgccagggc acacgtgtct gcagccaacc ttgtatcggc ttacgagcag acagtaaagg 11100
aagagcgtaa cttccaaaag tcttttaata atcatgtcg aacctgatt gcccpcgaag 11160
aagttaccct tggtttgatg catttggtgg atttgatgga agctatcatt cagaacccta 11220
ctagcaaacc tctgaccgcc cagctgtttc tgggtggtgca acacagcaga gacaatgagg 11280
ctttcagaga ggcgtgctg aacatcacgc aaccggagg gagatggtg tatgatctta 11340
tcaacattct acagagtatc atagtgcagg agcggagcct gggcctggcc gagaagggtg 11400
ctgccatcaa ttactcgggt ttgagcttgg gaaaatatta cgtctgcaa atctacaaga 11460
ctccatacgt tcccatagac aaggaggtga agatagatgg gttctacatg cgcagcgc 11520
tcaaggctct gaccctgagc gatgatcttg ggggtgtatc caatgacaga atgcatcgcg 11580
cggttagcgc cagcaggagg cgcgagttaa gcgacagga actgatgcac agtttgcaa 11640
gagctctgac tggagctgga accgagggg agaattactt cgacatggga gctgacttgc 11700
agtggcagcc tagtcgcagg gctctgagcg ccgcgacggc aggatgtgag cttccttaca 11760
tagaagaggc ggatgaaggc gaggaggaag agggcgagta cttggaagac tgatggcaca 11820
acccgtgtt tttgctagat ggaacagcaa gcaccggatc ccgcaatcg ggcggcgtg 11880
cagagccagc cgtccggcat taactcctcg gacgattgga ccaggccat gcaacgtatc 11940
atggcgttga cgactcgcaa cccgagcc tttagacagc aaccggagc caaccgtcta 12000
tcggccatca tpgaagctgt agtgccttcc cgctctaac cactcatga gaaggctctg 12060
gccatcgtga acgcgttggg ggagaacaaa gctattcgtc cagatgaggc cggactggtg 12120

tacaacgctc tcttagaacg cgtggctcgc tacaacagta gcaatgtgca aaccaatttg 12180
 gaccgtatga taacagatgt acgcgaagcc gtgtctcagc gcgaaagggt ccagcgtgat 12240
 gccaacctgg gttcgctggg ggcgttaaat gctttcttga gtactcagcc tgctaattgtg 12300
 ccgcgtgggtc aacaggatta tactaacttt ttaagtgcct tgagactgat ggtatcagaa 12360
 gtacctcaga gcgaagtgtg tcagtcagggt cctgattact tctttcagac tagcagacag 12420
 ggcttgacaga cggtaaatct gagccaagct tttaaaaacc ttaaagggtt gtggggagtg 12480
 catgccccgg taggagaaag agcaaccgtg tctagcttgt taactccgaa ctccgccta 12540
 ttattactgt tggtagctcc tttcaccgac agcggtagca tcgaccgtaa ttcctatttg 12600
 ggttacctac taaacctgta tcgcgaagcc atagggcaaa gtcagggtga cgagcagacc 12660
 tatcaagaaa ttaccaagt cagtcgcgct ttgggacagg aagacactgg cagtttgaa 12720
 gccactctga acttcttget taccaatcgg tctcaaaaga tccctctca atatgctctt 12780
 actgcggagg aggagaggat ccttagatat gtgcagcaga gcgtgggatt gtttctgatg 12840
 caagaggggg caactccgac tgcagcactg gacatgacag cgcgaaatat ggagcccagc 12900
 atgtatgcc aataaccgacc tttcattaac aaactgctgg actacttgca cagagctgcc 12960
 gctatgaact ctgattattt caccaatgcc atcttaaacc cgcactggct gccccacct 13020
 ggtttctaca cgggcgaata tgacatgcc gaccctaag acggatttct gtgggacgac 13080
 gtggacagcg atgtttttt acctctttct gatcatcgca cgtggaaaaa ggaaggcggc 13140
 gatagaatgc attcttctgc ategctgtcc ggggtcatgg gtgctaccgc ggctgagccc 13200
 gagtctgcaa gtccttttcc tagtctaccc ttttctctac acagtgtacg tagcagcgaa 13260
 gtgggtagaa taagtcgccc gagtttaag ggcaagagg agtatctaaa cgattccttg 13320
 ctacagaccg caagagaaaa aaatttccca aacaatggaa tagaaagttt ggtggataaa 13380
 atgagtagat ggaagactta tgctcaggat cacagagacg agcctgggat catggggatt 13440
 acaagtagag cgagccgtag acgccagcg catgacagac agaggggtct tgtgtgggac 13500
 gatgaggatt cggccgatga tagcagcgtg ctggacttgg gtgggagagg aaggggcaac 13560
 ccgtttgctc atttgcgccc tcgcttgggt ggtatgttgt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 13620
 ctcaccaagg ccatggcgac gagcgtacgt tcgttcttct ttattatctg tgtctagtat 13680
 aatgaggcga gtcgtgctag gcggagcggg ggtgtatccg gagggctctc ctcttcgta 13740
 cgagagcgtg atgcagcagc agcaggcgac ggcgggtgat caatccccac tggaggctcc 13800
 ctttgtgcct ccgcgatacc tggcacctac ggagggcaga aacagcattc gttattcgga 13860
 actggcacct cagtacgata ccaccagggt gtatctgggt gacaacaagt cggcggacat 13920
 tgcttctctg aactatcaga atgaccacag caacttcttg accacgggtg tgcaaaacaa 13980
 tgactttacc cctacggaag ccagcaccca gaccattaac tttgatgaac gatcgcgggtg 14040

gggcggtcag ctaaagacca tcatgcatac taacatgcc aacgtgaacg agtatatgtt 14100
tagtaacaag ttcaaagcgc gtgtgatggt gtccagaaaa cctcccgcg gtgctgcagt 14160
tggggatact tatgatcaca agcaggatat ttgaaatat gagtggttcg agtttacttt 14220
gccagaaggc aacttttcag ttactatgac tattgatttg atgaacaatg ccatcataga 14280
taattacttg aaagtgggta gacagaatgg agtgcttgaa agtgacattg gtgttaagtt 14340
cgacaccagg aacttcaagc tgggatggga tcccgaacc aagttgatca tgcctggagt 14400
gtatacgtat gaagccttcc atcctgacat tgtcttactg cctggctgcg gagtggattt 14460
taccgagagt cgtttgagca accttcttgg tatcagaaaa aaacagccat ttcaagaggg 14520
ttttaagatt ttgtatgaag atttagaagg tggtaatat ccggccctct tggatgtaga 14580
tgcctatgag aacagtaaga aagaacaaaa agccaaaata gaagctgcta cagctgctgc 14640
agaagctaag gcaaacatag ttgccagcga ctctacaagg gttgctaacg ctggagaggt 14700
cagaggagac aattttgcgc caacacctgt tccgactgca gaatcattat tggccgatgt 14760
gtctgaagga acggacgtga aactcactat tcaacctgta gaaaaagata gtaagaatag 14820
aagctataat gtgttggaag acaaaatcaa cacagcctat cgcagttggt atctttcgta 14880
caattatggc gatccccgaa aaggagtgcg ttcctggaca ttgtcacca cctcagatgt 14940
cacctgcgga gcagagcagg tctactggtc gcttcagac atgatgaagg atcctgtcac 15000
tttccgctcc actagacaag tcagtaacta ccctgtggtg ggtgcagagc ttatgcccgt 15060
cttctcaaag agcttctaca acgaacaagc tgtgtactcc cagcagctcc gccagtcac 15120
ctcgcttacg cacgtcttca accgcttcc tgagaaccag attttaatcc gtccgccggc 15180
gcccaccatt accaccgtca gtgaaaacgt tctgtcttc acagatcacg ggaccctgcc 15240
gttgccgagc agtatccggg gagtccaacg tgtgaccgtt actgacgcca gacgccgcac 15300
ctgtccctac gtgtacaagg cactgggcat agtcgcaccg cgcgtccttt caagccgcac 15360
tttctaaaaa aaaaaaaaaat gtccattctt atctcgccca gtaataacac cggttggggt 15420
ctgcgcgctc caagcaagat gtacggaggc gcacgcaaac gttctacca acatectgtc 15480
cgtgttcgcg gacattttcg cgctccatgg ggcgccctca agggccgcac tcgcgttcga 15540
accaccgtcg atgatgtaat cgatcagggt gttgccgacg cccgtaatta tactcctact 15600
gcgcctacat ctactgtgga tgcagttatt gacagtgtag tggctgacgc tcgcaactat 15660
gctcgacgta agagccggcg aaggcgcat gccagacgcc accgagctac cactgccatg 15720
cgagccgcaa gagctctgct acgaagagct agacgcgtgg ggcgaagagc catgcttagg 15780
gcggccagac gtgcagcttc gggcgccagc gccggcaggt cccgcaggca agcagccgct 15840
gtcgcagcgg cgactattgc cgacatggcc caatcgcgaa gaggcaatgt atactgggtg 15900

cgtgacgctg ccaccggtca acgtgtaccc gtgcgcaccc gtccccctcg cacttagaag 15960
 atactgagca gtctccgatg ttgtgtccca gcggcgagga tgtccaagcg caaatacaag 16020
 gaagaaatgc tgcaggttat cgcacctgaa gtctacggcc aaccgttgaa ggatgaaaaa 16080
 aaacccccga aaatcaagcg ggttaaaaag gacaaaaaag aagaggaaga tggcgatgat 16140
 gggctggcgg agtttgtgcg cgagtttgcc ccacggcgac gcgtgcaatg gcgtgggcgc 16200
 aaagttcgac atgtgttgag acctggaact tcggtggtct ttacaccggg cgagcggtca 16260
 agcgctactt ttaagcggtc ctatgatgag gtgtacgggg atgatgatat tcttgagcag 16320
 gcggctgacc gattaggcga gtttgcttat ggcaagcgta gtagaataac ttccaaggat 16380
 gagacagtgt cgataccctt ggatcatgga aatccccacc ctagtcttaa accggtcact 16440
 ttgcagcaag tgttaccctg aactccgcga acaggtgtta aacgcgaagg tgaagatttg 16500
 tatcccta tgcaactgat ggtacccaaa cgccagaagt tggaggacgt tttggagaaa 16560
 gtaaaagtgg atccagatat tcaacctgag gttaaagtga gaccattaa gcaggtagcg 16620
 cctggtctgg ggtacaaac tgtagacatt aagattccca ctgaaagtat ggaagtgcaa 16680
 actgaacccg caaagcctac tgccacctcc actgaagtgc aaacggatcc atggatgccc 16740
 atgcctatta caactgacgc cgccgggtccc actcgaagat cccgacgaaa gtacgggtcca 16800
 gcaagtctgt tgatgccaa ttatgttgta caccatcta ttattcctac tcctggttac 16860
 cgaggcactc gctactatcg cagccgaaac agtacctccc gccgtcgccg caagacacct 16920
 gcaaatcgca gtcgtcgccg tagacgcaca agcaaatcga ctccggcgcc cctggtgccc 16980
 caagtgtacc gcaatggtag tgcggaacct ttgacactgc cgcgtgcccg ttaccatccg 17040
 agtatcatca cttaataat gttgccgctg cctccttgca gatatggccc tcaattgtcg 17100
 ccttcgctt cccatcactg gttaccgagg aagaaactcg cgccgtagaa gagggatgtt 17160
 gggacgcgga atgcgacgct acagggcgac gcgtgctatc cgcaagcaat tgcgggggtg 17220
 tttttacca gccttaattc caattatcg tgctgcaatt ggcgcgatac caggcatagc 17280
 ttccgtggcg gttcaggcct cgcaacgaca ttgacattgg aaaaaaacgt ataaataaaa 17340
 aaaaaaaaaat acaatggact ctgacactcc tggctcctgt actatgtttt cttagagatg 17400
 gaagacatca atttttcatc cttggctccg cgacacggca cgaagccgta catgggcacc 17460
 tggagcgaca teggcacgag ccaactgaac gggggcgccct tcaattggag cagtatctgg 17520
 agcgggctta aaaatttttg ctcaaccata aaacatacg ggaacaaagc ttggaacagc 17580
 agtacaggac aggcgcttag aaataaactt aaagaccaga acttccaaca aaaagtagtc 17640
 gatgggatag cttccggcat caatggagtg gtagatttgg ctaaccaggc tgtgcagaaa 17700
 aagataaaca gtcgttttga cccgccgcca gcaacccag gtgaaatgca agtggaggaa 17760
 gaaattcctc cgccagaaaa acgaggcgac aagcgtccgc gtcccgattt ggaagagacg 17820

ctggtgacgc gcgtagatga accgccttct tatgaggaag caacgaagct tggaatgccc 17880
 accactagac cgatagcccc aatggccacc ggggtgatga aaccttctca gttgcatcga 17940
 cccgtcacct tggatttgcc cctccccct gctgctactg ctgtacccgc ttctaagcct 18000
 gtcgctgccc cgaaccagct cgccgtagcc aggtcacgtc ccgggggccc tcctcgtcca 18060
 aatgcgcact ggcaaaatac tctgaacagc atcgtgggtc taggcgtgca aagtgtaaaa 18120
 cgccgtcgtt gcttttaatt aaatatggag tagcgcttaa cttgcctatc tgtgtatatg 18180
 tgtcattaca cgccgtcaca gcagcagagg aaaaaaggaa gaggtcgtgc gtcgacgctg 18240
 agttactttc aagatggcca ccccatcgat gctgccccaa tgggcataca tgcacatcgc 18300
 cggacaggat gcttcggagt acctgagtcg ggggtctggtg cagttcgccc gcgccacaga 18360
 cacctacttc aatctgggaa ataagtttag aaatcccacc gtacgcccga cccacgatgt 18420
 gaccaccgac cgtagccagc ggctcatggt gcgcttcgtg cccgttgacc gggaggacaa 18480
 tacatactct tacaagtgcc ggtacacctt ggccgtgggc gacaacagag tgctggatat 18540
 ggccagcacg ttctttgaca ttaggggtgt gttggacaga ggtcccgatt tcaaacctta 18600
 ttctggtagc gcttacaact ccctggctcc taaaggcgct ccaaatacat ctgagtggat 18660
 tgcagaaggt gtaaaaaata caactggtga ggaacacgta acagaagagg aaaccaatac 18720
 tactacttac acttttggca atgctcctgt aaaagctgaa gctgaaatta caaagaagg 18780
 actcccgatg ggttttgaag ttccagatga agaaagtaaa ccgatttatg ctgataaaac 18840
 atatcagcca gaacctcagc tgggagatga aacttgact gaccttgatg gaaaaaccga 18900
 aaagtatgga ggcagggtc tcāaacccga tactaagatg aaaccatgct acgggtcctt 18960
 tgccaaacct actaatgtga aaggcggtca ggcaaaaca aaaacaacgg agtagccaaa 19020
 tcagaaagtc gaatatgata tcgacatgga gttttttgat gcggcatcgc agaaacaaa 19080
 cttaagtcct aaaattgtca tgtatgcaga aaatgtaaat ttggaaactc cagacactca 19140
 tgtagtgtac aaacctggaa cagaagacac aagttccgaa gctaatttgg gacaacaatc 19200
 tatgcccaac agaccaact acattggctt cagagataac ttatttggac ttatgtacta 19260
 taacagtact ggtaacatgg ggggtgctggc tggtaagctg tctcagttaa atgcagtgg 19320
 tgacttgcat gacagaaaca cagaactttc ttaccaactc ttgcttgact ctctgggcga 19380
 cagaaccaga tacttttagca tgtggaatca ggctgtggac agttatgatc ctgatgtacg 19440
 tgttattgaa aatcatggtg tggaagatga acttcccaac tactgttttc cactggacgg 19500
 cataggtgtt ccaacaacca gttacaaatc aatagttcca aatggagaca atgcgcctaa 19560
 ttggaaggaa cctgaagtaa atggaacaag tgagatcggg cagggttaatt tgtttgcat 19620
 ggaaattaac cttcaagcca atctatggcg aagtttcctt tattccaatg tggctctata 19680

tctcccagac tcgtacaaat acaccccgtc caatgtcact cttccagaaa acaaaaacac 19740
 ctacgactac atgaacgggc ggggtgggccc gccatctcta gtagacacct atgtgaacat 19800
 tgggtgccagg tgggtctctgg atgccatgga caatgtcaac ccattcaacc accaccgtaa 19860
 cgctggccttg cgttaccgat ccatgcttct gggtaacgga cgttatgtgc ctttccacat 19920
 acaagtgcct caaaaattct tcgctgttaa aaacctgctg cttctcccag gctcctacac 19980
 ttatgagtgg aacttttagga aggatgtgaa catggttcta cagagttccc tcggtaacga 20040
 cctgcgggta gatggcgcca gcatcagttt cagcagcadc aacctctatg ctactttttt 20100
 ccccatggct cacaacaccg cttccaccct tgaagccatg ctgcggaatg acaccaatga 20160
 tcatgtattc aacgactacc tatctgcagc taacatgctc taccctattc ctgccaatgc 20220
 atccaatatt cceatttcca ttcttctctg caactgggcg gctttcagag gctgggtcatt 20280
 taccagactg aaaaccaaaag aaactccctc tttgggggtct ggatttgacc cctactttgt 20340
 ctattctggg tctattccct acctggatgg taccttctac ctgaaccaca cttttaagaa 20400
 ggtttccatc atgtttgact cttcagtgag ctggcctgga aatgacaggt tactatctcc 20460
 taacgaattt gaaataaagc gcactgtgga tggcgaaggc tacaacgtag cccaatgcaa 20520
 catgaccaa gactgggtct tggtagagat gctcgccaac tacaacatcg gctatcaggg 20580
 cttctacatt ccagaaggat acaagatcg catgtattca ttttccagaa acttccagcc 20640
 catgagcagg caggtgggtg atgaggtcaa ttacaaagac ttcaaggccg tcgccatacc 20700
 ctaccaacac aacaactctg gctttgtggg ttacatggct ccgaccatgc gccaaggcca 20760
 accctatccc gctaactatc cctatecact cattggaaca actgccgtaa atagtgttac 20820
 gcagaaaaag ttcttgtgtg acagaaccat gtggcgcata ccgttctcga gcaacttcat 20880
 gtctatgggg gcccttacag acttgggaca gaatatgctc tatgccaaact cagctcatgc 20940
 tctggacatg acctttgagg tggatcccat ggatgagccc accctgcttt atcttctctt 21000
 cgaagttttc gacgtgggtc gagtgcata gccacaccgc ggcacatcg aggcagtcta 21060
 cctgcgtaca ccgttctcgg ccggtaacgc taccacgtaa gaagcttctt gcttcttgca 21120
 aatagcagct gcaaccatgg cctgcggatc ccaaaaeggc tccagcggagc aagagctcag 21180
 agccattgtc caagacctgg gttgcggacc ctattttttg ggaacctacg ataagcgctt 21240
 cccgggggtc atggcccccg ataagctcgc ctgtgccatt gtaaatacgg ccggacgtga 21300
 gacgggggga gagcactggg tggctttcgg ttggaaccca cgttctaaca cctgtacatc 21360
 ttttgatcct tttggattct cggatgatcg tctcaaacag atttaccagt ttgaatatga 21420
 ggggtctctg cgccgcagcg ctcttgctac caaggaccgc tgtattacgc tggaaaaatc 21480
 taccagacc gtgcagggtc cccgttctgc cgctgcgga cttttctgct gcatgttctc 21540
 tcacgccttt gtgcactggc ctgaccgtcc catggacgga aaecccacca tgaaattgct 21600

aactggagtg ccaaacaaca tgcttcattc tcctaaagtc cagcccaccc tgtgtgacaa 21660
tcaaaaagca ctctaccatt ttcttaatac ccattcgccct tattttcgct cccatcgta 21720
acacatcgaa agggccactg cgttcgaccg tatggatgtt caataatgac tcatgtaaac 21780
aacgtgttca ataaacatca ctttattttt ttacatgtat caaggctctg cattacttat 21840
ttattttaca gtcgaatggg ttctgacgag aatcagaatg acccgaggc agtgatacgt 21900
tgcggaactg atacttgggt tgccacttga attcgggaat caccaacttg ggaaccggta 21960
tatcgggcag gatgtcactc cacagctttc tggtcagctg caaagctcca agcaggtcag 22020
gagccgaaat cttgaaatca caattaggac cagtgccttg agcgcgagag ttgcggtaca 22080
ccggattgca gcaactgaaac accatcagcg acggatgtct cagccttgcc agcacgggtg 22140
gatctgcaat catgcccaca tccagatctt cagcattggc aatgctgaac ggggtcatct 22200
tgcaggtctg cctacccatg gcgggcaccc aattaggctt gtggttgcaa tcgcagtga 22260
gggggatcag tatcatcttg gctgatcct gtctgattcc tggatacacg gctctcatga 22320
aagcatcata ttgcttgaaa gcctgctggg ctttactacc ctcggtataa aacatcccgc 22380
aggacctgct cgaaaactgg ttagctgcac agccggcatc attcacacag cagcgggcgt 22440
cattgttagc tatttgcacc acacttctgc cccagcgggt ttgggtgatt ttggttcgct 22500
cgggattctc ctttaaggct cgttgtccgt tctcgtggc cacatccatc tcgataatct 22560
gctccttctg aatcataata ttgcatgca ggcacttcag cttgccctca taatcattgc 22620
agccatgagg ccacaacgca cagcctgtac attcccaatt atggtggcg atctgagaaa 22680
aagaatgtat cattccctgc agaaatcttc ecacatcgt gctcagtgtc ttgtgactag 22740
tgaaagttaa ctggatgcct cgggtgctct cgtttacgta ctggtgacag atgcgcttgt 22800
attgttcgtg ttgctcaggc attagtttaa aagaggttct aagttcgta tccagcctgt 22860
acttctccat cagcagacac atcacttcca tgcttttctc ccaagcagac accaggggca 22920
agctaactcg attcttaaca gtgcaggcag cagctccttt agccagaggg tcatcttag 22980
cgatcttctc aatgcttctt ttgccatcct tctcaacgat gcgcacgggc gggtagctga 23040
aaccactgc tacaagttgc gcctcttctc tttcttcttc gctgtcttga ctgatgtctt 23100
gcatggggat atgtttggtc ttcctggct tctttttggg gggatcgga ggaggaggac 23160
tgtcgtccg ttccggagac agggaggatt gtgacgttc gctcaccatt accaactgac 23220
tgtcggtaga agaacctgac cccacacggc gacaggtgtt tctcttcggg ggcagaggtg 23280
gaggcgattg cgaagggtg eggtccgacc tggaggcg atgactggca gaacccttc 23340
cgcttcggg ggtgtgctcc ctgtggcggc cgcttaactg atttcttcg cggctggcca 23400
ttgtgttctc ctaggcagag aaacaacaga catggaaact cagccattgc tgtcaacatc 23460

gccacgagtg ccatcacatc tcgtcctcag cgacgaggaa aaggagcaga gcttaagcat 23520
 tccaccgccc agtcctgcca ccacctctac cctagaagat aaggaggctc acgcatctca 23580
 tgacatgcag aataaaaaag cgaaagagtc tgagacagac atcgagcaag acccgggcta 23640
 tgtgacaccg gtggaacacg aggaagagtt gaaacgcttt ctagagagag aggatgaaaa 23700
 ctgccccaaa caacgagcag ataactatca ccaagatgct ggaaataggg atcagaacac 23760
 cgactacctc atagggcttg acggggaaga cgcgctcctt aaacatctag caagacagtc 23820
 gctcatagtc aaggatgcat tattggacag aactgaagtg cccatcagtg tggaagagct 23880
 cagccgcgcc tacgagctta acctcttttc acctcgtact cccccaaac gtcagccaaa 23940
 cggcacctgc gagccaaatc ctcgcttaaa cttttatcca gcttttgctg tgccagaagt 24000
 actggctacc tatcacatct tttttaaaaa tcaaaaaatt ccagtctcct gccgcgctaa 24060
 tcgcaccgcg gccgatgccc tactcaatct gggacctggg tcacgcttac ctgatatagc 24120
 ttccttggaag gaggttccaa agatcttcga gggctctggg aataatgaga ctccggccgc 24180
 aatgctctg caaaaggag aaaatggcat ggatgagcat cacagcgttc tgggtggaatt 24240
 ggaaggcgat aatgccagac tcgcagtact caagcgaagc atcgaggtca cacacttcgc 24300
 atatcccgct gtcaacctgc cccctaaagt catgacggcg gtcatggacc agttactcat 24360
 taagcgcga agtccccctt cagaagacat gcatgaccca gatgcctgtg atgagggtaa 24420
 accagtggc agtgatgagc agetaacccg atggctgggc accgactctc ccagggattt 24480
 ggaagagcgt cgcaagctta tgatggccgt ggtgctgggt accgtagaac tagagtgtct 24540
 ccgacgtttc ttaccgatt cagaaatctt gcgcaaaact gaagagaatc tgcactacac 24600
 ttttagacac ggctttgtgc ggcaggcatg caagatatct aacgtggaac tcaccaacct 24660
 ggtttcctac atgggtattc tgcatgagaa tcgectagga caaagcgtgc tgcacagcac 24720
 cctgaagggg gaagcccgcc gtgattacat ccgcgattgt gtctatctgt acctgtgcca 24780
 cacgtggcaa accggcatgg gtgtatggca gcaatgttta gaagaacaga acttgaaaga 24840
 gcttgacaag ctcttacaga aatctcttaa ggttctgtgg acagggttcg acgagcgcac 24900
 cgtcgcttcc gacctggcag acctcatctt cccagagcgt ctcagggtta ctttgcgaaa 24960
 cggattgcct gactttatga gccagagcat gcttaacaat tttcgtctt tcctcctgga 25020
 acgtccggg atcctgccc ccacctgctg cgcactgcc tccgactttg tgcctctcac 25080
 ctaccgcgag tgcccccgcc cgctatggag tcaactgtac ctgttccgtc tggccaacta 25140
 tctctcctac cactcggatg tgatcgagga tgtgagcgga gacggcttgc tggagtgtca 25200
 ctgccgctgc aatctgtgca cgcgcccg gtccctagct tgcaaccccc agttgatgag 25260
 cgaaaccag ataataggca cttttgaatt gcaaggcccc agcagccaag gcgatgggtc 25320
 ttctcctggg caaagtttaa aactgacccc gggactgtgg acctccgcct acttgcgcaa 25380

gtttgctccg gaagattacc acccctatga aatcaagttc tatgaggacc aatcacagcc 25440
tccaaaggcc gaactttcgg cctgcgtcat caccagggg gcaattctgg cccaattgca 25500
agccatccaa aaatcccgcc aagaatttct actgaaaaag ggtaaggggg tctacctga 25560
ccccagacc ggcgaggaac tcaacacaag gttccctcag gatgtcccaa cgacgagaaa 25620
acaagaagtt gaagggtgag ccgcccggc cagaagatat ggaggaagat tgggacagtc 25680
aggcagagga ggcggaggag gacagtctgg aggacagtct ggaggaagac agtttgagg 25740
aggaaaacga ggaggcagag gaggtggaag aagtaaccgc cgacaaacag ttatcctcgg 25800
ctgaggagac aagcaacagc gctaccatct ccgctccgag tcgaggaacc cggcggcgtc 25860
ccagcagtag atgggacgag accggacgct tcccgaacct aaccagcgt tccaagaccg 25920
gtaagaagga tcggcagggg tacaagtcct ggcgggggca taagaatgcc atcatctcct 25980
gcttgcatga gtgcgggggc aacatatact tcacgcggcg ctacttgcta ttccaccatg 26040
gggtgaactt tccgcgcaat gttttgcatt actaccgtca cctccacagc ccctactata 26100
gccagcaaat cccggcagtc tcgacagata aagacagcgg cggcgacct caacagaaaa 26160
ccagcagcgg cagttagaaa atacacaaca agtcagcaa caggaggatt aaagattaca 26220
gccaacgagc cagcgcaaac ccgagagtta agaatcgga tctttccaac cctgtatgcc 26280
atcttccagc agagtcgggg tcaagagcag gaactgaaaa taaaaaacg atctctcgt 26340
tcgctcacca gaagttgttt gtatcacaag agcgaagatc aacttcagcg cactctcgag 26400
gacgccgagg ctctcttcaa caagtactgc gcgctgactc ttaaagagta ggcagcgacc 26460
gcgcttattc aaaaaaggcg ggaattacat catcctcgac atgagtaaag aaattcccac 26520
gccttacatg tggagttatc aaccccaaat gggattggcg gcaggcgct cccaggacta 26580
ctccaccgc atgaattggc tcagcgccgg gccttctatg atttctcgag ttaatgatat 26640
acgcgctac cgaaaccaa tacttttggg acagtcagct ctaceacca cgccccgcca 26700
acaccttaat cccagaaatt ggcccgccgc cctagtgtac caggaaagtc ccgctcccac 26760
cactgtatta ctctctcgag acgcccaggc cgaagtccaa atgactaatg cagggtcgca 26820
gttagctggc ggctccacc tatgtcgtca caggcctcgg cataatataa aacgcctgat 26880
gatcagaggc cgaggtatcc agtcaacga cgagtcggtg agctctccgc ttggtctacg 26940
accagacgga atctttcaga ttgccggctg cgggagatct tccttcacc ctcgtcaggc 27000
tggtctgact ttggaaagtt cgtcttcgca accccgctcg ggcggaatcg ggaccgttca 27060
atttgaggag gagtttactc cctctgtcta cttcaacccc ttctccggat ctctgggca 27120
ttaccgggac gagttcatac cgaacttcga cgcgattagc gagtcagtg acggctacga 27180
ttgatgtctg gtgacgggc tgagctatct cggctgcgac atctagacca ctgccggcg 27240

ttctgctgct ttgcccggga actcattgag ttcattctact tcgaactccc caaggatcac 27300
 cctcaagggtc cggcccacgg agtgcggatt tctatcgaag gcaaaataga ctctcgctg 27360
 caacgaattt tctcccagcg gcccgtgctg atcgagcgag accagggaaa caccacgggt 27420
 tccatctact gcatttgtaa tcaccccggg ttgcatgaaa gcctttgctg tcttatgtgt 27480
 actgagttaa ataaaaactg aatgaagact ctctacgga ctgccgcttc ttcaaccggg 27540
 attttacaac cagaagaacg aaacttttcc tgtcgtccag gactctgtta acttcacctt 27600
 tccrctcac aaactagaag ctcaacgact acaccgctt tccagaagca ttttccctac 27660
 taatactact ttcaaaaccg gaggtgagct ccaagggtctt cctacagaaa acccttgggg 27720
 ggaagcgggc cttgtagtgc taggaattct tgcgggtggg cttgtgatta ttctttgcta 27780
 cctatacaca ccttgcttca ctttcttagt ggtgttggg tattgggtta aaaaatggg 27840
 cccatactag tcttgcttgt tttactttcg cttttggaac cgggttctgc caattacgat 27900
 ccatgtctag acttcgaccc agaaaactgc acacttactt ttgcacccga cacaagccgc 27960
 atctgtggag ttcttattaa gtgcggatgg gaatgcagggt ccgttgaaat tacacacaat 28020
 aacaaaacct ggaacaatac cttatccacc acatgggagc caggagtcc cgagtggtag 28080
 actgtctctg tccgagggtc tgacgggtcc atccgcatta gtaacaacac tttcattttt 28140
 tctgaaatgt gcatctggc catgttcctg agcaaacagt attctctatg gcctctagc 28200
 aaggacaata tcgtaacgtt ctccattgct tattgcttgt gcgcttgctt tcttactgct 28260
 ttactgtgcg tatgcataca cctgcttcta accactcgca tcaaaaacgc caataacaaa 28320
 gaaaaaatgc cttaacctct ttctgtttac agacatggct tctcttacat ctctcatatt 28380
 tgtcagcatt gtcaetgccg ctcatggaca aacagtcgtc tctatccctc taggacataa 28440
 ttacactctc ataggacccc caatcacttc agaggctatc tggaccaaac tgggaagcgt 28500
 tgattacttt gatataatct gcaacaaaac aaaaccaata atagtaactt gcaacataca 28560
 aaatcttaca ttgattaatg tttagcaaagt ttacagcggg tactattatg gttatgacag 28620
 atacagtagt caatatagaa attacttggg tctgtttacc cagttgaaaa ccacgaaaat 28680
 gccaaatatg gcaaagattc gatccgatga caattctcta gaaactttta catctccac 28740
 cacaccgac gaaaaaaaca tcccagattc aatgattgca attgttgacg cgggtggcgt 28800
 ggtgatggca ctaataataa tatgcattgt tttatatgct tgtcgtaca aaaagtttca 28860
 tcctaaaaaa caagatctcc tactaagggt taacatttaa tttcttttta tacagccatg 28920
 gtttccacta ccacattcct tatgcttact agtctcgcaa ctctgacttc tgctcgtca 28980
 cacctcactg taactatagg ctcaaactgc aactaaaag gacctcaagg tggcatgtc 29040
 ttttggtgga gaatatatga caatggatgg ttacaaaac catgtgacca acctggtaga 29100
 ttttctgca acggcagaga cctaaccatt atcaacgtga cagcaaatga caaaggcttc 29160

tattatggaa ccgactataa aagtagttta gattataaca ttattgtact gccatctacc 29220
actccagcac cccgcacaac tactttctct agcagcagtg tcgctaaca tacaatttcc 29280
aatccaacct ttgccgcgt tttaaaacgc actgtgaata attctacaac ttcacatata 29340
acaatttcca cttaacaat cagcattatc gctgcagtga caattggaat atctatttct 29400
gtttttacca taacctacta cgcctgctgc tatagaaaag acaaacataa aggtgatcca 29460
ttacttagat ttgatattta atttgttctt tttttttta ttacagtat ggtgaacacc 29520
aatcatggtta cctagaaatt tcttcttcac catactcatt tgtgcattta atgtttgcgc 29580
tactttcaca gcagtagcca cagcaacccc agactgtata ggagcatttg cttcctatgc 29640
actttttgct tttgttactt gcatctgcgt atgtagcata gtctgcctgg ttattaattt 29700
ttccaactt atagactgga tcttgtgcg aattgcctac ctgcgccacc atcccgaata 29760
ccgcaacca aatatcgcg cacttcttag actcatctaa aaccatgcag gctatactac 29820
caatattttt gcttctattg cttccctacg ctgtctcaac ccagctgcc tatagtactc 29880
caccagaaca ccttagaaaa tgcaaatcc aaacaaccgtg gtcatttctt gcttgctatc 29940
gagaaaaatc agaatcccc ccaaatttaa taatgattgc tggataaatt aatataatct 30000
gttgccacct aatttcattt ttgatatacc ccctatttga ttttggtgg aatgctcca 30060
atgcacatga tcatccaca gaccagagg aacacattcc cctacaaaac atgcaacatc 30120
caatagcgt aatagattac gaaagtgaac cacaaccccc actatctctt gctattagtt 30180
acttcaacct aaccggcgga gatgactgaa acactcacca cctccaattc cgccgaggat 30240
ctgctcgata tggacggcgg cgtctcagaa cagcgactcg cccaactacg catccgccag 30300
cagcaggaac gcgcgcccaa agagctcaga gatgtcatcc aaattcacca atgcaaaaaa 30360
ggcatattct gtttggttaa acaagccaag atatcctacg agatcacgc tactgaccat 30420
cgctctctt acgaacttgg cccccaacga caaaaattta cctgcatggt gggaatcaac 30480
cccatagtta tcaccagca aagtggagat actaagggtt gcattcactg ctctgcgat 30540
tccatcgagt gcacctacac cctgctgaag accctatgcg gcctaagaga cctgctacca 30600
atgaattaaa aatgattaa taaaaaatca ctacttgaa atcagcaata aggtctctgt 30660
tgaaatttct tcccagcagc acctcactt cctcttcca actctggtat tctaaacccc 30720
gttcagcggc atactttctc catactttaa aggggatgtc aaattttagc tctctctctg 30780
taccacaat cttcatgtct ttcttcccag atgaccaaga gagtccggt cagtgactcc 30840
ttcaacctg tctacctta tgaagatgaa agcacctccc aacacccctt tataaaccca 30900
gggtttattt ccccaaatgg ettcacaca agcccaaacg gagttcttac tttaaaatgt 30960
ttaacccac taacaaccac aggcggatct ctacagctaa aagtgggagg gggacttaca 31020

gtggatgaca ccaacggttt ttgaaagaa aacataagt ccaccacacc actcggttaag 31080
 actggtcact ctatagggtt accactagga gccggattgg gaacgaatga aaataaactt 31140
 tgtatcaaat taggacaagg acttacattc aattcaaaca acatttgcac tgatgacaat 31200
 attaacacct tatggacagg agtcaacccc accgaagcca actgtcaaat catgaaactc 31260
 agtgaatcta atgattgcaa attaatctta acactagtta aaactggagc actagtcact 31320
 gcatttggtt atgttatagg agtatctaac aattttaata tgctaactac acacagaaat 31380
 ataaatttta ctgcagagct gtttttcgat tctactggta atttactaac tagactctca 31440
 tccctcaaaa ctccacttaa tcataaatca ggacaaaaca tggctactgg tgccattact 31500
 aatgctaaag gtttcatgcc cagcagcact gcctatcctt tcaatgataa ttctagagaa 31560
 aaagaaaact acatttacgg aacttggtac tacacagcta gtgatcgac tgcttttccc 31620
 attgacatat ctgtcatgct taaccgaaga gcaataaatg acgagacatc atattgtatt 31680
 cgtataactt ggtcctggaa cacaggagat gcccagagg tgcaaacctc tgctacaacc 31740
 ctagtcacct cccatttac cttttactac atcagagaag acgactgaca aataaagttt 31800
 aacttggtta ttgaaaatc aattcacaaa atccgagtag ttattttgcc tccccctcc 31860
 catttaacag aatcaccaa tctctccca cgcacagctt taaacatttg gataccatta 31920
 gatatagaca tggttttaga ttccacattc caaacagttt cagagcgagc caatctgggg 31980
 tcagtgatag ataaaaatcc atcgggatag tcttttaaag cgctttcaca gtccaactgc 32040
 tgcggatgcg aetccggagt ctggatcacg gtcatctgga agaagaacga tgggaatcat 32100
 aatccgaaaa eggatcggc cgattgtgtc tcatcaaacc cacaagcagc cgctgtctgc 32160
 gtcgctccgt gcgactgctg ttataggat caggggtccac agtgctctga agcatgattt 32220
 taatagccct taacatcaac tttctggtgc gatgcgcgca gcaacgcatt ctgatttcac 32280
 tcaaatcttt gcagtaggta caacacatta ttacaatatt gtttaataaa ccataattaa 32340
 aagcgtcca gccaaaactc atatctgata taatcgcccc tgcattgacca tcataccaaa 32400
 gtttaataa aattaaatga cgttccctca aaaacacact accacatac atgatctctt 32460
 ttggcatgtg catattaaca atctgtctgt accatggaca acgttggtta atcatgcaac 32520
 ccaatataac cttccggaac cacactgcc acaccgctcc ccagccatg cattgaagtg 32580
 aaccctgctg attacaatga caatgaagaa cccaattctc tcgaccgtga atcacttgag 32640
 aatgaaaaat atctatagt gcacaacata gacataaatg catgcatctt ctcataattt 32700
 ttaactctc aggattttaga aacatatccc agggaaatagg aagctcttgc agaacagtaa 32760
 agctggcaga acaaggaaga ccacgaacac aacttacact atgcatagtc atagtatcac 32820
 aatctggcaa cagcgggtgg tcttcagtca tagaagctcg ggtttcattt tctcacaac 32880
 gtggttaactg ggctctggtg taagggtgat gtctggcgca tgatgtcgag cgtgcgcgca 32940

accttgatcat aatggagttg cttcctgaca ttctcgtatt ttgtatagca aaacgcggcc 33000
 ctggcagaac acactcttct tcgccttcta tectgccgct tagcgtgttc cgtgtgatag 33060
 ttcaagtaca accacactct taagttgggtc aaaagaatgc tggcttcagt tgtaatcaaa 33120
 actccatcgc atctaactcgt tctgaggaaa tcatccacgg tagcatatgc aaatcccaac 33180
 caagcaatgc aactggattg tgtttcaagc aggagaggag aggaagaga cggaagaacc 33240
 atgttaattt ttattccaaa cgatctcgca gtacttcaaa ttgtagatcg cgcagatggc 33300
 atctctcgcc cccactgtgt tggtgaaaaa gcacagctag atcaaaagaa atgcgatttt 33360
 caagtgctc aacggtggct tccagcaag cctccacgcg cacatccaag aacaaaagaa 33420
 taccaaaaga aggagcattt tctaactcct caatcatcat attacattcc tgcaccattc 33480
 ccagataatt ttcagctttc cagccttgaa ttattcgtgt cagttcttgt ggtaaattcca 33540
 atccacat tacaacagg tcccgaggcg cgcctccac caccattctt aaacacaccc 33600
 tcataatgac aaaatatctt gctcctgtgt cacctgtagc gaattgagaa tggcaacatc 33660
 aattgacatg ccttggctc taagttcttc ttttaagttct agttgtaaaa actctctcat 33720
 attatcacc aactgcttag ccagaagccc cccgggaaca agagcagggg acgctacagt 33780
 gcagtacaag cgcagacctc cccaattggc tccagcaaaa acaagattgg aataagcata 33840
 ttgggaaccg ccagtaatat catcgaagtt gctggaaata taatcaggca gagtttcttg 33900
 taaaaattga ataaaagaaa aatttgccaa aaaaacattc aaacctctg ggatgcaaat 33960
 gcaataggtt accgcgctgc gctccaacat tgtagtttt gaattagtct gcaaaaataa 34020
 aaaaaaaac aagcgtcata tcatagttag ctgacgaaca gatggataaa tcagtcttc 34080
 catcacaaga caagccacag ggtctccagc tcgacctcg taaaacctgt catcatgatt 34140
 aaacaacagc accgaaagtt cctcgcgggtg accagcatga ataattcttg atgaagcata 34200
 caatccagac atgttagcat cagttaacga gaaaaaacag ccaacatagc ctttgggtat 34260
 aattatgctt aatcgtaagt atagcaaac caccctcgc ggatacaaa taaaaggcac 34320
 aggagaataa aaaatataat tatttctctg ctgctgttca ggcaacgtcg ccccggtcc 34380
 ctctaaatac acatacaaag cctcatcagc catggcttac cagacaaagt acagcgggca 34440
 cacaagcac aagctctaaa gtgactctcc aacctctcca caatatatat atacacaagc 34500
 cctaaactga cgtaatggga gtaaagtga aaaaatcccc ccaaaccac cacacacccc 34560
 gaaactgcgt caccagggaa aagtacagtt tcacttccgc aatccaaca ggcgtaactt 34620
 cctcttctc acggtacgtg atatccact aacttgcaac gtcattttcc cagggtcgca 34680
 ccgccccctt tagccgttaa cccacagcc aatcaccaca cgatccacac tttttaaatt 34740
 cacctcattt acatattggc accattccat ctataaggta tattatatag atag 34794

<210> 3
 <211> 5287
 <212> DNA
 <213> Adenovirus

<400> 3

```

ctatggcatc tcgatccagc agacctctc gtttcgcggg tttggacggc tcctggaata 60
gggtatgaga cgatgggcgt ccagcgctgc cagggttcgg tccttccagg gtctcagtgt 120
tcgagtcagg gttgtttccg tcacagtga ggggtgtgcg cctgcttggg cgcttgccag 180
gggtgcgcttc agactcatcc tgctggtcga aaactttctgt cgcttggcgc cctgtatgtc 240
ggccaagtag cagtttacca tgagttcgta gttgagcgcc tcggctgcgt ggcctttggc 300
gcggagetta cctttggaag ttttcttgca taccgggcag tataggcatt tcagcgcata 360
caacttgggc gcaaggaaaa cggattctgg ggagtatgca tctgcgccgc agggaggcga 420
aacagtttca cattccacca gccaggttaa atccggttca ttggggtaaa aaacaagttt 480
tccgccatat tttttgatgc gtttcttacc tttggtctcc atgagttcgt gtcctcgttg 540
agtgacaaac aggtgttccg tgtccccgta gactgatttt acagacctct tctccagtgg 600
agtgcctcgg tcttcttctgt acaggaactc tgaccactct gatacaaagg cgcgcgtcca 660
ggccagcaca aaggaggcta tgtgggaggg gtagcgatcg ttgtcaacca gggggtccac 720
cttttccaaa gtatgcaaac acatgtcacc ctcttcaaca tccaggaatg tgattggcct 780
gtaggtgtat ttcacgtgac ctgggggtccc cgctgggggg gtataaaagg gggcggttct 840
ttgctcttcc tcactgtctt ccggatcgct gtccaggaac gtcagctgtt ggggtaggta 900
ttccctctcg aaggcgggca tgacctctgc actcaggttg tcagtttcta agaacgagga 960
ggatttgata ttgacagtgc cggttgagat gcctttcatg aggttttctg ccatctggtc 1020
agaaaacaca atttttttat tgtcaagttt ggtggcaaat gatccataca gggcggttga 1080
taaaagtttg gcaatggatc gcatggtttg gttcttttcc ttgtccgcgc gctctttggc 1140
ggcgaagtgg agttggacat actcgcgtgc caggcacttc cattcgggga agatagttgt 1200
taattcatct ggcacgattc tcaattgcca ccctcgatta tgcaaggtaa ttaaatccac 1260
actggtggcc acctgcctc gaaggggttc attggtcaa cagagcctac ctcctttcct 1320
agaacagaaa gggggaagtg ggtctagcat aagttcatcg ggagggtctg catccatggt 1380
aaagattccc ggaagtaaat ctttatcaaa atagctgatg ggagtggggt catctaaggc 1440
catttgccat tctcgagctg ccagtgcgcg ctcatatggg ttaaggggac tgcccatgg 1500
catgggatgg gtgagtgcag aggcatacat gccacagatg tcatagacgt agatgggatc 1560
ctcaaagatg cctatgtagg ttggatagca tcgccccct ctgatacttg ctcgcacata 1620
gtcatatagt tcatgtgatg gcgctagcag ccccgaccc aagttggtgc gattgggttt 1680

```

ttctgttctg tagacgatct ggcgaaagat ggcgtgagaa ttggaagaga tgggtgggtct 1740
ttgaaaaatg ttgaaatggg catgaggtag acctacagag tctctgacaa agtgggcata 1800
agattcttga agcttgggta ccagttcggc ggtgacaagt acgtctaggg cgcagtagtc 1860
aagtgtttct tgaatgatgt cataacctgg ttggtttttc ttttcccaca gttcgcgggt 1920
gagaaggtat tcttcgcgat ccttccagta ctcttctagc ggaaacctgt ctttgtctgc 1980
acggtaagat cctagcatgt agaactgatt aactgccttg taagggcagc agcccttctc 2040
tacgggtaga gagtatgctt gagcagcttt tcgtagcgaa gcgtagtaa gggcaaaggt 2100
gtctctgacc atgactttga ggaattggta tttgaagtcg atgtcgtcac aggtctccctg 2160
ttcccagagt tggaaagtcta cccgtttctt gtaggcgggg ttgggcaaag cgaaagtaac 2220
atcattgaag agaactttgc cggccctggg catgaaattg cgagtgatgc gaaaaggctg 2280
tggtaacttc gctcgggttat tgataacctg ggcagctagg acgatctcgt cgaaacctgt 2340
gatgttgtgt cctacgatgt ataattctat gaaacgcggc gtgcctctga cgtgaggtag 2400
cttactgagc tcatcaaagg ttaggtctgt ggggtcagat aaggcgtagt gttcgagagc 2460
ccattcgtgc aggtgaggat tcgctttaag gaaggaggac cagaggcca ctgccagtgc 2520
tgtttgtaac tggccccgt actgacgaaa atgcctccg actgccattt tttctgggg 2580
gacgcaatag aaggtttggg ggtcctgccc ccagcgatcc cacttgagtt ttatggcgag 2640
gtcatagggc atgttgacga gccgctggtc tcagagagt tcatgacca gcatgaaggg 2700
gattagctgc ttgcaaagg accccatcca ggtgtaggt tccacatcgt aggtgagaaa 2760
gagcctttct gtgcgaggat gagagccaat cgggaagaac tggatctcct gccaccagt 2820
ggaggaatgg ctgttgatgt gatggaagta gaactccctg cgacgcggc agcattcatg 2880
cttgtgcttg tacagacggc cgcagtagtc gcagcgttg acgggttgta tctcgtgaat 2940
gagttgtacc tggcttccct tgacgagaaa tttcagtggg aagccgaggc ctggcgattg 3000
tatctcgtgc tttactatgt tgtctgcac gccctgttca tcttctgtct cgatggtgg 3060
catgctgacg agccctcgcg ggaggcaagt ccagacctc gcgcggcagg ggcggagctc 3120
gaggacgaga gcgcgcaggc tggagctgtc cagggtcctg agacgctgc gactcaggt 3180
agtaggcagt gtcaggagat taacttgcg gatcttttg agggcgtgag ggaggttcag 3240
atagtacttg atctcaacgg gtccgttggt ggagatgtcg atggcttgca gggttccgtg 3300
tcccttgggc gctaccaccg tgcccttggt tttcattttg gacggcgggt gctctgttg 3360
ttcttgcatg tttagaagcg gtgtcgaggg cgcgcaccgg gcggcagggg cggctcggga 3420
cccggcggca tggctggcag tggtagtcg gcgcgcgcg cgggtagggt ctggtactgc 3480
gccctgagaa gactcgcag cgcgacgac cggcggttga catcctggat ctgacgcctc 3540
tgggtgaaag ctaccggccc cgtgagcttg aacctgaaag agagttcaac agaataatc 3600

tcggtatcgt tgacggcggc ttgcctaagg atttcttgca cgtcaccaga gttgtcctgg 3660
 taggcgatct ccgccatgaa ctgctcgatc tcttctcttt gaagatctcc gcggcccgt 3720
 ctctcgacgg tggccgcgag gtcgttgag atgcgccaa tgagttgaga gaatgcattc 3780
 atgcccgcct cgttccagac gcggtgttag accacggccc ccacgggatc tctcgcgcc--- 3840
 atgaccacct gggcgagggt gagctccacg tggcgggtga agaccgcata gttgcatagg 3900
 cgctggaaaa ggtagttgag tgtggtggcg atgtgctcgg tgacgaagaa atacatgatc 3960
 catcgtctca gcggcatctc gctgacatcg cccagagctt ccaagcgctc catggcctcg 4020
 tagaagtcca cggcaaaatt aaaaaactgg gagtttcgcg cggacacggt caactcctct 4080
 tccagaagac ggataagttc ggcgatggtg gtgcgcacct cgcgctcgaa agcccctggg 4140
 atttcttctt caatctcttc ttcttccact aacatctctt cctcttcagg tggggctgca 4200
 ggaggagggg gaacgcggcg acgccggcg cgcacgggca gacggtcgat gaatctttca 4260
 atgacctctc cgcggcggcg gcgcattggt tcagtgcagg cgcggccgtt ctcgcgcggt 4320
 cgcagagtaa aaacaccgcc gcgcattctc ttaaagtggg gactgggagg ttctcegttt 4380
 gggagggaga gggcgctgat tatacattt attaattggc ccgtagggac tgcacgcaga 4440
 gatctgatcg tgtcaagatc cacgggatct gaaaaccttt cgacgaaagc gtctaaccag 4500
 tcacagtcac aaggtaggct gagtacggct tcttggtggc gggggtggtt atgtgttcgg 4560
 tctgggtctt ctgtttcttc ttcatctcgg gaagggtgaga cgatgctgct ggtgatgaaa 4620
 ttaaagtagg cagttctaag acggcggatg gtggcgagga gcaccaggtc tttgggtccg 4680
 gcttgetgga tacgcaggcg attggccatt cccaagcat tatectgaca tctagcaaga 4740
 tctttgtagt agtcttgcac gagccgttct acgggcactt cttctcacc cgttctgcca 4800
 tgcatacgtg tgagtccaaa tccgcgcatt ggttgtagca gtgccaagtc agctacgact 4860
 ctttcggcga ggatggcttg ctgtacttgg gtaagggtgg cttgaaagtc atcaaaatcc 4920
 acaaagcggg ggtaagctcc tgtattaatg gtgtaagcac agttggccat gactgaccag 4980
 ttaactgtct ggtgaccagg gcgcacgagc tcggtgtatt taaggcgcga ataggcgcgg 5040
 gtgtcaaaga tgtaatcgtt gcaggtgccc accagatact ggtaccctat aagaaaatgc 5100
 ggcggtggtt ggcggtagag aggccatcgt tctgtagctg gagegccagg ggcgaggtct 5160
 tccaacataa ggcggtgata gccgtagatg tacctggaca tccaggtgat tcctgcggcg 5220
 gtagtagaag cccgaggaaa ctcgcgtacg cggttccaaa tgttgcttag cggcatgaag 5280
 tagttca 5287

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 4

gggagtttcg cgcggacacg g

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 5

gcgccgccgc cgcggagagg t

21

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 6

cgagagccca ttcgtgcagg tgag

24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 7

gctgcgacta ctgcggccgt ctgt

24

<210> 8

<211> 4195

<212> DNA

<213> Adenovirus

<400> 8

tcataagact ctcgtccatc tggtcagaaa acacaatctt cttgttgtcc agcttgggtgg 60

caaatgatcc atagagggca ttggatagaa gcttggcgat ggagcgcag gtttggttct 120

tttccttgtc cgcgcgctcc ttggcgggtga tgttaagctg gacgtactcg cgcgccacac 180

atttccattc aggaaagatg gttgtcagtt catccggaac tattctgatt cgccatcccc 240

tattgtgcag gggtatcaga tccacactgg tggccacctc gcctcggagg ggctcattgg 300

tccagcagag tcgacctctt tttcttgaac agaaaggggg gaggggggtct agcatgaact 360

catcaggggg	gtccgcatct	atggtaaata	ttcccggtag	caaatctttg	tcaaaatagc	420
tgatggtggc	gggatcatcc	aaggatcatct	gccattctcg	aactgccagc	gcgcgctcat	480
aggggttaag	aggggtgccc	cagggcatgg	ggtgggtgag	cgcgaggga	tacatgccac	540
agatatcgt	gacatagagg	ggctcttcga	ggatgccgat	gtaagtggga	taacatcgcc	600
cccctctgat	gcttgctcgc	acatagtcac	agagttcatg	tgagggggca	agaagacccg	660
ggcccagatt	ggtgcggtg	ggtttttccg	ccctgtaaac	gatctggcga	aagatggcat	720
gggaattgga	agagatagta	ggtctctgga	atatgttaaa	atgggcatga	ggtaagccta	780
cagagtccct	tatgaagtgg	gcatatgact	cttgacgctt	ggctaccagc	tcggcggtga	840
tgagtacatc	cagggcacag	tagtcgagag	tttcctggat	gatgtcataa	cgcggttggc	900
ttttcttttc	ccacagctcg	cggttgagaa	ggtattcttc	gtgatccttc	cagtactctt	960
cgaggggaaa	cccgtctttt	tctgcacggg	aagagcccaa	catgtagaac	tgattgactg	1020
ccttgtaggg	acagcatccc	ttctccactg	ggagagagta	tgcttgggct	gcattgcgca	1080
gcgaggtatg	agtgagggca	aaagtgtccc	tgaccatgac	tttgaggaat	tgatacttga	1140
agtcgatgtc	atcacaggcc	ccctgttccc	agagttggaa	gtccacccgc	ttcttgtagg	1200
cgggggttggg	caaagcgaaa	gtaacatcat	tgaagaggat	cttgccggcc	ctgggcatga	1260
aatttcgggt	gattttgaaa	ggctgaggaa	cctctgctcg	gttattgata	acctgagcgg	1320
ccaagacgat	ctcatcaaag	ccattgatgt	tgtgccccac	tatgtacagt	tctaagaatc	1380
gaggggtgcc	cctgacatga	ggcagcttct	tgagttcttc	aaaagtgaga	tctgtagggg	1440
cagtgaagac	atagtgttcg	agggcccat	cgtgcacgtg	agggttcgct	ttaaggaagg	1500
aggaccagag	gtccactgcc	agtgtgtttt	gtaactgggt	ccggtactga	cgaaaatgct	1560
gtccgactgc	catcttttct	ggggtgacgc	aatagaagg	ttgggggtcc	tgccgccagc	1620
gatccactt	gagttttatg	gcgaggtcat	agggcatgtt	gacgagccgc	tggtctccag	1680
agagtttcat	gaccagcatg	aaggggatta	gctgcttgcc	aaaggacccc	atccaggtgt	1740
aggtttccac	atcgtaggtg	agaaagagcc	tttctgtgcg	aggatgagag	ccaatcgggg	1800
agaactggat	ctcctgccac	cagttggagg	aatggctgtt	gatgtgatgg	aagtagaact	1860
ccctgcgacg	cgccgagcat	tcatgcttgt	gcttgtacag	acggccgcag	tactcgcagc	1920
gattcacggg	atgcacctta	tgaatgagtt	gtacctgact	tcctttgacg	agaaatttca	1980
gtggaaaatt	gaggcctggc	gcttgtacct	cgcgctttac	tatgttgtct	gcacggcat	2040
gaccatcttc	tgtctcgatg	gtggtcatgc	tgacgagccc	tcgcgggagg	caagtccaga	2100
cctcggcgcg	gcaggggagg	agctcgagga	cgagagcgcg	caggccggag	ctgtccaggg	2160
tcctgagacg	ctgcggagtc	aggttagtag	gcagtgtcag	gagattaact	tgcatgatct	2220
tttgaggggc	gtgagggagg	ttcagatagt	acttgatctc	aacgggtccg	ttggtggaga	2280

tgtcgaatggc ttgcaggggt ccgtgtccct tgggcgctac caccgtgccc ttgtttttca 2340
ttttggacgg cgggtggctct gttgcttctt gcatgttttag aagcgggtgtc gagggcgcg 2400
accggggcggc agggggcggct cgggacccgg cggcatggct ggcaagtggta cgtcggcgcc 2460
gcgcgcgggt aggttctggg actgcgccct gagaagactc gcatgcgcga cgacgcggcg 2520
gttgacatcc tggatctgac gcctctgggt gaaagctacc ggccccgtga gcttgaacct 2580
gaaagagagt tcaacagaat caatctcggg atcgttgacg gcggcttgcc taaggatttc 2640
ttgcacgtcg ccagagttgt cctggtaggc gatctcgcc atgaactgct cgatctcttc 2700
ctcttgaaga tctccgcggc ccgtctcttc gacgggtggc gcgaggtcgt tggagatgcg 2760
cccaatgagt tgagagaatg cattcatgcc cgcctcgttc cagacgcggc tntagaccac 2820
agcccccacg ggatctctcg cgcgcatgac cacctgggcg aggttgagct ccacgtggcg 2880
ggtgaagacc gcatagttgc ataggcgctg gaaaggttag ttgagtgtgg tggcgatgtg 2940
ctcggtgacg aagaaataca tgatccatcg tctcagcggc atctcgtga catcgcccag 3000
cgcttccaag cgctccatgg cctcgtagaa gtccacggca aagttaaaaa actgggagtt 3060
acgcgcggac acggtcaact cctcttccag aagacggata agttcggcga tgggtggtcg 3120
cacctcgcgc tcgaaagccc ctgggatttc ttctcaatc tcttcttctt cactaacat 3180
ctcttctctt tcaggtgggg ctgcaggagg agggggaacg cggcgacgcc ggcggcgcac 3240
gggcagacgg tcgatgaatc tttcaatgac ctctccgcgg cggcggcgca tgggtctcgt 3300
gacggcacga ccgttctccc tgggtctcag agtgaagacg cctccgcgca tctccctgaa 3360
gtggtgactg ggaggctctc cgttgggcag ggacaccgcg ctgattatgc attttatcaa 3420
ttgccccgta ggtactccgc gcaaggacct gatcgtctca agatccacgg gatctgaaaa 3480
cctttcgcgc aaagcgtcta accagtcgca atcgcaagggt aggctgagca ctgtttcttg 3540
cgggcggggg cggctagacg ctcggtcggg gttctctctt tcttctctt cctcctcttg 3600
ggaggggtgag acgatgctgc tgggtgatgaa attaaaatag gcagttttga gacggcggat 3660
ggtggcgagg agcaccagggt ctttgggtcc ggcttggttg atacgcaggc gatgagccat 3720
tccccaaagca ttatcctgac atctggccag atctttatag tagtcttgca tgagtcgttc 3780
cacgggcact tcttcttcgc ccgctctgcc atgcatgcga gtgatcccga acccgcgcat 3840
gggctggaca agtgccagggt ccgtacaac ctttcggcg aggatggctt gctgcacctg 3900
ggtgaggggtg gcttggaagt cgtcaaagtc cacgaagcgg tggtagggcc cgggtgtgat 3960
tgtgtaggag cagttggcca tgaatgacca gttgactgtc tggtgcccag ggcgcacgag 4020
ctcgggtgtac ttgagggcg agtatgcgcg ggtgtcaaag atgtaatcgt tgcaggtgcg 4080
caccaggtac tggtagccaa tgagaaagtg tggcggtggc tggcggtaca ggggccatcg 4140

WO 2005/118825

PCT/US2005/018301

ctctgtagcc ggggctccgg gggcgaggtc ttccagcatg aggcggtggt agccg

4195

- (12) **Publicación de la solicitud internacional bajo PCT**
 (19) **Organización Mundial de Propiedad Intelectual**
Oficina Internacional
 (43) **Fecha de publicación internacional : 15 de diciembre de 2005 (15.12.2005)**
 (10) **Número de publicación internacional: WO 2005/118825 A2**
-
- (51) **Clasificación Internacional de patentes: C12N 15/861, 7/01, 7/02, A61K 48/00**
 (21) **Número de solicitud internacional: PCT/US2005/018301**
 (22) **Fecha de presentación internacional: 24 de mayo de 2005 (24.05.2005)**
 (25) **Idioma de la presentación: inglés**
 (26) **Idioma de la publicación: inglés**
 (30) **Antecedentes de prioridad:**
 60/574,851 del 28 de mayo de 2004 (28.05.2004) US
 (71) **Solicitante (para todos los estados designados con excepción de US): SCHERING**
AKTIENGESSELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, 13353 Berlin (DE).
 (72) **Inventores; y**
 (75) **Inventor/Solicitante (solamente para US): HARDEN, Paul [US/US]; 879 Larkspur CT,**
Brentwood, CA 94513 (US). HERMISTON, Terry [US/US]; 9 Seamast Passage, Corte
Madera, CA 94925 (US). KUHN, Irene [US/US]; 5847 San Jose Avenue, Richmond, CA
94804 (USA).
 (81) **Estados designados (en la medida en que no se indique lo contrario, para cada tipo de**
protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.
 (84) **Estados designados (en la medida en que no se indique lo contrario, para cada tipo de**
protección regional disponible): Patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
Patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS,
IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- **sin el Informe de búsqueda internacional y será repúblicado luego de recibir dicho Informe**

Véanse las explicaciones („Guidance Notes on Codes an Abbreviations“) al comienzo de cada edición regular de la Gaceta-PCT para la explicación del código de dos dígitos y de las otras abreviaturas

(54) Título: ADENOVIRUS QUIMÉRICOS PARA USO EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

(57) Resumen

La presente invención se refiere a adenovirus oncolíticos con aplicaciones terapéuticas. Se proveen adenovirus quiméricos recombinantes y métodos para producirlos. Los adenovirus quiméricos de la invención comprenden secuencias de ácido nucleico derivadas de los serotipos adenovirales clasificados en los subgrupos B a F y presentan un índice terapéutico mejorado.

WO 2005/118825

PCT/US2005/018301

ADENOVIRUS QUIMÉRICOS PARA USO EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Esta solicitud reivindica los beneficios de la Solici-
5 tud Provisoria US N° de serie 60/574,851, presentada el 26
de mayo de 2004, la que es incorporada como referencia en la
presente.

CAMPO DE LA INVENCION

La invención descrita en la presente se relaciona en
10 general con el campo de la biología molecular y, más especí-
ficamente, con adenovirus oncolíticos que poseen aplicacio-
nes terapéuticas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer es una de las principales causas de muerte en
15 los EE.UU. y en el mundo. Según el tipo de cáncer, el trata-
miento consiste típicamente de cirugía, quimioterapia y/o
radiación. Estos tratamientos a menudo fracasan, y resulta
clara la necesidad de nuevas terapias que se podrán utilizar
solas o en combinación con las técnicas clásicas.

20 Un enfoque ha comprendido el uso de adenovirus, ya sea
solos o como vectores capaces de distribuir proteínas tera-
péuticas anticancerosas entre las células tumorales. Los
adenovirus son virus a ADN de cadena doble icosaédricos sin
envoltura con un genoma lineal de 36 pares de kilobases
25 aproximadamente. Cada extremo del genoma viral contiene una

secuencia corta, conocida como repetición terminal invertida (o ITR), que es necesaria para la replicación viral. Todos los genomas de adenovirus humanos examinados hasta la fecha presentan la misma organización general; es decir, los genes
5 que codifican funciones específicas están ubicados en la misma posición en el genoma viral. Dicho genoma viral contiene cinco unidades de transcripción tempranas (E1A, E1B, E2, E3 y E4), dos unidades tempranas tardías (IX e Iva2) y una unidad tardía (tardía principal) que es procesada para
10 generar cinco familias de ARNm tardíos (L1-L5). Las proteínas codificadas por los genes tempranos están comprometidas en la replicación, en tanto los genes tardíos codifican proteínas estructurales virales. Las porciones del genoma viral pueden ser sustituidas fácilmente por ADN de origen extraño
15 y los adenovirus recombinantes son estructuralmente estables, siendo estas propiedades las que permiten que estos virus sean de potencial utilidad para una terapia genética (véase Jolly, D. (1994) *Cancer Gene Therapy* 1: 51-64).

Actualmente, los esfuerzos de los investigadores para
20 producir una terapia adenoviral de utilidad clínica se han centrado en el serotipo adenoviral, Ad5. La genética de este adenovirus humano está bien caracterizada y hay sistemas bien descritos para su manipulación molecular. Se han desarrollado métodos de producción a gran escala para sustentar
25 las aplicaciones clínicas y ya existe alguna experiencia

clínica con el agente. Véase, Jolly, D. (1994) *Cancer Gene Therapy*, 1: 51-64. La investigación relacionada con el uso de adenovirus humanos (Ad) en el tratamiento del cáncer se ha centrado en el desarrollo de los adenovirus basados en
5 Ad5 que presentan una mayor potencia, o están dirigidos preferencialmente, contra tipos de células tumorales específicos y persiste la necesidad de generar virus oncolíticos más potentes si la terapia adenoviral pueda llegar a ser de aplicación práctica en un ensayo clínico.

10 El Ad5 es tan solo uno de los 51 serotipos adenovirales conocidos actualmente, que se clasifican en los subgrupos A-F basado en diversos atributos incluyendo sus propiedades de hemaglutinación ((véase, Shenk, "Adenoviridae: The Viruses and Their Replication," en *Fields Virology*, Vol. 2, Cuarta
15 Edición, Knipe, ea., Lippincott, Williams & Wilkins, págs. 2265-2267 (2001)). Estos serotipos difieren en varios niveles, por ejemplo en cuanto a patología en humanos y roedores, en los receptores celulares usados para su unión, pero estas diferencias fueron ignoradas por mucho tiempo como un
20 medio potencial para desarrollar adenovirus oncolíticos más potentes (con la excepción de las alteraciones de las fibras, véase Stevenson et al. (1997) *J. Virol.* 71: 4782-4790; Krasnykh et al. (1996) *J. Virol.* 70: 6839-6846; Wickham et al. (1997) *J. Virol.* 71: 8221-8229; Legrand et al. (2002)
25 *Curr. Gene Ther.* 2: 323-329; Barnett et al. (2002) *Biochim.*

Biophys. Acta 1-3: 1-14; Solicitud de Patente de EE.UU. N°: 2003/0017138).

La explotación de las diferencias entre los serotipos adenovirales puede proveer una fuente de productos terapéuticos basados en adenovirus más eficaces, usando nuevos adenovirus con mayor selectividad y potencia. Persiste la necesidad de tales terapias mejoradas basadas en adenovirus.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención provee nuevos adenovirus quiméricos, o variantes o derivados de los mismos, que son de utilidad para una terapia basada en virus. En particular, la invención provee adenovirus quiméricos, o variantes o derivados de los mismos, que poseen un genoma que comprende una región E2B

en el que dicha región E2B comprende una secuencia de ácido nucleico derivada de un primer serotipo adenoviral y una secuencia de ácido nucleico derivada de un segundo serotipo adenoviral;

en el que dichos primer y segundo serotipos adenovirales se seleccionan cada uno entre los subgrupos adenovirales B, C, D, E o F y son distintos entre sí; y

en el que dicho adenovirus quimérico es oncolítico y presenta un índice terapéutico mejorado para una célula tumoral.

En una realización, el adenovirus quimérico comprende

además regiones que codifican proteínas de fibras, hexones y pentones, donde los ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas provienen todos del mismo serotipo adenoviral. En otra realización, el adenovirus quimérico de la invención
5 comprende una región E3 o E4 modificada.

En otra realización, el adenovirus quimérico presenta un índice terapéutico mejorado en una célula tumoral de colon, mama, páncreas, pulmón, próstata, ovario o hematopoyéticas. En una realización particularmente preferida, el adenovirus quimérico presenta un índice terapéutico mejorado en
10 células tumorales de colon.

En una realización preferida, la región E2B del adenovirus quimérico comprende la SEQ ID N°: 3. En una realización particularmente preferida, el adenovirus quimérico comprende la SEQ ID N°: 1.
15

La presente invención provee un adenovirus quimérico recombinante, o una variante o derivado del mismo, que posee un genoma que comprende una región E2B

donde dicha región E2B comprende una secuencia de ácido nucleico derivada de un primer serotipo adenoviral y un segundo ácido nucleico derivado de un segundo serotipo adenoviral;
20

donde dichos primer y segundo serotipos adenovirales se seleccionan cada uno entre los subgrupos adenovirales B, C, D, E o F y son distintos entre sí;
25

donde dicho adenovirus quimérico es oncolítico y presenta un índice terapéutico mejorado para la célula tumoral; y

donde dicho adenovirus quimérico se ha vuelto deficiente para la replicación a través de la supresión de una o más regiones adenovirales que codifican proteínas comprometidas en la replicación adenoviral seleccionadas del grupo formado por E1, E2, E3 o E4.

En una realización, el adenovirus quimérico de la invención comprende además un gen heterólogo que codifica una proteína terapéutica, donde dicho gen heterólogo se expresa dentro de una célula infectada con dicho adenovirus. En una realización preferida, la proteína terapéutica se selecciona del grupo formado por citoquinas y quimioquinas, anticuerpos, enzimas convertidoras de prodrogas y proteínas inmunoregulatoras.

La presente invención provee métodos para usar los adenovirus quiméricos de la invención con fines terapéuticos. En una realización, los adenovirus quiméricos se pueden usar para inhibir el crecimiento de células cancerosas. En una realización particular, el adenovirus quimérico que comprende la SEQ ID N°: 1 es de utilidad para inhibir el crecimiento de células cancerosas de colon.

En otra realización, los adenovirus de la invención son de utilidad como vectores para distribuir proteínas terapéu-

ticas en células.

La presente invención provee un método para producir los adenovirus quiméricos de la invención, donde dicho método comprende

- 5 a) agrupar los serotipos adenovirales que representan los subgrupos adenovirales B-F, creando así una mezcla adenoviral;
- b) someter la mezcla de adenovirus agrupados del paso (a) a pasajes sobre un cultivo de células tumorales en crecimiento activo a una relación de partícula por célula su-
10 ficientemente alta como para promover la recombinación entre serotipos, pero no tan alta como para producir una muerte celular prematura;
- c) cosechar el sobrenadante del paso (b);
- 15 d) infectar un cultivo quiescente de células tumorales con el sobrenadante cosechado en el paso (c);
- e) cosechar el sobrenadante del cultivo celular del paso (d) antes de la aparición de algún signo de CPE;
- f) infectar un cultivo quiescente de células tumorales con
20 el sobrenadante cosechado en el paso (e); y
- g) aislar el adenovirus quimérico del sobrenadante cosechado en el paso (f) por purificación en placa.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

Figura 1. Perfiles de los tiempos de retención de Ad
25 sobre una columna de HPLC TMAE. A) Perfiles de retención pa-

ra los serotipos individuales de Ad que se usaron para generar la agrupación viral inicial original. B) Perfiles de retención de agrupaciones del pasaje 20 derivadas de las líneas celulares HT-29, Panc-1, MDA-231 y PC-3, respectivamente.

Figura 2. Actividad citolítica de las agrupaciones de virus individuales. Se infectaron células A) HT-29, B) MDA-231, C) Panc-1 y D) PC-3 con las respectivas agrupaciones virales a relaciones de VP por célula entre 100 y 0,01. Se llevaron a cabo ensayos MTS en distintos días después de la infección (indicados en cada caso) según la línea celular. Cada dato en el panel representa un ensayo efectuado por cuadruplicado y los resultados se expresan como la media $\pm$ DE. El panel muestra un experimento representativo y todas las agrupaciones virales fueron evaluadas al menos tres veces independientes entre sí con la línea de células tumorales blanco (Leyenda de la figura: —●— Ad5; —|— agrupación viral inicial; —■— agrupación derivada de células específicas, pasaje 20).

Figura 3. Actividad citolítica de ColoAd1 y Ad5 sobre líneas de células tumorales humanas. Se llevó a cabo un ensayo MTS con A) un panel general de líneas de células tumorales humanas y B) un panel de líneas celulares de cáncer de colon humano para determinar la especificidad de la potencia potencial. El ensayo MTS se realizó en diferentes días según

la línea celular. Cada panel es un experimento representativo que se repitió al menos tres veces. Cada dato en el panel representa un ensayo realizado por cuadruplicado y los resultados se expresan como la media $\pm$ DE (Leyenda de la figura: —●— Ad5; —▼— ColoAd1).

Figura 4. Actividad citolítica de ColoAd1 y Ad5 con un panel de células normales. Se infectaron células HS-27, HUVEC y SAEC (fibroblastos primarios, células endoteliales y epiteliales, respectivamente) con ColoAd1 y Ad5 a relaciones de VP por célula entre 100 y 0,01. El ensayo MTS se realizó en distintos días después de la infección según la célula y cada panel es un experimento representativo que se repitió al menos tres veces. Cada dato en el panel representa un ensayo realizado por cuadruplicado y los resultados se expresan como la media $\pm$ DE (Leyenda de la figura: —●— Ad5; —▼— ColoAd1).

Figura 5. Actividad citolítica de ColoAd1, Ad5 y ONYX-015 con células endoteliales normales primarias (HUVEC) y una línea de células tumorales de colon (HT-29). Cada panel es un experimento representativo que se repitió al menos tres veces. Cada dato en el panel representa un ensayo realizado por cuadruplicado y los resultados se expresan como la media $\pm$ DE (Leyenda de la figura: —●— Ad5; —▼— ColoAd1; —■— Onyx-015).

Figura 6. Actividad citolítica de ColoAd1, Ad11p y Ad5

con una línea de células epiteliales normales (SAEC) y una línea celular de cáncer de colon humano (HT-29). Cada panel es un experimento representativo que se repitió al menos tres veces. Cada dato en el panel representa un ensayo realizado por cuadruplicado y los resultados se expresan como la media +/- DE (Leyenda de la figura: —●— Ad5; —▽— Ad11p; —■— ColoAd1).

Figura 7. Actividad citolítica de virus recombinantes. Los virus recombinantes representan cuatro poblaciones virales (Adp11, ColoAd1, extremo izquierdo de Ad11p/extremo derecho de ColoAd1(ColoAd1.1) y extremo izquierdo de ColoAd1/extremo derecho de Ad11p (ColoAd1.2)) que se construyeron como se describe en el ejemplo 6. Se determinó la actividad citolítica de cada población en células HT29 como se describió previamente. (Leyenda de la figura: —●— Ad5; —▽— Ad11p; —■— ColoAd1; —○— ColoAd1.1; —▲— ColoAd1.2).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Todas las publicaciones, incluyendo patentes y solicitudes de patente, mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan en este documento a modo de referencia como si cada publicación individual se incorporara por completo específica e individualmente a modo de referencia.

Definiciones

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el

significado conocido comúnmente por el especialista en el arte al cual pertenece esta invención. En general, la nomenclatura usada en la presente y los procedimientos de laboratorio descritos más adelante son los que son bien conocidos y de uso común en el arte.

Tal como se utiliza en la presente, el término "adenovirus", "serotipo" o "serotipo adenoviral" se refiere a cualquiera de los 51 serotipos adenovirales humanos conocidos actualmente, o aislados en el futuro. Véase, por ejemplo, Strauss, "Adenovirus infections in humans," en The Adenoviruses, Ginsberg, ed., Plenum Press, Nueva York, NY, págs. 451-596 (1984). Estos serotipos se clasifican en los subgrupos A-F (véase, Shenk, "Adenoviridae: The Viruses and Their Replication," en Fields Virology, Vol. 2, Cuarta Edición, Knipe, ed., Lippincott Williams & Wilkins, págs. 2265-2267 (2001), como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

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

Tal como se utiliza en la presente, un "adenovirus quimérico" se refiere a un adenovirus cuya secuencia de ácido nucleico está compuesta por las secuencias de ácido nucleico de al menos dos de los serotipos adenovirales descritos precedentemente.

Tal como se utiliza en la presente, "serotipo adenoviral progenitor" se refiere al serotipo adenoviral que representa el serotipo del cual deriva la mayor parte del genoma del adenovirus quimérico.

10 Tal como se utiliza en la presente, el término "recombinación homóloga" se refiere a dos moléculas de ácido nucleico, cada una de las cuales tiene secuencias homólogas, donde las dos moléculas de ácido nucleico se entrecruzan o sufren recombinación en la región de homología.

15 Tal como se utiliza en la presente, el término "potencia" se refiere al potencial lítico de un virus y representa su capacidad para replicarse, lisar y dispersarse. A los efectos de la presente invención, la potencia es un valor que compara la actividad citolítica de un adenovirus dado de la invención con la de Ad5 en la misma línea celular, es decir potencia = IC_{50} de AdX/ IC_{50} de Ad5, donde X es el serotipo adenoviral particular examinado y donde a la potencia de Ad5 se le otorga un valor de 1.

25 Tal como se utiliza en la presente, el término "virus oncolítico" se refiere a un virus que mata preferencialmente

células cancerosas en comparación con células normales.

Tal como se utiliza en la presente, el término "índice terapéutico" o "ventana terapéutica" se refiere a un número que indica el potencial oncolítico de un adenovirus dado y
5 se determina dividiendo el potencia del adenovirus en una línea de células cancerosas por la potencia del mismo adenovirus en una línea celular normal (es decir no cancerosa).

Tal como se utiliza en la presente, el término "modificado" se refiere a una molécula con una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos que difiere de la secuencia natural,
10 p.ej. una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de tipo salvaje. Una molécula modificada puede retener la función o actividad de una molécula de tipo salvaje, es decir un adenovirus modificado puede retener su actividad oncolítica. Las
15 modificaciones incluyen mutaciones en ácidos nucleicos como se describirá más adelante.

Tal como se utiliza en la presente, una "mutación" con referencia a un polinucleótido o polipéptido, se refiere a un cambio o una diferencia natural, sintética, recombinante, o
20 química en la estructura primaria, secundaria o terciaria de un polinucleótido o polipéptido, en comparación con un polinucleótido o polipéptido de referencia, respectivamente (p. ej., en comparación con un polinucleótido o polipéptido de tipo salvaje). Las mutaciones incluyen cambios tales como, p.
25 ej., supresiones, inserciones o sustituciones. Los polinucleó-

tidos y polipéptidos que contienen dichas mutaciones se pueden aislar o generar usando métodos bien conocidos en el arte.

Tal como se utiliza en la presente, una "supresión" se
5 define como un cambio ya sea en las secuencias de polinucleótidos o aminoácidos en las cuales faltan uno o más residuos de polinucleótidos o aminoácidos, respectivamente.

Tal como se utiliza en la presente, una "inserción" o "adición" es aquel cambio en una secuencia de polinucleótidos o de aminoácidos que ha dado como resultado la adición de uno o más residuos de polinucleótidos o de aminoácidos, respectivamente, en comparación con la secuencia de polinucleótidos o de aminoácidos natural.

Tal como se utiliza en la presente, una "sustitución" es
15 el resultado del reemplazo de uno o más polinucleótidos o aminoácidos por polinucleótidos o aminoácidos diferentes, respectivamente.

Tal como se utiliza en la presente, el término "derivado adenoviral" se refiere a un adenovirus de la invención
20 que ha sido modificado de manera tal que se ha efectuado una adición, supresión o sustitución o en el genoma viral, de modo tal que el derivado adenoviral resultante exhibe una potencia y/o índice terapéutico mayor que la del adenovirus progenitor, o de alguna otra manera es de mayor utilidad terapéutica (es decir, es menos inmunogénico, tiene un mayor
25

perfil de depuración). Por ejemplo, un derivado de un adenovirus de la invención puede contener una supresión en uno de los genes tempranos del genoma viral, incluyendo, en un sentido no limitativo, la región E1A o E2B del genoma viral.

5 Tal como se utiliza en la presente, una "variante" con referencia a un polinucleótido o polipéptido, se refiere a un polinucleótido o polipéptido que puede variar en cuanto a su estructura primaria, secundaria o terciaria, en comparación con un polinucleótido o polipéptido de referencia, res-
10 pectivamente (p.ej., en comparación con un polinucleótido o polipéptido de tipo salvaje). Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico puede contener una mutación o modificación que difiere de la secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico de referencia. En algunas realizaciones,
15 la variante adenoviral puede ser una isoforma o un polimorfismo diferente. Las variantes pueden ser polinucleótidos o polipéptidos naturales, sintéticos, recombinantes o modificados químicamente que fueron aislados o generados usando métodos bien conocidos en el arte. Los cambios en la secuen-
20 cia de polinucleótidos de la variante pueden ser silentes. Es decir, no alteran los aminoácidos codificados por el polinucleótido. Cuando las alteraciones se limitan a cambios silentes de este tipo, la variante codificará un polipéptido con la misma secuencia de aminoácidos que la referencia. Co-
25 mo alternativa, dichos cambios en la secuencia de polinu-

cleótidos de la variante pueden alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia, dando como resultado cambios de aminoácidos conservadores o no conservadores, como se describirá más adelante. Dichos cambios de polinucleótidos pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, supresiones, fusiones y truncamientos de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia. Se pueden introducir diversas sustituciones de codones, de modo tal que los cambios
5
10
silentes producen diversos sitios de restricción, con el fin de optimizar la clonación en un vector plásmido o viral o la expresión en un sistema procariota o eucariota particular.

Tal como se utiliza en la presente, una "variante adenoviral" se refiere a un adenovirus cuya secuencia de polinucleótidos difiere de la del polinucleótido de referencia, p.ej. un adenovirus de tipo salvaje, como se describió precedentemente. Las diferencias son limitadas de modo que las secuencias de polinucleótidos del progenitor y de la variante son similares en todo y, en la mayoría de las regiones, idénticas. Tal como se utiliza en la presente, se dice que una primera secuencia de nucleótidos o de aminoácidos es "similar" a una segunda secuencia cuando una comparación de las dos secuencia muestra que presentan pocas diferencias (es decir, la primera y segunda secuencias son casi idénticas). Tal
15
20
25
como se utiliza en la presente, las diferencias en la se-

cuencia de polinucleótidos presentes entre la variante adenoviral y el adenovirus de referencia no dan como resultado una diferencia en la potencia y/o el índice terapéutico.

Tal como se utiliza en la presente, el término "conservadores" se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido diferente que posee propiedades químicas similares. Las sustituciones de aminoácidos conservadores incluyen el reemplazo de una leucina por isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato o una treonina por una serina. Las inserciones o supresiones comprenden típicamente un rango entre 1 y 5 aminoácidos aproximadamente.

Tal como se utiliza en la presente, el término "no conservadora" se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido diferente, que presenta propiedades químicas diferentes. Las sustituciones no conservadoras incluyen, a modo de ejemplo, la sustitución de ácido aspártico (D) por glicina (G); de asparagina (N) por lisina (K); o de alanina (A) por arginina (R).

Los códigos de una sola letra para los residuos de aminoácidos incluyen los siguientes: A = alanina, R = arginina, N = asparagina, D = ácido aspártico, C = cisteína, Q = glutamina, E = ácido glutámico, G = glicina, H = histidina, I = isoleucina, L = leucina, K = lisina, M = metionina, F = fenilalanina, P = prolina, S = serina, T = treonina, W = trip-

tofino, Y = tirosina, V = valina.

Se comprenderá que los polipéptidos a menudo contienen aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos conocidos comúnmente como los 20 aminoácidos naturales y que muchos aminoácidos, incluyendo los aminoácidos terminales, pueden estar modificados en un polipéptido dado, ya sea mediante procesos naturales, tal como glicosilación y otras modificaciones de post-traducción, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidos en el arte. Aún las modificaciones comunes que suceden naturalmente en los polipéptidos son demasiado numerosas como para enumerarlas exhaustivamente en la presente, pero todos están bien descritos en los textos básicos y en monografías más detalladas, así como en la enorme literatura de investigación, y son bien conocidos por los especialistas en el arte. Entre las modificaciones conocidas que se pueden encontrar en los polipéptidos de la presente invención se pueden mencionar, para nombrar unos pocos a efectos ilustrativos, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un grupo hemo, unión covalente de un polinucleótido o de un derivado de un polinucleótido, unión covalente de un lípido o de un derivado de un lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cistina, formación de pi-

roglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicación, glicosilación, formación de anclajes de GPI, hidroxilación, iodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos a proteínas mediada por ARN de transferencia tal como arginilación y ubiquitinación.

Dichas modificaciones son bien conocidas por los especialistas y están descritas con mayor detalle en la literatura científica. Varias modificaciones particularmente comunes, como p.ej. la glicosilación, unión a lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ribosilación de ADP, están descritas en los textos más básicos, tal como, p.ej., I. E. Creighton, *Proteins- Structure and Molecular Properties*, 2ª Ed., W.H. Freeman y Company, Nueva York, 1993. Hay muchas revisiones detalladas disponibles sobre este tema, tal como, p.ej., las provistas por Wold, F., en *Post-translational Covalent Modification of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, págs 1-12, 1983; Seifter et al., *Meth. Enzymol.* 182: 626-646, 1990 y Rattan et al., *Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging*, Ann.N.Y.Acad.Sci. 663: 48-62, 1992.

Se comprenderá, como es de conocimiento general y como se indicara precedentemente, que los polipéptidos no siempre son completamente lineales. Por ej. los polipéptidos pueden

ser ramificados como resultado de una ubiquitinación y pueden ser circulares, con o sin ramificación, en general como resultado de eventos de post-traducción, incluyendo eventos de procesamiento naturales y eventos debidos a la manipulación humana que no tienen lugar naturalmente. Los polipéptidos circulares, ramificados y circulares ramificados se pueden sintetizar mediante procesos naturales que no son de traducción y también mediante métodos completamente sintéticos.

10 Las modificaciones pueden aparecer en cualquier parte en un polipéptido, incluyendo el esqueleto del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo terminales. De hecho, el bloqueo de un grupo amino o carboxilo en un polipéptido, o ambos, con una modificación
15 covalente, es común en los polipéptidos naturales y sintéticos y dichas modificaciones también pueden estar presentes en los polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, el residuo amino terminal de los polipéptidos sintetizados en *E. coli*, antes del procesamiento proteolítico, casi invariablemente es N-formilmetionina.
20

Las modificaciones que aparecen en el polipéptido a menudo dependerán de la manera en que fue sintetizado. Por ejemplo, para los polipéptidos sintetizados por expresión de un gen clonado en un huésped, la naturaleza y extensión de
25 las modificaciones estarán determinadas en gran parte por la

capacidad de modificación de post-traducción de la célula huésped y las señales de la modificación estarán presentes en la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Por ejemplo, como es conocido en general, la glicosilación rara vez tiene
5 lugar en los huéspedes bacterianos, tal como *E. coli*. Por consiguiente, cuando se desea una glicosilación, el polipéptido deberá expresarse en un huésped glicosilante, en general una célula eucariota. En las células de insecto a menudo tienen lugar las mismas glicosilaciones de post-traducción
10 que en las células de mamífero y por este motivo se han desarrollado sistemas de expresión en células de insecto, entre otros, a fin de expresar eficazmente proteínas de mamífero con los patrones nativos de glicosilación. Se pueden aplicar consideraciones similares a las demás modificaciones.

15 Se comprenderá que el mismo tipo de modificación puede estar presente en un grado similar o variable en diversos sitios en un polipéptido dado. Además, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones.

Tal como se utilizan en la presente, se usan los siguientes términos para describir las relaciones de secuencia entre dos o más secuencias de polinucleótidos o aminoácidos: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia", "identidad sustancial", "similitud" y "homólogo". Una "se-
25 cuencia de referencia" es una secuencia definida que se usa

como base para una comparación de secuencias; la secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, como un segmento de un ADNc de longitud completa o una secuencia genética dada en un listado de secuencias o puede comprender un ADNc o secuencia genética completa. En general, la secuencia de referencia es de al menos 18 nucleótidos o 6 aminoácidos de longitud, con frecuencia de al menos 24 nucleótidos o 8 aminoácidos de longitud y a menudo de al menos 48 nucleótidos o 16 aminoácidos de longitud. Dado que dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos pueden, cada una, (1) comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia de polinucleótidos o de aminoácidos completa) que es similar entre las dos moléculas, y (2) comprender además una secuencia que sea divergente entre las dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) moléculas se efectúan típicamente comparando las secuencia de las dos moléculas sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un segmento conceptual de al menos 18 posiciones contiguos de nucleótidos o 6 de aminoácidos, donde la secuencia de polinucleótidos o la secuencia de aminoácidos se puede comparar con una secuencia de referencia de al menos 18 nucleótidos o 6 aminoácidos contiguos

y donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones, supresiones, sustituciones y semejantes (es decir, huecos o faltas de coincidencia) del 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para una alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear en una ventana de comparación se puede efectuar, por ejemplo, con el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), con el algoritmo de alineación por homología de Needleman y Wunsch, *J.Mol.Biol.* 48: 443 (1970), con el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc.Natl.Acad.Sci. (EEUU)* 85: 2444 (1988), con las implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BEST-FIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), VectorNTI de Informatix, Geneworks, o los paquetes de software de MacVector) o por inspección, y luego se selecciona la mejor alineación (es decir, la que da como resultado en mayor porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generada por los distintos métodos.

Tal como se utiliza en la presente, el término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótidos o de aminoácidos son idénticas (es decir, en una

base de nucleótido por nucleótido o residuo por residuo) sobre la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas de forma óptima sobre la ventana de comparación, determinando la cantidad de posiciones en que aparece la base de ácido nucleico (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) o el residuo idéntico en ambas secuencias con el fin de obtener la cantidad de posiciones coincidentes, dividiendo la cantidad de posiciones coincidentes por la cantidad total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. El término "identidad sustancial", tal como se utiliza en la presente, indica una característica de una secuencia de polinucleótidos o de aminoácidos, donde el polinucleótido o el aminoácido comprende una secuencia que tiene al menos un 85 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 90 a 95 por ciento de identidad de secuencia, más habitualmente al menos un 99 por ciento de identidad de secuencia en comparación con la secuencia de referencia sobre una ventana de comparación de al menos 18 posiciones de nucleótidos (6 de aminoácidos), con frecuencia sobre una ventana de al menos 24-48 posiciones de nucleótidos (8-16 de aminoácidos), donde el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con una se-

cuencia que puede incluir supresiones o adiciones que alcanzan un total de un 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia sobre la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande. El término "similitud", cuando se usa para describir un polipéptido, se determina comparando la secuencia de aminoácidos y los sustitutos conservados de aminoácidos de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. El término "homólogo", cuando se usa para describir un polinucleótido, indica que dos polinucleótidos, o una secuencia designada de los mismos, cuando se alinean y comparan de forma óptima, son idénticos, con las inserciones o supresiones de nucleótidos apropiadas en al menos un 70% de los nucleótidos, habitualmente entre un 75% y 99% aproximadamente y más preferentemente al menos entre un 98 y 99% aproximadamente de los nucleótidos.

Tal como se utiliza en la presente, un "homólogo", cuando se usa para describir un polinucleótido, indica que dos polinucleótidos, o una secuencia designada de los mismos, cuando se alinean y comparan de forma óptima, son idénticas, con las inserciones o supresiones de nucleótidos apropiadas, en al menos un 70% de los nucleótidos, habitualmente entre un 75% y 99% aproximadamente y más preferentemente al menos entre un 98 y 99% aproximadamente de los nucleótidos.

Tal como se utiliza en la presente, la "reacción en ca-

dena de la polimerasa" o "PCR" se refiere a un procedimiento en el cual se amplifican extensiones específicas de ADN como se describe en la Patente de EE.UU. N°: 4.683.195. En general, es necesaria la información de secuencia de los extremos del fragmento de polipéptido de interés o más, de modo que puedan diseñarse cebadores de oligonucleótidos; estos cebadores apuntarán una hacia la otra y serán idénticas o similares en cuanto a secuencia a las cadenas opuesta del templado a amplificar. Los nucleótidos 5' terminales de los dos cebadores coincidirán con los extremos del material amplificado. La PCR se puede usar para amplificar una secuencia de ADN específica a partir de un ADN genómico total, un ADNc transcrito a partir del ARN celular total, una secuencia de plásmido, etc. (Véase en general Mullis et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51: 263, 1987; Erlich, ed., *PCR Technology*, Stockton Press, NY, 1989).

Tal como se utiliza en la presente, la "severidad" tiene lugar típicamente en un rango entre aproximadamente la T_m (temperatura de fusión)-5°C (5° debajo de la T_m de la sonda) y aproximadamente 20°C a 25°C debajo de la T_m . Como comprenderán los especialistas en el arte, se puede usar una hibridación severa para identificar o detectar secuencias de polinucleótidos idénticas o para identificar o detectar secuencias de polinucleótidos similares o relacionadas. Tal como se usa en la presente, el término "condiciones severas" significa que

la hibridación solamente tendrá lugar si existe al menos un 95% y preferentemente al menos un 97% de identidad entre las secuencias.

Tal como se utiliza en la presente, el término "hibridación", usado en la presente, incluirá "cualquier proceso por el cual una cadena de polinucleótido se une con una cadena complementaria a través de un apareamiento de bases " (Coombs, J., *Dictionary of Biotechnology*, Stockton Press, Nueva York, N.Y., 1994).

10 Tal como se utiliza en la presente, el término "dosis eficaz para uso terapéutico" o "cantidad eficaz" se refiere a aquella cantidad de adenovirus que alivia los síntomas o las condiciones de una enfermedad. Una dosis es considerada una dosis eficaz para uso terapéutico en el tratamiento de
15 cáncer, o de metástasis del mismo, cuando el tumor o el crecimiento metastásico es demorado o detenido o cuando se observa que el tumor o la metástasis disminuye de tamaño, de modo que conduce a una prolongación de la expectativa de vida para el sujeto.

20 **Adenovirus de la invención**

La presente invención provee adenovirus quiméricos, o variantes o derivados de los mismos, que poseen un genoma en el cual la secuencia de nucleótidos de la región E2B del adenovirus quimérico comprende secuencias de ácido nucleico
25 derivadas de al menos dos serotipos adenovirales, donde di-

chos serotipos se seleccionan cada uno entre los subgrupos adenovirales B, C, D, E y F y son distintos entre sí. El adenovirus quimérico de la invención es oncolítico y presenta un índice terapéutico mejorado para una célula tumoral.

5 Aislamiento de adenovirus quiméricos

Los adenovirus quiméricos de la invención, o variantes o derivados de los mismos, se pueden producir usando una modificación de la técnica conocida como "bioselección", en la cual un adenovirus con las propiedades deseadas, tal como
10 una mayor oncogenicidad o especificidad para el tipo celular, es generado mediante el uso de una selección genética bajo condiciones controladas (Yan et al. (2003) *J. Virol.* 77: 2640-2650).

En la presente invención, se agrupa una mezcla de adenovirus de diferentes serotipos y luego es sometida a pasajes, preferentemente al menos dos veces, sobre un cultivo subconfluyente de células tumorales a una relación de partícula por célula suficientemente alta como para promover una recombinación entre serotipos, pero no tan alta como para
15 producir una muerte celular prematura. Una relación de partícula por célula preferida comprende aproximadamente 500 partículas por célula, y puede ser determinada fácilmente por el especialista en el arte. Tal como se utiliza en la presente, un "cultivo subconfluyente" de células se refiere a
20 un cultivo en monocapa o en suspensión donde las células se

encuentran en crecimiento activo. Para las células cultivadas como una monocapa, un ejemplo sería un cultivo donde aproximadamente un 50% a 80% del área disponible para el crecimiento celular está cubierta con células. Se prefiere un cultivo
5 donde aproximadamente un 75% del área de crecimiento está cubierta con células.

En una realización preferida, la mezcla adenoviral es aquella que incluye los serotipos adenovirales representativos de los subgrupos adenovirales B, C, D, E y F. Los adenovirus del grupo A no están incluidos en la mezcla ya que están asociados con la formación de tumores en roedores. Las líneas de células tumorales preferidas de utilidad en el proceso de bioselección incluyen, a modo de ejemplo, las que derivan de mama, colon, páncreas, pulmón y próstata. Algunos
10 ejemplos de líneas de células de tumores sólidos de utilidad para el pasaje "bioselectivo" de la mezcla adenoviral incluyen, a modo de ejemplo, células MDA231, HT29, PAN-1 y PC-3. Las líneas celulares hematopoyéticas incluyen, a modo de ejemplo, las células linfoides B Raji y Daudi, células eritroblastoides K562, células mieloides U937 y células linfoides T HSB2.
15

Los adenovirus producidos durante estos pasajes iniciales se usan para infectar células tumorales quiescentes a una relación de partícula a célula suficientemente baja como
25 para permitir la infección de una célula por no más de un

adenovirus. Después de hasta un máximo de 20 pasajes bajo estas condiciones, se cosecha el sobrenadante del último pasaje antes de observar un efecto citopático visible (CPE, véase Fields *Virology*, Vol. 2, Cuarta edición, Knipe, ea., Lippincott Williams & Wilkins, págs. 135-136) para incrementar la selección de virus muy potentes. El sobrenadante cosechado se puede concentrar mediante técnicas bien conocidas por los especialistas en el arte. Un método preferido para obtener células quiescentes, es decir células en las cuales se ha detenido el crecimiento activo, en un cultivo de monocapa consiste en permitir que el cultivo crezca durante 3 días después de la confluencia, donde el término confluencia significa que toda el área disponible para el crecimiento celular está ocupado (cubierto con células). De manera similar, se pueden llevar cultivos en suspensión hasta densidades caracterizadas por la ausencia de un crecimiento celular activo.

Se puede examinar el perfil del serotipo del sobrenadante concentrado, que contiene la agrupación adenoviral bioseleccionada, midiendo los tiempos de retención de la agrupación viral cosechada sobre una columna de intercambio aniónico, ya que los diferentes serotipos adenovirales son conocidos por sus tiempos de retención característicos (Blanche et al. (2000) *Gene Therapy* 7: 1055-1062); véase el ejemplo 3, las figuras 1A y B. Los adenovirus de la inven-

ción se pueden aislar del sobrenadante concentrado por dilución y purificación en placa, u otras técnicas bien conocidas en el arte, y cultivar para una caracterización adicional. Se usan técnicas bien conocidas en el arte para determinar la secuencia de los adenovirus quiméricos aislados (véase el ejemplo 5).

Un ejemplo de un adenovirus quimérico de la invención es el adenovirus quimérico ColoAd1, que se aisló usando células de colon HT29 en el proceso de bioselección. El adenovirus ColoAd1 tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID N°: 1. La mayor parte de la secuencia de nucleótidos de ColoAd1 es idéntica a la secuencia de nucleótidos del serotipo Ad11 (SEQ ID N°: 2) (Stone et al. (2003) *Virology* 309: 152-165; Mei et al. (2003) *J. Gen. Virology* 84: 2061-2071). Hay dos supresiones en la secuencia de nucleótidos de ColoAd1 en comparación con Ad11, una de 2444 pares de bases de longitud dentro de la región de la unidad de transcripción E3 del genoma (pares de bases 27979 a 30423 de la SEQ ID N°: 2) y una segunda supresión más pequeña, de 25 pares de bases de longitud (pares de bases 33164 a 33189 de la SEQ ID N°: 2), dentro del gen E4orf4. La región de la unidad de transcripción E2B (SEQ ID N°: 3) de ColoAd1, que codifica las proteínas adenovirales ADN polimerasa y la proteína terminal, está ubicada entre los pares de bases 5067 y 10354 de la SEQ ID N°: 1, y es un área de recombinación homóloga en-

tre los serotipos Ad11 y Ad3. Dentro de esta región de ColoAd1, hay cambios de 198 pares de bases, en comparación con la secuencia de Ad11 (SEQ ID N°: 1). Los cambios dan como resultado las extensiones de nucleótidos dentro de la región
5 E2B de ColoAd1 que son homólogas de la secuencia comprendida en una porción de la región E2B de Ad3 (SEQ ID N°: 8), siendo la extensión más larga de homología entre ColoAd1 y Ad3 de 414 bp de longitud. La región E2B de ColoAd1 (SEQ ID N°: 3) confiere una mayor potencia al adenovirus ColoAd1 en comparación con el adenovirus Ad11 no modificado (véase el
10 ejemplo 6; figura 7). En otras realizaciones, el adenovirus quimérico de la invención puede comprender secuencias de ácido nucleico de más de dos serotipos adenovirales.

El adenovirus quimérico de la invención, o una variante
15 o derivado del mismo, puede ser evaluado por su selectividad para un tipo de tumor específico mediante examen de su potencial lítico en un panel de células tumorales derivadas del mismo tejido sobre el cual se hicieron inicialmente los pasajes de la agrupación adenoviral. Por ej., el adenovirus
20 quimérico ColoAd1 (SEQ ID N°: 1), que inicialmente derivaba de una agrupación adenoviral sometida a pasajes sobre líneas de células tumorales de colon HT-29, fue examinado nuevamente en células HT-29 y también en un panel de otras líneas de células tumorales derivadas de colon, incluyendo DLD-1,
25 LS174T, LS1034, SW403, HCT116, SW48 y Colo320DM (véase la

figura 3B). Cualquiera de las líneas de células tumorales de colon disponibles podría ser igualmente útil para dicha evaluación. Los clones adenovirales aislados de las agrupaciones adenovirales seleccionados sobre otros tipos de células tumorales pueden ser evaluados de manera similar en un panel de células tumorales adecuado, incluyendo, a modo de ejemplo, líneas celulares de próstata (p.ej. las líneas celulares DU145 y PC-3); líneas celulares de páncreas (por ejemplo la línea celular Panc-1); líneas de células tumorales de mama (p.ej. la línea celular MDA231) y líneas celulares de ovario (p.ej. la línea celular OVCAR-3). Hay otras líneas de células tumorales disponibles que son igualmente útiles para aislar e identificar los adenovirus de la invención.

Los adenovirus quiméricos de la invención presentan un índice terapéutico mejorado en comparación con los serotipos adenovirales de los cuales fueron derivados. (véase la figura 6, que compara la actividad citolítica del adenovirus quimérico ColoAd1 con Ad11p).

La invención también abarca adenovirus quiméricos que se construyen usando las técnicas recombinantes bien conocidas por los especialistas en el arte. Dichos adenovirus quiméricos comprenden una región de la secuencia de nucleótidos derivada de un serotipo adenoviral que se incorpora mediante técnicas recombinantes en el genoma de un segundo serotipo adenoviral. La secuencia incorporada confiere una propiedad,

p.ej. especificidad tumoral o mayor potencia, al serotipo adenoviral progenitor. Por ej., se puede incorporar la región E2B de ColoAd1 (SEQ ID N° 3) en el genoma de Ad35 o Ad9.

Derivados adenovirales

5 La invención también abarca un adenovirus quimérico de la invención que fue modificado para proveer otros adenovirus quiméricos útiles para uso terapéutico. Las modificaciones incluyen, a modo de ejemplo, los que se describirán a continuación.

10 Una modificación es la producción de derivados del adenovirus quimérico de la invención que carece sustancialmente de la capacidad para unirse a p53 como resultado de una mutación en el gen adenoviral que codifica la proteína E1B-55K. En dichos virus en general se ha suprimido parte, o to-
15 da, la región E1B-55K. (véase la Patente de EE.UU. N°: 5.677.178). En la Patente de EE.UU. N°: 6.080.578 se describen, entre otros temas, mutantes Ad5 que contienen supresiones en la región de la proteína E1B-55K que es responsable de la unión a p53. Otra modificación preferida en los adeno-
20 virus quiméricos de la presente invención comprende mutaciones en la región E1A, descrita en las Patentes de EE.UU. N°: 5.801.029 y 5.972.706. Estos tipos de modificaciones proveen derivados del adenovirus quimérico de la invención que poseen una mayor selectividad por las células tumorales.

25 Otro ejemplo de una modificación abarcada por la inven-

ción es un adenovirus quimérico que exhibe un mayor grado de especificidad tisular debido a que la replicación viral se encuentra bajo el control de un promotor específico del tejido descrito en la Patente de EE.UU. N°: 5.998.205. La replicación del adenovirus quimérico de la invención también se puede poner bajo el control de un elemento que responde a E2F como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. N°: 09/714.409. Esta modificación permite obtener un mecanismo de control de la replicación viral basado en la presencia de E2F, dando como resultado una mayor especificidad para el tejido tumoral, y es distinto del control realizado por un promotor específico del tejido. En estas dos realizaciones, el promotor específico del tejido y del elemento que responde a E2F está ligado operativamente a un gen adenoviral que es esencial para la replicación del adenovirus.

Otra modificación abarcada por la invención es el uso de un adenovirus quimérico de la invención, por ejemplo ColoAd1, como esqueleto para la producción de nuevos vectores adenovirales de replicación deficiente. Tal como se describe en Lai et al. ((2002) *DNA Cell Bio.* 21: 895-913), los vectores adenovirales de replicación deficiente se pueden usar para distribuir y expresar genes terapéuticos. En la presente se proveen vectores adenovirales de primera generación (en los cuales se han suprimido las regiones E1 y E3) y de segunda generación (en los cuales se ha suprimido además la

región E4) derivados de los adenovirus quiméricos de la invención. Dichos vectores se pueden producir fácilmente usando técnicas bien conocidas por los especialistas en el arte (véase Imperiale y Kochanek (2004) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 273: 335-357; Vogels et al. (2003) *J. Virol.* 77: 8263-8271).

Una modificación adicional abarcada por la invención es la inserción de un gen heterólogo, de utilidad como marcador o informante para efectuar un seguimiento de la eficacia de la infección viral. Una realización de este tipo de modificación es la inserción del gen de la timidina quinasa (TK). La expresión de TK dentro de las células infectadas se puede usar para rastrear el nivel de virus remanente en las células después de una infección viral, usando para ello sustratos marcados radioactivamente para la reacción de la TK (Sangro et al. (2002) *Mol. Imaging Biol.* 4: 27-33).

Los métodos para construir los adenovirus quiméricos modificados son conocidos en general en el arte. Véase, Mittal, S. K. (1993) *Virus Res.* 28: 67-90 y Hermiston, T. et al. (1999) *Methods in Molecular Medicine: Adenovirus Methods and Protocols*, W.S.M. Wold, ed, Humana Press. Se usan las técnicas estándar en los métodos de recombinación de ácidos nucleicos, síntesis de polinucleótidos y cultivos y transformación microbianos (por ejemplo, electroporación, lipofección). En general, las reacciones enzimáticas y los pasos

de purificación se efectúan de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Las técnicas y los procedimientos se efectúan en general de acuerdo con los métodos convencionales en el arte y según se describen en las diferentes referencias generales (véase en general, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) que se mencionan en este documento. La nomenclatura usada en la presente y los procedimientos de laboratorio de química analítica, química de síntesis orgánica y de formulaciones farmacéuticas que se describen más adelante son bien conocidos y de uso común en el arte.

Determinación del potencial terapéutico

Los adenovirus quiméricos de la invención, o variantes o derivados de los mismos, pueden ser evaluados por su utilidad terapéutica mediante examen de su potencial lítico en células tumorales derivadas de los tejidos de interés como blancos terapéuticos. Las líneas de células tumorales de utilidad para el estudio de dichos adenovirus incluyen, a modo de ejemplo, líneas celulares de colon, incluyendo a modo de ejemplo, las líneas celulares DLD-1, HCT116, HT29, LS1034 y SW48; líneas celulares de próstata, incluyendo a modo de ejemplo, las líneas celulares DU145 y PC-3; líneas celulares de páncreas, incluyendo a modo de ejemplo, la línea celular Panc-1; líneas de células tumorales de mama, in-

cluyendo a modo de ejemplo, la línea celular MDA231 y líneas celulares de ovario, incluyendo a modo de ejemplo, la línea celular OVCAR-3. Las líneas celulares hematopoyéticas incluyen, a modo de ejemplo, las células linfoides B Raji y Daudi, las células eritroblastoides K562, las células mieloides U937 y las células linfoides T HSB2. Se puede usar cualquier otra línea de células tumorales disponible en la evaluación e identificación de los adenovirus de la invención para su uso en el tratamiento de neoplasias.

10 La actividad citolítica de los adenovirus de la invención se puede determinar en líneas de células tumorales representativas y los datos pueden ser convertidos en una medida de la potencia, utilizando para ello un adenovirus que pertenece al subgrupo C, preferentemente Ad5, como estándar
15 (es decir, dada una potencia de 1). Un método preferido para determinar la actividad citolítica es el ensayo MTS (véase el ejemplo 4, figura 2).

 El índice terapéutico de un adenovirus de la invención en una línea de células tumorales particular se puede calcular por comparación de la potencia de un adenovirus dado en
20 una línea de células tumorales con la potencia del mismo adenovirus en una línea celular no cancerosa. Las líneas celulares no cancerosas preferidas son las células SAEC, que son de origen epitelial, y las células HUVEC que son de origen endotelial (véase la figura 4). Estos dos tipos de célu-
25

las representan células normales a partir de las cuales derivan órganos y vasculatura, respectivamente, y son representativas de los sitios probables de toxicidad durante una terapia adenoviral, dependiendo del modo de administración del adenovirus. Sin embargo, la práctica de la invención no se limita al uso de estas células y también se pueden usar otras líneas celulares no cancerosas (por ejemplo células B, células T, macrófagos, monocitos, fibroblastos).

Los adenovirus quiméricos de la invención pueden ser evaluados además por su capacidad para afectar el crecimiento de células neoplásicas (es decir, cáncer) por su capacidad para reducir la tumorigénesis o la carga de células neoplásicas en ratones desnudos a los que se le ha efectuado un trasplante de células neoplásicas, en comparación con ratones no tratados con una carga equivalente de células neoplásicas (véase el ejemplo 7).

La evaluación de los adenovirus de la invención también se puede efectuar usando explantes de tumores primarios humanos (Lam et al.(2003) *Cancer Gene Therapy*; Grill et al.(2003) *Mol.Therapy* 6:609-614), que proveen las condiciones de prueba en tumores que normalmente no se pueden obtener usando los estudios de xenoinjertos tumorales.

Utilidad terapéutica

La presente invención provee el uso de los adenovirus quiméricos de la invención para inhibir el crecimiento de

células tumorales, así como el uso de vectores adenovirales derivados de estos adenovirus quiméricos para distribuir proteínas terapéuticas de utilidad en el tratamiento de neoplasias y otros estados de enfermedad.

5 Composiciones farmacéuticas y administración de las mismas

La presente invención también se relaciona con composiciones farmacéuticas que comprenden los adenovirus quiméricos de la invención, incluyendo variantes y derivados de los mismos, formulados para la administración terapéutica a un
10 paciente. Para el uso terapéutico, se administra una composición estéril que contiene una dosificación eficaz para uso farmacológico del adenovirus a un paciente humano o a un paciente no humano veterinario para el tratamiento, por ejemplo, de una afección neoplásica. En general, la composición
15 comprenderá aproximadamente 10^{11} o más partículas de adenovirus en una suspensión acuosa. A menudo se emplea un vehículo o excipiente aceptable para uso farmacéutico en dichas composiciones estériles. Se pueden usar diversas soluciones acuosas, por ejemplo agua, agua con solución amortiguadora,
20 solución salina 0,4%, glicina 0,3% y semejantes. Estas soluciones son estériles y en general están libres de materia particulada distinta del vector adenoviral deseado. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares aceptables para uso farmacéutico según necesidad para acercarse a las
25 condiciones fisiológicas, tal como ajuste del pH y agentes

amortiguadores, agentes para ajustar la toxicidad y semejantes, p.ej. acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio, etc. Se pueden incluir excipientes que aumentan la infección de las células
5 por adenovirus. (véase la Patente de EE.UU. N°: 6.392.069)

Los adenovirus de la invención también se puede administrar a células neoplásicas mediante administrar con liposomas o inmunoliposomas; dicha distribución puede ser dirigida selectivamente a las células neoplásicas basado en una
10 propiedad de superficie celular presente en la población de células neoplásicas (por ejemplo, la presencia de una proteína de la superficie celular que se une a una inmunoglobulina en un inmunoliposoma). Típicamente, se encapsula una suspensión acuosa que contiene a los viriones en liposomas o
15 inmunoliposomas. Por ejemplo, se puede encapsular una suspensión de viriones de adenovirus en micelas para formar inmunoliposomas utilizando métodos convencionales (Patente de EE.UU. N°: 5.043.164, Patente de EE.UU. N°: 4.957.735, Patente de EE.UU. N°: 4.925.661; Connor y Huang, (1985) *J. Cell Biol.* 101: 581; Lasic D.D. (1992) *Nature* 355: 279; *Novel Drug Delivery* (eds. Prescott y Nimmo, Wiley, Nueva York, 1989); Reddy et al. (1992) *J. Immunol.* 148:1585). Se pueden usar inmunoliposomas que comprenden un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de células cancerosas (por
25 ejemplo, CALLA, CEA) presente sobre las células cancerosas

del individual para dirigir los viriones a dichas células (Fisher (2001) *Gene Therapy* 8: 341-348).

Para aumentar aún más la eficacia de los adenovirus de la invención, es posible modificarlos para que exhiban un mayor tropismo para tipos de células tumorales particulares. Por ej., como se demuestra en PCT/US98/04964, se puede modificar una proteína de la cubierta exterior de un adenovirus para que exprese un agente químico, preferentemente un polipéptido, que se una a un receptor presente sobre las células tumorales en un grado mayor que en las células normales. (Véase también, las Patentes de EE.UU. N°: 5.770.442 y 5.712.136). El polipéptido puede ser un anticuerpo y, preferentemente, es un anticuerpo de cadena simple.

Terapia adenoviral

Los adenovirus de la invención, o composiciones farmacéuticas con los mismos, pueden ser administrados para el tratamiento terapéutico de una enfermedad neoplásica o cáncer. En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones son administradas a un paciente que ya padece una enfermedad neoplásica particular, en una cantidad suficiente como para curar o al menos detener parcialmente la afección y las complicaciones de la misma. Una cantidad adecuada para lograrlo se define como una "dosis eficaz para uso terapéutico" o "dosis eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la severidad de la afección, del estado general del

paciente y de la ruta de administración.

Por ejemplo, pero no en un sentido limitativo, es posible tratar un paciente humano o un mamífero no humano que sufre de una enfermedad neoplásica sólida o hematológica (por ejemplo carcinoma de páncreas, de colon, de ovario, de pulmón o de mama, leucemia o mieloma múltiple) mediante la administración de una dosificación eficaz para uso terapéutico de un adenovirus apropiado de la invención, es decir uno que ha demostrado un mayor índice terapéutico para dicho tipo de tejido. Por ejemplo, un adenovirus quimérico preferido para el tratamiento de cáncer de colon sería el adenovirus ColoAd1 (SEQ ID N°: 1). Las suspensiones de partículas infecciosas de adenovirus se pueden distribuir al tejido neoplásico utilizando distintas rutas, incluyendo la vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subdérmica y tópica. Se puede administrar una suspensión de adenovirus que contiene aproximadamente entre 10^3 y 10^{12} o más partículas de viriones por ml por infusión (por ejemplo, en la cavidad peritoneal para el tratamiento de cáncer de ovario, en la vena porta para el tratamiento de un hepatocarcinoma o metástasis hepáticas de otros tumores primarios no hepáticos) u otra ruta adecuada, incluyendo inyección directa en la masa tumoral (por ejemplo, un tumor de mama), enema (p.ej., cáncer de colon) o catéter (p.ej., cáncer de vejiga). Hay otras rutas de administración que serán adecuadas para los carcinomas de

otro origen, tal como inhalación como una neblina (p.ej., para la distribución en pulmón en el tratamiento de carcinoma broncogénico, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón o cáncer de laringe) o aplicación directa en el sitio del tumor (p.ej., carcinoma broncogénico, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma laríngeo, carcinoma cervical).

La terapia adenoviral que emplea los adenovirus de la presente invención se puede combinar con otros protocolos antineoplásicos, tal como una quimioterapia o terapia con rayos X convencional para tratar un tipo de cáncer particular. El tratamiento puede ser concurrente o consecutivo. Un agente quimioterapéutico preferido es cisplatino y la dosis preferida puede ser elegido por el profesional a cargo sobre la base de la naturaleza del cáncer a tratar y demás factores considerados de rutina en la administración de cisplatino. Preferentemente, el cisplatino será administrado por vía intravenosa a una dosis de 50-120 mg/m² durante 3-6 horas. Más preferentemente, es administrado por vía intravenosa a una dosis de 80 mg/m² durante 4 horas. Un segundo agente quimioterapéutico preferido es el 5-fluorouracilo, que a menudo es administrado en combinación con cisplatino. La dosis preferida de 5-fluorouracilo es de 800-1200 mg/m² por día durante 5 días consecutivos.

La terapia adenoviral que emplea los adenovirus de la

presente invención como vectores adenovirales también se puede combinar con otros genes conocidos por ser de utilidad en una terapia basada en virus. Véase la Patente de EE.UU. N°: 5.648.478. En dichos casos, el adenovirus quimérico comprende además un gen heterólogo que codifica una proteína terapéutica, incorporada en el genoma viral, de modo tal que el gen heterólogo se expresa dentro de la célula infectada. Una proteína terapéutica, tal como se utiliza en la presente, se refiere a una proteína que podría proveer algún beneficio terapéutico cuando se expresa en una célula dada.

En una realización, el gen heterólogo es un gen activador de una prodroga, tal como la citosina deaminasa (CD) (Véase, las Patentes de EE.UU. N°: 5.631.236; 5.358.866; y 5.677.178). En otras realizaciones, el gen heterólogo es un inductor conocido de muerte celular, por ejemplo apoptina o proteína de muerte adenoviral (ADP), o una proteína de fusión, p.ej. una glicoproteína fusogénica de membrana (Danen-Van Oorschot et al. (1997) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94: 5843-5847; Tollefson et al. (1996) *J. Virol.* 70: 2296-2306; Fu et al. (2003) *Mol. Therapy* 7: 48-754, 2003; Ahmed et al. (2003) *Gene Therapy* 10: 1663-1671; Galanis et al. (2001) *Human Gene Therapy* 12(7): 811-821).

Otros ejemplos de genes heterólogos, o fragmentos de los mismos, incluyen los que codifican proteínas inmunomoduladoras, tal como citoquinas o quimioquinas. Los ejemplos

incluyen interleuquina 2, Patentes de EE.UU. N°: 4.738.927 ó
5.641.665; interleuquina 7, Patentes de EE.UU. N°: 4.965.195
ó 5.328.988; e interleuquina 12, Patente de EE.UU. N°:
5.457.038; factor de necrosis tumoral alfa, Patentes de EEUU
5 N° 4.677.063 ó 5.773.582; gamma-interferón, Patentes de EEUU
N° 4.727.138 ó 4.762.791; o GM CSF, Patentes de EE.UU. N°
5.393.870 ó 5.391.485, Mackensen et al. (1997) *Cytokine
Growth Factor Rev.* 8: 119-128). Otras proteínas inmunomodu-
ladoras incluyen además proteínas inflamatorias de macrófa-
10 gos, incluyendo MIP-3. También se puede usar la proteína
quimiotáctica de monocitos (MCP-3 alfa); una realización
preferida de un gen heterólogo es un gen quimérico que con-
siste de un gen que codifica una proteína que atraviesa las
membranas celulares, p.ej., VP22 o TAT, fusionado a un gen
15 que codifica una proteína que preferentemente sea tóxica pa-
ra las células cancerosas pero no para las células normales.

Los adenovirus quiméricos de la invención también se
pueden usar como vectores para distribuir genes que codifican
moléculas de ARN útiles para uso terapéutico, es decir ARN-
20 si (Dorsett y Tuschl (2004) *Nature Rev Drug Disc* 3:318-329).

En algunos casos, se pueden incorporar genes en un ade-
novirus quimérico de la invención para mejorar aún más la
capacidad del virus oncolítico para erradicar el tumor, aun
cuando no tenga ningún impacto directo sobre el propio tu-
25 mor. Estos incluyen genes que codifican proteínas que compro-

meten la presentación de MHC clase I (Hewitt et al. (2003) *Immunology* 110: 163-169), que bloquean el complemento, que inhiben IFN y los mecanismos inducidos por IFN, las quimioquinas y citoquinas, la muerte basada en células NK (Orange et al., (2002) *Nature Immunol.* 3: 1006-1012; Mireille et al. (2002) *Immunogenetics* 54: 527-542; Alcamí (2003) *Nature Rev. Immunol.* 3:36-50; que subsensibilizan la respuesta inmune (p. ej. IL-10, TGF-beta, Khong y Restifo (2002) *Nature Immunol.* 3:999-1005; 2002) y metaloproteasas que pueden degradar la matriz extracelular y mejorar la dispersión del virus dentro del tumor (Bosman y Stamenkovic (2003) *J. Pathol.* 2000: 423-428; Visse y Nagase (2003) *Circulation Res.* 92: 827-839).

Conjuntos de elementos

La invención se relaciona además con envases farmacéuticos y conjuntos de elementos que comprenden uno o más contenedores rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones de la invención mencionadas precedentemente. Dichos contenedores pueden incluir una nota en la forma prescrita por una oficina gubernamental reguladora de la elaboración, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, que refleje la aprobación por parte de dicha oficina de la elaboración, el uso o la venta del producto destinado a la administración en humanos.

La presente invención se describe además con los siguientes ejemplos, que son ilustrativos de realizaciones es-

pecíficas de la invención y de diversos usos de la misma. Estos ejemplos, que ilustran determinados aspectos específicos de la invención, no representan limitaciones ni circunscriben el alcance de la invención descrita.

5 A menos que se indique de otra manera, la práctica de la presente invención emplea las técnicas convencionales de cultivo celular, biología molecular, microbiología, manipulación de ADN recombinante, inmunología, que son propias del conocimiento del arte. Dichas técnicas están explicadas por
10 completo en la literatura. Véase, p.ej. *Cell Biology: a Laboratory Handbook*: J. Celis (Ed). Academic Press. N.Y. (1996); Graham, F.L. y Prevec, *Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines*. En: *Vaccines: New Approaches to Immunological Problems*. R.W. Ellis (ed) Butterworth, págs. 363-390; Gra-
15 han y Prevec *Manipulation of adenovirus vectors*. En: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7: *Gene Transfer and Expression Techniques*. E.J. Murray y J.M. Walker (eds) Humana Press Inc., Clifton, N.J. págs. 109-128, 1991; Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor La-
20 boratory Press; Sambrook et al. (1989) y Ausubel et al. (1995), *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons.

EJEMPLOS

Métodos

Se usan técnicas estándar en los métodos con ácidos nu-
25 cleicos recombinantes, en la síntesis de polinucleótidos y

en el cultivo y la transformación microbiana (por ejemplo, electroporación, lipofección). En general, las reacciones enzimáticas y los pasos de purificación se efectúan de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Las técnicas y los procedimientos se efectúan en general de acuerdo con los métodos convencionales en el arte y las diversas referencias generales (véase en general, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) citadas en todo este documento. La nomenclatura usada en la presente y los procedimientos de laboratorio de química analítica, química de síntesis orgánica y de formulación y administración farmacéutica, y el tratamiento de pacientes, así como los métodos para construir los mutantes adenovirales son los conocidos en general en el arte. Véase, Mittal, S. K., *Virus Res.*, 1993, vol: 28, páginas 67-90; y Hermiston, T. et al., *Methods in Molecular Medicine: Adenovirus Methods and Protocols*, W.S.M. Wold, ed, Humana Press, 1999. Además, se registró el genoma del adenovirus 5 en Genbank 10 con el N° Acceso M73260, y el virus se encuentra disponible en el American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE.UU., con el N° Acceso VR-5.

Virus y líneas celulares

Los serotipos de Ad, Ad3 (cepa GB), Ad4 (cepa RI-67), Ad5 (cepa Adenoide 75), Ad9 (cepa Hicks), Ad11p (cepa Slo-

bitski), Ad16 (cepa Ch. 79) y todas las líneas celulares, con la excepción de los siguientes se obtuvieron todos de ATCC: MDA231-mt1 (un derivado aislado por el Dr. Deb Zajchowski de un xenoinjerto de células MDA231 implantado de forma subcutánea de crecimiento rápido) y Panc1-sct (derivado por la Dra. Sandra Biroc a partir de un xenoinjerto de células Panc1 implantadas de forma subcutánea de crecimiento rápido), HUVEC (Vec Technologies, Rensselaer, NY) y SAEC (Clonetics, Walkersville, MD). El Ad40 fue obsequio del Dr. William S.M. Wold de la Universidad de St. Louis.

Ejemplo 1: Purificación y cuantificación viral

Las soluciones madre de los virus se propagaron sobre células 293 y luego fueron purificados sobre gradientes de CsCl (Hawkins et al., 2001). El método usado para cuantificar las partículas virales se basa en el de Shabram et al. (1997) *Human Gene Therapy* 8: 453-465, con la excepción que se usó el intercambiador aniónico TMAE Fractogel en lugar de Resource Q. Brevemente, se empaquetó una columna de 1,25 ml con Fractogel EMD TMAE-650 (S) (N° catálogo 116887-7 EMD Science, Gibbstown, NJ 08027). Se efectuó una separación por HPLC con un equipo de HPLC Agilent HP 1100 usando las siguientes condiciones: solución amortiguadora A = HEPES 50 mM, pH 7,5; solución amortiguadora B = NaCl 1,0 M en solución amortiguadora A; velocidad de flujo de 1 ml por minuto. Después de equilibrar la columna durante no menos de 30 mi-

nutos en solución amortiguadora A, se cargaron aproximadamente 10^9 - 10^{11} partículas virales de muestra sobre la columna en un volumen de 10-100 μ l, seguido de 4 volúmenes de columna de solución amortiguadora A. Se aplicó un gradiente lineal que se extendió sobre 16 volúmenes de columna y se terminó con 100% de solución amortiguadora B.

El efluente de la columna se monitoreó a A260 y A280 nm, se calcularon las áreas pico y se determinó la relación de 260 a 280 nm. Los picos virales se identificaron como aquellos picos que tenían una relación de A260/A280 cercana a 1,33. Se incluyó un estándar viral con cada serie de muestras. La cantidad de partículas virales por ml del estándar se había determinado usando el método de Lehmborg et al. (1999) *J.Chrom.B*, 732:411-423}. En el rango de concentración viral usado, el área del pico de A260 nm de cada muestra es directamente proporcional a la cantidad de partículas virales presente en la muestra. Se calculó la cantidad de partículas virales por ml en cada muestra de prueba multiplicando la cantidad conocida de partículas virales por ml en el estándar por la relación del área del pico viral a A260 nm de la muestra con el área del pico viral a A260 nm del estándar.

La columna fue regenerada después de cada gradiente de muestra mediante lavado con dos volúmenes de columna de NaOH 0,5 N seguido de dos volúmenes de columna de 100% de solución amortiguadora A, 3 volúmenes de columna de 100% de so-

lución amortiguadora B y luego 4 volúmenes de columna de 100% de solución amortiguadora A.

Ejemplo 2: Bioselección

Se agruparon los serotipos virales que representan los
5 subgrupos Ads B-F y luego fueron sometidos a pasajes sobre
cultivos subconfluentes de las líneas de células tumorales
blanco a una relación alta de partícula viral-por-célula por
dos rondas para promover la recombinación entre los seroti-
pos. El sobrenadante (1,0; 0,1; 0,01; 0,001 ml) de la segun-
10 da ronda de la infección con la relación alta de partícula
viral-por-célula, de cultivos subconfluentes, se usó luego
para infectar una serie de frascos de cultivo tisular T-75
sobreconfluentes de las líneas de células tumorales blanco
PC-3, HT-29, Panc-1 y MDA-231. Para obtener la sobrecon-
15 fluencia, cada línea celular fue sembrada a relaciones de
partición que permitían que la línea celular alcanzara con-
fluencia entre 24 y 40 horas después de la siembra y se dejó
que las células crecieran por un total de 72 horas después
de la siembra antes de la infección. Esto se efectuó para
20 maximizar la confluencia de las células para imitar las con-
diciones de crecimiento en tumores sólidos humanos.

Se cosechó el sobrenadante del cultivo celular del pri-
mer frasco en una serie de 10 diluciones que no mostró nin-
gún signo de CPE el día 3 ó 4 de postinfección (en el caso
25 de HT-29 y PC-3, esto se modificó para los pasajes 10-20 pa-

ra la cosecha del segundo frasco, es decir una cosecha 100 veces por debajo de la dilución a la cual era detectable el CPE el día 3 de postinfección). Cada cosecha sirvió como material inicial para el pasaje sucesivo del virus. Este proceso se repitió hasta que la agrupación viral había alcanzado 20 pasajes bioselectivos.

Se aislaron los virus individuales de cada agrupación bioseleccionada mediante dos rondas de purificación en placa con células A549 usando los métodos estándar (Tollefson, A., Hermiston, T.W., y Wold, W.S.M.; "Preparation and Titration of CsCl-banded Adenovirus Stock" en Adenovirus Methods and Protocols, Humana Press, 1999, págs 1-10, W.S.M. Wold, Ed). Brevemente, se usaron diluciones del sobrenadante cosechado del pasaje 20 para cada línea tumoral blanco para infectar células A549 en un ensayo en placa estándar. Se cosecharon las placas bien individualizadas y se empleó el mismo método de ensayo en placa para generar una segunda ronda de placas individuales a partir de estas cosechas. Las placas bien aisladas de la segunda ronda de purificación en placa se consideraron puras, se prepararon cultivos infectados usando estas placas purificadas y se determinó la potencia oncolítica de estos sobrenadantes de cultivo con el ensayo MTS como ya se describió.

Ejemplo 3: Caracterización del serotipo

Se identificaron los serotipos adenovirales progenito-

res que comprenden las agrupaciones virales o el adenovirus ColoAd1 aislado usando cromatografía de intercambio aniónico de manera similar a la descrita en Shabram et al. (1997) *Human Gene Therapy* 8: 453:465, con la excepción que se usó el intercambiador aniónico con medio TMAE Fractogel (EM Industries, Gibbstown, NJ) en lugar de Resource Q, como se describió en el ejemplo 1 (véase la figura 1).

El adenovirus tipo 5 eluyó aproximadamente a un 60% de solución amortiguadora B durante el gradiente. Los demás serotipos (3, 4, 9, 11p, 16, 35 y 40) eluyeron, cada uno, a un tiempo de retención característico coherente con los tiempos de retención sobre Q Sepharose XL publicados por Blanche et al. (2000) *Gene Therapy* 7:1055-1062.

Ejemplo 4: Ensayo citolítico

Se midió la capacidad lítica viral usando una modificación del ensayo MTT (Shen et al., 2001). Brevemente, se usó el ensayo MTS (Ensayo de proliferación celular acuoso no radioactivo CellTiter 96® de Promega) en lugar del ensayo MTT dado que la conversión de MTS por las células en formazán soluble acuoso reduce el tiempo y elimina el uso del solvente orgánico volátil asociado con el ensayo MTT.

Para realizar el ensayo, se sembraron células a una densidad definida para cada línea de células tumorales que generaba una monocapa confluyente dentro de las 24 hs. Se dejó que estas células densamente sembradas crecieran durante

otros dos 2 días antes de exponerlas al o a los virus de prueba. Las infecciones de las células tumorales y primarias normales se efectuaron por cuadruplicado con diluciones en serie al tercio de los virus comenzando a una relación de
5 partícula por célula de 100 y terminando a una relación de partícula por célula de 0,005. Las células infectadas se incubaron a 37°C y el ensayo MTS se efectuó en los tiempos indicados para las células primarias individuales o líneas de células tumorales. Las células infectadas falsas sirvieron
10 como controles negativos y determinaron el punto de 100% de sobrevida para el ensayo dado.

Ejemplo 5: Secuenciación del ADN

La secuenciación de ADN de los ADN genómicos de Ad11p (SEQ ID N° 2) y de ColoAd1 (SEQ ID N° 1) se efectuó de la
15 siguiente manera. Brevemente, se digirió parcialmente el ADN de adenovirus purificado a partir de ColoAd1 y Ad11p con la endonucleasa de restricción Sau3A1 y se clonó por el método *shotgun* en el vector plásmido pBluescript II (Stratagene, La Jolla, CA). Los clones positivos fueron propagados y secuen-
20 ciados usando los cebadores M13R y KS (Stratagene, La Jolla, CA). Se ordenaron, editaron y ensamblaron las reacciones de secuencias individuales usando el equipo Sequencher™ (Gene Codes Corp., Ann Arbor, Michigan). Los huecos o faltas de coincidencia abarcados fueron amplificados con cebadores de
25 oligonucleótidos estándar y luego fueron secuenciados. Los

extremos de los genomas virales fueron secuenciados directamente a partir del ADN adenoviral. En todos los casos, cada genoma se secuenció con una cobertura de 3X+ y 431 bases con una cobertura de 2X.

5 Para determinar el origen de la región E2B de ColoAd1, se generaron dos conjuntos de cebadores, uno para el gen pTP E2B (bp9115, 5'GGGAGTTTCGCGCGGACACGG3' (SEQ ID N° 4) y bp 9350, 5' GCGCCGCCGCCGCGGAGAGGT3' (SEQ ID N° 5)) y uno para el gen de la ADN polimerasa (bp 7520
10 5'CGAGAGCCCATTCGTGCAGGTGAG3' (SEQ ID N°: 6) y bp 7982, 5'GCTGCGACTACTGCGGCCGTCTGT3' (SEQ ID N°: 7) y se usaron para aislar mediante PCR fragmentos de ADN de los diversos serotipos (Ad3, 4, 5, 9, 11p, 16 y 40) empleando los reactivos del conjunto de elementos para PCR Advantage 2 (Clonetics,
15 Walkersville, MD; N° catálogo K1910-Y) y el termociclador PTC-200 de MJ Research (Watertown, MA). Estos fragmentos fueron secuenciados entonces a lo largo de la secuencia de ADN de Ad3 usando secuenciación con terminador colorante junto con el analizador ABI 3100.

20 La región E2B de Ad3 fue secuenciada usando el ADN de Ad3 aislado y cebadores superpuestos.

La información de secuencia se analizó usando el programa Vector NTI (Informatix).

Ejemplo 6: Construcción de los virus recombinantes

25 Se purificaron los ADN genómicos de Ad11p (SEQ ID N° 2)

y ColoAd1 (SEQ ID N° 1) a partir de partículas de virus de bandas del gradiente de CsCl. Los ADN genómicos fueron digeridos con PacI que corta solamente una vez dentro del genoma viral. El corte de PacI se produce en la base 18141 de la
5 secuencia de nucleótidos de ColoAd1 (SEQ ID N°: 1) y en la base 18140 de la secuencia de nucleótidos de Ad11 (SEQ ID N°: 2). Los ADN digeridos se mezclaron en cantidades iguales y luego se ligaron en presencia de la T4 ADN ligasa a 16 °C durante la noche. Esta mezcla de ligación fue transfectada
10 en células A549 usando el conjunto de elementos para transfección con CaPO₄ de Invitrogen, Carlsbad, CA (N° catálogo K2780-01). Las placas aisladas fueron repicadas y examinadas mediante digestión con enzimas de restricción y análisis por PCR para distinguir las cuatro poblaciones virales (Ad11p,
15 ColoAd1, extremo izquierdo de Ad11p/extremo derecho de ColoAd1 (ColoAd1.1) y extremo izquierdo de ColoAd1/extremo derecho de Ad11p(ColoAd1.2)).

Se determinó la capacidad lítica viral de cada población en varias líneas celulares, incluyendo las líneas celulares HT29 y HUVEC, descritas en el ejemplo 3. Los resultados demostraron el orden de potencia, desde menos potente a
20 más potente, de Ad11p, ColoAd1.2, ColoAd1.1, ColoAd1 (véase la figura 7 por los resultados en células HT29).

También se construyeron los adenovirus quiméricos
25 pCJ144 y pCJ146, que contienen el genoma de longitud comple-

ta de ColoAd1 en el cual se ha restablecido la región E3 y E4 de tipo salvaje de Ad1p, respectivamente. Estas modificaciones fueron introducidas por recombinación homóloga en BJ5183 de *E. coli* (Chartier et al. (1996) *J. Virol.* 70: 4805-4810). Ambos adenovirus quiméricos demostraron una menor capacidad lítica en células HT29 y HUVEC en comparación con ColoAd1 o ColoAd1.2.

Ejemplo 7: Eficacia del adenovirus *in vivo*

Se usó un experimento típico con ratones desnudos con xenoinjertos de tumores humanos, donde los animales recibieron inyecciones de 5×10^6 células por vía subcutánea en el flanco posterior del ratón. Cuando los tumores habían alcanzado un tamaño de 100-200 μ l, se les inyectó vehículo (PBS) o virus a razón de 2×10^{10} partículas durante cinco días consecutivos (1×10^{11} partículas en total). Se observará una reducción en el tamaño del tumor con relación al control de PBS y otros virus control (Ad5, ONYX-015).

Ejemplo 8: Selectividad de ColoAd1 con explantes primarios de tejido humano

Se colocaron muestras de tejido de tumores colorrectales y tejidos adyacentes normales retirados con cirugía en medio de cultivo y luego fueron infectadas con cantidades iguales del virus ColoAd1 o bien, Ad5. Se recolectaron los sobrenadantes de cultivo 24 horas después de la infección y se determinó la cantidad de partículas virales producidas.

El virus ColoAd1 produjo más partículas virales por partícula introducida que Ad5 en el tejido tumoral, en tanto produjo menos partículas por partícula introducida que Ad5 en el tejido normal.

REIVINDICACIONES

1.Un adenovirus quimérico recombinante, o una variante o derivado del mismo que tiene un genoma que comprende una región E2B

5 en el que dicha región E2B comprende una secuencia de ácido nucleico derivada de un primer serotipo adenoviral y una secuencia de ácido nucleico derivada de un segundo serotipo adenoviral;

en el que dicho primer y segundo serotipos se seleccionan cada uno entre los subgrupos adenovirales B, C, D, E, o 10 F y son distintos entre sí; y

en el que dicho adenovirus quimérico es oncolítico y presenta un índice terapéutico mejorado para la célula tumoral.

15 2.El adenovirus de la reivindicación 1 que además comprende regiones que codifican proteínas de fibras, hexones y pentones, en el que el ácido nucleico que codifica las proteínas de fibras, hexones y pentones de dicho adenovirus proviene del mismo serotipo adenoviral.

20 3.El adenovirus de la reivindicación 1 que además comprende una región E3 modificada.

4.El adenovirus de la reivindicación 1 que además comprende una región E4 modificada.

5.El adenovirus de la reivindicación 1, en el que 25 dicha célula tumoral es una célula de un tumor de colon, ma-

ma, páncreas, pulmón, próstata, ovario o hematopoyético.

6.El adenovirus de la reivindicación 5, en el que dicha célula tumoral es una célula de tumor de colon.

7.El adenovirus de la reivindicación 1, en el que la
5 secuencia de nucleótidos de la región E2B de dicho adenovirus comprende la SEQ ID N°: 3, o una porción de la misma.

8.El adenovirus de la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos de dicho adenovirus comprende la SEQ ID N°: 1.

10 9.Un adenovirus quimérico recombinante, o una variante o derivado del mismo, que tiene un genoma que comprende una región E2B

en el que dicha región E2B comprende una secuencia de ácido nucleico derivada de un primer serotipo adenoviral y
15 una secuencia de ácido nucleico derivada de un segundo serotipo adenoviral;

en el que dicho primer y segundo serotipos adenovirales se seleccionan cada uno entre los subgrupos adenovirales B, C, D, E o F y son distintos entre sí;

20 en el que dicho adenovirus quimérico es oncolítico y presenta un índice terapéutico mejorado para la célula tumoral; y

en el que dicho adenovirus quimérico se ha vuelto deficiente para la replicación por supresión de una o más regiones adenovirales que codifican proteínas comprometidas en la
25

replicación adenoviral seleccionadas del grupo formado por E1, E2, E3 o E4.

10. El adenovirus de replicación deficiente de la reivindicación 9, en el que se han suprimido las regiones E1
5 y E3.

11. El adenovirus de replicación deficiente de la reivindicación 10 que además comprende una supresión de la región E4.

12. El adenovirus de la reivindicación 1 o de la
10 reivindicación 9 que además comprende un gen heterólogo, donde dicho gen heterólogo se expresa dentro de la célula infectada con dicho adenovirus.

13. El adenovirus de la reivindicación 12, en el que dicho gen heterólogo es de la timidina quinasa.

14. El adenovirus de la reivindicación 12, en el que
15 dicho gen heterólogo codifica una proteína terapéutica seleccionada del grupo formado por citoquinas y quimioquinas, anticuerpos, enzimas convertidoras de prodrogas y proteínas inmunorreguladoras.

15. Un método para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa que comprende infectar dicha célula cancerosa con el adenovirus de la reivindicación 1.

16. El método de la reivindicación 15, en el que dicha célula cancerosa es una célula de cáncer de colon.

17. El método de la reivindicación 16, en el que la
25

secuencia de nucleótidos de dicho adenovirus comprende la
SEQ ID N°: 1.

18. Un método para administrar una proteína terapéu-
tica a una célula que comprende infectar la célula con el
5 adenovirus de la reivindicación 14.

19. Un método para aislar el adenovirus de la rei-
vindicación 1, que comprende

- a) agrupar los serotipos adenovirales que representan los
subgrupos adenovirales B-F, creando así una mezcla ade-
10 noviral;
- b) someter la mezcla de adenovirus agrupados del paso (a) a
pasajes con un cultivo de células tumorales en creci-
miento activo a una relación de partícula por célula su-
ficientemente alta como para promover la recombinación
15 entre serotipos, pero no tan alta como para producir una
muerte celular prematura;
- c) cosechar el sobrenadante del paso (b);
- d) infectar un cultivo quiescente de células tumorales con
el sobrenadante cosechado en el paso (c);
- 20 e) cosechar el sobrenadante del cultivo celular del paso (d)
antes de la aparición de algún signo de CPE;
- f) infectar un cultivo quiescente de células tumorales con
el sobrenadante cosechado en el paso (e); y
- g) aislar el virus de la reivindicación 1 a partir del so-
25 brenadante cosechado en el paso (f) por purificación en

placa.

20. El método de la reivindicación 19, en el que el paso (b) se efectúa dos veces antes de cosechar el sobrenadante en el paso (c).

5 21. El método de la reivindicación 19, en el que los pasos (e) y (f) se repiten hasta 20 veces antes del paso (g).

22. El método de la reivindicación 19, en el que la segunda ronda de purificación en placa se efectúa después
10 del paso (g).

23. El método de la reivindicación 19, en el que la célula tumoral es una célula de tumor de colon, mama, páncreas, pulmón, próstata, ovario o hematopoyético.

24. Un adenovirus quimérico recombinante, o una variante o derivado del mismo, que tiene un genoma que comprende una región E2B
15

en el que dicha región E2B comprende una secuencia de ácido nucleico derivada de un primer serotipo adenoviral y una secuencia de ácido nucleico derivada de un segundo serotipo adenoviral;
20

en el que dicho primer y segundo serotipos adenovirales se seleccionan cada uno entre los subgrupos adenovirales B, C, D, E o F y son distintos entre sí; y

en el que dicho adenovirus quimérico es oncolítico y
25 presenta un índice terapéutico mejorado para la célula tumo-

ral;

y es producido con un método que comprende los pasos de

- a) agrupar los serotipos adenovirales que representan los subgrupos adenovirales B-F, creando así una mezcla adenoviral;
- b) someter la mezcla de adenovirus agrupados del paso (a) a pasajes con un cultivo de células tumorales en crecimiento activo a una relación de partícula por célula suficientemente alta como para promover la recombinación entre serotipos, pero no tan alta como para producir una muerte celular prematura;
- c) cosechar el sobrenadante del paso (b);
- d) infectar un cultivo quiescente de células tumorales con el sobrenadante cosechado en el paso (c);
- e) cosechar el sobrenadante del cultivo celular del paso (d) antes de la aparición de algún signo de CPE;
- f) infectar un cultivo quiescente de células tumorales con el sobrenadante cosechado en el paso (e); y
- g) aislar dicho adenovirus quimérico a partir del sobrenadante cosechado en el paso (f) por purificación en placa.

25. El método de la reivindicación 24, en el que el paso (b) se efectúa dos veces antes de cosechar el sobrenadante en el paso (c).

26. El método de la reivindicación 24, en el que los

pasos (e) y (f) se repiten hasta 20 veces antes del paso (g).

27. El método de la reivindicación 24, en el que la segunda ronda de purificación en placa se efectúa después
5 del paso (g).

FIGURA 1A

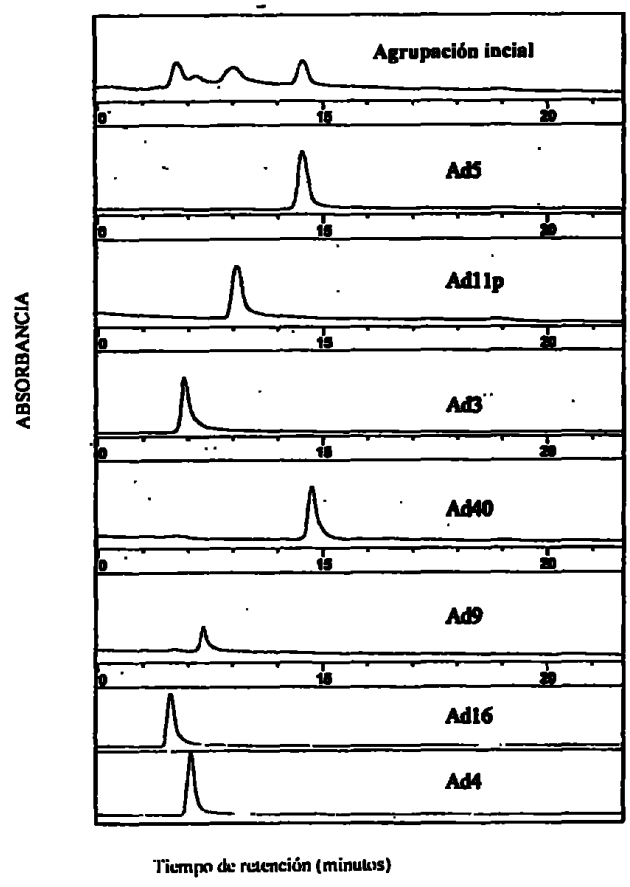


FIGURA 1B

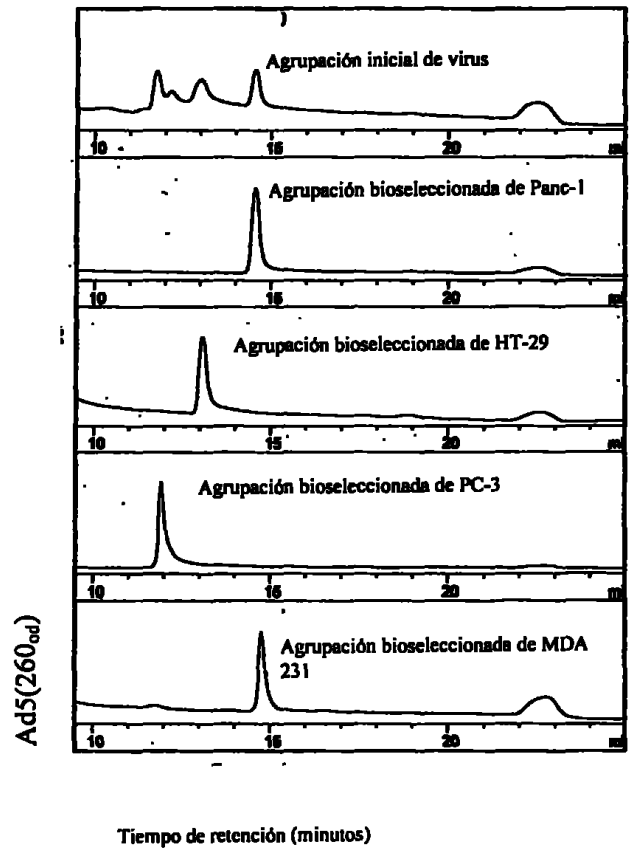
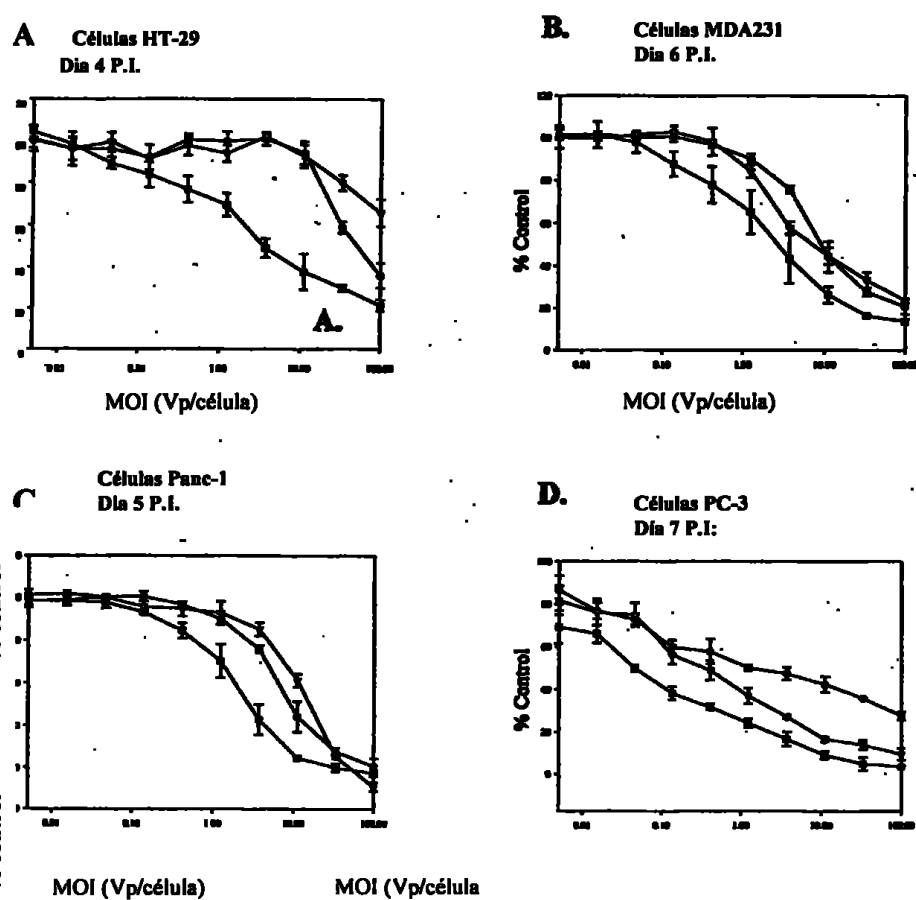
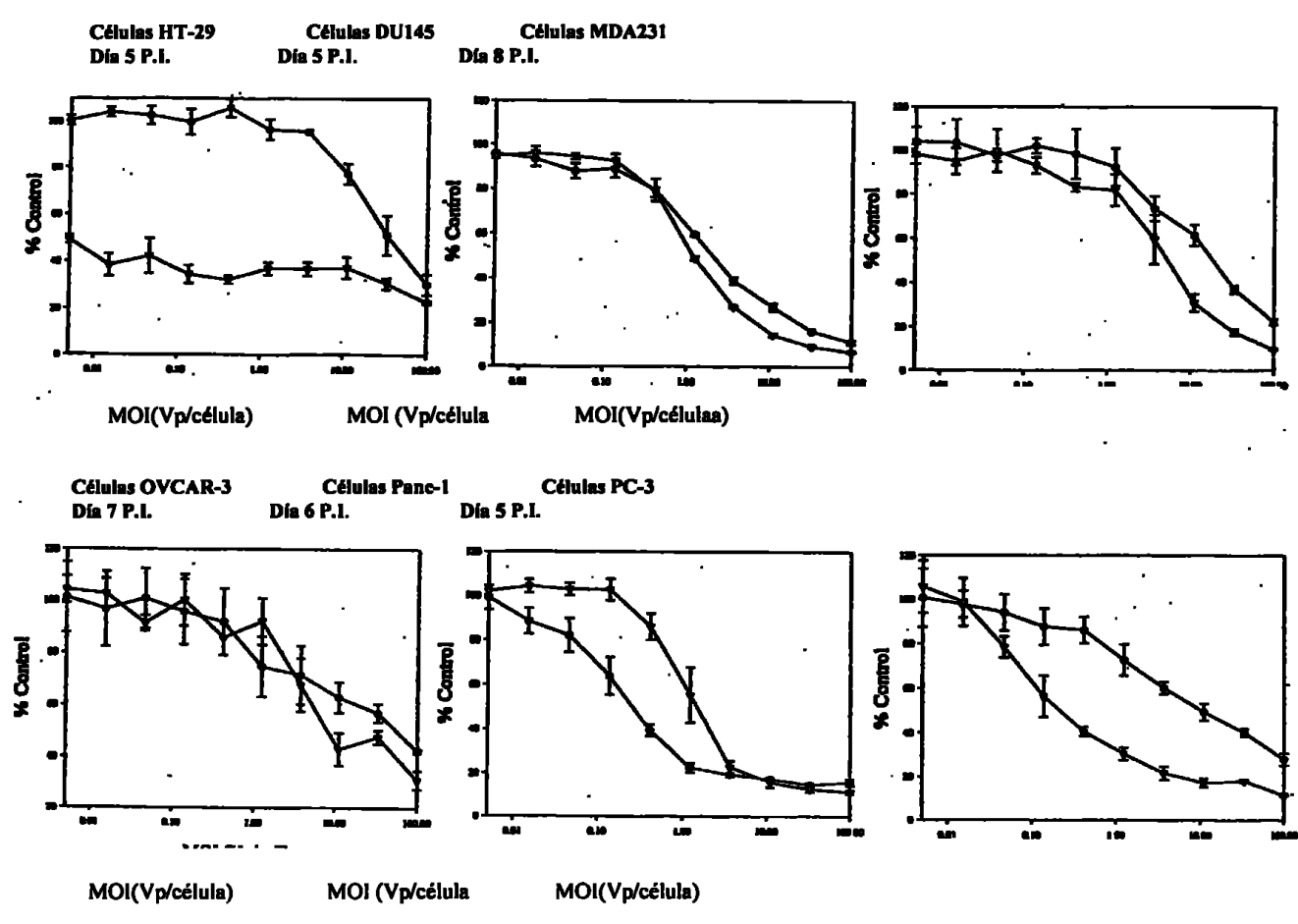


FIGURA 2

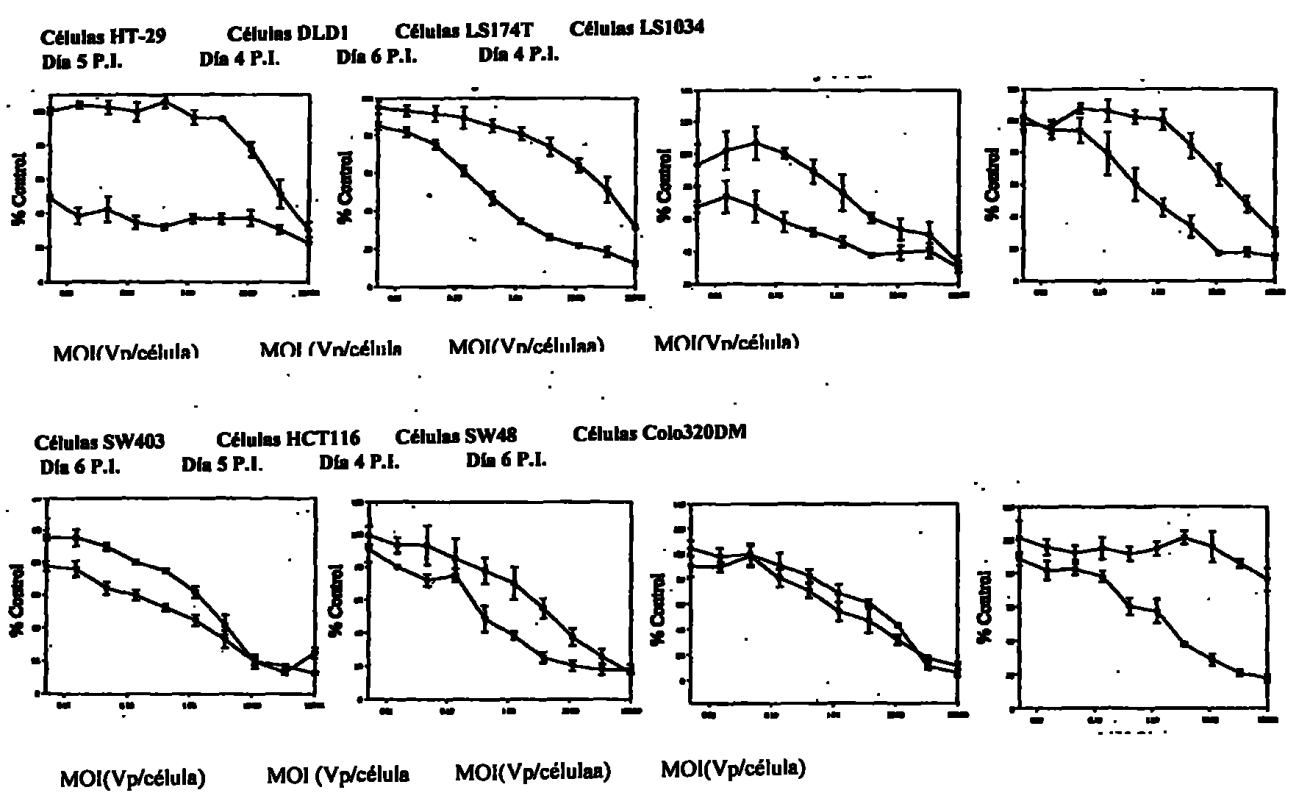


4/9

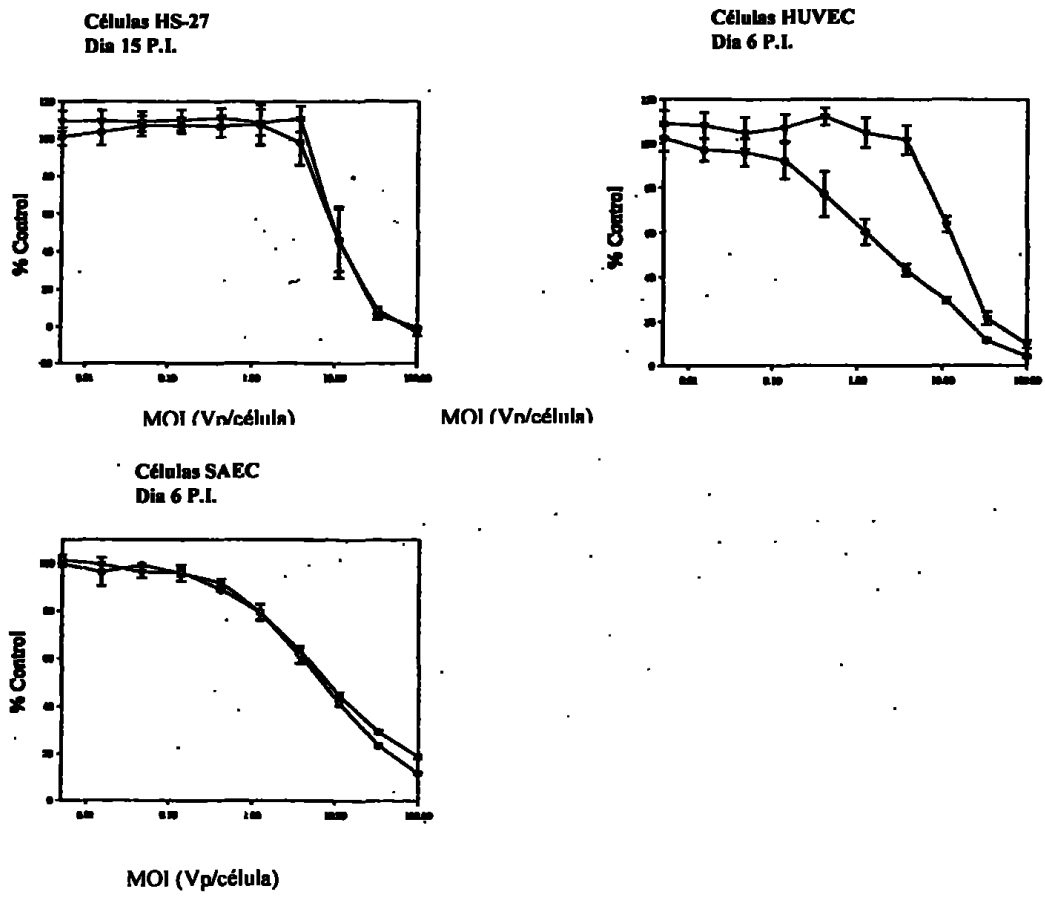
FIGURA 3 A



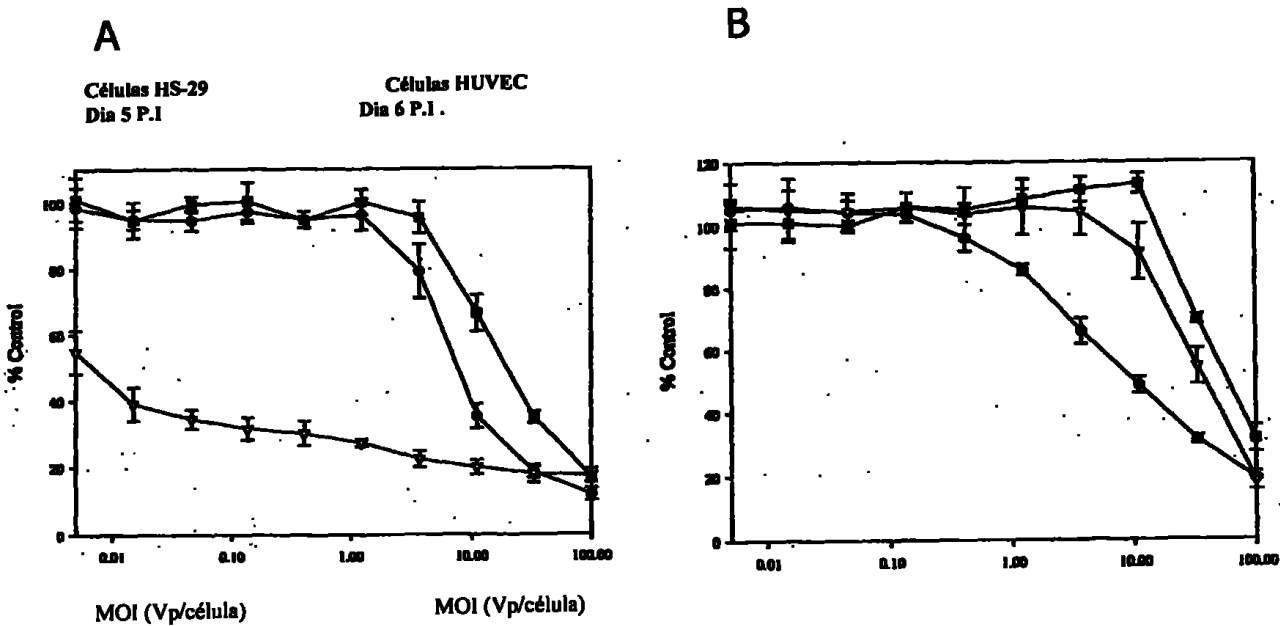
5/9
FIGURA 3E



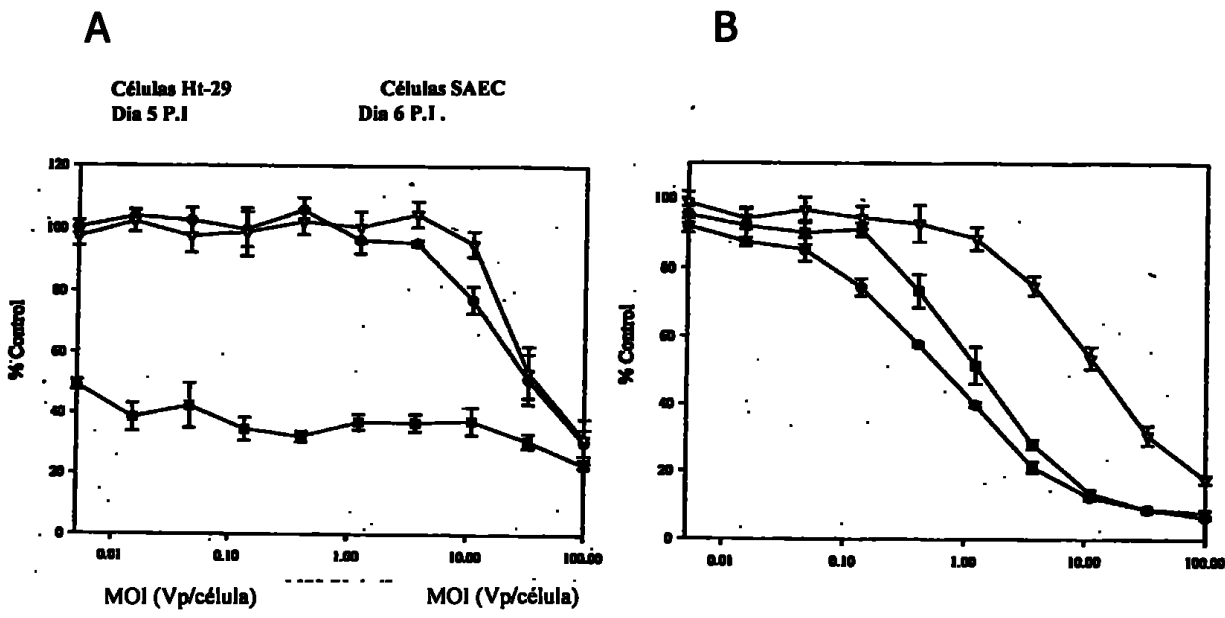
6/9
FIGURA 4



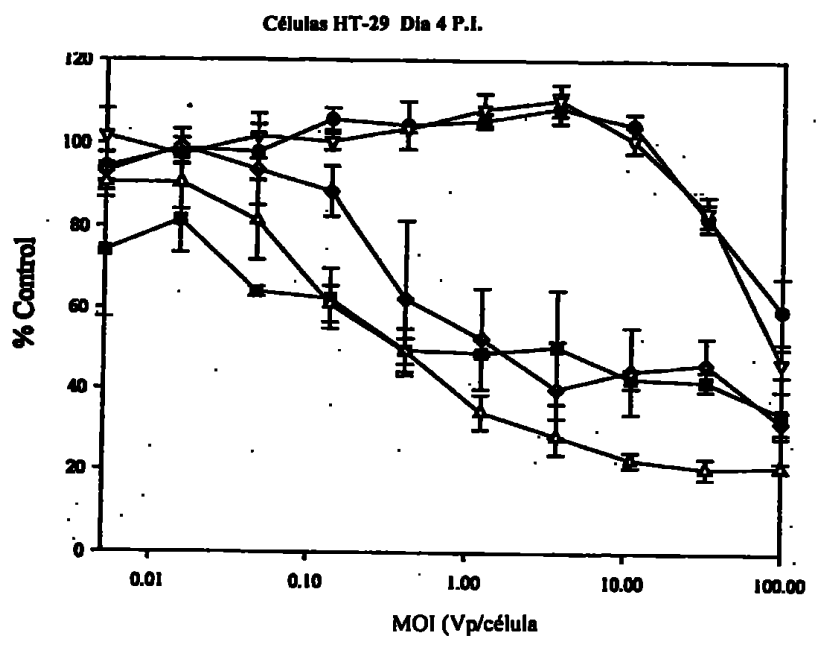
7/9
FIGURA 5



8/9
FIGURA 6



9/9
FIGURA 7



LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> ADENOVIRUS QUIMÉRICOS PARA USO EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

<130> 53183AUSM1

<150> US 60/574.851

<151> 2004-05-26

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 32325

<212> ADN

<213> Adenovirus

<400> 1

ctatctatat aatatacctt atagatggaa tgggtgccaat atgtaaatga ggtgatttta	60
aaaagtgtgg atcgtgttgt gattggctgt ggggttaacg gctaaaaggg gcggtgcgac	120
cgtgggaaaa tgacgttttg tgggggtgga gtttttttgc aagttgtcgc gggaaatgtg	180
acgcataaaa aggctttttt ctcacggaac tacttagttt tcccacggta tttaacagga	240
aatgaggtag ttttgaccgg atgcaagtga aaattgttga ttttcgcgcg aaaactgaat	300
gaggaagtgt ttttctgaat aatgtggtat ttatggcagg gtggagtatt tggtcagggc	360
caggtagact ttgaccatt acgtggaggt ttcgattacc gtgtttttta cctgaatttc	420
cgcgtagcgt gtcaaagtct tctgttttta cgtaggtgtc agctgatcgc tagggatttt	480
atacctcagg gtttgtgtca agaggccact cttgagtgcc agcgagaaga gttttctcct	540
ctgcgccggc agtttaataa taaaaaaatg agagatttgc gatttctgcc tcaggaaata	600
atctctgctg agactggaaa tgaaatattg gagcttgtgg tgcacgccct gatgggagac	660
gatccggagc cacctgtgca gctttttgag cctcctacgc ttcaggaact gtatgattta	720
gaggtagagg gatcggagga ttctaattgag gaagctgtaa atggcttttt taccgattct	780
atgcttttag ctgctaataa agggttagaa ttagatccgc ctttgacac ttttgatact	840
ccaggggtaa ttgtggaaaag cggtagcagg gtaagaaaat tacctgattt gagttccgtg	900
gactgtgatt tgcactgcta tgaagacggg tttcctccga gtgatgagga ggaccatgaa	960
aaggagcagt ccatgcagac tgcagcgggt gagggagtga aggctgccaa tggttggtttt	1020
cagttggatt gcccggagct tcctggacat ggctgtaagt cttgtgaatt tcacaggaaa	1080
aatactggag taaaggaact gttatgttcg ctttgttata tgagaacgca ctgccacttt	1140

atttacagta agtgtgttta agttaaaatt taaaggaata tgctgttttt cacatgtata	1200
ttgagtgtga gttttgtgct tcttattata ggtcctgtgt ctgatgctga tgaatcacca	1260
tctcctgatt ctactacctc acctcctgag attcaagcac ctgttcctgt ggacgtgcgc	1320
aagcccattc ctgtgaagct taagcctggg aaacgtccag cagtggaaaa acttgaggac	1380
ttgttacagg gtggggacgg acctttggac ttgagtacac ggaaacgtcc aagacaataa	1440
gtgttcata tccgtgttta cttaagggtga cgtcaatatt tgtgtgacag tgcaatgtaa	1500
taaaaatatg ttaactgttc actgggtttt attgcttttt gggcggggac tcaggatatat	1560
aagtagaagc agacctgtgt ggtagctca taggagctgg ctttcatcca tggaggtttg	1620
ggccattttg gaagacctta ggaagactag gcaactgtta gagaacgctt cggacggagt	1680
ctccggtttt tggagattct ggttcgctag tgaattagct agggtagttt ttaggataaa	1740
acaggactat aaacaagaat ttgaaaagtt gttggtagat tgcccaggac tttttgaagc	1800
tcttaatttg ggccatcagg ttcactttta agaaaaagtt ttatcagttt tagacttttc	1860
aaccccaggt agaactgctg ctgctgtggc ttttcttact tttatattag ataaatggat	1920
cccgagact catttcagca ggggatacgt tttggatttc atagccacag cattgtggag	1980
aacatggaag gttcgcaaga tgaggacaat cttaggttac tggccagtgc agcctttggg	2040
tgtagcggga atcctgaggc atccaccggc catgccagcg gttctggagg aggaacagca	2100
agaggacaac ccgagagccg gcctggaccc tccagtggag gaggcggagt agctgacttg	2160
tctcctgaac tgcaacgggt gcttactgga tctacgtcca ctggacggga taggggcgtt	2220
aagagggaga gggcatctag tggtagctgat gctagatctg agttggcttt aagtttaatg	2280
agtcgcagac gtccctgaaac ctttgggtgg catgaggttc agaaagaggg aagggatgaa	2340
gtttctgtat tgcaggagaa atattcactg gaacagggtga aaacatgttg gttggagcct	2400
gaggatgatt gggaggtggc cattaaaaat tatgccaaaga tagctttgag gcctgataaa	2460
cagtataaga ttactagacg gattaatatc cggaatgctt gttacatatc tggaaatggg	2520
gctgaggtgg taatagatac tcaagacaag gcagttatta gatgctgcat gatggatatg	2580
tggcctgggg tagtcggtat ggaagcagta acttttgtaa atgttaagtt taggggagat	2640
ggttataatg gaatagtgtt tatggccaat accaaactta tattgcatgg ttgtagcttt	2700
tttggtttca acaataacctg tgtagatgcc tggggacagg ttagtgtagc gggatgtagt	2760
ttctatgcgt gttggattgc cacagctggc agaaccaaga gtcaattgtc tctgaagaaa	2820
tgcatatttc aaagatgtaa cctgggcatt ctgaatgaag gcgaagcaag ggtccgccac	2880
tgcgcttcta cagatactgg atgttttatt ttgattaagg gaaatgccag cgtaaagcat	2940
aacatgattt gcggtgcttc cgatgagagg ccttatcaaa tgctcacttg tgctggtggg	3000

cattgtaata tgctggctac tgtgcatatt gtttcccatc aacgcaaaaa atggcctggt 3060
 tttgatcaca atgtgatgac gaagtgtacc atgcatgcag gtgggcgtag aggaatgttt 3120
 atgccttacc agtghtaacat gaatcatgtg aaagtgttgt tggaaccaga tgccttttcc 3180
 agaatgagcc taacaggaat ttttgacatg aacatgcaaa tctggaagat cctgaggtat 3240
 gatgatacga gatcgagggg acgcgcatgc gaatgcggag gcaagcatgc caggttccag 3300
 ccggtgtgtg tagatgtgac tgaagatctc agaccggatc atttggttat tgcccgcaact 3360
 ggagcagagt tcggatccag tggagaagaa actgactaag gtgagtattg ggaaaacttt 3420
 ggggtgggat tttcagatgg acagattgag taaaaatttg ttttttctgt cttgcagctg 3480
 tcatgagtgg aaacgcttct ttttaagggg gagtcttcag cccttatctg acagggcgctc 3540
 tcccatcctg ggcaggaggt cgtcagaatg ttatgggatc tactgtggat ggaagaccgc 3600
 tccaaccgcg caattcttca acgctgacct atgctacttt aagttcttca cctttggacg 3660
 cagctgcagc tgccgcgcgc gcttctgttg ccgctaacac tgtgcttga atgggttact 3720
 atggaagcat catggctaata tccacttctc ctaataaccc ttctaccctg actcaggaca 3780
 agttacttgt ccttttggcc cagctggagg ctttgaccca acgtctgggt gaactttctc 3840
 agcaggtggt cgagttgcga gtacaaactg agtctgctgt cggcacggca aagtctaaat 3900
 aaaaaaatcc cagaatcaat gaataaataa acaagcttgt tgttgattta aaatcaagtg 3960
 tttttatttc atttttcgcg cacggtatgc cctagaccac cgatctctat cattgagaac 4020
 tcggtggatt ttttccagga tcctatagag gtgggattga atgttttagat acatgggcat 4080
 taggccgtct ttggggtgga gatagctcca ttgaagggat tcatgctccg gggtagtggt 4140
 gtaaatacacc cagtcataac aaggctgcag tgcatgggtg tgcacaatat cttttagaag 4200
 taggctgatt gccacagata agcccttggg gtaggtgttt acaaaccggg tgagctggga 4260
 tgggtgcatt cggggtgaaa ttatgtgcat tttggattgg atttttaagt tggcaatatt 4320
 gccgccaaga tcccgctctg ggttcatgtt atgaaggacc accaagacgg tgtatccggg 4380
 acatttagga aatttatcgt gcagcttga tggaaaagcg tggaaaaatt tggagacacc 4440
 cttgtgtcct ccaagatttt ccatgcactc atccatgata atagcaatgg ggccgtgggc 4500
 agcggcgcg gcaaacacgt tccgtgggtc tgacacatca tagttatgtt cctgagttaa 4560
 atcatcataa gccattttta tgaatttggg gcggagagta ccagattggg gtatgaatgt 4620
 tccttcgggc cccggagcat agttcccctc acagatttgc atttcccaag ctttcagttc 4680
 cgagggtgga atcatgtcca cctggggggc tatgaaaaac accgtttctg gggcgggggt 4740
 gattaattgt gatgatagca aatttctgag caattgagat ttgccacatc cgggtggggc 4800

ataaatgatt	ccgattacgg	gttgacaggtg	gtagtttagg	gaacggcaac	tgccgtcttc	4860
togaagcaag	ggggccacct	cgttcatcat	ttcccttaca	tgcataat	cccgcaccaa	4920
atccattagg	aggcgctctc	ctcctagtga	tagaagtctt	tgtagtgagg	aaaagttttt	4980
cagcggtttc	agaccgtcag	ccatgggcat	tttgagagag	gtttgctgca	aaagtcttag	5040
tctgttccac	agttcagtga	tgtgttctat	ggcatctcga	tccagcagac	ctcctcgttt	5100
cgcggttttg	gacggctcct	ggaatagggt	atgagacgat	gggcgtccag	cgctgccagg	5160
gttcggtcct	tccagggtct	cagtgttcga	gtcagggttg	tttccgtcac	agtgaagggg	5220
tgtgcgcctg	cttgggcgct	tgccagggtg	cgcttcagac	tcatcctgct	ggtcgaaaac	5280
ttctgtcgct	tggcgccctg	tatgtcggcc	aagtagcagt	ttaccatgag	ttcgtagttg	5340
agcgccctcg	ctgcgtggcc	tttggcgcg	agcttacctt	tggaagt	cttgcatacc	5400
gggcagtata	ggcatttcag	cgcatacaac	ttgggcgcaa	ggaaaacgga	ttctggggag	5460
tatgcatctg	cgccgcagga	ggcgcaaaca	gtttcacatt	ccaccagcca	ggttaaattc	5520
ggttcatttg	ggtcaaaaac	aagttttccg	ccataat	tgatgcgttt	cttacctttg	5580
gtctccatga	gttcgtgtcc	tcggtgagtg	acaaacaggc	tgtccgtgtc	cccgtagact	5640
gattttacag	gcctcttctc	cagtggagtg	cctcggtctt	cttcgtacag	gaactctgac	5700
cactctgata	caaaggcgcg	cgtccaggcc	agcacaaagg	aggctatgtg	ggaggggtag	5760
cgatcgttgt	caaccagggg	gtccaccttt	tccaaagtat	gcaaacacat	gtcacccctc	5820
tcaacatcca	ggaatgtgat	tggcttgtag	gtgtatttca	cgtgacctgg	ggccccgct	5880
gggggggtat	aaaagggggc	ggttctttgc	tcttcctcac	tgtcttcggg	atcgctgtcc	5940
aggaacgtca	gctgttgggg	taggtattcc	ctctcgaagg	cgggcatgac	ctctgcactc	6000
aggttgtcag	tttctaagaa	cgaggaggat	ttgatattga	cagtgccggg	tgagatgcct	6060
ttcatgaggt	tttcgtccat	ctggtcagaa	aacacaat	ttttattgtc	aagtttggtg	6120
gcaaattgatc	catacagggc	gttgataaaa	agtttggcaa	tggatcgcat	ggtttggttc	6180
ttttccttgt	ccgcgcgctc	tttggcgggc	atgttgagtt	ggacatactc	gcgtgccagg	6240
cacttccatt	cggggaagat	agttgttaat	tcatctggca	cgattctcac	ttgccaccct	6300
cgattatgca	aggtaattaa	atccacactg	gtggccacct	cgctcgaag	gggttcattg	6360
gtccaacaga	gcctacctcc	tttcctagaa	cagaaagggg	gaagtgggtc	tagcataagt	6420
tcatcgggag	ggtctgcatc	catggtaaag	attcccgga	gtaaatcctt	atcaaaatag	6480
ctgatgggag	tggggtcatc	taaggccatt	tgccattctc	gagctgccag	tgcgcgctca	6540
catgggttaa	ggggactgcc	ccatggcatg	ggatgggtga	gtgcagaggc	atacatgcca	6600
cagatgtcat	agacgtagat	gggatcctca	aagatgccta	tgtaggtttg	atagcatcgc	6660

cccctctga tacttgctcg cacatagtca tatagttcat gtgatggcgc tagcagcccc 6720
 ggaccaagt tggcgcgatt gggtttttct gttctgtaga cgatctggcg aaagatggcg 6780
 tgagaattgg aagagatggg gggcttttga aaaatgttga aatgggcgatg aggtagacct 6840
 acagagtctc tgacaaagtg ggcataagat tcttgaagct tggttaccag ttcggcgggtg 6900
 acaagtacgt ctaggcgca gtagtcaagt gtttcttgaa tgatgtcata acctgggttg 6960
 ttttctttt cccacagttc gcggttgaga aggtattctt cgcgatcctt ccagtactct 7020
 tctagcggaa acccgtcttt gtctgcacgg taagatccta gcatgtagaa ctgattaact 7080
 gccttgtaag ggcagcagcc cttctctacg ggtagagagt atgcttgagc agcttttcgt 7140
 agcgaagcgt gagtaagggc aaagggtgtct ctgaccatga ctttgaggaa ttgggtatttg 7200
 aagtcgatgt cgtcacaggc tccctgttcc cagagttgga agtctacccg tttctttag 7260
 gcggggttg gcaaagcgaa agtaacatca ttgaagagaa tcttgccggc cctgggcgatg 7320
 aaattgcgag tgatgcgaaa aggtgtggt acttcgcctc gggtattgat aacctgggca 7380
 gctaggacga tctcgtcgaa accgttgatg ttgtgtccta cgatgtataa ttctatgaaa 7440
 cgcggcgtgc ctctgacgtg aggtagctta ctgagctcat caaaggtag gtctgtgggg 7500
 tcagataagg cgtagtgttc gagagcccat tcgtgcagggt gaggattcgc ttaaggaag 7560
 gaggaccaga ggtccactgc cagtgtgtt tgtaactggt cccggtactg acgaaaatgc 7620
 cgtccgactg ccattttttc tggggtgacg caatagaagg tttgggggtc ctgccgccag 7680
 cgatccact tgagttttat ggcgaggtca taggcgatgt tgacgagccg ctggtctcca 7740
 gagagtttca tgaccagcat gaaggggatt agctgcttgc caaaggaccc catccagggtg 7800
 taggtttcca catcgtagggt gagaaagagc ctttctgtgc gaggatgaga gccaatcggg 7860
 aagaactgga tctcctgccca ccagttggag gaatggctgt tgatgtgatg gaagtagaac 7920
 tccctgcgac gcgccgagca ttcatgcttg tgcttgtaga gacggccgca gtagtcgcag 7980
 cgttgcacgg gttgtatctc gtgaatgagt tgtacctggc ttcccttgac gagaaatttc 8040
 agtgggaagc cgaggcctgg cgattgtatc tcgtgcttta ctatgttgtc tgcacggcc 8100
 tgttcattct ctgtctcgat ggtgggtcatg ctgacgagcc ctcgcgggag gcaagtccag 8160
 acctcggcgc ggcaggggcg gagctcgagg acgagagcgc gcaggctgga gctgtccagg 8220
 gtcctgagac gctgcggact caggttagta ggcagtgtca ggagattaac ttgcatgatc 8280
 ttttgagggg cgtgcgggag gttcagatag tacttgatct caacgggtcc gttggtggag 8340
 atgtcgatgg cttgcagggt tccgtgtccc ttgggcgcta ccaccgtgcc cttgtttttc 8400
 attttgagcg gcggtggctc tgttgcttct tgcatgttta gaagcgggtg cgagggcgcg 8460

caccgggcg	caggggcg	tgggaccc	gcggcatgg	tggcagtgg	acgtcggcg	8520
cgcgcgcg	taggttctg	tactgcgcc	tgagaagact	cgcatgcgc	acgacgcgg	8580
ggttgacat	ctggatctg	cgctctggg	tgaagctac	cgccccgtg	agcttgaacc	8640
tgaagagag	ttcaacagaa	tcaatctcg	tatcgttgac	ggcggcttg	ctaaggattt	8700
cttgcacgt	accagagtt	tcctggtag	cgatctccg	catgaactg	tcgatctct	8760
cctcttgaag	atctccgcg	cccgtctct	cgacggtgg	cgcgaggtc	ttggagatg	8820
gccaatgag	ttgagagaat	gcattcatg	ccgcctcgt	ccagacgcg	ctgtagacca	8880
cgcccccc	gggatctct	gcgcgcata	ccacctggg	gaggttgag	tccacgtgg	8940
gggtgaagac	cgcatagtt	cataggcgt	ggaaaaggta	gttgagtgt	gtggcgatgt	9000
gctcggtgac	gaagaaata	atgatccat	gtctcagcg	catctcgct	acatcgcccc	9060
gagcttccaa	gcgctccat	gcctcgtag	agtccacgg	aaaattaaaa	aactgggagt	9120
ttcgcgcgga	cacggtcaac	tcctcttcca	gaagacggat	aagttcggcg	atggtggtg	9180
gcacctcgc	ctcgaaagcc	cctgggattt	cttctcaat	ctcttcttct	tccactaaca	9240
tctcttctc	ttcaggtgg	gctgcaggag	gagggggaac	gcggcgacg	cggcggcgca	9300
cgggcagac	gtcgatgaat	ctttcaatga	cctctccgc	gcggcggcg	atggtttcag	9360
tgacggcgcg	gccgttctc	cgcggtcgca	gagtaaaaac	accgcgcgc	atctccttaa	9420
agtggtgact	gggaggttct	ccgtttggga	gggagaggg	gctgattata	cattttatta	9480
attggcccg	agggactgca	cgagagatc	tgatcgtgt	aagatccac	ggatctgaaa	9540
acctttcgac	gaaagcgtct	aaccagtcac	agtcacaagg	taggctgagt	acggcttctt	9600
gtgggcggg	gtggttatgt	gttcggtct	ggtcttctgt	ttcttcttca	tctcggaag	9660
gtgagacgat	gctgctggt	atgaaattaa	agtaggcagt	tctaagacg	cggatggtg	9720
cgaggagcac	caggtcttt	ggtccggct	gctggatac	caggcgatt	gccattcccc	9780
aagcattatc	ctgacatcta	gcaagatctt	tgtagtagtc	ttgcatgag	cgttctacg	9840
gcacttcttc	ctcacccg	ctgccatgca	tacgtgtgag	tccaaatcc	cgcatgggt	9900
gtaccagtg	caagtcagct	acgactcttt	cggcgaggat	ggcttgctgt	acttgggtaa	9960
gggtggcttg	aaagtcata	aaatccacaa	agcggtggt	agtcctgta	ttaatggtgt	10020
aagcacagtt	ggccatgact	gaccagttaa	ctgtctggt	accagggcg	acgagctcg	10080
tgtattttaag	gcgcgaatag	gcgcgggtgt	caaagatgta	atcgttgcag	gtgcgcacca	10140
gatactggta	ccctataaga	aaatgcggcg	gtggttggcg	gtagagagg	catcgttctg	10200
tagctggagc	gccagggcg	aggtcttcca	acataaggcg	gtgatagcc	tagatgtacc	10260
tggacatcca	ggtgattcct	gcggcggtag	tagaagcccc	aggaaactcg	cgtacgcggt	10320

tcctaatggt gcgtagcggc atgaagtagt tcattgtagg cacggtttga ccagtgaggc 10380
 gcgcgcagtc attgatgctc tatagacacg gagaaaatga aagcggttcag cgactcgact 10440
 ccgtagcctg gaggaacgtg aacgggttgg gtcgcggtgt acccgggttc gagacttgta 10500
 ctcgagccgg ccggagccgc ggctaacgtg gtattggcac tcccgtctcg acccagccta 10560
 caaaaatcca ggatacggaa tcgagtcgtt ttgctggttt ccgaatggca gggagtgag 10620
 tcctatTTTT tttttttgcc gctcagatgc atcccgtgct gcgacagatg cgtccccaac 10680
 aacagccccc ctgcagcag cagcagcagc aatcacaaaa ggctgtccct gcaactactg 10740
 caactgccgc cgtgagcggc gcgggacagc ccgcctatga tctggacttg gaagagggcg 10800
 aaggactggc acgtctaggt gcgccttcac ccgagcggca tccgcgagtt caactgaaaa 10860
 aagattctcg cgaggcgat gtgcccacac agaacctatt tagagacaga agcggcgagg 10920
 agccggagga gatgcgagct tcccgtttta acgcgggtcg tgagctgctg cacggtttgg 10980
 accgaagacg agtggttgcg gacgaggatt tcgaagtga tgaaatgaca gggatcagtc 11040
 ctgccagggc acacgtggct gcagccaacc ttgtatcggc ttacgagcag acagtaaagg 11100
 aagagcgtaa cttccaaaag tcttttaata atcatgtgcg aacctgatt gccgcgaag 11160
 aagttaccct tggtttgatg cttttgtggg atttgatgga agctatcatt cagaacccta 11220
 ctagcaaacc tctgaccgcc cagctgtttc tgggtggtgca acacagcaga gacaatgagg 11280
 ctttcagaga ggcgtgctg aacatcaccg aaccggaggg gagatgggtg tatgatctta 11340
 tcaacattct acagagtatc atagtgcagg agcggagcct gggcctggcc gagaagggtg 11400
 ctgccatcaa ttactcgggt ttgagcttgg gaaaatatta cgctcgcaa atctacaaga 11460
 ctccatagc tcccatagac aaggagggtga agatagatgg gttctacatg cgcagtcgc 11520
 tcaaggctct gaccctgagc gatgatcttg ggggtgtatc caatgacaga atgcatcgcg 11580
 cggtttagcgc cagcaggagg cgcgagttaa gcgacaggga actgatgcac agtttgcaaa 11640
 gagctctgac tggagctgga accgaggggt agaattactt cgacatggga gctgacttgc 11700
 agtggcagcc tagtcgcagg gctctgagcg ccgcgacggc aggatgtgag cttccttaca 11760
 tagaagaggc ggatgaaggc gaggaggaag agggcgagta cttggaagac tgatggcaca 11820
 acccgtgttt tttgctagat ggaacagcaa gcaccggatc ccgcaatgcg ggcggcgctg 11880
 cagagccagc cgtccggcat taactcctcg gacgattgga ccagggccat gcaacgtatc 11940
 atggcggtga cgactcgcaa cccgaagcc tttagacagc aacccaggc caaccgtcta 12000
 tcggccatca tggaagctgt agtgccttcc cgctctaata cactcatga gaaggctctg 12060
 gccatcgtga acgcgttggg ggagaacaaa gctattcgtc cagatgaggc cggactggta 12120

tacaacgctc	ctttagaacg	cgtggctcgc	tacaacagta	gcaatgtgca	aaccaatttg	12180
gaccgtatga	taacagatgt	acgcgaagcc	gtgtctcagc	gcgaaagggt	ccagcgtgat	12240
gccaacctgg	gttcgctggg	ggcgttaaat	gctttcttga	gtactcagcc	tgctaattgt	12300
ccgcgtgggc	aacaggatta	tactaacttt	ttaagtgcct	tgagactgat	ggtatcagaa	12360
gtacctcaga	gcgaagtgtg	tcagtcgggt	cctgattact	tctttcagac	tagcagacag	12420
ggcttgacga	cggtaaatct	gagccaagct	tttaaaaacc	tttaaagggt	tgtggggagt	12480
gcatgccccg	gtaggagaaa	gagcaaccgt	gtctagcttg	ttaactccga	actcccgctt	12540
attattactg	ttggtagctc	ctttcaccga	cagcggtagc	atcgaccgta	attcctattt	12600
gggttaccta	ctaaacctgt	atcgcgagc	catagggcaa	agtcagggtg	acgagcagac	12660
ctatcaagaa	attaccaag	tcagtcgcgc	tttgggacag	gaagacactg	gcagtttgga	12720
agccactctg	aacttcttgc	ttaccaatcg	gtctcaaaag	atccctcttc	aatatgctct	12780
tactgaggag	gaggagagga	tccttagata	tgtgcagcag	agcgtgggat	tgtttctgat	12840
gcaagagggg	gcaactccga	ctgcagcact	ggacatgaca	gcgcgaaata	tgagagccag	12900
catgtatgcc	agtaaccgac	ctttcattaa	caaactgctg	gactacttgc	acagagctgc	12960
cgctatgaac	tcgtattatt	tcaccaatgc	catcttaaac	ccgcactggc	tgccccacc	13020
tggtttctac	acgggcgaat	atgacatgcc	cgacccta	gacggatttc	tgtgggacga	13080
cgtggacagc	gatgtttttt	cacctctttc	tgatcatcgc	acgtggaaaa	aggaaggcgg	13140
cgatagaatg	cattcttctg	catcgctgtc	cggggtcatg	ggtgctaccg	cggtgagcc	13200
cgagtctgca	agtccttttc	ctagtctacc	cttttctcta	cacagtgtac	gtagcagcga	13260
agtgggtaga	ataagtcgcc	cgagttta	gggcgaagag	gagtatctaa	acgattcctt	13320
gctcagaccg	gcaagagaaa	aaaatttccc	aaacaatgga	atagaaagtt	tgggtggataa	13380
aatgagtaga	tggaagactt	atgctcagga	tcacagagac	gagcctggga	tcaggggat	13440
tacaagtaga	gcgagccgta	gacgccagcg	ccatgacaga	cagaggggtc	ttgtgtggga	13500
cgatgaggat	tcggccgatg	atagcagcgt	gctggacttg	ggtgggagag	gaaggggcaa	13560
cccgtttgct	catttgcgcc	ctcgcttggg	tggtatgttg	taaaaaaaaa	taaaaaaaaa	13620
actaccaag	gccatggcga	cgagcgtacg	ttcgttcttc	tttattatct	gtgtctagta	13680
taatgaggcg	agtcgtgcta	ggcggagcgg	tggtgtatcc	ggagggctct	cctccttcgt	13740
acgagagcgt	gatgcagcag	cagcaggcga	cggcggtgat	gcaatcccca	ctggaggctc	13800
cctttgtgcc	tccgcgatac	ctggcaccta	cgaggggcag	aaacagcatt	cgttattcgg	13860
aactggcacc	tcagtacgat	accaccaggt	tgtatctggt	ggacaacaag	tcggcgggaca	13920
ttgcttctct	gaactatcag	aatgaccaca	gcaacttctt	gaccacggtg	gtgcaaaaca	13980

atgactttac	ccctacggaa	gccagcacc	agaccattaa	ctttgatgaa	cgatcgcggt	14040
ggggcggtca	gctaaagacc	atcatgcata	ctaacatgcc	aaacgtgaac	gagtatatgt	14100
ttagtaacaa	gttcaaagcg	cgtgtgatgg	tgtccagaaa	acctcccgac	ggtgctgcag	14160
ttggggatac	ttatgatcac	aagcaggata	ttttgaaata	tgagtgggtc	gagtttactt	14220
tgccagaagg	caacttttca	gttactatga	ctattgattt	gatgaacaat	gccatcatag	14280
ataattactt	gaaagtgggt	agacagaatg	gagtgcctga	aagtgcatt	ggtgttaagt	14340
tcgacaccag	gaacttcaag	ctgggatggg	atcccgaac	caagttgatc	atgcctggag	14400
tgtatacgta	tgaagccttc	catcctgaca	ttgtcttact	gcctggctgc	ggagtggatt	14460
ttaccgagag	tcgtttgagc	aaccttcttg	gtatcagaaa	aaaacagcca	tttcaagagg	14520
gttttaagat	tttgtatgaa	gatttagaag	gtggtaatat	tccggccctc	ttggatgtag	14580
atgcctatga	gaacagtaag	aaagaacaaa	aagccaaaat	agaagctgct	acagctgctg	14640
cagaagctaa	ggcaaacata	gttgccagcg	actctacaag	ggttgctaac	gctggagagg	14700
tcagaggaga	caatttttgcg	ccaacacctg	ttccgactgc	agaatcatta	ttggccgatg	14760
tgtctgaagg	aacggacgtg	aaactcacta	ttcaacctgt	agaaaaagat	agtaagaata	14820
gaagctataa	tgtgttggaa	gacaaaatca	acacagccta	tcgcagttgg	tatctttcgt	14880
acaattatgg	cgatcccgaa	aaaggagtgc	gttcctggac	attgctcacc	acctcagatg	14940
tcacctgogg	agcagagcag	gtctactggg	cgcttccaga	catgatgaag	gatcctgtca	15000
ctttccgctc	cactagacaa	gtcagtaact	accctgtggg	gggtgcagag	cttatgccc	15060
tcttctcaaa	gagcttctac	aacgaacaag	ctgtgtactc	ccagcagctc	cgccagtcca	15120
cctogcttac	gcacgtcttc	aaccgctttc	ctgagaacca	gattttaatc	cgtccgccgg	15180
cgcccaccat	taccaccgtc	agtgaaaacg	ttcctgctct	cacagatcac	gggaccctgc	15240
cgttgcgag	cagtatccgg	ggagtccaac	gtgtgaccgt	tactgacgcc	agacgccgca	15300
cctgtcccta	cgtgtacaag	gcactgggca	tagtcgcacc	gcgcgtcctt	tcaagccgca	15360
ctttctaaaa	aaaaaaaaaa	tgtccattct	tatctcgccc	agtaataaca	ccggttgggg	15420
tctgcgcgct	ccaagcaaga	tgtacggagg	cgcacgcaaa	cgttctaccc	aacatcctgt	15480
ccgtgttcgc	ggacattttc	gcgctccatg	gggcgccctc	aagggccgca	ctcgcggttcg	15540
aaccaccgtc	gatgatgtaa	tcgatcaggt	ggttgccgac	gcccgttaatt	atactcctac	15600
tgcgcctaca	tctactgtgg	atgcagttat	tgacagtgtg	gtggctgacg	ctcgcaacta	15660
tgctcgacgt	aagagccggc	gaaggcgcat	tgccagacgc	caccgagcta	ccactgccat	15720
gcgagccgca	agagctctgc	tacgaagagc	tagacgcgtg	gggcgaagag	ccatgcttag	15780

ggcggccaga cgtgcagctt cgggcgccag cgccggcagg tcccgcaggc aagcagccgc 15840
 tgtcgacgcg gcgactattg ccgacatggc ccaatcgca agaggcaatg tatactgggt 15900
 gcgtgacgct gccaccggtc aacgtgtacc cgtgcgcacc cgtccccctc gcacttagaa 15960
 gatactgagc agtctccgat gttgtgtccc agcggcgagg atgtccaagc gcaaatacaa 16020
 ggaagaaatg ctgcaggtta tcgcacctga agtctacggc caaccgttga aggatgaaaa 16080
 aaaaccccgcc aaaatcaagc ggggttaaaaa ggacaaaaaa gaagaggaag atggcgatga 16140
 tgggctggcg gagtttgtgc gcgagtttgc ccacggcgca cgcgtgcaat ggcgtgggcg 16200
 caaagttcga catgtgttga gacctggaac ttcggtggtc ttacacccg gcgagcgttc 16260
 aagcgctact ttttaagcgtt cctatgatga ggtgtacggg gatgatgata ttcttgagca 16320
 ggcggctgac cgattaggcg agtttgctta tggcaagcgt agtagaataa cttccaagga 16380
 tgagacagtg tcgataccct tggatcatgg aaatcccacc cctagtctta aaccggtcac 16440
 tttgcagcaa gtgttaccgc taactccgcg aacaggtgtt aaacgcgaag gtgaagattt 16500
 gtatcccact atgcaactga tggtagccaa acgccagaag ttggaggacg ttttgagaa 16560
 agtaaaagtg gatccagata ttcaacctga ggttaaagtg agaccatta agcaggtagc 16620
 gcctgggtctg ggggtacaaa ctgtagacat taagattccc actgaaagta tggaaagtga 16680
 aactgaaccc gcaaagccta ctgccacctc cactgaagtg caaacggatc catggatgcc 16740
 catgcctatt acaactgacg ccgccgggtcc cactcgaaga tcccgcgaa agtacgggtcc 16800
 agcaagtctg ttgatgcca attatgttgt acaccatct attattccta ctctgggtta 16860
 ccgaggcact cgctactatc gcagccgaaa cagtacctcc cgccgtcgcc gcaagacacc 16920
 tgcaaatcgc agtcgtcgcc gtagacgcac aagcaaaccg actcccgcg ccctgggtgcg 16980
 gcaagtgtac cgcaatggta gtgcggaacc tttgacactg ccgcgtgcgc gttaccatcc 17040
 gagtatcatc acttaatcaa tgttgccgct gcctccttgc agatatggcc ctcaactgtc 17100
 gccttcgcgt tcccatcact ggttaccgag gaagaaactc gcgccgtaga agagggatgt 17160
 tgggacgcgg aatgcgacgc tacaggcgac ggcgtgctat ccgcaagcaa ttgcggggtg 17220
 gttttttacc agccttaatt ccaattatcg ctgctgcaat tggcgcgata ccaggcatag 17280
 cttccgtggc gggtcaggcc tcgcaacgac attgacattg gaaaaaacg tataaataaa 17340
 aaaaaaaaaa tacaatggac totgacactc ctggctcctgt gactatgttt tcttagagat 17400
 ggaagacatc aatttttcat ccttggctcc gcgacacggc acgaagccgt acatgggcac 17460
 ctggagcgac atcggcacga gccaaactgaa cggggggcgcc ttcaattgga gcagtatctg 17520
 gagcgggctt aaaaattttg gctcaaccat aaaaacatac gggaacaaag cttggaacag 17580
 cagtacagga caggcgctta gaaataaact taaagaccag aacttccaac aaaaagtagt 17640

cgatgggata gcttccggca tcaatggagt ggtagatttg gctaaccagg ctgtgcagaa 17700
 aaagataaac agtcgttttg acccgccgcc agcaacccca ggtgaaatgc aagtggagga 17760
 agaaattcct ccgccagaaa aacgaggcga caagcgtccg cgtcccgatt tggaagagac 17820
 gctggtgacg cgcgtagatg aaccgccttc ttatgaggaa gcaacgaagc ttggaatgcc 17880
 caccactaga ccgatagccc caatggccac cggggtgatg aaaccttctc agttgcatcg 17940
 acccgtcacc ttggatttgc cccctcccc tgctgctact gctgtaccg cttctaagcc 18000
 tgtcgtgcc ccgaaaccag tcgccgtagc caggtcacgt cccgggggcg ctccctcgcc 18060
 aaatgcgcac tggcaaaata ctctgaacag catcgtgggt ctaggcgtgc aaagtgtaaa 18120
 acgccgtcgc tgcttttaac taaatatgga gtagcgctta acttgccctat ctgtgtatat 18180
 gtgtcattac acgccgtcac agcagcagag gaaaaaagga agaggtcgtg cgtcgacgct 18240
 gagttacttt caagatggcc accccatoga tgctgcccc atgggcatac atgcacatcg 18300
 ccggacagga tgcttcggag tacctgagtc cgggtctggt gcagttcgcc cgcgccacag 18360
 acacctactt caatctggga aataagttta gaaatccac cgtagcgccg acccacgatg 18420
 tgaccaccga ccgtagccag cggctcatgt tgcgcttcgt gcccgttgac cgggaggaca 18480
 atacatactc ttacaaagtg cggtagaccc tggccgtggg cgacaacaga gtgctggata 18540
 tggccagcac gttctttgac attaggggtg tgttggacag aggtcccagt ttcaaaccct 18600
 attctggtac ggcttacaac tccctggctc ctaaaggcgc tccaaataca tctcagtggg 18660
 ttgcagaagg tgtaaaaaat acaactggtg aggaacacgt aacagaagag gaaaccaata 18720
 ctactactta cacttttggc aatgctctg taaaagctga agctgaaatt acaaaagaag 18780
 gactcccagt aggttttgaa gtttcagatg aagaaagtaa accgatttat gctgataaaa 18840
 catatcagcc agaaccctcag ctgggagatg aaacttggac tgaccttgat ggaaaaaccg 18900
 aaaagtatgg aggcagggct ctcaaaccg atactaagat gaaaccatgc tacgggtcct 18960
 ttgccaaacc tactaatgtg aaaggcggtc aggcaaaaca aaaaacaacg gagcagccaa 19020
 atcagaaagt cgaatatgat atcgacatgg agttttttga tgcggcacg cagaaaacaa 19080
 acttaagtcc taaaattgtc atgtatgcag aaaatgtaaa tttggaaact ccagacactc 19140
 atgtagtgta caaacctgga acagaagaca caagttccga agctaatttg ggacaacaat 19200
 ctatgccccaa cagacccaac tacattggct tcagagataa ctttattgga cttatgtact 19260
 ataacagtac tggtaacatg ggggtgctgg ctggtcaagc gtctcagtta aatgcagtgg 19320
 ttgacttgca ggacagaaac acagaacttt cttaccaact cttgcttgac tctctgggcg 19380
 acagaaccag atactttagc atgtggaatc aggtgtgga cagttatgat cctgatgtac 19440

gtgttattga aaatcatggt gtggaagatg aacttcccaa ctactgtttt ccactggacg	19500
gcataggtgt tccaacaacc agttacaaat caatagttcc aaatggagac aatgcgccta	19560
attggaagga acctgaagta aatggaacaa gtgagatcgg acagggtaat ttgtttgcc	19620
tggaaattaa ccttcaagcc aatctatggc gaagtttctt ttattccaat gtggctctat	19680
atctcccaga ctcgtaacaa tacaccccgt ccaatgtcac tcttccagaa aacaaaaaca	19740
cctacgacta catgaacggg cgggtgggtgc cgccatctct agtagacacc tatgtgaaca	19800
ttggtgccag gtggtctctg gatgccatgg acaatgtcaa ccattcaac caccaccgta	19860
acgctggctt gcgttacga tccatgcttc tgggtaacgg acgttatgtg cctttccaca	19920
tacaagtgcc tcaaaaattc ttcgctgtta aaaacctgct gcttctccca ggctcctaca	19980
cttargagtg gaactttagg aaggatgtga acatggttct acagagttcc ctcggtaacg	20040
acctgcggt agatggcgcc agcatcagtt tcaogagcat caacotctat gctacttttt	20100
tccccatggc tcacaacacc gcttccaccc ttgaagccat gctgcggaat gacaccaatg	20160
atcagtcatt caacgactac ctatctgcag ctaacatgct ctacccatt cctgccaatg	20220
caaccaatat tccatttcc attccttctc gcaactgggc ggctttcaga ggctggctcat	20280
ttaccagact gaaaaccaa gaaactccct ctttggggtc tggatttgac ccctactttg	20340
tctattctgg ttctattccc tacctggatg gtaccttcta cctgaaccac acttttaaga	20400
aggtttccat catgtttgac tcttcagtga gctggcctgg aaatgacagg ttactatctc	20460
ctaacgaatt tgaaataaag cgcactgtgg atggcgaagg ctacaacgta gcccaatgca	20520
acatgaccaa agactggttc ttggtacaga tgctcgccaa ctacaacatc ggctatcagg	20580
gcttctacat tccagaagga tacaagatc gcatgtattc atttttcaga aacttccagc	20640
ccatgagcag gcaggtggtt gatgaggtca attacaaaga cttcaaggcc gtcgccatac	20700
cctaccaaca caacaactct ggctttgtgg gttacatggc tccgaccatg cgccaaggtc	20760
aacctatcc cgctaactat ccctatccac tcattggaac aactgccgta aatagtgtta	20820
cgcagaaaaa gttcttgtgt gacagaacca tgtggcgcat accgttctcg agcaacttca	20880
tgtctatggg ggcccttaca gacttgggac agaatatgct ctatgccaac tcagctcatg	20940
ctctggacat gacctttgag gtggatccca tggatgagcc caccctgctt tatcttctct	21000
tcgaagtctt cgacgtggtc agagtgcac agccacaccg cggcatcatc gaggcagtct	21060
acctgcgtac accgttctcg gccggtaacg ctaccaogta agaagcttct tgcttcttgc	21120
aaatagcagc tgcaaccatg gcctgcggat cccaaaacgg ctccagcgag caagagctca	21180
gagccattgt ccaagacctg gggttgcggac cctatttttt gggaacctac gataagcgct	21240
tcccgggggt catggccccc gataagctcg cctgtgccat tgtaaatacg gccggacgtg	21300

agacgggggg agagcactgg ttggctttcg gttggaaccc acgttctaac acctgctacc 21360
 tttttgatcc ttttggattc tcggatgata gtctcaaaca gatttaccag tttgaatatg 21420
 agggctctct gcgccgcagc gctcttgcta ccaaggaccg ctgtattacg ctggaaaaat 21480
 ctaccagac cgtgcagggc ccccgttctg ccgcctgcgg acttttctgc tgcattgttc 21540
 ttcacgcctt tgtgcaactg cctgaccgtc ccatggacgg aaaccccacc atgaaattgc 21600
 taactggagt gccaaacaac atgcttcatt ctctaaagt ccagcccacc ctgtgtgaca 21660
 atcaaaaagc actctacat tttcttaata cccattcgcc ttattttcgc tcccatcgta 21720
 cacacatcga aagggccact gcgttcgacc gtatggatgt tcaataatga ctcatgtaaa 21780
 caacgtgttc aataaacatc actttatatt ttacatgta tcaaggctct gcattactta 21840
 tttatttaca agtcgaatgg gttctgacga gaatcagaat gaccgcagg cagtgtatcg 21900
 ttgcggaact gatacttggg ttgccacttg aattcgggaa tcaccaactt gggaaccggt 21960
 atatcgggca ggatgtcact ccacagcttt ctggctcagct gcaaagctcc aagcaggtca 22020
 ggagccgaaa tcttgaaatc acaattagga ccagtgcctt gagcgcgaga gttgcggtac 22080
 accggattgc agcactgaaa caocatcagc gacggatgtc tcacgcttgc cagcacgggtg 22140
 ggatctgcaa tcatgccac atccagatct tcagcattgg caatgctgaa cggggtcatc 22200
 ttgcaggtct gcctacccat ggcgggcacc caattaggct tgtggttgca atcgcagtcg 22260
 agggggatca gtatcatctt ggcctgatcc tgtctgattc ctggatacac ggctctcatg 22320
 aaagcatcat attgcttgaa agcctgctgg gctttactac cctcgggata aaacatcccg 22380
 caggacctgc tcgaaaactg gttagctgca cagccggcat cattcacaca gcagcgggcg 22440
 tcattgttag ctatttgac cacacttctg cccagcgggt tttgggtgat tttggttcgc 22500
 tcgggattct cctttaaggc tcgttgtccg ttctcgtcgg ccacatccat ctcgataatc 22560
 tgctccttct gaatcataat attgccatgc aggcacttca gcttgccctc ataactcattg 22620
 cagccatgag gccacaacgc acagcctgta cattcccaat tatggtgggc gatctgagaa 22680
 aaagaatgta tcattccctg cagaaatctt cccatcatcg tgctcagtggt cttgtgacta 22740
 gtgaaagtta actggatgcc tcggtgctcc tcgtttacgt actggtgaca gatgcgcttg 22800
 tattgttcgt gttgctcagg cattagttta aaagagggtc taagtctggt atccagcctg 22860
 tacttctcca tcagcagaca catcaacttc atgcctttct cccaagcaga caccaggggc 22920
 aagctaactg gattcttaac agtgcaggca gcagctcctt tagccagagg gtcattctta 22980
 gcgatcttct caatgcttct ttgcatcc ttctcaacga tgcgcacggg cgggtagctg 23040
 aaacccactg ctacaagttg cgcctcttct ctttcttctt cgctgtcttg actgatgtct 23100

tgcatgggga	tatgtttggt	cttccttggc	ttcttttttg	ggggtatcgg	aggaggagga	23160
ctgtcgctcc	gttcgggaga	cagggaggat	tgtgacgttt	cgctcaccat	taccaactga	23220
ctgtcggtag	aagaacctga	ccccacacgg	cgacaggtgt	ttctcttcgg	gggcagaggt	23280
ggaggcgatt	gcgaagggtc	gcggtccgac	ctggaaggcg	gatgactggc	agaaccctt	23340
ccgcgttcgg	gggtgtgctc	cctgtggcgg	tcgcttaact	gatttccttc	gcggctggcc	23400
attgtgttct	cctaggcaga	gaaacaacag	acatggaaac	tcagccattg	ctgtcaacat	23460
cgccacgagt	gccatcacat	ctcgtcctca	gcgacgagga	aaaggagcag	agcttaagca	23520
ttccaccgcc	cagtcttgcc	accacctcta	ccctagaaga	taaggaggtc	gacgcctctc	23580
atgacatgca	gaataaaaaa	gcgaaagagt	ctgagacaga	catcgagcaa	gacccgggct	23640
atgtgacacc	ggtggaacac	gaggaagagt	tgaaacgctt	tctagagaga	gaggatgaaa	23700
actgccc aaa	acaacgagca	gataactatc	accaagatgc	tggaaatagg	gatcagaaca	23760
ccgactacct	catagggtct	gacggggaag	acgcgctcct	taaacatcta	gcaagacagt	23820
cgctcatagt	caaggatgca	ttattggaca	gaactgaagt	gcccacagt	gtggaagagc	23880
tcagccgcgc	ctacg'agctt	aacctctttt	cacctcgta	tccccccaaa	cgtcagccaa	23940
acggcacctg	cgagccaaat	cctcgcttaa	acttttatcc	agcttttgct	gtgccagaag	24000
tactggctac	ctatcacatc	ttttttaaaa	atcaaaaaat	tccagtctcc	tgccgcgcta	24060
atcgaccccg	cgccgatgcc	ctactcaatc	tgggacctgg	ttcacgctta	cctgatatag	24120
cttccttggg	agaggttcca	aagatcttcg	agggtctggg	caataatgag	actcggggccg	24180
caaatgctct	gcaaaaggga	gaaaatggca	tggatgagca	tcacagcggt	ctggtggaat	24240
tgggaaggcg	taatgccaga	ctcgcagtac	tcaagcgaag	catcgaggtc	acacacttcg	24300
catatcccgc	tgtcaacctg	ccccctaaag	tcatgacggc	ggtcatggac	cagttactca	24360
ttaagcgcgc	aagtccccct	tcagaagaca	tgcattgacc	agatgcctgt	gatgagggtta	24420
aaccagtggg	cagtgatgag	cagctaacct	gatggctggg	caccgactct	cccagggtatt	24480
tgggaagagcg	tcgcaagctt	atgatggccg	tgggtgctgg	taccgtagaa	ctagagtgtc	24540
tccgacgttt	ctttaccgat	tcagaaacct	tgcgcaaact	cgaagagaat	ctgcactaca	24600
cttttagaca	cggctttgtg	cggcaggcat	gcaagatata	taacgtggaa	ctcaccaacc	24660
tggtttctcta	catgggtatt	ctgcatgaga	atcgcttagg	acaaagcgtg	ctgcacagca	24720
ccctgaaggg	ggaagcccg	cgtgattaca	tccgcgattg	tgtctatctg	tacctgtgcc	24780
acacgtggca	aaccggcatg	ggtgtatggc	agcaatgttt	agaagaacag	aacttgaaag	24840
agcttgacaa	gctcttacag	aaatctctta	aggttctgtg	gacagggttc	gacgagcgca	24900
cogtcgcttc	cgacctggca	gacctcatct	tcccagagcg	tctcagggtt	actttgcgaa	24960

acggattgcc tgactttatg agccagagca tgcttaacaa ttttcgctct ttcacccctgg 25020
 aacgctccgg tatcctgccc gccacctgct gcgcactgcc ctccgacttt gtgcctctca 25080
 cctaccgcca gtgccccccg ccgctatgga gtcactgcta cctgttccgt ctggccaact 25140
 atctctccta ccactcggat gtgatcgagg atgtgagcgg agacggcttg ctggagtgtc 25200
 actgccgctg caatctgtgc acgccccacc ggtccctagc ttgcaacccc cagttgatga 25260
 gcgaaaccca gataataggc acctttgaat tgcaaggccc cagcagccaa ggcgatgggt 25320
 ctctctcctg gcaaagtta aaactgaccc cgggactgtg gacctccgcc tacttgcgca 25380
 agtttgctcc ggaagattac caccocctatg aaatcaagtt ctatgaggac caatcacagc 25440
 ctccaaaggc cgaactttcg gcctgcgtca tcaccaggg ggcaattctg gcccaattgc 25500
 aagccatcca aaaatccgc caagaatttc tactgaaaaa gggtaagggg gtctaccttg 25560
 acccccagac cggcgaggaa ctcaacacaa ggttccctca ggatgtccca acgacgagaa 25620
 aacaagaagt tgaaggtgca gccgccgccc ccagaagata tggaggaaga ttgggacagt 25680
 caggcagagg aggcggagga ggacagtctg gaggacagtc tggaggaaga cagtttgag 25740
 gaggaaaacg aggaggcaga ggaggtggaa gaagtaaccg ccgacaaaca gttatcctcg 25800
 gctgcggaga caagcaacag cgctaccatc tccgctccga gtcgaggaaac ccggcggcgt 25860
 cccagcagta gatgggacga gaccggacgc ttcccgaacc caaccagcgc ttccaagacc 25920
 ggtaagaagg atcggcaggg atacaagtcc tggcgggggc ataagaatgc catcatctcc 25980
 tgcttgcatg agtgcggggg caacatatcc ttacgcggc gctacttgct attccaccat 26040
 ggggtgaact ttccgcgcaa tgttttgcat tactaccgtc acctccacag cccctactat 26100
 agccagcaaa tcccggcagt ctgcacagat aaagacagcg gcggcgacct ccaacagaaa 26160
 accagcagcg gcagttagaa aatacacaac aagtgcagca acaggaggat taaagattac 26220
 agccaacgag ccagcgcaaa cccgagagtt aagaaatcgg atctttccaa cctgtatgc 26280
 catcttccag cagagtcggg gtcaagagca ggaactgaaa ataaaaaacc gatctctgcg 26340
 ttcgctcacc agaagttggt tgtatcacia gagcgaagat caacttcagc gcactctcga 26400
 ggacgccgag gctctcttca acaagtactg cgcgctgact cttaaagagt aggcagcgac 26460
 cgcgcttatt caaaaaaggc gggaattaca tcatcctcga catgagtaaa gaaattccca 26520
 cgccttacat gtggagttat caaccccaaa tgggattggc ggcaggcgcc tcccaggact 26580
 actccacccg catgaattgg ctacgcgcgg ggccttctat gatttctcga gttaatgata 26640
 tacgcgccta ccgaaacca atacttttgg aacagtcagc tcttaccacc acgccccgcc 26700
 aacaccttaa tcccagaaat tggcccgcgg ccctagtgtg ccaggaaagt cccgctccca 26760

ccactgtatt acttcctcga gacgcccagg ccgaagtcca aatgactaat gcagggtgcgc 26820
 agttagctgg cggctccacc ctatgtcgtc acaggcctcg gcataatata aaacgcctga 26880
 tgatcagagg ccgaggtatc cagctcaacg acgagtcggg gagctctccg cttgggtctac 26940
 gaccagacgg aatctttcag attgccggct gggggagatc ttccttcacc cctcgtcagg 27000
 ctgttctgac tttggaaagt tcgtcttcgc aaccccgctc gggcggaatc gggaccgttc 27060
 aatttgtgga ggagtttact ccctctgtct acttcaaccc cttctccgga tctcctgggc 27120
 attraccgga cgagttcata ccgaacttcg acgcgattag cgagtcagtg gacggctacg 27180
 attgatgtct ggtgacgcgg ctgagctatc tcggctgcga catctagacc actgccgccg 27240
 ctttcgctgc tttgccggg aactcattga gttcatctac ttcgaactcc ccaaggatca 27300
 ccctcaaggc ccggcccacg gagtgcggat ttctatcgaa ggcaaaatag actctcgcct 27360
 gcaacgaatt ttctcccagc ggcccggtgct gatcgagcga gaccaggga acaccacggt 27420
 ttccatctac tgcatttgta atcaccocgg attgcatgaa agcctttgct gtcttatgtg 27480
 tactgagttt aataaaaact gaattaagac tctcctacgg actgccgctt cttcaacccg 27540
 gattttacaa ccagaagaac gaaacttttc ctgtcgtcca ggactctgtt aacttcacct 27600
 ttctactca caaactagaa gctcaacgac tacaccgctt ttccagaagc attttcccta 27660
 ctaatactac tttcaaaacc ggaggtgagc tccaaggctc tcctacagaa aacccttggg 27720
 tggagcggg ccttgtagtg ctaggaattc ttgcgggtgg gcttgtgatt attctttgct 27780
 acctatacac accttgcttc actttcttag tgggtgtgtg gtattggttt aaaaaatggg 27840
 gccatacta gtcttgcttg ttttactttc gcttttggaa ccgggttctg ccaattacga 27900
 tccatgtcta gacttcgacc cagaaaactg cacacttact tttgcacccg acacaagccg 27960
 catctgtgga gttcatcgcc tctcttacga acttggcccc caacgacaaa aatttacctg 28020
 catggtggga atcaacccca tagttatcac ccagcaaagt ggagatacta agggttgcat 28080
 tcaactgctc tgcgattcca tcgagtgcac ctacaccctg ctgaagaccc tatggggcct 28140
 aagagacctg ctaccaatga attaaaaaat gattaataaa aaatcactta cttgaaatca 28200
 gcaataaggc ctctgttgaa attttctccc agcagcacct cacttccctc ttcccaactc 28260
 tgggtattcta aaccccgctc agcggcatac tttctccata ctttaaaggg gatgtcaaat 28320
 tttagctcct ctctgtacc cacaatcttc atgtctttct tccagatga ccaagagagt 28380
 ccggctcagt gactccttca accctgtcta ccctatgaa gatgaaagca cctcccaaca 28440
 cccctttata aacccagggt ttatttcccc aaatggcttc acacaaagcc caaacggagt 28500
 tcttacttta aaatgtttaa cccactaac aaccacaggc ggatctctac agctaaaagt 28560
 gggaggggga cttacagtgg atgacaccaa cggttttttg aaagaaaaca taagtgccac 28620

cacaccactc gtttaagactg gtcactctat aggtttacca ctaggagccg gattgggaac 28680
 gaatgaaaat aaactttgta tcaaattagg acaaggactt acattcaatt caaacaacat 28740
 ttgcattgat gacaatatta acaccttatg gacaggagtc aaccccaccg aagccaactg 28800
 tcaaatacatg aactccagtg aatctaataa ttgcaaatta attctaacac tagttaaaac 28860
 tggagcacta gtcactgcat ttgtttatgt tataggagta tctaacaatt ttaatatgct 28920
 aactacacac agaaatataa attttactgc agagctgttt ttcgattcta ctggtaattt 28980
 actaactaga ctctcatccc tcaaaactcc acttaatcat aaatcaggac aaaacatggc 29040
 tactggtgcc attactaatg ctaaagggtt catgccagc acgactgcct atcctttcaa 29100
 tgataattct agagaaaaag aaaactacat ttacggaact tgttactaca cagctagtga 29160
 tcgcactgct tttccattg acatatctgt catgcttaac cgaagagcaa taaatgacga 29220
 gacatcatat tgtattcgta taacttggtc ctggaacaca ggagatgcc cagaggtgca 29280
 aacctctgct acaaccctag tcacctcccc atttaccttt tactacatca gagaagacga 29340
 ctgacaaata aagtttaact tgtttatgtg aaaatcaatt cacaaaatcc gagtagttat 29400
 tttgcctccc ccttccatt taacagaata caccaatctc tccccacgca cagctttaaa 29460
 catttgata ccattagata tagacatggt tttagattcc acattccaaa cagtttcaga 29520
 gcgagccaat ctggggtcag tgatagataa aaatccatcg ggatagtctt ttaaagcgct 29580
 ttcacagtcc aactgctgcg gatgcgactc cggagtctgg atcacggtca tctggaagaa 29640
 gaacgatggg aatcataatc cgaaaacggg atcggacgat tgtgtctcat caaaccacaa 29700
 agcagccgct gtctgcgtcg ctccgtgcga ctgctgttta tgggacagg gtccacagtg 29760
 tcctgaagca tgattttaat agcccttaac atcaactttc tgggtcgatg cgcgcagcaa 29820
 cgcattctga tttcactcaa atctttgcag taggtacaac acattattac aatattgttt 29880
 aataaaccat aattaaaagc gctccagcca aaactcatat ctgatataat cgcccctgca 29940
 tgaccatcat accaaagttt aatataaatt aaatgacgtt ccctcaaaaa cacactaccc 30000
 acatacatga tctcttttgg catgtgcata ttaacaatct gtctgtacca tggacaacgt 30060
 tggttaatca tgcaacccaa tataaccctc cggaaccaca ctgccaacac cgctccccc 30120
 gccatgcatt gaagtgaacc ctgctgatta caatgacaat gaagaacca attctctcga 30180
 ccgtgaatca cttgagaatg aaaaatatct atagtggcac aacatagaca taaatgcatg 30240
 catcttctca taatttttaa ctcttcagga tttagaaaca tatcccaggg aataggaagc 30300
 tcttgagaa cagtaaagct ggcagaacaa ggaagaccac gaacacaact tacactatgc 30360
 atagtcatag tatcacaatc tggcaacagc ggggtggtctt cagtcataga agctcgggtt 30420

tcatttttcct cacaacgtgg taactgggct ctggtgtaag ggtgatgtct ggcgcacgat 30480
 gtcgagcgtg cgcgcaacct tgtcataatg gagttgcttc ctgacattct cgtattttgt 30540
 atagcaaaac gcggccctgg cagaacacac tcttcttcgc cttctatcct gccgcttagc 30600
 gtgttccgtg tgatagtcca agtacaacca cactcttaag ttggtcaaaa gaatgctggc 30660
 ttcagttgta atcaaaaactc catcgcatct aatcgttctg aggaaatcat ccaagcaatg 30720
 caactggatt gtgtttcaag caggagagga gagggaagag acggaagaac catgttaatt 30780
 tttattccaa acgatctcgc agtacttcaa attgtagatc gcgcagatgg catctctcgc 30840
 cccactgtg ttggtgaaaa agcacagcta gatcaaaaga aatgcgattt tcaagggtgt 30900
 caacggtggc ttccagcaaa gcctccacgc gcacatccaa gaacaaaaga ataccaaaag 30960
 aaggagcatt ttctaactcc tcaatcatca tattacattc ctgcaccatt ccagataat 31020
 tttcagcttt ccagccttga attattcgtg tcagttcttg tggtaaatac aatccacaca 31080
 ttacaaacag gtcccggagg gcgccctcca ccaccattct taaacacacc ctcataatga 31140
 caaaatatct tgctcctgtg tcacctgtag cgaattgaga atggcaacat caattgacat 31200
 gcccttggct ctaagttctt ctttaagttc tagttgtaaa aactctctca tattatcacc 31260
 aaactgctta gccagaagcc ccccggaac aagagcaggg gacgctacag tgcagtacaa 31320
 gcgcagacct cccaattgg ctccagcaaa aacaagattg gaataagcat attgggaacc 31380
 gccagtaata tcatcgaagt tgctggaaat ataatcaggc agagtttctt gtaaaaattg 31440
 aataaaaagaa aaatttgcca aaaaaacatt caaaacctct gggatgcaaa tgcaatagggt 31500
 taccgcgtg cgctccaaca ttgttagttt tgaattagtc tgcaaaaata aaaaaaaaaa 31560
 caagcgtcat atcatagtag cctgacgaac agatggataa atcagtcttt ccatcacaag 31620
 acaagccaca gggctctccag ctcgaccctc gtaaaacctg tcatcatgat taaacaacag 31680
 caccgaaagt tcctcgcggt gaccagcatg aataattctt gatgaagcat acaatccaga 31740
 catgttagca tcagttaacg agaaaaaaca gccaacatag cctttgggta taattatgct 31800
 taatcgtaag tatagcaaag ccaccctcg cggatacaaa gtaaaaggca caggagaata 31860
 aaaaatataa ttatttctct gctgctgttc aggcaacgtc gcccccggtc cctctaaata 31920
 cacatacaaa gcctcatcag ccatggctta ccagacaaag tacagcgggc acacaaagca 31980
 caagctctaa agtgactctc caacctctcc acaatatata tatacacaaag ccctaaactg 32040
 acgtaatggg agtaaagtgt aaaaaatccc gccaaaccca acacacacccc cgaaactgcg 32100
 tcaccagggg aaagtacagt ttcacttccg caatcccaac aggcgtaact tcctctttct 32160
 cacggtacgt gatatcccac taacttgcaa cgtcattttc ccacggtcgc accgcccctt 32220
 ttagccgtta accccacagc caatcaccac acgatccaca ctttttaaaa tcacctcatt 32280

tacatattgg caccattcca tctataaggt atattatata gatag 32325

<210> 2

<211> 34794

<212> ADN

<213> Adenovirus

<400> 2

ctatctatat aatatacctt atagatggaa tgggtgccaat atgtaaata ggtgatttta 60
 aaaagtgtgg atcgtgtggt gattggctgt ggggttaacg gctaaaagg gcggtgcgac 120
 cgtgggaaaa tgacgttttg tgggggtgga gtttttttgc aagttgtcgc gggaaatgtg 180
 acgcataaaa aggctttttt ctcacggaac tacttagttt tcccacggtt tttaacagga 240
 aatgaggtag ttttgaccgg atgcaagtga aaattgttga ttttcgcgcg aaaactgaat 300
 gaggaagtgt ttttctgaat aatgtggtat ttatggcagg gtggagtatt tgttcagggc 360
 caggtagact ttgaccatt acgtggaggt ttcgattacc gtgtttttta cctgaatttc 420
 cgcgtaccgt gtcaaagtct tctgttttta cgtaggtgtc agctgatcgc tagggatttt 480
 atacctcagg gtttgtgtca agaggccact cttgagtgcc agcgagaaga gttttctcct 540
 ctgcgccggc agtttaataa taaaaaatg agagatttgc gatttctgcc tcaggaaata 600
 atctctgctg agactggaaa tgaaatattg gagcttgtgg tgcacgccct gatgggagac 660
 gatccggagc cacctgtgca gctttttgag cctcctacgc ttcaggaact gtatgattta 720
 gaggtagagg gatccggagga ttctaataag gaagctgtaa atggcttttt taccgattct 780
 atgcttttag ctgctaatag agggtagaa ttagatccgc ctttggacac ttttgatact 840
 ccaggggtaa ttgtggaaag cggtagaggt gtaagaaaat tacctgattt gagttccgtg 900
 gactgtgatt tgcactgcta tgaagacggg tttcctccga gtgatgagga ggaccatgaa 960
 aaggagcagt ccatgcagac tgcagcgggt gagggagtga aggctgccaa tgttggtttt 1020
 cagttggatt gcccgagct tcctggacat ggctgtaagt cttgtgaatt tcacaggaaa 1080
 aatactggag taaaggaact gttatgttcg ctttgttata tgagaacgca ctgccacttt 1140
 atttacagta agtgtgttta agttaaaatt taaaggaata tgctgttttt cacatgtata 1200
 ttgagtgtga gttttgtgct tcttattata ggtcctgtgt ctgatgctga tgaatcacca 1260
 tctcctgatt ctactacct acctcctgag attcaagcac ctgttcctgt ggacgtgcgc 1320
 aagcccatte ctgtgaagct taagcctggg aaacgtccag cagtggaaaa acttgaggac 1380
 ttgttacagg gtggggacgg acctttggac ttgagtacac ggaaacgtcc aagacaataa 1440
 gtgttccata tccgtgttta ctttaaggtga cgtcaatatt tgtgtgacag tgcaatgtaa 1500
 taaaaatatg ttaactgttc actggttttt attgcttttt gggcggggac tcaggatat 1560

aagtagaagc agacctgtgt ggtagctca taggagctgg ctttcatcca tggaggtttg	1620
ggccattttg gaagacctta ggaagactag gcaactgtta gagaacgctt cggacggagt	1680
ctccggtttt tggagattct ggctcgctag tgaattagct agggtagttt ttaggataaa	1740
acaggactat aaacaagaat ttgaaaagtt gttggtagat tgcccaggac tttttgaagc	1800
tcttaatttg ggccatcagg ttcactttaa agaaaaagtt ttatcagttt tagacttttc	1860
aaccccaggt agaactgctg ctgctgtggc ttttcttact tttatattag ataaatggat	1920
cccgagact catttcagca ggggatacgt tttggatttc atagccacag cattgtggag	1980
aacatggaag gttcgcaaga tgaggacaat cttaggttac tggccagtgc agcctttggg	2040
tgtagcggga atcctgaggc atccaccggt catgccagcg gttctggagg aggaacagca	2100
agaggacaac ccgagagccg gcctggacc tccagtggag gaggcggagt agctgacttg	2160
tctcctgaac tgcaacgggt gcttactgga tctacgtcca ctggacggga taggggcgtt	2220
aagagggaga gggcatctag tggtagctgat gctagatctg agttggcttt aagtttaatg	2280
agtcgcagac gtcctgaaac catttggtgg catgaggttc agaaagaggg aagggatgaa	2340
gtttctgtat tgcaggagaa atattcactg gaacagggtga aaacatgttg gttggagcct	2400
gaggatgatt gggagggtgg cattaaaaat tatgccaaga tagctttgag gcctgataaa	2460
cagtataaga ttactagacg gattaatatc cggaatgctt gttacatatc tggaaatggg	2520
gctgagggtgg taatagatac tcaagacaag gcagttatta gatgctgcat gatggatatg	2580
tggcctgggg tagtcggtat ggaagcagta acttttgtaa atgttaagtt taggggagat	2640
ggttataatg gaatagtgtt tatggccaat accaaactta tattgcatgg ttgtagcttt	2700
tttggtttca acaatacctg tgtagatgcc tggggacagg ttagtgtacg gggatgtagt	2760
ttctatgcgt gttggattgc cacagctggc agaaccaaga gtcaattgtc tctgaagaaa	2820
tgcatatttc aaagatgtaa cctgggcatt ctgaatgaag gcgaagcaag ggtccgccac	2880
tgcgcttcta cagatactgg atgttttatt ttgattaagg gaaatgccag cgtaaagcat	2940
aacatgattt gcggtgcttc cgatgagagg ccttatcaaa tgctcacttg tgctgggtggg	3000
cattgtaata tgctggctac tgtgcatatt gtttcccatc aacgcaaaaa atggcctgtt	3060
tttgatcaca atgtgatgac gaagtgtacc atgcatgcag gtgggcgtag aggaatgttt	3120
atgccttacc agtgtaacat gaatcatgtg aaagtgttgt tgggaaccaga tgcccttttc	3180
agaatgagcc taacaggaat ttttgacatg aacatgcaaa tctggaagat cctgagggtat	3240
gatgatacga gatcgagggg acgcgcatgc gaatgcggag gcaagcatgc caggttccag	3300
ccggtgtgtg tagatgtgac tgaagatctc agaccggatc atttggttat tggccgcaat	3360

ggagcagagt tcggatccag tggagaagaa actgactaag gtgagtattg ggaaaacttt 3420
 ggggtgggat ttccagatgg acagattgag taaaaatttg ttttttctgt cttgcagctg 3480
 tcatgagtgg aaacgcttct ttttaagggg gagtcttcag cccttatctg acagggcgctc 3540
 tcccatcctg ggcaggagtt cgtcagaatg ttatgggac cactgtggat ggaagacccg 3600
 tccaacccgc caattcttca acgctgacct atgctacttt aagttcttca ctttggacg 3660
 cagctgcagc tgccgcgcgc gcttctgttg ccgctaacac tgtgcttga atgggttact 3720
 atggaagcat catggetaat tccacttct ctaataacct ttctaccctg actcaggaca 3780
 agttacttgt ccttttggcc cagctggagg ctttgaccca acgtctgggt gaactttctc 3840
 agcaggtggt cgagttgcga gtacaaactg agtctgctgt cggcacggca aagtctaaat 3900
 aaaaaaatcc cagaatcaat gaataaataa acaagcttgt tgttgattta aaatcaagtg 3960
 tttttatttc atttttcgcg cacggtatgc cctagaccac cgatctctat cattgagaac 4020
 tcggtggatt ttttcagga tcctatagag gtgggattga atgttttagat acatgggcat 4080
 taggccgtct ttgggggtga gatagctcca ttgaagggat tcatgctccg gggtagtggt 4140
 gtaaataacc cagtcataac aaggctgcag tgcattggtg tgcaaatat cttttagaag 4200
 taggctgatt gccacagata agcccttggt gtaggtgttt acaaaccggt tgagctggga 4260
 tgggtgcatt cggggtgaaa ttatgtgcat tttggattgg atttttaagt tggcaatatt 4320
 gccgccaaga tcccgctctg ggttcatgtt atgaaggacc accaagacgg tgtatccggt 4380
 acatttagga aatttatcgt gcagcttggg tggaaaagcg tggaaaaatt tggagacacc 4440
 cttgtgtcct ccaagatttt ccatgcactc atccatgata atagcaatgg ggccgtgggc 4500
 agcggcgcg gcaaacacgt tccgtgggtc tgacacatca tagttatgtt cctgagttaa 4560
 atcatcataa gccattttta tgaatttggg gcggagagta ccagattggg gtatgaatgt 4620
 tccttcgggc cccggagcat agttccctc acagatttgc atttcccaag ctttcagttc 4680
 cgaggggtga atcatgtcca cctggggggc tatgaaaaac accgtttctg gggcgggggt 4740
 gattaattgt gatgatagca aatttctgag caattgagat ttgccacatc cgggtggggcc 4800
 ataaatgatt ccgattacgg gttgcagggt gtagtttagg gaacggcaac tgccgtcttc 4860
 tcgaagcaag ggggccacct cgttcatcat ttcccttaca tgcatatttt cccgcaccaa 4920
 atccattagg aggcgtctc ctctagtga tagaagttct tgtagtggg aaaagttttt 4980
 cagcggtttc agaccgtcag ccatgggcat tttggagaga gtttgctgca aaagttctag 5040
 tctgttccac agttcagtga tgtgttctat ggcattctga tccagcagac ctctcgttt 5100
 cgcggtttg gacggctcct ggaatagggt atgagacgat gggcgctccag cgctgccagg 5160
 gttcggctct tccaggtct cagtgttcca gtcagggttg tttccgtcac agtgaagggg 5220

tgtgcgctg	cttgggcgct	tgccaggggtg	cgcttcagac	tcatcctgct	ggtcgaaaac	5280
ttctgtcgct	tggegcctg	tatgtcggcc	aagtagcagt	ttaccatgag	ttcgtagttg	5340
agcgctcgg	ctgcgtggcc	tttggcgcg	agcttacctt	tggaagtttt	cttgcatacc	5400
gggcagtata	ggcatttcag	cgcatacaac	ttgggcgcaa	ggaaaacgga	ttctggggag	5460
tatgcatctg	cgccgcagga	ggcgcaaaca	gtttcacatt	ccaccagcca	ggttaaatcc	5520
ggttcattgg	ggtcaaaaac	aagttttccg	ccatattttt	tgatgcgttt	cttacctttg	5580
gtctccatga	gttcgtgtcc	tcgttgagt	acaaacaggc	tgtccgtgtc	cccgtagact	5640
gattttacag	gcctcttctc	cagtggagt	cctcggtctt	cttcgtacag	gaactctgac	5700
cactctgata	caaaggcgcg	cgtccaggcc	agcacaaagg	aggctatgtg	ggaggggtag	5760
cgatcgttgt	caaccagggg	gtccaccttt	tccaaagtat	gcaaacacat	gtcacccctc	5820
tcaacatcca	ggaatgtgat	tggtttgtag	gtgtatttca	cgtgacctgg	ggccccgct	5880
gggggggtat	aaaagggggc	ggttctttgc	tcttctcac	tgtcttcggg	atcgctgtcc	5940
aggaacgtca	gctgttgggg	taggtattcc	ctctcgaagg	cgggcatgac	ctctgcactc	6000
aggttgtcag	tttctaagaa	cgaggaggat	ttgatattga	cagtgccggt	tgagatgcct	6060
ttcatgaggt	tttcgtccat	ttggtcagaa	aacacaattt	ttttattgtc	aagtttggtg	6120
gcaaattgatc	catacagggc	gttgataaaa	agtttgcaa	tgatcgcat	ggtttggttc	6180
ttttccttgt	ccgcgcgctc	tttggcgcg	atgttgagtt	ggacatactc	gcgtgccagg	6240
cacttccatt	cggggaagat	agttgttaat	tcatctggca	cgattctcac	ttgccaccct	6300
cgattatgca	aggttaattaa	atccacactg	gtggccacct	cgctcgaag	gggttcattg	6360
gtccaacaga	gcctacctcc	tttctagaa	cagaaagggg	gaagtgggtc	tagcataagt	6420
tcatcgggag	ggctctgcatc	catggtaaag	attcccggaa	gtaaatcctt	atcaaaatag	6480
ctgatgggag	tggggtcatc	taaggccatt	tgccattctc	gagctgccag	tgcgcgctca	6540
tatgggttaa	ggggactgcc	ccatggcatg	ggatgggtga	gtgcagaggc	atacatgcca	6600
cagatgtcat	agacgtagat	gggatcctca	aagatgccta	tgtaggttgg	atagcatcgc	6660
ccccctctga	tacttgctcg	cacatagtca	tatagttcat	gtgatggcgc	tagcagcccc	6720
ggaccaagt	tggtgcgatt	gggtttttct	gttctgtaga	cgatctggcg	aaagatggcg	6780
tgagaattgg	aagagatgg	gggtctttga	aaaatgttga	aatgggcatg	aggtagacct	6840
acagagtctc	tgacaaagt	ggcataagat	tcttgaagct	tggttaccag	ttcggcggtg	6900
acaagtacgt	ctagggcgca	gtagtcaagt	gtttcttgaa	tgatgtcata	acctggttgg	6960
tttttctttt	cccacagttc	gcggttgaga	aggtattctt	cgcgatcctt	ccagtactct	7020

tctagcggaa	acccgtcttt	gtctgcacgg	taagatccta	gcatgtagaa	ctgattaact	7080
gccttgtaag	ggcagcagcc	cttctctacg	ggtagagagt	atgcttgagc	agcttttcgt	7140
agcgaagcgt	gagtaagggc	aaaggtgtct	ctgaccatga	ctttgagaaa	ttggtatttg	7200
aagtcgatgt	cgtcacaggc	tccctgttcc	cagagttgga	agtctacccg	tttcttgtag	7260
gcgggggttg	gcaaagcgaa	agtaacatca	ttgaagagaa	tcttaccggc	tctgggcata	7320
aaattgcgag	tgatgcgaaa	aggctgtggt	acttccgctc	gattgttgat	cacctgggca	7380
gctaggacga	tctcgtcgaa	accgttgatg	ttgtgtccta	cgatgtataa	ttctatgaaa	7440
cgcggcgtgc	ctctgacgtg	aggtagctta	ctgagctcat	caaaggttag	gtctgtgggg	7500
tcagataagg	cgtagtgttc	gagagcccat	tcgtgcaggt	gaggatttgc	atgtaggaat	7560
gatgaccaa	gatctaccgc	cagtgtctgt	tgtaactggt	cccgatactg	acgaaaatgc	7620
cggccaattg	ccattttttc	tggagtgaca	cagtagaagg	ttctggggtc	ttgttgccat	7680
cgatcccact	tgagtttaat	ggctagatcg	tgggccatgt	tgacgagacg	ctcttctcct	7740
gagagtttca	tgaccagcat	gaaaggaact	agttgtttgc	caaaggatcc	catccaggtg	7800
taagtttcca	catcgtaggt	caggaagagt	ctttctgtgc	gaggatgaga	gccgatcggg	7860
aagaactgga	tttcctgcc	ccagttggag	gattggctgt	tgatgtgatg	gaagtagaag	7920
tttctgcggc	gcgccgagca	ttcgtgtttg	tgcttgtaga	gacggccgca	gtagtgcgag	7980
cgttgccacg	gttgatatct	gtgaatgagt	tgtacctggc	ttcccttgac	gagaaatttc	8040
agtgggaagc	cgaggccctg	cgattgtatc	tcgtgtctct	ctatatccgc	tgtatcggcc	8100
tgttcatctt	ctgtttcgat	ggtggctcat	ctgacgagcc	cccgcgggag	gcaagtccag	8160
acctcggcgc	gggaggggag	gagctgaagg	acgagagcgc	gcaggctgga	gctgtccaga	8220
gtcctgagac	gctgcggact	caggttagta	ggtagggaca	gaagattaac	ttgcatgac	8280
ttttccaggg	cgtgcgggag	gttcagatgg	tacttgattt	ccacaggttc	gtttgtagag	8340
acgtcaatgg	cttgccaggt	tccgtgtcct	ttgggcgcc	ctaccgtacc	tttgtttttt	8400
cttttgatcg	gtggtggctc	tcttgcttct	tgcatgctca	gaagcgggtg	cggggacgcg	8460
cgcggggcgg	cagcggttgt	tccggacccg	agggcattgg	tggtagtggc	acgtcggcgc	8520
cgcgcacggg	caggttcttg	tactgcgctc	tgagaagact	tgctgctgcc	accacgcgtc	8580
gattgacgtc	ttgtatctga	cgtctctggg	tgaaagctac	cggccccgtg	agcttgaaac	8640
tgaaagagag	ttcaacagaa	tcaatttcgg	tatcgttaac	ggcagcttgt	ctcagtattt	8700
cttgtagctc	accagagttg	tccgtgtagg	cgatctccgc	catgaactgc	tcgatttctt	8760
cctcctgaag	atctccgcga	cccgtctctt	cgcgggtggc	cgcgagggtc	ttggagatac	8820
ggcccatgag	ttggggagaat	gcattcatgc	ccgcctcgtt	ccagacgcgg	ctgtaaacca	8880

cgccccctc	ggagtctctt	gcgcgcatca	ccacctgagc	gaggttaagc	tccacgtgtc	8940
cggtgaagac	cgcatagttg	cataggcgct	gaaaaaggta	gttgagtgtg	gtggcaatgt	9000
gttcggcgac	gaagaaatac	atgatccatc	gtctcagcgg	catttcgcta	acatcgccca	9060
gagcttccaa	gcgctccatg	gcctcgtaga	agtcacggc	aaaattaaaa	aactgggagt	9120
ttcgcgcgga	cacggccaat	tcctcctcga	gaagacggat	gagttcggct	atgggtggccc	9180
gtacttcgcy	ttcgaaggct	cccgggatct	cttcttcctc	ttctatctct	tcttccacta	9240
acatctcttc	ttcgtcttca	ggcgggggcy	gagggggcac	gcggcgacgt	cgacggcgca	9300
cgggcaaacy	gtcgatgaat	cgttcaatga	cctctccgcy	gcggcggcgc	atggtttcag	9360
tgacggcgcy	gccgttctcy	cgcggtcgca	gagtaaaaac	accgccgcgc	atctccttaa	9420
agtggtgact	gggaggttct	ccgtttggga	gggagagggc	gctgattata	cattttatta	9480
attggcccg	agggactgca	cgcagagatc	tgatcgtgtc	aagatccacg	ggatctgaaa	9540
acctttcgac	gaaagcgtct	aaccagtcac	agtcacaagg	taggctgagt	acggcttctt	9600
gtgggcgggg	gtggttatgt	gttcgggtctg	ggtcttctgt	ttcttcttca	tctcgggaag	9660
gtgagacgat	gctgctgggt	atgaaattaa	agtaggcagt	tctaagacgg	cggttggtgg	9720
cgaggagcac	caggctcttg	ggtccggctt	gctggatacg	caggcgattg	gccattcccc	9780
aagcattatc	ctgacatcta	gcaagatctt	tgtagtagtc	ttgcatgagc	cgttctacgg	9840
gcacttcttc	ctcaccggtt	ctgccatgca	tacgtgtgag	tccaaatccg	cgcatgtggt	9900
gtaccagtgc	caagtcagct	acgactcttt	cgcgagggat	ggcttgctgt	acttggttaa	9960
gggtggcttg	aaagtcatca	aaatccacaa	agcggtggtg	agctcctgta	ttaatggtgt	10020
aagcacagtt	ggccatgact	gaccagttaa	ctgtctgggt	accagggcgc	acgagctcgg	10080
tgtattttaag	gcgcgaatag	gcgcgggtgt	caaagatgta	atcgttgcag	gtgcgcacca	10140
gatactggta	ccctataaga	aaatgcggcg	gtggttggcg	gtagagaggc	catcgttctg	10200
tagctggagc	gccaggggcy	aggtcttcca	acataaggcg	gtgatagccg	tagatgtacc	10260
tggacatcca	ggtgattcct	gcggcggtag	tagaagcccg	aggaaactcg	cgtacgcggt	10320
tccaaatggt	gcgtagcggc	atgaagtagt	tcattgtagg	cacggtttga	ccagtgaggc	10380
gcgcgcagtc	attgatgctc	tatagacacg	gagaaaatga	aagcgttcag	cgactcgact	10440
ccgtagcctg	gaggaacgtg	aacgggttgg	gtcgcggtgt	accccggttc	gagacttgta	10500
ctcgagccgg	ccggagccgc	ggctaacgtg	gtattggcac	tcccgtctcg	accagccta	10560
caaaaatcca	ggatacggaa	tcgagtcggt	ttgctggttt	ccgaatggca	gggaagtgag	10620
tcctatTTTT	TTTTTTTgcc	gctcagatgc	atcccgtgct	gcgacagatg	cgcccccaac	10680

aacagcccc	ctcgagcag	cagcagcagc	aatcacaaaa	ggctgtccct	gcaactactg	10740
caactgccgc	cgtgagcgg	gcgggacagc	ccgcctatga	tctggacttg	gaagagggcg	10800
aaggactggc	acgtctaggt	gcgccttcac	ccgagcggca	tccgcgagtt	caactgaaaa	10860
aagattctcg	cgaggcgat	gtgccccaac	agaacctatt	tagagacaga	agcggcgagg	10920
agccggagga	gatgcgagct	tcccgcctta	acgcgggtcg	tgagctgcgt	cacggtttgg	10980
accgaagacg	agtgttgcg	gacgaggatt	tcaagttga	tgaaatgaca	gggatcagtc	11040
ctgccagggc	acacgtgtct	gcagccaacc	ttgtatcggc	ttacgagcag	acagtaaagg	11100
aagagcgtaa	cttccaaaag	tcttttaata	atcatgtgcg	aaccttgatt	gcccgcgaag	11160
aagttaccct	tggtttgatg	catttggtgg	atttgatgga	agctatcatt	cagaacccta	11220
ctagcaaacc	tctgaccgcc	cagctgtttc	tgggtggtgca	acacagcaga	gacaatgagg	11280
ctttcagaga	ggcgctgctg	aacatcaccg	aaccgcaggg	gagatggttg	tatgatctta	11340
tcaacattct	acagagtatc	atagtgcagg	agcggagcct	gggcctggcc	gagaagggtg	11400
ctgccatcaa	ttactcggtt	ttgagcttgg	gaaaatatta	cgctcgcaaa	atctacaaga	11460
ctccatacgt	tcccatagac	aaggagggtga	agatagatgg	gttctacatg	cgcatgacgc	11520
tcaaggtctt	gaccctgagc	gatgatcttg	gggtgtatcg	caatgacaga	atgcatcgcg	11580
cggttagcgc	cagcaggagg	cgcgagttaa	gcgacaggga	actgatgcac	agtttgcaaa	11640
gagctctgac	tggagctgga	accgaggggtg	agaattactt	cgacatggga	gctgacttgc	11700
agtggcagcc	tagtcgcagg	gctctgagcg	ccgcgacggc	aggatgtgag	cttccttaca	11760
tagaagaggc	ggatgaaggc	gaggaggaag	agggcgagta	cttggaagac	tgatggcaca	11820
accctgtgtt	tttgctagat	ggaacagcaa	gcaccggatc	ccgcaatgcg	ggcggcgctg	11880
cagagccagc	cgtccggcat	taactcctcg	gacgattgga	cccaggccat	gcaacgtatc	11940
atggcgttga	cgactcgcaa	ccccgaagcc	tttagacagc	aaccccaggc	caaccgtcta	12000
tccgccatca	tggaagctgt	agtgccttcc	cgctctaate	ccactcatga	gaaggtcctg	12060
gccatcgtga	acgcgttgg	ggagaacaaa	gctattcgtc	cagatgaggc	cggactggta	12120
tacaacgctc	tcttagaacg	cgtggctcgc	tacaacagta	gcaatgtgca	aaccaatttg	12180
gaccgtatga	taacagatgt	acgcgaagcc	gtgtctcagc	gcgaaagggt	ccagcgtgat	12240
gccaacctgg	gttcgctgg	ggcgttaaat	gctttcttga	gtactcagcc	tgctaattgt	12300
ccgcgtggtc	aacaggatta	tactaacttt	ttaagtgttt	tgagactgat	ggtatcagaa	12360
gtacctcaga	gcgaagtgt	tcagtccggt	cctgattact	tctttcagac	tagcagacag	12420
ggcttgacga	cggtaaatct	gagccaagct	tttaaaaacc	ttaaagggtt	gtggggagtg	12480
catgccccgg	taggagaaa	agcaaccgtg	tctagcttgt	taactccgaa	ctccgccta	12540

ttattactgt tggtagctcc tttcacccgac agcggtagca tcgaccgtaa ttcctatattg 12600
 ggttacctac taaacctgta tcgcgaagcc atagggcaaa gtcaggtgga cgagcagacc 12660
 tatcaagaaa ttacccaagt cagtcgcgct ttgggacagg aagacactgg cagtttggaa 12720
 gccactctga acttcttgct taccaatcgg tctcaaaaga tccctcctca atatgctctt 12780
 actgcgaggagg aggagaggat ccttagatat gtgcagcaga gcgtgggatt gtttctgatg 12840
 caagaggggg caactccgac tgcagcactg gacatgacag cgcgaaatat ggagcccagc 12900
 atgtatgcca gtaaccgacc tttcattaac aaactgctgg actacttgca cagagctgcc 12960
 gctatgaact ctgattatit caccaatgcc atcttaaacc cgcactggct gccccacct 13020
 ggtttctaca cgggcgaata tgacatgcc gaccctaattg acggatttct gtgggacgac 13080
 gtggacagcg atgttttttc acctctttct gatcatcgca cgtggaaaaa ggaaggcggc 13140
 gatagaatgc attcttctgc atcgctgtcc ggggtcatgg gtgctaccgc ggctgagccc 13200
 gagtctgcaa gtctttttcc tagtctaccc ttttctctac acagtgtacg tagcagcgaa 13260
 gtgggtagaa taagtgcgcc gagtttaattg ggcgaagagg agtatctaaa cgattccttg 13320
 ctacagaccgg caagagaaaa aaatttccca aacaatggaa tagaaagttt ggtggataaa 13380
 atgagtagat ggaagactta tgctcaggat cacagagacg agcctgggat catggggatt 13440
 acaagtagag cgagccgtag acgccagcgc catgacagac agaggggtct tgtgtgggac 13500
 gatgaggatt cggccgatga tagcagcgtg ctggacttgg gtgggagagg aaggggcaac 13560
 ccgtttgctc atttgcgccc tcgcttgggg ggtatgttgt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 13620
 ctaccaagg ccatggcgac gagcgtaagt tcgttcttct ttattatctg tgtctagtat 13680
 aatgaggcga gtctgtctag gcggagcggg ggtgtatccg gagggctctc ctcttcgta 13740
 cgagagcgtg atgcagcagc agcaggcgac ggcggtgatg caatccccac tggaggctcc 13800
 ctttgtgcct ccgcgatacc tggcacctac ggagggcaga aacagcattc gttattcgga 13860
 actggcacct cagtacgata ccaccagggt gtatctggtg gacaacaagt cggcggacat 13920
 tgcttctctg aactatcaga atgaccacag caacttcttg accacgggtg tgcaaaacaa 13980
 tgactttacc cctacggaag ccagcaccga gaccattaac tttgatgaac gatcgcggtg 14040
 gggcggtcag ctaaagacca tcatgcatac taacatgcca aacgtgaacg agtatatggt 14100
 tagtaacaag ttcaaagcgc gtgtgatggg gtccagaaaa cctcccgcg gtgctgcagt 14160
 tggggatact tatgatcaca agcaggatat tttgaaatat gagtgggttcg agtttacttt 14220
 gccagaaggc aacttttcag ttactatgac tattgatttg atgaacaatg ccatcataga 14280
 taattacttg aaagtgggta gacagaatgg agtgcttgaa agtgacattg gtgttaagtt 14340

cgacaccagg aacttcaagc tgggatggga tcccgaacc aagttgatca tgcctggagt 14400
 gtatacgtat gaagccttcc atcctgacat tgtcttactg cctggctgcg gagtggattt 14460
 taccgagagt cgtttgagca accttcttgg tatcagaaaa aaacagccat ttcaagaggg 14520
 ttttaagatt ttgtatgaag atttagaagg tggtaatatt ccggccctct tggatgtaga 14580
 tgcctatgag aacagtaaga aagaacaaaa agccaaaata gaagctgcta cagctgctgc 14640
 agaagctaag gcaaacatag ttgccagcga ctctacaagg gttgctaacg ctggagaggt 14700
 cagaggagac aattttgcg ccaacacctgt tccgactgca gaatcattat tggccgatgt 14760
 gtctgaaggga acggacgtga aactcactat tcaacctgta gaaaaagata gtaagaatag 14820
 aagctataat gtgttgaag acaaaatcaa cacagcctat cgcagttggt atctttcgta 14880
 caattatggc gatcccgaaa aaggagtgcg ttcttgaca ttgctacca cctcagatgt 14940
 cacctgcgga gcagagcagg tctactggtc gcttccagac atgatgaagg atcctgtcac 15000
 tttccgctcc actagacaag tcagtaacta ccctgtggtg ggtgcagagc ttatgcccg 15060
 ctctcaaag agcttctaca acgaacaagc tgtgtactcc cagcagctcc gccagtcac 15120
 ctcgcttacg cacgtcttca accgctttcc tgagaaccag attttaatcc gtccgccggc 15180
 gccaccatt accaccgtca gtgaaaacgt tctgtctctc acagatcacg ggaccctgcc 15240
 gttgcgcagc agtatccggg gagtccaacg tgtgaccgtt actgacgcca gacgccgcac 15300
 ctgtccctac gtgtacaagg cactgggcat agtcgcaccg cgcgtccttt caagccgcac 15360
 tttctaaaaa aaaaaaaaaat gtccattctt atctcgccca gtaataacac cggttggggt 15420
 ctgcgcgtc caagcaagat gtacggaggg gcacgcaaac gttctacca acatcctgtc 15480
 cgtgttcgcg gacattttcg cgctccatgg ggcgccctca agggccgcac tcgcgttcga 15540
 accaccgtcg atgatgtaat cgatcaggtg gttgccgacg cccgtaatta tactcctact 15600
 gcgcctacat ctactgtgga tgcagttatt gacagtgtag tggctgacgc tcgcaactat 15660
 gctcgacgta agagccggcg aaggcgcatt gccagacgcc accgagctac cactgccatg 15720
 cgagccgcaa gagctctgct acgaagagct agacgcgtgg ggcgaagagc catgcttagg 15780
 gcggccagac gtgcagcttc gggcgccagc gccggcaggt cccgcaggca agcagccgct 15840
 gtgcgagcgg cgactattgc cgacatggcc caatcgcgaa gaggcaatgt atactgggtg 15900
 cgtgacgctg ccaccggtca acgtgtaccc gtgcgcaccc gtcccctcg cacttagaag 15960
 atactgagca gtctccgatg ttgtgtccca gcggcgagga tgtccaagcg caaatacaag 16020
 gaagaaatgc tgcaggttat cgcacctgaa gtctacggcc aaccgttgaa ggatgaaaaa 16080
 aaaccccgca aaatcaagcg ggttaaaaag gacaaaaaag aagaggaaga tggcgatgat 16140
 gggctggcgg agtttgtgcg cgagtttgcc ccacggcgac gcgtgcaatg gcgtgggcgc 16200

aaagttcgac atgtgttgag acctggaact tcggtggtct ttacacccgg cgagcggttca 16260
 agcgctactt ttaagcgttc ctatgatgag gtgtacgggg atgatgatat tcttgagcag 16320
 gcggctgacc gattagggca gtttgcttat ggcaagcgta gtagaataac ttccaaggat 16380
 gagacagtgt cgataccctt ggatcatgga aatcccaccc ctagtcttaa accggtcact 16440
 ttgcagcaag tgttaccctt aactccgca acaggtgtta aacgcgaagg tgaagatttg 16500
 tatcccacta tgcaactgat ggtacccaaa cgccagaagt tggaggacgt tttggagaaa 16560
 gtaaaagtgg atccagatat tcaacctgag gttaaagtga gaccattaa gcaggtagcg 16620
 cctggtctgg gggtagaaac tgtagacatt aagattccca ctgaaagtat ggaagtgcaa 16680
 actgaacccg caaagcctac tgccacctcc actgaagtgc aaacggatcc atggatgcc 16740
 atgcctatta caactgacgc cgccggtccc actcgaagat cccgacgaaa gtacgggtcca 16800
 gcaagtctgt tgatgcccaa ttatgttgta caccatcta ttattcctac tcttggttac 16860
 cgaggcactc gctactatcg cagccgaaac agtacctccc gccgtcgccg caagacacct 16920
 gcaaatcgca gtcgtcgccg tagacgcaca agcaaaccga ctcccggcgc cctggtgcgg 16980
 caagtgtacc gcaatggtag tgcggaacct ttgacactgc cgcgtagcgc ttaccatccg 17040
 agtatcatca cttaatcaat gttgcccgtg cctccttgca gatatggccc tcaattgtcg 17100
 ccttcgcgtt cccatcactg gttaccgagg aagaaactcg cgccgtagaa gagggatgtt 17160
 gggacgcgga atgcgacgct acaggcgacg gcgtgctatc cgcaagcaat tgcggggtgg 17220
 ttttttacca gccttaattc caattatcgc tgctgcaatt ggcgcgatac caggcatagc 17280
 ttccgtggcg gttcaggcct cgcaacgaca ttgacattgg aaaaaaacgt ataaataaaa 17340
 aaaaaaaaaat acaatggact ctgacactcc tggctctgtg actatgtttt cttagagatg 17400
 gaagacatca atttttcatc cttggctccg cgacacggca cgaagccgta catgggcacc 17460
 tggagcgaca tcggcacgag ccaactgaac gggggcgccct tcaattggag cagtatctgg 17520
 agcgggctta aaaatttttg ctcaaccata aaaacatacg ggaacaaagc ttggaacagc 17580
 agtacaggac aggcgcttag aaataaactt aaagaccaga acttccaaca aaaagtagtc 17640
 gatgggatag ctcccgcat caatggagtg gtagatttgg ctaaccaggc tgtgcagaaa 17700
 aagataaaca gtcgtttgga cccgcgcga gcaacccag gtgaaatgca agtggaggaa 17760
 gaaattcctc cgccagaaaa acgaggcgac aagcgtcgc gtcccgattt ggaagagacg 17820
 ctggtgacgc gcgtagatga accgccttct tatgaggaag caacgaagct tggaatgccc 17880
 accactagac cgatagcccc aatggccacc ggggtgatga aaccttctca gttgcatcga 17940
 cccgtcacct tggatttgcc cctcccccct gctgctactg ctgtacccgc ttctaagcct 18000

gtcgctgccc cgaaaccagt cgccgtagcc aggtcacgtc ccggggggcgc tcctcgtcca 18060
 aatgcgcact ggcaaaatac tctgaacagc atcgtgggtc taggcgtgca aagtgtaaaa 18120
 cgccgtcgct gcttttaatt aaatatggag tagcgcttaa cttgcctatc tgtgtatatg 18180
 tgtcattaca cgccgtcaca gcagcagagg aaaaaaggaa gaggtcgtgc gtcgacgctg 18240
 agttactttc aagatggcca ccccatcgat gctgcccacaa tgggcataca tgcacatcgc 18300
 cggacaggat gcttcggagt acctgagtcg gggctctgggtg cagttcgccc gcgccacaga 18360
 cacctacttc aatctgggaa ataagtttag aaatcccacc gtagcgccga cccacgatgt 18420
 gaccaccgac cgtagccagc ggctcatgtt gcgcttcgtg cccgttgacc gggaggacaa 18480
 tacatactct taaaaagtgc ggtacaccct ggccgtgggc gacaacagag tgctggatat 18540
 ggccagcacg ttctttgaca ttaggggtgt gttggacaga ggtcccagtt tcaaacccta 18600
 ttctggtacg gcttacaact ccctggctcc taaaggcgct ccaaatacat ctcagtggat 18660
 tgcagaaggt gtaaaaaata caactggtga ggaacacgta acagaagagg aaaccaatac 18720
 tactacttac acttttggca atgctcctgt aaaagctgaa gctgaaatta caaaagaagg 18780
 actcccagta ggtttggag tttcagatga agaaagtaaa ccgatttatg ctgataaaac 18840
 atatcagcca gaacctcagc tgggagatga aacttggact gaccttgatg gaaaaaccga 18900
 aaagtatgga ggcagggctc tcaaaccoga tactaagatg aaaccatgct acgggtcctt 18960
 tgccaaacct actaatgtga aaggcggtca ggcaaaacaa aaaacaacgg agcagccaaa 19020
 tcagaaagtc gaatatgata tcgacatgga gttttttgat gcggcatcgc agaaaacaaa 19080
 ctttaagtcct aaaattgtca tgtatgcaga aaatgtaaat ttggaaactc cagacactca 19140
 tgtagtgtac aaacctggaa cagaagacac aagttccgaa gctaatttgg gacaacaatc 19200
 tatgcccac agacccaact acattggctt cagagataac tttattggac ttatgtacta 19260
 taacagtact ggtaacatgg ggggtgctggc tggtaagcg tctcagttaa atgcagtgg 19320
 tgacttgag gacagaaaca cagaactttc ttaccaactc ttgcttgact ctctgggcga 19380
 cagaaccaga tacttttagca tgtggaatca ggctgtggac agttatgatc ctgatgtacg 19440
 tgttattgaa aatcatgggtg tggaagatga acttcccac tactgttttc cactggacgg 19500
 cataggtgtt ccaacaacca gttacaaatc aatagttcca aatggagaca atgogcctaa 19560
 ttggaaggaa cctgaagtaa atggaacaag tgagatcgga cagggttaatt tgtttgccat 19620
 ggaaattaac cttcaagcca atctatggcg aagtttcctt tattccaatg tggctctata 19680
 tctcccagac tcgtacaaat acaccccgct caatgtcact cttccagaaa acaaaaacac 19740
 ctacgactac atgaacgggc ggggtgggtgcc gccatctcta gtagacacct atgtgaacat 19800
 tgggtgccagg tgggtctctgg atgccatgga caatgtcaac ccattcaacc accaccgtaa 19860

cgctggcttg cgttaccgat ccatgcttct gggtaacgga cgttatgtgc ctttccacat 19920
 acaagtgcct caaaaattct tcgctgttaa aaacctgctg cttctcccag gctcctacac 19980
 ttatgagtg aacttttagga aggatgtgaa catgggttcta cagagttccc tcggtaacga 20040
 cctgcgggta gatggcgcca gcatcagttt cagcagcatc aacctctatg ctactttttt 20100
 ccccatggct cacaacaccg cttccaccct tgaagccatg ctgcggaatg acaccaatga 20160
 tcagtcattc aacgactacc tatctgcagc taacatgctc taccctattc ctgccaatgc 20220
 aaccaatatt ccattttcca ttctttctcg caactgggcg gctttcagag gctggtcatt 20280
 taccagactg aaaaccaaag aaactccctc ttgggggtct ggatttgacc cctactttgt 20340
 ctattctggt tctattccct acctggatgg taccttctac ctgaaccaca cttttaagaa 20400
 ggtttccatc atgtttgact cttcagtgag ctggcctgga aatgacaggt tactatctcc 20460
 taacgaattt gaaataaagc gcactgtgga tggcgaaggc tacaacgtag cccaatgcaa 20520
 catgaccaa gactggttct tggtagatg gctcgccaac tacaacatcg gctatcaggg 20580
 cttctacatt ccagaaggat acaaagatcg catgtattca tttttcagaa acttccagcc 20640
 catgagcagg caggtggttg atgaggtcaa ttacaaagac ttcaaggccg tcgccatacc 20700
 ctaccaacac aacaactctg gctttgtggg ttacatggct ccgaccatgc gccaaagtca 20760
 accctatccc gctaactatc cctatccact cattggaaca actgccgtaa atagtgttac 20820
 gcagaaaaag ttcttgtgtg acagaaccat gtggcgcata ccgttctcga gcaacttcat 20880
 gtctatgggg gcccttacag acttgggaca gaatatgctc tatgccaaact cagctcatgc 20940
 tctggacatg acctttgagg tggatcccat ggatgagccc accctgcttt atcttctctt 21000
 cgaagttttc gacgtggtca gagtgcacga gccacaccgc ggcatcatcg aggcagtcta 21060
 cctgcgtaca ccgttctcgg ccggtaacgc taccacgtaa gaagcttctt gcttcttgca 21120
 aatagcagct gcaaccatgg cctgcggatc ccaaacggc tccagcgagc aagagctcag 21180
 agccattgtc caagacctgg gttgcggacc ctattttttg ggaacctacg ataagcgctt 21240
 cccgggggtc atggcccccg ataagctcgc ctgtgccatt gtaaatacgg ccggacgtga 21300
 gacgggggga gagcactggt tggctttcgg ttggaaccca cgttctaaca cctgctacct 21360
 ttttgatcct tttggattct cggatgatcg tctcaaacag atttaccagt ttgaatatga 21420
 ggggtctcctg cgccgcagcg ctcttgctac caaggaccgc tgtattacgc tggaaaaatc 21480
 taccagacc gtgcagggtc ccggttctgc cgctgcgga cttttctgct gcatgttctt 21540
 tcacgccttt gtgcactggc ctgaccgtcc catggacgga aaccccacca tgaaattgct 21600
 aactggagtg ccaacaaca tgcttcattc tcctaaagtc cagcccaccc tgtgtgacaa 21660

tcaaaaagca ctctaccatt ttcttaatac ccattcgcct tattttcgct cccatcgta 21720
 acacatcgaa agggccactg cgttcgaccg tatggatggt caataatgac tcatgtaaac 21780
 aacgtgttca ataaacatca ctttattttt ttacatgtat caaggctctg cattacttat 21840
 ttatttaciaa gtcgaatggg ttctgacgag aatcagaatg acccgagggc agtgatacgt 21900
 tgcggaactg atacttgggt tgccacttga attcggaat caccaacttg ggaaccggta 21960
 tatcgggag gatgtcactc cacagctttc tggtcagctg caaagctcca agcaggtcag 22020
 gagccgaaat cttgaaatca caattaggac cagtgccttg agcgagagag ttgcggtaca 22080
 ccggattgca gcaactgaaac accatcagcg acggatgtct cacgcttgcc agcacgggtg 22140
 gatctgcaat catgccaca tccagatctt cagcattggc aatgctgaac ggggtcatct 22200
 tgcaggtctg cctacccatg gggggcacc aattaggctt gtggttgcaa tcgcagtga 22260
 gggggatcag tatcatcttg gcctgatcct gtctgattcc tggatacacg gctctcatga 22320
 aagcatcata ttgcttgaaa gcctgctggg ctttactacc ctcggtataa aacatccgc 22380
 aggacctgct cgaaaactgg ttagctgcac agccggcatc attcacacag cagcgggct 22440
 cattgttagc tatttgcacc acacttctgc cccagcgggt ttgggtgatt ttggttcgct 22500
 cgggattctc ctttaaggct cgttgtccgt tctcgctggc cacatccatc tcgataatct 22560
 gctccttctg aatcataata ttgccatgca ggcacttcag cttgccctca taatcattgc 22620
 agccatgagg ccacaacgca cagcctgtac attcccaatt atggtgggag atctgagaaa 22680
 aagaatgtat cattccctgc agaaatcttc ccatcatcgt gctcagtgtc ttgtgactag 22740
 tgaaagttaa ctggatgcct cgggtgctcct cgtttacgta ctggtgacag atgcgcttgt 22800
 attgttcgtg ttgctcaggc attagtttaa aagaggttct aagttcgta tccagcctgt 22860
 acttctccat cagcagacac atcaacttca tgcctttctc ccaagcagac accaggggca 22920
 agctaatcgg attcttaaca gtgcaggcag cagctccttt agccagaggg tcatctttag 22980
 cgatcttctc aatgcttctt ttgccatcct tctcaacgat gcgcacgggc gggtagctga 23040
 aaccactgc tacaagttgc gcctcttctc tttcttcttc gctgtcttga ctgatgtctt 23100
 gcatggggat atgtttggc ttccctggct tctttttggg gggtatcgga ggaggaggac 23160
 tgtcgctccg ttccggagac agggaggatt gtgacgttcc gctcaccatt accaactgac 23220
 tgtcggtaga agaacctgac cccacacggc gacagggtgt tctcttcggg ggcagagggtg 23280
 gaggcgattg cgaagggtg cgggtccgac tggaggcg atgactggca gaacctctc 23340
 cgcgttcggg ggtgtgctcc ctgtggcggc cgttaactg atttctctcg cggctggcca 23400
 ttgtgttctc ctaggcagag aaacaacaga catggaaact cagccattgc tgtcaacatc 23460
 gccacgagtg ccatcacatc tcgtctcag cgacgaggaa aaggagcaga gcttaagcat 23520

tccaccgccc agtcctgcca ccacctctac cctagaagat aaggagggtcg acgcatctca 23580
 tgacatgcag aataaaaaag cgaaagagtc tgagacagac atcgagcaag acccgggcta 23640
 tgtgacaccg gtggaacacg aggaagagtt gaaacgcttt ctagagagag aggatgaaaa 23700
 ctgccccaaa caacgagcag ataactatca ccaagatgct ggaaataggg atcagaacac 23760
 cgactacctc atagggcttg acggggaaga cgcgctcctt aaacatctag caagacagtc 23820
 gctcatagtc aaggatgcat tattggacag aactgaagtg cccatcagtg tggagagct 23880
 cagccgcgcc tacgagctta acctcttttc acctcgtact cccccaaac gtcagccaaa 23940
 cggcacctgc gagccaaatc ctgccttaaa cttttatcca gcttttgctg tgccagaagt 24000
 actggctacc tatcacatct tttttaaaaa tcaaaaaatt ccagtctcct gccgcgctaa 24060
 tcgcacccgc gccgatgccc tactcaatct gggacctggt tcacgcttac ctgatatagc 24120
 ttccctggaa gaggttccaa agatcttcga gggctcgggc aataatgaga ctcgggccgc 24180
 aaatgctctg caaaagggag aaaatggcat ggatgagcat cacagcgttc tggtggaatt 24240
 ggaaggcgat aatgccagac tcgcagtact caagcgaagc atcgagggtca cacacttcgc 24300
 atatcccgct gtcaacctgc cccctaaagt catgacggcg gtcattggacc agttactcat 24360
 taagcgcgca agtccccctt cagaagacat gcatgaccca gatgcctgtg atgagggtaa 24420
 accagtggtc agtgatgagc agctaaccgc atggctgggc accgactctc ccagggattt 24480
 ggaagagcgt cgcaagctta tgatggccgt ggtgctgggt accgtagaac tagagtgtct 24540
 ccgacgtttc tttaccgatt cagaaacctt gcgc aaactc gaagagaatc tgcaactacac 24600
 ttttagacac ggctttgtgc ggcaggcatg caagatatct aacgtggaac tcaccaacct 24660
 ggtttcctac atgggtattc tgcatgagaa tcgcctagga caaagcgtgc tgcacagcac 24720
 cctgaagggg gaagcccgcg gtgattacat ccgcgattgt gtctatctgt acctgtgcca 24780
 cacgtggcaa accggcatgg gtgtatggca gcaatgttta gaagaacaga acttgaaaga 24840
 gcttgacaag ctcttacaga aatctcttaa ggttctgtgg acagggttcg acgagcgcac 24900
 cgtcgcttcc gacctggcag acctcatctt ccagagcgt ctcagggtta ctttgcgaaa 24960
 cggattgcct gactttatga gccagagcat gcttaacaat ttctgctctt tcatcctgga 25020
 acgtccggt atcctgcccg ccacctgctg cgcaactgcc tccgactttg tgccctctcac 25080
 ctaccgcgag tgccccccgc cgctatggag tcaactgctac ctgttccgtc tggccaacta 25140
 tctctcctac cactcggatg tgatcgagga tgtgagcgga gacggcttgc tggagtgtca 25200
 ctgccgctgc aatctgtgca cgccccaccg gtccctagct tgcaaccccc agttgatgag 25260
 cgaaaccag ataataggca cctttgaatt gcaaggcccc agcagccaag gcgatgggtc 25320

ttctcctggg caaagtttaa aactgacccc gggactgtgg acctccgcct acttgcgcaa 25380
 gtttgctccg gaagattacc acccctatga aatcaagttc tatgaggacc aatcacagcc 25440
 tccaaaggcc gaactttcgg cctgcgtcat caccagggg gcaattctgg cccaattgca 25500
 agccatccaa aaatcccgcc aagaatttct actgaaaaag ggtaaggggg tctaccttga 25560
 cccccagacc ggcgaggaac tcaacacaag gticcctcag gatgtcccaa cgacgagaaa 25620
 acaagaagtt gaaggtgcag ccgccgcccc cagaagatat ggaggaagat tgggacagtc 25680
 aggcagagga ggcggaggag gacagtctgg aggacagtct ggaggaagac agtttgagg 25740
 aggaaaacga ggaggcagag gagggtggaag aagtaaccgc cgacaaacag ttatcctcgg 25800
 ctgcggagac aagcaacagc gctaccatct ccgctccgag tcgaggaacc cggcggcgtc 25860
 ccagcagtag atgggacgag accggacgct tcccgaacct aaccagcgct tccaagaccg 25920
 gtaagaagga tcggcagggg tacaagtcct ggcgggggca taagaatgcc atcatctcct 25980
 gcttgcatga gtgcgggggc aacatatcct tcacgcggcg ctacttgcta ttccaccatg 26040
 ggggtgaactt tccgcgcaat gttttgcatt actaccgtca cctccacagc ccctactata 26100
 gccagcaaat cccggcagtc tcgacagata aagacagcgg cggcgacctc caacagaaaa 26160
 ccagcagcgg cagttagaaa atacacaaca agtgcagcaa caggaggatt aaagattaca 26220
 gccaacgagc cagcgcaaac ccgagagtta agaaatcgga tctttccaac cctgtatgcc 26280
 atcttccagc agagtcgggg tcaagagcag gaactgaaaa taaaaaacgg atctctgcgt 26340
 tcgctcacca gaagttgttt gtatcacaa agcgaagatc aacttcagcg cactctcgag 26400
 gacgccgagg ctctcttcaa caagtactgc gcgctgactc ttaaagagta ggcagcgacc 26460
 gcgcttattc aaaaaaggcg ggaattacat catcctcgac atgagtaaag aaattccac 26520
 gccttacatg tggagttatc aaccccaa at gggattggcg gcaggcgctt cccaggacta 26580
 ctccaccgcg atgaattggc tcagcgccgg gccttctatg atttctcgag ttaatgatat 26640
 acgcgcctac cgaaaccaa tacttttggg acagtcagct cttaccacca cgccccgcca 26700
 acaccttaat ccagaaatt ggcccgcgc cctagtgtac caggaaagtc ccgctccac 26760
 cactgtatta cttcctcgag acgcccaggc cgaagtccaa atgactaatg cagggtgcga 26820
 gttagctggc ggctccaccc tatgtcgtca caggcctcgg cataatataa aacgcctgat 26880
 gatcagaggc cgaggatatc agctcaacga cgagtcgggtg agctctccgc ttgggtctacg 26940
 accagacgga atctttcaga ttgccggctg cgggagatct tccttcaccc ctcgtcaggc 27000
 tgttctgact ttggaaagtt cgtcttcgca accccgctcg ggcggaatcg ggaccgttca 27060
 atttgtggag gaggttactc cctctgtcta cttcaacccc ttctccggat ctctggggca 27120
 ttacccggac gaggttcatac cgaacttcga cgcgattagc gagtcagtg acggctacga 27180

ttgatgtctg gtgacgcggc tgagctatct cggctgcgac atctagacca ctgccgccgc 27240
 tttcgctgct ttgcccgga actcattgag ttcattctact tcgaactccc caaggatcac 27300
 cctcaaggtc cggcccacgg agtgcggtt tctatcgaag gcaaaataga ctctcgctg 27360
 caacgaattt tctcccagcg gcccggtgctg atcgagcgag accagggaaa caccacgggt 27420
 tccattctact gcatttgtaa tcaccccgga ttgcatgaaa gcctttgctg tcttatgtgt 27480
 actgagttta ataaaaactg aattaagact ctctacgga ctgccgcttc ttcaaccgg 27540
 attttacaac cagaagaacg aaacttttcc tgtcgccag gactctgtta acttcacctt 27600
 tctactcac aaactagaag ctcaacgact acaccgcttt tccagaagca tttccctac 27660
 taatactact ttcaaaaccg gaggtgagct ccaaggctct cctacagaaa acccttgggt 27720
 ggaagcgggc cttgtagtgc taggaattct tgcgggtggg cttgtgatta ttctttgcta 27780
 cctatacaca ccttgcttca ctttcttagt ggtgtgtgg tattggttta aaaaatggg 27840
 cccatactag tcttgcttgt tttactttcg cttttggaac cgggttctgc caattacgat 27900
 ccatgtctag acttcgaccc agaaaactgc acacttactt ttgcaccgga cacaagccgc 27960
 atctgtggag ttcttattaa gtgcggatgg gaatgcaggt ccgttgaaat tacacacaat 28020
 aacaaaacct ggaacaatac cttatccacc acatgggagc caggagtcc cgagtgttac 28080
 actgtctctg tccgaggtcc tgacgggtcc atccgcatta gtaacaacac tttcattttt 28140
 tctgaaatgt gcgatctggc catgttcatg agcaaacagt attctctatg gcctcctagc 28200
 aaggacaaca tcgtaacgtt ctccattgct tattgcttgt gcgcttgctt tcttactgct 28260
 ttactgtgcg tatgcataca cctgcttcta accactcgca tcaaaaacgc caataacaaa 28320
 gaaaaaatgc cttaacctct ttctgtttac agacatggct tctcttacat ctctcatatt 28380
 tgtcagcatt gtcactgccg ctcatggaca aacagtcgtc tctatccctc taggacataa 28440
 ttacactctc ataggacccc caatcacttc agaggtcctc tggaccaaac tgggaagcgt 28500
 tgattacttt gatataatct gcaacaaaac aaaaccaata atagtaactt gcaacataca 28560
 aaatcttaca ttgattaatg ttagcaaagt ttacagcggg tactattatg gttatgacag 28620
 atacagtagt caatatagaa attacttggg tcgtgttacc cagttgaaaa ccacgaaaat 28680
 gccaaatatg gcaaagattc gatccgatga caattctcta gaaactttta catctccac 28740
 cacacccgac gaaaaaaaca tcccagattc aatgattgca attgttgag cggtggcagt 28800
 ggtgatggca ctaataataa tatgcatgct tttatatgct tgcgctaca aaaagtttca 28860
 tcctaaaaaa caagatctcc tactaaggct taacatttaa tttcttttta tacagccatg 28920
 gtttccacta ccacattcct tatgcttact agtctcgcaa ctctgacttc tgctcgctca 28980

cacctcactg taactatagg ctcaaactgc acactaaaag gacctcaagg tggatcatgtc 29040
ttttgggtgga gaatatatga caatggatgg tttaaaaaac catgtgacca acctggtaga 29100
tttttctgca acggcagaga cctaaccatt atcaacgtga cagcaaatga caaaggcttc 29160
tattatggaa ccgactataa aagtagttta gattataaca ttattgtact gccatctacc 29220
actccagcac cccgcacaaac tactttctct agcagcagtg tcgctaacaa tacaatttcc 29280
aatccaacct ttgccgcgct tttaaaacgc actgtgaata attctacaac ttcacatata 29340
acaatttcca cttcaacaat cagcattatc gctgcagtg caattggaat atctattctt 29400
gtttttacca taacctacta cgcttgcgtc tatagaaaag acaaacataa aggtgatcca 29460
ttacttagat ttgatattta atttgttctt ttttttttta ttacagtat ggtgaacacc 29520
aatcatggta cctagaaatt tcttcttcac catactcatt tgtgcattta atgtttgcgc 29580
tactttcaca gcagtagcca cagcaacccc agactgtata ggagcatttg ctctctatgc 29640
actttttgct tttgttactt gcatctgcgt atgtagcata gtctgcctgg ttattaattt 29700
tttccaactt atagactgga tccttgtgcg aattgcctac ctgcgccacc atcccgaata 29760
ccgcaaccaa aatatcgcgg cacttcttag actcatctaa aaccatgcag gctatactac 29820
caatattttt gcttctattg ctctccctac ctgtctcaac ccagctgcc tatagtactc 29880
caccagaaca ccttagaaaa tgcaaattcc aacaaccgtg gtcatttctt gcttgctatc 29940
gagaaaaatc agaaattccc ccaaatttaa taatgattgc tggaataatt aatataatct 30000
gttgccaccat aatttcattt ttgatatacc ccctatttga ttttggctgg aatgctccca 30060
atgcacatga tcatccacaa gaccagagg aacacattcc cctacaaaac atgcaacatc 30120
caatagcgct aatagattac gaaagtgaac cacaaccccc actactccct gctattagtt 30180
acttcaacct aaccggcgga gatgactgaa acactcacca cctccaattc cgccgaggat 30240
ctgctcgata tggacggccg cgtctcagaa cagcgactcg cccaactacg catccgccag 30300
cagcaggaac gcgcggccaa agagctcaga gatgtcatcc aaattcacca atgcaaaaaa 30360
ggcatattct gtttggtaaa acaagccaag atatcctacg agatcacgc tactgaccat 30420
cgctctctt acgaacttgg cccccaacga caaaaattta cctgcatggg gggaatcaac 30480
cccatagtta tccccagca aagtggagat actaagggtt gcattcactg ctcttgcgat 30540
tccatcgagt gcacctacac cctgctgaag accctatgcg gcttaagaga cctgctacca 30600
atgaattaaa aatgattaa taaaaaatca cttacttgaa atcagcaata aggtctctgt 30660
tgaaattttc tcccagcagc acctcacttc cctcttccca actctggtat tctaaacccc 30720
gttcagcggc atactttctc catactttta aggggatgtc aaatttttagc tctctctctg 30780
taccacaat cttcatgtct ttcttcccag atgaccaaga gagtccggct cagtgcactc 30840

ttcaaccctg tctacccta tgaagatgaa agcacctccc aacaccctt tataaaccca 30900
 gggtttattt ccccaaatgg cttcacacaa agcccaaacg gagttcttac tttaaaatgt 30960
 ttaacccac taacaaccac aggcggatct ctacagctaa aagtgggagg gggacttaca 31020
 gtggatgaca ccaacggttt tttgaaagaa aacataagtg ccaccacacc actcgttaag 31080
 actggtcact ctataggttt accactagga gccggattgg gaacgaatga aaataaactt 31140
 tgtatcaa ataggacaagg acttacattc aattcaaaca acatttgcat tgatgacaat 31200
 attaacacct tatggacagg agtcaacccc accgaagcca actgtcaa catgaactcc 31260
 agtgaatcta atgattgcaa attaatctta acactagtta aaactggagc actagtcaact 31320
 gcatttgttt atgttatagg agtatctaac aattttaata tgctaactac acacagaaat 31380
 ataaatttta ctgcagagct gtttttcgat tctactggta atttactaac tagactctca 31440
 tccctcaaaa ctccacttaa tcataaatca ggacaaaaca tggctactgg tgccattact 31500
 aatgctaaag gtttcatgcc cagcacgact gcctatcctt tcaatgataa ttctagagaa 31560
 aaagaaaact acatttacgg aacttgttac tacacagcta gtgatcgac tgcttttccc 31620
 attgacatat ctgtcatgct taaccgaaga gcaataaatg acgagacatc atattgtatt 31680
 cgtataactt ggtcctggaa cacaggagat gcccagagg tgcaaacctc tgctacaacc 31740
 ctagtcaact cccatttac cttttactac atcagagaag acgactgaca aataaagttt 31800
 aacttgttta tttgaaaac aattcacaaa atccgagtag ttattttgcc tcccccttc 31860
 catttaacag aatacaccaa tctctcccca cgcacagctt taaacatttg gataccatta 31920
 gatatagaca tggttttaga ttccacattc caaacagttt cagagcgagc caatctgggg 31980
 tcagtgatag ataaaaatcc atcgggatag tcttttaag cgctttcaca gtccaactgc 32040
 tgcggatgcg actccggagt ctggatcacg gtcacttgga agaagaacga tgggaatcat 32100
 aatccgaaaa cggtatcgga cgattgtgtc tcatcaaacc cacaagcagc cgctgtctgc 32160
 gtcgctccgt gcgactgctg tttatgggat cagggtccac agtgtcctga agcatgattt 32220
 taatagccct taacatcaac tttctggtgc gatgcgcgca gcaacgcatt ctgatttcac 32280
 tcaaactctt gcagtaggta caacacatta ttacaatatt gtttaataaa ccataattaa 32340
 aagcgctcca gccaaaactc atatctgata taatcgcccc tgcattgacca tcataccaaa 32400
 gtttaatat aattaaatga cgttccctca aaaacacact acccacatac atgatctctt 32460
 ttggcatgtg catattaaca atctgtctgt accatggaca acgttggtta atcatgcaac 32520
 ccaatataac ctcccggaac cacactgcc aacccgctcc cccagccatg cattgaagtg 32580
 aaccctgctg attacaatga caatgaagaa ccaattctc tcgacogtga atcaactgag 32640

aatgaaaaat atctatagtg gcacaacata gacataaatg catgcatctt ctcataattt 32700
 ttaactcctc aggattttaga aacatatccc agggaaatagg aagctcttgc agaacagtaa 32760
 agctggcaga acaaggaaga ccacgaacac aacttacact atgcatagtc atagtatcac 32820
 aatctggcaa cagcgggtgg tcttcagtca tagaagctcg ggtttcattt tctcacaac 32880
 gtggtaactg ggctctggtg taagggatgat gtctggcgca tgatgtcgag cgtgcgcgca 32940
 accttgtcat aatggagttg cttcctgaca ttctcgtatt ttgtatagca aaacgcggcc 33000
 ctggcagaac acactcttct tgccttcta tctgcccgt tagcgtgttc cgtgtgatag 33060
 ttcaagtaca accacactct taagttggtc aaaagaatgc tggcttcagt tgtaatcaaa 33120
 actccatcgc atctaactgt tctgaggaaa tcatccacgg tagcatatgc aaatcccaac 33180
 caagcaatgc aactggattg tgtttcaagc aggagaggag agggaaagaga cggaaagaacc 33240
 atgttaattt ttattccaaa cgatctcgca gtacttcaaa ttgtagatcg cgcagatggc 33300
 atctctcgcc cccactgtgt tggtgaaaaa gcacagctag atcaaaagaa atgcgatttt 33360
 caaggtgctc aacggtggct tccagcaaag cctccacgcg cacatccaag aacaaaagaa 33420
 taccaaaaga aggagcattt tctaactcct caatcatcat attacattcc tgcaccattc 33480
 ccagataatt ttcagcttct cagccttgaa ttattcgtgt cagttcttgt ggtaaatcca 33540
 atccacacat tacaaacagg tcccggaggg cgccctccac caccattctt aaacacaccc 33600
 tcataatgac aaaatatctt gctcctgtgt cacctgtagc gaattgagaa tggcaacatc 33660
 aattgacatg cccttggctc taagttcttc tttaagttct agttgtaaaa actctctcat 33720
 attatcacca aactgcttag ccagaagccc cccgggaaca agagcagggg acgctacagt 33780
 gcagtacaag cgcagacctc cccaattggc tccagcaaaa acaagattgg aataagcata 33840
 ttgggaaccg ccagtaatat catcgaagtt gctggaaata taatcaggca gagtttcttg 33900
 taaaaattga ataaaagaaa aatttgccaa aaaaacattc aaaacctctg ggatgcaaat 33960
 gcaatagggt accgcgctgc gctccaacat tgttagtttt gaattagtct gcaaaaataa 34020
 aaaaaaaaac aagcgtcata tcatagtagc ctgacgaaca gatggataaa tcagtcttct 34080
 catcacaaga caagccacag ggtctccagc tcgacctcg taaaacctgt catcatgatt 34140
 aaacaacagc accgaaagtt cctcgcggtg accagcatga ataattcttg atgaagcata 34200
 caatccagac atgttagcat cagttaacga gaaaaacag ccaacatagc ctttgggtat 34260
 aattatgctt aatcgtaagt atagcaaagc caccctcgc ggatacaaag taaaaggcac 34320
 aggagaataa aaaatataat tatttctctg ctgctgttca ggcaacgctg ccccggtcc 34380
 ctctaataac acatacaaag cctcatcagc catggcttac cagacaaagt acagcgggca 34440
 cacaagcac aagctctaaa gtgactctcc aacctctcca caatatatat atacacaagc 34500

cctaaactga cgtaatggga gtaaagtgtg aaaaatcccg ccaaacccaa cacacacccc 34560
 gaaactgcgt caccagggaa aagtacagtt tcacttccgc aatcccaaca ggcgtaactt 34620
 cctctttctc acggtacgtg atatccact aacttgcaac gtcattttcc caccgtcgca 34680
 ccgccccctt tagccgttaa cccacagcc aatcaccaca cgatccacac tttttaaaat 34740
 cacctcatct acatattggc accattccat ctataaggta tattatatag atag 34794

<210> 3
 <211> 5287
 <212> ADN
 <213> Adenovirus

<400> 3
 ctatggcatc tcgatccagc agacctctc gtttcgcggg tttggacggc tcctggaata 60
 gggatatgaga cgatgggcgt ccagcgcgtc cagggttcgg tccttcagg gtctcagtgt 120
 tcgagtcagg gttgtttccg tcacagtga ggggtgtgcg cctgcttggg cgcttgccag 180
 ggtgcgcttc agactcatcc tgctggtcga aaacttctgt cgcttggcgc cctgtatgtc 240
 ggccaagtag cagtttacca tgagttcgta gttgagcgcc tcggctgcgt ggcctttggc 300
 gcggagctta cctttggaag ttttcttgca taccgggcag tataggcatt tcagcgcata 360
 caacttgggc gcaaggaaaa cggattctgg ggagtatgca tctgcgccgc aggaggcgca 420
 aacagtttca cattccacca gccagggtta atccggttca ttgggggtcaa aaacaagttt 480
 tccgccatat tttttgatgc gtttcttacc tttggtctcc atgagttcgt gtccctcgtt 540
 agtgacaaac aggcgtgtccg tgtccccgta gactgatttt acaggcctct tctccagtgg 600
 agtgccctcg tcttcttcgt acaggaactc tgaccactct gatacaaagg cgcgcgtcca 660
 ggccagcaca aaggaggcta tgtgggaggg gtagcgatcg ttgtcaacca ggggggtccac 720
 cttttccaaa gtatgcaaac acatgtcacc ctcttcaaca tccaggaatg tgattggctt 780
 gtaggtgtat ttcacgtgac ctgggggtccc cgctgggggg gtataaaagg gggcggttct 840
 ttgctcttcc tcactgtctt ccggatcgct gtccaggaac gtcagctgtt ggggtaggta 900
 ttcctctctg aaggcgggca tgacctctgc actcagggtt tcagtttcta agaacgagga 960
 ggatttgata ttgacagtgc cggttgagat gcctttcatg aggttttcgt ccatctggtc 1020
 agaaaacaca atttttttat tgtcaagttt ggtggcaaat gatccatata gggcgttgga 1080
 taaaagtttg gcaatggatc gcatggtttg gttcttttcc ttgtccgcgc gctctttggc 1140
 ggcgatgttg agttggacat actcgcgtgc caggcacttc cattcgggga agatagttgt 1200
 caattcatct ggcacgattc tcacttgcca ccctcgatta tgcaaggtaa ttaaatccac 1260
 actggtggcc acctcgctc gaaggggttc attggtccaa cagagcctac ctcccttct 1320

agaacagaaa gggggaagtg ggtctagcat aagttcatcg ggaggggtctg catccatggt 1380
 aaagattccc ggaagtaaat ccttatcaaa atagctgatg ggagtggggt catctaaggc 1440
 catttgccat tctcgagctg ccagtgcgcg ctcatatggg ttaaggggac tgcccatgg 1500
 catgggatgg gtgagtgcag aggcatacat gccacagatg tcatagacgt agatgggatc 1560
 ctcaaagatg cctatgtagg ttggatagca tcgccccct ctgatacttg ctgcacata 1620
 gtcataatgt tcatgtgatg gcgctagcag ccccgaccc aagttgggtgc gattgggttt 1680
 ttctgttctg tagacgatct ggcgaaagat ggcgtgagaa ttggaagaga tgggtgggtct 1740
 ttgaaaaatg ttgaaatggg catgaggtag acctacagag tctctgacaa agtgggcata 1800
 agattcttga agcttggtta ccagttcggc ggtgacaagt acgtctaggg cgcagtagtc 1860
 aagtgtttct tgaatgatgt cataacctgg ttggtttttc ttttcccaca gttcgcggtt 1920
 gagaaggat tcttcgcgat ccttcagta ctcttctagc ggaaaccggt ctttgtctgc 1980
 acggttaagat cctagcatgt agaactgatt aactgccttg taagggcagc agcccttctc 2040
 tacgggtaga gagtatgctt gagcagcttt tcgtagcgaa gcgtgagtaa gggcaaagg 2100
 gtctctgacc atgactttga ggaattggta tttgaagtcg atgtcgtcac aggtccctg 2160
 ttcccagagt tggaagtcta cccgtttctt gtaggcgggg ttgggcaaag cgaaagtaac 2220
 atcattgaag agaatcttgc cggccctggg catgaaattg cgagtgatgc gaaaaggctg 2280
 tggtaacttc gctcggttat tgataacctg ggcagctagg acgatctcgt cgaaaccgtt 2340
 gatgttgtgt cctacgatgt ataattctat gaaacgcggc gtgcctctga cgtgaggtag 2400
 ctactgagc tcatcaaagg ttaggtctgt ggggtcagat aaggcgtagt gttcgagagc 2460
 ccattcgtgc aggtgaggat tcgctttaag gaaggaggac cagaggtcca ctgccagtgc 2520
 tgtttgtaac tgggccgggt actgacgaaa atgccgtccg actgccattt tttctggggt 2580
 gacgcaatag aaggtttggg ggtcctgccg ccagcgatcc cacttgagtt ttatggcgag 2640
 gtcataggcg atgttgacga gccgctggtc tccagagagt ttcatgacca gcatgaagg 2700
 gattagctgc ttgccaaagg accccatcca ggtgtagggt tccacatcgt aggtgagaaa 2760
 gagcctttct gtgcgaggat gagagccaat cgggaagaac tggatctcct gccaccagtt 2820
 ggaggaatgg ctgttgatgt gatggaagta gaactccctg cgacgcgccg agcattcatg 2880
 cttgtgcttg tacagacggc cgcagtagtc gcagcgttgc acgggttgta tctcgtgaat 2940
 gagttgtacc tggcttcctt tgacgagaaa tttcagtggg aagccgaggc ctggcgattg 3000
 tatctcgtgc ttactatgt tgtctgcac gccctgttca tcttctgtct cgatggtggt 3060
 catgctgacg agccctcgcg ggaggcaagt ccagacctcg gcgcggcagg ggcggagctc 3120

gaggacgaga gcgcgcagggc tggagctgtc cagggtcctg agacgctgcg gactcaggtt 3180
 agtaggcagt gtcaggagat taacttgcac gatcttttgg agggcgctgcg ggaggttcag 3240
 atagtacttg atctcaacgg gtccgttggg ggagatgtcg atggcttgca gggttccgtg 3300
 tcccttgggc gctaccaccg tgccttggg tttcattttg gacggcggtg gctctgttgc 3360
 ttcttgcacg tttagaagcg gtgtcgaggg cgcgcaccgg gcggcagggg cggctcggga 3420
 cccggcggca tggctggcag tggtagctcg gcgcgcgcg cgggtaggtt ctggtactgc 3480
 gccctgagaa gactcgcacg cgcgacgacg cggcggttga catcctggat ctgacgcctc 3540
 tgggtgaaag ctaccggccc cgtgagcttg aacctgaaag agagttcaac agaataatc 3600
 tcggtatcgt tgacggcggc ttgcctaagg atttcttgca cgtcaccaga gttgtcctgg 3660
 taggcgatct ccgccatgaa ctgctcgatc tcttctctt gaagatctcc gcggcccgtt 3720
 ctctcgacgg tggccgcgag gtctgtggag atgcgcccaa tgagttgaga gaatgcattc 3780
 atgccgcct cgttcacacg gcggctgtag accacggccc ccacgggatc tctcgcgcg 3840
 atgaccacct gggcgaggtt gagctccacg tggcggttga agaccgcata gttgcatagg 3900
 cgctggaaaa ggtagttgag tgtggtggcg atgtgctcgg tgacgaagaa atacatgatc 3960
 catcgtctca gcggcatctc gctgacatcg cccagagctt ccaagcgctc catggcctcg 4020
 tagaagtcca cggcaaaatt aaaaaactgg gagtttcgcg cggacacggg caactcctct 4080
 tccagaagac ggataagttc ggcgatggtg gtgcgcacct cgcgctcgaa agcccctggg 4140
 atttcttctt caatctcttc ttcttccact aacatctctt cctcttcagg tggggctgca 4200
 ggaggagggg gaacgcggcg acgcggcgcg cgcacgggca gacggtcgat gaatctttca 4260
 atgacctctc cgcggcgggc gcgcacgtt tcagtgacgg cgcggccgtt ctcgcgcggt 4320
 cgcagagtaa aaacaccgce gcgcacctcc ttaaagtggg gactgggagg ttctccgttt 4380
 gggagggaga gggcgctgat tatacatttt attaatggc ccgtagggac tgcacgcaga 4440
 gatctgatcg tgtcaagatc cacgggatct gaaaaccttt cgacgaaagc gtctaaccag 4500
 tcacagtcac aaggtaggct gagtacggct tcttgtgggc gggggtggtt atgtgttcgg 4560
 tctgggtctt ctgtttcttc ttcatctcgg gaaggtgaga cgatgctgct ggtgatgaaa 4620
 ttaaagtagg cagttctaaag acggcggtat gtggcgagga gcaccaggtc tttgggtccg 4680
 gcttgctgga tacgcaggcg attggccatt cccaagcat tatcctgaca tctagcaaga 4740
 tctttgtagt agtcttgcac gagccgttct acgggcactt ctctctcacc cgttctgcca 4800
 tgcatacgtg tgagtccaaa tccgcgcatt ggttgtacca gtgccaagtc agctacgact 4860
 ctttcggcga ggatggcttg ctgtacttgg gtaaggggtg cttgaaagtc atcaaaatcc 4920
 acaaagcggg ggtaagctcc tgtattaatg gtgtaagcac agttggccat gactgaccag 4980

traactgtct ggtgaccagg gcgcacgagc tcggtgtatt taaggcgcgga ataggcgcgg 5040
gtgtcaaaga tgtaatcggt gcaggtgcgc accagatact ggtaccctat aagaaaatgc 5100
ggcgggtggtt ggcggtagag aggccatcgt tctgtagctg gagcgccagg ggcgaggtct 5160
tccaacataa ggcggtgata gccgtagatg tacctggaca tccaggtgat tctgcggcg 5220
gtagtagaag cccgaggaaa ctgcgtacg cggttccaaa tgttgcgtag cggcatgaag 5280
tagttca 5287

<210> 4
<211> 21
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 4
gggagtttcg cgcgacacg g 21

<210> 5
<211> 21
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 5
gcgccgccgc cgcgagagg t 21

<210> 6
<211> 24
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 6
cgagagcca ttcgtgcagg tgag 24

<210> 7
<211> 24
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 7
gctgcgacta ctgcggccgt ctgt 24

<210> 8
 <211> 4195
 <212> ADN
 <213> Adenovirus

<400> 8
 tcataagact ctcggtccatc tggtcagaaa acacaatctt cttgttgtcc agcttggtgg 60
 caaatgatcc atagagggca ttggatagaa gcttggcgat ggagcgcatg gtttggttct 120
 tttccttgtc cgcgcgctcc ttggcgggtga tgttaagctg gacgtactcg cgcgccacac 180
 atttccattc aggaaagatg gttgtcagtt catccggaac tattctgatt cgccatcccc 240
 tattgtgcag ggttatcaga tccacactgg tggccacctc gcctcggagg ggctcattgg 300
 tccagcagag tcgacctcct tttcttgaac agaaaggggg gaggggggtct agcatgaact 360
 catcaggggg gtccgcatct atggtaaata ttcccggtag caaatctttg tcaaaatagc 420
 tgatggtggc gggatcatcc aagggtcatct gccattctcg aactgccagc gcgcgctcat 480
 aggggttaag aggggtgccc cagggcatgg ggtgggtgag cgcggaggca tacatgccac 540
 agatatcgta gacatagagg ggctcttcga ggatgccgat gtaagtggga taacatcgcc 600
 cccctctgat gcttgctcgc acatagtcac agagttcatg tgagggggca agaagacccg 660
 ggcccagatt ggtgcggttg ggtttttccg ccctgtaaac gatctggcga aagatggcat 720
 gggaattgga agagatagta ggtctctgga atatgttaaa atgggcatga ggtaagccta 780
 cagagtcctt tatgaagtgg gcatatgact cttgcagctt ggctaccagc tcggcgggtga 840
 tgagtacatc cagggcacag tagtcgagag tttcctggat gatgtcataa cgcggttggc 900
 rtttcttttc ccacagctcg cggttgagaa ggtattcttc gtgatccttc cagtactctt 960
 cgaggggaaa cccgtctttt tctgcacggt aagagcccaa catgtagaac tgattgactg 1020
 ccttgtaggg acagcatccc ttctccactg ggagagagta tgcttgggct gcattgcgca 1080
 gcgaggtatg agtgagggca aaagtgtccc tgaccatgac tttgaggaat tgatacttga 1140
 agtcgatgtc atcacaggcc ccctgttccc agagttggaa gtccaccgcg ttcttgtagg 1200
 cggggttggg caaagcgaaa gtaacatcat tgaagaggat cttgccggcc ctgggcatga 1260
 aatttcgggt gatthttgaaa ggctgaggaa cctctgctcg gttattgata acctgagcgg 1320
 ccaagacgat ctcatcaaag ccattgatgt tgtgccccac tatgtacagt tctaagaatc 1380
 gaggggtgcc cctgacatga ggcagcttct tgagttcttc aaaagtgaga tctgtaggg 1440
 cagtgagagc atagtgttcg agggcccatc cgtgcacgtg agggttcgct ttaaggaagg 1500
 aggaccagag gtccactgcc agtgctgttt gtaactggtc ccggtactga cgaaaatgct 1560
 gtccgactgc catcttttct ggggtgacgc aatagaaggt ttgggggtcc tgccgccagc 1620

gatccactt gagttttatg gcgaggtcat aggcgatgtt gacgagccgc tggctctccag 1680
agagtttcat gaccagcatg aaggggatta gctgcttgcc aaaggacccc atccaggtgt 1740
aggtttccac atcgtaggtg agaaagagcc tttctgtgcg aggatgagag ccaatcggga 1800
agaactggat ctctgccac cagttggagg aatggctgtt gatgtgatgg aagtagaact 1860
ccctgcgacg cgccgagcat tcatgcttgt gcttgtacag acggccgcag tactcgcagc 1920
gattcacggg atgcacctta tgaatgagtt gtacctgact tcctttgacg agaaatttca 1980
gtggaaaatt gaggcctggc gcttgtacct cgcgctttac tatgttgtct gcatcggcat 2040
gaccatcttc tgtctcgatg gtggtcatgc tgacgagccc tcgcgggagg caagtccaga 2100
cctcggcgcg gcaggggagg agctcgagga cgagagcgcg caggccggag ctgtccaggg 2160
tcctgagacg ctgcggagtc aggttagtag gcagtgtcag gagattaact tgcattgatct 2220
tttgaggggc gtgagggagg ttcatagatg acttgatctc aacgggtccg ttggtggaga 2280
tgtcgatggc ttgcagggtt ccgtgtccct tgggcgtac caccgtgcc ttgtttttca 2340
ttttggacgg cgggtggctct gttgcttctt gcatgttttag aagcgggtgc gagggcgcg 2400
accgggcggc aggggcggct cgggacccgg cggcatggct ggcagtggta cgtcggcgcc 2460
gcgcgcgggt aggttctggt actgcgccct gagaagactc gcatgcgcga cgacgcggcg 2520
gttgacatcc tggatctgac gcctctgggt gaaagctacc ggccccgtga gcttgaacct 2580
gaaagagagt tcaacagaat caatctcggg atcgttgacg gcggcttgcc taaggatttc 2640
ttgcacgtcg ccagagttgt cctggtaggc gatctcggcc atgaactgct cgatctcttc 2700
ctcttgaaga tctccgcggc ccgctctctc gacggtggcc gcgaggtcgt tggagatgcg 2760
cccaatgagt tgagagaatg cattcatgcc cgcctcgttc cagacgcggc tgtagaccac 2820
agccccacg ggatctctcg cgcgcacgac cacctgggcg aggttgagct ccacgtggcg 2880
gggtgaagacc gcatagttgc ataggcgctg gaaaaggtag ttgagtgtgg tggcgatgtg 2940
ctcggtgacg aagaaataca tgatccatcg tctcagcggc atctcgctga catcgcccag 3000
cgcttccaag cgctccatgg cctcgtagaa gtccaaggca aagttaaaaa actgggagtt 3060
acgcgcggac acggtcaact cctcttccag aagacggata agttcggcga tgggtggtgcg 3120
cacctcgcgc tcgaaagccc ctgggatttc ttctcaatc tcttcttctt ccactaacat 3180
ctcttctctc tcaggtgggg ctgcaggagg agggggaacg cggcgacgcc ggcggcgcac 3240
gggcagacgg tcgatgaatc tttcaatgac ctctccgcgg cggcggcgca tggctctcgg 3300
gacggcacga ccgttctccc tgggtctcag agtgaagacg cctccgcgca tctccctgaa 3360
gtggtgactg ggaggctctc cggtgggcag ggacacgcg ctgattatgc attttatcaa 3420
ttgccocgta ggtactccgc gcaaggacct gatcgtctca agatccacgg gatctgaaaa 3480

cctttcgacg aaagcgtcta accagtcgca atcgcaaggt aggctgagca ctgtttcttg	3540
cgggcggggg cggctagacg ctcggtcggg gttctctctt tcttctcctt cctcctcttg	3600
ggagggtgag acgatgctgc tggatgatgaa attaaaatag gcagttttga gacggcggat	3660
ggtggcgagg agcaccaggt ctttgggtcc ggcttggttg atacgcaggc gatgagccat	3720
tccccaagca ttatcctgac atctggccag atctttatag tagtcttgca tgagtcgttc	3780
cacgggcact tcttcttcgc ccgctctgcc atgcatgcga gtgatccga acccgcgcat	3840
gggctggaca agtgccaggt ccgctacaac ctttcggcg aggatggctt gctgcacctg	3900
ggtgagggtg gcttggaagt cgtcaaagtc cacgaagcgg tggtagggcc cggtggtgat	3960
tgtgtaggag cagttggcca tgactgacca gttgactgtc tggtgcccag ggcgcacgag	4020
ctcggtgtac ttgaggcgcg agtatgcgcg ggtgtcaaag atgtaatcgt tgcaaggcgc	4080
caccaggtac tggtagccaa tgagaaagtg tggcgggtggc tggcgggtaca ggggccatcg	4140
ctctgtagcc ggggctccgg gggcgaggtc ttccagcatg aggcggtggt agccg	4195

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

PCT
Informe de Búsqueda Internacional

(Artículo PCT 18, así como reglas PCT 43 y 44)

Referencia del solicitante o del agente 53183AWOM1	PROCEDER Ver notificación formulario PCT/ISA/220, así como, en tanto corresponda, el punto 5.abajo	
Referencia Internacional PCT/US 2005/018301	Fecha de presentación Internacional 24.05.2005	Fecha de prioridad (la más antigua) (día/mes/año) 26.05.2004
*Solicitante SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT		

Este Informe de Búsqueda Internacional fue elaborado por el Organismo de Búsqueda Internacional y, de acuerdo con el artículo 18, es enviado al solicitante. Se envía una copia a la Oficina Internacional.

Este Informe de búsqueda Internacional comprende, en total, 5 hojas.

☒ Además se adjunta una copia de cada uno de los antecedentes del estado de la técnica mencionados en este Informe

1. Fundamentos del Informe

a. Con respecto al idioma, la búsqueda internacional, en tanto no se indique otra cosa en este punto, fue llevada a cabo sobre la base de:

☒ la solicitud internacional en el idioma en que fue presentada

☐ La búsqueda internacional fue llevada a cabo basada sobre una traducción de la solicitud internacional presentada ante el organismo (regla 23.1 b)).

b. ☒ Con respecto a los nucleótidos y/o aminoácidos revelados en la solicitud internacional, ver campo Nº 1

2. ☒ Determinadas reivindicaciones no eran investigables (ver campo II).

3. ☐ La invención carece de uniformidad (ver campo III).

4. Con respecto al título,

☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.

☐ el texto fue establecido por el organismo como sigue:

5. Con respecto al resumen,

☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.

☐ el texto fue establecido por el organismo, de acuerdo con la regla 38.2 b), en la versión indicada en el campo IV. El solicitante puede presentar una posición ante el organismo en el transcurso de un mes a partir de la fecha del envío de este Informe de Búsqueda Internacional.

6. Con respecto a las ilustraciones

a. Con el resumen se debe publicar la siguiente figura de Las Ilustraciones: figura Nº .

☐ sugerida por el solicitante.

☐ seleccionada por el organismo, dado que el mismo solicitante no sugiere ninguna figura.

☐ seleccionada por el organismo, dado que esta figura caracteriza mejor la invención.

b. ☒ con el resumen no se publica ninguna de las ilustraciones

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional

PCT/US 2005/018301

Campo I: Secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos (continuación del ítem 1.b de la hoja 1)

- 1- Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos revelados en la solicitud internacional y necesarios para la invención reivindicada, la búsqueda internacional fue llevada a cabo basada sobre:
 - a. Tipo de material
 - ☒ un listado de secuencia
 - ☐ tabla(s) relacionada(s) con el listado de secuencia
 - b. Formato del material
 - ☒ en papel
 - ☒ en forma electrónica
 - c. Momento de presentación/suministro
 - ☒ contenido en la solicitud internacional tal como fue presentada
 - ☒ presentado con la solicitud internacional en forma electrónica
 - ☐ suministrado posteriormente a los propósitos de la búsqueda
2. ☐ Adicionalmente, en caso de que fueran presentadas o suministradas más de una versión o copia del listado de secuencia y/o tabla relacionada a ésta, se suministra la declaración requerida de que la información incluida en las copias subyacentes o adicionales es idéntica a aquella incluida en la solicitud tal como fue presentada o no supera la solicitud tal como fue presentada, lo que sea apropiado.
3. Comentarios adicionales

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional

PCT/US 2005/018301

Campo II: Observaciones acerca de porque determinadas reivindicaciones no eran investigables (continuación del ítem 2 de la hoja 1)

Este Informe de Búsqueda Internacional no fue realizado con respecto a algunas reivindicaciones, según el artículo 17(2)(a), por las siguientes razones:

- 1. ☒ Reivindicaciones Nº:
porque se refieren a objetos que no requieren ser investigados por esta autoridad, a saber:

Si bien las reivindicaciones 15-18 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano /animal, la búsqueda se llevó a cabo basada sobre los efectos alegados del compuesto/composición.

- 2. ☐ Reivindicaciones Nº:
porque se refieren a partes de la Solicitud Internacional que no cumplen con los requisitos prescritos en una extensión que no permite llevar a cabo una búsqueda internacional, específicamente:

- 3. ☐ Reivindicaciones Nº:
porque son reivindicaciones dependientes y no están desarrolladas en conformidad con la segunda y la tercera frase de la regla 6.4(a).

Campo III: Observaciones por falta de uniformidad de la invención (continuación del ítem 3 de la hoja 1)

Este Organismo de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, a saber:

- 1. ☐ Como todas las tasas adicionales fueron abonadas en término por el solicitante, este Informe de Búsqueda Internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.

- 2. ☐ Como todas las reivindicaciones investigables pueden ser investigadas sin un esfuerzo que justifique una tasa adicional, este Organismo no solicita ningún pago o tasa adicional.

- 3. ☐ Como solo algunas de las tasas adicionales fueron abonadas en término por el solicitante, este Informe de Búsqueda Internacional cubre solo aquellas reivindicaciones para las cuales fueron abonadas las tasas, específicamente, las reivindicaciones Nº:

- 4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas fue abonada en término por el solicitante. En consecuencia, este Informe de Búsqueda Internacional está restringido a la invención mencionada inicialmente en las reivindicaciones; la misma está cubierta por las reivindicaciones Nº:

Observaciones sobre protestas

- ☐ Las tasas adicionales fueron acompañadas por la protesta del solicitante

- ☐ Las tasas adicionales no fueron acompañadas por ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL		Referencia Internacional PCT/US 2005/018301
A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD		
INV. C12N15861 C12N7/01 C12N7/02 A61K48/00		
Según la clasificación internacional de patentes (IPK) o la clasificación internacional la IPK		
B. ÁMBITOS INVESTIGADOS		
Materiel mínimo investigado (Sistema de clasificación y símbolos de clasificación) C12N		
Publicaciones investigadas pero no pertenecientes al material mínimo investigado, en tanto pertenezcan al ámbito investigado		
Banco electrónico de datos consultado durante la búsqueda internacional (nombre del banco de datos y expresiones de búsqueda eventualmente empleadas) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE		
C. ANTECEDENTES CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría	Denominación de la publicación, así como, de ser requerido, indicación de las piezas consideradas	Con referencia a reivindicación Nº
P, X	KUHN ET AL.: "319. ColoAd1, a Chimeric Ad11p/Ad3 Oncolytic Virus for the Treatment of Colon Cancer" MOLECULAR THERAPY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 11, 15 de agosto de 2005 (2005.08.15), página 124, XP005015658 ISSN: 1525-0018 todo el documento	1-8, 9-11, 24
A	STONE ET AL.: "THE COMPLETE NUCLEOTIDE SEQUENCE, GENOME ORGANIZATION AND ORIGIN OF HUMAN ADENOVIRUS TYPE 11" VIROLOGY, RAVEN PRESS, NEW YORK, NY, US vol. 308, nº 1, 25 de abril de 2003 (2003.4.25), páginas 152-165, XP001153788 ISSN: 0042-6822 mencionado en la solicitud todo el documento	1-27
☒ Otras publicaciones están listadas en la continuación del campo C		☐ Ver familia de patentes en el anexo
"A"	Categorías particulares indicadas en publicaciones que define el estado general de la técnica pero no considerada como particularmente importante	"T" publicaciones posteriores a las difundidas en la fecha de presentación internacional o de la fecha de prioridad y que no colisionan con la solicitud, sino que solo están indicadas para mayor entendimiento del principio fundamental de la invención o de la teoría sobre la cual se basa
"B"	documento anterior pero publicado recién o después de la de la fecha de presentación internacional	"X" publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada, solo como consecuencia de esta publicación, como novedosa o apoyarse en una actividad inventiva
"L"	publicación adecuada para hacer aparecer como dudosa una reivindicación de prioridad, o mediante la cual debe ser considerada la fecha de divulgación de otra publicación mencionada en el informe de búsqueda o que es indicada por otra razón particular (como realizada)	"Y" publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada como apoyada en una actividad inventiva cuando puede ser relacionada con una o varias otras publicaciones de esta categoría y tal relación es notoria para un especialista
"O"	publicación que se refiere a una revelación oral, a una utilización, a una exposición o a otras disposiciones	"Z" publicación que es miembro de la misma familia
"P"	publicación realizada antes de la fecha de presentación internacional pero luego de la fecha de prioridad reivindicada	
Fecha de finalización de la búsqueda internacional 10 de agosto de 2006		Fecha de envío del Informe de Búsqueda Internacional 29.08.2006
Nombre y Código Postal de ISA European Patent Office – P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel.: (+31-70) 340-2040; Tx: 31 851 apo nl Fax: (+31-70) 340-3018		Funcionario Apoderado Donath, C

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL		Referencia Internacional
		PCT/US 2005/018301
C. (continuación) ANTECEDENTES CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría	Denominación de la publicación, así como, de ser requerido, indicación de las piezas consideradas	Con referencia a reivindicación N°
A	MEI Y-F ET AL.: "Comparative analysis of the genome organization of human adenovirus 11, a member of the human adenovirus species B, and the commonly used human adenovirus 5 vector, a member of species C" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, SPENCERS WOOD, GB, vol. 84, n° PART 8 agosto de 2003 (2003-08) páginas 2061-2071, XP002249517 ISSN: 0022-1317 mencionado en la solicitud todo el documento	1-27
A	YAN WEN ET AL.: "Developing novel oncolytic adenoviruses through bioselection" JOURNAL OF VIROLOGY vol. 77, N° 4, febrero de 2003 (2003-02) páginas 2640-2650, XP002394479 ISSN: 0022-538X todo el documento	1-27
A	HERMISTON ET AL.: "Armed therapeutic viruses: Strategies and challenges to arming oncolytic viruses with therapeutic genes" CANCER GENE THERAPY 01 DEC 2002 UNITED STATES vol. 9, N° 12 1 de diciembre de 2002 (2002.12.01), páginas 1022-1035, XP002384972 ISSN: 0929-1903 todo el documento	1-27
A	HERMISTON ET AL.: "The discovery and development of selectively replicating adenoviruses as anticancer agents" TUMOR TARGETING 1999 UNITED KINGDOM, vol. 4, N° 4, 1999, páginas 218-224 XP009070598 ISSN: 1351-8488 todo el documento	1-27

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 53183AWOM1	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/US2005/018301	International filing date (day/month/year) 24/05/2005	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 26/05/2004
Applicant SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT		

This International search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International search report consists of a total of 5 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2005/018301

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/861 C12N7/01 C12N7/02 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	KUHN ET AL: "319. ColoAd1, a Chimeric Ad11p/Ad3 Oncolytic Virus for the Treatment of Colon Cancer" MOLECULAR THERAPY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA,, US, vol. 11, 15 August 2005 (2005-08-15), page 124, XP005015658 ISSN: 1525-0016 the whole document — — — — — -/-	1-6, 9-11, 24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance;

"E" earlier document but published on or after the international filing date;

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified);

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means;

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed;

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention;

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone;

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents; such combination being obvious to a person skilled in the art;

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 August 2006

Date of mailing of the international search report

29/08/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-8840, Tx. 31 651 apo nl,
Fax (+31-70) 340-8016

Authorized officer

Donath, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2005/018301

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A ✓	STONE D ET AL: "THE COMPLETE NUCLEOTIDE SEQUENCE, GENOME ORGANIZATION, AND ORIGIN OF HUMAN ADENOVIRUS TYPE 11" VIROLOGY, RAVEN PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 309, no. 1, 25 April 2003 (2003-04-25), pages 152-165, XP001153788 ISSN: 0042-6822 cited in the application the whole document	1-27
A ✓	MEI Y-F ET AL: "Comparative analysis of the genome organization of human adenovirus 11, a member of the human adenovirus species B, and the commonly used human adenovirus 5 vector, a member of species C" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, SPENCERS WOOD, GB, vol. 84, no. PART 8, August 2003 (2003-08), pages 2061-2071, XP002249517 ISSN: 0022-1317 cited in the application the whole document	1-27
A ✓	YAN WEN ET AL: "Developing novel oncolytic adenoviruses through bioselection." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 77, no. 4, February 2003 (2003-02), pages 2640-2650, XP002394479 ISSN: 0022-538X the whole document	1-27
A	HERMISTON T W ET AL: "Armed therapeutic viruses: Strategies and challenges to arming oncolytic viruses with therapeutic genes." CANCER GENE THERAPY 01 DEC 2002 UNITED STATES, vol. 9, no. 12, 1 December 2002 (2002-12-01), pages 1022-1035, XP002384972 ISSN: 0929-1903 the whole document	1-27
A	HERMISTON T ET AL: "The discovery and development of selectively replicating adenoviruses as anticancer agents" TUMOR TARGETING 1999 UNITED KINGDOM, vol. 4, no. 4, 1999, pages 218-224, XP009070596 ISSN: 1351-8488 the whole document	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/018301**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 15-18 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2005/018301

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☒ contained in the international application as filed
 - ☒ filed together with the international application in electronic form
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

Del ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL		PCT	
A ver formulario PCT/ISA/220		INFORME ESCRITO DEL ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL (regla PCT Nº 43b/a.1)	
		Fecha de envío (día/mes/año) ver formulario PCT/ISA/210 (hoja 2)	
Referencia del Solicitante o Agente ver formulario PCT/ISA/220		PROCEDER Ver abajo, punto 2	
Referencia Internacional PCT/AUS 2005/018301	Fecha de Presentación Internacional (día/mes/año) 24.05.2005	Fecha de Prioridad (día/mes/año) 28.05.2004	
Clasificación Internacional de Patentes (IPK) o clasificación nacional e IPK INV. C12N15/861, C12N7/01, C12N7/02, A61K48/00			
Solicitante SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT			

1. Este informe contiene indicaciones acerca de los siguientes puntos:	
☒ Campo Nº I	Fundamento del informe
☒ Campo Nº II	Prioridad
☐ Campo Nº III	No realización de dictamen alguno sobre novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial
☐ Campo Nº IV	Falta de uniformidad de la invención
☒ Campo Nº V	Declaración fundada según regla PCT 43b/a.1(a)(i) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; documentos y aclaraciones destinadas a apoyar esta resolución.
☒ Campo Nº VI	Documentos específicos expuestos
☐ Campo Nº VII	Falencias específicas de la solicitud internacional
☐ Campo Nº VIII	Observaciones específicas a la solicitud internacional
2. PROCEDER	
Cuando se solicita un Examen Preliminar Internacional, este informe es válido como informe escrito del organismo encargado de la búsqueda internacional ("IPEA"); esto no es así cuando, según la regla 86.1bis(b), el solicitante elige otro organismo distinto a este como IPEA y el IPEA elegido informó a la Oficina internacional que los informes escritos de este organismo de búsqueda internacional no serán reconocidos.	
Cuando este informe es válido como informe escrito de IPEA, tal como está previsto arriba, el solicitante es intimado a presentar ante IPEA una posición por escrito, y cuando corresponde, modificaciones, en el plazo de 3 meses a partir de la fecha en la que fue remitido el formulario PCT/ISA/220 o en el plazo de 22 meses a partir de la fecha de prioridad, según el plazo que venza más tarde.	
Para otras opciones, ver formulario PCT/ISA/220.	
3. Para otros detalles, ver las instrucciones del formulario PCT/ISA/220.	

Nombre y Dirección Postal del ISA Oficina de Patentes Europeas D - 80296 Munich Tel.: +49 89 23699 - 0; Tx: 523656 apmu d Fax: +49 89 23699 - 4485	Funcionario Apoderado Donath, C Tel: +49 89 23699-8710
--	--

Campo Nº I	Fundamento del Informe
1.	Con respecto al idioma, el informe fue confeccionado, basado sobre la solicitud internacional, en el idioma en que fue presentada, en tanto en este punto no se indique otra cosa. ☒ La solicitud internacional en el idioma en que fue presentada ☐ El informe está basado sobre una traducción del idioma original al siguiente idioma, al que se trata del idioma de la traducción presentada a los efectos de la búsqueda internacional (según las reglas 12.3 y 23.1 b)).
2.	Con respecto a la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos revelada en la solicitud internacional y requerida para la invención reivindicada, el informe fue confeccionado sobre la siguiente base: a. Tipo de material ☐ listado de secuencias ☐ tablas del listado de secuencias b. Forma del material ☐ en forma escrita ☐ en forma legible por computadora c. Momento de la presentación ☐ comprendido en la presentación internacional tal como fue presentada ☐ presentado, junto con la solicitud internacional, en forma legible por computadora ☐ suministrado posteriormente ante el organismo a los efectos de la búsqueda
3.	☐ Habiendo presentado más de una versión o copia de un protocolo de secuencias y/o la tabla correspondiente se deben presentar adicionalmente las declaraciones requeridas de que la información de las copias presentadas posteriormente o adicionales coincide con la versión original de la solicitud o que no la supera.
4.	Observaciones adicionales

Campo Nº II	Prioridad
1.	☒ No fue considerada la validez de la reivindicación de prioridad porque el Organismo de Búsqueda Internacional no estaba en posesión de una copia de la solicitud anterior cuya reivindicación fue reivindicada o, cuando es requerida, de una traducción de tal solicitud anterior. De cualquier forma, este informe fue confeccionado asumiendo que el dato relevante es la fecha de prioridad reivindicada (reglas 34bis.1 y 64.1).
2.	☐ Este informe fue confeccionado como si no se hubiera reivindicado una prioridad, debido al hecho de que se consideró no válida la reivindicación de prioridad (reglas 43bis.1 y 564.1). En consecuencia, a los propósitos de este informe, la fecha de presentación indicada arriba es considerada la fecha relevante.
3.	Observaciones adicionales, si corresponden:

INFORME ESCRITO DEL
ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional
PCT/US 2005/018301

Campo N° V	Resolución fundada según regla PCT 43b/a.1(a)(i) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; documentos y aclaraciones destinadas a apoyar esta resolución			
1. Resolución				
Novedad	SI	Reivindicaciones:		1-27
	No	Reivindicaciones:		
Actividad inventiva	SI	Reivindicaciones:		1-27
	No	Reivindicaciones:		
Aplicabilidad industrial	SI	Reivindicaciones:		1-27
	No	Reivindicaciones:		
2. Documentos y aclaraciones:				
ver hoja adjunta				

Campo N° VI Antecedentes definidos mencionados

- 1- Documentos definidos publicados (reglas 43b/a.1 y 70.10)
 y/o
- 2. Revelaciones no escritas (reglas 43b/a.1 y 70.9)
 ver formulario 210

Campo N° VIII Observaciones definidas sobre la solicitud internacional

Se efectúan las siguientes observaciones acerca de la claridad de las reivindicaciones, descripción e ilustraciones o de la cuestión de si las reivindicaciones están completamente apoyadas por la descripción:
 ver hoja adjunta

Con respecto al ítem V

Resolución fundada según regla PCT 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; documentos y aclaraciones destinadas a apoyar esta resolución

1. Se mencionan los siguientes documentos:

D1: YAN WEN ET AL.: "Developing novel oncolytic adenoviruses through bioselection", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 77, Nº 4, febrero de 2003 (2003-02), páginas 2640-2650, XP002394479, ISSN: 0022-538X

D2: HERMISTON ET AL.: "Armed therapeutic viruses: Strategies and challenges to arming oncolytic viruses with therapeutic genes", CANCER GENE THERAPY 01 DEC 2002 UNITED STATES, vol. 9, Nº 12, 1 de diciembre de 2002 (2002.12.01), páginas 1022-1035, XP002384972, ISSN: 0829-1903

- 2. La presente solicitud internacional se refiere a adenovirus quiméricos oncolíticos. Tales adenovirus oncolíticos incluyen una región E2B que comprende secuencias de ácidos nucleicos derivados de dos serotipos adenovirales diferentes, clasificados dentro de los subgrupos B a F. Además, la presente solicitud internacional se refiere a un método para el aislamiento de tales adenovirus quiméricos oncolíticos, así como a métodos para la inhibición del crecimiento de una célula cancerosa mediante el uso de tales adenovirus quiméricos oncolíticos. A la luz de los documentos mencionados en el Informe de Búsqueda Internacional, el objeto de las reivindicaciones 1-27 de la presente solicitud internacional son considerados novedosos (artículo PCT 33(2)).**
- 3. El estado de la técnica más cercano para evaluar el objeto de las reivindicaciones 1-27 de la presente solicitud internacional es el documento D1.**
D1 describe mutantes de adenovirus humanos (Ad5) con actividad oncolítica aumentada. Dos mutantes, ONYX-201 y ONIX-203, fueron purificados en placa a partir de un conjunto de Ad5 mutados al azar que fueron pasados repetidas veces en la línea de cáncer celular colorectal humano HT29. Ambos, ONYX-201 y ONIX-203, contienen siete mutaciones de pares de base simple cuando son comparados con Ad5, cuatro de los cuales son comunes entre ONYX-201 y ONIX-203. La mutación en el nucleótido 8352, compartida por ambos virus mutantes, fue observada como esencial en los fenotipos observados. Esta mutación fue mapeada en la región líder de la mayor transición tardía, resultando en el truncamiento de 21 aminoácidos del término C de la proteína líder.
En el estado de la técnica no se dan indicaciones de un adenovirus quimérico oncolítico que incluya una región E2B que comprende secuencias de ácidos nucleicos derivados de dos serotipos adenovirales clasificados dentro de los subgrupos B a F.
Además, también D2 resume resultados clínicos normales con virus oncolíticos selectivos a replicación, referidos a adenovirus que poseen tanto mutaciones en la región E2A como supresiones en la región E1B y/o E3.
En consecuencia, ninguno de los dos documentos mencionados en el Informe de Búsqueda Internacional puede inducir a un experto a desarrollar un adenovirus quimérico oncolítico que incluye una región E2B que comprende secuencias de ácidos nucleicos derivados de dos serotipos adenovirales diferentes clasificados dentro de los subgrupos B a F, como se reivindica en la presente solicitud internacional.
En consecuencia, se reconoce una actividad inventiva para las reivindicaciones 1-27 de la presente solicitud internacional (artículo PCT 33(3)).

Con respecto al ítem VI

Antecedentes definidos mencionados

KUHN ET AL.: "319. ColoAd1, a Chimeric Ad11p/Ad3 Oncolytic Virus for the Treatment of Colon Cancer", MOLECULAR THERAPY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 11, 15 de agosto de 2005 (2005.08.15), página 124, XP005015658, ISSN: 1525-0016

A pesar de que el documento precedente no integra el estado de la técnica en el sentido de la regla PCT 64.1(b), el mismo parece revelar todas las realizaciones de las reivindicaciones 1-8, 9-11 y 24 de la presente solicitud internacional.

Con respecto al ítem VIII

Observaciones definidas sobre la solicitud internacional

1. Con respecto a las reivindicaciones 15-18, así como en lo que concierne a métodos *in vivo*, Informamos que en el caso de una solicitud europea tales reivindicaciones no son permitidas porque "métodos de tratamiento del cuerpo humano/animal mediante cirugía o métodos de terapia y diagnóstico practicados en el cuerpo humano o animal no son consideradas invenciones susceptibles de aplicación industrial".

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2005/018301

International filing date (day/month/year)
24.05.2005

Priority date (day/month/year)
26.05.2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C12N15/861 C12N7/01 C12N7/02 A61K48/00

Applicant
SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII: Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 68.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80299 Munich
Tel: +49 89 2369 - 0 Tx: 523655 epmu d
Fax: +49 89 2369 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Donath, C

Telephone No. +49 89 2369-8710



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2005/018301

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2005/018301

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(I) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-27
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	1-27
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-27
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and/or

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

Box No. VII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2005/018301

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
observations and explanations supporting such statement**

1. The following documents are cited:

- D1: YAN WEN ET AL: "Developing novel oncolytic adenoviruses through
bloselection." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 77, no. 4, February 2003 (2003-
02), pages 2640-2650, XP002394479 ISSN: 0022-538X**
- D2: HERMISTON T W ET AL: "Armed therapeutic viruses: Strategies and
challenges to arming oncolytic viruses with therapeutic genes" CANCER GENE
THERAPY 01 DEC 2002 UNITED STATES, vol. 9, no. 12, 1 December 2002
(2002-12-01), pages 1022-1035, XP002384972 ISSN: 0929-1903**

**2. The present International application concerns oncolytic chimeric adenoviruses. Said
chimeric adenoviruses comprise an E2B region which comprises nucleic acid
sequences derived from two different adenoviral serotypes classified within the
subgroups B through F. Furthermore, the present International application refers to a
method for isolating said oncolytic chimeric adenovirus as well as to methods of
inhibiting growth of a cancer cell by the use of said oncolytic chimeric adenovirus.
In view of the documents cited in the International Search Report the subject-matter
of claims 1-27 of the present International application has to be regarded as being
new (Article 33(2) PCT).**

**3. The closest prior art to evaluate the subject-matter of claims 1-27 of the present
international application is document D1.
D1 describes mutants of human adenovirus 5 (Ad5) with enhanced oncolytic activity.
Two mutants, ONYX-201 and ONYX-203, were plaque purified from a pool of
randomly mutagenized Ad5 that was repeatedly passaged in the human colorectal
cancer cell line HT29. Both ONYX-201 and -203 contain seven single-base-pair
mutations when compared with Ad5, four of which were common between ONYX-201
and -203. The mutation at nucleotide 8350, shared by both mutant viruses, was
shown to be essential for the observed phenotypes. This mutation was mapped to
the i-leader region of the major late transcription unit, resulting in the truncation of 21**

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2005/018301

amino acids from the C terminus of the i-leader protein.

In the prior art no indication has been given for an oncolytic chimeric adenovirus comprising an E2B region which comprises nucleic acid sequences derived from two different adenoviral serotypes classified within the subgroups B through F.

Moreover, even D2 reviewing current clinical results with replication-selective oncolytic viruses refers to adenoviruses having either mutations in the E1A region or deletions in/of the E1B or E3 region.

Thus, none of the documents cited in the International Search Report will prompt the skilled person to develop an oncolytic chimeric adenovirus comprising an E2B region which comprises nucleic acid sequences derived from two different adenoviral serotypes classified within the subgroups B through F as claimed in the present International application.

Therefore, an inventive step has to be acknowledged for claims 1-27 of the present International application (Article 33(3) PCT).

Re Item VI

Certain documents cited

KUHN ET AL: "319. ColoAd1, a Chimeric Ad11p/Ad3 Oncolytic Virus for the Treatment of Colon Cancer" MOLECULAR THERAPY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA., US, vol. 11, 15 August 2005 (2005-08-15), page 124, XP005015658 ISSN: 1525-0016

Although the above document does not constitute prior art within the meaning of Rule 64.1(b) PCT, the document appears to disclose all features of claims 1-6, 9-11 and 24 of the present International application.

Re Item VIII

Certain observations on the International application

1. With respect to claims 15-18 and insofar as in vivo methods are concerned you are already informed that in case of an European application said claims are not allowable because, "methods of treatment of the human or animal body by surgery or

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2005/018301

therapy and diagnostic methods practised on the human or animal body shall not be regarded as inventions which are susceptible of industrial application."

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Descripción de la invención []
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

199

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RAISBECK J. IAN
Apoderado(a) y/o Representante de
SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT

REFERENCIA	Radicación No.	06 127751
	Solicitud internacional	PCT/US2005/018301
	Fecha inicio fase nacional	26/12/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	1913

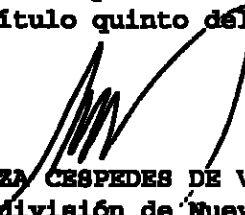
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. No obstante haber allegado copia tanto del poder como del documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, debe allegar la legalización de los mismos, de conformidad con el artículo 259 del Código de procedimiento Civil, o en su defecto, legalizados a través de la apostille.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMONA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 09-FEB. 2007
adpa10