

平成 25 年 7 月 12 日

遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保
に関する法律に基づき申請のあった第一種使用規程に係る意見
について

遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会
委員長 山口 照英

遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成 15 年法律第 97 号）に基づき申請のあった下記の遺伝子組換え生物等の第一種使用規程について、本審査委員会^注で検討を行い、その結果を別紙のとおりとりまとめたので報告いたします。

記

1. HGF の競合的アンタゴニストである NK4 を発現する非増殖性の遺伝子組換えアデノウイルス 5 型ベクター（Ad5CMV-NK4）
申請者：千葉大学医学部附属病院 病院長 宮崎 勝
申請日：平成 23 年 10 月 27 日

注）本審査委員会は、前身となる「遺伝子治療臨床研究作業委員会」及び「遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する作業委員会」を平成 25 年 4 月に統合して設置された。

その際、前身の各委員会において審議中であった事項については本審査委員会が審議を引き継ぐこととされ、本遺伝子組換え生物等の第一種使用規程についても前身の「遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する作業委員会」から本審査委員会に審議が引き継がれたものである。

【審査委員会の評価結果（千葉大学医学部附属病院）】

1. HGF の競合的アンタゴニストである NK4 を発現する非増殖性の遺伝子組換えアデノウイルス 5 型ベクター (Ad5CMV-NK4)
第一種使用等の内容：治療施設におけるヒトの治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
申請者：千葉大学医学部附属病院 病院長 宮崎 勝
(1) 生物多様性影響評価の結果について ① 他の微生物を減少させる性質 申請されている第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、本遺伝子組換え生物 (Ad5CMV-NK4) の環境中への拡散は極力抑えられており、拡散したとしてもその量は極めて微量と考えられる。 本遺伝子組換え生物の感染性は野生型と同一であり、ヒトを含む一部のほ乳類及び鳥類に感染するが、微生物に感染することはない。また、有害物質等の産生により他の微生物を減少させることはないと考えられる。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、他の微生物を減少させる性質に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。 ② 病原性 本遺伝子組換え生物の感染性は野生型と同一であり、ヒトを含む一部のほ乳類及び鳥類に感染するが、本遺伝子組換え生物は、増殖に必須のタンパク質 (E1A 及び E1B) がコードされている E1 領域を欠損しており、増殖能を失っていることから、他の野生動植物に対して病原性を呈するおそれはない。また、仮に増殖能をもった RCA (増殖性アデノウイルス) や野生型アデノウイルスが生じたとしても、すでに自然界に広く分布しているアデノウイルス 5 型以上の感染性と病原性を獲得するものではない。 本遺伝子組換え生物がヒトに感染した場合は、導入遺伝子である NK4 タンパク質の一過性の発現が見られるが、これによるヒトへの病原性は知られていない (NK4 は、癌細胞に対して、HGF (hepatocyte growth factor) の c-Met 受容体への結合を阻害することによりその浸潤・転移を抑制し、また血管新生を抑制するが、それ自身では生物活性を発揮することはない。) また、アデノウイルス 5 型を用いた遺伝子治療用ベクターは、1990 年以降、国内外において使用されているが、環境中への悪影響に関する報告はない。 さらに、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、本遺伝子組換え生物及び RCA 等の環境中への拡散は極めて微量であると考えられる。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、病原性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。 ③ 有害物質の産生性 本遺伝子組換え生物の有害物質の産生性は知られておらず、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。 ④ 核酸を水平伝達する性質 本遺伝子組換え生物は、ヒトを含む一部のほ乳類及び鳥類に感染するが、増殖能を失っていることから、他の野生動植物に対して核酸を水平伝達するおそれはない。また、仮に増殖能をもった RCA 等が生じたとしても、その核酸を水平伝達する性質は、自然界に広く分布しているアデノウイルス 5 型と同様である。 さらに、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、本遺伝子組換え生物及び RCA 等の環境中への拡散は極めて微量であると考えられる。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、核酸を水平伝達する性質に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。 (2) 生物多様性影響評価書を踏まえた結論 以上を踏まえ、本遺伝子組換え生物を第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は妥当であると判断した。

厚生科学審議会科学技術部会
遺伝子治療臨床研究に係る
生物多様性影響評価に関する作業委員会 委員名簿

【 千葉大学医学部附属病院 】

「切除不能悪性胸膜中皮腫を対象としたNK4遺伝子発現型アデノウイルスベクターによる臨床研究」

(平成25年3月31日以前)

○

氏 名	所 属
いわさき かずひろ 岩崎 一弘	(独)国立環境研究所 主任研究員
おざわ けいや 小澤 敬也	自治医科大学 医学部教授
かんだ ただひと 神田 忠仁	(独)理化学研究所 新興・再興感染症研究ネットワーク推進センター 業務展開チーム チームリーダー
さいとう いずむ 斎藤 泉	東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設教授
しまだ たかし 島田 隆	日本医科大学 医学部教授
はやかわ たかお 早川 堯夫	近畿大学 薬学総合研究所所長
やまぐち てるひで 山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部研究員

○：委員長（五十音順 敬称略）

厚生科学審議会科学技術部会
遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会 委員名簿

(平成25年4月1日以降)

氏 名	所 属
荒戸 照世	北海道大学大学院 医学研究科教授
岩崎 一弘	内閣府 政策統括官付参事官
大橋 十也	東京慈恵会医科大学 DNA医学研究所教授
小野寺 雅史	国立成育医療研究センター研究所 成育遺伝研究部長
神田 忠仁	理化学研究所 新興・再興感染症研究ネットワーク推進センター 業務展開チーム チームリーダー
久米 晃啓	自治医科大学 医学部遺伝子治療研究部准教授
斎藤 泉	東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設教授
竹内 隆正	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官
谷 憲三朗	九州大学生体防御医学研究所 所長
中西 真人	産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 副研究センター長
那須 保友	岡山大学病院 新医療研究開発センター教授
水口 裕之	大阪大学大学院 薬学研究科分子生物学分野教授
三宅 弘一	日本医科大学 医学部准教授
○ 山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部研究員

疾患専門

なかの 中野 孝司	兵庫医科大学 内科学呼吸器・RCU科主任教授
--------------	------------------------

○：委員長（五十音順 敬称略）

第一種使用規程承認申請書

平成 23 年 10 月 27 日

一部修正 平成 25 年 7 月 1 日

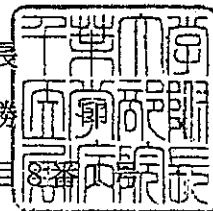
厚生労働大臣 殿

環境大臣 殿

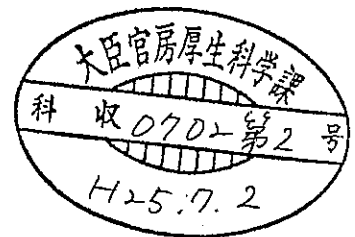
申請者 千葉大学医学部附属病院病院長

宮 崎 勝

千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目



第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第4条第2項の規定により、次のとおり申請します。



遺伝子組換え生物等の種類の名称	ヒト肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) の競合的拮抗阻害剤であるNK4分子の遺伝子を発現する非増殖性の遺伝子組換えアデノウイルス5型ベクター (Ad5CMV-NK4)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	治療施設におけるヒトの治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	治療施設の所在地：千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 治療施設の名称：千葉大学医学部附属病院 (1) Ad5CMV-NK4溶液は、容器に密封後、凍結状態で治療施設に輸送し、凍結状態のまま施設内のP2レベルの拡散防止措置を執ることのできるベクター調製室（以下「ベクター調製室」という。）内の施設可能な前室に設置した冷凍庫に保管する。 (2) 凍結状態のAd5CMV-NK4溶液の融解、容器の開封並びにAd5CMV-NK4溶液の希釈、分注操作は、ベクター調製室内の安全キャビネット内で行う。希釈溶液や分注した溶液の保存を行う場合は、適切な表記した上で上記の冷凍庫に保存する。 なお、Ad5CMV-NK4希釈溶液や凍結品を、開放系区域を通じて他のP2レベル相当区域に運搬する必要がある場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。 (3) Ad5CMV-NK4溶液（希釈溶液も含む。以下同じ。）を廃棄する際には、ウイルスの不活化（高圧蒸気滅菌処理又は次亜塩素酸処理。以下同じ。）後、千葉大学医学部附属病院で定められた医療廃棄物管理規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従い廃棄する。 (4) Ad5CMV-NK4溶液は二重に密閉し、環境中への拡散防止措置を適切に執った個室（以下「個室」という。）に直ちに運搬する。 (5) 被験者に対するAd5CMV-NK4の投与は、個室においてAd5CMV-NK4溶液を胸腔内に局所投与することにより行う。この時、注射針を用いて体表より胸腔内に投与するが、投与部位の周囲には滅菌された不織布を敷く。その後同注射針を慎重に抜去し、Ad5CMV-NK4溶液の漏出及びエアロゾル化を防止して、同部位を消毒する。またロッカーカテーテルからAd5CMV-NK4溶液投与した場合は、投与後に同カテーテルを抜去する。 (6) 上記(5)でAd5CMV-NK4溶液投与に使用した注射針、注射器、カテーテル及びチューブ等の器具等並びに布及びガーゼ、マスク類等は、使い捨てとし、使用後はウイルスの不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従って廃棄する。なお、ウイルスの不活化を他の区域で行う場合は、二重に密閉した容器に入れて運搬する。 (7) 投与後7日間あるいはウイルスの排泄がなくなるまで、被験者を個室で管理する。なお、検査等の理由で被験者が一時的に、個室外の開放系区域に出る場合は、マスク及びガウンを着用するなど、ウイルスの漏出予防措置を義務付ける。 (8) 個室における管理期間中の被験者の排泄物等（唾液、血液、及び尿を指す。以下同じ。）は、ウイルス不活化後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。ウイルスの不活化を他の区域で行う場合は、二重に密閉した容器に入れて運搬する。排泄物等で床等が汚染した場合は、消毒液等を使用して除染する。なお、臨床検体として使用する被験者の排泄物等の取扱いは、Ad5CMV-NK4溶液の取扱いに準じる。

	(9) 個室における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具等及び被験者の排泄物等に接触した器具等は、ウイルスを不活化後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄するか、もしくは環境中への拡散防止措置を適切に執った室内で十分洗浄する。これらのウイルスの不活化を他の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。 (10) 個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の排泄物等からA d 5 CMV—NK 4が検出されないことを確認する。A d 5 CMV—NK 4が検出されていれば、個室における被験者の管理を継続する。個室における管理が終了後、個室の床等は消毒液を用いて清掃する。 (11) 個室における管理解除後に、被験者の排泄物等からA d 5 CMV—NK 4が検出された場合は、直ちに上記個室における管理下に移し、上記(7)から(11)と同様の措置を執る。
--	--

(別紙様式)

生物多様性影響評価書

(区分：遺伝子治療臨床研究)

ヒト肝細胞増殖因子(h e p a t o c y t e g r o w t h f a c t o r
; H G F) の競合的拮抗阻害剤であるNK 4分子の遺伝子を発現する非増
殖性の遺伝子組換えアデノウイルス5型ベクター (A d 5 C M V—N K 4)

目 次

I	宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報.....	3
1	分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況.....	3
2	使用等の歴史及び現状.....	3
3	生理・生態学的特性.....	4
II	遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....	7
1	供与核酸に関する情報.....	7
2	ベクターに関する情報.....	11
3	遺伝子組換え生物等の調製方法.....	13
4	移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性.....	16
5	遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度 及び信頼性.....	17
6	宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	18
III	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	20
1	使用等の内容.....	20
2	使用等の方法.....	20
3	承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における 情報収集の方法.....	21
4	生物多様性影響が生じるおそれのある場合における生物多様性 影響を防止するための措置.....	21
5	実験室等での使用又は第一種使用等が予定されている環境と類 似の環境での使用等の結果.....	22
6	国外における使用等により得られた情報.....	23
IV	生物多様性影響評価.....	25
1	他の微生物を減少させる性質.....	25
2	病原性.....	25
3	有害物質の産生性.....	26
4	核酸を水平伝達する性質.....	27
5	その他の性質.....	27
V	総合的評価.....	28
別紙	NK4 遺伝子発現アデノウイルスベクターの全塩基配列.....	29

I 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

1 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

ヒトアデノウイルスはアデノウイルス科マストアデノウイルス属に分類されている（文献1、2）。これまでに分離されたウイルスは、中和抗体を誘導する抗原性の違いで51の血清型に分けられており（文献1、2）、ヒトNK分子を発現する非増殖性の遺伝子組換えアデノウイルスベクターAd5CMV-NK4はヒトアデノウイルス5型を宿主として作製された。

アデノウイルス5型は4歳以下の乳幼児の多くに感染しており、咽頭及び糞便からウイルスが分離される（文献2）。子供の40－60%が中和抗体をもつ（文献2）。自然環境において、ヒト以外の動物での増殖は報告されていない。実験室内では、コットンラット及びニュージーランドウサギへの経鼻接種でウイルス増殖が報告されている（文献1）。

文献1：Kaipe DM, Howley PM ed., Fields VIROLOGY fourth edition, pp.2265-2326, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001.

文献2：畑中正一編，ウイルス学，pp.198-208，朝倉書店，東京，1997.

2 使用等の歴史及び現状

アデノウイルス5型そのものの人為的な利用は知られていない。ヒトアデノウイルス4型及び7型は、経口生ワクチンとして米国で30年以上にわたり、延べ約100万人の兵士に対し風邪ワクチンとして投与されてきた実績があり、重篤な副作用の報告もない。

なお、アデノウイルス5型の遺伝子治療用ベクターとしての利用は、1990年以後ウイルス複製に必須のE1領域を遺伝子組換え技術により欠失させた非増殖性のものが、国内外で汎用されている。1999年に初めて遺伝子治療薬の投与に起因する死亡例が、当該ベクターを用いた米国での遺伝子治療臨床研究において発生したが、その後の調査研究により、当該事例はベクター大量投与の結果、循環血中に漏れ出たベクターのウイルス蛋白質により引き起こされた全身的免疫反応に起因するものである事が明らかにされた。

3 生理・生態学的特性

(1) 基本的特性

ヒトアデノウイルスはエンベロープをもたない2本鎖DNAウイルスであり、アデノウイルス科マストアデノウイルス属に分類される。ウイルスキャプシドは直径80 nmの正二十面体である。51の血清型が知られており、ハムスターへの腫瘍原性により3つの群に分けられている。ウイルス粒子はDNAと蛋白質より成る。DNAの分子量は $20-25 \times 10^6$ ダルトン、長さ約12 μm の線状2本鎖(ゲノムサイズ: 約36 kb)である。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

ヒトに感染し増殖する。培養細胞でも、ヒト由来の細胞でのみ効率よく増殖する。サル由来培養細胞で低レベルの増殖が起こる。経口感染することから推定されるように、室温で比較的安定である。

(3) 捕食性又は寄生性

自然界において、宿主域はヒトを始めとして、サル、ネコ、イヌ、ウサギ、ラット、マウス、ハムスター、等の哺乳類及び鳥類の細胞に幅広く感染し取り込まれる。しかし、生活環を完結しウイルス粒子を産生するためには、ヒトアデノウイルスは種特異的であり、ヒト以外では、ハムスター、コットンラット等ごくわずかな種でしかウイルスの増殖は認められない。ヒトに最も近いサルですら宿主としては適当でなく、シミアンウイルス40 (SV40) の共感染下にはじめてウイルス粒子が産生される。

また、ヒトアデノウイルスは広範な組織に感染可能であり、高度に分化した神経系、筋系、肝細胞から上皮細胞、線維芽細胞に至る付着系の細胞に感染することが知られている。しかしながら、細胞内での増殖の程度は組織により異なる。

(4) 繁殖又は増殖の様式

ヒトアデノウイルスの生活環は次のように考えられている。ウイルス粒子は、ファイバーを介して標的細胞の受容体と結合し、次いでペントンベースがインテグリンに結合する。ペントンベースとインテグリンの相互作用により、ウイルス粒子はエンドサイトーシスにより細胞質に取り込まれる。細胞表面に吸着したウイルス粒子の80-85%がエンドソーム中に取り込まれ、エンドソーム中のウイルス粒子の約90%がエンドソームを破壊して細胞質へ移動する。その過程で、まずペントンベースが外れ、続いて粒子構造が壊れコアが核膜内に放出される。核内でウイルスゲノムは染色体外遺伝子として存在する(epichromosomal localization)。ウイルスゲノムから細胞由来の転写因子を利用してE1A遺伝子産物がまず産生され、他の初期遺伝子群の発現を制御する。次いでE2遺伝子産物の蓄積に伴い、DNA複製反応が開始される。同時に後期遺伝子群の発現が起こり、ウイルス粒子構成蛋白質が産生される。その際、E1B遺伝子産物及びE4遺伝子産物により、感染細胞由来mRNAの細胞質

への移行が阻害されるとともに、細胞由来の 5'末端に存在するキャップ構造に結合する蛋白質 (CBP) が脱リン酸化され、細胞由来 mRNA の翻訳は著しく制御される。その結果、キャップ非依存的に翻訳されるウイルス由来 mRNA が効率的に細胞質に蓄積し、ウイルス粒子構成蛋白質の産生が促進される。過剰に産生されたウイルス粒子構成蛋白質は、ウイルスゲノムとともに核内でウイルス粒子として組み立てられる。さらに、ウイルス粒子の蓄積により、その凝集塊から成る核内封入体と呼ばれる構造体が形成される。ウイルス粒子は、感染細胞の崩壊により、細胞外に放出される。

ヒトアデノウイルスはヒトに経口感染し、急性の呼吸器疾患、角膜炎、乳幼児下痢症等を引き起こす。感染経路としては飛沫感染がある。

(5) 病原性

ヒトアデノウイルスは、急性の呼吸器疾患、角結膜炎、乳幼児下痢症などの原因ウイルスとして知られている。各疾患の発症はアデノウイルスの血清型と関連しており、Ad5CMV-NK4 の由来であるアデノウイルス 5 型は、不顕性に終わることが多いが、乳幼児における急性発熱性咽頭炎の起因ウイルスとして知られている。最近、百日咳様症候群との関連が報告されているが、アデノウイルス 5 型の単独感染が百日咳様症候群の原因であるよりむしろ、百日咳菌の感染下に潜在ウイルスの活性化が起きている可能性が指摘されている。また、肝移植患者において、免疫抑制剤服用下にアデノウイルス C 亜群由来のアデノウイルス肝炎が報告されている。アデノウイルス 5 型感染症に対する治療薬は存在しないが、免疫力の低下した患者に重症の感染症を来した場合には免疫グロブリンの投与を行う。一般的には予後良好なので、安静を保ち二次感染を防ぐことが肝要である。アデノウイルス感染に関連した疾患について表 1 に示した。

表 1. アデノウイルス感染に関連した疾患

疾 患 名	対 象 患 者	関連血清型
急性発熱性咽頭炎	乳幼児	1-3、5-7
咽頭結膜性発熱	小児	3、7、1
急性呼吸疾患	新兵 (軍人)	3、4、7、14、21
肺炎	乳幼児	1-3、7
肺炎	新兵 (軍人)	4、7
流行性角結膜炎	全世代	8、11、19、37
百日咳様症候群	乳幼児	5
急性出血性膀胱炎	乳幼児	11、21
胃腸炎	乳幼児	40、41
肝炎	肝移植レシピエント (乳幼児)	1、2、5
尿管内ウイルス存続	AIDS 患者他免疫抑制状態の患者	34、35

(6) 有害物質の産生性

野生型ヒトアデノウイルスの細胞障害性の発現は、感染細胞内での蛋白質合成阻害及びウイルス構成蛋白の貯留によると考えられている。現在まで、野生型ヒトアデノウイルスにおける有害物質の産生性は同定されていない。

(7) その他の情報

野生型ヒトアデノウイルスは、他の DNA ウィルスと同様、高圧蒸気滅菌、ガス滅菌、焼灼、紫外線殺菌灯、次亜塩素酸ナトリウム (1-20 ppm) 等により不活化される。また、Ad5CMV-NK4 は、E1 領域を欠いているために非増殖性である。

II 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

1 供与核酸に関する情報

(1) 構成及び構成要素の由来

ウイルスベクターに導入した核酸である NK4 発現カセットは、①ヒトサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター配列、②コザック配列、③NK4cDNA、④SV40 ポリアデニレーション配列から成る。各領域は、Ad5CMV-NK4 ウイルスベクター5'末端の塩基を 1 とした時の塩基番号で示した。

① 505-1332 (CMV プロモーター)

GenBank Database の CMV プロモーターの塩基配列 828bp (下記) と一致する。ヒトサイトメガロウイルスに由来するプロモーター配列。

TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATT
GCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTG
ACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGA
GTTCCGCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGAC
GTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTA
TTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT
CAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCA
GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTG
ATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCA
CCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGCTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCG
TGTAACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCC
ACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGG

② 1339-1344 (Kozak 配列)

コザック配列は (6 bp: GCCACC)、細菌由来のグアニン-シトシンを多く含む DNA 配列で、遺伝子の ATG 開始コドンの周辺で見つかったもの。

③ 1345-2769 (NK4cDNA)

ヒト NK4 遺伝子はヒト HGF 遺伝子的一部分として定義される。ヒト HGF の遺伝子座は第 7 染色体長腕 (7q11.2-21) 上に位置し、18 個のエクソンから成り、728 アミノ酸残基の HGF 蛋白質をコードする。NK4cDNA は NK4 遺伝子のエクソン部分 1419 bp (下記) から成り、473 アミノ酸残基をコードする。

ATGTGGGTGACCAACTCCTGCCAGCCCTGCTGCTGCAGCATGTCTCTCTGCATCTCTCTCTGCTCCCC
ATCGCCATCCCCTATGCAGAGGGACAAAGGAAAAGAAGAAATACAATTATGAATTCAAAAAATCAGCA
AAGACTACCCTAATCAAAATAGATCCAGCACTGAAGATAAAAAACCAAAAAAGTGAATACTGCAGACCAA

TGTGCTAATAGATGTACTAGGAATAAAGGACTTCCATTCACTTGCAAGGCTTTTGTGTTTTGATAAAGCA
 AGAAAAACAATGCCTCTGGTTCCCCTTCAATAGCATGTCAAGTGGAGTGAAAAAGAATTTGGCCATGAA
 TTTGACCTCTATGAAAACAAAGACTACATTAGAACTGCATCATTGGTAAAGGACGCAGCTACAAGGGA
 ACAGTATCTATCACTAAGAGTGGCATCAAATGTCAGCCCTGGAGTTCCATGATACCACACGAACACAGC
 TATCGGGGTAAAGACCTACAGGAAACTACTGTGAAATCCTCGAGGGGAAGAAGGGGGACCCTGGTGT
 TTCACAAGCAATCCAGAGGTACGCTACGAAGTCTGTGACATTCTCAGTGTTTCAAGAGTTGAATGCATG
 ACCTGCAATGGGGAGAGTTATCGAGGTCTCATGGATCATACAGAATCAGGCAAGATTTGTCAGCGCTGG
 GATCATCAGACACCCACCCGGCACAAATCTTGCCTGAAAGATATCCCGACAAGGGCTTTGATGATAAT
 TATTGCCGCAATCCCGATGGCCAGCCGAGGCCATGGTGCTATACTCTTGACCCTCACACCCGCTGGGAG
 TACTGTGCAATTAAACATGCGCTGACAATACTATGAATGACACTGATGTTCTTTTGAAACAACCTGAA
 TGCATCCAAGGTCAAGGAGAAGGCTACAGGGGCACTGTCAATACCATTGGAATGGAATTCATGTCAG
 CGTTGGGATTCTCAGTATCCTCACGAGCATGACATGACTCCTGAAAATTTCAAGTGCAAGGACCTACGA
 GAAAATTACTGCCGAAATCCAGATGGGTCTGAATCACCTGGTGTTTTTACCACTGATCCAAACATCCGA
 GTTGGCTACTGCTCCCAAATTCCAAATGTGATATGTCACATGGACAAGATTGTTATCGTGGGAATGGC
 AAAAATTATATGGGCAACTTATCCCAAACAAGATCTGGACTAACATGTTCAATGTGGGACAAGAACATG
 GAAGACTTACATCGTCATATCTTCTGGGAACCAGATGCAAGTAAGCTGAATGAGAATTACTGCCGAAAT
 CCAGATGATGATGCTCATGGACCCTGGTGCTACACGGGAAATCCACTCATTCTTGGGATTATTGCCCT
 ATTTCTCGTTGTGAAGGTGATACCACACCTACAATAGTC

④ 2776-2920 (SV40 ポリアデニレーション配列)

GenBank Database の SV40pA の塩基配列 146 bp (下記) と一致する。SV40 ポリアデニレーション配列は、SV40 に由来するポリ A 付加シグナル配列。

CGAGATCCGAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACA
 AATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTC
 TAGATCT

(2) 構成要素の機能

a) NK4 蛋白質の構造

ヒト NK4cDNA より予想されるヒト NK4 蛋白質の全アミノ酸配列を下に示した (473 アミノ酸残基、下線部は分泌シグナル配列)。

MWVTKLLPALLLQHVLHLLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIKTKKVNTA
 DQCANRCTRNGKLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDLYENKDYIRNCIIGKGR
 SYKGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSYRGKDLQENYCRNPRGEEGPPWCFTSNPEVRYEVC DIPQC
 SEVECMTCNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQTPHRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYT
 LDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTDVPLETTECIQGQGEYRGTVNTIWNIGIPCQRWDSQYPHEHDMT
 PENFKCKDLRENYCRNPDGSESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTR
 SGLTCSMWDKNMEDLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTT

PTIV

ヒト NK4 蛋白質 (5 残基欠損型) は N 末端の分泌シグナル配列 (31 アミノ酸残基) を除く 442 アミノ酸残基から構成され、下記のような特徴的ドメインを有する。

細胞外分泌シグナル配列 :	aa1-31
N 末端ヘアピン構造 :	aa39-122
第 1 クリングル構造 :	aa126-202
第 2 クリングル構造 :	aa203-284
第 3 クリングル構造 :	aa297-379
第 4 クリングル構造 :	aa383-465

HGF 蛋白質は不活性型 1 本鎖 preproHGF として翻訳された後、細胞外分泌シグナル配列によって細胞外に分泌されプロセッシングを受けて 2 本鎖の活性型成熟分子となる。N 末端ヘアピン構造とそれに続く第 1 クリングル構造は、c-Met レセプターとの結合に関与する。クリングル構造は、デンマークの菓子パン Kringle の構造と似ていることから名付けられた蛋白質の構造上の特徴であり、プラスミノゲンなどの造血因子蛋白質に多く見られ蛋白質間相互作用に関与すると考えられている。各クリングル構造内には 3 箇所のジスルフィド結合があり立体構造を保持している。プラスミノゲンの分子内断片でクリングル構造を持つアンジオスタチンにも血管新生阻害作用が認められており、クリングル構造と血管新生阻害作用との関連が示唆されているが、詳細なメカニズムは不明である。

NK4 蛋白質には下記のように 3 箇所の糖鎖付加部位が存在するが、グリコシダーゼ処理によって糖鎖を除去しても HGF アンタゴニスト活性及び血管新生阻害活性に影響は見られなかった。

アスパラギン (aa289) :	N-結合型糖鎖
アスパラギン (aa397) :	N-結合型糖鎖
スレオニン (aa471) :	O-結合型糖鎖

b) NK4 蛋白質の生物活性

HGF は、細胞膜を貫通する c-Met レセプターに結合することにより、増殖促進、血管新生、遊走促進、形態形成など多面的な生物活性を発揮する。c-Met レセプターには、細胞内ドメインにチロシンキナーゼと呼ばれる蛋白質のチロシン残基をリン酸化する酵素活性を持つ部分が存在する。HGF が c-Met に結合すると細胞質のチロシンキナーゼ活性が活性化され、これにより細胞内に様々なシグナルが伝達される。癌細胞の多くはこの c-Met を過剰発現しており、HGF の結合によって活性化されると、癌細胞の浸潤・転移に至る複数の事象が同時に進行する。すなわち、HGF はカドヘリンなどの細胞接着分子を介した細胞間接着をルーズにし、癌細胞が原発巣から離脱するのを促す。また、HGF は基底膜やコラーゲンなど細胞外基質を分

解する様々な蛋白質分解酵素の産生を促すとともに、癌細胞の活発な遊走を促す。同時に、癌細胞と血管内皮細胞の接着を促進するなど、これら一連の反応の同時進行により HGF は癌細胞の浸潤・転移を強力に促進する。

NK4 蛋白質は、c-Met レセプターへの結合に関与する N 末端ヘアピン構造と第 1 クリングル構造を持っているため、c-Met に結合するものの c-Met を活性化しない (図 1)。つまり、NK4 はそれ自身生物活性を発揮することなく、HGF が c-Met 受容体に結合するのを競合的に阻害するアンタゴニストとして作用することにより、HGF の関与する癌細胞の浸潤・転移を強力に抑制する。一方、NK4 は、HGF アンタゴニスト活性とは独立したメカニズムによって、HGF だけではなく VEGF や bFGF による血管新生をも抑制する。従って、NK4 は HGF アンタゴニスト活性と血管新生阻害活性を同時に有する 2 機能性分子であり、癌細胞を“凍結”、あるいは“休眠”の状態に至らしめる新規な抗癌剤の分子標的としての利用が期待される (図 2)。

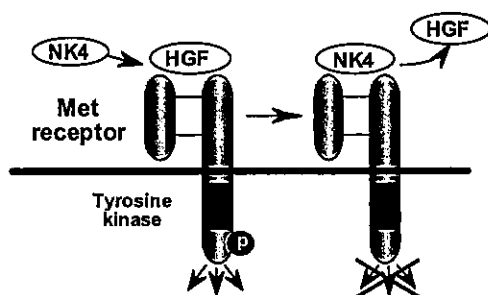


図 1. NK4 による HGF アンタゴニスト作用

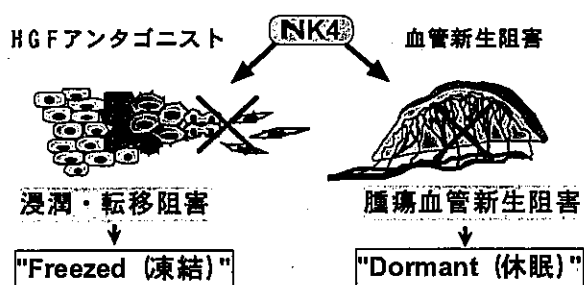


図 2. NK4 の 2 つの機能と癌の“凍結・休眠”療法

2 ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

Ad5CMV-NK4は、NK4遺伝子発現カセットを含む pAdApt.NK4 (図3) と、アデノウイルス5型ゲノムを含むpWE.AdAfIII-rITRsp (図4) の相同組換えによって作成された(次項目)。pAdApt.NK4の由来はシャトルベクターpAdApt (Crucell社) で、一方、pWE.AdAfIII-rITRsp (Crucell社) はコスミドベクターpWE25に由来する。

(2) 特性

pAdAptは、大腸菌複製開始点ori、アンピシリン耐性遺伝子Amp、アデノウイルス5型ゲノムDNA相同部位2箇所(1-454、3511-6095)、CMVプロモーター、SV40ポリアデニレーション配列を構成要素とする。一方、pWE.AdAfIII-rITRspはコスミドベクターpWE25に由来し、アデノウイルス5型ゲノムDNA全長を含む。

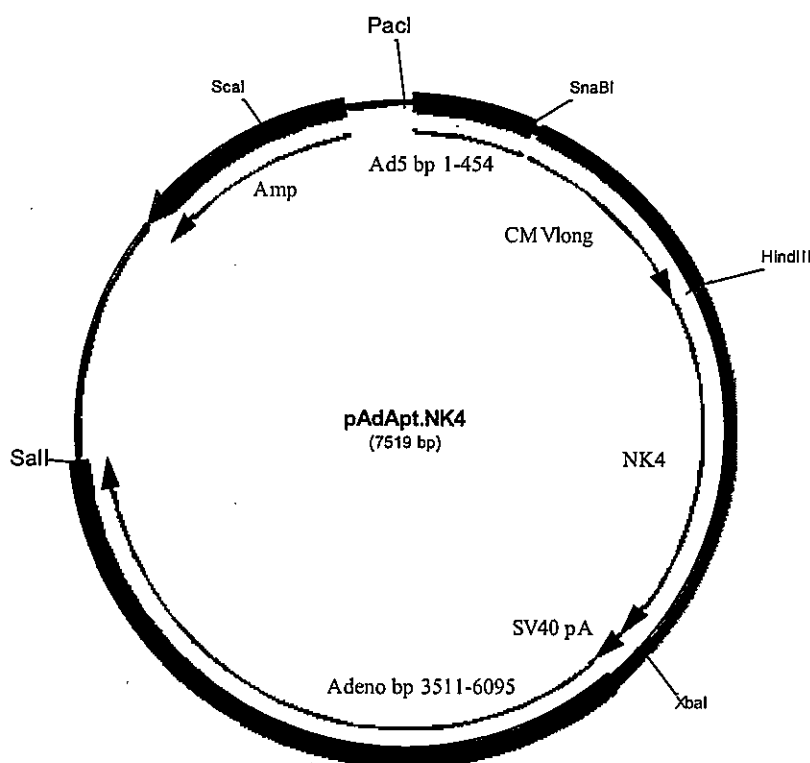


図 3. プラスミドベクターpAdApt.NK4

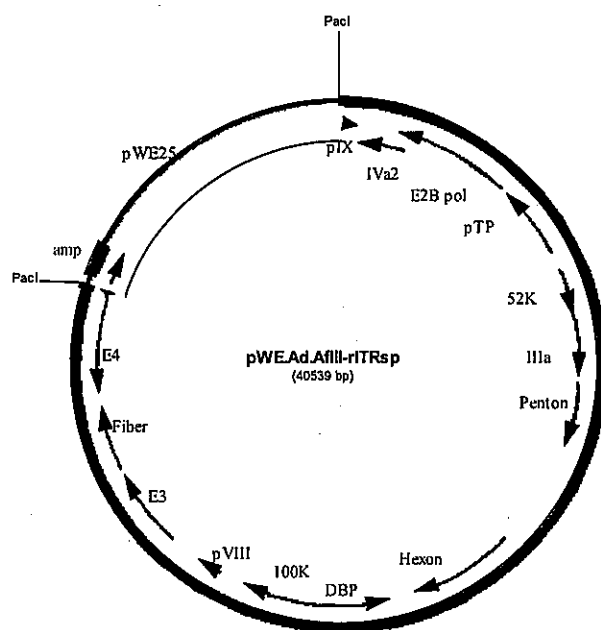


図 4. コスミドベクター-pWE.Ad.AfIII-rITRsp

3 遺伝子組換え生物等の調製方法

(1) 宿主内に移入された核酸全体の構成

アデノウイルスは全質量の13%を占めるDNAと87%を占める蛋白質を含む、直径65-80 nmの正二十面体の構造を有する。ウイルスのDNAは約36 kbの長さである。アデノウイルス蛋白質の発現は、一般的に早期と後期とに分類される。6つの蛋白質が早期(E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4)に、他の蛋白質(L1、IVa2、IX)は後期に発現する。E1AとE1BはウイルスDNAの複製に重要な役割を果たす。E2AはDNA結合タンパクをコードし、E2BはDNA polymerase及びウイルスゲノムの5'末端に見られるタンパクをコードする。E3はウイルスDNAの複製に関連しないが、ウイルスの感染に対する宿主免疫反応を引き起こすと考えられる。E4蛋白質はウイルスの構築に関連すると考えられている。本研究に用いられるAd5CMV-NK4ベクターは、E1A及びE1B部分が欠損しておりその欠損部にCMVプロモーターで転写制御されるNK4cDNAが挿入されている(図5)。

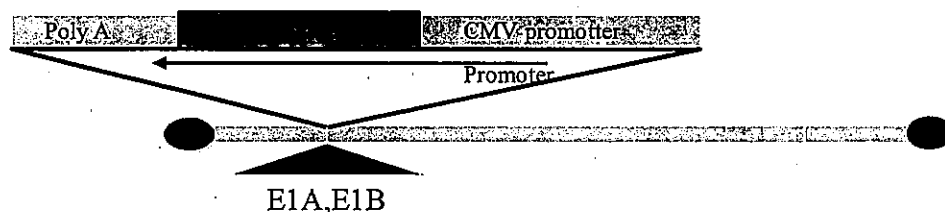


図5. Ad5CMV-NK4の模式図

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

プラスミドベクターpAdAptのHindIII及びXbaI制限酵素サイトにコザック配列(GCCACC)を付加したNK4cDNAを挿入し、プラスミドベクターpAdApt.NK4(図3)を作成した。pAdApt.NK4をPacI及びSalI制限酵素で、Ad5CMV-NK4ゲノムDNAを含むコスミドベクターpWE.AdAfl II-rITRsp(図4)をPacI制限酵素にて直鎖状にし、各DNA断片を精製した。上述の2種のDNA断片をPER.C6TMヘルパー細胞(Crucell社)にLipofectamine200CD(Invitrogen社)を用いたリポソーム法によって同時に組み込んだ。2種のDNA断片の相同組換えにより、アデノウイルス5型のE1領域がNK4発現カセットに組換えられたAd5CMV-NK4のDNA全長が形成される(Ad5CMV-NK4の全塩基配列は別紙)。PER.C6TMヘルパー細胞はアデノウイルス5型のE1領域、約4kbを内在しておりE1由来転写活性因子を産生する細胞株である。この転写活性因子がE1領域を除去した(M73260において460-3514が欠損している)Ad5CMV-NK4にトランスに働き、Ad5CMV-NK4ウイルスベクターが産生される。尚、PER.C6TM細胞は従来の293細胞と異なり、Ad5CMV-NK4の発現カセット前後との相同部位をE1遺伝子の前後に持たないので、PER.C6TM由来のE1遺伝子とAd5CMV-NK4の発現カセットとの相同組換えが理論上起こらず、Replication Compet

ent Adenovirus (RCA) の発生頻度は低い。なお、Ad5CMV-NK4の全シーケンスはALF ExpressTM自動DNA解析装置 (Pharmacia Biotech社) により確認済みである。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

本研究に用いられるAd5CMV-NK4は、現行のGMP基準に従って、神戸バイオメディカル創造センターのBiologics Laboratoryで製造された。Biologics Laboratoryは神戸大学発ベンチャーの株式会社GMJ (旧株式会社ジーンメディスンジャパン) 社によって運営管理されており、千葉大学の臨床研究実施研究者が共同研究者である神戸大学の臨床研究実施研究者と共に実施した。マスターセルバンク、マスターウイルスシードストック (マスターウイルスバンク) など原材料から製造工程、最終製品に至るまで一貫した品質管理のもとに製造され、保管されている。最終製品については、各種ウイルスやマイコプラズマの混入がなく、無菌試験、エンドトキシン試験にて下記項目が陰性であることが確認された (表2) (添付資料1-3)。

表2. ウイルスベクター最終製品の品質管理試験	
試験項目	内容
力価測定	吸光度によるvirus particle、TCID ₅₀ 法
ウイルス検出試験	PCRによるHBV, HCV, HIV-1, HTLV-1, Parvovirus B19の検出
マイコプラズマ検出試験	PCRによるマイコプラズマ遺伝子検査
無菌試験	ソイビーンカゼインダイジェスト培地、液状チオグリコール酸培地にて生育可能な細菌・真菌の検討
エンドトキシン検出試験	第十五改正日本薬局方におけるエンドトキシン試験法
RCA 検出試験	A549細胞を用いたCPE検出法

また、アデノウイルスベクターの調製に使用する PER.C6TM細胞のマスターセルバンク、ワーキングセルバンク及び Ad5CMV-NK4 マスターウイルスシードストックに対しても品質管理試験が施行され、各項目における安全性が確認されている。マスターセルバンク等及びマスターウイルスシードストックの試験項目は下記のとおりである。

<マスターセル・ワーキングセルバンク>

- ・チオグリコレートブイヨン・トリプケースイブイヨンによる無菌試験
- ・エンドトキシン否定試験
- ・マイコプラズマ否定試験
- ・HTLV-I 否定試験 (PCR 法)
- ・HCV, HBV 否定試験 (PCR 法)

- ・ HIV-1 否定試験 (PCR 法)
- ・ サイトメガロウイルス否定試験 (PCR 法)
- ・ EB ウイルス否定試験 (PCR 法)
- ・ Parvovirus B19 DNA 否定試験 (PCR 法)
- ・ アデノウイルス検出試験 (抗アデノウイルス抗体による蛍光染色)
- ・ ウイルス分離試験 (HEL ヒト胎児肺由来細胞、HeLa, Vero, RD ヒト横紋筋由来細胞、MDCK イヌ腎臓由来細胞, A549 細胞を用いた CPE 検出試験)

<マスターウイルスシードストック>

- ・ チオグリコレートブイヨン・トリプケースイブイヨンによる無菌試験
- ・ エンドトキシン否定試験
- ・ マイコプラズマ否定試験
- ・ HTLV-I 否定試験 (PCR 法)
- ・ HCV, HBV 否定試験 (PCR 法)
- ・ HIV-1 否定試験 (PCR 法)
- ・ サイトメガロウイルス否定試験 (PCR 法)
- ・ EB ウイルス否定試験 (PCR 法)
- ・ Parvovirus B19 DNA 否定試験 (PCR 法)

4 移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

移入した核酸は2本鎖DNAゲノムの一部として存在し、保管中は極めて安定で、感染する動物等の種類及び感染様式が保管中に変化することはない。細胞に感染すると、Ad5CMV-NK4のゲノムは核内の染色体外に存在し、NK4遺伝子が転写されるが、その発現は一過性である。Ad5CMV-NK4はPER.C6™細胞を使用して増殖させているため、相同組換えを起こしてRCAが産生されるとは極めて考えにくい、万一そのような場合は供与核酸のほぼ大半は消失していると考えられる。

またAd5CMV-NK4投与によるNK4蛋白質の生体内発現については以下のとおりである。当該実験には6-7週齢のC57BL/6マウス(雄)を用いた。Ad5CMV-NK4 (1×10^9 pfu) を生理食塩水で希釈し、マウスの尾静脈から投与した。投与後、経時的に解剖し、採取した臓器及び血漿中のNK4蛋白質濃度をELISAにて分析した。

NK4の血漿中濃度はAd5CMV-NK4投与後1週間をピークとしており、ピーク時における血中濃度は約150 ng/mlで、その後血漿中濃度は低下したが1箇月後でも約10 ng/mlと、血中HGFを阻害するのにじゅうぶんな濃度のNK4蛋白質レベルが維持された(図6)。また肝臓・肺・腎臓においても投与後1-2週間をピークに持続的なNK4蛋白質の産生が認められた。Ad5CMV-NK4は各種臓器において発現されるが、とりわけ、肝臓におけるNK4のレベルは最も高い発現が認められた。したがって、1回のAd5CMV-NK4投与によって1箇月間のNK4蛋白質の発現・産生が維持できることが明らかになった。さらに、この期間中、マウスにおいて外見的な異常はなく、大きな副作用はほとんど認められなかった。

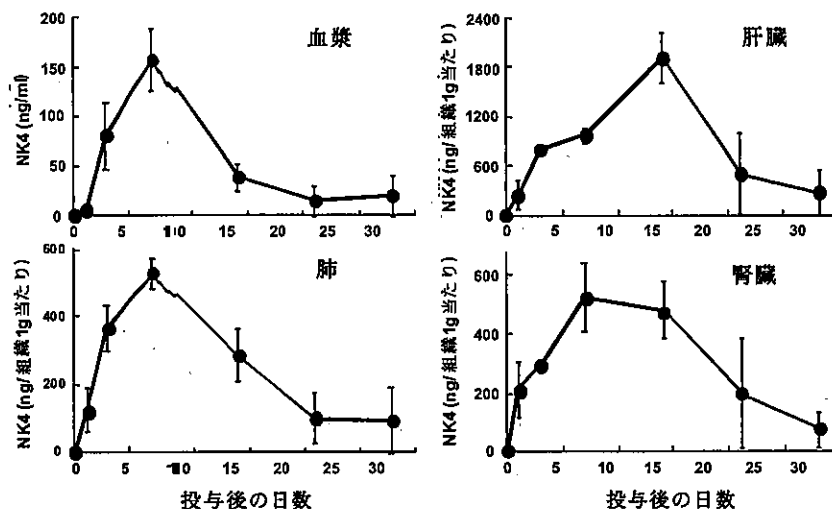


図6. Ad5CMV-NK4を投与したマウス血漿中並びに臓器中のNK4蛋白質の発現変化

5 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

PCR 法にて Ad5CMV-NK4 を検出することができる。PCR 法では、野生型アデノウイルスの遺伝子には存在しない Ad5CMV-NK4 特有の遺伝子配列(イントロンを挟む NK4cDNA 配列)をプライマーとして使用することで、Ad5CMV-NK4 の存在を特異的に検出できる。検体中の 1 コピーを検出することが可能であり、本検出法の信頼性については、同様の定量的 PCR 法を用いたウイルス検出法が既に臨床検査等でされていることから、十分に確立しているものと考えられる。

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

(1) Ad5CMV-NK4 ウイルスベクターの生物学的特徴

Ad5CMV-NK4 ウイルスベクターは、アデノウイルスの増殖に必須の蛋白質(E1A および E1B) がコードされている E1 領域が欠損しているために、恒常的に当該蛋白質が発現している細胞(例えば 293 細胞) 以外では増殖性を有しない。しかし、CMV プロモーターから転写される NK4 蛋白質を産生する。ウイルスの基本構造がタイプ 5 型由来であり、感染性については同野生型ウイルスと同様である。野生型アデノウイルスと同様、染色体に組み込まれることはなく、染色体外遺伝子として存在し、感染細胞の細胞分裂によって NK4 遺伝子の発現は減少していく。したがって NK 蛋白質の発現も一過性のものとなる。

(2) 増殖性ウイルス出現の可能性

①増殖性アデノウイルス (RCA) 出現の機序

Ad5CMV-NK4 ウイルスベクターはウイルス複製に必要な E1 領域が除かれ、当該部分が NK 遺伝子に置き換えられている。したがって、293 細胞のように E1 領域遺伝子が発現する細胞が、当該遺伝子をトランスに発現しなければ、複製増殖することができない。この胎児性腎細胞由来の 293 細胞は、ヒト 5 型アデノウイルスの E1A 及び E1B 遺伝子を包括する nt 1-4137 の領域を含んでおり、この領域はアデノウイルスゲノムの左腕の 12%に相当する。一方非増殖性の Ad5CMV-NK4 のような組換え型アデノウイルスは通常 nt 400-3500 領域を欠失しているが、293 細胞中の E1 領域とは相同部位が存在しており、その結果、組換え型アデノウイルスの作製にあたって相同組換えが生じ、RCA が発生する可能性がある。一般的に、293 細胞への 1 粒子の組換え型アデノウイルスの感染は 10,000 粒子以上の子孫アデノウイルスを生じうる。同時に、組換え型アデノウイルスと 293 細胞間の一回の相同組換えが起こる頻度は最低で 10^6 回の組換えに対して 1 回程度であると予想されている。

②PER.C6TM細胞使用による RCA 出現リスクの低減

RCA 出現の原因となる相同部位の除去のため、PER.C6TM細胞がオランダ Crucell 社によって開発された。PER.C6TM細胞はヒト胎児性網膜芽細胞に、E1A 及び E1B 領域 (Ad5 nt 459-3510) を導入したものである。この配列には E1 プロモーター及びポリ A シグナルは含まれておらず、ヒトホスホグリセリン酸キナーゼ PGK プロモーター及び B 型肝炎ウイルスのポリ A シークエンスが組み込まれている。また同時に Ad5 の E1 領域 (Ad5 nt 455-3510) を欠失させた組換え型アデノウイルスを作製するための pAdApt シャトルベクターも同時に開発された。これらの PER.C6TM細胞により作製された組換え型アデノウイルスでは、RCA の出現は極めて低いと考えられる。

③RCA の検出方法

Ad5CMV-NK4 と RCA との違いは E1 領域にあるため、E1A あるいは E1B 遺伝子に関する PCR

を行うことによって両者を区別することが可能である。ウイルスが含まれた検査すべき検体を、E1 領域を含まない A549 細胞あるいは HeLa 細胞の培養液に入れてウイルスを感染させ、RCA を増殖させた後に、当該細胞より DNA を抽出し、E1A あるいは E1B のウイルス遺伝子内に設定したプライマーを使用した RCR を行うことによって、Ad5CMV-NK4 と RCA の区別をつけることが可能で、RCA 有無の検出ができる。本手法により検体中 1 コピーの RCA を検出することが可能である。

Ⅲ 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

1 使用等の内容

治療施設におけるヒトの治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為

2 使用等の方法

治療施設の所在地：千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号

治療施設の名称：千葉大学医学部附属病院

- (1) Ad5CMV-NK4溶液は、容器に密封後、凍結状態で治療施設に輸送し、凍結状態のまま施設内のP2レベルの拡散防止措置を執ることのできるベクター調製室（以下「ベクター調製室」という。）内の施錠可能な前室に設置した冷凍庫に保管する。
- (2) 凍結状態のAd5CMV-NK4溶液の融解、容器の開封並びにAd5CMV-NK4溶液の希釈、分注操作は、ベクター調製室内の安全キャビネット内で行う。希釈溶液や分注した溶液の保存を行う場合は、適切な表記した上で上記の冷凍庫に保存する。なお、Ad5CMV-NK4希釈溶液や凍結品を、開放系区域を通して他のP2レベル相当区域に運搬する必要がある場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。
- (3) Ad5CMV-NK4溶液（希釈溶液も含む。以下同じ。）を廃棄する際には、ウイルスの不活化（高圧蒸気滅菌処理又は次亜塩素酸処理。以下同じ。）後、千葉大学医学部附属病院で定められた医療廃棄物管理規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従い廃棄する。
- (4) Ad5CMV-NK4溶液は二重に密閉し、環境中への拡散防止措置を適切に執った個室（以下「個室」という。）に直ちに運搬する。
- (5) 被験者に対するAd5CMV-NK4の投与は、個室においてAd5CMV-NK4溶液を胸腔内に局所投与することにより行う。この時、注射針を用いて体表より胸腔内に投与するが、投与部位の周囲には滅菌された不織布を敷く。その後同注射針を慎重に抜去し、Ad5CMV-NK4溶液の漏出及びエアロゾル化を防止して、同部位を消毒する。またトロッカーカテーテルからAd5CMV-NK4溶液投与した場合は、投与後に同カテーテルを抜去する。
- (6) 上記（5）でAd5CMV-NK4溶液投与に使用した注射針、注射器、カテーテル及びチューブ等の器具等並びに布及びガーゼ、マスク類等は、使い捨てとし、使用後はウイルスの不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従って廃棄する。なお、ウイルスの不活化を他の区域で行う場合は、二重に密閉した容器に入れて運搬する。
- (7) 投与後7日間あるいはウイルスの排泄がなくなるまで、被験者を個室で管理する。

なお、検査等の理由で被験者が一時的に、個室外の開放系区域に出る場合は、マスク及びガウンを着用するなど、ウイルスの漏出予防措置を義務付ける。

- (8) 個室における管理期間中の被験者の排泄物等(唾液、血液、及び尿を指す。以下同じ。)は、ウイルス不活化後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。ウイルスの不活化を他の区域で行う場合は、二重に密閉した容器に入れて運搬する。排泄物等で床等が汚染した場合は、消毒液等を使用して除染する。なお、臨床検体として使用する被験者の排泄物等の取扱いは、Ad5CMV-NK4溶液の取扱いに準じる。
- (9) 個室における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具等及び被験者の排泄物等に接触した器具等は、ウイルスを不活化後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄するか、もしくは環境中への拡散防止措置を適切に執った室内で十分洗浄する。これらのウイルスの不活化を他の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。
- (10) 個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の排泄物等からAd5CMV-NK4が検出されないことを確認する。Ad5CMV-NK4が検出されていれば、個室における被験者の管理を継続する。個室における管理が終了後、個室の床等は消毒液を用いて清掃する。
- (11) 個室における管理解除後に、被験者の排泄物等からAd5CMV-NK4が検出された場合は、直ちに上記個室における管理下に移し、上記(7)から(10)と同様の措置を執る。

3 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

※ 主務大臣が必要と認める場合にのみ記載し、それ以外の場合は空欄とすること。

4 生物多様性影響が生じるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

※ 主務大臣が必要と認める場合にのみ記載し、それ以外の場合は空欄とすること。

5 実験室等での使用又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

(1) Ad5CMV-p53を用いた臨床研究の結果

岡山大学付属病院を中心に米国と同様のプロトコールにより1999年3月から非小細胞肺癌に対するAd5CMV-p53を用いた第I相臨床試験が行われ、被験者からの血液、尿、便、リンパ節などでのAd5CMV-p53の検出検査(PCR法)では、血液中には3日目まで検出され、咽頭うがい液からは13日後にも検出されたが、尿中には投与後ずっと検出されず、環境への拡散の危険についての報告は無い。また、本施設(千葉大学医学部附属病院)で実施中の食道癌に対するAd5CMV-p53を用いた第I-II相臨床研究(文献3)では、食道癌患者10名に対しAd5CMV-p53投与から一週間後に被験者の血液、尿、糞便中のAd5CMV-p53検出試験を計46回行い、45回は陰性、1回のみ糞便に陽性で、この被験者は隔離解除を延期し12日目に陰性となった。なお、医療従事者への感染は、当該従事者の健康状態からみてないと考えられ、環境中への拡散の可能性はない。

(2) マウスを用いた Ad5CMV-NK4 の安全性試験

Crl:CD-1 (ICR) 系雄性マウスを用いて Ad5CMV-NK4 の単回静脈内投与による安全性試験を実施した。Ad5CMV-NK4 の投与量は、高用量 (1.25×10^8 pfu /animal) 及び低用量 (1.25×10^6 pfu /animal) の2用量 (n=6) とし、対照群のマウスにはリン酸緩衝液 (-) を静脈内投与した(n=6)。投与後1、3及び14日後に採血し血清を採取した。また、採血終了後、脳、肺、肝臓、腎臓及び精巣を摘出し重量測定後、肺、腎臓及び精巣については左側を、脳については正中線で2分割した左側を、肝臓については最も大きい葉(左葉)を液体窒素で凍結し保存した。他方はホルマリン固定後に、常法に従って病理組織検査を実施した。投与1日後に低用量群の1例が死亡した。投与2及び3日後に高用量群の2例に、自発運動減少、脱毛、後肢浮腫及び痂皮形成がみられ、低用量群の2例に脱毛及び自発運動減少がみられた。投与3日後に低用量群の1例に自発運動減少、失調歩行、脱毛及び体温低下がみられた。各臓器の病理組織検査では、高用量群、低用量群とも対照群と同様の組織像を呈しており、Ad5CMV-NK4 の正常組織への病理組織学的影響は認められなかった。

組織より抽出したDNAを用いてウイルスベクター投与後の各臓器中に存在するアデノウイルス量を検討した結果では、高用量投与群において、投与14日後でも肝組織中にアデノウイルスDNAの存在が確認され、肺には投与1日後のみアデノウイルスDNAの存在が確認されたが、低用量投与群においては、いずれの臓器においても、アデノウイルスDNAの存在は確認されなかった。一方、組織より抽出したRNAを用いて各臓器中でのNK4mRNA発現を確認した結果においては、高用量投与群の投与1日後の肺・肝・精巣組織、また、投与3日後の肝組織に対照群と比して高いレベルでNK4の発現を認めたが、それ以外では対照群と同程度のレベルのNK4mRNAの発現状況であった。

また Ad5CMV-NK4 を胸腔内投与についても検討を行った。Ad5CMV-NK4 を実際の臨床投

与量の 380 倍という高用量で胸腔内に投与し、経時的に安全性に関する検討を 14 日後まで行った。その結果、マウス体重の一過性の減少があったが次第に回復し、非投与群と大差ないレベルまで回復した。また生化学的検査から肝機能障害が認められ、14 日後においてもその状況が継続していた。またアデノウイルス DNA の生体内分布を検討すると、ウイルス投与後 24 時間後では肺が最大で、その他、脳、胃、肝臓、脾臓、腎臓、小腸、大腸、精巣、および末梢血の全てでウイルス DNA が検出されたが、そのレベルは時間経過とともに減少した。病理組織的検討では、ウイルス投与後 24 時間後および 7 日後の脾臓において軽度のリンパ濾胞の肥大を認め、肝臓ではウイルス投与後 24 時間後より肝細胞に変性と炎症性細胞浸潤を認めたが、14 日後には回復傾向にあった。一方、他の臓器には異常所見はなく、全試験期間を通じてマウスの死亡例はなかった。また脳、肺、胃、脾臓、腎臓、肝臓、小腸、大腸、精巣について NK4 mRNA の発現レベルを検討した。その結果、各マウスの個体差が大きく、アデノウイルス DNA 量と NK4 mRNA の発現レベルは必ずしも相関関係にはなかったが、各臓器の NK4 mRNA の発現レベルは、Ad5CMV-NK4 投与後時間の経過と共に減少した。臓器別では Ad5CMV-NK4 投与後 24 時間でアデノウイルス DNA が高いレベルで検出された肺が、最も強く NK4 mRNA 発現を示した。また 14 日後では肝臓における NK4 mRNA の発現が、その他の臓器と比較して最大であった。以上のことから、Ad5CMV-NK4 の胸腔内投与は大量投与でも、重篤な有害事象はないとは想定されるが、他のアデノウイルスの投与経路と同様に肝障害の遷延化を惹起する可能性があると判断された。

6 国外における使用等により得られた情報

Ad5CMV-NK4を用いた臨床試験は、実施例がないためこれまでに得られた情報はない。搭載 cDNA が異なる Ad5CMV ベクターの使用経験は 4 つの臨床研究で報告されているので、その結果を記載する。

- ① 本臨床研究の対象と同じ悪性胸膜中皮腫を対象とした、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子発現型アデノウイルスベクターの第 I 相臨床試験（胸腔内投与）が米国のペンシルバニア大学において実施された（文献 4）。投与量は 5×10^{10} viral particles (vp) から 5×10^{13} vp まで胸腔内投与が行われた。その結果、最高投与量まで増量されたが、最大耐量は確認できず 5×10^{13} vp 以上と判断された。主な副作用は注入部位疼痛、発熱などで、腎毒性等の化学療法に良く見られる重篤な毒性は報告されておらず忍容性は良好であった。なお、環境中への拡散について報告はない。
- ② 悪性胸膜中皮腫を対象とした、インターフェロン β 遺伝子発現型アデノウイルスベクターの第 I 相臨床試験（胸腔内投与）が米国のペンシルバニア大学において実施された（文献 5）。投与量は 9×10^{11} vp と 3×10^{12} vp の 2 用量で胸腔内投与が行われた。その結果、 3×10^{12}

vp 投与4症例において一過性の低酸素症が1例（原疾患に心不全を有していた症例で、利尿剤にて改善）と肝機能障害が1例（生化学的検査によるもので臨床的症状は認められず）が認められた。一方 9×10^{11} vp 投与の場合、6例中6例でグレード1ないし2の有害事象が観察され、当該研究における最大耐量は 9×10^{11} vp と判断された。主な副作用は注入部位疼痛、発熱などで、腎毒性等の化学療法に良く見られる重篤な毒性は報告されておらず忍容性は良好であった。また、上記10症例のなかで4例の患者から、アデノウイルス投与4日後まで血清中よりPCRによって当該アデノウイルスが検出された。

- ③ また最近上記研究グループより、2種類のアデノウイルス（インターフェロンβおよびインターフェロンα2b）を2回胸腔内投与した臨床試験の結果が報告された（文献6,7）。最初のアデノウイルス投与によって生じた抗アデノウイルス抗体によって、2回目の投与の遺伝子導入効率が落ちる可能性があり、そのため2回目の投与はより早期に行うべきであることがその論文の主旨であるが、一方で腫瘍に対する抗体が生じた可能性にも言及している。安全性については、インターフェロンβを発現するアデノウイルスベクターのフェーズI試験（最大投与量 3×10^{12} vp、7例を含む）で、17名の対象患者中、肺がん患者1名に部分トロンボプラスチン時間の延長、肺がん患者1名に心タンポナーデが見られたが、その他には重篤な有害事象はなかった（文献6）。また、同試験において、前者はその他特段の異常を認めず、後者は心嚢穿刺で症状が改善されていた。また、インターフェロンα2bを発現するアデノウイルスベクターを用いたパイロット試験（最大投与量 1×10^{12} vp）では、インターフェロンα2bによると思われるインフルエンザ様症状が見られたが、その他リンパ球減少（グレード4）以外、おおむね忍容性が確保されていた（文献7）。

- 文献3：Shimada H, Matsubara H, Shiratori T, et al. Phase I/II adenoviral p53 gene therapy for chemoradiation resistant advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2006; 97: 554-561.
- 文献4：Stermán DH, Recio A, Vachani A, et al. Long-term follow-up of patients with malignant pleural mesothelioma receiving high-dose adenovirus herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapy. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 7444-7453.
- 文献5：Stermán DH, Recio A, Carroll RG, et al. A phase I clinical trial of single-dose intrapleural IFN-β gene transfer for malignant pleural mesothelioma and metastatic pleural effusions. high rate of antitumor immune responses. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 4456-4466.
- 文献6：Stermán DH, Recio A, Haas A, Vachani A, Katz SI, Gillespie CT et al. A Phase I trial of repeated intrapleural adenoviral-mediated interferon-β gene transfer for mesothelioma and metastatic pleural effusions. *Mol Ther* 2010; 18: 852-860.
- 文献7：Stermán DH, Haas A, Moon E, Recio A, Schwed D, Vachani A et al. A trial of intrapleural adenoviral-mediated interferon-α2b gene transfer for malignant pleural mesothelioma. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 1395-1399.

IV 生物多様性影響評価

1 他の微生物を減少させる性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

Ad5CMV-NK4の感染性は、感染の種特異性を司る遺伝子に改変を加えていないことから野生型のタイプ5型Adと同一であり、微生物に感染することはなく、また有害物質等の産生により他の微生物を減少させることないと考えられる。したがって、このために影響を受ける可能性のある野生動植物はない。これは野生型アデノウイルスとなっても同じである。

(2) 影響の具体的内容の評価

他の微生物を減少させることはないため、当該ウイルスに関して該当事項はない。

(3) 影響の生じやすさの評価

他の微生物を減少させることはないため、当該ウイルスに関して該当事項はない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

当該第一種使用規程に従って使用等を行うかぎり、他の微生物を減少させる性質について生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられる。

2 病原性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

Ad5CMV-NK4の感染性はアデノウイルス5型と同じであり、当該遺伝子組換えウイルスが感染しうる対象はヒトを含む一部のほ乳類及び鳥類である。しかし、自己増殖能を失っていることから、他の野生動植物に対して病原性を呈するおそれはないと考えられる。また、欠損しているE1領域について、Ad5CMV-NK4がこれを取り込み、野生型アデノウイルスとなることを、現実問題として自然界で起こることは想定し難いが、万一野生型となったとしても、結局はアデノウイルス5型と同一の感染性と病原性を有するにすぎず、すでに自然界に広く分布しているアデノウイルス5型以上の感染性と病原性を獲得するものではない。

(2) 影響の具体的内容の評価

Ad5CMV-NK4がヒトに感染した場合、一過性にNK4蛋白質の発現が見られるが、これによるヒトへの病原性は知られていない。また Ad5CMV-NK4由来のRCAおよび、万一野生型アデノウイルスとなった場合においても、その感染性と病原性はすでに自然界に分布するアデノウイルスと同等であり、その病原性については、I「宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報」の3「生理・生態学的特性」(5)病原性に記載されているものと同一である。Ad5を用いた遺伝子治療用ベクターについては1990年以降、米国・欧州・中国あるい

は本邦においても使用されているが、環境中への悪影響に関する報告はない。またAd5による遺伝子治療ベクターによる死亡例は、I「宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報」の2「使用等の歴史及び現状」に記載されたとおりである。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、Ad5CMV-NK4および、万一生じると仮定した野生型アデノウイルスの環境中への拡散は極めて微量である。実際問題としてAd5CMV-NK4が感染しうるのはヒトのみあり、当該ウイルスは自己増殖能を失っていることから環境中で増殖することはない。Ad5CMV-NK4由来の野生型アデノウイルスが、環境中に大量に放出されることは考えられず、万一そのようなことが生じても、その病原性は広く自然界に分布するアデノウイルスと同等である。したがって、Ad5CMV-NK4の投与によって、被験者以外のヒトに対して病原性を示す可能性は極めて少ないと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

当該第一種使用規程に従って使用等を行うかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられる。

3 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

Ad5CMV-NK4の有害物質の産生性は知られておらず、また安全性試験の結果等において、当該遺伝子組換えウイルスの野生動物に対する有害物質の産生性は認められていない。また植物に対して有害物質産生もないことから、他の野生動植物等に対する有害物質を産生するおそれはないと考えられる。

(2) 影響の具体的内容の評価

有害物質の産生はないことから特記すべきことはない。

(3) 影響の生じやすさの評価

有害物質の産生はないことから特記すべきことはない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

有害物質の産生性について、当該第一種使用規程に従って使用等を行うかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられる。

4 核酸を水平伝達する性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

Ad5CMV-NK4の感染性はアデノウイルス5型と同じであり、実際問題として感染しうるのは自然宿主のヒトであり、また当該遺伝子組換えウイルスは自己増殖能を失っていることから、他の野生動植物に対して核酸を水平伝達するおそれはないと考えられる。万一野生型のアデノウイルスが生じて、その感染性はアデノウイルス5型を越えるものではない点から、核酸の水平伝達によって影響を受ける可能性のある野生動植物等はない。

(2) 影響の具体的内容の評価

Ad5CMV-NK4が感染したヒトにおいて一過性にNK4遺伝子が発現しうるが、これによってヒトを含む他の哺乳類等への水平伝達は知られていない。また野生型アデノウイルスが万一生じて、核酸水平伝達の性質は自然界に広く分布するアデノウイルス5型と同様である。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、Ad5CMV-NK4より派生するRCAの環境中への拡散は極めて微量である。Ad5CMV-NK4は自己増殖能を失っており、被験者に野生型アデノウイルスが共感染しないかぎり、環境中で増殖することはない。アデノウイルスが自然界において感染し増殖するのはヒトにほぼ限られており、野生型アデノウイルスが同一個体の同一細胞に共感染する可能性は、ヒトのアデノウイルスに対する免疫応答を考えれば極めて低い。Ad5CMV-NK4より派生するRCAの核酸水平伝達の性質は自然界に広く分布するアデノウイルス5型と同様である。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

核酸を水平伝達する性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられる。

5 その他の性質

なし。

V 総合的評価

Ad5CMV-NK4 の感染性は、感染の種特異性を司る遺伝子に改変を加えていないことから野生型のタイプ 5 型 Ad と同一であり、自然界では微生物、植物に感染することはない、また有害物質等の産生により他の微生物等を減少させることないと考えられる。また Ad5CMV-NK4 の動物への感染性はヒトを含む一部のほ乳類及び鳥類であるが、自己増殖能を失っていることから、他の野生動物に対して病原性を呈するおそれはないと考えられる。また、欠損している E1 領域について、Ad5CMV-NK4 がこの遺伝子を取り込み、野生型アデノウイルスとなることは現実には自然界で起こることは想定し難いが、万一野生型となったとしても、結局はアデノウイルス 5 型と同一の感染性と病原性を有するにすぎず、すでに自然界に広く分布しているアデノウイルス 5 型以上の感染性と病原性を獲得するものではない。さらに、Ad5CMV-NK4 による有害物質の産生性は認められていないことから、他の野生動植物等に対する有害物質を産生するおそれはないと考えられる。したがって、他の微生物を減少させる性質に起因する生物多様性影響、病原性に関して生物多様性影響、水平伝達によるヒトや他の哺乳類に対し生物多様性影響を生じるおそれはないと考えられる。

また、使用等を行う場所としては主として P2 レベル相当の個室に限っており、被験者の排泄物等については不活化する等の措置を講じることとしている。

以上のことから、当該第一種使用規程に従って使用等を行うかぎり、Ad5CMV-NK4 の第一種使用等により生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

TCGTTTCGCGGGTTGGGGCGGCTTTTCGCTGTACGGCAGTAGTCGGTGCTCGTCCAGACGGGCCAGGGTCATGTCTTTCCACGGGCGC
 AGGGTCTCTCGTCAGCGTAGTCTGGGTACGGTGAAGGGGTGCGCTCCGGGCTGCGCGCTGGCCAGGGTGCGCTTGAGGCTGGTCTCTG
 CTGGTCTGAAGCGCTGCCGCTTTCGCCCTGCGCGTCGGCCAGGTAGCATTGTACCATGGTGTCTAGTCCAGCCCCCTCCGCGGCG
 TGGCCCTTGGCGCGCAGCTTGCCCTTGGAGGAGGCGCGCAGAGGGCAGATGCGAGACTTTTGAGGGCTGAGAGCTTGGGCGCGCAGA
 AATACCGATTCCGGGGAGTAGGCATCCGCGCGCAGGCCCGCAGACGGTCTCGCATTCACAGAGCCAGGTGAGCTCTGGCCGTTCG
 GGGTCAAAAACAGGTTTCCCCATGCTTTTGTATGCGTTTCTTACCTCTGGTTTCCATGAGCCGGTGTCCACGCTCGGTGACGAAA
 AGGCTGTCCGTGTCCCCGTATACAGACTTGAGAGGCCTGTCTCGAGCGGTGTTCCGCGGTCTCTCTCGTATAGAAACTCGGACCAC
 TCTGAGACAAAGGCTCGCGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCTAAGTGGGAGGGGTAGCGGTGCTTGTCCACTAGGGGGTCCACTCGC
 TCCAGGGTGTGAAGACACATGTGCCCCCTTTCGGCATCAAGGAAGGTGATTGGTTTGTAGGTGTAGGCCACGTGACCGGGTGTCTCT
 GAAGGGGGGTATATAAAGGGGGTGGGGGCGGCTTCGTCTCTCACTCTCTTCCGCATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGGTGA
 TACTCCCTCTGAAAAGCGGGCATGACTTCTGCGCTAAGATTGTCTAGTTTCCAAAACAGAGGAGGATTGATATTACCTGGCCCGCG
 GTGATGCTTTTGGGGTGGCCGCATCCATCTGGTCAGAAAAGACAATCTTTTGTGTCAAGCTTGGTGGCAAACGACCCGTAGAGG
 GCGTTGGACAGCAACTTGGCGATGGAGCGCAGGGTTTGGTTTGTGTGCGCATCGGCGCGCTCTTGGCCGCGATGTTTAGCTGCACG
 TATTGCGCGCAACCGCACCCGCATTTCGGGAAAGACGGTGGTGGCTCGTCTGGGACCAAGGTGCACGCGCAACCGCGGTTGTGCAGG
 GTGACAAGGTCAACGCTGGTGGCTACCTCTCCGCGTAGGCGCTCGTTGGTCCAGCAGAGGCGGCGCCCTTGGCGGAGCAGAATGGC
 GGTAGGGGTCTAGCTGCGCTCTCGTCCGGGGGTCTGCGTCCAGGTAAGACCCCGGCGCAGAGCGCGCTGCAAGTAGTCTTATC
 TTGCATCCTTGCAAGTCTAGCGCCTGTGCCATGCGCGGGCGCAAGCGCGCGCTCGTATGGGTTGAGTGGGGGACCCCATGGCATG
 GGGTGGGTGAGCGCGGAGGCGTACATGCCGCAATGTCTGTAACGTAGAGGGGCTCTCTGAGTATTCCAAGATATGTAGGGTAGCAT
 CTTCCACCGCGGATGCTGGCGCGCACGTAATCGTATAGTTCGTGCGAGGGAGCGAGGAGGTGCGGACCGAGGTTGCTACGGGCGGGC
 TGCTCTGCTCGGAAGACTATCTGCTTGAAGATGGCATGTGAGTTGGATGATATGGTTGGACGCTGGAAGACGTTGAAGCTGGCGTCT
 GTGAGACCTACCGCTCACGCACGAAGGAGGCGTAGGAGTCCGCGAGCTTGTGACCACTCGGCGGTGACCTGCACGCTTAGGGCG
 CAGTAGTCAGGGTTTCTTGTATGATGTCTACTTATCTGTCTCTTTTTCACAGCTCGCGGTTGAGACAAACTCTTCCGCG
 TCTTTCCAGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGGTAAGAGCCTAGCATGTAGAAGTGGTTGACGGCCTGGTAGGCG
 CAGCATCCCTTTTCTACGGGTAGCGGTATGCTTGGCGGCGCTTCCGAGCGAGGTGTGGGTGAGCGCAAAGGTGTCCCTGACCATG
 ACTTTGAGGTACTGTTATTTGAAGTCAGTGTCTGCGCATCCGCGCTGCTCCAGAGCAAAAAGTCCGTGCGCTTTTGGAAACGCGGA
 TTTGGCAGGGCGAAGGTGACATCGTTGAAGAGTATCTTCCCGCGCGAGGCATAAAGTTGCGTGTGATGCGGAAGGGTCCGCGCACC
 TCGGAACGGTTGTTAATTACCTGGGCGGCGAGCAGATCTCGTCAAAGCCGTTGATGTTGTGGCCACAATGTAAAGTTCCAAGAAG
 CGCGGATGCCCTTGATGGAAGCAATTTTAAAGTTCTCTGAGGTGAGCTCTTTCAGGGGAGCTGAGCCCGTCTCTGAAAGGGCC
 CAGTCTGCAAGATGAGGGTTGGAAGCGACGAATGAGCTCCACAGGTACAGGGCCATTAGCATTGTGAGGTGGTTCGCGAAAGGTCTTA
 AACTGGCGACCTATGGCCATTTTCTGGGGTGTATGAGTAGAAGGTAAGCGGGTCTTGTTCACGCGTCCCATCCAAGGTTCGCG
 GCTAGGTCTCGCGCGGCGAGTCACTAGAGGCTCATCTCCGCCAACTTCATGACCAGCATGAAGGGCAGCAGCTGCTTCCCAAAGGCC
 CCCATCCAAGTATAGGTCTCTACATCGTAGGTGACAAAGAGACGCTCGGTGCGAGGATGCGAGCCGATCGGGAAGAACTGGATCTCC
 CGCCACCAATTGGAGGAGTGGCTATTGATGTGGTGAAGTAGAAGTCCCTGCGACGGGCGCAACACTCGTGCTGGCTTTTGTAAAAA
 GTGCGGAGTACCTGGCAGCGGTGACCGGCTGTACATCTGACAGGTGACCTGACGACCGCACAAGGAAGCAGAGTGGGAAT
 TTGAGCCCCCTCGCTGGCGGGTTTGGCTGGTGGTCTTCTACTTTCGGCTGCTTGTCTTACCGTCTGGCTGCTCGAGGGGAGTTACG
 GTGGATCGGACCACACGCGCGCGAGCCCAAAGTCCAGATGTCCGCGCGCGGCGGTGCGAGCTTGATGACAAATCGCGCAGATGG
 GAGCTGTCCATGTTCTGGAGCTCCCGCGCGCTCAGGTGAGGCGGAGCTCCTGCGAGTTTACCTCGCATAGACGGGTGAGGGCGCGG
 GCTAGATCCAGGTGATACCTAATTTCCAGGGGCTGGTTGGTGGCGCGCTCGATGGCTTGAAGAGGCGCGATCCCCGCGGCGGACT
 ACGGTACCGCGCGGCGGCGGTGGGCGCGGGGGTGTCTTGGATGATGCATCTAAAGCGGTGACGCGGCGAGCCCCCGGAGGTA
 GGGGGGGCTCCGGACCCGCGGGGAGAGGGGGCAGGGGCAGCTCGGCGCGCGCGCGCGGCGAGGAGTGGTGTCTGCGCGGTAGGTTG
 TGGCGAACCGCAGCAGCGCGGCGGTGATCTCTGAACTGCGCGCTCTGCGTGAAGACGAGCGGCGCGGTGAGCTTGAACCTGAAAG
 AGAGTTGACAGAATCAATTTCTGGTGTCTGTGACGGCGGCTGGCGCAAATCTCTGACGCTCTCTGAGTTGTCTTGATAGGCGA
 TCTCGGCCATGAAGTGTCTGATCTCTTCTCTCTGGAGATCTCCGCGTCCGCGCTCGCTCCACGGTGGCGGCGAGGTGCTTGGAAATGC
 GGGCCATGAGCTGCGAGAAGGCGTTGAGGCCCTCCCTCGTTCCAGACGCGGCTGTAGACCACGCCCCCTTCGGCATCGCGGGCGCGCA
 TGACCACCTTGGCGAGATTGAGCTCCACGTGCGGCGGAAGACGGCGTAGTTTTCGAGGCGCTGAAAGAGGTAGTTGAGGGTGGTG
 CGGTGTGTTCTGCCACGAAGAAGTACATAACCCAGCGTGCAGCTGAGTTCGTTGATATCCCCCAAGGCTCAAGGCGCTCCATGG
 CCTCGTAGAAGTCCACGGCGAAGTTGAAAACTGGGAGTTGCGCGCGACACGGTTAACTCTCTCCAGAAGACGGATGAGCTCGG
 CGACAGTGTGCGCACCTCGCGCTCAAAGGCTACAGGGGCTCTTCTTCTTCAATCTCTCTTCCATAAGGGGCTCCCTTCTT
 CTCTTCTGGCGGCGGTGGGGGAGGGGGGACAGCGCGGCGACAGCGCGCACCGGGAGGCGGTGACAAAGCGCTCGATCATCTCCC
 CGCGGCGACGCGCGCATGGTCTCGGTGACGGCGCGGCGCTTCTCGGGGGGCGCAGTTGGAAGACGCGCGCCCGTCATGTCCCGGTTAT
 GGGTTGGCGGGGGGTGCCATCGGCGAGGATACGGCGCTAACGATGCATCTCAACAATTGTTGTGTAGGTACTCCGCGCGCGAGGG
 ACCTGAGCGAGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGAGAAAGCGCTTAACCAAGTCAAGTTCGCAAGGTAGGCTGAGCACCG
 TGGCGGGCGGCGAGCGGGCGGCTCGGGGTGTTTCTGGCGGAGGTGCTGCTGATGATGTAATTAAGTAGGCGGTCTTGAGACGGC
 GGATGGTGCACAGAAGCACCATGTCTTGGGTCCGGCTGTGAATGCGCAGGCGGTGCGCCATGCCCCAGGCTTCGTTTGTACATC
 GGCGCAGGTCTTTGTAGTAGTCTTGATGAGCCTTTCTACCGGCACTTCTTCTTCTCTCTCTCTTGTCTCTGATCTCTTGTGATCTA
 TCGCTGCGGCGGCGGCGGAGTTTGGCCGTAGGTGGCGCCCTCTTCTCTCCATGCGTGTGACCCCCGAAGCCCTCATCGGCTGAAGCA
 GGGCTAGGTGCGCGACAACCGCTCGGCTAATATGGCCTGTGACCTGCGTGAGGGTAGACTGGAAGTCAATCATGTCCACAAAGC
 GGTGGTATGCGCCCGTGTGTATGGTGAAGTGCAGTTGGCCATAACGGACCAAGTTAACGGTCTGGTGACCCGCGCTGCGAGAGCTCG
 TGTACCTGAGACGCGAGTAAGCCCTCGAGTCAAATACGTAGTCTGTTGCAAGTCCGCACCAGGTACTGGTATCCACCAAAAAGTGCG
 GCGGCGGCTGGCGGTAGAGGGGCCAGCGTAGGGTGGCCGGGGCTCCGGGGCGAGATCTTCCAACATAAGGCGATGATATCCGTAGA
 TGTACCTGGACATCCAGGTGATGCGGCGGCGGTGGTGGAGGCGCGGAAAGTCCGCGACGCGGTTCCAGATGTTGCGCAGCGGCA
 AAAAGTGTCTCATGGTCCGGACGCTCTGGCCGGTCAGGCGCGCGCAATCGTTGACGCTCTAGACCGTGCAAAGGAGAGCCTGTAAG
 CGGGCACTCTTCCGTGGTCTGGTGGATAAATTCGAAGGTATCATGGCGGACGACCGGGGTTGAGCCCGGTATCCGGCGCGTCCGC
 CGTGATCCATCGGTTACCGCGCGGTGTCGAACCCAGGTGTCGACGTGAGCAACAGGGGAGTGTCTCTTTGGCTCTCTTCCAG
 GCGCGGCGGCTGTGCGCTAGCTTTTGGCCACTGGCCGCGCGCAGCGTAAGCGGTTAGGCTGGAAGCGAAAGCATTAAGTGGCT
 CGCTCCCTGTAGCCGAGGGTTATTTTCCAAGGGTTGAGTCCGCGGACCCCCGTTGAGTCTCGGACCGGCGGACTGCGGCGAAC
 GGGGGTTTGCCTCCCGTCTGCAAGACCCCGTTGCAATCTCTCGGAAACAGGGACGAGCCCTTTTGTCTTTCCAGATGC
 ATCCGGTGTGCGGCGAGATGCGCCCCCTCTCAGCAGCGGCAAGAGCAAGAGCAGCGGCGAGACATGAGGGCACCTCCCTCTCT

CTACCGCGTCAGGAGGGGCGACATCCGCGGTTGACGCGGCAGCAGATGGTGATTACGAACCCCGCGCGCGGGCCCGGCACTACC
 TGGACTTGGAGGAGGGCGAGGGCCTGGCGCGGCTAGGAGCGCCCTCTCTGAGCGGCACCCAAGGGTGCAGCTGAAGCGTGATACGC
 GTGAGGCGTACGTGCCGCGGCAGAACCTGTTTTCGCGACCGCGAGGGAGAGGAGCCCGAGGAGATGCGGGATCGAAAGTTCCACGCAG
 GCGCGAGCTGCGGCATGGCCTGAATCGCGAGCGGTTGCTCGCGAGGAGGACTTTGAGCCCGACGCGCGAACCGGGATTAGTCCCG
 CGCGCGCACACGTGGCGGCCCGCGACCTGGTAACCGCATACGAGCAGACCGTGAACAGGAGATTAACTTTCAAAAAAGCTTTAACA
 ACCACGTGCGTACGCTTGTGGCGCGCGAGGAGGTGGCTATAGGACTGATGCATCTGTGGGACTTTGTAAGCGCGCTGGAGCAAAACC
 CAAATAGCAAGCCGCTCATGGCGCAGCTGTTCTTATAGTGACACAGCAGGGACAACGAGGCATTAGGGATGCGCTGCTAAACA
 TAGTAGAGCCCGAGGGCCGCTGGCTGCTCGATTTGATAAACATCCTGCAGAGCATAGTGGTGCAGGAGCGCAGCTTGAGCCTGGCTG
 ACAAGGTGGCCGCATCACTATTCCATGCTTAGCCTGGGCAAGTTTTACGCCCCGAAGATATACCATACCCCTTACGTTCCCATAG
 ACAAGGAGGTAAAGATCGAGGGGTTTACATGCGCATGGCGCTGAAGTGCTTACCTTGAGCGACGACCTGGGCGTTTATCGCAACG
 AGCGCATCCACAAGGCCGTGAGCGTGAGCCGCGCGCGAGCTCAGCGACCGCGAGCTGATGCACAGCCTGCAAGGGCCCTGGCTG
 GCACGGGCGAGCGCGATAGAGAGGCCGAGTCTACTTTGACGCGGGCGCTGACCTGCGCTGGGCCCCAAGCCGACGCGCCCTGGAGG
 CAGCTGGGGCCGACCTGGGCTGGCGGTGGCACCCGCGCGCGCTGGCAACGTGCGCGCGTGGAGGAATATGACGAGGACGATGAGT
 ACGAGCCAGAGGACGGCGAGTACTAAGCGGTGATGTTTCTGATCAGATGATGCAAGACGCAACGACCCGCGGTGCGGGCGGCGCT
 GCAGAGCCAGCGCTCCGGCCTTAACCTCCACGACGACTGGCGCCAGGTGATGGACCGCATCATGTGCTGACTGCGCGCAATCCTGA
 CGCGTTCGCGCAGCAGCCGAGGCCAACCGGCTCTCCGCAATTCTGGAAGCGGTGGTCCGCGCGCGCGCAAAACCCACGCAGAGAA
 GGTGCTGGCGATCGTAACCGCGCTGGCCGAAACAGGGCCATCCGCGCCGAGCGAGCCGCGCTGGTCTACGACGCGCTGCTTACGCG
 CGTGGCTCGTTACAACAGCGGCAACGTGCAGACCAACCTGGACCGGCTGGTGGGGGATGTGCGCGAGGCGCTGGCGCAGCGTGAGCG
 CGCGCAGCAGCGGGCAACCTGGGCTCCATGGTTGCACTAAACGCTTCTCTGAGTACACAGCCCGCAACGTGCGCGGGGACAGGA
 GGACTACACCAACTTTGTGAGCGCACTGCGGCTAATGGTGACTGAGACACCGCAAGTGAGGTGTACCAGTCTGGGCCAGACTATTT
 TTTCCAGACCAGTAGACAAGGCCCTGCAGACCGTAAACCTGAGCCAGGCTTTCAAAAACTTGACAGGGCTGTGGGGGTGCGGGCTCC
 CACAGGCGACCGCGCGACCGTGTCTAGCTTGTGACGCCCCAATCGCGCTGTTGCTGCTGCTAATAGCGCCCTTACGGACAGTGG
 CAGCGTGTCCCGGACACATACCTTAGGTCACTTGTGCACTGTACCGCGAGGCCATAGGTGAGCGCATGTGGACGAGCATACTTT
 CCAGGAGATTACAAGTGTGACCGCGCGCTGGGGCAGGAGACACGGGCGAGCTGGAGGCAACCCCTAAACTACCTGCTGACCAACCG
 GCGGCAGAAGATCCCTCGTTGCACAGTTTAAACAGCGAGGAGGAGCGCATTTTGCCTACGTGCAGCAGAGCGTGAGCCTTAACCT
 GATGCGCGACCGGGTAACGCCCAGCGTGGCGCTGGACATGACCGCGCGCAACATGGAACCGGGCATGTATGCTTCAACCGCGCGTT
 TATCAACCGCCTAATGGACTACTTGCATCGCGCGCGCCGCTGAACCCCGAGTATTTACCAATGCCATCTTGAACCCGCACTGGCT
 ACCGCCCCCTGGTTTCTACACCGGGGATTTCAGGTGCCCCGAGGGTAACGATGGATTCTCTGGGACGACATAGACGACAGCGTGT
 TTCCCGGAACCGCAGACCTGCTAGAGTTGCAACAGCGCGAGCAGGCGAGGCGCGCTGCGAAAGGAAAGCTTCCGCGAGGCCAAG
 CAGCTTGTCCGATCTAGGCGCTGCGGCCCGCGGTGAGTGCTAGTAGCCCATTTTCAAGCTTGATAGGGTCTCTTACCAGCACTCG
 CACCACCCGCGCGCTGCTGGGCGAGGAGTACCTAAACAACCTGCTGCTGCAGCCGCGAGCGCAAAAAACCTGCTTCCGCG
 ATTTCCCAACACCGGGATAGAGAGCCTAGTGGACAAGATGAGTAGATGGAAGACGTACGCGCAGGAGCAGAGGACGTGCCAGGCCC
 GCGCCCGCCACCCGTCGTCAAAGGCACGACCGTCAAGCGGGTCTGGTGTGGGAGGACGATGACTCGGCAGACGACAGCAGCGTCTCT
 GGATTTGGGAGGAGTGGCAACCCGTTTGGCGACCTTCGCCCCAGGCTGGGGAGAATGTTTAAAAAAGCATGATGCAAA
 ATAAAAAATCAACCAAGGCCATGGCACCGAGCGTTGGTTTCTTGTATTCCCTTAGTATGCGGCGCGCGCGCATGTATGAGGAAG
 TCCTCTCCCTCTACGAGAGTGTGGTGAGCGCGCGCCAGTGGCGCGCGCTGGGTTCTCCCTTCGATGCTCCCTGGACCCGCG
 GTTTGTGCTTCCGCGGTACCTGCGGCTACCGGGGGAGAAACAGCATCCGTTACTCTGAGTTGGCACCCCTATTTCGACACCCCG
 TGTGTACCTGTTGGACAACAAGTCAACGGATGTGGCATCCCTGAACCTACCAGAACGACCAAGCAACTTTCTGACCACGCTCATTCA
 AAACAATGACTACAGCCCGGGGAGGCAAGCACACAGACCATCAATCTTGACGACCGGTGCGACTGGGGCGGCGACCTGAAAACCAT
 CCTGCATACCAACTGCAAAATGTGAACGAGTTTACATGTTTACCAATAAGTTTAAAGCGCGGGTGTGGTGTGCGCTTCCGCTACTAA
 GGACAATCAGTTGGAGCTGAAATACGAGTGGGTGAGTTACGCTGCCCCAGGGCAACTACTCCGAGACCATGACCATGACCTTAT
 GAACAACGCGATCGTGGAGCACTACTTGAAGTGGGCGAGCAGAACCGGGTCTGGAAGCGACATCGGGGTAAAGTTTGACACCCG
 CAACCTTCACTGAGGTTTGGACCCGCTCACTGGTCTTGTGATGCTTGGGGTATATACAAACGAAGCCTTCCATCCAGACATCATTTT
 GCTGCCAGGATCGGGGTGAGCTTCAACCCAGCGCCTGAGCAACTTGTGGGCGATCCGCAAGCGGCAACCCCTTCCAGGAGGGCTT
 TAGGATCACCTACGATGATCTGGAGGGTGGTAACATCCCGCACTGTGGATGTGGACGCTTACCAGGCGAGCTTGAAGATGACAC
 CGAACAGGCGGGGTGGCGCAGGCGGCGAGCAACAGCATGGGCGAGGCGGAGAGAACTCAACGCGCGCGCGCATGATGCA
 GCGGTTGGAGGACATGACGATCATGTCATTCGCGCGACACTTTGGCACACGGGCTGAGGAGAAGCGCGCTGAGGCCGAGCAGC
 GGCCGAAGCTGCGCCCCCGCTGCGCAACCCGAGGTGAGAGCCTCAGAAGAAACCGGTGATCAAAACCCCTGACAGAGGACAGCAA
 GAAACGCGATTACAACCTAATAAGCAATGACAGCACCTTCAACCGAGTACCGCAGCTGGTACCTTGACATCAACTACGGCGACCTCA
 GACCGGAATCCGCTCATGGACCTGCTTTCGACTCCTGACGTAACCTGCGGCTCGGAGCAGGTCTACTGCTGCTTGCAGACATGAT
 GCAAGACCCGCTGACCTTCCGCTCCACGCGCCAGATCAGCAACTTTCCGTTGGTGGGCGCGGAGCTGTTGCCCGTGCCTCAAGAG
 CTTCTACAACGACGAGCCGCTTACTCCCAACTCATCCGCGAGTTTACCTCTTGACCCACGTGTTCAATCGCTTTCGCGAGAACCA
 GATTTTGGCGCGCCCGCAGCCGCCCCACCATCACCACCTGAGTCAAGCAAGCTTCTGCTCTACAGATCAGGGGACGCTACCGCTGCG
 CAACAGCATCGGAGGAGTCCAGCGAGTGACCATTAAGTACGCGCAGACGCGCACCTGCCCCCTACGTTTACAAGGCCCTGGGCATAGT
 CTGCGCGCGCTCTATCGAGCCGCACTTTTGGAGCAAGCATGTCCATCCTTATATCGCCAGCAATAACAGGCTGGGGCTGCG
 CTTCCCAAGCAAGATGTTTGGCGGGGCCAAGAAGCGCTCCGACCAACACCCAGTGCAGCTGCGCGGGGCACTACCGCGCGCCCTGGGG
 CGCGCAAAACCGGCGCGCACTGGGCGCACCAACCGTGCATGACGCCATCGACGCGGTGGTGGAGGAGGCGCGCAACTACACGCCCC
 GCGCGTACAGTGTCCACAGTGGACGCGGCCATTACAGCCGTGGTGCGCGAGCCCGCGCTATGCTAAATGAAGAGACGCGGAG
 GCGCGTACAGCTGCGCCACCGCGGCGGCACTGCGGCCCAACGCGCGGCGCGCGCCCTGCTTAAACGACCGCACCTGCGCACCGG
 CCGACGGGCGGCCATGCGGGCCGCTCGAAGGCTGGCCGCGGGTATTGTACTGTGCCCCCAGGTCCAGGCGACGAGCGGCGCGCG
 AGCAGCCGCGGCCATTAGTGCTATGACTCAGGGTTCGAGGGGCAACGTGTATTGGTGGCGGACTCGGTTAGCGGCTGCGCGTGGC
 CGTGCGACCCGCCCCCGCGCAACTAGATTGCAAGAAAACTACTTAGACTCGTACTGTTGTATGTATCCAGCGGCGGCGCGCG
 CAACGAAGCTATGTCCAAGCGCAAAATCAAAGAAGAGATGCTCCAGGTGATCGCGCGGAGATCTATGGCCCCCGAAGAAGGAAGA
 GCAGGATTACAAGCCCCGAAAGCTAAAGCGGGTCAAAAAGAAAAAGAAAGATGATGATGAACCTTGACGACGAGGTGGAAGTGTCT
 GCACGCTACCGCGCCGAGCGGAGGTGGAAGGTGAGCGTAAACGTTGTTTGGACCCGCGACCAACCGTAGCTTGTACT
 GCGCGTGAGCGCTCAACCGCACCTACAAGCGCGTGTATGATGAGGTGTACGCGACGAGGACCTGCTTGGAGAGGCCAACGAGCG
 CCTCGGGGAGTTTGCTACGGAAGCGGCATAAGGACATGCTGGCGTTGCGGCTGGACGAGGGCAACCCCAACCTAGCCTAAAGCC
 CGTAACACTGCAGCAGGTGCTGCCCGCGCTTGACCGTCCGAAGAAAGCGCGGCTTAAAGCGCGAGTCTGGTGAATTGGCACCCAC

CGTGCAGCTGATGGTACCCAAGCGCCAGCGACTGGAAGATGTCTTGGAAAAAATGACCGTGGAACCTGGGCTGGAGCCCCGAGGTCCG
 CGTGGCGCAATCAAGCAGGTGGCGCCGGGACTGGGCGTGACACCGTGGACGTTTACGATACCCACTACCAGTAGCACCAGTATTCG
 CACCGCCACAGAGGGCATGGAGACACAAACGTCCCCGGTTGCTCAGCGGTGGCGGATGCCGCGGTGCAGGCGGTGCTGCGGCCGC
 GTCCAAGACCTCTACGGAGGTGCAACCGGACCCGTGGATGTTTCGCGTTTCAGCCCCCGCGGCCCGCGCGCTTCGAGGAAGTACGG
 CGCGCCAGCGCGCTACTGCCGAAATATGCCCTACATCTTCCATTGGCGCTACCCCGGCTACCGGCTACACCTACCGCCCCAG
 AAGACGAGCAACTACCCGACGCCGAACCACTGGAACCCCGCGCGCGTGCCTGCGCCAGCCCGTGTGGCCCCGATTTCCTGT
 GCGCAGGGTGGCTCGCGAAGGAGGAGCAGGACCTGGTGTGCCAACAGCGCGCTACCACCCAGCATCGTTTAAAGCCGGTCTTTGT
 GGTCTTGCAGATATGGCCCTCACCTGCCGCTCCGTTTCCCGGTGCCGGGATTCCGAGGAAGAATGCACCGTAGGAGGGGCATGGC
 CGGCCACGGCCTGACGGGCGGCATGCGTGTGCGCACCACCGCGCGCGCGCGTGCACCGTGCATGCGCGGCGGTATCCTGCC
 CCTCTTATTCCACTGATCGCCGCGCGGATTGGCGCGGTGCCCGGAATTGCATCCGTGGCCTTGACGGCGCAGAGACACTGATTAA
 AACAGTTGCATGTGGAAAAATCAAAATAAAAGTCTGGACTCTCAGCTCGCTTGGTCTGTAACTATTTGTAGAATGGAAGACA
 TCAACTTTGCGTCTCTGGCCCCGCGACACGGCTCGCGCCGTTTCATGGGAACTGGCAAGATATCGGCACCAATATGAGCGGTG
 GCGCCTTCAGCTGGGGCTCGCTGTGGAGCGGCATTAAAAATTTCCGTTCCACCGTTAAGAACTATGGCAGCAAGGCCTGGAACAGCA
 GCACAGGCCAGATGCTGAGGGATAAGTTGAAAGAGCAAAATTTCAACAAAAGGTGGTAGATGGCCTGGCCTCTGGCATTAGCGGGG
 TGGTGGACCTGGCCAACAGGCAGTGCAAAATAAGATTAAACAGTAAGCTTGATCCCCCGCTCCCGTAGAGGAGCCTCCACCGGCCG
 TGGAGACAGTGTCTCCAGAGGGGCTGGCGAAAAGCGTCCGCGCCCCGACAGGGAAGAACTCTGGTGACGCAATAGACGAGCCTC
 CCTCGTACGAGGAGGCACTAAAGCAAGGCCTGCCACCACCGTCCCATCGCGCCCATGGCTACCGGAGTGCTGGGCCAGCACAC
 CCGTAACGCTGGACCTGCCCTCCCCTCCGCGACACCCAGCAGAAACCTGTGTGCCAGGCCGACCGCGCTTGTGTAAACCCGTCTTA
 GCCGCGCGTCCCTGCGCGCGCGCGCCAGCGGTCCGCGATCGTTGCGGCCCGTAGCCAGTGGCAACTGGCAAGCACACTGAACAGCA
 TCGTGGGTCTGGGGGTGCAATCCCCTGAAGCGCCGACGATGCTTCTGATAGCTAACGTGTGATGTGTGTCATGTATGCGTCCATGT
 CGCCGCGCAGAGGAGTGTGAGCGCGCGCGCGCGCTTTCAGATGGCTACCCCTTCGATGATGCCGCAAGTGGTCTTACATGCAC
 ATCTCGGGCCAGGACGCTCGGAGTACCTGAGCCCCGGGTGGTGAGTTTGGCCGCGCCACCGAGACGTACTTCAGCTGAATAAC
 AAGTTTAGAAAAACCCAGCGTGGCGCTTACGCAAGCGTGCACGAGTGCACAGACCGGTCCAGCGTTTGACGCTGCGGTCTCATCTCTGGAC
 CGTGAGGATACTGCGTACTCGTACCAAGCGCGGTTTACCCTAGCTGTGGGTGATAACCGTGTGCTGGACATGGCTTCCAGCTACTTT
 GACATCCGCGCGTGTGAGACAGGGCCCTACTTTTAAAGCCCTACTCTGGCACTGCCTACAACGCCCTGGCTCCCAAGGGTGGCCCA
 AATCCTTGCGAATGGGATGAAGCTGCTACTGCTCTTGAATAAACCTAGAAGAAGAGGACGATGACAACGAAGACGAAGTAGACGAG
 CAAGCTGAGCAGCAAAAAACCTACGTTATTTGGGCAGGCGCCTTATTCTGGTATAAATATTACAAAGGAGGTATTCAAATAGGTGTC
 GAAGGTCAAACACCTAAATATGCCGATAAAACATTTCAACCTGAACCTCAAATAGGAGAATCTCAGTGGTACGAAACAGAAATTAAT
 CATGCAGCTGGGAGAGTCTAAAAAGACTACCCCAATGAACCATGTTACGGTTTATATGAAAACCCACAAATGAAATGGAGGG
 CAAGGCATTCTTTGTAAGCAACAAATGGAAGAGCTAGAAAGTCAAGTGGAATGCAATTTTCTCACTACTGAGGCAGCGCGAGGC
 AATGGTGATAAATTGACTCCTAAAGTGGTATTGTACAGTGAAGATGTAGATATAGAAACCCAGACACTCATATTTCTTACATGCC
 ACTATTAAGGAAGGTAACCTACGAGAAGTAATGGGCCAACAATCTATGCCCAACAGGCCTAATTACATTGCTTTTAGGGACAATTTT
 ATTGGTCTAATGTATTACAACAGCACCGGTAATATGGGTGTTCTGGCGGGCCAGCATCGCAGTTGAATGCTGTTGTAGATTGTCAA
 GACAGAAACACAGAGCTTTTATACAGCTTTTGTGTTGATTCCATTGGTGATAGAACCAGGTACTTTTCTATGTGGAATCAGGCTGTT
 GACAGCTATGATCCAGATGTTAGATTATTGAAAAATCATGGAAGTGAAGTGAATGAACTTCAAATTACTGCTTTTCCACTGGGAGGTGTG
 ATTAATACAGAGACTCTTACCAAGGTAAAAACCTAAAAACAGGTACAGGAAATGGATGGGAAAAAGATGCTACAGAATTTTTCAGATAAA
 AATGAAATAAGAGTTGGAATAAATTTTGCCATGGAATCAATCTAAATGCCAACCTGTGGAGAAATTTCTGTACTCCAACATAGCG
 CTGTATTGCCCCGACAAGCTAAAGTACAGTCTTCCAACGTAAAAATTTCTGATAACCCAAACACCTACGACTACATGAACAAGCGA
 GTGGTGGTCTCCCGGGCTAGTGGACTGCTACATTAACCTTGGAGCAGCTGGTCCCTTGACTATATGGACAACGCTCAACCCATTTAAC
 CACCACCGCAATGCTGGCCTGCGCTACCGCTCAATGTTGCTGGGCAATGGTTCGCTATGTGCCCTTCCACATCCAGGTGCCTCAGAAG
 TTCTTTGGCCATTAAAAACCTCTTCTCCTGCGGGCTCATACCTACGAGTGAAGTTCAGGAAGGATTTACATGCTGTTCTGCGAG
 AGCTCCCTAGGAAATGACCTAAGGGTTGACGGAGCCAGCATTAAAGTTTGATAGCATTGCTTTACGCCACCTTCTTCCCATGGCC
 CACAACACCGCCTCCAGCTTGAGGCCATGCTTAGAAACGACACCAACGACAGTCTTTAACGACTATCTCTCGCGGCCAACATG
 CTCTACCTTATACCCGCCAACGCTACCAACGTGCCCATATCCATCCCTCCCGCACTGGGCGGCTTTCCGCGGCTGGGCCTTTCAG
 CGCCTTAAGACTAAGGAACCCCACTACTGGGCTCGGGCTACGACCTTATTACACTACTCTGGCTCTATACCTACCTAGATGGA
 ACCTTTTACCTCAACCACACCTTTAAGAGGTGGCCATTACCTTTGACTCTTCTGTGAGTGGCCTGGCAATGACCGCTGCTTACC
 CCCAACGAGTTTGAATTAAGCGCTCAGTTGACGGGGAGGTTTACACGTTGCCAGTGAACATCAACAGCAAGACTGTTTCTGGTA
 CAAATGCTAGCTACATAACATTGGCTACCGGGCTTCTATATCCAGAGAGCTACAAGGACCGCATGTACTCTTCTTTAGAAAC
 TTCCAGCCCATGAGCCGTGAGGTGGTGGATGATACTAAATACAAGGACTACCAACAGGTGGGCATCTACACCAACACAACAACCTCT
 GGATTTGTTGGCTACCTTGCCCCCACCATGCGCGAAGGACAGGCTACCTGCTAACTTCCCTATCCGCTTATAGGCAAGACCGCA
 GTTGACAGCATTACCCAGAAAAAGTTTCTTTCGATCGCACCTTTGGCGCATCCCATTTCCAGTAACTTTATGTCCATGGGCGCA
 CTCACAGACCTGGGCCAAAACCTTCTCTACGCCAATCCGCCACGCGCTAGACATGACTTTTGGGTGGATCCCATTGGACGAGCCC
 ACCCTCTTTATGTTTGTGTTGAACTTTGACGTGCTCCGTGTCACCGCGGCTGACAGCGGCTCATGAAACCGTGTGTTCTGCG
 ACGCCCTTCTCGGCCCGCAACGCCACAACATAAAGGAAGCAAGCAACATCAACAACAGCTCGCGCCATGGGCTCCAGTGAGCAGGAAC
 TGAAAGCCATTGTCAAAGATCTTGGTTGTGGGCCATATTTTTTGGGCACCTATGACAAGCGCTTTCCAGGCTTTGTTTCTCCACACA
 AGCTCGCCTGCGCCATAGTCAATACGGCCGTGCGGAGACTGGGGCGGTACACTGGATGGCCTTTGCTGGAACCCGCACTCAAAAA
 CATGCTACCTCTTTGAGCCCTTTGCTTTCTGACAGCGACTCAAGCAGGTTTACCAGTTTGTAGTACGAGTCACTCCTGCGCCGTA
 GCGCCATTGCTTCTTCCCCGACCGCTGTATAACGCTGGAAAAGTCCACCCAAAGCGTACAGGGGCCAACTCGGCCCGCTGTGGAC
 TATTCTGCTGCATGTTTCTCCAGCCTTTTGCCAAGTGGCCCCCACTCCCATGGATCACAAACCCACCATGAACTTATTACCGGGG
 TACCCACTCCATGCTCAACAGTCCCGAGTACAGCCACCTCGCTGCGCAACAGGAACAGCTCTACAGTCTCTGGAGCGCCACT
 CGCCCTACTTCCGCGAGCCACAGTGCAGAGATTAGGAGCGCCACTTCTTTTGTCACTTGAATAACATGTAAATAATGTACTAGAG
 AACTTTTCAATAAAGGCAATGCTTTTATTTGTACACTCTCGGTGATTATTTACCCCAACCTTGGCGTCTGCGCGGTTTAAAAAT
 CAAAGGGGTTCTGCCGCGCATCGCTATGCGCCACTGGCAGGGACAGTGTGCGATACTGGTGTAGTGCTCCACTTAAACTCAGGCA
 CAACCATCCGCGCGAGCTCGGTGAAGTTTCACTCCACAGGCTGCGCACCATCAACAACCGTCTTAGCAGGTGGGCGCGGATATCT
 TGAAGTCCGAGTTGGGCCCTCCGCTCTGCGCGCGCGGATGCGGATACACAGGTTGACAGCTGGAACACTATCAGCGCGGGTGGT
 GCACGCTGCGCAGCAGCTCTTGTGCGAGATCAGATCCGCTGACAGTCTCCGCTGTCAGGCGCAACGAGTCAACTTTGGTA
 GCTGCTTCCCAAAAAGGGCGCGTGGCCAGGCTTTGAGTTGCACTCGCACCGTAGTGGCATCAAAAGGTGACCGTGGCGCGGTCTGGG
 CGTTAGGATACAGCGCTGCATAAAGCCTTGATCTGCTTAAAGCCACCTGAGCCTTTGCGCCTTCAGAGAAGAACATGCCGCAAG

ACTTGCCGGAAAACTGATTGGCCGGACAGGCCGCGTCGTGCACGCAGCACCTTGGCTGGTGTGGAGATCTGCACCACATTTCCGGC
 CCCACCGGTTCTTACGATCTTGGCCTTGCTAGACTGCTCCTTCAGCGCGCGCTGCCGTTTTGCTCGTCACATCCATTTCAATCA
 CGTGCTCCTTATTTATCATAATGCTTCCGTGTAGACACTTAAGCTCGCCTTCGATCTCAGCGCAGCGGTGCAGCCACAACCGCGCAGC
 CCGTGGGCTCGTGATGCTTGTAGGTACCTCTGCAACAGCATGCAGGTACGCTGCAGGAATCGCCCCATCATCGTCACAAAGGTCT
 TGTGCTGGTGAAGGTCAAGTGCACCCCGCGGTGCTCCTCGTTCAGCCAGGTCTTGATACAGGCCGCCAGAGCTTCCACTTGGTCAG
 GCAGTAGTTTTGAAGTTCGCCTTTAGATCGTTATCCACGTGGTACTTGTCCATCAGCGCGCGCAGCCTCCATGCCCTTCTCCACG
 CAGACACGATCGGCACACTCAGCGGGTTCATCACCGTAATTTCACTTTCCGCTTGGCTGGGCTCTTCTCTTCTTCTTGGCTCGCA
 TACCACGCGCCACTGGGTGCTCTTCACTCAGCGCGCCGACTGTGCGCTTACCTCCTTTGCCATGCTTGATTAGCACCGGTGGGTTGC
 TGAAACCCACCATTTGTAGCGCCACATCTTCTCTTCTTCTCTCGCTGTCCACGATTACCTCTGGTGATGGCGGGCGCTCGGGCTTGG
 GAGAAGGGCGCTTCTTTTCTTCTTGGGCGCAATGCCAAATCCGCGCGCGAGGTGCATGGCCGCGGGCTGGGTGTGCGCGGCACCA
 GCGCGTCTTGTGATGAGTCTTCTCTCTCTCGACTCGATACGCGCCTCATCCGCTTTTTTGGGGCGCCCGGGGAGCGCGCGCG
 ACGGGACGGGACGACACGCTCCATGGTTGGGGGACGTGCGCGCGCACCGCTCCGCGCTCGGGGGTGGTTTCGCGCTGCTCCT
 CTTCCCGACTGGCCATTTCTTCTCTCTATAGGCAGAAAAAGATCATGGAGTCAGTCGAGAAGAAGGACAGCCTAACCGCCCCCTCTG
 AGTTCCGCCACCACCGCTCCACCGATGCCGCCAACGCGCTTACCACCTTCCCGCTCGAGGCACCCCGCTTGAGGAGGAGGAAGTGA
 TTATCGAGCAGGACCCAGGTTTTTGAAGCGAAGACGACGAGGACCGCTCAGTACCAACAGAGGATAAAAAAGCAAGACCAGGACAACG
 CAGAGGCAACAGGGAACAAGTCGGGCGGGGGGACGAAAGGCATGGCGACTACCTAGATGTGGGAGACGACGTGCTGTTGAAGCATC
 TGCAGCGCAGTGGCGCATTATCTGCGACGCGTTGCAAGAGCGCAGCGATGTGCCCTCGCCATAGCGGATGTAGCCTTGCCTACG
 AACGCCACCTATTCTCAGCGCGCTTACCCCCCAACGCCAAGAAAAAGGCACATGCGAGCCCAACCCGCGCCTCAACTTCTACCCCG
 TATTTGCCGTGCCAGAGGTGCTTGCACCTATCACATCTTTTCCAAAACGCAAGATACCCCTATCCTGCCGTGCCAACCGCAGCC
 GAGCGGACAAGCAGCTGGCCTTGGCGCAGGGCGCTGTATACCTGATATCGCTCAGCTCAACGAGTGCCAAAAATCTTTGAGGGTCT
 TTGGACGCGACGAGAAGCGCGCGCAACGCTCTGCAACAGGAAAAACGCGAAAAATGAAAGTCACTCTGGAGTGTGGTGAACTCG
 AGGGTGACAACGCGCGCCTAGCCGTACTAAAAACGAGCATCGAGGTACCCACTTTGCCTACCCGCACTTAACCTACCCCCAACGG
 TCATGAGCAGCAGTATGAGTTCGCTGCTGCGCGTGCAGCGCCCTGGAGAGGGATGCAAAATTGCAAGAACAAACAGAGGAGG
 GCCTACCCGCACTTGGCGACGAGCAGCTAGCGCGCTGGCTTCAAACGCGCGAGCCTGCCGACTTGGAGGAGCGACGCAAACTAATGA
 TGGCCGCGAGTGTGCTTACCGTGGAGCTTGTGTCATGCAGCGGTTCTTTGTGACCCGAGATGCAGCGCAAGCTAGAGGAAACAT
 TGCATACACCTTTGCAGAGGGCTACGTACGCCAGGCGTGAAGATCTCCAAGTGGAGCTCTGCAACCTGGTCTCCTACCTTGGAA
 TTTTGCACGAAAAACCGCTTGGGCAAAACGCTTCACTCCACGCTCAAGGGCGAGGCGCGCGCGACTACGTCCGCGACTGCGTTT
 ACTTATTTCTATGCTACACCTGGCAGACGGCCATGGCGTGTGGCAGCAGTGTGGAGGAGTGCAACCTCAAGGAGCTGCAGAAAC
 TGCTAAAGCAAACTTGAAGGACCTATGGACGCGCTTCAACGAGCGCTCCGTGGCCGCGCACCTGGCGGACATCATTTTCCCCGAAC
 GCCTGCTTAAACCTGCAACAGGGTCTGCCAGACTTACCAGTCAAAGCATGTTGCAGAACTTTAGGAACCTTATCCTAGAGCGCT
 CAGGAATCTTGCCCGCCACCTGCTGTGCACTTCTTAGCGACTTGTGCCCATTAAAGTACCGCGAATGCCCTCCGCCGCTTTGGGGCC
 ACTGCTACCTTCTGCAGCTAGCCAACTACCTTGCCTACCACTCTGACATAATGAAGACGTGAGCGGTGACGGTCTACTGGAGTGTG
 ACTGTGCTGCAACCTATGCACCCCGCACCGCTCCCTGGTTTGAATTCGCGAGCTGCTTAACGAAAGTCAAATATCGGTACCTTTG
 AGTGTGAGGGTCCCTCGCCTGACGAAAAGTCCGCGGCTCCGGGTTGAACTCACTCCGGGGCTGTGGACGTGCGGCTTACCTTCGCA
 AATTTGTACCTGAGGACTACCAACGCCACGAGATTAGTTTCTACGAAGACCAATCCCGCCGCTTAATGCGGAGCTTACCGCTGCG
 TCATTACCCAGGGCCACATTCTTGGCCAATTGCAAGCCATCAACAAAGCCCGCAAGAGTTTCTGCTACGAAAGGGACGGGGGTTT
 ACTTGGACCCCGAGTCCGGCGAGGAGCTCAACCCAATCCCCCGCGCGCGCAGCCCTATCAGCAGCAGCCGCGGGCCCTTGCTTCCC
 AGGATGGCACCCAAAAAGAGCTGAGCTGCCGCCGCCACCGACGAGGAGGAATACTGGGACAGTCAGGCAGAGGAGGTTTTG
 GACGAGGAGGAGGAGGACATGATGGAAGACTGGGAGAGCCTAGACGAGGAAGCTTCCGAGGTGCAAGAGGTGTGACAGGAAACCG
 TCACCTCGGTGCGATTCCCTCGCCGCGGCCAGAAATCGGCAACCGGTTCCAGCATGGCTACAACCTCCGCTCCTCAGGCGCG
 CCGGCACTGCCGTTGCGCGGACCCCAACCGTAGATGGGACACCTAGGAACCGGCGGTAAGTCCAGACGCGCGCGCTTAGCC
 CAAGAGCAACAACAGCGCCAAGGCTACCGCTCATGGCGCGGACACAAGAACGCCATAGTTGCTTGTGCAAGACTGTGGGGCAAC
 ATCTCCTTCCGCCGCGCTTTCTTCTTACCATCACGCGTGGCCTTCCCCGTAACATCCTGCATTACTACCGTCATCTTACAGC
 CCATACTGCACCGCGCGCAGCGGCAGCAACAGCAGCGGCCACACAGAAGCAAGGCGACCGGATAGCAAGACTCTGACAAAGCCCAA
 GAAATCCACAGCGCGCGCAGCAGCAGGAGGAGCGCTGCGTCTGGCGCCCAACGAAACCGTATCGACCCGCGAGCTTAGAAACAG
 GATTTTCCCACTCTGTATGCTATATTCAACAGAGCAGGGGCCAAGAACAAGAGCTGAAAATAAAAAACAGGTCTCTGCGATCCCT
 CACCCGACGTGCTGTATCACAAAAGCGAAGATCAGCTTCGGCGCAGCTGGAAGACGCGGAGGCTCTCTTCACTAATAATGTGCGC
 GCTGACTCTTAAGGACTAGTTTCGCGCCCTTTCTCAAATTAAGCGCGAAAACCTACGTCTATCTCCAGCGGCCACACCCGCGCCAGC
 ACCTGTTGTGACGCGCATTATGAGCAAGGAAATCCACGCGCTACATGTGGAGTTACCAGCCACAAATGGGACTTGCAGCTGGAGC
 TGCCCAAGACTACTCAACCCGAATAAATACATGAGCGCGGACCCCAATGATATCCCGGTCAACCGAATACGCGCCACCGGAA
 CCGAATCTCTGGAACAGGCGGCTATTACCAACACCTCGTAATAACCTTAATCCCGTAGTTGGCCCGCTGCCCTGGTGTACCA
 GGAAGTCCCGCTCCACCACTGTGGTACTTCCAGAGACGCGGCGGAGGTTACAGTACTGCAACTCAGGGGCGCAGCTTGGCGG
 CGGCTTGTGTCAGGGGTGCGGTGCGCCGCGGACGGGTAACTCAGTCAACATCAGAGGGCGAGGTATTTCAGCTCAACGACGAGTC
 GGTGAGCTCCTCGCTTGGTCTCGCTCCGACGCGGACATTTAGATCGGCGCGCGCGCGCTCTTCACTACGCGCTCGTCAGGCAAT
 CCTAACTCTGCAGACCTCGTCTCTGAGCGCGCTCTGGAGGCAATTGGAACCTGCAATTTATTGAGGAGTTGTGCCATCGGTCTA
 CTTTAAACCCCTTCTCGGACCTCCCGGCCACTATCCGGATCAATTTATTCTTAACCTTTGACGCGGTAAAGGACTCGGCGGACGGCTA
 CGACTGAATGTTAAGTGGAGAGGACAGCAACTGCGCCTGAAACACCTGGTCCACTGTGCGCGCCACAAGTGCTTTGCCCGCGACTC
 CGGTGAGTTTTGCTACTTTGAATTTCCCGGAGGATCATATCAGGGGCGGCGCACGGCTTACCGCCAGGGAGAGCTTGC
 CCGTAGCTGATTTCGGGAGTTTACCCAGCGGCCCTGCTGCTGAGCGGGACGGGACCTGTGTTCTCACTGTGATTGCAACTG
 TCCTAACCTGGATTACATCAAGATCTTTGTTGCCATCTCTGTGCTGAGTATAATAAATACAGAAATTAATAATACTGGGGCTCCT
 ATCGCCATCCTGTAAACGCCACCGCTTTCACCGCCCAAGCAACCAAGGCGAACCTTACCTGGTACTTTTAACTCTCTCCCTCTG
 TGATTTACAACAGTTTCAACCCAGACGAGTGAGTCTACGAGAGAACCTCTCCGAGCTCAGCTACTCCATCAGAAAAACACCAACC
 TCCTTACCTGCCGGGAACGTACGAGTGCGTCAACGGCGCGTGCACCACACCTACCGCTGACCGTAAACAGACTTTTTCCGGACAG
 ACCTCAATAACTCTGTTTACCAGAACAGGAGGTGAGCTTAGAAAACCTTAGGGTATTAGGCCAAAGGCGCAGCTACTGTGGGGTTT
 ATGAACAATTCAAGCAACTCTACCGGCTATTCTAAGCTTTCTCTAGAATTCCGGGTTGGGGTTATTCTGTCTTGTGATTCTC
 TTTATTCTTATACTAACGCTTCTCTGCTAAGGCTCGCCGCGCTGCTGTGTGCACATTTGCATTTATTGTGACGTTTTTAAACGCTGG
 GGTGCGCACCAAGATGATTAGGTACATAATCTAGGTTTACTCACCTTGGCTCAGCCACGGTACCACCAAAAGGTGGATTTTA
 AGGAGCCAGCCTGTAATGTTACATTGCGAGCTGAAGCTAATGAGTGCACCACCTTATAAAATGCACCACAGAATGAAAAGCTGC

TTATTCCGCCACAAAAACAAATTGGCAAGTATGCTGTTTATGCTAT TTGGCAGCCAGGTGACACTACAGAGTATAATGTTACAGTTT
 TCCAGGGTAAAGTCATAAACTTTTATGTATACTTTTCCATTTA TGAAATGTGCGACATTAACCATGTACATGAGCAAACAGTATA
 AGTTGTGGCCCCACAAATTGTGTGGAACAACTGGCACTTTCTG CTGCACTGCTATGCTAATTACAGTGCTCGCTTTGGTCTGTA
 CCTACTCTATATTAAATACAAAAGCAGACGCAGCTTTATTGAGGA AAAGAAAATGCCCTAATTTACTAAGTTACAAAGCTAATGTC
 ACCACTAAGTCTTTACTCGCTGCTTGCAAAACAAATTCAAAAAGT TAGCATTATAATTAGAATGAGATTAAACCCCGGTCATT
 TCCTGCTCAATACCATTTCCCTGAACAATTGACTCTATGTGGGATA TGCTCCAGCGCTACAACCTTGAAGTCAGGCTTCCTGGATGT
 CAGCATCTGACTTTGGCCAGCACCTGTCCCGGGATTGTTCCAGT CCAACTACAGCGACCCACCTAACAGAGATGACCAACACAA
 CCAACGCGGCCCGCTACCGGACTTACATCTACCACAAATACACC CCAAGTTTCTGCCTTTGTCAATAACTGGGATAACTTGGGCA
 TGTGGTGGTTCTCCATAGCGCTTATGTTGTATGCCTTATTATTAT GTGGCTCATCTGCTGCCTAAAGCGCAAACGCGCCCCGACCAC
 CCATCTATAGTCCCATCATTTGTGCTACACCCAAACAATGATGGAAT CCATAGATTGGACGGACTGAAACACATGTTCTTTCTCTTA
 CAGTATGATTAAATGAGACATGATTCCTCGAGTTTATATTACTG ACCCTTGTTCGCTTTTGTGCGCTTTTGTGCGTCCACATTGGCTG
 CGGTTTGTCCCGACCAATCAGCCTCGCCACCTTCTCCACCCCTT ACTGAAATCAGCTACTTTAATCTAACAGGAGGAGATGACTG
 TCATCACTGTGGTCTATCGCCTTTATCCAGTGCATTGACTGGGTCTG TGTGCGCTTTGCATATCTCAGACACCATCCCCAGTACAGGG
 ACAGGACTATAGCTGAGCTTCTTAGAATTCTTTAATTATGAAATTA CTGTGACTTTTCTGCTGATTATTTGCACCCTATCTGCGTT
 TTGTTCCCGACCTCCAAGCCTCAAAGACATATATCATGCAGATTC ACTCGTATATGGAATATTTCCAAGTTGCTACAAATGAAAAAAG
 CGATCTTTCCGAAGCCTGGTTATATGCAATCATCTCTGTTATGGTG TTCTGCAGTACCATCTTAGCCCTAGCTATATATCCCTACCT
 TGACATTGGCTGGAACGCAATAGATGCCATGAACACCCAACTTTC CCCGCGCCGCTATGCTTCCACTGCAACAAGTTGTTGCGCG
 CGGCTTTGTCCCGACCAATCAGCCTCGCCACCTTCTCCACCCCTT CCAAGTATCAGCTACTTTAATCTAACAGGAGGAGATGACTG
 ACACCCTAGATCTAGAAATGGACGGAATTATTACAGAGCAGCGCT GCTAGAAAGACGCGAGGGCAGCGCCGAGCAACAGCGCATGA
 ATCAAGAGCTCCAAGACATGGTTAACTTGCACCAAGTGCAAAAGGGG TATCTTTGTCTGGTAAAGCAGGCCAAAGTCACCTACGACA
 GTAATACCACCGGACACCGCCTTAGCTACAAGTTGCCAACCAGCG TCAGAAATTGGTGGTCAAGTGGGAGAAAAGCCATTACCA
 TAACTCAGCACTCGGTAGAAACCGAAGGCTGCATTCACTCACCTTG TCAAGGACCTGAGGATCTCTGCACCCTTATTAAGACCCTGT
 GCGGTCTCAAAGATCTTATTCCTTTAACTAATAAAAAAATAAT AAAGCATCACTTACTTAAATCAGTTAGCAAAATTTCTGTCC
 AGTTTATTACAGCAGCACTCTCTTGCCTTCTCCAGCTCTGTTATG GAGCTTCTCTGCTGCAAACTTTCTCCACAATCTAAAT
 GGAATGTCAAGTTTCTCTGTTTCTGTCATCCGACCCACTATCT TCATGTTGTTGCAGATGAAGCGCGCAAGACCGTCTGAAGAT
 ACCTTCAACCCCGTGTATCCATATGACACGGAACCGGTCTCCAA CTGTGCTTTTCTTACTCTCTCTTGTATCCCCCAATGGG
 TTTCAAGAGAGTCCCTCGGGGACTCTCTTGTGCGCTATCCGAAC CTCTAGTTACCTCCAATGGCATGCTTGGCTCAAAATGGGC
 AACGGCCTCTCTCTGGACGAGGCGCGCAACCTTACCTCCCAAAATG TAACCACTGTGAGCCACCTCTCAAAAAACCAAGTCAAAAC
 ATAACTTGGAAATATCTGACCCCTCAGATTACCTCAGAAGCCC TAAGTGTGGCTGCCGCGCACCTCTAATGTTGCGGGGCAAC
 ACACCTCACCATGCAATCAGGCCCCGCTAACCGTGCACGACTCCA AACTTAGCATGGCCACCAAGGACCCCTCAGAGTGTGAGAA
 GGAAAGCTAGCCCTGCAAAACATCAGGCCCCCTCACCACCACCGATA GCAGTACCCTTACTATCACTGCCTCACCCCTCTAACTACT
 GCCACTGGTAGCTTGGGCATTGACTTGAAGAGGCCATTTATACAC AAAATGGAAACTAGGACTAAAGTACGGGGCTCCTTTGCAT
 GTAACAGACGACCTAAACACTTTGACCGTAGCAACTGGTCCAGGTG TGAATTAATAATACTTCTTGCAAACTAAAGTTACTGGA
 GCCTTGGGTTTGTATTCACAAGGCAATATGCAACTTAATGTAGCAG GAGGACTAAGGATTGATTCTCAAAACAGACGCCCTTACTT
 GATGTTAGTTATCCGTTTGTATGCTCAAAACCACTAAATCTAAGAC TAGGACAGGGCCCTCTTTTATAAATCAGCCCAACTTG
 GATATTAACCTACAACAAAGGCTTTACTTGTTTACAGCTTCAAAACA ATTTCCAAAAGCTTGAAGTTAACTAAGCACTGCCAAGGGG
 TTGATGTTTGCAGCTACAGCCATAGCCATTAATGCAGGAGATGGGC TTGAATTTGGTTACCTAATGCACCAACACAAATCCCTC
 AAAACAAAATTTGGCCATGGCCTAGAAATTTGATTCAACAAGGCTA TGGTTCTTAACTAGGAAGTGGCCTTAGTTTGTACAGCACA
 GGTGCCATTACAGTAGGAAACAAAATATGATAAGCTAATTTGT GGAACACACAGCTCCATCTCTAACTGTAGACTAAATGCA
 GAGAAAGATGCTAAACTCACTTTGGTCTTAACAAAATGTGGCAGTC AAATACTTGCTACAGTTTCAGTTTGGCTGTTAAAGGCAGT
 TTGGCTCCAATATCTGGAACAGTTCAAAGTGTCTATCTTATTATAA GATTGACGAAATGGAGTGTCTACTAAACAATCTCTCTG
 GACCCAGAATATTGGAAGTGTAGAAATGGAGATCTTACTGAAGCA GAGCTTATACAAACGCTGTTGGATTTATGCCTAACCTATCA
 GCTTATCCAAAATCTCAGGTAATACTGCCAAAAGTAACATTTGT CA GTCAAGTTTACTTAAACGGAGACAAAACCTAAGCTGTAACA
 CTAACATTACACTAAACGGTACACAGGAAACAGGAGACACAATC CAAGTGCATACTCTATGTCAATTTTATGGGACTGGTCTGGC
 CACAACATACATTAATGAATATTTGCCACATCCTCTTACACTTTT CATACATTGCCAAGAATAAAGAATCGTTTGTGTTATGTTT
 CAACGTGTTTATTTTCAATTGCAGAAAATTTCAAGTCAATTTTCA CTCACTAGTATAGCCCCACCACCATAGCTTTATACAGATC
 ACCGTACCTTAAATCAACTCAGAACCCCTAGATTCAACCTGCCA CTCTCTCCCAACACACAGAGTACACAGTCTTCTTCCCCG
 GCTGGCCCTTAAAGCATCATATCATGGGTACAGACATATTCTTA GGTGTTATATTCCACACGGTTTCTGTGAGCCAAACGCTC
 ATCAGTGATATTAATAAACTCCCCGGGCAGCTCACTTAAGTTTCA TG TCGCTGTCCAGCTGCTGAGCCACAGGCTGCTGTCCAACTTG
 CGGTTGCTTAACGGGCGCGAAGGAGAAGTCCACGCCTACATGGGG GTAGAGTCATAATCGTGCATCAGGATAGGGCGGTGGTGTG
 CAGCAGCGCGCAATAAAGTGTGCTGCCGCGCGCTCCGTCTGTCAG GAATACAACATGGCAGTGGTCTCTCAGCGATGATTTCGCAC
 CGCCCGCAGCATAAGGCGCCTTGTCTCCGGGCACAGCAGCGCAAC CTGATCTCACTTAAATCAGCAGCACTAAGTGCAGCACAGCAC
 CACAATATTGTTCAAATCCCACAGTGCAAGGCGCTGTATGCCAAG CTGATGCGGGGACCACAGAACCACCTGAGCACTATCATA
 CAAGCGCAGGTAGATTAAAGTGGCGACCCCTCATAAACACGCTGGAC ATAAACATTACCTCTTTTGGCATGTTGTAATTCACCACTC
 CCGGTACCATATAAACCTCTGATTAAACATGGCGCCATCCACCACC ATCCTAAACAGCTGGCCAAAACCTGCCGCGCGGTATACA
 CTGCAGGGAACCGGGACTGGAACAATGACAGTGGAGAGCCAGGAC TCGTAACCATGGATCATCATGCTCGTCATGATATCAATGTT
 GGCACAACACAGGCACAGTGCATACACTTCTCAGGATTACAAGC TCCTCCCGCGTTAGAACCATATCCAGGGAACAACCCATTC
 CTGAATCAGCGTAAATCCCACACTGCAGGGAAGAGCTCGCACGTAA CTCACGTTGTGCATTGTCAAAGTGTGTACATTCCGGCAGCAG
 CGGATGATCTCTCAGTATGGTAGCGGGTTTCTGTCTCAAAAGGA GGTAGACGATCCCTACTGTACGGAGTGCGCCGAGACACCG
 AGATCGTGTGGTGTAGTGTATGCTGCAAAATGGAAACGCGGACGTA GTCATATTTCTGAAGCAAAACAGGTGCGGGCGGTGACAAA
 CAGATCTGCGTCTCCGGTCTCGCGCTTAGATCGCTCTGTGTAGTA GTTGTAGTATATCCACTCTCTCAAAGCATCCAGGCGCCCC
 TGGCTTCCGGGTTCTATGTAACCTCTTATGCGCGCTGCCCTGAT AACATCCACCACCGCAGAATAAGCCACACCCAGCCAACTTA
 CACATTCTGTTCTGCGAGTCAACACGCGGAGAGCGGGAAGAGCTGG AAGAACCATGTTTTTTTTTTTATTCCAAAAGATTATCCAAA
 ACCTCAAAATGAAGATCTATTAAGTGAACGCGCTCCCTCCGGTGG CGTGGTCAAACCTCTACAGCCAAAGAACAGATAATGGCATT
 GTAAGATGTTGCACAATGGCTTCCAAAAGGCCAACCGCCCTCAGT CCAAGTGGACGTAAGGCTAAACCTTTCAGGTTGAATCTCC
 TCTATAAATCTTCCAGCACTTCAACCATGCCAAATAATTCTCAT CTCGCCACCTTCTCAATATATCTCTAAGCAAAATCCGGAATA
 TTAAGTCCGGCCATTGTAAAAATCTGCTCCAGAGCGCCCTCCACCT TCAGCCTCAAGCAGCGAATCATGATTGCAAAAATTCAGGTT
 CCTCACAGACCTGTATAAGATTCAAAGCGGAACATTAACAAAAT ACCCGCATCCCGTAGGTCCTTTCGAGGGCCAGCTGAACAT

AATCGTGCAGGTCTGCACGGACCAGCGCGGCCACTTCCCCGCCAGGAACCATGACAAAAGAACCCACACTGATTATGACACGCATAC
TCGGAGCTATGCTAACCAGCGTAGCCCCGATGTAAGCTTGTTCATGGGCGGCGATATAAAATGCAAGGTGCTGCTCAAAAAATCAG
GCAAAGCCTCGCGCAAAAAGAAAGCACATCGTAGTCATGCTCATGCAGATAAAGGCAGGTAAGCTCCGGAACACAGACAGAAAAAG
ACACCATTTTTCTCTCAAACATGTCTGCGGGTTTCTGCATAAACACAAAATAAAATAACAAAAAACATTTAAACATTAGAAGCCTG
TCTTACAACAGGAAAAACAACCCCTTATAAGCATAAGACGGACTACGGCCATGCCGGCGTGACCGTAAAAAACTGGTCACCGTGATT
AAAAAGCACCACCGACAGCTCCTCGGTTCATGTCCGGAGTCATAATGTAAGACTCGGTAAACACATCAGGTTGATTTCATCGGTCAGTG
CTAAAAAGCGACCGAAATAGCCCGGGGGAATACATAACCGCAGGCGTAGAGACAACATTACAGCCCCCATAGGAGGTATAACAAAAT
TAATAGGAGAGAAAAACACATAAACACCTGAAAAACCCCTCCTGCCTAGGCAAAATAGCACCCCTCCCGCTCCAGAACAACATACAGCG
CTTCCACAGCGGCAGCCATAACAGTCAGCCTTACCAGTAAAAAAGAAAACCTATTAAAAAACACCACTCGACACGGCACCAGCTC
AATCAGTCACAGTGTAATAAAGGGCCAAGTGCAGAGCGAGTATATATAGGACTAAAAAATGACGTAACGGTTAAAGTCCACAAAAA
CAGCCAGAAAACCGCACGCGAACCTACGCCCAGAAACGAAAGCCAAAAAACCCACAACCTTCTCAAATCGTCACTTCCGTTTTCCCA
CGTTACGTCACTTCCCATTTTAAGAAAACCTACAATTCCCAACACATACAAGTTACTCCGCCCTAAACCTACGTACCCGCCCCGTT
CCCACGCCCCGCGCCACGTCAAAACTCCACCCCTCATTATCATATTGGCTTCAATCCAAAATAAGGTATATTATTGATGATG