

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 833**

51 Int. Cl.:

A61K 35/761 (2015.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2016 PCT/US2016/012482**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2016 WO16112188**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2016 E 16735409 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 3256140**

54 Título: **Composiciones para la vacunación contra el virus del Ébola**

30 Prioridad:

09.01.2015 US 201562101968 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.11.2020

73 Titular/es:

**ETUBICS CORPORATION (100.0%)
410 West Harrison Street, Suite 200
Seattle WA 98119, US**

72 Inventor/es:

**JONES, FRANK R. y
GABITZSCH, ELIZABETH**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 795 833 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones para la vacunación contra el virus del Ébola

5 **Referencia cruzada**

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos n.º 62/101.968, presentada el 9 de enero de 2015.

10 **Antecedentes de la invención**

Los virus del Ébola, miembros de la familia Filoviridae, están asociados con brotes de fiebre hemorrágica muy letal en seres humanos y primates no humanos. El virus del Ébola de Bundibugyo, virus del Ébola de Zaire y virus del Ébola de Sudán se han asociado con grandes brotes en África, La gravedad del brote actual del Ébola en África occidental, ha destacado la necesidad médica de una vacuna contra el Ébola duradera y exhaustiva que abarque muchas cepas para poblaciones en riesgo que no tienen acceso habitual a atención médica. Aunque algunas vacunas recombinantes basadas en adenovirus han conferido buena protección contra múltiples cepas del Ébola después de una única inmunización, su eficacia se ve alterada con frecuencia en seres humanos por la inmunidad preexistente al adenovirus como se ha analizado anteriormente.

Son de particular interés los productos inmunoterapéuticos basados en Ad5 que se han usado repetidas veces en seres humanos para inducir respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T (IMC) robustas, manteniendo al mismo tiempo un amplio perfil de seguridad. Además, se pueden fabricar vectores Ad5 de manera fiable en grandes cantidades y son estables para el almacenamiento y el suministro para administración ambulatoria. No obstante, un obstáculo importante para el uso de vectores basados en Ad5 de primera generación (con supresión de E1) es la alta frecuencia de anticuerpos neutralizantes anti-adenovirus de tipo 5 preexistentes. Estos anticuerpos pueden estar presentes en un posible receptor de vacuna debido a una infección previa por adenovirus de tipo silvestre y/o inducción de anticuerpos neutralizantes de adenovirus mediante inyecciones repetidas con vacunas basadas en Ad5, lo que da como resultado estimulación inmunitaria inadecuada contra el AE diana.

Un problema importante con los vectores de adenovirus ha sido su incapacidad para mantener la expresión transgénica a largo plazo debido en gran parte a la respuesta inmunitaria del hospedador que elimina el vector de adenovirus y las células transducidas por virus en sujetos inmunodeficientes. Por tanto, el uso de vacunas de vectores de adenovirus de primera generación está gravemente limitado por la inmunidad preexistente o inducida de las vacunas contra adenovirus (Ad) (Yang, *et al.* J Virol 77/799-803 (2003); Casimiro, *et al.* J Virol 77/6305-6313 (2003)). Un grupo informó de que una preponderancia de seres humanos tiene anticuerpos contra adenovirus de tipo 5 (Ad5), el serotipo más ampliamente usado para vectores de transferencia de genes, y que dos tercios de los seres humanos estudiados tienen respuestas linfoproliferativas contra Ad (Chirmule, *et al.* Gene Ther 6/1574-1583 (1999)). En otro estudio, una vacuna de vector de adenovirus que portaba un gen de la envoltura del VIH-1 fue incapaz de volver a inmunizar una respuesta inmunitaria sensibilizada usando ADN sin adyuvante (Barouch, *et al.* J. Virol 77/8729-8735 (2003)). Otro grupo informó de que los primates no humanos que tienen inmunidad preexistente contra Ad5 debido a una única inmunización con Ad5 no pudieron generar anticuerpos específicos de transgenes para proteínas del VIH, así como alterar las respuestas globales de linfocitos T (McCoy, *et al.* J. Virol 81/6594-6604 (2007)).

Existen numerosos mecanismos por los que la inmunidad preexistente interfiere con vacunas de vectores de adenovirus, pero una de las principales preocupaciones es la presencia de anticuerpo neutralizante seguido de eliminación inmunitaria mediada por células de células que albergan antígenos infectados con Ad. Ambas de estas respuestas pueden dirigirse a varias proteínas Ad. Un enfoque es aumentar la dosis de la vacuna del vector. Aunque existen pruebas de que el aumento de las dosis de la vacuna puede aumentar la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células (IMC) deseadas en animales inmunes a Ad (Barouch, *et al.* J. Virol 77/8729-8735 (2003)), con frecuencia da como resultado efectos adversos inaceptables en animales y seres humanos. Cuando se usan vacunas de vectores de Ad5 de primera generación, una opción puede ser usar el enfoque de un régimen de sensibilización-refuerzo heterólogo, usando ADN desnudo (no vectorizado) como vacunación de sensibilización, seguido de una inmunización con vector de Ad5. Este protocolo puede dar como resultado una respuesta inmunitaria posterior contra Ad5 de modo que no se pueda administrar una nueva inmunización adicional (refuerzo) con la misma vacuna de vector de adenovirus (o una diferente) que utiliza la misma cadena principal vírica. Por lo tanto, con la actual primera generación de vectores de Ad5, el uso de este enfoque también puede anular cualquier uso adicional de inmunización con vector de Ad5 en el vacunado inmunizado con Ad5.

Las vacunas de vectores de adenovirus de primera generación (con supresión de E1) expresan genes tardíos de Ad, aunque a un nivel disminuido y durante un periodo de tiempo más largo que el virus Ad de tipo silvestre (Nevins, *et al.* Cell 26/213-220 (1981); Gaynor, *et al.* Cell 33/683-693 (1983); Yang, *et al.* J Virol 70/7209-7212 (1996)). Cuando se usan vectores de adenovirus de primera generación para la inmunización, se presentan antígenos de vacunas al sistema inmunitario simultáneamente con proteínas de la cápside de Ad muy inmunogénicas. El principal problema con estos vectores de adenovirus es que es menos probable que las respuestas inmunitarias generadas se dirijan a los epítopos de vacuna deseados (McMichael, *et al.* Nat Rev Immunol 2/283-291 (2002)) y es más probable que se

dirijan a los antígenos procedentes de adenovirus, es decir, competencia antigénica. Existe polémica acerca del mecanismo por el que los vectores de adenovirus de primera generación son inmunógenos potentes. Se ha planteado la hipótesis de que la composición de la cápside de Ad o un efecto tóxico de los genes víricos crea inflamación generalizada que da como resultado un efecto inmunoestimulante inespecífico. Las proteínas E1 de Ad actúan para inhibir la inflamación después de la infección (Schaack, *et al.* PNAS 101/3124-3129 (2004)). La eliminación de los segmentos génicos de estas proteínas, que es el caso de los vectores de adenovirus de primera generación, da como resultado mayores niveles de inflamación (Schaack, *et al.* PNAS 101/3124-3129 (2004); Schaack, *et al.* Viral Immunol 18/79-88 (2005)).

Por tanto, resulta evidente que sigue existiendo la necesidad de un candidato a vector de vacuna contra el Ébola más eficaz. Los vectores de vacunas de Ad permiten respuesta inmunitaria a largo plazo, múltiples vacunas y vacunas en individuos con inmunidad preexistente a Ad. La presente invención proporciona esta y otras ventajas.

Sumario de la invención

La presente divulgación se refiere a métodos y vectores de adenovirus para generar respuestas inmunitarias contra antígenos diana, en particular, los relacionados con células con Ébola. Como tal, la presente divulgación proporciona además secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más antígenos diana de interés, o fragmentos o variantes de los mismos. Como tal, la presente divulgación proporciona polinucleótidos que codifican antígenos diana de cualquier fuente como se describe adicionalmente en el presente documento, vectores que comprenden dichos polinucleótidos y células hospedadoras transformadas o transfectadas con dichos vectores de expresión. La invención se define en las reivindicaciones.

Los intentos de superar la inmunidad anti-Ad han incluido el uso de serotipos de Ad alternativos y/o alternancias en la proteína de la cápside vírica de Ad5, cada uno con éxito limitado y el potencial de alterar significativamente la biodistribución de las vacunas resultantes. Por lo tanto, se intentó un enfoque completamente novedoso reduciendo adicionalmente la expresión de proteínas víricas de los vectores Ad5 con supresión de E1, proteínas que se sabe que son dianas de inmunidad a Ad preexistente. Específicamente, se ha descrito una plataforma de Ad5 recombinante novedosa con supresiones en la región de gen temprano 1 (E1) y supresiones adicionales en la región de gen temprano 2b (E2b) (Ad5 [E1-, E2b-]). La supresión de la región E2b (que codifica ADN polimerasa y la proteína pre-terminal) da como resultado disminución de la replicación de ADN vírico y expresión de proteína vírica de fase tardía. Se ha informado previamente de que esta plataforma vectorial induce con éxito respuestas de IMC en modelos animales de cáncer y enfermedades infecciosas y, lo que es más importante, esta plataforma recombinante de administración de gen de Ad5 supera la barrera de la inmunidad a Ad5 y puede usarse en el establecimiento de inmunidad a Ad preexistente y/o inducida por vector, permitiendo de este modo múltiples administraciones homólogas de la vacuna.

La presente divulgación proporciona composiciones, métodos y kits para generar una respuesta inmunitaria contra uno o múltiples antígenos del Ébola en una composición individual A que comprende un vector de adenovirus defectuoso en replicación que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno del virus del Ébola, en donde la secuencia que codifica el antígeno del virus del Ébola tiene de 70 % a 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y combinaciones de las mismas.

En un aspecto, se proporciona una composición que comprende un vector de ácido nucleico recombinante, en donde el vector de ácido nucleico recombinante comprende un vector de adenovirus defectuoso en replicación; y en donde, tras la administración a un ser humano, la composición es capaz de inducir una respuesta inmunitaria dirigida hacia células que expresan un antígeno del virus del Ébola en dicho ser humano, en donde la respuesta inmunitaria comprende inmunidad mediada por células.

En algunas realizaciones, el vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende un vector de adenovirus 5 defectuoso en replicación. En algunas realizaciones, el vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende una supresión en una región del gen E2b. En algunas realizaciones, el antígeno del virus del Ébola comprende una modificación de 25 o menos aminoácidos.

En un aspecto, se proporciona una composición que comprende un vector de adenovirus 5 defectuoso en replicación recombinante que tiene una supresión en una región del gen de E2b que comprende una secuencia que codifica un antígeno del virus del Ébola, en donde el antígeno del virus del Ébola comprende una modificación de 25 o menos aminoácidos. En algunas realizaciones, el antígeno del virus del Ébola comprende una modificación de 20, 15, 10, 5 o menos aminoácidos. En algunas realizaciones, el antígeno del virus del Ébola comprende una modificación en 2, 3 o 4 aminoácidos. En algunas realizaciones, el antígeno del virus del Ébola comprende una modificación en 1 aminoácido. En algunas realizaciones, el vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende una supresión en una región del gen E1. En algunas realizaciones, el vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende una supresión en una región del gen E3. En algunas realizaciones, el vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende una supresión en una región del gen E4. En algunas realizaciones, el virus del Ébola se selecciona del grupo que consiste en EBOV, SUDV, TAFV, BDBV, RESTV y cualquier combinación de los mismos. En algunas

realizaciones, el antígeno del virus del Ébola comprende una secuencia con al menos 80 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, el antígeno del virus del Ébola está codificado por una secuencia con al menos 90 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, el antígeno del virus del Ébola está codificado por una secuencia con al menos 95 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, el antígeno del virus del Ébola está codificado por una secuencia con al menos 97 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, el antígeno del virus del Ébola está codificado por una secuencia con al menos 99 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, el antígeno del virus del Ébola está codificado por una secuencia con 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, el vector de ácido nucleico recombinante es capaz de efectuar sobreexpresión del antígeno del virus del Ébola en células transfectadas. En algunas realizaciones, el vector de ácido nucleico recombinante es capaz de inducir una respuesta inmunitaria específica contra células que expresan el antígeno del virus del Ébola en un ser humano que es al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 25 veces mayor que la basal. En algunas realizaciones, el ser humano tiene un título inverso de anticuerpos neutralizantes de Ad5 mayor de 50, 75, 100, 125, 150, 175 o 200. En algunas realizaciones, el ser humano tiene un título inverso de anticuerpos neutralizantes de Ad5 mayor de 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 o 4767. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se mide como una respuesta de anticuerpos específica del antígeno del virus del Ébola. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se mide como una respuesta neutralizante de anticuerpos específica del antígeno del virus del Ébola. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se mide como inmunidad mediada por células (IMC) específica del antígeno del virus del Ébola. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se mide como secreción de IFN- γ específica del antígeno del virus del Ébola. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se mide como secreción de IL-2 específica del antígeno del virus del Ébola. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria contra el antígeno del virus del Ébola se mide mediante un ensayo de ELISpot. En algunas realizaciones, la IMC específica del antígeno del virus del Ébola es mayor de 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 o 300 células formadoras de manchas (CFM) de IFN- γ por cada 10^6 células mononucleares de sangre periférica (PBMC). En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se mide mediante la lisis de linfocitos T de células presentadoras de antígenos con pulsos de CAP-1, células alogénicas que expresan el antígeno del virus del Ébola de una línea celular infectada con Ébola o de una célula autóloga infectada con Ébola. En algunas realizaciones, la composición comprende además un componente inmunogénico. En algunas realizaciones, el componente inmunogénico comprende una citocina seleccionada del grupo que consiste en IFN- γ , TNF α IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. En algunas realizaciones, el componente inmunogénico se selecciona del grupo que consiste en IL-7, un ácido nucleico que codifica IL-7, una proteína con identidad sustancial con IL-7 y un ácido nucleico que codifica una proteína con identidad sustancial con IL-7.

En un aspecto, se proporciona un vial que comprende una composición que consiste en una solución terapéutica de un volumen en el intervalo de 0,8-1,2 ml, comprendiendo la solución terapéutica $2,5-7,5 \times 10^{11}$ partículas víricas; en donde las partículas víricas comprenden un adenovirus defectuoso en replicación que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno del virus del Ébola.

En algunas realizaciones, el vector de ácido nucleico recombinante es capaz de efectuar sobreexpresión del antígeno del virus del Ébola en células transfectadas. En algunas realizaciones, las células transfectadas son células E.C7. En algunas realizaciones, el vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende un vector de adenovirus 5 defectuoso en replicación. En algunas realizaciones, el adenovirus defectuoso en replicación comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria específica contra células que expresan el antígeno del virus del Ébola en un ser humano. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se mide como una respuesta de anticuerpos específica del antígeno del virus del Ébola. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se mide como una respuesta neutralizante de anticuerpos específica del antígeno del virus del Ébola. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se mide como inmunidad mediada por células (IMC) específica del antígeno del virus del Ébola. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se mide como secreción de IFN- γ específico del antígeno del virus del Ébola. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se mide como secreción de IL-2 específica del antígeno del virus del Ébola. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria contra el antígeno del virus del Ébola se mide mediante un ensayo de ELISpot. En algunas realizaciones, la IMC específica del antígeno del virus del Ébola es mayor de 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 o 300 células formadoras de manchas (CFM) de IFN- γ por cada 10^6 células mononucleares de sangre periférica (PBMC). En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se mide mediante la lisis de linfocitos T de células presentadoras de antígenos con pulsos de CAP-1, células alogénicas que expresan el antígeno del virus del Ébola de una línea celular infectada con Ébola o de una célula autóloga infectada con Ébola. En algunas realizaciones, la solución terapéutica comprende al menos $1,0 \times 10^{11}$, $1,5 \times 10^{11}$, $2,0 \times 10^{11}$, $2,5 \times 10^{11}$, $3,0 \times 10^{11}$, $3,5 \times 10^{11}$, $4,0 \times 10^{11}$, $4,5 \times 10^{11}$, $4,8 \times 10^{11}$, $4,9 \times 10^{11}$ o $4,99 \times 10^{11}$ partículas víricas que comprenden el vector de ácido nucleico recombinante. En algunas realizaciones, la

solución terapéutica comprende como máximo $7,0 \times 10^{11}$, $6,5 \times 10^{11}$, $6,0 \times 10^{11}$, $5,5 \times 10^{11}$, $5,2 \times 10^{11}$, $5,1 \times 10^{11}$, $5,05 \times 10^{11}$ o $5,01 \times 10^{11}$, partículas víricas que comprenden el vector de ácido nucleico recombinante. En algunas realizaciones, la solución terapéutica comprende $1,0-7,0 \times 10^{11}$ partículas víricas que comprenden el vector de ácido nucleico recombinante. En algunas realizaciones, la solución terapéutica comprende $4,5-5,5 \times 10^{11}$ partículas víricas que comprenden el vector de ácido nucleico recombinante. En algunas realizaciones, la solución terapéutica comprende $4,8-5,2 \times 10^{11}$ partículas víricas que comprenden el vector de ácido nucleico recombinante. En algunas realizaciones, la solución terapéutica comprende $4,9-5,1 \times 10^{11}$ partículas víricas que comprenden el vector de ácido nucleico recombinante. En algunas realizaciones, la solución terapéutica comprende $4,95-5,05 \times 10^{11}$ partículas víricas que comprenden el vector de ácido nucleico recombinante. En algunas realizaciones, la solución terapéutica comprende $4,99-5,01 \times 10^{11}$ partículas víricas que comprenden el vector de ácido nucleico recombinante. En algunas realizaciones, el vial comprende además un componente inmunogénico. En algunas realizaciones, el componente inmunogénico comprende una citocina seleccionada del grupo de IFN- γ , TNF α IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. En algunas realizaciones, el componente inmunogénico se selecciona del grupo que consiste en IL-7, un ácido nucleico que codifica IL-7, una proteína con identidad sustancial con IL-7 y un ácido nucleico que codifica una proteína con identidad sustancial con IL-7.

En un aspecto, se proporciona un método para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno del virus del Ébola en un ser humano, comprendiendo el método administrar al ser humano una composición descrita en el presente documento.

En un aspecto, se proporciona un método para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno del virus del Ébola en un ser humano, comprendiendo el método administrar al ser humano la composición de un vial descrito en el presente documento.

En algunas realizaciones, la etapa de administración se repite al menos una vez. En algunas realizaciones, la etapa de administración se repite después de aproximadamente 3 semanas tras una etapa de administración anterior. En algunas realizaciones, la etapa de administración se repite después de aproximadamente 3 meses tras una etapa de administración anterior. En algunas realizaciones, la etapa de administración se repite dos veces.

En un aspecto, se proporciona un método para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno del virus del Ébola en un ser humano que comprende: una primera fase de tratamiento que comprende administrar al ser humano una primera composición que comprende un primer vector de adenovirus defectuoso en replicación que codifica un antígeno del virus del Ébola que induce una respuesta inmunitaria contra células que expresan el antígeno del virus del Ébola en el ser humano; y una segunda fase de tratamiento posterior que comprende administrar al ser humano una segunda composición que comprende un segundo vector de adenovirus defectuoso en replicación que codifica un antígeno del virus del Ébola que induce una respuesta inmunitaria contra células que expresan el antígeno del virus del Ébola en el ser humano.

En un aspecto, se proporciona un método de tratamiento que comprende: seleccionar una primera fase de tratamiento y una segunda fase de tratamiento; durante la primera fase, administrar a un ser humano, un total de n veces, una primera composición que comprende un primer vector de adenovirus defectuoso en replicación que codifica un antígeno del virus del Ébola que induce una respuesta inmunitaria contra células que expresan el antígeno del virus del Ébola en el ser humano; y durante la segunda fase del tratamiento, administrar al ser humano, un total de m veces, una segunda composición que comprende un segundo vector de adenovirus defectuoso en replicación que codifica un antígeno del virus del Ébola que induce una respuesta inmunitaria contra células que expresan el antígeno del virus del Ébola en el ser humano.

En algunas realizaciones, n es mayor de 1. En algunas realizaciones, n es 3. En algunas realizaciones, m es mayor de 1. En algunas realizaciones, m es 3. En algunas realizaciones, la primera fase es de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 semanas. En algunas realizaciones, la segunda fase es de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 meses. En algunas realizaciones, la segunda fase comienza 3-16 semanas después de que termine la primera fase. En algunas realizaciones, en la primera fase, dos administraciones del adenovirus defectuoso en replicación están separadas por al menos 18 días. En algunas realizaciones, en la primera fase, dos administraciones del adenovirus defectuoso en replicación están separadas por aproximadamente 21 días. En algunas realizaciones, en la primera fase, dos administraciones del adenovirus defectuoso en replicación están separadas por un máximo de 24 días. En algunas realizaciones, en la segunda fase, dos administraciones del adenovirus defectuoso en replicación están separadas por al menos 10 semanas. En algunas realizaciones, en la segunda fase, dos administraciones del adenovirus defectuoso en replicación están separadas por aproximadamente 13 semanas. En algunas realizaciones, en la segunda fase, dos administraciones del adenovirus defectuoso en replicación están separadas por un máximo de 16 semanas.

En un aspecto, se proporciona un método de tratamiento que comprende: seleccionar una primera fase y una segunda fase de tratamiento; durante la primera fase, administrar a un ser humano un total de 3 veces, en intervalos de aproximadamente 3 semanas, una primera composición que comprende un primer vector de adenovirus defectuoso en replicación que codifica un antígeno del virus del Ébola que induce una respuesta inmunitaria contra células que expresan el antígeno del virus del Ébola en el ser humano; y durante la segunda fase, administrar a dicho ser humano

un total de 3 veces, en intervalos de aproximadamente 3 meses, una segunda composición que comprende un segundo vector de adenovirus defectuoso en replicación que codifica un antígeno del virus del Ébola que induce una respuesta inmunitaria contra células que expresan un antígeno del virus del Ébola en el ser humano; en donde la segunda fase comienza aproximadamente 3 meses después del final de la primera fase.

5 En algunas realizaciones, el antígeno del virus del Ébola codificado por el primer vector de adenovirus defectuoso en replicación es el mismo que el antígeno del virus del Ébola codificado por el segundo vector de adenovirus defectuoso en replicación. En algunas realizaciones, el antígeno del virus del Ébola codificado por el primer vector de adenovirus defectuoso en replicación es diferente del antígeno del virus del Ébola codificado por el segundo vector de adenovirus defectuoso en replicación. En algunas realizaciones, el primer vector de adenovirus defectuoso en replicación y el segundo vector de adenovirus defectuoso en replicación son iguales. En algunas realizaciones, el primer vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende un vector de adenovirus 5 defectuoso en replicación. En algunas realizaciones, el segundo vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende un vector de adenovirus 5 defectuoso en replicación. En algunas realizaciones, el primer vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende una secuencia con 60 %-100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el segundo vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende una secuencia con 60 %-100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y cualquier combinación de las mismas.

10 En algunas realizaciones, el antígeno del virus del Ébola codificado por el primer o el segundo vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende una modificación de 25 aminoácidos o menos. En algunas realizaciones, el antígeno del virus del Ébola codificado por el primer o el segundo vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende una modificación de 20, 15, 10 o 5 aminoácidos o menos. En algunas realizaciones, el antígeno del virus del Ébola codificado por el primer o el segundo vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende una modificación de 1 aminoácido. En algunas realizaciones, el primer vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende una supresión en una región del gen E2b. En algunas realizaciones, el primer vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende además una supresión en una región del gen E1. En algunas realizaciones, el primer vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende además una supresión en una región del gen E3. En algunas realizaciones, el primer vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende además una supresión en una región del gen E4. En algunas realizaciones, el segundo vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende una supresión en una región del gen E2b. En algunas realizaciones, el segundo vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende además una supresión en una región del gen E1. En algunas realizaciones, el segundo vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende además una supresión en una región del gen E3. En algunas realizaciones, el segundo vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende además una supresión en una región del gen E4. En algunas realizaciones, la primera composición, la segunda composición o ambas, comprende al menos $1,0 \times 10^{11}$, $1,5 \times 10^{11}$, $2,0 \times 10^{11}$, $2,5 \times 10^{11}$, $3,0 \times 10^{11}$, $3,5 \times 10^{11}$, $4,0 \times 10^{11}$, $4,5 \times 10^{11}$, $4,8 \times 10^{11}$, $4,9 \times 10^{11}$, $4,95 \times 10^{11}$ o $4,99 \times 10^{11}$ partículas víricas que comprenden el vector de ácido nucleico recombinante. En algunas realizaciones, la primera composición, la segunda composición o ambas, comprende como máximo $7,0 \times 10^{11}$, $6,5 \times 10^{11}$, $6,0 \times 10^{11}$, $5,5 \times 10^{11}$, $5,2 \times 10^{11}$, $5,1 \times 10^{11}$, $5,05 \times 10^{11}$ o $5,01 \times 10^{11}$ partículas víricas. En algunas realizaciones, la primera composición, la segunda composición o ambas, comprende $1,0$ - $7,0 \times 10^{11}$ partículas víricas. En algunas realizaciones, la primera composición, la segunda composición o ambas, comprende $4,5$ - $5,5 \times 10^{11}$ partículas víricas. En algunas realizaciones, la primera composición, la segunda composición o ambas, comprende $4,8$ - $5,2 \times 10^{11}$ partículas víricas. En algunas realizaciones, la primera composición, la segunda composición o ambas, comprende $4,9$ - $5,1 \times 10^{11}$ partículas víricas. En algunas realizaciones, la primera composición, la segunda composición o ambas, comprende $4,95$ - $5,05 \times 10^{11}$ partículas víricas. En algunas realizaciones, la primera composición, la segunda composición o ambas, comprende $4,99$ - $5,01 \times 10^{11}$ partículas víricas. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria al antígeno del virus del Ébola aumenta al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 25 veces. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se mide como una respuesta de anticuerpos específica del antígeno del virus del Ébola. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se mide como una respuesta neutralizante de anticuerpos específica del antígeno del virus del Ébola. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se mide como inmunidad mediada por células (IMC) específica del antígeno del virus del Ébola. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se mide como secreción de IFN- γ específico del antígeno del virus del Ébola. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se mide como secreción de IL-2 específica del antígeno del virus del Ébola. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria contra el antígeno del virus del Ébola se mide mediante ensayo de ELISpot. En algunas realizaciones, la IMC específica del antígeno del virus del Ébola es mayor de 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 o 300 células formadoras de manchas (CFM) de IFN- γ por cada 10^6 células mononucleares de sangre periférica (PBMC). En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se mide mediante la lisis de linfocitos T de células presentadoras de antígenos con pulsos de CAP-1, células alógenas que expresan el antígeno del virus del Ébola de una línea celular infectada con Ébola o de una célula autóloga infectada con Ébola. En algunas realizaciones, un adenovirus defectuoso en primera o segunda replicación infecta células dendríticas en el ser humano, y en donde las células dendríticas infectadas presentan el antígeno del virus del Ébola, induciendo de este modo la respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, las etapas de administración comprenden administración subcutánea. En algunas realizaciones, el ser humano porta un título inverso de anticuerpos neutralizantes de Ad5 que es mayor de 50, 75, 100, 125, 150, 160, 175, 200, 225, 250, 275 o 300 antes de la etapa de administración. En algunas realizaciones, el ser humano tiene un título inverso de anticuerpos neutralizantes de Ad5 mayor de 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 o 4767. En algunas realizaciones, el ser humano no está siendo tratado simultáneamente con

ninguno de esteroides, corticoesteroides, agentes inmunosupresores e inmunoterapia. En algunas realizaciones, el ser humano no ha sido tratado con ninguno de esteroides, corticoesteroides, agentes inmunosupresores e inmunoterapia antes de la etapa de administración. En algunas realizaciones, el ser humano no tiene una enfermedad autoinmunitaria. En algunas realizaciones, el ser humano no tiene enfermedad inflamatoria intestinal, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, esclerodermia, esclerosis múltiple, hepatitis vírica o VIH. En algunas realizaciones, el ser humano tiene enfermedad tiroidea autoinmunitaria o vitíligo. En algunas realizaciones, el ser humano tiene células que expresan el antígeno del virus del Ébola. En algunas realizaciones, el ser humano no tiene células que expresen el antígeno del virus del Ébola. En algunas realizaciones, el ser humano tiene al menos uno, dos o tres síntomas de una infección por el virus del Ébola. En algunas realizaciones, el ser humano ha recibido una terapia antes de la administración. En algunas realizaciones, antes de la primera fase, el ser humano ha recibido al menos un medicamento seleccionado del grupo que consiste en: rehidratación con líquidos orales o intravenosos, productos de sangre, terapias inmunitarias, fármacos o terapias para síntomas específicos tales como fiebre, astenia, mialgia, cefalea y dolor de garganta, vómitos, diarrea, erupción, función renal y hepática alterada y hemorragia interna y externa. En algunas realizaciones, el ser humano recibe simultáneamente tratamiento de quimioterapia o radioterapia. En algunas realizaciones, el ser humano recibe simultáneamente una terapia que comprende la administración de al menos un medicamento del grupo que consiste en fluoropirimidina, irinotecán, oxaliplatino, bevacizumab, capecitabina, mitomicina, regorafenib, cetuxinab, panitumumab y paracetamol. En algunas realizaciones, el ser humano comprende células que sobreexpresan el antígeno del virus del Ébola. En algunas realizaciones, las células que sobreexpresan el antígeno del virus del Ébola sobreexpresan el antígeno del virus del Ébola al menos 2, 3, 4, 5, 10, 15 o 20 veces por encima de una expresión basal de un antígeno del virus del Ébola en una célula no infectada. En algunas realizaciones, las células que sobreexpresan el antígeno del virus del Ébola comprenden células infectadas con Ébola. En algunas realizaciones, las células que sobreexpresan el antígeno del virus del Ébola comprenden células inmunitarias. En algunas realizaciones, las células que sobreexpresan el antígeno del virus del Ébola comprenden células sanguíneas. En algunas realizaciones, las células que sobreexpresan el antígeno del virus del Ébola comprenden células epiteliales. En algunas realizaciones, el antígeno del virus del Ébola es un antígeno de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV, RESTV o cualquier combinación de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

La **FIG. 1** ilustra un gráfico de barras que muestra los niveles de anticuerpos de ratones inmunizados con Ad5 nulo (vector vacío). Los ratones se inmunizaron tres veces con partículas víricas (PV) Ad5 nulas a intervalos de 14 días. Los niveles de anticuerpos anti-Ad (anticuerpos neutralizantes) aumentaron después de cada inmunización. La **FIG. 2** ilustra un gráfico de barras que muestra los niveles de anticuerpos neutralizantes (NAb) de ratones inmunizados con Ad5 nulo. Los ratones se inmunizaron tres veces con PV Ad5 nulas a intervalos de 14 días. Los niveles de anticuerpos neutralizantes aumentaron después de cada inmunización. Las lecturas de densidad óptica indican la presencia de células diana viables. La **FIG. 3** ilustra una estructura de un genoma del virus del Ébola. La **FIG. 4** ilustra la falta de expresión génica tardía por vectores Ad5 [E1-, E2b-] en células Hela. Las células Hela se infectaron con vector Ad5 [E1-]-LacZ o con un Ad5 [E1-, E2b-]-LacZ. Se recogieron lisados de proteínas y se detectó la proteína de fibra de 66 kD mediante transferencia de Western. Como control positivo, se incluye una parte de un lisado proteico de la infección productiva de un virus Ad cultivado en una línea celular complementaria. La **FIG. 5** ilustra la supervivencia en ratones vacunados y ratones de control a los que se ha inyectado solución salina o Ad5 nulo. La **FIG. 6** ilustra ratones vacunados (arriba) o ratones de control (abajo). Obsérvese la amplia inflamación en ratones de control, pero no en ratones vacunados después de la exposición. La **FIG. 7** ilustra títulos de inhibición de la hemaglutinación (HAI) que se indujeron en monos inmunes a Ad5 después de 1 vacunación con Ad5 [E1-, E2b-]-HA. Obsérvese que se detectó actividad HAI 14 días después de la inmunización y aumentó significativamente por encima de los niveles del día 14 para el día 28 ($P < 0,01$). Media \pm ETM. La **FIG. 8** ilustra cuatro vacunas basadas en Ad5 [E1-, E2b-]-AE que se han generado. La **FIG. 9** ilustra la expresión de GP del Ébola de células E.C7 infectadas durante 24 horas con Ad5 [E1-, E2b-]-GP_{EZ} (carril izquierdo). Obsérvese la presencia de la banda de proteínas GP en el carril izquierdo que migra a aproximadamente 125 kDa pero no en el carril derecho (un lisado de células no infectadas).

55 Descripción detallada de la invención

Los siguientes pasajes describen diferentes aspectos de la invención con mayor detalle. Cada aspecto de la invención puede combinarse con cualquier otro aspecto o aspectos de la invención a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferente o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica de las características indicadas como preferentes o ventajosas. Como se usa en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, el artículo "un/una" significa uno o más, a menos que se indique explícitamente otra cosa. Como se usa en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, expresiones tales como "contener", "que contiene", "incluir", "que incluye", y similares significan "que comprende". Como se usa en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, el término "o" puede ser conjuntivo o disyuntivo. Como se usa en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, cualquier realización puede combinarse con cualquier otra realización.

- Se ha descubierto que los vectores Ad5 [E1-, E2b-] no solo son más seguros que, sino que parecen ser superiores a los vectores Ad5 [E1-] con respecto a la inducción de respuestas inmunitarias específicas de antígeno, haciéndolos mucho más adecuados como plataforma para administrar vacunas contra el Ébola que puedan dar como resultado una respuesta clínica. En otros casos, la inducción inmunitaria puede tardar meses. Los vectores Ad5 [E1-, E2b-] no solo son más seguros que, sino que parecen ser superiores a los vectores Ad5 [E1-] con respecto a la inducción de respuestas inmunitarias específicas de antígeno, haciéndolos mucho más adecuados como plataforma para administrar vacunas contra el Ébola que puedan dar como resultado una respuesta clínica.
- Diversas realizaciones de la invención, aprovechando el nuevo sistema de vector Ad5 [E1-, E2b-] en la administración de una necesidad largamente buscada para desarrollar una vacuna terapéutica contra el Ébola, superan barreras encontradas con otros sistemas Ad5 y permiten la inmunización de personas que han estado expuestas previamente a Ad5. En otras realizaciones de la invención, aprovechando el nuevo sistema de vector Ad5 [E1-, E2b-] en la administración de una necesidad largamente buscada para desarrollar una vacuna terapéutica contra el Ébola, superan barreras encontradas con otros sistemas Ad5 y permiten la inmunización de personas que han estado expuestas previamente a Ad5. En otras realizaciones de la invención, aprovechando el nuevo sistema de vector Ad5 [E1-, E2b-] en la administración de una necesidad largamente buscada para desarrollar una vacuna terapéutica contra el Ébola, superan barreras encontradas con otros sistemas Ad5 y permiten la inmunización de personas que han estado expuestas previamente a Ad5.
- Un "adenovirus" (Ad) se refiere a virus de ADN sin envoltura de la familia Adenoviridae. Estos virus se pueden encontrar en, pero sin limitación, especies humanas, aviáres, bovinas, porcinas y caninas. La presente invención contempla el uso de cualquier Ad de cualquiera de los cuatro géneros de la familia Adenoviridae (p. ej., *Aviadenovirus*, *Mastadenovirus*, *Atadenovirus* y *Siadenovirus*) como la base de un vector de virus con supresión de E2b o un vector que contiene otras supresiones como se describe en el presente documento. Además, se encuentran varios serotipos en cada especie. Ad también se refiere a derivados genéticos de cualquiera de estos serotipos víricos, incluyendo, pero sin limitación, mutaciones genéticas, supresiones o transposiciones.
- Un "adenovirus auxiliar" o "virus auxiliar" se refiere a un Ad que puede proporcionar funciones víricas que una célula hospedadora en particular no puede (el hospedador puede proporcionar productos génicos de Ad tales como proteínas E1). Este virus se usa para suministrar, en *trans*, funciones (p. ej., proteínas) que carecen de un segundo virus o virus dependiente de auxiliar (p. ej., un virus destripado, o un virus con supresión de una región en particular tal como E2b u otra región como se describe en el presente documento); se dice que el primer virus incompetente para replicación "ayuda" al segundo virus dependiente de auxiliar, permitiendo de este modo la producción del segundo genoma vírico en una célula.
- Un "adenovirus 5 nulo (Ad5 nulo)" se refiere a un Ad no replicante que no contiene ninguna secuencia de ácido nucleico heterólogo para expresión.
- Un "adenovirus de primera generación" se refiere a un Ad que tiene la región temprana 1 (E1) suprimida. En casos adicionales, la región temprana 3 (E3) también se puede suprimir.
- "Destripado" se refiere a un vector de Ad del que se han suprimido todas las regiones codificantes víricas.
- "Transfección" se refiere a la introducción de ácido nucleico extraño en células eucariotas. Los medios de transfección ilustrativos incluyen coprecipitación con fosfato de calcio-ADN, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por polibreno, electroporación, microinyección, fusión de liposomas, lipofección, fusión de protoplastos, infección retroviral y biolística.
- "Transfección estable" o "transfectado de manera estable" se refiere a la introducción e integración de ácido nucleico extraño, ADN o ARN, en el genoma de la célula transfectada. La expresión "transfectante estable" se refiere a una célula que ha integrado de manera estable ADN extraño en el ADN genómico.
- Un "gen indicador" indica una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula indicadora (p. ej., una enzima). Una "molécula indicadora" es detectable en cualquiera de diversos sistemas de detección, incluyendo, pero sin limitación, ensayos de detección basados en enzimas (p. ej., ELISA, ensayos histoquímicos), sistemas fluorescentes, radiactivos y luminiscentes. Pueden emplearse el gen de la β -galactosidasa de *E. coli*, proteína verde fluorescente (GFP), el gen de la fosfatasa alcalina placentaria humana, el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT); y otros genes indicadores.
- Una "secuencia heteróloga" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se liga a, o se manipula para que se ligue a, una secuencia de ácido nucleico a la que no está ligada en la naturaleza, o a la que está ligada en un lugar diferente en la naturaleza. El ácido nucleico heterólogo puede incluir una secuencia de nucleótidos de origen natural o alguna modificación en relación con la secuencia de origen natural.
- Un "transgén" se refiere a cualquier región codificante de genes, secuencias de ácido nucleico naturales o heterólogas

o secuencias de ácido nucleico homólogas o heterólogas fusionadas, introducida en células o en un genoma del sujeto. Los transgenes pueden ser portados en cualquier vector vírico usado para introducir transgenes en las células del sujeto.

- 5 Un "adenovirus de segunda generación" se refiere a un Ad que tiene todas o parte de las secuencias génicas de ADN E1, E2, E3 y, en determinadas realizaciones, E4 suprimidas (eliminadas) del virus.

Un "sujeto" se refiere a cualquier animal, incluyendo, pero sin limitación, seres humanos, primates no humanos (p. ej., rhesus u otros tipos de macacos), ratones, cerdos, caballos, burros, vacas, ovejas, ratas y aves.

- 10 Un "fragmento inmunogénico" se refiere a un fragmento de un polipéptido que se reconoce específicamente (es decir, se une específicamente) por un receptor de antígeno de superficie de linfocitos B y/o linfocitos T que da como resultado una generación de una respuesta inmunitaria específicamente contra un fragmento.

- 15 Un "antígeno diana" o "proteína diana" se refiere a una molécula, tal como una proteína, contra la que se debe dirigir una respuesta inmunitaria.

- "Con supresión de E2b" se refiere a una secuencia de ADN mutada de tal manera que se evite la expresión y/o función de al menos un producto génico de E2b. Por tanto, en determinadas realizaciones, "con supresión de E2b" se usa en relación con una secuencia de ADN específica que se suprime (elimina) de un genoma de Ad. Con supresión de E2b o "que contiene una supresión dentro de una región E2b" se refiere a una supresión de al menos un par de bases dentro de una región E2b de un genoma de Ad. Por tanto, en determinadas realizaciones, se suprime más de un par de bases y, en realizaciones adicionales, se suprimen al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 o 150 pares de bases. En otra realización, una supresión es de más de 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250 o 300 pares de bases dentro de una región E2b de un genoma de Ad. Una supresión de E2b puede ser una supresión que evite la expresión y/o función de al menos un producto génico de E2b y, por lo tanto, abarca supresiones dentro de los exones de partes codificantes de proteínas específicas de E2b, así como supresiones dentro de secuencias promotoras y líderes. En determinadas realizaciones, una supresión de E2b es una supresión que evita la expresión y/o función de una o ambas de una ADN polimerasa y una proteína preterminal de una región E2b. En una realización adicional, "con supresión de E2b" se refiere a una o más mutaciones puntuales en una secuencia de ADN de esta región de un genoma de Ad, de modo que una o más proteínas codificadas no son funcionales. Dichas mutaciones incluyen restos que se reemplazan con un resto diferente que conduce a un cambio en una secuencia de aminoácidos que da como resultado una proteína no funcional.

- 35 "Con supresión de E1" se refiere a una secuencia de ADN que se muta de tal manera que se evite la expresión y/o función de al menos un producto génico de E1. Por tanto, en determinadas realizaciones, "con supresión de E1" se usa en relación con una secuencia de ADN específica que se suprime (elimina) del genoma de Ad. Con supresión de E1 o "que contiene una supresión dentro de la región E1" se refiere a una supresión de al menos un par de bases dentro de la región E1 del genoma de Ad. Por tanto, en determinadas realizaciones, se suprime más de un par de bases y, en realizaciones adicionales, se suprimen al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 o 150 pares de bases. En otra realización, la supresión es de más de 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250 o 300 pares de bases dentro de la región E1 del genoma de Ad. Una supresión de E1 puede ser una supresión que evite la expresión y/o función de al menos un producto génico de E1 y, por lo tanto, abarca supresiones dentro de los exones de partes codificantes de proteínas específicas de E1, así como supresiones dentro de secuencias promotoras y líderes. En determinadas realizaciones, una supresión de E1 es una supresión que impide la expresión y/o función de uno o ambos de un factor regulador transcripcional de acción en *trans* de la región E1. En una realización adicional, "con supresión de E1" se refiere a una o más mutaciones puntuales en la secuencia de ADN de esta región de un genoma de Ad, de modo que una o más proteínas codificadas no son funcionales. Dichas mutaciones incluyen restos que se reemplazan con un resto diferente que conduce a un cambio en la secuencia de aminoácidos que da como resultado una proteína no funcional.

- 50 "Generar una respuesta inmunitaria" o "inducir una respuesta inmunitaria" se refiere a un cambio estadísticamente significativo, p. ej., incrementar o disminuir, en el número de una o más células inmunitarias (linfocitos T, linfocitos B, células presentadoras de antígenos, células dendríticas, neutrófilos y similares) o en la actividad de una o más de estas células inmunitarias (actividad CTL, actividad HTL, secreción de citocinas, cambio en el perfil de secreción de citocinas, etc.).

- Las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan en esencia indistintamente en el presente documento. Los polinucleótidos de la invención pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (p. ej., genómico, ADNc o sintético) o ARN. Las moléculas de ARN pueden incluir moléculas de ARNhn, que contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN de manera individual, y moléculas de ARNm, que no contienen intrones. Las secuencias codificantes o no codificantes adicionales pueden estar presentes, aunque no es necesario, dentro de un polinucleótido de la presente invención, y un polinucleótido puede estar ligado, aunque no es necesario, a otras moléculas y/o materiales de soporte. Un polinucleótido aislado, como se usa en el presente documento, significa que un polinucleótido está sustancialmente separado de otras secuencias codificantes. Por ejemplo, una molécula de ADN aislada como se usa en el presente documento no contiene partes grandes de ADN

codificante no relacionado, tales como fragmentos cromosómicos grandes u otros genes funcionales o regiones codificantes de polipéptidos. Esto se refiere a la molécula de ADN como se aisló originalmente y no excluye genes o regiones codificantes añadidas posteriormente al segmento de forma recombinante en el laboratorio.

5 Como entenderán los expertos en la materia, los polinucleótidos de esta divulgación pueden incluir secuencias genómicas, secuencias extragenómicas y codificadas por plásmidos y segmentos génicos menores modificados por ingeniería genética diseñados que expresan o pueden adaptarse para expresar antígenos diana como se describe en el presente documento, fragmentos de antígenos, péptidos y similares. Dichos segmentos pueden estar aislados de manera natural o modificados sintéticamente por la mano del hombre.

10 Al comparar secuencias polinucleotídicas, dos secuencias son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinea para correspondencia máxima, como se describe a continuación. Se realizan comparaciones entre dos secuencias normalmente comparando las secuencias en una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, habitualmente de 30 a aproximadamente 75, de 40 a aproximadamente 50, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alineen de manera óptima. La alineación óptima de secuencias para comparación se puede realizar usando el programa Megalign en el conjunto de software de bioinformática Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.), usando parámetros por defecto. Este programa incorpora varios esquemas de alineación.

25 Como alternativa, se puede realizar alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse mediante el algoritmo de identidad local de Smith y Waterman, *Add. APL. Math* 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de identidad de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), por los métodos de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA) o mediante inspección.

30 Un ejemplo de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0. BLAST y BLAST 2.0 pueden usarse, por ejemplo, con los parámetros descritos en el presente documento, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los polinucleótidos de la invención. El software para realizar análisis de BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica. En un ejemplo ilustrativo, las puntuaciones acumuladas se pueden calcular usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (valor de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre >0) y N (valor de penalización para restos no coincidentes; siempre <0). La prolongación de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: el valor de alineación acumulada queda fuera por una cantidad X de su valor máximo obtenido; el valor acumulado llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos con puntuación negativa; o se alcanza el final de una de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN utiliza como valores predeterminados una longitud de palabra (W) de 11 y expectativa (E) de 10, y las alineaciones de la matriz de puntuación BLOSUM62, (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas.

45 El "porcentaje de identidad de secuencia" se puede determinar comparando dos secuencias alineadas de manera óptima en una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en donde la parte de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) de 20 por ciento o menos, habitualmente del 5 al 15 por ciento o del 10 al 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o supresiones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparecen las bases de ácido nucleico idénticas en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la secuencia de referencia y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

55 Los expertos en la técnica apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un antígeno particular de interés, o fragmento del mismo, como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos tienen homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, la presente invención contempla específicamente polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso codónico. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en el presente documento están dentro del alcance de la presente invención. Los alelos son genes endógenos que se alteran como resultado de una o más mutaciones, tales como supresiones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y la proteína resultantes pueden tener, aunque no es necesario, una estructura o función alterada. Los alelos pueden identificarse usando técnicas convencionales (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias de bases de datos).

65 Como entendería el experto en la materia al leer la presente divulgación, se pueden suprimir otras regiones del genoma de Ad. Por tanto, tener "supresión" en una región particular del genoma de Ad, como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ADN específica que está mutada de tal manera que se evita la expresión y/o función de al menos un producto génico codificado por esa región. En determinadas realizaciones, tener "supresión" en una

región particular se refiere a una secuencia de ADN específica que se suprime (elimina) del genoma de Ad de tal manera que se evite la expresión y/o la función codificada por esa región (p. ej., funciones E2b de ADN polimerasa o función de proteína preterminal). "Con supresión" o "que contiene una supresión" dentro de una región particular se refiere a una supresión de al menos un par de bases dentro de esa región del genoma de Ad. Por tanto, en determinadas realizaciones, se suprime más de un par de bases y, en realizaciones adicionales, se suprimen al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 o 150 pares de bases de una región particular. En otra realización, la supresión es de más de 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250 o 300 pares de bases dentro de una región particular del genoma de Ad. Estas supresiones son tales que se evita la expresión y/o función del producto génico codificado por la región. Por tanto, las supresiones abarcan supresiones dentro de exones que codifican partes de proteínas, así como las supresiones dentro de secuencias promotoras y líderes. En una realización adicional, "con supresión" en una región particular del genoma de Ad se refiere a una o más mutaciones puntuales en la secuencia de ADN de esta región de un genoma de Ad, de modo que una o más proteínas codificadas no son funcionales. Dichas mutaciones incluyen restos que se reemplazan con un resto diferente que conduce a un cambio en la secuencia de aminoácidos que da como resultado una proteína no funcional. Las supresiones o mutaciones en el genoma de Ad pueden estar dentro de una o más de regiones E1a, E1b, E2a, E2b, E3, E4, L1, L2, L3, L4, L5, TP, POL, IV y VA. Los vectores de adenovirus con supresión de la presente invención pueden generarse usando técnicas recombinantes.

Como reconocería el experto en la materia, los vectores de adenovirus para usar en la presente invención se pueden cultivar con éxito hasta títulos altos usando una línea celular de empaquetamiento adecuada que exprese de manera constitutiva productos del gen E2b y productos de cualquiera de los genes necesarios que pueden haberse suprimido. En determinadas realizaciones, se pueden usar células procedentes de HEK-293 que no solo expresan de manera constitutiva las proteínas E1 y ADN polimerasa, sino también la proteína preterminal de Ad. En una realización, se usan células E.C7 para cultivar con éxito reservas de títulos altos de los vectores de adenovirus.

Para suprimir genes críticos de vectores de adenovirus autopropagables, las proteínas codificadas por los genes diana pueden coexpresarse en primer lugar en células HEK-293, o similares, junto con las proteínas E1. Por ejemplo, solo se pueden utilizar selectivamente las proteínas que no son tóxicas cuando se coexpresan de manera constitutiva (o proteínas tóxicas expresadas de manera inducible). Es posible la coexpresión en células HEK-293 de los genes de E1 y E4. Los genes de E1 y proteína IX, una proteína estructural de virión, pueden coexpresarse. También es posible la coexpresión adicional de los genes de E1, E4 y proteína IX. Los genes de E1 y 100 k pueden expresarse con éxito en líneas celulares de complementación en trans, como también pueden los genes de E1 y proteasa.

Se describen líneas celulares que coexpresan productos génicos de E1 y E2b para su uso en el cultivo de títulos altos de partículas de Ad con supresión de E2b. La región E2b codifica proteínas de replicación vírica, que son esenciales para la replicación del genoma de Ad. Las líneas celulares útiles expresan de manera constitutiva la ADN polimerasa de Ad de aproximadamente 140 kDa y/o la proteína preterminal de aproximadamente 90 kDa. En particular, son deseables líneas celulares que tengan coexpresión constitutiva de alto nivel de las proteínas E1, ADN polimerasa y preterminales, sin toxicidad (p. ej., E.C7), para su uso en la propagación de Ad para su uso en múltiples vacunas. Estas líneas celulares permiten la propagación de vectores de adenovirus con supresión de las proteínas E1, ADN polimerasa y preterminales.

Se puede encontrar información adicional sobre sistemas de suministro vírico en Fisher-Hoch *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 317-321, 1989; Flexner *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 569: 86-103, 1989; Flexner *et al.*, Vaccine 8: 17-21, 1990; patentes de los Estados Unidos n.º 4.603.112, 4.769.330 y 5.017.487; documento WO 89/01973; patente de los Estados Unidos n.º 4.777.127; documento GB 2.200.651; documento EP 0.345.242; documento WO 91/02805; Berkner, Biotechniques 6: 616-627, 1988; Rosenfeld *et al.*, Science 252: 431-434, 1991; Kolls *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 215-219, 1994; Kass-Eisler *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11498-11502, 1993; Guzman *et al.*, Circulation 88: 2838-2848, 1993; y Guzman *et al.*, Cir. Res. 73: 1202-1207, 1993.

50 Ácido nucleico heterólogo

Los vectores de adenovirus de la presente invención comprenden normalmente secuencias de ácido nucleico modificadas o heterólogas que codifican uno o más antígenos diana de interés, o variantes, fragmentos o fusiones de los mismos, contra los que se desea generar una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, los vectores de adenovirus de la presente invención comprenden secuencias de ácido nucleico modificadas o heterólogas que codifican una o más proteínas, variantes de las mismas, fusiones de las mismas o fragmentos de las mismas, que pueden modular la respuesta inmunitaria. En una realización adicional de la invención, el vector de adenovirus de la presente invención codifica uno o más anticuerpos contra antígenos específicos, tales como el antígeno protector contra el carbunco, lo que permite inmunoterapia pasiva. En determinadas realizaciones, los vectores de adenovirus de la presente invención comprenden secuencias de ácido nucleico modificadas o heterólogas que codifican una o más proteínas que tienen efecto terapéutico (p. ej., función antivírica, antibacteriana, antiparasitaria o antiébola). Por tanto, la presente invención proporciona los vectores de adenovirus con supresión de E2b de segunda generación que comprenden una secuencia de ácido nucleico heteróloga. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico o modificada heteróloga es un antígeno de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV o RESTV, una variante de los mismos, un fragmento de los mismos o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico o modificada heteróloga es una combinación o fusión de un antígeno de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV o RESTV, una

variante de los mismos, un fragmento de los mismos o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico o modificada heteróloga es una combinación o fusión de un antígeno de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV o RESTV, una variante de los mismos, un fragmento de los mismos o una combinación de los mismos.

- 5 En particular, la presente invención proporciona una vacuna basada en adenovirus (Ad) mejorada de modo que se pueden lograr múltiples vacunas contra una o más entidades diana antigénicas. En algunas realizaciones, la vacuna basada en adenovirus mejorada (Ad) comprende un adenovirus defectuoso en replicación que porta un antígeno diana, un fragmento, una variante o un fragmento de variante del mismo, tal como Ad5 [E1-, E2b-]-SEQ. ID. NO.:1, Ad5 [E1-, E2b-]-SEQ. ID. NO.:2, Ad5 [E1-, E2b-]-SEQ. ID. NO.:4, Ad5 [E1-, E2b-]-SEQ. ID. NO.:5, Ad5 [E1-, E2b-]-SEQ. ID. NO.:6. En algunas realizaciones, la vacuna basada en adenovirus mejorada (Ad) comprende un adenovirus defectuoso en replicación que porta un antígeno diana, un fragmento, una variante o un fragmento de variante del mismo, tal como Ad5 [E1-, E2b-]-GP, Ad5 [E1-, E2b-]-NP, Ad5 [E1-, E2b-]-VP40, Ad5 [E1-, E2b-]-VP35, Ad5 [E1-, E2b-]-VP30 y Ad5 [E1-, E2b-]-VP24. Pueden seleccionarse variantes y/o fragmentos de antígenos diana, por ejemplo, antígenos de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV o RESTV, tales como GP, NP, VP40, VP35, VP30 o VP24, en función de diversos factores, incluyendo potencial inmunogénico. En consecuencia, un mutante de un antígeno de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV o RESTV, tal como un mutante de un antígeno de GP, NP, VP40, VP35, VP30 o VP24 se utiliza en diversas realizaciones de la invención por su mayor capacidad para aumentar una respuesta inmunitaria en relación con la forma de tipo silvestre. Cabe destacar que la vacunación puede realizarse en presencia de inmunidad preexistente al Ad y/o administrarse a sujetos previamente inmunizados múltiples veces con el vector de adenovirus de la presente invención u otros vectores de adenovirus. Los vectores de adenovirus de la invención pueden administrarse a los sujetos múltiples veces para inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno de interés, por ejemplo, un antígeno de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV o RESTV, tal como GP, NP, VP40, VP35, VP30 o VP24, incluyendo, pero sin limitación, la producción de anticuerpos y respuestas inmunitarias mediadas por células contra uno o más antígenos diana de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV o RESTV, tales como GP, NP, VP40, VP35, VP30 o VP24 y/o una o más cepas del virus del Ébola, como se describe en el presente documento y está disponible públicamente en GenBank.

El polipéptido inmunogénico puede ser una secuencia de ARN del Ébola Zaire (GenBank: KJ660347.2) o un fragmento de la misma. En algunas realizaciones, el vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende una secuencia que codifica un nucleótido o polipéptido con al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de identidad con el polipéptido inmunogénico.

En algunas realizaciones, la secuencia que codifica el polipéptido inmunogénico comprende la secuencia de la SEQ. ID. NO.:1. En algunas realizaciones, la secuencia que codifica el nucleótido o polipéptido inmunogénico comprende una secuencia con al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de identidad con la SEQ. ID. NO.:1 o una secuencia generada a partir de la SEQ. ID. NO.:1 mediante reemplazos de codones alternativos optimizados para el genoma humano. En algunas realizaciones, el polipéptido inmunogénico codificado por los vectores de adenovirus descritos en el presente documento comprende hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40 o más mutaciones puntuales, tales como sustituciones o supresiones de aminoácidos individuales, en comparación con una secuencia de GenBank de tipo silvestre (Zaire KJ660347).

En algunas realizaciones, la secuencia que codifica el polipéptido inmunogénico comprende la secuencia de la SEQ. ID. NO.:2. En algunas realizaciones, la secuencia que codifica el nucleótido o polipéptido inmunogénico comprende una secuencia con al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de identidad con la SEQ. ID. NO.:2 o una secuencia generada a partir de la SEQ. ID. NO.:2 mediante reemplazos de codones alternativos optimizados para el genoma humano. En algunas realizaciones, el polipéptido inmunogénico codificado por los vectores de adenovirus descritos en el presente documento comprende hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40 o más mutaciones puntuales, tales como sustituciones o supresiones de aminoácidos individuales, en comparación con una secuencia de GenBank de tipo silvestre (Sudán KC545392.1).

En algunas realizaciones, la secuencia que codifica el polipéptido inmunogénico comprende la secuencia de la SEQ. ID. NO.:4. En algunas realizaciones, la secuencia que codifica el nucleótido o polipéptido inmunogénico comprende una secuencia con al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de identidad con la SEQ. ID. NO.:4 o una secuencia generada a partir de la SEQ. ID. NO.:4 mediante reemplazos de codones alternativos optimizados para el genoma humano. En algunas realizaciones, el polipéptido inmunogénico codificado por los vectores de adenovirus descritos en el presente documento comprende hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40 o más mutaciones puntuales, tales como sustituciones o supresiones de aminoácidos individuales, en comparación con una secuencia del NCBI de tipo silvestre (bosque de Tai NC 014372.1).

En algunas realizaciones, la secuencia que codifica el polipéptido inmunogénico comprende la secuencia de la SEQ. ID. NO.:5. En algunas realizaciones, la secuencia que codifica el nucleótido o polipéptido inmunogénico comprende una secuencia con al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de identidad con la SEQ. ID. NO.:5 o una secuencia generada a partir de la SEQ. ID. NO.:5 mediante reemplazos de codones alternativos optimizados para el genoma humano. En algunas realizaciones, el polipéptido inmunogénico codificado por los vectores de adenovirus descritos en el presente documento comprende hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40 o más mutaciones puntuales, tales como sustituciones o supresiones de aminoácidos individuales, en comparación con una secuencia del NCBI de tipo silvestre del virus del Ébola de

Bundibugyo (NC_014373.1).

En algunas realizaciones, la secuencia que codifica el polipéptido inmunogénico comprende la secuencia de la SEQ. ID. NO.:6. En algunas realizaciones, la secuencia que codifica el nucleótido o polipéptido inmunogénico comprende una secuencia con al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % de identidad con la SEQ. ID. NO.:6 o una secuencia generada a partir de la SEQ. ID. NO.:6 mediante reemplazos de codones alternativos optimizados para el genoma humano. En algunas realizaciones, el polipéptido inmunogénico codificado por los vectores de adenovirus descritos en el presente documento comprende hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40 o más mutaciones puntuales, tales como sustituciones o supresiones de aminoácidos individuales, en comparación con un virus del Ébola de Reston de tipo silvestre (GenBank: JX477166.1).

En diversas realizaciones, los vectores procedentes de adenovirus descritos en el presente documento tienen una supresión en la región E2b y, opcionalmente, en la región E1, confiriendo la supresión diversas ventajas al uso de los vectores en inmunoterapia como se describe en el presente documento.

Determinadas regiones dentro del genoma de adenovirus cumplen funciones esenciales y puede ser necesario que estén sustancialmente conservadas cuando se construyen los vectores de adenovirus defectuosos en replicación de la invención. (Véase, Lauer *et al.*, J. Gen. Virology, 85, 2615-2625 (2004)); Leza *et al.*, J. Virology, págs. 3003-3013 (1988); y Miralles *et al.*, JBC. Vol. 264, n.º 18, págs. 10763-10772 (1983).

Los vectores basados en adenovirus de subtipo 5 (Ad5) con supresión de E1, de primera generación, aunque son plataformas prometedoras para su uso como vacunas, tienen su actividad obstaculizada por anticuerpos neutralizantes específicos de Ad de origen natural o inducidos. Los vectores basados en Ad5 con supresiones de las regiones E1 y E2b (Ad5 [E1-, E2b-]), codificando este último la ADN polimerasa y la proteína preterminal, en virtud de la disminución de la expresión de proteínas víricas de fase tardía, brindan la oportunidad de evitar la eliminación inmunológica e inducen respuestas inmunitarias más potentes contra el transgén de antígeno codificado en hospedadores inmunes a Ad.

Se pueden usar de acuerdo con la presente invención múltiples inmunizaciones homólogas con Ad5 [E1-, E2b-]EA, que codifica un antígeno del Ébola, para inducir respuestas inmunitarias mediadas por células (IMC) específicas de AE con actividad anti-Ébola en ratones a pesar de la presencia de anticuerpos neutralizantes de Ad5 preexistentes o inducidos. Las cohortes de pacientes con Ébola pueden inmunizarse con dosis crecientes de Ad5 [E1-, E2b-]EA. Se pueden observar respuestas de IMC específicas de AE a pesar de la presencia de inmunidad de Ad5 preexistente en muchos o la mayoría de los pacientes. Cabe destacar que la toxicidad mínima, y la supervivencia general del paciente puede ser similar independientemente de los títulos de anticuerpos neutralizantes de Ad5 preexistentes. En sujetos infectados con Ébola, la plataforma novedosa de administración de genes de Ad5 [E1-, E2b-] puede usarse para generar respuestas de IMC significativas a antígenos del Ébola en el contexto de inmunidad específica de Ad5 tanto adquirida de manera natural como inducida por inmunización. Una IMC específica de antígeno del Ébola puede ser, por ejemplo, mayor de 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 5000, 10000 o más células formadoras de manchas (CFM) de IFN- γ por cada 10⁶ células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Por tanto, los métodos y composiciones de la invención se refieren a un vector de ácido nucleico recombinante, en donde el vector de ácido nucleico recombinante comprende un vector de adenovirus defectuoso en replicación y en donde tras la administración a un ser humano, la composición es capaz de inducir una respuesta inmunitaria dirigida hacia células que expresan un antígeno del Ébola en dicho ser humano. La respuesta inmunitaria puede inducirse incluso en presencia de inmunidad preexistente contra Ad5. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se eleva en un sujeto humano con un título inverso de anticuerpo neutralizante de Ad5 preexistente mayor de 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 1000, 12000, 15000 o superior. La respuesta inmunitaria puede comprender una inmunidad mediada por células y/o una inmunidad humoral como se describe en el presente documento. La respuesta inmunitaria se puede medir mediante una o más tinciones de citocinas intracelulares (TCI), ELISpot, ensayos de proliferación, ensayos de linfocitos T citotóxicos incluyendo ensayos de liberación de cromo o equivalentes y análisis de expresión génica usando cualquier número de ensayos basados en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o RT-PCR, como se describe en el presente documento y en la medida en que estén disponibles para una persona experta en la materia, así como cualquier otro ensayo adecuado conocido en la técnica para medir la respuesta inmunitaria.

Aunque la inmunoterapia contra el Ébola lograda mediante la administración de antígenos asociados con el Ébola (AE) proporciona algunos beneficios de supervivencia, existen limitaciones para estas estrategias y se necesitan vacunas inmunológicamente más potentes. Para abordar la baja inmunogenicidad se proporcionan diversas estrategias de vacunación multicomponentes, avanzadas, que incluyen la administración conjunta de adyuvantes y citocinas inmunoestimulantes. La invención se refiere a vectores víricos recombinantes que proporcionan inherentemente señales proinflamatorias innatas, modificados simultáneamente por ingeniería genética para expresar el antígeno de interés. Son de particular interés los productos inmunoterapéuticos basados en adenovirus de serotipo 5 (Ad5) que se han usado repetidas veces en seres humanos para inducir respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T (IMC) robustas, manteniendo al mismo tiempo un amplio perfil de seguridad. Además, se pueden fabricar vectores Ad5 de manera fiable en grandes cantidades y son estables para el almacenamiento y el suministro para administración ambulatoria. No obstante, un obstáculo importante para el uso de vectores basados en Ad5 de primera generación

(con supresión de E1) es la alta frecuencia de anticuerpos neutralizantes anti-adenovirus de tipo 5 preexistentes. Estos anticuerpos pueden estar presentes en un posible vacunado debido a una infección previa por adenovirus de tipo silvestre y/o inducción de anticuerpos neutralizantes de adenovirus mediante inyecciones repetidas con vacunas basadas en Ad5, dando como resultado cada uno estimulación inmunitaria inadecuada contra el AE diana.

5 En el presente documento se proporciona una plataforma de Ad5 [E1-, E2b-] que contiene un inserto génico para un antígeno de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV o RESTV con una modificación que potencia respuestas de linfocitos T y se usa en diversas realizaciones de la invención para terapias que elevan una respuesta inmunitaria contra al menos un antígeno de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV o RESTV. Se pueden usar múltiples inmunizaciones con esta plataforma de
10 Ad5 para inducir respuestas de IMC específicas de antígeno de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV o RESTV con actividad anti-Ébola a pesar de la presencia de inmunidad a Ad5 existente en ratones. En algunas realizaciones, el Ad5 [E1-, E2B-] comprende las SEQ. ID. NO.:1, SEQ. ID. NO.:2, SEQ. ID. NO.:4, SEQ. ID. NO.:5, SEQ. ID. NO.: 6 o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el Ad5 [E1-, E2B-] comprende una secuencia codificante de antígenos de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV o RESTV de GenBank. En algunas realizaciones, el Ad5 [E1-, E2B-]
15 comprende una subespecie de secuencia codificante de antígenos de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV o RESTV de un aislado humano de GenBank o NCBI. Se contempla que un ensayo clínico de fase I/II de inmunoterapias de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV o RESTV, como se proporciona en el presente documento, demostraría seguridad e inmunogenicidad en humanos. Se puede inducir IMC sin un efecto sustancial en el resultado clínico en relación con la existencia de inmunidad a Ad5 preexistente.

EBOV como diana para respuesta inmunitaria

25 El virus del Ébola (EBOV) es un miembro de la familia Filoviridae. Su genoma comprende una molécula de ARN monocatenaria de aproximadamente 19 kb de tamaño. Los viriones del ébola son partículas filamentosas que pueden aparecer en forma de cayado, de una "U" o de un "6", y pueden ser enrollados, toroides o ramificados. En general, los viriones del Ébola tienen 80 nanómetros (nm) de anchura y pueden ser de hasta 14.000 nm de longitud. EBOV se puede subdividir en al menos cinco especies distintas con diferentes niveles de patogenicidad. Los genomas de los cinco virus del Ébola diferentes (BDBV, EBOV, RESTV, SUDV y TAFV) difieren en la secuencia y el número y la ubicación de solapamientos génicos.

30 Los virus del Ébola presentan partículas filamentosas que le dan al virus su nombre característico, tienen envoltura, no están segmentados, tienen ARN monocatenario y morfología variable. El genoma del virus del Ébola contiene siete genes, la nucleoproteína (NP), proteína viriónica (VP) 35, VP40, glucoproteína (GP), VP30, VP24 y una ARN polimerasa dependiente de ARN (L). Excepto por GP, todos los genes son monocistrónicos y codifican una proteína
35 estructural. El complejo de ribonucleoproteína interno del virus contiene el genoma de ARN que está encapsulado por la NP, que se asocia con VP35, VP30 y ARN polimerasa dependiente de ARN al complejo de transcriptasa-replicasa funcional. Las proteínas del complejo de ribonucleoproteína tienen funciones adicionales, tales como VP35, que es un antagonista de interferón. VP40 es una proteína de matriz y media en la formación de partículas víricas. VP24 es otra proteína estructural asociada con la membrana e interfiere con la señalización de interferón. La GP es la única proteína
40 de superficie transmembrana y forma prolongaciones triméricas que consisten en GP-1 y GP-2 que son dos fragmentos de escisión de furina unidos por disulfuro. Una característica importante del virus del Ébola en comparación con otros Mononegavirales es la producción de GP soluble (del gen de GP) secretada por células infectadas.

45 En algunos aspectos, la divulgación proporciona un vector recombinante como se proporciona en el presente documento que comprende al menos un antígeno de virus diana del BDBV. En algunos aspectos, la divulgación proporciona un vector recombinante como se proporciona en el presente documento que comprende al menos un antígeno de virus diana de EBOV. En algunos aspectos, la divulgación proporciona un vector recombinante como se proporciona en el presente documento que comprende al menos un antígeno de virus diana de RESTV. En otro
50 aspecto, la divulgación proporciona un vector recombinante como se proporciona en el presente documento que comprende al menos un antígeno de virus diana de SUDV. En otro aspecto, la divulgación proporciona un vector recombinante como se proporciona en el presente documento que comprende al menos un antígeno de virus diana de TAFV. En otro aspecto, la divulgación proporciona un vector recombinante como se proporciona en el presente documento que comprende los antígenos de virus diana de los virus del Ébola descritos en GenBank y NCBI.

55 En otro aspecto, la divulgación proporciona un vector recombinante como se proporciona en el presente documento que comprende los antígenos de virus diana de una combinación de cepas del Ébola, por ejemplo, BDBV, EBOV, RESTV, SUDV y TAFV, y otros como se describen en GenBank y NCBI.

60 Los viriones del Ébola, como viriones de otros filovirus, puede contener siete proteínas (véase FIG. 3): una glucoproteína de superficie (GP), una nucleoproteína (NP), cuatro proteínas estructurales de virión (VP40, VP35, VP30 y VP24) y una ARN polimerasa dependiente de ARN (L).

65 La glucoproteína del virus del Ébola es atípica porque está codificada en dos marcos abiertos de lectura. Se necesita la edición transcripcional para expresar la forma transmembrana que se incorpora al virión. La forma no editada produce una glucoproteína secretada no estructural (sGP) que se sintetiza en grandes cantidades temprano durante el transcurso de la infección. En algunos casos, la proteína codificada se corta después de la traducción, generando

una forma secretada madura que se sitúa sobre las superficies de partículas víricas, así como una parte más pequeña cubierta de azúcar.

5 En algunos aspectos, la divulgación proporciona un vector recombinante como se proporciona en el presente documento que comprende un antígeno de virus diana de la glucoproteína (GP) de al menos un virión del Ébola. En algunos aspectos, la divulgación proporciona un vector recombinante como se proporciona en el presente documento que comprende un antígeno de virus diana de una nucleoproteína (NP) de al menos un virión del Ébola. En algunos aspectos, la divulgación proporciona un vector recombinante como se proporciona en el presente documento que comprende los antígenos de virus diana de al menos una de las cuatro proteínas estructurales de virión (VP40, VP35, 10 VP30 y VP24), de al menos un virión del Ébola. Por ejemplo, un vector recombinante puede comprender un antígeno de virus diana de VP40 de al menos un virión del Ébola. Por ejemplo, un vector recombinante puede comprender un antígeno de virus diana de VP35 de al menos un virión del Ébola. Por ejemplo, un vector recombinante puede comprender un antígeno de virus diana de VP30 de al menos un virión del Ébola. Por ejemplo, un vector recombinante puede comprender un antígeno de virus diana de VP24 de al menos un virión del Ébola. En algunos aspectos, la divulgación proporciona un vector recombinante como se proporciona en el presente documento que comprende un antígeno de virus diana de la proteína L de al menos un virión del Ébola.

20 Se cree que el ciclo de vida del Ébola comienza con un virión que entra en contacto con una célula hospedadora. La glucoproteína estructural (conocida como GP1.2) es responsable de la capacidad del virus para unirse con e infectar células diana. Se cree que el virión se une a receptores específicos de la superficie celular en la célula hospedadora, tales como, por ejemplo, lectinas de tipo C, DC-SIGN o integrinas, lo que se sigue de la fusión de la envoltura vírica con membranas celulares de la célula hospedadora. Después de que los viriones son captados por la célula hospedadora viajan a endosomas y lisosomas ácidos, donde se escinde la glucoproteína GP de la envoltura vírica.

25 La ARN polimerasa vírica, codificada por el gen L, destapa parcialmente la nucleocápside y transcribe los genes en ARNm de cadena positiva, que después se traducen en proteínas estructurales y no estructurales que comprenden el virión. La proteína más abundante producida es la nucleoproteína, cuya concentración en la célula hospedadora determina cuándo L cambia de transcripción génica a replicación del genoma. La replicación del genoma vírico da como resultado antígenomas de cadena positiva, de longitud completa, que, a su vez, se transcriben en copias del 30 genoma de la descendencia del virus de cadena negativa. Las proteínas estructurales y los genomas de nueva síntesis se autoensamblan y acumulan cerca del interior de la membrana celular. Los viriones brotan de la célula hospedadora, obteniendo sus envolturas de la membrana celular de la que brotan. Las partículas de la descendencia vírica madura infectan después otras células para repetir el ciclo.

35 En algunos aspectos, la divulgación proporciona un vector recombinante como se proporciona en el presente documento que comprende los antígenos de virus diana del gen L de al menos un virión del Ébola. En un aspecto, la divulgación proporciona un vector recombinante como se proporciona en el presente documento que comprende el virus diana que inhibe la producción de la nucleoproteína de al menos un virión del Ébola. En un aspecto, la divulgación proporciona un vector recombinante como se proporciona en el presente documento que comprende los antígenos del 40 virus diana que inhiben la replicación del genoma de al menos un virión del Ébola. En un aspecto, la divulgación proporciona un vector recombinante como se proporciona en el presente documento que comprende los antígenos del virus diana que inhiben el proceso de brote de al menos un virión del Ébola. En un aspecto, la divulgación proporciona un vector recombinante como se proporciona en el presente documento que comprende los antígenos de virus diana el proceso de infección de al menos un virión del Ébola.

45 En diversas realizaciones, Ad5 [E1-, E2B-]-SEQ. ID. NO.:1, Ad5 [E1-, E2B-]-SEQ. ID. NO.:2, Ad5 [E1-, E2B-]-SEQ. ID. NO.:4, Ad5 [E1-, E2B-]-SEQ. ID. NO.:5 y/o Ad5 [E1-, E2B-]-SEQ. ID. NO.:6 aumentan la capacidad de transducir células dendríticas, mejorando las respuestas inmunitarias específicas de antígeno en la vacuna aprovechando la reducción de la respuesta inflamatoria contra proteínas víricas del vector Ad5 [E1-, E2b-] y la evasión resultante de la 50 inmunidad a Ad preexistente.

Por ejemplo, Ad5 [E1-, E2B-]-GP, Ad5 [E1-, E2B-]-NP, Ad5 [E1-, E2B-]-VP40, Ad5 [E1-, E2B-]-VP35, Ad5 [E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24 y/o [E1-, E2b-]-L pueden aumentar la capacidad de transducir células dendríticas, mejorando las respuestas inmunitarias específicas de antígeno en la vacuna aprovechando la reducción de la respuesta 55 inflamatoria contra proteínas víricas del vector Ad5 [E1-, E2b-] y la evasión resultante de la inmunidad a Ad preexistente.

60 En diversas realizaciones, se pueden usar vacunas terapéuticas y preventivas de Ad5 [E1-, E2B-]-SEQ. ID. NO.:1, Ad5 [E1-, E2B-]-SEQ. ID. NO.:2, Ad5 [E1-, E2B-]-SEQ. ID. NO.:4, Ad5 [E1-, E2B-]-SEQ. ID. NO.:5, Ad5 [E1-, E2B-]-SEQ. ID. NO.: 6 para aumentar la supervivencia general (SG) de un ser humano y tienen un perfil de toxicidad dentro de los límites de seguridad técnica. Por ejemplo, se pueden usar vacunas terapéuticas y preventivas de Ad5 [E1-, E2B-]-GP, Ad5 [E1-, E2B-]-NP, Ad5 [E1-, E2B-]-VP40, Ad5 [E1-, E2B-]-VP35, Ad5 [E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24 y/o [E1-, E2b-]-L para aumentar la supervivencia general (SG) de un ser humano y tienen un perfil de toxicidad dentro de los límites de seguridad técnica.

65 Además, en diversas realizaciones, la composición y los métodos de la divulgación conducen a respuestas clínicas,

tales como alteración de la progresión de la enfermedad o la esperanza de vida de seres humanos infectados con Ébola. Además, en diversas realizaciones, la composición y los métodos de la invención conducen a respuestas clínicas, tales como alteración de la progresión de la enfermedad o la esperanza de vida de seres humanos en riesgo bajo, medio y alto de infección con el Ébola.

5 En algunos aspectos, la divulgación proporciona composiciones y métodos que usan vectores basados en adenovirus que expresan al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en: un antígeno de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV y RESTV. Por ejemplo, la divulgación proporciona composiciones y métodos que usan vectores basados en adenovirus que expresan al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en antígenos GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y L.

15 Además, en diversas realizaciones, la composición y los métodos de la divulgación conducen a respuestas clínicas, tales como alteración de la progresión de la enfermedad o la esperanza de vida de seres humanos infectados con Ébola. Además, en diversas realizaciones, la composición y los métodos de la invención conducen a respuestas clínicas, tales como alteración de la progresión de la enfermedad o la esperanza de vida de seres humanos en riesgo bajo, medio y alto de infección con el Ébola.

Vacunas contra el Ébola basadas en Ad5

20 Los adenovirus son una familia de virus de ADN caracterizados por una cápside icosaédrica, sin envoltura, que contiene un genoma bicatenario lineal. De los Ad humanos, ninguno está asociado con ninguna enfermedad neoplásica y solo provocan enfermedad autolimitada, relativamente leve, en individuos inmunocompetentes. Los primeros genes expresados por el virus son los genes E1, que actúan para iniciar la expresión génica de alto nivel de los otros promotores génicos de Ad5 presentes en el genoma de tipo silvestre. La replicación de ADN vírico y el ensamblaje de los viriones descendientes se producen dentro del núcleo de las células infectadas y el ciclo de vida completo dura aproximadamente 36 horas con una producción de aproximadamente 10^4 viriones por célula. El genoma de Ad5 de tipo silvestre es de aproximadamente 36 kb y codifica genes que se dividen en funciones víricas tempranas y tardías, dependiendo de si se expresan antes o después de la replicación de ADN. La delineación temprana/tardía es casi absoluta, ya que se ha demostrado que la superinfección de células previamente infectadas con un Ad5 da como resultado falta de expresión génica tardía del virus superinfectante hasta que ha replicado su propio genoma. Sin estar limitado por la teoría, esto probablemente se deba a una activación en *cis* dependiente de la replicación del promotor tardío principal (MLP) de Ad5, que previene la expresión génica tardía (principalmente las proteínas de la cápside de Ad5) hasta que los genomas replicados estén presentes para ser encapsulados. La composición y los métodos de la invención aprovechan la característica en el desarrollo de vectores/vacunas de Ad de generación avanzada.

Vectores de Ad5

40 Se construyen vectores de adenovirus de primera generación o con supresión de E1 Ad5 [E1-] de manera que un transgén reemplace solo la región E1 de los genes. Normalmente, aproximadamente 90 % del genoma de Ad5 de tipo silvestre se conserva en el vector. Los vectores Ad5 [E1-] tienen una menor capacidad para replicarse y no pueden producir virus infeccioso después de la infección de células que no expresan los genes E1 de Ad5. Los vectores recombinantes Ad5 [E1-] se propagan en células humanas (normalmente células 293) permitiendo la replicación y el empaquetamiento del vector Ad5 [E1-]. Los vectores Ad5 [E1-] tienen varios atributos positivos; uno de los más importantes es su relativa facilidad para aumentar la escala y la producción de GMPc. En la actualidad, más de 220 ensayos clínicos en seres humanos utilizan vectores Ad5 [E1-], habiendo recibido más de dos mil sujetos el virus sc, im o iv. Adicionalmente, los vectores de Ad5 no se integran; sus genomas permanecen episómicos. En general, para vectores que no se integran en el genoma del hospedador, el riesgo de mutagénesis por inserción y/o transmisión a la línea germinal es extremadamente bajo, si existe. Los vectores convencionales Ad5 [E1-] tienen una capacidad de carga que se aproxima a 7 kb.

Vectores Ad5 [E1-] usados como vacuna

55 Los vectores Ad5 [E1-] que codifican diversos antígenos pueden transducir eficazmente 95 % de CD expuestas *ex vivo* a títulos altos del vector. Cabe destacar que se observaron niveles crecientes de expresión de genes extraños en las CD con multiplicidades de infección (MOI) crecientes con el vector. Las CD infectadas con vectores Ad5 [E1-] que codifican diversos antígenos (incluyendo los antígenos tumorales MART-1, MAGE-A4, DF3/MUC1, p53, antígeno de melanoma hgp 100, antígeno T medio del virus del poliovirus) tienen propensión a inducir respuestas de CTL específicas de antígeno, tienen una capacidad mejorada de presentación de antígenos y tienen una capacidad mejorada para iniciar la proliferación de linfocitos T en reacciones mixtas de linfocitos. Se ha demostrado que la inmunización de animales con CD transducidas por vectores Ad5 que codifican antígenos específicos de tumor da como resultado niveles significativos de protección para los animales cuando se exponen a células tumorales que expresan el antígeno respectivo. Resulta interesante que la inyección intratumoral de Ad que codifican IL-7 fue menos eficaz que la inyección de CD transducidas con vectores de Ad5 que codifican IL-7 para inducir inmunidad antitumoral, aumentando adicionalmente el interés en la transducción *ex vivo* de CD por vectores de Ad5. También se han usado estrategias de transducción de CD *ex vivo* para intentar inducir tolerancia en hospedadores receptores, por ejemplo,

mediante la administración mediada por Ad5 de CTLA4Ig en CD, bloqueando interacciones de las CD CD80 con la molécula CD28 presente en linfocitos T.

5 Las interacciones de la cápside del vector Ad5 con CD en sí mismas pueden desencadenar varias respuestas
beneficiosas, que pueden aumentar la propensión de las CD a presentar antígenos codificados por vectores de Ad5.
Por ejemplo, las CD inmaduras, aunque estén especializadas en la captación de antígenos, son efectores
relativamente ineficaces de la activación de linfocitos T. La maduración de CD coincide con la mejora de la capacidad
de las CD para impulsar la inmunidad de linfocitos T. En algunos casos, las composiciones y métodos de la invención
10 aprovechan una infección por Ad5 que da como resultado inducción directa de la maduración de CD. Los estudios de
CD inmaduras procedentes de la médula ósea de ratones sugieren que la infección por vector de Ad de CD inmaduras
procedentes de la médula ósea de ratones resultantes puede regular positivamente marcadores de la superficie celular
normalmente asociados con la maduración de CD (MHC I y II, CD40, CD80, CD86 e ICAM-1), así como regulación
negativa de CD11c, una integrina que se sabe que está regulada negativamente en la maduración de CD mieloides.
En algunos casos, la infección por vector de Ad desencadena la producción de IL-12 por CD, un marcador de
15 maduración de CD. Sin quedar ligados a teoría alguna, estos acontecimientos pueden deberse posiblemente a la
activación desencadenada por Ad5 de rutas de NF- κ B. Las CD maduras se pueden transducir eficazmente mediante
vectores de Ad y no perdieron su potencial funcional para estimular la proliferación de linfocitos T vírgenes con MOI
menor, como lo demuestra la CD humana CD83+ madura (procedente de monocitos de sangre periférica. Sin
embargo, las CD maduras también pueden ser menos infectables que las inmaduras. Se puede usar modificación de
20 las proteínas de la cápside como estrategia para optimizar la infección de CD mediante vectores de Ad, así como
potenciar la maduración funcional, por ejemplo, usando el receptor de CD40L como receptor de vector vírico, en lugar
de usar los mecanismos normales de infección de receptor CAR.

De manera más drástica, cuando el potencial de los vectores no víricos para inducir respuestas inmunitarias contra el
25 VIH se comparó directamente con los sistemas de vectorización basados en Ad5, se descubrió que los sistemas
basados en Ad5 eran muy superiores. Por ejemplo, en modelos de primates no expuestos a Ad5, la vacunación con
un Ad5 [E1-] que expresa la gag del VIH fue superior en la protección de los animales de infecciones por SHIV en
comparación con intentos similares que utilizan vacunas de ADN desnudo que expresan la gag del VIH. Por tanto, los
vectores víricos pueden ser superiores a los enfoques de ADN desnudo. Las estrategias combinadas (basándose en
30 sus experiencias clínicas con vectores desnudos de ADN-gag solos) que usan vacunas desnudas de ADN-gag como
vacuna de sensibilización, seguidas de refuerzo con la vacuna de Ad5 [E1-]gag mejoraron adicionalmente las
respuestas de linfocitos T en ensayos en seres humanos que las observadas previamente con el vector codificante de
ADN-gag de VIH solo.

35 En un ensayo clínico de fase 1 reciente que evaluaba la seguridad e inmunogenicidad, 20 adultos sanos fueron
vacunados una vez por vía intramuscular con una vacuna recombinante basada en Ad de chimpancé (cAd) que
contenía el componente GP de las cepas de Zaire y Sudán del virus del Ébola (cAd-EBO). Se indujeron anticuerpos
específicos de GP en los 20 sujetos. Los títulos de anticuerpos fueron mayores en el grupo (n=10) que recibió 2×10^{11}
partículas víricas (PV) en comparación con el grupo (n=10) que recibió 2×10^{10} PV. Se observó que las respuestas de
40 anticuerpos alcanzadas estaban en el intervalo que se ha indicado que está asociado con la inmunidad protectora
inducida por vacuna en estudios de exposición con primates no humanos (PNH). Las respuestas de linfocitos T
específicos de GP también fueron más frecuentes entre los que recibieron la dosis de 2×10^{11} PV en comparación con
los que recibieron la dosis de 2×10^{10} PV. La vacuna se toleró con seguridad y no se observaron efectos adversos
graves. Cabe destacar que se demostró que también se indujeron anticuerpos anti-Ad de chimpancé en los sujetos y
45 estos anticuerpos evitarán la vacunación adicional (refuerzo) que puede ser necesaria para mantener respuestas
inmunitarias protectoras. Para evitar la exposición de refuerzo, estos investigadores proponen realizar un ensayo
clínico adicional que evalúe la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna de cAd-EBO combinada con una vacuna de
refuerzo compuesta por un virus vaccinia modificado recombinante Ankara (MVA) que contiene GP del virus del Ébola
(MVA-EBO). Incluso si este enfoque tiene éxito, se debe considerar el desarrollo de anticuerpos neutralizantes tanto
50 para cAd como para MVA, ya que eso podría mitigar inmunizaciones posteriores usando estas dos vacunas
recombinantes.

Los vectores Ad5 ofrecen una oportunidad única para permitir la transducción eficaz y de alto nivel de AE tales como
antígenos de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV y RESTV, tales como GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y L. Uno de los
55 principales problemas a los que se enfrentan los vectores basados en Ad5 es la alta propensión a inmunidad
preexistente contra Ad en la población humana y cómo esto puede impedir el uso de Ad5 [E1-] suprimido convencional
(Ad de primera generación) en la mayoría de las poblaciones humanas, para cualquier aplicación de vacuna adicional.

60 Vacuna de Ad5 [E1-, E2B-]-Ébola: El uso de vacunas de Ad5 [E1-, E2b-] para superar el reto de la inmunidad anti-Ad5
preexistente

Los estudios en seres humanos y animales han demostrado que la inmunidad preexistente contra Ad5 puede ser un
factor inhibitor para el uso comercial de vacunas basadas en Ad. La mayoría de seres humanos tienen anticuerpos
65 contra Ad5, el subtipo más ampliamente usado para vacunas humanas, teniendo dos tercios de los seres humanos
estudiados respuestas linfoproliferativas contra Ad5. Esta inmunidad preexistente puede inhibir la inmunización o
reinmunización usando vacunas de Ad5 habituales y puede impedir la inmunización de un vacunado contra un segundo

antígeno, usando un vector de Ad5, en un momento posterior. Superar el problema de la inmunidad anti-vector preexistente ha sido objeto de intensa investigación. Se han examinado investigaciones que usan subtipos de Ad5 humanos alternativos (no basados en Ad5) o incluso formas no humanas de Ad5. Incluso si estos enfoques tienen éxito en una inmunización inicial, las vacunas posteriores pueden ser problemáticas debido a las respuestas inmunitarias al nuevo subtipo de Ad5. Para evitar la barrera de inmunización contra Ad5 y mejorar la eficacia limitada de los vectores Ad5 [E1-] de primera generación para inducir respuestas inmunitarias óptimas, diversas realizaciones de la invención se refieren a una plataforma de vacuna basada en el vector de Ad5 de próxima generación. La nueva plataforma de Ad5 tiene supresiones adicionales en la región E2b, eliminando la ADN polimerasa y los genes de proteínas preterminales. La plataforma Ad5 [E1-, E2b-] tiene capacidad de clonación expandida que es suficiente para permitir la inclusión de muchos genes posibles. Los vectores Ad5 [E1-, E2b-] tienen una capacidad de transporte de genes de hasta aproximadamente 12 kb en comparación con la capacidad de 7 kb de los vectores Ad5 [E1-], proporcionando espacio para múltiples genes, si es necesario. En algunas realizaciones, se introduce un inserto de más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 kb en un vector de Ad5, tal como el vector Ad5 [E1-, E2b-]. La supresión de la región E2b confiere propiedades inmunitarias ventajosas a los vectores de Ad5 de la invención, induciendo con frecuencia respuestas inmunitarias potentes a antígenos transgénicos diana, minimizando al mismo tiempo las respuestas inmunitarias a proteínas víricas de Ad.

En diversas realizaciones, los vectores Ad5 [E1-, E2b-] de la invención inducen una IMC potente, así como anticuerpos contra los antígenos de vacuna expresados por vector incluso en presencia de inmunidad a Ad. Los vectores Ad5 [E1-, E2b-] también tienen reacciones adversas reducidas en comparación con los vectores Ad5 [E1-], en particular la aparición de hepatotoxicidad y daño tisular. Un aspecto clave de estos vectores de Ad5 es que la expresión de genes tardíos de Ad se reduce en gran medida. Por ejemplo, se pudo detectar la producción de proteínas de fibra de la cápside *in vivo* para vectores Ad5 [E1-], mientras que la expresión de fibras se eliminó de vacunas de vectores Ad5 [E1-, E2b-]. La respuesta inmunitaria innata a Ad de tipo silvestre es compleja. Las proteínas suprimidas de los vectores Ad5 [E1-, E2b-] desempeñan en general un papel importante. Específicamente, los vectores Ad5 [E1-, E2b-] con supresiones de proteína preterminal o ADN polimerasa presentan menor inflamación durante las primeras 24 a 72 horas después de la inyección en comparación con los vectores Ad5 [E1-]. En diversas realizaciones, la falta de expresión génica de Ad5 hace que las células infectadas sean invisibles para la actividad anti-Ad y permite que las células infectadas expresen el transgén durante periodos de tiempo prolongados, lo que desarrolla inmunidad a la diana.

Diversas realizaciones de la invención contemplan aumentar la capacidad de los vectores Ad5 [E1-, E2b-] para transducir células dendríticas, mejorando las respuestas inmunitarias específicas de antígeno en la vacuna aprovechando la reducción de la respuesta inflamatoria contra proteínas víricas del vector Ad5 [E1-, E2b-] y la evasión resultante de la inmunidad a Ad preexistente.

En algunos casos, esta inducción inmunitaria puede tardar meses. Los vectores Ad5 [E1-, E2b-] no solo son más seguros que, sino que parecen ser superiores a los vectores Ad5 [E1-] con respecto a la inducción de respuestas inmunitarias específicas de antígeno, haciéndolos mucho más adecuados como plataforma para administrar vacunas contra el Ébola que puedan dar como resultado una respuesta clínica.

Diversas realizaciones de la invención, aprovechando el nuevo sistema de vector Ad5 [E1-, E2b-] en la administración de una necesidad largamente buscada para desarrollar una vacuna terapéutica contra el Ébola, superan barreras encontradas con otros sistemas Ad5 y permiten la inmunización de personas que han estado expuestas previamente a Ad5.

En diversas realizaciones, las composiciones y métodos comprenden un efecto de la vacuna del Ébola de vector Ad5 [E1-, E2b-] de aumento de la supervivencia general (SG) dentro de los límites de la seguridad técnica.

50 Vectores de adenovirus

En comparación con los vectores de adenovirus de primera generación, determinadas realizaciones de los vectores de adenovirus con supresión de E2b de segunda generación de la presente invención contienen supresiones adicionales en el gen de la ADN polimerasa (pol) y supresiones de la proteína pre-terminal (pTP). Los vectores con supresión de E2b tienen una capacidad de transporte de genes de hasta 13 kb en comparación con la capacidad de 5 a 6 kb de los vectores de adenovirus de primera generación, proporcionando fácilmente espacio para secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de diversos antígenos diana. Los vectores de adenovirus con supresión de E2b también tienen menores reacciones adversas en comparación con los vectores de adenovirus de primera generación. Los vectores con supresión de E2b tienen menor expresión de genes víricos y esta característica conduce a extensión de la expresión transgénica *in vivo*.

La respuesta inmunitaria innata al Ad de tipo silvestre puede ser compleja y parece que las proteínas de Ad expresadas a partir de vectores de adenovirus desempeñan un papel importante. Específicamente, las supresiones de proteína pre-terminal y ADN polimerasa en los vectores con supresión de E2b parecen reducir la inflamación durante las primeras 24 a 72 horas después de la inyección, mientras que los vectores de adenovirus de primera generación estimulan la inflamación durante este periodo. Además, se ha informado de que el bloque de replicación adicional

creado por la supresión de E2b también conduce a una reducción de 10.000 veces en la expresión de genes tardíos de Ad, mucho más allá de la que proporcionan las supresiones de E1, E3 solo. La disminución de los niveles de proteínas de Ad producidas por vectores de adenovirus con supresión de E2b reduce eficazmente el potencial respuestas inmunitarias competitivas, no deseables, a antígenos de Ad, respuestas que evitan el uso repetido de la plataforma en individuos inmunizados contra o expuestos a Ad. La reducción de la inducción de la respuesta inflamatoria por vectores con supresión de E2b de segunda generación da como resultado un mayor potencial para que los vectores expresen los antígenos de vacuna deseados durante la infección de células presentadoras de antígenos (es decir, células dendríticas), disminuyendo el potencial de competencia antigénica, lo que da como resultado mayor inmunización de la vacuna al antígeno deseado en relación con intentos idénticos con vectores de adenovirus de primera generación. Los vectores de adenovirus con supresión de E2b proporcionan un candidato a vacuna mejorado basado en Ad que es más seguro, más eficaz y más versátil que los candidatos a vacuna descritos anteriormente que usan vectores de adenovirus de primera generación.

Por tanto, los vectores basados en adenovirus de subtipo 5 (Ad5) con supresión de E1, de primera generación, aunque son plataformas prometedoras para su uso como vacunas, tienen su actividad obstaculizada por anticuerpos neutralizantes específicos de Ad de origen natural o inducidos. Sin quedar ligados a teoría alguna, los vectores basados en Ad5 con supresiones de las regiones E1 y E2b (Ad5 [E1-, E2b-]), codificando este último la ADN polimerasa y la proteína preterminal, por ejemplo, en virtud de la disminución de la expresión de proteínas víricas de fase tardía, pueden evitar la eliminación inmunológica e inducen respuestas inmunitarias más potentes contra el transgén de antígeno codificado en hospedadores inmunes a Ad.

La presente divulgación contempla el uso de vectores de adenovirus con supresión de E2b, tales como los descritos en las patentes de los Estados Unidos n.º 6.063.622; 6.451.596; 6.057.158; 6.083.750; y 8.298.549. Los vectores con supresiones en las regiones E2b, en muchos casos, debilitan la expresión de proteínas víricas y/o disminuyen la frecuencia de generación de Ad competente para replicación (RCA). La propagación de estos vectores de adenovirus con supresión de E2b se puede realizar utilizando líneas celulares que expresan los productos génicos con E2b suprimido. La presente divulgación también proporciona tales líneas celulares de empaquetamiento; por ejemplo E.C7 (formalmente denominada C-7), derivada de la línea celular HEK-293.

Además, los productos génicos de E2b, ADN polimerasa y proteína preterminal, pueden expresarse de manera constitutiva en E.C7 o células similares junto con los productos génicos de E1. La transferencia de segmentos génicos del genoma de Ad a la línea celular de producción tiene beneficios inmediatos: (1) mayor capacidad de carga; y, (2) disminución del potencial de generación de RCA, necesitando normalmente dos o más acontecimientos de recombinación independientes para generar RCA. Las líneas celulares que expresan E1, ADN polimerasa de Ad y/o proteínas preterminales usadas en la presente invención pueden permitir la propagación de vectores de adenovirus con una capacidad de carga cercana a 13 kb, sin la necesidad de un virus auxiliar contaminante. Además, cuando se eliminan genes críticos para el ciclo de vida vírico (p. ej., los genes de E2b), se produce un mayor debilitamiento de Ad para replicar o expresar otras proteínas génicas víricas. Esto puede disminuir el reconocimiento inmunitario de las células infectadas por virus y permitir periodos prolongados de expresión de transgenes extraños.

Los vectores con supresión de E1, ADN polimerasa y proteína preterminal normalmente son incapaces de expresar las proteínas respectivas de las regiones E1 y E2b. Además, pueden mostrar una falta de expresión de la mayoría de las proteínas estructurales víricas. Por ejemplo, el promotor tardío principal (MLP) de Ad es responsable de la transcripción de las proteínas estructurales tardías L1 a L5. Aunque el MLP es mínimamente activo antes de la replicación del genoma de Ad, los genes tardíos de Ad muy tóxicos se transcriben y traducen principalmente a partir del MLP solo después de que se haya producido replicación del genoma vírico. Esta activación dependiente de cis de la transcripción de genes tardíos es una característica de los virus de ADN en general, tal como en el crecimiento de polio y SV-40. La ADN polimerasa y las proteínas preterminales son importantes para la replicación de Ad (a diferencia de las proteínas E4 o proteína IX). Su supresión puede ser extremadamente perjudicial para la expresión de genes tardíos del vector de adenovirus y los efectos tóxicos de esa expresión en células tales como APC.

En determinadas realizaciones, los vectores de adenovirus contemplados para su uso en la presente invención incluyen vectores de adenovirus con supresión de E2b que tienen una supresión en la región E2b del genoma de Ad y, opcionalmente, la región E1. En algunos casos, dichos vectores no tienen ninguna otra región del genoma de Ad suprimida. En otra realización, los vectores de adenovirus contemplados para su uso en la presente invención incluyen vectores de adenovirus con supresión de E2b que tienen una supresión en la región E2b del genoma de Ad y, opcionalmente, supresiones en las regiones E1 y E3. En algunos casos, dichos vectores no tienen ninguna otra región suprimida. En una realización adicional, los vectores de adenovirus contemplados para su uso en la presente invención incluyen vectores de adenovirus que tienen una supresión en la región E2b del genoma de Ad y, opcionalmente, eliminación parcial o completa de las E4. En algunos casos, dichos vectores no tienen ninguna otra supresión. En otra realización, los vectores de adenovirus contemplados para su uso en la presente invención incluyen vectores de adenovirus que tienen una supresión en la región E2b del genoma de Ad y, opcionalmente, supresiones en las regiones E1 y/o E4. En algunos casos, dichos vectores no contienen ninguna otra supresión. En una realización adicional, los vectores de adenovirus contemplados para su uso en la presente invención incluyen vectores de adenovirus que tienen una supresión en las regiones E2a, E2b y/o E4 del genoma de Ad. En algunos casos, dichos vectores no tienen ninguna otra supresión. En una realización, los

vectores de adenovirus para su uso en el presente documento comprenden vectores que tienen las funciones de E1 y/o ADN polimerasa de la región E2b suprimidas. En algunos casos, dichos vectores no tienen ninguna otra supresión. En una realización adicional, los vectores de adenovirus para su uso en el presente documento tienen las funciones de E1 y/o proteína preterminal de la región E2b suprimidas. En algunos casos, dichos vectores no tienen ninguna otra supresión. En otra realización, los vectores de adenovirus para su uso en el presente documento tienen las funciones de E1, ADN polimerasa y/o proteína preterminal suprimidas. En algunos casos, dichos vectores no tienen ninguna otra supresión. En una realización particular, los vectores de adenovirus contemplados para su uso en el presente documento tienen supresión de al menos una parte de la región E2b y/o la región E1. En algunos casos, dichos vectores no son vectores de adenovirus "destripados". En este sentido, los vectores pueden tener supresión de las funciones tanto de ADN polimerasa como de proteína preterminal de la región E2b. En una realización adicional, los vectores de adenovirus contemplados para su uso en la presente invención incluyen vectores de adenovirus que tienen una supresión en las regiones E1, E2b y/o 100K del genoma de adenovirus. En una realización, los vectores de adenovirus para su uso en el presente documento comprenden vectores que tienen las funciones de E1, E2b y/o proteasa suprimidas. En algunos casos, dichos vectores no tienen ninguna otra supresión. En una realización adicional, los vectores de adenovirus para su uso en el presente documento tienen las regiones E1 y/o E2b suprimidas, mientras que los genes de fibras se han modificado mediante mutación u otras alteraciones (p. ej., para alterar el tropismo de Ad). Se puede añadir eliminación de genes de las regiones E3 o E4 a cualquiera de los vectores de adenovirus mencionados. En determinadas realizaciones, el vector de adenovirus puede ser un vector de adenovirus "destripado".

La presente divulgación también proporciona composiciones y métodos para inmunoterapia contra el Ébola usando una plataforma de administración de genes víricos para inmunizar contra genes del Ébola combinada con un modulador de punto de control de la ruta inmunitaria. Por ejemplo, se pueden usar composiciones y métodos para inmunoterapia contra el Ébola que usan una plataforma de administración de genes víricos para inmunizar contra genes del Ébola combinados con un modulador de punto de control de la ruta inmunitaria, tal como un inhibidor de PD1. Estas composiciones y métodos pueden utilizar una vacuna de Ad5 [E1-, E2b-]-Ébola combinada con un modulador de punto de control de la ruta inmunitaria, tal como un inhibidor de un inhibidor de punto de control.

Las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno diana expresado y/o presentado por una célula. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar respuestas inmunitarias contra un antígeno del Ébola, tal como un antígeno del Ébola expresado o presentado por una célula. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV o RESTV, tal como GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24, L o cualquier combinación de los mismos, expresado o presentado por una célula. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno de EBOV expresado y/o presentado por una célula. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno de SUDV expresado y/o presentado por una célula. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno de TAFV expresado y/o presentado por una célula. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno de BDBV expresado y/o presentado por una célula. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno de RESTV expresado y/o presentado por una célula. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra GP expresada y/o presentada por una célula. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra NP expresada y/o presentada por una célula. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra VP40 expresada y/o presentada por una célula. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra VP35 expresada y/o presentada por una célula. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra VP30 expresada y/o presentada por una célula. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra VP24 expresada y/o presentada por una célula. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra L expresada y/o presentada por una célula.

Las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra múltiples antígenos diana expresados y/o presentados por una célula. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra dos o más antígenos de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV o RESTV, tales como dos o más de antígenos GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y L. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno de EBOV y un antígeno de SUDV. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno de TAFV y un antígeno de BDBV. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno de RESTV y un antígeno de EBOV. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra GP y NP. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra GP y VP40. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra GP y VP35. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra GP y VP30. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra GP y VP24. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra GP y L.

Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra NP y VP40. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra NP y VP35. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra NP y VP30. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra NP y VP24. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra NP y L. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra VP40 y VP35. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra VP40 y VP30. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra VP40 y VP24. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra VP40 y L. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra VP35 y VP30. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra VP35 y VP24. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra VP35 y L. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra VP30 y VP24. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra VP30 y L. Por ejemplo, las composiciones y los métodos se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra VP24 y L.

Un forma modificada de un antígeno de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV o RESTV, tal como GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 o L se puede usar en una vacuna dirigida a aumentar una respuesta inmunitaria contra un antígeno de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV o RESTV, tal como GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 o L; o células que expresan y/o presentan un antígeno de EBOV, SUDV, TAFV, BDBV o RESTV, tal como GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 o L. Normalmente, las variantes polinucleotídicas contendrán una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inserciones, preferentemente de modo que la inmunogenicidad del epítipo del polipéptido codificado por el polinucleótido variante o de modo que la inmunogenicidad de la proteína diana heteróloga no disminuya sustancialmente en relación con un polipéptido codificado por la secuencia polinucleotídica nativa. En algunos casos, dichas una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inserciones pueden dar como resultado un aumento de la inmunogenicidad del epítipo del polipéptido codificado por el polinucleótido variante. Como se describe en otra parte en el presente documento, las variantes polinucleotídicas pueden codificar una variante del antígeno diana o un fragmento (p. ej., un epítipo) del mismo en donde la propensión del polipéptido o fragmento variante (p. ej., epítipo) del mismo para reaccionar con anticuerpos específicos de antígeno y/o líneas o clones de linfocitos T no disminuye sustancialmente en relación con el polipéptido nativo. Las variantes polinucleotídicas pueden codificar una variante del antígeno diana o un fragmento del mismo en donde la propensión del polipéptido variante o fragmento del mismo a reaccionar con anticuerpos específicos de antígeno y/o líneas o clones de linfocitos T aumenta sustancialmente en relación con el polipéptido nativo.

En particular, la presente invención proporciona una vacuna basada en Ad mejorada de modo que se pueden lograr múltiples vacunas contra una o más entidades diana antigénicas. En algunas realizaciones, la vacuna basada en Ad mejorada comprende un adenovirus defectuoso en replicación que porta un antígeno diana, un fragmento, una variante o un fragmento de variante del mismo, tal como Ad5 [E1-, E2b-]-EBOV. Pueden seleccionarse variantes o fragmentos de antígenos diana, tales como GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 o L, en función de diversos factores, incluyendo potencial inmunogénico. Puede utilizarse un GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 o L mutante por su mayor capacidad para elevar una respuesta inmunitaria en relación con el GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 o L de tipo silvestre, respectivamente. Cabe destacar que la vacunación puede realizarse en presencia de inmunidad preexistente al Ad o administrarse a sujetos previamente inmunizados múltiples veces con el vector de Ad de la presente invención u otros vectores de Ad. Los vectores de Ad pueden administrarse a los sujetos múltiples veces para inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno de interés, tal como GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 o L, incluyendo, pero sin limitación, la producción de anticuerpos y respuestas de IMC contra uno o más antígenos diana. En realizaciones particulares, las variantes o fragmentos de antígenos diana se modifican de modo que tengan una o más actividades biológicas reducidas. Por ejemplo, un antígeno diana de proteína del Ébola puede modificarse para reducir o eliminar la actividad vírica de la proteína o una proteína vírica puede modificarse para reducir o eliminar una o más actividades o la proteína vírica. Un ejemplo de una proteína del Ébola modificada es una GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 o L, que tiene una mutación puntual que da como resultado una proteína variante, tal como una proteína variante con mayor inmunogenicidad.

Para expresar un polipéptido de antígeno diana deseado o fragmento o variante del mismo, o proteína de fusión que comprende cualquiera de los anteriores, como se describe en el presente documento, las secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido, o equivalentes funcionales, se insertan en un Ad adecuado como se describe en otra parte en el presente documento usando técnicas recombinantes conocidas en este campo.

COMPOSICIONES

Vectores víricos para inmunoterapias y vacunas contra el Ébola

Los vectores víricos recombinantes pueden usarse para expresar genes o antígenos que codifican proteínas (p. ej., AE). Las ventajas de las vacunas y la inmunoterapia basadas en vectores víricos recombinantes incluyen transducción génica de alta eficacia, administración muy específica de genes a las células diana, inducción de respuestas inmunitarias robustas y aumento de la inmunidad celular. La presente divulgación proporciona vectores de adenovirus

recombinantes que comprenden supresiones o inserciones de regiones cruciales del genoma vírico. Los vectores víricos proporcionados por la presente divulgación pueden comprender secuencias de ácido nucleico heterólogo que codifican uno o más antígenos diana de interés, o variantes, fragmentos o fusiones de los mismos, contra los que se desea generar una respuesta inmunitaria.

5 Los vectores víricos adecuados que pueden usarse con los métodos y composiciones de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, retrovirus, lentivirus, provirus, virus vaccinia, adenovirus, virus adenoasociados, virus adenoasociados autocomplementarios, citomegalovirus o virus de Sendai. En algunas realizaciones, el vector vírico puede ser competente en replicación. En algunas realizaciones, el vector vírico puede ser defectuoso en replicación.
10 Para vectores víricos defectuosos en replicación, el genoma de los virus puede tener las regiones codificantes necesarias para ciclos adicionales de replicación y empaquetamiento reemplazadas por otros genes o suprimidas. Estos virus son capaces de infectar sus células diana y suministrar su carga vírica, pero después no consiguen continuar la ruta lítica normal que conduce a lisis celular y muerte. Dependiendo del vector vírico, la longitud máxima normal de un inserto de ADN o ADNc permisible en un vector vírico defectuoso en replicación puede ser de
15 aproximadamente 8-10 kilobases (kb).

Se han usado retrovirus para expresar antígenos, tales como un virus de ARN monocatenario con envoltura que contiene transcriptasa inversa. Los vectores de retrovirus pueden ser defectuosos en replicación. Los vectores de retrovirus pueden ser de origen murino o aviar. Los vectores de retrovirus pueden ser del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV). Se pueden usar vectores de retrovirus que requieren integración del genoma para expresión
20 génica. Se pueden usar vectores de retrovirus para proporcionar expresión génica a largo plazo. Por ejemplo, los vectores de retrovirus pueden tener un tamaño de genoma de aproximadamente 7-11 kb y el vector puede albergar insertos de ADN extraño de 7-8 kb de longitud. Se pueden usar vectores de retrovirus para presentar baja inmunogenicidad y la mayoría de los pacientes no muestran inmunidad preexistente a vectores retrovíricos. Se pueden
25 usar vectores de retrovirus para infectar células en división. Se pueden usar vectores de retrovirus para no infectar células que no se dividen.

Se han usado vectores de lentivirus para expresar antígenos. Los lentivirus constituyen una subclase de retrovirus. Se pueden usar vectores de lentivirus para infectar células que no se dividen. Se pueden usar vectores de lentivirus para
30 infectar células en división. Se pueden usar vectores de lentivirus para infectar tanto células que no se dividen como en división. Los lentivirus presentan en general tropismo más amplio que los retrovirus. Varias proteínas tales como tat y rev regulan la replicación de los lentivirus. Estas proteínas reguladoras normalmente están ausentes en los retrovirus. El VIH es un lentivirus ilustrativo que se puede introducir por ingeniería genética en un vector de administración transgénica. Las ventajas de los vectores de lentivirus son similares a las de los vectores retrovíricos.
35 Aunque los lentivirus pueden desencadenar potencialmente tumorigénesis, el riesgo es menor que el de los vectores retrovíricos, ya que los sitios de integración de los lentivirus están lejos de los sitios que albergan promotores celulares. Se pueden generar vectores basados en el VIH, por ejemplo, suprimiendo la envoltura vírica del VIH y algunos de los genes reguladores no necesarios durante la producción del vector. En lugar de la envoltura precursora, se generan varios vectores de envoltura quiméricos o modificados porque determina la especificidad celular y tisular.

40 Se han usado vectores de citomegalovirus (CMV) para expresar antígenos. El CMV es un miembro de los herpesvirus. Se pueden usar CMV específicos de especie (p. ej., CMV humano (HCMV), p. ej., herpesvirus humano de tipo 5. El HCMV contiene un genoma de ADN lineal bicatenario de 235 kb rodeado por una cápside. La envoltura contiene glucoproteínas gB y gH, que se unen con receptores celulares.

45 Se han usado vectores del virus de Sendai (SeV) para expresar antígenos. SeV es un virus de ARN monocatenario con envoltura de la familia Paramyxovirus. El genoma de SeV codifica seis proteínas y dos glucoproteínas de la envoltura, proteínas HN y F, que median en la entrada celular y determinan su tropismo. Se pueden usar vectores de SeV que carecen de proteína F como virus defectuoso en replicación para mejorar la seguridad del vector. Puede usarse vector de SeV producido en una célula de empaquetamiento para expresar la proteína F. Un genoma con supresión del gen F e inserción de transgén puede transfectarse en una célula de empaquetamiento. SeV contiene
50 ARN polimerasa dependiente de ARN y el genoma vírico se localiza en el citoplasma. Esto asegura que se produzca expresión génica rápida poco después de la infección y la ventaja genotóxica de SeV. Se pueden usar vectores de SeV para presentar transferencia de genes muy eficaz. Se pueden usar vectores de SeV para transducir células tanto en división como que no se dividen. Se pueden usar vectores de SeV para transducir células que no se dividen. Se pueden usar vectores de SeV para transducir células en división. Se pueden usar vectores de SeV, por ejemplo, para transducir eficazmente células epiteliales de las vías respiratorias humanas. Los vectores de SeV pueden administrarse, por ejemplo, por una vía mucosa (p. ej., oral y nasal). La administración intranasal puede usarse para reducir potencialmente la influencia de una inmunidad preexistente a SeV, en comparación con la administración intramuscular. En comparación con otros vectores víricos, su capacidad transgénica (3,4 kb) es baja. SeV es muy homólogo del virus paragripal humano de tipo 1 (hPIV-1); por tanto, una inmunidad preexistente contra hPIV-1 puede actuar en contra del uso de SeV.

Vectores de adenovirus

65 En general, los adenovirus son atractivos para la clínica porque pueden tener un tropismo amplio, pueden infectar

diversos tipos de células en división y que no se dividen y pueden usarse de manera sistémica y también a través de superficies mucosas más selectivas en un cuerpo de mamífero. Además, su termoestabilidad relativa facilita adicionalmente su uso clínico. Los adenovirus son una familia de virus de ADN caracterizados por una cápside icosaédrica, sin envoltura, que contiene un genoma bicatenario lineal. En general, los adenovirus se encuentran como virus sin envoltura que comprenden genoma de ADN bicatenario con un tamaño aproximado de 30-35 kilobases. De los Ad humanos, ninguno está asociado con ninguna enfermedad neoplásica y solo provocan enfermedad autolimitada, relativamente leve, en individuos inmunocompetentes. Los primeros genes expresados por el virus son los genes E1, que actúan para iniciar la expresión génica de alto nivel de los otros promotores génicos de Ad5 presentes en el genoma de tipo silvestre. La replicación de ADN vírico y el ensamblaje de los viriones descendientes se producen dentro del núcleo de las células infectadas y el ciclo de vida completo dura aproximadamente 36 horas con una producción de aproximadamente 10^4 viriones por célula. El genoma de Ad5 de tipo silvestre es de aproximadamente 36 kb y codifica genes que se dividen en funciones víricas tempranas y tardías, dependiendo de si se expresan antes o después de la replicación de ADN. La delineación temprana/tardía es casi absoluta, ya que se ha demostrado que la superinfección de células previamente infectadas con un Ad5 da como resultado falta de expresión génica tardía del virus superinfectante hasta que ha replicado su propio genoma. Sin estar limitado por la teoría, esto probablemente se deba a una activación *in cis* dependiente de la replicación del promotor tardío principal (MLP) de Ad5, que previene la expresión génica tardía (principalmente las proteínas de la cápside de Ad5) hasta que los genomas replicados estén presentes para ser encapsulados. La composición y los métodos de la invención aprovechan la característica en el desarrollo de vectores/vacunas de Ad de generación avanzada. El genoma lineal del adenovirus está flanqueado en general por dos orígenes para replicación de ADN (ITR) y tiene ocho unidades para transcripción mediada por ARN polimerasa II. El genoma porta cinco unidades tempranas E1A, E1B, E2, E3, E4 y E5, dos unidades que se expresan con retardo después del inicio de la replicación vírica (IX y IVa2), y una unidad tardía (L) que se subdivide en L1-L5. Algunos adenovirus pueden codificar además una o dos especies de ARN denominado ARN asociado a virus (VA).

Se proporcionan adenovirus que inducen respuestas inmunitarias innatas y adaptativas en pacientes humanos. Por supresión o inserción de regiones cruciales del genoma vírico, se proporcionan vectores recombinantes que se han modificado por ingeniería genética para aumentar su previsibilidad y reducir los efectos secundarios no deseados. En algunos aspectos, la invención proporciona un vector de adenovirus que comprende la supresión o inserción del genoma seleccionado del grupo que consiste en: E1A, E1B, E2, E3, E4, E5, IX, IVa2, L1, L2, L3, L4 y L5, y cualquier combinación de los mismos.

La presente divulgación proporciona vectores de adenovirus recombinantes que comprenden una cápside alterada. En general, la cápside de un adenovirus comprende principalmente 20 facetas triangulares de un icosaedro, cada icosaedro contiene 12 copias de trímeros de hexones. Además, también hay otras varias proteínas de la cápside menores adicionales, IIIa, VI, VIII y IX.

La presente divulgación proporciona vectores de adenovirus recombinantes que comprenden una o más proteínas de fibra alteradas. En general, las proteínas de fibra, que también forman trímeros, se insertan en los 12 vértices en las bases pentaméricas de pentones. La fibra puede comprender una cola N-terminal delgada, un eje y un dominio de botón. El eje puede comprender un número variable de repeticiones de cadena β . El botón puede comprender uno o más bucles A, B, C, D, E, F, G, H, I, J. Los bucles de los botones de fibra pueden unirse con receptores celulares. La presente divulgación proporciona vectores de adenovirus para usar en sistemas de vacunas para el tratamiento del Ébola.

Los adenovirus adecuados que se pueden usar con los presentes métodos y composiciones de la divulgación incluyen, pero sin limitación, adenovirus específicos de especie, incluyendo los subgrupos humanos A, B1, B2, C, D, E y F o sus regiones genómicas cruciales según lo proporcionado en el presente documento, pudiendo dichos subgrupos clasificarse adicionalmente en serotipos inmunológicamente distintos. Además, los adenovirus adecuados que pueden usarse con los presentes métodos y composiciones de la divulgación incluyen, pero sin limitación, adenovirus específico de especie o sus regiones genómicas cruciales identificadas a partir de primates, bovinos, aves, reptiles o ranas.

Algunos serotipos de adenovirus se dirigen preferentemente a órganos definidos. Serotipos tales como AdHu1, AdHu2 y AdHu5 (subgénero C), generalmente efectúan la infección respiratoria superior, mientras que los subgéneros A y F afectan a órganos gastrointestinales. La presente divulgación proporciona vectores de adenovirus recombinantes para usar preferentemente en la dirección a órganos definidos para el tratamiento del Ébola. En algunas aplicaciones, el vector de adenovirus recombinante se altera para reducir el tropismo a un órgano específico en un mamífero. En algunas aplicaciones, el vector de adenovirus recombinante se altera para aumentar el tropismo a un órgano específico en un mamífero.

El tropismo de un adenovirus se puede determinar mediante su capacidad para unirse con receptores de células hospedadoras. En algunos casos, el proceso de unión a células hospedadoras puede implicar la unión inicial del dominio de botón distante de la fibra con una molécula de la superficie de la célula hospedadora seguida de la unión del motivo de RGD dentro de la base de pentones con integrinas αV . La presente divulgación proporciona vectores de adenovirus recombinantes con tropismo alterado de modo que puedan modificarse por ingeniería genética para

infectar tipos celulares específicos de un hospedador. La presente divulgación proporciona vectores de adenovirus recombinantes con tropismo alterado para el tratamiento de infecciones por Ébola específicas de células. La presente divulgación proporciona vectores de adenovirus recombinantes con botón de fibra alterada de uno o más adenovirus de subgrupos A, B, C, D o F, o una combinación de los mismos o la inserción de secuencias de RGD. En algunas aplicaciones, los vectores de adenovirus recombinantes que comprenden un botón de fibra alterado dan como resultado un vector con tropismo reducido para uno o más tipos celulares particulares. En algunas aplicaciones, los vectores de adenovirus recombinantes que comprenden un botón de fibra alterado dan como resultado un vector con tropismo mejorado para uno o más tipos celulares particulares. En algunas aplicaciones, los vectores de adenovirus recombinantes que comprenden un botón de fibra alterado dan como resultado un vector con respuestas de linfocitos B o T específicas de producto reducidas. En algunas aplicaciones, los vectores de adenovirus recombinantes que comprenden un botón de fibra alterado dan como resultado un vector con respuestas de linfocitos B o T específicas de producto mejoradas.

La presente divulgación proporciona vectores de adenovirus recombinantes que están recubiertos con otras moléculas para evitar los efectos de los anticuerpos neutralizantes de virus o mejorar la transducción en una célula hospedadora. La presente divulgación proporciona vectores de adenovirus recombinantes que están recubiertos con una molécula adaptadora que ayuda en la unión del vector con un receptor de células hospedadoras. A modo de ejemplo, un vector de adenovirus puede recubrirse con una molécula adaptadora que conecta el receptor de Ad de coxsackie (CAR) con CD40L, lo que da como resultado mayor transducción de células dendríticas, mejorando de este modo las respuestas inmunitarias en un sujeto. La presente divulgación también incluye otros vectores de adenovirus diseñados de manera similar para mejorar la unión con otros tipos celulares diana.

Vectores de Ad5

Los estudios en seres humanos y animales han demostrado que la inmunidad preexistente contra Ad5 puede ser un factor inhibitorio para el uso comercial de vacunas basadas en Ad. La mayoría de seres humanos tienen anticuerpos contra Ad5, el subtipo más ampliamente usado para vacunas humanas, teniendo dos tercios de los seres humanos estudiados respuestas linfoproliferativas contra Ad5. Esta inmunidad preexistente puede inhibir la inmunización o reinmunización usando vacunas de Ad5 habituales y puede impedir la inmunización de una vacuna contra un segundo antígeno, usando un vector de Ad5, en un momento posterior. Superar el problema de la inmunidad anti-vector preexistente ha sido objeto de intensa investigación. Se han examinado investigaciones que usan subtipos de Ad5 humanos alternativos (no basados en Ad5) o incluso formas no humanas de Ad5. Incluso si estos enfoques tienen éxito en una inmunización inicial, las vacunas posteriores pueden ser problemáticas debido a las respuestas inmunitarias al nuevo subtipo de Ad5. Para evitar la barrera de inmunización contra Ad5 y mejorar la eficacia limitada de los vectores Ad5 [E1-] de primera generación para inducir respuestas inmunitarias óptimas, diversas realizaciones de la invención se refieren a una plataforma de vacuna basada en el vector de Ad5 de próxima generación.

Se construyen vectores de adenovirus de primera generación o con supresión de E1 Ad5 [E1-] de manera que un transgén reemplace solo la región E1 de los genes. Normalmente, aproximadamente 90 % del genoma de Ad5 de tipo silvestre se conserva en el vector. Los vectores Ad5 [E1-] tienen una menor capacidad para replicarse y no pueden producir virus infeccioso después de la infección de células que no expresan los genes E1 de Ad5. Los vectores recombinantes Ad5 [E1-] se propagan en células humanas (p. ej., células 293) permitiendo la replicación y el empaquetamiento del vector Ad5 [E1-]. Los vectores Ad5 [E1-] tienen varios atributos positivos; uno de los más importantes es su relativa facilidad para aumentar la escala y la producción de GMPc. En la actualidad, más de 220 ensayos clínicos en seres humanos utilizan vectores Ad5 [E1-], habiendo recibido más de dos mil sujetos el virus sc, im o iv. Adicionalmente, los vectores de Ad5 no se integran; sus genomas permanecen episómicos. En general, para vectores que no se integran en el genoma del hospedador, el riesgo de mutagénesis por inserción y/o transmisión a la línea germinal es extremadamente bajo, si existe. Los vectores convencionales Ad5 [E1-] tienen una capacidad de carga que se aproxima a 7 kb.

Los vectores basados en Ad5 con supresiones de las regiones E1 y E2b (Ad5 [E1-, E2b-]), codificando este último la ADN polimerasa y la proteína preterminal, en virtud de la disminución de la expresión de proteínas víricas de fase tardía, brindan la oportunidad de evitar la eliminación inmunológica e inducen respuestas inmunitarias más potentes contra el transgén de antígeno del Ébola codificado en hospedadores inmunes a Ad. La nueva plataforma de Ad5 tiene supresiones adicionales en la región E2b, eliminando la ADN polimerasa y los genes de proteínas preterminales. La plataforma Ad5 [E1-, E2b-] tiene capacidad de clonación expandida que es suficiente para permitir la inclusión de muchos genes posibles. Los vectores Ad5 [E1-, E2b-] tienen una capacidad de transporte de genes de hasta aproximadamente 12 kb en comparación con la capacidad de 7 kb de los vectores Ad5 [E1-], proporcionando espacio para múltiples genes, si es necesario. En algunas realizaciones, se introduce un inserto de más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 kb en un vector de Ad5, tal como el vector Ad5 [E1-, E2b-]. La supresión de la región E2b confiere propiedades inmunitarias ventajosas a los vectores de Ad5 de la invención, induciendo con frecuencia respuestas inmunitarias potentes a antígenos transgénicos diana, minimizando al mismo tiempo las respuestas inmunitarias a proteínas víricas de Ad.

En diversas realizaciones, los vectores Ad5 [E1-, E2b-] de la invención inducen una IMC potente, así como anticuerpos contra los antígenos de vacuna expresados por vector incluso en presencia de inmunidad a Ad. Los vectores Ad5 [E1-

, E2b-] también tienen reacciones adversas reducidas en comparación con los vectores Ad5 [E1-], en particular la aparición de hepatotoxicidad y daño tisular. Un aspecto clave de estos vectores de Ad5 es que la expresión de genes tardíos de Ad se reduce en gran medida. Por ejemplo, se pudo detectar la producción de proteínas de fibra de la cápside *in vivo* para vectores Ad5 [E1-], mientras que la expresión de fibras se eliminó de vacunas de vectores Ad5 [E1-, E2b-]. La respuesta inmunitaria innata a Ad de tipo silvestre es compleja. Las proteínas suprimidas de los vectores Ad5 [E1-, E2b-] desempeñan en general un papel importante. Específicamente, los vectores Ad5 [E1-, E2b-] con supresiones de proteína preterminal o ADN polimerasa presentan menor inflamación durante las primeras 24 a 72 horas después de la inyección en comparación con los vectores Ad5 [E1-]. En diversas realizaciones, la falta de expresión génica de Ad5 hace que las células infectadas sean invisibles para la actividad anti-Ad y permite que las células infectadas expresen el transgén durante periodos de tiempo prolongados, lo que desarrolla inmunidad a la diana.

Diversas realizaciones de la invención contemplan aumentar la capacidad de los vectores Ad5 [E1-, E2b-] para transducir células dendríticas, mejorando las respuestas inmunitarias específicas de antígeno en la vacuna aprovechando la reducción de la respuesta inflamatoria contra proteínas víricas del vector Ad5 [E1-, E2b-] y la evasión resultante de la inmunidad a Ad preexistente.

Vector de Ad5 defectuoso en replicación

Los intentos de superar la inmunidad anti-Ad han incluido el uso de serotipos de Ad alternativos y/o alternancias en la proteína de la cápside vírica de Ad5, cada uno con éxito limitado y el potencial de alterar significativamente la biodistribución de las vacunas resultantes. Por lo tanto, se intentó un enfoque completamente novedoso reduciendo adicionalmente la expresión de proteínas víricas de los vectores Ad5 con supresión de E1, proteínas que se sabe que son dianas de inmunidad a Ad preexistente. Específicamente, se ha descrito una plataforma de Ad5 recombinante novedosa con supresiones en la región de gen temprano 1 (E1) y supresiones adicionales en la región de gen temprano 2b (E2b) (Ad5 [E1-, E2b-]). La supresión de la región E2b (que codifica ADN polimerasa y la proteína preterminal) da como resultado disminución de la replicación de ADN vírico y expresión de proteína vírica de fase tardía. Esta plataforma vectorial se puede usar para inducir respuestas de IMC en modelos animales de infección por el Ébola y, lo que es más importante, esta plataforma recombinante de administración de gen de Ad5 supera la barrera de la inmunidad a Ad5 y puede usarse en el establecimiento de inmunidad a Ad preexistente y/o inducida por vector, permitiendo de este modo múltiples administraciones homólogas de la vacuna. En realizaciones particulares, la presente invención se refiere a un vector de adenovirus defectuoso en replicación del serotipo 5 que comprende una secuencia que codifica un polipéptido inmunogénico. El polipéptido inmunogénico puede ser un mutante, variante natural o un fragmento de la misma.

En algunas realizaciones, el vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende una secuencia modificada que codifica un polipéptido con al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % de identidad con un polipéptido inmunogénico de tipo silvestre o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, el vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende una secuencia modificada que codifica una subunidad de un polipéptido de tipo silvestre. Las composiciones y los métodos de la invención, en algunas realizaciones, se refieren a un vector procedente de adenovirus que comprende al menos 60 % de identidad de secuencia con las SEQ. ID. NO.: 1, 2, 4, 5 o 6.

En algunas realizaciones, un vector procedente de adenovirus, opcionalmente relacionado con un adenovirus defectuoso en replicación, comprende una secuencia con al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 %, 99,9 % de identidad con las SEQ. ID. NO.: 1, 2, 4, 5 o 6 o una secuencia generada a partir de la SEQ. ID. NO.:3 por reemplazos de codones alternativos. En diversas realizaciones, los vectores procedentes de adenovirus descritos en el presente documento tienen una supresión en la región E2b y, opcionalmente, en la región E1, confiriendo la supresión diversas ventajas al uso de los vectores en inmunoterapia como se describe en el presente documento.

Determinadas regiones dentro del genoma de adenovirus cumplen funciones esenciales y puede ser necesario que estén sustancialmente conservadas cuando se construyen los vectores de adenovirus defectuosos en replicación de la invención. Estas regiones se describen adicionalmente en Lauer *et al.*, J. Gen. Virol., 85, 2615-25 (2004), Leza *et al.*, J. Virol., pág. 3003-13 (1988) y Miralles *et al.*, J. Bio Chem., vol. 264, n.º 18, pág. 10763-72 (1983). Los vectores de ácido nucleico recombinante que comprenden una secuencia con valores de identidad de al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 %, 99,9 % con una parte de las SEQ. ID. NO.: 1, 2, 4, 5 o 6, tal como una parte que comprende al menos aproximadamente 100, 250, 500, 1000 o más bases de las SEQ. ID. NO.: 1, 2, 4, 5 o 6 están dentro de los límites de la invención.

La presente invención contempla el uso de vectores de adenovirus con supresión de E2b, tales como los descritos en las patentes de los Estados Unidos n.º 6.063.622; 6.451.596; 6.057.158; 6.083.750; y 8.298.549. Los vectores con supresiones en las regiones E2b, en muchos casos, debilitan la expresión de proteínas víricas y/o disminuyen la frecuencia de generación de Ad competente para replicación (RCA). La propagación de estos vectores de adenovirus con supresión de E2b se puede realizar utilizando líneas celulares que expresan los productos génicos con E2b suprimido. Dichas líneas celulares de empaquetamiento se proporcionan en el presente documento; p. ej., E.C7

(formalmente denominada C-7), derivada de la línea celular HEK-293.

Además, los productos génicos de E2b, ADN polimerasa y proteína preterminal, pueden expresarse de manera constitutiva en E.C7 o células similares junto con los productos génicos de E1. La transferencia de segmentos génicos del genoma de Ad a la línea celular de producción tiene beneficios inmediatos: (1) mayor capacidad de carga; y, (2) disminución del potencial de generación de RCA, necesitando normalmente dos o más acontecimientos de recombinación independientes para generar RCA. Las líneas celulares que expresan E1, ADN polimerasa de Ad y/o proteínas preterminales usadas en la presente invención pueden permitir la propagación de vectores de adenovirus con una capacidad de carga cercana a 13 kb, sin la necesidad de un virus auxiliar contaminante. Además, cuando se eliminan genes críticos para el ciclo de vida vírico (p. ej., los genes de E2b), se produce un mayor debilitamiento de Ad para replicar o expresar otras proteínas génicas víricas. Esto puede disminuir el reconocimiento inmunitario de las células infectadas y extender las duraciones de expresión de transgenes extraños.

Los vectores con supresión de E1, ADN polimerasa y proteína preterminal normalmente son incapaces de expresar las proteínas respectivas de las regiones E1 y E2b. Además, pueden mostrar una falta de expresión de la mayoría de las proteínas estructurales víricas. Por ejemplo, el promotor tardío principal (MLP) de Ad es responsable de la transcripción de las proteínas estructurales tardías L1 a L5. Aunque el MLP es mínimamente activo antes de la replicación del genoma de Ad, los genes tardíos de Ad muy tóxicos se transcriben y traducen principalmente a partir del MLP solo después de que se haya producido replicación del genoma vírico. Esta activación dependiente de cis de la transcripción de genes tardíos es una característica de los virus de ADN en general, tal como en el crecimiento de polioma y SV-40. La ADN polimerasa y las proteínas preterminales son importantes para la replicación de Ad (a diferencia de las proteínas E4 o proteína IX). Su supresión puede ser extremadamente perjudicial para la expresión de genes tardíos del vector de adenovirus y los efectos tóxicos de esa expresión en células tales como APC.

Los vectores de adenovirus pueden incluir una supresión en la región E2b del genoma de Ad y, opcionalmente, la región E1. En algunos casos, dichos vectores no tienen ninguna otra región del genoma de Ad suprimida. Los vectores de adenovirus pueden incluir una supresión en la región E2b del genoma de Ad y supresiones en las regiones E1 y E3. En algunos casos, dichos vectores no tienen ninguna otra región suprimida. Los vectores de adenovirus pueden incluir una supresión en la región E2b del genoma de Ad y supresiones en las E1, E3 y eliminación parcial o completa de las regiones E4. En algunos casos, dichos vectores no tienen ninguna otra supresión. Los vectores de adenovirus pueden incluir una supresión en la región E2b del genoma de Ad y supresiones en las regiones E1 y/o E4. En algunos casos, dichos vectores no contienen ninguna otra supresión. Los vectores de adenovirus pueden incluir una supresión en las regiones E2a, E2b y/o E4 del genoma de Ad. En algunos casos, dichos vectores no tienen ninguna otra supresión. Los vectores de adenovirus pueden tener las funciones de E1 y/o ADN polimerasa de la región E2b suprimidas. En algunos casos, dichos vectores no tienen ninguna otra supresión. Los vectores de adenovirus pueden tener las funciones de E1 y/o la proteína preterminal de la región E2b suprimidas. En algunos casos, dichos vectores no tienen ninguna otra supresión. Los vectores de adenovirus pueden tener las funciones de E1, ADN polimerasa y/o la proteína preterminal suprimidas. En algunos casos, dichos vectores no tienen ninguna otra supresión. Los vectores de adenovirus pueden tener al menos una parte de la región E2b y/o la región E1. En algunos casos, dichos vectores no son vectores de adenovirus destripados. En este sentido, los vectores pueden tener supresión de las funciones tanto de ADN polimerasa como de proteína preterminal de la región E2b. Los vectores de adenovirus pueden tener una supresión en las regiones E1, E2b y/o 100K del genoma de adenovirus. Los vectores de adenovirus pueden comprender vectores que tienen las funciones de E1, E2b y/o proteasa suprimidas. En algunos casos, dichos vectores no tienen ninguna otra supresión. Los vectores de adenovirus pueden tener las regiones E1 y/o E2b suprimidas, mientras que los genes de fibras se han modificado mediante mutación u otras alteraciones (por ejemplo, para alterar el tropismo de Ad). Se puede añadir eliminación de genes de las regiones E3 o E4 a cualquiera de los vectores de adenovirus mencionados. En determinadas realizaciones, el vector de adenovirus puede ser un vector de adenovirus destripado.

Se pueden suprimir otras regiones del genoma de Ad. Una "supresión" en una región particular del genoma de Ad se refiere a una secuencia de ADN específica que está mutada o eliminada de tal manera que se evite la expresión y/o función de al menos un producto génico codificado por esa región (p. ej., funciones de E2b de la ADN polimerasa o función de la proteína preterminal). Las supresiones abarcan supresiones dentro de exones que codifican partes de proteínas, así como supresiones dentro de secuencias promotoras y líderes. Una supresión dentro de una región particular se refiere a una supresión de al menos un par de bases dentro de esa región del genoma de Ad. Se pueden suprimir más de un par de bases. Por ejemplo, al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 o 150 pares de bases se pueden suprimir de una región particular. La supresión puede ser de más de 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250 o 300 pares de bases dentro de una región particular del genoma de Ad. Estas supresiones pueden evitar la expresión y/o función del producto génico codificado por la región. Por ejemplo, una región particular del genoma de Ad puede incluir una o más mutaciones puntuales de manera que una o más proteínas codificadas no sean funcionales. Dichas mutaciones incluyen restos que se reemplazan con un resto diferente que conduce a un cambio en la secuencia de aminoácidos que da como resultado una proteína no funcional. Las supresiones o mutaciones ilustrativas en el genoma de Ad incluyen una o más de las regiones E1a, E1b, E2a, E2b, E3, E4, L1, L2, L3, L4, L5, TP, POL, IV y VA. Se pueden preparar vectores de adenovirus con supresiones, por ejemplo, usando técnicas recombinantes.

Los vectores de adenovirus para usar en la presente invención se pueden cultivar con éxito hasta títulos altos usando una línea celular de empaquetamiento adecuada que exprese de manera constitutiva productos génicos de E2b y productos de cualquiera de los genes necesarios que pueden haberse suprimido. Se pueden usar células procedentes de HEK-293 que no solo expresan de manera constitutiva las proteínas E1 y ADN polimerasa, sino también la proteína preterminal de Ad. Se pueden usar células E.C7, por ejemplo, para cultivar reservas de títulos altos de los vectores de adenovirus.

Para suprimir genes críticos de vectores de adenovirus autopropagables, las proteínas codificadas por los genes diana pueden coexpresarse en primer lugar en células HEK-293, o similares, junto con proteínas E1. Por ejemplo, se pueden utilizar selectivamente las proteínas que no son tóxicas cuando se coexpresan de manera constitutiva (o proteínas tóxicas expresadas de manera inducible). La coexpresión en células HEK-293 de los genes de E1 y E4 es posible (por ejemplo, utilizando promotores inducibles, no constitutivos). Los genes de E1 y proteína IX, una proteína estructural de virión, pueden coexpresarse. También es posible la coexpresión adicional de los genes de E1, E4 y proteína IX. Los genes de E1 y 100K pueden expresarse en líneas celulares transcomplementarias, como también pueden los genes de E1 y proteasa.

Se pueden usar líneas celulares que coexpresan productos génicos de E1 y E2b para su uso en el cultivo de títulos altos de partículas de Ad con supresión de E2b. Las líneas celulares útiles expresan de manera constitutiva la ADN polimerasa de Ad de aproximadamente 140 kDa y/o la proteína preterminal de aproximadamente 90 kDa. Son deseables líneas celulares que tengan coexpresión constitutiva de alto nivel de las proteínas E1, ADN polimerasa y preterminales, sin toxicidad (p. ej., E.C7), para su uso en la propagación de Ad para su uso en múltiples vacunas. Estas líneas celulares permiten la propagación de vectores de adenovirus con supresión de las proteínas E1, ADN polimerasa y preterminales.

El Ad recombinante de la presente invención se puede propagar usando, por ejemplo, placas de cultivo tisular que contienen células E.C7 infectadas con reservas de virus de vector Ad a una MOI adecuada (p. ej., 5) e incubar a 37 °C durante 40-96 h. Las células infectadas se pueden recoger, resuspender en Tris-Cl 10 mM (pH 8,0) y sonicar, y el virus se puede purificar mediante dos ciclos de centrifugación con densidad de cloruro de cesio. La banda que contiene el virus se puede desalar sobre una columna, se pueden añadir sacarosa o glicerol y se pueden almacenar alícuotas a -80 °C. El virus se puede colocar en una solución diseñada para mejorar su estabilidad, tal como A195. El título de la reserva se puede medir (p. ej., mediante medición de la densidad óptica a 260 nm de una alícuota del virus después de la lisis). Se puede transfectar ADN plasmídico, ya sea lineal o circular, que abarca el vector de adenovirus con supresión de E2b recombinante completo en E.C7, o células similares, e incubarse a 37 °C hasta que estén presentes pruebas de producción vírica (p. ej., efecto citopático). Se pueden usar medios acondicionados de células para infectar más células para expandir la cantidad de virus producido antes de la purificación. La purificación se puede lograr, por ejemplo, mediante dos ciclos de centrifugación con densidad de cloruro de cesio o filtración selectiva. El virus se puede purificar mediante cromatografía usando productos disponibles en el mercado o columnas cromatográficas personalizadas.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender suficiente virus para garantizar que las células para infectar se enfrenten a un número determinado de virus. Por tanto, en diversas realizaciones, la presente invención proporciona una reserva de Ad recombinante, tal como una reserva de Ad recombinante sin RCA. Las reservas víricas pueden variar considerablemente en su título, dependiendo en gran medida del genotipo vírico y el protocolo y las líneas celulares usadas para prepararlas. Las reservas víricas pueden tener un título de al menos aproximadamente 10^6 , 10^7 o 10^8 ufp/ml o superior, tal como al menos aproximadamente 10^9 , 10^{10} , 10^{11} o 10^{12} ufp/ml. Dependiendo de la naturaleza del virus recombinante y la línea celular de empaquetamiento, una reserva vírica de la presente invención puede tener un título de incluso aproximadamente 10^{13} partículas/ml o superior.

Polinucleótidos y variantes que codifican dianas de antígeno

La presente divulgación proporciona además secuencias de ácido nucleico, también denominados en el presente documento polinucleótidos que codifican uno o más antígenos diana de interés, o fragmentos o variantes de los mismos. Como tal, la presente invención proporciona polinucleótidos que codifican antígenos diana de cualquier fuente como se describe adicionalmente en el presente documento, vectores que comprenden dichos polinucleótidos y células hospedadoras transformadas o transfectadas con dichos vectores de expresión. Para expresar un polipéptido de antígeno diana deseado, se puede insertar las secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido, o equivalentes funcionales, en un vector de Ad adecuado (p. ej., usando técnicas recombinantes). El vector de adenovirus adecuado puede contener los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada y cualquier conector deseado. Se pueden usar métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia para construir estos vectores de adenovirus que contienen secuencias que codifican un polipéptido de interés y elementos de control de la transcripción y la traducción adecuados. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un polipéptido/proteína/epítipo del antígeno diana de la invención o una parte del mismo) o pueden comprender una secuencia que codifica una variante, fragmento o derivado de dicha secuencia. Las secuencias polinucleotídicas

pueden codificar proteínas de antígeno diana. En algunas realizaciones, los polinucleótidos representan una secuencia génica novedosa optimizada para su expresión en tipos celulares específicos que pueden variar sustancialmente con respecto a la secuencia o variante de nucleótidos nativa pero codifican un antígeno proteico similar.

5 En otras realizaciones relacionadas, las variantes de polinucleótidos tienen identidad sustancial con secuencias nativas que codifican proteínas (p. ej., antígenos diana de interés), por ejemplo, los que comprenden al menos 70 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %, o más, identidad de secuencia en comparación con una secuencia polinucleotídica nativa que codifica los polipéptidos (p. ej., análisis BLAST usando parámetros predeterminados). Estos valores se pueden ajustar adecuadamente para
10 determinar la identidad correspondiente de proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degradación codónica, la similitud de aminoácidos, el posicionamiento del marco de lectura y similares. Los polinucleótidos pueden codificar una proteína que comprende, por ejemplo, al menos 70 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %, o más, identidad de secuencia en comparación con una secuencia proteica codificada por una secuencia polinucleotídica nativa.

15 Los polinucleótidos pueden comprender al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 11, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 o más nucleótidos contiguos que codifican un polipéptido (p. ej., antígenos proteicos diana), y todas las longitudes intermedias entre ellas. "Longitudes intermedias", en este contexto, se refiere a cualquier longitud entre los valores citados, tales como 16, 17, 18, 19, etc.;
20 21, 22, 23, etc.; 30, 31, 32, etc.; 50, 51, 52, 53, etc.; 100, 101, 102, 103, etc.; 150, 151, 152, 153, etc.; incluyendo todos los números enteros hasta 200-500; 500-1000 y similares. Una secuencia polinucleotídica puede extenderse en uno o ambos extremos por nucleótidos adicionales no hallados en la secuencia nativa que codifica un polipéptido, tal como un epítipo o proteína diana heteróloga. Esta secuencia adicional puede consistir en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,
25 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos o más, en cualquier extremo de la secuencia desvelada o en ambos extremos de la secuencia desvelada.

Los polinucleótidos, independientemente de la longitud de la secuencia codificante en sí misma, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, tales como promotores, secuencias de control de la expresión, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiples, otros segmentos codificantes y similares, de modo que su longitud total puede variar considerablemente. Por lo tanto, se contempla que se puede emplear un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, estando la longitud total preferentemente limitada por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante previsto. Se consideran útiles segmentos de polinucleótidos ilustrativos con longitudes totales de aproximadamente 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000,
30 8000, 9000, 10.000, aproximadamente 500, aproximadamente 200, aproximadamente 100, aproximadamente 50 pares de bases de longitud y similares, (incluyendo todas las longitudes intermedias) en muchas implementaciones de la presente invención.

Un enfoque de mutagénesis, tal como mutagénesis específica de sitio, puede emplearse para preparar secuencias de antígeno diana. Se pueden realizar modificaciones específicas en una secuencia polipeptídica mediante mutagénesis de los polinucleótidos subyacentes que las codifican. Se puede usar mutagénesis específica de sitio para producir mutantes mediante el uso de secuencias oligonucleotídicas que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia de cebador de tamaño y complejidad de secuencia suficientes para formar una doble cadena estable en ambos lados de la unión de
40 supresión que se atraviesa. Por ejemplo, se puede emplear un cebador que comprende de aproximadamente 14 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud aproximadamente, con de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 restos en ambos lados de la unión de la secuencia que se altera. Se pueden realizar mutaciones en una secuencia polinucleotídica seleccionada para mejorar, alterar, disminuir, modificar o cambiar de otro modo las propiedades del polinucleótido y/o alterar las propiedades, actividad, composición, estabilidad o secuencia primaria del polipéptido
50 codificado.

Se puede usar mutagénesis de secuencias polinucleotídicas para alterar una o más propiedades del polipéptido codificado, tales como la inmunogenicidad de un epítipo comprendido en un polipéptido o la inmunogenicidad de un antígeno diana. Los ensayos para evaluar la inmunogenicidad de un polipéptido incluyen, pero sin limitación, ensayos de citotoxicidad de linfocitos T (ensayos de liberación de CTL/cromo), ensayos de proliferación de linfocitos T, tinción intracelular de citocinas, ELISA, ELISpot, etc. Se pueden emplear otras formas de obtención de variantes de secuencia de péptidos y las secuencias de ADN que los codifican. Por ejemplo, se pueden tratar vectores recombinantes que codifican la secuencia peptídica deseada con agentes mutagénicos, tales como hidroxilamina, para obtener variantes de secuencia.
55

60 Se pueden preparar fácilmente segmentos o fragmentos de polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la presente invención mediante, por ejemplo, síntesis directa del fragmento por medios químicos. Se pueden obtener fragmentos mediante la aplicación de tecnología de reproducción de ácido nucleico, tal como PCR, mediante la introducción de secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para producción recombinante y mediante otras técnicas de ADN recombinante generalmente conocidas por los expertos en la técnica de la biología molecular.
65

Se pueden utilizar diversos sistemas de vector/hospedador para contener y producir secuencias polinucleotídicas. Los sistemas ilustrativos incluyen microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de ADN recombinante de bacteriófagos, plásmidos o cósmidos; levaduras transformadas con vectores de levadura; sistemas de células de insecto infectados con vectores de virus (p. ej., baculovirus); sistemas de células vegetales transformados con vectores de virus (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores bacterianos (p. ej., plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales.

Los elementos de control o las secuencias reguladoras presentes en un vector de Ad pueden incluir las regiones no traducidas de los potenciadores, promotores y regiones no traducidas 5' y 3' del vector. Dichos elementos pueden variar en su concentración y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y el hospedador utilizados, se puede usar cualquiera de varios elementos de transcripción y traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, se pueden ligar secuencias que codifican un polipéptido de interés en un complejo de transcripción/traducción de Ad que consiste en el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Se puede usar inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma vírico para obtener un virus viable que sea capaz de expresar el polipéptido en células hospedadoras infectadas. Además, se pueden usar potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus del sarcoma de Rous (VSR), para aumentar la expresión en células hospedadoras de mamíferos.

También se pueden usar señales de iniciación específicas para lograr una traducción más eficaz de secuencias que codifican un polipéptido de interés (p. ej., codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes). Los elementos traduccionales exógenos y los codones de iniciación pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de expresión puede mejorarse mediante la inclusión de potenciadores que sean adecuados para el sistema celular particular que se use. También se pueden incorporar secuencias de terminación específicas, ya sea para transcripción o para traducción, para lograr una traducción eficaz de la secuencia que codifica el polipéptido elegido.

Se pueden usar diversos protocolos para detectar y medir la expresión de productos codificados por polinucleótidos (p. ej., antígenos diana) (p. ej., usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el producto). Los ejemplos incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se puede preferir para algunas aplicaciones un inmunoensayo de base monoclonal de dos sitios que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos para dos epítomos no interferentes en un polipéptido dado, pero también se puede emplear un ensayo de unión competitiva.

Los vectores de Ad pueden comprender un producto que puede detectarse o seleccionarse, tal como un gen indicador cuyo producto puede detectarse, tal como mediante fluorescencia, actividad enzimática en un sustrato cromogénico o fluorescente, y similares, o seleccionarse mediante las condiciones de cultivo. Los genes indicadores ilustrativos incluyen proteína verde fluorescente (GFP), β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), luciferasa, neomicina fosfotransferasa, fosfatasa alcalina secretada (SEAP) y hormona del crecimiento humano (HGH). Los marcadores seleccionables ilustrativos incluyen resistencias farmacológicas, tales como neomicina (G418), higromicina y similares.

Los vectores de Ad también pueden comprender una secuencia promotora o de control de la expresión. La elección del promotor dependerá en parte del tipo celular diana y el grado o tipo de control deseado. Los promotores que son adecuados dentro del contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, constitutivos, inducibles, específicos de tejido, específicos de tipo celular, específicos temporales o específicos de acontecimiento. Los ejemplos de promotores constitutivos o inespecíficos incluyen el promotor temprano de SV40, el promotor tardío de SV40, promotor de gen temprano de CMV, promotor del virus del papiloma bovino y promotor de adenovirus. Además de promotores víricos, los promotores celulares también son susceptibles dentro del contexto de la presente invención. En particular, son útiles los promotores celulares para los denominados genes constitutivos (p. ej., β -actina). Los promotores víricos son en general promotores más fuertes que los promotores celulares. También se pueden usar promotores inducibles. Estos promotores incluyen MMTV LTR, inducible por dexametasona, metalotioneína, inducible por metales pesados, y promotores con elementos de respuesta a AMPc, inducibles por AMPc, promotor de choque térmico. Al usar un promotor inducible, el ácido nucleico puede administrarse a una célula y permanecerá inactivo hasta la adición del inductor. Esto permite mayor control sobre el momento de producción de la proteína de interés. Se pueden usar promotores específicos de tipo de acontecimiento (p. ej., LTR de VIH), que están activos o regulados positivamente solo tras la aparición de un acontecimiento, tal como infección por Ébola, por ejemplo. El promotor LTR del VIH está inactivo a menos que el producto del gen tat esté presente, lo que sucede tras infección vírica. Algunos promotores de tipo acontecimiento también son específicos de tejido. Los promotores específicos de tipo de acontecimiento preferidos incluyen promotores activados tras infección vírica.

Los ejemplos de promotores incluyen promotores para α -fetoproteína, α -actina, myo D, antígeno carcinoembrionario, receptor de VEGF; receptor de FGF; TEK o tie 2; tie; receptor de urocinasa; selectinas E y P; VCAM-1; endogлина; endosialina; integrina α V- β 3; endotelina-1; ICAM-3; antígeno E9; factor de von Willebrand; CD44; CD40; cadherina vascular-endotelial; notch 4, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular; antígeno específico de próstata 1, probasina, receptor de FGF, receptor de VEGF, erb B2; erb B3; erb B4; MUC-1; HSP-27; int-1; int-2, CEA, receptor de HBEGF; receptor de EGF; tirosinasa, MAGE, receptor de IL-2; fosfatasa ácida prostática, probasina, antígeno de membrana específico de próstata, α -cristalina, receptor de PDGF, receptor de integrina, α -actina, cadenas pesadas

de miosina SM1 y SM2, calponina-h1, receptor de α -angiotensina SM22, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, cadena pesada de inmunoglobulina, cadena ligera de inmunoglobulina y CD4.

5 Se pueden insertar secuencias represoras, reguladores negativos o silenciadores específicos de tejido para reducir la expresión inespecífica del polinucleótido. Se pueden insertar múltiples elementos represores en la región promotora. La represión de la transcripción es independiente de la orientación de elementos represores o la distancia del promotor. Un tipo de secuencia represora es una secuencia aislante. Dichas secuencias inhiben la transcripción y pueden silenciar la transcripción de fondo. Se pueden ubicar elementos reguladores negativos en las regiones promotoras de varios genes diferentes. El elemento represor puede actuar como un represor de la transcripción en ausencia de factores, tales como esteroides, al igual que el NSE en la región promotora del gen de la ovoalbúmina. Estos elementos reguladores negativos pueden unirse con complejos proteicos específicos del oviducto, ninguno de los cuales es sensible a esteroides. Se ubican tres elementos diferentes en el promotor del gen de la ovoalbúmina. Los oligonucleótidos correspondientes a partes de estos elementos pueden reprimir la transcripción vírica del indicador TK. Uno de los elementos silenciadores comparte identidad de secuencia con silenciadores en otros genes
15 (TCTCTCCNA (SEQ. ID. NO.: 7)).

Además, pueden ubicarse elementos represores en la región promotora de diversos genes, incluyendo el gen de colágeno II, por ejemplo. Los factores nucleares de células HeLa se pueden unir específicamente a fragmentos de ADN que contienen la región silenciadora. Los elementos represores pueden desempeñar un papel regulador de la transcripción en el gen de fosfato de carbamilo sintetasa. Este gen se expresa solo en dos tipos celulares diferentes, hepatocitos y células epiteliales de la mucosa intestinal. También se encuentran regiones reguladoras negativas en la región promotora del gen de la colina acetiltransferasa, el promotor de la albúmina, promotor del gen de la fosfoglicerato cinasa (PGK-2) y en el gen de la 6-fosfofructo-2-cinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa, en los que el elemento regulador negativo inhibe la transcripción en líneas celulares no hepáticas. Asimismo, el elemento regulador negativo Tse-1 se ubica en varios genes específicos del hígado, incluyendo tirosina aminotransferasa (TAT). La expresión del gen de TAT es específica del hígado e inducible tanto por glucocorticoides como por la ruta de señalización de AMPc. El elemento de respuesta de AMPc (CRE) puede actuar como la diana para represión por Tse-1 y elementos específicos de hepatocitos. En consecuencia, resulta evidente que se conocen o se identifican fácilmente variedades de dichos elementos.
30

En determinadas realizaciones, pueden incorporarse elementos que aumenten la expresión del antígeno diana deseado en la secuencia de ácido nucleico de los vectores de Ad descritos en el presente documento. Los elementos ilustrativos incluyen sitios de unión a ribosomas internos (IRES). Los IRES pueden aumentar la eficacia de traducción. Del mismo modo, otras secuencias pueden potenciar la expresión. Para algunos genes, las secuencias especialmente en el extremo 5' pueden inhibir la transcripción y/o traducción. Estas secuencias son habitualmente palíndromos que pueden formar estructuras en horquilla. En algunos casos, dichas secuencias en el ácido nucleico para administrar se suprimen. Los niveles de expresión del transcrito o del producto traducido se pueden ensayar para confirmar o determinar qué secuencias afectan a la expresión. Los niveles de transcripción se pueden ensayar mediante cualquier método conocido, incluyendo hibridación de transferencia de Northern, protección de sonda de RNasa y similares. Los niveles de proteína se pueden ensayar mediante cualquier método conocido, incluyendo ELISA.
40

Inmunoterapias y vacunas específicas para el antígeno del Ébola

45 La presente divulgación proporciona inmunización con antígeno individual o antígeno combinado contra antígenos del Ébola, tales como GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L, utilizando dichos vectores y otros vectores como se proporcionan en el presente documento. La presente divulgación proporciona vacunas terapéuticas contra antígenos del Ébola. La presente divulgación proporciona vacunas profilácticas contra antígenos del Ébola. Además, en diversas realizaciones, la composición y los métodos proporcionados en el presente documento pueden conducir a respuestas clínicas, tales como alteración de la progresión de la enfermedad o la esperanza de vida.
50

Se pueden usar vectores Ad5 [E1-] que codifican diversos antígenos para transducir eficazmente 95 % de CD expuestas *ex vivo* a títulos altos del vector. Cabe destacar que los inventores han descubierto niveles crecientes de expresión de genes extraños en la CD con crecientes multiplicidades de infección (MOI) con el vector. Las CD infectadas con vectores Ad5 [E1-] pueden codificar diversos antígenos del Ébola que tienen propensión a inducir respuestas de CTL específicas de antígeno, tienen una capacidad mejorada de presentación de antígenos y/o tienen una capacidad mejorada para iniciar la proliferación de linfocitos T en reacciones mixtas de linfocitos. Se puede usar inmunización de animales con células dendríticas (CD) previamente transducidas por vectores de Ad5 que codifican antígenos específicos de tumor para inducir niveles significativos de protección para los animales cuando se estimulan con células tumorales que expresan el antígeno respectivo. Resulta interesante que la inyección intratumoral de Ad que codifican IL-7 es menos eficaz que la inyección de CD transducidas con vectores de Ad5 que codifican IL-7 para inducir inmunidad antitumoral. La presente descripción contempla la transducción *ex vivo* de CD por vectores de Ad5. Se pueden usar estrategias de transducción de CD *ex vivo* para inducir tolerancia del hospedador receptor. Por ejemplo, La administración mediada por Ad5 del CTLA4Ig en las CD puede bloquear las interacciones de CD80 de las CD con moléculas CD28 presentes en linfocitos T.
60
65

Las interacciones de la cápside del vector de Ad5 con CD pueden desencadenar varias respuestas beneficiosas, que

pueden aumentar la propensión de las CD a presentar antígenos codificados por vectores de Ad5. Por ejemplo, las CD inmaduras, aunque estén especializadas en la captación de antígenos, son efectores relativamente ineficaces de la activación de linfocitos T. La maduración de CD coincide con la mejora de la capacidad de las CD para impulsar la inmunidad de linfocitos T. En algunos casos, las composiciones y los métodos de la invención aprovechan una infección de Ad5 que da como resultado la inducción directa de la maduración de CD. La infección por vector de Ad de CD procedentes de médula ósea inmadura de ratones puede regular positivamente los marcadores de superficie celular normalmente asociados con la maduración de CD (MHC I y II, CD40, CD80, CD86 e ICAM-1), así como regulación negativa de CD11c, una integrina regulada negativamente tras la maduración de CD mieloides. En algunos casos, la infección por vector de Ad desencadena la producción de IL-12 por CD, un marcador de maduración de CD. Sin quedar ligados a teoría alguna, estos acontecimientos pueden deberse posiblemente a la activación desencadenada por Ad5 de rutas de NF- κ B. Las CD maduras se pueden transducir eficazmente mediante vectores de Ad y no pierden su potencial funcional para estimular la proliferación de linfocitos T vírgenes con MOI menor, como lo demuestra la CD humana CD83+ madura (procedente de monocitos de sangre periférica). Sin embargo, las CD maduras también pueden ser menos infectables que las inmaduras.

Se puede usar modificación de las proteínas de la cápside como estrategia para optimizar la infección de CD mediante vectores de Ad, así como potenciar la maduración funcional, por ejemplo, usando el receptor de CD40L como receptor de vector vírico, en lugar de usar los mecanismos normales de infección de receptor CAR.

En diversas realizaciones, las composiciones y métodos de la invención comprenden un efecto de vacuna Ad5 [E1-, E2b-]-GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24, L o cualquier combinación de los mismos, de mayor supervivencia general (SG) dentro de los límites de la seguridad técnica. Por ejemplo, las composiciones y los métodos de la invención pueden comprender un efecto de vacuna de GP de vector o vectores Ad5 [E1-, E2b-] de aumento de la supervivencia general (SG) dentro de los límites de la seguridad técnica. Por ejemplo, las composiciones y los métodos de la invención pueden comprender un efecto de vacuna de NP de vector o vectores Ad5 [E1-, E2b-] de aumento de la supervivencia general (SG) dentro de los límites de la seguridad técnica. Por ejemplo, las composiciones y los métodos de la invención pueden comprender un efecto de vacuna de VP40 de vector o vectores Ad5 [E1- E2b-] de aumento de la supervivencia general (SG) dentro de los límites de la seguridad técnica. Por ejemplo, las composiciones y los métodos de la invención pueden comprender un efecto de vacuna de VP35 de vector o vectores Ad5 [E1- E2b-] de aumento de la supervivencia general (SG) dentro de los límites de la seguridad técnica. Por ejemplo, las composiciones y los métodos de la invención pueden comprender un efecto de vacuna de VP30 de vector o vectores Ad5 [E1- E2b-] de aumento de la supervivencia general (SG) dentro de los límites de la seguridad técnica. Por ejemplo, las composiciones y los métodos de la invención pueden comprender un efecto de vacuna de VP24 de vector o vectores Ad5 [E1- E2b-] de aumento de la supervivencia general (SG) dentro de los límites de la seguridad técnica. Por ejemplo, las composiciones y los métodos de la invención pueden comprender un efecto de vacuna de L de vector o vectores Ad5 [E1-, E2b-] de aumento de la supervivencia general (SG) dentro de los límites de la seguridad técnica.

Como se ha indicado anteriormente, los vectores de adenovirus de la presente invención comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican una o más proteínas o antígenos diana de interés. En este sentido, los vectores pueden contener ácido nucleico que codifica 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más antígenos diana diferentes de interés. Los antígenos diana pueden ser una proteína de longitud completa o pueden ser un fragmento (p. ej., un epítipo) de la misma. Los vectores de adenovirus pueden contener secuencias de ácido nucleico que codifican múltiples fragmentos o epítopos de una proteína diana de interés o pueden contener uno o más fragmentos o epítopos de numerosas proteínas diana diferentes de interés.

Un antígeno diana puede comprender cualquier sustancia contra la que es deseable generar una respuesta inmunitaria pero, en general, el antígeno diana es una proteína. Un antígeno diana puede comprender una proteína de longitud completa, una subunidad de una proteína, una isoforma de una proteína o un fragmento de la misma que induce una respuesta inmunitaria (es decir, un fragmento inmunogénico). Se puede modificar un antígeno diana o fragmento del mismo, p. ej., para reducir una o más actividades biológicas del antígeno diana o para mejorar su inmunogenicidad.

En determinadas realizaciones, los fragmentos inmunogénicos se unen con una molécula del MHC de clase I o clase II. Un fragmento inmunogénico puede "unirse con" una molécula del MHC de clase I o clase II si dicha unión es detectable usando cualquier ensayo conocido en la técnica. Por ejemplo, la capacidad de un polipéptido para unirse con el MHC de clase I puede evaluarse indirectamente mediante la supervisión de la capacidad de promover la incorporación de β -2-microglobulina (β -2m) marcada con 125 I en complejos heterotriméricos del MHC de clase I/ β 2m/péptido (véase Parker *et al.*, J. Immunol. 152: 163, 1994). Como alternativa, pueden emplearse ensayos de competición de péptidos funcionales que se conocen en la técnica. En general, se pueden identificar fragmentos inmunogénicos de polipéptidos. Las técnicas representativas para identificar fragmentos inmunogénicos incluyen exploración de polipéptidos para determinar la capacidad de reaccionar con antisueros específicos de antígeno y/o líneas o clones de linfocitos T. Un fragmento inmunogénico de un polipéptido diana particular es un fragmento que reacciona con dichos antisueros y/o linfocitos T a un nivel que no es sustancialmente menor que la reactividad del polipéptido diana de longitud completa (p. ej., en un ELISA y/o ensayo de reactividad de linfocitos T). En otras palabras, un fragmento inmunogénico puede reaccionar dentro de dichos ensayos a un nivel que es similar a o mayor que la reactividad del polipéptido de longitud completa. Dichas exploraciones pueden realizarse usando métodos conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, los vectores víricos de la presente invención comprenden secuencias de ácido nucleico heterólogo que codifican una o más proteínas, variantes de las mismas, fusiones de las mismas o fragmentos de las mismas, que pueden modular la respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, el vector vírico de la presente invención codifica uno o más anticuerpos contra antígenos específicos, tales como el antígeno protector contra el carbunco, lo que permite inmunoterapia pasiva. En algunas realizaciones, los vectores víricos de la presente invención comprenden secuencias de ácido nucleico heterólogas que codifican una o más proteínas que tienen efecto terapéutico (p. ej., función antivírica, antibacteriana, antiparasitaria o antiébola). En algunas realizaciones, los vectores de adenovirus con supresión de E2b de segunda generación comprenden una secuencia de ácido nucleico heterólogo. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico heterólogo es GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24, L, una variante, una parte o cualquier combinación de las mismas.

Los antígenos diana incluyen, pero sin limitación, antígenos procedentes de diversos virus del Ébola. En algunas realizaciones, partes o variantes de las proteínas del Ébola se emplean como antígenos diana. En algunas realizaciones, partes o variantes de las proteínas del Ébola que se emplean como antígenos diana tienen una capacidad modificada, por ejemplo, aumentada, para efectuar una respuesta inmunitaria contra la proteína del Ébola o las células que la contienen. Una vacuna de la presente invención puede vacunar contra un antígeno. Una vacuna también puede dirigirse a un epítipo. Un antígeno puede ser un antígeno del virus del Ébola. Un epítipo puede ser un epítipo del virus del Ébola. Dicho epítipo del virus del Ébola puede obtenerse de una amplia variedad de virus del Ébola, tales como antígenos de los virus del Ébola resultantes de mutaciones y antígenos específicos de especies del Ébola compartidos. Los antígenos del Ébola (AE) pueden ser antígenos que el hospedador normalmente no expresa. Los antígenos asociados con el Ébola pueden ser, por ejemplo, proteínas o fragmentos de proteínas, hidratos de carbono complejos, gangliósidos, haptenos, ácidos nucleicos, otras moléculas biológicas o cualquier combinación de los mismos.

Las proteínas ilustrativas del Ébola útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitación, uno o más de GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y L. En algunas realizaciones, el vector vírico comprende una secuencia de antígeno diana que codifica un polipéptido modificado seleccionado de GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y L en donde el polipéptido o un fragmento del mismo tiene al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % de identidad con la secuencia descrita.

Los inventores han descubierto que múltiples inmunizaciones homólogas con Ad5 [E1-, E2b-]-GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L, indujeron respuestas inmunitarias mediadas por células (IMC) específicas de GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L con actividad anti-Ébola en animales a pesar de la presencia de anticuerpos neutralizantes de Ad5 preexistentes o inducidos. Las cohortes de pacientes con Ébola pueden inmunizarse con dosis crecientes de Ad5 [E1-, E2b-]-GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L. En sujetos con infecciones por Ébola, la nueva plataforma de administración de genes Ad5 [E1-, E2b-] genera respuestas de IMC significativas a los GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L de AE en el contexto de inmunidad específica de Ad5 tanto adquirida de manera natural como inducida por inmunización.

La IMC específica de antígeno GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L puede ser, por ejemplo, mayor de 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 5000, 10000 o más células formadoras de manchas (CFM) de IFN- γ por cada 10^6 células mononucleares de sangre periférica (PBMC). En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se eleva en un sujeto humano con un título inverso de anticuerpo neutralizante de Ad5 preexistente mayor de 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 12000, 15000 o superior. La respuesta inmunitaria puede comprender una inmunidad mediada por células y/o una inmunidad humoral como se describe en el presente documento. La respuesta inmunitaria se puede medir mediante una o más tinciones de citocinas intracelulares (TCI), ELISpot, ensayos de proliferación, ensayos de linfocitos T citotóxicos incluyendo ensayos de liberación de cromo o equivalentes y análisis de expresión génica usando cualquier número de ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o RT-PCR, como se describe en el presente documento y en la medida en que estén disponibles para una persona experta en la materia, así como cualquier otro ensayo adecuado conocido en la técnica para medir la respuesta inmunitaria.

En algunas realizaciones, el vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende una secuencia modificada que codifica una subunidad con al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % de identidad con una subunidad de tipo silvestre del polipéptido. El polipéptido inmunogénico puede ser un GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 o L mutantes, o un fragmento de los mismos. En algunas realizaciones, el vector de adenovirus defectuoso en replicación comprende una secuencia que codifica un polipéptido con al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % de identidad con el polipéptido inmunogénico. En algunas realizaciones, la secuencia que codifica el polipéptido inmunogénico comprende la secuencia de la SEQ. ID. NO.: 1.

En algunas realizaciones, la secuencia que codifica el polipéptido inmunogénico comprende una secuencia con al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % de identidad con las SEQ. ID. NO.: 1, 2, 4, 5 o 6, o una secuencia generada a partir de las SEQ. ID. NO.: 1, 2, 4, 5 o 6 mediante reemplazos de codones alternativos. En algunas realizaciones, el polipéptido inmunogénico codificado por los vectores de adenovirus comprende hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40 o más mutaciones

puntuales, tales como sustituciones o supresiones de aminoácidos individuales, en comparación con una secuencia de GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 o L humana de tipo silvestre.

En determinadas realizaciones, los antígenos del Ébola pueden identificarse directamente a partir de un individuo infectado con un virus del Ébola. En este sentido, se pueden llevar a cabo exploraciones usando diversas tecnologías conocidas. Por ejemplo, en una realización, se toma una biopsia de células o tejidos de un paciente, se aísla ARN de las células de muestra y se explora usando un chip génico (por ejemplo, de Affymetrix, Santa Clara, Calif.) y se identifica un antígeno del virus del Ébola. Una vez que se identifica el antígeno diana del virus del Ébola, entonces puede clonarse, expresarse y purificarse usando técnicas conocidas en este campo.

Este antígeno diana puede unirse después a uno o más epítomos o incorporarse o unirse a casetes o vectores víricos descritos en el presente documento y administrarse al paciente para alterar la respuesta inmunitaria a la molécula diana aislada de una muestra del paciente infectado por Ébola. De esta manera, se contemplan inmunoterapia y vacunas "personalizadas" dentro del contexto de la invención. En algunas realizaciones, un antígeno del Ébola personalizado relacionado con las SEQ. ID. NO.:1, SEQ. ID. NO.:2, SEQ. ID. NO.:4, SEQ. ID. NO.:5, SEQ. ID. NO.:6 o una combinación de las mismas se caracteriza a partir de un paciente y se utiliza además como el antígeno diana en su conjunto, en parte o como una variante.

Inmunoterapias y vacunas combinadas

La presente divulgación proporciona una inmunoterapia y composiciones de vacuna combinadas para el tratamiento de infecciones por Ébola. En algunos aspectos, las inmunoterapias y vacunas combinadas proporcionadas en el presente documento pueden comprender un enfoque inmunoterapéutico de múltiples dianas contra antígenos asociados con infecciones por Ébola. En algunos aspectos, las inmunoterapias y vacunas combinadas proporcionadas en el presente documento pueden comprender un enfoque inmunoterapéutico de identificación antigénica de múltiples dianas contra antígenos asociados con infecciones por Ébola. Las composiciones y los métodos de la invención, en diversas realizaciones, proporcionan vectores basados en virus que expresan un tipo silvestre o una variante de GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L para la inmunización del Ébola, como se proporciona en el presente documento. Estos vectores pueden aumentar la respuesta inmunitaria contra GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L.

En algunos aspectos, el vector comprende al menos un antígeno. En algunos aspectos, el vector comprende al menos dos antígenos. En algunos aspectos, el vector comprende al menos tres antígenos. En algunos aspectos, el vector comprende más de tres antígenos. En algunos aspectos, la formulación de vacuna comprende una relación 1:1 de vector con respecto a antígeno. En algunos aspectos, la vacuna comprende una relación 1:2 de vector con respecto a antígeno. En algunos aspectos, la vacuna comprende una relación 1:3 de vector con respecto a antígeno. En algunos aspectos, la vacuna comprende una relación 1:4 de vector con respecto a antígeno. En algunos aspectos, la vacuna comprende una relación 1:5 de vector con respecto a antígeno. En algunos aspectos, la vacuna comprende una relación 1:6 de vector con respecto a antígeno. En algunos aspectos, la vacuna comprende una relación 1:7 de vector con respecto a antígeno. En algunos aspectos, la vacuna comprende una relación 1:8 de vector con respecto a antígeno. En algunos aspectos, la vacuna comprende una relación 1:9 de vector con respecto a antígeno. En algunos aspectos, la vacuna comprende una relación 1:10 de vector con respecto a antígeno.

En algunos aspectos, la vacuna es una vacuna combinada, en donde la vacuna comprende al menos dos vectores que contienen cada uno al menos un único antígeno. En algunos aspectos, la vacuna es una vacuna combinada, en donde la vacuna comprende al menos tres vectores que contienen cada uno al menos un único antígeno diana. En algunos aspectos, la vacuna es una vacuna combinada, en donde la vacuna comprende más de tres vectores que contienen cada uno al menos un único antígeno.

En algunos aspectos, la vacuna es una vacuna combinada, en donde la vacuna comprende al menos dos vectores, en donde un primer vector de los al menos dos vectores comprende al menos un único antígeno y en donde un segundo vector de los al menos dos vectores comprende al menos dos antígenos. En algunos aspectos, la vacuna es una vacuna combinada, en donde la vacuna comprende al menos tres vectores, en donde un primer vector de los al menos tres vectores comprende al menos un único antígeno y en donde un segundo vector de los al menos tres vectores comprende al menos dos antígenos. En algunos aspectos, la vacuna es una vacuna combinada, en donde la vacuna comprende tres o más vectores, en donde un primer vector de los tres o más vectores comprende al menos un único antígeno y en donde un segundo vector de los tres o más vectores comprende al menos dos antígenos. En algunos aspectos, la vacuna es una vacuna combinada, en donde la vacuna comprende más de tres vectores que contienen cada uno al menos dos antígenos.

Cuando una mezcla de diferentes antígenos se administran o expresan simultáneamente a partir de un mismo o diferente vector en un individuo, pueden competir entre sí. Como resultado, las formulaciones que comprenden diferentes concentraciones y relaciones de antígenos expresados en una inmunoterapia o vacuna combinada deben evaluarse y adaptarse al individuo o grupo de individuos para garantizar que se produzcan respuestas inmunitarias eficaces y sostenidas después de la administración.

La composición que comprende múltiples antígenos puede estar presente en diversas relaciones. Por ejemplo, las

formulaciones con más de un vector pueden tener diversas relaciones. Por ejemplo, las inmunoterapias o vacunas pueden tener dos vectores diferentes en una estequiometría de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 2:1, 2:3, 2:4, 2:5, 2:6, 2:7, 2:8, 3:1, 3:3, 3:4, 3:5, 3:6, 3:7, 3:8, 3:1, 3:3, 3:4, 3:5, 3:6, 3:7, 3:8, 4:1, 4:3, 4:5, 4:6, 4:7, 4:8, 5:1, 5:3, 5:4, 5:6, 5:7, 5:8, 6:1, 6:3, 6:4, 6:5, 6:7, 6:8, 7:1, 7:3, 7:4, 7:5, 7:6, 7:8, 8:1, 8:3, 8:4, 8:5, 8:6 u 8:7. Por ejemplo, las inmunoterapias o vacunas pueden tener tres vectores diferentes en una estequiometría de: 1:1:1, 1:2:1, 1:3:1, 1:4:1, 1:5:1, 1:6:1, 1:7:1, 1:8:1, 2:1:1, 2:3:1, 2:4:1, 2:5:1, 2:6:1, 2:7:1, 2:8:1, 3:1, 3:3:1, 3:4:1, 3:5:1, 3:6:1, 3:7:1, 3:8:1, 3:1:1, 3:3:1, 3:4:1, 3:5:1, 3:6:1, 3:7:1, 3:8:1, 4:1:1, 4:3:1, 4:4:1, 4:5:1, 4:6:1, 4:7:1, 4:8:1, 5:1:1, 5:3:1, 5:4:1, 5:5:1, 5:6:1, 5:7:1, 5:8:1, 6:1:1, 6:3:1, 6:4:1, 6:5:1, 6:6:1, 6:7:1, 6:8:1, 7:1:1, 7:3:1, 7:4:1, 7:5:1, 7:6:1, 7:7:1, 7:8:1, 8:1:1, 8:3:1, 8:4:1, 8:5:1, 8:6:1, 8:7:1, 8:8:1, 1:1:2, 1:2:2, 1:3:2, 1:4:2, 1:5:2, 1:6:2, 1:7:2, 1:8:2, 2:1:2, 2:3:2, 2:4:2, 2:5:2, 2:6:2, 2:7:2, 2:8:2, 3:1:2, 3:3:2, 3:4:2, 3:5:2, 3:6:2, 3:7:2, 3:8:2, 3:1:2, 3:3:2, 3:4:2, 3:5:2, 3:6:2, 3:7:2, 3:8:2, 4:1:2, 4:3:2, 4:4:2, 4:5:2, 4:6:2, 4:7:2, 4:8:2, 5:1:2, 5:3:2, 5:4:2, 5:5:2, 5:6:2, 5:7:2, 5:8:2, 6:1:2, 6:3:2, 6:4:2, 6:5:2, 6:6:2, 6:7:2, 6:8:2, 7:1:2, 7:3:2, 7:4:2, 7:5:2, 7:6:2, 7:7:2, 7:8:2, 8:1:2, 8:3:2, 8:4:2, 8:5:2, 8:6:2, 8:7:2, 8:8:2, 1:1:3, 1:2:3, 1:3:3, 1:4:3, 1:5:3, 1:6:3, 1:7:3, 1:8:3, 2:1:3, 2:3:3, 2:4:3, 2:5:3, 2:6:3, 2:7:3, 2:8:3, 3:1:3, 3:3:3, 3:4:3, 3:5:3, 3:6:3, 3:7:3, 3:8:3, 3:1:3, 3:3:3, 3:4:3, 3:5:3, 3:6:3, 3:7:3, 3:8:3, 4:1:3, 4:3:3, 4:4:3, 4:5:3, 4:6:3, 4:7:3, 4:8:3, 5:1:3, 5:3:3, 5:4:3, 5:5:3, 5:6:3, 5:7:3, 5:8:3, 6:1:3, 6:3:3, 6:4:3, 6:5:3, 6:6:3, 6:7:3, 6:8:3, 7:1:3, 7:3:3, 7:4:3, 7:5:3, 7:6:3, 7:7:3, 7:8:3, 8:1:3, 8:3:3, 8:4:3, 8:5:3, 8:6:3, 8:7:3, 8:8:3, 1:1:4, 1:2:4, 1:3:4, 1:4:4, 1:5:4, 1:6:4, 1:7:4, 1:8:4, 2:1:4, 2:3:4, 2:4:4, 2:5:4, 2:6:4, 2:7:4, 2:8:4, 3:1:4, 3:3:4, 3:4:4, 3:5:4, 3:6:4, 3:7:4, 3:8:4, 3:1:4, 3:3:4, 3:4:4, 3:5:4, 3:6:4, 3:7:4, 3:8:4, 4:1:4, 4:3:4, 4:4:4, 4:5:4, 4:6:4, 4:7:4, 4:8:4, 5:1:4, 5:3:4, 5:4:4, 5:5:4, 5:6:4, 5:7:4, 5:8:4, 6:1:4, 6:3:4, 6:4:4, 6:5:4, 6:6:4, 6:7:4, 6:8:4, 7:1:4, 7:3:4, 7:4:4, 7:5:4, 7:6:4, 7:7:4, 7:8:4, 8:1:4, 8:3:4, 8:4:4, 8:5:4, 8:6:4, 8:7:4, 8:8:4, 1:1:5, 1:2:5, 1:3:5, 1:4:5, 1:5:5, 1:6:5, 1:7:5, 1:8:5, 2:1:5, 2:3:5, 2:4:5, 2:5:5, 2:6:5, 2:7:5, 2:8:5, 3:1:5, 3:3:5, 3:4:5, 3:5:5, 3:6:5, 3:7:5, 3:8:5, 3:1:5, 3:3:5, 3:4:5, 3:5:5, 3:6:5, 3:7:5, 3:8:5, 4:1:5, 4:3:5, 4:4:5, 4:5:5, 4:6:5, 4:7:5, 4:8:5, 5:1:5, 5:3:5, 5:4:5, 5:5:5, 5:6:5, 5:7:5, 5:8:5, 6:1:5, 6:3:5, 6:4:5, 6:5:5, 6:6:5, 6:7:5, 6:8:5, 7:1:5, 7:3:5, 7:4:5, 7:5:5, 7:6:5, 7:7:5, 7:8:5, 8:1:5, 8:3:5, 8:4:5, 8:5:5, 8:6:5, 8:7:5, 8:8:5, 1:1:6, 1:2:6, 1:3:6, 1:4:6, 1:5:6, 1:6:6, 1:7:6, 1:8:6, 2:1:6, 2:3:6, 2:4:6, 2:5:6, 2:6:6, 2:7:6, 2:8:6, 3:1:6, 3:3:6, 3:4:6, 3:5:6, 3:6:6, 3:7:6, 3:8:6, 3:1:6, 3:3:6, 3:4:6, 3:5:6, 3:6:6, 3:7:6, 3:8:6, 4:1:6, 4:3:6, 4:4:6, 4:5:6, 4:6:6, 4:7:6, 4:8:6, 5:1:6, 5:3:6, 5:4:6, 5:5:6, 5:6:6, 5:7:6, 5:8:6, 6:1:6, 6:3:6, 6:4:6, 6:5:6, 6:6:6, 6:7:6, 6:8:6, 7:1:6, 7:3:6, 7:4:6, 7:5:6, 7:6:6, 7:7:6, 7:8:6, 8:1:6, 8:3:6, 8:4:6, 8:5:6, 8:6:6, 8:7:6, 8:8:6, 1:1:7, 1:2:7, 1:3:7, 1:4:7, 1:5:7, 1:6:7, 1:7:7, 1:8:7, 2:1:7, 2:3:7, 2:4:7, 2:5:7, 2:6:7, 2:7:7, 2:8:7, 3:1:7, 3:3:7, 3:4:7, 3:5:7, 3:6:7, 3:7:7, 3:8:7, 3:1:7, 3:3:7, 3:4:7, 3:5:7, 3:6:7, 3:7:7, 3:8:7, 4:1:7, 4:3:7, 4:4:7, 4:5:7, 4:6:7, 4:7:7, 4:8:7, 5:1:7, 5:3:7, 5:4:7, 5:5:7, 5:6:7, 5:7:7, 5:8:7, 6:1:7, 6:3:7, 6:4:7, 6:5:7, 6:6:7, 6:7:7, 6:8:7, 7:1:7, 7:3:7, 7:4:7, 7:5:7, 7:6:7, 7:7:7, 7:8:7, 8:1:7, 8:3:7, 8:4:7, 8:5:7, 8:6:7, 8:7:7 u 8:8:7.

La presente divulgación proporciona inmunoterapias o vacunas combinadas que comprenden: al menos dos, al menos tres o más de tres antígenos diana diferentes que comprenden una secuencia que codifica un GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L. Por ejemplo, una inmunoterapia o vacuna combinada puede comprender al menos dos, al menos tres o más de tres antígenos diana diferentes que comprenden una secuencia que codifica un GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L de tipo silvestre o modificado, en donde un antígeno diana de tipo silvestre o modificado comprende una secuencia con al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de identidad de secuencia con la SEQ. ID. NO.:1. Por ejemplo, una inmunoterapia o vacuna combinada puede comprender al menos dos, al menos tres o más de tres antígenos diana diferentes que comprenden una secuencia que codifica un GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L de tipo silvestre o modificado, en donde un antígeno diana de tipo silvestre o modificado comprende una secuencia con al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de identidad de secuencia con la SEQ. ID. NO.:2. Por ejemplo, una inmunoterapia o vacuna combinada puede comprender al menos dos, al menos tres o más de tres antígenos diana diferentes que comprenden una secuencia que codifica un GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L de tipo silvestre o modificado, en donde un antígeno diana de tipo silvestre o modificado comprende una secuencia con al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de identidad de secuencia con la SEQ. ID. NO.:4. Por ejemplo, una inmunoterapia o vacuna combinada puede comprender al menos dos, al menos tres o más de tres antígenos diana diferentes que comprenden una secuencia que codifica un GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L de tipo silvestre o modificado, en donde un antígeno diana de tipo silvestre o modificado comprende una secuencia con al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de identidad de secuencia con la SEQ. ID. NO.:5. Por ejemplo, una inmunoterapia o vacuna combinada puede comprender al menos dos, al menos tres o más de tres antígenos diana diferentes que comprenden una secuencia que codifica un GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L de tipo silvestre o modificado, en donde un antígeno diana de tipo silvestre o modificado comprende una secuencia con al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de identidad de secuencia con la SEQ. ID. NO.:6.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona inmunoterapias combinadas que comprenden productos inmunoterapéuticos de múltiples dianas dirigidos a AE y composiciones moleculares que comprenden un modulador de punto de control de la ruta inmunitaria que se dirige al menos a una proteína de punto de control inmunitario de la ruta inhibidora inmunitaria. La presente divulgación proporciona inmunoterapias o vacunas combinadas que comprenden: al menos dos, al menos tres o más de tres antígenos diana diferentes que comprenden una secuencia que codifica un GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L de tipo silvestre o modificado, y al menos una composición molecular que comprende un modulador de punto de control de la ruta inmunitaria. Por ejemplo, una inmunoterapia o vacuna combinada puede comprender al menos dos, al menos tres o más de tres antígenos diana diferentes que comprenden una secuencia que codifica un GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L modificado de tipo silvestre o modificado, en donde el antígeno diana modificado comprende una secuencia con al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de identidad de secuencia con la SEQ. ID. NO.: 1, 2, 4, 5 y/o 6, y al menos una composición molecular de la ruta inhibidora del punto de control inmunitario.

En algunas realizaciones, la al menos una composición molecular comprende un modulador de punto de control de la ruta inmunitaria que se dirige a CTLA4. En algunas realizaciones, la al menos una molecular comprende un modulador de punto de control de la ruta inmunitaria que se dirige a PD1. En algunas realizaciones, la al menos una composición molecular comprende un modulador de punto de control de la ruta inmunitaria que se dirige a PDL1. En algunas realizaciones, la al menos una composición molecular comprende un modulador de punto de control de la ruta inmunitaria que se dirige a LAG3. En algunas realizaciones, la al menos una composición molecular comprende un modulador de punto de control de la ruta inmunitaria que se dirige a B7-H3. En algunas realizaciones, la al menos una composición molecular comprende un modulador de punto de control de la ruta inmunitaria que se dirige a B7-H4. En algunas realizaciones, la al menos una composición molecular comprende un modulador de punto de control de la ruta inmunitaria que es un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido a PD1, PDL1, PDL2, CD28, CD80, CD86, CTLA4, B7RP1, ICOS, B7RPI, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, KIR, TCR, LAG3, CD137, CD137L, OX40, OX40L, CD27, CD70, CD40, CD40L, TIM3 (es decir, HAVcr2), GAL9 y A2aR.

Dianas antigénicas de compañero de fusión inmunológico

Los vectores víricos de la presente invención también pueden incluir secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas que aumentan la inmunogenicidad del antígeno diana. En este sentido, la proteína producida después de la inmunización con el vector de adenovirus que contiene dicha proteína puede ser una proteína de fusión que comprende el antígeno diana de interés fusionado con una proteína que aumenta la inmunogenicidad del antígeno diana de interés.

En una realización, dicho compañero de fusión inmunológico procede de una *Mycobacterium* sp., tal como un fragmento Ra12 procedente de *Mycobacterium tuberculosis*. Las composiciones de Ra12 y métodos para su uso en la mejora de la expresión y/o inmunogenicidad de secuencias polinucleotídicas/polipeptídicas heterólogas se describen en la solicitud de patente de los Estados Unidos 60/158.585 y la patente de los Estados Unidos n.º 7.009.042. En resumen, Ra12 se refiere a una región polinucleotídica que es una subsecuencia de un ácido nucleico de MTB32A de *Mycobacterium tuberculosis*. MTB32A es una serina proteasa de 32 kDa codificada por un gen en cepas virulentas y avirulentas de *M. tuberculosis*. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de MTB32A se han descrito (véase, p. ej., solicitud de patente de los Estados Unidos 60/158.585; Skeiky *et al.*, *Infection and Immun.* 67: 3998-4007 (1999)). Los fragmentos C-terminales de la secuencia codificante de MTB32A se expresan a niveles altos y permanecen como polipéptidos solubles durante todo el proceso de purificación. Por otra parte, Ra12 puede mejorar la inmunogenicidad de polipéptidos inmunogénicos heterólogos con los que se fusiona. Un polipéptido de fusión de Ra12 comprende un fragmento C-terminal de 14 kDa correspondiente a los restos de aminoácidos 192 a 323 de MTB32A. Otros polinucleótidos Ra12 comprenden en general al menos aproximadamente 15, 30, 60, 100, 200, 300 o más nucleótidos que codifican una parte de un polipéptido Ra12. Los polinucleótidos Ra12 pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un polipéptido Ra12 o una parte del mismo) o pueden comprender una variante de dicha secuencia. Las variantes polinucleotídicas de Ra12 pueden contener una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inserciones de modo que la actividad biológica del polipéptido de fusión codificado no disminuya sustancialmente, en relación con un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido Ra12 nativo. Las variantes pueden tener al menos aproximadamente 70 %, 80 % o 90 % de identidad, o más, con una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido Ra12 nativo o una parte del mismo.

Un compañero de fusión inmunológico puede proceder de proteína D, una proteína de superficie de la bacteria gramnegativa *Haemophilus influenzae* B. En algunos casos, un derivado de proteína D comprende aproximadamente el primer tercio de la proteína (p. ej., los primeros 100-110 aminoácidos N-terminales). Un derivado de proteína D puede estar lipidado. En determinadas realizaciones, los primeros 109 restos de un compañero de fusión de lipoproteína D se incluyen en el extremo N para proporcionar al polipéptido epítopos de linfocitos T exógenos adicionales, que pueden aumentar el nivel de expresión en *E. coli* y pueden actuar como un potenciador de la expresión. La cola lipídica puede garantizar la presentación óptima del antígeno a células presentadoras de antígenos. Otros compañeros de fusión incluyen la proteína no estructural del virus de la gripe, NS1 (hemaglutinina). Normalmente, se usan los 81 aminoácidos N-terminales, aunque pueden usarse diferentes fragmentos que incluyen epítopos de auxiliares T.

El compañero de fusión inmunológico puede ser la proteína conocida como LYTA o una parte de la misma (preferentemente una parte C-terminal). LYTA procede de *Streptococcus pneumoniae*, que sintetiza una N-acetil-L-alanina amidasa conocida como amidasa LYTA (codificada por el gen *LytA*). LYTA es una autolisina que degrada específicamente determinados enlaces en la cadena principal de peptidoglucano. El dominio C-terminal de la proteína LYTA es responsable de la afinidad con la colina o con algunos análogos de colina tales como DEAE. Esta propiedad se ha aprovechado para el desarrollo de plásmidos que expresan C-LYTA de *E. coli* útiles para la expresión de proteínas de fusión. Se puede emplear la purificación de proteínas híbridas que contienen el fragmento de C-LYTA en el extremo amino. En otra realización, se puede incorporar una parte repetida de LYTA en un polipéptido de fusión. Una parte repetida se puede encontrar, por ejemplo, en la región C-terminal comenzando en el resto 178. Una parte repetida en particular incorpora los restos 188-305.

En algunas realizaciones, la diana antigénica comprende un componente inmunogénico que comprende una citocina seleccionada del grupo de IFN- γ , TNF α IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. En algunas realizaciones, la diana antigénica comprende además uno o más componentes inmunogénicos que comprenden una citocina seleccionada del grupo de IFN- γ , TNF α IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13.

5 En algunas realizaciones, la diana antigénica comprende un componente inmunogénico que comprende un ácido nucleico que codifica IFN- γ , TNF α IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, una proteína con identidad sustancial con IFN- γ , TNF α IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 y un ácido nucleico que codifica una proteína con identidad sustancial con IFN- γ , TNF α IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13.

10 En algunas realizaciones, la diana antigénica se fusiona o se une con un componente inmunogénico que comprende una citocina seleccionada del grupo de IFN- γ , TNF α IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. En algunas realizaciones, la diana antigénica se coexpresa en una célula con un componente inmunogénico que comprende una citocina seleccionada del grupo de IFN- γ , TNF α IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13.

Moduladores de puntos de control de la ruta inmunitaria

20 En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención se administran con uno o más moduladores de puntos de control de la ruta inmunitaria. Un equilibrio entre la activación y las señales inhibitoras regula la interacción entre linfocitos T y células enfermas, en donde las respuestas de linfocitos T se inician mediante el reconocimiento de antígenos por el receptor de linfocitos T (TCR). Las rutas y señales inhibitoras se denominan puntos de control inmunitarios. En circunstancias normales, los puntos de control inmunitarios desempeñan un papel fundamental en el control y la prevención de la autoinmunidad y también protegen del daño tisular en respuesta a infección patógena.

25 La presente divulgación proporciona inmunoterapias combinadas que comprenden vacunas y composiciones basadas en vectores víricos para modular rutas inhibitoras de puntos de control inmunitarios para el tratamiento de infecciones por Ébola. En algunas realizaciones, la modulación es el aumento de la expresión o actividad de un gen o una proteína. En algunas realizaciones, la modulación es la disminución de la expresión o actividad de un gen o una proteína. En algunas realizaciones, la modulación afecta a una familia de genes o proteínas.

30 En general, las rutas inhibitoras inmunitarias son iniciadas por interacciones de ligando-receptor. Ahora está claro que en enfermedades, la enfermedad puede incorporar rutas de puntos de control inmunitarios como mecanismo para inducir resistencia inmunitaria en un sujeto.

35 La inducción de resistencia inmunitaria o rutas inhibitoras inmunitarias en un sujeto por una enfermedad dada puede bloquearse mediante composiciones moleculares tales como ARNip, antisentido, moléculas pequeñas, miméticos, una forma recombinante de ligando, receptor o proteína, o anticuerpos (que pueden ser una proteína de fusión de Ig) que se sabe que modulan una o más de las rutas inhibitoras inmunitarias. Por ejemplo, hallazgos clínicos preliminares con bloqueadores de proteínas de puntos de control inmunitarios, tales como el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA4) y la proteína 1 de muerte celular programada (PD1) resultan prometedores para mejorar la inmunidad antitumoral.

40 Debido a que las células enfermas pueden expresar múltiples ligandos inhibitoros y los linfocitos de infiltración en la enfermedad expresan múltiples receptores inhibitoros, el bloqueo doble o triple de proteínas de puntos de control inmunitarios puede mejorar la inmunidad contra la enfermedad. Las inmunoterapias combinadas proporcionadas en el presente documento pueden comprender una o más composiciones moleculares que comprenden un modulador de punto de control de la ruta inmunitaria que se dirige a una o más de las siguientes proteínas de puntos de control inmunitarios: PD1, PDL1, PDL2, CD28, CD80, CD86, CTLA4, B7RP1, ICOS, B7RPI, B7-H3 (también conocida como CD276), B7-H4 (también conocida como B7-S1, B7x y VCTN1), BTLA (también conocida como CD272), HVEM, KIR, TCR, LAG3 (también conocida como CD223), CD137, CD137L, OX40, OX40L, CD27, CD70, CD40, CD40L, TIM3 (también conocida como HAVcr2), GAL9, A2aR y adenosina. En algunas realizaciones, la composición molecular comprende un ARNip. En algunas realizaciones, la composición molecular comprende una molécula pequeña. En algunas realizaciones, la composición molecular comprende una forma recombinante de un ligando. En algunas realizaciones, la composición molecular comprende una forma recombinante de un receptor. En algunas realizaciones, la composición molecular comprende un anticuerpo. En algunas realizaciones, la terapia de combinación comprende más de una composición molecular y/o más de un tipo de composición molecular. Como apreciarán los expertos en la materia, las proteínas descubiertas en el futuro de las rutas inhibitoras de puntos de control inmunitarios también están abarcadas en la presente divulgación.

60 En algunas realizaciones, las inmunoterapias combinadas comprenden composiciones moleculares para la modulación de CTLA4. En algunas realizaciones, las inmunoterapias combinadas comprenden composiciones moleculares para la modulación de PD1. En algunas realizaciones, las inmunoterapias combinadas comprenden composiciones moleculares para la modulación de PDL1. En algunas realizaciones, las inmunoterapias combinadas comprenden composiciones moleculares para la modulación de LAG3. En algunas realizaciones, las inmunoterapias combinadas comprenden composiciones moleculares para la modulación de B7-H3. En algunas realizaciones, las

inmunoterapias combinadas comprenden composiciones moleculares para la modulación de B7-H4. En algunas realizaciones, las inmunoterapias combinadas comprenden composiciones moleculares para la modulación de TIM3. En algunas realizaciones, la modulación es un aumento o una mejora de la expresión. En otras realizaciones, la modulación es la disminución de la ausencia de expresión.

5 Dos inhibidores de puntos de control inmunitarios ilustrativos incluyen el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y la proteína 1 de muerte celular programada (PD1). CTLA-4 se puede expresar exclusivamente en linfocitos T donde regula las primeras etapas de activación de linfocitos T. CTLA-4 interactúa con el receptor de linfocitos T coestimulante CD28, lo que puede dar como resultado señalización que inhibe la actividad de linfocitos T. Una vez
10 que se produce reconocimiento del antígeno de TCR, la señalización de CD28 puede mejorar la señalización de TCR, lo que conduce en algunos casos a linfocitos T activados y CTLA-4 inhibe la actividad de señalización de CD28. La presente divulgación proporciona inmunoterapias según lo proporcionado en el presente documento en combinación con anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 para el tratamiento del Ébola. La presente divulgación proporciona inmunoterapias según lo proporcionado en el presente documento en combinación con composiciones moleculares
15 de CTLA-4 para el tratamiento del Ébola.

El ligando 1 de proteína de muerte celular programada (PDL1) es un miembro de la familia B7 y se distribuye en diversos tejidos y tipos celulares. PDL1 puede interactuar con PD1 inhibiendo la activación de linfocitos T y la lisis mediada por CTL. Se ha demostrado expresión significativa de PDL1 en diversos tumores humanos y la expresión de
20 PDL1 es uno de los mecanismos clave en los que los tumores evaden las respuestas inmunitarias antitumorales del hospedador. El ligando 1 de muerte programada (PDL1) y la proteína 1 de muerte celular programada (PD1) interactúan como puntos de control inmunitarios. Esta interacción puede ser un mecanismo de tolerancia importante que da como resultado amortiguación de las respuestas inmunitarias antitumorales y posterior progresión del tumor. PD1 está presente en linfocitos T activados y PDL1, el ligando primario de PD1, se expresa con frecuencia en células
25 tumorales y células presentadoras de antígenos (APC), así como otras células, incluyendo linfocitos B. Se ha demostrado expresión significativa de PDL1 en diversos tumores humanos, incluyendo cánceres de cabeza y cuello asociados al VPH. PDL1 interactúa con PD1 en linfocitos T inhibiendo la activación de linfocitos T y lisis mediada por linfocitos T citotóxicos (CTL). La presente divulgación proporciona inmunoterapias según lo proporcionado en el presente documento en combinación con anticuerpo monoclonal anti-PD1 o anti-PDL1 para el tratamiento del Ébola.
30 La presente divulgación proporciona inmunoterapias según lo proporcionado en el presente documento en combinación con composiciones moleculares de PD1 o anti-PDL1 para el tratamiento del Ébola. La presente divulgación proporciona inmunoterapias según lo proporcionado en el presente documento en combinación con anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 y anti-PD1 para el tratamiento del Ébola. La presente divulgación proporciona inmunoterapias según lo proporcionado en el presente documento en combinación con anticuerpos monoclonales anti-
35 CTLA-4 y PDL1 para el tratamiento del Ébola. La presente divulgación proporciona inmunoterapias según lo proporcionado en el presente documento en combinación con anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4, anti-PD1, PDL1 o una combinación de los mismos, para el tratamiento del ébola.

Los linfocitos T pueden expresar moléculas de puntos de control inmunitarios. Las moléculas de puntos de control inmunitarios pueden actuar eficazmente como "frenos" para modular negativamente o inhibir una respuesta inmunitaria. Las moléculas de puntos de control inmunitarios incluyen, pero sin limitación, muerte programada 1 (PD1, también conocida como PDCD1 o CD279, número de referencia: NM 005018), antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4, también conocido como CD152, número de referencia de GenBank AF414120.1), LAG3 (también conocido como CD223, número de referencia: NM 002286.5), Tim3 (también conocido como HAVCR2, número de referencia de GenBank: JX049979.1), BTLA (también conocido como CD272, número de referencia: NM_181780.3), BY55 (también conocido como CD160, número de referencia de GenBank: CR541888.1), TIGIT (también conocido como IVSTM3, número de referencia: NM 173799), LAIR1 (también conocido como CD305, número de referencia de GenBank: CR542051.1), SIGLEC10 (número de referencia de GenBank: AY358337.1), 2B4 (también conocido como CD244, número de referencia: NM 001166664.1), PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, CD96, CRTAM, SIGLEC7,
50 SIGLEC9, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, TGFBRII, TGFRBRI, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, ILIORA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, GUCY1B3 que inhiben directamente las células inmunitarias. Por ejemplo, PD1 se puede combinar con una vacuna adenovírica de la presente invención para tratar a un paciente que lo necesite.

55 La **Tabla 1**, sin ser exhaustivo, muestra genes de puntos de control inmunitarios ilustrativos que pueden inactivarse para mejorar la eficacia de la vacuna adenovírica de la presente invención. El gen de puntos de control inmunitarios puede seleccionarse de genes de este tipo enumerados en la tabla 1 y otros implicados en la función de receptor coinhibidor, muerte celular, señalización de citocinas, falta de triptófano y arginina, señalización TCR, represión
60 inducida de T-reg, factores de transcripción que controlan el agotamiento o la anergia y tolerancia mediada por hipoxia.

Tabla 1

N.º de SEQ ID	Símbolo del gen	N.º del NCBI (GRCh38.p2)	Inicio	Parada	Ubicación en el genoma
1	ADORA2A	135	24423597	24442360	22q11.23
2	CD276	80381	73684281	73714518	15q23-q24
3	VTCN1	79679	117143587	117270368	1p13.1
4	BTLA	151888	112463966	112499702	3q13.2
5	CTLA4	1493	203867788	203873960	2q33
6	IDO1	3620	39913809	39928790	8p12-p11
7	KIR3DL1	3811	54816438	54830778	19q13.4
8	LAG3	3902	6772483	6778455	12p13.32
9	PDCD1	5133	241849881	241858908	2q37.3
10	HAVCR2	84868	157085832	157109237	5q33.3
11	VISTA	64115	71747556	71773580	10q22.1
12	CD244	51744	160830158	160862902	1q23.3
13	CISH	1154	50606454	50611831	3p21.3

La combinación de una vacuna basada en adenovirus y un modulador de punto de control de la ruta inmunitaria puede reducir la infección, progresión o síntomas del Ébola en pacientes tratados, en comparación con uno de los agentes solo. En otra realización de la presente invención, la combinación de una vacuna basada en adenovirus y un modulador de punto de control de la ruta inmunitaria puede mejorar la supervivencia general de los pacientes tratados, en comparación con uno de los agentes solo. En algunos casos, la combinación de una vacuna adenovírica y un modulador de punto de control de la ruta inmunitaria puede aumentar la frecuencia o intensidad de las respuestas de linfocitos T específicos del Ébola en pacientes tratados en comparación con uno de los agentes solo.

La presente divulgación también desvela el uso de la inhibición de puntos de control inmunitarios para mejorar el rendimiento de una vacuna basada en vectores adenovíricos. Dicha inhibición de puntos de control inmunitarios puede administrarse en el momento de la vacuna. Dicha inhibición de puntos de control inmunitarios también puede administrarse después de una vacuna. La inhibición de puntos de control inmunitarios puede producirse simultáneamente con una administración de vacuna adenovírica. La inhibición de puntos de control inmunitarios puede producirse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o 60 minutos después de la vacunación. La inhibición de puntos de control inmunitarios también puede producirse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas después de la vacunación. En algunos casos, la inhibición inmunitaria puede producirse 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días después de la vacunación. La inhibición de puntos de control inmunitarios puede producirse en cualquier momento antes o después de la vacunación.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una vacuna que comprende un antígeno y un modulador de punto de control de la ruta inmunitaria. La divulgación puede referirse a un método para tratar a un sujeto que tiene una afección que se beneficiaría de la regulación negativa de una proteína de punto de control inmunitario, PD1, por ejemplo, y su o sus compañeros de unión naturales en células del sujeto.

Un modulador de punto de control de la ruta inmunitaria puede combinarse con una vacuna adenovírica que comprenda cualquier antígeno. Por ejemplo, un antígeno puede ser GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L. Un modulador de punto de control de la ruta inmunitaria puede producir un efecto sinérgico cuando se combina con una vacuna. Un modulador de punto de control de la ruta inmunitaria también puede producir un efecto aditivo cuando se combina con una vacuna.

Formulaciones

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un régimen de vacunación que puede administrarse solo o junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, por cualquier vía, y dicha administración puede llevarse a cabo en dosis individuales y múltiples. Más en particular, la composición farmacéutica se puede combinar con diversos vehículos inertes farmacéuticamente aceptables en forma de comprimidos, cápsulas, pastillas para chupar, trociscos, caramelos de mano, polvos, pulverizaciones, suspensiones acuosas, soluciones inyectables, elixires, jarabes y similares. Dichos vehículos incluyen diluyentes sólidos o cargas, medios acuosos estériles y diversos disolventes orgánicos no tóxicos, etc. Por otra parte, dichas formulaciones farmacéuticas orales pueden endulzarse y/o aromatizarse adecuadamente por medio de diversos agentes del tipo habitualmente empleado para tales fines. Las composiciones descritas a lo largo del documento pueden formularse en un medicamento farmacéutico y usarse para tratar a un ser humano o mamífero, que lo necesite, al que se ha diagnosticado una enfermedad, p. ej., Ébola.

Para la administración, la reserva de vectores de adenovirus se puede combinar con un tampón adecuado, vehículo

fisiológicamente aceptable, excipiente o similares. En determinadas realizaciones, se administra un número adecuado de partículas de vector de virus (PV) en un tampón adecuado, tal como, PBS estéril o solución salina. En determinadas realizaciones, las composiciones de vectores víricos desveladas en el presente documento se proporcionan en formulaciones específicas para administración por vía subcutánea, por vía parenteral, por vía intravenosa, por vía intramuscular o incluso por vía intraperitoneal. En determinadas realizaciones, se pueden preparar formulaciones en una solución de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos, emulsión a base de escualeno, emulsiones de aceite en agua a base de escualeno, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua, emulsiones no acuosas, emulsión de agua en aceite de parafina y mezclas de los mismos y en aceites. En otras realizaciones, pueden proporcionarse vectores víricos en formulaciones específicas para administración en forma de píldora mediante ingestión o mediante supositorio.

Las formas farmacéuticas ilustrativas adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (véase, p. ej., patente de los Estados Unidos n.º 5.466.468). Se pueden preferir formas fluidas en la medida en que exista fácil inyectabilidad. Las formas que son estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento están dentro de los límites de la presente invención. En diversas realizaciones, las formas se conservan contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias, mohos y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (p. ej., glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y/o aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y/o mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede facilitar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y timerosal. Será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Puede obtenerse absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En una realización, para administración parenteral en una solución acuosa, la solución puede tamponarse adecuadamente si fuera necesario y el diluyente líquido en primer lugar hacerse isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los expertos en la materia conocerán, a la luz de la presente divulgación, un medio acuoso estéril que se puede emplear. Por ejemplo, una dosis puede disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y añadirse a 1000 ml de líquido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio propuesto de infusión. Puede producirse alguna variación en la dosificación dependiendo de la condición del sujeto que se trate.

Los vehículos de formulación pueden comprender todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción, tampones, soluciones transportadoras, suspensiones, coloides y similares. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar principios activos complementarios en las composiciones. GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y L.

En determinadas realizaciones, los vectores víricos de la invención pueden administrarse junto con uno o más inmunoestimulantes, tal como un adyuvante. Un inmunoestimulante se refiere esencialmente a cualquier sustancia que mejore o potencie una respuesta inmunitaria (mediada por anticuerpos y/o células) a un antígeno. Un tipo de inmunoestimulante comprende un adyuvante. Muchos adyuvantes contienen una sustancia diseñada para proteger el antígeno del catabolismo rápido, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral y un estimulante de respuestas inmunitarias, tales como lípido A, proteínas procedentes de *Bordetella pertussis* o *Mycobacterium tuberculosis*. Determinados adyuvantes están disponibles en el mercado como, por ejemplo, adyuvante incompleto y adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories); adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc.) AS-2 (SmithKline Beecham); sales de aluminio tales como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio; sales de calcio, hierro o zinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados; polisacáridos derivatizados catiónica o aniónicamente; polifosfacenos; microesferas biodegradables; monofosforil lípido A y quil A. También se pueden usar citocinas, tales como GM-CSF, IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 y/o IL-13, y otros, como factores de crecimiento, como adyuvantes.

En determinadas realizaciones, la composición adyuvante puede ser una que induzca una respuesta inmunitaria predominantemente del tipo Th1. Altos niveles de citocinas de tipo Th1 (p. ej., IFN- γ , TNF α , IL-2 e IL-12) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células a un antígeno administrado. Por el contrario, altos niveles de citocinas de tipo Th2 (p. ej., IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias humorales. Después de la aplicación de una vacuna según lo proporcionado en el presente documento, un paciente puede mantener una respuesta inmunitaria que incluye respuestas de tipo Th1 y/o Th2. En determinadas realizaciones, en las que una respuesta es predominantemente de tipo Th1, el nivel de citocinas de tipo Th1 aumentará en mayor medida que el nivel de citocinas de tipo Th2. Los niveles de estas citocinas pueden evaluarse fácilmente mediante ensayos normales. Por tanto, diversas realizaciones de la invención se refieren a terapias que inducen una respuesta inmunitaria contra un antígeno diana, por ejemplo, las SEQ. ID. NO.:1, SEQ. ID. NO.:2, SEQ. ID. NO.:4,

SEQ. ID. NO.:5 o SEQ. ID. NO.:6 usando citocinas, p. ej., IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 y/o IL-13 suministradas simultáneamente con un tratamiento de vector vírico defectuoso en replicación. En algunas realizaciones, una citocina o un ácido nucleico que codifica una citocina, se administra junto con un vírico defectuoso en replicación descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, se realiza administración de

5 citocinas antes o después de la administración del vector vírico. En algunas realizaciones, un vector vírico defectuoso en replicación capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno diana, por ejemplo, SEQ. ID. NO.:1, SEQ. ID. NO.:2, SEQ. ID. NO.:4, SEQ. ID. NO.:5 o SEQ. ID. NO.:6 comprende además una secuencia que codifica una citocina.

10 Determinados adyuvantes ilustrativos para inducir una respuesta predominantemente de tipo Th1 incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A, tal como monofosforil lípido A 3-des-O-acilado, junto con una sal de aluminio. Están disponibles en el mercado adyuvantes MPL®. Los oligonucleótidos que contienen CpG (en los que el dinucleótido CpG no está metilado) también inducen una respuesta predominantemente Th1. Dichos oligonucleótidos son bien conocidos y se describen. También se describen secuencias de ADN inmunoestimulantes.

15 Otro adyuvante para su uso en la presente invención comprende una saponina, tal como Quil A, o derivados de la misma, incluyendo QS21 y QS7; escina; digitonina; o saponinas de *Gypsophila* o *Chenopodium quinoa*. Otras formulaciones pueden incluir más de una saponina en las combinaciones adyuvantes de la presente invención, por ejemplo, combinaciones de al menos dos del siguiente grupo que comprende QS21, QS7, Quil A, β -escina o digitonina.

20 En determinadas realizaciones, las composiciones pueden administrarse mediante pulverizaciones intranasales, inhalación y/u otros vehículos de administración de aerosoles. La administración de fármacos usando resinas de micropartículas intranasales y compuestos de lisofosfatidilglicerol (patente de los Estados Unidos n.º 5.725.871) son bien conocidos en la técnica farmacéutica. De manera análoga, se describe la administración transmucosa ilustrativa de fármaco en forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno.

25 En determinadas realizaciones, se usan liposomas, nanocápsulas, micropartículas, partículas lipídicas, vesículas y similares para la introducción de las composiciones de la presente invención en células/organismos hospedadores adecuados. En particular, las composiciones de la presente invención pueden formularse para administración encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera o una nanopartícula o similares.

30 Como alternativa, las composiciones de la presente invención pueden unirse, de manera covalente o no covalente, a la superficie de dichos vehículos transportadores.

La formación y el uso de liposomas y preparaciones de tipo liposómico como posibles vehículos farmacológicos son conocidos en general por los expertos en la materia (véase, Lasic, Trends Biotechnol julio de 1998; 16(7): 307-21; Takakura, Nippon Rinsho marzo de 1998; 56(3): 691-5; Chandran *et al.*, Indian J Exp Biol. agosto de 1997; 35(8): 801-9; Margalit, Crit. Rev Ther Drug Carrier Syst. 1995; 12 (2-3): 233-61; patente de los Estados Unidos n.º 5.567.434; patente de los Estados Unidos n.º 5.552.157; patente de los Estados Unidos n.º 5.565.213; patente de los Estados Unidos n.º 5.738.868 y patente de los Estados Unidos n.º 5.795.587).

35

40 Se han usado con éxito liposomas con varios tipos celulares que son normalmente difíciles de transfectar mediante otros procedimientos, incluyendo suspensiones de linfocitos T, cultivos de hepatocitos primarios y células PC 12. Los liposomas se han usado eficazmente para introducir genes, diversos fármacos, agentes radioterapéuticos, enzimas, virus, factores de transcripción, efectores alostéricos y similares, en diversas líneas celulares cultivadas y animales. Asimismo, el uso de liposomas no parece estar asociado con respuestas autoinmunitarias o toxicidad inaceptable

45 después de la administración sistémica.

En determinadas realizaciones, se forman liposomas a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas de bicapas concéntricas multilaminares (denominadas también vesículas multilaminares (MLV)).

50

Como alternativa, en otras realizaciones, la invención proporciona formulaciones de nanocápsulas farmacéuticamente aceptables de las composiciones de la presente invención. Las nanocápsulas pueden en general inmovilizar compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debidos a la sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (de un tamaño de aproximadamente 0,1 μ m) deben diseñarse usando

55 polímeros que pueden degradarse *in vivo*. Dichas partículas pueden prepararse como se describe en Couvreur *et al.*, Crit. Rev Ther Drug Carrier Syst. 1988; 5 (1): 1-20; zur Muhlen *et al.*, Eur J Pharm Biopharm. marzo de 1998; 45 (2): 149-55; Zambaux *et al.* J Controlled Release. 2 de enero de 1998; 50 (1-3): 31-40; y la patente de los Estados Unidos n.º 5.145.684.

60 **MÉTODOS**

Las composiciones y los métodos de la invención, en diversas realizaciones, aprovechan linfocitos T citolíticos (CTL) humanos, como los que reconocen los epítomos GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L que se unen con moléculas del MHC seleccionadas, p. ej., HLA-A2, A3 y A24. Los individuos que expresan moléculas del MHC de determinados

65 serotipos, p. ej., HLA-A2, A3 y A24 pueden seleccionarse para terapia que usa los métodos y las composiciones de la invención. Por ejemplo, los individuos que expresan moléculas del MHC de determinados serotipos, p. ej., HLA-A2,

A3 y A24, pueden seleccionarse para una terapia que incluye inducir una respuesta inmunitaria contra GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L, usando los métodos y las composiciones descritos en el presente documento.

5 En diversas realizaciones, estos linfocitos T pueden generarse mediante cultivos *in vitro* que usan células presentadoras de antígenos expuestas al epítipo de interés para estimular células mononucleares de sangre periférica. Además, también se pueden generar líneas de linfocitos T después de estimulación con perlas de látex de GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L, células mononucleares de sangre periférica adherentes a plástico estimuladas con proteína GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L, o CD sensibilizadas con ARN de GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L. También se pueden generar linfocitos T a partir de pacientes inmunizados con un vector de
10 vacuna que codifica inmunógeno de GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L. Los péptidos presentados por HLA A2 de GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L se pueden encontrar además en pacientes infectados con Ébola. En diversas realizaciones, la invención se refiere a un epítipo restringido a HLA A2 de GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L, con capacidad para estimular CTL de pacientes inmunizados con vacuna-GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L.

15 **Métodos de tratamiento**

Los vectores de adenovirus de la presente invención se pueden usar en varios entornos de vacuna para generar una respuesta inmunitaria contra uno o más antígenos diana como se describe en el presente documento. La presente
20 invención proporciona métodos para generar una respuesta inmunitaria contra cualquier antígeno diana, tales como los descritos en otra parte del presente documento. Los vectores de adenovirus son particularmente importantes debido al hallazgo inesperado de que pueden usarse para generar respuestas inmunitarias en sujetos que tienen inmunidad preexistente a Ad y pueden usarse en regímenes de vacunación que incluyen múltiples ciclos de inmunización usando los vectores de adenovirus, regímenes no posibles usando vectores de adenovirus de
25 generaciones anteriores.

En general, la generación de una respuesta inmunitaria comprende la inducción de una respuesta humoral y/o una respuesta mediada por células. Puede ser deseable aumentar una respuesta inmunitaria contra un antígeno diana de interés. La generación de una respuesta inmunitaria puede implicar una disminución de la actividad y/o el número de
30 determinadas células del sistema inmunitario o una disminución del nivel y/o la actividad de determinadas citocinas u otras moléculas efectoras. Se conocen en la técnica diversos métodos para detectar alteraciones en una respuesta inmunitaria (p. ej., números de células, expresión de citocinas, actividad celular) y son útiles en el contexto de la presente invención. Los métodos ilustrativos útiles en este contexto incluyen la tinción de citocinas intracelulares (TCI), ELISpot, ensayos de proliferación, ensayos de linfocitos T citotóxicos incluyendo ensayos de liberación de cromo o
35 equivalentes y análisis de expresión génica usando cualquiera de varios ensayos basados en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o RT-PCR.

La generación de una respuesta inmunitaria puede comprender un aumento de la actividad de CTL específica de antígeno diana de entre 1,5 y 5 veces en un sujeto al que se administraron los vectores de adenovirus de la invención
40 en comparación con un control. En otra realización, la generación de una respuesta inmunitaria comprende un aumento de la actividad de CTL específica de diana de aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más veces en un sujeto al que se han administrado los vectores de adenovirus en comparación con un control.

La generación de una respuesta inmunitaria puede comprender un aumento en la actividad de HTL específica de antígeno diana, tal como proliferación de linfocitos T auxiliares, de entre 1,5 y 5 veces en un sujeto al que se han
45 administrado los vectores de adenovirus de la invención que comprenden ácido nucleico que codifica el antígeno diana en comparación con un control adecuado. En otra realización, la generación de una respuesta inmunitaria comprende un aumento de la actividad de HTL específica de diana de aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5,
50 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más veces en comparación con un control. En este contexto, la actividad de HTL puede comprender un aumento como se ha descrito anteriormente, o disminución, de la producción de una citocina en particular, tal como interferón- γ (IFN- γ), interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) u otra citocina. En este sentido, la generación de una respuesta
55 inmunitaria puede comprender un cambio de una respuesta de tipo Th2 a una respuesta de tipo Th1 o en determinadas realizaciones un cambio de una respuesta de tipo Th1 a una respuesta de tipo Th2. En otras realizaciones, la generación de una respuesta inmunitaria puede comprender la estimulación de una respuesta de tipo predominantemente Th1 o Th2.

La generación de una respuesta inmunitaria puede comprender un aumento de la producción de anticuerpos específicos de diana de entre 1,5 y 5 veces en un sujeto al que se han administrado los vectores de adenovirus de la
60 presente invención en comparación con un control adecuado. En otra realización, la generación de una respuesta inmunitaria comprende un aumento de la producción de anticuerpos específicos de diana de aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más veces en un sujeto al que se ha administrado el vector de adenovirus en comparación con un control.

Por tanto, la presente divulgación proporciona métodos para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno diana de interés que comprende administrar al individuo un vector de adenovirus que comprende: a) un vector de adenovirus defectuoso en replicación, en donde el vector de adenovirus tiene una supresión en la región E2b y b) un ácido nucleico que codifica el antígeno diana; y readministrar el vector de adenovirus al menos una vez al individuo; generándose de este modo una respuesta inmunitaria contra el antígeno diana. En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona métodos en donde el vector administrado no es un vector destripado. En realizaciones particulares, el antígeno diana puede ser una proteína de tipo silvestre, un fragmento, una variante o un fragmento de variante de la misma. En algunas realizaciones, el antígeno diana comprende GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24, L, un fragmento, una variante o un fragmento de variante de los mismos.

En una realización adicional, la presente invención proporciona métodos para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno diana en un individuo, en donde el individuo tiene inmunidad preexistente contra Ad, administrando al individuo un vector de adenovirus que comprende: a) un vector de adenovirus defectuoso en replicación, en donde el vector de adenovirus tiene una supresión en la región E2b y b) un ácido nucleico que codifica el antígeno diana; y readministrar el vector de adenovirus al menos una vez al individuo; generándose de este modo una respuesta inmunitaria contra el antígeno diana. En realizaciones particulares, el antígeno diana puede ser una proteína de tipo silvestre, un fragmento, una variante o un fragmento de variante de los mismos. En algunas realizaciones, el antígeno diana comprende GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24, L, un fragmento, una variante o un fragmento de variante de los mismos.

Con respecto a la inmunidad preexistente contra Ad, esta se puede determinar usando métodos conocidos en la técnica, tales como ensayos basados en anticuerpos para determinar la presencia de anticuerpos contra Ad. Además, en determinadas realizaciones, los métodos de la presente invención incluyen, en primer lugar, determinar que un individuo tiene inmunidad preexistente contra Ad y después administrar los vectores de adenovirus con supresión de E2b de la invención como se describe en el presente documento.

Una realización de la divulgación proporciona un método para generar una respuesta inmunitaria contra uno o más antígenos diana en un individuo que comprende administrar al individuo un primer vector de adenovirus que comprende un vector de adenovirus defectuoso en replicación, en donde el vector de adenovirus tiene una supresión en la región E2b y un ácido nucleico que codifica al menos un antígeno diana; administrar al individuo un segundo vector de adenovirus que comprende un vector de adenovirus defectuoso en replicación, en donde el vector de adenovirus tiene una supresión en la región E2b y un ácido nucleico que codifica al menos un antígeno diana, en donde el al menos un antígeno diana del segundo vector de adenovirus es igual o diferente del al menos un antígeno diana del primer vector de adenovirus. En realizaciones particulares, el antígeno diana puede ser una proteína de tipo silvestre, un fragmento, una variante o un fragmento de variante de los mismos. En algunas realizaciones, el antígeno diana comprende GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24, L, un fragmento, una variante o un fragmento de variante de los mismos.

Por tanto, la presente invención contempla múltiples inmunizaciones con el mismo vector de adenovirus con supresión de E2b o inmunizaciones múltiples con diferentes vectores de adenovirus con supresión de E2b. En cada caso, los vectores de adenovirus pueden comprender secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más antígenos diana como se describe en otra parte del presente documento. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden múltiples inmunizaciones con un adenovirus con supresión de E2b que codifica un antígeno diana y nueva administración del mismo vector de adenovirus múltiples veces, induciendo de este modo una respuesta inmunitaria contra el antígeno diana. En algunas realizaciones, el antígeno diana comprende GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24, L, un fragmento, una variante o un fragmento de variante de los mismos.

En una realización adicional, los métodos comprenden inmunización con un primer vector de adenovirus que codifica uno o más antígenos diana y después la administración con un segundo vector de adenovirus que codifica uno o más antígenos diana que pueden ser iguales o diferentes a los antígenos codificados por el primer vector de adenovirus. En este sentido, uno de los antígenos diana codificados puede ser diferente o todos los antígenos codificados pueden ser diferentes, o algunos pueden ser iguales y algunos pueden ser diferentes. Además, en determinadas realizaciones, los métodos incluyen administrar el primer vector de adenovirus múltiples veces y administrar el segundo adenovirus múltiples veces. En este sentido, los métodos comprenden administrar el primer vector de adenovirus 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más veces y administrar el segundo vector de adenovirus 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más veces. El orden de administración puede comprender administrar el primer adenovirus una o múltiples veces seguidas, seguido de administrar el segundo vector de adenovirus una o múltiples veces seguidas. En determinadas realizaciones, los métodos incluyen alternar la administración del primer y el segundo vector de adenovirus como una administración de cada uno, dos administraciones de cada uno, tres administraciones de cada uno y así sucesivamente. En determinadas realizaciones, el primer y el segundo vector de adenovirus se administran simultáneamente. En otras realizaciones, el primer y el segundo vector de adenovirus se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, el antígeno diana comprende GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24, L, un fragmento, una variante o un fragmento de variante de los mismos.

Como entendería fácilmente el experto en la materia, se pueden usar más de dos vectores de adenovirus en los métodos de la presente divulgación. Se pueden usar 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más vectores de adenovirus diferentes en

los métodos de la divulgación. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden administrar más de un vector de adenovirus con supresión de E2b a la vez. En este sentido, se pueden generar respuestas inmunitarias contra múltiples antígenos diana de interés administrando múltiples vectores de adenovirus diferentes simultáneamente, comprendiendo cada uno secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más antígenos diana.

5 También se proporcionan métodos para tratar o aliviar los síntomas del Ébola. Los métodos de tratamiento comprenden administrar los vectores de adenovirus una o más veces a individuos que padecen una infección por Ébola o en riesgo de padecer una infección por Ébola como se describe en el presente documento. Como tal, la presente invención proporciona métodos para vacunar contra el Ébola en individuos que están en riesgo de infectarse con dicho virus. Las personas en riesgo pueden ser individuos que pueden exponerse al Ébola en algún momento o que han estado expuestas previamente pero que aún no tienen síntomas de infección por Ébola o que son particularmente susceptibles a una infección por Ébola. Se puede determinar que los individuos que padecen una infección por Ébola expresan y/o presentan un antígeno diana, que puede usarse para guiar las terapias del presente documento. Por ejemplo, se puede encontrar un ejemplo para expresar y/o presentar un antígeno diana y un vector de adenovirus que codifica el antígeno diana, una variante, un fragmento o un fragmento de variante del mismo puede administrarse posteriormente.

La presente divulgación contempla el uso de vectores de adenovirus para la administración *in vivo* de ácidos nucleicos que codifican un antígeno diana, o un fragmento, una variante o un fragmento de variante del mismo. Una vez inyectada en un sujeto, la secuencia de ácido nucleico se expresa dando lugar a una respuesta inmunitaria contra el antígeno codificado por la secuencia. La vacuna del vector de adenovirus se puede administrar en una "cantidad eficaz", es decir, una cantidad de vector de adenovirus que es eficaz en una o más vías de administración seleccionadas para inducir una respuesta inmunitaria como se describe en otra parte del presente documento. Una cantidad eficaz puede inducir una respuesta inmunitaria eficaz para facilitar la protección o el tratamiento del hospedador contra el Ébola diana. La cantidad de vector en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunitaria, inmunoprotectora u otra inmunoterapéutica sin efectos adversos significativos asociados en general con vacunas habituales. Una vez vacunados, los sujetos pueden supervisarse para determinar la eficacia del tratamiento con la vacuna. Se puede realizar supervisión de la eficacia de vacunación mediante cualquier método conocido por una persona experta habitual en la técnica. En algunas realizaciones, se pueden analizar muestras de sangre o líquido para detectar niveles de anticuerpos. En otras realizaciones, se pueden realizar ensayos de ELISpot para detectar una respuesta inmunitaria mediada por células de células sanguíneas en circulación o de células de tejido linfóide.

Las vías y frecuencia de administración de las composiciones terapéuticas descritas en el presente documento, así como la dosificación, pueden variar entre individuos y entre enfermedades, y pueden establecerse fácilmente usando técnicas convencionales. En general, las composiciones farmacéuticas y vacunas pueden administrarse mediante inyección (p. ej., intracutánea, intramuscular, intravenosa o subcutánea), por vía intranasal (p. ej., por aspiración), en forma de píldora (p. ej., ingestión, supositorio para administración vaginal o rectal). En determinadas realizaciones, se pueden administrar entre 1 y 10 dosis durante un periodo de 52 semanas. En determinadas realizaciones, se administran 6 dosis, a intervalos de 1 mes, y a continuación se pueden administrar vacunas de refuerzo adicionales periódicamente. Los protocolos alternativos pueden ser adecuados para pacientes individuales. Como tales, se pueden administrar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más dosis durante un periodo de 1 año o durante periodos más cortos o más largos, tal como durante periodos de 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 semanas. Las dosis se pueden administrar a intervalos de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas o intervalos más largos.

Se puede infundir una vacuna durante un periodo de menos de aproximadamente 4 horas y, más preferentemente, durante un periodo de menos de aproximadamente 3 horas. Por ejemplo, los primeros 25-50 mg podrían infundirse en 30 minutos, preferentemente incluso 15 minutos, y el resto se infunden durante las siguientes 2-3 horas. Más en general, la dosis de una construcción de vacuna administrada se puede administrar como una dosificación cada 2 o 3 semanas, repetida para un total de al menos 3 dosis. Por otro lado, la construcción se puede administrar dos veces a la semana durante 4-6 semanas. El programa de dosificación se puede repetir opcionalmente a otros intervalos y la dosis puede administrarse a través de diversas vías parenterales, con el ajuste adecuado de la dosis y la pauta. Las composiciones de la presente invención se pueden administrar a un paciente junto con (p. ej., antes, simultáneamente o después de) cualquiera de varias modalidades de tratamiento relevantes.

Una dosis adecuada es una cantidad de un vector de adenovirus que, cuando se administra como se ha descrito anteriormente, es capaz de promover una respuesta inmunitaria a antígeno diana como se describe en otra parte del presente documento. En determinadas realizaciones, la respuesta inmunitaria es al menos 10-50 % mayor que el nivel basal (es decir, sin tratar). En determinadas realizaciones, la respuesta inmunitaria es al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 110, 125, 150, 200, 250, 300, 400, 500 o más sobre el nivel basal. Dicha respuesta se puede supervisar midiendo los anticuerpos de antígeno o antígenos diana en un paciente o mediante la generación dependiente de la vacuna de células efectoras citolíticas capaces de destruir células infectadas del paciente *in vitro*, u otros métodos conocidos en la técnica para supervisar las respuestas inmunitarias. Dichas vacunas también deberían ser capaces de provocar una respuesta inmunitaria que conduzca a una mejora del resultado clínico de la enfermedad en cuestión en pacientes vacunados en comparación con pacientes

sin vacunar. En algunas realizaciones, la mejora del resultado clínico comprende el tratamiento de la enfermedad, la reducción de los síntomas de una enfermedad, el cambio de la progresión de una enfermedad o la prolongación de la vida.

- 5 En general, un régimen de dosificación y tratamiento adecuado proporciona los vectores de adenovirus en una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico y/o profiláctico. Dicha respuesta se puede supervisar estableciendo un resultado clínico mejorado para la enfermedad en particular que se trate en pacientes tratados en comparación con pacientes sin tratar. Los datos de supervisión se pueden evaluar a lo largo del tiempo. La progresión de una enfermedad a lo largo del tiempo puede alterarse. Dichas mejoras en el resultado clínico serían fácilmente reconocidas por un médico tratante. Los aumentos de respuestas inmunitarias preexistentes a una proteína diana generalmente se pueden correlacionar con un mejor resultado clínico. Dichas respuestas inmunitarias generalmente se pueden evaluar usando ensayos convencionales de proliferación, citotoxicidad o citocinas, que pueden realizarse usando muestras obtenidas de un paciente antes y después del tratamiento.
- 10
- 15 Aunque una ventaja de la presente invención es la capacidad de administrar múltiples vacunas con el mismo o diferentes vectores de adenovirus, en particular en individuos con inmunidad preexistente contra el Ad, las vacunas adenovíricas de la presente invención también se pueden administrar como parte de un régimen de sensibilización y refuerzo. Un esquema de inoculación de modalidad mixta de sensibilización y refuerzo puede dar lugar a una mejora de la respuesta inmunitaria. Por tanto, un aspecto de la presente invención es un método para sensibilizar a un sujeto con una vacuna plasmídica, tal como un vector plasmídico que comprende un antígeno diana de interés, administrando la vacuna plasmídica al menos una vez, permitiendo que pase un periodo de tiempo predeterminado y reforzando después mediante la administración del vector de adenovirus. Se pueden emplear múltiples sensibilizaciones, p. ej., 1-4, aunque se pueden usar más. El periodo de tiempo entre la sensibilización y el refuerzo puede variar normalmente de aproximadamente cuatro meses a un año, pero se pueden usar otros plazos. En determinadas realizaciones, los sujetos pueden sensibilizarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces con vacunas de plásmidos y después reforzarse 4 meses después con el vector de adenovirus.
- 20
- 25

Selección de pacientes

- 30 Diversas realizaciones se refieren a composiciones y métodos para aumentar una respuesta inmunitaria contra uno o más antígenos de las SEQ. ID. NO.:1, SEQ. ID. NO.:2, SEQ. ID. NO.:4, SEQ. ID. NO.:5 o SEQ. ID. NO.:6 en poblaciones de pacientes seleccionadas. Puede administrarse cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento a un individuo. "Individuo" puede usarse indistintamente con "sujeto" o "paciente". Un individuo puede ser un mamífero, por ejemplo, un ser humano o animal tal como un primate no humano, un roedor, un conejo, una rata, un ratón, un caballo, un burro, una cabra, un gato, un perro, una vaca, un cerdo o una oveja. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano. En algunas realizaciones, el individuo es un feto, un embrión o un niño. En algunos casos, las composiciones proporcionadas en el presente documento se administran a una célula *ex vivo*. En algunos casos, las composiciones proporcionadas en el presente documento se administran a un individuo como un método para tratar una infección por Ébola.
- 35
- 40 En algunos casos, un sujeto no tiene una infección por Ébola. En algunos casos, el tratamiento se administra antes de una infección por Ébola. Un sujeto puede tener una infección por Ébola no detectada. Un sujeto puede tener una carga baja de infección por Ébola. Un sujeto también puede tener una carga alta de infección por Ébola.
- 45 En algunas realizaciones, puede ser necesario que los pacientes hayan recibido y, opcionalmente, progresado a través de otras terapias. En algunos casos, la negativa del individuo a aceptar dichas terapias puede permitir que el paciente sea incluido en un grupo elegible para terapia con métodos y composiciones. En algunas realizaciones, puede ser necesario que los individuos que reciben terapia que usa los métodos y las composiciones tengan una esperanza de vida estimada de, al menos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 18, 21 o 24 meses. El grupo de pacientes para recibir una terapia que usa los métodos y las composiciones de la invención puede estar limitado por la edad. Por ejemplo, individuos mayores de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 25, 30, 35, 40, 50, 60 o más años de edad pueden ser elegibles para terapia con los métodos y las composiciones de la invención. Como otro ejemplo, los individuos menores de 75, 70, 65, 60, 55, 50, 40, 35, 30, 25, 20 o menos años de edad pueden ser elegibles para terapia con los métodos y las composiciones de la invención.
- 50
- 55 En algunas realizaciones, los pacientes que reciben terapia que usa los métodos y las composiciones están limitados a individuos con función hematológica adecuada, por ejemplo, con uno o más recuentos de glóbulos blancos de al menos 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 o más por microlitro, un nivel de hemoglobina de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más g/dl, un recuento de plaquetas de al menos 50.000; 60.000; 70.000; 75.000; 90.000; 100.000; 110.000; 120.000; 130.000; 140.000; 150.000 o más por microlitro; con un valor de PT-INR menor o igual a 0,8, 1,0, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,8, 2,0, 2,5, 3,0 o superior, un valor de PTT menor de o igual a 1,2, 1,4, 1,5, 1,6, 1,8, 2,0 X ULN o más. En diversas realizaciones, los límites del indicador de la función hematológica se eligen de manera diferente para individuos en diferentes grupos de sexo y edad, por ejemplo, 0-5, 5-10, 10-15, 15-18, 18-21, 21-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80 o mayores de 80.
- 60
- 65 En diversas realizaciones, se pueden recoger muestras, por ejemplo, muestras de suero u orina, de los individuos o

individuos candidatos para una terapia que usa los métodos y las composiciones. Se pueden recoger muestras antes, durante y/o después de la terapia, por ejemplo, en las últimas 2, 4, 6, 8, 10 semanas antes del inicio de la terapia, en un plazo de 1 semana, 10 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas desde el inicio de la terapia, en las últimas 2, 4, 6, 8, 10 semanas antes del inicio de la terapia, en un plazo de 1 semana, 10 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 9 semanas o 12 semanas desde el inicio de la terapia, en intervalos de 1 semana, 10 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 9 semanas o 12 semanas durante la terapia, en intervalos de 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años después de la terapia, durante un periodo de 6 meses, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 años o más. Las muestras se pueden probar para determinar cualquiera de los indicadores de función hematológica, renal o hepática descritos en el presente documento, así como otros adecuados conocidos en la técnica, por ejemplo, un β -HCG para mujeres con posibilidad de quedarse embarazadas. En ese sentido, las pruebas hematológicas y bioquímicas, incluyendo hemogramas con fórmula leucocitaria, PT, INR y PTT, pruebas de medición de Na, K, Cl, CO₂, BUN, creatinina, Ca, proteína total, albúmina, bilirrubina total, fosfatasa alcalina, AST, ALT y glucosa están dentro de los límites de la invención. En algunas realizaciones, la presencia o la cantidad de anticuerpos contra el VIH, BsAg de hepatitis o anticuerpo contra la hepatitis C se determinan en una muestra de individuos o individuos candidatos para una terapia que usa los métodos y las composiciones de la invención. Los marcadores biológicos, tales como anticuerpos contra las SEQ. ID. NO.:1, SEQ. ID. NO.:2, SEQ. ID. NO.:4, SEQ. ID. NO.:5, SEQ. ID. NO.:6 o los anticuerpos neutralizantes para el vector de Ad5 se pueden analizar en una muestra, tal como suero, de individuos o individuos candidatos para una terapia que usa los métodos y las composiciones. En algunos casos, una o más muestras, tal como una muestra de sangre se puede recolectar y archivar de individuos o individuos candidatos para una terapia que usa los métodos y las composiciones. Las muestras recogidas se pueden ensayar para evaluación inmunológica. Los individuos o individuos candidatos para una terapia que usa los métodos y las composiciones pueden evaluarse en estudios de captura de imágenes, por ejemplo, usando exploraciones de TC o IRM del tórax, el abdomen o la pelvis. Los estudios de captura de imágenes se pueden realizar antes, durante o después de la terapia que usa los métodos y las composiciones de la invención, durante y/o después de la terapia, por ejemplo, en las últimas 2, 4, 6, 8, 10 semanas antes del inicio de la terapia, en un plazo de 1 semana, 10 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas desde el inicio de la terapia, en las últimas 2, 4, 6, 8, 10 semanas antes del inicio de la terapia, en un plazo de 1 semana, 10 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 9 semanas o 12 semanas desde el inicio de la terapia, en intervalos de 1 semana, 10 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 9 semanas o 12 semanas durante la terapia, en intervalos de 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años después de la terapia, en un plazo de 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años o más después de la terapia, durante un periodo de 6 meses, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 años o más.

Dosificaciones y administración

Las composiciones y los métodos de la divulgación contemplan diversos regímenes de dosificación y administración durante la terapia. Los pacientes pueden recibir uno o más adenovirus o vectores de adenovirus defectuosos en replicación, por ejemplo, Ad5 [E1-, E2B-]-SEQ. ID. NO.:1, Ad5 [E1-, E2B-]-SEQ. ID. NO.:2, Ad5 [E1-, E2B-]-SEQ. ID. NO.:4, Ad5 [E1-, E2B-]-SEQ. ID. NO.:5, Ad5 [E1-, E2B-]-SEQ. ID. NO.:6 que son capaces de inducir una respuesta inmunitaria en un individuo contra un antígeno objetivo descrito en el presente documento, por ejemplo, las SEQ. ID. NO.:1, SEQ. ID. NO.:2, SEQ. ID. NO.:4, SEQ. ID. NO.:5 o SEQ. ID. NO.:6. En diversas realizaciones, el adenovirus defectuoso en replicación se administra a una dosis que es adecuada para afectar a dicha respuesta inmunitaria. En algunos casos, el adenovirus defectuoso en replicación se administra a una dosis que es mayor o igual a 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , $1,5 \times 10^{12}$, 2×10^{12} , 3×10^{12} o más partículas víricas (PV) por inmunización. En algunos casos, el adenovirus defectuoso en replicación se administra a una dosis que es menor o igual a 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , $1,5 \times 10^{12}$, 2×10^{12} , 3×10^{12} o más partículas víricas por inmunización. En diversas realizaciones, una dosis deseada descrita en el presente documento se administra en un volumen adecuado de tampón de formulación, por ejemplo, un volumen de aproximadamente 0,1-10 ml, 0,2-8 ml, 0,3-7 ml, 0,4-6 ml, 0,5-5 ml, 0,6-4 ml, 0,7-3 ml, 0,8-2 ml, 0,9-1,5 ml, 0,95-1,2 ml o 1,0-1,1 ml. Los expertos en la materia aprecian que el volumen puede quedar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores (p. ej., de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 1,1 ml). La administración de partículas víricas puede ser a través de diversas rutas adecuadas para suministro, por ejemplo, puede ser por inyección (p. ej., por vía intracutánea, por vía intramuscular, por vía intravenosa o por vía subcutánea), por vía intranasal (p. ej., por aspiración), en forma de píldora (p. ej., ingestión, supositorio para administración vaginal o rectal. En algunas realizaciones, se puede preferir una administración subcutánea y puede ofrecer mayor acceso a las células dendríticas.

La administración de partículas víricas a un individuo puede repetirse. Los suministros repetidos de partículas víricas pueden seguir una pauta o, como alternativa, se pueden realizar según sea necesario. Por ejemplo, la inmunidad del individuo contra un antígeno diana, por ejemplo, las SEQ. ID. NO.: 1, SEQ. ID. NO.:2, SEQ. ID. NO.:4, SEQ. ID. NO.:5 o SEQ. ID. NO.:6 se puede probar y reponer según sea necesario con suministros adicionales. En algunas realizaciones, las pautas de suministro incluyen la administración de partículas víricas a intervalos regulares. Los regímenes de suministro conjuntos pueden estar diseñados para comprender uno o más de un periodo con una pauta

y/o un periodo de administración basada en la necesidad evaluada antes de la administración. Por ejemplo, un régimen de terapia puede incluir una administración, tal como administración subcutánea una vez cada tres semanas y después otro tratamiento de inmunoterapia cada tres meses hasta que se retire de la terapia por cualquier motivo, incluyendo muerte. Otro régimen ilustrativo comprende tres administraciones cada tres semanas y después otro conjunto de tres tratamientos de inmunoterapia cada tres meses. Otro régimen ilustrativo comprende un primer periodo con un primer número de administraciones a una primera frecuencia, un segundo periodo con un segundo número de administraciones a una segunda frecuencia, un tercer periodo con un tercer número de administraciones a una tercera frecuencia, etc., y opcionalmente uno o más periodos con un número indeterminado de administraciones según sea necesario. El número de administraciones en cada periodo se puede seleccionar de manera independiente y puede ser, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más. La frecuencia de la administración en cada periodo también se puede seleccionar de manera independiente, por ejemplo, puede ser aproximadamente todos los días, cada dos días, cada tres días, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, cada tres semanas, cada mes, cada seis semanas, cada dos meses, cada tres meses, cada cuatro meses, cada cinco meses, cada seis meses, una vez al año, etc. La terapia puede durar un periodo total de hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 30, 36 meses o más. El intervalo programado entre inmunizaciones puede modificarse de modo que el intervalo entre inmunizaciones se revise hasta en un quinto, un cuarto, un tercio o la mitad del intervalo. Por ejemplo, para una pauta de intervalos de 3 semanas, una inmunización puede repetirse entre 20 y 28 días (3 semanas -1 día a 3 semanas +7 días). Para las primeras 3 inmunizaciones, si la segunda y/o tercera inmunización se retrasa, las inmunizaciones posteriores pueden cambiarse permitiendo una cantidad mínima de tampón entre inmunizaciones. Por ejemplo, para una pauta de intervalos de tres semanas, si una inmunización se retrasa, la inmunización posterior puede programarse para que se realice no antes de 17, 18, 19 o 20 días después de la inmunización previa.

Las composiciones de la invención, tales como vectores y partículas víricas Ad5 [E1-, E2B-]-SEQ. ID. NO.: 1, Ad5 [E1-, E2B-]-SEQ. ID. NO.:2, Ad5 [E1-, E2B-]-SEQ. ID. NO.:4, Ad5 [E1-, E2B-]-SEQ. ID. NO.:5 y Ad5 [E1-, E2B-]-SEQ. ID. NO.:6 producidos usando estos vectores, se puede proporcionar en diversos estados, por ejemplo, a temperatura ambiente, en hielo o congelado. Las composiciones se pueden proporcionar en un recipiente de un tamaño adecuado, por ejemplo, un vial de vial de 2 ml. En una realización, 1 vial de 2 ml con 1,0 ml de vacuna extraíble contiene 5×10^{11} partículas víricas totales/ml. Las condiciones de almacenamiento, incluyendo la temperatura y la humedad, pueden variar. Por ejemplo, las composiciones para su uso en terapia pueden almacenarse a temperatura ambiente, 4 °C, -20 °C o menos.

En diversas realizaciones, se realizan evaluaciones generales de los individuos que reciben tratamiento según los métodos y las composiciones de la invención. Se pueden realizar una o más de cualquier prueba según sea necesario o de manera programada, tal como en las semanas 0, 3, 6, etc. Se puede realizar un conjunto diferente de pruebas simultáneamente con la inmunización frente a momentos sin inmunización.

Las evaluaciones generales pueden incluir uno o más antecedentes médicos, puntuación de rendimiento de ECOG, estado de rendimiento de Karnofsky y examen físico completo con peso por el médico tratante. Se puede registrar cualquier otro tratamiento, medicamento, producto biológico o hemoderivado que el paciente recibe o ha recibido desde la última visita. Los pacientes pueden seguirse en la clínica por un periodo adecuado, por ejemplo, aproximadamente 30 minutos, después de recibir la vacuna para supervisar cualquier reacción adversa. La reactividad local y sistémica después de cada dosis de vacuna se evaluará diariamente durante un tiempo seleccionado, por ejemplo, durante 3 días (el día de la inmunización y 2 días después). Se pueden usar tarjetas de diario para informar de síntomas y se puede usar una regla para medir la reactividad local. Se pueden evaluar los sitios de inyección de inmunización. Se pueden realizar exploraciones de TC o IRM del tórax, abdomen y pelvis.

En diversas realizaciones, se realizan evaluaciones hematológicas y bioquímicas en los individuos que reciben tratamiento según los métodos y las composiciones de la invención. Se pueden realizar una o más de cualquier prueba según sea necesario o de manera programada, tal como en las semanas 0, 3, 6, etc. Se puede realizar un conjunto diferente de pruebas simultáneamente con la inmunización frente a momentos sin inmunización. Las evaluaciones hematológicas y bioquímicas pueden incluir uno o más análisis de sangre para química y hematología, CBC con fórmula leucocitaria, Na, K, Cl, CO₂, BUN, creatinina, Ca, proteína total, albúmina, bilirrubina total, fosfatasa alcalina, AST, ALT, glucosa y ANA.

En diversas realizaciones, se evalúan los marcadores biológicos en individuos que reciben tratamiento según los métodos y las composiciones de la invención. Se pueden realizar una o más de cualquier prueba según sea necesario o de manera programada, tal como en las semanas 0, 3, 6, etc. Se puede realizar un conjunto diferente de pruebas simultáneamente con la inmunización frente a momentos sin inmunización.

Las evaluaciones de marcadores biológicos pueden incluir uno o más de los anticuerpos de medición para las SEQ. ID. NO.: 1, SEQ. ID. NO.:2, SEQ. ID. NO.:4, SEQ. ID. NO.:5, SEQ. ID. NO.:6 o el vector de Ad5, de una muestra de suero de volumen adecuado, por ejemplo, aproximadamente 5 ml. Los biomarcadores pueden revisarse si se determinan y están disponibles.

En diversas realizaciones, se realiza una evaluación inmunológica en individuos que reciben tratamiento según los

métodos y las composiciones de la invención. Se pueden realizar una o más de cualquier prueba según sea necesario o de manera programada, tal como en las semanas 0, 3, 6, etc. Se puede realizar un conjunto diferente de pruebas simultáneamente con la inmunización frente a momentos sin inmunización.

- 5 Se pueden extraer sangre periférica, por ejemplo, aproximadamente 90 ml antes de cada inmunización y en un momento después de al menos algunas de las inmunizaciones, para determinar si hay un efecto sobre la respuesta inmunitaria en momentos específicos durante el estudio y/o después de un número específico de inmunizaciones. La evaluación inmunológica puede incluir uno o más ensayos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para respuestas de linfocitos T a las SEQ. ID. NO.:1, SEQ. ID. NO.:2, SEQ. ID. NO.:4, SEQ. ID. NO.:5 o SEQ. ID. NO.:6 usando ELISpot, ensayos de proliferación, análisis citométrico de flujo multiparamétrico y ensayos de citotoxicidad. El suero de cada extracción de sangre se puede archivar, enviar y determinar.

- 15 En diversas realizaciones, se realiza una evaluación de infección por Ébola o un ensayo de replicación del Ébola en individuos que reciben tratamiento según los métodos y las composiciones de la invención. Se pueden realizar una o más de cualquier prueba según sea necesario o de manera programada, tal como antes del tratamiento, en las semanas 0, 3, 6, etc. Se puede realizar un conjunto diferente de pruebas simultáneamente con la inmunización frente a momentos sin inmunización. La infección por Ébola puede incluir una o más pruebas inmunes específicas del Ébola antes del tratamiento, en un momento después de al menos algunas de las inmunizaciones y aproximadamente cada semana o tres meses después de completar un número seleccionado, por ejemplo, 2, 3 o 4, de primeros tratamientos y, por ejemplo, hasta la retirada del tratamiento.

- 25 Las respuestas inmunitarias contra un antígeno diana descrito en el presente documento, tal como las SEQ. ID. NO.:1, SEQ. ID. NO.:2, SEQ. ID. NO.:4, SEQ. ID. NO.:5 o SEQ. ID. NO.:6 se pueden evaluar a partir de una muestra, tal como una muestra de sangre periférica de un individuo que usa una o más pruebas adecuadas para la respuesta inmunitaria, tales como ELISpot, citometría de flujo de citocinas o respuesta de anticuerpos. Se puede determinar una respuesta inmunitaria positiva midiendo una respuesta de linfocitos T. Una respuesta de linfocitos T puede considerarse positiva si el número medio de puntos ajustados para el fondo en seis pocillos con antígeno supera el número de puntos en seis pocillos de control en 10 y la diferencia entre los valores individuales de los seis pocillos que contienen antígeno y los seis pocillos de control es estadísticamente significativa a un nivel de $p \leq 0,05$ usando la prueba de t de Student.
- 30 Se pueden realizar ensayos de inmunogenicidad antes de cada inmunización y en momentos programados durante el periodo del tratamiento. Por ejemplo, un momento para un ensayo de inmunogenicidad aproximadamente en la semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 20, 24, 30, 36 o 48 de un tratamiento puede programarse incluso sin una inmunización programada en este momento. En algunos casos, un individuo se puede considerar evaluable para la respuesta inmunitaria si recibe al menos un número mínimo de inmunizaciones, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más inmunizaciones.

Determinación de la respuesta clínica

- 40 En algunas realizaciones, la determinación de la progresión de la enfermedad o la respuesta clínica se realiza según los criterios de RECIST 1.1 entre pacientes con enfermedad medible/evaluable. En algunas realizaciones, las terapias que usan los métodos y composiciones de la invención afectan a una respuesta completa (RC; desaparición de todos los antígenos o síntomas de sitios diana o desaparición de todos los sitios no diana y normalización del nivel de antígenos o síntomas para sitios no diana) en un individuo que recibe la terapia. En algunas realizaciones, las terapias que usan los métodos y las composiciones de la invención efectúan una respuesta parcial (RP; una disminución de al menos 30 % en la suma del LD de sitios diana, tomando como referencia la suma basal de LD para sitios diana) en un individuo que recibe la terapia.

- 50 En algunas realizaciones, las terapias que usan los métodos y las composiciones de la invención efectúan una enfermedad estable (EE; ni reducción suficiente de antígenos o síntomas para calificarse como RP ni aumento suficiente para calificarse como EP, tomando como referencia la menor suma de LD desde que comenzó el tratamiento para sitios diana) en un individuo que recibe la terapia. En algunas realizaciones, las terapias que usan los métodos y las composiciones de la invención efectúan una respuesta incompleta/enfermedad estable (EE; persistencia de uno o más sitios no diana) y/o mantenimiento de antígenos o síntomas por encima de los límites normales para sitios no diana) en un individuo que recibe la terapia. En algunas realizaciones, las terapias que usan los métodos y las composiciones de la invención efectúan una enfermedad progresiva (EP; un aumento de al menos 20 % en la suma del LD de antígenos o síntomas, tomando como referencia la menor suma de LD registrada desde que comenzó el tratamiento o la aparición de uno o más antígenos o síntomas nuevos o la persistencia de uno o más antígenos o síntomas no diana y/o el mantenimiento del nivel de antígenos por encima de los límites normales en un individuo que recibe la terapia.

KITS

- 65 Las composiciones, inmunoterapia o vacunas se pueden proporcionar en forma de kit. Los kits de la presente divulgación pueden comprender además instrucciones con respecto a la dosificación y/o administración, incluyendo información del régimen de tratamiento.

En algunas realizaciones, los kits comprenden las composiciones y los métodos para proporcionar inmunoterapia combinada del Ébola de múltiples dianas. En algunas realizaciones, los kits comprenden las composiciones y los métodos para el tratamiento combinado de múltiples dianas de una infección por Ébola. En algunas realizaciones, los kits pueden comprender además componentes útiles para administrar los componentes del kit e instrucciones sobre cómo preparar los componentes. En algunas realizaciones, el kit puede comprender además software para realizar supervisión del paciente antes y después del tratamiento con pruebas de laboratorio adecuadas o comunicar los resultados y los datos del paciente al personal médico. Los componentes que comprenden el kit pueden estar en forma seca o líquida. Si están en forma seca, el kit puede incluir una solución para solubilizar el material seco. El kit también puede incluir factor de transferencia en forma líquida o seca. Si el factor de transferencia está en forma seca, el kit incluirá una solución para solubilizar el factor de transferencia. El kit también puede incluir recipientes para mezclar y preparar los componentes. El kit también puede incluir un instrumento para ayudar con la administración, tal como, por ejemplo, agujas, tubos, aplicadores, inhalador, jeringa, pipeta, pinzas, cuchara de medición, cuentagotas o cualquier vehículo de suministro aprobado médicamente de este tipo. Los kits o sistemas de suministro de fármacos de la presente invención también incluirán normalmente un medio para contener composiciones de la presente divulgación en confinamiento estrecho para venta y distribución comercial.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Múltiples inyecciones del vector de adenovirus Ad5Nulo producen anticuerpos antiadenovirus

Este ejemplo muestra que múltiples inyecciones de Ad5-nulo dan como resultado la producción de anticuerpos antiadenovirus en los sujetos inyectados.

Se demostró que el vector de adenovirus Ad5-nulo que no contiene ninguna secuencia de ácido nucleico heterólogo, generó una respuesta inmunitaria neutralizante en ratones. En un experimento, se inmunizaron ratonas Balb/c de 5-7 semanas de edad con partículas víricas de Ad5-nulo a intervalos de 14 días. Para determinar la presencia de anticuerpos antiadenovirus, se usó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Para este ELISA, se aplicaron 10^9 partículas víricas sobre pocillos de microtitulación en 100 μ l de tampón de carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6, y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente. Para una curva de referencia convencional de inmunoglobulina G (IgG), se aplicaron 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng y 0 ng de IgG de ratón purificada sobre pocillos de microtitulación como se ha descrito anteriormente. Después de la incubación, todos los pocillos se lavaron 3 veces con 250 μ l de seroalbúmina bovina al 1 % (BSA) en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4. Después del lavado, se añadieron 250 μ l de BSA/PBS a todos y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear los sitios no unidos. Después de la incubación, todos los pocillos se lavaron 3 veces con 250 μ l de BSA/PBS. Después del lavado, se añadieron 200 μ l de una dilución de suero 1/100 en BSA/PBS a los pocillos y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Para un control positivo, se añadieron 200 μ l de una dilución 1/10000 de antisuero antiadenovirus en BSA/PBS a los pocillos. Los pocillos de control solo contenían BSA/PBS. Después de la incubación, todos los pocillos se lavaron 3 veces con 250 μ l de BSA/PBS. Después del lavado, se añadieron a cada pocillo 200 μ l de una dilución 1/10000 de IgG de cabra anti-ratón específica de cadena y conjugada con peroxidasa (Sigma Chemicals) en BSA/PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación, todos los pocillos se lavaron 3 veces con 250 μ l de BSA/PBS. Después del lavado, se añadieron a cada pocillo 200 μ l de reactivo de revelado (0,5 mg/ml de 1,2-fenilendiamina en tampón de fosfato de potasio 0,2 M, pH 5,0, que contenía peróxido de hidrógeno al 0,06 %) y se incubaron durante 30-40 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, la reacción de color se detuvo mediante la adición de 50 μ l de HCl 5 N a cada pocillo. Todos los pocillos se leyeron después en un lector de placas de micropocillos a 492 nm. Después de obtener las lecturas, las lecturas de densidad óptica de muestras desconocidas se correlacionaron con la curva patrón de IgG para obtener los ng de IgG unidos por pocillo. Esto se realizó usando el paquete estadístico INSTAT.

ELISA para detectar anticuerpos contra AE

Las placas de ELISA se recubrirán con 100 ng de GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 o L en tampón de carbonato-bicarbonato 0,05 M pH 9,6 y se incubarán durante una noche a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween-20 al 1 % (PBS-T) y después se bloquearon con PBS que contenía BSA al 1 % durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados adicionales, se añadirá suero diluido 1/50 en PBS-T a los pocillos y las placas se incubarán durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadirá a los pocillos anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina (Ig) G (específica de la cadena γ) de ratón marcado con peroxidasa (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:5000 después de los lavados y las placas se incubaron durante 1 hora. Las placas se lavarán tres veces y se añadirá una solución de sustrato de 1,2-fenilendiamina a cada pocillo. La reacción se detendrá añadiendo ácido fosfórico al 10 %. La absorbancia se medirá a 492 nm en un lector de ELISA SpectraMax 190. Los equivalentes de nanogramos de IgG unidos a GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 o L, por pocillo se obtendrán por referencia a una curva patrón generada usando IgG de ratón purificada y se desarrollarán al mismo tiempo que el ELISA de GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 o L. Los resultados se analizaron y cuantificaron usando el software SoftMax Pro 6.3.

Se detectaron niveles significativos ($P < 0,001$) de anticuerpo anti-IgG de adenovirus en ratones 2 semanas después de una primera inyección con 10^{10} Ad-5-nulo (FIG. 1). Se observó un nivel significativamente mayor ($P < 0,001$) 2

semanas después de una segunda inyección con 10^{10} adenovirus. Se continuaron observando niveles significativamente mayores ($P < 0,001$) de anticuerpo 2 semanas después de una tercera inyección con 10^{10} Ad5-nulo. Cada valor representa el promedio de determinaciones por triplicado de sueros agrupados de 5 ratones en cada grupo. Las inyecciones múltiples de Ad5-nulo dieron como resultado la producción de anticuerpos anti-adenovirus en los sujetos.

Para determinar la presencia de anticuerpo neutralizante contra Ad, se utilizó el siguiente ensayo. Se cultivó una línea celular HEK-293T en 200 μ l de medio de cultivo que consiste en DMEM que contiene suero de ternero fetal al 10 % (DMEM/FCS) en placas de cultivo tisular de micropocillos a una concentración celular de 2×10^3 células por pocillo durante 24 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %. Después de la incubación, se eliminaron 100 μ l de medio de cultivo de pocillos por triplicado y se mezclaron con 20 μ l de DMEM/FCS que contiene partículas víricas (PV). Después de mezclar, la mezcla de 120 μ l se volvió a añadir a los micropocillos respectivos. En otro conjunto de pocillos por triplicado, se eliminaron 100 μ l de medio de cultivo y se mezclaron con 20 μ l de suero de ratón inmune a Ad termoinactivado (56 °C durante 1 h) previamente incubado con PV durante una hora a temperatura ambiente. Después de mezclar, se añadió de 120 μ l se volvió a añadir a los pocillos respectivos. En pocillos de control celular por triplicado, se añadieron 20 μ l de DMEM/FCS para controlar el volumen medio de cultivo total. Los pocillos de control por triplicado solo con medio contenían 220 μ l de DMEM/FCS. La placa de cultivo tisular se incubó durante 3 días adicionales a 37 °C en CO₂ al 5 %. Después de la incubación, se añadieron 40 μ l de reactivo de viabilidad celular PROMEGA (reactivo de Owen) a todos los pocillos y se incubaron durante 75 minutos a 37 °C en CO₂ al 5 %. En este ensayo, El reactivo de Owen (compuesto de tetrazolio MTS) es biorreducido por células viables en un producto de formazán coloreado que es soluble en medio de cultivo tisular. La cantidad de producto de formazán medida por absorbancia a 490 nm es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo. Después de la incubación, se retiraron 150 μ l de cada pocillo y se transfirieron a otra placa de micropocillos para lecturas de densidad óptica. Posteriormente se obtuvieron lecturas de densidad óptica a 492 nm usando un lector de placa de micropocillos.

Para detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra Ad, se inyectaron grupos de 5 ratones cada uno una vez, dos veces o tres veces con 10^{10} Ad5-nulo a intervalos de dos semanas. Dos semanas después de la inyección final del virus, se tomaron muestras de sangre de los ratones, se agruparon y se evaluaron para determinar anticuerpos neutralizantes como se ha descrito anteriormente usando 4×10^7 PV incubadas con o sin sueros termoinactivados. Las células cultivadas solas actuaron como un grupo de control. Los ratones normales y los ratones inyectados una vez con Ad5nulo no presentaron niveles significativos de anticuerpo neutralizante (FIG. 2). Los ratones inyectados dos veces con Ad presentaron niveles significativos ($P < 0,05$) de anticuerpo neutralizante en comparación con células incubadas solo con virus. Los ratones inyectados tres veces con Ad5-nulo también presentaron niveles significativos ($P < 0,01$) de anticuerpo neutralizante en comparación con células incubadas solo con virus.

EJEMPLO 2: La vacuna de vector Ad5[E1-]-AE induce respuesta inmunitaria específica de AE tras la reinmunización en ratones inmunes a Ad5

Este ejemplo muestra que la plataforma de vector Ad5 [E1-, E2b-] induce respuestas de IMC contra los antígenos asociados al Ébola GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L en presencia de inmunidad preexistente a Ad5 en ratones.

Se construirán y producirán Ad5 [E1-, E2B-]-GP, Ad5 [E1-, E2B-]-NP, Ad5 [E1-, E2B-]-VP40, Ad5 [E1-, E2B-]-VP35, Ad5 [E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24 y/o [E1-, E2b-]-L. En resumen, los transgenes se subclonarán en la región E1 del vector Ad5 [E1-, E2b-] usando un enfoque basado en recombinación homóloga. El virus deficiente en replicación se propagará en la línea celular de empaquetamiento E.C7, se purificará con CsCl₂ y se valorará. El título infeccioso vírico se determinará como unidades formadoras de placas (UFP) en una monocapa de células E.C7. La concentración de PV se determinará mediante rotura por dodecil sulfato de sodio (SDS) y espectrofotometría a 260 nm y 280 nm.

Caracterización de vectores Ad5 CEA

Se realizaron estudios iniciales para confirmar la expresión de genes de GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L de dos plataformas de vectores Ad5-GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L. Se determinó en primer lugar que los antígenos podían expresarse en células transfectadas con las plataformas de vectores de vacuna. Se obtuvieron células A549 de ATCC y se transfectaron con Ad5 [E1-]-GP, Ad5 [E1-]-NP, Ad5 [E1-]-VP40, Ad5 [E1-]-VP35, Ad5 [E1-]-VP30, [E1-]-VP24 y/o [E1-]-L; o Ad5 [E1-, E2B-]-GP, Ad5 [E1-, E2B-]-NP, Ad5 [E1-, E2B-]-VP40, Ad5 [E1-, E2B-]-VP35, Ad5 [E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24 y/o [E1-, E2b-]-L. El análisis de transferencia de Western reveló que las células transfectadas con las plataformas de vectores expresaron los antígenos indicados.

Métodos

Se inocularon células A549 a una MOI de 555 PV/célula con Ad5 [E1-, E2B-]-GP, Ad5 [E1-, E2B-]-NP, Ad5 [E1-, E2B-]-VP40, Ad5 [E1-, E2B-]-VP35, Ad5 [E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24 y/o [E1-, E2b-]-L. Las células se incubaron durante 48 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %. Después de 48 horas, las células se recogieron y se lavaron con PBS y se congelaron/descongelaron tres veces. El lisado celular completo se calentó a 70 °C durante 10 minutos antes de cargar en el gel. Se cargó control recombinante de GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L a 30 ng/línea y el lisado preparado a 20 μ l/carril. El tampón de carga de muestra se incluyó como un control negativo adicional y los controles positivos

fueron marcadores de Western Magic Mark CP y el GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y/o L recombinante. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se bloqueó con solución de bloqueo SuperBlock durante 60 minutos. La membrana se exploró con anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 o L (1:1000) y un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP (1:2500). La membrana se lavó tres veces, después se incubó con reactivo quimioluminiscente SuperSignal y se visualizó la formación de bandas exponiendo la película de rayos X a la membrana seguido de revelado.

Inducción de inmunidad a Ad5 en ratones

Para evaluar los niveles de inmunidad a Ad5 que podrían inducirse, se inyectará por vía subcutánea en grupos de ratones C57B1/6 no expuestos a Ad5 la plataforma de vector Ad5 (PV). De veintiocho a cuarenta y dos días después, se recogerán muestras de suero y se evaluarán para determinar títulos finales de NAb de Ad5. Se pueden observar títulos de NAb de Ad5 indetectables (título final de NAb de Ad5 $<1/25$) en ratones de control normales. NAb de Ad5 (títulos finales de $1/25$ a $1/50$) puede ser detectable después de una inyección pero puede aumentar drásticamente después de tres inyecciones de 10^{10} Ad5. Por lo tanto, en estudios inmunitarios adicionales de Ad5, se inyectarán en ratones dos veces 10^{10} PV de Ad5 para hacer a los animales inmunes a Ad5.

Inmunización de ratones inmunes a Ad5 con Ad5 [E1-]-AE o Ad5 [E1-, E2b-]-AE.

Estos experimentos se diseñarán para determinar y comparar el potencial de inducción de inmunización de vacunas Ad5 [E1-]-AE y Ad5 [E1-, E2b-]-AE en ratones inmunes a Ad5. Se inmunizarán grupos de ratones C57B1/6, de 4 a 8 semanas de edad, 2 veces a intervalos de 2 semanas con 10^{10} PV de Ad5-nulo. Dos semanas después de la última inmunización de Ad5-nulo, los ratones se inmunizarán 3 veces a intervalos semanales con 10^{10} PV de Ad5 [E1-]-AE o Ad5 [E1-, E2b-]-EA. Dos semanas después de la última inmunización, los ratones se sacrificarán y sus bazos y sueros se recogerán para análisis.

Las respuestas de IMC se evaluarán mediante ensayos ELISpot realizados en esplenocitos expuestos a antígeno AE intacto. Se recogerán esplenocitos de ratones C57B1/6 inmunes a Ad5 que se inmunizaron por vía subcutánea con Ad5 E1-]-AE o Ad5 [E1-, E2b-]-AE y se evaluarán para determinar el número de células secretoras de IFN- γ e IL-2. Se pueden observar cantidades significativamente elevadas de células secretoras tanto de IFN- γ como de IL-2 en bazos analizados de ratones inmunizados con Ad5 [E1-, E2b-]-AE en comparación con ratones inmunizados con Ad5 [E1-]-AE. Se puede mostrar que la inmunización de ratones inmunes a Ad5 con Ad5 [E1-, E2b-]-CEA induce respuestas IMC significativamente mayores.

Falta de efectos adversos en el hígado en ratones inmunizados

Se realizarán estudios de toxicidad en suero de ratones C57B1/6 inmunes a Ad5 inmunizadas con Ad5 [E1-]-AE, Ad5 [E1-, E2b-]-AE como se ha descrito anteriormente. Los ratones no expuestos a Ad5 o inmunes a Ad5 en los que se ha inyectado tampón solo actuarán como controles. Tres días después de la tercera inmunización, se evaluarán los niveles de aspartato aminotransferasa (AST) en las muestras de sangre para determinar la toxicidad hepática debida al tratamiento. Los niveles de AST pueden no estar elevados con respecto a los controles después de la inmunización con cualquiera de los vectores. También se evaluarán los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) y se pueden observar resultados similares.

Inmunoterapia de Ad5 [E1-, E2b-]-CEA en ratones infectados por Ébola inmunes a Ad5

En función de los resultados inmunológicos exitosos observados anteriormente, se realizaron estudios en los que se establecieron infecciones por Ébola en ratones y después se trataron como se describe a continuación. Después de la infección por Ébola, los ratones se tratarán con la plataforma de vector Ad5 [E1-, E2b-]-AE novedosa. Para determinar si los ratones infectados por Ébola inmunes a Ad5 podrían tratarse con el vector Ad5 [E1-, E2b-]-AE, se inyectarán en ratones C57B1/6 dos veces por vía subcutánea 10^{10} PV de Ad5 [E1-]-nulo a intervalos de 14 días para hacer a los ratones inmunes a Ad5. Dos semanas después de la última inyección, se inyectarán por vía subcutánea en dos grupos de 7 ratones C57B1/6 10^6 células que expresan AE. Siete días después, cuando la infección por Ébola puede ser palpable, se tratará un grupo de ratones mediante inyección subcutánea distal con 10^{10} PV de Ad5 [E1-, E2b-]-AE los días 7, 13 y 19. Un grupo de ratones C57B1/6 tratados solo con tampón de inyección actuarán como controles no tratados. Todos los ratones se supervisarán para determinar regresión de infección por Ébola durante un periodo de 21 días y se determinará el título de infección por virus del Ébola. Al final del estudio, se recogerán bazos de ratones y la respuesta IMC específica de CEA se determinará mediante ensayo ELISpot.

Análisis de respuestas IMC mediante ensayo ELISpot.

Se realizará un ensayo ELISpot para determinar los linfocitos secretores de IFN- γ . En resumen, se incubarán PBMC aisladas (2×10^5 células/pocillo) de muestras de pacientes individuales 36-40 h con un grupo de péptidos AE para estimular linfocitos T productores de IFN- γ . Se determinarán las respuestas de IMC a Ad5 después de la exposición de PBMC del paciente a Ad5-nulo (vector vacío). Las células que se estimularán con concanavalina A (Con A) a una concentración de $0,25 \mu\text{g/pocillo}$ actuarán como control positivo. Se contarán las células formadoras de manchas

(CFM) coloreadas usando un lector de placas Immunospot ELISpot y las respuestas se considerarán positivas si se detectan 50 CFM/10⁶ células después de restar el control negativo y las CFM fueron ≥2 veces mayores que las de los pocillos de control negativo.

5 Determinación de títulos de anticuerpos neutralizantes de Ad5 (NAb).

Se determinarán los títulos finales de NAb de Ad5. En resumen, se mezclarán diluciones de sueros de prueba termoinactivados en 100 µl de DMEM que contienen de suero de ternero fetal al 10 % con 4x10⁷ PV de Ad5 [E1-]-nulo y se incubarán durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se añadirán a micropocillos que contienen células HEK293 cultivadas en DMEM que contiene de suero de ternera termoinactivado al 10 % a 2x10³ células/pocillo durante 24 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %. La mezcla se incubará durante 72 horas adicionales a 37 °C en CO₂ al 5 %. Se usará un ensayo de biorreducción de tetrazolio MTS para medir la destrucción celular y los títulos finales de NAb de Ad5. Se asignará a los títulos finales con un valor inferior a 1:25 un valor de 0.

15 Estadística.

Se realizarán análisis estadísticos que comparan las respuestas inmunitarias empleando la prueba de Mann-Whitney (PRISM, Graph Pad). Se realizarán comparaciones de supervivencia empleando gráficos de Kaplan-Meier (PRISM, Graph Pad). El título de NAb de Ad5 y la IMC específico de AE se analizarán como variables continuas. La asociación del título de NAb de Ad5 con el cambio en la IMC específica de AE se ensayará con el coeficiente de correlación de Spearman. La asociación del título de NAb de Ad5 con la supervivencia se ensayará con la prueba de Wald del modelo de riesgos proporcionales.

Un objetivo secundario será evaluar las respuestas inmunitarias específicas de AE después de tratamientos de inmunización con el producto.

Se generarán células dendríticas a partir de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un sujeto infectado por Ébola; usando PBMC de este paciente después de la vacunación, se intentará establecer líneas individuales de linfocitos T específicas para AE. En resumen, las PBMC se aislarán usando un gradiente de medio de separación de linfocitos, se resuspenderán en medio AIM-V (2x10⁷ células) y se permitirá que se adhieran en una placa de 6 pocillos durante 2 horas. Las células adherentes se cultivarán durante 5 días en medio AIM-V que contiene 100 ng/ml de GM-CSF humano recombinante (rh) y 20 ng/ml de rhIL-4. El medio de cultivo se repondrá cada 3 días.

35 ***EJEMPLO 3: Producción de BPL de vacuna de múltiples dianas de uso clínico***

Este ejemplo muestra la producción de vacunas de múltiples dianas de uso clínico usando principios de buenas prácticas de laboratorio (BPL). Anteriormente, el producto de Ad5 [E1-, E2b-]-CEA(6D) se produjo usando un biorreactor celular de 5 l en condiciones de BPL de acuerdo con los principios de buenas prácticas de fabricación. Este ejemplo puede mostrar que los productos de Ad5 [E1-, E2b-]-AE GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y L se pueden producir en un biorreactor celular de 5 l usando enfoques similares.

En resumen, los viales de la línea celular de fabricación E.C7 se descongelarán, se transferirán a matraces T225 y se cultivarán inicialmente a 37 °C en CO₂ al 5 % en DMEM que contiene FBS al 10 %/L-glutamina 4 mM. Después de la expansión, las células E.C7 se expandirán usando CellSTACKS de 10 capas (CS-10) y se pasarán a medio sin suero (MSS) FreeStyle. Las células E.C7 se cultivarán en MSS durante 24 horas a 37 °C en CO₂ al 5 % a una densidad diana de 5x10⁵ células/ml en el biorreactor celular. Las células E.C7 se infectarán después con Ad5 [E1-, E2B-]-GP, Ad5 [E1-, E2B-]-NP, Ad5 [E1-, E2B-]-VP40, Ad5 [E1-, E2B-]-VP35, Ad5 [E1-, E2B-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24 y/o [E1-, E2b-]-L, respectivamente, y se cultivarán durante 48 horas.

Se realizará procesamiento de flujo medio de manera idéntica a la usada para preparar producto de Ad5 [E1-, E2B-]-GP, Ad5 [E1-, E2B-]-NP, Ad5 [E1-, E2B-]-VP40, Ad5 [E1-, E2B-]-VP35, Ad5 [E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24 y/o [E1-, E2b-]-L de uso clínico. 30 minutos antes de la recogida, se añadirá benzonasa nucleasa al cultivo para promover mejor sedimentación celular para concentración. Después de sedimentación por centrifugación, se desechará el sobrenadante y los sedimentos se resuspenderán en tampón de lisis que contiene polisorbato-20 al 1 % durante 90 minutos a temperatura ambiente. El lisado se tratará después con benzonasa y la reacción se detendrá mediante la adición de NaCl 5 M. La suspensión se centrifugará y se desechará el sedimento. El lisado se clarificará mediante filtración y se someterá a un procedimiento de intercambio iónico de dos columnas.

Para purificar los productos de vacuna, se realizará un procedimiento de intercambio aniónico de dos columnas. Una primera columna se empaquetará con resina Q Sepharose XL, se desinfectará y se equilibrará con tampón de carga. El lisado clarificado se cargará en la columna y se lavará con tampón de carga. El producto de vacuna se eluirá y el pico de elución principal (eluato) que contiene Ad5 [E1-, E2B-]-GP, Ad5 [E1-, E2B-]-NP, Ad5 [E1-, E2B-]-VP40, Ad5 [E1-, E2B-]-VP35, Ad5 [E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24 y/o [E1-, E2b-]-L se llevará a la siguiente etapa. Una segunda columna se empaquetará con resina Source 15Q, se desinfectará y se equilibrará con tampón de carga. El eluato de la primera columna de intercambio aniónico se cargará en la segunda columna y el producto de vacuna se eluirá con un gradiente que comienza a 100 % de tampón A (Tris 20 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 8,0) que funciona al 50 %

de tampón B (Tris 20 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 2 M, pH 8,0). El pico de elución que contiene Ad5 [E1-, E2B-]-GP, Ad5 [E1-, E2B-]-NP, Ad5 [E1-, E2B-]-VP40, Ad5 [E1-, E2B-]-VP35, Ad5 [E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24 y/o [E1-, E2b-]-L se recogerá y almacenará durante una noche a 2-8 °C. La fracción de elución máxima se procesará a través de un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) para concentración y diafiltración frente a tampón de formulación (Tris 20 mM, NaCl 25 mM, glicerol al 2,5 % (v/v), pH 8,0). Después del procesamiento, el producto final de vacuna se esterilizará por filtrado, se distribuirá en alícuotas y se almacenará a ≤-60 °C. Normalmente se produce un producto muy purificado que se acerca al 100 % de pureza y se predicen resultados similares para estos productos.

La concentración y el número total de producto de PV producido se determinarán mediante espectrofotometría. La pureza del producto se evaluará mediante HPLC. La actividad infecciosa se determinará realizando un ensayo de tinción de hexones de Ad5 para partículas infecciosas usando equipos.

Se realizarán transferencias de Western usando lisados de células transfectadas con vector para verificar la expresión de AE. Se realizarán pruebas de control de calidad para determinar que los productos finales de vacuna están exentos de micoplasmas, no tienen carga biológica microbiana y presentan niveles de endotoxina inferiores a 2,5 unidades de endotoxina (UE) por ml. Para confirmar la inmunogenicidad, los vectores individuales se probarán en ratones.

EJEMPLO 7: Inmunogenicidad de vectores víricos de GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24, L de dianas individuales y múltiples

Se inyectarán sc en ratonas C57BL/6 10¹⁰ PV de Ad5 [E1-, E2B-]-GP, Ad5 [E1-, E2B-]-NP, Ad5 [E1-, E2B-]-VP40, Ad5 [E1-, E2B-]-VP35, Ad5 [E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24 o [E1-, E2b-]-L, o una combinación de 10¹⁰ PV de dos o más virus en una relación de 1:1:1. Se inyectarán en ratones de control 3x10¹⁰ PV de Ad-nulo (sin inserción de transgén). Las dosis se administrarán en 25 µl de tampón de inyección (HEPES 20 mM con sacarosa al 3 %) y los ratones se vacunarán tres veces a intervalos de 14 días. Catorce días después de la inyección final se recogerán bazo y sueros. Los sueros se congelarán a -20 °C. Se generarán suspensiones de esplenocitos se generarán aplastando suavemente los bazo a través de un filtro de células de nailon de 70 µm (BD Falcon, San José, CA). Los glóbulos rojos se eliminarán mediante la adición de tampón de lisis de glóbulos rojos (Sigma-Aldrich, San Luis, MO) y los esplenocitos se lavarán dos veces y se resuspenderán en R10 (RPMI 1640 complementado con L-glutamina (2 mM), HEPES (20 mM), penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml y suero bovino fetal al 10 %. Los esplenocitos se analizarán para determinar la producción de citocinas mediante ELISPOT y citometría de flujo.

Estudios de inmunogenicidad:

Dos semanas después de la última inmunización, Se determinará la actividad de IMC empleando ensayos ELISpot para células secretoras de IFN-γ (CFM) después de la exposición de esplenocitos a agrupaciones de péptidos AE.

En resumen, las respuestas de IMC contra AE según lo evaluado mediante ensayos ELISpot para esplenocitos secretores de IFN-γ (CFM) se detectarán en ratones inmunizados para múltiples dianas pero no en ratones de control (en los que se ha inyectado el vector vacío Ad5-Nulo). La especificidad de las respuestas de ensayo ELISpot se confirmará por la falta de reactividad a antígenos peptídicos irrelevantes SIV-nef o SIV-vif. Un control positivo incluirá células expuestas a concanavalina A (Con A).

Ensayo ELISPOT

Se determinarán linfocitos T secretores de IFN-γ o IL-2 específicos de GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 o L mediante ensayo ELISPOT a partir de esplenocitos de ratón recién aislados. En resumen, se estimularán 2x10⁵ esplenocitos con 0,2 µg/pocillo de péptidos de 15 unidades solapantes en un único grupo procedente de GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 o L. Las células se estimularán con Con A a una concentración de 0,0625 µg/por pocillo como un control positivo y se usarán grupos de péptidos completos de 15 unidades procedentes de SIV-Nef y SIV-Vif como controles peptídicos irrelevantes. El número de CFM se determinará usando un lector de placas Immunospot ELISpot y los resultados se presentarán como el número de CFM por cada 10⁶ esplenocitos. Para determinar el nivel de citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDCC), se realizará una prueba de CDCC usando células diana de AE.

Estimulación intracelular de citocinas

Se prepararán esplenocitos. Se realizarán ensayos de estimulación usando 1x10⁶ esplenocitos vivos por pocillo en placas con fondo en U de 96 pocillos. Se sintetizarán grupos de péptidos solapantes que abarcan las secuencias codificantes completas de GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 y L como 15meros con solapamientos de 11 aminoácidos y los grupos de péptidos liofilizados se disolverán en DMSO. Los grupos de péptidos construidos de manera similar correspondientes a SIV-Vif y SIV-Nef actuarán como controles fuera de diana. Se estimularán esplenocitos en medio R10 (RPMI 1640, suero bovino fetal al 10 % y antibióticos) mediante la adición de agrupaciones de péptidos a 2 µg/ml/péptido durante 6 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %, con inhibidor del transporte de proteínas (GolgiStop) añadido 2 h después del comienzo de la incubación. Los esplenocitos estimulados se teñirán después con respecto a marcadores de superficie de linfocitos CD8α y CD4, se fijarán, se permeabilizarán y después se teñirán con respecto a la acumulación intracelular de IFN-γ y TNFα. Se usarán anticuerpos contra CD8α, CD4, IFN-γ y TNFα de ratón y se

realizó tinción en presencia de anti-CD 16/CD32. Se realizará citometría de flujo y se analizará en el software BD Accuri C6.

Ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

5 Se cultivarán células AE durante una noche a una densidad de 2×10^4 células por pocillo en microplacas de cultivo tisular de 96 pocillos. Se añadirán sueros de ratón termoinactivados agrupados a una dilución 1:50 y se incubarán a 37 °C durante 1 hora. Después se añadirá suero de conejo a una dilución 1:50 como fuente de complemento y las células se incubarán 2,5 horas adicionales a 37 °C. Los sobrenadantes de cultivo celular se analizarán usando el ensayo de citotoxicidad no radiactiva Promega Cytotox 96, según las instrucciones del fabricante. El porcentaje de lisis de células AE se calculará mediante la fórmula % de lisis = (experimental - espontánea diana) / (máxima diana - espontánea diana) x 100 %.

Estudios de inmunoterapia contra el ébola:

15 Se realizarán estudios para probar la capacidad anti-Ébola de vacunas múltiples basadas en Ad5 [E1-, E2b-] en estudios de inmunoterapia en ratones con infecciones de Ébola establecidas. En este estudio, se evaluará la actividad anti-Ébola de los componentes individuales de la vacuna múltiple basada en Ad5 [E1-, E2b-].

20 Se inyectarán grupos de ratones C57B1/6 por vía subcutánea en el flanco derecho con 5×10^5 células que expresan AE. Los ratones se tratarán con 3 inyecciones subcutáneas con 1×10^{10} PV cada una de Ad5 [E1-, E2b-]-nulo (sin transgén, p. ej., vector vacío), Ad5 [E1-, E2b-]-GP, Ad5 [E1-, E2b-]-NP, Ad5 [E1-, E2b-]-VP40, Ad5 [E1-, E2b-]-VP35, Ad5 [E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24 y [E1-, E2b-]-L, respectivamente.

EJEMPLO 8: Uso de GP y NP de virus del Ébola como dianas de vacuna.

30 Se han construido vacunas de vectores basados en Ad5 (Ad5 [E1-]) recombinantes de generación anterior que contienen componentes génicos del virus del Ébola, incluyendo GP y/o NP, se han producido y se han probado en un entorno de laboratorio. Se han obtenido efectos protectores preclínicos prometedores en ratones y primates no humanos (PNH) usando estas vacunas, pero se anuló la eficacia cuando los animales presentaron inmunidad preexistente o inducida por el vector Ad5 contra el adenovirus.

35 En este ejemplo, se usarán los componentes GP y NP del virus del Ébola en una vacuna. Ya que las cepas de Zaire y Sudán son responsables de la mayoría de las muertes de casos específicos de especie, se usarán inicialmente componentes víricos de estas dos cepas. Se empleará GP porque es una glucoproteína de superficie que puede ser diana. Los genes de GP de ambas cepas aisladas del Ébola se usarán para inducir respuestas inmunitarias ampliamente reactivas contra el Ébola. Ya que NP se asocia con VP35, VP30 y ARN polimerasa dependiente de ARN al complejo de transcriptasa-replicasa funcional, se usará en la vacuna para inducir respuestas inmunitarias que interfieren con y/o previenen la replicación del virus. De esta manera, se desarrollará una vacuna ampliamente reactiva basada en una plataforma Ad5 [E1-, E2b-] que inducirá respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células (IMC) contra el Ébola.

Uso de vectores basados en Ad5 [E1-, E2b-] recombinantes como vacunas.

45 La vacuna se administrará directamente mediante inyección subcutánea para exposición de antígenos del Ébola definidos a células presentadoras de antígenos (APC) que inducen respuestas inmunitarias potentes. Amplificación de vacunas contra el Ébola de vector basado en Ad5 [E1-, E2b-].

50 Se construyeron cuatro vacunas basadas en Ad5 [E1-, E2b-] (FIG. 8). Para la vacuna de la cepa de Zaire, las secuencias de nucleótidos de GP y NP del brote actual (aislado de virus del Ébola de Zaire H.sapiens-wt/GIN/2014/Gueckedou-C07, n.º de referencia de GeneBank KJ660347) se optimizaron para uso codónico humano y se clonaron en el vector Ad5 [E1-, E2b-] bajo la regulación de promotor de CMV. Se rescataron partículas víricas mediante la transfección de células E.C7 que expresan de manera estable los genes adenovíricos de E1 y E2b con construcciones de plásmido Ad5 [E1-, E2b-] linealizado, produciendo un producto Ad5 [E1-, E2b-]-GP_{EZ} y un producto Ad5 [E1-, E2b-]-NP_{EZ}.

60 Para la vacuna contra la cepa de Sudán, las secuencias de nucleótidos de GP y NP de una cepa de Sudán del virus del Ébola (aislado de virus del Ébola de Sudán EboSud-682 2012, genoma completo GenBank: KC545392.1) se optimizaron para uso codónico humano y se clonaron en el vector Ad5 [E1-, E2b-] bajo la regulación de promotor de CMV. Se rescataron partículas víricas mediante la transfección de células E.C7 que expresan de manera estable los genes adenovíricos de E1 y E2b con construcciones de plásmido Ad5 [E1-, E2b-] linealizado, produciendo un producto Ad5 [E1-, E2b-]-GP_{ES} y un producto Ad5 [E1-, E2b-]-NP_{ES}.

Producción, purificación y prueba de vacunas basadas en Ad5 [E1-, E2b-] recombinante.

65 Se prepararán vacunas adicionales para estudios posteriores con PNH. La línea celular E.C7 permite que los vectores

Ad5 [E1-, E2b-] crezcan con rendimientos altos y reproducibles. Los vectores Ad5 [E1-, E2b-] se fabricarán y producirán mediante liberación de células humanas E.C7 usando Triton X-100, purificación en gradientes de CsCl o cromatografía de intercambio iónico, y diálisis contra HEPES 20 mM (pH 7,4) que contiene sacarosa al 5 %. Las vacunas de virus basadas en Ad5 [E1-, E2b-] recombinante purificado se dividirán en alícuotas y se congelarán en un baño de hielo seco-etanol. La infecciosidad de las partículas víricas se mide usando un ensayo en placa. Las concentraciones de partículas víricas (PV) se calcularán a partir de la absorbancia a 260 nm y se usarán para determinar las cantidades de virus para inmunizaciones *in vivo*. Las transferencias Western de lisados de células A549 transfectadas verificarán la expresión del transgén del antígeno. Un ejemplo de expresión de GP del Ébola (cepa de Zaire) en un lisado celular de células E.C7 después de 24 horas de transfección con Ad5 [E1-, E2b-]-GP_{EZ} se muestra en la FIG. 9.

Estudio de inmunogenicidad de aumento de dosis.

Estos estudios se realizarán usando un modelo de ratón inmune a Ad5 clínicamente relevante. Los ratones BALB/c se harán inmunes a Ad5 mediante dos inyecciones subcutáneas con 10^{10} PV de Ad5-nulo en intervalos de dos semanas. Dos semanas después de la segunda inyección, se probarán los sueros para determinar Ab neutralizante de Ad5 (NAb) para verificar que los ratones son inmunes a Ad5. Los ratones y monos tratados de esta manera logran títulos de NAb de Ad5 de 1/100 a 1/200 y en un ensayo clínico el título de NAb de Ad5 preexistente medio entre todos los pacientes fue 1:18961:71 (media \pm ETM). Se evaluarán respuestas inmunitarias que se inducen después de inmunización con dosis crecientes de Ad5 [E1-, E2b-]-GP_{EZ}/NP_{EZ} y Ad5 [E1-, E2b-]-GP_{ES}/NP_{ES} (una mezcla igualmente combinada). Se inmunizarán grupos de ratones inmunes a Ad5 (n=5/grupo) dos veces por vía subcutánea cada dos semanas usando dosis crecientes de 4×10^8 , 4×10^9 o 4×10^{10} PV (una mezcla de vacuna que contiene cantidades iguales de Ad5 [E1-, E2b-]-GP_{EZ}/NP_{EZ} y Ad5 [E1-, E2b-]-GP_{ES}/NP_{ES}). Se inyectarán en ratones de control (n = 5) 4×10^{10} PV de Ad5 [E1-, E2b-]-nulo en la misma pauta. Catorce días después de la inmunización final, se evaluarán las respuestas inmunitarias mediadas por anticuerpos (Ab) y células (IMC). Para la evaluación de IMC, se evaluarán los esplenocitos de ratones individuales usando ensayos ELISpot descritos previamente para medir el número de células linfoides secretoras de interferón- γ (IFN- γ) e IL-2 después de exposición a grupos de péptidos GP o NP. Las muestras de suero se evaluarán para determinar la actividad de Ab usando productos purificados disponibles en el mercado.

Usando la mayor dosis inmunogénica, se realizará un estudio que emplee una o dos inmunizaciones subcutáneas para determinar si son necesarias una o dos dosis para vacunación eficaz. Se inmunizarán grupos de ratones (n=5/grupo) una o dos veces cada dos semanas utilizando la dosis más eficaz de vacuna. Se inyectará en ratones de control (n = 5) Ad5 [E1-, E2b-]-nulo (cantidad de PV igual que la vacuna) en la misma pauta. Catorce días después de la inmunización final, se evaluarán las respuestas de Ab e IMC como se ha descrito anteriormente. Estos estudios permitirán determinar si son necesarias una o dos inmunizaciones para inducir respuestas inmunitarias significativas.

Estudios de inmunogenicidad en ratones inmunes a Ad5 mediante ELISA, ELISpot y citometría de flujo.

Para estos estudios, se usarán la dosis y frecuencia de vacunación más eficaces determinadas anteriormente. En un estudio de prueba de concepto en monos con vacuna contra la gripe, se observó que las respuestas de Ab, según lo evaluado por ensayos de inhibición de hemaglutinación (HAI), pueden necesitar hasta 30 días para desarrollar niveles máximos (FIG. 9). Por lo tanto, se evaluarán la actividad de Ab y respuestas IMC en ratones BALB/c inmunes a Ad5 (n=5/grupo) a las dos semanas, 30 días y 60 días después de vacunación subcutánea con la dosis y frecuencia de vacunación más eficaces (mezcla de vacuna que contiene cantidades iguales de Ad5 [E1-, E2b-]-GP_{EZ}/NP_{EZ} y Ad5 [E1-, E2b-]-GP_{ES}/NP_{ES}). Se inyectará en ratones de control Ad5 [E1-, E2b-]-nulo (cantidad de PV igual que la vacuna) en la misma pauta. Dos semanas, 30 días o 60 días después de la vacunación, se recogerán células de suero y bazo de ratones individuales. Se evaluarán los esplenocitos de ratones individuales para determinar respuestas de IMC usando ELISpot para medir el número de células linfoides secretoras de IFN- γ e IL-2 después de exposición a grupos de péptidos GP o NP. Ya que las respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) también serán importantes en la evaluación de las vacunas, se analizará la secreción de granzima B mediante ensayos ELISpot en esplenocitos después de exposición a grupos de péptidos GP o NP para determinar la actividad de CTL, ya que este es un buen ensayo para medir la actividad de CTL funcional de CD8. Las muestras de suero se evaluarán para determinar la actividad de Ab frente a proteínas de virus del Ébola purificadas disponibles en el mercado empleando una técnica de ELISA. Para la actividad neutralizadora de virus, también se realizarán ensayos de neutralización de reducción de placas en sueros de ratones individuales.

Según los estudios anteriores en los que se observan las mayores respuestas de IMC, también se realizarán estudios de citometría de flujo para caracterizar las respuestas inmunitarias de linfocitos T inducidas por inmunización con las vacunas. Se inmunizarán ratones BALB/c inmunes a Ad5 (n = 5) con la vacuna usando la dosis y frecuencia de vacunación más eficaces. Se inyectará en ratones de control (n = 5) Ad5 [E1-, E2b-]-nulo (cantidad de PV igual que la vacuna) en la misma pauta. Según el tiempo óptimo después de la vacunación, se extraerán los bazo y se determinarán los linfocitos T CD4+ y CD8+ mediante citometría de flujo para células que expresan IFN- γ y/o TNF- α después de la exposición a grupos de péptidos GP o NP. En resumen, se recogerán esplenocitos de ratones inmunizados y de control y se incubarán durante 5 horas con 0,5 μ g/ml de grupos de péptidos GP o NP, en presencia de GolgiStop, un inhibidor del transporte de proteínas. Después, los linfocitos T CD4+ o CD8+ se fijarán, se permeabilizarán, se tefirán con respecto a IFN- γ o TNF- α y se analizarán mediante citometría de flujo.

Protección de ratones inmunes a Ad5 vacunados contra exposición a virus.

5 En una prueba de viabilidad, se realizará un estudio de exposición en ratones. Dos grupos de ratones BALB/c (n=15/grupo) se volverán inmunes a Ad5 como se ha descrito anteriormente. Usando la dosis y frecuencia para
10 vacunación más eficaces, un grupo se inmunizará con la vacuna (mezcla de vacuna que contiene cantidades iguales de Ad5 [E1-, E2b-]-GP_{EZ}/NP_{EZ} y Ad5 [E1-, E2b-]-GP_{ES}/NP_{ES}). Se inyectará en un grupo de control Ad5 [E1-, E2b-]-nulo (cantidad de PV igual que la vacuna) en la misma pauta. Cuando se obtienen títulos neutralizantes de virus inducidos, los ratones se expondrán mediante inoculaciones a una cepa letal del Ébola adaptada a ratones. Se supervisará la pérdida de peso y el tiempo hasta la muerte con respecto a los criterios de valoración. Se observará a los ratones diariamente para determinar signos clínicos de morbilidad durante más de 21 días después de la exposición.

Estudios de fase 2

15 En estudios de fase 2, se evaluará la inmunogenicidad de las vacunas contra el Ébola en PNH. Se determinará la dosis de inmunización adecuada, pauta de refuerzo y potencial de exposición al Ébola vivo. Además, se evaluará la plataforma basada en Ad5 [E1-, E2b-] que contiene genes de GP y NP fusionados de las cepas del virus del Ébola de Zaire y Sudán. De esta manera se producirán dos vectores recombinantes, un producto Ad5 [E1-, E2b-]-GP_{EZ}/NP_{EZ} y un producto Ad5 [E1-, E2b-]-GP_{ES}/NP_{ES}. Al introducir múltiples genes en un vector basado Ad5 [E1-, E2b-] recombinante, el número de partículas víricas que serían necesarias se reducirá significativamente en comparación
20 con la producción y combinación de cada uno de los 4 vectores recombinantes individuales.

ES 2 795 833 T3

SEQ. ID. NO: 1

cggacacacaaaaagaagaatttttaggatcttttgtgtgccaataactatgaggaagattaataattt
tcctctcattgaaatttatatcggaatttaaattgaaattgttactgtaatcataacctgggttggttcagagc
catatcaccaagatagagaacaacctagggtctccggagggggcaaggccatcagtggtcagttgaaaatcc
cttgtcaacatctaggccttatcacatcacaagttccgccttaaactctgcagggtgatccaacaacctta
agcaacattattgttaaaggacagcatttagttcacagtcacaacaagcaagattgagaattaactttgattttg
aacctgaacacccagaggactggagactcaacaacctaaagcctggggtaaaacattagaaaatgatttaaag
acaaattgctcggaatcacaaaattccgagtatggattctcgtcctcagaaaagtctggatgacgccgagctc
actgaatctgacatggattaccacaagatcttgacagcaggtctgtccgttcaacaggggattgttcggcaaa
gagtcaccccagtgatcaagtaacaatcttgaggaaatttgccaacttatcatacaggcctttgagctgg
tgttgattttcaagagagtgccgacagtttccctctcatgctttgtcttcatcatgctaccaaggagattac
aaacttttcttgaaagtggcgcagtcagatatttggaagggcacgggttccgttttgaagtcaagaagcgtg
atggagtgaagcgccttgaggaattgctgccagcagatctagtgggagaaacattaagagaaacttgctgc
catgccggaagagagacgactgaagctaagccggcagttcctctcctttgcaagtctattcctccgaaa
ttggtagtaggagaaaaaggcttgcccttgagaaggttcaaaggcaaattcaagtacatgcagagcaaggactga
tacaatatccaacagcttggaatcagtaggacacatgatgggtgattttccgtttgatgcgacaaaattttt
gatcaaatcttcttaatacaccaagggtgacatgggtgcccagacatgatgccaacgatgctgtgatttca
aattcagtggtcaagctcgtttttcaggtctattgattgtcaaacagtaacttgatcatatcctacaaaaga
cagaacgaggagttcgtctccatcctcttgcaaggaccgccaaggtaaaaaatgaggtgaaactcctcaaggc
tgcactcagctccctggccaagcatggagagtatgctcctttcgcgccacttttgaacctttctggagtaaat
aatcttgagcatggcttttccctcaactgtcggcaattgcaactcggagtcgccacagcccacgggagcacc
tcgcaggagtaaatgttggagaacagatcaacagctcagagggcagccactgaggtcagagcaactcca
acaatatgcccagctcgtgaaacttgaccttggacttgatgatcaggaaaagaaaattcttatgaaactc
catcagaaaaagaacgaaatcagcttccagcaaacacgcgatggtaactctaagaaaagagcgcctggcca
agctgacagaagctatcactgctgcatcactgccaaaaacaagtggacattacgatgatgatgacgacattcc
ctttccaggaccatcaatgatgacgacaatcctggccatcaagatgatgatccgactgactcacaggatacgc
accattcccgatgtggtagttgatcccgatgatggaggctacggcgaataccaaagttactcggaaaacggca
tgagtgcaccagatgacttggctctattcgatctagacgaggacgacgaggacaccaagccagtgccaaacag
atcgaccaaggtggacaacagaaaaacagtcaaaagggccagcatacagagggcagacagacacaatccacg
ccaactcaaacgtcacaggccctcgcagaacaatccaccatgccagtgctccactcacggacaatgacagaa
gaaacgaaccctccggtcaaccagccctcgcagatgctgaccccaatcaacgaagagggcagaccactggacga
tgccgacgacgagacgtctagccttccgccttagagtcatgatgaagaacaggacaggggacggaacttct
aaccgcaccccactgtcgcaccaccggctcccgtatacagagatcactccgaaaagaaagaactcccgcaag
atgaacaacaagatcaggaccacattcaagaggccaggaaaccaagacagtgaacaacaccagccagaacattc
ttttgaggagatgtatcgccacattctaagatcacaggggccattttgatgccgttttgtattatcatatgatg
aaggatgagcctgtagttttcagtagcagtgatggtaagagtaacagatccggactcccttgaagaggaat
atccacatggctcactgaaaaagaggccatgaatgatgagaatagatttgttacactggatgggtcaacaatt
ttattggccagtaataatcacaggaataaattcatggcaatcctgcaacatcatcagtgaaatgagcatgtaa
taatgggatgatttaatcgacaaaatagctaacaattaaatagtcaaggaacgcaaacaggaagaatttttgatg
tctaaggtgtgaattattatcacaataaaagtgtattcttagttttgaatttaaagctagcttattattactag
ccgttttcaaagttcaatttgagcttaaatgcaataaagcgttaagccacagttatagccataatggtaact
caatatcttagccagcgttttatctaataataaattacattatgcttttataacttacctagctagcctcccaa
catttacacagatcgttttataattaagaaaaactaatgatgaaagattaaaacttcatcatccttacgctcaa
ttgaattctctagcactagaagcttattgtcttcaatgtaaaagaaaagctggcctaacaagatgacaactag
aacaagggcaggggccatactgtggccaagcactcaaacgacagaatgccaggccctgagctttcgggctgg
atctctgagcagctaatgaccggaaggattcctgtaaacgacatcttctgtgatattgagaacaatccaggat
tatgctacgcatcccaaatgcaacaaacgaagccaaaccgaagatgcgcaacagtcaaaacccaaacggaccc
aatttgcaatcatagttttgaggaggtagtacaacattggcttcattggctactgttgtgcaacaacaacc
atcgcatcagaatcattagaacaacgcattacagagcttgagaatgggtctaaagccagtttatgatatggcaa
aaacaatctcctcattgaacaggggttggctgagatgggttgcaaaatgatcttctgggtgatgacaaccgg
tcgggcaacagcaaccgctgcccgaactgaggcttattgggctgaacatgggtcaaccaccacctggaccatca
ctttatgaagaaagtgcgattcggggtaagattgaatctagagatgagactgtccctcaaagtggttagggag
cattcaacaatctagacagtagcacttcaactgaggaaaattttgggaaacctgacatttcggcaaaagga
tttgagaaaacattatgtatgatcacttgctgggttttggaaactgctttccaccaatagtagcaagtgatttgt
aaattgggaaaagatagcaattcattggacattattcatgctgagttccaggccagcctggctgaaggagact
cccctcaatgtgccctaaattcaattcaaaaaagagttccaatcttccaagatgctgctccacctgtcatcca
catccgctctcgaggtgacattccccgagcttgccagaagagcttgccgtccagtcocaccatcacccaagatt
gatcgaggttgggtatgtgtttttcagcttcaagatggtaaaacacttggactcaaaatttgagccaatctct

ES 2 795 833 T3

t t t c c c t c c g a a g a g g c a a c t a a t a g c a g a g g c t t c a a c t g c t g a a c t a t a g g g t a t g t t a c a t t a a t g a t a
c a c t t g t g a g t a t c a g c c t a g a t a a t a t a a g t c a a t t a a c a c c a a g a t a a a a t t g t t c a t a t c c c g c t a g
c a g c t t t a a g a t a a a t g t a a t a g g a g c t a t a c c t c t g a c a g t a t t a t a a t t a a t t g t t a t t a a g t a a c c c a a
a c c a a a a a t g a t g a a g a t t a a g a a a a c c t a c c t c g a c t g a g a g a g t g t t t t t c a t t a a c c t t c a t c t t g t a
a a c g t t g a g c a a a a t t g t t a a a a t a t g a g g c g g g t t a t a t t g c c t a c t g c t c c t c o t g a a t a t a t g g a g g c c
a t a t a c c c t g c c a g g t c a a a t t c a a c a a t t g c t a g g g g t g g c a a c a g c a a t a c a g g c t t c c t g a c a c c g g a g t
c a g t c a a t g g a g a c a c t c c a t c g a a t c c a c t c a g g c c a a t t g c t g a t g a c a c c a t c g a c c a t g c c a g c c a c a c
a c c a g g c a g t g t g t c a t c a g c a t t c a t c c t c g a a g c t a t g g t g a a t g t c a t a t c g g g c c c a a a g t g c t a a t g
a a g c a a a t t c c a a t t t g g c t t c c t c t a g g t g t c g t g a t c a a a a g a c c t a c a g c t t t g a c t c a a c t a c g g c c g
c c a t c a t g c t t g c t t c a t a t a c t a t c a c c c a t t t c g g c a a g g c a c c a a t c c g c t t g t c a g a g t c a a t c g g c t
g g g t c c t g g a a t c c c g g a t c a c c c c t c a g g c t c c t g c g a a t t g g a a c c a g g c t t t c c t c c a g g a g t t c g t t
c t t c c a c c a g t c c a a c t a c c c c a g t a t t c a c c t t t g a t t t g a c a g c a c t c a a a c t g a t c a c t c a a c c a c t g c
c t g c t g c a a c a t g g a c c g a t g a c a c t c c a a c t g g a t c a a a t g g a g c g t t g c g t c c a g g a a t t t c a t t t c a t c c
a a a a c t t c g c c c a t t c t t t a c c c a c a a a a g t g g g a a g a g g g g a a c a g t g c c g a t c t a a c a t c t c c g g a g
a a a a t c c a a g c a a t a a t g a c t t c a c t c c a g g a c t t t a a g a t c g t t c c a a t t g a t c c a a c c a a a a a t a t c a t g g
g t a t c g a a g t g c c a g a a a c t c t g g t c c a c a a g c t g a c c g g t a a g a a g g t g a c t t c c a a a a a t g g a c a a c c a a t
c a t c c c t g t t c t t t t g c c a a a g t a c a t t g g g t t g g a c c g g t g g c t c c a g g a g a c c t c a c c a t g g t a a t c a c a
c a g g a t t g t g a c a c g t g t c a t t c t c t g c a a g t c t t c a g c t g t g g t t g a g a a g t a a t t g c a a t a a t t g a c t c
a g a t c c a g t t t t a c a g a a t c t t c t c a g g g a t a g t g a t a a c a t c t t t t a a t a a t c c g t c t a c t a g a a g a g a t a
c t t c t a a t t g a t c a a t a t a c t a a a g g t g c t t t a c a c c a t t g t c t c t t t t c t c t c t a a a t g t a g a g c t t a a c a
a a a g a c t c a t a a t a t a c c t g t t t t t a a a g a t t g a t t g a a a g a t c a t g a c t a a t a a c a t t a c a a a c a a c a t c
c t a c t a t a a t c a a t a c g g t g a t t c a a a t g t c a a t c t t t c t c a t t g c a c a t a c t c t t t g t c c t t a t c c t c a a a t
t g c c t a c a t g c t t a c a t c t g a g g a c a g c c a g t g t g a c t t g g a t t g g a g a t g t g g a g g a a a a a t c g g g g c c c a t
t t c t a a g t t g t t c a c a a t c t a a g t a c a g a c a t t g c t c t t c t a a t t a a g a a a a a t c g g c g a t g a a g a t t a a g c
c g a c a g t g a g c g t a a t c t t c a t c t c t c t t a g a t t a t t t g t c t t c c a g a g t a g g g g t c a t c a g g t c c t t t t c a a
t t g g a t a a c c a a a a t a a g c t t c a c t a g a a g g a t a t t g t g a g g c g a c a a c a a t g g g t g t t a c a g g a a t a t t g
c a g t t a c c t c g t g a t c g a t t c a a g a g g a c a t c a t t c t t t c t t t g g g t a a t t a t c c t t t t c c a a a g a c a t t t t
c c a t c c c g c t t g g a g t t a t c c a c a a t a g t a c a t t a c a g g t t a g t g a t g t c g a c a a a c t a g t t t g t c g t g a c a a
a c t g t c a t c c a c a a a t c a a t t g a g a t c a g t t g g a c t g a a t c t c g a g g g a a t g g a g t g g c a a c t g a c g t g c c a
t c t g c g a c t a a a a g a t g g g g c t t c a g g t c c g g t g t c c c a c c a a a g g t g g t c a a t t a t g a a g c t g g t g a a t g g g
c t g a a a a c t g c t a c a a t c t t g a a t c a a a a a c c t g a c g g g a g t g a g t g t c t a c c a g c a g c c c a g a c g g g a t
t c g g g g c t t c c c c c g g t g c c g g t a t g t g c a a a a g t a t c a g g a a c g g g a c c a t g t g c c g g a g a c t t t g c c t c
c a c a a a g a g g g t g c t t t c t t c c t g t a t g a t c g a c t t g c t t c c a c a g t t a t c t a c c g a g g a a c g a c t t t c g c t g
a a g g t g t c g t t g c a t t t c t g a t a c t g c c c a a g c t a a g a a g g a c t t c t t c a g c t c a c a c c c t t g a g a g a g c c
g g t c a a t g c a a c g g a g g a c c c g t c g a g t g g c t a t t a t t c t a c c a c a a t t a g a t a t c a g g t a c c g g t t t t g g a
a c t a a t g a g a c a g a g t a c t t g t t c g a g g t t g a c a a t t t g a c c t a c g t c c a a c t t g a a t c a a g a t t c a c a c c a c
a g t t t c t g c t c c a g c t g a a t g a g a c a a t a t a t g c a a g t g g g a a g a g g a g c a a c a c c a c g g g a a a a c t a a t t t g
g a a g g t c a a c c c g a a a t t g a t a c a a a t c g g g g a g t g g g c e t t c t g g g a a a c t a a a a a a c c t c a c t a g a a
a a a t t c g c a g t g a a g a g t g t c t t t c a c a g c t g a t c a a a c g g a c c c a a a a a c a t c a g t g g t c a g a g t c c g g c
g c g a a c t t c t t c c g a c c a g a g a c c a c a c a a a a a t g a a g a c c a a a a t c a t g g c t t c a g a a a a t t c c t c t
g c a a t g g t t c a a g t g c a c a g t c a a g g a a g g a a g c t g a g t g c g a t c t g a c a a c c c t t g c c a c a a t c t c c a
c g a g t c c t c a a c c t c c c a c a a c c a a a a c a g g t c c g g a c a a c a g c a c c c a t a a t a c a c c o g t g t a t a a a c t t g a
c a t c t c t g a g g c a a c t c a a g t t g g a c a a c a t c a c c g t a g a c a g a c a a c g a c a g c a c a g c c t c c g a c a c t c c c
c c c g c c a c g a c c g c a g c c g g a c c c t t a a a a g c a g a g a c a c c a a c a c g a g t a a g a g c g t g a c t c c c t g g a c c
t c g c c a c a c g a c a a g c c c c a a a a c t a c a g c g a g a c t g c t g g c a a c a c a a c a c t c a t c a c c a a g a t a c c g g
a g a a g a g a g t g c c a g c a g c g g g a a g c t a g g c t t a a t t a c c a a t a c t a t t g c t g g a g t a g c a g g a c t g a t c a c a
g g c g g g a g a a g g a c t c g a a g a g a a g t a a t t g t c a a t g c t c a c c c a a a t g c a a c c c a a t t t a c a t t a c t g g a
c t a c t c a g g a t g a a g g t g c t g c a a t c g g a t t g g c c t g g a t a c c a t a t t t c g g g c c a g c a g c c g a a g g a a t t a
c a c a g a g g g g c t a a t g c a c a c c a a g a t g g t t t a a t c t g t g g g t t g a g g c a g c t g g c c a a c g a a a c g a c t c a a
g c t c t c c a a c t g t t c c t g a g a g c c a a a c t g a g c t g c g a a c c t t t t c a a t c c t c a a c c g t a a g g c a a t t g a c t
t c c t g c t g c a g c g a t g g g g t g g c a c a t g c c a c a t t t t g g g a c c g g a c t g c t g t a t c g a a c c a c a t g a t t g g a c
c a a g a a c a t a a c a g a c a a a a t t g a t c a g a t t a t t c a t g a t t t t g t t g a t a a a a c c c t t c c g g a c c a g g g g g a c
a a t g a c a a t t g g t g g a c a g g a t g g a g a c a a t g g a t a c c g g c a g g t a t t g g a g t t a c a g g t g t t a t a a t t g c a g
t t a t c g c t t t a t t c t g t a t a t g c a a a t t t g t c t t t t a g t c t t t c t t c a g a t t g t t t c a c g g c a a a a c t c a a c c
t c a a a t c a a t g a a a c t a g g a t t t a a t t a t a t g a a t c a c t t g a a t c t a a g a t t a c t t g a c a a a t g a t a a c a t a a
t a c a c t g g a g c t t c a a c a t a g c c a a t g t g a t t c t a a c t c e t t t a a a c t c a c a g t t a a t c a t a a a c a a g g t t t
g a c a t c a a t c t a g c t a t a t c t t t a a g a a t g a t a a a c t t g a t g a a g a t t a a g a a a a a g g t a a t c t t t c g a t t a t
c t t t a g t c t t c a t c c t t g a t t c t a c a a t c a t g a c a g t t g t c t t t a a t g a a a a a g g a a a a a g c c t t t t a t t a

ES 2 795 833 T3

agttgtaataatcagatctgcaaaccggtagaatthtagttgtaacctaacacacacaaaagcatttggtaaaaa
gtcaatagaaatttaaacagtgagtgacagacaactcttaaatggaagcttcatatgagagagggacgccccga
gctgccagacagcattcaagggatggacacgaccaccatggtcgagcagcatcatcatccagagagaattatc
gaggtgagtagcctcaatcaaggagcgctcacaagtgcgcttccactgtatctcataagaagagagttga
accattaacagttcctccagcacctaaagacatagtccgacctgaaaaaaggatTTTTGTGTGACAGTAGT
TTTTGAAAAAGACCACAGTTAGAAAGTTAAGTGAAGGAACTACTCCTACTAATCGCCGTAAGACTT
GTGGATCAGTAGAACAAATAATAATACTGCACCAAGGACTCGCGCTTAGCAAATCCAACGGCTGATGA
TTCCAGCAAGAGGAAGGTTCCAAAAATTACCTTGTGACACTGATCAAGACGGCAGAACACTGGGCGAGACAA
GACATCCGAACCATAGAGGATCCAAATTAAGGGCATTGTTAAGTCTATGTGCTGTGATGACGAGGAAATCT
CAAAATCCCAGCTGAGTCTTTGTGTGAGACACACCTAAGGCGGAAGGGCTTGGGCAAGATCAGGCAGAAC
CGTCTCGAAGTATATCAACGATTACACAGTGATAAAGGAGGAGTTTGAAGCTGCCTATGGCAACAATGG
GACCGACAATCCCTAATATGTTTACTGCACTTCTGAATATCGCTCTCCAGTTACCGTGTGAAAGTTCTG
CTGCTGTTGTTTCAGGGTTAAGAACATTGGTTCCTCAATCAGATAATGAGGAAGCTTCAACCAACCCGGGGAC
ATGCTCATGGTCTGATGAGGGTACCCTTAATAAGGCTGACTAAAACACTATATAACCTTCTACTTGATCACA
ATACTCCGTATACCTATCATCATATATTTAATCAAGACGATATCCTTTAAAACCTTATTCAGTACTATAATCAC
TCTCATTTCAAAATGATAAGATATGCATAATTGCCTTAATATATAAAGAGGTATGATATAACCCAAAACATTGA
CCAAAGAAAATCATAATCTCGTATCGCTCGCAATATAACCTGCCAAGCATACTCTTGCACAAAGTGATCTT
GTACACAAATAATGTTTGACTCTACAGGAGGTAGCAACGATCCATCTCATCAAAAAATAAGTATTTTATGATT
TACTAATGATCTCTAAAATATAAGAAAACTGACGGAACATAAATCTTTCTGCTTCAAGTTGTGGAGGAG
GTCTATGGTATTGCTATTGTTATATTACAATAACAAGCTTGTAATAAATATTGTTCTTGTTCAGGAGG
TATATTGTGACCGGAAAAGCTAAACTAATGATGAAGATTAATGCGGAGGTCTGATGAGAATAAACCTCATTAT
TCAGATTAGGCCCAAGAGGCATTCTTCATCTCCTTTAGCAAAATACTATTTCCAGGATAGTCCAGCTAGTGA
CACGCTCTTTAGCTGTATACCAGTTGCCCTGAGATACGCCACAAAAGTGTCTCTGAGCTAAAGTGGTCTGTA
CACATCTCATACATTGTATTAGGGGCAATAATATCTAATTGAACCTAGCCATTTAAAATTTAGTGCATAAATC
TGGGCTAACTCCACCAGGTCAACTCCATTGGCTGAAAAGAAGCCACCTACAACGAACATTACTTTGAGCGCC
CTCACAATTAATAAATAAGAGCGTCTTCCAACAATCGAGCGCAAGGTTACAAGGTTGAAGTGTGAGAGTGTCTA
GACAACAAAATATCGATACTCCAGACACCAAGCAAGACCTGAGAAAAACCATGGCCAAAGCTACGGGACGAT
ACAATCTAATATCGCCAAAAAGGACCTGGAGAAAGGGTGTCTTAAGCGACCTCTGTAACCTCTTAGTTAG
TCAAATCAATCAAGGGTGGAAAGTTATTGGGCTGGTATTGAGTTTGATGTGACTCACAAGGAATGGCCCTA
TTGCATAGACTGAAAACCTAATGACTTTGCCCTGATGGTCAATGACAAGGAACCTATTTCCCATTTATTTT
AAAATCCGAATCCACTATTGAATCACCGCTGTGGGACTGAGAGTCACTCTGACGAGGGATACAGGACCA
GTTAATTGACCAGTCTTTGATGTAACCCTTAGCAGGAGCCCTTGGTCTGATCTCTGATTGGGTGCTAACAACC
AACACTAACCATTTCAACATGCGAACACAACGCTGTCAAGGAACAATTGAGCCTAAAAATGCTGTGCTTGATTC
GATCCAATATTTCAAGTTTATTAACAATTTGGATGCTCTACATGTGCTGAACATAATGGATTATTGAGCAG
TATTGAAATTTGGAACCTAAAAATCATACAATCATCATAACTCGAACTAACATGGGTTTTCTGGTGGAGCTCCAA
GAACCCGACAAAATCGGCAATGAACCGCAAGAAGCCTGGGCGGGCGAAATTTCCCTCCTTCATGAGTCCACAC
TGAAAGCATTTACACAAGGTCCTCGACACGAATGCAAAGTTAATCTTGAATTCATAGCTCTCTTGCTAT
CTAATAAGATGGAATACTTCATATTGGGCTAACTCATATATGCTGACTCAATAGTTAACTTGACATCTCTGC
CTTCATAATCAGATATATAAGCATAATAAATAACTCATATTTCTTGATAATTTGTTAACCACAGATAAAA
TCTCACTGTAAAGCAGCTTCCAAGTTGACACCCTTCAAAAAACAGGACTCAGAATCCCTCAAATAAGAGAT
TCCAAGACAACATCATAGAATTGCTTTATTATTAATAAGCATTTTATCACTAGAAATCCAATATACGAAAT
GGTAAATTGTAACATAAACCCGCAAGTTCATGTGTGTTAGGTTTCAAAAATTATATATATTACTAACTCCATACT
CGTAACTAACATTAGATAAGTAGGTTAAGAAAAAGCTTGAGGAAGATTAAGAAAAACTGCTTATTGGGTCTT
TCCGTGTTTTAGATGAAGCAGTTGACATTCTTCTCTTGATATTAATGGCTACACAACATACCCAATACCCA
GACGCCAGGTATCATCACCAATTGTATTGGACCAATGTGACCTTGTCACTAGAGCTTGGGGTGTGATTATCAT
CATACTCCCTTAATCCGCAACTACGCAACTGTAACCTCCGAAACATATATAACCGTTAAAATATGATGTAAC
TGTTACCAAGTTCTTAAGTGTGATGATACCAGTGGCGACATTGCCCATAGATTTTCATAGTCCCAATCTTCTCAAG
GCCTATCAGGCAATGGGTTCTGTCTGTTGAGCGCGGTGCCAACAGTTCTTAGATGAAATTAATAAGTACA
CAATGCAAGATGCTCTCTCTGAAATATTATCTCAAAAATGTGGGTGCTCAAGAAGACTGTGTTGATGACCA
CTTTCAAGAAAAATCTTATCTTCAATTCAGGGCAATGAATTTTACATCAAAATGTTTTCTGGTATGACCTG
GCTATTTAACTCGAAGGGGTAGATTAATCGAGGAACTCTAGATCAACGTGGTTTTGTTCTGATGATTTAA
TAGACATCTTAGGCTATGGGGACTATGTTTTTGGAGATCCCAATTTCACTGTTACCCTGAACACACAAGG
AATCCCCATGCTGCTATGGATTGGTATCAGACATCAGTATTCAAAGAAGCGGTTCAAGGGCATAACACACATT
GTTTTCTGTTTCTACTGCCGATGCTTGATAATGTGCAAGATTTAATTACATGTGATTCAACACAACCTCTAA
TCTCAAAAATAGCAGAGGTTGAGGACCCAGTTTGTCTGATTATCCCAATTTAAGATTGTGTCTATGCTTTA
CCAGAGCGGAGATTACTTACTCTCATATTAGGGTCTGATGGGTATAAAATCATTAAAGTTTCTCGAACCATTTG
TGCTTGGCTAAAATCAATTGTGCTCAAAGTACCCGAGAGGAAGGGCCGATTTCTAACACAAATGCATTTAG
CTGTAATCACACCCTGGAAGAAATACAGAAATACGTGCACTAAAGCCTTCACAGGCTCACAAGATCCGTGA

atccatagaacattgataaggctggagatgacgccacaacaactttgtgagctattttccatacaaaaaacac
tgggggcatcctgtgctacatagtgaaacagcaatccaaaaagttaaaaaacatgctacgggtgctaaaagcat
tacgccctatcgtgattttcgagacatattgtgttttttaaatatagcattgcaaacattattttgatagtc
aggatcttggtagacagtggttacctcagatagaaatctaaccagggtcttaattcttatatacaaaagaaatcaa
ttccctcggttgccaatgattaaagaactgctatgggaattttaccaccttgaccatcctccacttttctcaa
ccaaaattattagtgacttaagtatttttataaaagacagagctactgcagtagaaaggacatgctgggatgc
agtattcagagcctaagtgtctgggatataatccacctcacaattcagtagcaaacagtgtagccggaacaattt
ttagagcaagaaaacttttctattgagaatgttctttctacgcgcaaaaactcgagtagtactactaccacaat
atcggaatttttctttctcattgaaagagaaagagttgaatgtaggtagaactttcggaatttgccttatcc
gactcgcaatggttcaaacactttgtgaagctctgttagctgatggtcttgctaaagcatttcttagcaatag
atggtagttacggaacgtgaacaaaaagaaagcttattgcatcaagcatcatggcaccacacaagtgatgatt
tcggtgagcatgccacagttagagggagtagctttgtaactgattagagaaatacaatcttgcaatttaggta
tgagtttacagcaccttttatagaatattgcaaccggtgctatggtggttaagaatgttttaattggatgcat
tatacaatcccacagtggttatatgcatgctcagtgattattataatccaccgcataacctcacactggaaaatc
gaaacaacccccctgaagggcctagttcctacaggggtcatalatgggagggattgaaggactgcaacaaaaact
ctggacaagtatctcatgtgctcaaatttctttagttgaaattaagactgggttttaagttgctgctcagctgtg
atgggtgacaatcagtgattaccgttttatcagctcttccccttagagactgatgcagacgagcaggaacaga
gcccagaggacaatgcagcaggggtggccgcccagcctagcaaaagttacaagtgccctgtggaatctttttaa
acctgatgaaacatttgtacattcaggttttatctattttggaaaaaaacaatatttgaatgggggtccaattg
cctcagtcctttaaaccggctacaagaatggcaccattgtctgatgcaatttttgatgatcttcaagggacc
tggctagtagtagtactgcttttgagcgtacctctctgagacacgacatactttccttgcaagaataaccgc
agctttccatacgttcttttcggtgagaactctgcaatatcatcacctcggatttaataaagggttttgacctt
ggacagttaacactcggcaaacctctggatttccggaacaatatcattggcactagcggtagccgaggtgcttg
gagggttatccttcttgaatcctgagaaatgtttctaccggaatctaggagatccagttacctcaggtttatt
ccagttaaaaacttatctccgaatgattgagatggatgatttattcttacctttaattgcaagaacccctggg
aactgcactgccattgactttgtgctaaatcctagcggattaaatgttctggggtcgcaagacttaacttcat
ttctgcccagattgtacgtaggactatcacctaaagtgcgaaaaacaacttattaataccttatttcatgc
atcagctgacttccaagacgaaatggtttgaagtggctcttatcatcaactcctggttatgagtcgtttcgca
gcccgatataattttcacgcacgcccagcgggaagcgattgcaaatcttaggatacttggaaaggaacacgcacat
tattagcctctaagatcatcaacaataacagagacgcccgggtttggacagactgaggaagataacattgca
aaggtggagtctatggtttagttatcttgatcattgtgataatatcctggcggaggtttaacccaaataact
tgcacagttgatttagcacagatcctgagggaaatattcatgggcacatattttagagggggagacctctattg
gagccacactcccattgatgattgagcaattcaaagtgggttggctgaaacctacgaacaatgtccgcagtg
ttcaaatgccaaagcaacctgggtgggaaccattcgtgtcagtagcagtagcaagaacatattggttagtgcatgg
ccaaatgcatcccgaataagctggactatcggggatggaaatcccatacattggatcaaggacagaagataaga
tagggcaacctgctattaaacaaaaatgtccttccgcagccttaagagagggccattgaaattggcgtcccgttt
aacatgggtaactcaaggcagttcgaacagtgacttgcataaaaaccatttttggaaagcagagtaaattta
agtggtcaagaaatacttcaaatgacccttccacttactcgggaaatattggttcataggtacaacagatcaat
acagtcctcattcttcatggccaatcgtatgagtaactcagcaacgcgattgattgtttctacaacaacttt
aggtgagttttcagaggtggccaatcggcacgcgacagcaatattattttccagaatgttataaaattatgca
ggtgcaactggtcagatattaaatttagaaacactgaggctacagatattccagtagaataatcgtgctcacttcatc
taactaagtggttgcacccgggaggtaccagctcagtatttaacatacacatctacattggatttagatttaac
aagataccgagaaaaatgaattgatttatgacaataatcctctaaaaggaggactcaattgcaatatctcattt
gataacccatttttccaaggcaaacagctgaacattatagaagatgaccttattcgactgcctcacttatctg
gatgggagctagctaagaccatcatgcaatcaattatttcagatagcaataattcgtctacagacccaattag
cagtgagagaaacaagatcattcactaccatttcttaacttatccaagataggacttctgtacagttttggg
gcctttgtaagttattatcttggcaatacaattcttggactaagaaattaacacttgacaattttttatatt
acttaactacccaaattcataatctaccacatcgtcattgcaatacttaagccaacattcaaacatgcaag
cgttatgtcagattaatgagttatgacccccatttttctatttcatagggcgggtgctgcaggtgacagagga
ctctcagatgcggccaggttatttttgagaacgtccatttcatctttcttacatttgtaaaggaatggataa
ttaatcgcggaacaattgtcccttatggatagtatatccattagaggggtcaaaatccaacacctgttaataa
tttccctccatcagatcgtagaactgctggtgcatgattcatcaagacaccagggtttttaaactaccataaat
gatcatgtacatcctcagcacaatctgtttacacatgtaagagtacagccagcaatttcttccatgcgtcat
tggcgtactggaggagcaggcagaaacagcaaccgaaaagacttgacaagaaactcttcaactggatcaag
cacaacaacagtgatggtcatattaagagaagtcaagaacaaaccaccagagatccacatgatggcactgaa
cggagtctagtcctgcaaatgagccatgaaataaaaagaacgacaattccacaagagaaacacgcaccagggtc
cgtcgttccagtcatttctaagtactctgcttgcggtacagcaaacccaaaactaaatttcgatagatcgag
acacaatgtgaaatctcaggatcataactcagcatccaagaggggaaggtcatcaataatctcacatcgtcta

gtcctacctttctttacattatctcaagggacacgccaattaacgtcatccaatgagtcacaaaccaagatg
 agatatcaaagtaacttacggcaattgagatccgtcattgataccacagtttattgtaggtttaccggtatagt
 ctctgcatgacattacaaacttgatgaggtcctttgggaaatagagaattttaagtcggctgtgacgctggca
 gagggagaaggtgctggtgcttactattgattcagaaataccaagttaagacctatttttcaacacgctag
 ctactgagtcocagtatagagtcagaaatagtatcaggaatgactactcctaggatgcttctacctgttatgtc
 aaaattccataatgaccaaattgagattattcttaacaactcagcaagccaataacagacataacaaatcct
 acttggtttaaagaccaagagcaaggtacctaggcaagtcgaggttataacctatggatgcagagacgacag
 agaataaaacagatcgaaattgtacgaagctgtacataaattgatcttacaccatggtgatccagcgtatt
 gaaagcagtggtccttaaagtctttctaagtataccgagggatggttatggctaaatgataatctagccccg
 tttttgccaactgggtatttaattaagccaataacgtcaagtgccaggtctagtgagtggtatctttgtctga
 cgaacttcttatcaactacacgtaagatgccacaccaaaccatctcagttgtaagcaggttaatacttacggc
 attgcaactgcaaattcaacggagccatactggctaagtcatttaactcagtatgctgactgcgatttacat
 ttaagctatatccgcttggttttccatcattagagaaagtaactataccacaggtataacctgtcgattcaa
 aaagaggtccactagtctctgtcactcagcacttagcacatcttagggcagagattcgagaattgaccaatga
 ttataatcaacagcgcacaaagtcggactcaaacatatcactttattcgtactgcaaaaggacgaatcacaaa
 ctagtcaatgattatttaaattctttcttattgtacaagcattaaaacataatgggacatggcaagctgagt
 ttaagaaattaccagagttgattagtgtgtgcaataggttctatcataatagagattgtaattgtgaagaacg
 tttcttagttcaaaccttataatttacatagaatgcaggattctgaagtaagcttatcgaaaggctgacaggg
 cttctgagtttattttcagatggctctctacaggttcgattgataaacctgcatagtttttgatacttgtaa
 aggttggttatcaacatacagattataaaaaactcataaattgctctcatacatcatcttgatctgatttcaa
 taataactatttagataacgaaaggagtccttacattatacactataattggcctctctccctgctgataa
 tcaaaaaattcacatacagcatgtgtgacataactgctgcaatgagtcctaacgcaacataataaactccg
 cactctttataattaagcttaacgataggtctgggctcatattggttattgatataagtaatggtgatcaata
 tcttgccagatggaatagtgctttgggttgataacacgacttcttaaaacaaaactgatctttaagattaagtt
 tttataattgtcattgctttaattgtcgatttaaaaatgggtgatagccttaatctttgtgtaaaaataagag
 attaggtgtaataactttaacattttttgtctagtaagctactattccattcagaatgataaaaattaaagaaa
 agacatgactgtaaaatcagaataaccttctttacaatatagcagactagataataatcttcgtgtaatgat
 aattaaggcattgaccacgctcatcagaaggctcactagaataaacggttgcaaaaaggatccctggaaaatg
 gtcgcacacaaaaatttaaaaataaatctatttcttctttttgtgtgtcca, (SEQ. ID. NO.:1).

SEQ. ID. NO: 2

CGGACACACAAAAAGAAAAGTTTTTTAGACTTTTTGTGTGCGAATAACTATGAGGAAGATTAATCATTT
 TCCTCAAACCTCAAACATAATTAACATTGAGATTGATCTCATCATTTACCAATTGGAGACAATTTAACTAGTC
 AATCCCCCATTTGGGGGCATTCCCTAAAGTGTGCAAAGGTATGTGGGTCGTATTGTTTTGCCTTTCCCTAAC
 TGGCTCCTCCTACAATCTAACCTGCTTGATAAGTGTGATTACCTGAGTAATAGACTAATTTCTGCTCGGTAA
 TTAGCATTCTTAGCAAAACCAATACTATCTCAAGTCCTAAGAGAAGGTGAGAAGAGGGTCCCGAGGTATCCC
 TCCAGTCCACAAAATCTAGCTAATTTAGCTGAGTGGACTGATTACTCTCATCACACGCTAACTACTAAGGGT
 TTACCTGAGAGCCTACAACATGGATAAACGGGTGAGAGGTTTCATGGGCCCTGGGAGGACAATCTGAAGTTGAT
 CTTGACTACCACAAAATATTAACAGCCGGGCTTTCGGTCCAACAAGGGATTGTGCGACAAAGAGTCATCCCGG
 TATATGTTGTGAGTGATCTTGAGGGTATTTGTCAACATATCATTACAGGCTTTGAAGCAGGCGTAGATTTCCA
 AGATAATGCTGACAGCTTCCCTTTACTTTTATGTTTACATCATGCTTACCAAGGAGATCATAGGCTCTTCTC
 AAAAGTGTGACAGTTCAATACTTAGAGGGCCATGGTTTCAGGTTTGAAGTCCGAGAAAAGGAGAATGTGCACC
 GTCTGGATGAATTGTGCCCCAATGTCACCGGTGAAAAAATCTTAGGAGAACATTGGCTGCAATGCCTGAAGA
 GGAGACAACAGAAGCTAATGCTGGTCAGTTTTATCCTTTGCCAGTTTGTCTACCCAACTTGTCTGTTGGG
 GAGAAAGCGTGTCTGAAAAAGTACAAAGGCAGATTCAGGTCCATGCAGAACAAGGGCTCATTCAATATCCAA
 CTTCCTGGCAATCAGTTGGACACATGATGGTGATCTTCCGTTTTGATGAGAACAACATTTTAAATCAAGTTCT
 ACTAATACATCAGGGGATGCACATGGTTCGACGGCCATGATGCGAACGACACAGTAATATCTAATCTGTTGCC
 CAAGCAAGGTTCTCTGGTCTTCTGATTGTAAGACTGTTCTGGACCACATCTACAAAAACCGATCTTGGAG
 TACGACTTCATCCACTGGCCAGGACAGCAAAAGTCAAGAATGAGGTCAGTTTCAATCAAGGCAGCTCTTGGCTC
 ACTTGCCAAGCATGGAGAATATGCTCCATTTGCACGTCTCCTCAATCTTCTGGAGTCAACAACCTTGAACAT
 GGGCTTTATCCACAACCTCAGCCATTGCTTTGGGTGTTGCAACTGCCACGGGAGCACGCTGGCTGGTGTTA
 ATGTAGGGGAGCAATATCAGCAACTGCGTGAGGCTGCTACTGAAGCTGAAAAGCAACTCCAACAATATGCTGA
 GACACGTGAGTTGGACAACCTTGGGCTTGATGAGCAGGAAAAGAAGATTCTCATGAGCTTCCACCAGAAGAAG
 AATGAGATCAGCTTCCAGCAAACCTAACGCAATGGTAACCTTGAAGGAAAGAGCGGCTGGCCAACTGACCGAAG
 CCATCAGACTGCATCAAAGATCAAGGTTGGAGATCGTTATCCTGATGACAATGATATCCATTTCCGGGCC
 GATCTATGATGAAACCCACCCCAACCTTCTGATGATAATCCTGATGATTCACGTGATAACAATATCCAGGT

GGTGTGTTGTTGACCCGTATGATGATGAGAGTAATAATTATCCTGACTACGAGGATTCGGCTGAAGGCACCACAG
GAGATCTTGATCTCTTCAATTTGGACGACGACGATGACGACAGCCAACCAGGACCACCAGACAGGGGGCAGAG
CAAGGAGAGAGCGGCTCGGACACATGGCCCTCCAAGATCCGACCTTGGACGGAGCGAAAAAGGTGCCGGAGTTA
ACCCAGGTTCCACCAACCAGGCAACCTCCACATCACCAGCCGGGTTCAAACACCAACCAACCACAAGGCA
ATATGTCATCTACTCTCCAGAGTATGACCCCTATACAGGAAGAATCAGAGCCCATGATCAGAAAGATGATGA
TGACGAGAGTCTCACATCCCTTGACTCTGAAGGTGACGAAGATGTTGAGAGCGTATCAGGGGAGAACAACCCA
ACTGTAGCTCCACCAGCACCAGTCTACAAAGATACTGGAGTAGACACTAATCAGCAAAATGGACCAAGCAATG
CTGTAGATGGTCAAGGTTCTGAAAGTGAAGCTCTCCCAATCAACCCCGAAAAGAGATCTGCACTGGAAGAAAC
ATATTATCATCTCCTAAAAACACAGGGTCCATTTGAGGCAATCAATTATTATCACCTAATGAGTGATGAGCCC
ATTGCTTTTAGCACTGAAAGTGGCAAGGAATATCTCTTCCAGATTCTCTTGAAGAAGCCTACCCGCCTTGGT
TGAGTGAGAAGGAGGCCTTAGAGAAAAGAAAATCGTTATCTGGTCATTGATGGCCAGCAATTCCTTCTGGCCAGT
AATGAGCCTACAGGACAAGTTCCCTGCTGTTCTTCAACATGACTGAGGACCCATGATTAGTAGATTTTGTFTA
TTCTGAGCTTGATTATAATTGTTTTGATAATTCAGTATGAGCACCAACCCGAAATATAAACCCCTATTTTAG
TTATGAGGAAATTAATAAATAATCTGTAAGTTGTAGGACTATGAAGAGCTGCTTGTGTCAATTTATCACGGG
TTAATACCCATACCGCAAGAATAATATTTAGTAATTTGATCAGCTTATGATATGTACCAATAGGAAAAAT
TATAGCATTAAAAATATAAAGTATCCTTCGATGAGCTTAGGAGGATAATATCCTGATGAATTCATAGAACTTA
GGATTAAGAAAAAATTCATGATGAAGATTAACCTTCATCATCCTTTAAAAAGAGAGCTATTCTTTATCTGA
ATGCCCTTATTAATGTCTAAGAGCTATTATTTGTACCCTTAGCCTAGACACTGCCAACATATAAATCAT
GCAGCAGGATAGCACTTATAGACATCATGGACCCGAAGTGTCTGGCTGGTTTTCTGAGCAATTAATGACCCGGC
AAAATACCGCTAACAGAGGTGTTTGTGATGTTGAAACAAACCAAGTCTGCCCGATAACCATTTATTAAGTA
AGAATCCCAAGACAACACGTAAGAGTGAATAAGCAAGTCCAAACAGATGATGCCAGTAGCTTATTGACAGAAGA
AGTCAAGGCTGCCATAAATTCGGTGATATCAGCTGTGCGTCGGCAAACCAATGCTATTGAATCACTAGAAGGT
CGAGTAACAACCTCTTGAGGCCAGCTTAAAACAGTTCAGACATGGCAAAGACCATATCATCCCTGAATCGCA
GCTGTGCCGAAATGGTTGCAAAAATACGACCTACTGGTGTGACCACTGGGCGAGCAACTGCCACTGCTGCAGC
AACAGAAGCATATTGGAATGAACATGGACAAGCACCTCCAGGCCATCATTGTACGAGGATGATGCTATTAAG
GCTAAATTTGAAAGATCCGAACGGGAAGGTTCCAGAAAGTGTCAAACAGGCCTACACAAATCTAGATAGCACAA
GTGCCCTCAATGAGGAAAATTCGGGCGACCTTACATTTAGCAAAAGATCTCAAGGAAATCATCTATGACCA
TCTCCCAGGATTTGGGACAGCTTTTCATCAGTTGGTGCAGGTTATCTGCAAAATTTGGTAAGGATAATAATATC
CTAGACATAATTCATGCAGAATTTCAAGCAAGCTTGGCTGAGGGAGACTCCCCCAGTGTGCATTAATCCAGA
TAACAAAACGGATCCCTGCTTCCAAGATGCCTCTCCTCCAATTTGTGCATATCAAGTCTCGAGGAGATATACC
CAAAGCCTGTGCAAAAAGCCTCCGGCCGGTCCCGCCGTACCAAAGATCGATAGAGGTTGGGTCTGTATTTTT
CAATTTCAAGACGGGAAGGCCCTTGGGCTAAAAATATGATACAGAAGCAAGGTAAGCTCATTTTTGCGATGGCC
AAATGATACTTATGACTGTTTTAAAAATCAAGTTAGACTAATAGTCTATCATGTACATAAGCTTATAAGTCAGTTT
TAAATTTCCCTCTATCCTAATCAATGATAATGCTGTCAATAGGAAAATTTCCCTGTATTGTAATAAGACCT
CATTAAACATTTTCTCTGCTTAGTACTATGCAGAAACCCCGAGCAAATTAATAATTTGATGAAGATTAAGAAA
AAGAGGGATTTTCTCAGGAAAAATCTTTTTCTTACCTTCATCTCATTAAACAAATTTAGGACTCAGGAAAA
ATGAAAAGGGTCACTGTGCCGACTGCACCACCTGCCTATGCTGACATTGGCTATCCTATGAGCATGCTTCCCA
TCAAGTCAAGCAGGGCTGTGAGTGAATTAACAGAAACAAGAGGTCCTTCTGGAATGGATAACCATCAAA
TTCTATGAGACCTGTTGCTGATGATAACATTGATCAATAACAAGTCATACCCCGAACGGAGTGGCCTCAGCATTC
ATCTTGGAGGCACTCAATGTGATCTCGGGCCCAAAGTCTCATGAAACAAATCCCTATTTGGTTGCCAC
TCGGAATTTGCTGACTCAAAACCGTACAGTTTTGACTCAACAACAGCAGCAATTATGCTCGCATCTTATACGAT
CACCCATTTTGGAAAAGGCCAACCAACCCCTTCGTTAGAGTGAATCGACTTGGTCAAGGAAATACCGGATCACCCA
CTCAGATTGCTCAGGATGGGGAACCAGGCTTTCTTCAAGAGTTTGTGCTACCACCAGTTCAACTGCCGCAAT
ATTTCACTTTTGATCTGACTGCACTCAAATTAGTGACACAGCCTCTCCCTGCTGCGACATGGACAGATGAGAC
TCCGAGCAACCTTTAGGAGCACTTCGTCCCGGGCTTTTCAATTTACCCAAAGCTGAGACCCGTTTACTTCCA
GGCAAAACGGGAAAGAAAGGGCATGTTTCTGATCTGACTGCTCCAGACAAAATTCAGACAATTTGTGAACCTGA
TGCAAGATTTCAAATCGTGCCAAATGATCCAGCTAAGAGTATCATTGGGATCGAGGTTCCAGAATTTGCTGGT
CCACAAGCTCACTGGGAAGAAAATGAGTCAGAAGAATGGACAGCCTATAATTCCTGTCTTACTTCCAAAATAC
ATTGGGCTAGATCCAATCTCACCTGGAGACCTGACTATGGTCATAACACCAGATTATGATGATTGTCATTAC
CTGCCAGTTGCTCTTATCTCAGTGAAGTGAATTTCTCACAAAGTGAAGAGAAACACCTCCAGTAAAGAAATCAA
ATCTTATCTATAGCAACTCAATCGACTTTTAGGAAGCTAGCAGTACATATACTATGGGACAACCTCAACCCCTCT
TGTTAAAAATGACTAATCGGGTCAAAGAATCTCAGTATCAAGCCTGAATCCAAGATAGAACCAGCCCAAAG
GGCCTCCCCAGAGTCTCTTACAAACTTAGCCAATCAATTAACATGCATAAGCGATCCATACTTACCCCAATCA
GTGTCCGATGTTACCCCTTCAAGCCTCCTTCTTAGCAAATGAACTAGCTGTACCAAGAGGTTCCCTCAGCC
TCCTTCTCAAATAACCTGATCCTTGAAGGTTACACCTTACCACCTATGCTCATTTCACCCAAACATAAAAAT
GAAATGTCTTAACATGATGACCAATTAAGAAAAACAAATCTGATGAAGATTAAGCCTGATTAAGGCCAACCC
TTCATCTTTTTACCATAATCTTGTCTCAGTACCATTTGATAAGGGTACTTGGCAAAACGCCCCCATCCTA
AGGGTCTCGCAATGGGGGTCTTAGCCTACTCCAATTTGCCAGGACAAGTTTCGGAAAAGCTCTTTCTTTGT

TTGGGTCATCATCTTATTCCAAAAGGCCTTTTCCATGCCTTTGGGTGTTGTGACTAACAGCACTTTAGAAGTA
 ACAGAGATTGACCAGCTAGTCTGCAAGGATCATCTTGCATCTACTGACCAGCTGAAATCAGTTGGTCTCAACC
 TCGAGGGGAGCGGAGTATCTACTGATATCCCATCTGCAACAAAGCGTTGGGGCTTCAGATCTGGTGTTCCTCC
 CAAGGTGGTCAGCTATGAAGCGGGAGAAATGGGCTGAAAATTTGCTACAATCTTGAAATAAAGAAGCCGGACGGG
 AGCGAATGCTTACCCCCACCCAGATGGTGTGAGAGGCTTTCCAAGGTGCCGCTATGTGCACAAAGCCCAAG
 GAACCGGGCCCTGCCAGGTGACTACGCCTTTACAAGGATGGAGCTTTCTTTCTCTATGACAGGCTGGCTTC
 AACTGTAATTTACAGAGGAGTCAATTTTGTGAGGGGGTATTGCATTCTTGATATTGGCTAAACCAAAAGAA
 ACGTTCCCTCAGTACCCCCCATTCGAGAGGCAGTAAACTACACTGAAAATACATCAAGTTATTATGCCACAT
 CCTACTTGGAGTATGAAATCGAAAATTTTGGTGTCAACACTCCACGACCCTTTTCAAATTTGACAATAATAC
 TTTTGTTCGTCTGGACAGGCCCCACAGCCTCAGTTCCTTTTCCAGCTGAACGACACCATTACCTTCACCAA
 CAGTTGAGTAATACTGAGGACTAATTTGGACACTAGATGCTAATATCAATGCTGATATTGGTGAATGGG
 CTTTTTGGGAAAATAAAAAATCTCTCCGAACAACACTACGTGGAGAAGAGCTGTCTTTTGAAGCTTTATCGCTC
 AACGAGACAGAAGACGATGATGCGGCATCGTCGAGAATTACAAAGGAAGAATCTCCGACCGGGCCACCAGGC
 AGTATTCGGACCTGGTTCCAAAAGAAATCCCCCTGGGATGGTTCATTGCACATACCAGAAGGGGAAACAACATT
 GCCGTCTCAGAATTCGACAGAAGGTCGAAGAGTAAGTGTGAACACTCAGGAGACCATCACAGAGACAGCTGCA
 ACAATTATAGGCACTAACGGCAACCATATGCAGATCTCCACCATCGGGATAAGACCGAGCTCCAGCCAAATCC
 CGAGTTCCTCACCAGCACCGGCACCAAGCCCTGAGGCTCAGACCCCAACCCACACATCAGGTCCATCAGT
 GATGGCCACCGAGGAACCAACAACACCACCGGAAGCTCCCCGGCCCAACAACAGAAGCACCACCTCTCACC
 ACCCCAGAAAATATAACAACAGCGGTTAAAACCTGCTTCCACAGGAGTCCACAAGCAACGGTCTAATAACTT
 CAACAGTAACAGGATCTTGGGAGTCTTGGGCTTCGAAAACGACAGCAGAAGACAACAACTAACACCAAGCCAC
 GGGTAAGTGAATCCCAACTTACACTACTGGACTGCACAAGAACAACATAATGCTGCTGGGATTGCCTGGATC
 CCGTACTTTGGACCGGTGCGGAAGGCATATACACTGAAGGCCCTGATGCATAACCAAAATGCCTTAGTCTGTG
 GACTTAGGCAACTTGCAAATGAAACAACCTCAAGCTCTGCAGCTTTTCTTAAGAGCCACAACGGAGCTGCGGAC
 ATATACCATACTCAACAGGAAGGCCATAGATTTCTTCTGCGACGATGGGGCGGGACATGCAGGATCCTGGGA
 CCAGATTGTTGCATTGAGCCACATGATTGGACAAAAACATCACTGATAAAATCAACCAATCATCCATGATT
 TCATCGACAACCCCTTACCTAATCAGGATAATGATGATAATTGGTGGACAGGCTGGAGACAGTGGATCCCTGC
 AGGAATAGGCATTACTGGAATTAATTTGCAATTAATGCTCTTCTTTGCGTTTGAAGCTGCTTTGCTGAATA
 TCAATTTGAATCATCAATTTAAGCTTGATACATTTCTAGCATTTTAAATTTATAAACCGATACTGATACTTGA
 AATCAGGCTAATGCCAAGTCTGTGCAAACTTGAAAGTAAGCTTACAAAATCCTTTGAACTGGAATGCTTT
 GATACTCTTTCTCAATACTATATAAGTTCCTTCCCAAGAATAATATTGATGAAGATTAAGAAAAAGTGACATT
 GTGCCACTTTTGTAACTTTCATCCACCTACACATTCATATTCAGGAATCTTTGAATTAACCCCTCACACTTGC
 TTAGGAAAGAGCCTATCTTACAAGAAATCCCGAGCGGCAATTCAGTTAATTTTATATCAAGATAACATCCA
 TTTCCAAGACCACAGATAACTATATTTAATCTTTACCACAAATATGGAGAGGGGTCGTGAGCGCGGGAGAT
 CAAGGAATTCACGTGCCGACCAGCAAAATTCACAGGTCTCAATTTAGGACAAGATCCATTTCCCGGGATAA
 GACAACAACAGACTACCGTAGTAGTCGAAGTACTTCGCAAGTTAGAGTCCCTACGGTTTTCCATAAGAAAGGT
 ACTGGGACCCTTACTGTCCCTCCAGCACCTAAGGATATTTGTCTACTCTCAGAAAAGGATTTCTATGTGACA
 GTAATTTCTGTAAGGACCATCAACTTGAAAGCCTAACCGACCGGGAGCTCCTACTTCTTATAGCACGGAA
 GACCTGTGGATCAACTGATTCATCGCTTAATATAGTCTCCTAAAGACCTAAGACTAGCAAATCCTACGGCT
 GATGACTTAAGCAAGACGGCAGTCCAAAATTAACCCATAAAATTTACTAGTCTGAGACTGCTGAGTTTGGGCCA
 ATCAGAATTTAAGTAGAGTAGATGATGCAAACTCCGCTCTCTTACGTTGAGTGTGCTGTCTAGTGTGCGGAA
 ATTCTCTAAGTACAGCTTAGTCAATTAATGTGAGAGTCTCTTAGGAGGGAAAACCTTAGGACAAGACCAAGT
 GAATCAGTTCTCGAGGTTTATCAACGTTTACATAGTGATAAAGGAGGTGCTTTTGGAGCAGCACTATGGCAAC
 AGTGGGATAGACAATCATTAACCTATGTTTATATCTGCTTTTCTCCATGTAGCATTGCAACTTTTCTGTGAGAG
 CTCCACTGTAGTGATATCAGGCCTACGCTTACTTGCCCCCAAGCGTTAATGAAGGGCTCCCTCCTGCACCA
 GGGGAATATACTTGGTCAGAAAGATAGTACAACCTTAGCCTATAGGGAGGACAAGTAAAACAAGATGCCCTTATC
 CTCTATAGATGGTATTTTTAAAGAGGGGGACAGGATAGGAATAAAGATAATGACTAAAGCCAATATAAAGATA
 CGAACACAAGTAGAAATTAATAAGAAATCAAAACAATCTCCCCTTGTTCATATGAAATATAATAGTGAGTA
 TTTGTTTCATGATGTCAATCATTTATTGTTAAAAATAAACAAGTCAAGTAAAGAGTGTAGGATCGTTATATTG
 CAAGGATCCTCCCTAGAAGCGTTGAATCATCTCAAGTAGCCTAGAACAAGAAGCAGAGCATTAAATTTGAAA
 TAGATAATAAGGATATTGCTTGTTTTTAAGATAGTTTTAGGAAGTTTTAAATTAAGAAAAAGAACCCATGGAC
 AACTCTAGCATTGAGGATGGGGTTCCTTGATGATAGTATAGTCTTAGGTATAGGGTAGTCTTACACGTCCT
 ATATTATACAGTCTAAACTTGTAATAATTAACCTACAAGAATGATGAAAATTAATGAGAAGGTTCCAAGATT
 GACTTCAATCCAAACACCTTGTCTGCCAATTTTCTCTTAAAGATATATGATTTTTGTTCTGCGAGATAA
 GGTTATCAAAATAGGGTGTGTATCTCTTTTACATATTTGGGCTCCCACTAGGCTAGGGTTTATAGTTAAGGAAG
 ACTCATCACATTTTTAATTTGAACTAGTCTACTCGCAGAATCCTACCGGAATAGAAATTAGAACATTTGTGAT
 ACTTTGACTATAGGAAATAATTTTCAACACTACCTGAGATCAGGTTATTCTTCCAACCTATTCTGCAAGTAAT
 TGTTTAGCATCATAACAACAACGTTATAATTTAAGAATCAAGTCTTGTAACAGAAAATAAGATAACAGAAAAGA
 ACCTTTATTATACGGGTCCATTAATTTTATAGGAGAAGCTCCTTTTACAAGCCTAAGATTCCATTAGAGATAA

CCAGAATGGCTAAAGCCACAGGCCGGTACAACCTGGTAACACCAAAAACGGGAGCTAGAGCAAGGAGTTGTGTT
TAGCGACCTATGCAACTTCCCTAGTGACTCCAACCTGTGCAAGGATGGAAGGTTTTACTGGGCTGGACTTGAGTTT
GATGTCAACCAAAAAGGGTATTACCTGTAAAATCGTCTTAAAGTGAATGATTTTTGCTCCTGCATGGGCGATGA
CCCGGAACCTCTTCCCACACTTGTTCAAAAACCAACAGTCTGAAGTCCAAACTCCCATTTGGGCTTAAGGGT
AATTCTTGCCCGGGATTTGACCAATTAATGGATCATTCCCTCATTGAGCCGCTATCAGGGGCCCTGAAC
CTAATTGCTGATTGGTTACTAACAACATCTACTAATCACTTCAACATGAGAACTCAACGAGTAAAGGACCAAC
TGAGTATGAGGATGTTATCTTTATAAGGTCAAATATTATTAACCTTTATAAATAAGCTCGAGACTCTTCATGT
CGTTAATTACAAGGGACTTCTAAGCAGTGTGAGATAGGAACACCAAGCTATGCAATCATCATTACCAGGACT
AATATGGGTTATCTTGTGGAAGTTCAGGAACCAGATAAATCTGCAATGGATATACGACACCCTGGTCTGTCA
AATTCTCCCTACTACATGAATCGACACTTAAACCTGTTGCCACTCCTAAACCGTCAAGCATTACTTCATTGAT
CATGGAGTTCAACAGTTCCTTGGCAATTTAATTGCCGTAATAACAATTTGACGATAGGGCTAACATTGATTCC
ATAATCCATCGTAGGACAGAATCAATTTCCCTGTATGATCTTAGTTAATCTCTCTTTATAACAATGATTAATAA
GGAGCTTGTTTAGAATGTACAAAAGTATACTGTTTGACCCCTAGTATCCCTGTAAATATCCTCATTCAATT
TTTTGCTTTTACATGTGTAGTCACCTGTATAGCATGACCCTAGTCATGCCTTTAATTAATACTTAATCTAACA
GTTAATATAATGTATAACTTTCCATGTTCAAAGAGTAGTCAAACAATGTGAGATCCAGTTTCACTCACAGCA
TCTATTCACTATTTACAGTATGATGAGCCCAAATTAACACAGTAGAGGTCTAGATTTATTAATAGAATGAGGA
AGATTAAGAAAAAGTCCATAATGCTGGGGAGGCAATCCTTGCCACCATAGGACTTTTTCAATTCCTCTATTTT
ATGATGGCTACCCAACATACACAATATCCTGATGCAAGATTGTCTTCCCAATTGTCTTAGACCAATGTGACC
TAGTGACAAGAGCTTGTGGACTTTACTCTGAGTATTCGCTGAACCTAAACTAAGGACATGCCGTTTACCAGAA
ACATATCTACAGATTAATAATATGACACTATTGTTTTACGATTTATCAGTGATGTCCCTGTAGCTACAATCCCA
ATAGACTACATTGCTCCGATGTTAATAAATGTTCTGGCAGATAGTAAAAATGTACCATTGGAACCTCCCTGCT
TGAGTTTCTTGGATGAAAATAGTCAATTATACCGTGCAGGATGCAGCATTCTTAATTATTACATGAATCAGAT
TAAAACACAGGAAGGAGTAATTACAGATCAATTGAAACAGAACATTCGTAGGGTCATTCACAAAAACAGATAT
CTATCTGCTCTATTCTTCTGGCATGATCTTGCCATCCTCACCCGTCGAGGGAGAATGAACCGAGGAAATGTGC
GCTCTACTTGGTTTTGTAACGAATGAGGTTGTTGACATTCTAGGATATGGTGATTATATCTTCTGGAAGATCCC
TATTGCTCTATTACCAATGAACACAGCTAATGTTCCACATGCATCAACTGACTGGTACCAACCTAATATCTTC
AAGGAGGCTATTCAAGGACACACACATATTATTTTCAGTCTCTACAGCCGAGGTCTTATTATGTGTAAGGATC
TTGTCAACAGTCGTTTTAATACCCTTCTGATTGCTGAGTTAGCCAGGTTGGAAGATCCAGTGTCTGCTGATTA
TCCACTAGTAGATAATATTCAATCTCTGTATGACGCAGGAGACTACCTGTTGTCCATATTGGGATCAGAGGGG
TACAAAATAATCAAATATCTCGAACCTCTGTGTTTGGCTAAGATTCAACTATGTTCCCAATATACAGAACGAA
AAGGGCGGTTTTTAACCCAGATGCATCTTGCAGTTATTTCAGACATTGCGTGAACCTCCTCCTAATAGAGGGTT
GAAAAAATCACAATTGTCTAAAATCCGCGAGTTTCACCAACTGTTGCTCAGACTCCGATCTACACCACAACAA
TTATGTGAATTATTTTTCAATCCAAAAACACTGGGGCCACCAGTTCTGCATAGTGAAAAGGCCATCCAAAAGG
TTAAAAATCATGCAACAGTTCTAAAGGCATTGCGGCCGATTATCATCTTTGAAACGTATTGTGTGTTCAAGTA
TAGTGTTGCAAAACATTTCTTTGATAGTCAAGGCACCTGGTACAGTGTGATATCAGACCGATGTTTAAACGCCG
GGATTGAATTCCTACATTAGGCGAAAATCAATTCCTCCACTTCCAATGATCAAAGATCTTTTATGGGAATTTT
ACCATTTGGATCATCTCCATTAATTTCCACGAAGATCATTAGTGACCTCAGCATTTCATTAAAGACCGCGC
AACAGCAGTTGAACAGACCTGTTGGGATGCAGTTTTTTCAGCCTAACGTTTTTGGGCTACAGTCCACCTTATCGA
TTCAATACCAACCGTGTACTTGAACAATTCCTGGAGCAAGAGGATTTTTCTATTGAGAGTGTCTTACAATAACG
CCCAAGAACTTAGGTACTTATGCCCCAGAATTTTCTTTTTTATTGAAAGAAAGAAATTAATGATG
TGGTAGGACATTTGAAAATTCCTTATTTAACCAGGAATGTCCAAACCCTCTGCGAAGCATTACTTGCAGAT
GGTTTTGGCTAAAGCCTTTTCAAGCAATATGATGGTGGTTCACAGAGAGGGAACAAAAGGAGAGCCTCCTTCACC
AAGCATCCTGGCACCATACAAGTGATGATTTTCGGAGAGCATGCCACAGTTTCGTGGAAGTAGTTTTTGTACAGA
CCTGGAAAAATACAATCTGGCCTTCAGGTATGAATTCACAGCTCCCTTCATCAAATATTGCAACCAATGCTAT
GGGGTTCGCAATGTCTTTGATTGGATGCACTTCCCTAATTCACAGTGTACATGCATGTTAGTGATTATTATA
ACCCACCACATAATGTAACCTTAGAGAATAGGGAATATCCCCCGAAGGACCAAGTGCTTATAGAGGCCACCT
TGGCGGTATTGAGGGGCTTCAACAAAAGTTATGGACTAGTATCTCATGTGCTCAAATCTCATTGGTAGAGATC
AAGACCGGGTTCAAATTGCGATCAGCAGTCATGGGGGATAATCAATGTATTACAGTATTATCAGTCTTTCCAC
TAGAATCTAGTCCGAATGAGCAGGAGAGATGCGCAGAAGACAATGCAGCCAGAGTGGCTGCTAGCTTGGCCAA
AGTCACAAGTGCCTGTGGGATATTCCTCAAGCTGATGAGACTTTTCGTACACTCAGGCTTTATCTATTTTGGC
AAAAAGCAATACTTGAACGGAATTCAATTACCTCAATCACTCAAGACAGCAGCTAGGATGGCCCTCTCTCAG
ATGCAATTTTTGATGACTTGCAAGGTACACTTGCTAGTATAGGAACTGCCTTTGAGCGATCAATCTCCGAAAC
TAGACATATTTTTACCATGTGCTGTTGCAGCTGCCTTTCATACATATTTCTCTGTTTCGGATCTTACAACATCAT
CACCTTGGTTTTCCATAAGGGTTCAGACCTTGGACAATTGGCAATCAATAAACCTCTTGATTTCCGGGACCATTG
CACTATCCCTAGCAGTTCCTCAGGTATTGGGTGGATTATCCTTCCCTAAATCCAGAAAAGTGCCTTTATCGCAA
CTTGGGTGATCCTGTAACCTCAGGCCATTCCAGTTGAAGCATTATCTGTCAATGGTGGGTATGAGTGATATC
TTTCATGCACTTGTGCAAAAAGCCAGGGAATTGTAGCCGATTGACTTTGTTCTAAACCCAGGCGGGTTAA
ATGTCCTTGGATCACAGGATTTAACAATCTTCCCTTCGTGATTTGTCAGAAGGAGTATCACACTTTCGGCAAG

GAACAAGTTAATCAACACGTTATTTTCACGCTTCTGCAGATCTTGAAGACGAATTAGTATGTAAATGGTTACTT
TCTTCAACGCCCGTGATGAGTCGTTTTCGCAGCCGATATTTTTCTCACGAACACCAAGCGGGAAAAGATTACAAA
TCTTGGGATACCTCGAGGGAACCAGAACCTTTATTAGCATCTAAAATGATAAGCAATAATGCAGAGACACCAAT
CTTGGAGAGGCTCAGAAAAATAACACTTCAAAGATGGAATCTATGGTTTTAGTTACCTAGACCATTGTGACCCA
GCTTTAATGGAAGCAATTCAACCAATTAAGTGTACTGTTGATATTGCTCAAATTTCTAGAGAATACTCCTGGG
CTCATATTCTTGATGGTAGACAGTTAATAGGGGCAACACTGCCATGTATACCTGAGCAGTTCCAAACCACATG
GTTAAAACCTTACGAGCAATGTGTGGAATGTTTCATCCACAAACAATACTAGTCCATATGTATCAGTTGCATTA
AAAAGGAACGTGGTTAGTGCTTGGCCTGATGCATCTAGATTGGGGTGGACGATTGGTGTATGGGATTCCCTACA
TAGGCTCAAGAACTGAGGACAAGATAGGTGAGCCCGCTATTAAGCCGAGGTGCCCATCAGCTGCATTAAGAGA
AGCTATTGAATTGACCTCTAGGTTGACCTGGGTCACTCAAGGTAGTGCAAACAGCGATCAGTTAATTCGCCCT
TTTTCTTGAGGCAAGAGTAACTTGAGTGTACAAGAGATTTCTCAAATGACCCCTCACATTACTCCGGTAATA
TTGTGCATCGGTATAATGATCAGTATAGCCCTCACTCCTTTATGGCTAACCGCATGAGTAACACAGCAACCGG
CTTGATGGTATCTACCAACACACTAGGAGAGTTTTCCGGAGGGGGTCAAGGCTGCACGTGATAGCAACATTATA
TTTTAAAATGTGATTAACCTTTGCAGTGGCCTTGATGACATTAGGTTTTCGGAACACTTGTACATCTTCTATTC
AATATCACAGGGCCCATATTCACCTGACGAATTGTTGTACGAGGGAAGTACCGGCCAATACTTAAACATACAC
AACCACGCTAAATCTAGATTTGAGTAAGTACCGTAATAATGAATGATTTATGATTGAGAGCCACTAAGAGGA
GGTCTCAACTGCAACTTATCGATTGACAGTCCCTTGATGAAGGGCCACGTTTAAATATTATTGAGGATGACT
TAATACGGTTGCCACATTTATCCGGCTGGGAATTAGCAAAAACAGTCTTGCAATCAATAATCTCTGATAGTAG
CAATTCATCAACAGATCCCATTAGCAGCGGTGAAACAAGATCTTCAACACCCTTCTTAACGTATCCAAA
ATAGGGCTCCTATACAGTTTTGGAGCCCTATAAGTTTTTATTTGGGTAATACTATTCTGTGCACGAAAAAGA
TCGGACTCACAGAATTTCTATACTATCTCCAGAATCAGATCCACAACCTTATCACATAGATGCCCTCGAATCCT
CAAACCGACATTTAGACACTCAAGTGTCTGTCCAGGTTGATGGATATAGACCCCAACTTCTCAATATATATT
GGTGGGACTGCAGGTGACCGTGGATTATCGGACGCTGCAAGATTATTTCTCCGAATTGCAATTTCAACTTTCT
TGAGCTTTGTTGAGGAGTGGGTTATCTTTAGGAAGGCAACATCCCACTATGGGTTATCTATCCTCTCGAAGG
CCAACGCCCTGATCCTCCTGGCGAATTTTTGAACCGAGTAAAATCTCTAATTGTTGGGACTGAAGATGATAAA
AATAAAGGCTCTATACTTTCAAGATCTGGAGAGAAATGCTCTTCAAATCTAGTTTTATAATTGCAAGAGTACAG
CAAGCAATTTTTTCCATGCATCATTGGCTTATTGGAGAGGTCGACACAGACCTAAGAAGACTATAGGTGCAAC
CAACGCGACAACAGCTCCACACATCCTGCCACCAGGAACTCTGATCGACCGCTGGCCTAGACCTTAAT
AGGAACGATGATACTTTCAATCCTACCAGAATTAACAGATAGTCCAAGGAGACTCTAGAAAACGACAGAACGA
CCACCACGAGATTTCCACCCAAAAGTAGGTCCACTCCAACATCAGCAACCGAGCCTCCTACAAAATGTATGA
GGGTTGCAACAACCCACCAAGGAAATTAACAGATACACATTTGGATGAGGATCACAAATGCCAAAGAGTTCCCA
TCCAATCCGCATCGTTTAGTAGTACCATTCTTTAAATTAACAAAAGATGGGGAATACAGTATCGAACCTTCTA
CTGAAGAAAGCCGAGTAATATAAAAAGGTTACTTCAACATTTAAGAACCATGGTTGATACTACCATATATTG
TCGCTTCACTGGAATTGTTTCATCAATGCATTATAAGTTAGATGAAGTACTATGGGAATATAATAAATTTGAA
TCAGCTGTAACCCCTAGCAGAAGGGGAGGGTTCAGGTGCCTTACTACTGATCCAAAAATACGGCGTTAAGAAGT
TATTTTTGAATACACTTGCTACTGAACATAGTATTGAGAGTGAAGTTATATCAGGTTACACCCTCCAAGGAT
GCTACTCTCAATTATGCCTAAAACACATCGTGGTGAGCTAGAGGTCAATTAATAAATCACTAGCTAGTCAATA
ACTGACATTACACACCGAGATTGGTTTTCAAATCAAAAAATAGGATTTCAAATGATGCTGATATTATTACCA
TATCAATCCTAAAACCTTTGAAAGTGGTCACTTAAAAGTCTTCCCTCAGCGATTTGGATGGGATGTGCTGGATT
AACAATTATCTTGCTCCTATGTTTGGATCAGGATATTTAATCAAACCTATAACATCAAGTGCAAGCTCAAGTG
AGTGGTATTTATGCTTATCTAATCTACTTTCAACCTTGAGAACTACTCAGCATCAAACCCAGGCAAACTGTCT
CCATGTGCTACAATGTGCTCTTCAACAGCAAGTACAAAGAGGGTCACTACTGGCTAAGTCATCTTACCAAATAC
ACCACAAGTAGATTGCACAATAGTTATATCGTATTTGGTTTTCTTTCATTAGAGAAGGTCCTATATCATAGGT
ATAACCTCGTTGATTTCGAGAAAACGGACCATTAGTTTTCTATAACGAGACACCTTGCCCTCCTCCAAACTGAGAT
CCGGGAGTTGGTAACTGATTATAATCAGCTGCGACAAAGTGAACCCAGACTTATCATTTTATAAAAAACATCC
AAGGGACGGATAACTAACTAGTGAATGATTATCTAAGATTTGAGTTGGTTATACGGGCTCTTAAAAATAAAT
CTACATGGCACCATGAGTTATACTTGCTACCAGAACTTATAGGTGTTTGCATCGATTTAATCATAACACGTAA
CTGTACATGCAGTGAAGGTTCTTGGTTCAAACCTTTATATCTACACCGAATGAGTGATGCTGAGATAAACTT
ATGGACCGGCTCACCAGCCTAGTCAATATGTTTCTGAAGGTTTTCAGGTCTAGTTCACTAATTTCTAACTGC
ACCAAAGGCTCTAGAAATATTTTAAATAACCAGGTGTATATCAAAGTCAATACAAGTGTA AAAACAATATGCA
AGGGACCACATTTAGGATCAGTTTATTGACTCTTCCAATACACAGAGTTGGAAGCACCGATTCAAGGTTTCTA
AGACGCTCTATCAATTATGTTGATAATGTAATAATAGCTTTTTCTGTCTATTATGACTTAAATAAACATATC
TATAACGACCATCACAGCTAAGTCGTTGCCCTAGTTCATATATTAATTAATAATTTGGAAGCTAGGTTAACTC
TAATTACATAAGTATTAAGAAAAAATTAATAAGACTAATACTCTCATGCCAAGAACTAGTAATGTGTTTCACA
TGACAGATTATTTCTAACTAAATTTGCAATTTCAATTTTAAAGCTAAGTTTAAACCTATAACAGCCAAAATA
TTTTCATAGGGCCGATGGGAATAACATAAGAGGAACATGATCAATGAACCTTTATTCCAACCTAGGCAGTTGAT
TGATAATCTACAAATTCATAAGATGTTCTTACGATATTTCTTTGTTTTAATCTCAATGTCAATGATTTAAT

AAGTAATAATAAAAAAATCACATTAAAGATGCAGGAAGATCTTGACCTCGCCAGGAAAATTAAGCGCACACAA
ATAAATTAAAAAATCTGTATTTTCTCTTTTTTGTGTGTCC, (SEQ. ID. NO.:2).

SEQ. ID. NO: 3

CATCATCAATAATATAACCTTATTTTGGATTGAAGCCAATATGATAATGAGGGGGTGGAGTTTGTGACGTGGCG
CGGGGCGTGGGAACGGGGCGGGTGACGTAGTAGTGTGGCGGAAGTGTGATGTTGCAAGTGTGGCGGAACACAT
GTAAGCGACGGATGTGGCAAAAGTGACGTTTTTGGTGTGCGCCGGTGTACACAGGAAGTGACAATTTTCGCGC
GGTTTTAGGCGGATGTTGTAGTAAATTTGGCGTAACCGAGTAAGATTTGGCCATTTTCGCGGAAAAC TGAA
TAAGAGGAAGTGAAATCTGAATAATTTTGTGTTACTCATAGCGCGTAATACTGTAATAGTAATCAATTACGGG
GTCATTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCG
CCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATT
GACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAC
GCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTT
CCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATG
GGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTG
GCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGCTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGT
GTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGAGATCTGGTACCGTCG
ACGCGGCCGCTCGAGCCTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTC
GGCTTAAAGGTACCCAGAGCAGACAGCCGCCACCATGGAGTCTCCCTCGGCCCTCCCCACAGATGGTGCATC
CCCTGGCAGAGGCTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCGCCACCCTGCCAAGCTCACTA
TTGAATCCACGCCGTTCAATGTGCGAGAGGGGAAGGAGGTGCTTCTACTTGTCCACAATCTGCCCCAGCATCT
TTTTGGCTACAGCTGGTACAAAGGTGAAAGAGTGGATGGCAACCGTCAAATTAAGGATATGTAATAGGAACT
CAACAAGCTACCCAGGGCCCGCATACAGTGGTTCGAGAGATAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGA
ACATCATCCAGAATGACACAGGATTCTACACCCTACACGTCAATAAGTCAAGTCTTGTGAATGAAGAAGCAAC
TGGCCAGTTCGGGTATACCCGGAGCTGCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTCAAACCCGTTGGAGGAC
AAGGATGCTGTGGCCTTACCTGTGAACCTGAGACTCAGGACGCAACCTACCTGTGGTGGGTAAACAATCAGA
GCCTCCCGGTGAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCAACAAGAAA
TGACACAGCAAGCTACAAATGTGAAACCCAGAACCCAGTGAAGTCCAGGCGCAGTGATTGAGTCACTCCTGAAT
GTCCTCTATGGCCGGATGCCCCCACCATTTCCTCTAAACACATCTTACAGATCAGGGGAAAATCTGAACC
TCTCCTGCCACGCAGCCTCTAACCCACCTGCACAGTACTCTTGGTTTTGTCAATGGGACTTTCCAGCAATCCAC
CCAAGAGCTCTTTATCCCCAACATCACTGTGAATAATAGTGGATCCTATACGTGCCAAGCCCATAACTCAGAC
ACTGGCCTCAATAGGACCACAGTACAGCAGATCACAGTCTATGCAGAGCCACCCAAACCCTTCATCACCAGCA
ACAACCTCAAACCCGTTGGAGGATGAGGATGCTGTAGCCTAACCTGTGAACCTGAGATTGAGAACAACAACCTA
CCTGTGGTGGGTAAATAATCAGAGCCTCCCGGTGAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGACAACAGGACCCTC
ACTCTACTCAGTGTCAAGGAATGATGTAGGACCCTATGAGTGTGGAATCCAGAACGAATTAAGTGTGACC
ACAGCGACCCAGTCATCCTGAATGTCTCTATGGCCAGACGACCCACCATTTCCCCCTCATACACCTATTA
CCGTCCAGGGGTGAACCTCAGCCTCTCCTGCCATGCAGCCTCTAACCCACCTGCACAGTATTCTTGGCTGATT
GATGGGAACATCCAGCAACACACACAAGAGCTCTTTATCTCCAACATCACTGAGAAGAACAGCGGACTCTATA
CCTGCCAGGCCAATAACTCAGCCAGTGGCCACAGCAGGACTACAGTCAAGACAATCACAGTCTCTGCGGAGCT
GCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTCAAACCCGTTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTACCTGTGAA
CCTGAGGCTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAAGAGCCTCCAGTCACTCCAGGCTGCAGC
TGTCCAATGGCAACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCAACAAGAAATGACGCAAGAGCCTATGTATGTGGAAT
CCAGAACTCAGTGAAGTCAAACCGCAGTGACCCAGTACCCTGGATGTCCTCTATGGGCCGGACACCCCATC
ATTTCCCCCCCAGACTCGTCTTACCTTTCCGGAGCGGACCTCAACCTCTCCTGCCACTCGGCCTCTAACCCAT
CCCCGAGTATTCTTGGCGTATCAATGGGATACCCGAGCAACACACACAAGTTCTCTTTATCGCCAAAATCAC
GCCAAATAATAACGGGACCTATGCCTGTTTTGTCTCTAACTTGGCTACTGGCCGCAATAATCCATAGTCAAG
AGCATCACAGTCTCTGCATCTGGAACCTCTCCTGGTCTCTCAGCTGGGGCCACTGTGCGCATCATGATTGGAG
TGCTGGTTGGGGTGTCTGATATAGCAGCCCTGGTGTAGTTTTCTTCATTTAGGAAGACTGACAGTTGTTTT
GCTTCTTCTTAAAGCATTGCAACAGCTACAGTCTAAAATTGCTTCTTTACCAAGGATATTTACAGAAAAGA
CTCTGACCAGAGATCGAGACCATCCTCTAGATAAGATATCCGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATC
AGCCATAACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGTCTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATA
AAATGAATGCAATTTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGTTTACAATAAAGCAATAGCATCAC
AAATTTCAAAATAAAGCATTTTTTTCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAA
CGCGGATCTGGGCGTGGTTAAGGGTGGGAAAGAATATATAAGGTGGGGTCTTATGTAGTTTTGTATCTGTTT
TGCAGCAGCCGCCGCCATGAGCACCACCTGTTTGTGGAAGCATTTGTGAGCTCATATTTGACAACGCGC
ATGCCCCCATGGGCCGGGTGCGTCAGAATGTGATGGGCTCCAGCATTGATGGTCCGCCCGTCTGCCCCGAA

ACTCTACTACCTTGACCTACGAGACCGTGTCTGGAACGCCGTTGGAGACTGCAGCCTCCGCCGCCGCTTCAGC
CGCTGCAGCCACCGCCCGCGGATTGTGACTGACTTTGCTTTCCCTGAGCCCGCTTGCAAGCAGTGCAGCTTCC
CGTTTCATCCGCCCGGATGACAAGTTGACGGCTCTTTTGGCACAATTGGATTCTTTGACCCGGAACTTAATG
TCGTTTCTCAGCAGCTGTGGATCTGCGCCAGCAGGTTTCTGCCCTGAAGGCTTCCCTCCCTCCCAATGCGGT
TTAAAACATAAATAAAAAACAGACTCTGTTTGGATTGGATCAAGCAAGTGTCTTGCTGTCTTTATTTAGGG
GTTTTGCGCGCGGTTAGGCCCGGACCAGCGGTCTCGGTGCTGAGGGTCTGTGTATTTTTTCCAGGACGT
GGTAAAGGTGACTCTGGATGTTTACAGATACATGGGCATAAGCCCGTCTCTGGGGTGGAGGTAGCACCCTGCAG
AGCTTCATGCTGCGGGGTGGTGTGTAGATGATCCAGTCTGAGCAGGAGCGCTGGGCGTGGTGCCTAAAAATG
TCTTTCAGTAGCAAGCTGATTGCCAGGGGCAGGCCCTTGGTGTAAAGTGTTTACAAAGCGGTTAAGCTGGGATG
GGTGCATACGTGGGGATATGAGATGCATCTTGGACTGTATTTTTAGGTTGGCTATGTTCCAGCCATATCCCT
CCGGGGATTTCATGTTGTGCAGAACCACCAGCACAGTGTATCCGGTGCACCTGGGAAATTTGTCATGTAGCTTA
GAAGGAAATGCGTGGAAAGAACTGGAGACGCCCTTGTGACCTCCAAGATTTTCCATGCATTCGTCCATAATGA
TGGCAATGGGCCCACGGGCGGCGGCTGGGCGAAGATATTTCTGGGATCACTAACGTTCATAGTTGTGTTCCAG
GATGAGATCGTCATAGGCCATTTTTACAAAGCGCGGGCGGAGGGTGCAGACTGCGGTATAATGGTTCCATCC
GGCCAGGGGCGTAGTTACCCTCACAGATTTGCATTTCCACGCTTTGAGTTCAGATGGGGGGATCATGTCTA
CCTGCGGGGCGATGAAGAAAAACGGTTCGGGGTAGGGGAGATCAGCTGGGAAGAAAGCAGGTTCCCTGAGCAG
CTGCGACTTACCGCAGCCGGTGGGCCGTAATCACACCTATTACCGGCTGCAACTGGTAGTTAAGAGAGCTG
CAGCTGCCGTTCATCCCTGAGCAGGGGGGCCACTTCGTTAAGCATGTCCCTGACTCGCATGTTTTCCCTGACCA
AATCCCGCAGAAGCGCTCGCCGCCAGCGATAGCAGTCTTGCAAGGAAGCAAAGTTTTTCAACGGTTTTGAG
ACCGTCCGCCGTAGGCATGCTTTGAGCGTTTGACCAAGCAGTTCAGGCGGTTCCACAGCTCGGTACCTGC
TCTACGGCATCTCGATCCAGCATATCTCCTCGTTTTCGCGGGTGGGGCGGCTTTCGCTGTACGGCAGTAGTCG
GTGCTCGTCCAGACGGGCCAGGTCATGTCTTCCACGGGCGCAGGGTCTCGTCCAGCGTAGTCTGGGTACG
GTGAAGGGGTGCGCTCCGGGCTGCGCGCTGGCCAGGGTGCAGCTTGGGCTGGTCTGCTGGTGTGAAGCGCT
GCCGGTCTTCCGCTGCGCGTCCGCCAGGTAGCATTGACCATGGTGTTCATAGTCCAGCCCTCCGCGGCGTG
GCCCTTGGCGCGCAGCTTGCCTTGGAGGAGGCGCCGACAGGGGCGAGTGCAGACTTTTGGGGCGTAGAGC
TTGGGCGCGAGAAATACCGATTCGGGGGAGTAGGCATCCGCGCCGAGGCCCGCAGACGGTCTCGCATTCCA
CGAGCCAGGTGAGCTCTGGCCGTTCCGGGTCAAAAACAGGTTTCCCCATGCTTTTTGATGCGTTTTCTTACC
TCTGGTTTTCCATGAGCCGGTGTCCACGCTCGGTGACGAAAAGGCTGTCCGTGTCCCGTATACAGACTTGAGA
GGCCTGTCTCGAGCGGTGTCCGCGTCTCCTCGTATAGAACTCGGACCCTCTGAGACAAAGGCTCGCG
TCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCTAAGTGGGAGGGTAGCGGTGTTGTCCACTAGGGGGTCCACTCGCTCCAG
GGTGTGAAGACACATGTGCCCTCTTCGGCATCAAGGAAGGTGATTGGTTTTGTAGGTGTAGGCCACGTGACCG
GGTGTTCCTGAAGGGGGGCTATAAAAGGGGTGGGGCGCGTTCGTCTCCTCACTCTTCCGCATCGCTGTCTG
CGAGGGCCAGCTGTTGGGGTGGTACTCCCTCTGAAAAGCGGGCATGACTTCTGCGCTAAGATTGTGAGTTT
CAAAAACGAGGAGGATTTGATATTCACCTGGCCCGCGGTGATGCCTTTGAGGGTGGCCGCATCCATCTGGTCA
GAAAAGACAATCTTTTTGTTGTCAAGCTTGGTGGCAAACGACCCGTAGAGGGCGTTGGACAGCAACTTGGCGA
TGGAGCGCAGGGTTTTGGTTTTGTGCGGATCGGCGCGCTCCTTGGCCCGCATGTTTAGCTGCACGTATTCGCG
CGCAACGCACCGCCATTCGGGAAAGACGGTGGTGGCTCGTCCGGCACCAGGTGCACGCGCCAACCGCGGTG
TGCAGGGTGAACAAGTCAACGCTGGTGGCTACCTCCTCCGCTAGGCGCTCGTTGGTCCAGCAGAGGCGGCCG
CCTTGGCGAGCAGAATGGCGGTAGGGGGTCTAGCTGCGTCTCGTCCGGGGGCTGCGCTCCACGGTAAAGAC
CCCGGCGAGCAGCGCGCTCGAAGTAGTCTATCTTGCATCCTTGCAAGTCTAGCCTGCTGCCATCGCGCG
GCGGCAAGCGCGCTCGTATGGGTGAGTGGGGGACCCCATGGCATGGGGTGGGTGAGCGCGGAGGCGTACA
TGCCGCAAAATGTCGTAACGTAGAGGGGCTCTCTGAGTATTCGAAGATATGTAGGGTAGCATCTTCCACCGG
GATGCTGGCGCGCACGTAATCGTATAGTTCTGTCGAGGGAGCGAGGAGGTGGGACCGAGGTTGCTACGGGCG
GGCTGCTCTGCTCGGAAGACTATCTGCCTGAAGATGGCATGTGAGTTGGATGATATGGTTGGACGCTGGAAGA
CGTTGAAGCTGGCGTCTGTGAGACCTACCGCGTCACGCACGAAGGAGGCGTAGGAGTTCGCGCAGCTTGTGAC
CAGCTCGGCGGTGACCTGCACGCTTAGGGCGCAGTAGTCCAGGGTTTTCTTGTATGATGTACACTTATCCTGT
CCCTTTTTTTTTCCACAGCTCGCGGTTGAGGACAACTCTTCCGCGTCTTTCCAGTACTCTTGGATCGGAAACC
CGTCCGCTCCGAACGGTAAGAGCCTAGCATGTAGAAGTGGTTGACGGCCTGGTAGGCGCAGCATCCCTTTTC
TACGGGTAGCGGATGCTTGCCTGCGCGGCTTCCGGCATGACCAGCATGAAGGGCACGAGCTGCTTCCCAAAGGC
CCCCATCCAAGTATAGGTCTTACATCGTAGGTGACAAAGAGACGCTCGGTGCGAGGATGCGAGCCGATCGGG
AAGAACTGGATCTCCCGCCACCAATTGGAGGAGTGGCTATTGATGTGGTGAAGTAGAAGTCCCTGCGACGGG
CCGAACACTCGTGTGGCTTTTGTAAAAACGTGCGCAGTACTGGCAGCGGTGCACGGGCTGTACATCCTGCAC
GAGGTTGACCTGACGACCGCGCACAAAGGAAGCAGAGTGGAAATTTGAGCCCTCGCTGGCGGGTTTTGGCTGG
TGGTCTTCTACTTTCGGCTGCTTGTCTTACCCTGCGTCTGGCTGCTCGAGGGGAGTTACGGTGGATCGGACCACCA
CGCCGCGCGAGCCCAAAGTCCAGATGTCCGCGCGCGGCGGTGGAGCTTGTGACAACATCGCGCAGATGGGA
GCTGTCCATGGTCTGGAGCTCCCGCGGCGTCAAGTCCAGGCGGGAGCTCCTGCAGGTTTACCTCGCATAGACGG
GTCAGGGCGCGGGCTAGATCCAGGTGATAACCTAATTTCCAGGGGCTGGTTGGTGGCGGCGTGCATGGCTTGA
AGAGGCCGATCCCCGCGCGGACTACGGTACCAGCGCGGGCGGCTGGGCCGCGGGGGTGTCTTGGATGA

TGCATCTAAAAGCGGTGACGCGGGCGAGCCCCGGAGGTAGGGGGGGCTCCGGACCCGCCGGGAGAGGGGGCA
GGGGCACGTGCGCGCCCGCGCGGGCAGGAGCTGGTGTGCGCGCGTAGGTTGCTGGCGAACGCGACGACGCG
GCGGTTGATCTCCTGAATCTGGCGCCTCTGCGTGAAGACGACGGGCCCGGTGAGCTTGAACCTGAAAGAGAGT
TCGACAGAATCAATTTGCGGTGTCGTTGACGGCGGCCTGGCGCAAATCTCCTGCACGTCTCCTGAGTTGTCTT
GATAGGCGATCTCGCCATGAACTGCTCGATCTCTCCTCCTGGAGATCTCCGCGTCCGGCTCGCTCCACGGT
GGCGGCGAGGTGCTTGAAATGCGGGCCATGAGCTGCGAGAAGGCGTTGAGGCCTCCCTCGTTCCAGACGCGG
CTGTAGACCACGCCCCCTTCGGCATCGCGGGCGCGCATGACCACCTGCGCGAGATTGAGCTCCACGTGCCGGG
CGAAGACGGCGTAGTTTCGACGGCGCTGAAAGAGGTAGTTGAGGGTGGTGGCGGTGTGTTCTGCCACGAAGAA
GTACATAAACCAGCGTCGCAACGTGGATTGTTGATAATTGTTGTGTAGTACTCCGCCGCGGAGGGACCTGA
GCGAGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGAGAAAGGCGTCTAACAGTACACAGTCCGAAGGTAGGCT
GAGCACCGTGGCGGGCGGACGCGGGCGGGTGGGGTGTGTTCTGGCGGAGGTGCTGCTGATGATGTAATTA
AAGTAGGCGGTCTTGAGACGGCGGATGGTCGACAGAAGCACCATGTCCTTGGGTCCGGCCTGCTGAATGCGCA
GGCGGTCCGGCCATGCCCCAGGCTTCGTTTTGACATCGGCGCAGGTCTTTGTAGTAGTCTTGATGAGCCTTTC
TACCGGCACTTCTTCTTCTCCTTCTTGTCTGTCATCTCTTGATCTATCGCTGCGGGCGGCGGGGAGTTT
GGCCGTAGGTGGCGCCCTCTTCTCCCATGCGTGTGACCCCGAAGCCCTCATCGGCTGAAGCAGGGCTAGGT
CGGCGACAACGCGCTCGGCTAATATGGCTGTGACCTGCGTGAGGGTAGACTGGAAGTCATCCATGTCCAC
AAAGCGGTGGTATGCGCCGTGTTGATGGTGTAAAGTGCAGTTGGCCATAACGGACCAGTTAACGGTCTGGTGA
CCCCGCTCGAGAGCTCGGTGTACCTGAGACGCGAGTAAGCCCTCGAGTCAAATACGTAGTCTGTTGCAAGTCC
GCACCAGTACTGGTATCCCACAAAAAGTGCGGCGGGCTGGCGGTAGAGGGCCAGCCTAGGTTGGCCGG
GGCTCCGGGGGCGAGATCTTCAACATAAGGCGATGATATCCGTAGATGTACCTGGACATCCAGGTGATCCG
GCGGCGGTGGTGGAGCGCGCGGAAAGTCCGCGACGCGGTTCCAGATGTTGCGCAGCGGCAAAAAGTGTCCA
TGGTCCGGGACCTCTGGCCGGTCAGGCGCGCGAATCGTTGACGCTCTAGCGTGCAAAAAGGAGAGCCTGTAAG
CGGGCACTCTTCCGTGGTCTGGTGGATAAATTGCAAGGGTATCATGGCGGACGACCGGGGTTTCGAGCCCCGT
ATCCGGCCGTCCGCCGTGATCCATGCGGTTACCGCCCGCGTGTGCAACCCAGGTGTGCGACGTGAGACAACGG
GGGAGTGCTCCTTTTGGCTTCTTCCAGGCGCGGGCTGCTGCGTAGCTTTTTTGGCCACTGGCCGCGCGC
AGCGTAAGCGGTTAGGCTGGAAAGCGAAAGCATTAAGTGGCTCGCTCCCTGTAGCCGGAGGGTTATTTTCAA
GGGTTGAGTGCGGGACCCCCGGTTCGAGTCTCGGACCGGCCGACTGCGGCGAACGGGGGTTTGCTCCCCG
TCATGCAAGACCCCGCTTGCAAATCCTCCGAAACAGGGACGAGCCCTTTTTTGTCTTTTCCAGATGCATC
CGGTGCTGCGGCAGATGCGCCCCCTCCTCAGCAGCGCAAGAGCAAGAGCAGCGGCAGACATGCAGGGCACC
CTCCCCCTCCTCCTACCGCGTCAAGAGGGGCGACATCCGCGGTTGACGCGGCAGCAGATGGTATTACGAACCC
CCGCGGCGCCGGGCCCCGGCACTACCTGGACTTGGAGGAGGGCGAGGGCCTGGCGCGGCTAGGAGCGCCCTCTC
CTGAGCGGCACCCAAGGGTGCAGCTGAAGCGTGATACGCGTGAGGCGTACGTGCCGCGGCAGAACCTGTTTCG
CGACCGGAGGGAGAGGAGCCCGAGGAGATGCGGGATCGAAAGTTCACGCAGGGCGCGAGCTGCGGCATGGC
CTGAATCGCGAGCGGTTGCTGCGCGAGGAGGACTTTGAGCCCGACGCGCAACCGGGATTAGTCCCGCGCGCG
CACACGTGGCGGCCCGGACCTGGTAACCGCATACGAGCAGACGGTGAACCAGGAGATTAACCTTTCAAAAAAG
CTTTAACAACCACGTGCGTACGCTTGTGGCGCGGAGGAGGTGGCTATAGGACTGATGCATCTGTGGGACTTT
GTAAGCGCGCTGGAGCAAAACCCAAATAGCAAGCCGCTCATGGCGCAGCTGTTCTTATAGTGCAGCACAGCA
GGGACAACGAGGCATTAGGGATGCGCTGCTAAACATAGTAGAGCCCGAGGGCCGCTGGCTGCTCGATTTGAT
AAACATCCTGCAGAGCATAGTGGTGCAGGAGCGCAGCTTGAGCCTGGCTGACAAGGTGGCCCGCATCAAGTAT
TCCATGCTTAGCTGGGCAAGTTTTACGCCGCAAGATATACCATAACCCCTTACGTTCCCATAGACAAAGGAG
TAAAGATCGAGGGGTTCTACATGCGCATGGCGCTGAAGGTGCTTACCTTGAAGCAGACCTGGGCGTTTATCG
CAACGAGCGCATCCACAAGGCCGTGAGCGTGAGCCGGCGGCGAGCTCAGCGACCGCGAGCTGATGCACAGC
CTGCAAAAGGGCCCTGGCTGGCACGGGCGAGCGGATAGAGAGGCCGAGTCTACTTTGACGCGGGCGCTGACC
TGCGCTGGGCCCCAAGCCGACGCGCCCTGGAGGCAGCTGGGGCCGACCTGGGCTGGCGGTGGCACCCGCGCG
CGCTGGCAACGTGCGCGGCTGGAGGAATATGACGAGGACGATGAGTACGAGCCAGAGGACGGCGAGTACTAA
GCGGTGATGTTTCTGATCAGATGATGCAAGACGCAACGGACCCGCGGTGCGGGCGGCGCTGCAGAGCCAGCC
GTCCGGCCTTAACTCCACGGACGACTGGCGCCAGGTGATGGACCGCATCATGTGCTGACTGCGCGCAATCCT
GACGCGTTCGGCGAGCAGCCGAGGCCAACCGGCTCTCCGCAATCTGGAAGCGGTGGTCCCGGCGCGCGCAA
ACCCACGCACGAGAAGGTGCTGGCGATCGTAAACGCGCTGGCCGAAAACAGGGCCATCCGGCCCCGACGAGGC
CGGCCTGGTCTACGACGCGCTGCTTACGCGCTGGCTCGTTACAACAGCGGCAACGTGCAGACCAACCTGGAC
CGGCTGGTGGGGGATGTGCGCGAGGCCGTGGCGCAGCGTGAGCGCGCGCAGCAGCAGGGCAACCTGGGCTCCA
TGGTTGCACTAAACGCCTTCTGAGTACACAGCCCGCAACGTGCCGCGGGGACAGGAGGACTACACCAACTT
TGTGAGCGCACTGCGGCTAATGGTGAAGTGAAGTGAAGTGTACCAGTCTGGGCCAGACTATTTTT
TTCCAGACCAGTAGACAAGGCCCTGCAGACCGTAAACCTGAGCCAGGCTTTCAAAAACCTGACAGGGGCTGTGGG
GGGTGCGGGCTCCACAGGGCAGCCGCGGACCGTGTCTAGCTTGTGACGCCAACTCGCGCCTGTTGTGCT
GCTAATAGCGCCCTTACGGACAGTGGCAGCGTGTCCCGGACACATACTAGGTCACTTGTGACTGTAC
CGCGAGGCCATAGGTGAGGCGCATGTGGACGAGCATACTTCCAGGAGATTACAAGTGTGAGCCGCGCGCTGG
GGCAGGAGGACACGGGCGACCTGGAGGCAACCTAAACTACCTGCTGACCAACCGGCGGCGAGAAGATCCCCCTC

GTTGCACAGTTTAAACAGCGAGGAGGAGCGCATTGTCGCTACGTGCAGCAGAGCGTGAGCCTTAACCTGATG
CGCGACGGGGTAACGCCAGCGTGGCGCTGGACATGACCGCGCGCAACATGGAACCGGGCATGTATGCCTCAA
ACCGGCCGTTTATCAACCGCCTAATGGACTACTTGCATCGCGCGGCCCGCCGTGAACCCCGAGTATTTACCAA
TGCCATCTTGAACCCGCACTGGCTACCGCCCCCTGGTTTTCTACACCGGGGATTTCGAGGTGCCCGAGGGTAAC
GATGGATTCTCTGGGACGACATAGACGACAGCGTGTTCCTCCCGCAACCGCAGACCCTGCTAGAGTTGCAAC
AGCGCGAGCAGGCAGAGGCGGCGCTGCGAAAGGAAAGCTTCCGCGAGGCCAAGCAGCTTGTCCGATCTAGGCGC
TGCGGCCCCGCGGTGAGATGCTAGTAGCCATTTCCAAGCTTGATAGGGTCTCTTACCAGCACTCGCACCACC
CGCCCCGCGCTGCTGGGCGAGGAGGAGTACCTAAACAACCTCGCTGCTGCAGCCGCGAGCGGAAAAAACCTGC
CTCCGGCATTTCCTCAACAACGGGATAGAGAGCCTAGTGGACAAGATGAGTAGATGGAAGACGTACGCGCAGGA
GCACAGGGACGTGCCAGGCCCGCGCCCGCCACCCGTCGTCAAAGGCACGACCCTCAGCGGGGTCTGGTGTGG
GAGGACGATGACTCGGCAGACGACAGCAGCGTCTGGATTTGGGAGGGAGTGGCAACCCGTTTGCACACCTTC
GCCCCAGGCTGGGGAGAATGTTTTAAAAAAAAAAAAAGCATGATGCAAAAATAAAAAACTCACCAAGGCCATGGC
ACCGAGCGTTGGTTTTCTTGTATTCCCTTAGTATGCGGCGCGCGGCGATGTATGAGGAAGGTCTCTCTCCCT
CCTACGAGAGTGTGGTGAGCGCGGCCAGTGGCGGGCGGCTGGGTTCTCCCTTCGATGCTCCCTGGACCC
GCCGTTTGTGCCTCCGCGGTACCTGCGGCCCTACCGGGGGGAGAAACAGCATCCGTTACTCTGAGTTGGCACCC
CTATTGACACCACCCGTGTGTACCTGGTGGACAACAAGTCAACGGATGTGGCATCCCTGAACTACCAGAACG
ACCACAGCAACTTTCTGACCACGGTCATTCAAAACAATGACTACAGCCCGGGGGAGGCAAGCACACAGACCAT
CAATCTTGACGACCCGTCGCACTGGGGCGGCGACCTGAAAACCATCCTGCATACCAACATGCCAAATGTGAAC
GAGTTCAATGTTTACCAATAAGTTTAAAGGCGGGTGTGGTGTGCGGCTTGCCTACTAAGGACAATCAGGTGG
AGCTGAAATACGAGTGGGTGGAGTTCACGCTGCCGAGGCCACTACTCCGAGACCATGACCATAGACCTTAT
GAACAACGCGACTCGTGGAGCACTACTTGAAGTGGGCGAGACAGAACGGGGTTCTGAAAGCGACATCGGGGTA
AAGTTTGACACCCGCAACTTCAGACTGGGTTTTGACCCCGTCACTGGTCTTGTGCATGCCTGGGGTATATACAA
ACGAAGCCTTCCATCCAGACATCATTTTGCTGCCAGGATGCGGGGTGGACTTCACCCACAGCCGCTGAGCAA
CTTGTGGGCATCCGCAAGCGGCAACCCCTCCAGGAGGGCTTTAGGATCACCTACGATGATCTGGAGGGTGGT
AACATTCGCGCACTGTTGGATGTGGACGCCCTACCAGGCGAGCTTGAAGATGACACCGAACAGGGCGGGGGTG
GCGCAGGCGGCAGCAACAGCAGTGGCAGCGGCGGGAAGAGAACTCCAACGCGGCAGCCGCGGCAATGCAGCC
GGTGGAGGACATGAACGATCATGCCATTCGCGGCGACACCTTGGCCACACGGGCTGAGGAGAAGCGCGCTGAG
GCCGAAGCAGCGCCGAAGCTGCCGCCCCGCTGCGCAACCCGAGGTCGAGAAGCCTCAGAAGAAACCGGTGA
TCAAACCCCTGACAGAGGACAGCAAGAAACGCAGTTACAACCTAATAAGCAATGACAGCACCTTCACCCAGTA
CCGCAGCTGGTACCTTGCATACAACCTACGGCGACCCTCAGACCAGGAAATCCGCTCATGGACCCTGCTTTGCACT
CCTGACGTAACCTGCGGCTCGGAGCAGTCTACTGGTCTGTCGAGACATGATGCAAGACCCCGTGCCTTCC
GCTCCACGCGCCAGATCAGCAACTTTCGGTGGTGGGCGCCGAGCTGTTGCCCGTGCCTCCAAGAGCTTCTA
CAACGACCAGGCCGCTACTCCCAACTCATCCGCCAGTTTACCTCTCTGACCCACGTGTTCAATCGCTTTCCC
GAGAACCAGATTTTGGCGCGCCCGCCAGCCCCACCATCACCACCGTCAAGTGAACCGTTTCTGCTCTCACAG
ATCACGGGACGCTACCGCTGCGCAACAGCATCGGAGGAGTCCAGCGAGTGACCATTACTGACGCCAGACGCCG
CACCTGCCCCCTACGTTTACAAGGCCCTGGGCATAGTCTCGCCGCGCGTCTATCGAGCCGCACTTTTTGAGCA
AGCATGTCCATCCTTATATCGCCAGCAATAACACAGGCTGGGGCTGCGCTTCCCAAGCAAGATGTTTGGCG
GGGCAAGAAGCGCTCCGACCAACACCCAGTGCCTGCGCGGCGGCACTACCAGCGCGCCCTGGGGCGCGCACA
ACCCGCGCCGCACTGGGCGCACACCCTGATGACGCCATCGACGCGGTGGTGGAGGAGGCGGCAACTACACG
CGCCGCCCCACCAGTGTCCACAGTGGACGCGGCCATTCAGACCCTGGTGGCGGAGCCCGGCACTATGCTA
AAATGAAGAGACGGCGGAGCGGCTAGCAGTGCACACCGCCGCGGACCCGCGGACTGCCGCCAACCGCGGCG
GGCGGCCCTGCTTAAACCGCGCACGTCGCACCGGCCGAGCGGCGCCATGCGGGCGCTCGAAGGCTGGCCGCG
GGTATTGTCACTGTGCCCCCAGGTCAGGCGACGAGCGGCCGCGCAGCAGCCGCGGCCATTAGTGCTATGA
CTCAGGGTTCGAGGGGCAACGTGTATTGGGTGCGGACTCGGTTAGCGGCCTGCGCGTGCCTGCGCACCCG
CCCCCGCGCAACTAGATTGCAAGAAAAACTACTTAGACTCGTACTGTTGTATGTATCCAGCGGCGGCGGCG
CGCAACGAAGCTATGTCCAAGCGCAAAATCAAAGAAGAGATGCTCCAGGTCATCGCGCCGAGATCTATGGCC
CCCCGAAGAAGGAAGAGCAGGATTACAAGCCCCGAAAGCTAAAGCGGGTCAAAAAGAAAAAGAAAGATGATGA
TGATGAACTTGACGACGAGGTGGAAGTCTGCACGCTACCAGCGCCAGGCGACGGGTACAGTGGAAAGGTGCA
CGCGTAAAACGTGTTTTGCGACCCGGCACACCCTAGTCTTTACGCCCCGGTGGAGCGCTCCACCCGCACTACA
AGCGCGTGTATGATGAGGTGTACGGCGACGAGGACCTGCTTGGAGCAGGCAACGAGCGCCTCGGGGAGTTTGC
CTACGGAAAGCGGCATAAGGACATGCTGGCGTGGCGCTGGACGAGGGCAACCAACACCTAGCCTAAAGCCC
GTAACACTGCAGCAGGTGCTGCCGCGCTTGCACCGTCCGAAGAAAAGCGCGGCCATAAGCGCGAGTCTGGTG
ACTTGGCACCCACCGTGCAGCTGATGGTACCCAAGCGCCAGCGACTGGAAGATGTCTTGGAAAAAATGACCGT
GGAACCTGGGCTGGAGCCGAGGTCCGCGTGGCGCAATCAAGCAGGTGGCGCCGGGACTGGGCGTGCAGACC
GTGGACGTTTACGATACCCACTACCAGTAGCACCAGTATTGCCACCGCCACAGAGGGCATGGAGACACAAACGT
CCCCGGTTGCCTCAGCGGTGGCGGATGCCGCGGTGCAGGCGGTGCTGCGGCGCGCTCCAAGACCTTACGGA
GGTGCAACCGGACCCGTGGATGTTTCGCGTTTTAGCCCCCGGCGCCCGCGGCTTCGAGGAAGTACGGCGCC
GCCAGCGCGCTACTGCCGAATATGCCCTACATCTTCCATTGCGCCTACCCCGGCTATCGTGGCTACACCT

ACCGCCCCAGAAGACGAGCAACTACCCGACGCCGAACCACCCTGGAACCCGCCGCCGCTCGCCGTCGCCA
 GCCCCGTGCTGGCCCCGATTTCCGTGCGCAGGGTGGCTCGCGAAGGAGGCAGGACCCTGGTGCTGCCAACAGCG
 CGCTACCACCCCAGCATCGTTTAAAAAGCCGGTCTTTTGTGGTTCTTGCAGATATGGCCCTCACCTGCCGCTCC
 GTTTCCCGGTGCCGGGATTCGAGGAAGAATGCACCGTAGGAGGGGCATGGCCGGCCACGGCCTGACGGGCGG
 CATGCGTGTGCGCACCACCGGCGGGCGCGCGTGCACCGTGCATGCGCGGGGTATCCTGCCCTCCTT
 ATTCCACTGATCGCCGCGGCGATTGGCGCCGTGCCCGGAATTGCATCCGTGGCCTTGCAGGGCGAGAGACT
 GATTA AAAACAAGTTGCATGTGAAAAATCAAATAAAAAGTCTGGACTCTCACGCTCGCTTGGTCTGTAAAC
 TATTTTGTAGAATGGAAGACATCAACTTTGCGTCTCTGGCCCCGCGACACGGCTCGCGCCCCGTTTTCATGGGAAA
 CTGGCAAGATATCGGCACCAGCAATATGAGCGGTGGCGCCTTTCAGCTGGGGCTCGCTGTGGAGCGGCATTAAA
 AATTTCCGTTCCACCGTTAAGAACTATGGCAGCAAGGCCTGGAACAGCAGCACAGGCCAGATGCTGAGGGATA
 AGTTGAAAGAGCAAAAATTTCCAACAAAAGGTGGTAGATGGCCTGGCCTCTGGCATTAGCGGGGTGGTGGACCT
 GGCCAACCAGGCAGTGCAAAAATAAGATTAACAGTAAGCTTGATCCCCGCCCTCCCGTAGAGGAGCCTCCACCG
 GCCGTGGAGACAGTGTCTCCAGAGGGGCGTGGCGAAAAGCGTCCGCGCCCCGACAGGGAAAGAACTCTGGTGA
 CGAAAATAGACGAGCCTCCCTCGTACGAGGAGGCACTAAAGCAAGGCCTGCCACCACCCGTTCCCATCGCGCC
 CATGGCTACCGGAGTGCTGGGCCAGCACACACCCGTAACGCTGGACCTGCCTCCCCCGCCGACACCCAGCAG
 AAACCTGTGCTGCCAGGCCGACCGCCGTTGTTGTAACCCGTCCTAGCCGCGCGTCCCTGCGCCGCGCCGCCA
 GCGGTCCGCGATCGTTGCGGCCCGTAGCCAGTGGCAACTGGCAAAGCACACTGAACAGCATCGTGGGTCTGGG
 GGTGCAATCCCTGAAGCGCCGACGATGCTTCTGATAGCTAACGTGTCGTATGTGTGTATGTATGCGTCCATG
 TCGCCGCCAGAGGAGCTGCTGAGCCGCCGCGCCGCTTTCCAAAGATGGTACCCTTCGATGATGCCGCGAG
 TGGTCTTACATGCACATCTCGGGCCAGGACGCCCTCGGAGTACCTGAGCCCCGGGCTGGTGCAGTTTGGCCGCG
 CCACCCAGACGTACTTACGCTGAATAACAAGTTTAGAAACCCACGGTGGCGCCTACGCACAGCAGTGAACAC
 AGACCGGTCCACGCTTTGACGCTGCGGTTTCATCCCTGTGGACCGTGAAGATACTGCGTACTCGTACAAGGCG
 CGGTTACCCCTAGCTGTGGGTGATAACCGTGTGCTGGACATGGCTTCCACGTACTTTGACATCCGCGGCGTGC
 TGGACAGGGGCCCTACTTTTAAAGCCCTACTCTGGCACTGCCTACAACGCCCTGGCTCCCAAGGGTGGCCAAA
 TCCTTGCGAATGGGATGAAGCTGCTACTGCTCTTGAATAAACCTAGAAGAAGAGGACGATGACAACGAAGAC
 GAAGTAGACGAGCAAGCTGAGCAGCAAAAACTCACGTATTTGGGCAGGCGCCTTATTCTGGTATAAATATTA
 CAAAGGAGGGTATTCAAATAGGTGTGGAAGGTCAAACACCTAAATATGCCGATAAAACATTTCAACCTGAACC
 TCAAATAGGAGAATCTCAGTGGTACGAAACAGAAATTAATCATGCAGCTGGGAGAGTCTAAAAAAGACTACC
 CCAATGAAACCATGTTACGGTTCATATGCAAAACCCACAAATGAAATGGAGGGCAAGGCATTCTTGTAAGC
 AACAAAATGGAAGCTAGAAAGTCAAGTGGAAATGCAATTTTTCTCAACTACTGAGGCAGCCGAGGCAATGG
 TGATAACTTGACTCCTAAAGTGGTATTGTACAGTGAAGATGTAGATATAGAAACCCAGACACTCATATTTCT
 TACATGCCCACTATTAAGGAAGGTAACCTACGAGAACTAATGGGCCAACAATCTATGCCCAACAGGCCTAATT
 ACATTGCTTTTAGGGACAATTTTATTGGTCTAATGTATTACAACAGCACGGGTAATATGGGTGTTCTGGCGGG
 CCAAGCATCGCAGTTGAATGCTGTTGTAGATTTGCAAGACAGAAACACAGAGCTTTCATACCAGCTTTTGCTT
 GATTCCATTGGTGATAGAACCAGGTACTTTTCTATGTGGAATCAGGCTGTTGACAGCTATGATCCAGATGTTA
 GAATTATTGAAAATCATGGAAGTGAAGATGAACCTCAAATTAAGTCTTTCCACTGGGAGGTGTGATTAATAC
 AGAGACTCTTACCAAGGTA AAAACCTAAAACAGGTCAGGAAAATGGATGGGAAAAGATGCTACAGAATTTTCA
 GATAAAAATGAAATAAGAGTTGGAATAATTTTGCCATGGAAATCAATCTAAATGCCAACCTGTGGAGAAAT
 TCCTGTACTCCAACATAGCGCTGTATTTGCCCGACAAGCTAAAAGTACAGTCTTCCAACGTA AAAATTTCTGA
 TAACCCAAACACTACGATACATGAACAAGCAGTGGTGGCTCCCGGGCTAGTGGACTGTACATTAACCTT
 GGAGCAGCTGCTCCCTGACTATATGGACAACGCTCAACCCATTTAACACCACCGCAATGCTGGCCTGCGCT
 ACCGCTCAATGTTGCTGGGCAATGGTTCGCTATGTGCCCTTCCACATCCAGGTGCCTCAGAAGTTCTTTGCCAT
 TAAAAACCTCCTTCTCCTGCCGGGCTCATAACCTACGAGTGGAACTT CAGGAAGGATGTTAACATGGTTCTG
 CAGAGCTCCCTAGGAAATGACCTAAGGGTTGACGGAGCCAGCATTAAAGTTTGATAGCATTTGCCTTTACGCCA
 CCTTCTTCCCATGGCCACAACACCGCCTCCACGCTTGAGGCCATGCTTAGAAACGACACCAACGACCAGTC
 CTTTAAAGACTATCTCTCCGCGCCAACATGCTCTACCCTATACCCGCCAACGCTACCAACGTGCCCATATCC
 ATCCCTCCCGCAACTGGGCGGCTTTCCGCGGCTGGGCCTTACGCGCCTTAAGACTAAGGAAACCCCATCAC
 TGGGCTCGGGCTACGACCCTTATTACACCTACTCTGGCTCTATACCCTACCTAGATGGAACCTTTTACCTCAA
 CCACACCTTTAAGAAGGTGGCCATTACCTTTGACTCTTCTGTGAGCTGGCCTGGCAATGACCGCCTGCTTACC
 CCCAACGAGTTTGAATTAAGCGCTCAGTTGACGGGGAGGGTTACAACGTTGCCAGTGTAAACATGACCAAAG
 ACTGGTTCCCTGGTACAAATGCTAGCTAACTATAACATTGGCTACCAGGGCTTCTATATCCAGAGAGCTACAA
 GGACCGCATGACTCCTTCTTTAGAAACTTCCAGCCCATGAGCCGTGAGGTGGTGGATGATACTAAATACAAG
 GACTACCAACAGGTGGGCATCCTACCCAACAACAACCTCTGGATTTGTTGGCTACCTTGCCCCACCATGC
 GCGAAGGACAGGCCTACCCTGCTAACTTCCCCTATCCGCTTATAGGCAAGACCGCAGTTGACAGCATTACCCA
 GAAAAAGTTTCTTTGCGATCGCACCCCTTTGGCGCATCCCATTCTCCAGTAACTTTATGTCCATGGGCGCACTC
 ACAGACCTGGGCCAAAACCTTCTCTACGCCAATCCGCCCACGCGCTAGACATGACTTTTGGAGGTGGATCCCA
 TGGACGAGCCACCCTTCTTTATGTTTTGTTTGAAGTCTTTGACGTGGTCCGTGTGCACCAGCCGACCCGCGG
 CGTCATCGAAACCGTGACTCTGCGCACGCCCTTCTCGGCCGGCAACGCCACAACATAAAGAAGCAAGCAACAT

CAACAACAGCTGCCGCCATGGGCTCCAGTGAGCAGGAAGTCAAAGCCATTGTCAAAGATCTTGGTTGTGGGCC
 ATATTTTTTTGGGCACCTATGACAAGCGCTTCCAGGCTTTGTTTCTCCACACAAGCTCGCCTGCGCCATAGTC
 AATACGGCCGGTCGCGAGACTGGGGGCGTACACTGGATGGCCTTTGCCTGGAACCCGCACTCAAAAAATGCT
 ACCTCTTTGAGCCCTTTGGCTTTTCTGACCAGCGACTCAAGCAGGTTTACCAGTTTGGAGTACGAGTCACTCCT
 GCGCCGTAGCGCCATTGCTTCTTCCCCGACCGCTGTATAACGCTGGAAAAGTCCACCCAAAGCGTACAGGGG
 CCAACTCGGCCGCTGTGGACTATTCTGCTGCATGTTTCTCCACGCCTTTGCCAACTGGCCCCAACTCCCA
 TGGATCACAACCCACCATGAACCTTATTACCGGGTACCCAACCTCCATGCTCAACAGTCCCCAGGTACAGCC
 CACCCTGCGTCGCAACCAGGAACAGCTCTACAGCTTCCCTGGAGCGCCACTCGCCCTACTTCCGCGCCACAGT
 GCGCAGATTAGGAGCGCCACTTCTTTTTGTCACTTGAAAAACATGTAAAAATAATGTACTAGAGACACTTTCA
 ATAAAGGCAAATGCTTTTTATTGTACACTCTCGGGTGATTATTTACCCCCACCCTTGCCGTCTGCGCCGTTTA
 AAAATCAAAGGGGTTCTGCCGCGCATCGCTATGCGCCACTGGCAGGGACACGTTGCGATACTGGTGTTTAGTG
 CTCCACTTAAACTCAGGCACAACCATCCGCGGACGCTCGGTGAAGTTTTCACTCCACAGGCTGCGCACCATCA
 CCAACGCGTTTAGCAGGTGGGGCGCCGATATCTGAAGTCGCGAGTTGGGGCCTCCGCCCTGCGCGCGGAGTT
 GCGATACACAGGGTTGCGACTGGAACTATCAGCGCCGGTGGTGCACGCTGGCCAGCACGCTCTTGTGCG
 GAGATCAGATCCGCGTCCAGGTCTCCGCGTTGCTCAGGGCGAACGGAGTCAACTTTGGTAGCTGCCTTCCCA
 AAAAGGGCGCGTGCCAGGCTTTGAGTTGCACTCGCACCGTAGTGGCATCAAAGGTGACCGTGGCCGGTCTG
 GCGTTAGGATACAGCGCCTGCATAAAAGCCTTGATCTGCTTAAAAGCCACTGAGCCTTTGCGCCTCAGAG
 AAGAACATGCCGCAAGACTTGCCGGAAAACGATGGCCGGACAGGCCGCGTGTGCACGCGACACTTGGCT
 CGGTGTTGGAGATCTGCACCACATTTGCGCCCCACCGGTTCTTACGATCTTGGCCTTGTCTAGACTGCTCCTT
 CAGCGCGCGCTGCCCGTTTTGCTCGTCACTCCATTTCAATCACGTGCTCCTTATTTATCATAATGCTTCCG
 TGTAGACACTTAAGCTCGCCTTCGATCTCAGCGCAGCGGTGCAGCCACAACGCGCAGCCCGTGGGCTCGTGAT
 GCTTGTAGGTCACTCTGCAAACGACTGCAGGTACGCTGCAGGAATCGCCCATCATCGTCACAAAGGTCTT
 GTTGCTGGTGAAGGTCAGCTGCAACCCGCGGTGCTCCTCGTTTACGCCAGGTCTTGCATACGGCCGCCAGAGCT
 TCCACTTGGTCAGGCAGTAGTTTGAAGTTCGCTTTAGATCGTTATCCACGTGGTACTTGTCCATCAGCGCGC
 GCGCAGCCTCCATGCCCTTCTCCACGCGACACGATCGGCACACTCAGCGGGTTCATCACCCTAATTTCACT
 TTCCGCTTTCGCTGGGCTCTTCTCTTCTTCTTGGCTCCGATACCACGCGCCACTGGGTGCTCTTCAATCAGC
 CGCCGCACTGTGCGCTTACCTCCTTTGCCATGCTTGATTAGCACCGGTGGGTGCTGAAACCCACCATTTGTA
 GCGCCACATCTTCTCTTCTTCTTCTCGCTGTCCACGATTACCTCTGGTGATGGCGGGCGCTCGGGCTTGGGAGA
 AGGGCGCTTCTTTTTCTTCTTGGGCGCAATGGCCAAATCCGCCCGGAGGTGATGGCCGCGGGCTGGGTGTG
 CGCGGCACCAGCGCGTCTTGTGATGAGTCTTCTCGTCTCGGACTCGATACGCCGCTCATCCGCTTTTTTG
 GGGGCGCCCGGGAGGCGCGCGGACGGGGACGGGGACGACAGTCTCCATGGTTGGGGGACGTGCGCGCCG
 ACCGCGTCCGCGCTCGGGGGTGGTTTCGCGCTGCTCCTTCCCGACTGGCCATTTCTTCTCTATAGGCAG
 AAAAAGATCATGGAGTCAGTCGAGAAGAAGGACAGCCTAACCGCCCCCTCTGAGTTGCGCACCCAGCCTCCA
 CCGATGCCGCCAACGCGCCTACCACCTTCCCCGTCGAGGCACCCCGCTTGAGGAGGAGGAAGTGATTATCGA
 GCAGGACCCAGGTTTTGTAAAGCGAAGACGACGAGGACCGCTCAGTACCAACAGAGGATAAAAAGCAAGACCAG
 GACAACGCGAGAGGCAAACGAGGAACAAGTCGGGCGGGGGACGAAAGGCATGGCGACTACCTAGATGTGGGAG
 ACGACGTGCTGTTGAAGCATCTGCAGCGCCAGTGGCCATTATCTGCGACGCGTTGCAAGAGCGCAGCGATGT
 GCCCTCGCCATAGCGGATGTGAGCCTTGCTTACGAACGCCACTATTCTCACCAGCGGTACCCCCAAACGC
 CAAGAAAACGACATGCGAGCCCAACCCGCGCTCAACTTCTACCCCGTATTTGCCGTGCCAGAGGTGCTTG
 CCACCTATCAGACTTTTTTCCAAAACGCAAGTACCCCTATCTGCCGTGCCAACCGCAGCCGAGCGGACAA
 GCAGTGGCCTTGCGCGCAGGGCGCTGTACACTGATATCGCCTCGCTCAACGAAGTGCCAAAAATCTTTGAG
 GGTCTTGGACCGACGAGAAGCGCGCGGCAAACGCTCTGCAACAGGAAAACAGCGAAAATGAAAGTCACTCTG
 GAGTGTGGTGGAACTCGAGGGTGACAACGCGCGCCTAGCCGTAATAAACGCGAGCATCGAGGTACCCACTT
 TGCCTACCCGGCACTTAACTACCCCAAGGTGATGAGCAGCATGAGTGAGTGCATGAGTGCAGCGGCTGCG
 CAGCCCCTGGAGAGGGATGCAAATTTGCAAGAACAACAGAGGAGGGCCTACCCGAGTTGGCGACGAGCAGC
 TAGCGCGCTGGCTTCAAACGCGCGAGCCTGCCGACTTGGAGGAGCGACGAAACTAATGATGGCCGAGTGCT
 CGTTACCGTGGAGCTTGAAGTGCATGCAGCGGTTCTTTGCTGACCCGAGATGCAGCGCAAGCTAGAGGAAACA
 TTGCACTACACCTTTGACAGGGCTACGTACGCCAGGCTGCAAGATCTCCAACGTGGAGCTCTGCAACCTGG
 TCTCCTACCTTGAATTTTGCACGAAAACCGCTTGGGCAAAACGTGCTTATTCCACGCTCAAGGGCGAGGC
 GCGCCGCGACTACGTCCGCGACTGCGTTTACTTATTTCTATGCTACACCTGGCAGACGGCCATGGGCGTTTGG
 CAGCAGTGCTTGGAGGAGTGCAACCTCAAGGAGCTGCAGAAACTGCTAAAGCAAACTTGAAGGACCTATGGA
 CGGCCTTCAACGAGCGCTCCGTGGCCGCGCACCCTGGCGGACATCATTTTCCCCGAACGCCTGCTTAAACCTT
 GCAACAGGGTCTGCCAGACTTACCAGTCAAAGCATGTTGCAGAACTTTAGGAACTTTATCCTAGAGCGCTCA
 GGAATCTTGGCCGCCACCTGCTGTGCACTTCTTAGCGACTTTGTGCCATTAAGTACCGCGAATGCCCTCCGC
 CGCTTTGGGGCCACTGCTACCTTCTGACGCTAGCCAACCTACCTTGCCTACCACTCTGACATAATGGAAGACGT
 GAGCGGTGACGGTCACTGGAGTGTCACTGTGCTGCAACCTATGCACCCCGCACCCTCCCTGGTTTGAAT
 TCGCAGCTGCTTAAAGAAAGTCAAATATCGGTACCTTTGAGCTGCAGGGTCCCTCGCCTGACGAAAAGTCCG
 CGGCTCCGGGGTTGAAACTCACTCCGGGGCTGTGGACGTCGGCTTACCTTCGCAAATTTGTACCTGAGGACTA

CCACGCCACGAGATTAGGTTCTACGAAGACCAATCCCGCCCGCTAATGCGGAGCTTACCGCCTGCGTCATT
 ACCCAGGGCCACATTCTTGGCCAATTGCAAGCCATCAACAAAGCCCGCAAGAGTTTCTGCTACGAAAGGGAC
 GGGGGTTTACTTGGACCCCCAGTCCGGCGGAGGAGCTCAACCCAATCCCCCGCCGCGCAGCCCTATCAGCA
 GCAGCCGCGGGCCCTTGTCTCCAGGATGGCACCCAAAAAGAAGCTGCAGCTGCCGCGCCACCCACGGACGA
 GGAGGAATACTGGGACAGTCAGGCAGAGGAGGTTTTGGACGAGGAGGAGGACATGATGGAAGACTGGGAG
 AGCCTAGACGAGGAAGCTTCCGAGGTGCAAGAGGTGTGACGAAACACCGTCACCCTCGGTGCGATTCCCCCT
 CGCCGGCGCCCCAGAAATCGGCAACCGGTTCCAGCATGGCTACAACCTCCGCTCCTCAGGCGCCGCGGCACT
 GCCCCGTTCCGCGACCCAACCGTAGATGGGACACCCTGGAACCAGGGCCGGTAAGTCCAAGCAGCCGCGCGCG
 TTAGCCCAAGAGCAACAACAGCGCCAAGGCTACCGCTCATGGCGCGGGCACAAGAAGCCATAGTTGCTTGCT
 TGCAAGACTGTGGGGGCAACATCTCCTTCCGCGCCGCTTTCTTCTCTACCATCACGGCGTGGCCTTCCCCCG
 TAACATCCTGCATTACTACCGTCATCTCTACAGCCATACTGCACCGCGGCAGCGGCAGCAACAGCAGCGGC
 CACACAGAAGCAAAGGCGACCGGATAGCAAGACTCTGACAAAGCCCAAGAAATCCACAGCGGCGGCAGCAGCA
 GGAGGAGGAGCGCTGCGTCTGGCGCCCAACGAACCCGTATCGACCCGCGAGCTTAGAAACAGGATTTTTCCCA
 CTCTGTATGCTATATTTCAACAGAGCAGGGGCCAAGAACAAGAGCTGAAAATAAAAAACAGGTCTCTGCGATC
 CCTCACCCGCGAGCTGCCTGTATCACAAGCGAAGATCAGCTTCGGCGCACGCTGGAAGACGCGGAGGCTCTC
 TTCAGTAAATACTGCGCGCTGACTCTTAAGGACTAGTTTCGCGCCCTTTCTCAAATTTAAGCGCGAAAACACT
 GTCATCTCCAGCGGCCACACCCGGCGCCAGCACCTGTTGTGAGCGCCATTATGAGCAAGGAAATTTCCACGCC
 CTACATGTGGAGTTACCAGCCACAAAATGGGACTTGGCGCTGGAGCTGCCAAGACTACTCAACCCGAATAAAC
 TACATGAGCGCGGGACCCACATGATATCCCGGCTCAACGGAATACGCGCCACCCGAAACCGAATTTCTCTGG
 AACAGCGGCTATTACCACACACCTCGTAATAACCTTAATCCCCGTAGTTGGCCGCTGCCCTGGTGTACCA
 GGAAAGTCCCGCTCCACCACTGTGTACTTCCAGAGACGCCAGGCCGAAGTTCAGATGACTAACTAACGGG
 GCGCAGCTTCCGGCGGCTTTTCGTACAGGTTGCGGTGCGCCGGGCGAGGTTATAACTCACCTGACAATCAGAG
 GGCGAGGTATTAGCTCAACGACGAGTCGGTGTGACTCCTCGCTTGGTCTCCGTCGCGGACGGGACATTTAGAT
 CGGCGCGCGCCGCGCTCTTTCATTACGCTCGTTCAGGCAATCCTAACTCTGCAGACCTCGTCTCTGAGCCG
 CGCTCTGGAGGCATTGGAACCTGCAATTTATTGAGGAGTTTGTGCCATCGGTCTACTTTAACCCCTTCTCGG
 GACCTCCCGGCCACTATCCGGATCAATTTATTCCCTAACTTTGACGCGGTAAAGGACTCGGCGGACGGCTACGA
 CTGAATGTTAAGTGGAGAGGCAGAGCAACTGCGCTGAAACACCTGGTCCACTGTGCGCCACAAGTGCTTT
 GCCCCGACTCCGGTGAGTTTGTACTTTGAATTTGCCGAGGATCATATCGAGGGCCCCGGCGCACGGCGTCC
 GGCTTACCGCCCAGGGAGAGCTTGCCGCTAGCTGATTGGGAGTTTACCCAGCGCCCCCTGCTAGTTGAGCG
 GGACAGGGGACCCCTGTGTCTCACTGTGATTTGCAACTGTCTAACCCCTGGATTACATCAAGATCCTCTAGTT
 AATGTCAGGTCGCTAAGTCGATTAAGTAGAGTACCCGGGATCTTATTCCCTTTAACTAATAAAAAAATA
 ATAAAGCATCACTTACTTAAATCAGTTAGCAAATTTCTGTCCAGTTTATTACAGCAGCACCTCCTTGCCCTCC
 TCCCAGCTCTGGTATTGCAGCTTCTCCTGGCTGCAAACCTTTCTCCACAATCTAAATGGAATGTCAGTTTCT
 CCTGTTCTGTCCATCCGCACCCACTATCTTCATGTTGTTGCAGATGAAGCGCGCAAGACCGTCTGAAGATAC
 CTTCAACCCCGTGTATCCATATGACACGGAAACCGTCTCCAACCTGTGCCTTTTCTTACTCCTCCCTTTGTA
 TCCCCAATGGGTTTCAAGAGAGTCCCCCTGGGGTACTCTCTTTGCGCTATCCGAACCTCTAGTTACCTCCA
 ATGGCATGCTTGGCTCAAAATGGGCAACGGCTCTCTCTGGACGAGGCGGCAACCTTACCTCCAAAATGT
 AACCACTGTGAGCCACCTCTCAAAAAACCAAGTCAAACATAAACCTGGAATATCTGCACCCCTCACAGTT
 ACCTCAGAAGCCCTAACTGTGGCTGCCGCGCACCTCTAATGGTGGGCAACACACTACCTACCATGCAATGAC
 AGGCCCGCTAACCTGACAGACTCCAACTTAGCATTTGCCACCCCAAGGACCCCTCACAGTGTGCAAGGAAA
 GCTAGCCCTGCAACATCAGGCCCCCTCACCACCAGGATAGCAGTACCCTTACTATCACTGCCTCACCCCT
 CTAACTACTGCCACTGGTAGCTTGGGCAATGACTTGAAGAGGCCATTTATACACAAAATGGAAAACCTAGGAC
 TAAAGTACGGGGCTCCTTTGCATGTAACAGACGACCTAAACACTTTGACCGTAGCAACTGGTCCAGGTGTGAC
 TATTAATAATACTTCTTGCAAAATAAGTTACTGGAGCCTTGGGTTTTGATTACAAAGGCAATATGCAACTT
 AATGTAGCAGGAGGACTAAGGATTGATTCTCAAAACAGACGCTTATACTTGTATGTTAGTTATCCGTTTGTG
 CTCAAAACCAACTAAATCTAAGACTAGGACAGGGCCCTCTTTTTATAAACTCAGCCCACAACCTGGATATTA
 CTACAACAAAGGCCTTTACTTGTTTACAGCTTCAAACAATTTCAAAAAGCTTGGAGTTAACCTAAGCACTGCC
 AAGGGGTTGATGTTTACGCTACAGCCATAGCCATTAATGCAGGAGATGGGCTTGAATTTGGTTTACCTAATG
 CACCAAACACAAATCCCCCAAAAATAAATGGCCATGGCCTAGAATTTGATTCAAAACAGGCTATGGTTCC
 TAAACTAGGAAGTGGCCTTAGTTTTGACAGCACAGGTGCCATTTACAGTAGGAAACAAAATAATGATAAGCTA
 ACTTTGTGGACCACACCAGCTCCATCTCTAACTGTAGACTAAATGCAGAGAAAGATGCTAAACTCACTTTGG
 TCTTAACAAAATGTGGCAGTCAAATACTTGTACAGTTTCAGTTTTGGCTGTTAAAGGCAGTTTGGCTCCAAT
 ATCTGGAACAGTTCAAAGTGTCTCATCTTATTATAAGATTTGACGAAAATGGAGTGTACTAAACAATTCCTTC
 CTGGACCCAGAATATTGGAACCTTAGAAATGGAGATCTTACTGAAGGCACAGCCTATACAAAACGCTGTTGGAT
 TTATGCCTAACCTATCAGCTTATCCAAAATCTCACGGTAAAACCTGCCAAAAGTAACATTGTGAGTCAAGTTA
 CTTAAACGGAGACAAAACCTGTAACACTAACCTTACACTAAACGGTACACAGGAAACAGGAGACACA
 ACTCCAAGTGCATACTCTATGTCATTTTCATGGGACTGGTCTGGCCACAACCTACATTAATGAAATATTTGCCA
 CATCCTCTTACACTTTTTCATACATTTGCCAAGAATAAAGAATCGTTTGTGTTATGTTTCAACGTGTTTATTT

TTCAATTGCAGAAAATTTCAAGTCATTTTTTCATTCAGTAGTATAGCCCCACCACCACATAGCTTATACAGATC
 ACCGTACCTTAATCAAACTCACAGAACCCTAGTATTCAACCTGCCACCTCCCTCCCAACACACAGAGTACACA
 GTCCTTTCTCCCCGGCTGGCCTTAAAAAGCATCATATCATGGGTAACAGACATATTCTTAGGTGTTATATTCC
 ACACGGTTTTCTGTGCGAGCCAAACGCTCATCAGTGATATTAATAAACTCCCCGGGCAGCTCACTTAAGTTCAT
 GTCGCTGTCCAGCTGCTGAGCCACAGGCTGCTGTCCAACCTTGCGGTTGCTTAACGGGCGGCGAAGGAGAAGTC
 CACGCCTACATGGGGGTAGAGTCATAATCGTGCATCAGGATAGGGCGGTGGTGTGCAGCAGCGCGCAATAA
 ACTGCTGCCGCCGCCCTCCGTCCTGCAGGAATAACAACATGGCAGTGGTCTCCTCAGCGATGATTCGCACCCG
 CCGCAGCATAAGGCGCCTTGTCCTCCGGGCACAGCAGCGCACCCCTGATCTCACTTAAATCAGCACAGTAACTG
 CAGCACAGCACCACAATATTGTTCAAATCCCACAGTGCAAGGCGCTGTATCCAAAGCTCATGGCGGGGACCA
 CAGAACCACGTTGCCATCATACCACAAGCGCAGGTAGATTAAGTGGCGACCCCTCATAAACACGCTGGACAT
 AAACATTACCTCTTTTGGCATGTTGTAATTCACCACCTCCCGGTACCATATAAACCTCTGATTAACATGGCG
 CCATCCACCACCATCCTAAACCAGCTGGCCAAAACCTGCCGCCGGCTATACACTGCAGGGAACCGGGACTGG
 AACAATGACAGTGGAGAGCCAGGACTCGTAACCATGGATCATCATGCTCGTCATGATATCAATGTTGGCACA
 ACACAGGCACACGTGCATACACTTCTCAGGATTACAAGCTCTCCCGCGTTAGAACCATATCCAGGGAACA
 ACCCATTCTGAATCAGCGTAAATCCCACACTGCAGGGAAGACCTCGCACGTAACCTCACGTTGTGCATTGTCA
 AAGTGTACATTTCGGGCAGCAGCGGATGATCCTCCAGTATGGTAGCGCGGTTTTCTGTCTCAAAAGGAGGTAG
 ACGATCCCTACTGTACGGAGTGCGCCGAGACAACCGAGATCGTGTGGTGTAGTGTGCATGCCAAATGGAACG
 CCGGACGTAGTCATATTTCTGAAGCAAAACCAGGTGCGGGCGTGACAAACAGATCTGCGTCTCCGGTCTCGC
 CGCTTAGATCGCTCTGTGTAGTAGTTGTAGTATATCCACTCTCTCAAAGCATCCAGGCGCCCCCTGGCTTCGG
 GTTCTATGTAAACTCCTTCATGCGCCGCTGCCCTGATAACATCCACCACCGCAGAATAAGCCACACCCAGCCA
 ACCTACACATTCGTTCTGCGAGTCACACACGGGAGGAGCGGGAAGAGCTGGAAGAACCATGTTTTTTTTTTTA
 TTCCAAAAGATTATCCAAAACCTCAAATGAAGATCTATTAAGTGAACGCGCTCCCCTCCGGTGGCGTGGTCA
 AACTCTACAGCCAAAGAACAGATAATGGCATTGTAAGATGTTGCACAATGGCTTCCAAAAGGCAAACGGCCC
 TCACGTCCAAGTGGACGTAAAGGCTAAACCCTCAGGGTGAATCTCCTCTATAAACATTCCAGCACCTTCAAC
 CATGCCCAAATAATTCTCATCTCGCCACCTTCTCAATATATCTCTAAGCAAATCCCGAATATTAAGTCCGGCC
 ATTGTA AAAATCTGCTCCAGAGCGCCCTCCACCTCAGCCTCAAGCAGCGAATCATGATTGCAAAAAATTCAGG
 TTCCTCACAGACCTGTATAAGATTCAAAGCGGAACATTAACAAAAATACCGCGATCCCGTAGGTCCCTTCGC
 AGGGCCAGCTGAACATAATCGTGCAGGTCTGCACGGACCAGCGCGGCCACTTCCCCGCCAGGAACCATGACAA
 AAGAACCACACTGATTATGACACGCATACTCGGAGCTATGCTAACCCAGCGTAGCCCCGATGTAAGCTTGTG
 CATGGGCGGCGATATAAAATGCAAGGTGCTGCTCAAAAATCAGGCCAAAGCCTCGCGCAAAAAAGAAAGCACA
 TCGTAGTCATGCTCATGCAGATAAAGGCAGGTAAGCTCCGGAACCACCACAGAAAAAGACACCATTTTTCTCT
 CAAACATGTCTGCGGGTTTTCTGCATAAACACAAAATAAAATAACAAAAAACATTTAAACATTAGAAGCCTGT
 CTTACAACAGGAAAAACAACCCTTATAAGCATAAGACGGACTACGGCCATGCCGGCGTGACCGTAAAAAACT
 GGTCACCGTGATTAAAAAGCACCACCGACAGCTCCTCGGTGATGTCCGGAGTCATAATGTAAGACTCGGTAAA
 CACATCAGGTTGATTACATCGGTGAGTGTAAAAAGCGACCGAAATAGCCGGGGGAATACATACCCGCAGG
 CGTAGAGACAACATTACAGCCCCATAGGAGGTATAACAAAATTAATAGGAGAGAAAAACACATAAACACCTG
 AAAACCCCTCCTGCCTAGGCAAAATAGCACCTCCCGCTCCAGAACAACATACAGCGCTTCCACAGCGGCAGC
 CATAACAGTCAGCCTTACCAGTAAAAAGAAAACTATTAAAAAAACCACTCGACACGGCACCAGCTCAAT
 CAGTCACAGTGTAAAAAGGGCCAAGTGCAGAGCGAGTATATATAGGACTAAAAATGACGTAACGGTTAAAG
 TCCACAAAAACACCCAGAAAACCGCACGCGAACCTACGCCCAGAAAACGAAAGCCAAAAAACCCACAACCTTCC
 TCAAATCGTCACTTCCGTTTTCCACGTTACGTCACTTCCCATTTTAAAGAAACTACAATTTCCAACACATAC
 AAGTTACTCCGCCCTAAAACCTACGTACCCGCCCGTTCCACGCCCGCGCCAGTCAAAAACCTCCACCC
 CTCATTATCATATTGGCTTCAATCCAAAATAAGGTATATTATTGATGAT (SEQ. ID. NO:3).

SEQ. ID. NO: 4

CGGACACACAAAAAGAAAGAAGTTTTTTTATGCTTTTATTGTGTGCGAATAACTATGAGGAAGATTAATAATTT
 TCCTCTCATTGACACTTACATTAAGATTAAGATTCTCATTGATCTGTACTTACTCTGAGGATAATAATTGGT
 GTTCAGAAGTACCCCATTTCCCAGTGGGGGCAAAGACAGTCCAAAAGACTCAACTTGTCTATTCAACTAATC
 TGTTTTGTCTCAGTAGTTCACATATTGATCATACCCAGGAGTTGGACCTAATTCCAAAGCTTAGAGTGGGACC
 TAGTGTATCCTCGGGGCTGTAATATAATCAGCCATTTAACACATAACAAGCCCTACTGTTTTCTTGTTTTGCC
 GTGCATTTAGAATAAGAGACAACCTTAAACCTCCGATTTCGGCAACACAGGGAATAATCTCACCAGACCCGCGAG
 TGTCTTCAGGCTTCATAGCCCCAAGATGGAGAGTTCGGGCCACAAAGCATGGATGACGCACACCGCATCAGGT
 TTCGAAACAGATTACCATAAGATTTTAAACAGCAGGATTGTGAGTCCAACAAGGCATTGTGAGACAACGGGTCA
 TTCAAGTCCACCAGGTTACAAACCTAGAAGAAATATGCCAATTGATCATTCAAGCCTTTGAAGCTGGTGTGA
 TTTTCAAGAGAGTGCAGACAGTTTTCTTGCTGATGCTATGTTTACATCATGCTTATCAGGGTGACTACAAGCAA

TTCTTGGAAAGCAATGCAGTCAAGTACCTTGAGGGTCATGGCTTTTCGCTTTGAGGTGAGGAAAAAGGAAGGAG
TCAAGCGACTCGAAGAATTGCTTCTGCTGCATCCAGTGGCAAGAGCATCAGGAGAACACTGGCTGCAATGCC
TGAAGAGGAGACAACAGAAGCAAAATGCCGGACAGTTCCCTCTCTTTTGGCTAGCTTATTTCTTCTAAGCTAGTT
GTCGGAGAAAAAGCCTGTCTAGAAAAGGTGCAGCGGCAAAATCAAGTTCATTCTGAGCAGGGATTGATCCAAT
ACCCACAGCCTGGCAGTCAAGTGGACACATGATGGTCATTTTCAGACTGATGAGAACAAATTTTCTAATTAA
GTTCTCTTATAACATCAAGGGATGCATATGGTAGCAGGACACGATGCTAACGATGCTGTCATCGCAAATCT
GTAGCTCAAGCACGTTTTTCAGGATTATTGATCGTTAAAACAGTGTAGATCACATCCTTCAGAAAACAGAGC
ACGGAGTGGCTCTTCATCCTTTGGCAAGAACTGCTAAGGTCAAGAACGAAGTAAATTCCTTTAAGGCTGCCCT
TAGCTCGCTAGCACAAACATGGAGAGTATGCTCCTTTTGGCTCGCTTGTGAATCTTTCTGGAGTCAACAATCTC
GAGCACGGACTGTTTCTCAGCTTTCTGCAATTGCCCTAGGTGTGCAACGGCACACGGCAGTACCCTGGCAG
GAGTAAATGTGGGGGAACAGTATCAGCAACTACGAGAAGCAGCCACTGAGGCAGAAAAACAATTGCAGAAATA
CGCTGAATCTCGCGAGCTTGACCATCTAGGTCTCGATGATCAAGAGAAGAAGATCTTGAAAGACTTCCATCAG
AAGAAAAATGAAATCAGCTTCCAGCAGACAACAGCCATGGTCACACTACGGAAGGAAAGGCTAGCCAAGCTCA
CTGAGGCAATCACCTCCACATCCCTTCTCAAGACAGGAAAACAGTATGATGATGACAACGATATCCCCTTTCC
TGGGCCCATCAATGATAACGAAAACCTCAGAACAGCAAGACGATGATCCAACAGATTCTCAGGACACTACCATC
CCTGATATCATTGTTGACCCGGATGATGGCAGATACAACAATTATGGAGACTATCCTAGTGAGACGGCGAATG
CCCCTGAAGACCTTGTCTTTTGGACCTTGAAGATGGTGACGAGGATGATCACCGACCGTCAAGTTCATCAGA
GAACAACAACAACACAGTCTTACAGGAACGACAGTAAACAAAACAAGTAACTGGAATCGAAAACCCGACTAAT
ATGCCAAAGAAAGACTCCACACAAAACAATGACAATCTGCACAGCGGGCTCAAGAATACGCCAGGATAACA
TCCAGGATACACCAACACCCCATCGAGCTCTAATCCCATCAGCGAAGAAACCCGCTCCAATGGTCAATAATGA
AGATGACATTGATAGCATCCCTCCTTTGGAATCAGACGAAGAAAACAACACTGAGACAACCATTACCACCACA
AAAAATACCCTGCTCCACCAGCCTGTTTTATCGAGTAATTCAGAAAAGGAGCCCCTCCCGCAAGAAAAAT
CCCAGAAGCAACCAACCAAGTGAGTGGTAGTGAGAATACCGACAATAAACCTCACTCAGAGCAATCAGTGGA
AGAAATGTATCGACACATCCTCCAAACACAAGGACCATTTGATGCCATCCTATACTATTACATGATGACGGAG
GAGCCGATTGTCTTTAGCACTAGTGTGGGAAAGAATACGTATACCCTGATTCTCTTGAAGGGGAGCATCCAC
CGTGGCTCAGTGAAGAAAGAGGCTTGAATGAGGACAATAGGTTTATCACAATGGATGATCAACAATTTCTACTG
GCCTGTAATGAATCACAGGAACAAATTCATGGCTATCCTTCAGCACCACAAGTAAATTTCTTCATAATGACAGA
TCATTGTAAGGTTATTACCACCATCCCTGCAACAAAGCATGAAAACCACACTCAACAACGCCCTACCACAGGA
TACCTTGGAGACCATAACCAAGATCAGCAGCTGTGCAACCACCCCATGCGAATCCACCACCACAACCACCA
AACAATAATCCCAAGACCAAAACCGCACACATCCAGATCAACCCAAACCCTCAAACACCACCCCACTCCGCGAT
CCCAGACCAAACTCCGCCCCAGACAAGCACCCACCCATCCAGAAACCGCACGGCCGAGAATCGATCCCCAG
CATTCAAAATGCGTTATTAAGAAAAACATATGATGAAGATTTAAACCTTCATCAACATTGCACAGACTTTGA
TCCTTAGGAGTTTATTCTAGCTATCTACAAAACGGGTCCAAAACGGAATGATTTCCACTAGGGCTGCAGCAAT
CAATGATCCTTATTACCAATCAGAAACCAGTGTACACGTGGCCCTGAACTATCAGGATGGATCTCCGAACAA
TTAATGACAGGCAAAATTCGGGTACATGAAATCTTCAACGACACTGAGCCCCACATAAGCTCAGGGTCCGACT
GCCTTCCCAGACCCAAAAACACGGCCCCCGGACTCGCAACACCCAGACACAGACCGATCCGGTTTGCAATCA
CAATTTTGAAGACGTTACACAAGCACTAACATCATTAAACCAATGTATACAAAAACAGGCTCTTAACTTAGAG
TCTCTCGAACAACGCATCATAGATCTAGAGAATGGCTTAAAGCCAATGTATGACATGGCTAAAGTCATTTCTG
CATTGAATAGATCTTGTGCTGAGATGGTAGCAAAAATATGATCTCCTGGTGTGACAACTGGCTTTTGAAGAG
CACCOCGCTGCAACTGAGGCTTATTGGGAGGAACATGGACAACCACCCACTGGACCATCCTTTATGAAGAG
AGTGCATTAGAGGCAAGATTAACAAGCAAGAGATAAAGTACCTAAGGAAGTTCAAGAAGCTTTTTCGTAATC
TGGACAGTACCAGCTCACTAACAGAAAGAACTTTGGCAAGCCAGATATATCTGCAAAGGACCTACGAGACAT
CATGTATGACCACCTACCAGGCTTCGGTACGGCTTTTTACCAACTGGTCCAGGTAATTTGCAAGCTAGGAAAA
GACAATTTGCAATTGGACATTATTTCATGCTGAGTTCCAAGCCAGCCTTGCTGAAGGTGATTCTCCCCAATGTG
CCCTGATCCAAATAACAAAACGGATCCCCATCTCCAGGATGCCACTCCGCCACAATTCACATCCGCTCTCG
TGGTGACATCCCACGTGCCTGCCAAAAAAGTCTCCGTCCAGTTCCTCCATCACCAAAAATAGACAGAGGTTGG
GTTTTGCATTTTCCAATTGCAGGACGGGAAGACACTTGGGCTCAAGATATAGGGTCCCCAGTCAAAGACACGT
GCGGTCCCATCCTCCCTCACCTCAGACATCAACGCATGGCAGTCCCAAACACCGGTGAGGGAGGGCGCCGGC
GACAACACATGATGATAGGCTGATCTTCGGGATAAGAGACATGAAAAACCAAAAAGCCGTTTACATCCAGATC
CAAGATCAAGAGTGGCTTGGAAATAAGGGGCACCTGTTCTTTGTCTCAAAGGACTTACAAAAACAAGGGTGT
GAAGATTAAGAAAAAGCCTCCTTCAGTTGCAAGGAGCTAATTTCTTAAACTTTCATCTAGACTAAGGATAAATC
GATTCGAATCAGGATGAGGAGAATCATCTACCACGGCACCACCTGAATACATGGAGGCTGTTTACCCAATG
AGAACAATGAATTTCTGGTGCAGACAACACTGCCAGTGGCCCTAATTACACAACAACCTGGTGTGATGACAAATG
ATACTCCCTCTAATTCCTCCGACCAGTTGCAGATGATAATATTGATCATCCGAGCCACACGCCTAACAGTGT
TGCTCTGCATTTATATTGGAAGCTATGGTGAATGTAATATCTGGCCCGAAAGTGTGATGAAGCAAAATCCCA
ATCTGGCTTCTCTGGGTGTCTCTGACCAGAAGACATATAGCTTTGATTCAACCACTGCTGCCATTATGCTAG
CATCATATACCATCACTCATTTTGGCAAAACCTCAAATCCCCTTGTGAGAATCAACCGACTTGGTCTGGCAT
ACCTGATCACCCACTACGACTCCTAAGAAATAGGAAATCAAGCCTTCTACAAGAGTTTGTGCTACCTCCTGTA

CAACTGCCACAATACTTCACTTTTGATCTGACAGCGCTGAAGCTGATCACCCAGCCACTCCCAGCGGCAACCT
 GGACAGATGAAACTCCAGCTGTGTCAACTGGCACGCTCCGCCAGGGATCTCATTCATCCCAAATTAAGGCC
 TATCCTGCTACCAGGAAGAGCTGGAAAGAAGGGCTCCAACCTCCGATCTAACATCTCCTGACAAAATCCAGGCT
 ATAATGAATTTCTTACAAGACCTCAAAAATTGTACCAATCGATCCAACCAAGAATATCATGGGTATTGAAGTGC
 CAGAACTCCTGGTTACAGGCTGACTGGGAAGAAGACAACCTACCAAGAATGGTCAACCAATCATTCCAATTCT
 GCTACCAAAGTACATTGGTCTTGATCCTCTATCTCAAGGTGATCTCACAATGGTGTACTCAGGACTGTGAT
 TCCTGCCACTCCCCGGCCAGTCTTCCCCCAGTCAATGAAAAATGACCATGAGACTCAACATCACACTGCCAGA
 GCACCTCACCGCAAGTCTATAACAACATCAACCCCGGCATCTACAACCTGCAAAAACCAGCCCATCTGATACT
 CCTGGCATCGGGGGCAAGACAAGGCAGCAAGCAGCAGCCCCGAGCCGAGCCCAAACCCATTACACCCGAGC
 CCAACACCCATCCAGCAACCCACAACCGTCAAACGCACAGATGGACAAGCAAAGAATCAAGCCAGGAGCAA
 CACAGACCCCAAGTCTAAGCTGATCAACCCCTCCCGCAATCCCACCAACGCCAGCAAAAATCCCCCAACTCGA
 TACCAACCCCAAGCAAATCAGCTCAAACCGTCTATCTCTCCCGCTTCACTCCACACCCAGATTTCAGCAAAC
 GATCAACGCACCTTCTTATGCCACAGCTTATATTAAGAAAAAGAACTTGATGAAGATTAAGGCAACCAGTGGTG
 CTATCTTCATCTCTTTGATTTGAGTCTTAAGTGAATACACAGGTTCTAATACTGTTCTTCTGTCCAACGGTAT
 AATTCAGCCAGGCCAAGACAGTAGCTAATCACAGTATCATGGGAGCGTCAGGGATTCTGCAATTGCCCGT
 GAGCGCTTCAGGAAAACATCTTCTTGTGGTAAATACTTCCATAAAGTCTTTTCAATCCCGTGG
 GGGTTGTACACAACAATACCTACAAGTGAAGTATTTGACAAGTTTGTGTGCCGAGACAACTCTCTTCAAC
 TAGCCAATTGAAGTCAGTCGGGTTGAACTTGGAGGGCAATGGAGTAGCAACTGATGTACCAACGGCAACCAA
 AGATGGGGTTTTTCGAGCTGGTGTCCACCAAAGTGGTAAATGCGAAGCTGGAGAATGGGCTGAGAATGTT
 ATAACCTGGCTATAAAGAAAGTTGATGGTAGTGCCTACCAGAAGCCCTGAGGGAGTGAGGGATTTTTCC
 CCGTTGCCGCTATGTACACAAGTCTCAGGAAGTGGACCATGCCAGGAGGACTCGCCTTTCACAAAGAAGGA
 GCCTTCTTCTGTATGACCGACTCGCATCAACAATCATTTATCGGGGTACAACCTTTGCCGAAGGAGTTATTG
 CATTTCTGATCTTGCCTAAGGCGGAAAGGATTTTTTCCAGTCTCCTCCATTGCATGAGCCTGCCAACATGAC
 CACGGATCCCTCCAGTTACTATCACACGACAACAATAAATACGTGGTTGATAATTTTGGAAACCAACACCACA
 GAGTTTCTGTTCCAAGTCGATCATTTGACGTATGTGCAGCTCGAGGCAAGATTCACACCACAATTCCTTGTC
 TCCTAAATGAAACCATCTACTCTGATAACCGCAGAAGTAACACAACAGGAAAATACTGGAAAATAAATCC
 CACTGTTGATAACCAGCATGGGTGAGTGGGCTTCTGGGAAAATAAAAAAATTCACAAAAACCTTTCAAGTG
 AAGAGTTGTCTTTCGTACCTGTACCAGAAACCCAGAACCAGGTCCTTGACACGACAGCGACGGTCTCTCCTCC
 CATCTCCGCCCACAACCACGCAGCCGAAGACCACAAAGAATTGGTTTTAGAGGATTCCACTCCAGTGGTTTCAG
 ATGCAAAAACATCAAGGGAAAGGACACAATGCCAACCACAGTGACGGGTGTACCAACAACCACACCCTCTCCAT
 TTCCAATCAATGCTCGCAACACTGATCATAACCAATCATTTATCGGCCTGGAGGGGCCCCAAGAAGACCACAG
 CACCACACAGCCTGCCAAGACCACCAGCCAACCAACCAACAGCACAGAATCGACGACACTAAACCCAAACATCA
 GAGCCCTCCAGTAGAGGCACGGGACCATCCAGCCCCACGGTCCCCAACACCACAGAAAGCCACGCCGAACCTG
 GCAAGACAACCCCAACCACACTCCCAGAACAGCACACTGCCGCCAGTGCCATTCCAAGAGCCGTGCACCCCGA
 CGAACTCAGTGGACCTGGCTTCTGACGAACACAATACGGGGGGTTACAAATCTCCTGACAGGATCCAGAAGA
 AAGCGAAGGGATGTCACTCCAATACACAACCCAAATGCAACCCAAACCTGCACTATTGGACAGCCTTGGATG
 AGGGTGCTGCCATAGGTTAGCCTGGATACCATACTTCGGGCCAGCAGCTGAGGGAATTTACTGAAGGCAT
 AATGGAGAATCAAAATGGATTGATCTGTGGATTGAGGCAGCTGGCCAACGAAACGACACAAGCTCTTCAATTG
 TTCTTAAGGCAACTACTGAGTTGCGTACATTTCTATACTAAATCGAAAGCAATAGACTTCTTGTCCAAA
 GATGGGGAGGAAACATGTACATTTCTAGGGCTGATGTTGCAATTAAGCCCAAGATTGGACCAAAAATATCAC
 TGATAAAAATGATCAAATAATCCATGACTTTGTCGATAATAATCTTCCAAATCAGAATGATGGCAGCAACTGG
 TGGACTGGATGGAACAATGGGTTCCTGCTGGAATAGGAATCACAGGAGTAATCATTGCTATTATTGCTTTGC
 TGTGCATTTGCAAATTCATGCTTTGAACTAATATAGCATCATACTTTCTAATATTTCCCCAATATGAATTTTT
 GTTTTGATTTTTATTTAATGATATATCCTCTGTATACCTCACTAATGTACTCGAGCATAATTTCCCTGATAGA
 CTTGATTGATTTGATGATTAAGGACCTCACAAAATTCCTGGGGATTGAAAAGAAGTGGATAACTCAATAAAT
 TTTATGCTAGGACCACAAATACACTTGATGAAGATTAAGAAAAAGATAATCTTATGATTATCATTGATCTTCA
 TCTATACCTTAAATACTCTATTCAGGAGAGTATGACAAAACCAAGTAGTATTGGATAAACTTGTCTGCATT
 CAAATCTGAAGACATACGGCTTATCTATTCATCTATTGTATTAGAAAATCTAGGGAATATCATTGAAACTAAT
 TAGTGACTAAAACACACAACCTCAAGTCGGCCAGAATGGAAGTTGTTTCATGAAAGAGGTGCTCCAGGATCTCC
 CGACAAAACACAAGGGATGGACCTAGTCAATTTAGTACGGGCGAGATCATCCTCTCGAGCTAGTTATCGAAGTG
 AATACCATAACCAAGGAGTGCCTCGCAGATCCGTGTCCCCTGTCTTTCATCGAAAAAGACAGATTTATT
 GACAGTTCCACCAGCACCTAAAGATGTATGCCGACTTTAAAGAAAGGGTTTCTATGTGACAGCAATTTCTGT
 AAAAAGGATCACCAACTTGAAAGCTTAACAGATAGAGAGTTACTCTTGCTGATTGCACGCAAGACATGTGGAT
 CCACGGAACAACAATAAGCATAGTTGCTCCAAAAGATTACGTCTGGCTAATCCTATTGCTGAGGATTTCCA
 ACAAAAAGATGGGCCTAAGGTAACACTGTTCGATGCTTATAGAGACAGCAGAGTATTGGTCCAAACAGGACATT
 AAGAACATCGATGATTCAAGATTAAGAGCTTTATTGACCCCTTGTGCTGTTATGACGCGCAAAATTTTCAAAAT
 CTCAACTTAGCTTGCTATGTGAAAGCCACTTACGGCGAGAAGGACTTGGTCAAGACCAATCAGAGTCAGTTCT
 GGAGGTATATCAACGCTTACACAGCGATAAAGGTGGGAATTTTCAGGCAGCACTATGGCAGCAGTGGGATCGG

CAATCATTGATAATGTTTCATAACAGCATTTTTTAAATATTGCATTACAATTACCATGTGAGAGTTCATCTGTTG
 TTATTTTCAGGTTTGAGAATGCTGATACCCAGTCGGAAGCCACTGAGGTTGTAACCCCTCCGAAACCTGCAC
 ATGGTCAGAAGGAGGAAGTTCCCATTTGAAGCCCCAAATCACAAGGCGAGCTAAAAAATCCCTTTTGAACATGC
 ATAACATCACATACAATTTCAAAGGCATTGGAATAAATGGTGATTTTCAGGAAGATTAGTGTTTTGCCCTCAAAA
 TCAGATCCGAGCAATAATCATCTACTCTACAGCCAGTTAATTTCTAATATAAAGGTTAAAAAATGCTGCAGG
 CCAGCTATTGTTCCACAGGTCCCAATTTCTTCTTGTAAATTTGTAGGAGCTAGCACAAGTGATGCAATTAAATG
 ATACTAGTATATACAATGCCACCACTTAATTTCTAAGATTTTGTATATCTCGGAAATTTCAAATTAATGCTA
 CGTTATTGATTCAATTAAGAAAAAGACAATGGACCATCAAATTTAGTTCAATACCTGAACTAATGCACCTTATA
 GAAACAGGAGAACCAGCCAGACAGCAGACAAAATAACAATGAACCACAATATGTTACTGCTATAATGAAGTTG
 TTAATTTCAAAAACAAATGATGAAGATTAATGCAGATGTCTAAAGGATAAACACTCCATGCATCAGTGTTATAA
 TTGGGCTCTGTAGAAAATCTTCATCTCCTCCAACCTACCTCAAAGAAGGATTTTACCAGGATTGGGAGTTATA
 ACGACAATAGGGACAACCACCTTTGACACTAGCCAAGCTTGTGCTGGGCACACAGCATTTTATCTTGCAACGT
 CGACATTTCCCATCAATCTGAGGAGTAACAGCTATCAAAACAACGCATATGTAGACATTGTGGTAATAGTACT
 GCCTAAGACAATTTATAATAACAGTTGGAATTCATTTTTTCAACCAAGCTATTCTCAAGTTAACAGTTGA
 AACAGGACTCGACCCAGGACAACCTCCGGATACGTAACATAAGAAAAGAACAACCCCTTGACCCAGAGTGAACAA
 GCTCATACTATCAAGGCTAATCCTCGGGCTGCCCTGGAGTCCACAATGGCCAAGGCTACTGGGAGGTACAACC
 TTATCTCCCCAAAGAAAGATCTTGAAAAGGGCTGGTCTGAATGACCTTTGCACTCTCTCAGTGGCCCAGAC
 GGTCCAGGGATGGAAGGTACCTGGGCTGGGATGAATTTGATGTTACACAGAAAGGGATGGCCTTATTGCAC
 AGGCTCAAGACAGTGAATTTGCTCCAGCCTGGTCAATGACCAGGAACCTATTTCCACATCTTTCAAAAAC
 CGAACTCTACAATTTGATCGCCACTTTGGGCACCTCGGGTCTACTAGCAGCAGGATTCAAGATCAGCTAAT
 TGATCAATCGTTGATCGAACCCCTTGGCAGGAGCGCTAGGCTTAATTTGCTGATTGGCTTCTTACTACTGGAACA
 AACCACTTTCAAATGCGCACACAACAGGCTAAGGAGCAACTAAGTCTAAAAATGTTGTCCCTGGTGCATCAA
 ACATCCTAAAGTTTCATCAACCAACTAGATGCACTACATGTTGTGAATTACAATGGACTTCTCAGTAGCATTGA
 AATTGGCACCAAAAAGCCATACAATTATAATTACCCGGACAAATATGGGTTTTTTGGTAGAGTTGCAAGAGCCT
 GACAAATCAGCCATGAACACCAGAAAACCAGGACCAGTCAAATTTCTCCCTCCTCCATGAATCAACCTTGAAGA
 CACTTGCTAAAAACCTGCGACCCAGATGCAAGCATAATCTTAGAATTCATAGTTCTCTCGCTATTTAACT
 CAACTCATCAAAATGCTAACTTGTGATCCTTAAGCTGCACCTTAGACTTTTGATAAGAATACTAACTATTGAT
 GATTGTCTTTGACATGAGGATAAGAACACTGCCATTAGATAGATGGGGTTCACCATTAATACACAATTACCC
 AATCATGTTAACAGCAGTTAGATCCCTCAAGTATATCAAGTTCAATTTCTACCCTTTGCATTGTCACCTAATTA
 AATCACCTGATACAATTATGTTAATTAGCTAGATTTCTCTCATTTTTTAGACTTGTGGTGTAGATAAATTGATCA
 TCCACTTGATTACACATCCAACCTAGGGTCTAGTTTATAGATTGCTAATAATCTTTAGTTCAATACTAATGACA
 AAGAGATTAGATTAGCTATAGCTTGAGGAAGATTAAGAAAAGTGTCTGTGGGGTCTTTCCGTGTAGAAGGGC
 ACACAGCCATAATTTCTTCCCTTTTATACAACATGGCTACACAACATACGCAATATCCAGACGCAAGGTTATCA
 TCACCTATAGTTTTAGATCAGTGTGATCTTGTCACTCGTGTGTTGTGGATTGTATTCCGCATACTCCTTAAATC
 CCCAACTAAAGAACTGTAGACTACCGAAACATATATACCGACTAAAATATGACACCCTGTTACAGAGTTTTT
 GAGTGATGTGCCGGTAGCAACATTTGCCAGCGGATTTTTTAGTACCTACATTTCTTAGGACTCTATCAGGAAAT
 GGTCTTGTCCAATTGATCCAAAATGCAGTCAATTTTTAGAAAGAAATGTCAATTATACTCTACAAGATATTC
 GCTTCCATAACTATTACCTCAATCGAGCCGGAGTGCATAACGATCATGTGGATAGGGATTTTGGACAAAAAAT
 TCGCAATCTAATTTGCGACAATGAGGTTTTACATCAAAATGTTTCACTGGTATGATCTTGAATTTCTAGCAGCT
 AGAGGGCGACTAAATAGAGGGAATAATCGTCAACATGGTTTGAAGTATAAATTTGGTAGATATCTAGCTAGTT
 ATGGAGATTATATTTTTGGAAAAATACCATTACTACTACCAGTGGATACACAAGGCCTCCACATCGAGC
 CAAGGACTGGTATCATGAATCGGTTTTCAAGGAGGCTATTTCAAGGCCATACACACATCGTGTCCATCTCTACA
 GCAGATGTCTTAATCATGTGTAAGGACATAATCACCTGTGATTTAATACTTTACTGATTGCTGCTGTGGCAA
 ATCTAGAGGATTGAGTTTCAATTCAGATTACCCTTTACCAGAAACAGTGTCTGACCTATACAAAGCAGGAGATTA
 TTTAATCTCATTGCTAGGATCAGAAGGTTACAAAGTCATAAAATTCCTTGAGCCGTTATGCTTAGCAAAGATC
 CAACTCTGCTCAAATTACACTGAGAGGAAAGGAAGATTCCTCACTCAAATGCATTTAGCTGTAAATCATAAC
 TTGAGGAACTTACAGGGTCCCGAGAAATTAAGGCCACAACAGATTCGGAAGGTAAGGGAATTCATCAAATGCT
 GATAAACCTTAAGGCAACTCCTCAACAACCTCTGTGAGTTGTTTTCACTGCAAAAAGCATTGGGGGCACCTGTC
 TTGCATAGCGAAAAGGCTATCCAAAAGTAAAGAAGCATGCAACAGTGATAAAAGCATTGCGCCCAATAATAA
 TCTTTGAAACATATTGTGTGTTTAAATACAGCATTGCAAAAACATTTATTTTGATAGTCAGGGTACGTGGTACAG
 TGTGACTTCTGACAGATGCTTAACACCAGGCCTTTCTCTTACATCAAAAAGAAACCAATTTCTCCACTACCT
 ATGATCAAAGAACTTTTGTGGGAATTTTATCACTTAGATCATCCTCCGTTATTCTCCACCAAAGTGATTAGTG
 ATTTGAGTATCTTTATTAAGATCGTGTACTGCAAGTTCGAGAAAACATGCTGGGACGCAGTTTTTTGAACCCAA
 TGTCTTGGTTATAACCCACCGAATAAATTTGCTACAAAAGGGTACCTGAGCAATTCCTTGAACAGGAGAAT
 TTCTCAATAGAGAGTGTCTTACATTAATGCTCAACGCTTGGAAATATCTTCTCCCGGAGTACCGGAATTTCTCT
 TTTCACTCAAGGAGAAGGAGTTAAACATTTGGACGAGCTTTTGGGAAATTTGCCATATCCAACACGCAATGTTCA
 AACTCTGTGCGAAGCTTTGTTAGCAGATGTTTTGGCGAAAGCATTTCCAAGCAATATGATGGTTGTGACAGAG
 CGCGAGCAAAAAGAAAGCCTTTTGCATCAAGCGTCTTGGCATCACACAAGTGATGATTTTTGGTGAGAATGCTA

CTGTTAGAGGCAGTAGTTTTGTAACAGACTTGGAATAACAATTTAGCATTCCGATATGAGTTTACAGCTCC
TTTTATTGAATACTGTAATCGTTGTTACGGTGTAAAGAAATTTGTTAATTGGATGCACTACACTATAACCACAG
TGTTATATACATGTGAGTGATTATTATAACCCCCACATGGAGTCTCTCTCGAAAACCGAGAAAATCCACCAG
AAGGTCCAAGCTCTTACCGTGGTCATCTAGGCGGGATTGAGGGACTTCAACAAAACCTCTGGACAAGCATCTC
ATGTGCACAGATTTTATTAGTTGAAATCAAAAACCGTTTTAACTGCGATCTGCGGTAATGGGTGACAATCAA
TGTATAACTGACTCTCTGTATTTCCCTCGAACTGAGTCTAGTGAGCAAGAATTAAGTTCTGAAGATAATG
CCGCTAGAGTAGCTGCTAGCTTAGCAAAAGTCACAAGTGCCTGCGGCATCTTTTTAAACCTGATGAACTTT
TGTTCACTCAGGTTTCATTTATTTGGCAAAAACAATATTTGAATGGAGTACAATTACCTCAATCACTGAAA
ACTGCTACTAGAATTGCACCCTTGTGAGATGCTATCTTTGATGATCTTCAAGGGACACTAGCTAGCATAGGCA
CGGCTTTTGAAGATCTATCTCGAACTAGGCACGTAGTCCCTTGTAGAGTAGCAGCTGCATTCCATACCTT
TTTTTCCGTAAGAATCTTACAATATCATCATCTTGGCTTCAACAAGGGAACAGACCTGGGTCAATTTGTCATTA
AGCAAGCCATTAGATTTTTGGAACATAACTTTGGCCTGGCAGTACCACAAGTCTTGGGTGGCTTATCATTCC
TAAATCCAGAAAAATGTTTTTATAGAAATCTGGGTGATCCTGTTACTTTCAGGGCTGTTTCAGCTCAAGACATA
TCTTCAAATGATCCACATGGATGATTTGTTTTACCTTTGATCGCAAAGAACCAGGGAACTGTAGCGCAATT
GACTTTGTGTTAAACCCTAGTGGGTAAACGTACCGGGGTACAGGATTTGACATCCTTCCCTACGTGAGATAG
TGCGCCGAACAATTACTCTAAGTGCTAAAAATAAATTAATAAACACTTTGTTCCATTCTTCTGCTGATTTAGA
AGATGAAATGGTTTGCAAATGGTTGCTTCTTCTACACCAGTCAAGTAGGTTTGGCGCCGATATATTTTCT
CGCACTCCAGTGGGAAACGTTTACAGATCTTAGGTTACCTTGAAGGGACTAGAACATTTGTTAGCCTCTAAAA
TTATAAGTTATAATACTGAGACACCTATCCTAGATCGATTGAGGAAAATTACGCTGCAAAGCTGGAGCCTGTG
GTTTTAGTTATCTCGACCCTGTGATCAAGTTCTGGCTGATGCCCTAACTCAGATAAACCCTGCATGTGGACTTA
GCACAGATTCTTCCGAGTACACCTGGGCACACATACTAGAGGGAAGGCAGCTCATTGGAGCAACACTTCTT
GTATACTAGAACAATAAATGTCATCTGGCTCAAACCATATGAGCATTGCCCTAAATGTGCAAAGTCAGCAAAA
CCCTAAAGGGGAACCTTTTGTCTTATTGCAATTAATAAACATGTAGTAAGTGCTTGGCCTGATCAATCACGA
CTTAGTTGGACAATTGGAGATGGCATCCCTTATATCGGATCTCGAACAGAGGATAAGATTGGGCAGCCAGCCA
TCAAACCAAATGCCCTTACGACGCTTACGTGAAGCAATTGAGTTGACATCAAGATTGACTTGGGTTACTCA
AGGTGGAGCAAACAGCGACTTACTAGTTAAACCCTTATAGAAAGCAGGATAAATTTAAGCGTACAGGAAAT
CTCCAAATGACACCTTCTCATTACTCCGGCAACATTGTGCATCGATATAATGATCAATATAGTCCACACTCAT
TTATGGCAAATAGGATGAGTAATTTCTGCTACTAGGTTAGTTGTTTCGACAAACACTCTTGGAGAATTTTCAGG
AGGAGGTCAGTCAGCAAGAGATAGTAATATTATCTTCCAGAATGTCATTAATTTTGTCTGTTGCACTTTTTGAT
CTACGATTTAGGAACGTGGCTACTTCTTCTATAACAACATCATCGGGCTCATCTTCAATTTGTCAAAGTGTGCA
CGCGAGAGGTTCCAGCCCAATATTTAGTTTATAACATCAACATTGCCATTGGACCTTACACGGTATCGGGATAA
TGAGTTGATTTACGATGACAATCCATTAAGAGGTGTTTTAAATGCAATCTTTCTTTTGATAATCCGCTTTTC
AAGGGCCAGAGACTTAAACATAATTGAAGAAGACTTGATTAGACTACCTTACTTATCAGGATGGGAGCTAGCTA
AAACTGTTATCCAATCTATAATTTCTGACAGCAACAATTCATCAACGGATCCAATCAGTAGTGGGGAAAACAG
ATCATTCAACTCACTTCTTACATATCCTAAGATTGGACTACTATATAGTTTGGTGCCTCATCAGTTAT
TATCTAGGCAACACCATTATTAGAACCAAAAAATTGACTCTTAAACACTTCAATATATTACCTAGCTACTCAA
TACATAATTTACCTCATCGCTCGTTGAGAACTCTTAAACCTACTTTGAAACACGCTAGTGTATCTCGAGATT
AATAAGTATTGACTCTCACTTCTCAATTTATATTGGAGGAAGTCTGGTGTGATCGAGGACTTTCCGATCGGGCA
AGATTGTTTCTTAGAAGTCCATTAATGTTCTTCAATTCGTTAGAAAAGTGGATAGTTGAACGCAAGACAG
CTATTCCACTGTGGTCACTACCTCTAGAAAGTCAAAGTCTAGTCCGATCAACAGTTTCTTACACCCAGCT
CATCGCATTTGTTGCAACATGAGTCTTCCACGATCATGTTTGTGCTGCAGAAGCCACAGTGCAGTACGAGACA
TTTTGATAATTTAGTTTATATGTGTAAGACAGCAAGTAACCTTTTCTTTCATGCTTCATTAGCATACTGGAGAA
GTCGATCTAAAAATCAAGACAAAAGAGAGATGACAAAGATATTATCTTTGACGCAAACGAAAAGAAAAATTC
ATTCGGCTATACAGCACATCCAGAAAAGCACTGCTGTTCTTGGTTCCCTCCAGACCAGCCTTGTCTCCACCTCCA
TCTGCTGACGAGGCTACATATGATAGGAAAAACAAAGTTTGAAGCTTCCAGACCTGGCAAGTATTCCAGAA
ATACAACCAAAGCCCCACCAACCAACAGTTGTGCGGATGTATCTCCCAATATCACAGGCACAGATGGGTG
CCCTTCTGCCAATGAGGGTCTAACAGCAATAACAATAATTTAGTCTCGCACAGAATTGACTGCCGTTTTTTT
ACATTGTCTCATAATTATAACGAAAAGACCCTCTATCAGAAAGTCTGAGGGGACAACAGAGATTGTAAGGCTTA
CTCGGCAGCTGAGGGCAATACCAGACACCACAATATATTGCCGCTTACGGGAATAGTTTCTTCAATGCACTA
TAAGCTCGATGAAGTCTTTGGGAATTTGATAATTTTAAAGTCTGCTATAACACTTGCCGAAGGTGAAGGTTG
GGTGCATTACTCTTATTACAAAAATATAAAGTAGAAACCTTGTTTTTTAACTACTAGCCACAGAACACAGCA
TTGAAGCAGAAATATTTCTGGAATAACTACACCAAGAATGCTTCTCCCTATTATGTCTAGGTTCCATGGTGG
ACAAATAAAAGTCACTTTAAACAATTTCTGCAAGCCAGATTACCGATATTACTAATCCAAGTTGGTTGGCAGAC
CAAAAATCTAGGATCCCTAAGCAAGTAGAGATTATAACCATGGATGCTGAAACAACAGAAAACATTAATCGGT
CAAAATTTGACGAAGCAGTCCAACAGCTGATTGTCTCACATATTGATCCGAATGCACTCAAAGTTGTGGTTCT
TAAAGTTTTTCTAAGTGACATTGATGGAATCCTATGGCTGAATGATAACCTTACCCCTTTGTTTGGGCTGGGT
TACTTGATCAAGCCGATCACCTTAGCCAAAATCTAGTGAGTGGTACCTATGTCTCTCAAACCTTCTTTCAA
CTTCAAGACGATTACCTCATCAGAGTCATACTACTTGCATGCATGTTATTCAAACAGCACTCCAGCTACAAAT

TCAGAGGAGCTCATATTGGCTTAGCCACCTTGTCCAGTATGCCAATCATAATTTGCATTTAGATTATATTAAT
 CTCGGTTTTCCCTTCATTGGAGAGGGTTTTATACCATAGATACAATTTAGTCGATTCTCAGAAAGGCCCTTTGA
 CTTCCATTGTCCAACATCTAGCGCACCTGCAGACCGAGATTAGGGAGTTGGTTAATGACTATAATCAACAAAG
 ACAAAGTCGAACCCAAAACATATCATTTTCATTTAAAACAATAAAAGGTCGTATTACAAAATTTGGTAAATGATTAC
 CTTAAGTTCTTTCTAATAATACAAGCCTTAAAGCACAATTGCACATGGCAAGAGGAAGTAAAGAGCTCTTCCAG
 ATCTAATTAGTGTCTGCACTCGATTCTATCATACTCGAACTGTTTCATGTGAAAACCGGTTTCTAGTACAGAC
 TTTATACTTATCACGCATGCAGGATTCGGAAAATCAAATAATAGATAGATTGACCGGCCTTCTTAGTCTATGT
 CCAAATGGTTTTTTTTCGGTAAGGACTCTTGACGTACAACTCCACATAGTTATAACAATGGTACCAGGACACTA
 TATGTAAATTGACCTAAGAAAGAGTAATTCGACACACAGAGTTCTCAAGTGAACCCCTCATCTCAGATTAT
 CTGTGGTTGCAATTCTAATATCCGATTGTTACCCCGTGAGTATAACTCCAGATTAATATAAGAAAAACCTTT
 TGTCCCTGCAATTTATCTTAAATTCAGTACATACGCTCCAAATCGTATAAAAATATTAAGAAAAAGTTAATCT
 GCTTGCTTTAATTATACTTTAATATTCGACAAAATAGTTAACGGTCTCATCACTCAAAAATTTTCATTAACAAA
 AGAAGTACTCTGAGTATATTCACATATCATATGTGATTAACATATAAGCAACGCATGATGCGCCTTCCCTCTTA
 CTTATTGTGTTGTACGCGAGTCGTTGTACTACCTCGAAAATTCAAAACAATAAATCGTGTCTATCCCGCATTT
 AGTGTCTTTAATTTAAGATCTCAAATCCAAAAAACTGGGTTTTATGTTGATGTAATCAATAATACCGAAATTG
 CTTGATATTAATAAAGCTTAAAGGATTTTTCTTAAACGGTGATGTTAGGTATATAGGAAAGCTCGATCAC
 GATGTCCCTTACTCAGAAAAAGAAAAACGGAAGCCCTATTGGCCATTTAATCGTACACAAAAATATCTTTACC
 AAATTGTTTTCTTTTTTTGTGTGTCCA, (SEQ ID. NO.:4).

SEQ. ID. NO: 5

CGGACACACAAAAAGAAATGAAGGATTTTTGAATCTTTATTGTGTGCGAGTAACTACGAGGAAGATTTAAAGATTT
 TCCTCTCATTGAAATTGAAATTGAGATTCTAATCTCGACGGATCGATCCCCAATACCAACACTGAGAATTGGC
 CTGAAGAAGTCATCTGCTCCTTGGCAAAACCAAGAGCAGGCCCAAAGGGCCATTAGGCCACATCTGCTGAGCC
 TGCAGAACACGCAGGACTTACTTAGCAGAAGAGAGCGCGTGCCGAAAACAGCCAACAAATTTGACACAGCTGCT
 CACTCTGACCCTGAATTCATAAACAATATTAAGTTGACAACAGAGATACTAATCCAATATTTGGATCAAGAAT
 CAAAATAGTGAAACGACTGACTATCCCTCCTTAGAATTAGCAAAGATCCTTTTGTAGACTATTGTGCTACATT
 CTCTATCCAAGACCTCAAATGGATCCTCGTCCAATCAGAACCTGGATGATGCATAACACATCTGAAGTTGAA
 GCAGACTACCATAAGATTCTAACTGCCGGATTGTCCGTCCAGCAAGGCATTGTGAGACAAAGAATCATTCCTG
 TTTACCAATCTCAAACCTGGAGGAAGTATGTCAACTCATCATAACAGGCATTCGAGGCTGGCGTCGACTTCCA
 GGATAGTGCAGATAGCTTTTTGTAAATGCTATGTCTGCATCATGCCTATCAAGGGGATTATAACAATTTTTG
 GAAAGTAATGCGGTAAAATACCTTGAAGGTCATGGATTCCGTTTTGAGATGAAGAAAAAGGAAGGTGTCAAGC
 GCCTGGAGGAAGTACTCCCTGCTGCCTCGAGTGGAAAGAACATCAAGAGAACATTGGCTGCAATGCCCAGGA
 GGAAACAACAGAAGCAAATGCTGGACAATTTCTTTCATTTGCTAGTCTGTTTCTCCAAAATTTGGTTGTCGGA
 GAAAAGGCCTGTCTGGAGAAGGTTCAACGACAAAATCCAAGTGCACGCAGAACAAAGGTCTGATTCAATACCCGA
 CATCTTGGCAATCGGTGGGACATATGATGGTCATCTTCAGACTAATGCGAACCAACTTCCCTGATTAAGTTCCCT
 CCTAATACATCAAGGAATGCATATGGTTGCAGGGCATGATGCTAATGATGCCGTCTATTGCCAACTCTGTAGCT
 CAAGCTCGTTTTCTCCGGATTGTTGATAGTCAAAACAGTGTCTGATCATATCTCCAAAAACAGAGCACGGAG
 TTCGCCTGCATCCCTTGGCGCGAACAGCCAAAGTCAAAAATGAGGTGAGCTCTTTTAAAGGCCGCTTTAGCCTC
 ACTAGCACAAACATGGAGAATATGCCCCGTTTGTCTGCTGCTGAATCTATCTGGGGTTAATAATCTTGAGCAT
 GGGCTTTTCCCTCAACTTTCTGCAATTGCTTTGGGAGTAGCAACTGCACATGGGAGCACTCTGGCTGGAGTCA
 ATGTAGGAGAGCAATACCAACAACACTGCGAGAAGCAGCCACTGAGGCCGAAAAGCAGTTGCAGAAATATGCTGA
 ATCTCGTGAACCTTGATCACCTAGGTCTTGATGATCAGGAAAAGAAAATCCTAAAAGACTTCCATCAGAAAAAG
 AATGAGATCAGCTTCCAGCAGACGACAGCCATGGTCACACTGCGGAAAGAGAGATTGGCCAAATGACCGAAG
 CTATTACTTCCACCTCTATCCTCAAACAGGAAGGCCGATGATGATGACAATGACATAACCTTTCCAGGGCC
 AATCAATGATAACGAGAACCTTGGTCAGAACGATGACGATCCAACAGACTCCCAGGATAACCACAATCCCGGAT
 GTAATAATCGATCCAAACGATGGTGGGTATAATAATTACAGCGATTATGCAAATGATGCTGCAAGTGTCTCTG
 ATGACCTAGTTCTTTTTGACCTTGAGGACGAGGATGATGCTGATAACCCGGCTCAAACACGCCAGAAAAAAA
 TGATAGACCAGCAACAACAAGCTGAGAAATGGACAGGACCAGGATGGAAACCAAGGCGAAACTGCATCCCCA
 CGGGTAGCCCCCAACCAATACAGAGACAAGCCAATGCCACAAGTACAGGACAGATCCGAAAATCATGACCAA
 CCCTTCAAACACAGTCCAGGGTTTTGACTCCTATCAGCGAGGAAGCAGACCCCAGCGACCACAACGATGGTGA
 CAATGAAAGCATTCTCCCTGGAATCAGACGACGAGGGTAGCACTGATACTACTGCAGCAGAAACAAAGCCT
 GCCACTGCACCTCCCGCTCCCGTCTACCGAAGTATCTCCGTAGATGATCTGTCCCCTCAGAGAACATTTCCCG
 CACAGTCCAATCAAACGAACAATGAGGACAATGTCAGGAACAATGCTCAGTCGGAGCAATCCATTGCAGAAAT
 GTATCAACATATCTTGAACACAAGGACCTTTTGATGCCATCCTTTACTACCATATGATGAAAGAAGAGCCC
 ATCATTTTTCAGCACTAGTGTGGGAAGGAGTATACATATCCAGACTCTCTTGAAGATGAGTATCCACCCTGGC
 TCAGCGAGAAGGAAGCCATGAACGAAGACAATAGATTCATAACCATGGATGGTCAGCAGTTTTACTGGCCTGT

GATGAATCATAGAAATAAATTCATGGCAATCCTCCAGCATCACAGGTGATCCGACCTCTAAAACTGAGCTCCT
 AACTACAAGCTACCCCATCACTCTGCCGGAATGCCAGAACCTCCCTCCAAAACAGCTCCACATCGAGAACCCTC
 CGACGCGGTACACAGGCAAGACAGGCAACCTAATGATGTTCTGTTACCCACAACCCTGCAACCAACACTTGAT
 CGACTTCCAAGACAACACAAACCCCTTAGCCAACCTCCACCACAGAAGCACCACCCATAACAACAACCCCAA
 ACCAACAACACTGCATGTAAGTATTTGTCTCACCCCAAGATGATCCCTGGACACCAACAACCCCTAACCTCCC
 CAAGTTGTCAATTAAGAAAAATATATGATGAAGATTAACCTTCATCAGAGCTATTTCTTCTACGCTTGGTT
 AGGACCAGTATTCACAAACTATTTTACAATCCCTACCCAATATGACCTCTAACAGAGCAAGGGTGACTTACAA
 CCCACCACCAACAACCACAGGCACACGATCGTGTGGGCCGGAACCTTCCGGGTGGATCTCTGAGCAATTGATG
 ACAGGCAAGATTCCGATTACCGATATCTTCAATGAAATTTGAAACCTTACCTAGTATAAGTCCCTCGATCCACT
 CCAAATCAAACCCCAAGTGTCAAACACGCAGTGTCCAGACCCAACTGACCCAAATTGTAATCATGATTT
 TGCAGAGGTTGTGAAAATGCTAACATCTCTAACCTTGTCTGACAAAAACAACCCCTTGCAACTGAATCACTT
 GAGCAACGCATTACTGACCTGGAAGGTAGCCTGAAACCAGTGTCTGAGATCACCAAGATTGTTTCTGCACTAA
 ATAGATCCTGTGCAGAGATGGTGGCCAAATATGATCTTCTAGTAATGACGACTGGTCTGCAACTGCCACTGC
 TGCAGCTACTGAAGCATACTGGGCAGAACATGGACGTCTCCACCAGGGGCCCTCATTGTACGAGGAGGATGCA
 ATCAGGACTAAAATTGGAAAAACAAGGGGATATGGTACCACAGGAAGTGAAGAGGCCTTCCGTAATCTGGATA
 GTACTGCCCTTCTAACGGAAAGAAATTTTGGGAAACCAGACATATCCGCAAAAGACTTGCAGCAATATCATGTA
 TGATCACCTCCCAGGTTTTTGGCACAGCATTTTCACTAAGTGTGCAAGTTATCTGCAAGTTAGGGAAAGGACAAT
 TCCTCACTTGATGTAATTCATGCAGAATTTTCAAGGATGACGACCCACCCGTAATCCATATTCGGTCACGCGGTGA
 TTCAGATAACCAACCGGATTCCTATTTTCCAAGATGACGACCCACCCGTAATCCATATTCGGTCACGCGGTGA
 TATACCAAAAGCGGTGTCAAAAGAGCCTCCGCTTGTCCACCATCACCAAGATTGATAGGGGTTGGGTATGC
 ATATTCAGCTACAAGACGAAAAACACTCGGACTCAAATCTAAGGTGAACAATTGCGCAACCTCCACAGTC
 GCCTATATTGCTTCTTCCGGAATCAGGGTATGATCGCGTAAAAAATAAGCTTCCAACATATTGATACACGAT
 CCATATCCATAATGCCATCTCCAGGAATATGAGAACGCAAGGCCATATCAGGACCCGATCTCAATTTCAATGC
 AACCTACTGTTAAGAATAAAAAAACAACATGTCTCTAGCCTTATATGTTCTCAAAAATACAAGTGAAGAT
 TAAGAAAAAGCATCCTTTACTTGAGAGGAGCTAATTTCTTTATACTTCACTAATCTTTAAGTAAGTTGATCAC
 TACCACCATGAGGAGGGCAATTTCTACCTACTGCACCGCCAGAATACATAGAGGCTGTCTACCCAATGAGAACG
 GTTAGTACTAGTATCAACAGTACTGCCAGTGGTCCGAACTTTCCAGCACCAGGATGTAATGATGAGTGATACAC
 CCTCCAACCTCACTCCGACCAATTTGCTGATGATAACATCGATCATCCAAGTCATACACCAACCAGTGTTCATC
 AGCCTTTATACTCGAGGCAATGGTGAATGTGATATCGGGGCCGAAGGTACTAATGAAGCAAATTCCTATATGG
 CTCCCTTGGGTGTTGCTGATCAAAAACATATAGTTTTGACTCAACTACAGCTGCAATTTATGCTCGCATCGT
 ACACCATCACTCACTTTGGCAAAACCTCCAATCCGCTTGTGAGAATCAATCGACTTGGTCTGGGATCCCCGA
 TCACCCGTTGCGGCTTCTAAGAATAGGAAATCAAGCCTTCTTGAAGAGTTTGTGCTGCCTCCAGTTCAATTG
 CCGCAGTATTTCACTTTTTGACCTGACGGCTCTAAGCTGATCACTCAACCTCTCCCGGCAGCAACCTGGACGG
 ATGATACTCCGACCGGTCCTACAGGAATACTTCTGCTTCCGAAATTTCTTTTCACTCCAAACTGAGACCTATCCT
 ATTGCCAGGGAAGACCCGGGAAAAAGAGGATCCAGCTCCGATCTTACTTCTCTGATAAAAATACAAGCAATAATG
 AACTTTCTCCAAGACCTCAAACCTCGTGCCGATTGATCCAGCCAAGAACATTATGGGTATTGAAGTGCCGGAAC
 TCTTGGTCCACAGACTAACTGGAAAGAAAATCACAAACAAAAATGGTCAACCAATAATTCCTATTCTTCTACC
 AAAGTATATTGGCATGGATCCCATTTCTCAGGGAGACCTCACAATGGTCACTCAAGACTGTGACACTTGC
 CATTCTCTGCTAGTCTTCTCCAGTCAGCGAGAAAATGAGCATGAAGTCCGAGGCTGCCCGCCACACGACC
 CCCAGGGCCTTCGTCCGGCTACCGAACCAACCTCCGACTTCACTCAAACCAAAAAATACCGCCACCGCGAAA
 GCTAAAATTCAGGACCAACATCCAACCAGCAACACCATCCATACACAGGTATCAATTGGGCTGCCGCAGCATA
 TAGACCCAATAGCAAGCTGCTGTCCAGAAAATAGTTCCGAAAGTAACTCAACCATCGCAAGCCCAATGCAGC
 TTTTCAAGAAATCCGCCAGCAACCCAACTCCACTGTACCCCAATATTAACCTGAATCGACTAACCAGCACTTTAA
 TTTGAAGTACATTTGTTCAATGGGTTCAATTTAAGAGTGTGCTTTTAGATTGTACCTTTGCTCACAGATAG
 TAAATTGTTATGGTATCAAACTTATTTAAGAAAAAGAACACGATGAAGATTAACGCGACCTAGAGCGCTGCCT
 TCATCTCATCAATTTAACTTGTCAATAGAGCAACCTAGTTTGTGATTACTCATCTTCCGTAGTTGACAAACAC
 TTTGCTGGTTAATTGTAAATATACCACAGTCATCATGGTTACATCAGGAATTTTACAATTTGCCCGTGAACGC
 TTCAGAAAAACATCATTTTTTGTGGGTAATAATCTTATTTTCAAAAGTTTTCCCTATCCCATTTGGGCGTAG
 TTCACAACAACACTCTCCAGGTAAGTATATAGATAAATTTGGTGTGCCGGGATAAACTTTTCTCCACAAGTCA
 GCTGAAATCGGTCGGGCTTAATCTAGAAGGTAATGGAGTTGCCACAGATGTACCAACAGCAACGAAGAGATGG
 GGATTCCGAGCTGGTGTTCACCCAAAGTGGTGAACACGAAGCTGGGGAGTGGGCTGAAAACCTGCTACAACC
 TGGACATCAAGAAAAGCAGATGGTAGCGAATGCCCTACCTGAAGCCCTGAGGGTGTAAAGAGGCTTCCCTCGCTG
 CCGTTATGTGCACAAGGTTTCTGGAACAGGGCCGTGCCCTGAAGGTTACGCTTTCCACAAAGAAGGCGCTTTC
 TTCCTGTATGATCGACTGGCATCAACAATCATCTATCGAAGCACCAGTTTTTCCAGAGGTGTTGTGGCTTTCT
 TGATCCTCCCCGAAACTAAAAAGGACTTTTTTCCAATCGCCACCACTACATGAACCGGCCAATATGACAACAGA
 CCCATCCAGCTACTACCACACAGTCACACTTAATTTATGTGGCTGACAATTTTGGGACCAATATGACTAACTTT
 CTGTTTTCAAGTGGATCATCTAACTTATGTGCAACTTGAACCAAGATTCACACCACAATTTCTTGTCCAACCTCA
 ATGAGACCATTTATACTAATGGGCGTCGCAGCAACACCACAGGAACACTAATTTGGAAAGTAAATCCTACTGT

TGACACCGGCGTAGGTGAATGGGCCCTTCTGGGAAAATAAAAAAACCCTTTCACAAAAACCCTTTCAAGTGAAGAGC
TGTCTGTCATATTTGTACCAAGAGCCCAGGATCCAGGCAGCAACCAGAAGACGAAGGTCACTCCCACCAGCTT
CGCCAACAACCAAACCTCCAAGAACCACGAAGACTTGGTTCAGAGGATCCCGCTTTCAGTGGTTCAAGTGCGA
GACCTCCAGAGGGAAAAACACAGTGCCGACCCACCCCCAGACACAGTCCCCACAACCTCTGATCCCCGACACAA
TGGAGGAACAAACCACCAGCCACTACGAACCACCAAACATTTCCAGAAACCATCAAGAGAGGAACAACACCCGC
ACACCCCGAAACTCTCGCAACAATCCCCCAGACAACACAACCCCGTCGACACCACCTCAAGACGGTGAAGCGG
ACAAGTTCCCACACAACACCCTCCCCCGCCAGTCCCAACCAGCACAATCCATCCCACCACACGAGAGACTC
ACATTTCCCACCACAATGACAACAAGCCATGACACCGACAGCAATCGACCCAACCCAATTGACATCAGCGAGTC
TACAGAGCCAGGACCACTACCAACACCACAAGAGGGGCTGCAAATCTGCTGACAGGCTCAAGAAGAACCCGA
AGGGAAATCACCCCTGAGAACACAAGCCAAATGCAACCCAAACCTACACTATTGGACAACCCAAGATGAAGGGG
CTGCCATTGGTTTAGCCTGGATACCTTACTTCGGGCCCGCAGCAGAGGGAATTTATACGGAAGGGATAATGCA
CAATCAAAATGGGCTAATTTGCGGGTTGAGGCAGCTAGCAAATGAGACGACTCAAGCCCTACAGTTATTCTTG
CGTGCTACCACGGAATTCGCGCACTTCTCTATATTGAATCGAAAAGCCATCGACTTTTTACTCCAAAGATGGG
GAGGAACGTGCCACATCTTAGGCCAGATTGCTGTATTGAGCCCATGATTGGACTAAGAACATTACTGACAA
AATAGATCAAATCATTGATTTTTCATTGATAAACCTCTACCAGATCAAACAGATAATGACAATTTGGTGGACA
GGGTGGAGGCAATGGGTTCTGCCGGATCGGGATCACGGGGTAATAATCGCAGTTATAGCACTGCTGTGTA
TTTGCAAATTTCTACTCTAATCTAGTCCGACTCTGTACCAGCATAATGGCCTCTAAAATAAGCTTTTGCTTCT
GCTTCTATAGTTAATACATTTTCAGCAAAAATCAACTATTAAGTCAAAAAGAAGATCCCTCTAATAATCCTAAT
TACCTTCAAAAATCTAGAACTTTATTAATTTCTCAGGGTATTAGAACAGCCAGATGACTTGCATAAGTTGTA
CTGTAATAAAAAGATACTTGATGAAGATTAAGAAAAAGACAGTCTTGTGATTGTCACATAATCTTCATCTCAA
ACATATTATTTTACCAGAAGCTACTATAGCCTACCTCCTTGACACATAGCAAACCTTACTCATGTTGATAAAT
GTTTGCCCTGCTATTTACATATTTACTAACTTACAAAATTTATCTTGGGGATTTCTCTGAACATATAATCAGAAT
TGGCATTAAAAACACAAGTTAGTCCATAATGGACTCATTTCATGAGAGAGGGCGTAGCAGAACTATTTCGACAGA
GTGCAAGAGATGGGCCGAGTCATCAAGTAAGAACAAGATCATCCTCCAGAGACAGCCACCGCAGCGAATATCA
TACACCTAGGAGCTCTTCCCAAGTTCGAGTCCCAGCTGTGTTTCATCGGAAGCGTACTGATTCTTTGACAGTT
CCACCAGCACCAAAGGACATATGTCTTACCTTAAGGAAAGGATTTTTGTGTGACAGCAATTTTTGTAAAAAGG
ACCATCAACTAGAAAAGTTAACAGATAGGGAGCTGCTTTTGCTGATTGCACGAAAACCTGCGGCTCCCTTGA
ACAACAATTGAACATCACTGCTCCTAAAGATACACGATTAGCAAATCCAATTGCAGATGATTTCCAACAAAA
GACGGCCCAAAAATTACACTATTGACACTTTTGGAGACTGCGGAGTATTGGTCAAAAACAAGATATCAAGGGCA
TTGATGACTCAAGACTAAGAGCATTACTAACCCTTTGTGCCGTGATGACGAGGAAATTTCTCAAAATCCCAGCT
TAGTCTATTGTGTGAGAGTCATCTACGACGAGAAGGGCTAGGACAGGATCAATCAGAATCTGTTCTTGAAGTG
TATCAGCGCTTACATAGCGACAAAAGGCGGAAATTTTGGAGCAGCCCTATGGCAACAATGGGACCGACAGTCTT
TGATCATGTTTATAACAGCATTTCTTAATATTGCTTTACAATTACCCTGTGAAAGTTCATCTGTTGTTATTTTC
AGGATTAAGGCTGCTAGTGCCCTCAATCAGAAGATACCGAGACCTCAACCTACACCGAGACACGTGCATGGTCA
GAGGAAGGTGGCCCCCATTAACATCTTCCACAGTGAATCTACCATAATTTCCCTATTCAACGCAGATAAGAA
TCAGTACTAAACCACAAGTGCAAAAATTAACAAAACACCAGCATAAGTGAATCCTGTCTGTGATTAGCAACA
CGAATGATCTTCAATCCTGTGCAATTCGCCAGTGATAATTGTATTACATTGTGGCCACAATATACTGTCTT
TTCCCATTTGAAAAATAAGGCTGAATCTATTACGCTACACAACCTTACAGGATTAGCACCACGACGGCTCAATA
CTATACCTATTGGTACGGCTCGATGTGTTAATCACTATATTTGATTATTGAAATTTACTCATTAGGCAAAA
TACTTTGATTAAGAAAAATAAATTTGAAAAACCAGAAAATCCCTAGGTATTTAAATTTCTATCTCCGGAGACTC
GAGATAATTAATCAAGCAATGAGGGAACAATGGTGAACAACAACATATTGTTGCCCTTTAGATTGGTCAAGT
TCCAAAAACAAGTGATGAAGATTAATGCAGATGTCCAAGGAACACATATTTGTGATTTAAACGTTCCAGTTAG
ACTCTGTTCAAGGATCTTTCATCTTTTGTAGCTCCACTCTGAGTCACAACATAAATTGAGTTTTTGTCTCAGAACA
GTTATCAGGATTAATTTCTCTCAAATAACTGAAACTACTAGCATCACTCTCAATTTTACTTACTTACGACAATC
ATTATCTTAATAATATTTCTCTAAATTTACTGACTTAATTTAGCTTGTAATCAGATAATATCGAAACCAATTTAT
CATAAGGCATAATTTGTATAAGTGATTTAGGATTTACCCAGAAGTGAATAAATTTCTTAGAATAAAAAGACCGA
CTAGAATATCCTTAAGGCTGTCTAACGTGCCACACAGCTAGGGTTAGCCTGACATCTGGAACAAGATCGATAC
TAATATAGGGATTTGTTTCATACTAGCTCTCTGCAAACACAATGGCTAAGGCAACAGGTAGGTACAACCTGGT
TTCACCTAAAAAGGACCTCGAGAGGGGGCTTGTGTTTGTAGTATTGTTGTCACGTTTTTGTGTTGATCAGACTATC
CAGGGGTGGCGGGTACTTGGGTTGGGATTGAATTTGACATCGCCAGAAAGGGATGGCTCTACTGCATCGGT
TAAAAACTGCTGACTTCGCTCCTGCATGGTGCATGACAAGGAATTTATTTCTCATTATTTCAAAATTTCAA
TTCTACTATTGAGTCTCCCTCTGGGCATTACGAGTGATTCTGGCAGCTGGTATTCAAGACCAGTTAATTGAC
CAATCCTTGGTAGAACCGTTGGCCGGAGCCCTGAGCTTAGTCTCCGATTGGCTTCTTACAACAAACACAAACC
ATTTTCAAATGCGCACGCAGCACGCTAAAGAGCAACTGAGCTTGAAGATGCTATCATTAGTGCCTCTAATAT
CTTGAATTCATCAGTCAATTGGACGCACTACATGTGCTGAACTACAATGGACTCTTGGACAGTATCGAAATTT
GGCACTAGAAATCATAACATTTATCATCAACAAGAACCAATGGGTTTCTGGTGAATTTACAGGAGCCTGATA
AATCTGCCATGAATCAAAAAGAAACCAGGACCAGTCAAGTTCTCCCTCCTGCATGAATCAACCTTCAAGGCTCT
AATCAAAAAACCCGCAACTAAGATGCAGGCCTTGATTTCTGGAATTTAACAGCTCCCTGGCAATATAGTCCAAC

GCTACCAACCATCATTTTTTGTAACTGCATCTCTTTTTATTTCCTTTTCTAACTTGATACAATTATAATCAAGAT
 CCCTAATCCCTTTTTGACGAAGTGGGCTAATTTTTGCTCATTCTAATAATAAATCATAACCTGAATAAAAAGACA
 CCACAATATTATAACCCAATAACACCTAGAGAATTTCTGAATTGCTAAAGATTATATACTCGCACTAAGAGAC
 AAGTTAATCAATCTTTACTTAATAATATACTAAATGCTAGATAGCTCTGGCTAACTAACCTGAGTTGTGGATT
 ACTCCTTTTTAAAAGTCTATCAATTTAAGCTTATCCTAATATTAAGGAGGACTTTTTAAATAAGAGCAAGTGT
 TATGTAGTCTTACTAAGAATGATTTGAGGAAGATTAAGAAAAAGTGTCTGTGGGGTCTTTCCGTTGTAGAGGA
 CACACGAGCAAACCTTCTTCTCTAATTTAATATGGCAACTCAACATACACAATATCCAGATGCAAGATTATC
 TTCACCCATTGTCTTAGATCAATGTGATCTTGTCAACCGTGTCTGCGGTCTGTATTCTTCATACTCATTAAAT
 CCTCAGTTGAAAAATTGTAGACTACCAAAACATATTTACCGCTCAAATTTGATGCTACGGTTACAAAATTTT
 TAAGCGATGTTCCAATAGTTACATTGCCGATAGATTACTTGACCCCTTTACTTTTTACGAACCTTTATCCGGGGA
 GGGCTTATGCCCTGTGCAACCAAAGTGCAGCCAATTTCTTAGATGAAATAGTAAGTTATGTTTTGCAGGATGCA
 CGTTTTTTAAGATACTATTTTAGGCATGTTGGAGTACACGATGACAATGTTGGAAAAAATTTTTGAGCCAAAAGA
 TTAAGGCTTTGATTTATGATAATGAATTTCTGCAACAATGTTTTATTGGTACGATTTAGCAATCCTAACGCG
 TAGAGGGCGCCTGAATCGAGGGAATAACCGTTCAACATGGTTTGCAAATGACGATTTAATAGACATTCTCGGG
 TACGGTGATTATTTTTCTGGAAAAATACCGTTGTCTTGTGTCACTCAACACAGAGGGGATTCTCATGCAG
 CTAAGGACTGGTATCACGCATCAATCTTCAAAGAAGCGGTTCAAGGTCACACACATATCGTGTGAGTTTCCAC
 TGCAGATGTTTTAATTATGTGTAAGGACATCATAACCTGTCTTTCAATACCACACTCATTGCAGCATTGGCA
 AATTTAGAAGATTCTATCTGTCTGACTATCCACAACCTGAAACAATCTCTAATCTGTATAAGGCAGGGGATT
 CCTAATCTCGATACTGGGTTTCAAGGTTATAAGGTTATAAGGTTTTTAGAACCACTATGTTTTAGCTAAGAT
 ACCAATGTGCTCAAATTACACTGAGAGGAAAGGAGATTCTTACTCAAATGCATTGCGCGTTAATCACACA
 CTTGAAGAAGCTTATTGAGGCGGGGATTGAAGTACAACAAGACTGGAAGATGAGGGAATTTACCGAATCT
 TAGTAAATTTAAAGTCAACACCACAACAACCTCTGTGAATGTTTTTCAGTGCAAAAGCATTGGGGGCATCCTGT
 GCTACATAGCGAGAAGGCTATTCAGAAAAGTAAAGAAACATGCAACCGTAATAAAAAGCATTGCGTCCCCTAATC
 ATCTTTGAGACATATTGTGTGTTCAAGTACAGCATTGCCAAACATTATTTTGATAGCCAAGGGTCATGGTATA
 GTGTAATCTCAGATAAACATCTAACACCAGGTTTACACTCTTACATTAAGAGGAACCAATTTCCGCCACTGCC
 TATGATTAAGACTTATTGTGGGAATTTCTATCACCTTGATCATCTCCCTTATTTTCCACCAAGATTATTAGT
 GACTTGAGTATTTTCAATTAAGGATCGCGCTACCGCAGTGGAAAAACATGTTGGGATGCAGTTTTCGAGCCTA
 ATGTTCTTGGATATAGTCTTCAAACAAGTTCTCAACTAAGAGGGTCTTGAACAGTTTTCTTGAACAAGAAAA
 TTTCTCGATTGATAGTGTCTCACTTATGCCAGCGCCTGGATTATCTACTTCCACAATACCGGAATTTTTCT
 TTCTCACTTAAGAAAAAGAATTAATGTAGGACGAGCTTTTGGTAAGCTACCTTATCTTACACGTAATGTTT
 AAACCTTTATGTGAAGCCTTATTGGCAGATGGATTAGCTAAAGCCTTCTTAGTAACATGATGGTTGTAACAGA
 GCGTGAGCAGAAGGAAAGCCTCTTGCACCAGCGTCTGTTGCCACCACACAAGTGACGATTTCCGGTGAGAATGCC
 ACTGTTAGAGGCAGCAGTTTTGTTACCGACCTAGAAAAATACAACCTTGGCATTTTAGATATGAGTTTACAGCTC
 CATTTATTGAATACTGTAATCGATGTTATGGTGTAAAAAATTTATTCAATTTGGATGCATTATACGATACCGCA
 ATGTTATATACATGTAAGTGATTATATAATCCCCCTCATGGAGTTTCGCTAGAAAAATCGGGAAGATCCCCCG
 GAAGGCCCTAGCTCTTACCGTGGTCATCTTGGGGGAATTGAGGGACTCCAACAGAAACTCTGGACCAGCATT
 CATGTGCACAAATCTCATTAGTTGAGATCAAGACTGGTTTCAAATTGAGATCTGCGGTAATGGGTGATAATCA
 ATGCATCACAGTTCTTCCGTATTTCTCTAGAGACAGATCCAATGAGCAAGAGCATAGCTCCGAGGACAAT
 GCTGCTCGCGTAGCAGCCAGTTTAGCCAAAGTCAAGGATGCTGTGGCATCTTCTAAAACCAAGTACGACTT
 TTGTGCATTACAGCTTTATTTATTTTCGGTAAGAAGCAATATTTAAATGGCGTTCAATTGCCACAATCACTCAA
 GACTGCTACCAGGATTCTCCCTGTGTCAGATGCAATCTTTGATGACCTTACGGAACTCTGGCTAGTATAGGA
 ACGGCATTTGAGAGATCTATATCCGAGACTAGACATGTATACCTTGGCGGGTGGTTGCCGCATTCATACAT
 TCTTCTCCGTTAGGATCCTCCAATACCACCACCTTGGTTTTCAACAAAGGAACCGATCTAGGTCAACTATCACT
 AAGCAAACCGTTGGATTTTCGGAACCTATCACTCTTGTCTTAGCGGTACCTCAAGTTCTAGGAGGTTTATCGTTT
 TTAACCCAGAGAAATGTTTTATCGCAACCTTGGAGACCCCGTGACCTCCGGCCTATTCCAACCTTAGGACTT
 ACCTGCAAATGATCAACATGGACGACTTATTTCTACCTTTAATTGCCAAGAACCCCGGGAACCTGTAGTGCAAT
 TGACTTTGACTCAACCAAGCGGATTGAATGTCCCTGGGTACAAGACCTAACATCTTTTTTTACGTGAGATA
 GTGCGTAGAACAATCACATTGAGTGCAAAAAATAAGCTAATAAACACATTGTTTCACTCCTCAGCCGATTTAG
 AAGATGAGATGGTATGTAATGGCTACTTTCTTCAACACCTGTAATGAGTCGGTTTGGTGTGATATATTCTC
 TCGTACTCCGAGTGGGAAGCGCTTGCAGATCCTAGGTTATTTAGAAGGGACTAGAACCTTGCTAGCCTCCAAA
 GTCATCAATAACAATGCAGAGACTCCTATTTTAGATAGGTTGAGGAAAATCACACTGCAGAGATGGAGTTTGT
 GGTTTAGCTACCTAGACCACTGTGATCAGGTTCTAGCAGATGCTTTAATAAAAAGTTTTCTGTACAGTTGATTT
 GCGCAAATTTTACGTGAATATACCTGGGCACACATACTAGAGGGAAGACAGCTCATTGGTGCAACACTTCTT
 TGCATGTTAGAACAATTTAATGTGTTTTGGCTCAAATCGTACGAACAATGCCCTAAATGTGCAAAAATCTAGAA
 ATCCAAAAGGAGAGCCATTTGTGTCAATTGCAATTAAGAAACAAGTTGTGAGTGCATGGCCGAATCAGTCACG
 GTTAAATTTGACCATTGGGGACGGTGTACCTTACATCGGGTCTCGAACAGAGGACAAGATTGGGCAGCCAGCA
 ATCAAGCCTAAGTGTCCCTCTGCTGCCCTTACGTGAAGCAATAGAGTTGACATCTAGACTAACATGGGTTACCC
 AAGGTGGTGCCAATAGTGATTTGCTAGTTAAACCTTTTGTAGAGGCACGAGTAAACCTGAGTGTGCAGGAGAT

CCTTCAAATGACGCCTTCTCATTATTCAGGGAACATCGTACATCGGTATAATGACCAATACAGCCCTCATTCT
TTCATGGCAAATAGAATGAGTAATTCCGCGACGAGATTGGTGGTGTGACAAAATACTCTCGGGGAGTTCTCAG
GTGGGGGGCAATCAGCAAGGGACAGCAATATCATCTTTCAAATGTAATCAATTTTTTCGGTTGCCCTATTTGA
TTTACGATTTTCGGAACACCGAAACATCCTCCATTCAGCATAATCGTGCCCATCTCCATCTTTACAGTGTTC
ACACGGGAAGTCCAGCTCAATACCTAACCTACACGTCTACGCTTTCTTGGATCTCACAAGGTACCGAGAGA
ATGAGTTAATTTATGATAACAATCCGTTAAAAGGTGGACTTAATTGCAACCTATCCTTTGATAATCCACTTTT
CAAGGGCCAAAGGCTCAATATCATAGAGGAGGATTTGATTAGATTTCTCATCTATCTGGGTGGAACTTGCG
AAAACCATCATTAGTCCATTATCTCAGACAGCAATAACTCATCCACAGACCCCATTAGCAGTGGAGAAACAC
GATCATTACAACCTACTTTCTCACATATCCTAAGGTTGGGCTCCTCTATAGTTTCGGCGCCATCGTGAGTTA
TTACTTAGGGAATACCATTATTAGGACCAAAAAGCTAGACCTCAGTCATTTTATGTATTACTTAACTCAA
ATCCATAATTTGCCACATCGCTCGTTGAGGATACTTAAGCCACCTTTAAACATGTTAGTGTGATATCAAGAC
TAATGAGTATTGATCCTCATTTTTTCAATCTACATCGGGGGTACGGCAGGTGATCGAGGGCTTTTCGGATGCTAC
CAGACTATTCTTCGAGTGGCCATTTCTTCTTCTTCAATTTATCAAAAAATGGATCGTGGAAATACAAGACA
GCTATTCTCTGTGGTTATATAACCCTTTGGAGGGACAAAATCCAGATCCAATTAATAGCTTTCTACATCTGA
TTATAGCCTTACTGCAAAATGAATCCCCTCAAAAACAACATCCAATTCGAAGACAGAAATAATCAACAGTT
GTCCGATAATCTAGTTTACATGTGCAAGAGCACTGCCAGTAATTTCTTCCATGCATCACTTGCCATTGGAGG
AGCCGGCACAAAGGACGGCCCAAAAATCGATCGACCGAAGAACAGACAGTTAAACCCATACCATATGATAATT
TTCATTCTGTAAATGTGCCTCAAACCCACCAAGCATCCCCAAATCTAAGTCAGGAACCTCAAGGTTCAAGCGC
ATTTTTTGAGAACTTGAATATGATAAAGAAAGAGAATTGCCAACAGCTTCCACACCAGCCGAACAATCCAAG
ACCTATATCAAGGCCCTATCCAGCCGAATTTATCATGGTAAAACACCATCCAATGCCGCAAAAGATGATTCAA
CAACCTCCAAGGGCTGCGATTCCAAAGAAGAAAATGCCGTTCAAGCTTACACCGAATTGTCTACCATTTTT
TACATTGTACAGAACGACTACAGAACTCCCTCAGCTAAAAGTCAAGATATAACTGAAATCACCAAACCTA
ATTCGACAATTAAGGCAATTCCAGATACCACTGTATACTGTGCTTTACAGGGGTTGTATCTTCAATGCATT
ATAAGCTTGATGAGGTTCTCTGGGAATTCGATAGTTTCAAACCTGCTGTGACTCTAGCTGAAGGAGAAGGGTC
AGGTGCCTTATTACTACTACAAAATATAAGGTCAGAACAATCTTTTTTAACACTTTAGCTACAGAGCATAGC
ATCGAGGCAGAAATAGTTTCTGGGACAACCACACCTCGAATGCTCCTTCTGTAATGGCCAAACTTCATGATG
ATCAAATAAATGTAATATTAACAATTTCTGCTAGCCAGGTTACTGATATCACTAACCTGCATGGTTCACTGA
CCAGAAATCTAGAATCCCCACACAAGTTGAGATTATGACTATGGATGCTGAAACGACAGAAAATATTAATCGG
TCAAATATATGAGGCTATTCAGCAATTAATTGTTTTACACATTGATACAAGGGTGTAAAGATTGTTATTA
TAAAGGTTTTTTTTAAGTGATATTGAAGGTCTCCTGTGGCTTAATGACCATCTTGCCCTTTTATTCGGATCCGG
CTATTTAATTAACCTATTACTTTCGAGTCCAAAGTCAAGCGAATGGTACTTATGTCTTTCAAATTTCTTTCA
GCCTCTCGACGACGGCTCATCAGGGTCATGCTACCTGTATGCAAGTCATCCAACAGCGCTACGACTCCAAG
TTCAAAGGAGTTTACTACTGGCTTAGCCATTTAGTGCAATATGCTGATATTAATTTGCACCTGAGTTATGTTAA
TTTGGGTTTTCCCTTCAATTGGAAAAGGTTCTTTACCATCGATATAACCTAGTTGATTACGGAAGGGTCCACTG
GTCTCGATCCTTTACCATTTAACACACTTGCAAGCAGAGATTAGAGAATTAGTGTGTGACTATAATCAGCAAC
GACAAAGTCGAACCCAAACATACCACTTCATCAAACGACAAAGGGCCGGATTACAAAATTAGTCAATGACTA
CCTTAAATTTTTATCTCGTAGTGCAAGCACTGAAGCATAATTGTCTTTGGCAGGAAGAACTCAGAACACTTCT
GACTTAATCAATGTTTGAATCGATTTTACCATATAAGGGACTGCTCATGTGAAGATCGATTTTTAATTCAAA
CTCTTTACTTAACCCGTATGCAAGACTCAGAAGCAAAATTAATGGAGAGATTAACCGGGTTTTCTAGGATTGTA
TCCTAATGGTATTAACGCTTAAAGATCCCCTTAGAGGCATCGCAATATGACTCCAACATTAATGATATTGCT
GTCAATACATCTACCTGACCGAGAGCAAGGTTTATTATAAAAAACCTATACACATGACTGCAATGCGTAATTT
ATACCGAAACACAGTGAGGGCTGCACATGCAGGTTCTGTGAGCTTTAAAAGATCATGCAATATAAAATGAT
ATTTGTATACTAATCATGTTAGTACTAATAACAGTACTCACTGCATATACTCTATCAATTAAGAAAAATTAC
TGTGGTTTTATGCATTTAAATGACATCACAGATGGATATAATATAGTTAATTTCTTACCTAAATGTTGAGTTATA
GTAATTTGAAGTTATAATTTATGATTAGTGTCTATACTATAAATAATAGCTATACCAAGTATACACAAGAAGTT
ATGATTTTGTATTCAAATTTATTTACAGGAACCTTGTGATTAATAATAAAAGTCTCAGTTGTTGGTTGTTGAG
TTGTAAAACCTCCCGTTAAAATTTATTTTCCACTTATAACTAATAATAATCATAGATCAGTATGAGTTGAGGC
TATTCAAACCTTAGAAAAATTGTGCGATGTTTTTACCATGTCAATCTTGATTTCAATGATATTGGAGGGCTT
GTCGATAAATTCAGTAATTAACATTAAGTCAAGTGTGGAACCTCATTGGATATTTGATCGTACACAAAATATCT
TTACAAAATTTGTTTTCTTTTTTTGTGTGTCCA, (SEQ ID. NO: 5).

SEQ. ID. NO: 6

CGGACACACAAAAGAAAAAGGTTTTTTTTAAGATTTTTTTGTGTGCGAGTAACTATGAGGAAGATTAACAGTTT
TCCTCAGTTTAAAGGTATACACTGAAATTTGAGATTGAGATTCTCCTCTTTGCTATTCTGTAACCTTCCCTGGTT
GTGACAATTTGAATCAGTTTTATCTATTACCAATTAACATCAACATGGTATGTCTAGTGATCTTGGACTCTTC
TTCATCTGGTTTTTCTTAGAGCTCTGAATCTATTTTGTGAGAAGTTTCATCCAACGACCCAGTGTCTGAAAAT

ACAAGAGGTTCCCTTTCCGTC AAGTTAAGGGTGTGTTTTGATTGTGTGTAGATTTTATAATCCTAGAGTGC
 CAAGGAGTTGCGTGTGCATCATTAATTGGGAAGATCAAGGAAACAATTTGTTCCAATAATATCGTACATCTTGA
 CTAAGTCTGAACAAGGGGAAGTCGATATGGATCGTGGGACCAGAAGAATCTGGGTGTGCGAAAAATCAAGGTGAT
 ACTGATTTAGATTATCATAAAAATTTTGACAGCTGGCCTTACTGTTCAACAGGGAATTGTGAGGCAGAAAAATA
 TTTCTGTATATCTTGTGATAACTTGGAGGCTATGTGTCAATTGGTAATACAAGCCTTTGAGGCCGGAATTGA
 TTTCCAAGAAAATGCCGACAGCTTCCCTTCTGATGCTTTGCCTACATCATGCTTACCAAGGTGACTATAAATG
 TTCTTGGAGAGCAATGCTGTACAGTATTTGGAAGGTCATGGATTCAAATTTGAGCTCCGGAAGAAGGACGGTG
 TCAATCGGCTCGAGGAATTGCTTCTGCTGCAACGAGTGGAAAAACATCAGGCGTACGTTGGCCGCACTGCC
 TGAAGAGGAGACTACAGAAGCAAATGCAGGGCAATTTCTCTCATTTGCGAGTTTGTCTTCCCAAACCTGGTT
 GTGGGAGAGAAGGCTTGTCTGGAAAAAGTCCAGCGACAAATTCAGGTTTATGCAGAACAGGGTTTAATTC AAT
 ATCCCACTGCATGGCAATCAGTTGGACACATGATGGTAATCTTCAGATTGATGAGGACTAATTTCTTGATTAA
 ATATTTACTGATCCACCAGGGTATGCATATGGTAGCTGGCCACGATGCCAATGATGCTGTCAATTGCTAATTC A
 GTTGCTCAGGCTCGCTTTTTCAGGACTCCTAATTTGTCAAACCGTTCTTGATCATATTTCTGCAGAAAAACCGACC
 AAGGAGTAAGACTTCAACCTTTGGCCGGAACAGCCAAAGTGCCTAATGAGGTTAATGCATTTAAGGCCGCCCT
 AAGCTCACTTGTAAAGCATGGGGAATATGCCCTTTTGTGCGCTTCTCAATCTCTCGGGAGTTAAACAACCTA
 GAACATGGTCTCTACCCACAGTTATCAGCAATGCTCTTGGAGTTGCCACAGCACATGGTAGCACCCCTTGCAG
 GAGTTAATGTTGGTGAGCAGTATCAGCAGCTTAGAGAGGCTGCCACTGAAGCTGAGAAGCAACTCCAACAATA
 TGCTGAGTCCAGAGAACTCGACAGCTTAGCCTAGACGATCAGGAAAGAAGAATACTAATGAACCTTCCATCAG
 AAGAAAATGAAATAGTTTCCAGCAGACCAATGCAATGGTAAACCTTAGGAAAGAGCGCACTGGCCAAATTA
 CAGAAGCTATAACGCTGGCCTCAAGACCTAACCTCGGGTCTAGACAAGACGACGACAATGAAATACCGTTCC
 TGGGCTATAAGCAACAACCCAGACCAAGATCATCTGGAGGATGATCCTAGAGACTCCAGAGACACTTCAAT
 CCTAATAGTGCAATTGACCCCGAGGATGGTGATTTTGA AAAATTACAATGGCTATCATGATGATGAAGTTGGGA
 CGGCAGGTGACTTGGTCTTGTTCGATCTTGACGATCATGAGGATGACAATAAAGCTTTTGTAGCTACAGGACAG
 CTCACCACAATCCCAAAGGGAAATAGAGAGAGAAAGATTAATTCATCCACCCCGAGGCAACAACAAGGACGAC
 AATCGGGCCTCAGACAACAATCAACAATCAGCAGATTTCTGAGGAACAAGAAGGTCAATACAACAGGCACCGAG
 GCCCAGAACGTACGACCGCAATCGAAGACTCTCACCAGTGCACGAAGAGGACACCCCTATAGATCAAGGCGA
 TGATGATCCCTCAAGCCCACCTCCGCTGGAATCTGATGATGACGATGCATCAAGTAGCCAACAAGATCCCGAT
 TATACAGCTGTTGCCCTCCTGCTCCTGTATACCGCAGTGCAGAAGCCCACGAGCCTCCCCACAAATCCTCGA
 ACGAGCCAGCTGAAACATCACAATTGAATGAAGACCTGATATCGGTCAATCAAAGTCTATGCAAAAATTAGA
 AGAGACATATCACCATCTGCTGAGAACTCAAGGTCCATTTGAAGCTATCAATTATTATCACATGATGAAGGAT
 GAGCCGGTAATATTTAGCACTGATGATGGGAAGGAATACACCTACCCGGATTCACTTGAGGAAGCCTATCCTC
 CATGGCTCACCGAGAAAGAACGACTGGACAATGAAAATCGATACATTTACATAAATAATCAACAGTTCTTCTG
 GCCTGTGCATGAGTCCCAGAGACAAAATTTCTTGCAATCTTGCAGCACCATCAGTAACCACAGCACAAAGCGCGG
 TCCACTTCGTAAGCTAAAATACACTTAAAGCTTGACCGATTCACTACAAAACTAATCCATTATAACTTATT
 AGTGCTACTTTTTCTATAAGTGATTTCTCAATCTAAGGCCATTAAGAGTTAAGCAATATACATATACACTTACA
 CCGGTCTATCCAAGATGTGGCTCAATGTTCTTAATTTGAACATAGTCATAAGGGGATAAATAACTTTATAT
 TTCTGATTGTGGATTGACCCATTTCTGCTTAAAATGCTTCCGCCATTA AAAATGTGATCTAATAGATAGCCCTG
 ACTAGACCAATTAAGAAAAACATTTGATGAAGATTA AAACCTTCACTAGGACCATTGTTAAGAGGTGCATAGGCATT
 ACCATCCTTGAGAACATGTATAATAATAAAATGAAGATATGTTTCAGGCCAGAAACAACATGGATGGATTTCTG
 AGCAACTAATGACAGGTAAGATTCAGTAACGTATATATTTCAATGATATTGATAACAAGCCAGATCAAATGGA
 AGTCCGGCTCAAACCATCATCAAGGAGCTCAACCAGAAC TTGTACAAGTAGCAGTCAGACGGAGGTCAACTAT
 GTACCTCTCCTTAAAAAGGTTGAGGATACATTAACTATGCTAGTGAGTGCAACCAGTCGTCAGAATGCTGCAA
 TCGAGGCCCTTGAAAACCGCCTCAGCACACTTGAGAGTAGCTTAAAGCCAATCCAAGACATGGGTAAAGTGAT
 TTCATCATTGAATCGCAGTTGTGCCGAAAATGGTGGCAAAATATGATCTTCTAGTTATGACAACCTGGACGGGCT
 ACTTCAACCGCAGCTGCAGTAGATGCGTACTGGAAAGAGCACAAACAGCCACCACCAGGGCCAGCGTTGTATG
 AAGAGAATGCGCTTAAAGGAAAAATCGATGATCCAAACAGCTATGTACCAGATGCTGTGCAGGAGGCTTACAA
 GAACCTTGACAGTACATCGACCCTGACCGAGGAAAATTTGGGAAACCTTATATATCTGCTAAAGATCTGAAG
 GAGATCATGTATGATCATCTACCTGGTTTTGGGACTGCCTTTACCAACTTGTTCAGTGATTTGTAAAATAG
 GAAAGGATAACAACCTCTTGACACAATCCATGCTGAGTTCCAGGCAAGTCTAGCAGATGGTGACTCTCCCCA
 ATGTGCACTCATAACAGATAACCAAAAAGAGTCCCAATCTTTTCAGGATGTGCCGCCCCGACAATCCACATTAGA
 TCCCGTGGTGATATCCACGAGCATGCCAAAAGAGTCTCCGACCAGCACCACCATCACCCAAAATTGATCGTG
 GTTGGGTTTTGTTTGTAAAGATGCAAGATGGTAAAACGCTTGGACTTAAAGATCTAAGGATCAAGATTTATTTA
 ACAAGGCAAGCCACAACCTTAGATAGAACCCTCAGCCAGACTATTGAACTATTGACGCTGTTGATGATAATATA
 TAATTAATGGTCATATTTGAATATGACAACATCTTGTCTTGTGTTTTGCCTTGTATCTCTTTGAGTTGGAAGA
 TCATTCCAAACTTACAAAATGCACAAGATGTTATGGTTTAGCAAAGAATTGATAGGAGTACTGGTATATAAT
 GTAAATATAACAAGTGATGAAGATTAAGAAAAACAGTCCGATTTTCCAGACTTGGCATTTCTTATCTTCAT
 CTTCTAAAGTGAGATATTTATCATCAAAAATGAGACGCGGAGTGTTACCAACGGCTCCTCCAGCATATAAT

GATATTGCATACTCTATGAGCATACTCCCAACCCGACCAAGTGT CATAGTCAATGAGACCAAATCAGATGTAC
TGGCAGTGCCAGGAGCAGATGTTCCATCAAACCTCCATGAGACCAGTGGCTGATGATAACATTGATCACTCAAG
CCATACTCCAAGCGGAGTAGCTTCTGCCCTTTATATTGGAAGCTAAAGTGAATGTAATTTTCGGAACAAAAGTC
CTGATGAAGCAAATACCTATTTGGCTTCCACTGGGTGTAGCTGATCAGAAGATATACAGCTTTGATTCAACAA
CAGCCGCAATTATGTTGGCTTCTACACAGTGACACACTTCGGGAAGATATCTAACCCGCTGGTACGTGTCAA
CAGGCTAGGCCCAGGAATACCCGATCATCCGCTACGACTCCTAAGGTTGGGCAATCAGGCATTCCCTCAAGAG
TTTGTCTTCCACCAGTCCAGCTTCCCAGTATTTACATTTGATCTAACAGCTCTAAAGCTCATCACTCAAC
CATTGCCAGCTGCAACCTGGACAGACGAACTCCAGCAGGAGCAGTCAATGCTCTTTCGTCTGGGCTCTCACT
CCATCCCAAGCTTCGTCCAATTCTTCTACCGGGGAAGATAGGAAAGAAAGGTCATGCTTCAGACTTAACATCA
CCTGACAAAATTCAAAACATCATGAATGCAATACCGGACCTCAAATTTGTCCCGATTGATCCAATCAAGAACA
TAGTTGGAATTGAGGTTCCAGAATTA TAGTTCAAAGGCTGACCGGCAAAAAACCACAACCCAAAAATGGCCA
ACCAATTATTCCAGTTCCTTCTCCGAAATATGTTGGACTTGATCCTATATCGCCAGGGGACTTAACTATGGTT
ATCACCCAGGATTGTGATTTCATGCCACTCTCCAGCCAGCCATCCGTATCACATGGACAAGCAGGATAGTTACC
AATAATTTAAATTCATTTCGAGCTATTTATCTGTCTAGTAATTCGACGGGATCAATAGACTAAAAATCTGATT
GTATAGAATTATAAAAAGAAATCAAGCAGAGGCAACAGACTCACAGCTTACGCCTAGATGACTAATATTAAGGAG
TTTTTTAATCTAATTTTCCAGTCTTAAGTAATAATCATTTCTTTTGTAAATTAATTATGCATTTGTTAACTTAT
CGGTGCGAGATTTCTTGAGAACCCGGCGGGCTTCTACTATCTGTAGTAACCAGAAGAGAAGTTCAACCCAG
TCAAACTAAACCAAGCAATATCTGAATGCTCTATAGTCTATTCTAATCAGAGGTATAACAATGGCTAAGAT
TTCATGACTCGTTAAACAATCGCTAGTAATTTTAACTCCAGATTAAGAAAAAGATATACGATGAAGATTAAG
GCGACAACGAGTCGAAACTTCATCTCTTTTAAAGATCTAACATTATCTGTTCCAAAGTCATACAAGACACAT
TCAAATCAGGGATTGTAAGCTGCTATTTCTTACCTCCCAAATCACCTATACAACATGGGGTCAGGATATCAA
CTTCTCCAATTGCCTCGGGAACGTTTTTCGTAAAACCTTCGTTCTTAGTATGGGTAATCATCCTCTTCCAGCGAG
CAATCTCCATGCCGCTTGGTATAGTGACAAATAGCACTCTCAAAGCAACAGAAATTGATCAATTGGTTTTGTGCG
GGACAACTGTCATCAACCAGTCAGCTCAAGTCTGTGGGGCTGAATCTGGAAGGAAATGGAATTGCAACCGAT
GTCCCATCAGCAACAAAACGCTGGGGATTCCGTTCCAGGTGTGCCTCCCAAGGTGGTCAGCTATGAAGCCGGAG
AATGGGCAGAAAATTGCTACAATCTGGAGATCAAAAAGTCAGACGGAAGTGAGTGCCTCCCTCTCCCTCCCGA
CGGTGTACGGGATTCCCTAGATGTGCTATGTCCACAAAGTTC AAGGAACAGGTCTTGTCCCGGTGACTTA
GCTTTCCATAAAAATGGGGCTTTTTTCTTGTATGATAGATTGGCCTCAACTGTCATCTACCGTGGGACAACCTT
TTGCTGAAGGTGTCATAGCTTTTTTAATCTGTCTAGAGCCCAAGAAGCATTTTTTGGAAAGGCTACACCAGCTCA
TGAACCGGTGAACACAACAGATGATTCACAAGCTACTACATGACCCTGACACTCAGCTACGAGATGTCAAAT
TTTGGAGGCGAGGAAAGTAACACCCTTTTTTAAGGTAGACAACCACACATATGTGCAACTAGATCGTCCACACA
CTCCGCAGTTCCTTGTTCAGCTCAATGAAACACTTCGAAGAAATAATCGCCTTAGCAACAGTACAGGGGAGATT
GACTTGGACATTGGATCCCAAAAATTGAACCAGATGTTGGTGAGTGGGCCTTCTGGGAAAATAAAAAAATTTT
CCCAACAACCTTCATGGAGAAAACCTTGCAATTTCAAATTTCTATCAACCCACACCAACAACCTCCTCAGATCAGAG
CCCGGCGGGAACCTGTCCAAGGAAAAATTAGCTACCACCCACCCACCAACAACCTCCGAGCTGGTTCCAACGGAT
TCCCCTCCAGTGGTTTTAGTGTCTACTGCAGGACGGACAGAGGAAATGTCGACCCAAGGTCTAACTAACGGAG
AGACAATCACAGGTTTACC CGGAACCAATGACAACCACCAATTGCCCAAGTCCAACCATGACAAGCGAGGT
TGATAACAATGTACCAAGTGAACAACCGAACAACACAGCATCCATTGAAGACTCCCCCCCCCGGCAAGCAAC
GAGACAATGACCACCTCCGAAATGAATTCGATCCAAGGCTGCAACAACCTCCGCCAGAGCCACAGACCAAGG
CCACGCCAGCGCCACAGCATCCCCGATGACCCTGGACCCGCAAGAGACGGCCAACAGCAGCAACACAGCAAC
CAGCCCAGGAAAGCCAGCCGAAAGTCAAGCCGGACTCACTATAAATACAATAAGTAAGGTAGCTGATTCA
CTGAGTCCCACCAGGAAAACAAAAGCGATCGGTTTCGACAAAACACCGCTAATAAATGTAACCCAGATCTTCACT
ATTGGACAGCTGTTGATGAGGGGGCAGCAGTAGGATTGGCATGGATTCCATATTTTGGACCTGCAGCAGAAGG
CATCTACATTGAGGGTGTAATGCATAATCAGAATGGGCTTATTTGCGGGCTACGTGAGCTAGCCAATGAAACT
ACCCAGGCTCTTCAATTATTTCTGCGGGCCACAACAGAACTGAGGACTTACTCACTTCTTAAACAGAAAAGCTA
TTGATTTTCTTCTTCAACGATGGGGAGGTACCTGTGCAATCCTAGGACCATCTTGTGTCATTGAGCCACATGA
TTGGACAAAATAATTACTGATGAAATTAACCAATTAACATGACTTTATTGACAATCCCCTACCAGACCAC
GGAGATGATCTTAATCTATGGACAGGTTGGAGACAATGGATCCCGGCTGGAATTGGGATTATTGGAGTTATAA
TTGCTATAATAGCCCTACTTTGTATATGTAAGATTTTGTGTTGATTTATTCTGAGATCTGAGAGAAAAAATC
TCAGGGTTACTCTAAGGAGAAAATATTTATTTTAAATTTACTTTAAATGCTGACCATTATCTTAAATGAGCAA
TTAATAATATGTTTTCTGCTCTTTTGCTTGATTTACAATATGATATTTCTCTTAATAATGATTAATATATTA
AGAAAACTTATGACGAAGATTAAAGGGGAGGATCGTTAACGGGAAAATCTCCCATCTCGTTCGTGCAAGCCA
CGTTGGTGGTGTCTGTCAGCTGAGAACAACCTCCAGAGATTGTAGGTAGAAAGGACCAGCATTTATAGGTAGGGG
TCAGAAAGCAACAATAGCCATAAAAAGGAGAGCTGACATTGCTATTTAATATCCTAGAACCTGATTTCTAGGT
TCTAGTTGTACAATCCGGATGATGGAGCATTCAAGAGAACGGGGTAGATCTAGCAACATGCGACATAATAGCC
GGGAACCATACGAAAATCCATCAAGGTCTCGCTCATTATCTCGGGACCCTAATCAGGTTGATCGTAGGCAGCC
TCGAAGTGCATCCCAAATTCGTGTTCCGAATCTGTTCCATCGGAAAAAGACTGATGCACTCATAGTTCTCCG
GCTCCCAAGATATATGCCAACACTCAAAAAGGATTCTCTGCGATAGTAAATTTTGCAAAAAGATCACC

AATTGGATAGCTTAAATGATCATGAATTACTACTGCTAATTGCAAGAAGAACATGTGGAATTATCGAGAGCAA
TTCGCAGATTACATCCCCAAAAGATATGCGGTTAGCGAATCCAACAGCTGAAGACTTCTCACAAGGTAATAGT
CCTAAATTAACACTTGCAGTCCCTTCTTCAAATTTGCTGAACATTTGGGCAACCAGAGACCTAAGGCAAATTTGAGG
ACTCTAAACTTAGAGCTCTTTTAAACCCTTTGTGCCGTATTAACAAGGAAATTTTCTAAATCCCAACTGGGTCT
TCTATGTGAGACCCACCTACGGCATGAGGGCCTCGGACAGGACCAAGCTGATTCTGTATTAGAGGTCTACCAA
AGACTCCACAGTGATAAAGGAGGGAATTTTGAGGCTGCCCTGTGGCAACAATGGGACCGACAGTTCGTTAATAA
TGTTTCATCTCTGCTTTTCTCAACATTTGCTCTCCAGACACCTTGTGAAAGTTCTAGTGTGCTAGTCTCAGGTCT
TGCCACATTTGATCCAGCACAAGACAATTTCTACACCATCCGAGGCAACTAATGATACCACCTGGTCAAGTACA
GTTGAATAGAAAACCACTGGAGCTATTTTTCCACGATTGCTCTCAGTCAATAAATTAATATAGATATAATACG
ACTTCGGTGTGCAATTTGTCAAGGGTCCATTTGGTAATAATGATTCTTAAAACAATCTACTATCGTAATTTATC
GATGGATCTACCCTATTTGACGGTACATGACTTGAATGTAATAAGGTAAGTTGGTATCTGAGGTATTTTGTCT
AGAGTATACTCAAAATCGTATGTCTAGCAAATTTATCAATAGCAAAGTTAAATTTCTCCTAACCTCATATTTTGA
TCAAGTAATCATGATTTTATGGTAATTTCTTTGCAGATTATCGGTTTAAATCTTTTATTAAGAAAAAATCATGATT
GTAGACAATTTACTGGTAGTCCCTGGGTATCCAAGTTTATGAACAGAGCTAGAGAGAATTTGCTACTTCCGAG
GTATAACTTTTATTATTTGCTACTTCGAATGCCATAAACAGTAATGCAGGATGAAGATTAATTTGCGGAGGAAT
CAGGAATTTCAACTTTAGTTCCCTAAGGCCTCGTCTGAATCTTCATCAGTTAGTAAGTTCTTTTATAGAAGTCA
TTAGCTTCTAAGGTGATTATATTTTAGTATTAATTTTGTAAATTTGCTTGTATAAAGTTGAAGTGTCTAATG
CTTAAATGAACATTTCTTTGAAGCTGACATACGAATACATCATATCATATGAAAACATCGCAATTTAGAGCGTC
CTTGAAGTCTGGCATTGACAGTCAACAGGCTGTTCTCAGTAGTCTGTCTTGGAAAGCTTTGGGAGACACAAGA
AGAGTCCCAGAGAGTCCCAACAGGTTGGCATAAGGTCAATTAACACCAGCATAGTCACTCGATCAAGACTGT
AAGCGAGTCGATTGCAACTAAAAAGATTTATTTCTTGTGTGTTTAAACAAATTCCTTTTGTGTGAGACACCCTCA
AGGCACAAGATGGCTAAAGCCACAGGCCGATACAATCTCGTGCCCCCAAAGAAAGATATGGAAGGGGAGTGA
TTTTTAGTGATCTTTGTAATTTCTTGATTACTCAAACCCTGCAAGGTTGGAAGGTTTATTGGGCAGGAATTTGA
GTTTTGATGTAAGTCAAAAAGGCATGGCTCTTCTGACAAGACTCAAAACAAATGACTTTGCTCCTGCCTGGGCG
ATGACAAGAAATCTCTTCCACATCTGTTCCAAAACCCAAATTCGGTTATTCAATCTCCCATCTGGGCTTTGA
GGGTAATTTTGGCAGCCGGATTGCAGGATCAGTTGTTAGACCATTCAATGGTTGAGCCATTGACAGGGGCTCT
CGGTCTAATTTCTGATTGGCTCCTAACTACAACGTCAACACATTTCAATCTTCGACTAGAAGCGTAAAGGAC
CAGCTTAGTTTTCTGATGTTATCTTTGATCAGGTCAAACATCTTGCAGTTTCAACAAGCTTGCAGCCCTGC
ATGTTGTCAATTACAATGGTTTACTCAGTAGTATTGAGATCGGGACTTCTACACACACAATCATTATAACTCG
TACAAATATGGGTTTTCTCGTGAAGTTCAGGAGCCTGACAAATCAGCTATGAATTTAAGCGCCAGGACCA
GTCAAGTTCTCATTACTTTCATGAGTCTGCCTCAAACCTTTCACTCGTGTTCCACAATCTGGGATGCAATCAT
TAATAATGGAGTTCAACAGTTTGTGGCAATTTAACAAGGTGATCTTAAATAAGTACATGAATGAGAATTAG
TTGTGGGTCTTACCTAGCATTGTTGAGTTAGCTATCTAATCTATTTTCACTAATTTGCATTGAGCACTGCTAGT
AGGTTTGCACCACGTTAAAGATTCAGAGTGTATGAATTTGTGCAGATTTAAACTTTGGGTTTTGCCTTATGCTTC
ATAGGTGGTCTTTTTTAAATGGAGATTATCAGCATTCTTCAATGGGAGGAGTTAGCAATCAGAAATTTGGAGA
TAAATGGACATCGGGATAGAACAATGCCTAACATTTGGGCGGCTTTCATTTTTAAATGTGTATATAACCAATC
TTTTCTATCTTTGCTTATATGGTGTAACTTTACTTTAATAACATGTCAATGCTATACTGTTAAGAGAAGGT
CTGAGGAAGATTAAGAAAAAGGTCTCGTGTTCACTTGGTTGCCGTCAAGTATCCTGTGGTTTTTTTCTACCTA
ACTTCTCTATGCCATATGGCTACCCAGCATACCCAGTACCCGGATGCACGTTTATCTTACCTATAGTCCCTGG
ATCAATGTGATTTGGTAACTCGAGCATGTGGTTATATTTCACTTATTCTCTAATCTCAAGTCAAGGCAATG
TAAATTACCAAAAACATATATCGACTTAAGTTTCGACACAATAGTATCCAAATTCCTAAGTATACACCTGTA
GCAACACTGCCGATAGACTATTTAGTACCAATTTCTCCGCTTCCCTAACGGGGCACGGTGATAGCCGTTGA
CCCCGACTTGTAATCAATTCCTTGATGGAATTTAATTTACTCTTTCATGATGCAGCCTTTCTTGATTACTA
TCTCAAGGCAACAGGTGCACAGGACCATTTGACAAACATTACAACCTAGAGAGAAGCTTAAAAACGAAATTTCTA
AACAATGATTATGTCCATCAATTTGTTCTTCTGGCATGACCTGTCTATTTTGGCTCGACGTGGGCGTCTGAATC
GCGGGAACAACCGTTCAACCTGGTTTGTTCATGATGAATTCATTGATATTTTAGGATATGGCGATTATATTTT
TTGGAAAATACCTTTATCATTATTACCAGTTACTATAGACGGGGTCCACACGCGGCAACTGACTGGTATCAA
CCGACTCTTTTTAAAGAATCCATCCTAGGGCACAGCCAAATCCTATCTGTGTGACAGCTGAAATACTAATTA
TGTGTAAAGATATTATCACCTGTAGGTTTAAATACATCACTGATTGCATCCATTGCAAAATTTAGAGGATGTAGA
TGTGTCTGATTATCCTGACCCGAGTGATATTTCTAAGATATACAATGCTGGAGACTATGTAATATCTATTTCTT
GGCTCAGAAGGTTATAAGATAATAAAGTACCTTGAACCACCTTGTGTTGGCCAAAATCCAACCTTTGCTCTAAAT
TCACAGAAAAGAAAAGGTGCTTTCTCACACAGATGCATTTATCAGTAATAAATGATCTTCGGGAGTTGATTTC
TAACCGCAGGTTAAAGGACTATCAGCAAGAGAAGATTAGGGATTTTCAAAAATATTATTACAATTTGCAATTA
TCTCCTCAACAGTTTTGTGAATTTATCTCTGTTCAAAAACATTTGGGGCATCCAATTTTACATAGTGAGAAAAG
CTATACAAAAGTAAAACGGCATGCAACCATCCTTAAAGGCTCTCAGACCTAATGTCATTTTTGAGACATATTG
TGTATTCAAGTACAATATTGCCAAGCACTATTTTCGACAGCCAAGGAACCTTGGTACAGTGAATCTCAGACAGG
AATTTAACTCCAGGACTCAACTCCTTCATAAAAACGTAATCACTTTCCTTCACTACCCATGATTAAGGATCTTC
TATGGGAATTTCTATCATCTTAATCACCTCCGTTATTTCTCTACAAAGGTGATTAGTGACTTAAGTATTTTCAT

CAAGGATAGGGCCACAGCTGTTGAACAGACATGTTGGGATGCAGTCTTTGAACCCAATGTGCTAGGTTACAAT
 CCTCCAAAACAAATTTCTCCACTAAAAGGGTGCCGGAACAATTTCTAGAACAGGAGGATTTTTCAATCGAAAAGTG
 TCCTGAATTATGCACAGGAATTACATTTATTTATTACCACAGAATAGGAATTTTTCTTTTTCTTTAAAGAAAA
 AGAATTAATATTTGGACGAAACATTTGGTAAGCTACCATATCTCACACGGAATGTCCAAACTTTATGTGAGGCT
 CTGTTAGCAGATGGACTGGCTAAGGCCCTCCCCAGTAACATGATGGTAGTAAGTGAACGTGAACAAAAAGAGA
 GCCTTCTTCATCAGGCATCATGGCACCACACCAGTGATGATTTTGGAGAGAATGCTACC GTTTCGAGGGAGTAG
 TTTTGTAACTGATTTAGAGAAGTACAATCTTGCATTTTCGCTATGAGTTCACTGCACCATTTATTGAGTACTGC
 AACCATTGCTATGGTGTGCGTAATGTCTTTAATTGGATGCATTATTTAATCCCGCAGTGTACATGCATGTAA
 GTGATTATTATAATCCGCCTACAATGTTAATCTTAGCAATCGAGAATATCCTCCTGAAGGCCCGAGTTCGTA
 CCGAGGGCACTTAGGAGGCATAGAGGGATTACAACAAAACTGTGGACGAGTATATCCTGTGCACAAATCTCC
 TTAGTGGAAATTAATAACTGGTTTTAAGTTACGATCAGCGGTTCATGGGAGACAATCAGTGTATAACCGTATTGT
 CTGTTTTTCCACTTGAAAACAGACCCTGAAGAGCAGGAGCAAAGCGCCGAAGACAATGCTGCAAGAGTAGCAGC
 AAGTCTTGCAAAAAGTAACCAGTGCATGTGGGATCTTTCTTAAACCAGAAGAGACATTCGTACACTCAGGTTTC
 ATTTATTTTCGAAAAAAAACAATATCTCAATGGTGTACAATTACCAGCAATCACTCAAAACAGCAGCAAGAATGG
 CGCCACTCTCTGATGCTATATTCGATGATCTACAAGGAACACTTGCCAGTATTGGAAGTGCCTTCGAACGTGC
 TATATCGGAAACCGACATATCCTCCCATGTCGTATTGTAGCAGCTTTCCATACGTATTTCCGCCGTTTCGGATT
 TTACAATATCACCATCTTGGATTTAATAAAGGCATCGATTTAGGGCAGTTGTCACTTAGTAAACCATTAGACT
 ATGGGACTATTACTCTAACATTTGGCGGTTCCACAAGTCTTGGGGGATTGTCTTTCTAAATCCAGAAAAGTG
 TTTTTATCGAACTTTCCGAGATCTCTGTGACTTTCCAGCTTTCCAGCTACGGGTGTACCTAGAAAATGGTTAAC
 ATGAAAGACCTATTTTATCCATTAATATCGAAAAATCCAGGAAATTTAGTGCATTTGATTTTGTCTTAAATC
 CATCCGGATTAATGTTCCAGGATCACAAGACTTGACATCCTTTTTGCGACAGATCGTTAGGCGTAGTATTAC
 ACTAACTGCAAGAAATAAGTTAATTAACACTCTCTTCCATGCCTCTGCTGATTTGGAAGATGAGATGGTTTTGT
 AAATGGCTCCTTTTCATCAAAACCCTGTCAATGAGTGCCTTTGCAGCGGATATTTTTTCCAGGACACCTAGTGGTA
 AACGTCTCCAAATATTAGGTTATCTTGAAGGGACCAGGACTCTATTGGCCTCCAAAATCATAAAACAACAACAG
 TGAGACACCTGTACTTGATAAGCTGAGGAAGATCACCTACAAGATGGAATCTGTGGTTCAGTTATTTGGAC
 CATTGTGACCAATTACTAGCAGATGCTCTACAGAAAATTAGTTGCACAGTGGATTTGGCCCAGATTTTTCGCTG
 AGTATACATGGTCACACATCTTAGAGGGTAGACCATTGATCGGAGCGACATTACCATGTATGGTGGAGCAATT
 CAAAGTTAAGTGGCTAAGACAATATGAACCTTGTCCAGAATGCCTCAACAAAAAAGGCTCAAATGCTTATGTC
 TCAGTTGCAGTCAAAGATCAAGTGGTCAAGTGGTTCAGTGGCTTGGCCTAATACTTCTCGAATAAGTTGGACAATAGGGAGTG
 GTGTCCCTATATAGGGTCAAGAACCAGGATAAAATCGGACAGCCTGCAATCAAGCCGCGATGCCCTTCATC
 TGCCCTCAAGGAGGCTATAGAATTAGCATCAAGGCTCACTTGGGTTACACAAGGAAGTTCTAATAGTGAACAA
 TTAATCCGGCCTTTCTTAGAAGCGAGAGTCAACCTTAGTGTCAAGTGAAGTCTGCAAATGACACCATCACATT
 ATTCAGGAAATATTGTCCATCGATATAACGACCAATATAGCCCGCACTCATTTATGGCGAATCGCATGAGCAA
 TACTGCGACCCGTCTCATAGTGTCAACTAATACACTTGGAGAATTTTTCAGGTGGAGGGCAGGCCGCCAGGGAT
 AGCAATATAATTTTTCCAGAATGTTATAAAATTTAGCAGTTGCCCTTTATGATATTAGATTCCGGAATACGAACA
 CCTCTGATATAAGGCATAATAGGGCTCATCTTCCACTGACAGAGTGTGTACTAAAGAGGTCCCGGCCAGTA
 TTTGACATATACAAGTGCACCTCAATCTGGATTTAAGCCGTTATCGTGATAATGAACATAATATGACTCAAAT
 CCACTGAGGGGAGGATTGAACTGCAATTTAACAATGGATAGTCTTTAGTGAAGGGTCTTAGGCTTAACATGA
 TTGAAGATGATCTTCTCCGCTTTCCACACCTTTCTGGATGGGAGTTAGCGAAAACGGTGTACAACTCCATCAT
 CTCAGACAATAGCAACTCATCAACAGATCCAATCAGTAGCGGAGAAAACACGCTCTTTTCAACTCATTTTCTC
 ACTTACCCTCAGATTGGCCTTCTTTACAGTTTCCGGGAGTATTATGCTTTTATCTAGGCAACTACTATCCTAT
 GGACTAAAAAAGTTGATTATGAACAGTTTCTATATTTTGCATAAACCAGCTGCACAACCTTACCTCATCGAGC
 ACTCCGTGTTTTTAAACCAACATTTAAGCATGCCAGTGTGATGTCCCGATTAATGGAATTTGATTCCAACCTTC
 TCAATTTATATTGGCGGGACATCTGGAGATCGAGGGCTGTCTGATGCTGCTCGACTGTTTCTTCGGACAGCAA
 TCGCGAGTTTTTTACAATTTCTTAAAAGCTGGATCATCGATCGCCAAAAGACAATTCCTTTATGGATAGTATA
 TCCGCTTGAAGGTCAACAGCCGGAAATCCATCAATGAATTTCTACATAAAAATTTTTGGTCTGCTCAAAACAAGGC
 CCCAAAAATATTCCAAAGGAGGTCAGCATTTCAAATGATGGACATTTGGATTTGGCAGAAAATAATTATGTTT
 ACAATAGTAAGAGCACTGCTAGTAATTTCTTCCATGCATCCTTAGCTTACTGGAGAAGTAGGAAATCTCGGAA
 AACTCAAGACCATAATGATTTCTCAAGAGGGGATGGAACACTTACAGAACCCGTGTGTAAGTTCTCAAGCAAT
 CATCAGTCAGATGAAAAGTACTACAATGTGACATGTGGAAAGTCAACGAAGCCGCAAGAACGCAAAAGACTTCT
 CGCAATACAGACTCAGCAATAACGGGCAAACAATGAGTAATCATCGTAAGAAAGGGAAGTTCCACAAGTGGAA
 TCCCTGCAAAGTGTAAATGGAGAGTCAAAGGGAACTGTTCTAAAAGAGGGTGACTACTTTCAAAAACAATACT
 CCACCAACAGATGATGATCAAGTCTCACCAGTCACTTCTACCATTTTTTAAATTTGGGAAATCACAACCATG
 CACATGATCAAGATGCCCAAGAATTGATAAATCAAAATATTAACAGTACCTACATCAGCTAAGGTCTATGTT
 GGACACCATAATATTGTAGATTACAGGGATTGTCTCATCCATGCATTACAAATTTGGACGAAGTTCTTCTA
 GAATACAATGGTTTTCGATTCAGCTATCACATTAGCTGAAGGTGAGGGGTGAGGGGCTCTATTACTTTTTGCAGA
 AATATAGTACAAGGTTATTTATTTTTGAACACATTTGGCAACAGAACACAGTATAGAGTCAGAAGTTGTATCAGG
 TTTTTCTACTCCGAGAATGTGTTACCAATAATGCAAAAGGTTTCATGAAGGACAAGTCACTGTTATCTTAAAT

ES 2 795 833 T3

AATTCAGCAAGTCAGATAACTGACATAACTAGCTCAATGTGGTTAAGTAATCAAAAATATAATCTACCTTGTC
AAGTTGAAATCATTACGATGGATGCTGAAACAACAGAGAAGTTAAACAGGTCCCAACTCTACCGAGCAGTATA
TAACCTAATACTTGATCACATTGATCCGCAGTATCTCAAGGTGGTGGTACTCAAAGTATTTCTGAGTGATATA
GAAGGAATATTATGGATTAATGATTACTTGGCTCCATTATTCGGGGCTGGTACTTGATTAAACCGATTACAT
CAAGTGCCCGGTCAAGTGAATGGTACCTTTGCTTATCAAATTTGATATCTACTAACAGGAGATCGGCCCATCA
GACTCACAAGGCATGTCTTGGTGTATCAGAGATGCTTTGCAAGCACAAGTCCAGCGAGGCGTGTACTGGTTG
AGTCACATCGCACAGTATGCTACAAAGAATCTCCATTGTGAATACATATGCCTTGGTTTCCCACCTCTAGAAA
AGGTCCTATATCACAGGTATAATCTAGTTGATACTGGACTCGGTCCATTGTCGTGAGTTATTAGACATTTAAC
TAACCTCCAGGCAGAGATACGAGACTTAGTATTAGATTATACCTTGATGAGAGAGAGTTCGCACTCAAACGTAC
CATTTTATTAAGACTGCAAAAGGCAGAATCACAAAGTTAGTCAATGACTTTCTGAAGTTTTCTTTAATTGTCC
AGGCACTCAAAAATAATTCTTCTTGGTATACTGAGCTTAAAAAATTACCTGAGGTGATTAATGTGTGTAATCG
ATTTTATCATACTCACAGTTGCGAATGTCAGGAAAAATTCTTTGTCCAGACGCTTTATTTACAACGCCTACGC
GATGCAGAAATCAAGCTAATTGAACGCCTTACCGGGTTAATGCGATTTTATCCAGAAGGGTTAATATATTCCA
ATCACACATAGGTACTAAATCATCATAGTATGAGGAATAAAAATAATGATAATTCCTGACGACAGTTTTAGTTC
CGATTCTAAGTATATCGGAAGAGAGTATGCCAATCTTAATTATTAAGGTAACAAGCTATTAGTTATTACTTA
TTGATAAGAATAAACTTTATCATAGCGTAACACATCATAACTTTATAGCGATTTTGCATTTCTAATCCTAGTA
TTTATTAGAATGTACTATCAGAGAAATGACCCAGTTCCTATCTTTAAATAATGATTGTGTGTATTAAATTAT
TAGTTTATTAGTTTATGAGTTGGTTACACAGTGAATATTAGTAATGAGGATTATGTAGATAGGTAATCTAA
CACTGAATCACCCATCTGATGTCACCATATCCAAATATTGTGCTAGTCGCATTTAAACATGCTATCTTCAGTT
AAGTAACATAGACTGAAAATGCTAAGAAGAGATTGGAGTAAAAGTATAAAATAAATTTAATTAACTTCAAAG
TGATTAATGATAATGATCTTGGGAAGTATGACCTCAAGTCAAAAATAATGTCAATATAATTGTTTGTAGT
AATATGAGTTATAATGTGAATTTTGTAACTAAGTCTTTAGTAGTTAAGATCAAATGCAAACATTCTAAGA
ATGTTAAGCGCACACAAAACATTATAAAAAACCAATTTTTTCTTTTTGTGTGTCC, (SEQ. ID. NO:
6) .

SEQ ID NO: 7
TCTCTCCNA (SEQ ID NO: 7)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende un vector de adenovirus 5 que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucoproteína (GP) de un virus del Ébola, en donde el vector de adenovirus 5 comprende una supresión en una región del gen E1 y una supresión en una región del gen E2b y en donde el virus del Ébola es el virus del Ébola de Zaire (EBOV), virus del Ébola de Sudán (SUDV), virus del Ébola del bosque de Tai (TAFV), virus del Ébola de Bundibugyo (BDBV), virus del Ébola de Reston (RESTV) o cualquier combinación de los mismos.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en donde el vector de adenovirus 5 comprende además una supresión en una región del gen E3, una región del gen E4 o cualquier combinación de las mismas.
3. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende además una citocina seleccionada del grupo que consiste en IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13.
- 15 4. La composición de la reivindicación 3, en donde la citocina es IL-7.
- 20 5. Una composición según cualquier reivindicación anterior para su uso en un método para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno del virus del Ébola en un sujeto en donde el método comprende administrar la composición al sujeto.
6. La composición para su uso según la reivindicación 5, en donde la administración se repite al menos una vez o al menos dos veces.
- 25 7. La composición para su uso según la reivindicación 5 o 6, en donde la administración comprende al menos $1,0 \times 10^{11}$, $1,5 \times 10^{11}$, $2,0 \times 10^{11}$, $2,5 \times 10^{11}$, $3,0 \times 10^{11}$, $3,5 \times 10^{11}$, $4,0 \times 10^{11}$, $4,5 \times 10^{11}$, $4,8 \times 10^{11}$, $4,9 \times 10^{11}$, $4,95 \times 10^{11}$ o $4,99 \times 10^{11}$ partículas víricas (PV).
- 30 8. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde, tras su administración, la composición es capaz de inducir una respuesta inmunitaria dirigida hacia células que expresan un antígeno del virus del Ébola de EBOV, en donde la respuesta inmunitaria comprende inmunidad mediada por células.
- 35 9. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde la respuesta inmunitaria contra el antígeno del virus del Ébola aumenta en al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 25 veces por encima de la basal.
- 40 10. La composición para su uso según la reivindicación 9, en donde la respuesta inmunitaria contra el antígeno del virus del Ébola se mide como una respuesta de anticuerpo específico de antígeno del virus del Ébola.
11. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en donde la administración comprende la administración subcutánea.
12. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en donde el sujeto comprende células que sobreexpresan el antígeno del virus del Ébola.
- 45 13. La composición para su uso según la reivindicación 12, en donde las células que sobreexpresan el antígeno del virus del Ébola sobreexpresan el antígeno del virus del Ébola al menos 2, 3, 4, 5, 10, 15 o 20 veces por encima de una expresión basal de un antígeno del virus del Ébola en una célula no infectada.
- 50 14. La composición para su uso según la reivindicación 12 o 13, en donde las células que sobreexpresan el antígeno del virus del Ébola comprenden células infectadas con Ébola, células sanguíneas, células epiteliales o cualquier combinación de las mismas.
15. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14, en donde el sujeto es un ser humano.

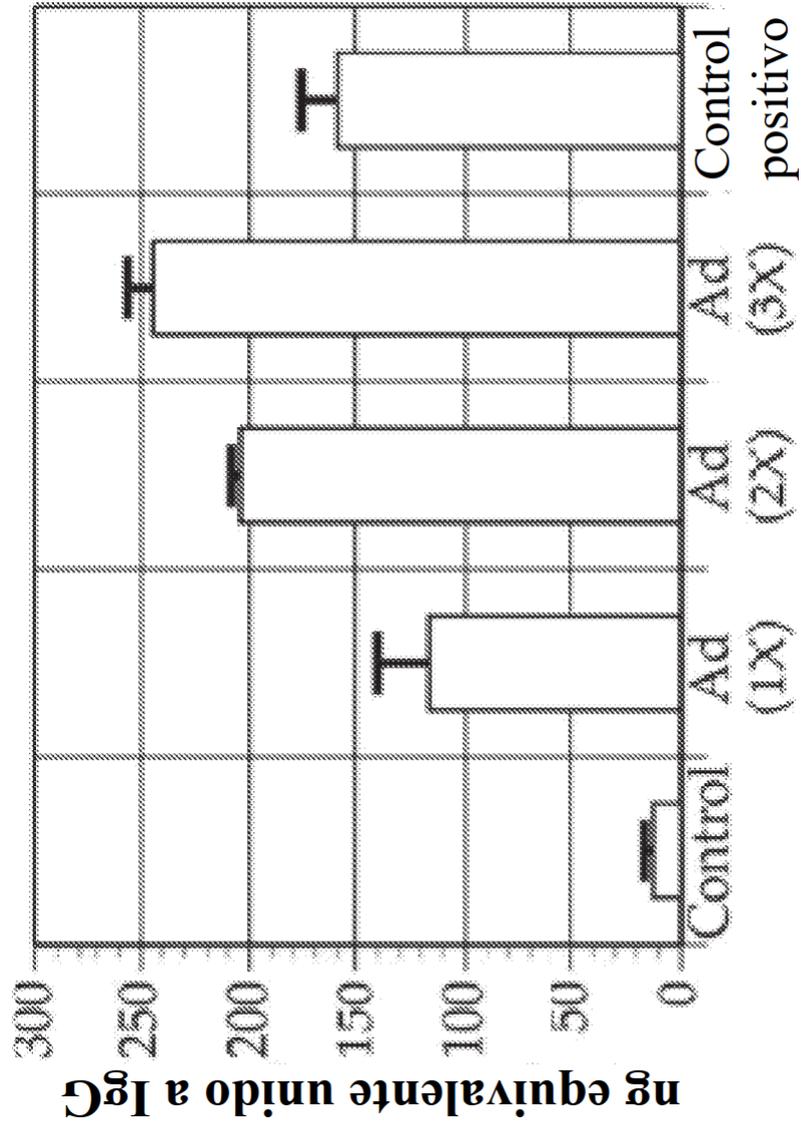


FIG. 1

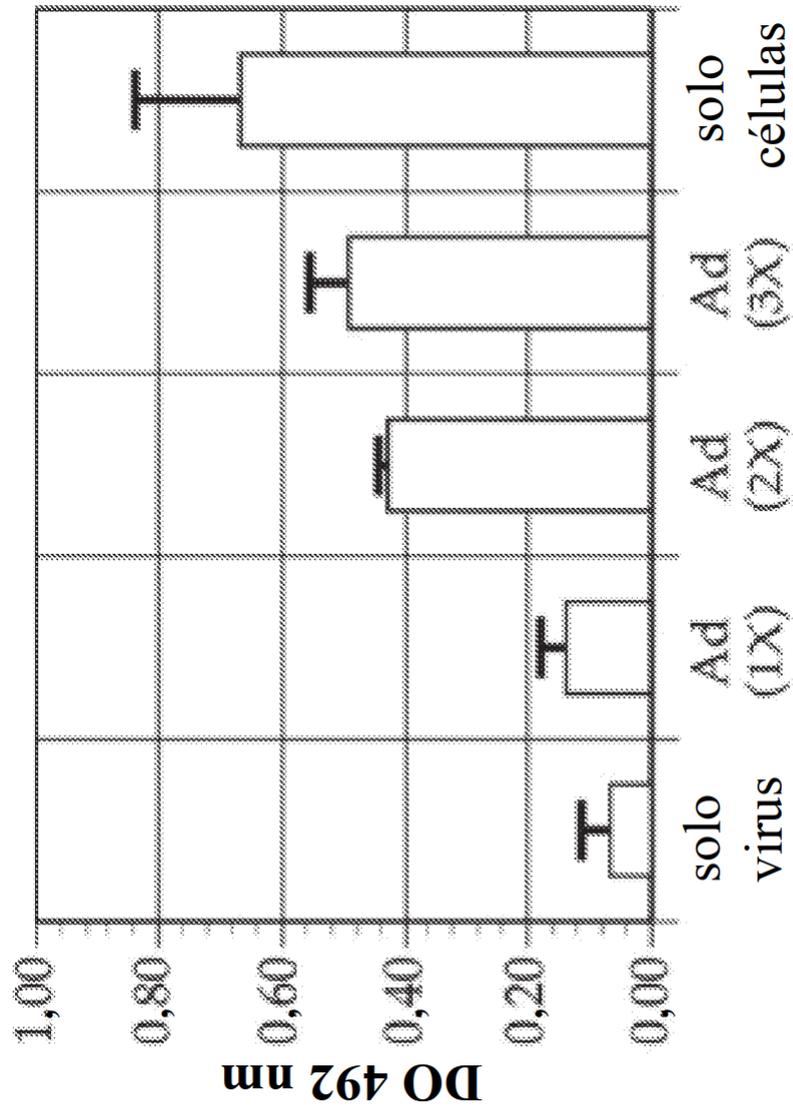
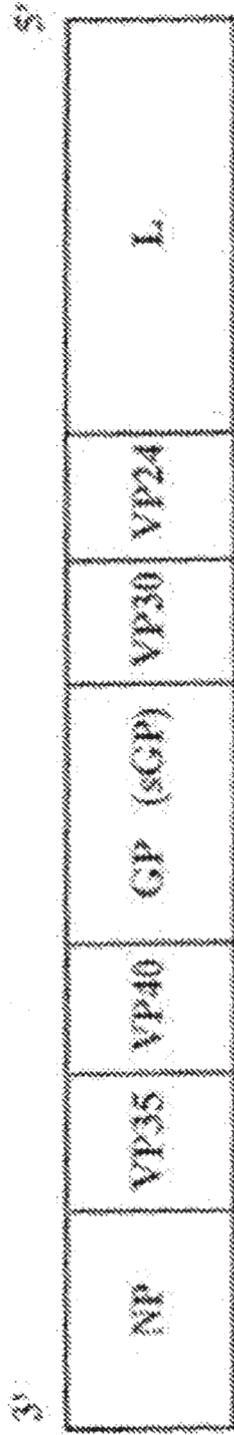


FIG. 2

Organización del genoma del virus del Ébola



- NP** Proteína de nucleocápsida mayor
- VP35** Fosfoproteína
- VP40** Proteína de la matriz asociada a membrana
- GP** Glucoproteína transmembrana
- sGP** Glucoproteína secretada
- VP30** Asociada a ribonucleoproteína (menor)
- VP24** Proteína asociada a membrana (menor)
- L** ARN polimerasa dependiente de ARN

FIG. 3

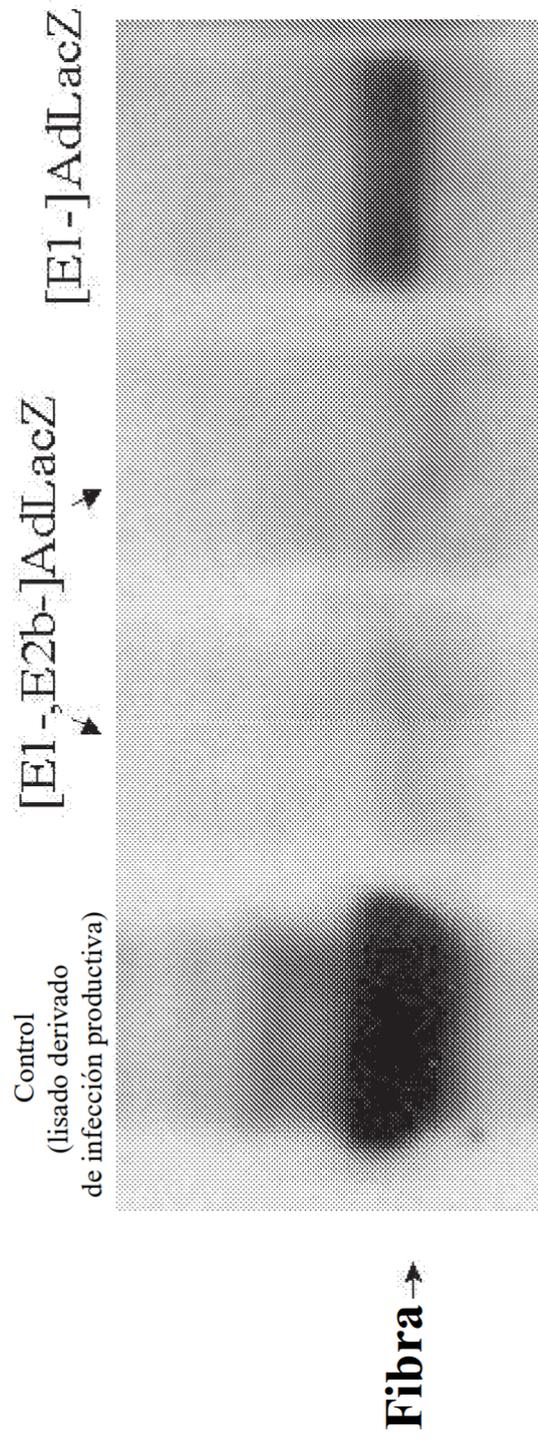


FIG. 4

■ Ratonés vacunados con Ad5 [E1-, E2b-]-HA+NA

● Control de vector

▲ Control experimental

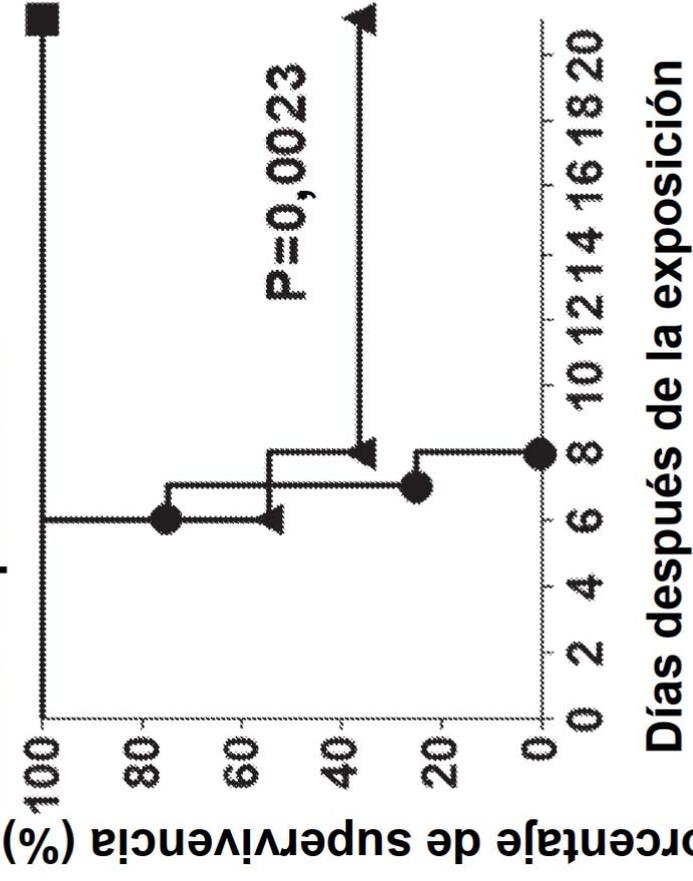


FIG. 5

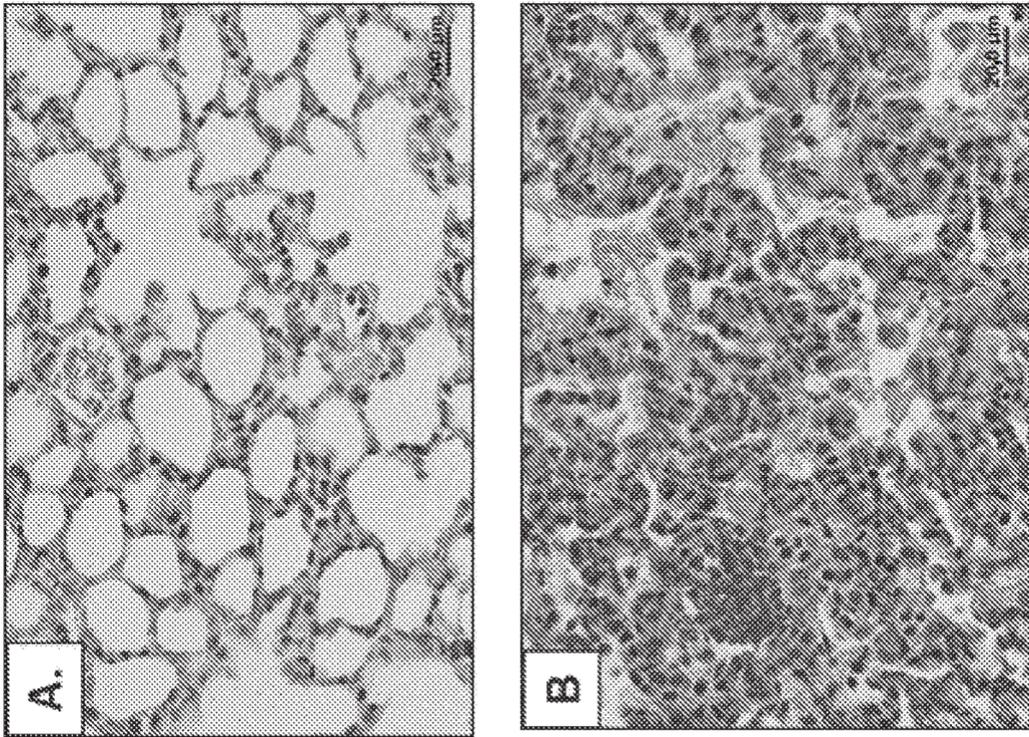


FIG. 6

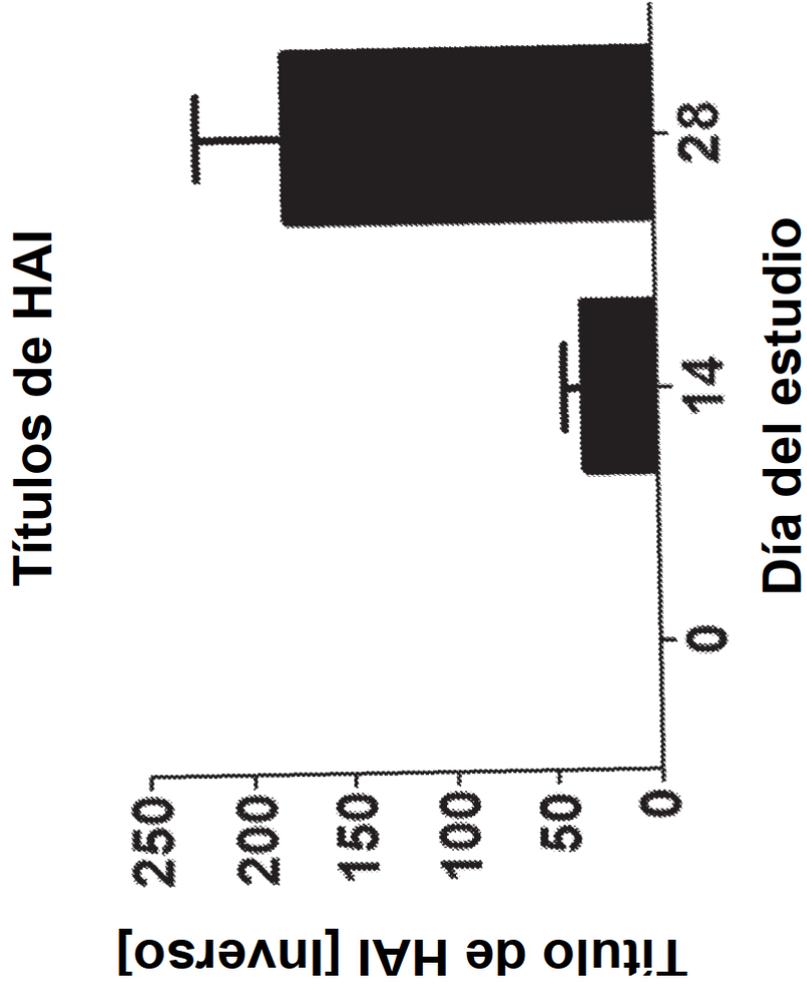


FIG. 7

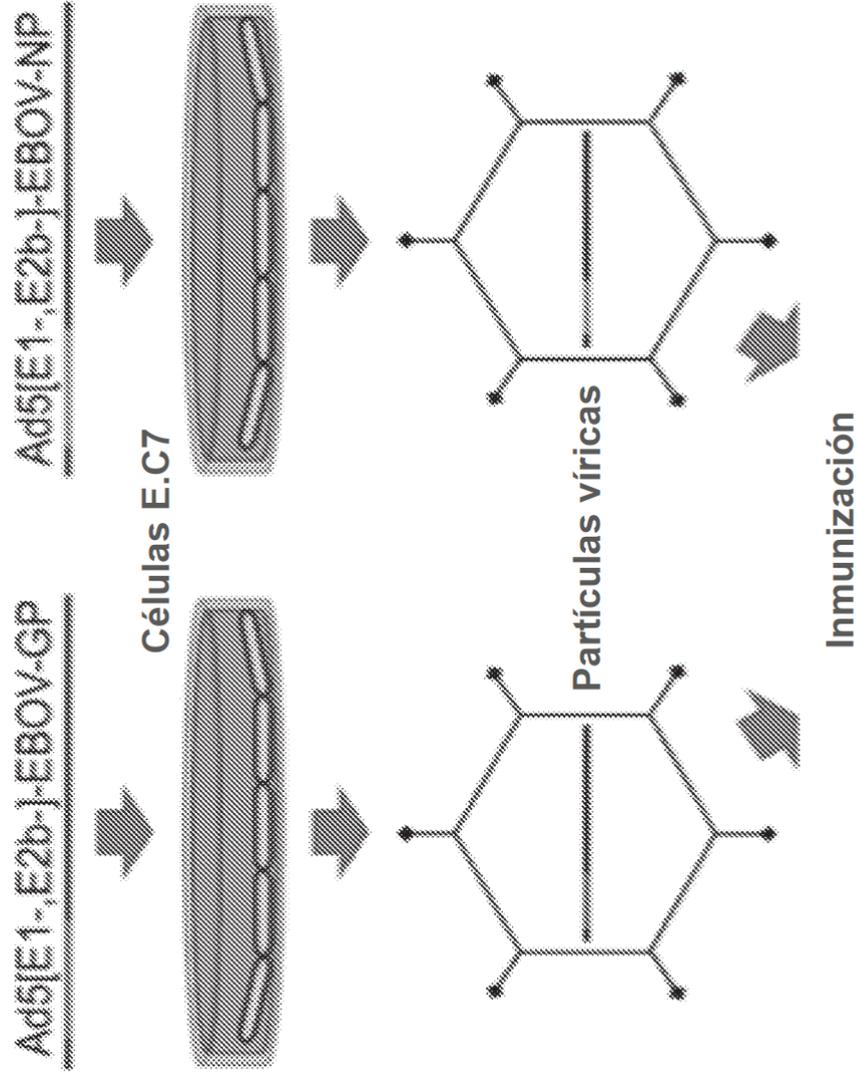


FIG. 8

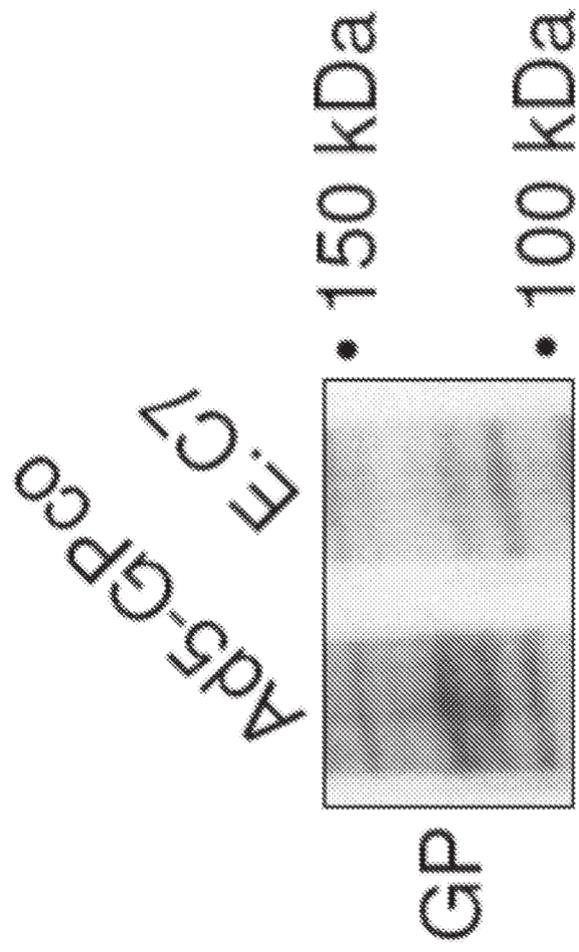


FIG. 9