



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 270 416**

51 Int. Cl.:
C12N 15/85 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **94914452 .1**
96 Fecha de presentación : **27.04.1994**
97 Número de publicación de la solicitud: **0724642**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.08.1996**

54 Título: **Vector nucleotídico, composición que lo contiene y vacuna para la inmunización contra la hepatitis.**

30 Prioridad: **22.10.1993 FR 93 12659**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.04.2007**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **30.11.2010**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **30.11.2010**

73 Titular/es: **INSTITUT PASTEUR**
28, rue du Docteur Roux
75724 Paris Cédex 15, FR
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) y
Universite d'Ottawa/University of Ottawa

72 Inventor/es: **Whalen, Robert Gérald;**
Davis, Heather Lynn y
Michel, Marie-Louise

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 270 416 T5

DESCRIPCIÓN

Vector nucleotídico, composición que lo contiene y vacuna para la inmunización contra la hepatitis.

5 La presente invención tiene por objeto un vector para la inmunización contra una hepatitis.

La misma se refiere asimismo a una composición que contiene este vector.

10 La inmunización por inyección de ADN desnudo en los tejidos musculares ha sido el objeto de varios trabajos desde el inicio de los años 1990.

Así, ULMER *et al.* (Science, 259, 1745-1749, 1993) han obtenido una protección contra el virus Influenza por inducción de linfocitos T citotóxicos inyectando en unos cuadriceps de ratón un plásmido que codifica para la nucleoproteína Influenza A. El plásmido utilizado lleva, o bien el promotor del virus del sarcoma de Rous, o bien el promotor del citomegalovirus.

20 RAZ *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 4523-4527, 1993) han inyectado unos vectores que comprenden el promotor del virus del sarcoma de Rous y un gen que codifica para la interleukina-2, la interleukina-4 o el factor de crecimiento transformador de tipo $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). Son mejoradas las respuestas inmunitarias humoral y celular de los ratones a los que se les ha administrado por vía intramuscular estos plásmidos.

25 WANG *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 4156-4160, 1993) han inyectado en los músculos de ratones un plásmido portador de un gen que codifica para la proteína de envoltura del virus HIV-1. La inyección de los plásmidos ha ido precedida por un tratamiento con bupivacaína en el mismo lugar en el músculo. Los autores constatan la presencia de anticuerpos capaces de neutralizar la infección por el virus HIV-1. Se destacará de todas formas que el ADN ha sido inyectado dos veces por semana para un número total de cuatro inyecciones.

30 DAVIS *et al.* (Informe del 28 Congreso Europeo sobre el músculo, Bielefeld, Alemania, 21-25 de Septiembre de 1992) han inyectado unos plásmidos portadores de un gen que codifica para la luciferasa o la β -galactosidasa tratando previamente los músculos con sucrosa o una cardiotoxina. Los autores observan la expresión de la luciferasa o de la β -galactosidasa.

35 Más recientemente, un artículo aparecido en Science et Avenir (Septiembre 1993, páginas 22-25) indica que WHALEN y DAVIS han conseguido inmunizar unos ratones contra el virus de la hepatitis B inyectándoles el ADN puro del virus en los músculos. Se cita de manera general una inyección previa de toxina de veneno de serpiente seguida de la inyección de ADN entre 5 y 10 días más tarde. Se ha precisado que este método no es práctico.

40 Estos trabajos habían sido precedidos por otros experimentos en los que diferentes ADN habían sido inyectados, en particular en unos tejidos musculares. Así, la solicitud de patente PCT/US 90/01 515 (publicada con el nº WO-90/11 092) da a conocer diversas construcciones plasmídicas que pueden ser inyectadas, en particular en unos tejidos musculares para el tratamiento de la distrofia muscular. Sin embargo, este documento precisa que el ADN es inyectado preferentemente en unos liposomas.

45 Ocurre lo mismo en la patente canadiense CA 362.966 (publicada con el nº 1.169.793) que describe la inyección intramuscular de liposomas que contienen ADN que codifica en particular para los antígenos HBs y HBc. Los resultados descritos en esta patente mencionan la expresión de antígenos HBs. No se ha buscado la presencia de anticuerpos anti-HBs.

50 La solicitud internacional PCT/FR 92/00 898 (publicada con el nº WO-93/06 223) describe unos vectores virales que pueden ser encaminados por vía sanguínea hasta unas células diana. Así, estos vectores son reconocidos por los receptores de células, tales como las células musculares y pueden ser empleados en el tratamiento de la distrofia muscular o de la trombosis.

55 Esta solicitud no se refiere a la inmunización frente a virus tales como por ejemplo el de la hepatitis B.

Por lo tanto se desprende del estado de la técnica citado que, aunque ya se conocían estas técnicas de inmunización frente a la hepatitis por inyección de ADN desnudo, éstas presentaban un gran número de inconvenientes que no las hacían prácticas de realizar.

60 Por otra parte, el ADN desnudo utilizado para vacunar unos ratones era el ADN puro del virus. Este tipo de tratamiento no es previsible para la vacunación humana, debido a los riesgos que hace correr a los pacientes.

Por último, los experimentos más antiguos en los que el ADN inyectado está contenido en unos liposomas no han demostrado ninguna respuesta inmunitaria.

65 El solicitante se ha comprometido por lo tanto a encontrar nuevas construcciones de vectores que permitan inmunizar frente a la hepatitis sin tener por ello consecuencias negativas para la salud humana.

ES 2 270 416 T5

Se ha comprometido por otra parte a encontrar un aditivo a unas composiciones que contienen estas construcciones que permita una degenerescencia eficaz del tejido muscular antes de la inyección del ADN, y que sea compatible con los imperativos de la salud humana.

5 El solicitante ha mostrado de manera sorprendente que se podía obtener un nivel de anticuerpos eficaz y duradero ampliamente superior al nivel que permite obtener en el hombre una protección inmunitaria eficaz y duradera frente a la infección por el virus de la hepatitis administrando por inyección intramuscular un vector que tiene una construcción definida, y una sustancia capaz de inducir una necrosis coaguladora de las fibras musculares.

10 La presente solicitud tiene por lo tanto por objeto un vector nucleotídico que comprende:

- (i) un gen o un ADN complementario que codifica para al menos una parte de la proteína HBs del virus de la hepatitis B,
- 15 (ii) la secuencia de terminación no traducida de dicho gen o de dicho ADN complementario, incluyendo la señal de poliadenilación, situada corriente abajo de dicho gen o de dicho ADN complementario,
- (iii) un promotor que controla la expresión de dicho gen o de dicho ADN complementario en unas células musculares, siendo dicho promotor seleccionado de entre:
 - 20 - el promotor del citomegalovirus,
 - el promotor de los genes de superficie del virus HBV, y
 - 25 - el promotor de un gen de una proteína del citoesqueleto

Dicho vector puede no replicarse en estas células.

30 También puede ser replicativo lo que permite obtener un número elevado de copias por célula y mejorar la respuesta inmunitaria.

El vector es además escogido con el fin de evitar su integración en el seno del ADN celular, siendo conocidas tales integraciones por activar los oncogenes e inducir la cancerización de las células.

35 Ventajosamente el vector según la presente invención es un plásmido en parte de origen bacteriano y que lleva en particular un origen de replicación bacteriana y un gen que permite su selección, tal como un gen de resistencia a un antibiótico.

40 Este vector puede también estar provisto de un origen de replicación que le permite replicarse en las células musculares de su huésped, tal como un origen de replicación de virus del papiloma bovino.

El gen o el ADN complementario llevado por este vector codifica para al menos una parte la proteína HBs, en una de sus formas S, S-preS2 o S-preS2-preS1, en cuyo caso el gen es el gen S.

45 Las secuencias de los genes o de las proteínas de los virus de estas hepatitis están descritas o pueden ser deducidas de los siguientes documentos:

50 patente FR-79 21 8111, patente FR 80.09.039, patente EP- 81.400.634, patente FR 84.03.564, patente EP 91.830.479 y el artículo de Najarian *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 2627-2631).

El vector puede comprender asimismo unos genes que codifican al menos en parte para la proteína gp160 del virus HIV1 asociada a la proteína p25, y/o a la proteína p55, y/o a la proteína p18 o al menos un gen que codifica para la proteína Rev del virus HIV1.

55 El promotor llevado por este vector es ventajosamente el promotor del citomegalovirus (CMV). Puede sin embargo ser cualquier otro promotor que permita una expresión eficaz del gen en las células musculares, tal como el definido en la reivindicación 1.

60 Así, puede ser:

- un promotor de un gen de una proteína del citoesqueleto, en particular de la desmina tal como se describe por BOLMONT *et al.* (Journal of submicroscopic cytology and pathology, 1990, 22, 117-122) y ZHENLIN *et al.* (Gene, 1989, 78, 243-254),
- 65 - el promotor de genes de superficie del virus HBV.

ES 2 270 416 T5

De manera general, el promotor puede ser heterólogo al huésped, es decir que no se encuentra en el huésped de manera natural, pero es ventajosamente homólogo, permaneciendo al mismo tiempo activo en origen en un tejido distinto al tejido muscular.

5 Además del promotor, el vector puede comprender una secuencia de terminación de la transcripción, situada corriente arriba del gen.

Un vector de este tipo puede ser el plásmido pCMV/HBS, o pRCCMV-HBS, que tiene la secuencia SEC ID n°1, depositado con el n° I-1370 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Institut Pasteur (CNCM) el 10 21 de octubre de 1993.

Puede también ser el plásmido pRSV/HBS depositado con el n° I-1371 en la CNCM el 21 de octubre de 1993.

15 Este plásmido tiene una estructura similar al pCMV/HBS pero comprende el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV) en vez del promotor del citomegalovirus (CMV).

Otros plásmidos pueden ser:

20 - el pCMVHB-S1.S2.S que ha sido construido por inserción del fragmento Bgl II-Bgl II del gen S, obtenido a partir del pCP10, en un vector pBlueScript modificado para contener unos lugares de clonado suplementarios en la parte "polylinker". El fragmento que contiene el gen S ha sido extraído a continuación por digestión KpnI-BssH II y después clonado en los lugares correspondientes del pcADN 3 (*In vitro* gen, Rad Systems Europe Ltd, Abingdon UK) con el fin de obtener el pCMVHB-S1.S2.S. Este plásmido ha sido depositado con el n° I-1411 en la CNCM.

25 - el pCMVHB-S2.S que ha sido obtenido eliminando la parte pre-S1 del gen HBS del pCMVHB-S1.S2.S por digestión KpnI/MstI y después ligando los dos extremos después del tratamiento con la nucleasa S1. El pCMVHB-S2.S ha sido depositado en la CNCM con el n° I-1410.

30 - el pHBV-S1.S2.S depositado con el n° I-1409 en la CNCM, ha sido obtenido por inserción del fragmento Bgl II-Bgl II del gen S, obtenido a partir del pCP10, en un vector pBlueScript modificado para contener los lugares de clonado suplementarios en la parte "polylinker".

35 La presente invención se refiere además a unos vectores nucleotídicos tales como los descritos anteriormente, que comprenden un promotor homólogo al huésped y otra secuencia de regulación para la expresión de un gen o de un ADN complementario que codifica para una de las proteínas citadas anteriormente.

40 La presente invención tiene además por objeto una vacuna o un medicamento que contiene al menos un vector, o una secuencia nucleotídica, tal como se ha definido anteriormente.

Se describe además una composición capaz de inducir una respuesta citotóxica constituida por al menos una secuencia nucleotídica expresada en las células musculares y que comprende un promotor tal como el definido más arriba.

45 La invención se refiere asimismo a una composición farmacéutica no lipídica destinada a la inmunización contra una infección viral tal como una hepatitis que comprende al menos por una parte una sustancia capaz de inducir una necrosis coagulativa de las fibras musculares y por otro un vector tal como el descrito más arriba o que comprende unas secuencias nucleotídicas tales como las descritas anteriormente completas o parciales. Se entiende por secuencia parcial una secuencia que codifica para al menos 6 aminoácidos.

50 Ventajosamente dicha sustancia es la bupivacaína.

De manera ventajosa, dicha composición se caracteriza porque el vector es administrado en el músculo del individuo a inmunizar, como mínimo 5 días después de la administración de la bupivacaína, y sustancialmente en el mismo lugar.

Una preadministración de bupivacaína de este tipo permite de manera sorprendente aumentar la eficacia de la administración del vector así como la inmunización del individuo.

60 Ventajosamente, el vector es administrado diez días después de la administración de la bupivacaína, y sustancialmente en el mismo lugar en el músculo del individuo.

La presente composición puede además contener adyuvantes compatibles y farmacéuticamente aceptables.

65 Una composición de este tipo es administrada preferentemente mediante una inyección intramuscular. La inyección puede ser realizada con ayuda de una jeringa asignada para este uso pero también con ayuda de una pistola de chorro líquido tal como la descrita por FURTH *et al.* (1992, Anal. Biochem. 205, 365-368).

ES 2 270 416 T5

Las cantidades de bupivacaína necesarias para obtener una degenerescencia suficiente del tejido muscular con el fin de obtener una inmunización óptima son del orden de 0,10 mg a 10 mg por dosis de composición inyectable.

Las cantidades de vectores a inyectar con el fin de obtener una inmunización óptima del individuo contra una hepatitis varían en función de la proteína codificada por el gen llevado por el vector. A título indicativo, se inyectarán entre 0,1 y 1.000 μg de vectores por individuo.

Los vectores podrán ser obtenidos mediante los métodos conocidos por el experto en la materia, en particular por síntesis o por los métodos de ingeniería genética.

Dichos métodos son los descritos en particular en el manual técnico:

Maniatis T. *et al.* 1982 - Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor - Ed. New York.

La presente invención es ilustrada sin por ello estar de ninguna manera limitada por los ejemplos siguientes en los que:

La figura 1 es una representación esquemática del plásmido pBC/CMV-HBs.

Las figuras 2A a 2D son unas representaciones esquemáticas respectivamente de los plásmidos pCMVHB-S, pCMVHB-S2.S, pCMVHB-S1.S2.S y pHBV-S1.S2.S.

Las figuras 3, 4 y 5 son unos mapas de restricción esquemáticos respectivamente de los plásmidos pCMVHB-S2.S, pHBV-S1.S2.S y pRSV-HBS.

La figura 6 ilustra la secreción de partículas antigénicas HBs (HBs Ag) en ng/ml (en ordenadas) en función del número de días (en abscisas) por unas células portadoras de los plásmidos pCMVHB-S, pCMVHB-S1.S2.S y pHBV-S1.S2.S, pSVS o pCMVHB-S2.S.

Las figuras 7A y 7B ilustran la constatación sobre ciertas partículas de la figura 6 de los antígenos PreS₁ y PreS₂ por respectivamente unos anticuerpos anti-preS₁ y anti-preS₂. La formación de los complejos anticuerpo-antígeno es constatada por la densidad óptica (en ordenadas), en función de la concentración en antígeno.

Las figuras 8A a 8D representan las respuestas anti-HBS (HBs Ab en ordenadas, expresadas en mUI/ml) y anti-preS₂ (preS₂ Ab en ordenadas, expresada en D.O.) de los ratones vacunados por respectivamente pCMVHB-S (8A), pCMVHB-S2.S (8B), pCMVHB-S1.S2.S (8C) y pHBV-S1.S2.S (8D).

La figura 9 ilustra la respuesta anticuerpo, inmunoglobulinas IgG y IgM (títulos en ordenadas), de un ratón vacunado por el pCMVHB-S2.S en función del número de semanas (en abscisas).

Las figuras 10A a 10C representan las respuestas antigruo y antisubtipo ay inducidas por el ADN del pCMV-S (ADN) o el antígeno HBS (prot) respectivamente, en los ratones B10 (10A), B10S (10B) y B10M (10C).

Las figuras 10D a 10F representan las respuestas antigruo a inducidas por el ADN del pCMV-S (ADN) o el antígeno HBS (prot) respectivamente, en los ratones B10 (10D), B10S (10E) y B10M (10F).

La figura 11 representa un mapa lineal de restricción del plásmido pBS-SKT-S1.S2.S.

Ejemplo 1

Inducción de anticuerpos frente a un antígeno de superficie de la hepatitis B por inyección secuencial de bupivacaína y de un plásmido portador de un gen que codifica para el antígeno

1) Materiales y métodos

1.1 Tratamiento previo con bupivacaína

Todos los experimentos han sido realizados sobre unos músculos de la tibia anterior (TA) de unos ratones C57BL/6J de 5 a 7 semanas de edad.

Se induce un ciclo único de degenerescencia y de regeneración de las fibras musculares en los músculos de la tibia anterior de ratones no anestesiados, mediante inyección intramuscular de 50 μl de marcaína (bupivacaína 0,5%, DMSO 1%) comercializada por los laboratorios Astra, Francia. La solución es inyectada utilizando una jeringa de tuberculosis y una aguja insertada en un manguito de polietileno, con el fin de limitar la penetración a una profundidad de 2 mm.

Siendo la marcaína un anestésico, las inyecciones en las piernas derecha e izquierda son espaciadas entre 10 y 30 minutos con el fin de evitar una sobredosis.

ES 2 270 416 T5

1.2 Preparación del ADN

5 El plásmido utilizado ha sido construido por clonación en un vector pBluescript modificado del fragmento de restricción Xho I-Bgl II del plásmido pCP10 que contiene el gen que codifica para el antígeno de superficie HBS y unas secuencias no traducidas corriente arriba y corriente abajo que incluyen la señal de poliadenilación.

10 El gen S es recuperado a continuación por digestión con ayuda de las enzimas KpnI-BssHII y el fragmento ha sido clonado en el lugar del vector pRC/CMV comercializado por *In vitro*gen. La construcción plasmídica final ha sido denominada pCMV-HBS y depositada con el nº I-1370 en la CNCM.

15 Este plásmido es representado esquemáticamente en la figura 1. El promotor CMV está situado entre el nucleótido 228 que es el lugar de corte de la MluI y el nucleótido 896, que es el lugar de corte de la KpnI. El fragmento de ADN que comprende el gen de estructura del antígeno HBs ha sido clonado entre los nucleótidos 896 y 2852 (lugar de la BssH III).

El gen HBs se extiende entre los nucleótidos 911 (lugar XhoI) y 2768 (lugar Bgl II).

La secuencia completa de este plásmido es la secuencia SEC ID nº1.

20 El ADN plasmídico purificado ha sido preparado mediante los métodos estándar, resuelto en tampón PBS y almacenado a -20°C hasta la inyección.

1.3 Inyección del ADN

25 Uno a cinco días después de la inyección de la marcaína, se ha inyectado en el mismo lugar el ADN, siendo anestesiado el ratón con ayuda de pentobarbital de sodio (75 mg/kg vía intraperitoneal).

30 La solución de ADN que contiene 50 µg de ADN plasmídico y 50 µg de tampón PBS ha sido inyectada a través de la piel en los músculos en curso de regeneración de la tibia anterior mediante una inyección única intramuscular.

Se han realizado unas inyecciones de manera bilateral, en las dos patas de los ratones, recibiendo así cada animal en total 100 µg de ADN plasmídico recombinante. Como para la inyección de marcaína, se inyecta la solución de ADN utilizando la jeringa de tuberculosis y la aguja descrita anteriormente.

35 En cada pata se ha realizado una sola inyección intramuscular de ADN.

2. Resultados

40 Los resultados obtenidos están resumidos en la tabla I siguiente.

Muestran de forma muy clara que la inyección de ADN después del tratamiento con la marcaína permite obtener unas proporciones importantes de anticuerpos séricos frente al antígeno de superficie de la hepatitis B.

45 Estos resultados son sorprendentes, no permitiendo el análisis del estado de la técnica suponer que un plásmido permitiría la inducción de anticuerpos anti-HBs que se pueden encontrar en el suero y permitiendo así una vacunación eficaz.

50 La facilidad de realización de la vacunación mediante unos plásmidos, y el hecho de que no sea necesario hacer recordatorios, permite prever una vacunación a gran escala.

Ejemplo 2

Comparación de la eficacia de inyección de un plásmido en presencia y en ausencia de lípidos

55 Una dosis de 10 µg de ADN plasmídico del vector SV40-Luciferasa disponible en el comercio ("pGL2-Control Vector" de Promega, referencia E1 11) en 50 µl de solución fisiológica es inyectada en un músculo tratado previamente con sucrosa según el método de Davis *et al.* (Hum. Gene Ther. 4:151-159 (1993)). El ADN inyectado es mezclado previamente con unos lípidos tales como el dioctadecilamidoglicil espermina (DOGS) o las mezclas siguientes: DOGS + espermidina, y DOGS + polietilenglicol (PEG). La actividad de la luciferasa es medida 5 días después de la inyección.

60 Estos resultados figuran seguidamente en la tabla II.

65 Muestran que la presencia de lípidos (DOGS) disminuye de forma importante la eficacia de la inyección del plásmido respecto a una composición sin lípidos (testigo).

Ejemplo 3

Comparación de las respuestas de ratones y de conejos frente a unos plásmidos portadores de diversos promotores y genes de envoltura del virus HBV

5

Se han construido cuatro plásmidos que permiten la expresión de una, dos o tres proteínas de envoltura del virus HBV. En tres de estas construcciones (pCMVHB-S, pCMVHB-S2.S, pCMVHB-S1.S2.S) los genes que codifican para las proteínas de envoltura del virus HBV están colocadas bajo el control transcripcional del promotor de los genes precoces del virus CMV (figura 1, figura 2A a 2C, figuras 3 y 4). El cuarto plásmido (pHBV-S1.S2.S) utiliza como elemento de control transcripcional el promotor de los genes de superficie del virus HBV contenido en la región pre-S1 de este virus (Cattaneo *et al.* (1983) *Nature*, 305, 336) (figura 2D). En las cuatro construcciones, la señal de poliadenilación utilizada está contenida en las secuencias HBV presentes en 3' del gen S.

10

1. Control *in vitro* de la eficacia de los vectores

15

Para controlar la eficacia de estos vectores *in vitro* en unas células eucariotas, se han transfectado unos fibroblastos o unos mioblastos de ratón. Se ha utilizado como control un plásmido que expresa las tres proteínas de envoltura bajo control del promotor SV40 (pSVS) (Michel *et al.* 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 7708-7712). La figura 6 muestra la cinética de secreción de las partículas HBs en los sobrenadantes de cultivo. Los bajos contenidos de antígeno producidos por transfección del vector pCMVHB-S1.S2.S son compatibles con una fuerte síntesis de la gran proteína de envoltura a partir del promotor CMV. Esta proteína que es miristilada en su parte amino terminal, es retenida en el retículo endoplasmático (Ganem, (1991), *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 168, 61-83). Se ha confirmado por inmunofluorescencia la retención en la célula de proteínas que llevan unos determinantes pre-S1.

20

La composición de las partículas secretadas ha sido analizada en un sistema ELISA sándwich utilizando como anticuerpo de captura un anticuerpo monoclonal de ratón específico de los determinantes pre-S1 (figura 7 A) ó pre-S2 (figura 7B) y como segundo anticuerpo un suero policlonal de conejo anti-HBs. Estos experimentos muestran que las partículas de AgHBs producidas a partir del vector pCMVHB-S1.S2.S llevan unos determinantes pre-S1 y pre-S2 que firman la presencia de la proteína de envoltura grande y mediana del virus HBV. Las partículas secretadas después de la transfección del vector pCMVHB-S2.S y pHBV-S1.S2.S llevan, además de los determinantes Hbs, unos determinantes pre-S2 característicos de la proteína media de envoltura.

25

30

2) Inoculación del ADN

El ADN purificado sobre columna Quiagen ha sido inyectado por vía intramuscular en una sola inyección de 100 µg (50 µg/pata) en el músculo anterior de la tibia de ratón C57/BL6 (8 ratones por grupo). Cinco días antes de la inyección, el músculo ha sido tratado previamente con la cardiotoxina con el fin de inducir una degenerescencia seguida de una regeneración de las células musculares favoreciendo así la captura del ADN por estas células.

35

Se han realizado también unos experimentos de inyección de ADN en el conejo. En este caso el ADN pCMVHB-S ha sido administrado en el músculo normal sin degenerescencia, o bien mediante una pistola de inyección sin aguja el Biojector®, o bien mediante unas jeringas convencionales provistas de agujas.

40

3) Respuestas anti-Hbs de los ratones vacunados por el ADN

45

Se induce una respuesta anticuerpo anti-HBs por una única inyección de uno u otro de los cuatro plásmidos utilizados.

La respuesta anticuerpo ha sido analizada mediante kits comerciales de detección de anticuerpos anti-HBs (Monolisa anti-Hbs, Diagnostic Pasteur). Los anticuerpos anti-preS2 son detectados en un sistema ELISA utilizando sobre la fase sólida un péptido de la región pre-S2 (AA 120-145) que corresponde al epítipo B mayor llevado por este ámbito (Neurath *et al.*, (1985), *Nature*, 315, 154).

50

Las figuras 8A a 8D muestran la cinética de la respuesta anti-HBs (HBs-Ab) expresada en miliunidades internacionales/ml y de la respuesta anti-pre-S2 (preS2Ab) medida en densidad óptica (492 nm) para unos sueros diluidos al 1/100. Se realiza la revelación con ayuda de un anticuerpo antiinmunoglobulina (IgG) de ratón marcado con peroxidasa.

55

La inyección del plásmido pCMVHB-S (figura 8A) induce una síntesis constante de los anticuerpos anti-HBs. Se obtiene la reconversión en el 100% de los ratones desde una semana después de la inyección con una proporción media de anticuerpos de 48 mUI/ml (de 12 a 84 mUI/ml, desviación tipo (SD)=28), lo que es de 4 a 5 veces superior al umbral requerido en el hombre para conferir la protección (10 mUI/ml).

60

La respuesta inducida por una única inyección de plásmido pCMVHB-S2.S (figura 8B) se caracteriza por la aparición muy precoz de anticuerpos anti-HBs. Estos anticuerpos alcanzan una proporción media de 439 mUI/ml (de 104 a 835 mUI/ml; SD=227) en una semana y después disminuyen para volver a aumentar y alcanzar a las 13 semanas la proporción inicial. El significado de este pico de anticuerpos será discutida más adelante. Se observa un pico de anticuerpos IgG anti-pre-S2 a las dos semanas.

65

ES 2 270 416 T5

La aparición de anticuerpos anti-HBs inducidos por la inyección de plásmidos pCMVHB-S1.S2.S (figura 8C) y pHBV-S1.S2.S (figura 8D) es retardada ligeramente puesto que los ratones se seroconvierten al 100% únicamente a partir de las dos semanas. El perfil de la seroconversión es idéntico, se caracteriza por una respuesta inicial específica del antígeno pre-S2 seguida de una respuesta anti-HBs que aumenta gradualmente hasta alcanzar unas proporciones de 488 mUI/ml (de 91 a 1.034 mUI/ml; SD=552) (pCMVHB-S1.S2.S) y 1.725 mUI/ml (de 143 a 6.037 mUI/ml; SD=1.808) (pHBV-S1.S2.S) a las 13 semanas.

4) Respuesta anti-HBs de los conejos vacunados por el ADN

Los resultados presentados en las tablas III y IV muestran que las proporciones de anticuerpos detectadas a las 8 semanas en los conejos inmunizados con Biojector son significativamente superiores a las obtenidas por inyección del ADN con aguja.

5. Análisis cualitativo de la respuesta humoral

Unos sistemas ELISA sobre la fase sólida de unos antígenos HBs de unas composiciones variadas respecto a unos determinantes presentados y utilizando como segundo anticuerpo unos anticuerpos específicos de los IgM o de los IgG de ratones han permitido analizar cualitativamente la respuesta anticuerpo obtenida.

En todos los casos, la inyección única del ADN en el ratón se caracteriza por la aparición precoz de IgM específicos del AgHBs seguido inmediatamente por la conversión en anticuerpo de isotipos IgG característicos de la respuesta memoria inducida con ayuda de células T auxiliares. La respuesta anticuerpo a la inyección del ADN se caracteriza por su precocidad. En efecto, la seroconversión es obtenida 8 a 15 días después de la inyección según el tipo de ADN utilizado y en todos los casos la meseta es alcanzada en cuatro semanas y mantenida de manera sostenida durante 12 semanas.

La utilización del antígeno HBs de subtipo heterólogo (ad) fijado sobre las placas ELISA permite evidenciar la presencia, en el suero de los ratones inmunizados, de anticuerpos específicos de grupo anti-a, y por diferencia de reactividad respecto al AgHBs del mismo subtipo (ay), de anticuerpos específicos del subtipo anti-y. La presencia de los anticuerpos específicos de los determinantes de grupo del AgHBs es muy importante puesto que éstos son capaces de conferir la protección contra unos virus subtipo heterólogos durante las pruebas virulentas en el chimpancé (Szmunn *et al.* (1982) N. Engl. J. Med. 307, 1481-1486).

El análisis de la respuesta inducida por el vector pCMV-S2.S muestra que ésta presenta una similitud destacable con la que se puede observar en el hombre durante la infección. Se caracteriza por un pico de IgM específicos de la región pre-S2 extremadamente precoz (8 días) seguido inmediatamente por una conversión en IgG anti-pre-S2 (figura 9). Esta respuesta es seguida por la aparición de los anticuerpos anti-HBs IgM y después IgG. La producción de los anticuerpos anti-HBs es constante y alcanza un máximo a las 4 semanas. A las 13 semanas unos IgG anti-HBs y anti-pre-S2 persisten con un nivel constante.

La respuesta antisubtipo (y) precede la respuesta antigupo (a) de la misma forma que ya se ha descrito durante la vacunación con la vacuna recombinante (Tron *et al.*, (1989) (J. Infect. Dis. 160, 199-204).

La respuesta obtenida con los otros tres ADN vacuna muestra la conmutación de clase IgM→IgG característica de la respuesta secundaria. Siendo la respuesta primero dirigida contra el subtipo antes de serlo contra los determinantes del grupo del AgHBs.

La respuesta a largo plazo, estudiada para el ADN pCMVHB-S, muestra que el pico de anticuerpos es alcanzado en 3 meses y que éstos persisten en una proporción igual a 6 meses más tarde (Tabla V)

6) Vacuna genética y no respuesta

Un problema mayor de la vacunación contra la hepatitis B sigue siendo el número elevado de no-contestadores a la vacunación clásica (2,5 a 5%). La no respuesta en el hombre ha podido ser correlacionada a ciertos tipo HLA (Krustall *et al.*, (1992) J. Exp. Med. 175, 495-502) y a un defecto de la presentación del antígeno o de la estimulación de las células T auxiliares.

Para estudiar el impacto posible de la vacunación genética sobre la no respuesta al AgHBs, se ha utilizado un panel de cepas de ratones cuya respuesta a las diferentes proteínas de envoltura del virus HBV es regulada genéticamente y ha sido bien caracterizado por Millich *et al.* (1986 J. Immunol. 137, 315). La construcción pCMVHB-S descrita anteriormente ha sido inyectada en los músculos de los ratones B10 (H-2^b) B10.S (H-2^s) y B10.M (H-2^f).

La cepa B10 responde a las tres proteínas de envoltura del virus, la cepa B10.S no responde a la AgHBs pero la no respuesta puede ser rodeada por inmunización con unos antígenos HBsAg portadores de unos determinantes pre-S2. La cepa B10M es totalmente no contestadora al antígeno HBs y al antígeno pre-S2. Una respuesta en esta cepa ha podido ser obtenida por inmunización con unos AgHBs portadores de las determinantes pre-S1.

ES 2 270 416 T5

Los ratones inmunizados por al ADN han recibido una única inyección (100 μg) en el músculo en regeneración. Los ratones testigo han recibido la proteína en dos inyecciones intraperitoneales con un mes de intervalo, la primera de 2 μg AgHBs ayudada con adyuvante completo de Freund (CFA) y la segunda de 2 μg de AgHBs con adyuvante incompleto de Freund (IFA).

Los resultados obtenidos con el ADN pCMVHB-S son ilustrados por las figuras 10A a 10F.

- En la cepa B10 (buena contestadora) la respuesta inducida por el ADN es más precoz que la respuesta inducida por la proteína después de una única inyección.
- En la cepa B10S (no contestadora a la AgHBs en ausencia de pre-S2) se observa la aparición de anticuerpos HBs específicos del subtipo y después específicos del grupo después de la inmunización con ADN pCMVHB-S. Se han obtenido unos anticuerpos anti-HBs específicos del grupo en los ratones inmunizados con la proteína HBs únicamente después de la 2ª inyección.
- En la cepa B10M (no contestadora a la AgHBs en ausencia de pre-S1) la inmunización por ADN permite obtener una respuesta anti-HBs específica de grupo y de subtipo mientras que la proteína induce una respuesta únicamente de subtipo y necesita dos inyecciones.

La respuesta inducida por los tres tipos de vectores es comparada en las tres cepas de ratón.

Conclusión

Generalmente se admite que la respuesta humoral al antígeno HBs es suficiente por sí sola para conferir la protección. La presencia de anticuerpos dirigidos contra otros determinantes (pre-S1 y pre-S2) llevados por las proteínas de envoltura del virus, a su vez protectores, podría mejorar la calidad de esta respuesta. El conjunto de experimentos indicados en este documento muestra que la respuesta humoral inducida por la vacunación genética antihepatitis B es, en muchos campos, superior a la que se puede obtener mediante la vacunación clásica.

En términos de proporción de seroconversión: se obtiene la proporción del 100% después de 8 días para los ratones inmunizados con los ADN pCMV-HBs y pCMVHB-S2.S y esto después de una única inyección.

En términos de nivel de respuesta: el umbral de 10 mUI/ml considerado suficiente en el hombre para conferir la protección es sobrepasado ampliamente.

En términos de precocidad de la respuesta; el vector pCMVHB-S2.S permite obtener en 8 días un nivel muy elevado de anticuerpos anti-pre-S2 y se sabe que éstos son capaces, por sí solos, de conferir la protección (Itoh *et al.*, (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9174-9178).

En términos de persistencia de la respuesta: los anticuerpos anti-HBs persisten a un nivel elevado durante más de 6 meses.

En términos de calidad de la respuesta: los anticuerpos obtenidos son de tipo IgG característicos de una respuesta dependiente de las células T auxiliares y por lo tanto de una respuesta de memoria.

En términos de actividad antiviral: los anticuerpos son específicos del subtipo viral pero sobre todo específicos del grupo y por lo tanto susceptibles de conferir una protección cruzada.

En términos de significación biológica: el perfil de la respuesta obtenida por inmunización con pCMVHB-S2.S mimica completamente el que se puede observar, en el hombre, durante una infección viral resuelta.

ES 2 270 416 T5

TABLA I

Inducción de anticuerpos contra el antígeno de superficie de la hepatitis B				
Descripción	Número de ratones	Proporción de anticuerpos contra el antígeno de superficie de la hepatitis B en el suero (mIU/ml)		
		Antes de la inyección de ADN	15 días después de la inyección de ADN	35 días después de la inyección de ADN
ADN inyectado 1 día después del tratamiento por la marcaína	5	0	Media : 56 de 5 a más de 140	Media: 59
ADN inyectado 5 días después del tratamiento por la marcaína	5	0	Media: 71 de 21 a más de 108	Media: 47

TABLA II

Grupo	RLU/seg/músculo de luciferasa (media \pm SEM) RLU= Unidad de Luz Relativa	Porcentaje con respecto al testigo
Testigo	43.082 \pm 5.419	100%
4x DOGS	28 \pm 7	0,06%
DOGS-Espermidina	50 \pm 23	0,12%
PEG-DOGS	0 \pm 0	0,00%

TABLA III

Inmunización con Biojector ^R			
pCMV-HB.S			
nº	0 semana	2 semanas	8 semanas
2.1	0	517	380
2.2	0	374	322
3.1	0	258	418
4.1	0	400	4.045
4.2	0	88	86
4.3	0	314	420
6.1	0	415	1.001
6.2	0	1.543	3.517
6.3	0	1181	141
Media	0	566 mUI/ml	1.148 mUL/ml
SD	0	476	1.521
SEM	0	159	507
N	9	9	9
CV		84%	133%

ES 2 270 416 T5

TABLA IV

Inmunización por inyección con ayuda de una aguja pCMV-HB.S			
nº	0 semana	2 semanas	8 semanas
1.1	1	0	1
5.1	0	287	186
5.2	0	162	798
5.3	0	305	203
7.1	0	86	175
7.2	0	1.108	Muerto
Media	0	325 mUI/ml	273 mUL/ml
SD	0	401	305
SEM	0	164	136
N	0	6	5
CV	245%	124%	112%

TABLA V

Respuesta a largo plazo de un ratón vacunado con el pCMVHB-S				
	1 mes	2 meses	3 meses	6 meses
*Título a-HBs en mUI/ml	227	662	1.299	1.082
*Título a-HBs ELISA	$3,5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$8,5 \cdot 10^{-4}$	$9 \cdot 10^{-4}$

REIVINDICACIONES

1. Vacuna que comprende:

- un vector nucleotídico, comprendiendo dicho vector nucleotídico:

(i) un gen o un ADN complementario que codifica para al menos una parte de la proteína HBs del virus de la hepatitis B;

(ii) la secuencia de terminación no traducida de dicho gen o de dicho ADN complementario, incluyendo la señal de poliadenilación, situada corriente abajo de dicho gen o de dicho ADN complementario,

(iii) un promotor que controla la expresión de dicho gen o de dicho ADN complementario en unas células musculares, siendo dicho promotor seleccionado de entre:

- el promotor del citomegalovirus,

- el promotor de los genes de superficie del virus HBV, y

- un promotor de un gen de una proteína del citoesqueleto, y

- unos adyuvantes compatibles y farmacéuticamente aceptables.

2. Vacuna según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicho vector nucleotídico no se replica en las células.

3. Vacuna según una de las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizada** porque dicho gen o dicho ADN complementario codifica para la proteína S, S-preS2 o S-preS2-preS1.

4. Vacuna según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque dicho gen es el gen S.

5. Vacuna según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque dicho vector nucleotídico es el plásmido pCMV-HBS depositado con el nº I-1370 en la CNCM el 21 de octubre de 1993.

6. Vacuna según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque dicho vector nucleotídico es el plásmido pCMVHB-S1.S2.S depositado en la CNCM con el nº I-1411.

7. Vacuna según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque dicho vector nucleotídico es el plásmido pCMVHB-S2.S depositado en la CNCM con el nº I-1410.

8. Vacuna que comprende como vector nucleotídico el plásmido pRSV-HBS depositado con el nº I-1371 en la CNCM el 21 de octubre de 1993.

9. Vacuna según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque dicho vector nucleotídico es el plásmido pHBV-S1.S2.S depositado en la CNCM con el nº I-1409.

10. Vacuna según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque el promotor de una proteína del citoesqueleto es el promotor de la desmina.

11. Composición farmacéutica no lipídica destinada a la inmunización contra una infección viral por el virus de la hepatitis que comprende un vector nucleotídico tal como el definido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y una sustancia capaz de inducir una necrosis coaguladora de las fibras musculares.

12. Composición según la reivindicación 11, **caracterizada** porque dicho vector es administrado en el músculo del individuo a inmunizar, como mínimo cinco días después de la administración de bupivacaína, sustancialmente en el mismo lugar.

13. Composición según la reivindicación 11, **caracterizada** porque el vector es administrado diez días después de la administración de la bupivacaína.

14. Composición según una de las reivindicaciones 12 y 13, **caracterizada** porque la administración se realiza mediante inyección intramuscular.

15. Composición según la reivindicación 13, **caracterizada** porque la inyección intramuscular se realiza con ayuda de una pistola de chorro líquido.

ES 2 270 416 T5

16. Vector nucleotídico que comprende:

- (i) un gen o un ADN complementario que codifica para al menos una parte de la proteína HBs del virus de la hepatitis B,
- (ii) la secuencia de terminación no traducida de dicho gen o de dicho ADN complementario, incluyendo la señal de poliadenilación, situada corriente abajo de dicho gen o de dicho ADN complementario,
- (iii) un promotor que controla la expresión de dicho gen o de dicho ADN complementario en unas células musculares, siendo dicho promotor seleccionado de entre:
 - el promotor del citomegalovirus,
 - el promotor de los genes de superficie del virus HBV, y
 - el promotor de un gen de una proteína del citoesqueleto.

17. Vector nucleotídico según la reivindicación 16, **caracterizado** porque es el plásmido pCMV-HBS depositado con el nº I-1370 en la CNCM el 21 de octubre de 1993.

18. Vector nucleotídico según la reivindicación 16, **caracterizado** porque es el plásmido pCMVHB-S1.S2.S depositado en la CNCM con el nº I-1411.

19. Vector nucleotídico según la reivindicación 16, **caracterizado** porque es el plásmido pCMVHB-S2.S depositado en la CNCM con el nº I-1410.

20. Vector nucleotídico según la reivindicación 16, **caracterizado** porque es el plásmido pHBV-S1.S2.S depositado en la CNCM con el nº I-1409.

21. Vector nucleotídico que es el plásmido pRSV-HBS depositado con el nº I-1371 en la CNCM el 21 de octubre de 1993.

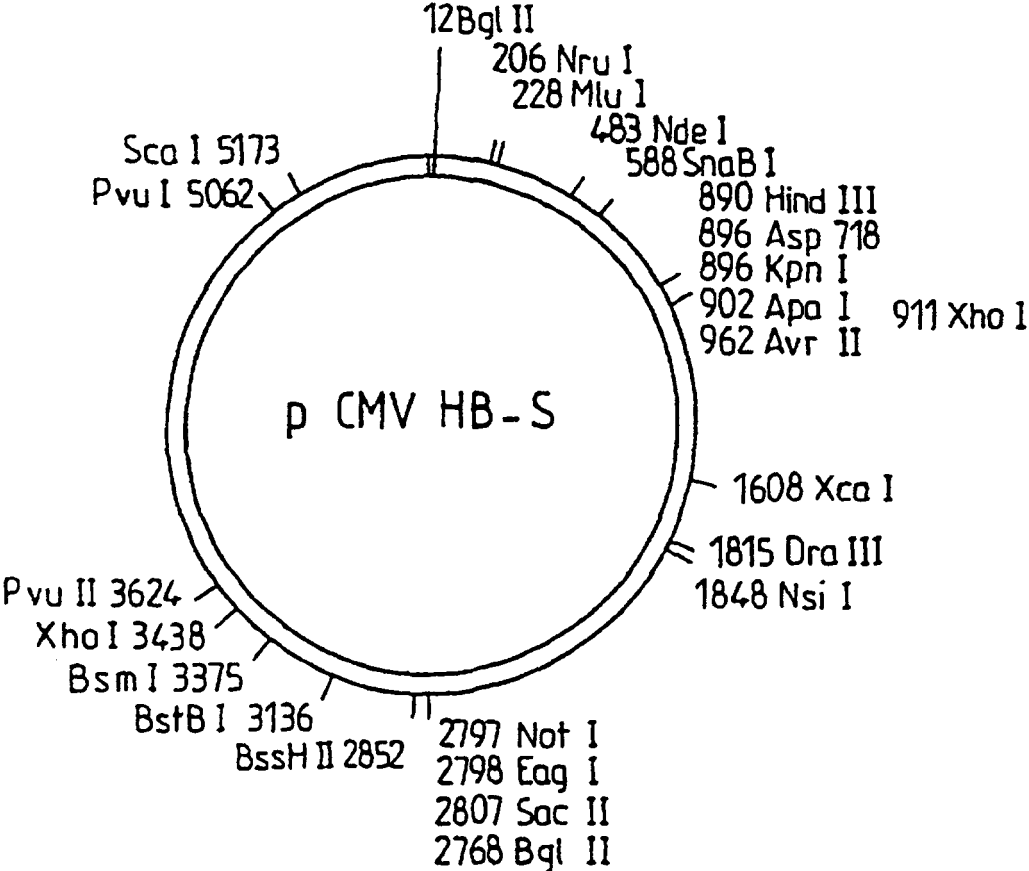


FIG.1

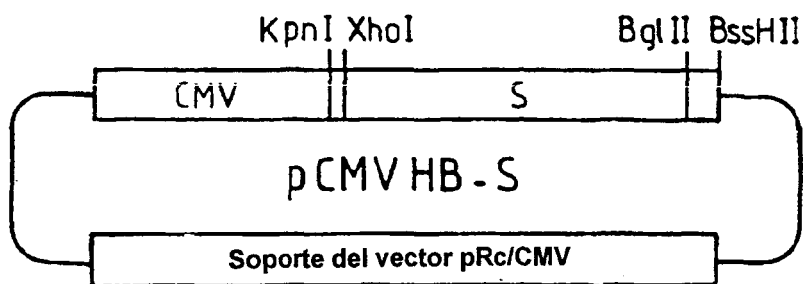


FIG.2A

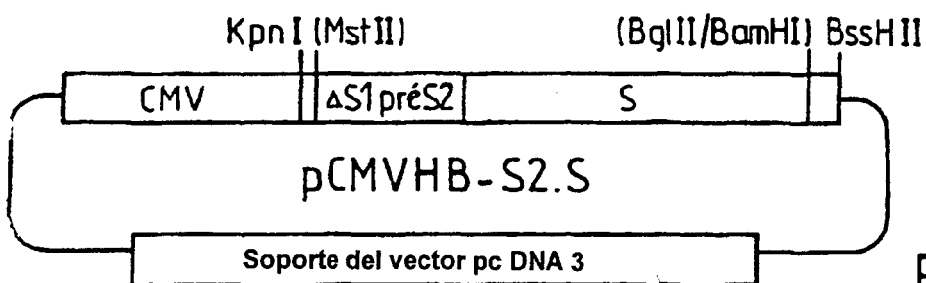


FIG.2B

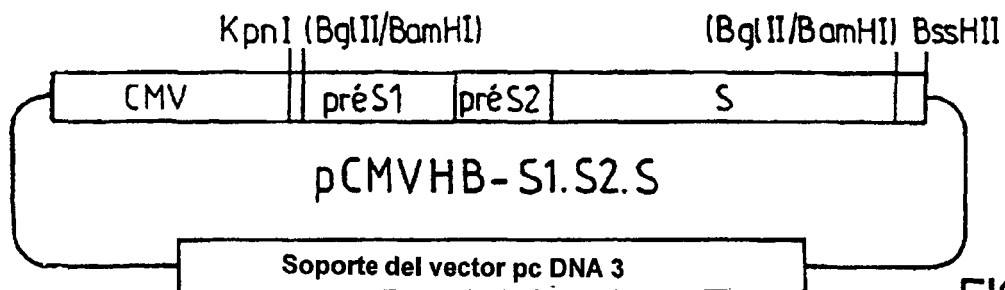


FIG.2C

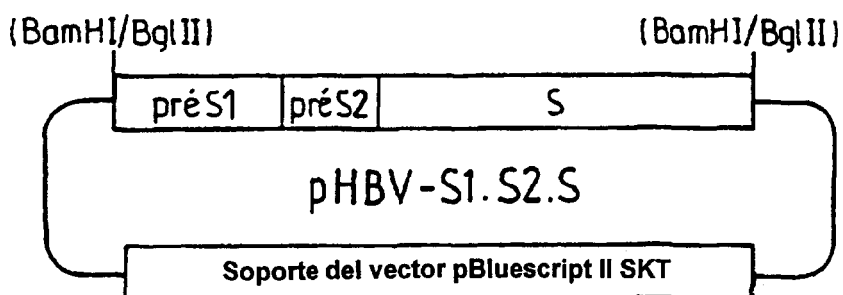


FIG.2D

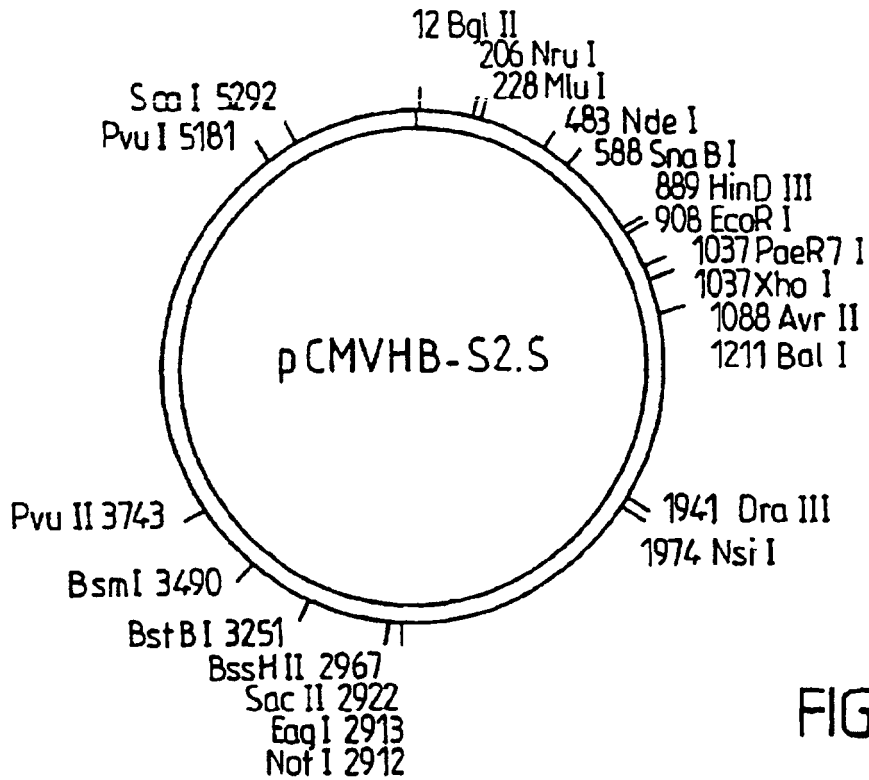


FIG. 3

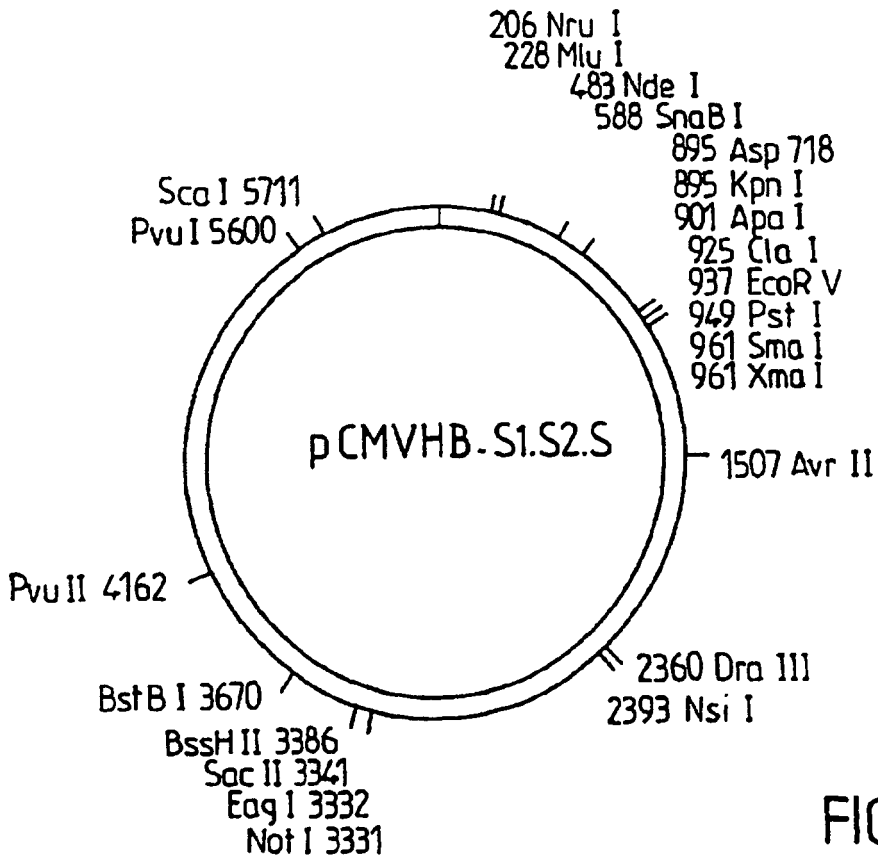


FIG. 4

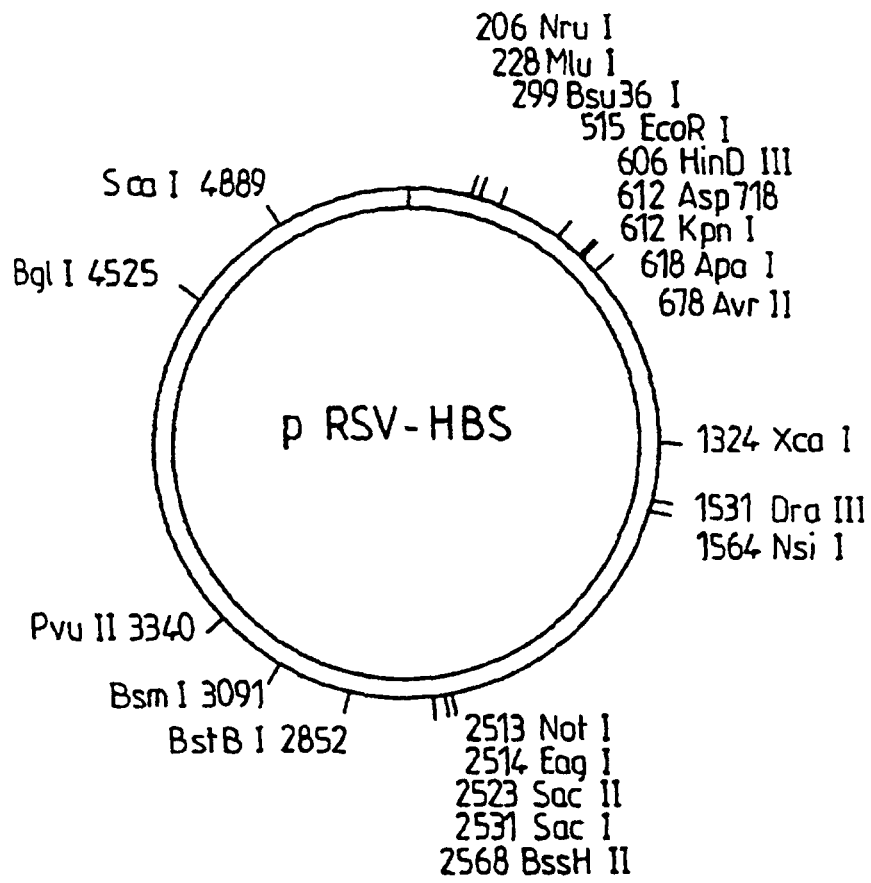


FIG. 5

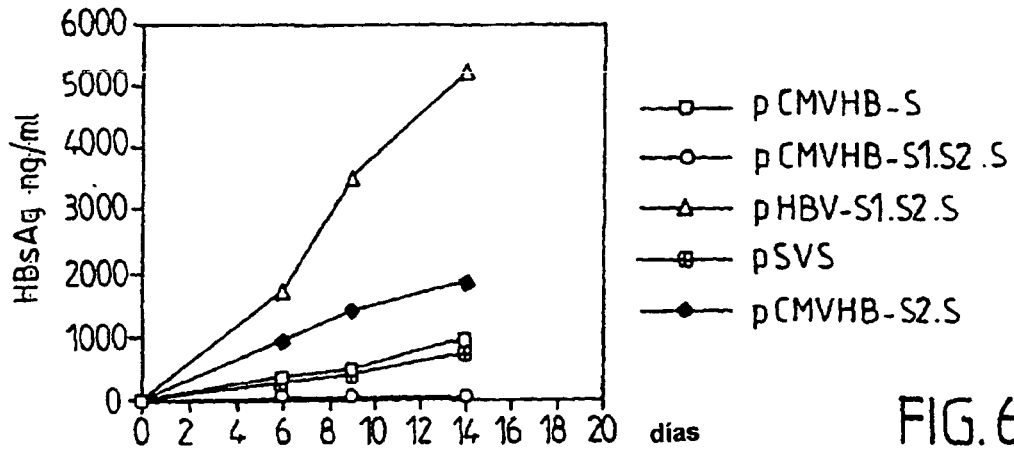


FIG. 6

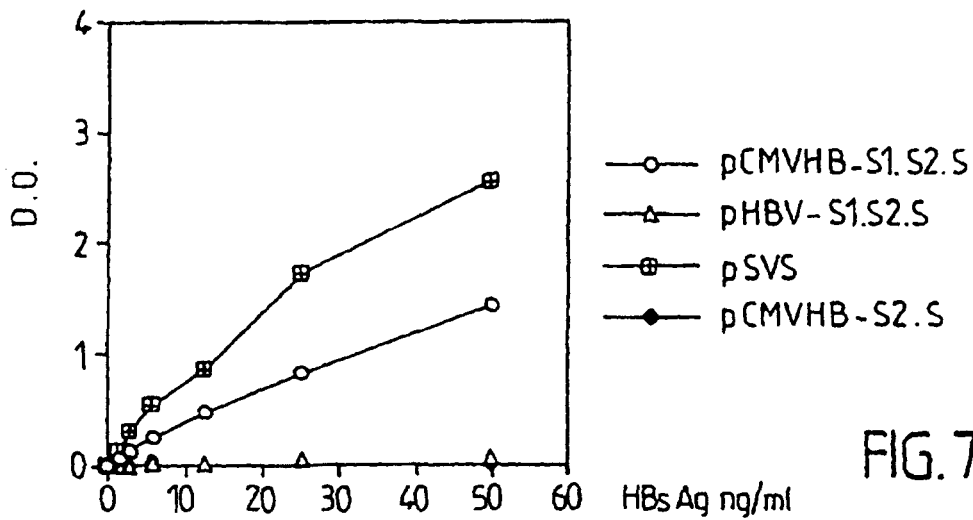


FIG. 7A

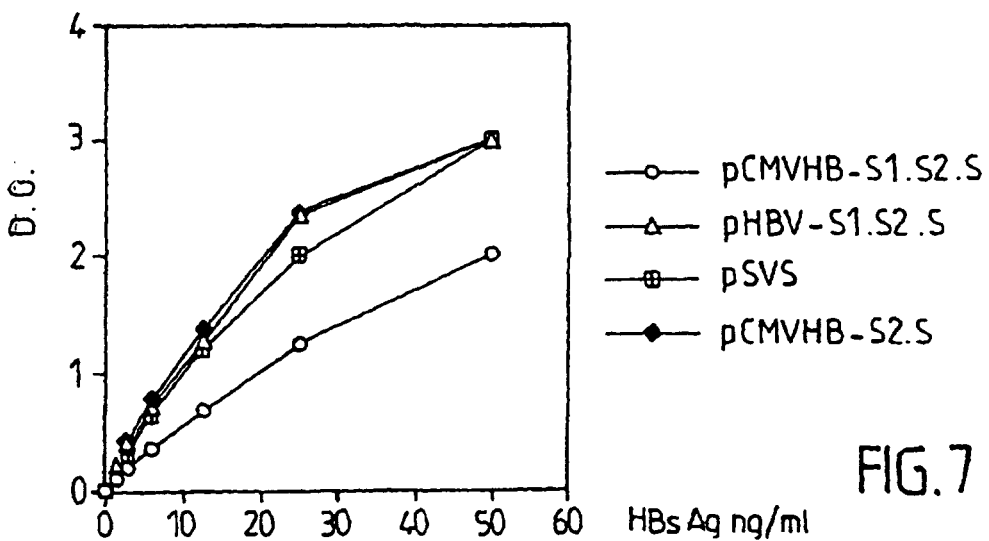


FIG. 7 B

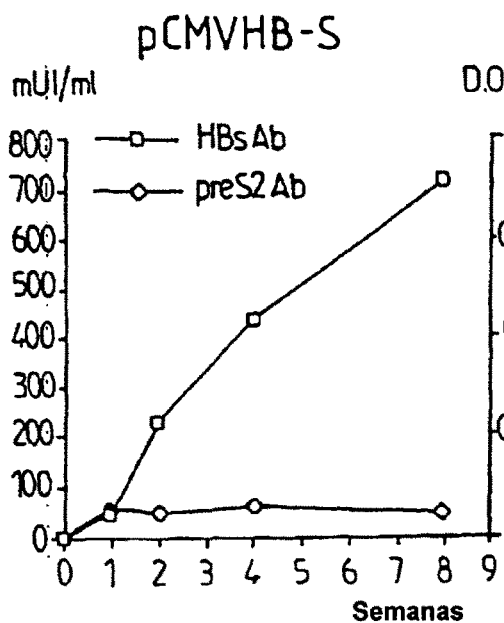


FIG. 8A

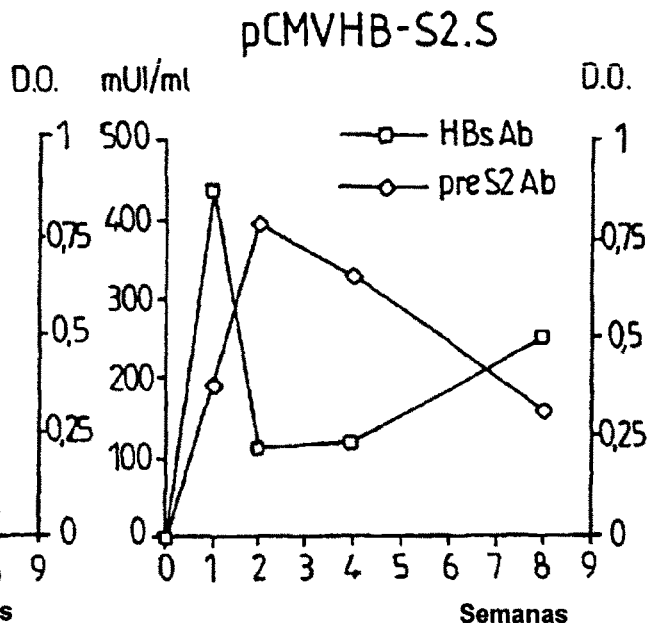


FIG. 8 B

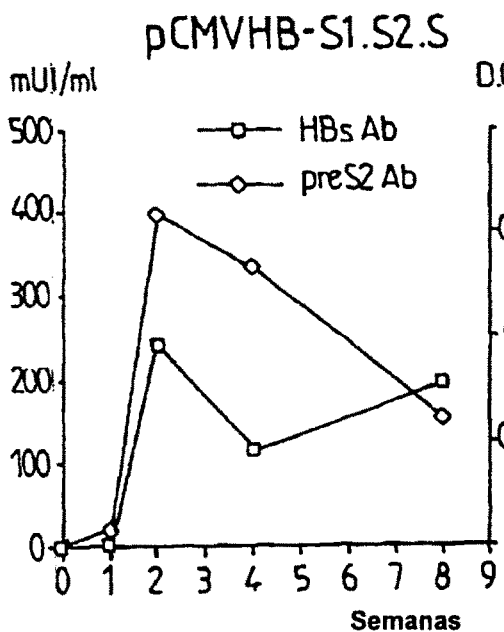


FIG. 8 C

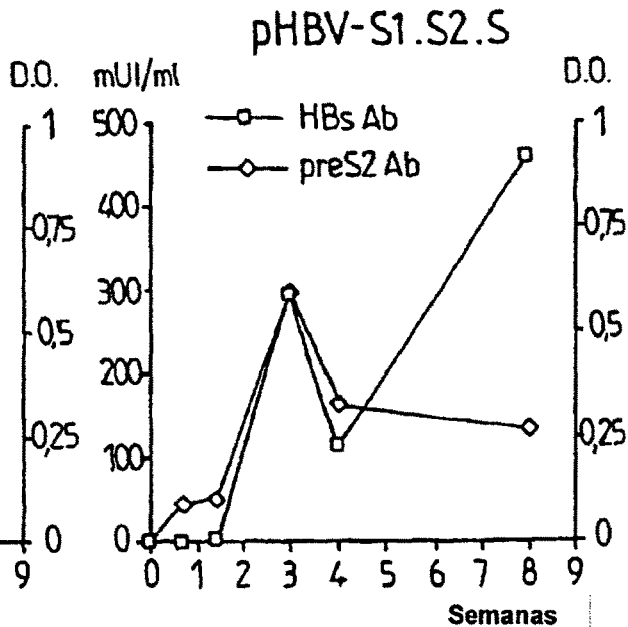


FIG. 8 D

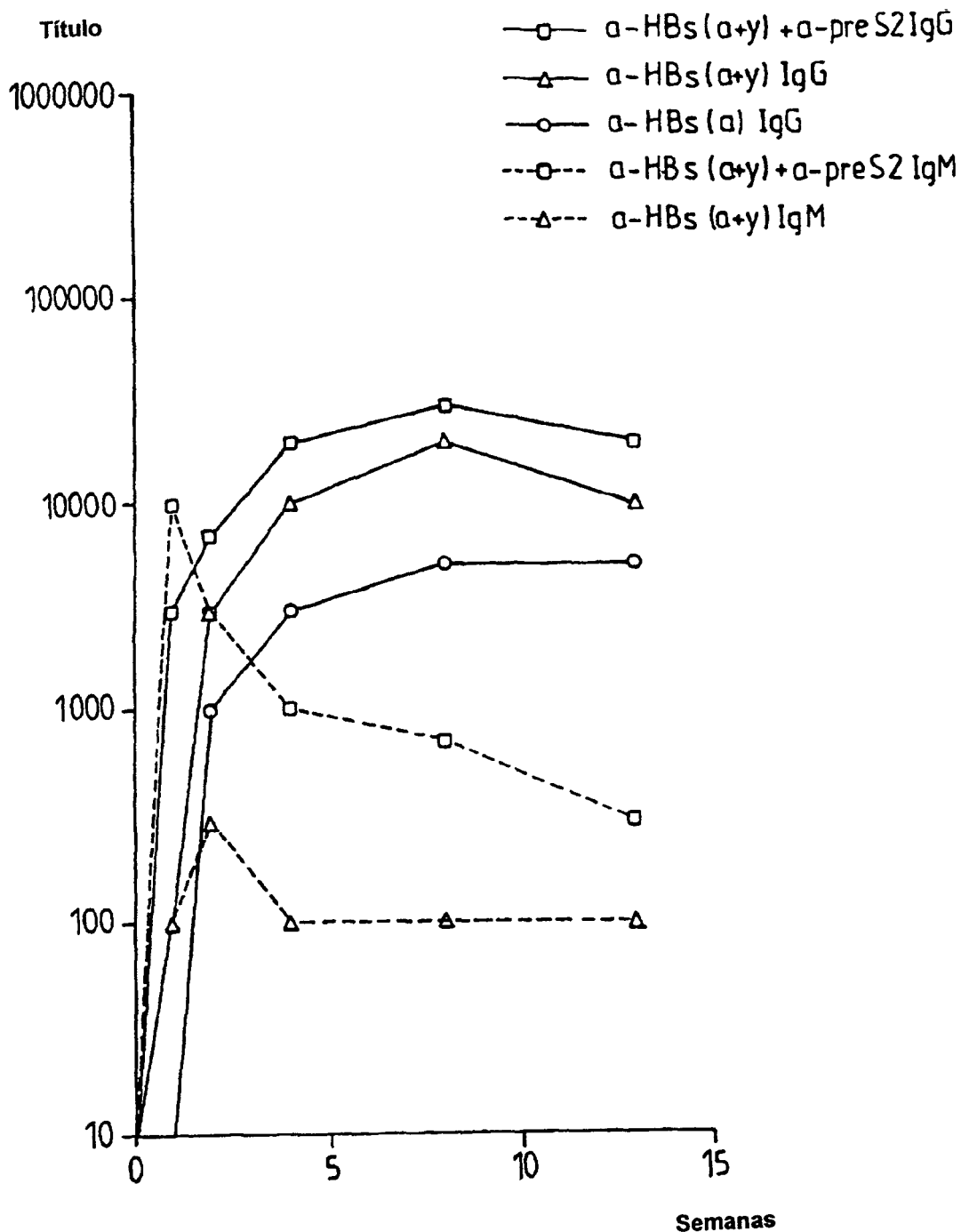
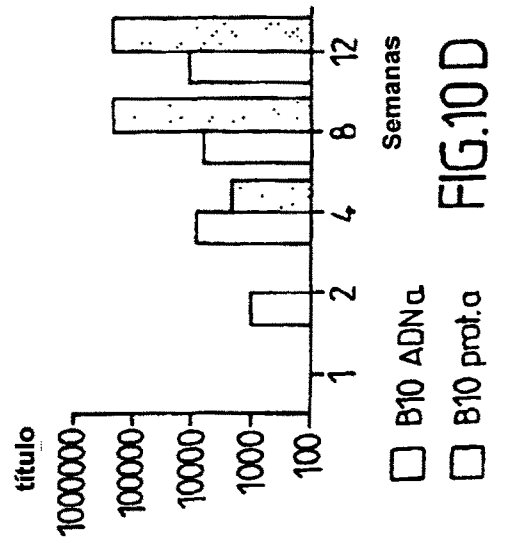
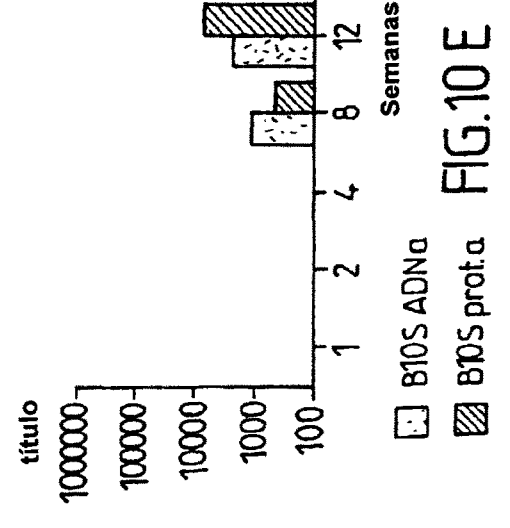
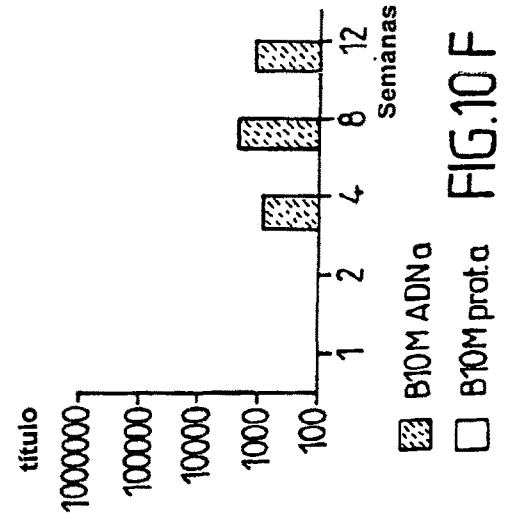
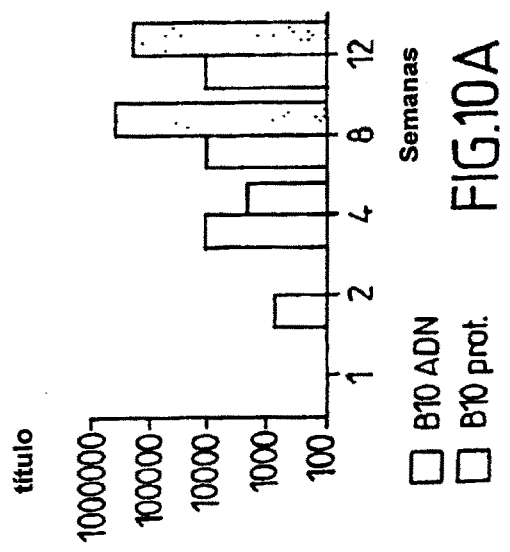
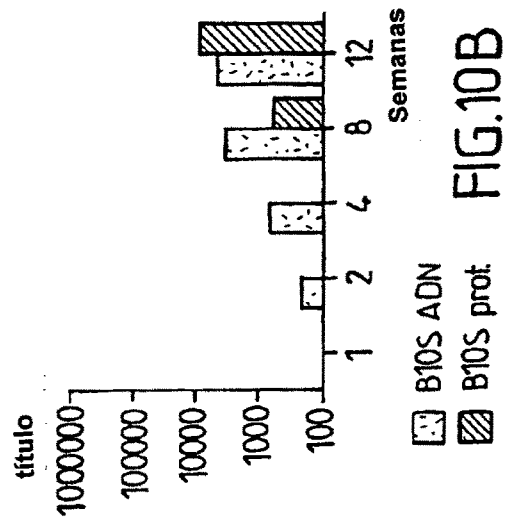
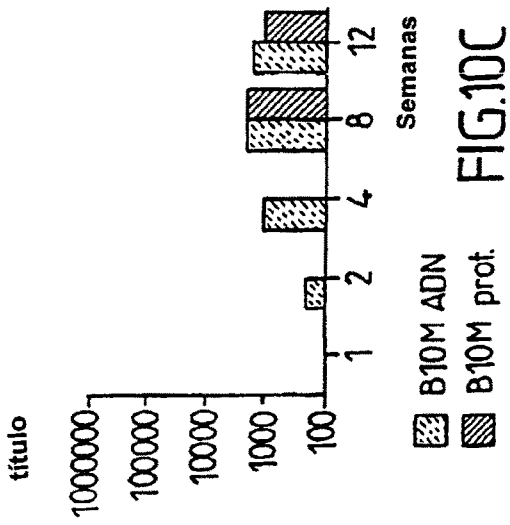


FIG. 9



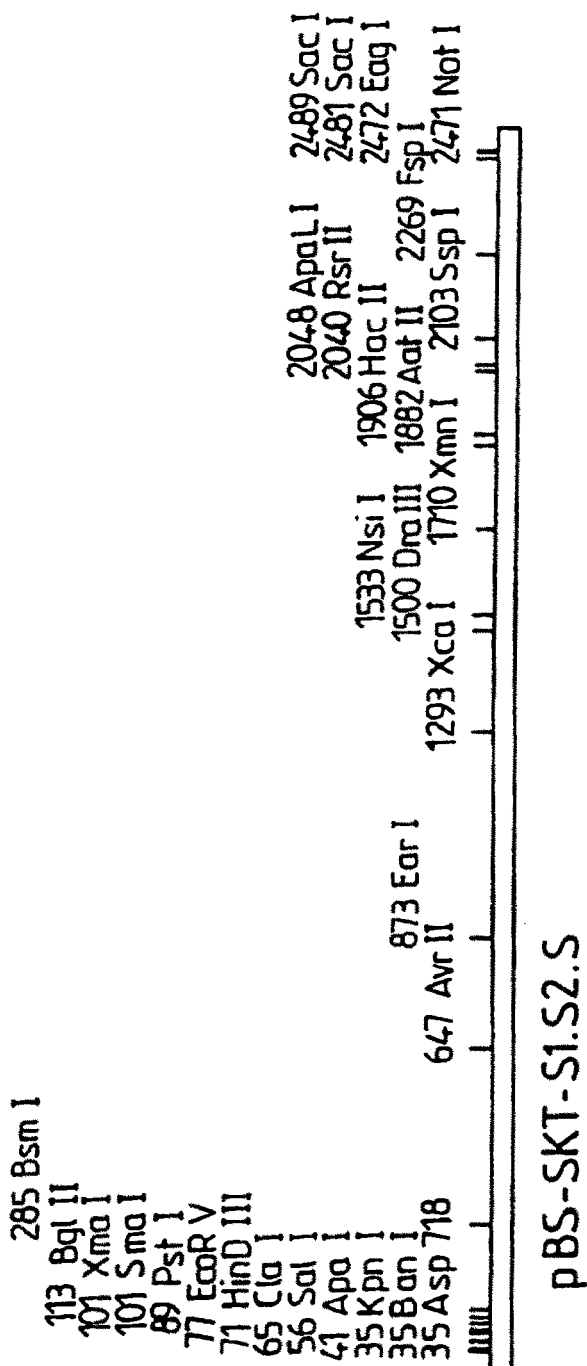


FIG.11

ES 2 270 416 T5

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: INSTITUT PASTEUR
 - (B) CALLE: 28, rue du Doctor Roux
 - 10 (C) CIUDAD: PARÍS
 - (E) PAÍS: FRANCIA
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 75724
- 15 (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Vector nucleotídico, composición que lo contiene y vacuna para la inmunización contra la hepatitis.
- (iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 1
- (iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- 20 (A) TIPO DE SOPORTE: disquete
 - (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/ MS-DOS
 - 25 (E) SISTEMA LOGÍSTICO: PatentIn Release #1.0, Versión # 1.25 (OEB)

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 1:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 5618 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) NÚMERO DE RAMIFICACIONES: doble
 - 35 (E) CONFIGURACIÓN: circular
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- 40 (vi) ORIGEN
- (B) CEPA: pRCCMV-HBS
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº:1:

45

50

55

60

65

ES 2 270 416 T5

GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTCGACTCT 40
 CAGTACAATC TGCTCTGATG CCGCATAGTT AAGCCAGTAT 80
 5 CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG 120
 CGAGCAAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG GCTTGACCGA 160
 CAATTGCATG AAGAATCTGC TTAGGGTTAG GCGTTTTGCG 200
 10 CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT 240
 GATTATTGAC TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC 280
 ATTAGTTCAT AGCCCATATA TGGAGTCCG CGTTACATAA 320
 15 CTTACGGTAA ATGGCCCCGCC TGGCTGACCG CCCAACGACC 360
 CCCGCCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT 400
 AACGCCAATA GGGACTTTCC ATTGACGTCA ATGGGTGGAC 440
 TATTTACGGT AAAGTCCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT 480
 20 ATCATATGCC AAGTACGCC CCTATTGACG TCAATGACGG 520
 TAAATGGCCC GCCTGGCATT ATGCCCAGTA CATGACCTTA 560
 TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA 600
 25 TCGCTATTAC CATGGTGATG CGTTTTTGGC AGTACATCAA 640
 TGGGCGTGGA TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT 680
 CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC 720
 AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC 760
 30 CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG 800
 GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA 840
 CTGCTTAACT GGCTTATCGA AATTAATACG ACTCACTATA 880
 35 GGGAGACCCA AGCTTGGTAC CGGGCCCCCC CTCGAGGATT 920
 GGGGACCCTG CGCTGAACAT GGAGAACATC ACATCAGGAT 960
 TCCTAGGACC CTTTCTCGTG TTACAGGCGG GGTTTTTCTT 1000
 40 GTTGACAAGA ATCCTCACAA TACCGCAGAG TCTAGACTCG 1040
 TGGTGGACTT CTCTCAATTT TCTAGGGGGA ACTACCGTGT 1080
 GTCTTGGCCA AAATTCGCAG TCCCCAACCT CCAATCACTC 1120
 45 ACCAACCTCT TGTCTCCAA CTTGTCTGG TTATCGCTGG 1160
 ATGTGTCTGC GGCCTTTTAT CATCTTCCTC TTCATCCTGC 1200
 TGCTATGCCT CATCTTCTTG TTGGTCTTC TGGACTATCA 1240
 50 AGGTATGTTG CCCGTTTGTG CTCTAATTCC AGGATCCTCA 1280
 ACAACCAGCA CGGGACCATG CCGGACCTGC ATGACTACTG 1320
 CTCAAGGAAC CTCTATGTAT CCCTCCTGTT GCTGTACCAA 1360
 ACCTTCGGAC GGAAATTGCA CCTGTATTCC CATCCCATCA 1400
 55 TCCTGGGCTT TCGGAAAATT CCTATGGGAG TGGGCCTCAG 1440
 CCCGTTTCTC CTGGCTCAGT TTAGTAGTGC CATTGTGTTCA 1480
 GTGGTTCGTA GGGCTTTCCC CCACTGTTTG GCTTTCAGTT 1520
 60 ATATGGATGA TGTGGTATTG GGGGCCAAGT CTGTACAGCA 1560
 TCTTGAGTCC CTTTTTACCG CTGTTACCAA TTTTCTTTTG 1600
 TCTTTGGGTA TACATTTAAA CCCTAACAAA ACAAAGAGAT 1640

65

ES 2 270 416 T5

5 GGGGTACTC TCTAAATTTT ATGGGTATG TCATTGGATG 1680
 TTATGGGTCC TTGCCACAAG AACACATCAT ACAAAAATC 1720
 AAAGAATGTT TTAGAAAAC TCCATTAAC AGGCCTATTG 1760
 ATTGGAAAGT ATGTCAACGA ATTGTGGGTC TTTTGGGTTT 1800
 10 TGCTGCCCT TTTACACAAT GTGGTTATCC TGC GTTGATG 1840
 CCTTTGTATG CATGTATTCA ATCTAAGCAG GCTTTCACTT 1880
 TCTCGCCAAC TTACAAGGCC TTTCTGTGTA AACAATACCT 1920
 GAACCTTTAC CCCGTTGCC GGC AACGGCC AGGTCTGTGC 1960
 15 CAAGTGTTTG CTGACGCAAC CCCACTGGC TGGGGCTTGG 2000
 TCATGGGCCA TCAGCGCATG CGTGGAACCT TTTCCGCTCC 2040
 TCTGCCGATC CATACTGCGG AACTCCTAGC CGCTTGTTTT 2080
 20 GCTCGCAGCA GGTCTGGAGC AAACATTATC GGGACTGATA 2120
 ACTCTGTTGT CCTATCCCGC AAATATACAT CGTTTCCATG 2160
 GCTGCTAGGC TGTGCTGCCA ACTGGATCCT GCGCGGGACG 2200
 25 TCCTTTGTTT ACGTCCCCTC GGCCTGAAT CCTGCGGACG 2240
 ACCCTTCTCG GGGTCGCTG GGA CTCTCTC GTCCCCTTCT 2280
 CCGTCTGCCG TTCCGACCGA CCACGGGGCG CACCTCTCTT 2320
 30 TACGCGGACT CCCCGTCTGT GCCTTCTCAT CTGCCGGACC 2360
 GTGTGCACTT CGCTTCACCT CTGCACGTCG CATGGAGACC 2400
 ACCGTGAACG CCCACCAAAT ATTGCCCAAG GTCTTACATA 2440
 35 AGAGGACTCT TGGACTCTCA GCAATGTCAA CGACCGACCT 2480
 TGAGGCATAC TTCAAAGACT GTTTGTTTAA AGACTGGGAG 2520
 GAGTTGGGGG AGGAGATTAG GTTAAAGGTC TTTGTACTAG 2560
 40 GAGGCTGTAG GCATAAATTG GTCTGCGCAC CAGCACCATG 2600
 CAACTTTTTT ACCTCTGCCT AATCATCTCT TGTTTCATGTC 2640
 CTACTGTTCA AGCCTCCAAG CTGTGCCTTG GGTGGCTTTG 2680
 45 GGGCATGGAC ATCGACCCTT ATAAAGAATT TGGAGCTACT 2720
 GTGGAGTTAC TCTCGTTTTT GCCTTCTGAC TTCTTTCCTT 2760
 CAGTACGAGA TCTGGCCAGG ATCCACTAGT TCTAGAGCGG 2800
 50 CCGCCACCGC GGTGGAGCTC CAGCTTTTGT TCCCTTTAGT 2840
 GAGGGTTAAT TGC GCGCATG CCCGACGGCG AGGATCTCGT 2880
 CGTGACCCAT GCGGATGCCT GCTTGCCGAA TATCATGGTG 2920
 55 GAAAATGGCC GCTTTTCTGG ATTCATCGAC TGTGGCCGGC 2960
 TGGGTGTGGC GGACCGCTAT CAGGACATAG CGTTGGCTAC 3000
 CCGTGATATT GCTGAAGAGC TTGCCGGCGA ATGGGCTGAC 3040

60

65

ES 2 270 416 T5

CGCTTCCTCG TGCTTTACGG TATCGCCGCT CCCGATTCGC 3080
 AGCGCATCGC CTTCTATCGC CTTCTTGACG AGTTCTTCTG 3120
 5 AGCGGGACTC TGGGGTTCGA AATGACCGAC CAAGCGACGC 3160
 CCAACCTGCC ATCACGAGAT TTCGATTCCA CCGCCGCCTT 3200
 CTATGAAAGG TTGGGCTTCG GAATCGTTTT CCGGGACGCC 3240
 10 GGCTGGATGA TCCTCCAGCG CGGGGATCTC ATGCTGGAGT 3280
 TCTTCGCCA CCCCAACTTG TTTATTGCAG CTTATAATGG 3320
 TTACAAATAA AGCAATAGCA TCACAAATTT CACAAATAAA 3360
 15 GCATTTTTTT CACTGCATTC TAGTTGTGGT TTGTCCAAAC 3400
 TCATCAATGT ATCTTATCAT GTCTGGATCC CGTCGACCTC 3440
 GAGAGCTTGG CGTAATCATG GTCATAGCTG TTTCTGTGT 3480
 20 GAAATTGTTA TCCGCTCACA ATTCCACACA ACATACGAGC 3520
 CGGAAGCATA AAGTGTAAG CCTGGGGTGC CTAATGAGTG 3560
 AGCTAACTCA CATTAATTGC GTTGCCTCA CTGCCCCGCTT 3600
 25 TCCAGTCGGG AAACCTGTCG TGCCAGCTGC ATTAATGAAT 3640
 CGGCCAACGC GCGGGGAGAG GCGGTTTGC TATTGGGCGC 3680
 TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG CGCTCGGTGC 3720
 30 TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT 3760
 AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG 3800
 AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAGGCC AGGAACCGTA 3840
 35 AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG TTTTCCATA GGCTCCGCC 3880
 CCCTGACGAG CATCACAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG 3920
 TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC 3960
 40 CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT 4000
 GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCCTTCT CCCTTCGGGA 4040
 AGCGTGGCGC TTTCTCAATG CTCACGCTGT AGGTATCTCA 4080
 45 GTTCGGTGTA GGTCGTTTCG TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA 4120
 CGAACCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT 4160
 AACTATCGTC TTGAGTCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT 4200
 CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC 4240
 50 GAGGTATGTA GCGGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG 4280
 CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT 4320
 GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG 4360
 55 TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT 4400
 GGTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA 4440

60

65

ES 2 270 416 T5

5 AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC 4480
 TGACGCTCAG TGGAACGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTTG 4520
 10 GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT 4560
 TAAATTAAAA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA 4600
 TGAGTAAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT 4640
 15 GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA 4680
 TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA CTACGATACG 4720
 GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG 4760
 20 CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA 4800
 ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC 4840
 AACTTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCGG 4880
 25 GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA 4920
 ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC 4960
 GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA 5000
 30 TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAG 5040
 CGGTTAGCTC CTTCGGTCCT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA 5080
 GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGCACTG 5120
 35 CATAATTCTC TTA CTGTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT 5160
 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA 5200
 GTGTATGCGG CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAATA 5240
 40 CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAAAGTGC 5280
 TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA AACTCTCAAG 5320
 GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT 5360
 45 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA 5400
 GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC 5440
 AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC 5480
 50 A TACTCTTCC TTTTTC AATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG 5520
 GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA 5560
 GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA 5600
 AAAGTGCCAC CTGACGTC 5618

55
60
65