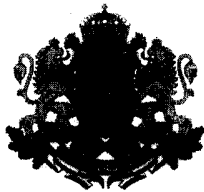


РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

(11) 106028A

(51) Int.Cl.

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

C12N 15/63 C12N 15/79 C12N  
15/11 A61K 48/00

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

<p>(21) Заявителски № 106028 (22) Заявено на 18.10.2001 (24) Начало на действие на патента от:</p> <p style="text-align: center;"><b>Приоритетни данни</b></p> <p>(31) 164034    (32) 30.09.1998    (33) US</p> <p>(41) Публикувана заявка в бюлетин № 12   29.12.2002 (45) Отпечатано на (46) Публикувано в бюлетин № на (56) Информационни източници:</p> <p>(62) Разделена заявка от рег. №</p>	<p>(71) Заявител(и): AMERICAN FOUNDATION FOR BIOLOGICAL RESEARCH, INC. . . , 20852 ROCKVILLE , 12111 PARKLAWN DRIVE MARYLAND ( US ) ; (72) Изобретател(и): MINCHEFF , Milcho S . , 20855 Rockville MARYLAND ( US ) ; LOUKINOV , Dmitri I . , 20874 Germantown MARYLAND ( US ) ; ZOUBAK , Serguei . , 20874 Germantown MARYLAND ( US ) ; (74) Представител по индустриална собственост: Георги Цветанов Перев , 1124 София , ул. "Леонардо да Винчи" 3</p> <p>(86) № на PCT заявка: PCT/ US99/2 / 0508 , 09.09.1999 (87) № и дата на PCT публикация: WO2000/18933 , 06.04.2000</p>
--	---

**(54) ИМУНОТЕРАПИЯ НА РАК ЧРЕЗ ЕКСПРЕСИЯ НА СКЪСЕН ТУМОРЕН ИЛИ ТУМОР-АСОЦИИРАН АНТИГЕН**

(57) Изобретението се отнася до ДНК конструкти - скъсени форми на специфични ракови или рак-асоциирани антигени, включени в плазмид или вирусен експресионен вектор. Използването на конструкти на скъсена, а не на цяла молекула цели да се отстранят страничните ефекти (токсичност, сигнална трансдукция и т.н.), възникващи при експресията на белтъци и/или в случаите, когато такива молекули се експресират въ рху мембраните, секретират се или се освобождават в извънклетъчната среда, за да се предотврати образуването на антители срещу тях. Клонирана е извънклетъчната част на човешкия, специфичен за простатн и клетки, мембранен антиген (ХС-PSMA). Пациентите се лекуват или чрез инжектиране на ДНК кодираща ХС-PSMA, включена в експресиращ се в бозайници под контрола на CMV промотор вектор, и/или чрез нереплициращ се аденовирусен вектор - шапка (Ad5), съдържащ експресионна клетка за ХС-PSMA. При третия метод се изолират дендритни клетки от пациент и се култивират в присъствието на плаزمид или аденовируса , използвани в предишните две манипулации. След това дендритните клетки се инжектират в пациента. При някои пациенти развитието на метастази на рак на простатата се забавя или спира. 32 претенции , 0

BG 106028 A

1988/01-ГП

**ИМУНОТЕРАПИЯ НА РАК, ЧРЕЗ ЕКСПРЕСИЯ НА СКЪСЕН  
ТУМОРЕН ИЛИ ТУМОР-АСОЦИИРАН АНТИГЕН**

**ОБЛАСТ НА ТЕХНИКАТА**

Настоящото изобретение се отнася до конструкти и методи за имунотерапия на пациенти с рак.

**ПРЕДШЕСТВАЩО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА**

Всички нормални човешки ядрени клетки експресират върху мембраните си малки, получени чрез *de novo* белтъчна синтеза фрагменти. Тези т.нар. пептиди се асоциират с молекулите на главния комплекс за тъканна съвместимост (МНС) клас I и формират антигените, разпознаващи се от CD 8+ цитотоксичните Т-лимфоцити (CTLs). Това разпознаване е много важно за елиминирането на инфектирани с вирус клетки, туморни клетки или клетки съдържащи вътреклетъчни паразити. За да се осъществи такова активиране на антиген-реактивните Т клетки, необходимо е те да бъдат "предварително обучени", чрез разпознаване на въпросния антиген, върху мембраната на професионалните антиген-представящи клетки (дендритни клетки) (APCs, DCs), които освен антигена, осигуряват, ко-стимулиращи сигнали за "съзряване" на Т клетките. В отсъствие на такива сигнали, Т-клетките остават парализирани и толерантни по отношение на въпросните антигени.

Туморните клетки, които не са професионални APCs, не стимулират образуването на CTL и не се отхвърлят от имунната система. За индуцирането на имуен отговор срещу тумор,

необходимо е туморният антиген(и) да се експресира(т) от професионалните APCs. Това представяне се осъществява, чрез култивиране на дендритни клетки *in vitro*, в присъствие на туморни лизати, съдържащи предимно туморни антигени; в присъствие на пречистени туморни антигени; или на пептиди, произхождащи от такива антигени.

Друга възможност за постигане на експресия на пептид, с антигенен произход е чрез въвеждането в дендритни клетки на дезоксирибо- (ДНК) или рибонуклеинова киселина (РНК), кодираща съответния антиген. Клетките, трансфектирани с плазмидна ДНК синтезират за кратко белтъка и пептидите получени по време на синтезата, след това се експресират асоциирани с МНС. Например, *in vitro* култивирани клетки от пациенти, се трансфектират с плаزمиди, съдържащи съответната ДНК или РНК, или се инфектират с рекомбинантен вирусен вектор, който съдържа тези ДНК или РНК, и след това се връщат в пациента. Друга възможност е директното имунизирание на пациента с плазида (имунизация с "гола" ДНК) или с рекомбинантния вирусен вектор.

Главния проблем при тези процедури идва от възможните неблагоприятни ефекти на експесираните продукти, върху здравето на пациента или върху клетъчната жизнеспособност. Тъй като функцията на тези тумор-асоциирани или тъканно-специфични антигени е в голяма степен неизяснена, тяхната *in vivo* синтеза и секреция от клетките на пациента, може да доведе до сериозни странични ефекти. Освен това, в случаите, в които дендритните клетки се трансфектират *in vitro*, експресията на функционален белтък може да промени жизнеността на дендритните клетки, техния миграционен модел или тяхната способност за Т клетъчно ко-стимулиране.

### ТЕХНИЧЕСКА СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Настоящото изобретение, разкрива идеята за въвеждане на специфични промени в ДНК или РНК, кодираща въпросния антиген, като начин за решаване на този проблем. Тези промени водят до експресията на функционално неактивни продукти, без това да се отрази на ефективността на транскрипцията и транслацията на ДНК, транслацията на РНК, или образуването на антигенни пептиди. По-специално, настоящото изобретение описва създаването на ДНК, която води до експресия на скъсена форма на човешкия специфичен за простатните клетки мембранен антиген (PSMA). По-точно, ние създадохме ДНК конструктор с делеции в мембранните и вътреклетъчните части на човешкия PSMA. Получената ДНК, кодираща извънклетъчната част на PSMA (XC-PSMA) е вкарана във вектори, експресиращи се от клетки на бозайници. PSMA представлява белтък тип II, на който липсва хидрофобната сигнална последователност и затова не се секретира от клетките, които го продуцират. Тъй като в нашия конструктор липсват мембранните и цитоплазмени последователности, получения белтък не се експресира върху мембраната и затова не предава сигнали, и не се освобождава от нея. Клетки трансфектирани с плазмида XC-PSMA, запазват жизнеспособността си и експресират пептиди, произхождащи от PSMA.

Освен това, тъй като синтезираният белтък не се освобождава, но остава в обкръжението на вътреклетъчната среда, продукция на антитела, насочени срещу белтъка липсва и имунният отговор остава стриктно клетъчно медиран. Финото ангажиране на клетъчно-медирания имунитет срещу специфичен антиген е много важно, особено в случаите когато съответният прицелен антиген се експресира в нормални тъкани, анатомично отделени в имуно-

толерантни места, като окото, мозъка, тестисите и т.н. Тези тъкани са неподатливи на клетъчно-медирано разрушаване, но лесно се увреждат от антитела. Имуноterapiaта, на базата на клетъчни отговори, към антигени (тирозиназа; gp100; TRP1; TRP2; MART-1/Melan-A; мембранно-асоцииран муцин, MUC-1 муцин) на диференцирани клетки или нормални тъканно-специфични (PSMA, PSA) антигени, са пример, при който продукцията на антитела срещу прицелните клетки не е необходима.

При първия метод за лечение на пациенти с рак на простатата, плазмидът се инжектира интрадермално. При втория метод на лечение, плазмидът се включва в генома на нереплициращ се аденовирус, който се инжектира в пациента интрадермално. При третия метод на лечение, моноцитни клетки CD 14 + от пациент с рак на простатата се изолират, стимулира се тяхната диференциация до дендритни клетки (DC) и се трансфектират или с плазида, или с аденовируса от първите два метода. След това се стимулира експресията на MHC от DC и те се връщат обратно в пациента, с рак на простатата, където стимулират автоложните T-клетки. Така стимулираните T-клетки, разрушават както нормалните, така и малигнените простатни клетки.

Ефектът от всички тези лечения е да се преодолее нормалната толерантност към собствени антигени, или толерантността към туморни антигени. Това ще позволи цитолизата на прицелните нормални и малигнени простатни клетки, които обикновено са имунно неразпознаваеми. Разрушаването на нормалните простатни клетки, чрез този метод не е пагубно за пациента. Малигнени простатни (смесени или нормални и малигнени) клетки, обикновено се отстраняват хирургично или чрез облъчване според общоприетото, първоначално лечение на това заболяване.

U.S. Патент 5,227,471 описва структурата на специфичен за простатните клетки мембранен антиген. Описан е метод за лечение на рак на простатата, който включва антитяло и свързан към него цитотоксичен агент, насочено срещу специфичния за простатните клетки мембранен антиген. Обаче, тъй като PSMA се експресира върху нормалните мозъчни клетки, недопустимо е използването на антитела, които могат да преминат през кръвно-мозъчната бариера и да увредят тези клетки. Описани са също така методи за доказване на рак на простатата и имуно-анализ за измерване на количеството на специфичния за простатните клетки мембранен антиген.

U.S. Патент 5,788,963 описва използването на човешки дендритни клетки за активирането на Т клетки към имуно-терапевтичен отговор срещу първичен и метастазиращ рак на простатата. Човешките дендритни клетки са изолирани и култивирани *in vitro*, в присъствието на PSMA или произхождащи от него пептиди. Счита се, че PSMA или пептидите се обменят с пептиди, вече свързани с МНС молекулите на дендритните клетки и така те могат да се експресират по имуногенен начин, позволявайки на DC да стимулират килърите (клетките - убийци), които впоследствие да лизират простатните клетки.

U.S. Патенти 5,227,471 и 5,788,963 са включени тук в литературната справка.

Настоящото изобретение се различава от предшестващото ниво на техниката с това, че чрез трансфекция с плазмид или аденовирус, се стимулират DC да представят върху тяхната повърхност антигена, произхождащ от простатни ракови клетки. Може да бъде извършена *in vivo* трансфекция, чрез инжектиране на плазмид или аденовирус. Съответно трансфекцията може да бъде осъществена *in vitro*, чрез използване на пречистени прекурсорни DC, изолирани от кръв на пациенти с рак на простатата. Ако

трансфекцията се извърши *in vitro*, трансформираните клетки се инжектират в пациента. Трансфектираните DC клетки превъзхождат *in vitro* култивираните в присъствие на антиген DC клетки, тъй като те носят антиген-произхождащия пептид и поради тяхната способност да стимулират клетките - килъри с по-голяма ефективност. Също така, *in vivo* трансфекцията, при която се използва плазмид или аденовирус е по-малко трудоемка и по-евтина в сравнение с *in vitro* методите. Използването на трансфектирани клетки, избягва необходимостта от идентифициране на пептиди, способни да се свързват с различни HLA фенотипове, както се изисква при методите, които включват добавяне на пептиди към клетките. В заключение, използването на ДНК последователност, която кодира непълна молекула на PSMA, гарантира, че белтъкът не се освобождава от трансфектираните клетки и не се продуцират никакви антитела срещу прицелния белтък, които са потенциално опасни за нормалната мозъчна тъкан. Чрез методите от настоящото изобретение, се преодолява нормалната толерантност към собствените антигени. Това позволява цитолизата на прицелни клетки, които по принцип са имунно неразпознаваеми.

Друго приложение, включва лечение на пациенти с меланом. Антигенът на меланоцитната диференциация MART-1 е общ меланомен антиген, разпознаван от много CTL на пациенти с меланом. Той представлява мембранен белтък от 118 аминокиселини и единичен трансмембранен домен. ДНК кодираща както непълната форма, без трансмембрания домен или целия белтък без водещата секвенция, се включва в плазмид или вирусен експресионен вектор и се използва за имунотерапия, подобна на описаната за пациенти с рак на простатата.

Друго приложение включва лечение на пациенти с рак на гърдата, рак на яйчника, рак на матката, и рак на простатата или

белодробен рак. Антигенът Her-2/neu е представител на групата рецептори за епидермалния фактор и се предполага, че функционира като рецептор за растежни фактори. Той е трансмембранен белтък и се експресира по време на зародишното развитие и много слабо в нормалните клетки, като единични копия. При много тумори при човека е идентифицирана амплификация на гена, и/или свръхекспресия на асоциирания белтък, например тумори като рак на гърдата, на яйчника, на матката, на стомаха, на простата и на белия дроб. Конструирана е ДНК кодираща скъсена форма на Her-2/neu белтъка, без трансмембранната част и водещата последователност, която е включена в плазмиден или вирусен вектор(и) и е използвана за *in vitro* или *in vivo* модификация на DC на пациенти и за имунотерапия.

### **ПОДРОБНО ОПИСАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО**

Настоящото изобретение описва идеята за конструиране на генетично модифицирани форми на полинуклеотиди, кодиращи тъканно-специфични или туморни антигени и за използване на тези конструкти за имунотерапия на първичен или метастазиращ рак. Генетичните модификации на конструктите водят или до експресията на функционално неактивни продукти или възпрепятстват функционално активните молекули или да се секретират или да се експресират върху мембраните на трансфектираните клетки. Такива генетични модификации обаче, не повлияват антигенността на експресирания белтък, неговата първична структура или образуването на пептиди, способни да се свързват с МНС молекулите на клетките. Полинуклеотидът може да бъде или ДНК, или РНК последователност. Когато полинуклеотидът е ДНК, той може също да бъде ДНК последователност, която не се

реплицира, но може да се включи в плазмид и плазмидът допълнително да включва репликатор. ДНК може да бъде секвенция конструирана така че, да не се интегрира в генома на клетката гостоприемник. Полинуклеотидните последователности могат да кодират полипептид, който или да се съдържа в клетките или да се секретира от тях, или могат да включват секвенция, която да насочва секрецията на пептида.

ДНК последователността може също да включва промоторна последователност. В един предпочитан вариант, ДНК последователността включва клетъчно-специфичен промотор, който позволява по същество транскрипция на ДНК само в предварително детерминирани клетки. ДНК може да кодира също полимеразата за ДНК транскрипцията, може да съдържа разпознавани от полимеразата места, а препаратите за инжектиране могат да включват първоначално количество от полимеразата.

В много случаи се предпочита транслацията на полинуклеотида да продължи ограничен период от време, така че доставянето на полипептида да става за кратко време. Предимството на полипептида е, че той може да бъде терапевтичен полипептид и може да включва ензим, хормон, лимфокин, рецептор, по специално клетъчно повърхностен рецептор, регулаторен белтък, например като растежен фактор или друг регулаторен представител, или какъвто и да е друг белтък или пептид, който е желателно да бъде доставен до клетките в гръбначните животни и за който съответната ДНК или мРНК може да бъде получена.

В предпочитани варианти, полинуклеотидът се въвежда в мускулната тъкан; в други варианти, полинуклеотидът се въвежда в кожата, мозъка, белия дроб, черния дроб, далака или кръвта. Препаратът се инжектира в гръбначните животни по различни начини, които могат да бъдат - интрадермален, подкожен,

инtrateкален или интравенозен, или може да бъде поставен в телесните кухини. В предпочитан вариант, полинуклеотидът се инжектира вътремускулно. В други варианти, препаратът включващ полинуклеотида се въвежда в кожата. Обсъжда се също така трансдермално въвеждане, както и инхалация.

Един от примерите за този подход е използването на ДНК, кодираща скъсена форма на човешки PSMA, в която липсват мембранната и цитоплазмената част на молекулата. Такава ДНК е включена от нас във вектор, експресиращ се в бозайници: плазмид и неразмножаващ се вирус.

За лечение на пациенти с рак на простатата, дендритни клетки се трансфектират или с плазмид или с рекомбинантен нереплициращ се аденовирус, чиято ДНК включва ДНК кодираща скъсен фрагмент на специфичния за простатните клетки мембранен антиген. Дендритните клетки могат да се трансфектират *in vivo* чрез инжектиране на плазмид или рекомбинантен нереплициращ се аденовирус в пациента. От друга страна, DC могат да се трансфектират (инфектират) *in vitro* чрез третиране на изолирани прекурсорни дендритни клетки с плазмид (или рекомбинантен нереплициращ се аденовирус). След това, дендритните клетки се инжектират в пациента.

Без да искат да се придържат към тази теория, изобретателите вярват, че успешната имунотерапия изисква прицелният антиген да бъде представен от дендритните клетки, едновременно до хелперите (помощниците) (CD 4+ Т клетки) и до ефекторите (CD 8+ Т клетки) на имунната система. Разпознаването от CD 4+ Т клетки изисква антигенните пептиди да бъдат експресирани заедно с клас II МНС молекулите върху повърхността на DC. Това може да се постигне чрез *in vivo* или *in vitro* трансфекция на DC с плазмид, или

чрез инфектиране на DC с рекомбинантен аденовирус, като и двата вектора носят ДНК за извънклетъчния участък на PSMA.

Експресията на PSMA е ограничена до епителните клетки на простатата (Horoszewicz JS, Kawinski E and Murphy GP. Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostate cells and serum of prostate cancer patients. *Anticancer Res.* 7:927;1987) и до мозъчна тъкан при човека (Luthi-Carter R, Barczak AK, Speno H, Coyle JT. Molecular characterization of human brain N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase (NAALADase). *J Pharmacol. Exp. Therap.* 286:1020;1998). Антигенът се експресира върху нормални и неопластични клетки на простатата или върху туморни метастазиращи клетки на простатата. Докато други маркерни антигени за карцинома на простатата, като киселата фосфатаза на простатата и специфичен за простатните клетки антиген (PSA) се секретират, PSMA представлява интегрален мембранен гликопротеин.

### **Клониране на извънклетъчния фрагмент на PSMA**

кДНК на извънклетъчния PSMA фрагмент (2118 нд) се получава от тотална мРНК, от туморна клетъчна линия на простатата LNCaP.FGC-CRL 1740 (ATCC). За обратната транскрипция на мРНК е използван специфичен за PSMA 3' праймер и обратна транскриптаза (RT) на птичи миелобластозен вирус (Boehringer). Получената кДНК след това се амплифицира, чрез Високо Ефективна PCR Система (Boehringer), PCR продуктите, с очакваната големина, се пречистват от гела и се клонират в pCR2.1 вектор (Invitrogen). Два клона са избрани и проверени чрез ДНК секвениране. Полученият конструктор носи последователност в която липсва мутация в извънклетъчния PSMA участък, към 5' края на

която при PCR амплификацията е добавена NotI-Kozak секвенция, а към 3' края - SfuI последователност.

**Приготвяне на експресиращ се в клетки от бозайници вектор,  
за субклонироване на извънклетъчната част на PSMA.**

За субклонирането се използва модифицирана форма на вектора pcDNA3.1 (Invitrogen). Векторът носи промотор/енхансерен район, кодиращ човешки цитомегаловирусни (CMV) белтъци, експресиращи се в ранните етапи на инфекцията, който позволява високо ефективна експресия на рекомбинантен белтък, както и 3' фланкираща област, съдържаща полиаденилиращ сигнал за говежди растежен хормон, който дава възможност за по-ефективна терминация на транскрипцията и за удължаване на полу-живота на мРНК *in vivo*. Генът за резистентност към неомицин (NRG) се отстранява чрез изрязване с NaeI ендонуклеазата, и последващо лигиране на краищата след пречистване на NRG - свободния фрагмент от гела.

**Субклонироване на извънклетъчния участък на PSMA в  
експресиращ се от клетки на бозайници вектор.**

Извънклетъчният фрагмент от PSMA е субклонирован в NotI-SfuI ендонуклеазните места в модифицирания, експресиращ се в бозайници вектор - pc DNA 3.1. Местата NotI и SfuI, както и Kozak последователността са въведени при RT-PCR етапа на клонирането.

**Депозирание на модифициран, експресиращ се в клетки на бозайници вектор рс DNA3.1.**

Модифицираният вектор, експресиращ се в клетки на бозайници, е депозиран под № 203 168, от 28 Август, 1998 год. в American Type Culture Collection, 10801, University Blvd, Manassas, Virginia, 20110.

**Приготвяне на рекомбинантен, нереплициращ се аденовирус Ad5-PSMA.**

Ad5-PSMA рекомбинантният аденовирус е приготвен чрез използване на кит от Quantum Biotechnology Inc. Пренасящия вектор, се конструира, чрез субклонирание на извънклетъчния участък на PSMA, в плазмида рAdBN (Quantum). За тази цел PSMA фрагментът е предварително субклониран в немодифицирана форма рCDNA3.1 вектор (Invitrogen). Участъкът от плазмидата, който съдържа CMV промотора - PSMA фрагмента - поли-А сигнала, се изрязва, чрез BglII и SmaI рестрикционни ендонуклеази. Полученият продукт е пречистен от агарозен гел и субклониран в BglII-EcoRV местата на рAdBN пренасящия вектор (Quantum Biotechnologies Inc., Montreal, Canada).

Линейната форма на Аденовирусната ДНК, е приготвена чрез ClaI, и ко-трансфектирана в 293 А клетки. Рекомбинантният аденовирус е пречистен три пъти и клониран и са подбрани позитивните клонове, експресиращи PSMA чрез имуноблотинг. Позитивният клон е амплифициран в 293 клетки и след това пречистен чрез два последователни градиента на CsCl. Накрая, пречистеният вирус, се диализира срещу 5 % захарозен разтвор на PBS.

Нереплициращият се рекомбинантен аденовирус Ad5-PSMA е депозирал в American Type Culture Collection под № \_\_\_\_\_ от 28 Август 1998, 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110.

### **IN VITRO ЕКСПЕРИМЕНТИ**

#### **Генен трансфер чрез нереплициращ се аденовирус.**

От прясно взета кръв от здрави анонимни донори са изолирани мононуклеарни клетки на периферната кръв (PBMC), чрез центрофугиране в плътностен Ficoll-Paque градиент при 468 g на 22 ° C за 30 минути. PBMC,  $1 \times 10^6$  клетки/ml, се ресуспендират в културална среда RPMI с 5% автоложен серум (пълна среда - CM) и оставени да адхерират в 175 cm<sup>2</sup> полистиренови културални матраци. Матраците се инкубират за на 37°C, и се разклащат всеки 20 минути по време на инкубацията. Неадхериралите клетки се отстраняват след 1 час на 37°C и адхериралите клетки се култивират в 30 ml среда, съдържаща 2 ng/ml гранулоцитен - макрофагов колонио стимулиращ фактор (GM-CSF) получен от Immunex, Seattle, WA и 4 ng/ml интерлевкин-4 (IL-4), получен от Sigma. Клетките са култивирани 5 дена, след което дендритните клетки (DCs) се събират чрез центрофугиране и след контрол под светлинен микроскоп, и flow-цитометрия са използвани в експериментите.

DCs са инфектирани с вируса при мултиплициране на инфекцията (MOI) 100. Експериментите, включващи инфектиране се провеждат в полипропиленови епруветки, за да се избегне клетъчната адхезия. 50 µl от вирусната суспензия се инокулират в 50 µl клетъчна суспензия ( $1.5 \times 10^6$  клетки) в пълна RPMI-1640 среда, съдържаща 2% автоложен серум. След инокулирането, клетките се инкубират за 90 минути на 37°C и 5%CO<sub>2</sub> в пълна RPMI-1640 среда,

съдържаща 2% автоложен серум, след което се промиват трикратно и инкубират в RPMI-1640 среда, съдържаща 10 % автоложен серум за още 24 часа на 37<sup>0</sup>C и 5% CO<sub>2</sub>. Експресията на PSMA е изследвана чрез имуноблотинг. Ефективността на аденовирусната инфекция на DC в нашите експерименти е 20 %, т.е. 20% от DC са инфектирани с рекомбинантен аденовирус.

В допълнителни експерименти DCs са получени от HLA-A2+ пациенти, инфектирани с аденовирус и култивирани в CM за 3 дена при 37<sup>0</sup>C, в присъствието на автоложни Т клетки. В края на инкубацията Т клетките се събират, CD 8+ Т клетките се пречистват на база на негативна селекция чрез анти-CD 4+ антитела и се анализира тяхната цитотоксичност. CD8+ Т клетките стимулирани от автоложните DC, инфектирани с Ad5-PSMA, са цитотоксични към туморната линия на простатата LNCaP.FGC (с HLA A2+ фенотип), но не и към Jurkat (Т левкемия) или U937 (миеломоноцитна клетъчна линия) клетки. За сравнение, прясно изолирани Т клетки не показват цитотоксичност срещу която и да е от трите клетъчни линии.

### **IN VIVO ЕКСПЕРИМЕНТИ**

#### **Лечение на пациенти с плазмид или аденовирус.**

##### **Модел на изследването:**

Една група от седем пациента са инжектирани трикратно с една и същата доза (100 µg) от XC PSMA-ДНК ваксина (XC PSMA-CD86 плазмид), през интервали от една седмица. Пет пациента (виж табл.1) са получили 10,000 IU Левкин (Immunex, Saettle, WA) веднага при прилагане на плазмида или 24, или 48 часа след имунизацията.

Допълнително тези седем пациента и група от 2 нови, са инжектирани трикратно два месеца по късно, с ваксина (Ad5-XC-PSMA) от рекомбинантен нереплициращ се аденовирус ( $5 \times 10^8$  PFU за еднократно приложение) през интервали от една седмица.

Плазмидът е инжектиран интрамускулно или интрадермално между първия и втория пръст на десния крак. Вирусната ваксина се прилага интрадермално в пъпната област.

В продължение 2 часа след ваксинирането, се провежда постоянен контрол на клиничното състояние и жизнените показатели. Ако състоянието на пациента е стабилно, на него му се разрешава да напусне болницата. Извършва се кратък контролен преглед на 24 час (или на 48 час, в случаи на GM-CSF инокулация).

#### **Включени критерии:**

Всички пациенти подписаха формуляр за съгласие, преди да бъдат включени в изследването. Данните от контролните прегледи са споделяни с пациентите по време на изследването като на пациентите се напомня, че те могат да се откажат от участието си по всяко време.

Само пациенти с напреднала хормонална резистентност към рак или пациенти, неспособни да приемат хормонална терапия са включени в изследването.

Пациенти с предишна диагноза, сочеща друга малигнизация или със сериозна активна инфекция, или с други заболявания са изключени от изследването.

#### **Контрол на изследването:**

Стандартните лабораторни тестове включват CBC, анализ на урината, чернодробни ензими, анти-ядрени антитела, скорост на еритроцитната седиментация, PSA. На всеки пациент е направен тазово САТ сканиране, гърдна радиография и кардиография в

началото и на 20 седмица (10 седмица за двамата пациенти имунизирани само с вирус). Сигурността се определя като липса на неблагоприятни клинични или лабораторни случаи, с особено внимание за локални реакции и реакции на целия организъм, както и за доказателство за анти-ядрено антитяло.

Допълнително беше направен анализ чрез flow цитометрия на клетките CD/HLADR+; CD4+; CD8+; CD3-/CD16+CD56+; CD3+; CD1+; CD25+; CD19+ , както и на съотношението CD4/CD8 преди и след имунотерапията.

### Резултати.

#### Характеристика на участниците:

В изследването са включени девет мъже на възраст между 49 и 69 години с напреднал аденокарцином на простатата. Трина пациенти са с пълна простатектомия, 2 са подготвени за хирургическа интервенция, трима не подлежат на операция и един подлежа на операция, но има други противопоказания за хирургическо лечение. Двама от пациентите умряха поради напреднала форма на рака.

#### Резултати от контрола за безопасност:

Имунизациите са понесени добре. Не са регистрирани изменения в жизнените показатели след инжектирането или по време на последвалите контролни прегледи.

Пациентите, които са получили интрадермална имунизация с плазмид, показват слаби DTH-подобни реакции, 24 часа след третата имунизация. Пациенти №№ 8 и 9 развиват DTH реакция 24 часа след всяко прилагане на рекомбинантния аденовирус. Пациенти с № от 1 до 7 не показват DTH-подобна реакция 24 часа след първата

имунизация с вирусния вектор, но развиват DTH след втората и третата имунизация. Всички DTH-подобни локални реакции протекоха леко и преминаха до 72 часа след имунизацията.

Пациент № 4 показва везикуларен обрив по гърба след последната вирусна имунизация, който премина през следващите два дни без лечение.

Пациент № 7 получи папуларен уртикарио-подобен обрив, с малки кръвоизливи в центъра, който се разви 24 часа след последната плазмидна имунизация и който изчезна след прекъсване на приложената антибиотикова терапия.

Не се наблюдават значителни промени в скоростта на еритроцитната седиментация, СВС, серумния креатинин или други кръвни химични показатели, или при анализ на урината. Стойностите на химичните показатели на чернодробния серум, остават в норма при всички изследвани пациенти.

Не са забелязани значителни промени при анализа на клетките CD/HLADR+; CD4+; CD8+; CD3-/CD16+CD56+; CD3+; CD1+; CD25+; CD19+, както и в съотношението CD4/CD8 преди и след имунотерапията.

При нито един от пациентите не се наблюдават аномални жизнени показатели след инжектирането, нито значително увеличаване в титъра на анти-ядрените антители, нито се откриват анти-ДНК антители.

За PSA стойности, САТ-сканирания, костна сцинтиграфия или метастази в лимфните възли преди и след имунизацията виж таблици 1 и 2.

Таблицы 1 и 2 показват, че при някои пациенти развитието на метастази при рак на простатата се забавя или спира.

Таблица 1. Пациентите се имунизират първоначално с PSMA плазмид три пъти, през интервали от една седмица. Два месеца по-късно всички пациенти, с изключение на пациент № 7, получават три допълнителни имунизации през интервали от една седмица, с рекомбинантен аденовирус.

Пациент #	Етап на заболяването	Тип имунизация	Допълнително лечение	PSA (ng/ml)		СТ сканиране		LN		Костни метастази		Странични ефекти
				преди	след	преди	след	преди	след	Преди	след	
1	T <sub>4</sub> N <sub>x</sub> M <sub>2</sub> не подлежи на операция	3 x плазмид интра-дермално 3 x Ad5PSMA	орхиектомия Casodex	6.3	-	+++	+++	-	+	++	++	екзитус
2	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> подлежи на операция <sup>#</sup>	3 x плазмид интра-мускулно + GM-CSF 3 x Ad5PSMA	орхиектомия Androcur	14.38	0.28	+++	*	-	-	-	-	не
3	T <sub>4</sub> N <sub>x</sub> M <sub>0</sub> не подлежи на операция	3 x плазмид интра-дермално 3 x Ad5PSMA	орхиектомия	33.0	0.04	+++	*	-	-	-	+	не
4	T <sub>4</sub> M <sub>x</sub> M <sub>2</sub> след BPH и TUR не подлежи на операция	3 x плазмид интра-дермално + GM-CSF 3 x Ad5PSMA	орхиектомия (текущо лечение с Flucinome)	1.11	3.8	++	++	-	-	+	++	не
5	T <sub>2-3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> в подготовка за операция	3 x плазмид интра-дермално + GM-CSF 3 x Ad5PSMA	MAВ	3.01	0.05	++	*	-	-	-	-	не
6	T <sub>3-4</sub> N <sub>x</sub> M <sub>6</sub> след TUR	3 x плазмид интра-дермално + GM-CSF 3 x Ad5PSMA	орхиектомия MAВ	1.6	0.04	+++	*	-	-	-	-	не
7	T <sub>4</sub> N <sub>x</sub> M <sub>2</sub> метастази след простатектомия	3 x плазмид интра-мускулно + GM-CSF	MAВ	100		+++	+++	-		++		екзитус кожен обрив ***

Легенда:

++; +++ увеличаване размерите на простатната жлеза или присъствие на метастазиращ тумор, след пълна простатектомия (пациент № 7)

-;+ липса (-) или присъствие на костни метастази или метастази в лимфните възли

\* значително намаляване размерите на простатната жлеза

\*\* - Пациент № 7. Липса на уринен екскрет от двата уретера, което се дължи на метастази преди имунотерапията. Поява на диуреза от десния бъбрек един месец след последната имунизация. Смърт, поради механично блокиране от метастази в илеуса, последвани от метастази в ректума и сигмоидеума.

\*\*\* - Пациент № 7 имаше лек кожен обрив 24 часа след третото въвеждане на плазмид, който изчезна след преустановяване на съвместната антибиотикова терапия.

\* - Пациент № 2 не може да бъде подложен на операция, поради кардиоваскуларни усложнения.

МAB - максимална андрогенна блокада със Zoladex, Casodex, или Flucinome

орхиектомия - във всички случаи билатерална

Таблица 2. Пациенти, имунизирани 3 пъти с рекомбинантен аденовирус през интервали от една седмица.

пациент #	Фаза на заболяването	Тип имунизация	Допълнително лечение	PSA(ng/ml)		СТ сканиране преди след		LN преди след		Костни метастази		странични ефекти
				Преди	след	преди	след	преди	след	преди	след	
8	T <sub>4</sub> N <sub>2</sub> M поява на метастази след пълна простатектомия	3 x Ad5PSMA	MAВ	32	NA	+++	NA	+++	NA	-	NA	не
9	T <sub>4</sub> NM <sub>2</sub> поява на метастази след пълна простатектомия	3 x Ad5PSMA	MAВ	4.47	NA	+++	NA	-	NA	+++	NA	не

-; ++; +++ липса (-) или присъствие на локални туморни метастази, или метастази в лимфните възли

MAВ - максимална андрогенна блокада с Zoladex, Casodex или Flucinome

NA – няма налични

За специалистите в областта е очевидно, че примерите и вариантите описани тук са илюстративни и не са лимитиращи и, че могат да се използват други примери, които не се различават от духа и обхвата на това изобретение, както е указано в претенциите.

### **ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ**

1. Методът за инициране на експресия на антигени в бозайник или негови клетки, които са функционално неактивни, без да повлиява върху ефективността на транскрипцията и транслацията на ДНК, транслацията на РНК или на образуването на антигенни пептиди, характеризиращ се с това, че включва етапа:

въвеждане в бозайник или негови клетки на ефективно количество РНК, плазмидна ДНК, или вирусен вектор, включващ ДНК или РНК, кодиращи променен антиген, който е функционално неактивен и още непроменен по отношение на ефективността на транскрипция и транслация на ДНК, транслацията на РНК, или образуване на антигенни пептиди.

2. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че промененият антиген е скъсена форма на антигена.

3. Метод съгласно претенция 2, характеризиращ се с това, че скъсената форма на антигена е извънклетъчният домен на антигена.

4. Метод съгласно претенция 3, характеризиращ се с това, че антигенът е човешки, специфичен за простатните клетки мембранен антиген.

5. РНК или плазмидна ДНК, кодираща променена форма на човешки рак-асоцииран антиген, който е функционално неактивен и още непроменен по отношение на ефективността на транскрипция и транслация на ДНК, транслация на РНК, или образуването на антигенни пептиди.

6. РНК или плазмидна ДНК съгласно претенция 5, характеризираща се с това, че променената форма на човешки рак-асоцииран антиген е извънклетъчната част от човешки специфичен за простатните клетки мембранен антиген.

7. Плазмидна ДНК съгласно претенция 6, с № за Достъп 203168 в АТСС.
8. Нуклеиновата киселина със секвенция SEQ ID NO: 1
9. Извънклетъчната част от човешки специфичен за простатните клетки мембранен антиген, кодиран от нуклеинова киселина SEQ ID NO: 1
10. Плазмидна ДНК съгласно претенция 5, характеризираща се с това че извънклетъчната част на човешкия специфичен за простатните клетки мембранен антиген, е кодиран от секвенцията на нуклеинова киселина SEQ ID NO: 1
11. Вирусен вектор, характеризиращ се с това че включва РНК или ДНК, където споменатият вектор, кодиращ променена форма на човешки рак-асоцииран антиген, който е функционално неактивен и още непроменен, по отношение на ефективността на транскрипция и трансляция на ДНК, трансляция на РНК, или образуване на антигенни пептиди.
12. Вирусен вектор съгласно претенция 11, характеризиращ се с това, че промененият човешки рак-асоцииран антиген е извънклетъчна част на човешки специфичен за простатните клетки мембранен антиген.
13. Вирусен вектор съгласно претенция 12, характеризиращ се с това, че вирусният вектор е рекомбинантен нереплициращ се аденовирус, включващ ДНК кодираща извънклетъчната част на човешкия специфичен за простатните клетки мембранен антиген.
14. Вирусен вектор съгласно претенция 13, имащ номер за Достъп в АТСС \_\_\_\_\_.
15. Вирусен вектор съгласно претенция 13, характеризиращ се с това че извънклетъчната част на човешкия специфичен за простатните клетки мембранен антиген е кодиран от секвенцията на нуклеинова киселина SEQ ID NO: 1.

16. Метод за лечение на рак, характеризиращ се с това, че включва прилагане на ефективно количество РНК или плазмидна ДНК на нуждаещ се болен от рак пациент, съгласно претенция 5.

17. Метод съгласно претенция 16, характеризиращ се с това че, пациентът е с диагноза рак на простатата и РНК или плазмидната ДНК е тази, съгласно претенция 6.

18. Методът съгласно претенция 17, характеризиращ се с това, че плазмидът е този, съгласно претенция 7.

19. Методът съгласно претенция 17, характеризиращ се с това, че плазмидната ДНК включва тази от SEQ ID NO: 1.

20. Метод за лечение на рак, характеризиращ се с това, че включва прилагането на ефективно количество от вирусен вектор на нуждаещ се и болен от рак пациент, съгласно претенция 11.

21. Методът съгласно претенция 20, характеризиращ се с това че пациентът е с рак на простатата и че вирусният вектор е вирусен вектор, съгласно претенция 13

22. Методът съгласно претенция 21, характеризиращ се с това, че вирусния вектор е този, съгласно претенция 14.

23. Методът съгласно претенция 13 характеризиращ се с това, че ДНК, кодираща извънклетъчната част на човешкия специфичен за простатните клетки мембранен антиген има секвенция SEQ ID NO: 1.

24. Методът за лечение на рак съгласно претенция 16, характеризиращ се по-нататък с това, че включва етапите на изчакване на подходящ интервал след етапа съгласно претенция 16 и прилагане на бустер доза от ефективното количество от вирусния вектор на пациента, съгласно претенция 11.

25. Методът за лечение на рак на простатата съгласно претенция 17, характеризиращ се по-нататък с това, че включва етап на изчакване на подходящ интервал след етапа съгласно претенция 17 и

прилагане на бустер доза от ефективно количество от вирусния вектор на пациенти, съгласно претенция 13.

26. Методът за лечение на рак на простатата съгласно претенция 25, характеризиращ се с това че плазмидната ДНК е тази съгласно претенция 7, и че вирусния вектор е този, съгласно претенция 14.

27. Методът за лечение на рак съгласно претенция 20, характеризиращ се по-нататък с това, че включва изчакване на подходящ интервал след етапа съгласно претенция 20 и прилагане на бустер доза от ефективно количество от РНК или плазмидна ДНК на пациента, съгласно претенция 5.

28. Методът за лечение на рак на простатата съгласно претенция 21, характеризиращ се по-нататък с това, че включва етапи на изчакване на подходящ интервал, след етапа съгласно претенция 21 и прилагане на бустер доза от ефективното количество РНК или плазмидна ДНК на пациента, съгласно претенция 6.

29. Методът за лечение на рак на простатата съгласно претенция 21, характеризиращ се по-нататък с това, че включва етап на изчакване на подходящ интервал, след етапа съгласно претенция 21 и прилагане на бустер доза от ефективно количество от РНК или плазмидна ДНК на пациента, съгласно претенция 7.

30. Метод за лечение на рак, характеризиращ се с това, че включва прилагане на ефективно количество автоложни дендритни клетки на нуждаещ се и болен от рак пациент, които са култивирани *in vitro* в присъствие или на РНК, или на плазмидна ДНК, съгласно претенция 5, или на вирусния вектор, съгласно претенция 11.

31. Методът за лечение на рак съгласно претенция 30, характеризиращ се с това, че пациентът е с рак на простатата и че РНК или плазмидната ДНК е съгласно претенция 6 и че вирусният вектор е този, съгласно претенция 12.

32. Методът за лечение на рак на простатата съгласно претенция 31, характеризиращ се с това, че РНК или плазмидната ДНК е тази, съгласно претенция 7 и че вирусният вектор е този, съгласно претенция 14.

**СПИСЪК НА СЕКВЕНЦИИТЕ:****(1) ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ:**

(i) АПЛИКАНТИ: Micheff, Milcho S.,

Loukinov, Dmitri I.

Zoubak, Serguei

(ii) ЗАГЛАВИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО: Имунотерапия на рак, чрез експресия на скъсен тумурен или тумор-асоцииран антиген.

(iii) БРОЙ НА СЕКВЕНЦИИТЕ: 1

**(iv) АДРЕСИ ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ:**

(A) АДРЕСАНТИ: William S. Ramsey, Cook, Looper & Kurlander, LLC

(B) УЛИЦА: 10420 Little Patuxent Parkway, Suite 250

(C) ГРАД: Columbia

(D) ЩАТ: Maryland

(E) ДЪРЖАВА: USA

(F) ПОЩЕНСКИ КОД: 21044

**(v) ФОРМА НА ПРОЧИТ НА КОМПЮТЪРНИ ДАННИ:**

(A) ТИП НОСИТЕЛ: дискета, 3.50 инчова, 1.44МВ памет.

(B) КОМПЮТЪР: PC

(C) ОПЕРАЦИОННА СИСТЕМА: Windows 95

(D) СОФТУЕАР: WordPerfect 8

**(viii) ИНФОРМАЦИЯ ЗА АДВОКАТА/АГЕНТА:**

(A) ИМЕ: Ramsey, William S.

(B) РЕГИСТРАЦИОНЕН НОМЕР: 32, 715

(C) РЕФЕРЕНТЕН/ДОСИЕ НОМЕР: br11

**(ix) ИНФОРМАЦИЯ ЗА ТЕЛЕКОМУНИКАЦИЯ:**

(A) ТЕЛЕФОН: (410) 992-9660

(B) ТЕЛЕФАКС: (410) 922-9540

**(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 1:**

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ НА СЕКВЕНЦИЯТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 2226 базови двойки

(B) ТИП: нуклеинова киселина

(C) ВЕРИЖНОСТ: двойна

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: геномна ДНК

(iii) ХИПОТЕЗА: не

(iv) АНТИ-СЕНС: не

(v) ПРОИЗХОД:

(A) ОРГАНИЗЪМ: човек

(B) КЛЕТЪЧЕН ТИП: простатна клетъчна линия

(x) ПУБЛИКУВАНА ИНФОРМАЦИЯ:

(A) АВТОРИ: Israeli, R.S., Powell, C.T., Fair, W.R., Murphy,  
G.P.

(B) ЗАГЛАВИЕ: Molecular cloning of a complimentary DNA  
encoding a prostate-specific membrane antigen.

(C) СПИСАНИЕ: Cancer Research

(D) ТОМ: 53

(E) КНИЖКА: (2)

(F) СТРАНИЦИ: 227-230

(G) ДАТА: Януари 15, 1992

(K) ВАЖНИ БАЗИ В SEQ ID NO: 1: от 1 до 2226

ATG AAA TCC TCC AAT GAA GCT ACT AAC ATT ACT CCA AAG CAT AAT	45
Met Lys Ser Ser Asn Glu Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn	15
ATG AAA GCA TTT TTG GAT GAA TTG AAA GCT GAG AAC ATC AAG AAG	90
Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys	30
TTC TTA TAT AAT TTT ACA CAG ATA CCA CAT TTA GCA GGA ACA GAA	135
Phe Leu Tyr Asn Phe Thr Gln Ile Pro His Leu Ala Gly Thr Glu	45
CAA AAC TTT CAG CTT GCA AAG CAA ATT CAA TCC CAG TGG AAA GAA	180
Gln Asn Phe Gln Leu Ala Lys Gln Ile Gln Ser Gln Trp Lys Glu	60
TTT GGC CTG GAT TCT GTT GAG CTA GCA CAT TAT GAT GTC CTG TTG	225
Phe Gly Leu Asp Ser Val Glu Leu Ala His Tyr Asp Val Leu Leu	75

TCC	TAC	CCA	AAT	AAG	ACT	CAT	CCC	AAC	TAC	ATC	TCA	ATA	ATT	AAT	270
Ser	Tyr	Pro	Asn	Lys	Thr	His	Pro	Asn	Tyr	Ile	Ser	Ile	Ile	Asn	90
GAA	GAT	GGA	AAT	GAG	ATT	TTC	AAC	ACA	TCA	TTA	TTT	GAA	CCA	CCT	315
Glu	Asp	Gly	Asn	Glu	Ile	Phe	Asn	Thr	Ser	Leu	Phe	Glu	Pro	Pro	105
CCT	CCA	GGA	TAT	GAA	AAT	GTT	TCG	GAT	ATT	GTA	CCA	CCT	TTC	AGT	360
Pro	Pro	Gly	Tyr	Glu	Asn	Val	Ser	Asp	Ile	Val	Pro	Pro	Phe	Ser	120
GCT	TTC	TCT	CCT	CAA	GGA	ATG	CCA	GAG	GGC	GAT	CTA	GTG	TAT	GTT	405
Ala	Phe	Ser	Pro	Gln	Gly	Met	Pro	Glu	Gly	Asp	Leu	Val	Tyr	Val	135
AAC	TAT	GCA	CGA	ACT	GAA	GAC	TTC	TTT	AAA	TTG	GAA	CGG	GAC	ATG	450
Asn	Tyr	Ala	Arg	Thr	Glu	Asp	Phe	Phe	Lys	Leu	Glu	Arg	Asp	Met	150
AAA	ATC	AAT	TGC	TCT	GGG	AAA	ATT	GTA	ATT	GCC	AGA	TAT	GGG	AAA	495
Lys	Ile	Asn	Cys	Ser	Gly	Lys	Ile	Val	Ile	Ala	Arg	Tyr	Gly	Lys	165
GTT	TTC	AGA	GGA	AAT	AAG	GTT	AAA	AAT	GCC	CAG	CTG	GCA	GGG	GCC	540
Val	Phe	Arg	Gly	Asn	Lys	Val	Lys	Asn	Ala	Gln	Leu	Ala	Gly	Ala	180
AAA	GGA	GTC	ATT	CTC	TAC	TCC	GAC	CCT	GCT	GAC	TAC	TTT	GCT	CCT	585
Lys	Gly	Val	Ile	Leu	Tyr	Ser	Asp	Pro	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Pro	195
GGG	GTG	AAG	TCC	TAT	CCA	GAT	GGT	TGG	AAT	CTT	CCT	GGA	GGT	GGT	630
Gly	Val	Lys	Ser	Tyr	Pro	Asp	Gly	Trp	Asn	Leu	Pro	Gly	Gly	Gly	210
GTC	CAG	CGT	GGA	AAT	ATC	CTA	AAT	CTG	AAT	GGT	GCA	GGA	GAC	CCT	675
Val	Gln	Arg	Gly	Asn	Ile	Leu	Asn	Leu	Asn	Gly	Ala	Gly	Asp	Pro	225
CTC	ACA	CCA	GGT	TAC	CCA	GCA	AAT	GAA	TAT	GCT	TAT	AGG	CGT	GGA	720
Leu	Thr	Pro	Gly	Tyr	Pro	Ala	Asn	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Arg	Arg	Gly	240
ATT	GCA	GAG	GCT	GTT	GGT	CTT	CCA	AGT	ATT	CCT	GTT	CAT	CCA	ATT	765
Ile	Ala	Glu	Ala	Val	Gly	Leu	Pro	Ser	Ile	Pro	Val	His	Pro	Ile	255
GGA	TAC	TAT	GAT	GCA	CAG	AAG	CTC	CTA	GAA	AAA	ATG	GGT	GGC	TCA	810
Gly	Tyr	Tyr	Asp	Ala	Gln	Lys	Leu	Leu	Glu	Lys	Met	Gly	Gly	Ser	270
GCA	CCA	CCA	GAT	AGC	AGC	TGG	AGA	GGA	AGT	CTC	AAA	GTG	CCC	TAC	855
Ala	Pro	Pro	Asp	Ser	Ser	Trp	Arg	Gly	Ser	Leu	Lys	Val	Pro	Tyr	285
AAT	GTT	GGA	CCT	GGC	TTT	ACT	GGA	AAC	TTT	TCT	ACA	CAA	AAA	GTC	900
Asn	Val	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Asn	Phe	Ser	Thr	Gln	Lys	Val	300
AAG	ATG	CAC	ATC	CAC	TCT	ACC	AAT	GAA	GTG	ACA	AGA	ATT	TAC	AAT	945
Lys	Met	His	Ile	His	Ser	Thr	Asn	Glu	Val	Thr	Arg	Ile	Tyr	Asn	315
GTG	ATA	GGT	ACT	CTC	AGA	GGA	GCA	GTG	GAA	CCA	GAC	AGA	TAT	GTC	990
Val	Ile	Gly	Thr	Leu	Arg	Gly	Ala	Val	Glu	Pro	Asp	Arg	Tyr	Val	330
ATT	CTG	GGA	GGT	CAC	CGG	GAC	TCA	TGG	GTG	TTT	GGT	GGT	ATT	GAC	1035
Ile	Leu	Gly	Gly	His	Arg	Asp	Ser	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Ile	Asp	345
CCT	CAG	AGT	GGA	GCA	GCT	GTT	GTT	CAT	GAA	ATT	GTG	AGG	AGC	TTT	1080
Pro	Gln	Ser	Gly	Ala	Ala	Val	Val	His	Glu	Ile	Val	Arg	Ser	Phe	360
GGA	ACA	CTG	AAA	AAG	GAA	GGG	TGG	AGA	CCT	AGA	AGA	ACA	ATT	TTG	1125
Gly	Thr	Leu	Lys	Lys	Glu	Gly	Trp	Arg	Pro	Arg	Arg	Thr	Ile	Leu	375
TTT	GCA	AGC	TGG	GAT	GCA	GAA	GAA	TTT	GGT	CTT	CTT	GGT	TCT	ACT	1170
Phe	Ala	Ser	Trp	Asp	Ala	Glu	Glu	Phe	Gly	Leu	Leu	Gly	Ser	Thr	390
GAG	TGG	GCA	GAG	GAG	AAT	TCA	AGA	CTC	CTT	CAA	GAG	CGT	GGC	GTG	1215
Glu	Trp	Ala	Glu	Glu	Asn	Ser	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Arg	Gly	Val	405

GCT TAT ATT AAT GCT GAC TCA TCT ATA GAA GGA AAC TAC ACT CTG 1260  
 Ala Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu 420  
  
 AGA GTT GAT TGT ACA CCG CTG ATG TAC AGC TTG GTA CAC AAC CTA 1305  
 Arg Val Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu 435  
  
 ACA AAA GAG CTG AAA AGC CCT GAT GAA GGC TTT GAA GGC AAA TCT 1350  
 Thr Lys Glu Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser 450  
 CTT TAT GAA AGT TGG ACT AAA AAA AGT CCT TCC CCA GAG TTC AGT 1395  
 Leu Tyr Glu Ser Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser 465  
  
 GGC ATG CCC AGG ATA AGC AAA TTG GGA TCT GGA AAT GAT TTT GAG 1440  
 Gly Met Pro Arg Ile Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu 480  
  
 GTG TTC TTC CAA CGA CTT GGA ATT GCT TCA GGC AGA GCA CGG TAT 1485  
 Val Phe Phe Gln Arg Leu Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr 495  
 ACT AAA AAT TGG GAA ACA AAC AAA TTC AGC GGC TAT CCA CTG TAT 1530  
 Thr Lys Asn Trp Glu Thr Asn Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr 510  
  
 CAC AGT GTC TAT GAA ACA TAT GAG TTG GTG GAA AAG TTT TAT GAT 1575  
 His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp 525  
  
 CCA ATG TTT AAA TAT CAC CTC ACT GTG GCC CAG GTT CGA GGA GGG 1620  
 Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val Ala Gln Val Arg Gly Gly 540  
  
 ATG GTG TTT GAG CTA GCC AAT TCC ATA GTG CTC CCT TTT GAT TGT 1665  
 Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val Leu Pro Phe Asp Cys 555  
  
 CGA GAT TAT GCT GTA GTT TTA AGA AAG TAT GCT GAC AAA ATC TAC 1710  
 Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg Lys Tyr Ala Asp Lys Ile Tyr 570  
  
 AGT ATT TCT ATG AAA CAT CCA CAG GAA ATG AAG ACA TAC AGT GTA 1755  
 Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr Tyr Ser Val 585  
  
 TCA TTT GAT TCA CTT TTT TCT GCA GTA AAG AAT TTT ACA GAA ATT 1800  
 Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys Asn Phe Thr Glu Ile 600  
  
 GCT TCC AAG TTC AGT GAG AGA CTC CAG GAC TTT GAC AAA AGC AAC 1845  
 Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe Asp Lys Ser Asn 615  
  
 CCA ATA GTA TTA AGA ATG ATG AAT GAT CAA CTC ATG TTT CTG GAA 1890  
 Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu Glu 630  
  
 AGA GCA TTT ATT GAT CCA TTA GGG TTA CCA GAC AGG CCT TTT TAT 1935  
 Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp Arg Pro Phe Tyr 645  
  
 AGG CAT GTC ATC TAT GCT CCA AGC AGC CAC AAC AAG TAT GCA GGG 1980  
 Arg His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly 660  
  
 GAG TCA TTC CCA GGA ATT TAT GAT GCC CTG TTT GAT ATT GAA AGC 2025  
 Glu Ser Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser 675  
  
 AAA GTG GAC CCT TCC AAG GCC TGG GGA GAA GTG AAG AGA CAG ATT 2070  
 Lys Val Asp Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile 690  
 TAT GTT GCA GCC TTC ACA GTG CAG GCA GCT GCA GAG ACT TTG AGT 2115  
 Tyr Val Ala Ala Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser 705  
  
 GAA GTA GCC GCT GCA GAG ACT TTG AGT GAA GTA GCC GGG CCC TTC 2160  
 Glu Val Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala Gly Pro Phe 720  
  
 GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT ATG CAT ACC GGT 2205  
 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Met His Thr Gly 735  
  
 CAT CAT CAC CAT CAC CAT TGA 2226  
 His His His His His His OPA 741