



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată  
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **95-01622**

(22) Data de depozit: **14.03.1994**

(30) Prioritate: **18.03.1993 US 032.383; 08.07.1993  
US 089.985;**

(41) Data publicării cererii:  
BOPI nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:  
**28.06.2002** BOPI nr. **6/2002**

(45) Data eliberării și publicării brevetului:  
BOPI nr.

(61) Perfecționare la brevet:  
Nr.

(62) Divizată din cererea:  
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:  
Nr. **US 94 / 02751 14.03.1994**

(87) Publicare internațională:  
Nr. **WO 94/21797 29.09.1994**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**WO 93/19183; 93/11092**

(71) Solicitant: **MERCK & CO. INC., RAHWAY, US; VICAL INCORPORATED, SAN DIEGO, US;**

(73) Titular: **MERCK & CO. INC., RAHWAY, US; VICAL INCORPORATED, SAN DIEGO, US;**

(72) Inventatori: **DONNELLY J. JOHN, HAVERTOWN, US; DWARKI J. VARAVANI, ALAMEDA, US; LIU  
MARGARET, ROSEMONT, US; MONTGOMERY DONNA, CHALFONT, US; PARKER E.  
SUEZANNE, SAN DIEGO, US; SHIVER W. JOHN, DOYLESTOWN, US; ULMER B. JEFFREY,  
CHALFONT, US;**

(74) Mandatar: **ROMINVENT S.A., BUCUREȘTI;**

### (54) CONSTRUCT ADN ȘI COMPOZIȚIE IMUNOGENĂ CU ACESTA

(57) Rezumat: Invenția se referă la un construct ADN, capabil să inducă un răspuns imun față de virusul Influenza și la o compoziție imunogenă,

ce conține acest construct ADN. în vederea prevenirii infectării cu virusul Influenza.

Revendicări: 5  
Figuri: 36

RO 117710 B1



Invenția se referă la un construct ADN capabil să inducă un răspuns imun față de virusul influenza utilizat ca vaccin împotriva acestui virus și la o compoziție imunogenă pe baza acesteia.

Gripa este o boală acută febrilă provocată prin infectarea tractului respirator cu virusul influenza A sau B. Izbucnirile gripei se întâlnesc pretutindeni în lume, aproape în fiecare an în perioadele epidemice sau pandemice. Gripa poate produce simptome sistemice semnificative, boală severă (precum, pneumonia virală), care necesită spitalizare sau pneumonia bacteriană secundară. Recentele epidemii din SUA au fost considerate a avea ca urmare, peste 10000 (până la 40000) decese pe an și 5000 - 10000 în anii lipsiți de epidemie. Cea mai bună strategie pentru prevenirea morbidității și mortalității asociate cu gripa este vaccinarea. Vaccinurile curente autorizate sunt derivate de la un virus crescut în ouă și apoi inactivat și includ trei tulpini virale (2 tulpini A și o tulpină B). Sunt accesibile 3 tulpini de vaccin: virus integral, subviron și antigen de suprafață purificat. Numai ultimele două sunt folosite la copii din cauza răspunsurilor febrile crescute cu vaccinuri virus integral. Copii sub vârsta de 9 ani necesită 2 imunizări, în timp ce adulții necesită o singură injecție. Totuși, s-a sugerat (vezi, Medical Letter 32: 89-90, sept. 17, 1993) că pacienții vaccinați în toamnă devreme pot să beneficieze de o a doua doză de iarnă sau primăvară devreme. Bazat pe observațiile că la unii pacienți în vârstă, titrurile de anticorp după vaccinare pot să scadă spre niveluri mai puțin protectoare în patru luni sau chiar mai repede. Aceste vaccinuri se reformulează în fiecare an anticipându-se ce tulpini virale revente vor circula clinic și evaluându-se care tulpină nouă virulentă este de așteptat să fie predominantă în sezonul de gripă care urmează.

Revaccinarea este recomandată anual.

A. *Limitele vaccinurilor autorizate sunt:*

1. Variația antigenică, în special la tulpinile A ale virusului influenza, are ca urmare virusuri care nu sunt neutralizate prin anticorpii generați printr-un vaccin anterior (sau infecție anterioară). Noi tulpini apar prin mutații punctuale (derivare antigenică) și prin rearanjarea (derivare antigenică) genelor care codifică glicoproteinele de suprafață (hemaglutinina (HA) și neuraminidaza), în timp ce proteinele interne sunt mai strict conservate printre tulpinile derivate și deviate. Imunizarea provoacă imunitate "homoloagă" cu specificitate de tulpină mediată de anticorp și cu imunitate "heteroloagă" comună grupului, imunitate bazată pe mediere celulară.

2. Chiar dacă tulpinile virusului influenza din circulație nu sunt derivate sau deviate de la un an la următorul, imunizarea trebuie să fie făcută în fiecare an datorită scăderii titrului de anticorp. Deși, anticorpii care inhibă hemaglutinarea (HI) și cei neutralizanți sunt raportați de către unii ca persistenți, timp de câteva luni ale anului cu o scădere graduală în continuare, Comitetul de Avizare al Procedurilor de Imunizare citează scăderea titrurilor de anticorp în anul care urmează imunizării ca motiv pentru imunizare anuală, chiar când nu a existat o derivare sau deviere importantă. (Anticorpii HI inhibă capacitatea virusului influenza de a aglutina eritrocitele. Ca și anticorpii de neutralizare, ei sunt orientați inițial, împotriva antigenului HA. Testele de inhibare sunt mai ușoare și mai puțin costisitoare de realizat, decât cele de neutralizare și astfel, sunt folosite adesea drept mijloace pentru testarea capacității anticorpilor produși de una dintre tulpinile influenza de a reacționa la o tulpină diferită. Așa cum s-a menționat mai sus, Medical Letter sugerează că anumii indivizi mai în vârstă, cu risc crescut, ar putea fi vaccinați de două ori într-un sezon datorită vieții scurte a titrurilor de anticorp de protecție.

3. Eficacitatea vaccinului este suboptimală. Dezvoltarea vaccinului sezonului următor pe baza presupunerilor asupra tulpinilor care urmează să intre în circulație (pe baza probelor de veghe din ASIA) este inexactă și poate avea ca urmare o potrivire redusă între tulpinile

folosite pentru vaccin și cele care circulă în prezent. Mai mult decât atât, așa cum s-a 50  
 întâmplat în timpul sezonului de gripă 1992 - 1993, o tulpină nouă H3N2 (A/Beijing/92) a  
 devenit aparent clinic în timpul fazei mai târzii a sezonului de gripă. Aceasta a inițiat o schim-  
 bare în compoziția vaccinului 1993 - 1994, datorită inter-reactivității scăzute cu anticorpul  
 A/Beijing/92, indus prin tulpina H3N2 mai timpurie (A/Beijing/89) datorită devierii antigenice.  
 Cu toate acestea, datorită timpului lung necesar pentru a produce și formula vaccinul auto- 55  
 rizat curent, noua tulpină de vaccin nu s-a putut introduce în sezonul 1992 - 1993 în ciuda  
 evidenței privind protecția scăzută de la vaccinul existent și a virulenței crescute a noii tulpini  
 H3N2 aflată în circulație.

Chiar când, între vaccin și tulpinile în circulație există o potrivire, vaccinul autorizat  
 previne boala în numai circa 70% din copiii sănătoși și adulții tineri și în 30...40 % dintre 60  
 adulții debili mai în vârstă. Astfel, pentru a indica eficacitatea vaccinului se folosesc alte  
 criterii când tulpinile de vaccin corespund tulpinilor în circulație. Aceste criterii includ preve-  
 nirea bolii severe și a complicațiilor secundare, care se reflectă prin prevenirea spitalizării  
 (70 % pentru bătrânii care locuiesc acasă față de 50...60 % pentru bătrânii care locuiesc în  
 case de îngrijire) și prevenirea decesului (80% pentru rezidenții caselor de îngrijire). Un alt 65  
 avantaj al imunizării se consideră imunitatea puternică pentru reducerea răspândirii infecției  
 într-o casă de îngrijire.

#### *B. Caracteristicile unui vaccin influențează universal ideal*

##### *1. Asigurarea protecției comune de grup (heteroloagă).*

Un vaccin universal va fi capabil să protejeze contra tulpinilor diferite, dintr-un subtip 70  
 H3N2, de exemplu, și posibil chiar subtipuri încrucișate, de exemplu, de la H1N1 la H3N2.  
 De asemenea, aceasta va fi mediată prin limfocite T citotoxice (CTL) care recunosc antigeni  
 din proteinele virale interne conservate, deși anticorpii orientați împotriva porțiunilor legate  
 la membrană ar putea, de asemenea, să joace un rol.

##### *2. Domeniul crescut al răspunsului anticorp.*

Deoarece CTL sunt considerate a juca un rol în recuperarea din boală, un vaccin 75  
 bazat numai pe un răspuns CTL este de așteptat să scurteze durata bolii (potențial până la  
 punctul transmiterii bolii subclinice), dar el nu va putea preveni complet boala. Metoda  
 producerii vaccinului influenza prin pasare în ouă s-a dovedit experimental ca fiind capabilă  
 să selecteze subpopulațiile virale care au antigenitate HA modificată. Ca un rezultat, eficaci- 80  
 tatea vaccinului poate fi diminuată datorită anticorpului provocat de vaccin, acesta neputând  
 fi complet eficient față de tulpinile predominante în circulație. În acest fel, primul ar putea  
 genera anticorpi, care au un domeniu al răspunsului îmbunătățit în comparație cu vaccinul  
 curent, prin aceea că, vaccinul a fost folosit A/Beijing/89 a generat anticorpi care au fost mai  
 puțin inter-reactivi (și puțin protectivi) față de noua tulpină A/Beijing/92, care de asemenea, 85  
 a fost mai virulentă. Ambele tulpini sunt H3N2, adică aparțin aceluiași subtip. În termenii  
 secvenței aminoacide, totuși, tulpinile asemenea A/Beijing/92 diferă de tulpinile asemenea  
 A/Beijing/89 prin numai 11 mutații punctuale (pozițiile 133, 135, 145, 156, 157, 186, 190,  
 191, 193, 226 și 262) din regiunea HA1. Nu se cunoaște dacă, procedeul obișnuit de  
 fabricare a influențat lipsa de interactivitate, dar este clar că o îmbunătățire în ceea ce 90  
 privește lărgirea domeniului de răspuns anticorp este de dorit.

##### *3. Creșterea duratei răspunsurilor anticorp.*

Din cauză că unul dintre grupurile foarte expuse morbidității și mortalității (bătrâni)  
 datorate infecției cu virus influenza, grup la care de asemenea, titrurile de anticorp de  
 protecție pot să scadă atât de rapid la imunizarea actuală printr-un vaccin îmbunătățit, s-ar 95  
 putea genera titruri de anticorpi protectivi care să persiste mai mult.

## C. Polinucleotide ca vaccin

Inocularea intramusculară a constructelor polinucleotidice, adică plasmidele ADN care codifică proteine, s-a dovedit a avea ca rezultat generarea *in situ*, în celulele musculare, a proteinei.

Prin folosirea plasmidelor cADN care codifică proteine virale, s-au generat, atât răspunsuri anticorp cât și CTL, furnizând protecție omoloagă, cât și heteroloagă, față de provocarea ulterioară, fie cu tulpini omoloage, cât și respectiv, tulpini încrucișate. Fiecare din aceste tipuri de răspunsuri imune oferă un avantaj potențial față de strategiile de vaccinare existente. Folosirea PNV-urilor pentru generarea anticorpilor poate avea ca rezultat: o durată mărită a răspunsurilor anticorp, precum și asigurarea unui antigen care poate avea, atât secvență exactă a tulpinii virale aflată clinic în circulație, precum și modificările post-translaționale corespunzătoare și conformația proteinei native (față de o proteină recombinată). Generarea răspunsurilor CTL prin aceste mijloace oferă beneficiile protecției de tulpină încrucișată fără folosirea unui vector viu potențial patogen sau a unui virus atenuat.

Astfel, o provocare principală pentru dezvoltarea vaccinurilor împotriva virusurilor precum gripa, împotriva căruia sunt generați anticorpi de neutralizare, este diversitatea proteinelor învelișului viral printre diferite izolate sau tulpini. Deoarece, limfocitele T citotoxice sunt capabile să recunoască epitopi derivați de la proteinele virale interconseruate, atât la oameni, cât și la șoareci (J.W.Yewdell și colab., *Proc.Natl.Acad.Sci. (USA)* 82, 1785 (1985); A.R.M. Townsend și colab., *Cell* 44, 959 (1986); A.J.McMichael și colab., *J.Gen.Virol.* 67, 719 (1986); J.Bastin și colaboratori., *J.Exp.Med.* 165, 1508 (1987); A.R.M. Townsend și H.Bodmer, *Ann.Rev.Immunol.* 7, 601 (1989) și sunt considerate a fi importante în răspunsul imun împotriva virusurilor (Y.-L. Lin și E.A.Askonas, *J.Exp.Med.* 154, 225 (1981); I.Gardner și colab., *Eur. J.Immunol.* 4, 68 (1974); K.L.Yap și G.L.Ada, *Natura* 273, 238 (1978); A.J.McMichael și colab., *New Engl. J.Med.* 309, 13 (1983); P.M. Taylor și B.A. Askona, *Immunol* 58, 417 (1986), eforturile au fost orientate spre dezvoltarea vaccinurilor CTL capabile să asigure protecție heteroloagă față de diferite tulpini virale.

CTL CD8<sup>+</sup> omoară celule infectate viral când receptorii celulei T recunosc peptide virale asociate cu molecule MHC clasa I (R.M.Zinkernagel și P.C.Doherty, *ibidem*, 141, 1427 (1975); R.N. Germain *Nature* 353, 605 (1991). Aceste peptide sunt derivate de la proteine virale sintetizate endogen, indiferent de localizarea sau funcția proteinei în virus. Astfel, prin recunoașterea epitopilor din regiunile virale, limfocitele T citotoxice (CTL) pot asigura protecție de tulpină încrucișată. Peptide capabile de asociere (CTL) pot asigura protecție de tulpină încrucișată. Peptide capabile de asociere cu MHC clasa I recunosc pentru CTL originea din proteinele care sunt prezente sau trec prin citoplasma sau reticulul endoplasmic (J.W.Yewdell și R.J. Bennink, *Science* 244, 1072 (1989); A.R.M-Townsend și colab., *Nature* 340, 443 (1989); J.G.Nuchtern și colab., *ibid.* 339, 223 (1989).

Ca urmare, în general, proteinele endogene care intră pe ciclul prelucrării endozomale (ca în cazul antigenilor prezentați de molecule MHC clasa II), nu sunt eficiente pentru generarea răspunsurilor CTL CD8<sup>+</sup>.

Cele mai multe eforturi de a genera răspunsuri CTL au folosit, fie replicarea vectorilor pentru a produce proteina antigen în celulă (J.R.Bennink și colab., *ibid.* 311, 578 (1984); J.R.Bennink și J.W.Yewdell, *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 163, 153 (1990), C.K.Stover și colab., *Nature* 351, 456 (1991); A.Aldovini și R.A. Young, *Nature* 351, 479 (1991); R.Schafer și colab., *J.Immunol.* 149, 53 (1992); C.S.Hahn și colab., *Proc.Natl.Acad.Sci. (USA)* 89, 2679 (1992), sau ele au fost concentrate pe introducerea peptidelor în citosol (F.R.Carbonate și M.J.Bevan, *J.Exp.Med.* 169, 603 (1989); K.Deres și colab., *Nature* 342, 561 (1989), H.Takahashi și colab., *ibid.* 344, 873 (1990), D.S.Collins și colab., *J.Immunol.* 148, 3336 (1992); M.J. Newman și colab., *ibid.* 148, 2357 (1992). Ambele abordări au limite care pot

# RO 117710 B1

- reduce utilitatea lor ca vaccinuri. Vectorii retrovirali au restricții privind mărimea și structura polipeptidelor care pot fi exprimate ca fuziune proteinică, cu menținerea în același timp a capacității de replicare a virusului recombinat (A.D.Miller, *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 158, 1 (1992) și eficacitatea vectorilor, precum vaccinia, pentru imunizări ulterioare, poate fi compromisă prin răspunsuri imune față de vector însuși/E.L.Cooney și colab., *lancet* 337, 567 (1991). De asemenea, vectorii virali și patogeni modificați prezintă riscuri inerente care pot limita utilizarea la oameni (R.R.Redfield și colab., *New Engl. J.Med.* 316, 673 (1987); L.Mascola și colab., *Arch Intern.Med.* 149, 1569 (1989). Mai mult decât atât, selectarea epitopilor peptidici prezentați este dependentă de structura antigenelor MHC ai unui individ și ca urmare, vaccinurile peptidice pot avea eficacitate limitată datorită diversității haplotipurilor MHC la populații din afara speciei. 150
- Benvenisty, N., și Reshef, L. (PNAS 83, 9551 - 9555 (1986) au arătat că poate fi exprimat ADN precipitat  $\text{CaCl}_2$  introdus în șoareci intraperitoneal, intravenos sau intramuscular. Injectarea intramusculară (i.m) la șoareci a vectorilor de expresie ADN s-a demonstrat că are ca rezultat absorbția ADN-ului de către celulele musculare și expresia proteinei codificate de către ADN (J.A.Wolff și colab., *Science* 247, 1465 (1990); G.Ascadi și colab., *Nature* 352, 815 (1991). Plasmidele s-au dovedit a fi menținute și nu au replicat. Ulterior, s-a observat expresie persistentă după injectare i.m. în mușchii scheletici ai șobolanilor, peștilor și primatelor și în mușchiul cardiac al șobolanilor (H.Lin și colab., *Circulation* 82, 2217 (1990), R.N. Kitsis și colab. *Proc.Natl.Acad.Sci USA*) 88, 4138 (1991); E.Hansen și colab., *FEBS Lett.* 290, 73 (1991); S.Jiao și colab., *Hum.Gene Therapy* 3, 21 (1992); J.A.Wolff și colab., *Human Mol.Genet.* 1,363 (1992). Tehnica folosirii acizilor nucleici ca agenți terapeutici s-a raportat în **WO 90/11092** (4 octombrie 1990), în care s-au folosit polinucleotide dezvelite pentru vaccinarea vertebratelor. 160
- Pentru succesul metodei nu este necesar ca imunizarea să fie intramusculară. Astfel, Tang și colab., (*Natura*, 356, 152-154 (1992) au arătat că introducerea microproiectilelor de aur învelite cu ADN care codifică hormonul de creștere bovin (BGH) în pielea șoarecilor are ca rezultat producerea în șoareci a anticorpilor anti-BGH.Furth și colab., (*Analytical Biochemistry*, 205, 365-368, (1992) a arătat că ar putea fi folosit un jet injector pentru transfectarea pielii, mușchiului, grăsimii și țesutului mamar al mamiferelor vii.Recent au fost recenzate de către Friedman, T., (*Science*, 244, 1275 - 1281 (1989) diferite metode de introducere a acizilor nucleici. Vezi, de asemenea, Robinson și colab., *Abstracts of papers Presented at the 1992 meeting of AIDS, Cold Spring Harbor*, p.92, unde administrarea im, ip și iv a ADN-ului de gripă la păsări, s-a susținut a asigura protecție față de provocarea letală. Cu toate acestea, nu a existat nici o descriere a genelor virusului gripă aviar care s-a folosit. În plus, s-au susținut numai răspunsurile imune specifice H7, fără vreo mențiune de inducere a protecției de tulpină încrucișată. 165
- Astfel, în **WO 93/19183** este descris un produs pentru imunizare la vertebrate, care cuprinde o unitate de transcripție a ADN care cuprinde ADN ce codifică un agent terapeutic legat operativ de o regiune a promotorului. 170
- Prezenta invenție înlătură dezavantajele menționate mai sus prin aceea că, constructul ADN constă dintr-un vector de expresie selectat din grupul constând din pnRSV, VI, VIJ, VIJR, VIJs și VIJneo și VIJneo și un terminator de transcripție legat operativ la o secvență nucleotidică care codifică o proteină a virusului influenza. 175
- Totodată, compoziția imunogenă cuprinde constructul ADN împreună cu o soluție acceptabilă farmaceutic, cu lipozomi sau cu un adjuvant acceptabil, și opțional, cu agenți care facilitează transfecția. 180
- Invenția de față prezintă următoarele avantaje: mărirea domeniului de protecție datorită răspunsurilor CTL + mărirea domeniului anticorpului și creșterea duratei de protecție. 185
- 190

195 Abordarea PNV evită nevoia de a face selecția și propagă resortanți, așa cum se face pentru vaccinul uzual autorizat, deoarece se poate produce mai direct constructul ADN nou, dintr-un domeniu izolat clinic.

Invenția asigură vectori de expresie care codifică o proteină virală influența ca un agent imunogen.

200 Invenția oferă un mijloc pentru inducerea imunității protectoare de tulpină încrucișată fără să fie nevoie de agenți auto-replicativi sau adjuvanți. Suplimentar, imunizarea cu ADN oferă numeroase alte avantaje. În primul rând, această abordare pentru vaccinare va fi aplicabilă pentru tumori, la fel de bine ca și pentru agenți infecțioși, deoarece răspunsul CTL CD8<sup>+</sup> este important pentru ambele procese patofiziologice. (K.Tanaka și colab., *Annu.Rev.Immunol.* 6,359 1988).

205 Deci, provocarea unui răspuns imun împotriva unei proteine cruciale pentru procesul de transformare poate fi un mijloc eficient pentru protejarea față de cancer sau pentru imunoterapie. În al doilea rând, generarea unui titru de anticorpi față de proteine exprimate după injectarea proteinei virale (NP și hemaglutinină) și ADN-ul hormonului uman de creștere (vezi, de exemplu, D-C.Tang și colab., *Nature* 256, 152, 1992), arată că acesta este un mijloc facil și extrem de eficient pentru producerea vaccinurilor bazate pe anticorpi, fie separat, fie în combinație cu vaccinul limfocit-T citotoxic îndreptat spre antigeni conservați.

210 Această facilitare a producerii și purificării constructelor ADN apare a fi favorabilă față de purificarea de proteină, ușurând generarea combinației de vaccinuri. Astfel, structurile multiple, care codifică, de exemplu, NP, HA, MI, PBI, NSI sau oricare alte gene ale virusului gripei se pot prepara, amesteca și administra împreună. În sfârșit, deoarece expresia proteinei se menține după injectare ADN (H.Lin și colab., *Circulation* 82, 2217 (1990); R.N.Kitsis și colab., *Proc.Natl.Acad.Sci (USA)* 88, 4138, (1992); E.Hansen și colab., *FEBS Lett.* 290, 73 (1991), S.JiAo și colab., *Hum. Gene. Therapy* 3, 21, (1992); J.A. Wolff și colab., *Human Mol. Genet.* 1,363 (1992), persistența memoriei celulei B și T poate fi sporită (D.Gray și P.Matzinger, *J.Exp.Med.* 174,969 (1991); S.Oehen și colab., *ibid.* 176 (1992), prin aceasta producând imunitate umorală de lungă durată și imunitate mediată celular.

215 Așa cum rezultă de mai sus, prezenta invenție privește oricare dintre metodele cunoscute pentru introducerea acizilor nucleici în țesut viu pentru introducerea expresiei proteinelor. Invenția asigură o metodă pentru introducerea proteinelor virale în ciclul de prelucrare antigenică pentru generarea de CTL specifice virusului. Astfel, necesitatea de agenți terapeutici specifici capabili să provoace răspunsuri imune profilactice dorite față de patogenii virali, s-a realizat în această invenție pentru virusul influența. De importanță deosebită, în această abordare terapeutică este capacitatea de inducere a răspunsurilor imune T-celulare care pot preveni infecțiile, chiar de la tulpini virale care sunt heteroloage față de tulpina de la care s-a obținut gena antigen. Prin urmare, această invenție asigură constructul ADN care codifică proteine virale ale virusului influența uman, nucleoproteine (NP), hemaglutinine (HA), neuraminidaze (NM), matrice (M), nestructurale (NS), polimerază (PB1 și PB2-polimeraze bazice 1 și 2; PA=polimerază acidă) sau oricare alte gene influența care codifică produse care generează CTL specifice.

225 Așa cum rezultă de mai sus, prezenta invenție privește oricare dintre metodele cunoscute pentru introducerea acizilor nucleici în țesut viu pentru introducerea expresiei proteinelor. Invenția asigură o metodă pentru introducerea proteinelor virale în ciclul de prelucrare antigenică pentru generarea de CTL specifice virusului. Astfel, necesitatea de agenți terapeutici specifici capabili să provoace răspunsuri imune profilactice dorite față de patogenii virali, s-a realizat în această invenție pentru virusul influența. De importanță deosebită, în această abordare terapeutică este capacitatea de inducere a răspunsurilor imune T-celulare care pot preveni infecțiile, chiar de la tulpini virale care sunt heteroloage față de tulpina de la care s-a obținut gena antigen. Prin urmare, această invenție asigură constructul ADN care codifică proteine virale ale virusului influența uman, nucleoproteine (NP), hemaglutinine (HA), neuraminidaze (NM), matrice (M), nestructurale (NS), polimerază (PB1 și PB2-polimeraze bazice 1 și 2; PA=polimerază acidă) sau oricare alte gene influența care codifică produse care generează CTL specifice.

230 Virusul influența are un genom de acid ribonucleic (ARN) care constă din numeroase segmente ARN. Fiecare segment ARN codifică cel puțin un produs genetic. Produsul genei NP se leagă la ARN și translocă ARN-ul viral în nucleul celulei infectate. Secvența este conservată cu numai 7% divergență în secvența aminoacidă care a apărut după o perioadă de 50 de ani. Produsele genei P (PB1, PB2, PA) sunt responsabile pentru sinteza de ARN-uri virale noi. Aceste gene sunt chiar mai strict conservate decât genele NP. HA este produsul genetic principal al anvelopei virale. El este conservat mai puțin strict decât NP. El leagă un receptor celular și prin urmare, este instrumentul de inițiere a noilor infecții influența.

240

- Răspunsul anticorpului de neutralizare este în principal orientat către acest produs genetic. Un răspuns substanțial limfocit T citotoxic este îndreptat, de asemenea, împotriva acestei proteine. Vaccinurile uzuale împotriva virusului influenza uman încorporează trei tulpini ale virusului influenza sau proteinele lor HA. Cu toate acestea, datorită variabilității din secvența proteică a HA din diferite tulpini, vaccinul trebuie să fie constant adaptat la tulpinile care cauzează un efect patologic. Totuși, HA dacă este prezentat complet trebuie să aibă unele elemente conservate pentru generarea de CTL. Produsele genei NS1 și NS2 au funcțiunile biologice caracterizate incomplet, dar pot fi semnificative în producerea răspunsurilor CTL protective. În sfârșit, produsele genei M1 și M2 care sunt ușor mai puțin conservate decât în HA, induc un răspuns CTL important. Proteina M1 este un produs genetic viral foarte abundent. 245
- Eficacitatea protectoare a vaccinării ADN față de provocarea virală ulterioară este demonstrată prin imunizare cu plasmid ADN nereplicativ care codifică una sau mai multe din proteinele virale menționate mai sus. Acesta este avantajos, deoarece nu este implicat nici un agent infecțios, nu este necesară asamblarea particulelor virale și este permisă selecția predeterminată. Mai mult decât atât, din cauza secvenței nucleoproteice și a faptului că alte produse genetice virale sunt conservate printre diverse tulpini de influenza, este posibilă protecția față de provocarea ulterioară printr-o tulpină de influenza virulentă care este omoloagă sau heteroloagă la tulpina de la care s-a obținut gena clonată. 250
- Constructul ADN capabil să fie exprimat la introducerea directă pe calea injectării sau altele de același fel, în țesuturile animale sunt terapeutice profilactice noi. Ele introduc limfocite T citotoxice (CTL) specifice pentru antigeni virali care răspund la diferite tulpini ale virusului, spre deosebire de anticorpii care sunt în general, specifici de tulpină. Generarea *in vivo* de astfel de CTL necesită de obicei expresia endogenă a antigenului, la fel ca în cazul infecției virale. Generarea unui antigen pentru prezentare la sistemul imunitar, fără limitări ale peptidului eliberat direct sau utilizarea vectorilor virali s-a realizat prin injectarea plasmidului ADN care codifică proteinele virusului influenza uman în mușchiul cvadriceps al șoarecilor BALB/c, acesta având ca urmare generarea de CTL virale specifice și protecție față de provocarea ulterioară cu o tulpină heteroloagă de influenza așa cum s-a măsurat prin descreșterea titrurilor virale pulmonare, inhibarea pierderii în greutate și creșterea supraviețuirii. S-a observat titrul ridicat de anticorp de neutralizare pentru hemaglutinină și anticorp pentru nucleoproteine generate în maimuțe Rhesus și descreșterea titrurilor nazale după provocare homoloagă și heteroloagă la fereți (nevăstuică). 255
- Observații cheie în legătură cu invenția includ:
1. *Demonstrarea eficacității.*
- Protecția heteroloagă s-a observat după imunizare cu ADN nucleoproteină (NP) așa cum s-a măsurat prin creșterea supraviețuirii, descreșterea titrurilor virale pulmonare și inhibarea pierderii în greutate la șoareci, provocați cu o tulpină de influenza diferită de sursa tulpinii pentru gena NP. În acest caz, proteinele de suprafață ale celor două tulpini au fost net diferite (H1N1 față de H3N2) și tulpina prin care s-a făcut provocarea a apărut la 34 ani după tulpina inițială. Imunizarea fereților cu ADN NP și ADN matrice (m1), fie separat, împreună sau în conjuncție cu ADN HA, a asigurat protecție (descreșterea virusului cu rezidență nazală) împotriva provocării cu o tulpină derivată (un izolat clinic). De remarcat că, protecția prin amestecul ADN (ADN NP și M1) care codifică proteinele Beijing/89 și ADN HA care codifică, fie HA Beijing/89 sau HA Hawaii/91) a fost mai mare decât cea conferită prin vaccinul autorizat (care conține Beijing/89). Amestecul conținând ADN HA de la Hawaii/91 a apărut a fi puțin mai eficace, decât amestecul care conține ADN HA de la Beijing/89. Protecția constatată cu amestecul incluzând ADN HA omolog (Georgia/93), în timp ce amestecul cu ADN HA pentru Beijing/89 a fost diferită de protecția omoloagă, deși ea a fost încă semnificativ mai bună decât a produsului autorizat. În toate speciile testate incluzând șoareci, fereți, maimuțe Rhesus și maimuțe africane verzi s-au generat anticorpi HI. 260

295

2. *Persistență.*

În studii care folosesc un ADN codificator al unei gene declarate, prezența ADN-ului și a proteinei de expresie a persistat cel puțin 1,5 ani (cel mai lung timp testat la șoareci: Wolff și colab. Al., *Humon Mol. Genet.* 1992). Astfel, dacă produsele genetice influența sunt, de asemenea, exprimate per sistem, răspunsul imun rezultat va persista de asemenea. Anticorpul și CTL (Yankauckas și colab., *DNA & Cell Biol.*, 1993), generate prin injectarea ADN influenza s-au dovedit a persista la șoareci timp de peste 1 an. Anticorpul s-au dovedit a persista în maimuțe Rhesus la fel de mult, timp de cel puțin 1 an. Durata răspunsurilor CTL și protecția heteroloagă (creșterea supraviețuirii) persistă până la 6 luni (cel mai lung timp testat, atât de departe). S-a întâlnit un ușor declin în gradul protecției heteroloage, dar protecția este puternic stabilă.

300

305

3. *Domeniul de dozare.*

Studiile de dozare s-au realizat la maimuțe Rhesus arătând că 100 μg ADN date de două ori au avut ca rezultat titruri bune ale anticorpului HI care au persistat până la un an sau mai mult. Generarea protecției (creșterea supraviețuirii după provocare heteroloagă) la șoareci s-a observat cu doze scăzute la nivelul de 6 μg (dat de 3 ori) și cu o injecție unică de 200 μg, dar, în general, o creștere a numărului injecțiilor (până la 3) îmbunătățește gradul de protecție. Studiile la primat au arătat că 2 injecții de 10 sau 100 μg ADN care codifică 3 hemaglutinine, NP și MI (ultima codificând gena H3N2 Beijing/89) au avut ca urmare titruri de anticorp MI, similare celor generate prin vaccinul autorizat. Este important de reamintit că toate animalele studiate nu au experiență față de gripă, în timp ce toată populația clinică vizată (indivizi mai în vârstă) are toată experiența față de gripă. (Reamintim că, copiii sub 9 ani au primit 2 injecții de vaccin autorizat).

310

315

Invenția asigură acizi terapeutici acizi care, atunci când sunt introduse direct într-un animal, inclusiv vertebrate, precum mamifere sau oameni, induc în animal expresia proteinelor codificate. Când proteina este una care nu se întâlnește de obicei în animal, exceptând condiții patologice, cum ar fi, proteinele asociate cu virusul influenza, de exemplu, însă fără să limiteze la nucleoproteina influenza, neuraminidază, hemaglutinină, polimerază, matrice sau proteine nestructurale, sistemul imunitar al animalului se activează pentru a produce un răspuns de protecție. Din cauză că aceste proteine exogene sunt produse de către țesuturi proprii animalelor, proteinele exprimate sunt prelucrate și prezentate prin complexul principal de histocompatibilitate, MHC. Această recunoaștere este analoagă celei care are loc pe infecția prezentă cu organismul înrudit. Rezultatul, așa cum s-a arătat în această descriere, este inducerea răspunsurilor imune care protejează față de infecția virulentă.

320

325

Această invenție asigură acizi nucleici, care atunci când se introduc în țesuturi animale *in vivo*, prin injecție, inhalare sau imprimare printr-un mecanism analog, are loc expresia produsului genei virusului gripal. Astfel, de exemplu, injecția constructului ADN al acestei invenții, în mușchiul șoarecilor, induce expresia produselor codificate de genă, în același mod, la fereți și maimuțe. La provocarea ulterioară cu virus gripal virulent, folosind doze care omoară constant animalele de control, animalele injectate cu vaccinul polinucleotidic prezintă morbiditate și mortalitate mult reduse. Astfel, această invenție descrie un vaccin util la oameni, pentru prevenirea cu virus gripal.

335

S-a arătat că, constructul ADN care codifică proteine virale influenza provoacă răspunsuri imune la animale. Așa cum se va descrie mai amănunțit în continuare, răspunsurile imune la animale au inclus anticorpul și generarea CTL la șoareci, generarea de anticorpi la fereți și primat și protecția față de provocarea virală la șoareci și fereți cu tulpini omoloage de influenza, derivate sau deviate. Poate că cele mai bune rezultate ale imunizării cu ADN care codifică proteine virale au fost conferirea protecției față de subtipuri virale distincte. Aceasta sugerează că, adăugarea unui component care provoacă CTL, la un

340



vaccin, ar putea servi pentru reducerea impactului variantelor noi care apar în mijlocul sezonului sau nu sunt anticipate când tulpinile de vaccin sunt alese în fiecare an pentru anul care urmează. De remarcat că, imunizarea cu vectori cADN care codifică o genă HA, NP și MI, este posibil să protejeze mai eficient față de tulpina derivată a virusului, la fereți, decât vaccinurile autorizate. Aceasta dă o justificare pentru folosirea constructului care codifică gene interne în PNV. 345

Într-unul din modurile preferate de realizare, produsul de vaccinat va consta din plasmide ADN separate care codifică, de exemplu, HA de la 3 tulpini clinice prevalente care reprezintă virusurile A/H1N1 (A/Texas/91), A/H3N2 (A/Georgia/93) și B (B/Panama/90), precum și constructe ADN care codifică proteinele interne conservate NP și MI (matrice), atât la tulpini A (Beijing/89; H3N2). cât și B, în vederea asigurării protecției comune de grup față de antigeni derivați sau deviați. ADN-urile HA vor funcționa prin generarea HA și anticorpilor care rezultă vor neutraliza față de HA. Aceasta va fi specifică de tip, cu o oarecare creștere a domeniului de protecție față de o tulpină derivată, comparativ cu vaccinul curent autorizat bazat pe proteină. Constructele NP și MI vor avea ca urmare generarea de CTL, care va asigura protecția de tulpină încrucișată cu încărcare virală potențial mai scăzută și accelerarea recuperării după îmbolnăvire. Persistența așteptată a constructului ADN (într-o formă epizonală nereplicativă, neintegrată în celulele musculare) este de presupus să asigure o durată de protecție crescută comparativ cu vaccinul uzual. 350 355 360

Într-unul dintre modurile de realizare preferate ale invenției, secvența nucleoproteinei (NP) a virusului influenza uman, obținută de la tulpina A/PR/8/34 se clonează într-un vector de expresie. Vectorul conține un promotor pentru transcripția la capătul secvenței care codifică NP. Într-un mod preferat de realizare, promotorul este lungimea terminală repetată (LTR) de la virusul sarcoma Rous (RSV) care este un promotor de transcripție puternic. Un promotor preferat este promotorul citomegalovirusului cu secvența intronului A (CMV-IntA). Un terminator de transcripție preferat este terminatorul hormonului bovin de creștere. În mod special, este preferată combinația CMVIntA-terminator BGH. Suplimentar, pentru asistarea preparării medicamentului, în vectorul de expresie este inclus, de asemenea, de preferință, un marker de referință la antibiotic. Se pot folosi genele de rezistență la ampicilină, genele de rezistență la neomicină sau oricare alt marker de rezistență la antibiotic acceptabil farmaceutic. În plus, pentru a sprijini producerea la nivel ridicat a medicamentului prin fermentație în organisme procariote și pentru a fi un număr ridicat de copii, este avantajos ca vectorii să conțină o origine a replicării. Oricare dintre numeroșii vectori procariotici de clonare accesibili comercial asigură aceste avantaje. Într-un mod de realizare preferat al acestei invenții, aceste funcționalități sunt asigurate prin vectorii accesibili comercial, cunoscuți ca pUC. Este de dorit să se îndepărteze secvențele ADN neesențiale. Astfel, secvențele care codifică pUC, lacZ și lacI se îndepărtează în unul din modurile preferate de realizare a invenției. 365 370 375 380

Într-unul din modurile preferate de realizare se folosește ca vector de expresie pnRSV, în care ca promotor este folosită lungimea terminală repetată (LTR) a virusului sarcoma Rous (RSV). Într-un alt mod preferat de realizare se folosește VI de transcripție BGH. Constructul VI-NP s-a folosit pentru a imuniza șoareci și a induce CTL care protejează față de provocare heteroloagă. Într-un mod de realizare preferat în mod deosebit al acestei invenții, elementele lui VI s-au combinat pentru a produce un vector de expresie numit VIJ. În VIJ se clonează o genă a virusului gripal, precum gena A/PR/8/34, NP, PBI, NSI, HA, PB2 sau MI. Într-un alt mod preferat de realizare, gena de rezistență la ampicilină se îndepărtează din VIJ și se înlocuiește cu o genă de rezistență la neomicină, pentru generarea VIJ-neo (SECV:ID:NR.18, fig.7), în care s-a clonat oricare dintre numeroasele gene diferite ale virusului influenza, în vederea utilizării în conformitate cu această invenție. Conform cu un alt mod preferat de realizare s-a obținut prin inginerie genetică vectorul VIJns, care este 385 390

395 același cu VIJ, cu excepția unui sit de restricție Sfil unic, în unicul sit KpnI la poziția 2114 a  
 lui VIJ-neo. Incidența siturilor Sfil în ADN-ul genomic uman este foarte scăzută (aproximativ  
 un sit pe 100000 baze). În acest fel acest vector permite urmărirea atentă a integrării vecto-  
 rului de expresie în ADN-ul gazdă, simplu prin digestia Sfil a ADN-ului genomic extras. O  
 400 perfecționare ulterioară este vectorul VIR. În acest vector, cât mai mult posibil din ADN-ul  
 neesențial a fost "lichidat" pentru a produce un vector cât mai compact. Acest vector este  
 un derivat al lui VIJns și este prezentat în fig.36 (SECV.ID:45). Acest vector permite să se  
 folosească inserte mai mari, care sunt codificate de mai puține secvențe nedorite și opti-  
 mizează absorbția de către celulele când constructul care codifică genele se introduce în țesut  
 înconjurător. În fig.36, porțiunile deletate ale lui VIJ-neo (fig.7) sunt prezentate ca o pauză  
 și secvența insertată este în text îngroșat, dar numărătoarea lui VIJ-neo este neschimbată.  
 405 Modificarea vectorului și procedurile de dezvoltare pot fi realizate prin metode cunoscute  
 specialistului în domeniu. Cu toate acestea, produsele particulare descrise, deși obținute prin  
 mijloace convenționale sunt utile în mod deosebit pentru scopul anume pentru care ele au  
 fost adaptate.

În timp ce unul din modurile de realizare preferate ale acestei invenții încorporează  
 gena influenza NP de la tulpinile A/PR/8/34, modul de realizare preferat încorporează o genă  
 410 NP, o genă MA, o genă NA, o genă PE, o genă M sau o genă NS de la izolate mai recente  
 de la virusul influenza. Aceasta se realizează prin prepararea copiilor ADN ale genelor virale  
 și apoi subclonarea individuală a genelor. Secvențe pentru numeroase gene a multor tulpini  
 ale virusului influenza sunt accesibile publicului pe GENBANK (circa 509 de astfel de sec-  
 vențe pentru genele virusului influenza A). Astfel, oricare dintre aceste gene, clonate din izo-  
 415 late virale recente Texax, Beijing sau Panama, tulpini care sunt recomandate de Centrul  
 pentru Controlul Bolilor ca fiind de dorit în vaccinuri antiinfluenza, sunt preferate în această  
 invenție (vezi FLU-IMMUNE vaccin virus influenza al lui Lederle, Physicians Desk Reference,  
 1993, p 1232, un vaccin trivalent purificat din antigen de suprafață influenza care conține o  
 420 proteină hemaglutinină de la A/Texax/36/91, H1N1; A/Beijing/353/89, H3N2; și B/Panama  
 (45/90). Pentru menținerea terminologiei constante, în descoperirea constructului ADN s-a  
 convenit următoarea notare: "vector-numele tulpinii-gena". Astfel, un construct în care este  
 clonată gena NP a tulpinii A/PR/8/34 în vectori de expresie VIJ-neo a primit numele: "VIJneo-  
 PR-NP". Natural, că așa cum tulpina etiologică a virusului se schimbă, se poate schimba și  
 425 gena precisă care este optimă pentru incorporare în medicament. Totuși, așa cum se  
 demonstrează în continuare, dat fiind faptul că se induc răspunsuri limfocitare citotoxice care  
 sunt capabile să protejeze față de tulpini heteroloage, variabilitatea de tulpină este mai puțin  
 critică în noile vaccinuri ale acestei invenții, comparativ cu vaccinurile bazate pe virus integral  
 sau subunitate polipeptidică. În plus, datorită faptului că medicamentul este ușor de  
 430 manipulat pentru inserarea unei gene noi, aceasta este o corecție ce se face ușor prin  
 tehnicile standard ale biologiei moleculare.

Deoarece, secvența nucleoproteinei este conservată printre diverse tulpini influenza,  
 s-a obținut protecție față de provocarea ulterioară printr-o tulpină de la care s-a clonat gena  
 pentru nucleoproteină. Comparațiile NP de la numeroase tulpini ale virusului gripei A nu au  
 435 demonstrat diferențe semnificative în structura secundară (M.Gammelin și colab., *Virology* 170,  
 71, 1989) și foarte puține schimbări în secvența aminoacizi (O.T.Gormanși colab., *J.Virology* 65,  
 3704, 1991). Într-o perioadă de aproximativ 50 de ani, NP în tulpinile umane s-a transformat  
 la o rată de 0,66 schimbări pe an. Mai mult decât atât, rezultatele conform invenției, care au  
 demonstrat că CTL specifice A/HK/68 recunosc celule țintă pulsate cu peptide NP sintetică  
 (147-155) derivată de la secvența NP a A/PR/8/34 arată că acest epitop CTL restricționat  
 440 N-2K<sup>d</sup> a rămas intact funcțional timp de peste 34 ani de la apariție (vezi fig.2). Ar fi de remar-  
 cat de asemenea, că acolo unde gena codifică un antigen viral de suprafață cum ar fi,  
 hemaglutinina sau chiar neuraminidaza, se generează în plus la răspunsul limfocitar foarte  
 important, un răspuns imun unoral (anticorp) de neutralizare.

Injectarea im a unui vector de expresie ADN care codifică o proteină internă conservată a gripei A a avut ca urmare generarea unei imunități de protecție semnificativă față de provocarea virală ulterioară. S-au produs în special, anticorpi NP specifici și CTL primare. Imunizarea ADN NP a avut ca rezultate, comparativ cu controalele, descreșterea titrurilor virale pulmonare, inhibarea pierderii în greutate și creșterea supraviețuirii. Răspunsul imun de protecție nu a fost mediat prin anticorpi specifici NP, așa cum s-a demonstrat prin absența efectului, doar al anticorpilor NP (vezi, exemplul 4) în combaterea unei infecții virale și astfel a fost datorat imunității celulare NP-specifice. În plus, s-au generat niveluri semnificative de CTL primare orientate contra NP. Protecția a fost față de o tulpină virulentă de influența A care a fost heteroloagă la tulpina de la care s-a clonat ADN-ul. Suplimentar, tulpina de provocare a apărut la mai mult de 3 decade sub tulpina A/PR/34, indicând că răspunsurile imune orientate împotriva proteinelor conservate pot fi eficiente în ciuda devierii și derivării antigenice a proteinelor variabile ale învelișului viral. Datorită faptului că produsele genei virusului gripei prezintă același grad de conservare și datorită faptului că gena virusului gripei prezintă același grad de conservare și datorită faptului că CTL pot fi generate ca răspuns la expresia intracelulară și prelucrarea MHC, este previzibil, ca alte gene ale virusului gripal vor provoca răspunsuri analoge celui obținut pentru NP. Metode pentru identificarea epitopilor imunogeni sunt binecunoscute în domeniu (vezi de exemplu, Shirai și colab., *J Immunol.* 148: 1657-1667, 1992; Choppin și colab., *J Immunol* 147: 575-583, 1991; Calin-laurens și colab., *Vaccine* 11: 974-978, 1993). Astfel, numeroase dintre aceste gene s-au clonat așa cum s-a demonstrat prin joncțiunile clonate din vectorul de expresie (vezi mai jos), astfel, încât aceste constructe constituie agenți profilactici într-o formă accesibilă.

Limitările curente ale vaccinurilor gripale autorizate accentuează nevoia dezvoltării de mijloace mai eficiente pentru prevenirea infecției și ameliorarea bolii. Vaccinurile mai vechi asigură protecție limitată, sunt eficiente doar față de câteva tulpini selectate ale virusului și scad în eficacitate după o perioadă scurtă. Astfel, vaccinurile uzuale în scopul de a fi eficiente trebuie să fie formulate pentru inoculare anuală. Generarea unui răspuns CTL îmbunătățit față de proteinele interne va asigura de asemenea, imunitate reactivă încrucișată semnificativă, de lungă durată, care acum nu este produsă prin vaccinul autorizat. Conform invenției, s-a demonstrat expresia proteinei de la constructul PNV în șoareci, fereți și primare non-umane, prin detectarea răspunsului imun al gazdei, orientat împotriva antigenilor gripali. Injectarea șoarecilor cu ADN care codifică NP de influența a avut ca urmare creșterea supraviețuirii, descreșterea titrurilor virale pulmonare și mai puțină pierdere în greutate în comparație cu animale de control după provocare cu subtipuri influența (tulpini deviate), diferite de cele incluse în constructele ADN NP. S-a observat, de asemenea, descreșterea rezidenței virale după provocare cu tulpini deviate la fereții inoculați cu ADN NP. Aceste rezultate arată că protecția față de tulpini influența în principal, este ajustată printr-un vaccin ADN ce include genele care codifică NP. Injectarea cu ADN HA urmată de provocarea experimentală a animalelor cu tulpini virale derivate a avut ca urmare chiar o mai substanțială descreștere în rezidența virală. Adăugarea ADN-ului proteinei interne mărește ușor gradul ridicat al protecției observată după injectarea doar a ADN-ului HA.

Răspunsul imun la ADN influența a urmat la șoareci aproape 6 luni de la injectare, cu persistența anticorpilor, activitate CTL și protecție *in vivo*. Repetarea injectării de ADN a mărit supraviețuirea după provocare la 25 săptămâni cu tulpină influența de subtip diferit și a indicat o capacitate de a produce imunitate de protecție mediată celular. Persistența anticorpului s-a cercetat timp de cel puțin 1 an după 2 injectări de ADN HA, cu persistența cel puțin pentru 9 luni după o singură injectare de ADN HA la maimuțe africane verzi.

Rezultatele de la aceste animale de experiență au arătat că injectarea directă de ADN asigură o metodă îmbunătățită pentru protecția oamenilor împotriva infecției și bolii

gripale. De remarcat, că protecția experimentală prin injectare de ADN s-a obținut la șoareci și fereți prin vaccinare animalelor care nu au avut de a face cu virusul gripal. Aduții umani vaccinați cu ADN au avut contacte anterioare cu virusul gripal. Aceste persoane vor demonstra un răspuns imun chiar sensibil mai mare, posibil creșterea duratei, după imunizare cu constructul ADN.

În vederea optimizării constructului pentru utilizare, se face o comparație a domeniului de dozare pentru imunogenicitate. În experimentele cu mamifere mici, au indus anticorpi și răspunsuri CTL cantități de ordinul a 1  $\mu\text{g}$  ADN NP. Imunizarea maimuțelor Rhesus a demonstrat răspuns anticorp la 2 din 2 animale cu doze de 100 și 1000  $\mu\text{g}$  ADN HA (A/PR/34), în timp ce unul din 2 animale au răspuns la o singură injectare de 10  $\mu\text{g}$ . În experimentele separate, s-au injectat maimuțe africane verzi cu un amestec de 5 constructe ADN diferite, care codifică HA de la 3 subtipuri, precum și ADN care codifică NP și MI de la virusul gripal A. Trei din 3 maimuțe din fiecare grup au răspuns la vaccinuri care au inclus 10  $\mu\text{g}$  sau 100  $\mu\text{g}$  din fiecare 50, 100 și 200  $\mu\text{g}$  ADN sunt eficiente la om.

Prevenirea infecției prin vaccin inactivate, autorizate se corelează cu nivelurile de anticorp seric și de la nivelul mucoasei orientat împotriva HA, dar nu se corelează răspunsuri anticorp pentru proteinele gripale interne. Astfel, HA trebuie să fie inclus în dezvoltarea vaccinului ADN gripal. Cu toate acestea, răspunsul imun la NP sporește răspunsul anticorpului la HA și proteinele interne gripale asigură un răspuns CTL inter-reactiv cu tulpini antigenice diferite de gripal. Așa cum s-a remarcat mai sus, experimentarea la animale a arătat, de asemenea, îmbunătățirea imunogenității și protecției când injectările includ constructe ADN care codifică proteine interne, precum HA. Incluziunea constructului ADN care codifică proteine interne ar putea de asemenea, să mărească eficacitatea vaccinului ADN la oameni. Deoarece, nivelurile de dozare sunt dependente, de asemenea, de interacțiunile acestor componente, testarea de rutină va permite unui specialist în domeniu să determine cantitatea ADN-ului din vaccin pentru a face un amestec de constructe ADN HA, NP și MI. Răspunsul gazdei la fiecare din aceste componente poate fi măsurat separat cu comparații ale tipurilor de inhibare a hemaglutininei și de neutralizare față de componentele HA și răspunsurile CTL față de epitopii MI și NP. Rezultatele se compară cu răspunsurile anticorp după injectarea constructelor care exprimă doar HA. Aceste studii permit evaluarea potențialului crescut de răspuns la un vaccin conținând ADN care codifică HA precum și proteinele interne.

Eficacitatea la oameni s-a demonstrat la voluntari care au primit vaccin ADN gripal, urmat de o provocare intranasală în vederea demonstrării eficacității vaccinului împotriva tulpinii virale similare, precum tulpinile gripale de subtip diferit. Compoziția, dozarea și regimurile de administrare se bazează pe studiile anterioare. Eficacitatea clinică este arătată prin rate de infectare, scorurile de îmbolnăvire și durata îmbolnăvirii. Aceste încercări clinice sunt comparate cu evaluarea în laborator a răspunsului imun al gazdei și rezidența virală, în vederea determinării markerilor înlocuitori care se corelează cu protecția.

Tehnicile standard ale biologiei moleculare pentru prepararea și purificarea constructelor ADN permit prepararea ADN-urilor terapeutice ale acestei invenții. În timp ce tehnicile standard ale biologiei moleculare sunt prin urmare suficiente pentru producerea invenției, constructe specifice dezvoltate aici asigură noi căi terapeutice care în mod surprinzător produc protecție încrucișată de tulpină, un rezultat care nu s-a obținut până acum cu vaccinuri virale integrale standard inactivate sau vaccinuri de subunități proteice.

Cantitatea ADN-ului exprimabil, care trebuie introdusă la un primitor de vaccin va depinde de forța transcripțională și promotorii translaționali folosiți în constructul ADN și de imunogenitatea produsului exprimat de genă. În general, se administrează direct în țesutul muscular o doză imunologică și eficientă profilactic de circa 1  $\mu\text{g}$  până la 1 ml, și de

preferință, 10 µg până la 300 µg. De asemenea, se au în vedere injectarea subcutanată, introducerea intradermică, impresia prin piele și alte moduri de administrare, precum intraperitoneală, intravenoasă sau eliberarea prin inhalare. De asemenea, se are în vedere să fie asigurate vaccinurile de rapel.

ADN-ul poate fi lipsit de înveliș, ceea ce înseamnă că nu este asociat cu nici o altă proteină, adjuvant sau alt agent care acționează asupra receptorilor sistemului imunitar. În acest caz, este de dorit, dar fără să fie limitat la, o soluție alcalină sterilă sau o soluție alcalină sterilă tamponată. Alternativ, ADN-ul se poate asocia cu lipozomi, precum lipozomi de lecitină sau alți lipozomi cunoscuți în domeniu, ca un amestec ADN-lipozomi (vezi de exemplu, **WO 9324640**) sau ADN-ul poate fi asociat cu un adjuvant cunoscut în domeniu pentru producerea de răspunsuri imune, cum ar fi, o proteină sau un alt purtător.

Agenți pentru sprijinirea absorbției celulare a ADN-ului precum, dar fără să fie limitat la, ioni de calciu, proteine virale și alți agenți care facilitează transfecția se pot folosi de asemenea, în mod avantajos. Acești agenți sunt cunoscuți în general, ca agenți pentru facilitarea transfecției și ca purtători acceptabili farmaceutic. Așa cum s-a folosit aici, termenul genă se referă la un segment de acid nucleic care codifică o polipeptidă anume. Termenul de medicament și vaccin sunt folosiți interschimbabil pentru indicarea compozițiilor utile pentru inducerea răspunsurilor imune. Termenii, construct și plasmid sunt folosiți interschimbabil. Termenul vector se folosește pentru a indica un ADN, în care genele pot fi clonate pentru utilizare conform metodei acestei invenții.

Pentru conformitate cu invenția, una din realizările preferate ale acestei invenții este o metodă pentru utilizarea genelor virusului gripei pentru inducerea răspunsurilor imune *in vivo*, într-un vertebrat, precum un mamifer, inclusiv un om, care cuprinde:  
 a- izolarea genei; b - legarea genei la secvențe reglatoare, astfel, încât gena este legată funcțional la secvențe de control, care atunci când sunt introduse într-un țesut viu, inițiază transcripția directă și translația ulterioară a genei; c - introducerea genei într-un țesut viu, și; d - la alegere, provocare cu gena influenza suplimentar.

Unul din modurile preferate de realizare a acestei invenții este o metodă pentru protejare față de tulpinile heteroloage ale virusului influenza. Aceasta se obține prin administrarea unei cantități eficiente dintr-un acid nucleic care codifică în epitop viral influenza conservat. De exemplu, întreaga gamă pentru nucleoproteine influenza asigură această funcție și este privită ca secvențele care codifică alte gene influenza și porțiuni ale acestora care codifică epitopi conservați în aceste gene asigurând în acest mod protecție încrucișată de tulpină.

Într-o altă realizare a acestei invenții, vaccinul ADN codifică nucleoproteina virusului gripal uman, hemaglutinină, matrice nestructurală sau produsul genei polimeraza. Exemple specifice ale acestei realizări sunt date în continuare, unde gena virusului gripei umane codifică nucleoproteina, polimeraza bazică 1, proteina nestructurală 1, hemaglutinina, matricea 1, polimeraza bazică 2 a virusului influenza uman izolat A/PR/8/34, nucleoproteina virusului influenza uman izolat A/Beijing/353/89, gena hemaglutininei virusului influenza uman izolat A/Texas/36/91 sau gena hemaglutininei virusului influenza uman izolat B/Panama/46/90.

În realizările specifice ale acestei invenții, constructul ADN codifică o genă de virus gripal, în care constructul ADN este capabilă să fie exprimată la introducere în țesuturi animale *in vivo* și să genereze un răspuns imun împotriva produsului exprimat al genei codificate de influenza. Mai mult, combinațiile cuprinzând astfel de constructe cu polinucleotide care codifică alți antigeni, neîntrudiți virusului gripal, sunt în mod clar avuți în vedere prin invenția de față.

545

550

555

560

565

570

575

580

585

- 590 Exemple ale genei influenza preferate care codifică constructul ADN includ:
- a) pRSV-PR-NP,
  - b) V1-PR-NP,
  - c) VIJ-PR-NP, al cărei capăt 5' este SECV.ID Nr:12,
  - d) VIJ-PR-PBI, al cărei capăt 5' este SECV.ID Nr:13,
  - 595 e) VIJ-PR-NS, al cărei capăt 5' este SECV.ID Nr:14,
  - f) VIJ-PR-HA, al cărei capăt 5' este SECV.ID Nr:15,
  - g) VIJ-PR-PB2, al cărei capăt 5' este SECV.ID Nr:16,
  - h) VIJ-PR-MI, al cărei capăt 5' este SECV.ID Nr:17,
  - i) VIJneo-BJ-NP, al cărei capăt 5' este SECV.ID Nr:20 și al cărei capăt 3' este
  - 600 secv.ID:21,
  - j) VIJneo-TX-PN, al cărei capăt 5' este SECV.ID Nr:24 și al cărei capăt 3' este SECV.ID Nr:25,
  - k) VIJneo-PA-HA, al cărei capăt 5' este SECV.ID Nr: 26 și al cărei capăt 3' este SECV.ID Nr:27,
  - 605 l) VIJns-GA-HA(A/Georgia/03/93), constructul de mărime 6,56 kb, al cărei capăt 5' este SECV.ID Nr:46 și al cărei capăt 3' este SECV.ID Nr:47,
  - m) VIJns-TX-MA(A/Texas/36/91), construct de mărime 6,56 kb, al cărei capăt 5' este SECV.ID Nr:48 și al cărei capăt 3' este SECV.ID Nr:49,
  - n) VIJns-PA-HA(S/panama/45/90), construct de mărime 6,61 kb, al cărei
  - 610 capăt 5' este SECV.ID Nr:50 și al cărei capăt 3' este SECV.ID Nr:51,
  - o) VIJns-BJ-NP (A/Beijing/353/89), construct de mărime 6,42 kb, al cărei capăt 5' este SECV.ID Nr:52 și al cărei capăt 3' este SECV.ID Nr:53,
  - p) VIJns-BJ-MI(A/Beijing/353/89), construct de mărime 5,62 kb, al cărei capăt 5' este SECV.ID Nr:54 și al cărei capăt 3' este SECV.ID Nr:55,
  - 615 q) VIJns-PA-NP (S/Panama/45/90), construct de mărime 6,54 kb, al cărei capăt 5' este SECV.ID Nr:56 și al cărei capăt 3' este SECV.ID Nr:57,
  - r) VIJns-PA-MI(B/Panama/45/90), construct de mărime 5,61 kb, al cărei capăt 5' este SECV.ID Nr:58 și al cărei capăt 3' este SECV.ID Nr:59.

În continuare, se dau următoarele exemple de realizare a invenției, în legătură și cu fig. 1-36, care reprezintă:

- fig.1, Detecția în mușchi a plasmoidului ADN NP. Șoareci BALB/c s-au injectat de 3 ori, la intervale de 3 săptămâni cu ADN RSV-NP sau vector blanc (100 μg/picior) în ambii mușchi cvadriiceps, apoi a urmat infecție prin influenza. Mușchii s-au îndepărtat la 4 săptămâni după injectarea finală și s-au înghețat imediat în acest lichid. Apoi, ei au fost pulverizați imediat în tampon de liză (25 mM TRIS-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH =8,2 M *trans*-1:2-acid diaminociclohexan-tetraacetic(CDTA), 2 mM DTT, 10% glicerol, 1% Triton-X-100). Într-un MIKRODISMEMBRATOR™ (B.Braun Instruments) și s-a extras ADN-ul cu greutate moleculară mare prin precipitare cu fenol/cloroform și etanol. S-a realizat o reacție PCR de 40 cicluri /PCR s-a realizat urmând instrucțiunile trusei perkin Elser Cetus GENEAMP™) pentru detectarea prezenței plasmidului ADN NP în mușchi. S-a generat un produs PCR de 772 baze perechi (vezi capătul săgeții). care se întinde, de la promotorul GMV prin majoritatea porțiunii 5' a genei NP insertate de la oligonucleotida sens de 18 baze lungime care s-a inițiat în regiunea promotorului (GTGTGCACCTCAAGCTGG, secv. ID:1) și o oligonucleotidă antisens de 23 baze lungime inițială în porțiunea 5' a secvenței NP insertate (CCCTTTGAGAATGTTGCACATTC, secv.ID:2).

635 Produsul 772 bp se observă pe un gel de agaroză colorat bromură de etidiu în probele de mușchi alese injectate ADN NP, dar nu se observă pe control injectat cu vectorul blanc (600 L). Marcarea de mai sus a fiecărei linii indică numărul șoarecelui și piciorul drept sau stâng.

# RO 117710 B1

- fig.2, Producerea anticorpilor NP în șoareci injectați cu ADN NP. S-au injectat șoarecii cu 100 μg ADN VI-NP în fiecare picior la 0,3 și 6 săptămâni și s-a prelevat sânge în săptămânile 0,2 5 și 8. Prezența IgG anti-NP în ser s-a cercetat printr-un test ELISA (J.J.Donnely și colab., *J.Immunol*, 145, 3071, 1980), cu NP purificat din celule de insecte transfectate cu un vector de expresie baculovirus. Rezultatele s-au marcat cu medie log<sub>10</sub> ELISA<sup>+</sup> SEM(n=10) față de timpul de la prima injectare de ADN NP. Șoarecii imunizați cu vectorul blanc nu au generat anticorpi NP detectabili. 640 645

- fig.3, Procentul lizei specifice determinat în a 4-a oră a țesutului de eliberare <sup>51</sup>Cr, pentru CTL obținute de la șoareci imunizați cu ADN. Șoarecii s-au imunizat cu 400 μg VI-NP ADN (cercuri umplute) sau vector blanc (pătrate umplute) și s-au sacrificat 3-4 săptămâni mai târziu. Controlul CTL negativ s-a obținut de la un șoarece recuperat de la injectare 4 săptămâni mai devreme cu A/HK/68 (triunghiuri umplute). Graficele prezintă date de la șoareci reprezentativi individual. S-au studiat cel puțin 8 indivizi pentru fiecare set de condiții. Tabloul A: Celule splenice restimulate cu celule splenice autoloage pulsate NP 147-155 și cercetate față de ținte P815 pulsate NP 147-155. Tabloul B: Celule splenice restimulate cu celule splenice autoloage pulsate NP 147-155 și cercetate față de ținte p815 infectate cu influenza A Victoria/73 (H3N2), timp de 6 h înainte adăugării de CTL. Tabloul C: Celule splenice restimulate cu ConA și IR-2 fără antigen suplimentar și cercetate față de celule P815 pulsate cu NP 147-155. Tabloul D: S-au injectat șoareci cu 200 μg/injectare ADN VI-NP sau vector blanc de 3 ori la intervale de 3 săptămâni. S-au prelevat splinele la 4 săptămâni după ultima imunizare, s-au cultivat celule splenice cu IL-2 și ConA, timp de 7 zile și s-au cercetat CTL față de celule țintă P815 infectate cu A/Victorieia/73. 650 655 660

- fig.4, Pierderea de masă (în g) și recuperarea la șoareci imunizați ADN după provocare intranasală fără anestezie cu 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> de A/HK/68. Șoarecii s-au imunizat de 3 ori la intervale de 3 săptămâni cu ADN VI-NP sau vector blanc, sau nu s-au infectat și s-au provocat la 3 săptămâni după ultima imunizare. S-au determinat greutatea pentru grupul de 10 șoareci la momentul provocării și zilnic din ziua a 4-a pentru șoareci infectați ADN-NP (cercuri umplute), controale cu vector blanc (triunghiuri neumplute). S-a prezentat media greutăților ±Sem. Șoarecii injectați ADN NP au prezentat pierderi de greutate sensibil mai mici din ziua 8 spre ziua 13, față de șoarecii imunizați cu vector blanc (p mai mic sau egal cu 0,005) și șoareci neinjectați (p mai mic sau egal cu 0,001) așa cum s-au analizat prin țesut t. Nu s-au remarcat diferențe semnificative între două controale (p00,9 prin țesut t). 665 670

- fig.5, Supraviețuirea șoarecilor imunizați ADN după provocare intranasală (sub anestezie) cu 10<sup>2,5</sup> TCID<sub>50</sub> de A/HK/68. Șoareci imunizați de 3 ori la intervale de 3 săptămâni (cercuri umplute) și controale neinjectate (triunghiuri neumplute) și s-au provocat la 3 săptămâni după imunizare finală. Procentul de supraviețuire s-a arătat pentru grupuri de 9 sau 10 șoareci. Supraviețuirea șoarecilor injectați a fost semnificativ mai mare decât controale (p=0,004 prin analiză Chisquare), în timp ce nu s-a observat nici o diferență semnificativă între șoarecii injectați cu vector blanc sau șoareci neinjectați (p=0,17 prin analiză Chisquare). 675

- fig.6, Secvența vectorului de expresie VIJ, Secv.ID Nr:10.

- fig.7, Secvența vectorului de expresie VIJ neo, Secv.ID Nr:18.

- fig.8, Secvența promotor - terminator CMVintA-BGH, Secv.ID Nr:11.

- fig.9, Anticorp de maimuță anti-NP.

- fig.10, Inhibarea hemaglutinării la feret, cu linia punctată indicându-se titrul minim de anticorp de protecție și cu un cerc ce are o linie prin el, fiind notată valoarea medie.

- fig.11, Anticorp IgG anti-NP la fereți după imunizare cu ADN.

- fig.12, Virus influenza rezident la feret cu și fără imunizare ADN.

- fig.13, Diagrama vectorilor pRSV-PR-NP și VI-NP. X marchează regiunea de codificare inserată. 680 685

- 690 - fig.14, Tulpini și proteine de influența, schematic.  
 - fig.15, Prelucrarea ADN-ului injectat în interiorul unei celule schematic.  
 - fig.16, Rezistența fereților la influența A/PR/8/34 indusă prin imunizare cu genele HA și proteină internă.  
 - fig.17, Vectorul VIJns, schematic  
 - fig.18, S-au injectat maimuțe africane verzi cu un amestec de ADN-uri care constă
- 695 din ADN HA (A/Beijing/89, B/Panama/90, A/Texas/91), ADN NP (A/PR/34) și ADN MI (A/PR/34). Fiecare component a fost administrat de două ori, fie 10 μg (pătrate umplute), fie 100 μg (cercuri umplute) cu un interval, de 6 săptămâni (vezi săgețile). Pentru comparație s-au injectat alte animale cu vaccinuri autorizate, subvironice (pătrate neumplute) și virioni integrali (cercuri umplute) la doză umană integrală (45 μg echivalent proteină: 15 μg/HA). S-au colectat probe de ser la fiecare 2 săptămâni, timp de 18 zile și s-au analizat prin titru MI față de HA A/Beijing/89. Datele sunt reprezentate ca medie geometrică a titrului MI\*SEM, unde n=3.
- 700 - fig.19, S-au injectat șoareci BALB/c, femele (4-6 săptămâni) cu ADN NP A/PR/34 (200 μg) de 3 ori la intervale de 3 săptămâni. Controalele negative au inclus șoareci cu ADN control (200 μg), proteină NP recombinată (10 μg) și șoareci neinițiați neinjectați (simulare). Pentru comparație s-au testat, de asemenea, șoareci infectați cu virusul influența A/HK/68 (gripă). S-au obținut *in vitro* CTL 6 luni post doză cu celule splenice singenice infectate cu virus, față de celulele P815 pulsate peptidă NP la un raport efector: țintă de 10:1. Datele reprezintă lista specifică % + sd, unde n=3.
- 705 - fig.20, S-au injectat șoareci C3H/HeN cu mioblaste normale C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (1 x 10<sup>7</sup> celule). Această cantitate de proteină NP (2 μg) a fost suficientă pentru generarea răspunsurilor anti-corp și a fost echivalentă cu aproximativ de 100 de ori cantitatea NP prezentă în mioblastele transfectate NP transplantate. S-au preparat CTL de la acești șoareci 6 săptămâni după tratament și s-au restimulat *in vitro* cu celule splenice singenice infectate cu virus influența.
- 710 Drept control pozitiv s-au preparat CTL de la șoareci care au fost infectați cu virus influența A/MK/68. Celulele țintă folosite au fost mioblaste netratate (bare umplute), infectate viral influența A/Victoria/23 (bare cu dungă) și mioblaste transfectate NP (bare punctate) la un raport efector:țintă de 25: 1. Datele sunt prezentate ca liză specifică % ±, unde n=3.
- 715 - fig.21, Șoareci BALB/c femele, în vârstă de 4 săptămâni, s-au imunizat intramuscular cu 200 μg ADN NP de 3 ori la intervale de 3 săptămâni. Șoarecii s-au provocat la 3 săptămâni după a treia imunizare cu 300 TCID<sub>50</sub> de A/HK/68, administrat sub anestezie (provocare a tractului respirator în totalitate). Proporția șoarecilor supraviețuitori (10/grup) este marcată față de timpul după provocare.
- 720 - fig.22, Șoareci BALB/c, femele în vârstă de 4 săptămâni, s-au imunizat intramuscular cu 100 μg ADN NP de 3 ori la intervale de 3 săptămâni. Șoarecii s-au provocat 3 săptămâni după a treia imunizare cu 300 TCID<sub>50</sub> de A/HK/68, administrat sub anestezie (provocare a tractului respirator în totalitate). S-au cântărit zilnic șoarecii și s-a calculat proporția greutatei inițiale pentru fiecare șoarece care supraviețuiește. S-a marcat media procentuală a greutatei inițiale + SEM, față de timpul după provocare.
- 725 - fig.23, S-au imunizat șoareci BALB/c femele, în vârstă de 4 săptămâni, intramuscular, cu 200 μg ADN NP de 3 ori la intervale de 3 săptămâni. Șoarecii s-au provocat 3 săptămâni după a treia imunizare cu 200 TCID<sub>50</sub> de A/HK/68, administrat fără anestezie (provocare a tractului respirator superior). S-au supus eutanasiei șoarecii la 7 zile după provocare, s-au recuperat și omogenizat plămânii și s-au determinat titrurile virale prin titrare
- 730 serială pe celule MDCK.
- 735 - fig.24, S-au imunizat șoareci BALB/c femele, în vârstă de 4 săptămâni, intramuscular, cu 6, 25, 100 sau 200 μg ADN NP de 3 ori la intervale de 3 săptămâni.



# RO 117710 B1

Șoarecii s-au provocat 3 săptămâni după a treia imunizare cu 300 TCID<sub>50</sub> de A/HK/68, administrat sub anestezie (provocarea tractului respirator în totalitate). Proporția șoarecilor care supraviețuiesc (10 șoareci/grup) este marcată față de timp, după provocare.

740

- fig.25, S-au imunizat șoareci BALB/c femele, în vârstă de 4 săptămâni, intramuscular, la intervale de 3 săptămâni cu 200 μg ADN NPA/PR/34, ADN control sau simulare. Șoarecii s-au provocat apoi cu TCID<sub>50</sub> A/HK/68, sub anestezie la 6, 12 și 25 săptămâni după a treia injectare a ADN-ului. Șoarecii selectați s-au reimunizat cu 200 μg ADN NP la săptămâna 22 și apoi s-au provocat la săptămâna 25. S-a prezentat media greutăților ca procent al greutății totale inițiale pentru fiecare grup. Greutatea de control prezentată este media tuturor grupurilor de control de la provocările din săptămânile 6, 12 și 25, un total a 6 grupuri care au primit ADN de control sau la care s-a simulat injectarea. Grupurile inițiale au conținut fiecare 10 animale; șoarecii care au murit s-au exclus de la analiză ulterioară a grutății.

745

- fig.26, S-au imunizat i.m. fereți adulți masculi (în vârstă de 22-26 săptămâni) cu 1 mg ADN care codifică NP de la A/beijing/89, 1 mg ADN care codifică MI de la A/Beijing/89 sau 1 mg ADN combinat, pe zilele 0 și 42. Fereții de control au primit ADN care nu codifică sau o doză umană integrală (15 μg/tulpină) din vaccin integral autorizat pentru virusul gripal. (formularea 92-93) care conține A/Beijing/89 pe zilele 0 și 42. Fereții s-au provocat cu A/Georgia/93 pe ziua 56. S-a determinat rezidența virală din spălături nazale. așa cum s-a descris mai sus. S-a comparat rezidența virală pe zilele 3-5 cu rezidența de la fereții care au primit ADN de control printr-o analiză pe două căi a variației. Rezidența virală la fereții care au primit ADN MI sau ADN NP+MI a fost semnificativ mai scăzută (p mai mic de 0,0001, 0,0016 și, respectiv, mai mic de 0,001), decât rezidența la fereții de control. Rezidența la fereții care au primit NP (nu s-au prezentat date), NI sau NP+MI nu a diferit semnificativ de rezidența de la fereții care au primit vaccinul autorizat (p, 0,104, 0,533 și respectiv, 0,145). Doza de imunizare de 1 mg s-a ales arbitrar; studii privind domeniul de dozare s-au realizat la primate non-umane.

750

755

760

- fig.27, S-au imunizat intramuscular grupuri de 8 fereți masculi în vârstă de 22-25 săptămâni cu ADN control, soluție salină sau ADN care codifică proteinele de la influenza A/PR/34 pe zilele 0, 21 și 121 și s-au provocat intranasal cu 200 TCID<sub>50</sub> A/PR/34 pe ziua 148. Animalele imunizate au primit 1 mg ADN NP sau 2 mg ADN combinat NP, NS1, PB1, PB2 și M1 (400 μg din fiecare construct). Controalele au primit 0,5 ml soluție salină/picior sau 1 mg ADN control, pentru scopurile analizei, grupările care au primit soluție salină ADN control s-au combinat (control) ca și grupările care au primit ADN NP singur sau în combinație cu alte gene ale proteinelor interne (intern). Graficul arată titrurile de infecțiozitate ale spălăturii nazale exprimate în TCID<sub>50</sub>/50 μl dintr-un volum de 3 ml fluid de spălare nazală. Fluidul de spălare nediluat (cea mai scăzută soluție testată) s-a considerat a fi o diluție 1:10 din exudatul nazal inițial și s-a acordat unei probe pozitive nediluate o valoare de 1 log. Titrurile peste 1 log s-au desemnat pe baza interpolării Reed-Muech prin 3 replicare la obținerea unui punct final de infecțiozitate de 50%. Probele care au fost negative când s-au testat nediluate au primit o valoare de 0 log. Valorile pentru p prezentate pe grafic s-au prelucrat pe computer pentru fereții imunizați față de controale pe zilele indicate printr-un test -T pentru două medii. Valorile pentru p pentru curbele întregi s-au prelucrat pe computer printr-o analiză pe două căi a variației și au fost mai mici de 0,0001 pentru NP, față de control și mai mici de 0,001 pentru ADN-urile combinate, față de control.

765

770

775

780

- fig.28, Supraviețuirea șoarecilor imunizați cu ADN și apoi, provocați cu virus influenza. Șoarecii s-au injectat im cu 200 μg ADN care codifică HA de la A/PR/34 sau ADN control (care nu codifică), de 3 ori la intervale de 3 săptămâni. După 3 săptămâni de la imunizarea finală șoarecii s-au provocat pe întregul tract respirator (prin instilație internazală sub anestezie) cu 100 TCID<sub>50</sub> de A/PR/34. Datele sunt marcate ca supraviețuire % față de timp după provocare (n=9 sau 10 șoareci per grup).

785

790 - fig.29, Pierderea în greutate la șoarecii imunizați cu ADN și apoi provocați cu virus  
gripal. S-au injectat i.m. șoarecii cu 200  $\mu$ g ADN care codifică HA de la A/PR/34 sau ADN  
control (care nu codifică), de 3 ori la intervale de 3 săptămâni. După 3 săptămâni de la imu-  
nizarea finală șoarecii s-au provocat pe întregul tract respirator (prin instilație internazală sub  
anestezie) cu 1000 TCID<sub>50</sub> de A/PR/34. Datele s-au marcat ca % din greutatea inițială pentru  
795 fiecare animal individual, media față de timp pentru fiecare grup (animalele moarte s-au  
exclus din medie).

- fig.30, Supraviețuirea șoarecilor imunizați cu ADN și apoi provocați cu virus gripal.  
Șoarecii s-au injectat im cu 1,10 sau 100  $\mu$ g ADN care codifică HA de la A/PR/34 sau ADN  
control (care nu codifică) de 3 ori la intervale de 3 săptămâni. După 3 săptămâni de la imuni-  
zarea finală șoarecii s-au provocat pe întregul tract respirator (prin instilație internazală sub  
800 anestezie) cu 1000 TCID<sub>50</sub> de A/PR/34. Datele sunt marcate ca supraviețuire % față de timp  
după provocare (n=9 sau 10 șoareci per grup).

- fig.31, S-a imunizat intramuscular grupuri de 8 fereți masculi în vârstă de 22...25  
săptămâni cu ADN control, soluție salină sau ADN care codifică proteina influenza A/PR/34  
pe zilele 0, 21 și 121 și s-au provocat intranazal cu 200 TCID<sub>50</sub> A/PR/34 pe ziua 148.  
805 Animalele imunizate au primit 1 mg ADN HA sau 2 mg ADN combinat HA, NP, NS1, PB1,  
PB2 și M1 (330  $\mu$ g din fiecare construct). Controalele au primit 0,5 ml soluție salină/picior  
sau 1 mg ADN control. Pentru scopurile analizei, grupările care au primit soluție salină și  
ADN control s-au combinat (Control) ca și grupările care au primit ADN HA singur sau în  
combinăție cu alte gene ale proteinelor interne (HA, HA+Intern). Graficul arată titrurile de  
810 infecțiozitate ale spălăturii nazale exprimate în TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ l dintr-un volum de 3 ml fluid de  
spălare nazală. Fluidul de spălare nediluat (cea mai scăzută diluție testată) s-a considerat  
a fi o diluție 1:10 din exudatul nazal inițial și s-a acordat unei probe pozitive nediluate o  
valoare de 1 log. Titrurile peste 1 log s-au desemnat pe baza interpolării Reed-Muench prin  
3 replicare la obținerea unui punct final de infecțiozitate de 50%. Probele care au fost  
815 negative când s-au testat nediluate au primit o valoare de 0 log. Valorile lui p pentru curbele  
întregi s-au prelucrat pe computer printr-o analiză pe două căi a variației și au fost mai mici  
de 0,0001 pentru HA față de control și mai mici de 0,0001 pentru ADN-urile combinate față  
de control.

- fig.32, S-au imunizat i.m. fereți adulți masculi (în vârstă de 22-26 săptămâni) cu  
820 1 mg ADN care codifică HA de la A/Georgia/93 pe zilele 0 și 42. Fereții de control au primit  
ADN care nu codifică sau o doză umană integrală (15  $\mu$ g/tulpină) din vaccin integral autorizat  
pentru virusul gripal. (Formulara 92-93) care conține A/Beijing/89 pe zilele 0 și 42. Fereții  
s-au provocat cu A/Georgia/93 pe ziua 56. S-a comparat rezidența virală din spălături  
825 nazale, așa cum s-a descris mai sus. S-a comparat rezidența virală pe zilele 1-6 cu rezidența  
de la fereții care au primit ADN de control printr-o analiză pe două căi a variației. Rezidența  
virală la fereții care au primit ADN HA a fost semnificativ mai scăzută (p mai mic de 0,0001)  
decât rezidența la fereții de control.

- fig.33, S-au imunizat i.m. fereți adulți masculului (în vârstă de 22-26 săptămâni) cu  
1 mg/ADN care codifică HA de la A/Hawaii/89 (nu s-au prezentat datele) pe zilele 0 și 42.  
830 Fereții de control au primit ADN care nu codifică sau o doză umană integrală (15  $\mu$ g/tulpină)  
din vaccin integral autorizat pentru virusul gripal. (formulara 92-93) care conține  
A/Beijing/89 pe zilele 0 și 42. Fereții s-au provocat cu A/Georgia/93 pe ziua 56. S-a deter-  
minat rezidența virală din spălături nazale, așa cum s-a descris mai sus. S-a comparat rezi-  
dența virală pe zilele 1-6 cu rezidența de la fereții care au primit ADN de control printr-o  
835 analiză pe două căi a variației. Rezidența virală la fereții care au primit ADN HA A/Hawaii/91  
a fost semnificativ mai scăzută (p mai mic de 0,0001) decât rezidența la fereții de control.  
Rezidența la fereții care au primit ADN HA A/Hawaii/91 a fost semnificativ mai mică decât

## RO 117710 B1

rezidența la animalele care au primit produsul autorizat ( $p=0,021$  pentru ADN HA A/Hawaii/91; ANOVA pe două căi pentru zilele 1-6); rezidența la fereții care au primit ADN HA A/Beijing/89 (datele nu s-au prezentat) nu a fost semnificativ diferită de rezidența de la animalele care au primit produsul autorizat ( $p=0,058$ ; ANOVA în 2 moduri pentru zilele 1-6).

840

- fig.34, S-au imunizat i.m. fereți adulți masculului (în vârstă de 22-26 săptămâni) cu 1 mg ADN care codifică HA de la A/Hawaii/91 (vezi fig.13), sau cu 330  $\mu\text{g}$  din fiecare ADN care codifică HA de la A/Hawaii(91 și NP și MI de la A/Beijing/89 pe zilele 0 și 42. Fereții de control au primit ADN care nu codifică sau o doză umană integrală (15  $\mu\text{g}$ /tulpină) din vaccin integral autorizat pentru virusul gripal. (Formulara 92-93) care conține A/Beijing/89 pe zilele 0 și 42. Fereții s-au provocat cu A/Georgia/92 pe ziua 56. S-a determinat rezidența virală pe zilele 1-6 cu rezidența de la fereții care au primit ADN de control printr-o analiză pe două căi a variației. Rezidența virală la fereții care au primit ADN HA+NP+MI a fost semnificativ mai scăzută, decât rezidența la fereții care au primit vaccinul autorizat ( $p$  mai mic de 0,0001) sau numai ADN HA ( $p=0,0053$ ).

845

850

- fig.35, S-au imunizat i.m. fereți adulți masculi (în vârstă de 22-26 săptămâni) cu 1 mg ADN care codifică HA de la A/Georgia/93 sau cu 330  $\mu\text{g}$  din fiecare ADN care codifică HA de la A/Hawaii/91 și NP și MI de la A/Beijing/89 pe zilele 0 și 42. Fereții de control au primit ADN care nu codifică sau o doză umană integrală (15  $\mu\text{g}$ /tulpină) din vaccin integral autorizat pentru virusul gripal. (formulara 92-93) care conține A/Beijing/89 pe zilele 0 și 42. Fereții s-au provocat cu A/Georgia/93 pe ziua 56. S-a determinat rezidența virală din spălături nazale așa cum s-a descris mai sus. S-a comparat rezidența virală pe zilele 1-6 cu rezidența de la fereții care au primit ADN de control printr-o analiză în două moduri a variației. Rezidența virală la fereții care au primit ADN HA+NP+MI nu a fost diferită semnificativ de rezidența virală de la animalele care au primit ADN HA homolog ( $p=0,064$ ).

855

860

- fig.36., Secvența pentru VIR.

**Exemplul 1.** Prepararea constructelor ADN care codifică proteinele virusului influenza uman

1) pnRSV-PRNP Gena A/PR/8(34/NP s-a izolat de la pAPR-501 (J.F.Y și colab., Young în *The origin of Pandemic Influenza Viruses*, W.G.Lawer, Ed.(Elsevier Science Publishing Co., Inc., 1983) ca un fragment EcoRI de 1565 baze-perechi, completat Klenow și clonat în situsul XbaI completat Klenow și tratat cu fosfatază al lui pRSV-BL. PRSV-BL s-a construit diferind, mai întâi vectorul pBL-CAT3 (B.Luckow și G.Schutz, *Nuc.Acids Res.*15,5490 (1987), Xho I și Nco I pentru îndepărtarea secvenței care codifică secvența CAT, s-a completat Klenow și s-a autoligat. Fragmentul promotor RSV s-a izolat ca Nde I și Asp 718 de la pRshgrnx (V.Giguere și colab., *Nature* 330, 624 (1987), completat Klenow și clonat în situsul HindIII al vectorului intermediar generat mai sus (pBL-CAT la care lipsește secvența CAT).

865

870

2) VI-NP. Vectorul de expresie VI s-a construit de la pCMVIE-AKI-DHFR (Y.Whang și colab., *J.Virol.*61, 1796 (1987). Genele AKI și DHFR s-au îndepărtat prin secționarea vectorului cu EcoR I și autoligare. Acest vector nu conține intronul A în promotorul CMV, așa că el s-a adăugat ca un fragment PCR care a avut deletat situsul intern SAC I (la 1885 după cum s-a numerotat în B.S. Chapman și colab., *Nuc.Acids.Rec.* 19,397 (1991). Matrița folosită pentru reacțiile PCR a fost pCMVintA-Lux., făcut prin ligarea grafmentului Hind III și Nhe I de la pCMV6a120 (vezi B.S.Chapman și colab., *ibid.*), care include intensificatorul /promotorul hCMV-IEI și intronul A în situsurile Hind III și Xba I ale lui pBL3 pentru a genera pCMVintBL. Fragmentul genei luciferazei de la 1881 baze-perechi (Hind III-Sma I completat Klenow) de la RSV-Lux (J.R. de Wet și colab., *Mol.Cell Biol.*7,725,1987) s-a clonat fosfatază.

875

880

885

Primerii care înconjoară intronul A sunt:

Primerul 5', Secv.ID Nr:5:

5'-CTATATAAGCAGAG CTCGTTTAG-3'

Primerul 3', Secv.ID Nr:6:

890 5'-GTAGCAAAGATCTAAGGACGGTGA CTGCAG-3'

Primerii folosiți pentru îndepărtarea stului Sac I sunt:

primerul sens, Secv.ID Nr:7:

5'-GTATGTCTGAAAATGAGCGTGGAGATTGGGCTCGCAC-3'

și primerul antisens Secv.ID Nr:8:

895 5'-GTGCGAGCCCAATCTCCACGCTCATTTTCAGACACA TAC-3'

Fragmentul PCR s-a tăiat cu Sac I și Bgl II și s-a inserat în vectorul care fusese tăiat cu aceleași enzime. Gena NP de la influenza A (A/PR/8/34) s-a decupat din pAPR501 (J.F.Youngși colab., în *The origin of Pandemic Influenza Viruses*, W.C.Lawer, Ed/Elsevier Science Publishing Co., Inc.1983), ca un fragment EcoR I și s-a teșit. El s-a inserat în VI-NP la situl teșit Bgl II pentru a face VI-NP. Plasmidele s-au propagat în *E. coli* și s-au purificat prin metoda lizei alcaline (J.Sambrook, S.F.Britsch și T.Maniatis, în *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, ediția a doua (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). ADN-ul stratificat CsCl s-a precipitat cu etanol și s-a resuspendat în soluție salină 0,9 % la 2 mg/ml pentru injectare.

905 **Exemplul 2. Analiza limfocitelor T citotoxice pentru virus influenza uman**

Limfocitele T citotoxice s-au generat de la șoareci care s-au imunizat cu ADN sau care s-au recuperat de la infecție cu A/HK/68. Culturi de control s-au derivat de la șoareci care au fost injectați cu ADN control și de la șoareci neinjectați. S-au preparat suspensii de celule izolate, s-au îndepărtat eritrocitele prin liză cu clorură de amoniu și celulele izolate, s-au îndepărtat eritrocitele prin liză cu clorură de amoniu și celulele splenice s-au cultivat în RPMI 1640 suplimentar cu 10% ser fetal de bovine (FBS), 100 μg/ml penicilină, 100 u/ml streptomycină, 0,01 M HEPES (pH= 7,5) și 2 ML-glutamidă. S-a adăugat un număr egal de celule autoloage iradiate stimulator, pulsate 60 min cu epitop peptidic restricționat H-2K<sup>d</sup> NP147-155 (Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val, Secv.ID:9) la 10 μM sau infectate cu influenza A/PR/8/34 (MINI) și 10 μ/ml IL-2 uman recombinat (Cellular products, Buffalo, NY) și culturile s-au menținut 7 zile, la 37°C cu 5 % CO<sub>2</sub> și umiditate relativă 100%. În experimente selectate, în locul celulelor autoloage stimuloare s-a adăugat rIL-2 (20 u/ml) și ConA (2μg/ml). Activitatea efectoare a celulei T citotoxice s-a determinat cu celule P8115 marcate, timp, de 3 h, cu 60 μCi <sup>51</sup>CR/10<sup>6</sup> celule, și pulsate ca mai sus cu NP147-155 sau infectate cu influenza A/Victoria/73 (H3N2). Țintele control s-au etalat la 1 x 10<sup>4</sup>/celule/godeu în plăci 96 godeuri și s-au incubat în triplicate cu efectori, timp, de 4 h. Supernatantul (30 μl) s-a îndepărtat din fiecare godeu și s-a cuantificat într-un numărător de scintilație Setaplate (LKB-Wallac, Turku, FinlADN). S-au determinat pentru fiecare preparat țintă numerele maxime, eliberate prin adăugare de HCl.

925 6 M și numerele spontane eliberate fără CTL. S-a calculat procentul lizei specifice ca:(experimental-spontan)/(maxim-spontan) x 100.

**Exemplul 3. Producerea in vivo de CTL și anticorpi NP specifici.**

Producerea in vivo de CTL și anticorpi NP specifici.

930 S-au injectat șoareci BALB/c în cvadriceps la ambele picioare cu plasmoid cADN care codifică nucleoproteine A/PR/8/34 condusă, fie printr-un promotor de virus sarcoma Rous, fie citomegalovirus.

Vectorii expresie folosiți au fost:

- 1) pNRSV-PRNP, vezi exemplul 1
- 2) VI-NP, vezi exemplul 1

# RO 117710 B1

- Animalele folosite au fost șoareci femele BALB/c, obținuți de la Charles River Laboratorie, Raleigh. NC. S-au obținut șoareci în vârstă de 4-5 săptămâni și s-au injectat inițial cu ADN la vârsta de 5-6 săptămâni. În afară de cazul când s-a notat altfel, s-au administrat injecții de ADN în mușchii cvadriiceps ai ambelor picioare, fiecare picior primind 50 l de soluție salină sterilă care conține 100 g ADN. Șoarecii au primit 1,2 sau 3 seturi de inoculări la intervale de 3 săptămâni. Animalele control negativ nu s-a injectat sau s-au injectat cu vectorii blanc corespunzător căruia îi lipsește gena NP. 935
- Prezența sau absența plasmidului ADN NP în mușchiul animalelor selectate s-a analizat prin PCR (Gig.1). Plasmidul ADD (fie ADN NP, fie ADN luciferază) s-a detectat în 44 din cei 48 de mușchi injectați testați. La șoarecii injectați cu ADN luciferază recuperată în extracte de mușchi, conform metodelor cunoscute în domeniu (J.A.Wolff și colab., *Science* 247, 1465 (1990), G.Ascadi și colab., *Nature* 352, 815 (1991), H.Lin și colab., *Circulation* 82, 2217 (1990); R.N.Kitsis și colab., *proc.Natl Acad.Sci (USA)*, 88. 4138(1991), E.Hansen și colab., *FEBS Lett.*290. 73, (1991); S.Jiso și colab., *Hum.Gene Therapy* 3, 21 (1992); J.A.Wolff și colab., *Human Mol.Genet* 1, 363 (1992). 945
- Expresia NP în mușchi, după injectare de ADN NP a fost sub limita detectării pentru analiza Western blot (sub 1 ng), dar s-a indicat prin producerea anticorpilor NP specifici (vezi fig.2). 950
- Pentru analiza generării CTL specifice NP, s-au recuperat splinele la 1-4 săptămâni după imunizare și celulele splenice s-au restimulat cu IL-2 umană recombinată plus celule splenice autoloage care au fost, fie infectate cu influenza A(A/PR/8/34), fie au fost pulsate cu peptida epitop a nucleoproteinei restricționată H-2K<sup>d</sup> (reziduurile NP 147-155, vezi O.K.Rotzsche și colab., *Nature* 348. 252 (1990). 955
- Celule splenice restimulate cu infectat viral sau cu celule singenice pulsate epitop au fost capabile să omoare celule țintă pulsate epitop nucleoproteină (fig.3A). Aceasta arată că injectarea i.m. de ADN NP a generat peptida derivată NP corespunzătoare în asociație cu MHC clasa I pentru introducerea de răspunsuri CTL specifice. Aceste CTL au fost capabile de recunoașterea și lizarea celulelor țintă infectate viral (fig.3B), sau celule țintă pulsate cu peptida epitop nucleoproteină restricționată H-2K<sup>d</sup> și celule țintă infectate viral. Aceasta demonstrează specificitatea lor, precum și abilitatea lor de a detecta epitopul generat în mod natural în celulele infectate. 960
- O măsură mai stringentă a imunogenității vaccinului ADN NP a fost evaluarea răspunsului CTL primar. Celule splenice prelevate de la șoareci injectați ADN NP s-au activat prin expunere la Con A și IL-2, dar nefiind anterior restimulate *in vitro* cu celule care exprimă antigenitatea testării capacității lor de a omorî ținte corespunzătoare. Splenocitele de la șoareci imunizați cu ADN NP, când s-au activat *in vitro* cu Con A și IL, fără restimulare antigen specifică, au lizat, atât celule țintă pulsate epitop, cât și infectate viral (fig.3C și D). Această activitate litică a celulelor splenice restimulate, cât și activate apare favorabilă comparativ cu cea a splenocitelor tratate similar, derivate de la șoareci care au fost anterior infectați cu influenza A/HK/68 o tulpină virulentă H3N2 adaptată la șoareci, tulpină ce a apărut la 34 ani după A/PR/8/34(H1NI). 965
- Astfel, infectarea ADN NP a generat CTL care au fost specifice pentru epitopul nucleoproteinei și care au fost capabile să identifice antigenul prelucrat natural (adică, au putut să omoare celule infectate viral). 970
- De asemenea, s-au generat CTL NP în șoareci C3H și șoareci transgenici B6 care exprimă HLA-A<sub>2</sub>. 975
- S-au detectat CTL în spline de șoareci BALB/c injectați cu o doză de 1 μg ADN NP (cea mai scăzută doză testată) (Tabelul 1). 980

Răspunsuri CTL la șoareci după o singură injecție ADN NP

Inocul	Doză	Liză specifică	sc
ADN NP	400	52,5	10,7
	400	8,4	10,3
ADN NP	200	75,6	5,4
	200	44,6	4,4
ADN NP	100	76,7	2,9
	100	35,6	8,9
ADN NP	50	62,9	0,6
	50	76,7	7,4
ADN NP	10	83,2	10,1
	10	37,7	2,5
ADN NP	1	44,2	0,3
	1	13	2
ADN control	100	4,9	1
Gripă	-	79,3	8,3

Tabelul 1: Șoareci femele BALB/c (4-6 săptămâni) s-au injectat cu o doză unică de ADN NP A/PR/34 (VIJNP) sau ADN control (VIJ) la dozele indicate. Pentru comparație, șoarecii s-au infectat cu virus gripal A/PR/34. S-a obținut CTL după 8 săptămâni, s-au restimulat *in vitro* cu celule splenice singenice pulsate peptidă NP și s-au analizat față de celule P815 pulsate peptidă NP la un raport elector/țintă de 50:1. Datele sunt prezentate ca liză specifică % individual, pentru șoareci reprezentativi.

Experimentele următoare au arătat că șoarecii care au primit o doză de 1 μg au menținut CTL NP pentru cel puțin 4,5 luni (cel mai târziu punct de timp testat). Mărimea răspunsurilor CTL după injectarea cu ADN a fost comparabilă celor de la șoareci infectați cu virus gripal. Totuși, ar fi de remarcat că analiza CTL după restimularea antigenică *in vitro* nu este strict cantitativă. Prin urmare, invenția a dezvoltat de obicei, analize de diluție limitată pentru a analiza mai precis nivelurile cantitative ale CTL NP specifice la șoareci. La șoarecii care s-au injectat cu 3 doze de 100 μg ADN NP, răspunsurile CTL s-au detectat la cel puțin 6 luni după imunizare. (fig.1). Deci, un PRV gripal are potențialul de a genera răspunsuri CTL de lungă durată orientate spre antigeni gripali conservați.

Injecția șoarecilor cu ADN NP a avut ca urmare producerea unui titru înalt de anticorpi IgG anti-NP (fig.2). Generarea titrului înalt de anticorpi IgG la șoareci este considerată ca necesitând celule Helper T CD<sub>4</sub> (P.Vieira ADN K.Kajewsky, Int.Immunol.2, 487. (1990); J.J.Donnely și colab., J.Immunol, 145, 3071 (1990). Aceasta arată că NP exprimată de plasmid *in situ* s-a prelucrat pentru prezentare prin ambele clase I și II.

#### Exemplul 4. Protecția șoarecilor la provocare cu virus gripal uman virulent

Rolul anticorpilor la provocare cu virus gripal uman virulent.

Rolul anticorpilor NP în imunitatea de protecție față de gripă este dovedit prin două abordări: inițial, s-au determinat titrurile virale pulmonare într-un experiment de transfer pasiv. Șoareci femele BALB/c în vârstă de cel puțin 10 săptămâni s-au injectat intraperitoneal cu 0,5 ml de colectat seric (diluat în 2,0 ml PBS) de la șoareci care fuseseră injectați de 3 ori pe zi cu 200 μg de ADN NP. Șoarecii de control s-au injectat cu un volum egal de colectat seric normal, de șoareci sau cu colectat seric de la șoareci care s-au recuperat după infecție cu A/HK/68, de asemenea, în 2,0 ml PBS.

# RO 117710 B1

- Doza de ser imun A/HK/68 s-au ajustat, astfel, încât titrul ELISA al anticorpului anti-NP a fost egal celui din colectatul seric de la șoareci injectați ADN NP. Șoarecii s-au provocat neanesteziati în manieră oarbă cu  $10^4$  TCID<sub>50</sub> de A/HK/68, 2 h după injectarea de ser și au primit o injecție suplimentară dintr-un volum egal de ser, 3 zile mai târziu. S-au sacrificat șoarecii la 6 la 7 zile după injectare și s-au determinat titrurile virale pulmonare în TCID<sub>50</sub>/ml așa cum s-a descris de către Moran (*J.Immunol.* 146, 321, 1991). 1030
- Șoareci fără contact gripal anterior s-au infuzat cu antiser anti-NP, obținut de la șoareci care s-au injectat cu ADN NP și apoi s-au provocat cu A/HK/68. Provocările virale s-au realizat cu o tulpină A/HK/68 și s-au menținut în continuare, prin păstrare *in vivo* la șoareci (Dr.I.Mbawuike, comunicare personală). Stocul de însămânțare virală folosit a fost omogenat de plămâni de la șoareci infectați și a avut un titru de infectivitate  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml pe celule de MDCK. 1035
- Pentru studiile de determinare a titrului viral pulmonar și de pierdere în greutate s-au realizat provocări în manieră oarbă prin instilația a 20  $\mu$ l care conțin  $10^4$  TCID<sub>50</sub> pe nările șoarecilor neanesteziati, care conduc la infecția progresivă a plămânilor cu virus, dar infecția nu este letală la șoareci BALB/c (Yetter.R.A.și colab., *Infect.Immunity* 29, 654, 1980). În experimente de supraviețuire șoarecii s-au provocat prin instilarea a 20  $\mu$ l care conțin  $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub> pe nări sau anestezie totală cu ketamină și xilazină, infectarea șoarecilor anesteziati cu această doză provoacă o infecție pulmonară rapidă, care este letală pentru 90 - 100 % din șoarecii neimunizați (J.L. Schulman ADN E.D.Kilbourne, *J.Exp.Med.* 118, 257, 1963; G.H. Scott ADN R.I.Sydskis, *Infect. Immunity* 14, 698, 1976; R.A. Yetter și colab., *Infect.Immunity* 29, 654, 1980). Titrurile virale pulmonare s-au determinat prin titrare serială pe celule MDCK (obținute de la ATCC, Rockville, MD), în plăci cu 96 godeuri, așa cum s-a descris de Moran și colab., (Ibid). 1040
- Nu s-a observat nici o reducere în titrurile virale pulmonare la șoareci care au primit antiser anti-NP ( $6,3 \pm 0,2$ ; medie  $\pm$  SEM; n=4). Ca un control pozitiv, s-a colectat ser de la șoareci care au fost infectați cu A/HK/68 și s-a transferat pasiv la 4 șoareci fără experiența gripală. După o provocare cu A/HK/68 nu s-a detectat infecție virală în plămâni lor, indicând că acest ser împotriva virusului integral a fost complet protector pentru provocare cu virusul omolog. În al doilea rând, șoarecii fără experiență gripală s-au imunizat cu NP purificat (5  $\mu$ g/picior, de 3 ori într-o perioadă de 6 săptămâni) prin injecție i.m. Acești șoareci au generat titruri ridicate de anticorpi specifici NP, dar au eșuat în ceea ce privește producerea de CTL NP - specifice și nu au fost protejați de o doză letală de virus. Prin urmare, spre deosebire de efectul de neutralizare al anticorpilor pentru virus integral, IgG anti-NP din circulație nu conferă imunitate de protecție pentru șoareci. 1045
- S-a evaluat eficacitatea de protecție *in vivo* a injectărilor ADN NP pentru a determina dacă un răspuns imun mediat celular a fost funcțional în mod semnificativ. O măsură directă a eficacității răspunsului imun a fost capacitatea șoarecilor imunizați la început cu ADN NP de a rezolva o infecție pulmonară subletală progresivă cu o tulpină influența homoloagă (A/HK/68;H3N2). Provocările virale s-au condus așa cum s-a descris mai sus. Șoarecii imunizați cu ADN NP au avut titruri virale pulmonare, după provocare, cu 3 ordine de mărime mai scăzute în ziua 7 ( $1,0 \pm 1,0$ ; medie +SEM; n=4) decât cele ale șoarecilor de control care nu au fost imunizați ori care s-au imunizat cu vector blanc ( $4,5 \pm 0,0$ ; medie +SEM; n=4). De fapt, 3 din 4 șoareci imunizați au avut niveluri de virus în plămân nedetectabile. În timp ce 9 dintre controale au fost limitați de virus la acest moment. Diferențele substanțiale în titrurile virale pulmonare observate în acest experiment și alte 6 demonstrează că răspunsul imun a accelerat îndepărtarea virusului. Lipsa efectului protector al vectorului blanc de control confirmă că nu ADN-ul a fost responsabil pentru răspunsul imun. Mai mult decât atât, deoarece tulpina virală de provocare, A/HK/68 (o tulpină virulentă H3N2 adaptată la șoarece) a fost heteroloagă față de tulpina A/PR/8/34 (HINI) de la care s-a clonat gena NP, imunitatea a fost în mod clar heterotipică. 1050
- 1055
- 1060
- 1065
- 1070
- 1075
- 1080

Ca o măsură a inducerii morbidității de către virus, s-a urmărit pierderea masei la șoareci care s-au injectat subletal cu *influenza A/HK/68* după imunizare cu ADN NP (fig.4). Drept controale s-au folosit șoareci neinjectați sau injectați cu vector blanc. Șoarecii imuni-zați cu ADN NP prezintă pierdere de greutate mai mică și o mai rapidă revenire la greutățile lor dinaintea provocării după infecția gripală A comparativ cu șoarecii de control.

Infecția intranasală a șoarecilor cu gripă A anesteziați total produce diminuarea rapidă a replicării virale în plămâni și moartea în 6-8 zile dacă infecția nu se controlează (R.A. Yetter și colab., *Infect. Immunity* 29, 654 (1980). Supraviețuirea șoarecilor provocați prin această metodă reflectă capacitatea lor de a limita severitatea unei infecții pulmonare acute. S-a studiat capacitatea șoarecilor de a supraviețui provocării cu 2 tulpini gripale diferite., *A/HK/68* (vezi fig.5) și *A/PR/8/234*. Șoarecii imuni-zați anterior cu ADN NP au prezentat o rată de supraviețuire de 90% comparativ cu 0% în cei injectați cu vector blanc și 20% în anima-  
lele de control neinjectate (fig.5). Dintr-un total de 14 astfel de cazuri studiate, șoarecii imuni-zați cu ADN NP au prezentat o rată de supraviețuire cu cel puțin 50 % mai mare decât controalele. Astfel, capacitatea răspunsului imun indus de ADN NP au prezentat o rată de supraviețuire cu cel puțin 50 % mai mare decât controalele. Astfel, capacitatea răspunsului imun indus ADN NP de a accelera eficient recuperarea și descreșterea bolii produse printr-un virus dintr-o tulpină diferită care a apărut 34 ani mai târziu sprijină rațiunea alegerii unei proteine conservate pentru generarea răspunsului T limfocitar citotoxic.

#### Exemplul 5. Izolarea genelor de la izolate virale influenza

Multe dintre tulpinile influenza vechi sunt depozitate la ATCC (*The 1990 Catalogue of Animal Viruses & Antisera, Chlamydiae & Rickettsiae, 6<sup>th</sup> Edition*) enumeră 20 tulpini influenza A și 14 tulpini influenza B).

##### A. Tulpini virale și purificare:

Tulpinile gripale cuprinse în vaccinul curent din sezonul de gripă 1992 s-a obținut de la Dr. Nancy J. Cox de la Division of Viral ADN Rickettsial Diseases, Centers of Disease Control, Atlanta, GA. Aceste tulpini sunt: (1) *A/Beijing/353/89* (H3N2); (2) *A/Texas/36/91* (H1N1); (3) *B/Panama/45/90*; și 849 *A/Georgia/03/93*.

Toate aceste virusuri s-au crescut prin trecere în două embrioane de 9 - 11 zile (excepție *A/Georgia* care s-a crescut în celule MDCK), (100 - 200 pe preparat viral) și s-au purificat printr-o modificare a metodei descrisă de Massicot și colab., (*Virology*, 101, 242-249 (1980). Pe scurt, suspensiile virale s-au clarificat prin centrifugare la 8000 rot/min (Centrifugă Sorvall RC5C, rotor 65-3 și apoi s-au paletat prin centrifugare la 16000 rot/min, timp de 2 h într-un rotor Beckman, Tip 19. Virusul paletat s-a resuspendat în STE (0,1 M NaCl, 20 mM Tris, pH =7,4, 1 mM EDTA) și s-a centrifugat la 4000 rot/min, timp de 10 min (centrifugă Herle Z 360 K) pentru îndepărtarea agregatelor. S-au depus 2 ml supernatant pe un gradient discontinuu de sucroză obținută din 2 ml sucroză 60% acoperită cu 7 ml sucroză 30% tamponată cu ETE și s-a centrifugat la 36000 rot/min (Beckman, rotor SN-40) 90 min. Virusul grupat s-a colectat la interfață, s-a diluat de 10 ori cu STE și s-a paletat la 30000 rot/min, 2 h (rotor Beckman Ti45). Virusul paletat la 30000 rot/min, 2 h (rotor Beckman Ti45). Virusul paletat s-a închețat apoi, la -70°C.

##### B. Extracția ARN-ului viral și sinteza cADN

ADN-ul viral s-a purificat din virus înghețat prin extracție guanidină izotiocianat folosind un Kit accesibil comercial (Stratagene, La Jolla, CA) folosind metoda lui Chomaczynski și Sacchi (*Anal. Biochim.* 162, 156-159. S-a preparat cADN dublu catonar de la ADN viral folosind un kit de sinteză cADN accesibil comercial (Pharmacia) după instrucțiunile fabricantului cu câteva modificări. Prima bandă cADN s-a inițiat folosind o oligodeoxiribonucleotidă 5-AGCAAAGCAGG-3', Secv.ID.Nr:30, care este complementară la o secvență conservată localizată la capătul terminal 3' al ADN-ului viral pentru toate genele tulpinii A. Această



# RO 117710 B1

- secvență este comună tuturor tipurilor de ADN-uri virale influenza A și prin urmare asigură o metodă pentru clonarea oricărei gene a virusului gripal tulpina A. După sinteza primei și celei de a doua benzi a cADN-ului reacțiile s-au extras cu fenol/cloroform și s-au precipitat cu etanol fără să se mai continue urmând instrucțiunile trusei. Aceste cADN-uri teșite la capete au fost apoi legate direct în vectorul VIJneo sau VIJns care apoi, s-au digerat cu enzime de restricție BgLI, s-au teșit la capete cu ADN polimerază T4 și s-au tratat cu fosfatază alcalină intestinală de vite.
- Pentru căutarea genelor virale particulare de lungime integrală s-au folosit oligodioxiribonucleotide sintetice care s-au denumit prin complementul capătul terminal 3' al capătului translațional al cadrului deschis de citire al unei gene de lungime întreagă prin cartografiere de restricție și determinarea mărimii pe electroforeze în geluri de agaroză, s-au verificat prin secvențarea dideoxinucleotidică a ambelor joncțiuni ale genei virale de VIJneo. Secvența joncțiunilor pentru fiecare genă clonată de la aceste virusuri este dată mai jos în exemplul 8.
- Strategii similare s-au folosit pentru clonarea cADN-urilor de la fiecare dintre virusurile numite mai sus cu excepția lui B/Panama/45/90 care nu are secvențe comune la fiecare capăt al ARN-ului viral, în acest caz folosindu-se un amestec de oligodeoxiribonucleotide pentru inițierea sintezei primei benzi cADN. Acești primeri au fost:
- (1) 5'-AGCAGAAGCGGAGC-3', Secv.ID Nr:31: pentru PB1 și PB2;
  - (2) 5'-AGCAGAAGCAGAGCA-3', Secv.ID Nr:19: pentru NS și HA;
  - (3) 5'-AGCAGAAGCACGCAC-3', Secv.ID Nr:22: pentru M; și
  - (4) 5'-AGCAGAAGCACAGCA-3', Secv.ID Nr:23: pentru NP.
- Pentru genele care s-au clonat prin PCR s-a folosit direct soluție de cADN teșit la capete, în reacții PCR ca matrită ADN. Primerii folosiți pentru clonarea celor 6 gene influenza obținute prin PCR sunt precum urmează:
1. Gena HA de la A/Georgia/03/93  
primer sens: Secv.ID Nr:33  
5'GGT ACA ACC ATG AAG ACT ATC ATT GCT TTG AGC 3'  
primer anti-sens: Secv.ID Nr:34:  
5' CCA CAT AGA TCT TCA AAT GCA AAT GTT GCA CCT AAT G 3'
  2. Gena HA de la A/Texas/36/91  
primer sens: Secv.ID Nr:35:  
5'GGT ACA ACC ATG AAA GCA AAA CTA GTC CTG TTA TG 3'  
primer anti-sens: Secv.ID Nr:36:  
5' CCA CAT TCA GAT GCA TAT TCT ACA CAA AG 3'
  3. Gena HA de la B/Panama/45/90  
primer sens: Secv.ID Nr:37:  
5'GGT ACA ACC ATG AAG GCA ATA GTA CTA CTC ATG 3'  
primer anti-sens: Secv.ID Nr:38:  
5'CCA CAT TTA TAG ACA GAT GGA GCA AGA AAC ATT GTC 3'
  4. Gena M1 de la A/Beijing/353/89  
primer sens: Secv.ID Nr:39:  
5'GGT ACA AGA TCT ACC ATG CTT CTA ACC GAG GTC 3'  
primer anti-sens: Secv.ID Nr:40:  
5' CCA CAT AGA TCT TCA CTT GAA CCG TTG CAT CTG CAC 3'
  5. Gena NP de la B/Panama/45/90  
primer sens: Secv.ID Nr:41:  
5'GGT ACA TCC ACC ATG TCC AAC ATG GAT ATT GAC GGC 3'  
primer anti-sens: Secv.ID Nr:42:

- 1180 5' CCA CAT GGA TCC TTA ATA ATC GAG GTC ATC ATA ATC CTC 3'  
6. Gena MI de la B/Panama/45/90  
primer sens: Secv ID Nr:43:  
5'GGT ACA GGA TCC ACC ATG RCG CTG TTT GGA ACA ATT GCC 3'  
primer anti-sens:Secv.ID Nr:44:  
5' CCA CAT GGA TCC TTA TAG GTA TTT CTT CAC AAG AGC TG 3'
- 1185 Toate clonele genei influenza, dacă s-au generat cADN sau PCR, s-au verificat prin secvențare prin siturile de ligare în genă și expresia genei în celule RD transfectate. Expresia s-a detectat prin imunoblot.
- 1190 Constructele NP și M1 pentru tulpina A/H3N2 (vectorii 4 și 5) s-au făcut de la genele A/Beijing/353/89. S-au ales aceste gene datorită gradului așteptat ridicat de conservare al genelor NP și MI și datorită accesibilității lor.
- Pornind de la cele anterioare s-au combinat, pentru formarea unui vaccin, un grup de 7 vectori de expresie preferați, grup care include:
1. VIJns-HA (A/Georgia/03/93) 6,56 Kc
  2. VIJns-HA (A/Texas/35/91) 6,56 Kb
  - 1195 3. VIJns--HA (B/Panama/45/90), 6,61 Kb
  4. VIJns-NP (A/Beijing/353/89) 6,42 Kc
  5. VIJns-MI (a/Beijing/353/89 5,62 Kb
  6. VIJns-NP (B/Panama/45/90) 6,54 Kc
  7. VIJns-MI (B/Panama(45/90) 5,61 Kc
- 1200 Secvențele relevante pentru joncțiunile acestor gene în vectori de expresie sunt date mai jos. Pentru confirmarea corectitudinii genelor clonate a fost nevoie să se secvențeze doar porțiuni mici ale constructelor. Prin comparație cu gene similare cunoscute, este ușor să se confirme că gena dată este o genă NP, o genă HA, o genă MI, etc. De exemplu, secvența genei HA A/Texas este foarte asemănătoare cu secvența genei HA A/Kiev/59/79, secvență care este accesibilă în GENBANK sub numărul de acces M38353. În mod asemănător, pentru secvența genei HA B/panama, care este foarte asemănătoare secvenței HA B/EngIADN/222/82, care de asemenea, este accesibilă în GENBANK sub numărul de acces MI8384. În același mod, poate fi confirmată identitatea oricărei secvențe clonate pentru o genă dată de la oricare virus gripal uman. În fiecare din cazurile de mai jos, s-a confirmat, atât o secvență 5', cât și o secvență 3' pentru asigurarea că a fost prezentă întreaga genă. În fiecare caz codonul ATG subliniat arată codonul de start pentru gena influenza. În timp ce secvența subliniată din porțiunea 3' este codonul stop.
1. VIJns-HA (A/Georgia/03/93) 6,56 Kb  
Secvența 5': (Secv.ID Nr:46:)  
1215 ...TCA CCG TCC TTA GAT C/GG TAC AAC CATGAA GAC TAT CAT TGC TTT GAG CTA  
CAT TTT ATG TCT GGT TTT CGC...  
Secvența 3' (Secv.ID Nr:47:)  
...TCA TGC TTT TTG CTT TGT GTT GTT TTG CTG GGG TTC ATC ATG TGG GCC TGC  
CAA AAA GGC AAC ATT AGG TGC AAC ATT TGC ATT TGA A/GA TCT ATG TGG GAT  
1220 CTG CTG TGC...
  2. V1Jns-HA (A/Texas/36/91) 6,56 Kb:  
Secvența 5': (Secv.ID Nr:48:)  
...TTA GAT C/GG AAC ATG AAA GCA AAA CTA CTA GTC CTG TTA TGT GCA TTT ACA  
1225 GCT ACA TAT GCA...  
Secvența 3': (Secv.ID Nr:49:)  
...CTG GTC CTT TTG GTC TCC CTG GGG GCA ATC AGC TTC TGG ATG TGT TCT AAT  
GGG TCT TTG CAG TGT AGA ATA TGC ATC TGA ATG TGG/GAT CTG CTG TGC CTT...

# RO 117710 B1

3. VIJns-HA (B/Panama/45/90) 6,61 Kb:  
Secvența 5': (Secv.ID Nr:50:) 1230  
...CCT TAG ATC /GGT ACA ACC ATG AAG GCA ATA ATT GTA CTA CTC ATG GTA GTA  
ACA TCC AAC GCA GAT CGA ATC TGC ACT GGG ATA ACA TCT TCA AAC TCA CCT  
CAT GTG...  
Secvența 3': (Secv.ID Nr:51:)  
...TTG GCT GTA ACA TTG ATG ATA GCT ATT TTT ATT GTT TAT ATG GTC TCC AGA 1235  
GAC AAT GTT TCT TGC TCC ATC TGT CTA TAA ATG TGG/GAT CTG CTG TGC CTT...
4. VIJns-HA (A/Beijing/353/89) 6,42 Kb:  
Secvența 5': /Secv.ID Nr:52:) 1240  
...GTC CTT AGA TC/C ACC ATG GCG TCC CAA GGC ACC AAA CGG TCT TAT GAA  
CAG ATG GAA ACT GAT GGG GAA CGC CAG AAT GCA ACT...  
Secvența 3': (Secv.ID Nr:53:)  
...GAA AAG GCA ACG AAC CCG ATC GTG CCC TCT TTT GAC ATG AGT AAT GAA GGA  
TCT TAT TTC TTC GGA GAC AAT GCA GAA GAG TAC GAC AAT TAA G/GA TCT GCT  
GTG CCT... 1245
5. V1Jns-M1 (A/Beijing/353/89) 5,62 Kb  
Secvența 5': (Secv.ID Nr: 54:) 1250  
...CTT AGA TC/C AGA TCT ACC ATG AGT CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG TAT GTT  
CTC TCT ATC GTT CCA TCA GGC CCC CTC AAA GCC GAA ATC GCG GAG AGA CTT  
GAA GAT GTC TTT GCT GGG AAA AAC ACA GAT...  
Secvența 3': (Secv.ID Nr:55:)  
...GGG ACT CAT CCT AGC TCC AGT ACT GGT CTA AAA GAT GAT CTT CTT GAA AAT  
TTG CAG ACC TAT CAG AAA CGA ATG GGG GTG CAG ATG CAA CGG TTC AAG TGA  
AGA TCT ATG TGG/GAT CTG CTG TGC CTT... 1255
6. VIJns-NP(B/Panama/45/90) 6,54 Kb  
Secvența 5': (Secv.ID Nr:56:) 1260  
...CTT AGA TC/C ACC ATG TCC AAC ATG GAT ATT GAC GGT ATC AAC ACT GGG ACA  
ATT GAC AAA ACA CCG GAA GAA ATA ACT TCT...  
SECVENȚA 3' /Secv.ID Nr:37:)  
...GTT GAA ATT CCA ATT AAG CAG ACC ATC CCC AAT TTC TTC TTT GGG AGG GAC  
ACA GCA GAG GAT TAT GAT GAC CTC GAT TAT TAA G/GA TCT GCT GTG...
7. V1Jns-M1 (B/Panama/45/90) 5,61 Kb 1265  
Secvența 5': (Secv.ID Nr:58:)  
...CTT AGA TC/C ACC ATG TCG CTG TTT GGA GAC ACA ATT GCC TAC CTG CTT TCA  
TTG ACA GAA GAT GGA GAA GGC AAA GCA GAA CTA GCA GAA AAA TTA...  
Secvența 3': (Secv.ID Nr:59:) 1270  
...AGA TCT CTT GGG GCA AGT CAA GAG AAT GGG GAA GGA ATT GCA AAG GAT  
GTG ATG GAA GTG CTA AAG CAG AGC TCT ATG GGA AAT TCA GCT CTT GTG AAG  
AAA TAC CTA TAA G/GA TCT GCT GTG...

## Exemplul 6. Vectorul de expresie VIJ, secvența ID Nr:10

Pentru crearea lui VIJ s-a urmărit îndepărtarea elementelor de inițiere și terminarea  
a transcripției din vectorul VI, în vederea înlocuirii lor cu un context mai definit, crearea unui  
vector mai compact și îmbunătățirea randamentelor de purificare a plasmidului. Vectorul VIJ 1275

este derivat de la vectorii VI (vezi exemplul 1) și pUC18, un plasmid accesibil comercial. Vectorul VI s-a digerat cu SspI și EcoRI care produs 2 fragmente ADN. Cel mai mic dintre  
 1280 aceste fragmente, care conține promotorul CMVintA și elementele de terminare a transcrip-  
 ției pentru hormonul bovin de creștere (BGH) care controlează expresia genelor heteroloage  
 (Secv.ID Nr:11) s-a purificat, de la o electroforeză în gel de agaroză. Capetele acestui  
 fragment de ADN au fost apoi "retezate" folosind enzima ADN polimerază T4, în vederea  
 facilității ligării lui la alt fragment ADN "capăt-retezat".

1285 S-a ales pUC18 pentru a asigura "miezul" expresiei vectorului. El este cunoscut a  
 produce randamente înalte de plasmid este bine caracterizat prin secvență și funcție și este  
 de mărime minimă. Conform invenției s-a îndepărtat în întregime operonul lac din acest  
 vector, care nu este necesar pentru scopurile urmărite și poate dăuna randamentelor plasmi-  
 dului și expresiei genei heteroloage prin digestie parțială cu enzima de restricție HaeII.

1290 Plasmidul care a rămas s-a purificat de la o electroforeză în gel de agaroză, s-a teșit la ca-  
 pete cu ADN polimerază T4, s-a tratat cu fosfatază alcalină intestinală de vițel și s-a ligat la  
 elementul CMVintA/BGH descris mai sus. S-au obținut plasmide care prezintă cele două  
 orientări posibile ale elementelor promotore din cuprinsul lui pUC. Unul din aceste plasmide  
 a dat randamente mult mai mari ale ADN-ului în *E.coli* și s-a desemnat VIJ (Secv.ID Nr:10).

1295 Structura acestui vector s-a verificat prin analiza secvenței regiunilor de joncțiune și s-a  
 demonstrat ulterior că, dă expresia genelor heteroloage comparabilă sau mai ridicată față  
 de VI.

#### Exemplul 7. Constructul genei virusului influenza în vectorul de expresie VIJ

1300 Numeroase gene ale tulpinii virale influenza A/PR/8/34 s-au clonat în vectorul de  
 expresie VIJ, care, așa cum s-a remarcat în exemplul 4, produce expresie la niveluri tot așa  
 de ridicate sau mai ridicate decât vectorul VI. Secvențele genei PR8 sunt cunoscute și  
 accesibile în baza de date GENBANK. Pentru fiecare din genele clonate mai jos, s-a înre-  
 gistrat mărimea fragmentului clonat prin măsurare pe gel și este dat numărul de acces  
 1305 GENBANK față de care s-au comparat secvențele parțiale. Pentru o metodă de obținere a  
 acestor gene de la tulpini virale, de exemplu, de la virusul obținut de la ATCC (A/PR/8/34//  
 este ATCC VR-95; sunt depozitate la ATCC numeroase alte tulpini), vezi exemplul 4.

##### A. Subclonarea genelor PR8 în VIJ

###### 1. Gena NP

1310 Gena NP s-a subclonat de la pAPR501 (J.F.Young, U.Desselberber, P.Graves,  
 P.Palese, A.Shatzman ADN M.Rosenberg (1983) în *The Origine of PADNemic Influenza*  
*Viruses*, ed.W.G.Laver (Elsevier, Emsterdam), pp.129-138. Ea s-a excizat prin secționarea  
 pAPR501 cu EcoRI, fragmentul s-a purificat pe gel și s-a teșit cu ADN polimerază T4.  
 Fragmentul clonat are o lungime de 1,6 kilobaze și s-a inserat în VIJ tăiat cu Bgl II și, de  
 asemenea, teșit cu ADN polimerază T4.

###### 2. NS

1315 Gena NS s-a subclonat de la pAPR801 (J.F.Young, U.Desselberber, P.Graves,  
 P.Palese, A.Shatzman și M.Rosenberger (1983), în *The Origins of pandemic Influenza*  
*Viruses*, ed.W.G.laver, (Elsevier, Amsterdam, pp.129-138).

1320 Ea s-a excizat prin secționarea pAPR801 cu EcoRI, fragmentul s-a purificat pe gel și s-a teșit  
 cu ADN polimerază T4. Fragmentul clonat are o lungime de 0,9 Kb (regiunea codificată  
 completă incluzând NS1 și NS2).

###### 3. HA

1325 Gena HA s-a subclonat de la pJZ102 (J.F.Young, U.Desselberber, P.Graves,  
 P.Palese, A.Shatzman și M.Rosenberger (1983), în *The Origins of pandemic Influenza*  
*Viruses*, ed.W.G.Laver, (Elsevier, Amsterdam), pp.129-138.

# RO 117710 B1

Ea s-a excizat prin secționarea pJZ102 cu Hind III, fragmentul s-a purificat pe gel și s-a teșit cu ADN polimerază T4. Fragmentul teșit s-a inserat în VIJ tăiat cu Bgl II și, de asemenea, teșit cu ADN polimerază T4. Fragmentul clonat are o lungimea de 1.75 kb.

## 4. PB1

Gena PB1 s-a subclonat de la pGemi-PB1 (Joncțiunile 5' și 3' ale genelor vectorului s-au secvențat pentru verificarea identității lor. Vezi J.F.Young, U.Desselberber, P.Graves, P.Palese, A.Shatzman și M.Rosenberger (1983), în *The Origins of pandemic Influenza Viruses*, ed.W.G.Laver, (Elsevier, Amsterdam), pp.129-138. 1330

Ea s-a excizat prin tăierea pGem-PB1 cu Hind III, fragmentul s-a purificat în gel și s-a teșit cu ADN polimerază T4. Fragmentul s-a inserat în VIJ tăiat cu Bgl II și, de asemenea, s-a teșit cu ADN polimerază T4. Fragmentul clonat a fost în lungime de 2,3 kb. 1335

## 5. PB2

Gena PB2 s-a subclonat de la pGem1-PB2(Joncțiunile 5' și 3' ale genelor vectorului s-au secvențat pentru verificarea identității lor. Vezi J.F.Young, U.Desselberber, P.Graves, P.Palese, A.Shatzman și M.Rosenberger (1983), în *The origins of pandemic Influenza Viruses*, ed.W.G.Laver, (Elsevier, Amsterdam), pp.129-138. Ea s-a decupat prin tăierea pGem-PB2 cu BamH I și fragmentul s-a purificat în gel. Fragmentul cu capetele adezive s-a introdus în VIJ tăiat cu BgIII. Fragmentul clonat a fost de 2,3 kb. 1340

## 6. MI

Gena MI s-a generat prin PCR de la plasmidul p8901 MITE. Secvența M din acest plasmid s-a generat prin PCR de la pAPR701 (J.F.Young, U.Desselberber, P.Graves, P.Palese, A.Shatzman și M.Rosenberger (1983), în *The Origins of pandemic Influenza Viruses*, ed.W.G. Laver, (Elsevier, Amsterdam), pp.129-138), folosind oligomerul 5'-GGT ACA AGA TCT ACC ATG CTT CTA ACC GAG GTC-3', Secv.ID Nr:3 pentru primerul "sens" și oligomerul 5'-CCA CAT AGA TCT TCA CTT GAA CCG TTG TTG CAT CTG CAC -3', Secv.ID Nr:4, pentru primerul "anti-sens". Fragmentul PCR s-a purificat în gel, s-a tăiat cu Bgl II și s-a ligat în VIJ tăiat cu BGI II. Fragmentul clonat a fost de 0,7 kb lungime. Capătul amino terminal al lui MI este codificat în primerul "sens" prezentat mai sus ca codon "ATG", în timp ce codonul stop al translației MI este codificat prin codonul invers "TCA", care în direcția sens este codonul stop "TGA". 1345

## B. Constructe de expresie a genei VIJ-influenza

În fiecare caz este prezentată joncțiunea secvențelor de la regiunea promotoare 5' (CMVintA) în gena clonată. Secvențele s-au generat prin secvențarea primerului: primer CMVintA 5'-CTA ACA GAC TGT TCC TTT CCA TG-3', Secv.ID Nr:28, care generează succesiunea secvenței care codifică. Poziția la care se întâlnește joncțiunea este delimitată prin "/", care nu reprezintă vreo discontinuitate în secvență. Metoda pentru prepararea acestor constructe este prezentată sumar după toate secvențele de mai jos. Fiecare secvență dată reprezintă un construct ADN exprimabilă, completă și accesibilă pentru gena influenza desemnată. 1350

Fiecare construct a fost transfectată temporar în celule RD (ATCC CCL36), o linie celulară cultivată de rabdomiosarcom uman. La 40 h după transfecție s-au recoltat celule și s-au rulat western blot-uri (exceptând constructul VIJ-PR-HA care s-a testat la șoareci și a dat un anticorp specific anti-HA înaintea analizei Western blot, evitând astfel necesitatea unui Western blot pentru ca expresia să fie observată *in vivo*. Anticorpul specific pentru proteinele PB1, PB2 și NS a fost asigurat prin Stephen Inglis de la Universitatea Cambridge, care a folosit proteine purificate exprimate ca proteine fuzionate  $\beta$ -galactozidază pentru generarea de antiseruri. Antiser policonat anti-NP s-a generat prin imunizarea iepurilor cu virus integral A/PR/8/34. Anticorpul anti-MI este accesibil comercial de la Biodesign ca un antiser de captă anti-gripă, număr de catalog B65245G. În fiecare caz s-a observat o proteină de mărime anticipată, care confirmă expresia *in vitro* a proteinei influenza codificate. 1365

1370

1375

# RO 117710 B1

Nomenclatura acestor constructe a urmat convenția "numele vectorului-genă-tulpină de gripă". În fiecare caz, secvența a fost înregistrată față de secvențe cunoscute din GENBANK pentru secvența genei A/PR/8/34 clonată și secvențată. Eficacitatea biologică a fiecăreia dintre aceste constructe este demonstrată ca în exemplele 2,3 și 4 de mai sus.

1380 Joncțiunile 5' ale secvenței încrucișate a CMVINTA și genele gripei de la A/PR/8/34:

1. VIJ-PR-NP, Secv.ID Nr:12; GENBANK număr de acces M38278

5' GTC ACC GTC CTT AGA TC/A ATT CCA GCA AAA GCA GGG

CMVintA NP.....

TAG ATA ATC ACT CAC TGA GTG ACA TCA AAA TCA TG

1385 2. 1.VIJ-PR-PB1, Secv.ID Nr:13; GENBANK număr de acces J02151

5' ACC GTC CTT AGA TC/A GCT TGG CAA AAG CAG GCA AAC

CMVintA PB1...

CAT TTG AAT GGA TGT CAA TCC GAC CTT ACT TTT CTT AAA AGT GCC AGC ACA

AAA TGC TAT AAG CAC AAC TTT CCC TTA TAC

1390 3. VIJ-PR-NS, Secv.ID Nr:14; GENBANK număr de acces J02150

5' GTC ACC GTC CTT AGA TC/A ATT CCA GCA AAA GCA GGG

CMVintA NS.....

TGA CAA AAA CAT AAT GGA TCC AAA CAC TGT GTC AAG CTT TCA GGT ASA TTG

CTT TCT TTG GCA TGT CCG CAA ACG AGT TGC AGA CCA AGA ACT AGG TGA T...

1395 4. VIJ-PR-HA, Secv.ID Nr:15; GENBANK număr de acces J02143

5' TCT GCA GTC ACC GTC CTT AGA TC/A GCT TGG AGC AAA

CMVintA HA...

AGC AGG GGA AAA TAA AAA CAA CCA AAA TGA AGG CAA ACC TAC TGG TCC TGT

TAA GTG CAC TTG CAG CTG CAG ATG CAG ACA CAA TAT GTA GCT ACC ATG CGA

ACA ATT CAA CC....

1400 5. VIJ-PR-PB2, Secv.ID Nr:16; GENBANK număr de acces J02153

5' TTT TCT GCA GTC ACC GTC CTT AGA TC/C CGA ATT CCA

CMVintA PB2...

GCA AAA GCA GGT CAA TTA TAT TCA ATA TGG AAA GAA TAA AAG AAC TAA GAA

1405 ATC TAA TGT CGC AGT CTG CCA CCC CGG AGA TAC TCA CAA AAA CCA CCG TGG

ACC ATA TGG CCA TAA TCA AGA AGT...

6. VIJ-PR-M1, Secv.ID Nr:17; GENBANK număr de acces J02145

5' GTC ACC GTC CTT AGA TCT/ACC ATG AGT CTT CTA ACC

CMVintA M1

1410 GAG GTC GAA ACG TAC GTA CTC TCT ATC CCG TCA GGC CCC CTC AAA GCC

GAG ATC GCA CAG AGA CTT GAA GAG TTG ACG GAA GA...

Cum s-au legat fragmentele:

1. VIJ-PR-NP: (Vector) BglII teșit la EcoRI teșit (NP)

1415 2. VIJ-PR-PB1:(Vector) BglII teșit la HindIII teșit (PB1)

3. VIJ-PR-NS: (Vector) BglII teșit la EcoRI teșit (NS1)

4. VIJ-PR-HA: (Vector) BglII teșit la HindIII teșit (HA)

5. VIJ-PR-PB2: (Vector) BglII adeziv la BamH1 adeziv (PB2)

6. VIJ-PR-M1: (Vector) BglII adeziv la BglII adeziv (M1)

1420 M1 s-a obținut prin PCR, folosind ca matriță p8901-MITE și primeri care adaugă un sit BglII la ambele capete 3 baze înainte de codonul de start ATG și exact după codonul de terminare pentru M1 (TGA).

# RO 117710 B1

## Exemplul 8. Vectorul de expresie VIJnei, Secv.ID Nr:18

A fost necesar să se îndeplineze gena *amp<sup>r</sup>* folosită pentru selecția de antibiotice a bacteriilor care adăpostesc VIJ deoarece ampicilina nu se poate folosi în fermentatoare de mare capacitate. 1425

Gena *amp<sup>r</sup>* din miezul pUC al lui VIJ s-a îndepărtat prin digestie cu enzimele de restricție SspI și EamI 1051. Plasmidul care a rămas s-a purificat prin electroforeză în gel de agaroză, s-a teșit la capete cu ADN polimerază T4 și apoi s-a tratat cu fosfază alcalină intestinală de vișel. Gena *kan<sup>r</sup>* accesibilă comercial, derivată de la transpozonul 903 și conținută în plasmidul pUC4K, s-a excizat folosind enzima de restricție *Pst*I, s-a purificat prin electroforeză în gel de agaroză și s-a tratat cu ADN polimerază T4. Acest fragment s-a ligat cu miezul VIJ și s-au derivat plasmidele cu gena *kan<sup>r</sup>* cu oricare orientare care s-au desemnat ca VIJneo numerele 1 și 3. Fiecare dintre aceste plasmide s-a confirmat prin analiză cu enzime de restricție, secvențare ADN a regiunilor de joncțiune și s-a demonstrat că produc cantități similare de plasmid VIJ. Expresia produselor genei heteroioage pentru acest vector VIJneo a fost, de asemenea, comparabilă celei a vectorilor VIJ. S-a ales arbitrar VIJneo nr. 1, 3, denumit în continuare VIJneo (Secv.1D Nr:18), care conține gena *kan<sup>r</sup>* în aceeași orientare ca gena *amp<sup>r</sup>* din VIJ, precum constructul de expresie. 1430 1435

Genele de la fiecare dintre tipurile A/Beijing/353/89, A/Texas/36/91 și B/Panama/46/90 s-au clonat în vectorul VIJneo ca cADN-uri. În fiecare caz, secvențele joncțiunii de la regiunea promotoare 5' (CMVintA) din gena clonată s-a secvențiat folosind primerul: CMVintA 5'-CTA ACA GAC TGT TCC TTT CCA TG-3', Secv.ID Nr:28, care generează succesiunea secvenței codificate. Aceasta este învecinată cu secvența de codificare/terminator, a cărei joncțiune este, de asemenea, prezentată. 1440 1445

Această secvență s-a generat folosind primerul BGH 5'-GGA GTG GCA CCT TCC AGG-3', Secv.ID Nr:29, care generează secvența benzii care nu codifică. În fiecare caz, secvența s-a verificat față de secvențele cunoscute din GENBANK pentru clonarea și secvențarea genelor din acestea sau alte izolate influența. Poziția la care se întâlnește joncțiunea este demarcată printr-un \*, care nu reprezintă nici o discontinuitate în secvență. În cazul joncțiunii VIJneo-TX-HA, gelul de secvențare a fost comprimat și a fost dificil să se citească secvența inițială. Prin urmare, primele 8 baze la acea joncțiune s-au prezentat ca "N". S-au confirmat aceste nucleotide și s-au dat nucleotidele identificate. Primul "ATG" considerat în fiecare secvență este codonul de inițiere a translației pentru respectiva genă clonată. Fiecare secvență dată reprezintă un construct ADN exprimabilă completă, accesibilă pentru gena influența desemnată. Nomenclatura urmează convenția: "Numele vectorului - gena-tulpina gripală". Eficacitatea biologică a fiecăreia dintre aceste constructe este demonstrată în același mod ca în exemplele 2, 3 și 4 de mai sus. 1450 1455

SECVENȚA JONCȚIUNILOR 5' ALE CMVintA ÎNCRUCIȘATĂ cu GENELE GRIPEI ȘI ÎNCRUCIȘAREA JONCȚIUNILOR 5' ALE CMVintA cu GENELE GRIPEI ȘI CONSTRUCTELE DE EXPRESIE A TERMINATORULUI BGH, FOLOSIND DIFERITE TULPINI ȘI PROTEINE INFLUENȚA. 1460

I. A/Beijing/353/89

A. VIJneo-BJ-NP:

PROMOTOR, Secv.ID Nr:20

5' TCA CCG TCC TTA GAT C/AA GCA GGG TTA ATA ATC  
CMVintA NP...

ACT CAC TGA GTG ACA TCA AAA TC ATG GCG TCC CAA GGC ACC AAA CGG TCT  
TAT

GAA CAG ATG GAA ACT GAT GGG GAA CGC CAG ATT

TERMINATOR, Secv.ID Nr:21

1470

# RO 117710 B1

5' GAG GGG CAA ACA ACA GAT GGC TGG CAA CTA GAA GGC  
ACA GCA GAT / ATT TTT TCC TTA ATT GTC GTA C...

BGH NP...

1475 II. A/TEXAS/36/91

A. VIJneo-TX-HA

PROMOTOR, Secv.ID Nr:24:

5-CCT TAG ATC/GGA AAT AAA AAC CAA AAT GAA

CMVintA HA...

1480 AGC AAA ACT ACT AGT CC...

TERMINATOR, Secv.ID Nr:25

5' GCA GAT C/CT TAT ATT TCT GAA ATT CTG GTC TCA GAT...

BGH HA...

III. B/PANAMA/46/90

1485 A. VIJneo-PA-HA

B. PROMOTOR, Secv.ID Nr:26 (Primele 1080 baze ale acestei secvențe sunt accesibile pe GENBANK cu numerele de acces M65171; secvența obținută mai jos este identică cu secvența cunoscută; Secvența 3' (Secv.ID Nr:27 de mai jos) nu a fost raportată anterior)

5' ACC GTC CTT AGA TC/C AGA AGC AGA GCA TTT TCT AAT

1490 CMVintA HA...

ATC CAC AAA ATG AAG GCA ATA ATT GTA CTA CTC ATG GTA GTA ACA TCC AAC  
GCA GAT CGA ATC TGC...

TERMINATOR, Secv.ID Nr:27

5' GGC ACA GCA GAT C/TT TCA ATA ACG TTT CTT TGT AAT GGT AAC...

1495 BGH HA...

## Exemplul 9. Producerea de VIJns

S-a adăugat un sit Sfil la VIJneo pentru a facilita studiile integrării. S-a adăugat un linker Sfil de 13 baze perechi, accesibil comercial (New EnglADN BioLabs) la situsul KpnI din secvența BGH a vectorului. S-a linearizat VIJneo cu KpnI, s-a purificat în gel, s-a tratat cu ADN polimerază T4 și s-a ligat la linkerul teșit Sfil. S-au ales izolate clonate prin cartografie restrictivă și s-au verificat prin secvențierea linkerului. Noul vector s-a desemnat VIJna (fig.17). Expresia genelor heteroloage cu VIJns (cu Sfil) a fost comparabilă expresiei aceluiași gene în VIJneo (cu KpnI).

1500

## Exemplul 10. Prepararea vectorului VIR

În efortul de a continua optimizarea vectorului de bază pentru vaccinare, s-a preparat un derivat al lui VIJns care s-a denumit VIR. Scopul pentru constructul acestui vector a fost de a obține un vector vaccin de mărime minimă, cu alte cuvinte, fără secvențele ADN care nu sunt necesare, care păstrează încă în întregime caracteristicile optimizate ale expresiei genei heteroloage și randamentele ridicate de plasmid pe care le permit VIJ și VIJns. S-a determinat din literatură, precum și experimental că (1) regiunile din miezul pUC care cuprind originea replicării pentru *E.coli* ar putea fi îndepărtate fără afectarea randamentului plasmidului din bacterie; (2) regiunea 3' a genei *kan<sup>r</sup>* care urmează cadrului deschis de citire pentru kenamicină poate fi îndepărtat dacă în locul lui s-a inserat un terminator bacterian (3) aproximativ 300 bp de la jumătatea 3' a terminatorului BGH au putut fi îndepărtate fără să afecteze funcția sa reglatoare (după situsul enzimei de restricție *kpnI* original în elementul BGH).

1510

1515

VIR s-a construit folosind PCR pentru sintetizarea a 3 fragmente ADN din VIJns reprezentând CMVintA promotor/BGH terminator, originea replicării și respectiv, elementele de rezistență la kenamicină. S-a adăugat pentru fiecare segment enzime de restricție unice la fiecare capăt de segment folosind oligomerii PCR: Sspl și XhoI pentru CMVintA/BGH;

1520



# RO 117710 B1

EcoRV și BamHI pentru gena *karf*; și BclI și Sall pentru *orf*. Aceste situri enzimatică s-au ales deoarece ele permit legarea direcțională a fiecăruia dintre segmentele ADN derivate PCR cu pierderea ulterioară a fiecărui sit.

EcoRV și Sspl părăsesc ADN-urile teșite care sunt compatibile pentru ligare, în timp ce BamHI și BclI părăsesc prelungirile complementare așa cum fac Sall și XhoI. De restricție corespunzătoare indicată mai sus și apoi s-au ligat împreună într-un singur amestec de reacție care conține toate cele 3 segmente ADN. Capătul 5' al lui *orf* a fost desemnat pentru includerea secvenței terminator independente T2 rho care este găsită de obicei în această regiune, astfel, încât ea a putut furniza informația de terminare pentru gena de rezistență la kanamicină. Produsul ligat s-a confirmat prin digestie enzimatică de restricție (mai mult de 8 enzime), precum și prin secvențarea joncțiunilor ligării. Randamentele de plasmid ADN și expresia heteroloagă prin folosirea genelor virale din VIR apare similară lui VIJns. Reducerea netă atinsă în mărimea vectorului a fost 1346 bp (VIJns= 4,86 kb; VIR=3.52 kb)., vezi fig.36, Secv.ID Nr:45. Secvențele oligomere folosite pentru sinteza VIR (siturile enzimei de restricție sunt subliniate și sunt identificate în parantezele care urmează secvenței):

(1) 5'-GGT ACA AAT ATT GG CTA TTG GCC ATT GCA TAC G-3'(sSPi), Secv.ID Nr:60,  
(2) 5'-CCA CAT CTC GAG GAA CCG GGT CAA TTC TTC AGC ACC-3' (XhoI) Secv..id:61  
(pentru segmentul CMVintA.BGH)

(3) 5'-GGT ACA GAT ATC GGA AAG CCA CGT TGT GTC TCA AAA TC-3' (EcoRV), Secv.ID Nr:62;

(4) 5'-CCA CAT GGA TCC G TAA TGC TCT GCC GTT ACA ACC-3'(BamHI). Secv..ID Nr:63; (pentru segmentul genei rezistente la kanamicină)

(5) 5'-GGT ACA TGA TCA CGT AGA AAA GAT CAA ACT TTC TTG-3'(BclI), Secv.ID Nr:64,  
(6) 5'-CCA CAT GTC GAC CC GTA AAA AGG CCG CGT TGC-3'(Sall), Secv.ID Nr:32  
(pentru originea replicării *E.coli*).

## Testul 1. Injecții intradermice ale genelor influenza

Modul pentru introducerea intradermică a genelor a fost același ca pentru introducerea intramusculară, trei injecții a 200 μg fiecare, 3 săptămâni separate, de VI-PR-NP. S-au prelevat splinele pentru analiza *in vitro*. la 55 zile după cea de-a 3-a injecție și s-au restimulat cu nonapeptide epitopul nucleoproteinei 147-155, Secv. ID Nr:9. Celulele țintă (celule P815, de mastocitom de șoarece, singenice cu H-2<sup>d</sup> de șoarece BALB/c) s-au infectat cu virusul heterolog A/Victoria/73 și s-au lizat specific folosind celule splenice ca efector la rapoarte efector: țintă 5:1 și 40:1. Controalele negative s-au realizat prin măsurarea lizei celulelor țintă care nu s-au infectat cu un virus gripal. Controalele pozitive s-au realizat măsurând liza celulelor infectate cu virus gripal prin celule splenice obținute de la un șoarece care s-a infectat de 3 ori cu 130 μg VI-PR-NP și care a supraviețuit unei infecții cu virus influenza viu aparținând tulpinii A/HK/68.

Rezultate: Liza specifică s-a atins folosind celule splenice de la șoareci injectați intradermic la toate rapoartele efector: țintă.

Nu s-a observat nici o liză specifică atunci când s-au folosit ca efector celule splenice obținute de la șoareci neinjectați sau șoareci injectați cu vectorul VI lipsit de gena inserată PR-NP. În plus, liza specifică obținută folosind eliberarea intradermică a fost comparabilă la toate rapoartele efector: țintă cu rezultatele obținute folosind eliberarea intramusculară. S-au măsurat, de asemenea, titrurile virale pulmonare la șoarecii injectați intradermic sau intramuscular. Folosind 5 șoareci/grup, 3 doze de 200 μg în 3 săptămâni după ultima doză, rezultatele au fost după cum urmează:

Tabelul 2

Vaccin	Mod de eliberare	Titru pulmonar la șoareci*	
		Ziua 5	Ziua 7
1570 VI-PR-NP	Intradermic	5,2+0,2	4,1+1 <sup>xx</sup>
VI	Intradermic	5,9+1	6,6+0,3
VI-PR-NP	Intramuscular	4,6+0,4	4,5+1,1 <sup>xx</sup>
Nici unul		6,2+0,3	5,9+0,3

\* Titru medie log <sup>±</sup>SEM1575 <sup>xx</sup> Un șoarece nu a avut nici un virus

În final, s-a testat procentul de supraviețuire la șoareci în ziua 28. În ziua 28 au supraviețuit 89 % dintre șoarecii care au primit VI-NP-PR dintre receptorii i.m. și 50 % dintre receptorii id. Nu a supraviețuit nici unul dintre șoarecii tratați cu vectorul VI și doar 30 % din șoarecii netratați. Acest experiment demonstrează că ADN-ul care codifică nucleoproteine de la tulpina A/PR/34 a fost capabil să inducă CTL care recunosc nucleoproteine de la tulpina A/PR 34 a fost capabil să inducă CTL care recunosc nucleoproteine de la tulpina heteroloagă A/Victoria/73 și un răspuns de protecție imună față de tulpina heteroloagă A/HK/68.

1585 *Testul 2. Vaccinarea polinucleotidică a primatelor*1. *Anticorpul pentru NP la maimuțe Rhesus*

S-au injectat im maimuțe Rhesus (006 NP, 009 NP sau control 101;021) local cu 1 μg de RSV-NP în 3 locuri pe ziua 1. S-au făcut la aceleași momente, în locuri separate, injecții de 1 mg fiecare RSV-LUX și CMV-int-LUX, constructe pentru gena de referință a expresiei luciferazei de licurici. Animalele s-au reinjectat pe ziua 15 cu același cantități de ADN ca înainte și, de asemenea, cu 1 mg de pD5-CAT, un construct pentru gena de referință pentru expresia cloranfenicol acetil transferază, fiecare într-un loc. S-a făcut biopsia siturilor musculare care conțin genele de referință și s-au analizat pentru activitatea genei de referință. S-a colectat ser după 3, 5, 9, 13 și 15 săptămâni după prima injecție. Prima probă pozitivă pentru anticorp anti-NP s-a colectat la săptămâna 11 și s-au colectat, de asemenea, probe pozitive în săptămânile 13 și 15. Anticorpul anti-NP s-a determinat prin ELISA. Rezultatele sunt prezentate în fig.9.

2. *Anticorpul de inhibare a hemaglutinării (HI) la maimuțe Rhesus*

S-au injectat i.m. maimuțe cu VIJ-PR-HA pe ziua 1. Câte 2 animale, au primit fiecare 1 mg sau 100 μg ADN în fiecare mușchi cvadriceps. Fiecare injecție s-a administrat într-un volum de 0,5 ml. S-a luat sânge de la animale înaintea injectării din ziua 1. Toate animalele s-au reinjectat cu ADN pe ziua 15 și apoi s-a colectat sânge la intervale de 2-4 săptămâni. Titru de inhibare a hemaglutinării (HI) față de A/PR/8/34 au fost pozitive la săptămânile 5, 9 și 12, după prima injecție a ADN-ului VIJ-PR-HA. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3 de mai jos:

1605

Titrul de anticorp HI la maimuțe Rhesus care au primit AND V1J-PR-HA

Rhesus nr.	Doza	Titrul anticorp HI la săptămâna nr.				
		Pre	Săpt.3	Săpt.5	Săpt.9	Săpt.12
88-010	1 mg	10	10	320	320	320
88-0200	1 mg	10	10	10	40	40
88-021	100 g	10	10	10	40	20
90-026	100 g	10	10	20	20	40
88-084	10 g	10	20	40	20	10
90-028	10 g	10	10	20	10	10

1610

1615

### Testul 3. Studii de vaccin polinucleotidic la fereți

1. S-a inițiat un studiu al vaccinării polinucleotidice la fereți cu scopul determinării dacă animalele ar putea fi protejate de infecția gripală A prin imunizare cu gene care codifică fie HA (o proteină de suprafață capabilă să inducă anticorpul de neutralizare specific de tulpină), fie proteina internă NP, NS1, PB1, M (considerate a induce un răspuns imun mediat celular ce ar putea fi independent de tulpină). Animalele s-au injectat cu ADN care codifică diferite gene influența în vectorul VIJ, așa cum se prezintă în tabelul 4, de mai jos:

1620

Tabelul 4

Grup	Construct	Doză	Nr. animale	Provoc. H1N1	Provoc. H3N2
1	VIJ-HA	1000 mg	16	8	8
2	VIJ-NP	1000 mg	16	8	8
3	VIJ-NP+ NS1+PB1+PB2+M	total 2000 mg	16	8	8
4	VIJ- HA+NP+NS1+PB1+PB2+M	total 2000 mg	16	8	8
5	VIJ	1000 mg	16	8	8
6	Nici una	Nici una	10	5	5
Total animale	-	-	90	45	45

1625

1630

2. În zilele 22 și 43 postimunizare, s-a colectat ser de la animale imunizate și s-a analizat pentru anticorpi de neutralizare (MI-care inhibă homoglutinarea) și pentru anticorpi de neutralizare (NI-care inhibă homoglutinarea) și pentru anticorpi pentru nucleoproteina (NP) prin ELISA. Animalele care au fost injectate cu ADN au exprimat anticorpi pentru genele corespunzătoare. Aceasta se reflectă în fig. 10, 11 și 16 anexate.

1635

3. În ziua 128, animalele imunizate selectate s-au provocat cu 1200 TCID<sub>50</sub> de influența A/HK/68. Această tulpină este heteroloagă tulpinii A/PR/8/34 care a fost sursa secvențelor de codificare folosite pentru imunizare și prin urmare, protecția indică imunitate bazată pe mediere celulară, mecanisme de imunitate independente de tulpină. Așa cum s-a

1640

1645 arătat în fig.12 anexată, s-a observat o reducere statistică semnificativă în rezidența virală la animalele imunizate cu ADN care codifică proteine interne comparat la controale, confirmând că imunizarea polinucleotidică la fereți este capabilă să producă răspuns imun și că asemenea răspunsuri sunt protectoare.

1650 4. Este testată similar o provocare omoloagă care folosește A/PR/8/34 și este demonstrată în mod similar eficacitatea de protecție a anticorpului de neutralizare indus prin vaccinare polinucleotidică.

*Testul 4.*

1. *Răspunsuri imune umorale*

1655 Injectarea ADN-ului care codifică HA, NP și MI gripal a avut ca rezultat răspunsuri imune umorale la șoareci, fereți și primat non-umane (incluzând maimuțe africane vezi și maimuțe Rhesus). Până acum s-a dovedit a genera anticorpi PNV-uri care conțin gene HA clonate de la tulpinile A/PR/34, B/Panama/90, A/Beijing/89, A/Texas/91, A/Hawaii/91 și A/Georgia/93 ale virusului gripal.

A) *Șoarece*

1660 S-au detectat prin ELISA în ser de la șoareci după injectarea ADN-ului, anticorpi ( $10^4$ - $10^6$ ) s-au generat cu 1  $\mu$ g de ADN NP (A/PR34) administrat o dată (cea mai mică doză testată), provocați de circa 2 săptămâni după injectare (cel mai devreme moment de timp testat) și nu au scăzut timp, de cel puțin 5 luni după injectare. Acești anticorpi NP nu sunt neutralizați și nu participă la protecție. Totuși, ei demonstrează expresia proteinei NP *in vivo*, după injectarea ADN-ului. Spre deosebire de aceștia, anticorpii pentru HA asigură imunitate protectoare față de tulpina omoloagă a virusului gripal. Injectarea ADN-ului HA donat de la tulpina A/PR/34 are ca urmare producere a anticorpilor de neutralizare, așa cum s-a măsurat *in vitro*, printr-o analiză de inhibare a hemaglutinării (HI). S-au măsurat titruri HI mai mari sau egale cu 1280 la numeroși șoareci la care s-au dat 3 doze de 100  $\mu$ g ADN HA și s-au observat titruri detectabile la acele animale care au primit 2 doze mici, de 0,1  $\mu$ g. A existat o legătură doză-răspuns între titru HI și doza ADN, precum și între titru MI și numărul infecțiilor. (Tabelul 5).

*Tabelul 5*

Doza ( $\mu$ g)	GMT HI Numărul dozelor		
	1	2	3
ADN HA(100)	75	106	260
ADN HA(10)	37	69	86
ADN HA(1)	$10^a$	13	24
ADN HA(0,1)	$10^b$	$10^a$	$10^c$
ADN HA(100)	$10^b$	$10^b$	$10^c$
neinjectat	-	$10^b$	-

1685 Tabelul 5: S-au injectat șoareci BALB/c femele (4-6 săptămâni) cu A/PR/34 ADN HA (VIJHA) la dozele indicate, o dată, de două ori sau de trei ori la intervale de 3 săptămâni. Controalele negative au inclus șoareci injectați cu ADN control constând din vectorul lipsit de genă inserată (VIJ) și șoareci neinjectați fără contact anterior cu gripa. S-au colectat probe de ser la 7 săptămâni după doza 1 și s-au analizat pentru prezența anticorpilor de inhibare a hemaglutinării (HI). Datele sunt reprezentate ca medie geometrică a titrului HI, unde:  
n=10

1690 <sup>a</sup> acei șoareci testați pozitiv pentru titruri HI  
<sup>b</sup> toți șoarecii

# RO 117710 B1

În fiecare șoarece testat, prezența anticorpilor HI s-a corelat cu protecția într-un model de provocare homoloagă. Răspunsurile anticorp HI la șoarecii injectați cu ADN HA, după cum s-au măsurat prin ELISA s-au generat, de asemenea, la șoareci folosind ADN HA de la tulpini A/Beijing/89, B/Panama/90 și A/Texas/91 ale virusului gripal.

Bazat pe o lucrare din literatură care a demonstrat expresia mai scăzută a genei de referință după injectarea ADN-ului la șoarecii mai în vârstă, s-a testat efectul vârstei asupra răspunsurilor imune umorale pentru HA. Datorită lipsei șoarecilor femele îmbătrânite virgine, s-au folosit hibridi izolați de aproximativ 10 luni, s-au comparat hibridii izolați și șoareci virgini de 4-6 săptămâni asupra capacității lor de a genera anticorpi HA după injectare de ADN HA la doze la fel de mici ca 1 μg (cea mai scăzută doză testată), titrul ușor mai scăzut la șoarecii mai tineri. (Tabelul 6).

1695

1700

Tabelul 6

Efectul vârstei asupra răspunsurilor imune umorale

1705

Inocul	Doză	GMT (4-6 săpt)	GMT (10 luni)
ADN HA	100	1034	110
ADN HA	10	338	68
ADN HA	1	80	20
ADN control	100	5 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>
neinjectați	-	5 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>
gripă	-	538	36

1710

Tabelul 6: Șoareci BALB/c femele (virgine în vârstă de 4-6 săptămâni și hibridi izolați de 10 luni) s-au injectat cu A/PR/34 ADN HA (VIJHA), la dozele indicate, de 3 ori la intervale de 3 săptămâni. Controalele negative au inclus șoareci injectați cu ADN control (VIJ) și șoareci fără contact anterior cu gripă, neinjectați. Pentru comparație, s-au infectat alți șoareci cu o doză subletală de influență A/PR/34. S-au colectat probe de ser la 9 săptămâni după prima doză și s-au analizat pentru titru HI. Datele sunt prezentate ca medie geometrică a

1715

1720

n=15,

<sup>a</sup> toți șoarecii testați negativ pentru titru HI

Totuși acesta nu a fost un rezultat al însăși și PNV, ci mai degrabă o capacitate diminuată la șoarecii mai bătrâni de a genera răspunsuri imune umorale, în general, deoarece șoarecii mai bătrâni prezintă, de asemenea, răspunsuri HI mai scăzute decât șoarecii mai tineri după infectarea cu virusul viu A/PR/34. De fapt, anticorpul HI au apărut a fi mai puțin dispersați la șoarecii în vârstă vaccinați ADN, decât șoarecii în vârstă infectați influență. Mai mult decât atât, hibridii izolați folosiți în aceste studii au fost cu aproximativ 50% mai productivi decât virginiile tipice de aceeași vârstă, care, bazat pe studiile altora, care folosind la șoareci diete restricționate caloric, ar fi putut avea un efect dăunător asupra răspunsurilor imune ale acestor animale. Din acest motiv, precum și din alte motive, răspunsurile imune ale acestor șoareci nu pot fi reprezentative. Totuși, vârsta (cel puțin până la 10 luni) nu apare a reduce semnificativ capacitatea vaccinării polinucleotidice de a induce răspunsuri imune umorale, chiar la doze de ordinul a 1 μg.

1725

1730

1735

B) Fereți

Răspunsurile imune umorale s-au generat la animale injectate cu ADN HA de la tulpinile virale influenza A/PR/34, A/Beijing/89, A/Hawaii/91 și A/Georgia/93. S-au produs prin PNV corespunzătoare anticorpi HI împotriva A/PR/34 și anticorpi ELISA împotriva HA-urilor de la alte tulpini. S-au găsit seruri de la fereți injectați cu ADN-uri HA A/Beijing/89, A/Hawaii/91 și A/Georgia/93 având anticorpi HI și anticorpi de neutralizare, deoarece aceste animale au fost protejate de provocarea virală.

C) *Primate non-umane* (De asemenea, vezi testul 2)

S-au imunizat de două ori maimuțe Rhesus cu ADN HA (A/PR/34) la doze de 10, 100 și 1000 μg și una din 2 maimuțe cu doze de 10 μg au avut un HI de 80. Mai departe serurile s-au analizat până la 13 luni; titrurile HI nu au scăzut apreciabil de la luna 6-13 (Tabelul 7)

Tabelul 7

Generarea anticorpilor HI în maimuțe Rhesus

Doză (μg)	Pre	1 lună	2 luni	5,5 luni	13 luni
2000	10	640	320	160	80
2000	10	40	40	20	20
200	10	80	40	40	80
200	10	80	80	40	20
20	10	40	20	20	20
20	10	10	10	10	10

Tabelul 7: Maimuțele Rhesus (atât masculi, cât și femele) în domeniul de mărime de 4,3 până la 8,8 kg, s-au injectat cu ADN HA A/PR/34 (V1JHA) la dozele indicate. La săptămânile 0 și 2. S-au colectat probe de ser la momentele indicate după prima doză și s-au analizat pentru titru HI. Datele reprezintă titruri HI pentru animale individuale.

La maimuțele africane verzi injectate cu o combinație PNV conținând 100 μg ADN HA (A/Beijing/89), evaluarea serurilor la 4-6 săptămâni post prima doză, a arătat un GMT de 29 (răspuns 8/9). Aceasta se prezintă favorabil comparativ cu răspunsurile la vaccinurile autorizate, subvirionice (GMT de 16, răspuns 5/6) și virionice integrale (GMT=36, răspuns 6/6) la același moment de timp (fig. 18). S-a observat un moment de revenire marcat la cea de a doua imunizare la animalele care au primit o doză de 10 μg ADN HA (GMT=1.9. după o doză și 199 după două doze). Vaccinul autorizat de virion integral a demonstrat un efect de revenire similar, în timp ce titrurile HI produse prin a 2-a doză de vaccin subvirionic au fost numai trecătoare. Până în prezent, s-au măsurat niveluri similare ale anticorpilor HI la 18 săptămâni la animale imunizate, atât cu doze de 10 μg, cât și cu 100 μg ADN HA, comparate cu cele mai bune vaccinuri autorizate (virion integral). Aceste rezultate demonstrează că PNV a fost eficient, cel puțin pentru generarea anticorpilor de neutralizare la fel ca vaccinul virion integral și superior vaccinului subvirionic; cu toate acestea, ele nu au fost testate la primatele non-umane. În acest studiu PNV a conținut un amestec pentavalent de ADN-uri care codifică HA de la A/Beijing/89, B/Panama/980 și A/Texas/91 și NP și M1 de la A/PR/34, în vederea desemnării unui candidat de vaccinare. De asemenea, s-au testat aceste animale pentru generarea răspunsurilor imune umorale față de alte componente ale vaccinului și s-au detectat anticorpi pentru HA B/Panama/90 și NP A/PR/34. Într-un experiment separat, s-au indus anticorpi de neutralizare și anticorpi HI față de A/Texas/91, HA prin injectare a 2 doze de ADN HA clonat PCR.

## 2. Răspunsuri imune mediate celular

Vezi exemplul 3 de mai sus

## 3. Generarea răspunsurilor imune

A) *Imunitate umorală*

1785

Evenimentele care duc la producerea răspunsurilor umorale și mediate celular, după injectarea de ADN nu au fost încă elucidate. Pentru producerea anticorpilor de neutralizare (de exemplu, împotriva HA viral influenza), este probabil că celulele trebuie să exprime antigenul pe membrana plasmatică sau să îl secrete în mediul extracelular. În plus, celulele transfectate ar putea exprima HA cu structură secundară, terțiară și cuaternară celei din virion. Într-o analiză de rozetare, s-a demonstrat expresia la suprafața celulei a HA în celule RD (rabdomioblastică) transfectate temporar cu ADN HA. Eritrocitele au aglomerat la suprafața celulelor transfectate HA, dar nu și la celulele transfectate simulat, indicând că HA nu s-a exprimat pe suprafață doar, ci de asemenea, și-a păstrat conformația caracteristică pentru legare la proteine care conțin acid sialic.

1790

1795

B) *Imunitate mediată celular*

Generarea răspunsurilor imune mediate celular (de exemplu, împotriva NP viral influenza) necesită prelucrarea proteolitică și prezentarea peptidelor derivate din aceasta în asociere cu MHC clasa I. Natura antigenului prezentat celulei ce duce la generarea răspunsurilor imune după injectarea ADN-ului încă nu este cunoscută. Celule musculare exprimă niveluri scăzute de MHC clasa I și nu sunt considerate a exprima costimulator molecule pe suprafețele lor. Prin urmare, celulele musculare, în general, nu sunt considerate a fi celule de prezentare de antigen. Totuși, unele trăsături ale evidenței sugerează că celulele musculare sunt implicate în generarea de răspunsuri imune după injectare im de ADN. În primul rând, s-a demonstrat o limită de supraviețuire a țesuturilor capabile de internalizare a plasmidului ADN dezvelit care duce la expresia proteinei *in situ*, numeroase tipuri de celule putând exprima gene de referință când se injectează plasmidul în țesut, dar substanțial mai puțin eficient decât celulele musculare. O analiză completă a absorbției ADN-ului de către celule non-musculare după injectare i.m. nu a fost însă raportată, dar este probabil că absorbția ar putea fi chiar mai puțin eficientă. În al doilea rând, expresia genelor de referință după injectare i.m. de ADN s-a demonstrat în celule musculare scheletice și cardiace în numeroase specii diferite. În al treilea rând, deși se pot genera răspunsuri CTL după injectarea ADN-ului pe alte căi (iv și id), cele mai bune răspunsuri imune de protecție s-au produs în șoareci după injectarea i.m. a ADN-ului. În al patrulea rând, mioblastele și micocitele pot fi recunoscute și lizate *in vitro* prin CTL și această liză poate fi sporită prin pretratare cu interferon care reglează expresia MHC clasa I. În sfârșit, transplantarea de mioblaste care exprimă NP transfectate stabil la șoareci singenici fără experiență gripală are ca rezultat generarea *in vivo* de răspunsuri imune protectoare mediate celular (fig.20). Prin urmare, expresia antigenilor de către celule musculare este suficientă pentru inducerea răspunsurilor imune de protecție observată după injectarea ADN. Mai mult decât atât, absorbția și expresia ADN-ului de către celule non-musculare, nu este necesar să fie luată în considerare pentru generarea imunității de protecție. Din punctul de vedere al nucleotidelor ca vaccinuri, ar putea fi potențial avantajos să se limiteze absorbția ADN la celule musculare. În primul rând, micocitele sunt diferențiate final și nu se divid. Aceasta poate fi importantă pentru micșorarea posibilității de integrare a plasmidului ADN în ADN cromozomal și menținerea unei expresii persistente a antigenului, care a putut duce la răspunsuri imune de lungă durată. În al doilea rând, micocitele sunt celule mari, multinucleate, ce pot fi regenerare prin fuziunea mioblastelor.

1800

1805

1810

1815

1820

1825

Aceasta poate ajuta să se explice de ce injectarea ADN-ului duce la expresia proteinei care poate persista potențial perioada lungi de timp fără evidențierea distrugerii citolitice prin CTL.

1830

## Testul 5

## Studii de protecție

1835 Imunizarea cu ADN care codifică antigene virale influenza asigură protecția de moarte și boală și reduce încărcările virale la o diversitate de combinații ale tulpinilor influenza, folosind 2 modele animale acceptate pe larg pentru infecția gripală umană (șoareci și fereți)

1840 1. Protecția heteroloagă (heterotipică, comună de grup) nu este asigurată eficient prin vaccinul autorizat de virus omorât, dar a fost asigurată prin vaccinare ADN în modele animale. Această protecție s-a demonstrat când ADN-ul care codifică NP sau M1 s-a injectat în animale de laborator. Răspunsul imun interactiv mediat celular (CMI) s-a indus prin aceste ADN-uri care au asigurat un răspuns de protecție.

## a) Șoareci

1845 S-au injectat i.m. șoareci BALB/c și C3H cu ADN care codifică NP de la A/PR/34 și s-au protejat de moarte și boală (testată prin reducere în greutatea corporală) când s-au provocat prin infecție pe întregul tract respirator cu o LD90 a A/Hong Kong/78 (H3N2), o tulpină heterotipică (H3 față de H1 pentru A/PR/34). Fig. 21 prezintă supraviețuirea șoarecilor BALB/c imunizați de 3 ori cu ADN NP (200 μg/doză) la intervale de 3 săptămâni și provocați la 3 săptămâni după ultima imunizare. Fig. 22 arată inhibarea pierderii de greutate după provocare la șoareci imunizați comparată cu pierderea severă de greutate observată la șoarecii de control. Fig. 23 prezintă reducerea încărcării virale pulmonare la 7 zile după provocarea tractului respirator a șoarecilor imunizați cu ADN NP comparat cu șoarecii care au primit ADN control care nu codifică. Șoarecii imunizați cu ADN NP au fost complet protejați de moarte, au prezentat o pierdere redusă în greutate și au arătat o încărcare virală în plămâni mai scăzută cu șoarecii de control. S-a dovedit că o cantitate mai mică sau egală cu 6,25 μg per injecție de ADN NP este necesară pentru protejarea șoarecilor de moarte și pierdere în greutate când s-au dat 3 injecții de ADN (fig.24). Protecția produsă prin imunizare cu ADN NP s-a dovedit a persista în esență neschimbată la șoarecii imunizați timp de cel târziu 3 luni. Nivelul de protecție a persistat până la 6 luni, dar a scăzut ușor, între lunile 3 și 6 după ultima imunizare. Cu toate acestea, revaccinarea cu o injecție unică de ADN NP la 22 săptămâni a refăcut în întregime protecția (fig.25). Astfel, imunizarea șoarecilor cu ADN NP a produs o protecție de lungă durată, heteroloagă și care se poate reinstaura. Capacitatea de a genera un răspuns anamnezic pe revaccinarea acestor animale sugerează că prin imunizare ADN NP a fost indusă memorie imunologică.

## 1865 b) Fereți

1870 Fereții sunt un model folosit de obicei pentru infecție influenza umană deoarece ei sunt susceptibili la infecție cu o varietate de izolate umane ale virusului gripal. Replicarea virală la fereți se întâlnește predominant în nări și trahee și nu se extinde aproape de loc în plămâni, spre deosebire de șoareci la care încărcarea virală în plămâni este mare. Infecția la fereți este urmată cel mai rapid de tirarea virusului în fluidul de spălătură nazală. Fereții imunizați cu ADN NP sau ADN M1, singure sau în combinație, dintr-o tulpină obținută recent de la oameni (A/Beijing/89, H3N2) prezintă o rezidență virală redusă semnificativ pe zilele 1-6, pe provocare virală cu un izolat prezent în circulație, A/Georgia/93 (H3N2) (fig.26). Acest izolat prezent în circulație prezintă o derivație antigenică de la tipul de tulpină A/Beijing/89, astfel, încât vaccinul autorizat A/Beijing/89 a oferit o protecție scăzută pentru oameni împotriva bolii produse de către A/Georgia/93.

1880 Fereții imunizați cu ADN care codifică proteine interne ale A/PR/34 prezintă rezidență virală nazală semnificativ redusă pe zilele 8 și 6 după infecție cu tulpina homotipică A/PR/34 (fig.27). Reducerea rezidenței virale s-a observat după provocare A/Georgia/93, atât la momente timpurii, cât și târzii, în timp ce după provocare A/PR/34 s-a observat doar târziu o reducere în rezidență virală; aceasta poate fi datorată unei diferențe de virulență între cele 2 tulpini pentru fereți.



# RO 117710 B1

2. Omoloagă (homotipică, specifică de tip). Protecția omoloagă s-a observat imediat, atât la șoareci, cât și la fereți imunizați cu ADN.

## a) Șoareci

Șoareci BALB/c imunizați cu ADN HA (A/PR/34) au fost complet protejați față de provocare cu LD90 de A/PR/34. După provocare, șoarecii imunizați experimental nu au prezentat nici moarte (fig.28), nici pierdere în greutate corporală mai mare de 5% (fig.29), în timp ce șoarecii experimentali de control 90...100 % au murit și au prezentat pierdere severă în greutate. Titrarea dozei de ADN HA necesară pentru a atinge protecție a dovedit că 3 injecții de 1 μg ADN HA au fost suficiente pentru atingerea protecției totale (fig.30).

1885

1890

## b) Fereți

Fereții care au fost imunizați cu ADN codificați pentru HA de la A/PR/34 au avut pe zilele 1-6 rezidență virală semnificativ mai mică după infecție provocată homolog, decât fereții care au primit ADN control (fig.31). În mod asemănător, fereții care au fost imunizați cu ADN HA/Georgia/93 au avut rezistență virală redusă pe ziua 1 și 3 - 7 după infecție omoloagă (fig.32). Anticorpii HA au fost prezenți în serul de la toți fereții imunizați împotriva tulpinilor corespunzătoare (vezi mai sus). Astfel, imunizarea cu ADN HA produce protecție omoloagă.

1895

3. Combinații de vaccinuri: Capacitatea ADN-ului HA de a furniza un domeniu superior de protecție atunci când s-a combinat cu ADN-uri NP și M1 s-a examinat în fereți.

1900

## a) Lărgirea protecției împotriva variantelor derivate antigenic

Derivarea antigenică care s-a întâlnit între tulpinile A/Beijing/89 și A/Beijing/92 a fost suficient de mare, astfel, încât numeroși oameni imunizați cu vaccinul autorizat conținând tulpina A/Beijing/89 nu au fost protejați împotriva bolii produse de varianta A/Beijing/92. În America de Nord, răspândirea deosebită a bolii a fost produsă de către A/Beijing/92 asemănător izolatelor din circulație, de exemplu, A/Georgia/93. Izolatele în circulație nord-americane sunt similare antigenic tipului de tulpină A/Beijing/92, dar diferă în ceea ce privește locul geografic al izolării și istoricul trecerii lor, în modul în care au trecut ele în culturi de celule mamifere mai degrabă decât în ouă. În termenii secvenței de aminoacizi a HA, totuși tulpinile asemenea A/Beijing/92 au diferit de tulpinile asemenea A/Beijing/89 prin numai 11 puncte de mutație (pozițiile 133, 135, 145, 156, 157, 186, 190, 191, 193, 226 și 262) din regiunea HI. Prin urmare, conform invenției, s-a luat în considerare să se determine dacă combinația răspunsurilor imune homotipice induse prin ADN NP și M1 ar putea asigura un grad mai mare de protecție împotriva acestui variant derivat antigenic. Imunizarea fereților cu vaccinul autorizat care conține tulpina A/Beijing/89, sau cu ADN HA de la A/Beijing/89, sau un izolat în circulație asemenea lui Beijing/89 (A/Hawaii/91) a dat o reducere din rezidența virală când animalele s-au provocat cu A/Georgia/93 (Fig.33). Animalele care s-au imunizat cu o combinație PNV conținând ADN-uri NP, M1 și HA au avut o rezidență virală semnificativ mai scăzută decât fereți imunizați cu produsul autorizat sau numai cu ADN HA (fig.34). În cazul ADN HA A/Hawaii/91 combinat cu ADN-uri NP și M1 A/Beijing/89, protecția rezultată nu a fost semnificativ diferită de protecția maximă furnizată prin ADN HA homolog A/Georgia/93 (fig.35). Astfel, combinarea ADN-urilor HA, NP și M1 a dat o protecție îmbunătățită împotriva unui derivat antigenic variant comparativ cu vaccinul autorizat.

1905

1910

1915

1920

## b) Efectul istoricului pasajului antigenului vaccinului

Fereții care au fost imunizați cu un vaccin constând din secvența ADN HA derivată de la un izolat în circulație din SUA care a fost trecut în culturi tisulare de celule MDCK (A/Hawaii/91) au prezentat experimental rezidență virală mai mică ( $p=0,21$  prin ANOVA pe 2 căi) decât fereții care au primit vaccinul autorizat de virus omorât care conține tulpina A/Beijing/89, trecută în ouă, când s-au provocat cu tulpina derivată antigenic A/Georgia/93 (fig.33). Spre deosebire de aceștia, fereții care au primit ADN HA de la A/Beijing/89 nu au

1925

1930

1935 exprimat diferență semnificativă de rezidență virală ( $p=0,058$ ) după provocare A/Georgia/93 de la fereți care au primit vaccinul autorizat conținând virusul identic. Tulpinile crescute în ouă și celulele de mamifere diferă prin 2 puncte de mutație în regiunea HA1 a HA (pozițiile 186 și 193), ambele fiind localizate în situl antigenic B, în vecinătatea apexului monomerului HA și anticorpilor de neutralizare. În unele circumstanțe, capacitatea unor izolate gripale umane de a se lega la RBC de pui este inițial scăzută, dar este crescută prin pasaje succesive în ouă sugerând că receptorul regiunii de legare a HA poate suferi selecție substanțială prin creșterea în celule aviare. Efectul micilor variații de secvență asupra eficacității vaccinurilor gripale bazate pe HA la animale de laborator subliniază importanța potențială a rămânerii cât mai aproape posibil de secvența virusului de tip sălbatic pentru prepararea de asemenea, virusuri.

c) *Primatele non-umane*

1940 Primatele non-umane nu sunt folosite de obicei, ca modelele de provocare gripală datorită absenței la ele a unui răspuns clinic la infecție. Cu toate acestea, s-a investigat imunogenitatea combinațiilor de vaccin PNV în primare non-umane comparativ cu vaccinurile autorizate de virus omorât. Titrurile de anticorp produse prin combinație PNV care conține HA și genele proteinelor interne au fost cel puțin echivalente produsului autorizat în termenii titrului de anticorp HI și duratei răspunsului la un PNV HA pentru un variant derivat antigenic, arătând că răspunsuri specifice de tip la PNV au putut fi generate la subiecte imunizate anterior. Maimuțele care au fost imunizate cu PNV au răspuns, de asemenea, la imunizare ulterioară cu vaccin convențional conținând virus omorât.

1950 4. Concluzie: Vaccinurile polinucleotidice împotriva gripei sunt eficiente în modele de animale de laborator ale infecției gripale. Protecția homoloagă poate fi atinsă folosind vectori ADN care codifică HA, cel mai probabil printr-un mecanism imunologic analog celui indus prin proteine HA folosite curent în vaccinul gripal autorizat.

1955 Protecția heteroloagă poate fi atinsă împotriva tulpinilor, atât deviate, cât și derivate antigenic, de asemenea, prin includerea ADN -ului care codifică proteinele interne conservate ale influenței. Combinația acestor abordări într-o imunizare unică dă protecție îmbunătățită împotriva variantelor deviate antigenic în comparație cu vaccinul autorizat obișnuit, așa cum s-a văzut în modelul folosind feretel.

(1) INFORMAȚIE GENERALĂ:

(i) SOLICITANT: Denney, John J

Dwark, Varavani J

Liu, Margaret A

Montgomery, Donne L

Parker, Suezanne E

Shiver, Dohn W

(ii) TITLUL INVENȚIEI: CONSTRUCT ADN ȘI COMPOZIȚIE  
IMUNOGENĂ CU ACESTA

(iii) NUMĂRUL SECVENȚELOR: 64

(iv) ADRESA PENTRU CORESPONDENȚĂ:

(A) ADRESANT: Merck & Co., Inc.

(B) STRADA: P.O.Box 2000

(C) ORAȘ: Rahway

(D) STAT: New Jersey

(E) ȚARA: SUA

(F) ZIP: 07065

(v) FORMA CITIBILĂ PE COMPUTER:

(A) TIPUL MEDIULUI: Floppy disk

1975

1980

# RO 117710 B1

- (B) COMPUTER: IBM PC compatibil  
(C) SISTEMUL DE OPERARE: PC-DOS/MS -DOS  
(D) SOFT: PATENTIN RELEASE NR.1.0, Versiune nr.1.25
- (iv) DATE CURENTE ALE CERERII:  
(A) CERERE NUMĂRUL: 95 - 01622  
(B) DATA DEPUNERII: 14.03.1999  
(C) CLASIFICARE: C12 N 15/44  
1985
- (vii) DATE PRIVIND CERERI ANTERIOARE:  
(A) CERERE NUMĂRUL: US 08/032 383  
(B) DATA DEPUNERII: 18.03.1993  
1990
- (vii) DATE PRIVIND CERERI ANTERIOARE:  
(A) CERERE NUMĂRUL: US 08/089 985  
(B) DATA DEPUNERII: 08.07.1993
- (viii) MANDATAR:  
(A) NUME: Bencen, Gerard M  
(B) Numărul de înregistrare: 35746  
(C) NUMĂRUL DE REFERINȚĂ AL DOSARULUI: 18972Y  
1995
- (xi) TELECOMUNICAȚII:  
(A) TELEFON: (908)594 - 3901  
(B) TELEFAX: (908) 594 - 4720  
2000
- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR.L:  
(i) CARACTERISTICILE SECVENȚEI:  
(A) LUNGIME: 18bp  
(B) TIP: acid nucleic  
(C) ÎMPLETIRE: unică  
(D) TOPOLOGIE: lineară  
2005
- (ii) TIPUL MOLECULEI: cADN

## Lista secvențelor

- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:1  
(I) Caracteristicile secvenței:  
(A) Lungime: 18 bp  
(B) Tip: acid nucleic  
(C) Împletire: unică  
(D) Topologie: liniară  
2010
- (II) Tipul moleculei: cADN  
2015
- (III) Ipotetică: nu
- (IV) Antisens: nu
- (XI) Descrierea secvenței: Secv.ID Nr:1  
GTGTGCACCT CAAGTCTCC  
2020
- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:2  
(I) Caracteristicile secvenței:  
(A) Lungime: 23 bp  
(B) Tip: acid nucleic  
(C) Împletire: simplă  
(D) Topologie: liniară  
2025
- (II) Tipul moleculei: cADN
- (III) Ipotetică: nu

- 2030 (IV) Antisens: nu  
 (XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR.2  
 CCCTTTGAGA ATGTTGCACA TTC
- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:3
- 2035 (I) Caracteristicile secvenței:  
 (A) Lungime: 33 bp  
 (B) Tip: acid nucleic  
 (C) Împletire: simplă  
 (D) Topologie: liniară
- 2040 (II) Tipul moleculei: cADN  
 (III) Ipotetică: Nu  
 (IV) Antisens: nu  
 (XI) Descrierea secvenței: Secv.ID Nr.3  
 GGTACAAGAT CTACCATGCT TCTAACCGAG GTC
- 2045 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:4
- (I) Caracteristicile secvenței:  
 (A) Lungime: 36 bp  
 (B) Tip: acid nucleic  
 (C) Împletire: simplă  
 (D) Topologie: liniară
- 2050 (II) Tipul moleculei: cADN  
 (III) Ipotetică: nu  
 (IV) Antisens: da
- 2055 (XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:4  
 CCACATAGAT CTTCACTTGA ACCGTTGCAT CTGCAC
- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:5
- (I) Caracteristicile secvenței:  
 (A) Lungime: 23 bp  
 (B) Tip: acid nucleic  
 (C) Împletire: simplă  
 (D) Topologie: liniară
- (II) Tipul moleculei: cADN
- 2065 (III) Ipotetică: nu  
 (IV) Antisens: nu  
 (XI) Descrierea Secvenței: SECV.ID NR:5  
 CTATATAAGC AGAGCTCGTT TAG
- 2070 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:6
- (I) Caracteristicile secvenței:  
 (A) Lungime: 30 bp  
 (B) Tip: acid nucleic  
 (C) Împletire: simplă
- 2075 (D) Topologie: liniară
- (II) Tipul moleculei: cADN  
 (III) Ipotetică: nu  
 (IV) Antisens: Da
- (XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:6
- 2080 GTAGCAAAGA TCTAAGGACG GTGACTGCAG

# RO 117710 B1

## (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:7

### (I) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 39 bp

(B) Tip: acid nucleic

(C) Împletire: simplă

(D) Topologie: liniară

2085

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotecă: nu

(IV) Antisens: nu

(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR.7

GTATGTGTCT GAAAATGAGC GTGGAGATTG GGCTCGCAC

2090

## (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA NR:8

### (I) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 39 bp

(B) Tip: acid nucleic

(C) Împletire: simplă

(D) Topologie: liniară

2095

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: da

2100

(XI) Descrierea secvenței: Secv.ID Nr.8

CTGCGACCC AATCTCCAgc CTCATTTTCA GACACATAC

## (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:9

### (I) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 9 aminoacizi

(B) Tip: aminoacidă

(C) Împletire: simplă

(D) Topologie: liniară

2105

(II) Tipul moleculei: peptidă

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: nu

(V) Tip de fragment: intern

2110

(XI) Descrierea secvenței: Secv.ID Nr.9

Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val

2115

1

5

## (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:10

### (I) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 4432 bp

(B) Tip: acid nucleic

(C) Împletire: dublă

(D) Topologie: ambele

2120

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: nu

(XI) Descrierea secvenței: Secv.ID Nr.10

2125

# RO 117710 B1

2130 TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA 60  
 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG 120  
 TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC 180  
 ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGATTGG 240  
 CTATTGGCCA TTGCATACGT TGTATCCATA TCATAATATG TACATTTATA TTGGCTCATG 300  
 2135 TCCAACATTA CCGCCATGTT GACATTGATT ATTGACTAGT TATTAATAGT AATCAATTAC 360  
 GGGGTCATTA GTTCATAGCC CATATATGGA GTTCCGCGTT ACATAACTTA CGGTAAATGG 420  
 CCCGCTGGC TGACCGCCCA ACGACCCCGG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC 480  
 CATAGTAACG CCAATAGGGA CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC 540  
 2140 TGCCCACTTG GCAGTACATC AAGTGTATCA TATGCCAAGT ACGCCCCCTA TTGACGTCAA 600  
 TGACGGTAAA TGGCCCCCCT GGCATTATGC CCAGTACATG ACCTTATGGG ACTTTCCTAC 660  
 TTGGCAGTAC ATCTACGTAT TAGTCATCGC TATTACCATG GTGATGCGGT TTTGGCAGTA 720  
 CATCAATGGG CGTGGATAGC GGTTTGACTC ACGGGGATTT CCAAGTCTCC ACCCCATTGA 780  
 2145 CGTCAATGGG AGTTTGT TTTT GGCACCAAAA TCAACGGGAC TTTCCAAAAT GTCGTAACAA 840  
 CTCCGCCCCA TTGACGCAA TGGGCGGTAG GCGTGTACGG TGGGAGGTCT ATATAAGCAG 900  
 AGCTCGTTTA GTGAACCGTC AGATCGCTG GAGACGCCAT CCACGCTGTT TTGACCTCCA 960  
 TAGAAGACAC CGGGACCGAT CCAGCCTCCG CGGCCGGGAA CGGTGCATTG GAACGCGGAT 1020  
 2150 TCCCCGTGCC AAGAGTGACG TAAGTACCGC CTATAGAGTC TATAGGCCCA CCCCCTTGCC 1080  
 TTCTTATGCA TGCTATACTG TTTTGGCTT GGGGTCTATA CACCCCGCT TCCTCATGTT 1140  
 ATAGGTGATG GTATAGCTTA GCCTATAGT GTGGGTTATT GACCATTATT GACCACTCCC 1200  
 CTATTGGTGA CGATACTTTC CATTACTAAT CCATAACATG GCTCTTTGCC ACAACTCTCT 1260  
 TTATTGGCTA TATGCCAATA CACTGTCTT CAGAGACTGA CACGGACTCT GTATTTTAC 1320  
 2155 AGGATGGGGT CTCATTTATT ATTTACAAAT TCACATATAC AACACCACCG TCCCAGTGC 1380  
 CCGCAGTTTT TATTAACAT AACGTGGGAT CTCCACGCGA ATCTCGGGTA CGTGTTCGG 1440  
 ACATGGGCTC TTCTCCGGTA GCGGCGGAGC TTCTACATCC GAGCCCTGCT CCCATGCCTC 1500  
 CAGCGACTCA TGGTCGCTCG GCAGTCTCTT GCTCCTAACA GTGGAGGCCA GACTTAGGCA 1560  
 2160 CAGCACGATG CCCACCACCA CCAGTGTGCC GCACAAGGCC GTGGCGGTAG GGTATGTGTC 1620  
 TGAAAATGAG CTCGGGGAGC GGGCTTGAC CGCTGACGCA TTTGGAAGAC TTAAGGCAGC 1680  
 GGCAGAAGAA GATGCAGGCA GCTGAGTTGT TGTGTTCTGA TAAGAGTCAG AGCTAACTAA 1740  
 CGTTGCGGTG CTGTTAACGG TGGAGGSCAG TCTAGTCTGA GCAGTACTCG TTGCTGCCGC 1800  
 2165 GCGCGCCACC AGACATAATA GCTGACAGAC TAACAGACTG TTCCTTTCCA TGGGTCTTTT 1860  
 CTGCAGTCAC CGTCCTTAGA TCTGCTGTGC CTCTAGTTG CCAGCCATCT GTTGTTTGCC 1920  
 CCTCCCCCGT GCCTTCCTTG ACCCTGGAAG GTGCCACTCC CACTGTCTT TCCTAATAAA 1980  
 ATGAGGAAAT TGCATCGCAT TGTCTGAGTA GGTGTCATTC TATTCTGGGG GGTGGGGTGG 2040  
 2170 GCCAGCACAG CAAGGGGGAG GATTGGGAAG ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG 2100  
 GCTCTATGGG TACCCAGGTG CTGAAGAATT GACCCGGTTC CTCCTGGGCC AGAAAAGAAGC 2160  
 AGGCACATCC CCTTCTCTGT GACACACCT GTCCACGCCC CTGGTTCTTA GTTCCAGCCC 2220  
 CACTCATAGG AACTCATAG CTCAGGAGGG CTCCGCCTTC AATCCCACCC GCTAAAGTAC 2280  
 2175 TTGGAGCGST CTCTCCCTCC CTCATCAGCC CACCAAACCA AACCTAGCCT CCAAGAGTGG 2340  
 GAAGAAATTA AAGCAAGATA GGCTATTAAG TGCAGAGGGA GAGAAAATGC CTCCAACATG 2400

# RO 117710 B1

TGAGGAAGTA ATGAGAGAAA TCATAGAATT TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGA CTGCTG 2460  
 CGCTCGGTGCG TTGGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA 2520  
 TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAGGCC 2580 2180  
 AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG TTTTCCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG 2640  
 CATCACAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC 2700  
 CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG CTCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC 2760  
 GGATACCTGT CCGCCTTCT CCCTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCAATG CTACACGCTGT 2820 2185  
 AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTCGTTCGC TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCC 2880  
 GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCA CCCGGTAAGA 2940  
 CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA 3000  
 GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA 3060  
 TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA 3120 2190  
 TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG 3180  
 CGCAGAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG 3240  
 TGGAACGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC 3300  
 TAGATCCTTT TAAATTA AAA ATGAAGTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAACT 3360 2195  
 TCGTGTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT 3420  
 CGTTCATCCA TAGTTGCTG ACTCCCGTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA 3480  
 CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA 3540  
 TCAGCAATA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCTGC AACTTTATCC 3600 2200  
 GCCTCCATCC AGTCTATTA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT 3660  
 AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC GTCGTTTGCT 3720  
 ATGGCTCCAT TCAGTCCGG TTCCAACGA TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCATGTTG 3780  
 TGCAAAAAG CGGTTAGCTC CTTGCTCCT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA CTTGGCCGCA 3840  
 GTGTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATAATTCTC TTA CTGTCAT GCCATCCGTA 3900 2205  
 AGATGCTTTT CTGTACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG 3960  
 CGACCGAGTT GCTCTTGCC GCGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT 4020  
 TAAAAGTGC TCATCATTGG AAAAGTTCT TCGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG 4080  
 CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCACT CGTGACCCA ACTGATCTC AGCATCTTT 4140 2210  
 ACTTTCACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA 4200  
 ATAAGGGCGA CACGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC 4260  
 ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA GAAAAATAAA 4320  
 CAAATAGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCGA AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCATT 4380 2215  
 ATTATCATGA CATTAACTA TAAAATAGG CGTATCACGA GGCCCTTTCG TC 4432

## INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:11

(I) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 2196 bp

(B) Tip: acid nucleic

(C) Împletire: dublă

(D) Topologie: ambele

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: nu

(XI) Descrierea secvenței: Secv.ID Nr.11

2220

2225

# RO 117710 B1

2230 ATTGGCTATT GGCCATTGCA TACGTTGTAT CCATATCATA ATATGTACAT TTATATTGGC 60  
 TCATGTCCAA CATTACCGCC ATGTTGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA ATAGTAATCA 120  
 ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT ATGGAGTTCC GCGTTACATA ACTTACGGTA 180  
 AATGGCCCCG CTGGCTGACC GCCCAACGAC CCCC GCCCAT TGACGTCAAT AATGACCTAT 240  
 GTTCCCATAG TAACGCCAAT AGGGACTTTC CATTGACGTC AATGGGTGGA GTATTTACGG 300  
 2235 TAAACTGCCC ACTTGGCAGT ACATCAAGT TATCATATGC CAAGTACGCC CCCTATTGAC 360  
 GTCAATGACG GTAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCCAGT ACATGACCTT ATGGGACTTT 420  
 CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC ATCGCTATTA CCATGGTGAT GCGGTTTTGG 480  
 CAGTACATCA ATGGGCGTGG ATAGCGGTTT GACTCACGGG GATTTCCAAG TCTCCAACCC 540  
 2240 ATTGACGTCA ATGGGAGTTT GTTTTGGCAC CAAAATCAAC GGGACTTTCC AAAATGTCGT 600  
 AACAACTCCG CCCATTGAC GCAAATGGGC GGTAGGCGTG TACGGTGGGA GGTCTATATA 660  
 AGCAGAGCTC GTTTAGTGAA CCGTCAGATC GCCTGGAGAC GCCATCCACG CTGTTTTGAC 720  
 CTCCATAGAA GACACCGGA CCGATCCAGC CTCCGCGGCC GGGAACGGTG CATTGGAACG 780  
 CGGATTCCCC GTGCCAAGAG TGACGTAAGT ACCGCCTATA GAGTCTATAG GCCCACCCCC 840  
 2245 TTGGCTTCTT ATGCATGCTA TACTGTTTTT GGCTTGGGGT CTATACACCC CCGCTTCTC 900  
 ATGTTATAGG TGATGGTATA GCTTAGCTA TAGGTGTGGG TTATTGACCA TTATTGACCA 960  
 CTCCCCTATT GGTGACGATA CTTTCCATTA CTAATCCATA ACATGGCTCT TTGCCACAAC 1020  
 TCTCTTTATT GGCTATATGC CAATACACTG TCCTTCAGAG ACTGACACGG ACTCTGTATT 1080  
 2250 TTTACAGGAT GGGGTCTCAT TTATTATTTA CAAATTCACA TATACAACAC CACCGTCCCC 1140  
 AGTGCCCGCA GTTTTTATTA AACATAACGT GGGATCTCCA CGCGAATCTC GGTACGTGT 1200  
 TCCGGACATG GGCTCTTCTC CGGTAGCGGC GGAGCTTCTA CATCCGAGCC CTGCTCCCAT 1260  
 GCCTCCAGCG ACTCATGGTC GCTCGGCAGC TCCTTGCTCC TAACAGTGA GGCAGACTT 1320  
 2255 AGGCACAGCA CGATGCCAC CACCACAGT GTGCCGACA AGGCCGTGGC GGTAGGGTAT 1380  
 GTGTCTGAAA ATGAGCTCGG GGAGCGGGCT TGCACCGCTG ACGCATTGG AAGACTTAAG 1440  
 GCAGCGGCAG AAGAAGATGC AGGCAGCTGA GTTGTGTGT TCTGATAAGA GTCAGAGGTA 1500  
 ACTCCCGTTG CGGTGCTGTT AACGGTGGAG GGCAGTGTAG TCTGAGCAGT ACTCGTTGCT 1560  
 2260 GCCGCGCGCG CCACCAGACA TAATAGCTGA CAGACTAACA GACTGTTCTT TTCCATGGGT 1620  
 CTTTTCTGCA GTCACCGTCC TTAGATCTGC TGTGCCTTCT AGTTGCCAGC CATCTGTTGT 1680  
 TTGCCCCCTC CCCGTGCCTT CCTTGACCT GGAAGGTGCC ACTCCCACTG TCCTTTCCTA 1740  
 ATAAAATGAG GAAATTGCAT CGCATTGTCT GAGTAGGTGT CATTCTATTC TGGGGGGTGG 1800  
 2265 GGTGGGGCAG CACAGCAAGG GGGAGGATTG GGAAGACAAT AGCAGGCATG CTGGGGATGC 1860  
 GGTGGGCTCT ATGGGTACCC AGGTGCTGAA GAATTGACCC GGTTCTCCT GGGCCAGAAA 1920  
 GAAGCAGGCA CATCCCCTC TCTGTGACAC ACCCTGTCCA CGCCCCTGGT TCTTAGTTCC 1980  
 AGCCCCACTC ATAGGACT CATAGCTCAG GAGGGCTCCG CCTTCAATCC CACCCGCTAA 2040  
 2270 AGTACTTGGA GCGGTCTCTC CCTCCCTCAT CAGCCCACCA AACCAAACCT AGCCTCCAAG 2100  
 AGTGGGAAGA AATTAAGCA AGATAGGCTA TTAAGTGCAG AGGGAGAGAA AATGCCTCCA 2160  
 ACATGTGAGG AAGTAATGAG AGAAATCATA GAATTC 2196



# RO 117710 B1

Informație pentru secvența ID nr:12

(I) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 71 bp

(B) Tip: acid nucleic

(C) Împletire: simplă

(D) Topologie: liniară

2275

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: nu

2280

(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:12

GTCACCGTCC TTAGATCAAT TCCAGCAAAA GCAGGGTAGA TAATCACTCA  
CTGAGTGACA

TCAAATCAT G

60

2285

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:13

(I) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 117 bp

(B) Tip: acid nucleic

(C) Împletire: dublă

(D) Topologie: ambele

2290

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: nu

2295

(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:13

ACCGTCCTTA GATCAGCTT GCAAAGCAG GCAAACCATT TGAATGGATG  
TCAATCCGAC

60

CTTACTTTTC TTAAAAGTGC CAGCAAAA TGCTATAAGC ACAACTTTCC CTTATAC 117

2300

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:14

(I) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 136 bp

(B) Tip: acid nucleic

(C) Împletire: dublă

(D) Topologie: ambele

2305

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: nu

2310

(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:14

GTCACCGTCC TTAGATCAAT TCCAGCAAAA GCAGGGTGAC AAAAACATAA  
TGGATCCAAA 60CACTGTCA AGCTTTCAGG TAGATTGCTT TCTTTGGCAT

GTCCGCAAAC GAGTTGCAGA

120

CCAAGAATA GGTCAT

136

2315

**(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:15**

**(I) Caracteristicile secvenței:**

- (A) Lungime: 152 bp
- (B) Tip: acid nucleic
- (C) Împletire: dublă
- (D) Topologie: ambele

**(II) Tipul moleculei: cADN**

**(III) Ipotetică: nu**

**(IV) Antisens: nu**

**(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:15**

2320	TCTGCAGTCA	CCGTCCTTAG	ATCAGCTTGG	AGCAAAAGCA	GGGAAAATA	
	AAAACAACCA					60
2330	AAATGAAGGC	AAACCTACTG	GTCCTGTAA	GTGCACTTGC	AGCTGCAGAT	
	GCAGACACAA					120
	TATGTATAGG	CTACCTGCG	AACAATTCAA	CC		152

**(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:16**

**(I) Caracteristicile secvenței:**

- (A) Lungime: 162 bp
- (B) Tip: acid nucleic
- (C) Împletire: dublă
- (D) Topologie: dublă

**(II) Tipul moleculei: cADN**

**(III) Ipotetică: nu**

**(IV) Antisens: nu**

**(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:16**

2340	TTTTCTGCAG	TCACCGTCCT	TAGATCCCGA	ATTCCAGCAA	AAGCAGGTCA	
	ATTATATTCA					60
2345	ATATGGAAAG	AATAAAAGAA	CTAAGAAATC	TAATGTCGCA	GTCTGCCACC	
	CCGAGATAC					120
	TCACAAAAC	CACCGTGGAC	CATATGGCCA	TAATCAAGAA	GT	162

**(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:17**

**(I) Caracteristicile secvenței:**

- (A) Lungime: 122 bp
- (B) Tip: acid nucleic
- (C) Împletire: dublă
- (D) Topologie: ambele

**(II) Tipul moleculei: cADN**

**(III) Ipotetică: nu**

**(IV) Antisens: nu**

**(XI) Descrierea secvenței: Secv.ID Nr:17**

2360	GTCACCGTCC	TTAGATCTAC	CATGAGTCTT	CTAACCGAGG	TCCAAACGTA	
	CGTACTCTCT					60
	ATCATCCCGT	CAGGCCCCCT	CAAAGCCGAG	ATCGCACAGA	GACTTGAAGA	
	GTTGACGGAA	120				122
	GA					

# RO 117710 B1

## (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:18

### (I) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 4864 bp

(B) Tip: acid nucleic

(C) Împletire: dublă

(D) Topologie: ambele

2365

### (II) Tipul moleculei:cADN

(III) Ipotetică: nu

(IV) antisens: nu

2370

### (XI) Descrierea secvenței: Secv.ID Nr.18:

TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA 60  
CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG 120  
TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC 180  
ACCATATGCC GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAC AAAATACCGC ATCAGATTGG 240  
CTATTGGCCA TTGCATACGT TGTATCCATA TCATAATATG TACATTTATA TTGGCTCATG 300  
TCCAACATTA CCGCCATGTT GACATTGATT ATTGACTAGT TATTAATAGT AATCAATTAC 360  
GGGGTCATTA GTTCATAGCC CATATATGGA GTTCCGCGTT ACATAACTTA CGGTAAATGG 420  
CCCGCCTGGC TGACCGCCCA ACGACCCCG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC 480  
CATAGTAACG CCAATAGGGA CTTTCCATTG ACCTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC 540  
TGCCCCACTG GCAGTACATC AAGTGTATCA TATGCCAAGT ACGCCCCCTA TTGACGTCAA 600  
TGACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCATTATGC CCAGTACATG ACCTTATGGG ACTTTCCTAC 660  
TTGGCAGTAC ATCTACGTAT TAGTCATCGC TATTACCATG GTCATGCGGT TTTGGCAGTA 720  
CATCAATGGG CGTGGATAGC GGTTTGACTC ACGGGGATTT CCAAGTCTCC ACCCCATTGA 780  
CGTCAATGGG AGTTTGT TTTT GGCACCAAAA TCAACGGGAC TTTCCAAAAT GTCGTAACAA 840  
CTCCGCCCCA TTGACGCAAA TGGGCGGTAG GCGTGTACGG TGGGAGGTCT ATATAAGCAG 900  
AGCTCGTTTA GTGAACCGTC AGATCGCCTG GAGACGCCAT CCACGCTGTT TTGACCTCCA 960

2375

2380

2385

2390

2395

# RO 117710 B1

TAGAAGACAC CGGGACCGAT CCAGCCTCCG CGGCCGGGAA CGGTGCATTG CAACGCGGAT 1020  
 TCCCCGTGCC AAGAGTGACG TAAGTACCGC CTATAGAGTC TATAGGCCCA CCCCCTTGGC 1080  
 TTCTTATGCA TGCTATACTG TTTTGGCTT GGGGTCTATA CACCCCGCT TCCTCATGTT 1140  
 2400 ATAGGTGATG GTATAGCTTA GCCTATAGGT GTGGGTATT GACCATTATT GACCACTCCC 1200  
 CTATTGGTGA CGATACTTTC CATTACTAAT CCATAACATG GCTCTTTGCC ACAACTCTCT 1260  
 TTATTGGCTA TATGCCAATA CACTGTCCTT CAGAGACTGA CACGGACTCT GTATTTTTAC 1320  
 AGGATGGGGT CTCATTTATT ATTTACAAAT TCACATATAC AACACCACCG TCCCAGTGC 1380  
 2405 CCGCAGTTTT TATTAAACAT AACGTGGGAT CTCCACGCGA ATCTCGGGTA CGTGTTCGGG 1440  
 ACATGGGCTC TTCTCCGGTA GCGGCGGAGC TTCTACATCC GAGCCCTGCT CCCATGCCTC 1500  
 CAGCGACTCA TGGTCGCTCG GCAGTCCTT GTCCTAACA GTGGAGGCCA GACTTAGGCA 1560  
 CAGCACGATG CCCACCACCA CCAGTGTGCC GCACAAGGCC GTGGCGGTAG GCTATGTGTC 1620  
 2410 TGAAAATGAG CTCGGGGAGC GGGCTTGAC CGCTGACGCA TTTGGAAGAC TTAAGGCAGC 1680  
 GGCACAAGAA GATGCAGGCA GCTGAGTTGT TGTGTTCTGA TAAGAGTCAG AGGTA ACTCC 1740  
 CGTTGCGGTG CTGTTAACGG TGGAGGGCAG TGTAGTCTGA GCAGTACTCG TTGCTGCCGC 1800  
 GCGCGCCACC AGACATAATA GCTGACAGAC TAACAGACTG TTCCTTTCCA TGGGTCTTTT 1860  
 CTGCAGTCAC CGTCCTTAGA TCTGCTGTGC CTTCTAGTTG CCAGCCATCT GTTGTTTGCC 1920  
 2415 CCTCCCCGT GCCTTCCTTG ACCCTGGAAG GTGCCACTCC CACTGTCCTT TCCTAATAAA 1980  
 ATGAGGAAAT TGCATCGCAT TGTCTGAGTA GGTGTCATTC TATTCTGGGG GGTGGGGTGG 2040  
 GGCAGCACAG CAAGGGGGAG GATTGGGAAG ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG 2100  
 GCTCTATGGG TACCAGGTG CTGAAGAATT GACCCGGTTC CTCCTGGGCC AGAAAGAAGC 2160  
 2420 AGGCACATCC CCTTCTCTGT GACACACCCT GTCCACGCCC CTGGTTCTTA GTTCCAGCCC 2220  
 CACTCATAGG AACTCATAG CTCAGGAGGG CTCCGCCTTC AATCCCACCC GCTAAAGTAC 2280  
 TTGGAGCGGT CTCTCCCTCC CTCATCAGCC CACCAAACCA AACCTAGCCT CCAAGAGTGG 2340  
 GAAGAAATTA AAGCAAGATA GGCTATTAAG TGCAGAGGGA GAGAAAATGC CTCCAACATG 2400  
 2425 TGAGGAAGTA ATGAGAGAAA TCATAGAATT TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGA CTGCTG 2460  
 CGCTCGGTGCG TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTGA 2520  
 TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAGGCC 2580  
 AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG TTTTCCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG 2640  
 2430 CATCACAAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC 2700  
 CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG CTCCTCGTG CGCTCTCTG TTCCGACCCT GCCGTTACC 2760  
 GGATACCTGT CCGCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCAATG CTCACGCTGT 2820  
 AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTGTTGCG TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCC 2880  
 GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCAA CCCGGTAAGA 2940  
 2435 CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA 3000  
 GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA 3060  
 TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA 3120  
 TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG TTGCAAGCA GCAGATTACG 3180  
 2440 CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG 3240

# RO 117710 B1

TGGAACGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC 3300  
 TAGATCCTTT TAAATTAATA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAACT 3360  
 TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT 3420  
 CGTTCATCCA TAGTTGCCTG ACTCCGGGGG GGGGGGGCGC TGAGGTCTGC CTCGTGAAGA 3480 2445  
 AGGTGTTGCT GACTCATACC AGGCCTGAAT CGAAAACCTCA TCCAGCCAGA AAGTGAGGGA 3540  
 GCCACGGTTG ATGAGAGCTT TGTTGTAGGT GGACCAGTTG GTGATTTTGA ACTTTTGCTT 3600  
 TGCCACGGAA CGGTCTGCGT TGTCGGGAAG ATGCGTGATC TGATCCTTCA ACTCAGCAAA 3660  
 AGTTCGATTT ATTCAACAAA GCCGCCGTCC CGTCAAGTCA GCGTAATGCT CTGCCAGTGT 3720  
 TACAACCAAT TAACCAATTC TGATTAGGAA AACTCATCGA GCATCAAATG AACTGCAAT 3780 2450  
 TTATTCATAT CAGGATTATC AATACCATAT TTTTGAAAAA GCCGTTTCTG TAATGAAGGA 3840  
 GAAAACCTCAC CGAGGCAGTT CCATAGGATG GCAAGATCCT GGTATCGGTC TGCGATTCCG 3900  
 ACTCGTCCAA CATCAATACA ACCTATTAAT TTCCCCTCGT CAAAAATAAG GTTATCAAGT 3960  
 GAGAAATCAC CATGAGTGAC GACTGAATCC GGTGAGAATG GCAAAGCTT ATGCATTTCT 4020 2455  
 TTCCAGACTT GTTCAACAGG CCAGCCATTA CGCTCGTCAT CAAAATCACT CGCATCAACC 4080  
 AAACCGTTAT TCATTCGTGA TTGCGCCTGA GCGAGACGAA ATACGCGATC GCTGTTAAAA 4140  
 GGACAATTAC AAACAGGAAT CGAATCCAAC CGGCGCAGGA AACTGCCAG CGCATCAACA 4200  
 ATATTTTAC CTGAATCAGG ATATTCTTCT AATACCTGGA ATGCTGTTTT CCCGGGGATC 4260 2460  
 GCAGTGGTGA GTAACCATGC ATCATCAGGA GTACGGATAA AATGCTTGAT GGTGGAAGA 4320  
 GGCATAAATT CCGTCAGCCA GTTTAGTCTG ACCATCTCAT CTGTAACATC ATTGGCAACG 4380  
 CTACCTTTC CATGTTTCAG AAACAACCTCT GGCGCATCGG GCTTCCCATA CAATCGATAG 4440  
 ATTGTGCGAC CTGATTGCCC GACATTATCG CGAGCCATT TATACCCATA TAAATCAGCA 4500 2465  
 TCCATGTTGG AATTTAATCG CGGCCTCGAG CAAGACGTTT CCCGTTGAAT ATGGCTCATA 4560  
 ACACCCCTTG TATTACTGTT TATGTAAGCA GACAGTTTTA TTGTTTATGA TGATATATTT 4620  
 TTATCTTGTG CAATGTAACA TCAGAGATTT TGAGACACAA CGTGGCTTTC CCCCCCCCCC 4680  
 CATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT 4740 2470  
 TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCCGCGC ACATTTCCC GAAAAGTGCC ACCTGAGTC 4800  
 TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAATA GGCATATCAC GAGGCCCTTT 4860  
 CGTC

4864

Informație pentru secvența ID nr:19 2475

(I) Caracteristicile secvenței:

- (A) Lungime: 15 bp
- (B) Tip: acid nucleic
- (C) Împletire: simplă
- (D) Topologie: liniară 2480

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: nu

(XI) Descrierea secvenței: Secv.ID Nr.19

AGCAGAAGCA GAGCA 2485

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:20

(I) Caracteristicile secvenței:

- (A) Lungime: 119 bp
- (B) Tip: acid nucleic
- (C) Împletire: dublă
- (D) Topologie: ambele

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: nu

(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:20

	TCACCGTCCT	TAGATCAAGC	AGGGTTAATA	ATCACTCACT	GAGTGACATC	
	AAAATCATGG				60	
	CGTCCCAAGG	CACCAAACGG	TCTTATGAAC	AGATGGAAAC	TGATGGGGAA	
2500	CGCCAGATT				119	

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:21

(I) Caracteristicile secvenței:

- (A) Lungime: 67 bp
- (B) Tip: acid nucleic
- (C) Împletire: dublă
- (D) Topologie: ambele

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: da

(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:21

	GAGGGGCAAA	CAACAGATGG	CTGGCAACTA	GAAGGCACAG	CAGATATTTT	
	TTCCTTAATT				60	
	GTCGTAC				67	

2515

Informație pentru secvența ID nr:22

(I) Caracteristicile secvenței:

- (A) Lungime: 15 bp
- (B) Tip: acid nucleic
- (C) Împletire: simplă
- (D) Topologie: liniară

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: nu

(XI) Descrierea secvenței: Secv.ID Nr:22

AGCAGAACCA CGCAC

15

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:23

(I) Caracteristicile secvenței:

- (A) Lungime: 15 bp
- (B) Tip: acid nucleic
- (C) Împletire: simplă
- (D) Topologie: liniară

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

2535

# RO 117710 B1

(IV) Antisens: nu		
(XI) Descrierea secvenței: Secv ID Nr:23		
AGCAGAAGCA CAGCA		15
(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:24		2540
(I) Caracteristicile secvenței:		
(A) Lungime: 33 bp		
(B) Tip: acid nucleic		
(C) Împletire: dublă		
(D) Topologie: ambele		
(II) Tipul moleculei: cADN		2545
(III) Ipotetică: nu		
(IV) Antisens: nu		
(XI) Descrierea secvenței: Secv.ID Nr:24		
CCTTAGATCG GAAATAAAAA CAACCAAAT GAA	33	2550
(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:25		
(I) Caracteristicile secvenței:		
(A) Lungime: 36 bp		
(B) Tip: acid nucleic		
(C) Împletire: dublă		2555
(D) Topologie: ambele		
(II) Tipul moleculei: cADN		
(III) Ipotetică: nu		
(IV) Antisens: da		
(XI) Descrierea secvenței: Secv.ID Nr:25		2560
GCAGATCCTT ATATTTCTGA AATTCTGGTC TCAGAT	36	
(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:26		
(I) Caracteristicile secvenței:		
(A) Lungime: 102 bp		2565
(B) Tip: acid nucleic		
(C) Împletire: dublă		
(D) Topologie: ambele		
(II) Tipul moleculei: cADN		
(III) Ipotetică: nu		2570
(IV) Antisens: nu		
(XI) Descrierea secvenței: Secv.ID Nr:26:		
ACCGTCCTTA GATCCAGAAG CAGAGCATT TCTAATATCC ACAAATGAA		
GGCAATAATT	60	2575
GTACTACTCA TGGTAGTAAC ATCCAACGCA GATCGAATCT GC	102	
(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:27		
(I) Caracteristicile secvenței:		
(A) Lungime: 42 bp		
(B) Tip: acid nucleic		2580
(C) Împletire:dublă		
(D) Topologie: ambele		
(II) Tipul moleculei: cADN		

- 2585 (III) Ipotetică: nu  
(IV) Antisens: da  
(XI) Descrierea secvenței: Secv.ID Nr:27  
GGCACAGCAC ATCTTTCAAT AACGTTTCTT TGTAATGGTA AC 42
- 2590 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:28  
(I) Caracteristicile secvenței:  
(A) Lungime:23 bp  
(B) Tip: acid nucleic  
(C) Împletire: simplă  
2595 (D)Topologie: liniară  
(II) Tipul moleculei: cADN  
(III) Ipotetică: nu  
(IV) Antisens: nu  
(XI) Descrierea secvenței: Secv.ID Nr:28
- 2600 CTAACAGACT GTTCCTTCC ATG 23
- (2) Informație pentru secvența ID nr: 29  
(I) Caracteristicile secvenței:  
(A) Lungime: 18 bp  
2605 (B) Tip: acid nucleic  
(C)Împletire: simplă  
(D) Topologie: liniară  
(II) Tipul moleculei: cADN  
(III) Ipotetică: nu  
2610 (IV) Antisens: da  
(XI) Descrierea secvenței: Secv.ID Nr:29  
GGAGTGGCAC CTTCCAGG 18
- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:30  
2615 (I) Caracteristicile secvenței:  
(A) Lungime: 12 bp  
(B) Tip: acid nucleic  
(C) Împletire: simplă  
(D) Topologie: liniară  
2620 (II) Tipul moleculei: cADN  
(III) Ipotetică: nu  
(IV) Antisens: nu  
(XI) Descrierea secvenței: Secv.ID Nr:30:  
AGCAAAAGCA GG 12
- 2625 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:31  
(I) Caracteristicile secvenței:  
(A) Lungime: 14 bp  
2630 (B) Tip: acid nucleic  
(C)Împletire: simplă  
(D) Topologie: liniară  
(II) Tipul moleculei: cADN  
(III) Ipotetică: nu



# RO 117710 B1

(IV) Antisens: nu		
(XI) Descrierea secvenței: Secv.ID Nr:31		
AGCAGAAGCG GAGC	14	2635
(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:32		
(I) Caracteristicile secvenței:		
(A) Lungime: 35 bp		
(B) Tip: acid nucleic		
(C) Împletire: dublă		2640
(D) Topologie: liniară		
(II) Tipul moleculei: cADN		
(III) Ipotetică: nu		
(IV) Antisens: nu		
(XI) Descrierea secvenței: Secv.ID Nr:32		2645
CCACATGTCG ACCCGTAAA AGCCCGCGTT GCTGG	35	
(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:33		
(I) Caracteristicile secvenței:		
(A) Lungime: 33 bp		2650
(B) Tip: acid nucleic		
(C) Împletire: dublă		
(D) Topologie: liniară		
(II) Tipul moleculei: cADN		
(III) Ipotetică: nu		2655
(IV) Antisens: nu		
(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:33		
GGTACAACCA TGAAGACTAT CATTGCTTTG AGC	33	
(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:34		2660
(I) Caracteristicile secvenței:		
(A) Lungime: 37 bp		
(B) Tip: acid nucleic		
(C) Împletire: dublă		
(D) Topologie: liniară		2665
(II) Tipul moleculei: cADN		
(III) Ipotetică: nu		
(IV) Antisens: nu		
(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:34		
CCACATAGAT CTTCAAATGC AAATGTTGCA CCTAATG	37	2670
(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:35		
(I) Caracteristicile secvenței:		
(A) Lungime: 37 bp		
(B) Tip: acid nucleic		2675
(C) Împletire: dublă		
(D) Topologie: liniară		
(II) Tipul moleculei: cADN		
(III) Ipotetică: nu		
(IV) Antisens: nu		2680
(XI) Descrierea secvenței: Secv.ID Nr:35		
GGTACAACCA TGAAAGCAAA ACTACTAGTC CTGTTATG	38	

- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR: 36
- 2685 (I) Caracteristicile secvenței:  
 (A) Lungime: 32 bp  
 (B) Tip: acid nucleic  
 (C) Împletire: dublă  
 (D) Topologie: liniară
- 2690 (II) Tipul moleculei: cADN  
 (III) Ipotetică: nu  
 (IV) Antisens: nu  
 (XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:36  
 CCACATTCAG ATGCATATTC TACA CTGCAA AG 32
- 2695 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:37
- (I) Caracteristicile secvenței:  
 (A) Lungime: 36 bp  
 (B) Tip: acid nucleic  
 2700 (C) Împletire: dublă  
 (D) Topologie: liniară
- (II) Tipul moleculei: cADN  
 (III) Ipotetică: nu  
 (IV) Antisens: nu
- 2705 (XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:37  
 GGTACAACCA TGAAGGCAAT AATTGTACTA CTCATG 36
- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:38
- (I) Caracteristicile secvenței:  
 2710 (A) Lungime: 36 bp  
 (B) Tip: acid nucleic  
 (C) Împletire: dublă  
 (D) Topologie: liniară
- (II) Tipul moleculei: cADN  
 2715 (III) Ipotetică: nu  
 (IV) Antisens: nu  
 (XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:38  
 CCACATTTAT AGACAGATTT AGCAAGAAAC ATTGTC 36
- 2720 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:39
- (I) Caracteristicile secvenței:  
 (A) Lungime: 33 bp  
 (B) Tip: acid nucleic  
 (C) Împletire: dublă  
 2725 (D) Topologie: liniară
- (II) Tipul moleculei: cADN  
 (III) Ipotetică: nu  
 (IV) Antisens: nu  
 (XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:39  
 2730 GGTACAAGAT CTACCATGCT TCTAACCGAG GTC 33

# RO 117710 B1

- (2) Informație pentru secvența ID nr:40:
- (I) Caracteristicile secvenței:
- (A) Lungime: 36 bp
  - (B) Tip: acid nucleic
  - (C) Împletire: dublă
  - (D) Topologie: liniară
- (II) Tipul moleculei: cADN
- (III) Ipotetică: nu
- (IV) Antisens: nu
- (XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:40  
CCACATAGAT CTTCACTTGA ACCGTTGCAT CTGCAC
- 2735
- 36 2740
- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:41
- (I) Caracteristicile secvenței:
- (A) Lungime: 39 bp
  - (B) Tip: acid nucleic
  - (C) Împletire: dublă
  - (D) Topologie: liniară
- (II) Tipul moleculei: cADN
- (III) Ipotetică: nu
- (IV) Antisens: nu
- (XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:41  
GGTACAGGAT CCACCATGTC CAACATGGAT ATTGACGGC
- 2745
- 2750
- 39
- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:42
- (I) Caracteristicile secvenței:
- (A) Lungime: 39 bp
  - (B) Tip: acid nucleic
  - (C) Împletire: dublă
  - (D) Topologie: liniară
- (II) Tipul moleculei: cADN
- (III) Ipotetică: nu
- (IV) Antisens: nu
- (XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:42  
CCACATGGAT CCTTAATAAT CGAGGTCATC ATAATCCTC
- 2755
- 2760
- 39 2765
- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:43
- (I) Caracteristicile secvenței:
- (A) Lungime: 42 bp
  - (B) Tip: acid nucleic
  - (C) Împletire: dublă
  - (D) Topologie: liniară
- (II) Tipul moleculei: cADN
- (III) Ipotetică: nu
- (IV) Antisens: nu
- (XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:43  
GGTACAGGAT CCACCATGTC GCTGTTTGGG GACACAATTG CC
- 2770
- 2775

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:44

(I) Caracteristicile secvenței:

- 2780 (A) Lungime: 38 bp
- (B) Tip: acid nucleic
- (C) Împletire: dublă
- (D) Topologie: ambele
- (II) Tipul moleculei: cADN
- 2785 (III) Ipotetică: nu
- (IV) Antisens: nu

(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:44

CCACATGGAT CCTTATAGGT ATTTCTTCAC AAGAGCTG

38

2790 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:45

(I) Caracteristicile secvenței:

- (A) Lungime: 3553 bp
- (B) Tip: acid nucleic
- (C) Împletire: dublă
- 2795 (D) Topologie: ambele

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: nu

(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:45

2800 GATATTGGCT ATTGGCCATT GCATACGTTG TATCCATATC ATAATATGTA CATTATATATT 60  
 GGCTCATGTC CAACATTACC GCCATGTTGA CATTGATTAT TGACTAGTTA TTAATAGTAA 120  
 TCAATTACGG GGTCAATTAGT TCATAGCCCA TATATGGAGT TCCGCGTTAC ATAACCTACG 180  
 2805 GTAAATGGCC CGCCTGGCTG ACCGCCCAAG GACCCCGCC CATTGACGTC AATAATGACG 240  
 TATGTTCCCA TAGTAACGCC AATAGGGACT TTCCATTGAC GTCAATGGGT GGAGTATTTA 300  
 CGGTAAACTG CCCACTTGGC AGTACATCAA GTGTATCATA TGCCAAGTAC GCCCCCTATT 360  
 GACGTCAATG ACGGTAAATG GCCCGCCTGG CATTATGCCC AGTACATGAC CTTATGGGAC 420  
 2810 TTTCTACTT GGCAGTACAT CTACGTATTA GTCATCGCTA TTACCATGGT GATGCGGTTT 480  
 TGGCAGTACA TCAATGGGCG TGGATAGCGG TTTGACTCAC GGGGATTTCC AAGTCTCCAC 540  
 CCCATTGACG TCAATGGGAG TTTGTTTTGG CACCAAATC AACGGGACTT TCCAAAATGT 600  
 CGTAACAACT CCGCCCCATT GACGCAAATG GGCGGTAGGC GTGTACGGTG GGAGGTCTAT 660  
 2815 ATAAGCAGAG CTCGTTTAGT GAACCGTCAG ATCGCCTGGA GACGCCATCC ACGCTGTTTT 720  
 GACCTCCATA GAAGACACCG GGACCGATCC AGCCTCCGCG GCCGGAACG GTGCATTGGA 780  
 ACGCGGATTC CCCGTGCCAA GAGTGACGTA AGTACCGCCT ATAGAGTCTA TAGGCCACC 840  
 CCCTTGGCTT CTTATGCATG CTATACTGTT TTTGGCTTGG GGTCTATACA CCCCCGCTTC 900  
 2820 CTCATGTTAT AGGTGATGGT ATAGCTTAGC CTATAGGTGT GGGTTATTGA CCATTATTGA 960  
 CCACTCCCCT ATTGGTGACG AACTTTCCA TTAATAATCC ATAACATGGC TCTTTGCCAC 1020

# RO 117710 B1

AACTCTCTTT ATTGGCTATA TGCCAATACA CTGTCCTTCA GAGACTGACA CGGACTCTGT 1080  
 ATTTTTACAG GATGGGGTCT CATTATTAT TTACAAATTC ACATATACAA CACCACCGTC 1140  
 CCCAGTGCCC GCAGTTTTTA TTAACATGC TAACGTGGGA TCTCCACGCG AATCTCGGGT 1200  
 ACGTGTTCCG GACATGGGCT CTTCTCCGGT AGCGGCGGAG CTTCTACATC CGAGCCCTGC 1260 2825  
 TCCCATGCCT CCAGCGACTC ATGGTCCCTC GGCAGCTCCT TGCTCCTAAC AGTGGAGGCC 1320  
 AGACTTAGGC ACAGCACGAT GCCCACCACC ACCAGTGTGC CGCACAAGGC CGTGGCGGTA 1380  
 GGGTATGTGT CTGAAAATGA GCTCGGGGAG CGGGCTTGCA CCGCTGACGC ATTTGGAAGA 1440  
 CTTAAGGCAG CGGCAGAAGA AGATGCAGGC AGCTGAGTTG TTGTGTTCTG ATAAGAGTCA 1500 2830  
 GAGGTAATC CCGTTGCGGT GCTGTTAACG GTGGAGGGCA GTGTAGTCTG AGCAGTACTC 1560  
 GTTGCTGCCG CGCGCGCCAC CAGACATAAT AGCTGACAGA CTAACAGACT GTTCCTTTCC 1620  
 ATGGGTCTTT TCTGCAGTCA CCGTCCTTAG ATCTCGTGTG CTTTCTAGTT GCCAGCCATC 1680  
 TGTTGTTTGC CCCTCCCCCG TGCCTTCTT GACCCTGGAA GGTGCCACTC CCACTGTCTT 1740 2835  
 TTCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT AGGTGTCATT CTATTCTGGG 1800  
 GGGTGGGGTG GGGCAGCACA GCAAGGGGGA GGATTGGGAA GACAATAGCA GGCATGCTGG 1860  
 GGATGCGGTG GGCTCTATGG GTACGCCCGC AGCGGCCGTA CCCAGGTGCT GAAGAATTGA 1920  
 CCCGTTTCTT CGACCCGTA AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCC 1980 2840  
 CCTGACGAGC ATCACA AAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GGCGAAACCC GACAGGACTA 2040  
 TAAAGATACC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCTG 2100  
 CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTCTC CTTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCAATGC 2160  
 TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG GTCGTTGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC 2220  
 GAACCCCCCG TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAG 2280 2845  
 CCGGTAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG 2340  
 AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG AAGTGGTGGC CTAACACGG CTACACTAGC 2400  
 TGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT 2460  
 GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTTGCAAG 2520 2850  
 CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGTGA 2580  
 TCCCGTAATG CTCTGCCAGT GTTACAACCA ATTAACCAAT TCTGATTAGA AAAACTCATC 2640  
 GAGCATCAA TGAACTGCA ATTTATTCAT ATCAGGATTA TCAATACCAT ATTTTTGAAA 2700  
 AAGCCGTTCC TGTAATGAAG GAGAAAATC ACCGAGGCAG TTCCATAGGA TGGCAAGATC 2760 2855  
 CTGGTATCGG TCTGCGATTG CACTCGTCC AACATCAATA CAACCTATTA ATTTCCOCTC 2820  
 GTCAAAAATA AGGTTATCAA GTGAGAAATC ACCATGAGTG ACGACTGAAT CCGGTGAGAA 2880  
 TGGCAAAAGC TTATGCATTT CTTTCCAGAC TTGTTCAACA GGCCAGCCAT TACGCTCGTC 2940  
 ATCAAAATCA CTCGCATCAA CCAAACCGTT ATTCATTCGT GATTGCGCCT GAGCGAGACG 3000 2860  
 AAATACGCGA TCGCTGTAA AAGGACAATT ACAAACAGGA ATCGAATGCA ACCGGCGCAG 3060  
 GAACACTGCC AGCGCATCAA CAATATTCC ACCTGAATCA GGATATTCTT CTAATACCTG 3120  
 GAATGCTGTT TTCCCGGGGA TCGCAGTGGT GAGTAACCAT GCATCATCAG GAGTACGGAT 3180  
 AAAATGCTTG ATGGTCGGAA GAGGCATAAA TTCCGTCAGC CAGTTTGTG TGACCATCTC 3240 2865  
 ATCTGTAACA TCATTGGCAA CGCTACCTTT GCCATGTTT AGAAACAACT CTGGCGCATC 3300  
 GGGCTTCCA TACAATCGAT AGATTGTGCG ACCTGATTGC CCGACATTAT CGCGAGCCCA 3360  
 TTTATACCA TATAAATCAG CATCCATGTT GGAATTTAAT CGCGGCCTCG AGCAAGACGT 3420  
 TTCCCGTTGA ATATGGCTCA TAACACCCCT TGTATTACTG TTTATGTAAG CAGACAGTTT 3480  
 TATTGTTTAT GATGATATAT TTTTATCTTG TGCAATGTAA CATCAGAGAT TTTGAGACAC 3540 2870  
 AACGTGGCTT TCC

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:46

(I) Caracteristicile secvenței:

- 2875 (A) Lungime: 72 bp
- (B) Tip: acid nucleic
- (C) Împletire: dublă
- (D) Topologie: ambele

(II) Tipul moleculei: cADN

2880 (III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: nu

(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:46

TCACCGTCCT TAGATCGGTA CAACCATGAA GACTATCATT GCTTTGAGCT  
ACATTTTATG 60

2885 TCTGGTTTTTC GC 72

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:47

(I) Caracteristicile secvenței:

- 2890 (A) Lungime: 111 bp
- (B) Tip: acid nucleic
- (C) Împletire: dublă
- (D) Topologie: ambele

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

2895 (IV) Antisens: nu

(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:47

TCATGCTTTT TGCTTTGTGT TCTTTTGCTG GGGTTCATCA TGTGEGCCTG  
CCAAAAAGGC 60

2900 AACATTAGGT GCAACATTTG CATTGAAGA TCTATGTGGG ATCTGCTGTG C 111

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:48

(I) Caracteristicile secvenței:

- 2905 (A) Lungime: 63bp
- (B) Tip: acid nucleic
- (C) Împletire: dublă
- (D) Topologie: ambele

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: nu

2910 (XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:48

TTAGATCGGA ACATGAAAGC AAAACTACTA GTCCTGTTAT GTGCATTTAC  
AGCTACATAT 60

GCA 63

2915 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:49

(I) Caracteristicile secvenței:

- 2920 (A) Lungime: 63 bp
- (B) Tip: acid nucleic
- (C) Împletire: dublă
- (D) Topologie: ambele

(II) Tipul moleculei: cADN

# RO 117710 B1

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: nu

(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:49

CTGGGCTTT TGGTGTCCCT GGGGGCAATC AGCTTCTGGA TGTGTTCTAA 2925  
 TGGGTCTTTG 60  
 CAGTGTAGAA TATGCATCTG AATGTGGGAT GTGCTGTGCC TT 102

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:50

(I) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 108 bp 2930

(B) Tip: acid nucleic

(C) Împletire: dublă

(D) Topologie: ambele

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu 2935

(IV) Antisens: nu

(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:50

CCTTAGATCG GTACAACCAT GAAGGCAATA ATTGTACTAC TCATGGTAGT  
 AACATCCAAC 60 2940  
 GCAGATCGAA TCTGCACTGG GATAACATC TCAAACCTCAC CTCATGTG 108

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:51

(I) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 102 bp 2945

(B) Tip: acid nucleic

(C) Împletire: dublă

(D) Topologie: ambele

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: nu 2950

(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:51

TTGGCTGTAA CATTGATGAT AGCTATTTTT ATTGTTTATA TGGTCTCCAG  
 AGACAATGTT 60  
 TCTTGCTCCA TCTGTCTATA AATGTGGGAT CTGCTGTGCC TT 102 2955

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:52

(I) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 84 bp 2960

(B) Tip: acid nucleic

(C) Împletire: dublă

(D) Topologie: ambele

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: nu 2965

(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:52

GTCCTTAGAT CCACCATGGC GTCCCAAGGC ACCAAACGGT CTTATGAACA  
 GATGGAAACT 60  
 GATGGGGAAC GCCAGAATGC AACT 84

# RO 117710 B1

2970 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:53

(I) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 108 bp

(B) Tip: acid nucleic

(C) Împletire: dublă

2975 (D) Topologie: ambele

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: nu

(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:53

2980 GAAAAGGCAA CGAACCCGAT CGTGCCCCCT TTTGACATGA GTAATGAAGG  
ATCTTATTTTC 60

TTCGGAGACA ATGCAGAAGA GTACGACAAT TAAGGATCTG CTGTGCCT 108

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:54

2985 (I) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 132 bp

(B) Tip: acid nucleic

(C) Împletire: dublă

(D) Topologie: ambele

2990 (II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: nu

(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:54

2995 CTTAGATCCA GATCTACCAT GAGTCTTCTA ACCGAGGTCG AAACGTATGT  
TCTCTCTATC 60

GTTCCATCAG GCCCCCCTCAA AGCCGAAATC GCGCAGAGAC TTGAAGATCT  
CTTTGCTGGG 120

AAAAACACAG AT 132

3000 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:55

(I) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 129 bp

(B) Tip: acid nucleic

(C) Împletire: dublă

3005 (D) Topologie: ambele

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: nu

(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:55

3010 GGGACTCATC CTAGCTCCAG TACTGGTCTA AAAGATGATC TTCTTGAAAA  
TTTGACAGACC 60

TATCAGAAAC GAATGGGGGT GCAGATGCAA CGGTTCAAGT GAAGATCTAT  
GTGGGATCTG 120

CTGTGCCTT 129



# RO 117710 B1

- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:56 3015
- (I) Caracteristicile secvenței:
- (A) Lungime: 81 bp
  - (B) Tip: acid nucleic
  - (C) Împletire: dublă
  - (D) Topologie: ambele
- (II) Tipul moleculei: cADN 3020
- (III) Ipotetică: nu
- (IV) Antisens: nu
- (XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:56
- CTTAGATCCA CCATGTCCAA CATGGATATT GACGGTATCA AACTGGGAC 3025
- AATGACAAA 60
- ACACCGGAAG AAATAACTTC T 81
- 
- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:57 3030
- (I) Caracteristicile secvenței:
- (A) Lungime: 96 bp
  - (B) Tip: acid nucleic
  - (C) Împletire: dublă
  - (D) Topologie: ambele
- (II) Tipul moleculei: cADn 3035
- (III) Ipotetică: nu
- (IV) Antisens: nu
- (XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:57
- GTTGAAATTC CAATTAAGCA GACCATCCCC AATTTCTTCT TTGGGAGGGA
- CACAGCAGAG 60
- GATTATGATG ACCTCGATTA TTAAGGATCT GCTGTG 3040
- 96
- 
- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:58 3045
- (I) Caracteristicile secvenței:
- (A) Lungime: 96 bp
  - (B) Tip: acid nucleic
  - (C) Împletire: dublă
  - (D) Topologie: ambele
- (II) Tipul moleculei: cADN 3050
- (III) Ipotetică: nu
- (IV) Antisens: nu
- (XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:58
- CTTAGATCCA CCATGTGCT GTTTGGAGAC ACAATTGCCT ACCTGCTTTC
- ATTGACAGAA 60
- GATGGAGAAG GCAAAGCAGA ACTAGCAGAA AAATTA 3055
- 96
- 
- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:59 3060
- (I) Caracteristicile secvenței:
- (A) Lungime: 123 bp
  - (B) Tip: acid nucleic
  - (C) Împletire: dublă
  - (D) Topologie: ambele

- (II) Tipul moleculei: cADN  
 (III) Ipotetică: nu  
 3065 (IV) Antisens: nu  
 (XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:59  
 AGATCTCTTG GGGCAAGTCA AGAGAATGGG GAAGGAATTG CAAAGGATGT  
 GATGGAAGTGG 60  
 CTAAAGCAGA GCTCTATGGG AAATTCAGCT CTTGTGAAGA AATACCTATA  
 3070 AGGATCTGCT 120  
 GTG 123
- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:60  
 (I) Caracteristicile secvenței:  
 3075 (A) Lungime: 33 bp  
 (B) Tip: acid nucleic  
 (C) Împletire: dublă  
 (D) Topologie: ambele
- (II) Tipul moleculei: cADN  
 3080 (III) Ipotetică: nu  
 (IV) Antisens: nu  
 (XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:60  
 GGTACAAATA TTGGCTATTG GCCATTGCAT 33
- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:61  
 (I) Caracteristicile secvenței:  
 (A) Lungime: 38 bp  
 (B) Tip: acid nucleic  
 (C) Împletire: dublă  
 3090 (D) Topologie: ambele
- (II) Tipul moleculei: cADN  
 (III) Ipotetică: nu  
 (IV) Antisens: nu  
 (XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:61  
 3095 CCACATCTCG AGGAACCGGG TCAATTCTTC AGCACC 36
- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:62  
 (I) Caracteristicile secvenței:  
 (A) Lungime: 38 bp  
 3100 (B) Tip: acid nucleic  
 (C) Împletire: dublă  
 (D) Topologie: ambele
- (II) Tipul moleculei: cADN  
 (III) Ipotetică: nu  
 3105 (IV) Antisens: nu  
 (XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:62  
 GGTACAGATA TCGGAAAGCC ACGTTGTGTC TCAAAATC 38

# RO 117710 B1

## (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:63

### (I) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 37 bp

(B) Tip: acid nucleic

(C) Împletire: dublă

(D) Topologie: ambele

3110

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: nu

3115

(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:63

CCACATGGAT CCGTAAGCT CTCACAGTGT TACAACC

37

## (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR:64

### (I) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 39 bp

(B) Tip: acid nucleic

(C) Topologie: ambele

3120

(II) Tipul moleculei: cADN

(III) Ipotetică: nu

(IV) Antisens: nu

3125

(XI) Descrierea secvenței: SECV.ID NR:64

GGTACATGAT CACGTAGAAA AGATCAAAGG ATCTTCTTG

39

3130

## Revendicări

1. Construct ADN capabil să inducă un răspuns imun față de virusul influenza, caracterizat prin aceea că este constituită dintr-un vector de expresie selectat din grupul constând din pnESV, V1, V1J, V1JR, V1Jns și V1Jneo și un terminator de transcripție legat operativ la o secvență nucleotidică care codifică o proteină a virusului influenza.

3135

2. Construct ADN, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că vectorul de expresie este ales din grupul constând: pnRSV-PR-NP, V1-PR-NP, V1Jns-NJ-NP, cu dimensiunea de 6,42 Kb, al cărui capăt terminal 5' este

GTCCTTAGAT CCACCATGGC GTCCCAAGGC ACCAAACGGT CTTATGAACA

3140

GATGGAAACT GATGGGGAAC GCCAGATGC AACT (Secv.ID Nr.52), iar capătul terminal 3' este

GAAAAGGCAA CGAACCCGAT CGTGCCCTCTTTTGACATGA GTAATGAAGG  
ATCTTATTTT TTCGAGACA ATGCAGAAGA GTACGACAAT TAAGCAAT TAAGGATCTG  
CTGTGCCT (SECV.ID NR.53),

3145

V1Jns-PA-NP (B/Panama/45/90), cu dimensiunea de 6,54 Kb, al cărui capăt terminal 5' este  
CTTAGATCCA CCATGTCCAA CATGGATATT GACGGTATCA AACTGGGAC  
AATTGACAAA ACACCGGAAG AAATAACTTC T (SECV.ID NR.56)  
iar capătul terminal 3' este

GTTGAAATTC CAATTAAGCA GACCATCCCC AATTTCTTCT TTGGGAGGGA  
CACAGCAGAG GATTATGATG ACCTCGATTA TTAAGGATCT GCTGTG (SECV.ID NR  
57), V1Jneo-BJ-NP al cărui capăt terminal 5' este

3150

TCACCGTCCT TAGATCAAGC AGGGTTAATA ATCACTCACT GAGTGACATC  
AAAATCATGG CGTCCCAAGG CACCAAACCG TCTTATGAAC AGATGGAAAC  
TGATGGGGAA CGCCAGATT (SECV.ID NR 20),

3155

iar capătul terminal 3' este

GAGGGCAAA CAACAGATGG CTGGCAACTA GAAGGCACAG CAGATATTTT  
TTCCTTAATT GTCGAC

V1Jneo-TX-NP

3160 al cărui capăt terminal 5' este

CCTTAGATCG GAAATAAAAA CAACCAAAT GAA

iar capătul terminal 3' este

GCAGATCCTT ATATTTCTTGA AATTCTGGTC TCAGAT (SECV.ID NR 25)

3165 3. Construct ADN, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că se folosește ca vaccin.**

4. Construct ADN, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că se folosește într-o metodă de inducere a răspunsului imun specific la virusul influenza, care cuprinde următoarele etape:**

3170 a) izolarea genei influenza;  
b) legarea genei influenza în mod operativ de secvențele reglatoare din constructul ADN, astfel, încât gena este legată operativ la secvențele de control care la introducerea (direct) într-un țesut viu, direcționează inițierea transcripției și ulterior, translația genei;  
c) introducerea constructului ADN care conține gena influenza într-un țesut viu și opțional,

3175 d) adăugarea unui construct adițional care conține gena influenza.

5. Compoziție imunogenă, **caracterizată prin aceea că, aceasta cuprinde constructul ADN, definit în revendicarea 1, împreună cu o soluție acceptabilă farmaceutic, cu lipozomi sau cu un adjuvant acceptabil și, opțional, cu agenți care facilitează transfecția.**

Președintele comisiei de examinare: **ing. Marin Elena**

Examinator: **ing. Pușcaș Corina**

# RO 117710 B1

(51) Int.Cl.<sup>7</sup> C 12 N 15/44;  
A 61 K 48/00;

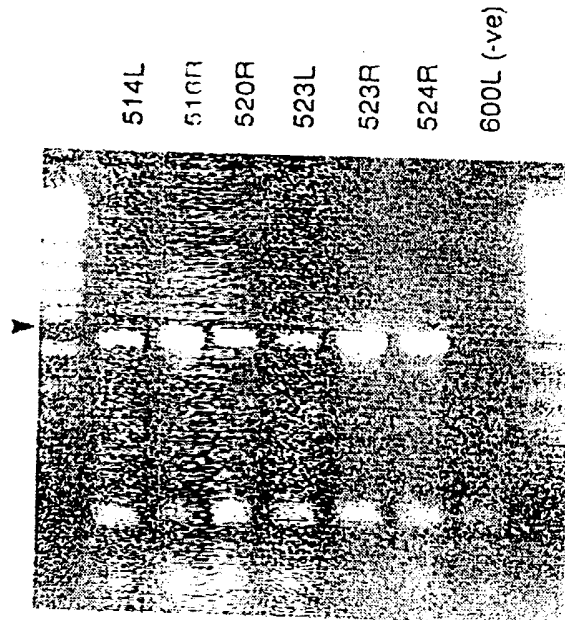


Fig. 1

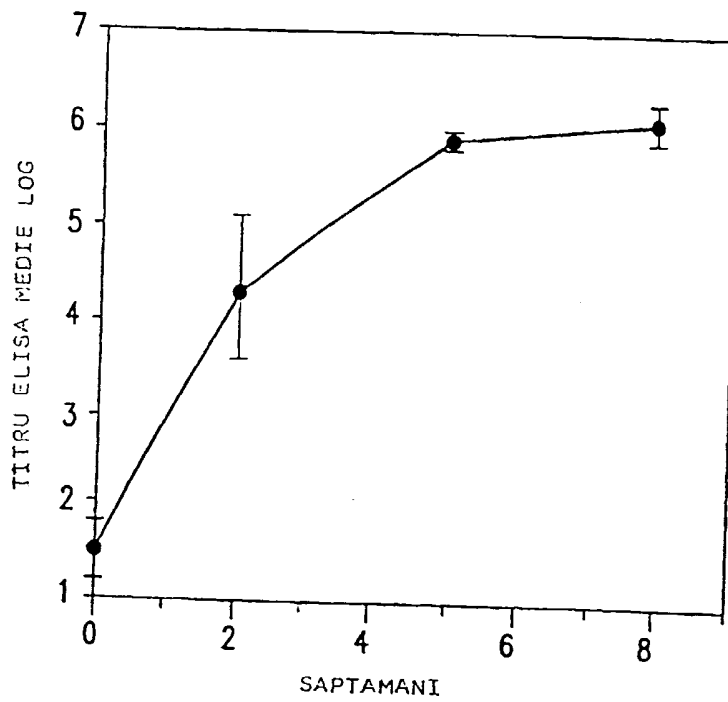


Fig. 2

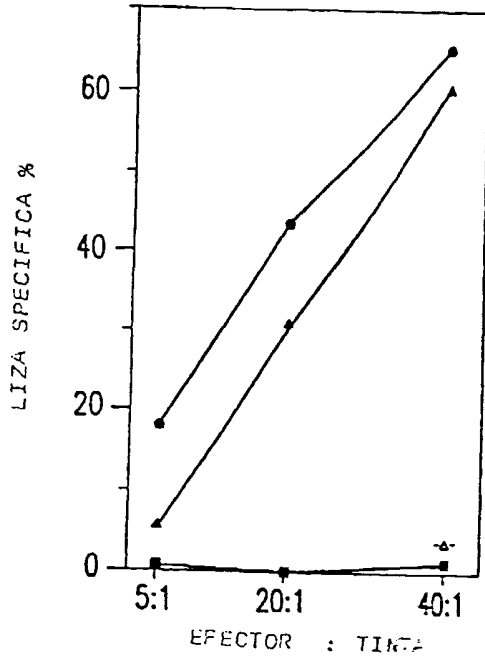


Fig. 3A

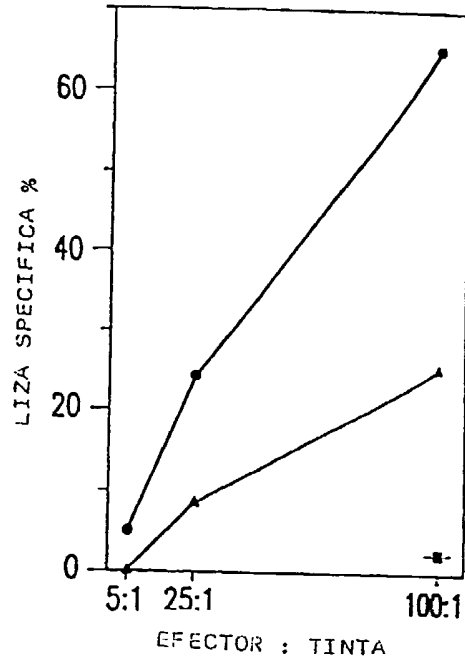


Fig. 3C

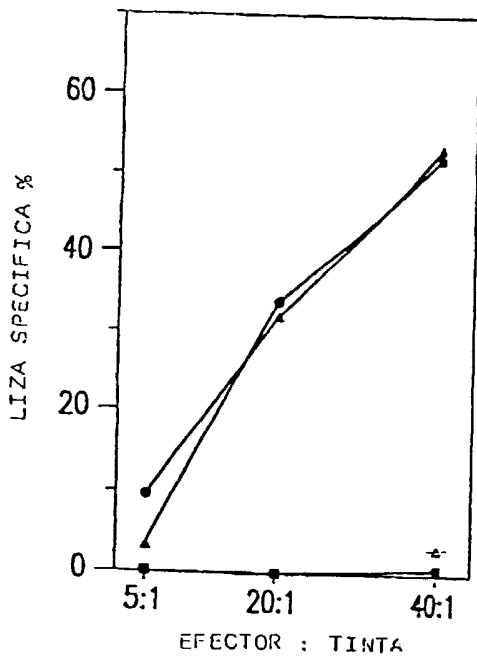


Fig. 3B

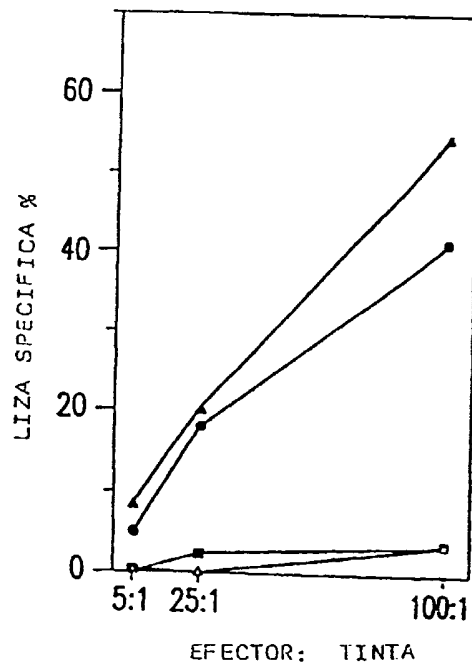


Fig. 3D

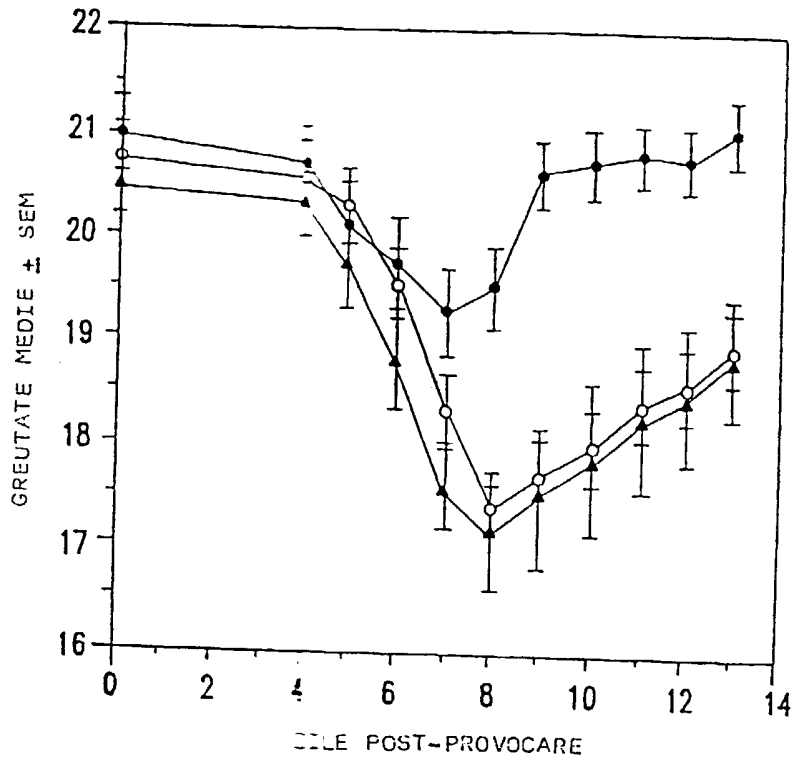


Fig. 4

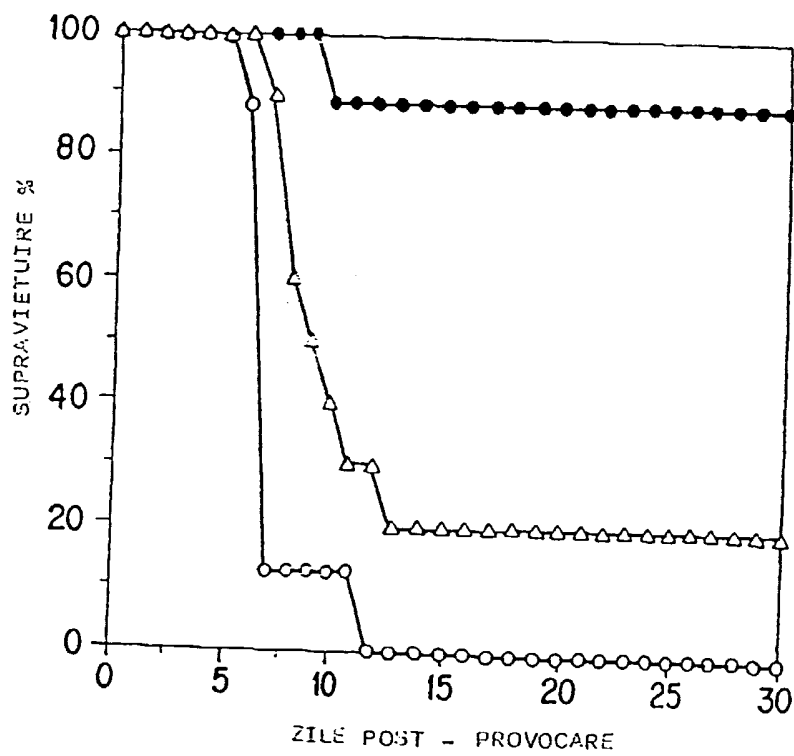


Fig. 5

VII.Sequence, SEQ. ID:10:

1 TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCC  
51 GAGACGGTCA CAGCTTGCTT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCC  
101 TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTAACTATG  
151 CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC ACCATATGCG GTGTGAAATA  
201 CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGATTGG CTATTGGCCA  
251 TTGCATACGT TGTATCCATA TCATAATATG TACATTTATA TTGGCTCATG  
301 TCCAACATTA CCGCCATGTT GACATTGATT ATTGACTAGT TATTAATAGT  
351 AATCAATTAC GGGGTCAATA GTTCATAGCC CATATATGGA GTTCCGCGT  
401 ACATAACTTA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC TGACCGCCCA ACGACCCCCG  
451 CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA  
501 CTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCCACTG  
551 GCAGTACATC AAGTGTATCA TATGCCAAGT ACGCCCCCTA TTGACGTCAA  
601 TGACGGTAAA TGGCCCCGCT GGCATTATGC CCAGTACATG ACCTTATGGG  
651 ACTTTCCTAC TTGGCAGTAC ATCTACGTAT TAGTCATCGC TATTACCATG  
701 GTGATGCGGT TTTGGCAGTA CATCAATGGG CGTGGATAGC GGTTTGACTC  
751 ACGGGGATTT CCAAGTCTCC ACCCCATTGA CGTCAATGGG AGTTTGTTF  
801 GGCACCAAAA TCAACGGGAC TTTCCAAAAT GTCGTAACAA CTCCGCCCCA  
851 TTGACGCAAA TGGGCGGTAG GCGTGTACGG TGGGAGGTCT ATATAAGCAG  
901 AGCTCGTTTA GTGAACCGTC AGATCGCCTG GAGACGCCAT CCACGCTGTT  
951 TTGACCTCCA TAGAAGACAC CGGGACCGAT CCAGCCTCCG CGGCCGGGAA  
1001 CGGTGCATTG GAACGCGGAT TCCCCGTGCC AAGAGTGACG TAAGTACCGC  
1051 CTATAGAGTC TATAGGCCCA CCCCCTTGGC TTCTTATGCA TGCTATACTG  
1101 TTTTGGCTT GGGGTCTATA CACCCCCGCT TCCTCATGTT ATAGGTGATG  
1151 GTATAGCTTA GCCTATAGGT GTGGGTTATT GACCATTATT GACCACTCCC  
1201 CTATTGGTGA CGATACTTTC CATTACTAAT CCATAACATG GCTCTTTGCC

Fig. 6A



# RO 117710 B1

(51) Int.Cl.<sup>7</sup> C 12 N 15/44;  
A 61 K 48/00;

1251 ACAACTCTCT TTATTGGCTA TATGCCAATA CACTGTCCTT CAGAGACTGA  
1301 CACGGACTCT GTATTTTAC AGGATGGGGT CTCATTTATT ATTTACAAAT  
1351 TCACATATAC AACACCACCG TCCCCAGTGC CCGCAGTTTT TATTAACAAT  
1401 AACGTGGGAT CTCCACGGGA ATCTCGGGTA CGTGTTCGGG ACATGGGCTC  
1451 TTCTCCGGTA GCGGCGGAGC TTCTACATCC GAGCCCTGCT CCCATGCCTC  
1501 CAGCGACTCA TGGTCGCTCG GCAGCTCCTT GCTCCTAACA GTGGAGGCCA  
1551 GACTTAGGCA CAGCAGATG CCCACCACCA CCAGTGTGCC GCACAAGGCC  
1601 GTGGCGGTAG GGTATGTGTC TGAAAATGAG CTCGGGGAGC GGGCTTGCAAC  
1651 CGCTGACCGA TTTGGAAGAC TTAAGGCAGC GGCAGAAGAA GATGCAGGCA  
1701 GCTGAGTTGT TGTGTTCTGA TAAGAGTCAG AGGTAECTCC CGTTGCGGTG  
1751 CTGTAAACGG TGGAGGGCAG TGTAGTCTGA GCAGTACTCG TTGCTGCCGC  
1801 GCGCGCCACC AGACATAATA GCTGACAGAC TAACAGACTG TTCCTTTCCA  
1851 TGGGTCTTTT CTGCAGTCAC CGTCCTTAG ATCTGCTGTG CCTTCTAGTT  
1901 GCCAGCCATC TGTTGTTTGC CCCTCCCCCG TGCCTTCCTT GACCCTGGAA  
1951 GGTGCCACTC CCACTGTCTT TTCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA  
2001 TTGTCTGAGT AGGTGTCAAT CTATTCTGGG GGGTGGGGTG GGCAGCACA  
2051 GCAAGGGGGA GGATTGGGAA GACAATAGCA GGCATGCTGG GGATGCGGTG  
2101 GGCTCTATGG GTACCCAGGT GCTGAAGAAT TGACCCGGTT CCTCCTGGGC  
2151 CAGAAAGAAG CAGGCACATC CCCTTCTCTG TGACACACCC TGTCACGCC  
2201 CCTGGTTCTT AGTTCCAGCC CCACTCATAG GACTCATA GCTCAGGAGG  
2251 GCTCCGCCTT CAATCCCACC CGCTAAAGTA CTTGGAGCGG TCTCTCCCTC  
2301 CCTCATCAGC CCACCAAACC AAACCTAGCC TCCAAGAGTG GGAAGAAATT  
2351 AAAGCAAGAT AGGCTATTAA GTGCAGAGGG AGAGAAAATG CCTCCAACAT  
2401 GTGAGGAAGT AATGAGAGAA ATCATAGAAT TTCTTCGCT TCCTCGCTCA  
2451 CTGACTCGCT GCGCTCGGTC GTTCGGCTGC GCGAGCGGT ATCAGCTCAC

Fig. 6B

2501 TCAAAGGCGG TAATACGGT ATCCACAGAA TCAGGGGATA ACGCAGGAAA  
2551 GAACATGTGA GCAAAAAGGCC AGCAAAAAGGC CAGGAACCGT AAAAAAGGCCG  
2601 CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC CCCCTGACGA GCATCACAAA  
2651 AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC CCGACAGGAC TATAAAGATA  
2701 CCAGGCGTTT CCCCCTGAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC  
2751 TGCCGCTTAC CGGATACCTG TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGCCG  
2801 CTTTCTCAAT GCTCACGCTG TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTCGTTCG  
2851 CTCCAAGCTG GGCTGTGTC ACGAACCCCC CGTTCAGCCC GACCGCTCCG  
2901 CCTTATCCGG TAACTATCGT CTGAGTCCA ACCCGGTAAG ACACGACTTA  
2951 TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATCT  
3001 AGGCGGTGCT ACAGAGTCT TGAAGTGGTG GCCTAACTAC GGCTACACTA  
3051 GAAGGACAGT ATTTGGTATC TCGCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA  
3101 AAAAGAGTTG GTAGCTCTG ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCCG  
3151 TGGTTTTTTTT GTTTGCAAGC AGCAGATTAC GCGCAGAAAA AAAGGATCTC  
3201 AAGAAGATCC TTTGATCTT TCTACGGGGT CTGACGCTCA GTGGAACGAA  
3251 AACTCACGTT AAGGGATTTT GGTCA TGAGA TTATCAAAAA GGATCTTCAC  
3301 CTAGATCCTT TAAATTA AAATGAAGTTT TAAATCAATC TAAAGTATAT  
3351 ATGAGTAAAC TTGGTCTGAC AGTTACCAAT GCTTAATCAG TGAGGCACCT  
3401 ATCTCAGCGA TCTGTCTATT TCGTTCATCC ATAGTTGCCT GACTCCCCGT  
3451 CGTGTAGATA ACTACGATAC GGGAGGGCTT ACCATCTGGC CCCAGTGCTG  
3501 CAATGATACC GCGAGACCCA CGCTCACCGG CTCCAGATTT ATCAGCAATA  
3551 AACCAGCCAG CCGGAAGGGC CGAGCGCAGA AGTGGTCTG CAACTTTATC  
3601 CGCCTCCATC CAGTCTATTA ATTGTTGCCG GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT  
3651 CGCCAGTTAA TAGTTTGGC AACGTTGTTG CCATTGCTAC AGGCATCGTG  
3701 GTGTCACGCT CGTCGTTTGG TATGGCTTCA TTCAGCTCCG GTTCCCAACG

Fig. 6C

3751 ATCAAGGCCGA GTTACATGAT CCCCATGTT GTGCAAAAAA GCGGTTAGCT  
3801 CCTTCGGTCC TCCGATCGT GTCAGAAGTA AGTTGGCCGC AGTGTTATCA  
3851 CTCATGGTTA TGGCAGCACT GCATAATTCT CTTACTGTCA TGCCATCCGT  
3901 AAGATGCTTT TCTGTGACTG GTGAGTACTC AACCAAGTCA TTCTGAGAAT  
3951 AGTGTATGCG GCGACCGAGT TGCTCTTGCC CGGCGTCAAT ACGGGATAAT  
4001 ACCGCGCCAC ATAGCAGAAC TTTAAAAGTG CTCATCATTG GAAAACGTTG  
4051 TTCGGGGCGA AAACCTCTCA GGATCTTACC GCTGTTGAGA TCCAGTTCGA  
4101 TGTAACCCAC TCGTGCACCC AACTGATCTT CAGCATCTTT TACTTTCACC  
4151 AGCGTTTCTG GGTGAGCAA AACAGGAAGG CAAAATGCCG CAAAAAGGG  
4201 AATAAGGGCG ACACGGAAAT GTTGAATACT CATACTCTTC CTTTTCAAT  
4251 ATTATTGAAG CATTTATCAG GGTTATTGTC TCATGAGCGG ATACATATT  
4301 GAATGTATTT AGAAAAATAA ACAAATAGGG GTTCCGCGCA CATTCCCCG  
4351 AAAAGTGCCA CCTGACGTCT AAGAAACCAT TATTATCATG ACATTAACCT  
4401 ATAAAAATAG GCGTATCAG AGGCCCTTTC GTC

Fig. 6D

V1]neo Sequence, SEQ. ID:18:

1 TCGCGCGTTT CCGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCC  
51 GAGACGGTCA CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCC  
101 TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG  
151 CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC ACCATATGCG GTGTGAAATA  
201 CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGATTGG GTATTGGCCA  
251 TTGCATACGT TGTATCCATA TCATAATATG TACATTTATA TTGGCTCATG  
301 TCCAACATTA CCGCCATGTT GACATTGATT ATTGACTAGT TATTAATAGT  
351 AATCAATTAC GGGGTCATTA GTTCATAGCC CATATATGGA GTTCCGCGTT  
401 ACATAACTTA CCGTAAATGG CCCGCCTGGC TGACCGCCCA ACGACCCCCG  
451 CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA  
501 CTTTCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCACTTG  
551 GCAGTACATC AAGTGTATCA TATGCCAAGT ACGCCCCCTA TTGACGTCAA  
601 TGACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCATTATGC CCAGTACATG ACCTTATGGG  
651 ACTTTCCTAC TTGGCAGTAC ATCTACGTAT TAGTCATCGC TATTACCATG  
701 GTGATGCGGT TTTGGCAGTA CATCAATGGG CGTGGATAGC GGTTTGACTC  
751 ACGGGGATTT CCAAGTCTCC ACCCCATTGA CGTCAATGGG AGTTTGTTTT  
801 GGCACCAAAA TCAACGGGAC TTTCCAAAAT GTCGTAACAA CTCCGCCCCA  
851 TTGACGCAA TGGGCGGTAG GCGTGACGG TGGGAGGTCT ATATAAGCAG  
901 AGCTCGTTTA GTGAACCGTC AGATCGCCTG GAGACGCCAT CCACGCTGTT  
951 TTGACCTCCA TAGAAGACAC CGGGACCGAT CCAGCCTCCG CGGCCGGGAA  
1001 CCGTGCAATTG GAACGCGGAT TCCCCGTGCC AAGAGTGACG TAAGTACCGC  
1051 CTATAGAGTC TATAGGCCCA CCCCCTTGGC TTCTTATGCA TGCTATACTG  
1101 TTTTTGGCTT GGGGTCTATA CACCCCGCT TCCTCATGTT ATAGGTGATG  
1151 GTATAGCTTA GCCTATAGGT GTGGGTTATT GACCATTATT GACCACTCCC

Fig. 7A

# RO 117710 B1

(51) Int.Cl.<sup>7</sup> C 12 N 15/44;  
A 61 K 48/00;

1201 CTATTGGTGA CGATACTTTC CATTACTAAT CCATAACATG GCTCTTTGCC  
1251 ACAACTCTCT TTATTGGCTA TATGCCAATA CACTGTCCTT CAGAGACTGA  
1301 CACGGACTCT GTATTTTAC AGGATGGGGT CTCATTTATT ATTTACAAAT  
1351 TCACATATAC AACACCACCG TCCCAGTGC CCGCAGTTTT TATTAAACAT  
1401 AACGTGGGAT CTCCACGCGA ATCTCGGGTA CGTGTTCCGG ACATGGGCTC  
1451 TTCTCCGGTA GCGGCGGAGC TTCTACATCC GAGCCCTGCT CCCATGCCTC  
1501 CAGCGACTCA TGGTCGCTCG GCAGCTCCTT GCTCCTAACA GTGGAGGCCA  
1551 GACTTAGGCA CAGCACGATG CCCACCACCA CCAGTGTGCC GCACAAGGCC  
1601 GTGGCGGTAG GGTATGTGTG TGAAAATGAG CTCGGGGAGC GGGCTTGAC  
1651 CGCTGACGCA TTTGGAAGAC TTAAGGCAGC GGCAGAAGAA GATGCAGGCA  
1701 GCTGAGTTGT TGTGTTCTGA TAAGAGTCAG AGGTA ACTCC CGTTGCGGTG  
1751 CTGTTAACGG TGGAGGGCAG TG TAGTCTGA GCAGTACTCG TTGCTGCCGC  
1801 GCGCGCCACC AGACATAATA GCTGACAGAC TAACAGACTG TTCCTTTCCA  
1851 TGGGTCTTTT CTGCAGTCAC CGTCCTTAG ATCTGCTGTG CCTTCTAGTT  
1901 GCCAGCCATC TGTTGTTTGC CCCTCCCCCG TGCCTTCCTT GACCCTGGAA  
1951 GGTGCCACTC CCACTGTCCT TTCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA  
2001 TTGTCTGAGT AGGTGTCATT CTATTCTGGG GGGTGGGGTG GGGCAGCACA  
2051 GCAAGGGGGA GGATTGGGAA GACAATAGCA GGCATGCTGG GGATGCGGTG  
2101 GGCTCTATGG GTACCCAGGT GCTGAAGAAT TGACCCGGTT CCTCCTGGGC  
2151 CAGAAAGAAG CAGGCACATC CCCTTCTCTG TGACACACCC TGTCCACGCC  
2201 CCTGGTTCTT AGTTCCAGCC CCACTCATAG GACACTCATA GCTCAGGAGG  
2251 GCTCCGCCTT CAATCCCACC CGCTAAAGTA CTTGGAGCGG TCTCTCCCTC  
2301 CCTCATCAGC CCACCAAACC AAACCTAGCC TCCAAGAGTG GGAAGAAATT  
2351 AAAGCAAGAT AGGCTATTAA GTGCAGAGGG AGAGAAAATG CCTCCAACAT  
2401 GTGAGGAAGT AATGAGAGAA ATCATAGAAT TTCTTCCGCT TCCTCGCTCA

Fig. 7B

2451 CTGACTCGCT GCGCTCGGTC GTTCGGCTGC GGCGAGCGGT ATCAGCTCAC  
2501 TCAAAGGCGG TAATACGGTT ATCCACAGAA TCAGGGGATA ACGCAGGAAA  
2551 GAACATGTGA GCAAAAGGCC AGCAAAAGGC CAGGAACCGT AAAAAGGCCG  
2601 CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC CCCCTGACGA GCATCACAAA  
2651 AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC CCGACAGGAC TATAAAGATA  
2701 CCAGGCGTTT CCCCTGGAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTCCGACCC  
2751 TGCCGCTTAC CGGATACCTG TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGCC  
2801 CTTTCTCAAT GCTCACGCTG TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTCGTTCC  
2851 CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC ACGAACCCCC CGTTCAGCCC GACCGCTGCC  
2901 CCTTATCCGG TAACTATCGT CTTGAGTCCA ACCCGGTAAG ACACGACTTA  
2951 TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT  
3001 AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTAACTAC GGCTACACTA  
3051 GAAGGACAGT ATTTGGTATC TCGCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA  
3101 AAAAGAGTTG GTAGCTCTTG ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG  
3151 TGGTTTTTTT GTTTGCAAGC AGCAGATTAC GCGCAGAAAA AAAGGATCTC  
3201 AAGAAGATCC TTTGATCTTT TCTACGGGGT CTGACGCTCA GTGGAACGAA  
3251 AACTCACGTT AAGGGATTTT GGTCATGAGA TTATCAAAAA GGATCTTCAC  
3301 CTAGATCCTT TTAAATTAAT AATGAAGTTT TAAATCAATC TAAAGTATAT  
3351 ATGAGTAAAC TTGGTCTGAC AGTTACCAAT GCTTAATCAG TGAGGCACCT  
3401 ATCTCAGCGA TCTGTCTATT TCGTTCATCC ATAGTTGCCT GACTCCGGGG  
3451 GGGGGGGGCG CTGAGGTCTG CCTCGTGAAG AAGGTGTTGC TGAICTATAC  
3501 CAGGCCTGAA TCGCCCCATC ATCCAGCCAG AAAGTGAGGG AGCCACGGTT  
3551 GATGAGAGCT TTGTTGTAGG TGGACCAGTT GGTGATTTTG AACTTTTGCT  
3601 TTGCCACGGA ACGGTCTGCG TTGTCGGGAA GATGCGTGAT CTGATCCTTC  
3651 AACTCAGCAA AAGTTCGATT TATTCAACAA AGCCGCCGTC CCGTCAAGTC

Fig. 7C

# RO 117710 B1

(51) Int.Cl.<sup>7</sup> C 12 N 15/44;  
A 61 K 48/00;

3701 AGCGTAATGC TCTGCCAGTG TTACAACCAA TTAACCAATT CTGATTAGAA  
3751 AAACATCATCG AGCATCAAAT GAAACTGCAA TTTATTCATA TCAGGATTAT  
3801 CAATACCATA TTTTGGAAA AGCCGTTTCT GTAATGAAGG AGAAAACCTCA  
3851 CCGAGGCAGT TCCATAGGAT GGCAAGATCC TGGTATCGGT CTGCGATTCC  
3901 GACTCGTCCA ACATCAATAC AACCTATTAA TTTCCCCTCG TCAAAAATAA  
3951 GGTTATCAAG TGAGAAATCA CCATGAGTGA CGACTGAATC CGGTGAGAAAT  
4001 GGCAAAAGCT TATGCATTTT TTTCCAGACT TGTTC AACAG GCCAGCCATT  
4051 ACGCTCGTCA TCAAAATCAC TCGCATCAAC CAAACCGTTA TTCATTCTGT  
4101 ATTGCGCCTG AGCGAGACGA AATACGCGAT CGCTGTAAA AGGACAATTA  
4151 CAAACAGGAA TCGAATGCAA CCGGCGCAGG AACACTGCCA GCGCATCAAC  
4201 AATATTTTCA CCTGAATCAG GATATTCTT TAATACCTGG AATGCTGTT  
4251 TCCCGGGGAT CGCAGTGGTG AGTAACCATG CATCATCAGG AGTACGGATA  
4301 AAATGCTTGA TGGTCGGAAG AGGCATAAAT TCCGTCAGCC AGTTTAGTCT  
4351 GACCATCTCA TCTGTAACAT CATTGGCAAC GCTACCTTTG CCATGTTTCA  
4401 GAAACAACCTC TGGCGCATCG GGCTTCCCAT ACAATCGATA GATTGTCCGA  
4451 CCTGATTGCC CGACATTATC GCGAGCCCAT TTATACCCAT ATAAATCAGC  
4501 ATCCATGTTG GAATTTAATC GCGGCCTCGA GCAAGACGTT TCCCGTTGAA  
4551 TATGGCTCAT AACACCCCTT GTATTACTGT TTATGTAAGC AGACAGTTTT  
4601 ATTGTTTCATG ATGATATATT TTTATCTTGT GCAATGTAAC ATCAGAGATT  
4651 TTGAGACACA ACGTGGCTTT CCCCCCCCCC CCATTATTGA AGCATTATC  
4701 AGGGTTATTG TCTCATGAGC GGATACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAAT  
4751 AAACAAATAG GGGTTCCGCG CACATTTCCC CGAAAAGTGC CACCTGACGT  
4801 CTAAGAAACC ATTATTATCA TGACATTAAC CTATAAAAAT AGGCGTATCA  
4851 CGAGGCCCTT TCGTC

Fig. 7D

CMVintaBGH Sequence, SEQ. ID:11:

1 ATTGGCTATT GGCCATTGCA TACGTTGTAT CCATATCATA ATATGTACAT  
51 TTATATTGGC TCATGTCCA CATTACCGCC ATGTTGACAT TGATTATTGA  
101 CTAGTTATTA ATAGTAATCA ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT  
151 ATGGAGTTCC GCGTTACATA ACTTACGGTA AATGGCCCCG CTGGCTGACC  
201 GCCCAACGAC CCCC GCCCAT TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG  
251 TAACGCCAAT AGGGACTTTC CATTGACGTC AATGGGTGGA GTATTTACGG  
301 TAAACTGCCC ACTTGGCACT ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC  
351 CCCTATTGAC GTCAATGACG GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCCACT  
401 ACATGACCTT ATGGGACTTT CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC  
451 ATCGCTATTA CCATGGTGAT GCGGTTTTGG CAGTACATCA ATGGGCGTGG  
501 ATAGCGGTTT GACTCACGGG GATTTCCAAG TCTCCACCCC ATTGACGTCA  
551 ATGGGAGTTT GTTTTGGCAC CAAAATCAAC GGGACTTTCC AAAATGTCG  
601 AACAACTCCG CCCCATTTGAC GCAAATGGGC GGTAGGCGTG TACGGTGGGA  
651 GGTCTATATA AGCAGAGCTC GTTTAGTGAA CCGTCAGATC GCCTGGAGAC  
701 GCCATCCACG CTGTTTTGAC CTCCATAGAA GACACCGGGA CCGATCCAGC  
751 CTCCGCGGCC GGAACGGTG CATTGGAACG CGGATTCCCC GTGCCAAGAG  
801 TGACGTAAGT ACCGCCTATA GAGTCTATAG GCCCACCCCC TTGGCTTCTT  
851 ATGCATGCTA TACTGTTTTT GGCTTGGGGT CTATACACCC CCGCTTCCTC  
901 ATGTTATAGG TGATGGTATA GCTTAGCCTA TAGGTGTGGG TTATTGACCA  
951 TTATTGACCA CTCCCCTATT GGTGACGATA CTTTCCATTA CTAATCCATA  
1001 ACATGGCTCT TTGCCACAAC TCTCTTTATT GGCTATATGC CAATACACTG  
1051 TCCTTCAGAG ACTGACACGG ACTCTGTATT TTTACAGGAT GGGGTCTCAT  
1101 TTATTATTTA CAAATTCACA TATAACAAC CACCGTCCCC AGTGCCCGCA  
1151 GTTTTTATTA AACATAACGT GGGATCTCCA CGCGAATCTC GGGTACGTGT  
1201 TCCGGACATG GGCTCTTCTC CGGTAGCGGC GGAGCTTCTA CATCCGAGCC

Fig. 8A



# RO 117710 B1

(51) Int.Cl.<sup>7</sup> C 12 N 15/44;  
A 61 K 48/00;

1251 CTGCTCCCAT GCCTCCAGCG ACTCATGGTC GCTCGGCAGC TCCTTGCTCC  
1301 TAACAGTGGA GGCCAGACTT AGGCACAGCA CGATGCCAC CACCACCAGT  
1351 GTGCCGCACA AGGCCGTGCG GGTAGGGTAT GTGTCTGAAA ATGAGCTCGG  
1401 GGAGCGGGCT TGCACCGCTG ACGCATTGAG AAGACTTAAG GCAGCGGCAG  
1451 AAGAAGATGC AGGCAGCTGA GTTGTGTGT TCTGATAAGA GTCAGAGGTA  
1501 ACTCCCGTTG CGGTGCTGTT AACGGTGGAG GGCAGTGTAG TCTGAGCAGT  
1551 ACTCGTTGCT GCCGCGCGCG CCACCAGACA TAATAGCTGA CAGACTAACA  
1601 GACTGTTCTT TTCCATGGGT CTTTTCTGCA GTCACCGTCC TTAGATCTG  
1651 CTGTGCCTTC TAGTTGCCAG CCATCTGTTG TTTGCCCTC CCCCCTGCTT  
1701 TCCTTGACCC TGAAGGTGC CACTCCCACT GTCCTTCTT AATAAAATGA  
1751 GGAAATTGCA TCGCATTGTC TGAGTAGGTG TCATTCTATT CTGGGGGGTG  
1801 GGGTGGGGCA GCACAGCAAG GGGGAGGATT GGAAGACAA TAGCAGGCAT  
1851 GCTGGGGATG CGGTGGGCTC TATGGGTAAC CAGGTGCTGA AGAATTGACC  
1901 CGGTTCCTCC TGGGCCAGAA AGAAGCAGGC ACATCCCCTT CTCTGTGACA  
1951 CACCCTGTCC ACGCCCCTGG TTCTTAGTTC CAGCCCCACT CATAGGACAC  
2001 TCATAGCTCA GGAGGGCTCC GCCTTCAATC CCACCCGCTA AAGTACTTGG  
2051 AGCGGTCTCT CCTCCCTCA TCAGCCACC AAACCAAACC TAGCCTCCAA  
2101 GAGTGGGAAG AAATTAAGC AAGATAGGCT ATTAAGTGCA GAGGGAGAGA  
2151 AAATGCCTCC AACATGTGAG GAAGTAATGA GAGAAATCAT AGAATTC

Fig. 8B

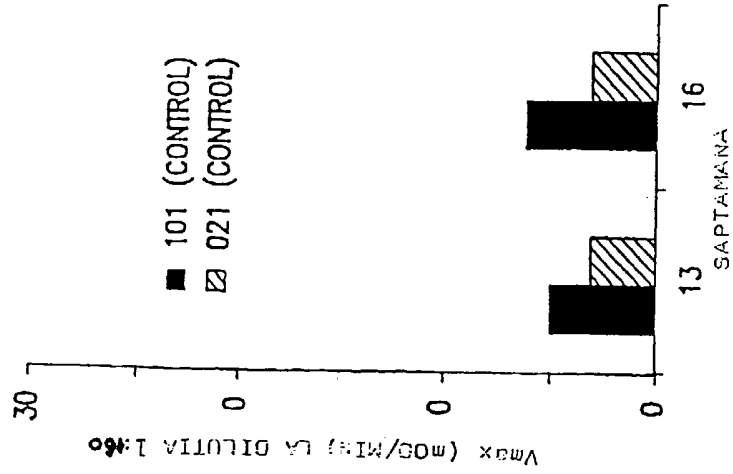


Fig. 9B

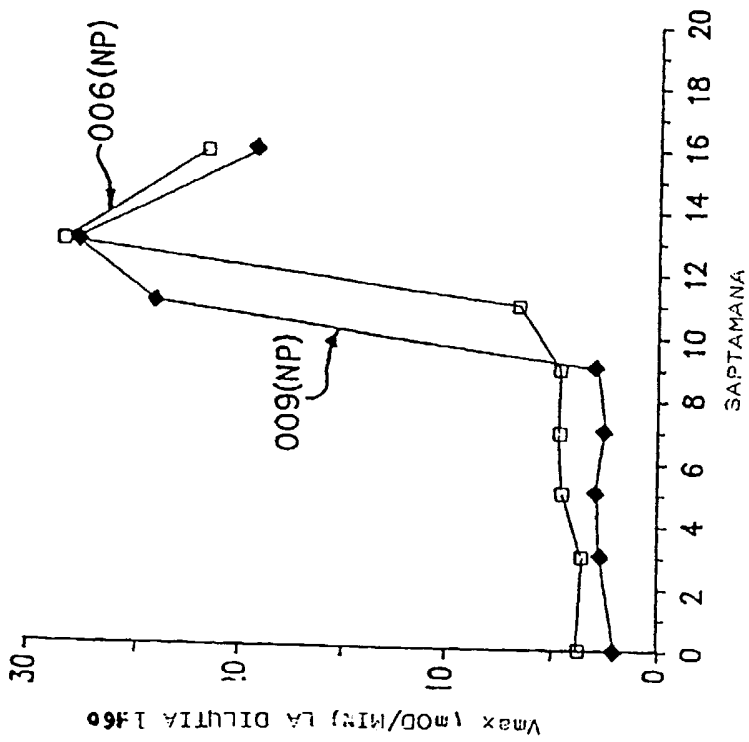


Fig. 9A

# RO 117710 B1

(51) Int.Cl.<sup>7</sup> C 12 N 15/44;  
A 61 K 48/00;

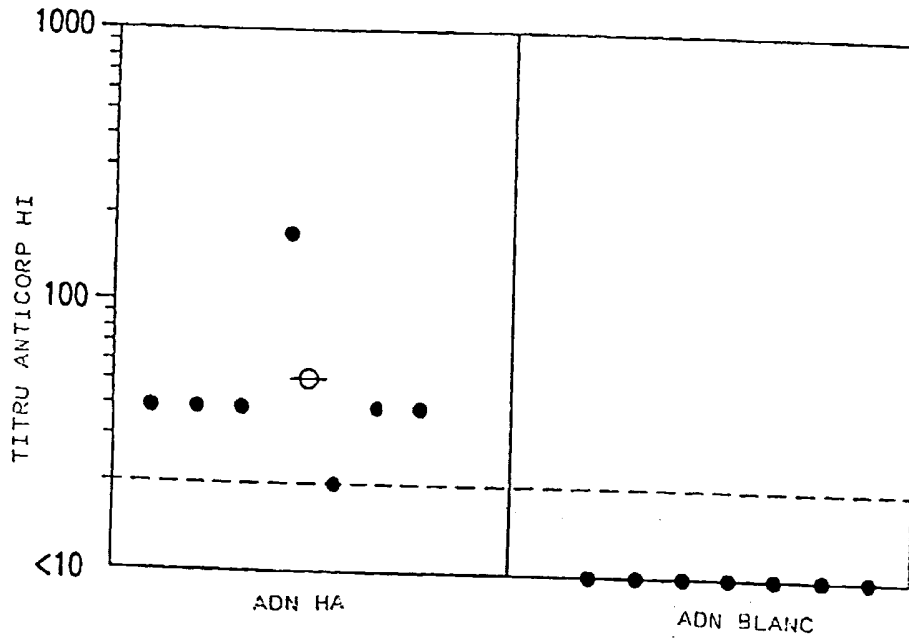


Fig. 10

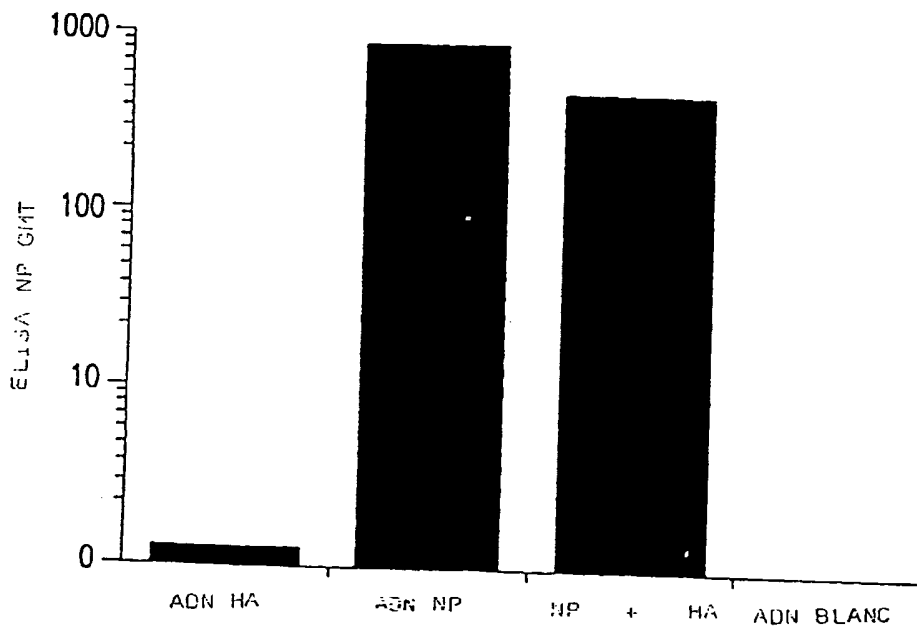
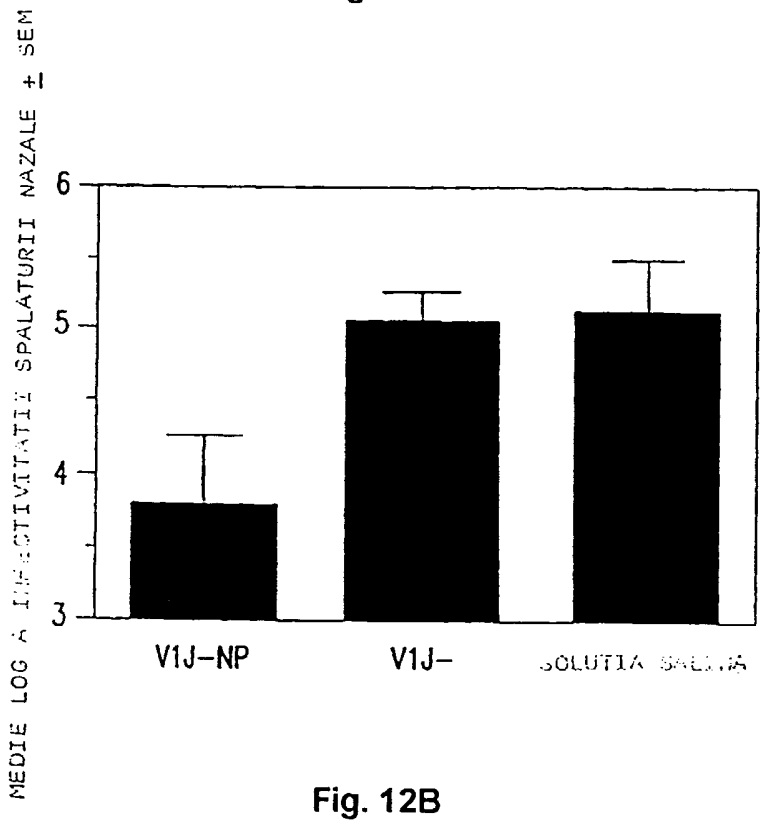
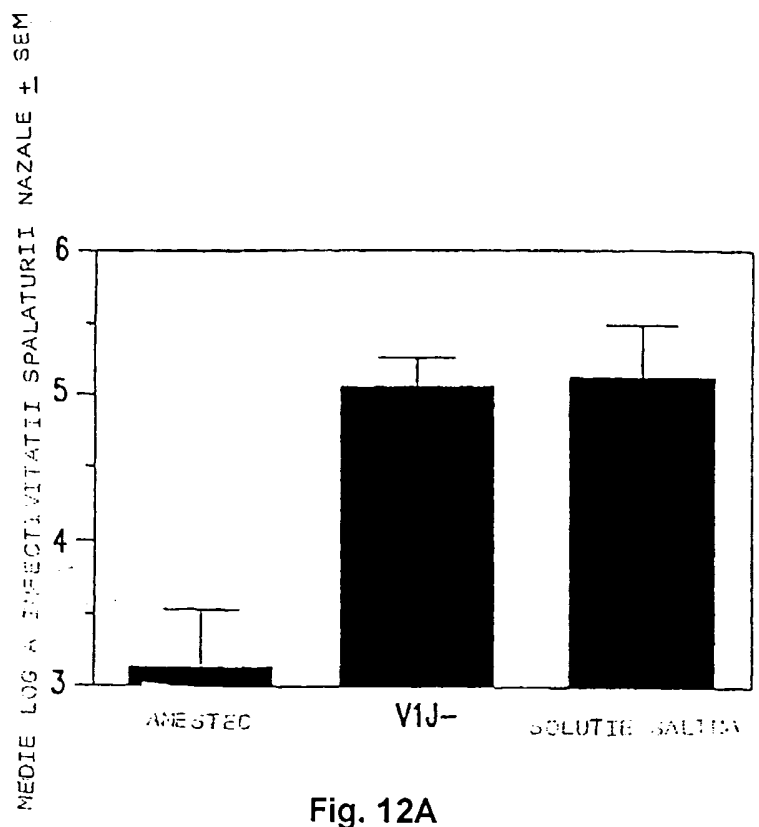


Fig. 11



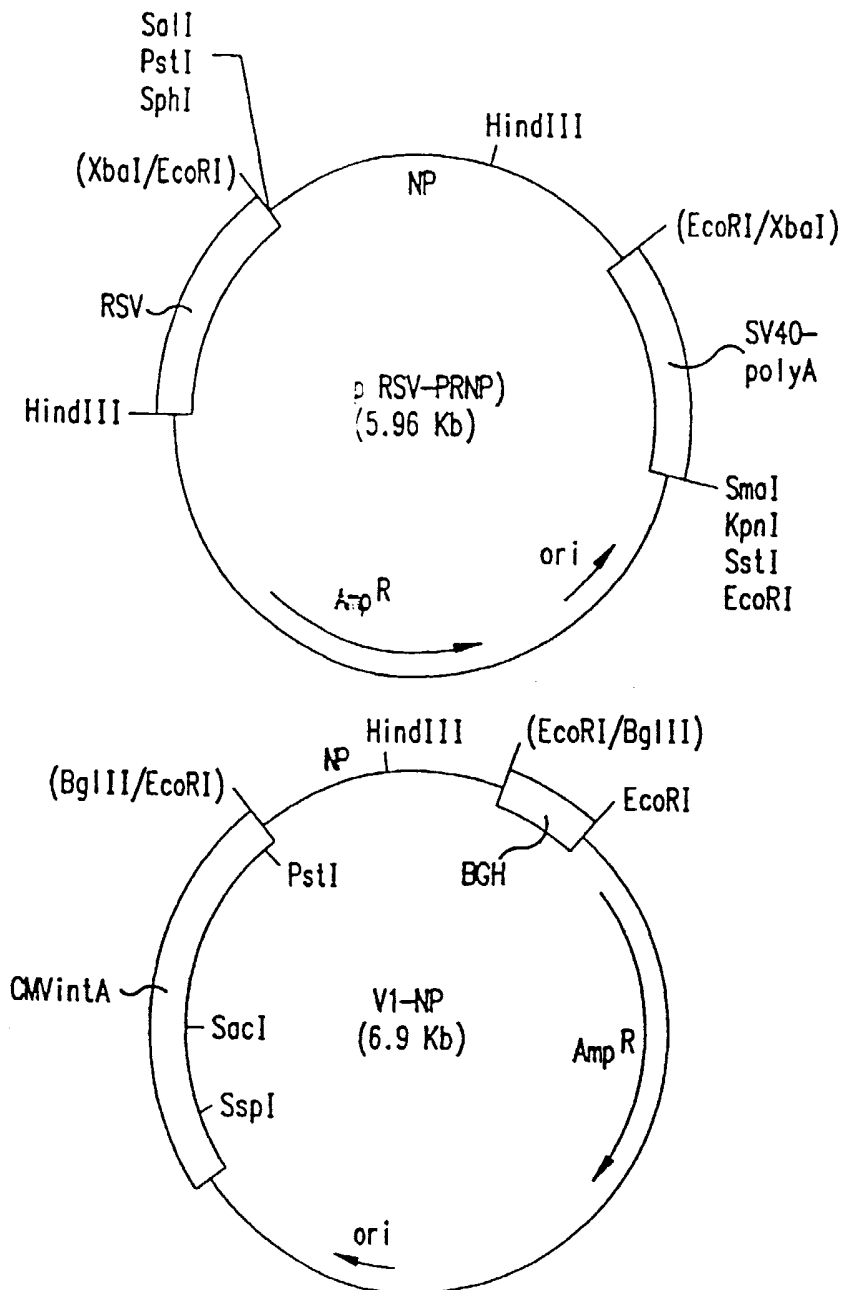


Fig. 13

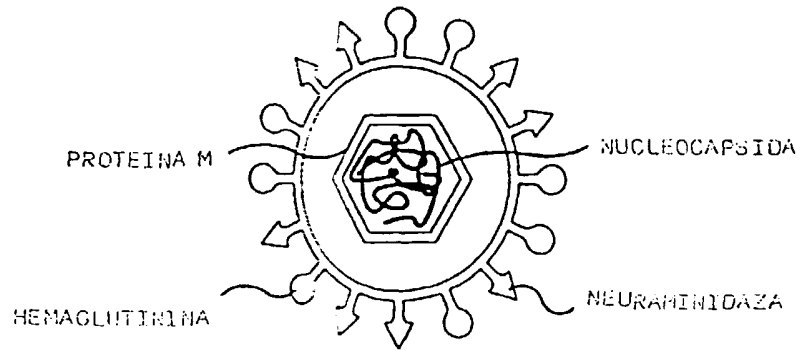


Fig. 14A

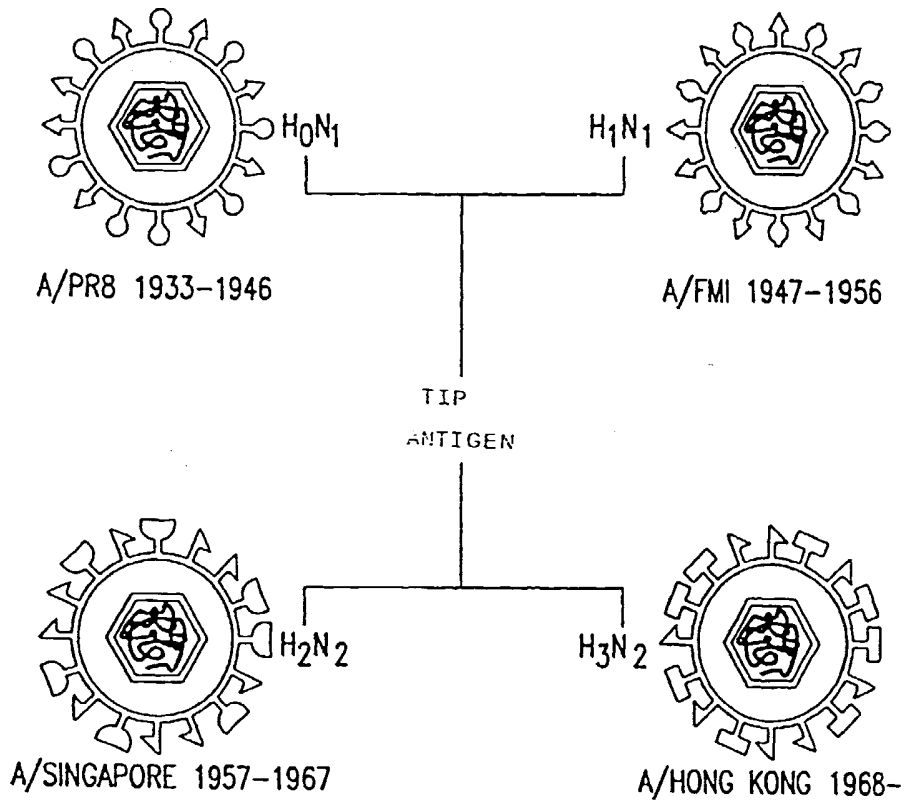


Fig. 14B

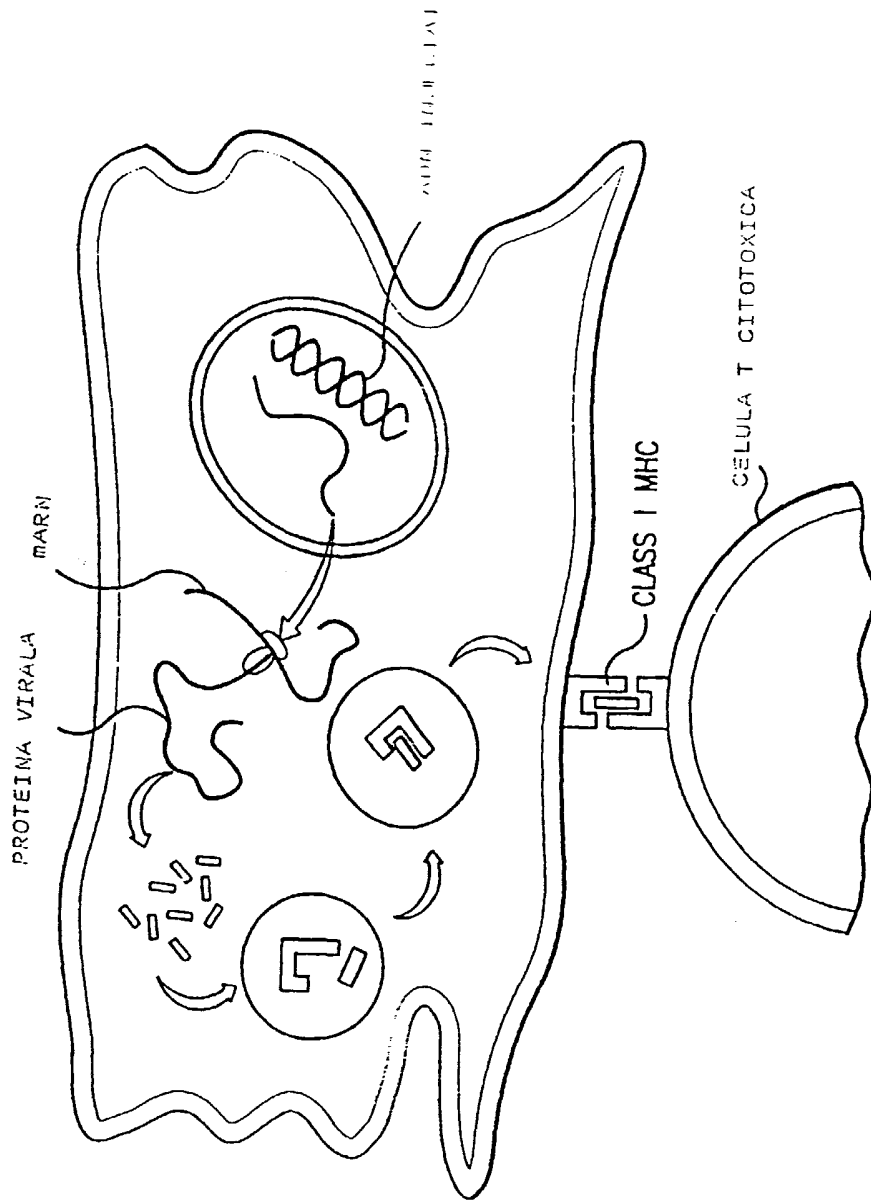


Fig. 15

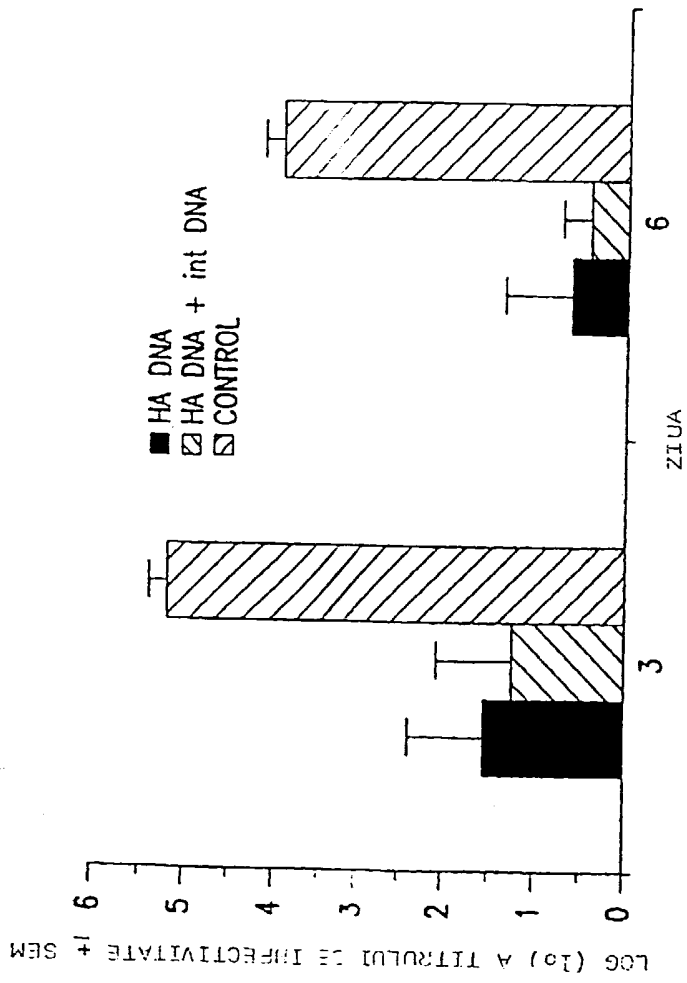


Fig. 16



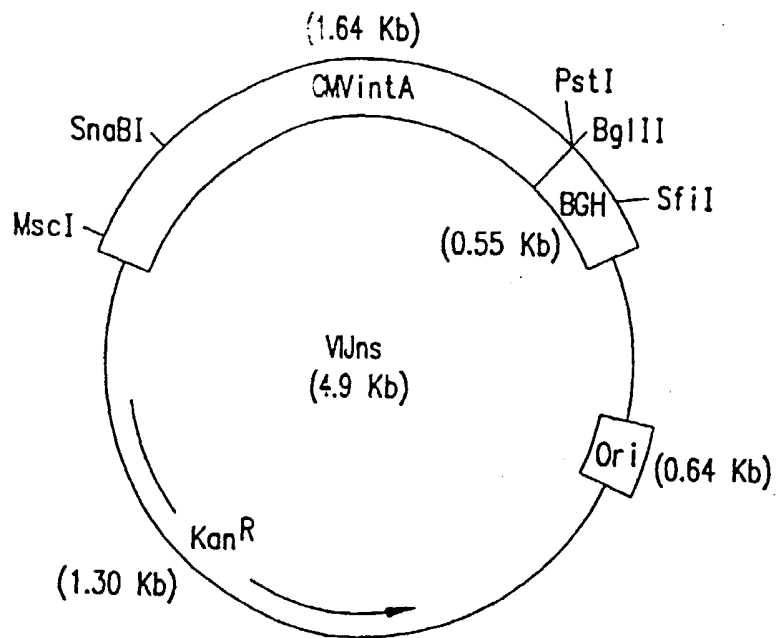


Fig. 17

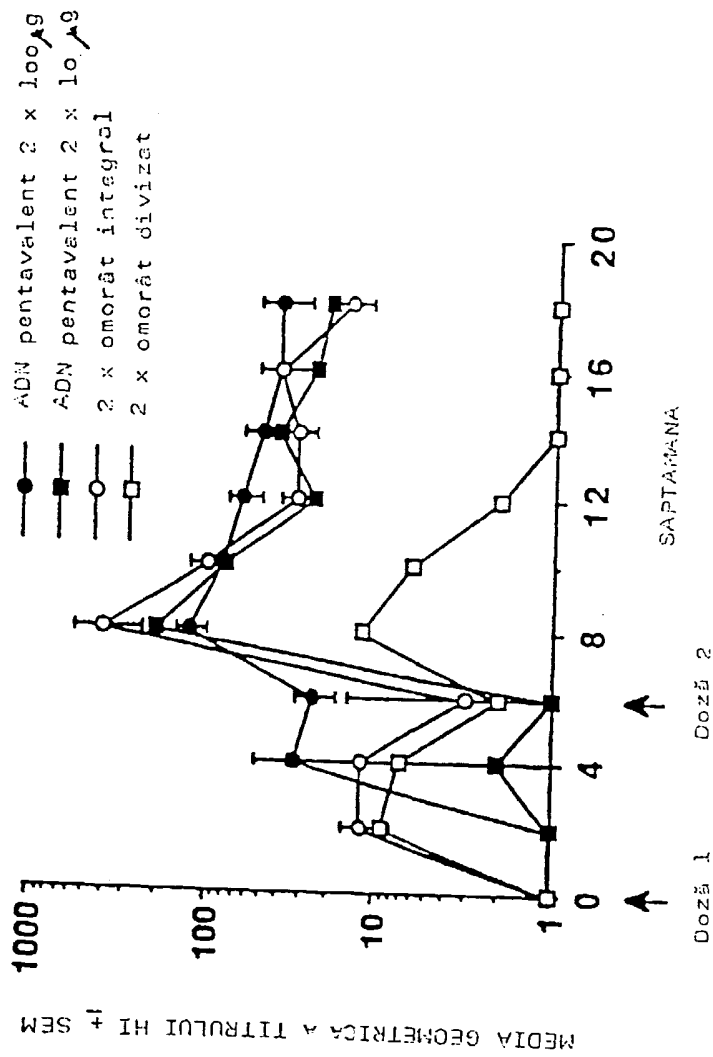


Fig. 18

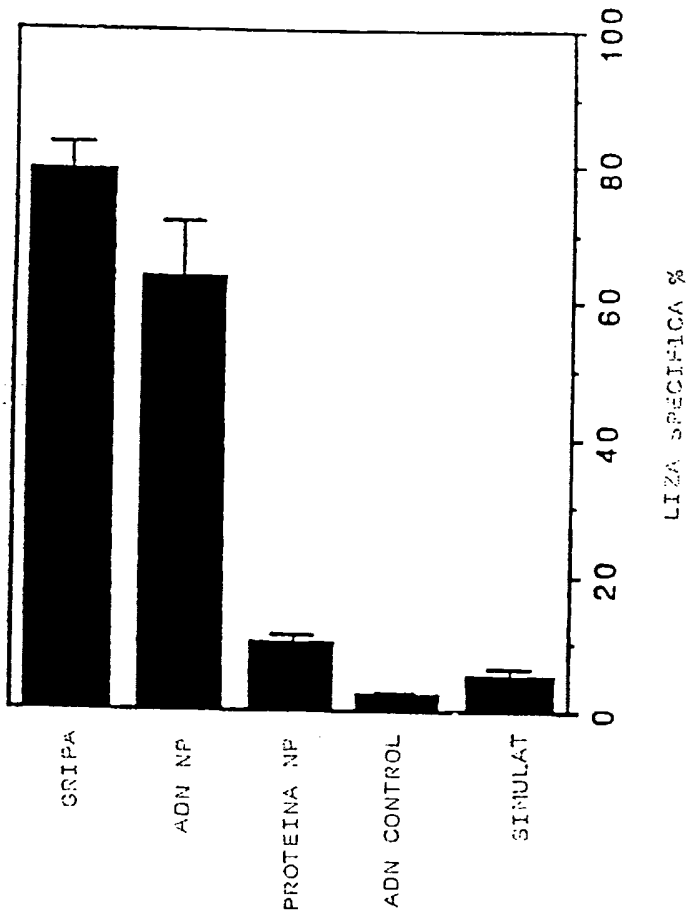


Fig. 19

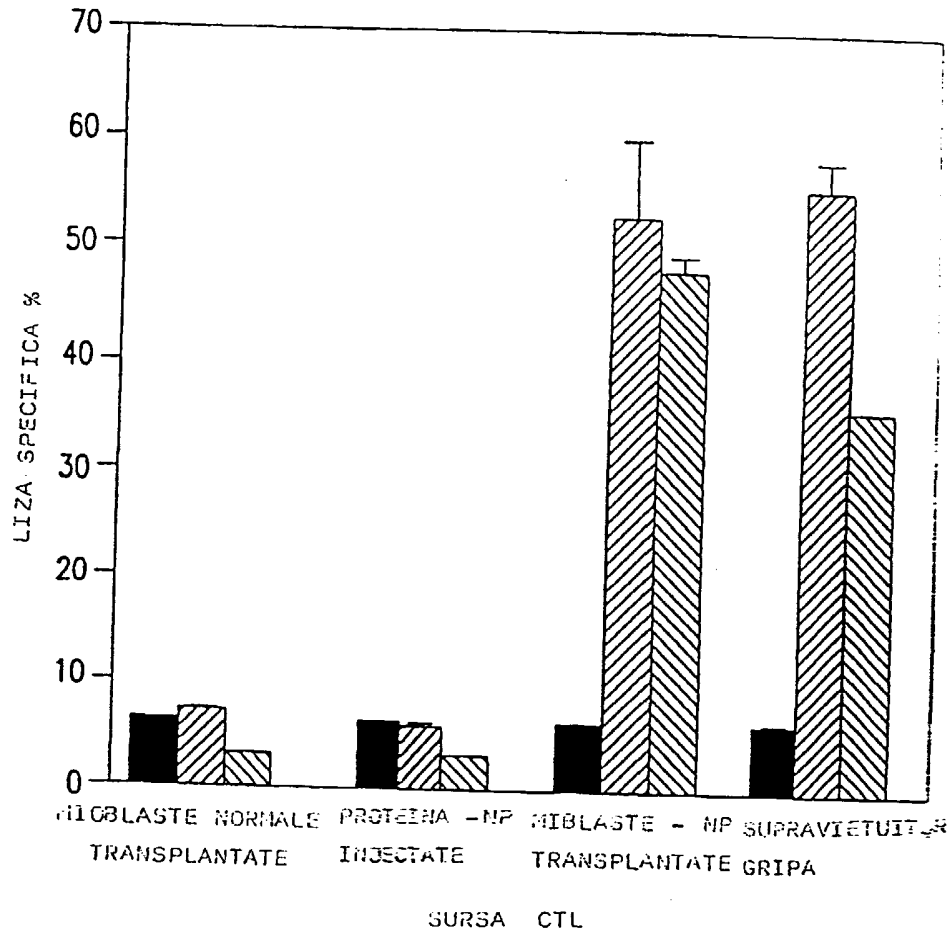


Fig. 20

(51) Int.Cl.<sup>7</sup> C 12 N 15/44;  
A 61 K 48/00;

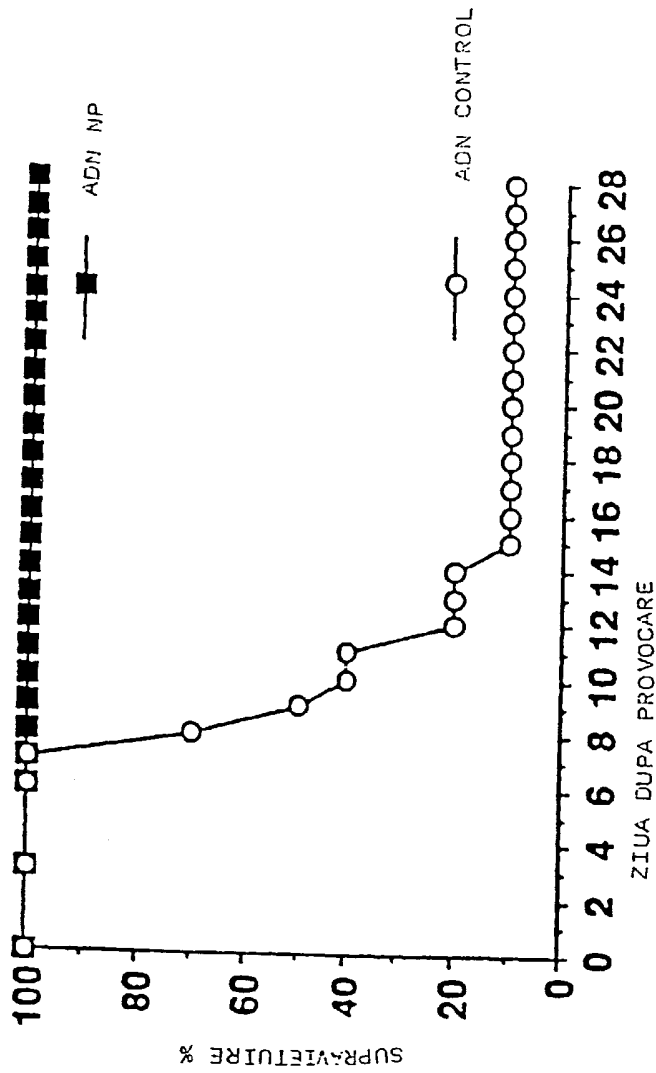


Fig. 21

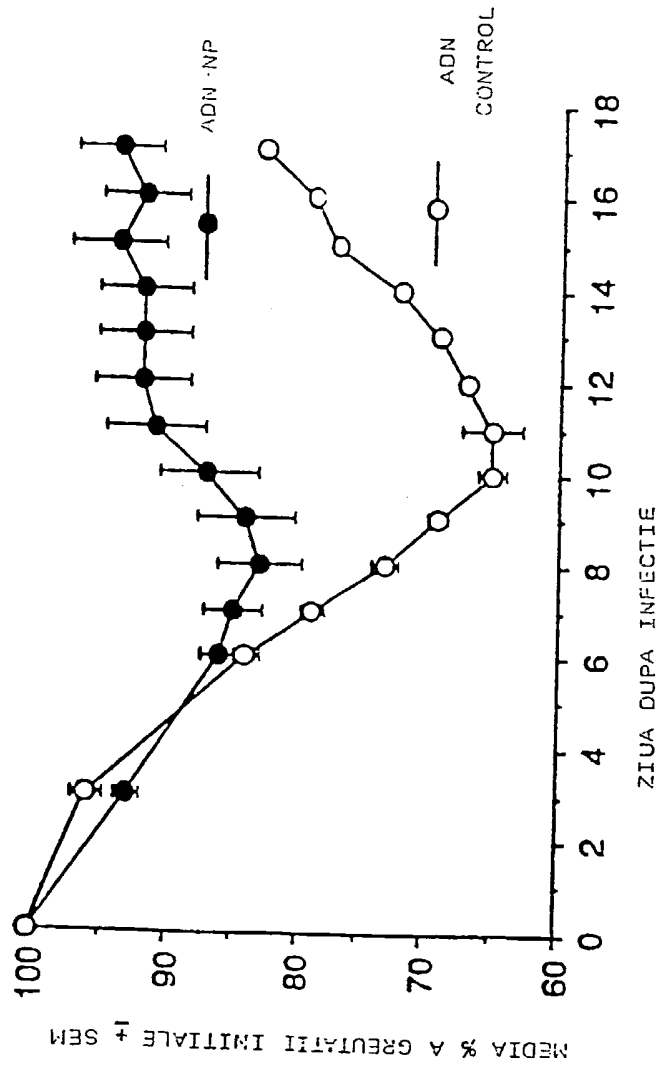


Fig. 22

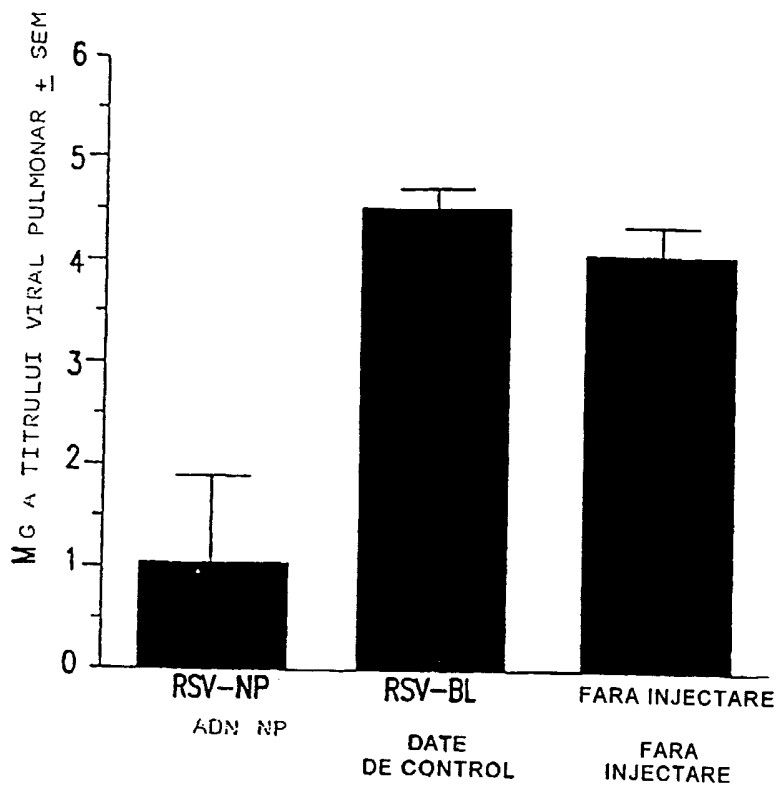


Fig. 23

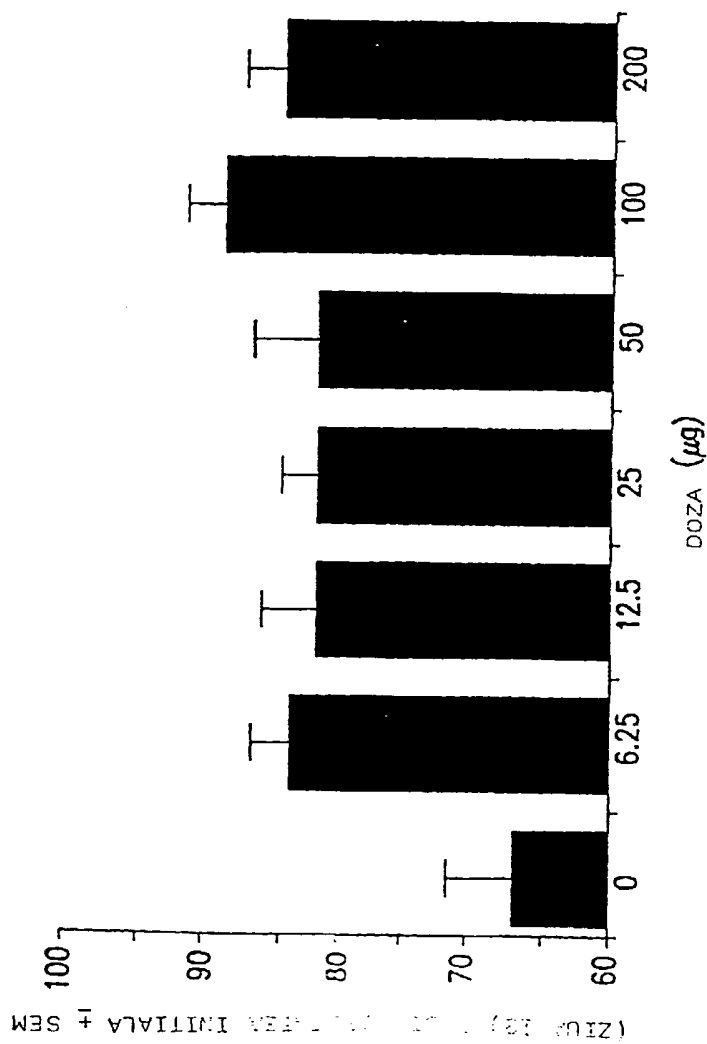


Fig. 24



(51) Int.Cl.<sup>7</sup> C 12 N 15/44;  
A 61 K 48/00;

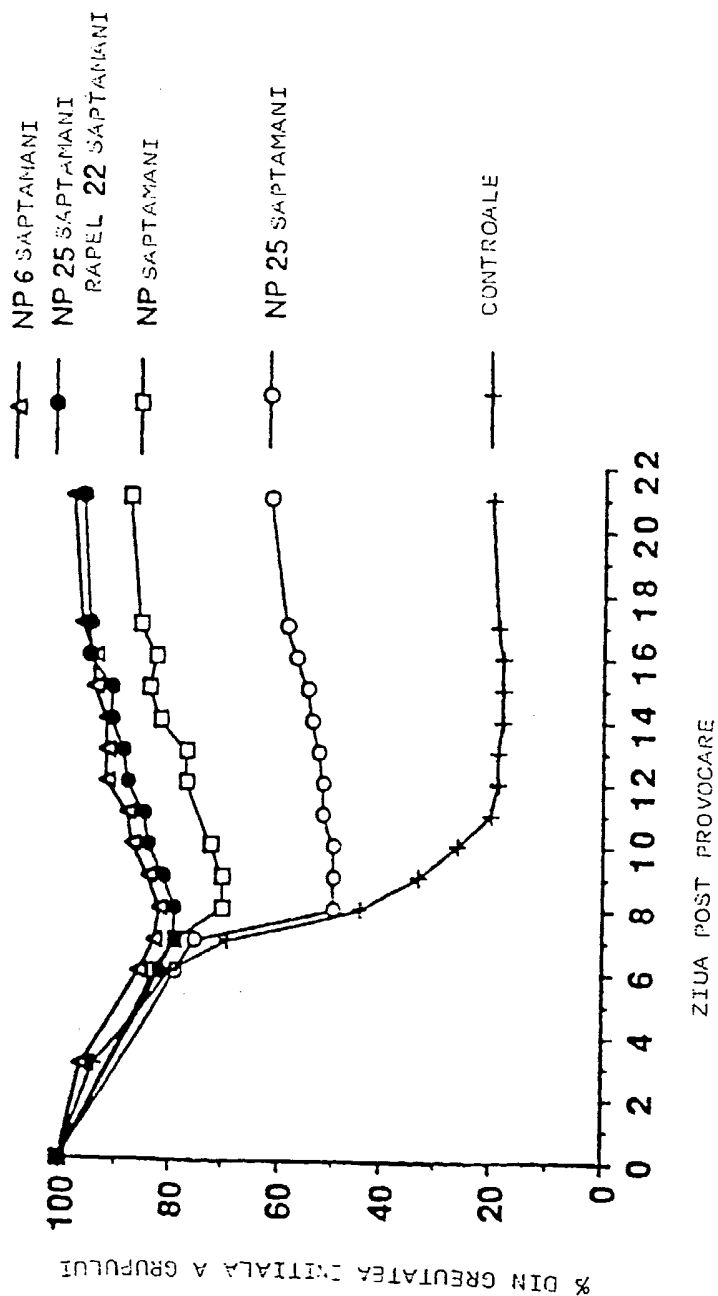


Fig. 25

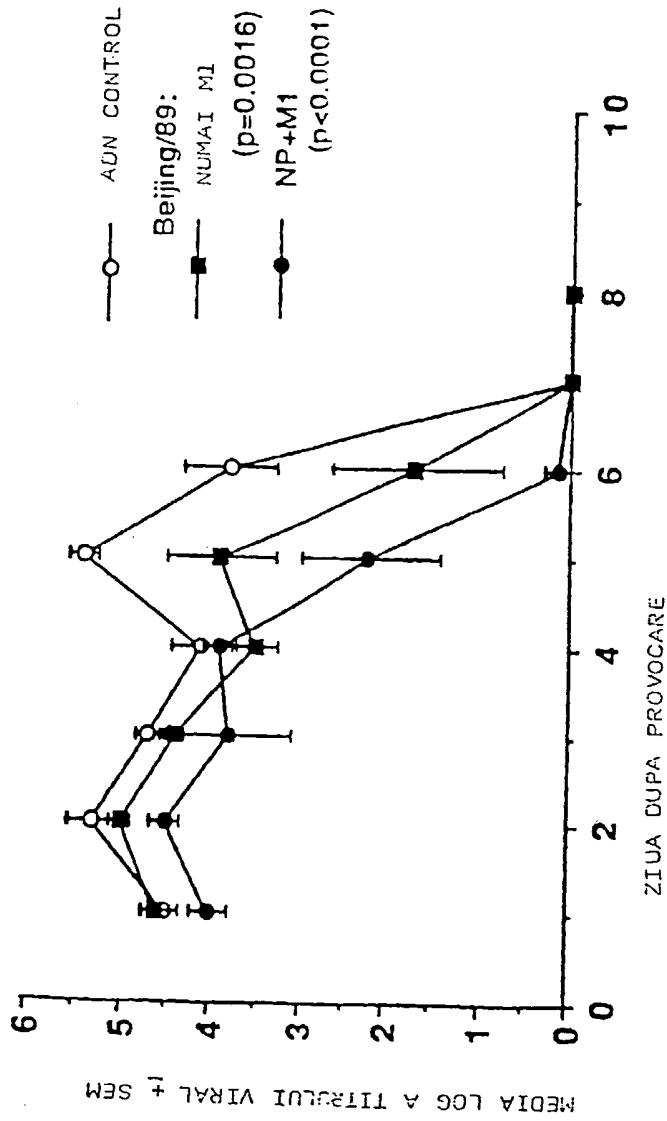


Fig. 26

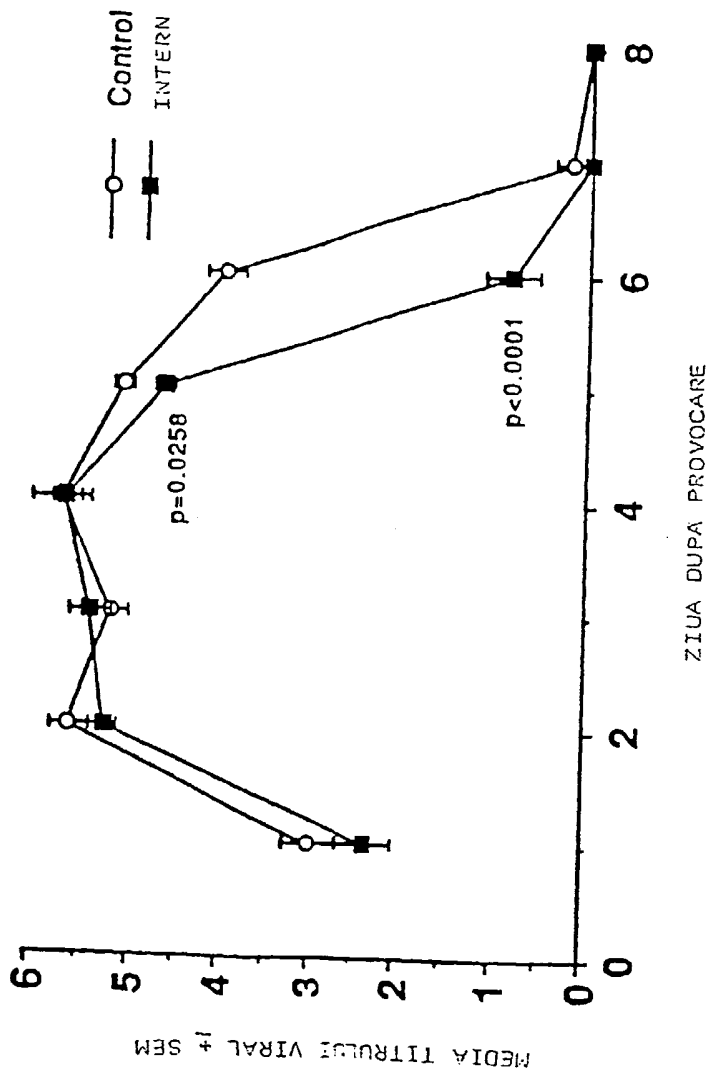


Fig. 27

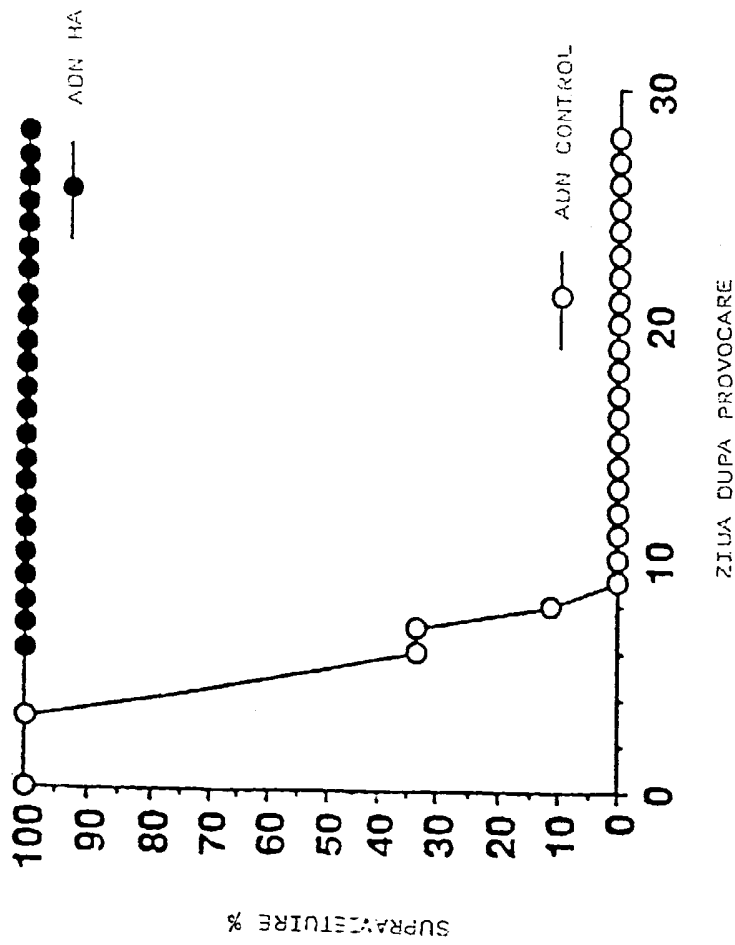


Fig. 28

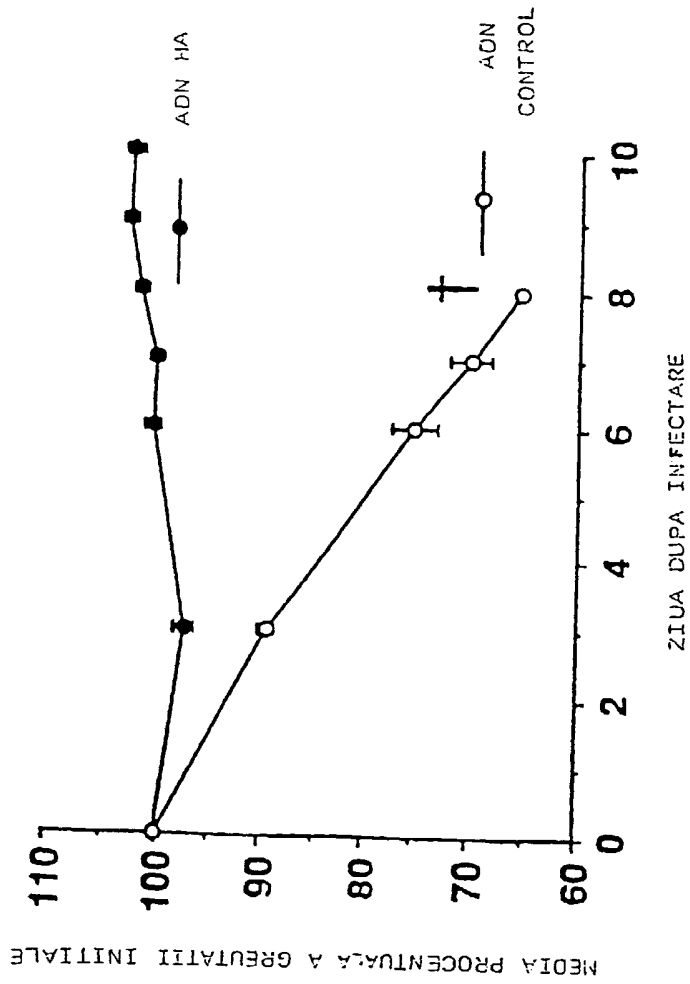


Fig. 29

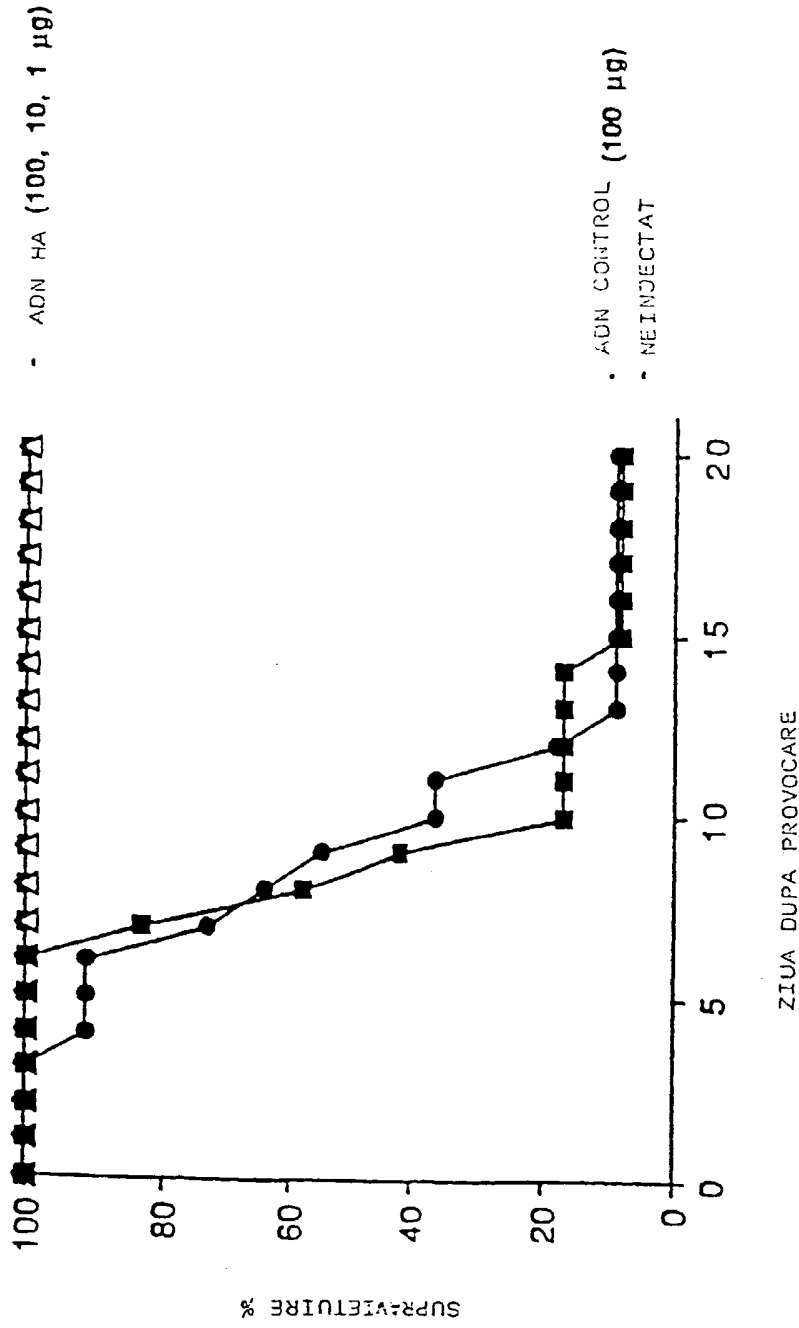


Fig. 30

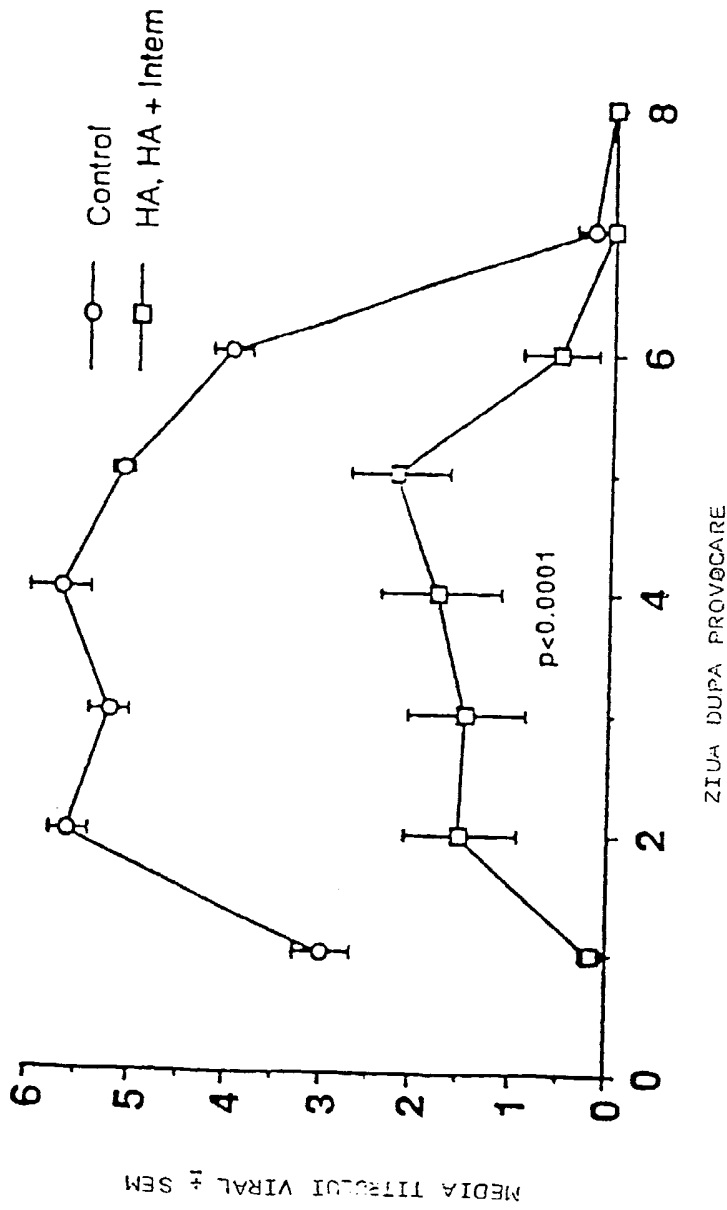


Fig. 31

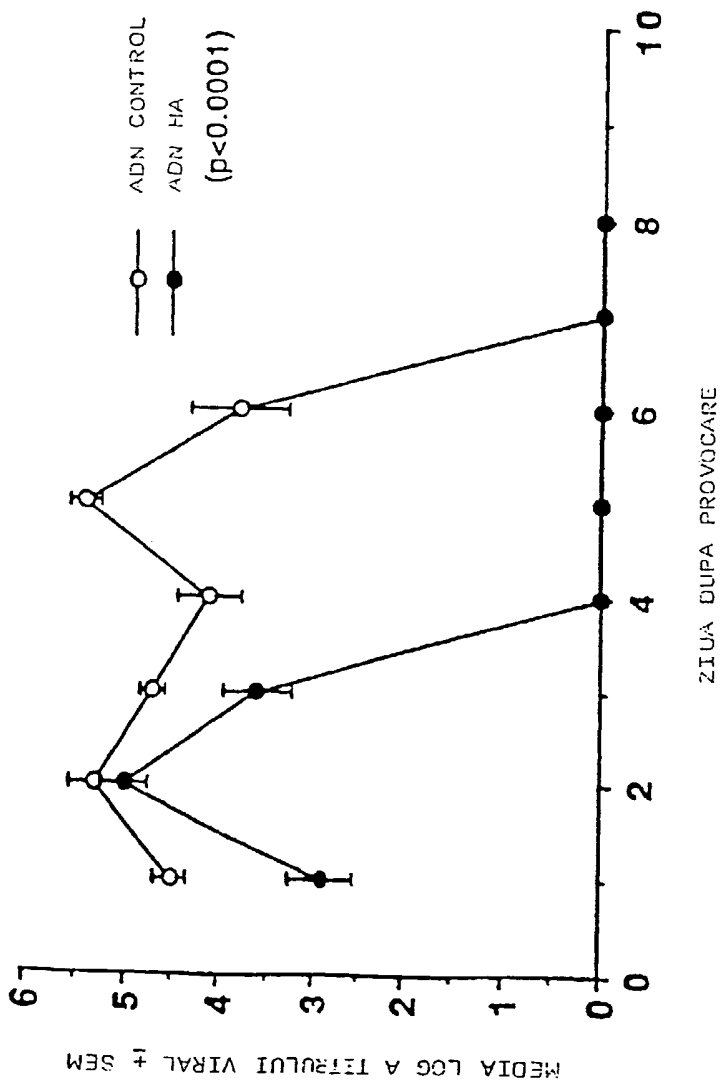


Fig. 32



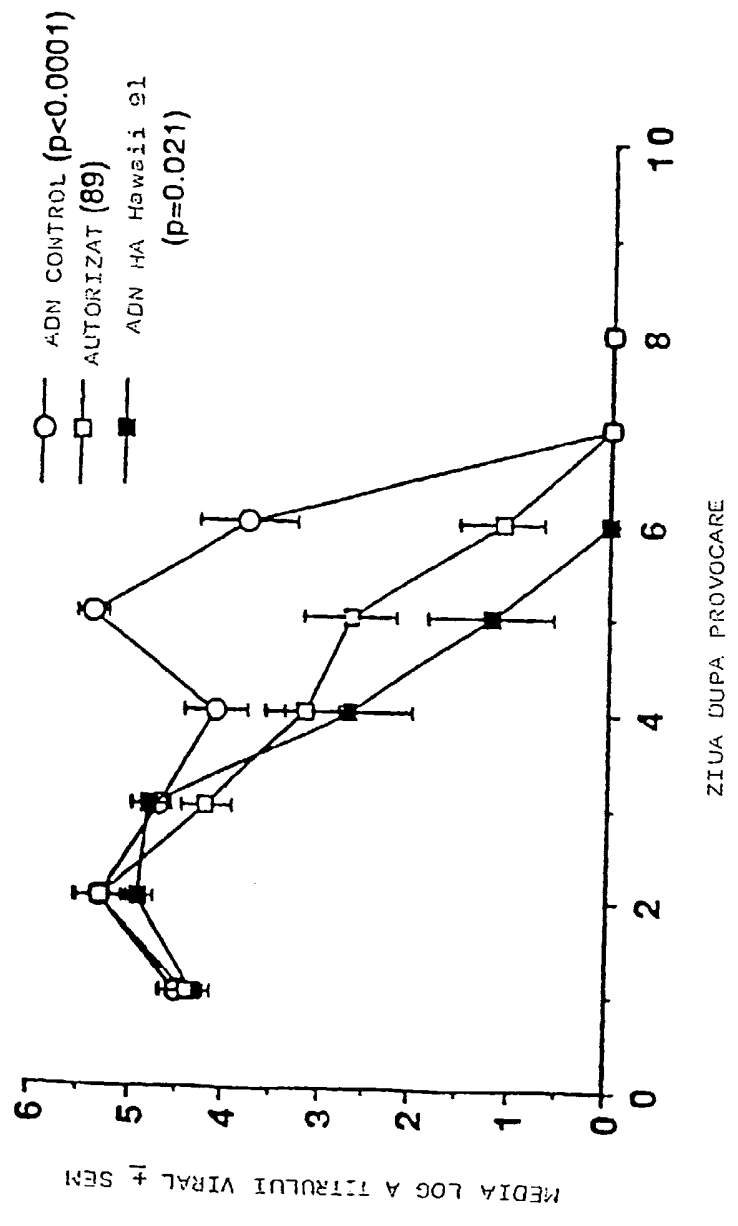


Fig. 33

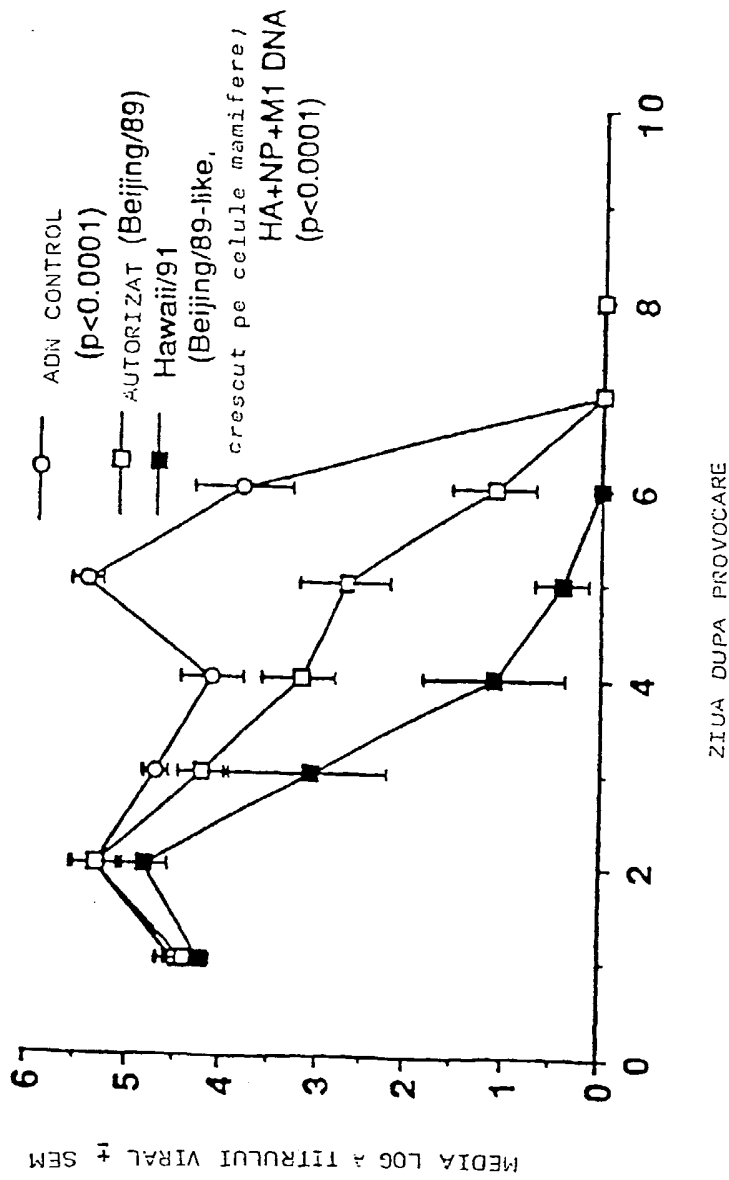


Fig. 34

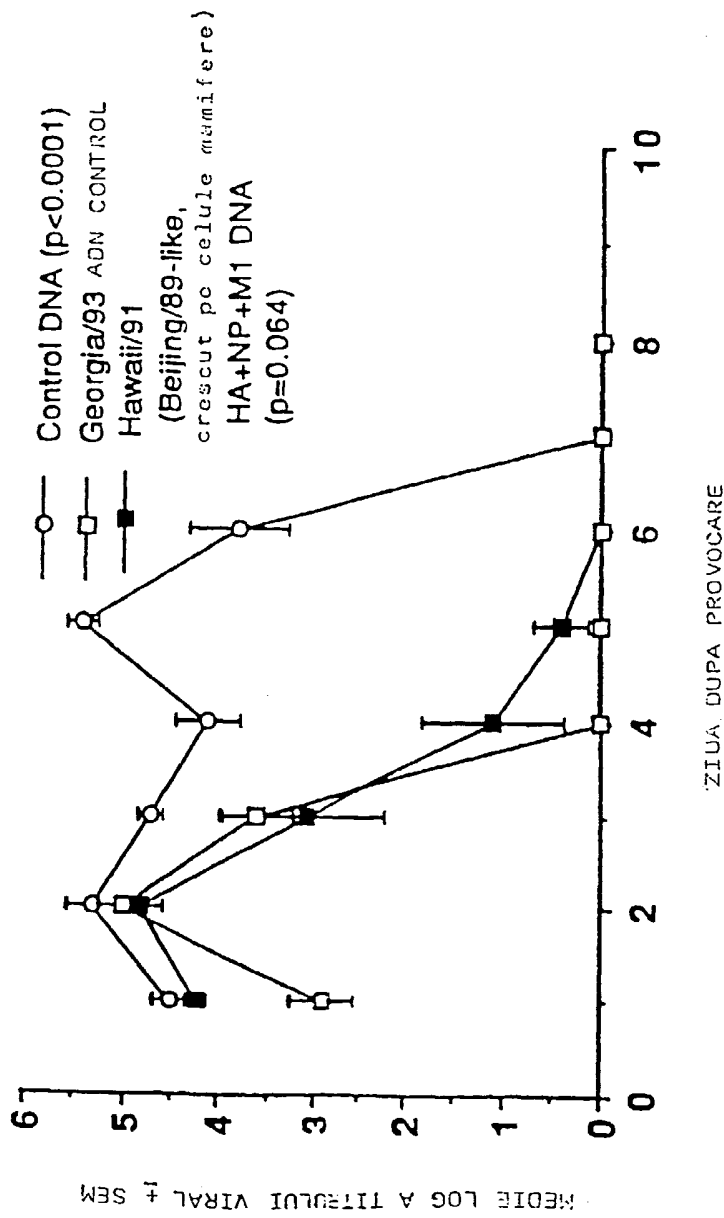


Fig. 35

VIR SEQUENCE, SEQ.ID:45:  
1 GATATTGG CTATTGGCCA  
251 TTGCATACGT TGTATCCATA TCATAATATG TACATTTATA TFGGCTCATG  
301 TCCAACATTA CCGCCATGTT GACATTGATT ATTGACTAGT TATTAATACT  
351 AATCAATTAC GGGGTCATTA GTTCATAGCC CATATATGGA GTTCCGCGT  
401 ACATAACTTA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC TGACCGCCCA ACGACCCCGG  
451 CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA  
501 CTTTCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCACTTG  
551 GCAGTACATC AAGTGTATCA TATGCCAAGT ACGCCCCCTA TTGACGTCAA  
601 TGACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCATTATGC CCAGTACATG ACCTTATGGG  
651 ACTTTCCTAC TTGGCAGTAC ATCTACGTAT TAGTCATCGC TATTACCATG  
701 GTGATGCGGT TTTGGCAGTA CATCAATGGG CGTGGATAGC GGTTTGACTC  
751 ACGGGGATTT CCAAGTCTCC ACCCCATTGA CGTCAATGGG AGTTTGTTT  
801 GGCACCAAAA TCAACGGGAC TTTCCAAAAT GTCGTAACAA CTCCGCCCCA  
851 TTGACGCAA TGGGCGGTAG GCGTGTACGG TGGGAGGTCT ATATAAGCAG  
901 AGCTCGTTTA GTGAACCGTC AGATCGCCTG GAGACGCCAT CCACGCTGTT  
951 TTGACCTCCA TAGAAGACAC CGGGACCGAT CCAGCCTCCG CGGCCGGGAA  
1001 CGGTGCATTG GAACGCGGAT TCCCCGTGCC AAGAGTGACG TAAGTACCGC  
1051 CTATAGAGTC TATAGGCCCA CCCCCTTGGC TTCTTATGCA TGCTATACTG  
1101 TTTTGGCTT GGGGTCTATA CACCCCGCT TCCTCATGTT ATAGGTGATG  
1151 GTATAGCTTA GCCTATAGGT GTGGGTTATT GACCATTATT GACCACTCCC  
1201 CTATTGGTGA CGATACTTTC CATTACTAAT CCATAACATG GCTCTTTGCC  
1251 ACAACTCTCT TTATTGGCTA TATGCCAATA CACTGTCCTT CAGAGACTGA  
1301 CACGGACTCT GTATTTTAC AGGATGGGGT CTCATTTATT ATTTACAAAT  
1351 TCACATATAC AACACCACCG TCCCCAGTGC CCGCAGTTTT TATTAACAT

Fig. 36A

# RO 117710 B1

(51) Int.Cl.<sup>7</sup> C 12 N 15/44;  
A 61 K 48/00;

1401 AACGTGGGAT CTCCACGGGA ATCTCGGGTA CGTGTTCGGG ACATGGGCTC  
1451 TTCTCCGGTA GCGGCGGAGC TTCTACATCC GAGCCCTGCT CCCATGCCTC  
1501 CAGCGACTCA TGGTCGCTCG GCAGCTCCTT GCTCCTAACA GTGGAGGCCA  
1551 GACTTAGGCA CAGCACGATG CCCACCACCA CCAGTGTGCC GCACAAGGCC  
1601 GTGGCGGTAG GGTATGTGTC TGAAAATGAG CTCGGGGAGC GGGCTTGAC  
1651 CGCTGACGCA TTTGGAAGAC TTAAGGCAGC GGCAGAAGAA GATGCAGGCA  
1701 GCTGAGTTGT TGTGTTCTGA TAAGAGTCAG AGGTA ACTCC CGTTGCGGTG  
1751 CTGTTAACGG TGGAGGGCAG TGTAGTCTGA GCAGTACTCG TTGCTGCCGC  
1801 GCGCGCCACC AGACATAATA GCTGACAGAC TAACAGACTG TTCCTTTCCA  
1851 TGGGTCTTTT CTGCAGTCAC CGTCCTTAG ATCTGCTGTG CCTTCTAGTT  
1901 GCCAGCCATC TGTTGTTTGC CCCTCCCCCG TGCCTTCCTT GACCCTGGAA  
1951 GGTGCCACTC CCACTGTCTT TCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA  
2001 TTGTCTGAGT AGGTGTCATT CTATTCTGGG GGGTGGGGTG GGGCAGCACA  
2051 GCAAGGGGGA GGATTGGGAA GACAATAGCA GGCATGCTGG GGATGCGGTG  
2101 GGCTCTATGG GTAC GGCCGACGGCC GTACCCAGGT GCTGAAGAAT  
TGACCCGGTT CCTCGACCCGT AAAAAGGCCG  
2601 CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC CCCCTGACGA GCATCACAAA  
2651 AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC CCGACAGGAC TATAAAGATA  
2701 CCAGGCGTTT CCCCTGGAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC  
2751 TGCCGCTTAC CGGATACCTG TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGCG  
2801 CTTTCTCAAT GCTCACGCTG TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTGCTTCC  
2851 CTCCAAGCTG GGCTGTGTC ACGAACCCCG GTTCAGCCC GACCGCTGCG  
2901 CCTTATCCGG TAACTATCGT CTTGAGTCCA ACCCGGTAAG ACACGACTTA  
2951 TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT  
3001 AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTAACTAC GGCTACACTA

Fig. 36B

3051 GAAGGACAGT ATTTGGATC TGCCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA  
 3101 AAAAGAGTTG GTAGCTCTG ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCCG  
 3151 TGGTTTTTTT GTTTGCAAGC AGCAGATTAC GCGCAGAAAA AAAGGATCTC  
 3201 AAGAAGATCC TTTGATCTT TCTACGTGATCC CGTAATGC TCTGCCAGCG  
 TTACAACCAA TTAACCAATT CTGATTAGAA  
 3751 AAACATCATG AGCATCAAA GAAACTGCAA TTTATTCATA TCAGGATTAT  
 3801 CAATACCATA TTTTGA AAA AGCCGTTTCT GTAATGAAGG AGAAAATCA  
 3851 CCGAGGCAGT TCCATAGSAT GGCAAGATCC TGGTATCGGT CTGCGATTCC  
 3901 GACTCGTCCA ACATCAATAC AACCTATTAA TTTCCCCTCG TCAAAAATAA  
 3951 GGTTATCAAG TGAGAAATCA CCATGAGTGA CGACTGAATC CCGTGAGAA  
 4001 GGCAAAAGCT TATGCATTC TTTCCAGACT TGTTCAACAG GCCAGCCAT  
 4051 ACGCTCGTCA TCAAAATCAC TCGCATCAAC CAAACCGTTA TTCATTCGTG  
 4101 ATTGCGCCTG AGCGAGACGA AATACGCGAT CGCTGTAAA AGGACAATTA  
 4151 CAAACAGGAA TCGAATGCAA CCGGCGCAGG AACACTGCCA GCGCATCAAC  
 4201 AATATTTTCA CCTGAATCAG GATATTCTTC TAATACCTGG AATGCTGTTT  
 4251 TCCCAGGGAT CGCAGTGGT AGTAACCATG CATCATCAGG AGTACGGATA  
 4301 AAATGCTTGA TGGTCGGAAG AGGCATAAAT TCCGTCAGCC AGTTTAGTCT  
 4351 GACCATCTCA TCTGTAACAT CATTGGCAAC GCTACCTTTG CCATGTTTCA  
 4401 GAAACAATC TGGCGCATCG GGCTTCCCAT ACAATCGATA GATTGTCGCA  
 4451 CCTGATTGCC CGACATTATC GCGAGCCCAT TTATACCCAT ATAAATCAGC  
 4501 ATCCATGTTG GAATTTAATC GCGGCCTCGA GCAAGACGTT TCCCGTTGAA  
 4551 TATGGCTCAT AACACCCCTT GTATTACTGT TTATGTAAGC AGACAGTTTT  
 4601 ATTGTTATG ATGATATATT TTTATCTTGT GCAATGTAAC ATCAGAGATT  
 4651 TTGAGACACA ACGTGGCTTT CC

Fig. 36C

