



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107530383 A

(43)申请公布日 2018.01.02

(21)申请号 201680014847.2

(22)申请日 2016.01.07

(30)优先权数据

62/101,968 2015.01.09 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.09.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/012482 2016.01.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/112188 EN 2016.07.14

(71)申请人 埃图比克斯公司

地址 美国华盛顿州

(72)发明人 弗兰克·R·琼斯

伊丽莎白·加比茨施

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 郑霞

(51)Int.Cl.

A61K 35/761(2006.01)

A61K 39/12(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

权利要求书8页 说明书63页

序列表43页 附图9页

(54)发明名称

用于埃博拉病毒疫苗接种的方法和组合物

(57)摘要

本发明提供了使用腺病毒载体产生针对埃博拉病毒抗原的免疫应答的方法,该方法允许使用相同腺病毒载体进行多次疫苗接种以及在具有预先存在的对腺病毒的免疫力的个体中进行疫苗接种。

1. 一种组合物,其包含复制缺陷型腺病毒载体,该复制缺陷型腺病毒载体包含编码埃博拉病毒抗原的核酸序列,其中所述埃博拉病毒抗原编码序列与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6及其组合的序列具有70%-100%的序列同一性。

2. 一种组合物,其包含重组核酸载体,其中所述重组核酸载体包含复制缺陷型腺病毒载体;并且其中当施用于人时,所述组合物能够在所述人中诱导针对表达埃博拉病毒抗原的细胞的免疫应答,其中所述免疫应答包括细胞介导的免疫。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述复制缺陷型腺病毒载体包括复制缺陷型5型腺病毒载体。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的组合物,其中所述复制缺陷型腺病毒载体包含E2b基因区的缺失。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的组合物,其中所述埃博拉病毒抗原包含25个或更少的氨基酸的修饰。

6. 一种组合物,其包含重组复制缺陷型5型腺病毒载体,该腺病毒载体在包含编码埃博拉病毒抗原的序列的E2b基因区域中具有缺失,其中所述埃博拉病毒抗原包含25个或更少的氨基酸的修饰。

7. 根据权利要求5或6所述的组合物,其中所述埃博拉病毒抗原包含20、15、10、5个或更少的氨基酸的修饰。

8. 根据权利要求7所述的组合物,其中所述埃博拉病毒抗原包含2、3或4个氨基酸的修饰。

9. 根据权利要求7所述的组合物,其中所述埃博拉病毒抗原包含1个氨基酸的修饰。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的组合物,其中所述复制缺陷型腺病毒载体包含E1基因区的缺失。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的组合物,其中所述复制缺陷型腺病毒载体包含E3基因区的缺失。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的组合物,其中所述复制缺陷型腺病毒载体包含E4基因区的缺失。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的组合物,其中所述埃博拉病毒选自EBOV、SUDV、TAFV、BDBV、RESTV及其任意组合。

14. 根据权利要求1-13中任一项所述的组合物,其中所述埃博拉病毒抗原包含与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6及其组合的序列具有至少80%的序列同一性的序列。

15. 根据权利要求14所述的组合物,其中所述埃博拉病毒抗原由与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6及其组合的序列具有至少90%的序列同一性的序列所编码。

16. 根据权利要求14所述的组合物,其中所述埃博拉病毒抗原由与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6及其组合的序列具有至少95%的序列同一性的序列所编码。

17. 根据权利要求14所述的组合物,其中所述埃博拉病毒抗原由与选自SEQ ID NO:1、

SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6及其组合的序列具有至少97%的序列同一性的序列所编码。

18.根据权利要求14所述的组合物,其中所述埃博拉病毒抗原由与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6及其组合的序列具有至少99%的序列同一性的序列所编码。

19.根据权利要求14所述的组合物,其中所述埃博拉病毒抗原由与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6及其组合的序列具有100%的序列同一性的序列所编码。

20.根据权利要求1-19中任一项所述的组合物,其中所述重组核酸载体能够实现所述埃博拉病毒抗原在转染的细胞中的过表达。

21.根据权利要求1-20中任一项所述的组合物,其中所述重组核酸载体能够在人中诱导对表达埃博拉病毒抗原的细胞的特异性免疫应答,该特异性免疫应答是基线的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或25倍。

22.根据权利要求1-21中任一项所述的组合物,其中所述人具有大于50、75、100、125、150、175或200的逆Ad5中和抗体滴度。

23.根据权利要求22所述的组合物,其中所述人具有大于250、500、750、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或4767的逆Ad5中和抗体滴度。

24.根据权利要求1-23中任一项所述的组合物,其中所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性抗体应答。

25.根据权利要求1-24中任一项所述的组合物,其中所述免疫应答被测量为中和埃博拉病毒抗原特异性抗体应答。

26.根据权利要求1-23中任一项所述的组合物,其中所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性细胞介导的免疫(CMI)。

27.根据权利要求1-23中任一项所述的组合物,其中所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性IFN- γ 分泌。

28.根据权利要求1-23中任一项所述的组合物,其中所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性IL-2分泌。

29.根据权利要求1-23中任一项所述的组合物,其中通过ELISpot测定来测量针对所述埃博拉病毒抗原的免疫应答。

30.根据权利要求29所述的组合物,其中所述埃博拉病毒抗原特异性CMI大于25、50、75、100、150、200、250或300个IFN- γ 斑点形成细胞(SFC)/ 10^6 个外周血单核细胞(PBMC)。

31.根据权利要求1-23中任一项所述的组合物,其中通过CAP-1脉冲抗原呈递细胞、来自埃博拉感染的细胞系或自体埃博拉感染的细胞的表达同种异体埃博拉病毒抗原的细胞的T细胞裂解来测量所述免疫应答。

32.根据权利要求1-31中任一项所述的组合物,进一步包含免疫原性组分。

33.根据权利要求32所述的组合物,其中所述免疫原性组分包括选自IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13的细胞因子。

34.根据权利要求32所述的组合物,其中所述免疫原性组分选自IL-7、编码IL-7的核酸、与IL-7具有基本的同一性的蛋白质以及编码与IL-7具有基本的同一性的蛋白质的核

酸。

35. 一种小瓶, 其包含由在0.8-1.2mL范围内的体积的治疗性溶液组成的组合物, 所述治疗性溶液包含 $2.5-7.5 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒; 其中所述病毒颗粒包含含有编码埃博拉病毒抗原的核酸序列的复制缺陷型腺病毒。

36. 根据权利要求35所述的小瓶, 其中所述重组核酸载体能够实现所述埃博拉病毒抗原在转染的细胞中的过表达。

37. 根据权利要求35或36所述的小瓶, 其中所述转染的细胞为E.C7细胞。

38. 根据权利要求35-37中任一项所述的小瓶, 其中所述复制缺陷型腺病毒载体包括复制缺陷型5型腺病毒载体。

39. 根据权利要求35-38中任一项所述的小瓶, 其中所述复制缺陷型腺病毒包含编码蛋白质的核酸序列, 该蛋白质能够在人中诱导针对表达埃博拉病毒抗原的细胞的特异性免疫应答。

40. 根据权利要求39所述的小瓶, 其中所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性抗体应答。

41. 根据权利要求39所述的小瓶, 其中所述免疫应答被测量为中和埃博拉病毒抗原特异性抗体应答。

42. 根据权利要求39所述的小瓶, 其中所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性细胞介导的免疫(CMI)。

43. 根据权利要求39所述的小瓶, 其中所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性IFN- γ 分泌。

44. 根据权利要求39所述的小瓶, 其中所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性IL-2分泌。

45. 根据权利要求39所述的小瓶, 其中通过ELISpot测定来测量所述针对埃博拉病毒抗原的免疫应答。

46. 根据权利要求45所述的小瓶, 其中所述埃博拉病毒抗原特异性CMI大于25、50、75、100、150、200、250或300个IFN- γ 斑点形成细胞(SFC)/ 10^6 个外周血单核细胞(PBMC)。

47. 根据权利要求39所述的小瓶, 其中通过CAP-1脉冲抗原呈递细胞、来自埃博拉感染的细胞系或自体埃博拉感染的细胞的表达同种异体埃博拉病毒抗原的细胞的T细胞裂解来测量所述免疫应答。

48. 根据权利要求35-47中任一项所述的小瓶, 其中所述治疗性溶液包含至少 1.0×10^{11} 、 1.5×10^{11} 、 2.0×10^{11} 、 2.5×10^{11} 、 3.0×10^{11} 、 3.5×10^{11} 、 4.0×10^{11} 、 4.5×10^{11} 、 4.8×10^{11} 、 4.9×10^{11} 、 4.95×10^{11} 或 4.99×10^{11} 个含有所述重组核酸载体的病毒颗粒。

49. 根据权利要求35-48中任一项所述的小瓶, 其中所述治疗性溶液包含至多 7.0×10^{11} 、 6.5×10^{11} 、 6.0×10^{11} 、 5.5×10^{11} 、 5.2×10^{11} 、 5.1×10^{11} 、 5.05×10^{11} 或 5.01×10^{11} 个含有所述重组核酸载体的病毒颗粒。

50. 根据权利要求48或49所述的小瓶, 其中所述治疗性溶液包含 $1.0-7.0 \times 10^{11}$ 个含有所述重组核酸载体的病毒颗粒。

51. 根据权利要求48或49所述的小瓶, 其中所述治疗性溶液包含 $4.5-5.5 \times 10^{11}$ 个含有所述重组核酸载体的病毒颗粒。

52. 根据权利要求48或49所述的小瓶,其中所述治疗性溶液包含 $4.8-5.2 \times 10^{11}$ 个含有所述重组核酸载体的病毒颗粒。

53. 根据权利要求48或49所述的小瓶,其中所述治疗性溶液包含 $4.9-5.1 \times 10^{11}$ 个含有所述重组核酸载体的病毒颗粒。

54. 根据权利要求48或49所述的小瓶,其中所述治疗性溶液包含 $4.95-5.05 \times 10^{11}$ 个含有所述重组核酸载体的病毒颗粒。

55. 根据权利要求48或49所述的小瓶,其中所述治疗性溶液包含 $4.99-5.01 \times 10^{11}$ 个含有所述重组核酸载体的病毒颗粒。

56. 根据权利要求33-55中任一项所述的小瓶,进一步包含免疫原性组分。

57. 根据权利要求56所述的小瓶,其中所述免疫原性组分包括选自IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13的细胞因子。

58. 根据权利要求56所述的小瓶,其中所述免疫原性组分选自IL-7、编码IL-7的核酸、与IL-7具有基本的同一性的蛋白质以及编码与IL-7具有基本的同一性的蛋白质的核酸。

59. 一种在人中产生针对埃博拉病毒抗原的免疫应答的方法,该方法包括向所述人施用权利要求1-34中任一项所述的组合物。

60. 一种在人中产生针对埃博拉病毒抗原的免疫应答的方法,该方法包括向所述人施用权利要求35-58中任一项所述的小瓶中的组合物。

61. 根据权利要求59或60所述的方法,其中重复所述施用步骤至少一次。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中在之前的施用步骤后约3周后重复所述施用步骤。

63. 根据权利要求61所述的方法,其中在之前的施用步骤后约3个月后重复所述施用步骤。

64. 根据权利要求61所述的方法,其中重复所述施用步骤两次。

65. 一种在人中产生针对埃博拉病毒抗原的免疫应答的方法,该方法包括:

(a) 治疗的第一阶段,其包括向所述人施用包含编码埃博拉病毒抗原的第一复制缺陷型腺病毒载体的第一组合物,该埃博拉病毒抗原在所述人中诱导针对表达所述埃博拉病毒抗原的细胞的免疫应答;以及

(b) 随后的治疗的第二阶段,其包括向所述人施用包含编码埃博拉病毒抗原的第二复制缺陷型腺病毒载体的第二组合物,该埃博拉病毒抗原在所述人中诱导针对表达所述埃博拉病毒抗原的细胞的免疫应答。

66. 一种治疗的方法,其包括:

(a) 选择治疗的第一阶段和治疗的第二阶段;

(b) 在所述第一阶段期间,向人施用包含编码埃博拉病毒抗原的第一复制缺陷型腺病毒载体的第一组合物总共n次,该埃博拉病毒抗原在所述人中诱导针对表达所述埃博拉病毒抗原的细胞的免疫应答;以及

(c) 在所述治疗的第二阶段期间,向所述人施用包含编码埃博拉病毒抗原的第二复制缺陷型腺病毒载体的第二组合物总共m次,该埃博拉病毒抗原在所述人中诱导针对表达所述埃博拉病毒抗原的细胞的免疫应答。

67. 根据权利要求66所述的方法,其中n大于1。

68. 根据权利要求67所述的方法, 其中 n 为3。
69. 根据权利要求中任一项所述的方法66-68, 其中 m 大于1。
70. 根据权利要求69所述的方法, 其中 m 为3。
71. 根据权利要求65-70中任一项所述的方法, 其中所述第一阶段为至少2、3、4、5、6、7或8周。
72. 根据权利要求65-71中任一项所述的方法, 其中所述第二阶段为至少2、3、4、5、6、7或8个月。
73. 根据权利要求65-72中任一项所述的方法, 其中所述第二阶段在第一阶段结束后3-16周开始。
74. 根据权利要求65-73中任一项所述的方法, 其中在所述第一阶段, 所述复制缺陷型腺病毒的两次施用相隔至少18天。
75. 根据权利要求74所述的方法, 其中在所述第一阶段, 所述复制缺陷型腺病毒的两次施用相隔约21天。
76. 根据权利要求74所述的方法, 其中在所述第一阶段, 所述复制缺陷型腺病毒的两次施用相隔至多24天。
77. 根据权利要求65-76中任一项所述的方法, 其中在所述第二阶段, 所述复制缺陷型腺病毒的两次施用相隔至少10周。
78. 根据权利要求77所述的方法, 其中在所述第二阶段, 所述复制缺陷型腺病毒的两次施用相隔约13周。
79. 根据权利要求77所述的方法, 其中在所述第二阶段, 所述复制缺陷型腺病毒的两次施用相隔至多16周。
80. 一种治疗的方法, 其包括:
- (a) 选择治疗的第一阶段和第二阶段;
 - (b) 在所述第一阶段期间, 以约3周的间隔向人施用包含编码埃博拉病毒抗原的第一复制缺陷型腺病毒载体的第一组合物总共3次, 该埃博拉病毒抗原在所述人中诱导针对表达所述埃博拉病毒抗原的细胞的免疫应答; 以及
 - (c) 在所述第二阶段期间, 以约3个月的间隔向所述人施用包含编码埃博拉病毒抗原的第二复制缺陷型腺病毒载体的第二组合物总共3次, 该埃博拉病毒抗原在所述人中诱导针对表达埃博拉病毒抗原的细胞的免疫应答; 其中所述第二阶段在所述第一阶段结束后约3个月开始。
81. 根据权利要求59-80中任一项所述的方法, 其中由所述第一复制缺陷型腺病毒载体编码的埃博拉病毒抗原与由所述第二复制缺陷型腺病毒载体编码的埃博拉病毒抗原相同。
82. 根据权利要求65-81中任一项所述的方法, 其中由所述第一复制缺陷型腺病毒载体编码的埃博拉病毒抗原与由所述第二复制缺陷型腺病毒载体编码的埃博拉病毒抗原不同。
83. 根据权利要求65-82中任一项所述的方法, 其中所述第一复制缺陷型腺病毒载体与所述第二复制缺陷型腺病毒载体是相同的。
84. 根据权利要求65-83中任一项所述的方法, 其中所述第一复制缺陷型腺病毒载体包含复制缺陷型5型腺病毒载体。
85. 根据权利要求65-84中任一项所述的方法, 其中所述第二复制缺陷型腺病毒载体包

含复制缺陷型5型腺病毒载体。

86. 根据权利要求65-85中任一项所述的方法, 其中所述第一复制缺陷型腺病毒载体包含与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6及其任意组合的序列具有60%-100%的序列同一性的序列。

87. 根据权利要求65-86中任一项所述的方法, 其中所述第二复制缺陷型腺病毒载体包含与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6及其任意组合的序列具有60%-100%的序列同一性的序列。

88. 根据权利要求65-87中任一项所述的方法, 其中由所述第一或所述第二复制缺陷型腺病毒载体编码的埃博拉病毒抗原包含25个氨基酸或更少的修饰。

89. 根据权利要求88所述的方法, 其中由所述第一或所述第二复制缺陷型腺病毒载体编码的埃博拉病毒抗原包含20、15、10或5个氨基酸或更少的修饰。

90. 根据权利要求88所述的方法, 其中由所述第一或所述第二复制缺陷型腺病毒载体编码的埃博拉病毒抗原包含1个氨基酸的修饰。

91. 根据权利要求65-90中任一项所述的方法, 其中所述第一复制缺陷型腺病毒载体包含E2b基因区的缺失。

92. 根据权利要求91所述的方法, 其中所述第一复制缺陷型腺病毒载体进一步包含E1基因区的缺失。

93. 根据权利要求91或92中任一项所述的方法, 其中所述第一复制缺陷型腺病毒载体进一步包含E3基因区的缺失。

94. 根据权利要求91-93中任一项所述的方法, 其中所述第一复制缺陷型腺病毒载体进一步包含E4基因区的缺失。

95. 根据权利要求65-94中任一项所述的方法, 其中所述第二复制缺陷型腺病毒载体包含E2b基因区的缺失。

96. 根据权利要求95所述的方法, 其中所述第二复制缺陷型腺病毒载体进一步包含E1基因区的缺失。

97. 根据权利要求95或96中任一项所述的方法, 其中所述第二复制缺陷型腺病毒载体进一步包含E3基因区的缺失。

98. 根据权利要求中任一项所述的方法95-97, 其中所述第二复制缺陷型腺病毒载体进一步包含E4基因区的缺失。

99. 根据权利要求65-98中任一项所述的方法, 其中所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含至少 1.0×10^{11} 、 1.5×10^{11} 、 2.0×10^{11} 、 2.5×10^{11} 、 3.0×10^{11} 、 3.5×10^{11} 、 4.0×10^{11} 、 4.5×10^{11} 、 4.8×10^{11} 、 4.9×10^{11} 、 4.95×10^{11} 或 4.99×10^{11} 个含有所述重组核酸载体的病毒颗粒。

100. 根据权利要求65-99中任一项所述的方法, 其中所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含至多 7.0×10^{11} 、 6.5×10^{11} 、 6.0×10^{11} 、 5.5×10^{11} 、 5.2×10^{11} 、 5.1×10^{11} 、 5.05×10^{11} 或 5.01×10^{11} 个病毒颗粒。

101. 根据权利要求99或100所述的方法, 其中所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含 $1.0-7.0 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。

102. 根据权利要求99或100所述的方法, 其中所述第一组合物、所述第二组合物或这两

种组合物包含 $4.5-5.5 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。

103. 根据权利要求99或100所述的方法, 其中所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含 $4.8-5.2 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。

104. 根据权利要求99或100所述的方法, 其中所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含 $4.9-5.1 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。

105. 根据权利要求99或100所述的方法, 其中所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含 $4.95-5.05 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。

106. 根据权利要求99或100所述的方法, 其中所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含 $4.99-5.01 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。

107. 根据权利要求59-106中任一项所述的方法, 其中所述针对埃博拉病毒抗原的免疫应答增加了至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或25倍。

108. 根据权利要求59-106中任一项所述的方法, 其中所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性抗体应答。

109. 根据权利要求59-106中任一项所述的方法, 其中所述免疫应答被测量为中和埃博拉病毒抗原特异性抗体应答。

110. 根据权利要求59-106中任一项所述的方法, 其中所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性细胞介导的免疫(CMI)。

111. 根据权利要求59-106中任一项所述的方法, 其中所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性IFN- γ 分泌。

112. 根据权利要求59-106中任一项所述的方法, 其中所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性IL-2分泌。

113. 根据权利要求59-106中任一项所述的方法, 其中通过ELISpot测定来测量所述针对埃博拉病毒抗原的免疫应答。

114. 根据权利要求113所述的方法, 其中所述埃博拉病毒抗原特异性CMI大于25、50、75、100、150、200、250或300个IFN- γ 斑点形成细胞(SFC)/ 10^6 个外周血单核细胞(PBMC)。

115. 根据权利要求59-106中任一项所述的方法, 其中通过CAP-1脉冲抗原呈递细胞、来自埃博拉感染的细胞系或自体埃博拉感染的细胞的表达同种异体埃博拉病毒抗原的细胞的T细胞裂解来测量所述免疫应答。

116. 根据权利要求59-115中任一项所述的方法, 其中第一或第二复制缺陷型腺病毒感染所述人中的树突细胞, 并且其中感染的树突细胞呈递所述埃博拉病毒抗原, 从而诱导所述免疫应答。

117. 根据权利要求59-116中任一项所述的方法, 其中所述施用包括皮下施用。

118. 根据权利要求59-117中任一项所述的方法, 其中在所述施用步骤之前, 所述人携带大于50、75、100、125、150、160、175、200、225、250、275或300的逆Ad5中和抗体滴度。

119. 根据权利要求59-118中任一项所述的方法, 其中所述人具有大于250、500、750、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或4767的逆Ad5中和抗体滴度。

120. 根据权利要求59-119中任一项所述的方法, 其中所述人不同时通过类固醇、皮质类固醇、免疫抑制剂和免疫治疗中的任一种进行治疗。

121. 根据权利要求59-120中任一项所述的方法, 其中所述人在所述施用步骤之前未通

过类固醇、皮质类固醇、免疫抑制剂和免疫治疗中的任一种进行治疗。

122. 根据权利要求59-121中任一项所述的方法,其中所述人没有自身免疫病。

123. 根据权利要求59-122中任一项所述的方法,其中所述人没有炎症肠病、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、硬皮病、多发性硬化、病毒性肝炎或HIV。

124. 根据权利要求59-123中任一项所述的方法,其中所述人患有自身免疫相关甲状腺疾病或白癜风。

125. 根据权利要求59-124中任一项所述的方法,其中所述人具有表达所述埃博拉病毒抗原的细胞。

126. 根据权利要求59-124中任一项所述的方法,其中所述人不具有表达所述埃博拉病毒抗原的细胞。

127. 根据权利要求59-126中任一项所述的方法,其中所述人具有埃博拉病毒感染的至少一种、两种或三种症状。

128. 根据权利要求59-127中任一项所述的方法,其中所述人在所述施用之前已接受过治疗。

129. 根据权利要求65-128中任一项所述的方法,其中在所述第一阶段之前,所述人已接受过至少一种选自下组的药物治疗:采用口服或静脉内流体的补液,血液制品,免疫治疗,用于特定症状如发烧、疲劳、肌肉疼痛、头痛和喉咙痛、呕吐、腹泻、皮疹、受损的肾功能和肝功能以及内出血和外出血的药物或治疗。

130. 根据权利要求59-129中任一项所述的方法,其中所述人同时接受化疗或放疗治疗。

131. 根据权利要求59-130中任一项所述的方法,其中所述人同时接受包括施用氟嘧啶、伊立替康、奥沙利铂、贝伐单抗、卡培他滨、丝裂霉素、瑞戈非尼、西妥昔单抗、帕尼单抗和对乙酰氨基酚中的至少一种药物的治疗。

132. 根据权利要求59-131中任一项所述的方法,其中所述人包含过表达所述埃博拉病毒抗原的细胞。

133. 根据权利要求132所述的方法,其中所述过表达所述埃博拉病毒抗原的细胞对所述埃博拉病毒抗原的过表达超过非感染细胞中埃博拉病毒抗原的基线表达的至少2、3、4、5、10、15或20倍。

134. 根据权利要求132或133所述的方法,其中所述过表达所述埃博拉病毒抗原的细胞包括埃博拉感染的细胞。

135. 根据权利要求132-134中任一项所述的方法,其中所述过表达所述埃博拉病毒抗原的细胞包括免疫细胞。

136. 根据权利要求132-135中任一项所述的方法,其中所述过表达所述埃博拉病毒抗原的细胞包括血细胞。

137. 根据权利要求132-136中任一项所述的方法,其中所述过表达所述埃博拉病毒抗原的细胞包括上皮细胞。

138. 根据权利要求59-137中任一项所述的方法,其中所述埃博拉病毒抗原为来自EBOV、SUDV、TAFV、BDBV、RESTV或其任意组合的抗原。

用于埃博拉病毒疫苗接种的方法和组合物

交叉引用

[0001] 本申请要求于2015年1月9日提交的美国临时申请号62/101,968的优先权,该申请通过引用而整体并入本文。

背景技术

[0001] 埃博拉病毒(Ebola viruses)——线状病毒科(Filoviridae)的成员,与人类和非人灵长类动物的高致死性出血热的爆发相关联。本迪布焦埃博拉病毒、扎伊尔埃博拉病毒和苏丹埃博拉病毒均与非洲的大规模疫情爆发相关联。西非目前埃博拉疫情爆发的严重性强调了对持久压缩埃博拉疫苗(其涵盖用于没有常规途径获得医疗护理的危险群体的许多菌株)的医疗需求。虽然一些基于重组腺病毒的疫苗在单次免疫后赋予了良好的保护来抵抗多种埃博拉菌株,但其在人类中的功效经常由于预先存在的对如上所述腺病毒的免疫力而受损。

[0002] 特别感兴趣的是基于Ad5的免疫治疗剂,其已被反复用于人类中,以诱导稳定的T细胞介导的免疫(CMI)应答,均同时保持充分的安全性谱。此外,Ad5载体可大量可靠地进行生产,并且对于用于门诊施用的储存和递送是稳定的。然而,使用第一代(E1缺失型)基于Ad5的载体的主要障碍在于高频率的预先存在的抗5型腺病毒中和抗体。这些抗体可存在于潜在疫苗接受者中,这是由于先前的野生型腺病毒感染和/或通过重复注射基于Ad5的疫苗而对腺病毒中和抗体的诱导,均导致对靶EA的免疫刺激不充足。

[0003] 采用腺病毒载体的主要问题在于它们无法维持长期的转基因表达,这主要是由于宿主免疫应答消除了有免疫能力的受试者中的腺病毒载体和病毒转导细胞。因此,第一代腺病毒载体疫苗的使用受到预先存在的或诱导的疫苗对腺病毒(Ad)的免疫力的严重限制(Yang等人,J Virol 77/799-803(2003);Casimiro等人,J Virol 77/6305-6313(2003))。一个小组报道,人类具有抗5型腺病毒(Ad5,最广泛使用的基因转移载体血清型)抗体的优势,并报道所研究的三分之二的人类具有抗Ad的淋巴增殖反应(Chirmule等人,Gene Ther 6/1574-1583(1999))。在另一项研究中,携带HIV-1包膜基因的腺病毒载体疫苗不能使用没有佐剂的DNA再次免疫初次免疫应答(Barouch等人,J.Virol 77/8729-8735(2003))。另一小组报道,具有预先存在的抗Ad5免疫力的非人灵长类动物由于用Ad5进行单次免疫而不能产生针对HIV蛋白的转基因特异性抗体,以及改变整个T细胞应答(McCoy等人,J.Virol 81/6594-6604(2007))。

[0004] 存在预先存在的免疫力干扰腺病毒载体疫苗的许多机制,但一个主要关注的问题是,在Ad感染的携带抗原的细胞的细胞介导的免疫消除之前存在中和抗体。这两种应答均可导向数种Ad蛋白。一种方法是增加载体疫苗剂量。尽管有证据证明,增加疫苗剂量可增加Ad免疫动物中对期望的细胞介导的免疫(CMI)应答的诱导(Barouch等人,J.Virol 77/8729-8735(2003)),但其经常导致动物和人类中不可接受的不良反应。当使用第一代Ad5载体疫苗时,一种选择可以是使用异源初次-加强方案的方法,即使用裸(非载体)DNA作为引发接种疫苗,然后采用Ad5载体进行免疫。该方案可导致针对Ad5的后续免疫应答,从而使得

不能用使用了相同病毒骨架的相同(或不同)腺病毒载体疫苗施用进一步的再次免疫(加强)。因此,采用当前第一代Ad5载体,使用该方法也可消除Ad5载体免疫在Ad5免疫疫苗接种者中的任何进一步使用。

[0005] 第一代(E1缺失型)腺病毒载体疫苗表达Ad晚期基因,尽管是以比野生型Ad病毒更低的水平且在更长的时间段内表达(Nevins等人,Cell 26/213-220(1981);Gaynor等人,Cell 33/683-693(1983);Yang等人,J Virol 70/7209-7212(1996))。当使用第一代腺病毒载体进行免疫时,疫苗抗原与高度免疫原性的Ad衣壳蛋白被同时呈递给免疫系统。采用这些腺病毒载体的主要问题是产生的免疫应答不太可能针对所需的疫苗表位(McMichael等人,Nat Rev Immunol 2/283-291(2002)),并且更有可能针对腺病毒衍生的抗原,即抗原竞争。关于第一代腺病毒载体是有效免疫原的机制存在争议。已经假设,Ad衣壳的组成或病毒基因的毒性作用产生广泛的炎症,从而导致非特异性免疫刺激作用。Ad的E1蛋白用于抑制感染后的炎症(Schaack等人,PNAS 101/3124-3129(2004))。这些蛋白质的基因区段的去除(这是第一代腺病毒载体的情况)导致增加的炎症水平(Schaack等人,PNAS 101/3124-3129(2004);Schaack等人,Viral Immunol 18/79-88(2005))。

[0006] 因此,显然仍需要更有效的埃博拉疫苗载体候选物。Ad疫苗载体允许长期免疫应答、多次疫苗接种和在具有预先存在的对Ad的免疫力的个体中的疫苗接种。本发明提供了该优势以及其他优势。

发明内容

[0007] 本发明涉及用于产生针对靶抗原,特别是与埃博拉细胞有关的靶抗原的免疫应答的方法和腺病毒载体。因此,本发明进一步提供了编码一种或多种感兴趣的靶抗原或其片段或变体的核酸序列。因此,本发明提供了编码来自如本文进一步描述的任何来源的靶抗原的多核苷酸,包含这样的多核苷酸的载体和用这样的表达载体转化或转染的宿主细胞。

[0008] 克服抗Ad免疫力的尝试包括使用Ad5病毒衣壳蛋白中的替代性Ad血清型和/或替代物,其中每一种均具有有限的成功和显著改变所得疫苗的生物分布的潜力。因此,通过进一步降低来自E1缺失型Ad5载体的病毒蛋白质,即已知是预先存在的Ad免疫力靶标的蛋白质的表达,来尝试完全新颖的方法。具体而言,已对新型重组Ad5平台在早期1(E1)基因区域中的缺失以及在早期2b(E2b)基因区域中的额外缺失(Ad5[E1-,E2b-])进行了描述。E2b区(编码DNA聚合酶和前末端蛋白)的缺失导致降低的病毒DNA复制和晚期病毒蛋白表达。先前已报道该载体平台在癌症和感染性疾病的动物模型中成功地诱导CMI应答,并且更重要的是,该重组Ad5基因递送平台克服了Ad5免疫力的屏障,并且可用于预先存在和/或载体诱导的Ad免疫力的环境中,从而能够实现疫苗的多次同源施用。

[0009] 本公开内容提供了用于在个体中产生针对一种或多种埃博拉抗原的免疫应答的组合物、方法和试剂盒。提供了一种包含复制缺陷型腺病毒载体的组合物,该复制缺陷型腺病毒载体包含编码埃博拉病毒抗原的核酸序列,其中该埃博拉病毒抗原编码序列与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6及其组合的序列具有70%-100%的序列同一性。

[0010] 在一个方面,提供了一种包含重组核酸载体的组合物,其中该重组核酸载体包含复制缺陷型腺病毒载体;并且其中当施用于人时,该组合物能够在所述人中诱导针对表达

埃博拉病毒抗原的细胞的免疫应答,其中该免疫应答包括细胞介导的免疫。

[0011] 在一些实施方案中,所述复制缺陷型腺病毒载体包括复制缺陷型5型腺病毒载体。在一些实施方案中,所述复制缺陷型腺病毒载体包含E2b基因区的缺失。在一些实施方案中,所述埃博拉病毒抗原包含25个或更少的氨基酸的修饰。

[0012] 在一个方面,提供了一种包含重组复制缺陷型5型腺病毒载体的组合物,该腺病毒载体在包含编码埃博拉病毒抗原的序列的E2b基因区域中具有缺失,其中该埃博拉病毒抗原包含25个或更少的氨基酸的修饰。在一些实施方案中,所述埃博拉病毒抗原包含20、15、10、5个或更少的氨基酸的修饰。在一些实施方案中,所述埃博拉病毒抗原包含2、3或4个氨基酸的修饰。在一些实施方案中,所述埃博拉病毒抗原包含1个氨基酸的修饰。在一些实施方案中,所述复制缺陷型腺病毒载体包含E1基因区的缺失。在一些实施方案中,所述复制缺陷型腺病毒载体包含E3基因区的缺失。在一些实施方案中,所述复制缺陷型腺病毒载体包含E4基因区的缺失。在一些实施方案中,所述埃博拉病毒选自EBOV、SUDV、TAFV、BDBV、RESTV及其任意组合。在一些实施方案中,所述埃博拉病毒抗原包含与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6及其组合的序列具有至少80%的序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述埃博拉病毒抗原由与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6及其组合的序列具有至少90%的序列同一性的序列所编码。在一些实施方案中,所述埃博拉病毒抗原由与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6及其组合的序列具有至少95%的序列同一性的序列所编码。在一些实施方案中,所述埃博拉病毒抗原由与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6及其组合的序列具有至少97%的序列同一性的序列所编码。在一些实施方案中,所述埃博拉病毒抗原由与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6及其组合的序列具有至少99%的序列同一性的序列所编码。在一些实施方案中,所述埃博拉病毒抗原由与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6及其组合的序列具有100%的序列同一性的序列所编码。在一些实施方案中,所述重组核酸载体能够实现所述埃博拉病毒抗原在转染的细胞中的过表达。在一些实施方案中,所述重组核酸载体能够在人中诱导对表达埃博拉病毒抗原的细胞的特异性免疫应答,该特异性免疫应答是基线的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或25倍。在一些实施方案中,所述人具有大于50、75、100、125、150、175或200的逆Ad5中和抗体滴度。在一些实施方案中,所述人具有大于250、500、750、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或4767的逆Ad5中和抗体滴度。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性抗体应答。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为中和埃博拉病毒抗原特异性抗体应答。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性细胞介导的免疫(CMI)。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性IFN- γ 分泌。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性IL-2分泌。在一些实施方案中,通过ELISpot测定来测量针对所述埃博拉病毒抗原的免疫应答。在一些实施方案中,所述埃博拉病毒抗原特异性CMI大于25、50、75、100、150、200、250或300个IFN- γ 斑点形成细胞(SFC)/ 10^6 个外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方案中,通过CAP-1脉冲抗原呈递细胞、来自埃博拉感染的细胞系或自体埃博拉感染的细胞的表达同种异体埃博拉病毒抗原的细胞的T细胞裂解来测量所述免疫应答。在一些实施方案中,所述组合物

进一步包含免疫原性组分。在一些实施方案中,所述免疫原性组分包括选自IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13的细胞因子。在一些实施方案中,所述免疫原性组分选自IL-7、编码IL-7的核酸、与IL-7具有基本的同一性的蛋白质以及编码与IL-7具有基本的同一性的蛋白质的核酸。

[0013] 在一个方面,提供了一种小瓶,其包含由在0.8-1.2mL范围内的体积的治疗性溶液组成的组合物,该治疗性溶液包含 $2.5-7.5 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒;其中该病毒颗粒包含含有编码埃博拉病毒抗原的核酸序列的复制缺陷型腺病毒。

[0014] 在一些实施方案中,所述重组核酸载体能够实现所述埃博拉病毒抗原在转染的细胞中的过表达。在一些实施方案中,所述转染的细胞为E.C7细胞。在一些实施方案中,所述复制缺陷型腺病毒载体包括复制缺陷型5型腺病毒载体。在一些实施方案中,所述复制缺陷型腺病毒包含编码蛋白质的核酸序列,该蛋白质能够在人中诱导针对表达埃博拉病毒抗原的细胞的特异性免疫应答。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性抗体应答。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为中和埃博拉病毒抗原特异性抗体应答。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性细胞介导的免疫(CMI)。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性IFN- γ 分泌。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性IL-2分泌。在一些实施方案中,通过ELISpot测定来测量所述针对埃博拉病毒抗原的免疫应答。在一些实施方案中,所述埃博拉病毒抗原特异性CMI大于25、50、75、100、150、200、250或300个IFN- γ 斑点形成细胞(SFC)/ 10^6 个外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方案中,通过CAP-1脉冲抗原呈递细胞、来自埃博拉感染的细胞系或自体埃博拉感染的细胞的表达同种异体埃博拉病毒抗原的细胞的T细胞裂解来测量所述免疫应答。在一些实施方案中,所述治疗性溶液包含至少 1.0×10^{11} 、 1.5×10^{11} 、 2.0×10^{11} 、 2.5×10^{11} 、 3.0×10^{11} 、 3.5×10^{11} 、 4.0×10^{11} 、 4.5×10^{11} 、 4.8×10^{11} 、 4.9×10^{11} 、 4.95×10^{11} 或 4.99×10^{11} 个含有所述重组核酸载体的病毒颗粒。在一些实施方案中,所述治疗性溶液包含至多 7.0×10^{11} 、 6.5×10^{11} 、 6.0×10^{11} 、 5.5×10^{11} 、 5.2×10^{11} 、 5.1×10^{11} 、 5.05×10^{11} 或 5.01×10^{11} 个含有所述重组核酸载体的病毒颗粒。在一些实施方案中,所述治疗性溶液包含 $1.0-7.0 \times 10^{11}$ 个含有所述重组核酸载体的病毒颗粒。在一些实施方案中,所述治疗性溶液包含 $4.5-5.5 \times 10^{11}$ 个含有所述重组核酸载体的病毒颗粒。在一些实施方案中,所述治疗性溶液包含 $4.8-5.2 \times 10^{11}$ 个含有所述重组核酸载体的病毒颗粒。在一些实施方案中,所述治疗性溶液包含 $4.9-5.1 \times 10^{11}$ 个含有所述重组核酸载体的病毒颗粒。在一些实施方案中,所述治疗性溶液包含 $4.95-5.05 \times 10^{11}$ 个含有所述重组核酸载体的病毒颗粒。在一些实施方案中,所述治疗性溶液包含 $4.99-5.01 \times 10^{11}$ 个含有所述重组核酸载体的病毒颗粒。在一些实施方案中,所述小瓶进一步包含免疫原性组分。在一些实施方案中,所述免疫原性组分包括选自IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13的细胞因子。在一些实施方案中,所述免疫原性组分选自IL-7、编码IL-7的核酸、与IL-7具有基本的同一性的蛋白质以及编码与IL-7具有基本的同一性的蛋白质的核酸。

[0015] 在一个方面,提供了一种在产生针对埃博拉病毒抗原的免疫应答的方法,该方法包括向该人施用本文所述的组合物。

[0016] 在一个方面,提供了一种在产生针对埃博拉病毒抗原的免疫应答的方法,该方法包括向该人施用本文所述的小瓶中的组合物。

[0017] 在一些实施方案中,重复所述施用步骤至少一次。在一些实施方案中,在之前的施用步骤后约3周后重复所述施用步骤。在一些实施方案中,在之前的施用步骤后约3个月后重复所述施用步骤。在一些实施方案中,重复所述施用步骤两次。

[0018] 在一个方面,提供了在人中产生针对埃博拉病毒抗原的免疫应答的方法,该方法包括:治疗的第一阶段,其包括向所述人施用包含编码埃博拉病毒抗原的第一复制缺陷型腺病毒载体的第一组合物,该埃博拉病毒抗原在所述人中诱导针对表达埃博拉病毒抗原的细胞的免疫应答;以及随后的治疗的第二阶段,其包括向所述人施用包含编码埃博拉病毒抗原的第二复制缺陷型腺病毒载体的第二组合物,该埃博拉病毒抗原在所述人中诱导针对表达埃博拉病毒抗原的细胞的免疫应答。

[0019] 在一个方面,提供了治疗方法,其包括:选择治疗的第一阶段和治疗的第二阶段;在第一阶段期间,向人施用包含编码埃博拉病毒抗原的第一复制缺陷型腺病毒载体的第一组合物总共n次,该埃博拉病毒抗原在所述人中诱导针对表达埃博拉病毒抗原的细胞的免疫应答;以及在治疗的第二阶段期间,向所述人施用包含编码埃博拉病毒抗原的第二复制缺陷型腺病毒载体的第二组合物总计m次,该埃博拉病毒抗原在所述人中诱导针对表达埃博拉病毒抗原的细胞的免疫应答。

[0020] 在一些实施方案中,n大于1。在一些实施方案中,n为3。在一些实施方案中,m大于1。在一些实施方案中,m为3。在一些实施方案中,所述第一阶段为至少2、3、4、5、6、7或8周。在一些实施方案中,所述第二阶段为至少2、3、4、5、6、7或8个月。在一些实施方案中,所述第二阶段在第一阶段结束后3-16周开始。在一些实施方案中,在所述第一阶段,所述复制缺陷型腺病毒的两次施用相隔至少18天。在一些实施方案中,在所述第一阶段,所述复制缺陷型腺病毒的两次施用相隔约21天。在一些实施方案中,在所述第一阶段,所述复制缺陷型腺病毒的两次施用相隔至多24天。在一些实施方案中,在所述第二阶段,所述复制缺陷型腺病毒的两次施用相隔至少10周。在一些实施方案中,在所述第二阶段,所述复制缺陷型腺病毒的两次施用相隔约13周。在一些实施方案中,在所述第二阶段,所述复制缺陷型腺病毒的两次施用相隔至多16周。

[0021] 在一个方面,提供了治疗方法,其包括:选择治疗的第一阶段和第二阶段;在第一阶段期间,以约3周的间隔向人施用包含编码埃博拉病毒抗原的第一复制缺陷型腺病毒载体的第一组合物总共3次,该埃博拉病毒抗原在所述人中诱导针对表达埃博拉病毒抗原的细胞的免疫应答;以及在第二阶段期间,以约3个月的间隔向所述人施用包含编码埃博拉病毒抗原的第二复制缺陷型腺病毒载体的第二组合物总共3次,该埃博拉病毒抗原在所述人中诱导针对表达埃博拉病毒抗原的细胞的免疫应答;其中第二阶段在第一阶段结束后约3个月开始。

[0022] 在一些实施方案中,由所述第一复制缺陷型腺病毒载体编码的埃博拉病毒抗原与由所述第二复制缺陷型腺病毒载体编码的埃博拉病毒抗原相同。在一些实施方案中,由所述第一复制缺陷型腺病毒载体编码的埃博拉病毒抗原与由所述第二复制缺陷型腺病毒载体编码的埃博拉病毒抗原不同。在一些实施方案中,所述第一复制缺陷型腺病毒载体与所述第二复制缺陷型腺病毒载体是相同的。在一些实施方案中,所述第一复制缺陷型腺病毒载体包含复制缺陷型5型腺病毒载体。在一些实施方案中,所述第二复制缺陷型腺病毒载体包含复制缺陷型5型腺病毒载体。在一些实施方案中,所述第一复制缺陷型腺病毒载体包含

与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6及其任意组合的序列具有60%-100%的序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述第二复制缺陷型腺病毒载体包含与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6及其任意组合的序列具有60%-100%的序列同一性的序列。在一些实施方案中,由所述第一或所述第二复制缺陷型腺病毒载体编码的埃博拉病毒抗原包含25个氨基酸或更少的修饰。在一些实施方案中,由所述第一或所述第二复制缺陷型腺病毒载体编码的埃博拉病毒抗原包含20、15、10或5个氨基酸或更少的修饰。在一些实施方案中,由所述第一或所述第二复制缺陷型腺病毒载体编码的埃博拉病毒抗原包含1个氨基酸的修饰。在一些实施方案中,所述第一复制缺陷型腺病毒载体包含E2b基因区的缺失。在一些实施方案中,所述第一复制缺陷型腺病毒载体进一步包含E1基因区的缺失。在一些实施方案中,所述第一复制缺陷型腺病毒载体进一步包含E3基因区的缺失。在一些实施方案中,所述第一复制缺陷型腺病毒载体进一步包含E4基因区的缺失。在一些实施方案中,所述第二复制缺陷型腺病毒载体包含E2b基因区的缺失。在一些实施方案中,所述第二复制缺陷型腺病毒载体进一步包含E1基因区的缺失。在一些实施方案中,所述第二复制缺陷型腺病毒载体进一步包含E3基因区的缺失。在一些实施方案中,所述第二复制缺陷型腺病毒载体进一步包含E4基因区的缺失。在一些实施方案中,所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含至少 1.0×10^{11} 、 1.5×10^{11} 、 2.0×10^{11} 、 2.5×10^{11} 、 3.0×10^{11} 、 3.5×10^{11} 、 4.0×10^{11} 、 4.5×10^{11} 、 4.8×10^{11} 、 4.9×10^{11} 、 4.95×10^{11} 或 4.99×10^{11} 个含有所述重组核酸载体的病毒颗粒。在一些实施方案中,所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含至多 7.0×10^{11} 、 6.5×10^{11} 、 6.0×10^{11} 、 5.5×10^{11} 、 5.2×10^{11} 、 5.1×10^{11} 、 5.05×10^{11} 或 5.01×10^{11} 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含 $1.0-7.0 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含 $4.5-5.5 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含 $4.8-5.2 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含 $4.9-5.1 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含 $4.95-5.05 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含 $4.99-5.01 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述针对埃博拉病毒抗原的免疫应答增加了至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或25倍。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性抗体应答。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为中和埃博拉病毒抗原特异性抗体应答。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性细胞介导的免疫(CMI)。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性IFN- γ 分泌。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为埃博拉病毒抗原特异性IL-2分泌。在一些实施方案中,通过ELISpot测定来测量所述针对埃博拉病毒抗原的免疫应答。在一些实施方案中,所述埃博拉病毒抗原特异性CMI大于25、50、75、100、150、200、250或300个IFN- γ 斑点形成细胞(SFC)/ 10^6 个外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方案中,通过CAP-1脉冲抗原呈递细胞、来自埃博拉感染的细胞系或自体埃博拉感染的细胞的表达同种异体埃博拉病毒抗原的细胞的T细胞裂解来测量所述免疫应答。在一些实施方案中,第一或第二复制缺陷型腺病毒感染所述人中的树突细胞,并且其中感染的树突细胞呈递所述埃博拉病毒抗原,从而诱导所述免疫应答。在一些实施方案中,所述施用包括皮

下施用。在一些实施方案中,在所述施用步骤之前,所述人携带大于50、75、100、125、150、160、175、200、225、250、275或300的逆Ad5中和抗体滴度。在一些实施方案中,所述人具有大于250、500、750、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或4767的逆Ad5中和抗体滴度。在一些实施方案中,所述人不同时通过类固醇、皮质类固醇、免疫抑制剂和免疫治疗中的任一种进行治疗。在一些实施方案中,所述人在所述施用步骤之前未通过类固醇、皮质类固醇、免疫抑制剂和免疫治疗中的任一种进行治疗。在一些实施方案中,所述人没有自身免疫病。在一些实施方案中,所述人没有炎性肠病、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、硬皮病、多发性硬化、病毒性肝炎或HIV。在一些实施方案中,所述人具有自身免疫相关甲状腺疾病或白癜风。在一些实施方案中,所述人具有表达所述埃博拉病毒抗原的细胞。在一些实施方案中,所述人不具有表达所述埃博拉病毒抗原的细胞。在一些实施方案中,所述人具有埃博拉病毒感染的至少一种、两种或三种症状。在一些实施方案中,所述人在所述施用之前已接受过治疗。在一些实施方案中,在所述第一阶段之前,所述人已接受过至少一种选自下组的药物治疗:采用口服或静脉内流体的补液,血液制品,免疫治疗,用于特定症状如发烧、疲劳、肌肉疼痛、头痛和喉咙痛、呕吐、腹泻、皮疹、受损的肾功能和肝功能以及内出血和外出血的药物或疗法。在一些实施方案中,所述人同时接受化疗或放疗治疗。在一些实施方案中,所述人同时接受包括施用氟嘧啶、伊立替康、奥沙利铂、贝伐单抗、卡培他滨、丝裂霉素、瑞戈非尼、西妥昔单抗、帕尼单抗和对乙酰氨基酚(acetaminophen)中的至少一种药物的治疗。在一些实施方案中,所述人包含过表达所述埃博拉病毒抗原的细胞。在一些实施方案中,所述过表达所述埃博拉病毒抗原的细胞对所述埃博拉病毒抗原的过表达超过非感染细胞中埃博拉病毒抗原的基线表达的至少2、3、4、5、10、15或20倍。在一些实施方案中,所述过表达所述埃博拉病毒抗原的细胞包括埃博拉感染的细胞。在一些实施方案中,所述过表达所述埃博拉病毒抗原的细胞包括免疫细胞。在一些实施方案中,所述过表达所述埃博拉病毒抗原的细胞包括血细胞。在一些实施方案中,所述过表达所述埃博拉病毒抗原的细胞包括上皮细胞。在一些实施方案中,所述埃博拉病毒抗原为来自EBOV、SUDV、TAFV、BDBV、RESTV或其任意组合的抗原。

援引并入

[0023] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请均通过引用而并入本文,其程度如同特别地且单独地指出每个单独的出版物、专利或专利申请通过引用而并入。

附图说明

[0024] 图1例示了显示来自用Ad5-空壳(空载体)免疫的小鼠的抗体水平的柱状图。用Ad5-空壳病毒颗粒(VP)以14天的间隔对小鼠进行三次免疫。每次免疫后抗Ad抗体(中和抗体)水平升高。

[0025] 图2例示了显示来自用Ad5-空壳免疫的小鼠的中和抗体(NAb)水平的柱状图。用Ad5-空壳VP以14天的间隔对小鼠进行三次免疫。每次免疫后中和抗体水平升高。光密度读数指示活靶细胞的存在。

[0026] 图3例示了埃博拉病毒基因组的一种结构。

[0027] 图4示例了HeLa细胞中Ad5[E1-,E2b-]载体的晚期基因表达的缺乏。用Ad5[E1-]-LacZ或用Ad5[E1-,E2b-]-LacZ载体感染HeLa细胞。收获蛋白质裂解物,并通过蛋白质印迹

法检测66kD纤突蛋白。作为阳性对照,包括来自增殖性感染的生长于补充细胞系中的Ad病毒的蛋白质裂解物的一部分。

[0028] 图5例示了疫苗接种小鼠和注射盐水或Ad5-空壳的对照小鼠的存活率。

[0029] 图6例示了疫苗接种小鼠(上)或对照小鼠(下)。注意到对照小鼠中的大量炎症,但在攻击后的疫苗接种小鼠中未观察到。

[0030] 图7例示了用Ad5[E1-,E2b-]-HA进行1次疫苗接种后,在Ad5免疫猴中诱导血细胞凝集抑制(HAI)滴度。注意到在免疫后14天检测到HAI活性,并且到第28天升高到显著高于第14天的水平($P<0.01$)。平均值 $\pm$ SEM。

[0031] 图8例示了已经生成的四种基于Ad5[E1-,E2b-]-EA的疫苗。

[0032] 图9例示了来自用Ad5[E1-,E2b-]-GP_{EZ}(左侧泳道)感染24小时的E.C7细胞的埃博拉GP的表达。注意到左侧泳道中GP蛋白条带的存在,并以大约125kDA迁移,但在右侧泳道(来自未感染细胞的裂解物)中未观察到。

具体实施方式

[0033] 以下段落更详细地描述了本发明的不同方面。除非有明确相反的指示,否则本发明的各个方面可与本发明的任何其他一个或多个方面相组合。特别地,任何被指示为优选或有利的特征可与被指示为优选或有利的特征中的任何其他特征相组合。如本文所用,除非另有说明,否则冠词“一个(a)”意指一个或多个,除非另有明确规定。如本文所用,除非另有说明,否则诸如“含有”、“含”、“包括(include或including)”等术语意指“包含(comprising)”。如本文所用,除非另有说明,否则术语“或”可以是结合性的或分离性的。如本文所用,除非另有说明,否则任何实施方案可与任何其他实施方案相组合。

[0034] 已经发现,Ad5[E1-,E2b-]载体不仅比Ad5[E1-]载体更安全,而且在诱导抗原特异性免疫应答方面似乎更优越,从而使得它们更适合作为递送可导致临床反应的埃博拉疫苗的平台。在其他情况下,免疫诱导可能需要数月。Ad5[E1-,E2b-]载体不仅比Ad5[E1-]载体更安全,而且在诱导抗原特异性免疫应答方面似乎更优越,从而使得它们更适合作为递送可导致临床反应的埃博拉疫苗的平台。

[0035] 本发明的各个实施方案通过利用新型Ad5[E1-,E2b-]载体系统为开发针对埃博拉的治疗疫苗提供长期受欢迎的需要的优势,克服了采用其他Ad5系统所发现的障碍,并允许对先前已经暴露于Ad5的人进行免疫。在本发明的其他实施方案中,通过利用新型Ad5[E1-,E2b-]载体系统为开发针对埃博拉的治疗疫苗提供长期受欢迎的需要的优势,克服了采用其他Ad5系统所发现的障碍,并允许对先前已经暴露于Ad5的人进行免疫。

[0036] “腺病毒”(Ad)是指来自腺病毒科的无包膜DNA病毒。这些病毒可在不限于人类、禽类、牛、猪和犬的物种中找到。本发明考虑使用来自腺病毒科(例如,禽腺病毒属(Aviadenovirus)、哺乳动物腺病毒属(Mastadenovirus)、腺嘌呤-胸腺嘧啶富集性腺病毒属(Atadenovirus)和唾液酸酶同源性腺病毒属(Siadenovirus))的四个属中的任何属的任何Ad作为E2b缺失型病毒载体或含有本文所述其他缺失的载体的基础。此外,在各个物种中

均发现了数种血清型。Ad还涉及这些病毒血清型中任一种的遗传衍生物,包括但不限于遗传突变、缺失或转座。

[0037] “辅助腺病毒”或“辅助病毒”是指可提供特定宿主细胞不能提供(该宿主可提供Ad基因产物如E1蛋白)的病毒功能的Ad。该病毒用于以反式提供第二种病毒或辅助依赖性病毒(例如,无内容(gutted)或无内容物(gutless)病毒,或特定区域如E2b或如本文所述的其他区域缺失的病毒)所缺乏的功能(例如,蛋白质);第一个复制缺陷型病毒被认为“帮助”第二个辅助依赖性病毒,从而允许细胞中第二个病毒基因组的产生。

[0038] “5型腺病毒空壳(adenovirus 5null)(Ad5-空壳(Ad5-null))”是指不包含用于表达的任何异源核酸序列的非复制型Ad。

[0039] “第一代腺病毒”是指具有早期区域1(E1)缺失的Ad。在另外的情况下,早期区域3(E3)也可能缺失。

[0040] “无内容(Gutted)”或“无内容物(gutless)”是指所有的病毒编码区均缺失的Ad载体。

[0041] “转染”是指将外来核酸引入真核细胞中。示例性的转染方法包括磷酸钙-DNA共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、聚凝胺介导的转染、电穿孔、显微注射、脂质体融合、脂转染、原生质体融合、逆转录病毒感染和生物射弹术(biolistics)。

[0042] “稳定的转染”或“稳定转染的”是指将外来核酸、DNA或RNA引入并整合到被转染细胞的基因组中。术语“稳定的转染子”是指已将外来DNA稳定地整合到基因组DNA中的细胞。

[0043] “报告基因”表示编码报告分子(例如,酶)的核苷酸序列。“报告分子”可在多种检测系统中的任一种中检测,该检测系统包括但不限于基于酶的检测分析(例如,ELISA、组织化学测定)、荧光、放射性和发光系统。可采用大肠杆菌(E.coli)β-半乳糖苷酶基因、绿色荧光蛋白(GFP)基因、人胎盘碱性磷酸酶基因、氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因以及其他报告基因。

[0044] “异源序列”是指与核酸序列连接或被操作以变成与该核酸序列连接的核苷酸序列,该核苷酸序列本质上不与该核酸序列连接或本质上在不同位置处与该核酸序列连接。异源核酸可包括天然存在的核苷酸序列或相对于天然存在的序列的一些修饰。

[0045] “转基因”是指被引入到受试者的细胞或基因组中的任何基因编码区(天然或异源的核酸序列或者融合的同源或异源核酸序列)。转基因可被携带在用于将转基因引入受试者的细胞中的任何病毒载体上。

[0046] “第二代腺病毒”是指具有E1、E2、E3的全部或部分的Ad,并且在某些实施方案中,从该病毒中删除(去除)E4DNA基因序列。

[0047] “受试者”是指任何动物,包括但不限于人类、非人灵长类动物(例如,恒河猴或其他类型的猕猴)、小鼠、猪、马、驴、牛、绵羊、大鼠和家禽。

[0048] “免疫原性片段”是指被B细胞和/或T细胞表面抗原受体特异性识别(即特异性结合)从而导致产生特异性针对片段的免疫应答的多肽的片段。

[0049] “靶抗原”或“靶蛋白”是指引起免疫应答的分子,如蛋白质。

[0050] “E2b缺失”是指发生突变以阻止至少一种E2b基因产物的表达和/或功能的DNA序列。因此,在某些实施方案中,“E2b缺失”用于涉及从Ad基因组删除(去除)的特定DNA序列。E2b缺失或“含有在E2b区内的缺失”是指在Ad基因组的E2b区内的至少一个碱基对的缺失。

因此,在某些实施方案中,多于一个碱基对缺失,而在另外的实施方案中,至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140或150个碱基对缺失。在另一个实施方案中,缺失是Ad基因组的E2b区内的多于150、160、170、180、190、200、250或300个碱基对的缺失。E2b缺失可以是阻止至少一种E2b基因产物的表达和/或功能的缺失,因此包括E2b特异性蛋白质的编码部分的外显子内的缺失以及启动子和前导序列内的缺失。在某些实施方案中,E2b缺失是阻止E2b区的DNA聚合酶和前末端蛋白中的一种或两种的表达和/或功能的缺失。在另外的实施方案中,“E2b缺失”是指Ad基因组的该区域的DNA序列中的一个或多个点突变,使得一种或多种编码的蛋白质是非功能性的。这样的突变包括被不同残基取代从而导致氨基酸序列的变化进而产生非功能性蛋白质的残基。

[0051] “E1缺失”是指发生突变以阻止至少一种E1基因产物的表达和/或功能的DNA序列。因此,在某些实施方案中,“E1缺失”用于涉及从Ad基因组删除(去除)的特定DNA序列。E1缺失或“含有在E1区内的缺失”是指在Ad基因组的E1区内的至少一个碱基对的缺失。因此,在某些实施方案中,多于一个碱基对缺失,而在另外的实施方案中,至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140或150个碱基对缺失。在另一个实施方案中,缺失是Ad基因组的E1区内的多于150、160、170、180、190、200、250或300个碱基对的缺失。E1缺失可以是阻止至少一种E1基因产物的表达和/或功能的缺失,因此包括E1特异性蛋白质的编码部分的外显子内的缺失以及启动子和前导序列内的缺失。在某些实施方案中,E1缺失是阻止E1区域的反式作用转录调控因子中的一种或两种的表达和/或功能的缺失。在另外的实施方案中,“E1缺失”是指Ad基因组的该区域的DNA序列中的一个或多个点突变,使得一种或多种编码的蛋白质是非功能性的。这样的突变包括被不同残基取代从而导致氨基酸序列的变化进而产生非功能性蛋白质的残基。

[0052] “产生免疫应答”或“诱导免疫应答”是指在一种或多种免疫细胞(T细胞、B细胞、抗原呈递细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞等)的数目方面或在这些免疫细胞中的一种或多种的活性(CTL活性、HTL活性、细胞因子分泌、细胞因子分泌谱的变化等)方面的统计学上显著的变化,例如,增加或减少。

[0053] 术语“核酸”和“多核苷酸”在本文中基本上可互换使用。本发明的多核苷酸可以是单链(编码链或反义链)或双链的,并且可以是DNA(例如,基因组DNA、cDNA或合成的DNA)或RNA分子。RNA分子可包括含有内含子并且以一对一的方式对应于DNA分子的HnRNA分子,以及不含内含子的mRNA分子。另外的编码或非编码序列可以但并不是必须存在于本发明的多核苷酸内,并且多核苷酸可以但并不是必须与其他分子和/或支持材料连接。如本文所用的分离的多核苷酸意指基本上远离其他编码序列的多核苷酸。例如,如本文所用的分离的DNA分子不含不相关的编码DNA的大部分,如大染色体片段或其他功能基因或多肽编码区。这是指如原始分离的DNA分子,并且不排除在实验室中后续重组添加到区段的基因或编码区。

[0054] 如本领域技术人员将会理解的,本发明的多核苷酸可包括基因组序列、外基因组序列和质粒编码的序列以及表达或可适于表达如本文所述的靶抗原、抗原片段、肽等的较小的工程化基因区段。这样的区段可自然地进行分离或人为地进行合成修饰。

[0055] 当比较多核苷酸序列时,如果两个序列中的核苷酸序列在进行如下所述的最大对应关系比对时是相同的,则这两个序列是“相同的”。通常通过比较对比窗口上的序列以鉴定并比较具有序列相似性的局部区域来进行两个序列之间的比较。如本文所用的“比较窗

口”是指至少约20个连续位置,通常为30至约75、40至约50个连续位置的区段,其中可在两个序列经过最佳比对后将一个序列与具有相同数目的连续位置的参考序列进行比较。可使用采用默认参数的生物信息学软件(DNASTAR, Inc., Madison, Wis.)的Lasergene套件中的Megalign程序来进行用于比较的序列的最佳比对。该程序体现了数种比对方案。

[0056] 或者,可通过Smith和Waterman, Add. APL. Math. 2:482 (1981)的本地同一性算法,通过Needleman和Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)的同一性比对算法,通过Pearson和Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)的相似性方法检索,通过这些算法(GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA和TFASTA)的计算机化实现,或通过检查来进行用于比较的序列的最佳比对。

[0057] 适用于确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的一个实例是BLAST和BLAST 2.0算法。例如,可利用本文所述参数,使用BLAST和BLAST 2.0来确定本发明的多核苷酸的百分比序列同一性。用于执行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心公开获得。在一个说明性实例中,对于核苷酸序列,可使用参数M(一对匹配残基的奖励得分;总是>0)和N(错配残基的罚分,总是<0)来计算累积分数。当出现以下情况时,每个方向上的单词点击(word hits)的延伸停止:累积比对得分从其最大获得值下降了数量X;由于一个或多个负评分残基比对的累积,使得累积得分变为零或以下;或者到达任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X决定了比对的灵敏度和速度。BLASTN程序使用以下默认设置:字长(W)为11,以及期望值(E)为10,以及BLOSUM62评分矩阵对齐,(B)为50,期望值(E)为10,M=5,N=-4以及两条链的比较。

[0058] 可通过在至少20个位置的比较窗口上比较两个最佳比对序列来确定“序列同一性百分比”,其中与用于两个序列最佳比对的参考序列(其不包括添加或缺失)相比,比较窗口中的多核苷酸序列的部分可包括20%或更少,通常5%至15%或10%至12%的添加或缺失(即空位)。通过以下方法来计算百分比:确定在两个序列中均出现的相同核酸碱基的位置的数目以得到匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以参考序列中的位置总数目,并将所得结果乘以100以得到序列同一性百分比。

[0059] 本领域普通技术人员将会理解,由于遗传密码的简并性,存在许多编码如本文所述的感兴趣的特定抗原或其片段的核苷酸序列。这些多核苷酸中的一些与任何天然基因的核苷酸序列具有最小的同源性。然而,本发明特别考虑了由于密码子使用的差异而变化的多核苷酸。此外,包含本文提供的多核苷酸序列的基因的等位基因在本发明的范围内。等位基因是由于一个或多个突变,如核苷酸的缺失、添加和/或置换而被改变的内源基因。所得到的mRNA和蛋白质可以但不必具有改变的结构或功能。可使用标准技术(如杂交、扩增和/或数据库序列比较)来鉴定等位基因。

[0060] 如熟练的技术人员在阅读本公开内容时将会理解的,Ad基因组的其他区域可以缺失。因此,如本文所用的,在Ad基因组的特定区域中“缺失”是指这样的特异性DNA序列,其发生突变使得阻止由该区域编码的至少一种基因产物的表达和/或功能。在某些实施方案中,在特定区域中“缺失”是指这样的特异性DNA序列,其从Ad基因组中被删除(去除)使得阻止由该区域编码的表达和/或功能(例如,DNA聚合酶的E2b功能或前末端蛋白功能)。“缺失”或在特定区域内“含有缺失”是指在Ad基因组的该区域内的至少一个碱基对的缺失。因此,在某些实施方案中,多于一个碱基对缺失,而在另外的实施方案中,至少20、30、40、50、60、70、

80、90、100、110、120、130、140或150个碱基对从特定区域缺失。在另一个实施方案中,缺失是Ad基因组的特定区域内的多于150、160、170、180、190、200、250或300个碱基对的缺失。这些缺失是阻止由该区域编码的基因产物的表达和/或功能的缺失。因此,缺失包括编码蛋白质部分的外显子内的缺失以及启动子和前导序列内的缺失。在进一步的实施方案中,Ad基因组的特定区域中的“缺失”是指Ad基因组的该区域的DNA序列中的一个或多个点突变,使得一种或多种编码的蛋白质是非功能性的。这样的突变包括被不同残基取代从而导致氨基酸序列的变化进而产生非功能性蛋白质的残基。Ad基因组中的缺失或突变可以在E1a、E1b、E2a、E2b、E3、E4、L1、L2、L3、L4、L5、TP、POL、IV和VA区中的一个或多个内。可使用重组技术产生本发明的缺失型腺病毒载体。

[0061] 熟练技术人员将会认识到,可使用组成型表达E2b基因产物和可能已被删除的任何必需基因的产物的合适包装细胞系,成功地使本发明中使用的Ad载体生长至高滴度。在某些实施方案中,可使用不仅组成型表达E1和DNA聚合酶蛋白而且还表达Ad前末端蛋白的HEK-293衍生的细胞。在一个实施方案中,使用E.C7细胞成功地使腺病毒载体的高滴度原种生长。

[0062] 为了从自我繁殖的腺病毒载体删除关键基因,可首先使由靶基因编码的蛋白质在HEK-293细胞或类似细胞中与E1蛋白一起共表达。例如,可选择性利用当组成型共表达时无毒的蛋白质(或可诱导表达的毒性蛋白质)。E1和E4基因在HEK-293细胞中的共表达是可能的。可共表达E1和蛋白IX基因(一种病毒体结构蛋白)。E1、E4和蛋白IX基因的进一步共表达也是可能的。E1和100k基因可在反式互补细胞系中表达,E1和蛋白酶基因也同样可以。

[0063] 描述了用于使高滴度的E2b缺失的Ad颗粒生长的共表达E1和E2b基因产物的细胞系。E2b区编码对Ad基因组复制而言必需的病毒复制蛋白。有用的细胞系组成型表达大约140kDa的Ad-DNA聚合酶和/或大约90kDa的前末端蛋白。特别是,没有毒性、具有E1、DNA聚合酶和前末端蛋白的高水平、组成型共表达的细胞系(例如E.C7)是用于繁殖用于多次疫苗接种的Ad所期望的。这些细胞系允许缺失E1、DNA聚合酶和前末端蛋白的腺病毒载体的繁殖

[0064] 可在Fisher-Hoch等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:317-321,1989;Flexner等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.569:86-103,1989;Flexner等人,Vaccine 8:17-21,1990;美国专利号4,603,112、4,769,330和5,017,487;WO 89/01973;美国专利号4,777,127;GB 2,200,651;EP 0,345,242;WO 91/02805;Berkner,Biotechniques 6:616-627,1988;Rosenfeld等人,Science 252:431-434,1991;Kolls等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:215-219,1994;Kass-Eisler等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:11498-11502,1993;Guzman等人,Circulation 88:2838-2848,1993;以及Guzman等人,Cir.Res.73:1202-1207,1993中找到关于病毒递送系统的进一步信息。

异源核酸

[0065] 本发明的腺病毒载体通常包含编码一种或多种感兴趣的靶抗原或其变体、片段或融合物的修饰的或异源的核酸序列,期望针对该靶抗原或其变体、片段或融合物产生免疫应答。在一些实施方案中,本发明的腺病毒载体通常包含编码可调节免疫应答的一种或多种蛋白质、其变体、其融合物或其片段的修饰的或异源的核酸序列。在本发明进一步的实施方案中,本发明的腺病毒载体编码针对特异性抗原如炭疽保护性抗原的一种或多种抗体,从而允许被动免疫治疗。在某些实施方案中,本发明的腺病毒载体包含编码具有治疗效果

(例如,抗病毒、抗细菌、抗寄生虫或抗肿瘤功能)的一种或多种蛋白质的修饰的或异源的核酸序列。因此,本发明提供了包含异源核酸序列的第二代E2b缺失型腺病毒载体。在一些实施方案中,所述异源的或修饰的核酸序列为EBOV、SUDV、TAFV、BDBV或RESTV抗原、其变体、其片段或其组合。在一些实施方案中,所述异源的或修饰的核酸序列为EBOV、SUDV、TAFV、BDBV或RESTV抗原、其变体、其片段或其组合的组合或融合物。在一些实施方案中,所述异源的或修饰的核酸序列为EBOV、SUDV、TAFV、BDBV或RESTV抗原、其变体、其片段或其组合的组合或融合物。

[0066] 特别是,本发明提供了改善的基于腺病毒(Ad)的疫苗,使得可实现针对一个或多个抗原性靶实体的多次疫苗接种。在一些实施方案中,所改善的基于腺病毒(Ad)的疫苗包含携带靶抗原、其片段、其变体或其变体片段,如Ad5[E1-,E2b-]-SEQ.ID.NO.:1、Ad5[E1-,E2b-]-SEQ.ID.NO.:2、Ad5[E1-,E2b-]-SEQ.ID.NO.:4、Ad5[E1-,E2b-]-SEQ.ID.NO.:5、Ad5[E1-,E2b-]-SEQ.ID.NO.:6的复制缺陷型腺病毒。在一些实施方案中,所改善的基于腺病毒(Ad)的疫苗包含携带靶抗原、其片段、其变体或其变体片段,如Ad5[E1-,E2b-]-GP、Ad5[E1-,E2b-]-NP、Ad5[E1-,E2b-]-VP40、Ad5[E1-,E2b-]-VP35、Ad5[E1-,E2b-]-VP30和Ad5[E1-,E2b-]-VP24的复制缺陷型腺病毒。可基于多种因素,包括免疫原性潜力来选择靶抗原,例如EBOV、SUDV、TAFV、BDBV或RESTV抗原的变体和/或片段,如GP、NP、VP40、VP35、VP30或VP24。因此,在本发明的各个实施方案中使用EBOV、SUDV、TAFV、BDBV或RESTV抗原的突变体,如GP、NP、VP40、VP35、VP30或VP24抗原的突变体,这是因为其相对于野生型形式引起免疫应答的能力增强。重要的是,疫苗接种可在预先存在的对Ad的免疫力的存在下进行,和/或施用于先前采用本发明的腺病毒载体或其他腺病毒载体免疫多次的受试者。可向受试者多次施用本发明的腺病毒载体,以诱导针对感兴趣的抗原,例如EBOV、SUDV、TAFV、BDBV或RESTV抗原,如GP、NP、VP40、VP35、VP30或VP24的免疫应答,包括但不限于产生针对EBOV、SUDV、TAFV、BDBV或RESTV,如GP、NP、VP40、VP35、VP30或VP24和/或如本文所述并且可在GenBank上公开获得的一种或多种埃博拉病毒菌株中的一种或多种靶抗原的抗体和细胞介导的免疫应答。

[0067] 免疫原性多肽可以是来自扎伊尔埃博拉(GenBank:KJ660347.2)的RNA序列或其片段。在一些实施方案中,所述复制缺陷型腺病毒载体包含编码与该免疫原性多肽具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.9%的同一性的核苷酸或多肽的序列。

[0068] 在一些实施方案中,所述编码免疫原性多肽的序列包含SEQ.ID.NO.:1的序列。在一些实施方案中,所述编码免疫原性核苷酸或多肽的序列包含与SEQ.ID.NO.:1具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.9%的同一性的序列或通过针对人类基因组优化的备选密码子替换从SEQ.ID.NO.:1生成的序列。在一些实施方案中,由本文所述的腺病毒载体编码的免疫原性多肽包含与野生型GenBank序列(扎伊尔KJ660347)相比的至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40个或更多个点突变,如单氨基酸置换或缺失。

[0069] 在一些实施方案中,所述编码免疫原性多肽的序列包含SEQ.ID.NO.:2的序列。在一些实施方案中,所述编码免疫原性核苷酸或多肽的序列包含与SEQ.ID.NO.:2具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.9%的同一性的序列或通过针

对人类基因组优化的备选密码子替换从SEQ. ID. NO:2生成的序列。在一些实施方案中,由本文所述的腺病毒载体编码的免疫原性多肽包含与野生型GenBank序列(苏丹KC545392.1)相比的至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40个或更多个点突变,如单氨基酸置换或缺失。

[0070] 在一些实施方案中,所述编码免疫原性多肽的序列包含SEQ. ID. NO.:4的序列。在一些实施方案中,所述编码免疫原性核苷酸或多肽的序列包含与SEQ. ID. NO:4具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.9%的同一性的序列或通过针对人类基因组优化的备选密码子替换从SEQ. ID. NO:4生成的序列。在一些实施方案中,由本文所述的腺病毒载体编码的免疫原性多肽包含与野生型GenBank序列(Tai Forest NC_014372.1)相比的至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40个或更多个点突变,如单氨基酸置换或缺失。

[0071] 在一些实施方案中,所述编码免疫原性多肽的序列包含SEQ. ID. NO.:5的序列。在一些实施方案中,所述编码免疫原性核苷酸或多肽的序列包含与SEQ. ID. NO:5具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.9%的同一性的序列或通过针对人类基因组优化的备选密码子替换从SEQ. ID. NO:5生成的序列。在一些实施方案中,由本文所述的腺病毒载体编码的免疫原性多肽包含与野生型NCBI序列Bundibugyo埃博拉病毒(NC_014373.1)相比的至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40个或更多个点突变,如单氨基酸置换或缺失。

[0072] 在一些实施方案中,所述编码免疫原性多肽的序列包含SEQ. ID. NO.:6的序列。在一些实施方案中,所述编码免疫原性核苷酸或多肽的序列包含与SEQ. ID. NO:6具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%的同一性的序列或通过针对人类基因组优化的备选密码子替换从SEQ. ID. NO:6生成的序列。在一些实施方案中,由本文所述的腺病毒载体编码的免疫原性多肽包含与野生型雷斯顿埃博拉病毒(GenBank: JX477166.1)相比的至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40个或更多个点突变,如单氨基酸置换或缺失。

[0073] 在各个实施方案中,本文所述的腺病毒衍生的载体在E2b区中以及任选地在E1区中具有缺失,该缺失赋予在本文所述的免疫治疗中使用载体的多种优势。

[0074] 在构建本发明的复制缺陷型腺病毒载体时,腺病毒基因组内的某些区域发挥基本功能,并且对于维持基本上保守可能是必需的。(参见,Lauer等人,J.Gen.Virology,85,2615-2625(2004));Leza等人,J.Virology,pp.3003-3013(1988);以及Miralles等人,JBC.Vol.264,No.18,pp.10763-10772(1983))。

[0075] 第一代基于E1缺失型腺病毒亚型5(Ad5)的载体虽然有希望用作癌症疫苗的平台,但在活性方面受到天然存在或诱导的Ad特异性中和抗体的阻碍。具有E1和E2b区缺失的基于Ad5的载体(Ad5[E1-,E2b-]) (后者编码DNA聚合酶和前末端蛋白),凭借降低的晚期病毒蛋白表达,提供机会来避免免疫学清除,并诱导针对Ad-免疫宿主中编码的抗原转基因的更有效的免疫应答。

[0076] 尽管存在预先存在的或诱导的Ad5中和抗体,但根据本发明可使用编码埃博拉抗原的Ad5[E1-,E2b-]-EA进行的多次同源免疫来诱导小鼠中具有抗埃博拉活性的EA特异性细胞介导的免疫(CMI)应答。可用递增剂量的Ad5[E1-,E2b-]-EA免疫埃博拉患者的队列。尽

管在许多或大多数患者中存在预先存在的Ad5免疫力,但仍可观察到EA特异性CMI应答。重要的是,不论预先存在的Ad5中和抗体滴度如何,最小的毒性和总患者存活期可以是相似的。在埃博拉感染受试者中,新型Ad5[E1-,E2b-]基因递送平台可用于在天然获得的和免疫诱导的Ad5特异性免疫力的环境中产生对埃博拉抗原的显著CMI应答。埃博拉抗原特异性CMI可以是,例如,大于10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、5000、10000个或更多个IFN- γ 斑点形成细胞(SFC)/ 10^6 个外周血单核细胞(PBMC)。因此,本发明的方法和组合物涉及重组核酸载体,其中该重组核酸载体包含复制缺陷型腺病毒载体,并且其中在施用于人时,该组合物能够在所述人中诱导针对表达埃博拉抗原的细胞的免疫应答。即使在预先存在的抗Ad5免疫力的存在下,也可诱导免疫应答。在一些实施方案中,在具有大于50、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、6000、7000、8000、9000、10000、12000、15000或更高的预先存在的逆Ad5中和抗体滴度的人类受试者中产生免疫应答。免疫应答可包括如本文所述的细胞介导的免疫和/或体液免疫。免疫应答可通过下组中的一种或多种测定来进行测量:如本文所述并达到可被本领域技术人员实现的程度的细胞内细胞因子染色(ICS)、ELISpot、增殖测定、细胞毒性T细胞测定(包括铬释放或等同测定)和使用任何数目的聚合酶链反应(PCR)的基因表达分析或基于RT-PCR的测定,以及本领域已知的用于测量免疫应答的任何其他合适的测定。

[0077] 通过递送埃博拉相关抗原(EA)实现的埃博拉免疫治疗提供了一定的存活期益处,然而,存在对这些策略的限制,并且需要更多的免疫有效的疫苗。为了解决低免疫原性,提供了多种高级的多组分疫苗接种策略,包括佐剂和免疫刺激细胞因子的共同施用。本发明涉及内在提供先天性促炎信号而同时工程化为表达感兴趣的抗原的重组病毒载体。特别感兴趣的是基于腺病毒血清型-5(Ad5)的免疫治疗剂,其已被反复用于人类中,以诱导稳定的T细胞介导的免疫(CMI)应答,均同时保持充分的安全性谱。此外,Ad5载体可大量可靠地进行生产,并且对于用于门诊施用的储存和递送是稳定的。然而,使用第一代(E1缺失型)基于Ad5的载体的主要障碍在于高频率的预先存在的抗5型腺病毒中和抗体。这些抗体可存在于潜在疫苗接受者中,这是由于先前的野生型腺病毒感染和/或通过重复注射基于Ad5的疫苗而对腺病毒中和抗体的诱导,每种均导致对靶EA的免疫刺激不充足。

[0078] 本文提供了包含针对EBOV、SUDV、TAFV、BDBV或RESTV抗原的基因插入片段的Ad5[E1-,E2b-]平台,其具有增强T细胞应答的修饰,并且用于本发明的各个实施方案中以用于引起针对至少一种EBOV、SUDV、TAFV、BDBV或RESTV抗原的免疫应答的治疗。尽管小鼠中存在现有的Ad5免疫力,但采用该Ad5平台进行的多次免疫仍可用于诱导具有抗埃博拉活性的EBOV、SUDV、TAFV、BDBV或RESTV抗原特异性CMI应答。在一些实施方案中,Ad5[E1-,E2B-]包含SEQ.ID.NO.:1、SEQ.ID.NO.:2、SEQ.ID.NO.:4、SEQ.ID.NO.:5、SEQ.ID.NO.:6或其组合。在一些实施方案中,Ad5[E1-,E2B-]包含来自GenBank的EBOV、SUDV、TAFV、BDBV或RESTV抗原编码序列。在一些实施方案中,Ad5[E1-,E2B-]包含来自GenBank或NCBI的人类分离株的EBOV、SUDV、TAFV、BDBV或RESTV抗原编码序列的亚种。考虑如本文所提供的EBOV、SUDV、TAFV、BDBV或RESTV免疫治疗的I/II期临床试验将证明,可在相对于预先存在的Ad5免疫力的存在对临床结果不产生实质性影响的情况下诱导人类CMI中的安全性和免疫原性。

EBOV作为免疫应答的靶标

[0079] 埃博拉病毒 (EBOV) 是线状病毒科的成员。其基因组包含大约19-kb大小的单链RNA分子。埃博拉病毒体是丝状颗粒,其可以以“U”或“6”的牧羊杖形状出现,并且它们可以是盘绕的、环形的或分支形的。通常,埃博拉病毒体为80纳米 (nm) 宽,并且可长达14,000nm。EBOV可细分为至少五种具有不同致病性水平的不同物种。五种不同埃博拉病毒 (BDBV、EBOV、RESTV、SUDV和TAFV) 的基因组在序列以及基因重叠的数目和位置方面有所不同。

[0080] 埃博拉病毒呈丝状颗粒 (给予了该病毒特征名称),有包膜,不分区段,具有负链RNA和不同的形态。埃博拉病毒基因组含有七种基因,即核蛋白 (NP)、病毒体蛋白 (VP) 35、VP40、糖蛋白 (GP)、VP30、VP24和RNA依赖性RNA聚合酶 (L)。除GP之外,所有基因均为单顺反子并编码一种结构蛋白。病毒的内部核糖核蛋白复合体含有被NP包封的RNA基因组,其中NP与VP35、VP30和RNA依赖性RNA聚合酶联合形成功能性转录酶-复制酶复合体。核糖核蛋白复合体的蛋白质具有额外的功能,如为干扰素拮抗剂的VP35。VP40是一种基质蛋白,并介导病毒颗粒形成。VP24是与膜相关联的另一种结构蛋白,并干扰干扰素信号传导。GP是唯一的跨膜表面蛋白,并形成由两个二硫键连接的弗林蛋白酶切割片段GP-1和GP-2组成的三聚体刺突。埃博拉病毒相比于其他单股负链病毒的重要特征在于从感染细胞中分泌出的可溶性GP (来自GP基因) 的产生。

[0081] 在一些方面,本公开内容提供了包含来自BDBV的至少一种靶病毒抗原的如本文所提供的重组载体。在一些方面,本公开内容提供了包含来自EBOV的至少一种靶病毒抗原的如本文所提供的重组载体。在一些方面,本公开内容提供了包含来自RESTV的至少一种靶病毒抗原的如本文所提供的重组载体。在另一个方面,本公开内容提供了包含来自SUDV的至少一种靶病毒抗原的如本文所提供的重组载体。在另一个方面,本公开内容提供了包含来自TAFV的至少一种靶病毒抗原的如本文所提供的重组载体。在另一个方面,本公开内容提供了包含来自GenBank和NCBI中所述埃博拉病毒的靶病毒抗原的如本文所提供的重组载体。

[0082] 在另一个方面,本公开内容提供了包含来自埃博拉菌株,例如BDBV、EBOV、RESTV、SUDV和TAFV以及如GenBank和NCBI中所述其他埃博拉菌株的组的靶病毒抗原的如本文所提供的重组载体。

[0083] 埃博拉病毒体像其他线状病毒的病毒体一样,可含有七种蛋白质 (参见图3): 表面糖蛋白 (GP)、核蛋白 (NP)、四种病毒体结构蛋白 (VP40、VP35、VP30和VP24) 和RNA依赖性RNA聚合酶 (L)。

[0084] 埃博拉病毒的糖蛋白不同寻常,因为其被编码在两个开放阅读框中。需要转录编辑来表达被并入到病毒体中的跨膜形式。未编辑的形式产生在感染过程早期大量合成的非结构分泌糖蛋白 (sGP)。在一些情况下,所编码的蛋白质在翻译后被切割,产生位于病毒颗粒表面上的成熟分泌形式,以及糖包覆的较小部分。

[0085] 在一些方面,本公开内容提供了包含来自至少一种埃博拉病毒体的糖蛋白 (GP) 的靶病毒抗原的如本文所提供的重组载体。在一些方面,本公开内容提供了包含来自至少一种埃博拉病毒体的核蛋白 (NP) 的靶病毒抗原的如本文所提供的重组载体。在一些方面,本公开内容提供了如本文所提供的重组载体,其包含来自至少一种埃博拉病毒体的四种病毒体结构蛋白 (VP40、VP35、VP30和VP24) 中的至少一种的靶病毒抗原。例如,重组载体可包含来自至少一种埃博拉病毒体的VP40的靶病毒抗原。例如,重组载体可包含来自至少一种埃

博拉病毒体的VP35的靶病毒抗原。例如,重组载体可包含来自至少一种埃博拉病毒体的VP30的靶病毒抗原。例如,重组载体可包含来自至少一种埃博拉病毒体的VP24的靶病毒抗原。在一些方面,本公开内容提供了包含来自至少一种埃博拉病毒体的L蛋白的靶病毒抗原的如本文所提供的重组载体。

[0086] 埃博拉病毒的生命周期被认为是开始于病毒体接触宿主细胞。结构糖蛋白(称为GP1,2)负责病毒结合并感染靶细胞的能力。病毒体被认为附着到宿主细胞上的特定细胞表面受体,例如,C型凝集素、DC-SIGN或整联蛋白,随后病毒包膜与宿主细胞的细胞膜融合。病毒体被宿主细胞吸收后,它们随后进入酸性核内体和溶酶体,在这些地方病毒包膜糖蛋白GP被切割。

[0087] 由L基因编码的病毒RNA聚合酶部分地揭开核衣壳并将基因转录成正链mRNA,这些mRNA随后被翻译成包含病毒体的结构和非结构蛋白。所产生的最丰富的蛋白质为核蛋白,其在宿主细胞中的浓度决定了L何时从基因转录转变为基因组复制。病毒基因组的复制产生全长正链反基因组,该反基因组继而被转录成负链病毒后代的基因组拷贝。新合成的结构蛋白和基因组在细胞膜内部附近自组装并积聚。病毒体从宿主细胞出芽,从作为病毒体芽来源的细胞膜获取其包膜。然后成熟的病毒后代颗粒感染其他细胞以重复该循环。

[0088] 在一些方面,本公开内容提供了包含来自至少一种埃博拉病毒体的L基因的靶病毒抗原的如本文所提供的重组载体。在一个方面,本公开内容提供了包含抑制至少一种埃博拉病毒体的核蛋白产生的靶病毒的如本文所提供的重组载体。在一个方面,本公开内容提供了包含抑制至少一种埃博拉病毒体的基因组复制的靶病毒抗原的如本文所提供的重组载体。在一个方面,本公开内容提供了包含抑制至少一种埃博拉病毒体的出芽过程的靶病毒抗原的如本文所提供的重组载体。在一个方面,本公开内容提供了包含抑制至少一种埃博拉病毒体的感染过程的靶病毒抗原的如本文所提供的重组载体。

[0089] 在各个实施方案中,Ad5[E1-,E2B-]-SEQ.ID.NO.:1、Ad5[E1-,E2B-]-SEQ.ID.NO.:2、Ad5[E1-,E2B-]-SEQ.ID.NO.:4、Ad5[E1-,E2B-]-SEQ.ID.NO.:5和/或Ad5[E1-,E2B-]-SEQ.ID.NO.:6增强了转导树突细胞的能力,从而通过利用对Ad5[E1-,E2b-]载体病毒蛋白降低的炎症应答以及所产生的对预先存在的Ad免疫力的逃避改善了疫苗中的抗原特异性免疫应答。

[0090] 例如,Ad5[E1-,E2B-]-GP、Ad5[E1-,E2B-]-NP、Ad5[E1-,E2B-]-VP40、Ad5[E1-,E2B-]-VP35、Ad5[E1-,E2b-]-VP30、[E1-,E2b-]-VP24和/或[E1-,E2b-]-L可增强转导树突细胞的能力,从而通过利用对Ad5[E1-,E2b-]载体病毒蛋白降低的炎症应答以及所产生的对预先存在的Ad免疫力的逃避改善了疫苗中的抗原特异性免疫应答。

[0091] 在各个实施方案中,Ad5[E1-,E2B-]-SEQ.ID.NO.:1、Ad5[E1-,E2B-]-SEQ.ID.NO.:2、Ad5[E1-,E2B-]-SEQ.ID.NO.:4、Ad5[E1-,E2B-]-SEQ.ID.NO.:5、Ad5[E1-,E2B-]-SEQ.ID.NO.:6治疗和预防疫苗可用于增加人类的总存活期(OS),并具有技术安全性的毒性特征范围。例如,Ad5[E1-,E2B-]-GP、Ad5[E1-,E2B-]-NP、Ad5[E1-,E2B-]-VP40、Ad5[E1-,E2B-]-VP35、Ad5[E1-,E2b-]-VP30、[E1-,E2b-]-VP24和/或[E1-,E2b-]-L治疗和预防疫苗可用于增加人类的总存活期(OS),并具有技术安全的毒性特征范围。

[0092] 此外,在各个实施方案中,本发明的组合物和方法导致临床反应,如感染有埃博拉的人的改变的疾病进展或预期寿命。此外,在各个实施方案中,本发明的组合物和方法导致

临床反应,如处于感染埃博拉的低、中和高风险中的人的改变的疾病进展或预期寿命。

[0093] 在一些方面,本公开内容提供了使用表达选自EBOV、SUDV、TAFV、BDBV和RESTV抗原的至少一种抗原的基于腺病毒的载体的组合物和方法。例如,本公开内容提供了使用表达选自GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和L抗原的至少一种抗原的基于腺病毒的载体的组合物和方法。

[0094] 此外,在各个实施方案中,本发明的组合物和方法导致临床反应,如感染有埃博拉的人的改变的疾病进展或预期寿命。此外,在各个实施方案中,本发明的组合物和方法导致临床反应,如处于感染埃博拉的低、中和高风险中的人的改变的疾病进展或预期寿命。

基于Ad5的埃博拉疫苗

[0095] 腺病毒是一种DNA病毒家族,其特征为含有线性双链基因组的二十面体无包膜衣壳。在人类Ad中,没有一种与任何肿瘤性疾病相关,并且仅在免疫活性个体中引起相对轻度的自限性疾病。由病毒表达的第一个基因是E1基因,该基因用于从存在于野生型基因组中的其他Ad5基因启动子启动高水平基因表达。病毒DNA复制和后代病毒体的组装发生在受感染细胞的核内,并且整个生命周期需要约36hr,并具有每个细胞大约 10^4 个病毒体的输出。野生型Ad5基因组为大约36kb,并编码这样的基因,该基因根据其在DNA复制之前还是之后表达而被分为早期和晚期病毒功能。早期/晚期勾画(delineation)几乎是绝对的,因为已经证明,先前感染有Ad5的细胞的超感染导致来自超感染病毒的晚期基因表达的缺乏,直到其复制了其自身基因组为止。不受理论的约束,这可能是由于Ad5主要晚期启动子(MLP)的复制依赖性顺式激活,从而阻止了晚期基因表达(主要为Ad5衣壳蛋白),直到复制的基因组存在才被包封。本发明的组合物和方法利用了先进的一代(advanced generation)Ad载体/疫苗的开发中的特征。

Ad5载体

[0096] 构建第一代或E1缺失型腺病毒载体Ad5[E1-],使得转基因仅替换基因的E1区。通常,约90%的野生型Ad5基因组保留在载体中。Ad5[E1-]载体在感染不表达Ad5E1基因的细胞后具有降低的复制能力并且无法产生感染性病毒。重组Ad5[E1-]载体在允许Ad5[E1-]载体复制和包装的人类细胞(例如,293细胞)中繁殖。Ad5[E1-]载体具有许多积极的特性;其中最重要的一个是它们相对易于扩大规模和cGMP产生。目前,远远超过220项人类临床试验利用Ad5[E1-]载体,其中多于两千名受试者通过皮下(sc)、肌肉(im)或静脉内(iv)给予病毒。此外,Ad5载体不整合;它们的基因组保持游离基因型。通常,对于不整合到宿主基因组中的载体,如果真的发生,则插入诱变和/或种系传播的风险是非常低的。常规的Ad5[E1-]载体具有接近7kb的承载容量。

用作疫苗的Ad5[E1-]载体

[0097] 编码多种抗原的Ad5[E1-]载体可用于将95%的离体暴露的DC有效转导至高滴度的载体。重要的是,在DC中注意到外来基因表达水平随着载体的感染复数(MOI)的增加而增加。用编码多种抗原(包括肿瘤抗原MART-1、MAGE-A4、DF3/MUC1、p53、hugp100黑素瘤抗原、多瘤病毒中间T抗原(polyoma virus middle-T antigen))的Ad5[E1-]载体感染的DC在混合淋巴细胞反应中具有诱导抗原特异性CTL应答的倾向、具有增强的抗原呈递能力和/或具有改善的启动T细胞增殖的能力。用转导了编码肿瘤特异性抗原的Ad5载体的DC免疫动物已证明了在用表达相应抗原的肿瘤细胞进行攻击时导致对动物的显著水平的保护。有趣的

是,肿瘤内注射编码IL-7的Ad比注射转导有编码IL-7的Ad5载体的DC在诱导抗肿瘤免疫方面效果更差,从而进一步增加了通过Ad5载体离体转导DC的兴趣。还使用离体DC转导策略尝试诱导受体宿主中的耐受性,例如,通过Ad5介导的CTLA4Ig向DC中的递送,从而阻断DC CD80与存在于T细胞上的CD28分子的相互作用。

[0098] 与DC相互作用的Ad5载体衣壳可在其中或本身触发数个有益的反应,从而可增强DC呈递由Ad5载体编码的抗原的倾向。例如,未成熟的DC尽管专门用于抗原摄取,但却是T细胞活化的效率相对低的效应物。DC成熟与DC驱动T细胞免疫的增强的能力相一致。在一些情况下,本发明的组合物和方法利用Ad5感染导致直接诱导DC成熟。对来自小鼠的未成熟骨髓衍生的DC的研究表明,所产生的来自小鼠的未成熟骨髓衍生的DC的Ad载体感染可上调通常与DC成熟相关联的细胞表面标志物(MHC I和MHC II、CD40、CD80、CD86和ICAM-1)以及下调CD11c(已知在骨髓DC成熟后下调的整联蛋白)。在一些情况下,Ad载体感染触发由DC产生IL-12,IL-12是DC成熟的标志物。不受理论的约束,这些事件可能是由于Ad5触发的NF- κ B途径的激活而引起的。如通过成熟的CD83+人DC(衍生自外周血单核细胞)所证明的,成熟的DC可被Ad载体有效转导,并且不会失去其在较低MOI下刺激幼稚T细胞增殖的功能潜力。然而,成熟的DC也可比未成熟的DC较少感染。可例如使用CD40L受体作为病毒载体受体,而不是使用常规的CAR受体感染机制,将衣壳蛋白的修饰用作通过Ad载体以及增强功能成熟优化DC的感染的策略。

[0099] 最显著的是,当将非病毒载体诱导抗HIV免疫应答的潜力直接与基于Ad5的载体系统进行比较时,发现基于Ad5的系统明显更优越。例如,在Ad5未处理的灵长类动物模型中,采用表达HIV gag的Ad5[E1-]进行的疫苗接种在保护动物免受SHIV感染方面比使用表达HIV-gag的裸DNA疫苗的相似努力更加优越。因此,病毒载体可优于裸DNA方法。与先前单独采用编码DNA-HIV-gag的载体所记录到的T细胞应答相比,使用裸DNA-gag疫苗作为引发接种疫苗,然后采用Ad5[E1-]-gag疫苗进行加强的组合策略(基于单独采用裸DNA-gag载体的临床经验)进一步增强了人类试验中的T细胞应答。

[0100] 在最近的评估安全性和免疫原性的1期临床试验中,用含有扎伊尔和苏丹埃博拉病毒菌株的GP组分重组黑猩猩基于Ad(cAd)的疫苗(cAd-EBO)对20名健康成年人进行一次肌肉内疫苗接种。GP特异性抗体在所有20名受试者中均得以诱导。与接受 2×10^{10} 个VP的组($n=10$)相比,接受 2×10^{11} 个病毒颗粒(VP)的组($n=10$)中的抗体滴度最高。观察到所获得的抗体应答在涉及非人灵长类动物(NHP)的攻击研究中所报道的与疫苗诱导的保护性免疫相关联的范围内。与接受 2×10^{10} 个VP的剂量的受试者相比,接受 2×10^{11} 个VP的剂量的受试者中GP特异性T细胞应答也更加频繁。疫苗安全耐受,并且没有观察到严重的不良反应。重要的是,已证实在受试者中还诱导抗黑猩猩Ad抗体,并且这些抗体将阻止维持保护性免疫应答可能需要的进一步疫苗接种(加强)。为了规避加强的攻击,这些研究人员建议进行额外的临床试验,以评估与由含有埃博拉病毒GP的重组修饰疫苗病毒安卡拉(MVA)(MVA-EBO)组成的加强疫苗组合的cAd-EBO疫苗的安全性和免疫原性。即使这种方法成功,也必须考虑针对cAd和MVA两者的中和抗体的开发,因为这样可以减少使用这两种重组疫苗的进一步免疫。

[0101] Ad5载体提供独特的机会,以允许EA,如EBOV、SUDV、TAFV、BDBV和RESTV抗原,如GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和L的高水平和有效转导。基于Ad5的载体面临的主要问题之一是人类群体中预先存在的对Ad的免疫力的高倾向,以及对于任何其他疫苗应用,这种高倾向

如何可阻碍常规Ad5[E1-]缺失型(第一代Ad)在大多数人类群体中的使用。

Ad5[E1-,E2B-]-埃博拉疫苗:使用Ad5[E1-,E2b-]疫苗克服预先存在的抗Ad5免疫力的攻击

[0102] 在人类和动物中的研究已经证明,预先存在的对Ad5的免疫力可以是商业使用的基于Ad的疫苗的抑制因子。人类具有抗Ad5(人类疫苗中最广泛使用的亚型)抗体的优势,其中所研究的三分之二人类具有抗Ad5的淋巴增殖反应。这种预先存在的免疫力可抑制使用典型的Ad5疫苗的免疫或再免疫,并且可阻止在随后使用Ad5载体的疫苗抗第二抗原的免疫。克服预先存在的抗载体免疫力的问题已经成为深入研究的课题。已经对使用替代人类(非基于Ad5的)Ad5亚型或甚至非人类形式的Ad5的研究进行了检查。即使这些方法在初次免疫中获得成功,但随后的疫苗接种可能由于对新型Ad5亚型的免疫应答而存在问题。为了避免Ad5免疫屏障并改善第一代Ad5[E1-]载体的有限功效以诱导最佳免疫应答,本发明的各个实施方案涉及下一代基于Ad5载体的疫苗平台。新的Ad5平台在E2b区有额外的缺失,从而去除DNA聚合酶和前末端蛋白基因。Ad5[E1-,E2b-]平台具有扩展的克隆容量,该克隆容量足以允许包含许多可能的基因。与Ad5[E1-]载体的7kb容量相比,Ad5[E1-,E2b-]载体具有高达约12kb的基因承载容量,从而为多个基因提供空间(如有需要)。在一些实施方案中,将多于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11kb的插入片段引入到Ad5载体中,如Ad5[E1-,E2b-]载体中。E2b区的缺失赋予本发明的Ad5载体有利的免疫特性,通常引发对靶转基因抗原的有效免疫应答,同时使对Ad病毒蛋白的免疫应答最小化。

[0103] 在各个实施方案中,本发明的Ad5[E1-,E2b-]载体即使在Ad免疫力的存在下也诱导有效的CMI以及抗该载体表达的疫苗抗原的抗体。与Ad5[E1-]载体相比,Ad5[E1-,E2b-]载体还具有减少的不良反应,特别是肝毒性和组织损伤的出现。这些Ad5载体的一个关键方面是Ad晚期基因的表达大大降低。例如,可在体内检测Ad5[E1-]载体的衣壳纤突蛋白的产生,而纤突表达从Ad5[E1-,E2b-]载体疫苗中去除。对野生型Ad的先天性免疫应答是复杂的。从Ad5[E1-,E2b-]载体删除的蛋白质通常起到重要作用。具体而言,与Ad5[E1-]载体相比,具有前末端蛋白或DNA聚合酶缺失的Ad5[E1-,E2b-]载体在注射后的第一个24h至72h期间显示出减少的炎症。在各个实施方案中,Ad5基因表达的缺乏使得感染的细胞对抗Ad活性不可见,并且允许感染的细胞在延长的时间段内表达转基因,从而发展出对靶标的免疫力。

[0104] 本发明的各个实施方案考虑增强Ad5[E1-,E2b-]载体转导树突细胞的能力,从而通过利用对Ad5[E1-,E2B-]载体病毒蛋白降低的炎症应答以及所产生的对预先存在的Ad免疫力的逃避改善了疫苗中的抗原特异性免疫应答。

[0105] 在一些情况下,这种免疫诱导可能需要数月。Ad5[E1-,E2b-]载体不仅比Ad5[E1-]载体更安全,而且在诱导抗原特异性免疫应答方面似乎更优越,从而使得它们更适合作为递送可导致临床反应的埃博拉疫苗的平台。

[0106] 本发明的各个实施方案通过利用新型Ad5[E1-,E2b-]载体系统为开发针对埃博拉的治疗疫苗提供长期受欢迎的需要的优势,克服了采用其他Ad5系统所发现的障碍,并允许对先前已经暴露于Ad5的人进行免疫。

[0107] 在各个实施方案中,本发明的组合物和方法包括在技术安全范围内增加总存活期(OS)的Ad5[E1-,E2b-]载体埃博拉疫苗效果。

腺病毒载体

[0108] 与第一代腺病毒载体相比,本发明的第二代E2b缺失型腺病毒载体的某些实施方案含有DNA聚合酶基因(pol)的额外缺失和前末端蛋白(pTP)的缺失。与第一代腺病毒载体的5至6kb容量相比,E2b缺失型载体具有高达13kb的基因承载容量,从而容易为编码多种靶抗原中的任一种的核酸序列提供空间。与第一代腺病毒载体相比,E2b缺失型腺病毒载体还具有降低的不良反应。E2b缺失型载体具有降低的病毒基因表达,并且这种特征导致体内延长的转基因表达。

[0109] 对野生型Ad的先天性免疫应答可能是复杂的,并且似乎从腺病毒载体表达的Ad蛋白发挥着重要作用。具体而言,E2b缺失型载体中前末端蛋白和DNA聚合酶的缺失似乎在注射后第一个24至72h期间减少了炎症,而第一代腺病毒载体在该时间段则刺激炎症。此外,据报道,通过E2b缺失产生的额外的复制嵌段还导致Ad晚期基因的表达降低10,000倍,远远超过E1、E3单独缺失所导致的表达降低。由E2b缺失型腺病毒载体产生的Ad蛋白的降低的水平有效地降低了对Ad抗原的竞争性、不期望的免疫应答的潜力,这些应答阻止在Ad免疫或暴露的个体中重复使用该平台。由第二代E2b缺失型载体诱导的炎症应答的降低导致载体在抗原呈递细胞(即,树突细胞)感染期间表达所需疫苗抗原的潜力增加,降低了抗原竞争的潜力,从而导致相对于用第一代腺病毒载体所进行的同样尝试,该疫苗对所需抗原更强的免疫作用。E2b缺失型腺病毒载体提供了改善的基于Ad的疫苗候选物,该候选物比先前描述的使用第一代腺病毒载体的疫苗候选物更安全、更有效并且更通用。

[0110] 因此,第一代基于E1缺失型腺病毒亚型5(Ad5)的载体虽然有希望用作癌症疫苗的平台,但在活性方面受到天然存在或诱导的Ad特异性中和抗体的阻碍。不受理论的约束,具有E1和E2b区缺失的基于Ad5的载体(Ad5[E1-,E2b-])(后者编码DNA聚合酶和前末端蛋白),例如凭借降低的晚期病毒蛋白表达,可避免免疫学清除并诱导对Ad免疫宿主中编码的肿瘤抗原转基因的更有效的免疫应答。

[0111] 本发明考虑E2b缺失型腺病毒载体的使用,如美国专利号6,063,622、6,451,596、6,057,158、6,083,750和8,298,549中描述的那些腺病毒载体。在E2b区具有缺失的载体在许多情况下削弱了病毒蛋白表达并且/或者降低了生成有复制能力的Ad(RCA)的频率。可利用表达E2b缺失的基因产物的细胞系进行这些E2b缺失型腺病毒载体的繁殖。本发明还提供了这样的包装细胞系;例如,衍生自HEK-2p3细胞系的E.C7(正式称为C-7)。

[0112] 此外,E2b基因产物、DNA聚合酶和前末端蛋白可在E.C7或相似细胞中与E1基因产物一起组成型表达。基因区段从Ad基因组到生产细胞系的转移具有直接的益处:(1)增加承载容量;和(2)降低RCA生成潜力,通常需要两个或更多个独立重组事件来生成RCA。本发明中使用的表达E1、Ad DNA聚合酶和/或前末端蛋白的细胞系可在不需要污染性辅助病毒的情况下使承载容量接近13kb的腺病毒载体能够繁殖。此外,当对病毒生命周期至关重要的基因(例如,E2b基因)被删除时,出现Ad复制或表达其他病毒基因蛋白的进一步削弱。这可以减少病毒感染细胞的免疫识别,并延长外来转基因表达的持续时间。

[0113] E1、DNA聚合酶和前末端蛋白缺失的载体通常不能从E1和E2b区表达相应的蛋白质。此外,它们可显示大部分病毒结构蛋白表达的缺乏。例如,Ad的主要晚期启动子(MLP)负责晚期结构蛋白L1至L5的转录。尽管MLP在Ad基因组复制之前为最低活性,但只有在病毒基因组复制发生后,高毒性Ad晚期基因才能从mLP首先得到转录并翻译。晚期基因转录的这一顺式依赖性活化通常是DNA病毒的特征,如多瘤病毒和SV-40的生长中。DNA聚合酶和前末

端蛋白对于Ad复制是重要的(不同于E4蛋白或IX蛋白)。它们的缺失可能极其不利于腺病毒载体晚期基因表达,以及该表达在细胞如APC中的毒性作用。

[0114] 在某些实施方案中,被考虑用于本发明的腺病毒载体包括在Ad基因组的E2b区中具有缺失并任选地在E1区中具有缺失的E2b缺失型腺病毒载体。在一些情况下,这样的载体不具有缺失的Ad基因组的其他任何区域。在另一个实施方案中,被考虑用于本发明的腺病毒载体包括在Ad基因组的E2b区中具有缺失并任选地在E1和E3区中具有缺失的E2b缺失型腺病毒载体。在一些情况下,这样的载体不具有缺失的其他区域。在另外的实施方案中,被考虑用于本发明的腺病毒载体包括在Ad基因组的E2b区中具有缺失并任选地在E1、E3中具有缺失,以及任选地还具有部分或完全去除的E4区的腺病毒载体。在一些情况下,这样的载体不具有其他缺失。在另一个实施方案中,被考虑用于本发明的腺病毒载体包括在Ad基因组的E2b区中具有缺失并任选地在E1和/或E4区中具有缺失的腺病毒载体。在一些情况下,这样的载体不含有其他缺失。在另一个实施方案中,被考虑用于本发明的腺病毒载体包括在Ad基因组的E2a、E2b和/或E4区中具有缺失的腺病毒载体。在一些情况下,这样的载体不具有其他缺失。在一个实施方案中,用于本文的腺病毒载体包括缺失E2b区的E1和/或DNA聚合酶功能的载体。在一些情况下,这样的载体不具有其他缺失。在另外的实施方案中,用于本文的腺病毒载体缺失E2b区的E1和/或前末端蛋白功能。在一些情况下,这样的载体不具有其他缺失。在另一个实施方案中,用于本文的腺病毒载体缺失E1、DNA聚合酶和/或前末端蛋白功能。在一些情况下,这样的载体不具有其他缺失。在一个具体实施方案中,被考虑用于本文的腺病毒载体缺失E2b区和/或E1区的至少一部分。在一些情况下,这样的载体不是“无内容”腺病毒载体。就这点而言,载体的E2b区的DNA聚合酶和前末端蛋白功能均可能缺失。在另一个实施方案中,用于本发明的腺病毒载体包括在腺病毒基因组的E1、E2b和/或100K区中具有缺失的腺病毒载体。在一个实施方案中,用于本文的腺病毒载体包括E1、E2b和/或蛋白酶功能缺失的载体。在一些情况下,这样的载体不具有其他缺失。在进一步的实施方案中,用于此处的腺病毒载体具有E1和/或E2b区缺失,而纤突基因已通过突变或其他改变(例如改变Ad向性)得到修饰。基因从E3或E4区的去除可被添加到所提及的任何腺病毒载体中。在某些实施方案中,腺病毒载体可以是“无内容”腺病毒载体。

[0115] 本发明还提供了用于使用与免疫途径检查点调节剂相组合对埃博拉基因进行免疫的病毒基因递送平台的针对埃博拉的免疫治疗的组合物和方法。例如,用于使用病毒基因递送平台的针对埃博拉的免疫治疗的组合物和方法可用于与免疫途径检查点调节剂如PD1的抑制剂相组合来对埃博拉基因进行免疫。这些组合物和方法可利用与免疫途径检查点调节剂如检查点抑制剂的抑制剂相组合的Ad5[E1-,E2b-]-埃博拉疫苗。

[0116] 所述组合物和方法可用地产生针对由细胞表达和/或呈递的靶抗原的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对埃博拉抗原,如由细胞表达或呈递的埃博拉抗原的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对EBOV、SUDV、TAFV、BDBV或RESTV抗原,如由细胞表达或呈递的GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24、L或其任意组合的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对由细胞表达和/或呈递的EBOV抗原的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对由细胞表达和/或呈递的SUDV抗原的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对由细胞表达和/或呈递的TAFV抗原的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对由细胞表达和/或呈递的BDBV抗原的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产

生针对由细胞表达和/或呈递的RESTV抗原的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对由细胞表达和/或呈递的GP的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对由细胞表达和/或呈递的NP的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对由细胞表达和/或呈递的VP40的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对由细胞表达和/或呈递的VP35的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对由细胞表达和/或呈递的VP30的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对由细胞表达和/或呈递的VP24的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对由细胞表达和/或呈递的L的免疫应答。

[0117] 该组合物和方法可用于产生针对由细胞表达和/或呈递的多种靶抗原的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对EBOV、SUDV、TAFV、BDBV或RESTV抗原中的两种或更多种,如GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和L抗原中的两种或更多种的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对EBOV抗原和SUDV抗原的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对TAFV抗原和BDBV抗原的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对RESTV抗原和EBOV抗原的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对GP和NP的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对GP和VP40的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对GP和VP35的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对GP和VP30的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对GP和VP24的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对GP和L的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对NP和VP40的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对NP和VP35的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对NP和VP30的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对NP和VP24的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对NP和L的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对VP40和VP35的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对VP40和VP30的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对VP40和VP24的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对VP40和L的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对VP35和VP30的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对VP40和VP24的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对VP35和L的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对VP30和VP24的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对VP30和L的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对VP24和L的免疫应答。

[0118] EBOV、SUDV、TAFV、BDBV或RESTV抗原,如GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24或L的修饰形式可用于导向引起针对EBOV、SUDV、TAFV、BDBV或RESTV抗原,如GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24或L;或针对表达和/或呈递EBOV、SUDV、TAFV、BDBV或RESTV抗原,如GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24或L的细胞的免疫应答的疫苗中。通常,多核苷酸变体将包含一个或多个置换、添加、缺失和/或插入,优选使得由变异多核苷酸编码的多肽的表位的免疫原性或使得异源靶蛋白的免疫原性相对于由天然多核苷酸序列编码的多肽基本不降低。在一些情况下,所述一个或多个置换、添加、缺失和/或插入可导致由变异多核苷酸编码的多肽的表位的免疫原性增加。如本文其他地方所述,多核苷酸变体可编码靶抗原的变体或其片段(例如,表位),其中变异多肽或其片段(例如,表位)与抗原特异性抗血清和/或T细胞系或克隆反应的倾向相对于天然多肽基本不降低。多核苷酸变体可编码靶抗原的变体或其片段,其中变异多肽或其片段与抗原特异性抗血清和/或T细胞系或克隆反应的倾向相对于天然多肽大幅增加。

[0119] 特别地,本发明提供了改善的基于Ad的疫苗,使得可实现针对一个或多个抗原靶实体的多次疫苗接种。在一些实施方案中,所改善的基于Ad的疫苗包含携带靶抗原、片段、其变体或变体片段,如Ad5[E1-,E2b-]-EBOV的复制缺陷型腺病毒。可基于包括免疫原性潜力在内的多种因素来选择靶抗原如GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24或L的变体或片段。可利用突变的GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24或L相对于相应野生型GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24或L的增强的引起免疫应答的能力。重要的是,疫苗接种可在预先存在的对Ad的免疫力的存在下进行,或施用于先前采用本发明的Ad载体或其他Ad载体免疫多次的受试者。可向受试者多次施用Ad载体以诱导针对感兴趣的抗原如GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24或L的免疫应答,包括但不限于产生针对一种或多种靶抗原的抗体和CMI应答。在具体的实施方案中,对靶抗原的变体或片段进行修饰使得它们具有一种或多种降低的生物活性。例如,可对埃博拉蛋白靶抗原进行修饰以降低或消除该蛋白质的病毒活性,或者可对病毒蛋白质进行修饰以降低或消除一种或多种活性或病毒蛋白质。修饰的埃博拉蛋白的实例是具有导致变异蛋白如具有增加的免疫原性的变异蛋白的点突变的GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24或L。

[0120] 为了表达期望的靶抗原多肽或其片段或变体,或包含如本文所述的上述任一种的融合蛋白,使用本领域已知的重组技术将编码多肽或功能等同物的核苷酸序列插入到如本文别处所述的合适的Ad中。

组合物

用于埃博拉免疫治疗和疫苗的病毒载体

[0121] 重组病毒载体可用于表达蛋白质编码基因或抗原(例如,EA)。基于重组病毒载体的疫苗和免疫治疗的优点包括高效率的基因转导、基因向靶细胞的高度特异性递送、强效免疫应答的诱导和增强的细胞免疫。本公开内容提供了包含病毒基因组关键区域的缺失或插入的重组腺病毒载体。由本公开内容提供的病毒载体可包含编码一种或多种感兴趣的靶抗原或其变体、片段或融合物的异源核酸序列,期望针对该靶抗原或其变体、片段或融合物产生免疫应答。

[0122] 可与本公开内容的方法和组合物一起使用的合适的病毒载体包括但不限于逆转录病毒、慢病毒、原病毒(provirus)、牛痘病毒(Vaccinia virus)、腺病毒、腺相关病毒(adeno-associated viruses)、自身互补型腺相关病毒(self-complementary adeno-associated virus)、巨细胞病毒或仙台病毒。在一些实施方案中,病毒载体可以是有复制能力的。在一些实施方案中,病毒载体可以是复制缺陷型的。对于复制缺陷型病毒载体,病毒的基因组可具有额外轮的复制所需的编码区,以及用其他基因替换或缺失的包装。这些病毒能够感染其靶细胞并递送其病毒有效负载,但随后无法继续导致细胞裂解和死亡的典型裂解途径。根据病毒载体,复制缺陷型病毒载体中可允许的DNA或cDNA插入片段的典型最大长度可以为约8-10千碱基(kb)。

[0123] 逆转录病毒已用于表达抗原,如包含逆转录酶的包膜单链RNA病毒。逆转录病毒载体可以是复制缺陷型的。逆转录病毒载体可以是鼠或禽类来源。逆转录病毒载体可来自莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV)。可使用需要基因组整合以供基因表达的逆转录病毒载体。逆转录病毒载体可用于提供长期基因表达。例如,逆转录病毒载体可具有大约7-11kb的基因组大小,并且该载体可携带7-8kb长的外来DNA插入片段。逆转录病毒载体可用于显示低免疫原性,并且大多数患者不显示对逆转录病毒载体的预先存在的免疫力。逆转录病毒载体可

用于感染分裂细胞。逆转录病毒载体可用于不感染非分裂细胞。

[0124] 慢病毒载体已用于表达抗原。慢病毒构成逆转录病毒的一个亚类。慢病毒载体可用于感染非分裂细胞。慢病毒载体可用于感染分裂细胞。慢病毒载体可用于感染非分裂细胞和分裂细胞两者。慢病毒通常显示出比逆转录病毒更广泛的向性。几种蛋白质如tat和rev调控慢病毒的复制。这些调控蛋白在逆转录病毒中通常不存在。HIV是已被工程化为转基因递送载体的示例性慢病毒。慢病毒载体的优点与逆转录病毒载体的优点类似。虽然慢病毒可潜在地触发肿瘤发生,但因为慢病毒的整合位点远离携带细胞启动子的位点,所以风险低于逆转录病毒载体。例如,可通过删除HIV病毒包膜和载体产生期间不需要的一些调控基因来生成基于HIV的载体。生成了若干嵌合或修饰的包膜载体(而非亲本包膜),因为该亲本包膜决定了细胞和组织的特异性。

[0125] 巨细胞病毒(CMV)载体已用于表达抗原。CMV是疱疹病毒(herpesviruses)的成员。可使用物种特异性CMV(例如,人CMV(HCMV),例如5型人疱疹病毒)。HCMV含有由衣壳包围的235-kb双链线性DNA基因组。包膜含有与细胞受体结合的糖蛋白gB和gH。

[0126] 仙台病毒(SeV)载体已用于表达抗原。SeV是副粘病毒科的包膜单链RNA病毒。SeV基因组编码六种蛋白质和两种包膜糖蛋白HN和F蛋白(其介导细胞进入并确定其向性)。缺乏F蛋白的SeV载体可用作复制缺陷型病毒以改善载体的安全性。在包装细胞中产生的SeV载体可用于表达F蛋白。F基因缺失和转基因插入的基因组可转染到包装细胞中。SeV含有RNA依赖性RNA聚合酶,并且病毒基因组定位于细胞质。这确保了快速基因表达在感染后不久发生,并且确保了SeV的遗传毒性优势。SeV载体可用于显示高效的基因转移。SeV载体可用于转导分裂细胞和非分裂细胞两者。SeV载体可用于转导非分裂细胞。SeV载体可用于转导分裂细胞。例如,SeV载体可用于有效转导人气道上皮细胞。可例如通过粘膜(例如,口和鼻)途径施用SeV载体。与肌肉施用相比,鼻内施用可用于潜在地降低预先存在的对SeV的免疫力的影响。与其他病毒载体相比,SeV载体的转基因容量(3.4kb)较低。SeV与人1型副流感病毒(hPIV-1)高度同源;因此,预先存在的对hPIV-1的免疫力可能对SeV的使用不利。

腺病毒载体

[0127] 通常,腺病毒对临床是有吸引力的,因为它们可以具有广泛的向性,它们可感染各种分裂和非分裂细胞类型,并且它们可全身使用以及通过哺乳动物身体中更具选择性的粘膜表面而使用。此外,它们的相对热稳定性进一步有利于其临床使用。腺病毒是特征为含有线性双链基因组的二十面体、无包膜衣壳的DNA病毒家族。通常,腺病毒被发现为无包膜病毒,其包含大约~30-35千碱基大小的双链DNA基因组。在人类Ad中,没有一种与任何肿瘤性疾病相关,并且仅在免疫活性个体中引起相对轻度的自限性疾病。由病毒表达的第一个基因是E1基因,该基因用于从存在于野生型基因组中的其他Ad5基因启动子启动高水平基因表达。病毒DNA复制和后代病毒体的组装发生在受感染细胞的核内,并且整个生命周期需要约36hr,并具有每个细胞大约 10^4 个病毒体的输出。野生型Ad5基因组为大约36kb,并编码这样的基因,该基因根据其在DNA复制之前还是之后表达而被分为早期和晚期病毒功能。早期/晚期勾画(delineation)几乎是绝对的,因为已经证明,先前感染有Ad5的细胞的超感染导致来自超感染病毒的晚期基因表达的缺乏,直到其复制了其自身基因组为止。不受理论的约束,这可能是由于Ad5主要晚期启动子(MLP)的复制依赖性顺式激活,从而阻止了晚期基因表达(主要为Ad5衣壳蛋白),直到复制的基因组存在才被包封。本发明的组合物和方法

利用了先进的一代 (advanced generation) Ad载体/疫苗的开发中的特征。腺病毒的线性基因组通常两侧为用于DNA复制的两个起始区 (ITR), 并且具有用于RNA聚合酶II介导的转录的8个单位。基因组携带五个早期单位E1A、E1B、E2、E3、E4和E5, 两个单位在病毒复制开始后延迟表达 (IX和IVa2), 并且一个晚期单位 (L) 被细分为L1-L5。一些腺病毒可进一步编码被称为病毒相关 (VA) RNA的一种或两种RNA。

[0128] 提供了诱导人类患者中的先天性和适应性免疫应答的腺病毒。通过病毒基因组的关键区域的缺失或插入, 提供重组载体, 该重组载体被工程化以增加其可预测性并减少不期望的副作用。在一些方面, 本发明提供了一种腺病毒载体, 其包含选自下组的基因组缺失或插入: E1A、E1B、E2、E3、E4、E5、IX、IVa2、L1、L2、L3、L4和L5及其任意组合。

[0129] 本公开内容提供了包含改变的衣壳的重组腺病毒载体。通常, 腺病毒的衣壳主要包括二十面体的20个三角形面, 每个二十面体含有六邻体三聚体的12个拷贝。此外, 还有其他几种额外的次要衣壳蛋白IIIa、VI、VIII和IX。

[0130] 本公开内容提供了包含一种或多种改变的纤突蛋白的重组腺病毒载体。通常, 还形成三聚体的纤突蛋白在12个顶点处插入到五聚体五邻体碱基中。纤突可包含细的N末端尾、轴和旋钮域。轴可包含可变数目的 β -链重复。旋钮可包含一个或多个环A、B、C、D、E、F、G、H、I、J。纤突旋钮环可与细胞受体结合。本公开内容提供了将在疫苗系统中使用以用于治疗埃博拉的腺病毒载体。

[0131] 可与本公开内容的方法和组合物一起使用的合适的腺病毒包括但不限于如本文提供的物种特异性腺病毒, 包括人亚组A、B1、B2、C、D、E和F, 或它们的关键基因组区域, 这些亚组可进一步分类为免疫学上不同的血清型。此外, 可与本公开内容的方法和组合物一起使用的合适的腺病毒包括但不限于从灵长类动物、牛、家禽、爬行动物或青蛙鉴定的物种特异性腺病毒或其关键基因组区域。

[0132] 一些腺病毒血清型优先靶向不同的器官。血清型如AdHu1、AdHu2和AdHu5 (亚类C) 通常实现上呼吸道的感染, 而亚类A和F则影响胃肠器官。本公开内容提供了将在优先靶向不同器官中使用以用于治疗埃博拉的重组腺病毒载体。在一些应用中, 改变重组腺病毒载体以降低对哺乳动物中特定器官的向性。在一些应用中, 改变重组腺病毒载体以增强对哺乳动物中特定器官的向性。

[0133] 可通过腺病毒附着于宿主细胞受体的能力来确定其向性。在一些情况下, 宿主细胞附着的过程可能包括纤突的远端旋钮域与宿主细胞表面分子的初始结合, 以及随后五邻体碱基内的RGD基序与 α V整联蛋白的结合。本公开内容提供了具有改变的向性使得腺病毒载体可被基因工程化以感染宿主的特定细胞类型的重组腺病毒载体。本公开内容提供了具有改变的向性以用于治疗细胞特异性埃博拉感染的重组腺病毒载体。本公开内容提供了具有改变的纤突旋钮的重组腺病毒载体, 该纤突旋钮来自具有亚组A、B、C、D或F或其组合或RGD序列的插入片段的一种或多种腺病毒。在一些应用中, 包含改变的纤突旋钮的重组腺病毒载体产生对一种或多种特定细胞类型具有降低的向性的载体。在一些应用中, 包含改变的纤突旋钮的重组腺病毒载体产生对一种或多种特定细胞类型具有增强的向性的载体。在一些应用中, 包含改变的纤突旋钮的重组腺病毒载体产生具有降低的产物特异性B细胞或T细胞应答的载体。在一些应用中, 包含改变的纤突旋钮的重组腺病毒载体产生具有增强的产物特异性B细胞或T细胞应答的载体。

[0134] 本公开内容提供了包被有其他分子以避免病毒中和抗体的作用或改善向宿主细胞中的转导的重组腺病毒载体。本公开内容提供了包被有帮助载体向宿主细胞受体附着的衔接分子的重组腺病毒载体。举例来说,腺病毒载体可包被有衔接分子,该衔接分子将柯萨奇Ad受体(CAR)与CD40L连接,导致树突细胞增强的转导,从而增强受试者中的免疫应答。被类似地工程化用于增强向其他靶细胞类型附着的其他腺病毒载体也被本公开内容所包含。

Ad5载体

[0135] 在人类和动物中的研究已经证明,预先存在的对Ad5的免疫力可以是商业使用的基于Ad的疫苗的抑制因子。人类具有抗Ad5(人类疫苗中最广泛使用的亚型)抗体的优势,其中所研究的三分之二人类具有抗Ad5的淋巴增殖反应。这种预先存在的免疫力可抑制使用典型的Ad5疫苗的免疫或再免疫,并且可阻止在随后使用Ad5载体的疫苗抗第二抗原的免疫。克服预先存在的抗载体免疫力的问题已经成为深入研究的课题。已经对使用替代人类(基于非Ad5的)Ad5亚型或甚至非人类形式的Ad5的研究进行了检查。即使这些方法在初次免疫中获得成功,但随后的疫苗接种可能由于对新型Ad5亚型的免疫应答而存在问题。为了避免Ad5免疫屏障并改善第一代Ad5[E1-]载体的有限功效以诱导最佳免疫应答,本发明的各个实施方案涉及下一代基于Ad5载体的疫苗平台。

[0136] 构建第一代或E1缺失型腺病毒载体Ad5[E1-],使得转基因仅替换基因的E1区。通常,约90%的野生型Ad5基因组保留在载体中。Ad5[E1-]载体在感染不表达Ad5E1基因的细胞后具有降低的复制能力并且无法产生感染性病毒。重组Ad5[E1-]载体在允许Ad5[E1-]载体复制和包装的人类细胞(例如,293细胞)中繁殖。Ad5[E1-]载体具有许多积极的特性;其中最重要的一个是它们相对易于扩大规模和cGMP产生。目前,远远超过220项人类临床试验利用Ad5[E1-]载体,其中多于两千名受试者通过皮下(sc)、肌肉(im)或静脉内(iv)给予病毒。此外,Ad5载体不整合;它们的基因组保持游离基因型。通常,对于不整合到宿主基因组中的载体,如果真的发生,则插入诱变和/或种系传播的风险是非常低的。常规的Ad5[E1-]载体具有接近7kb的承载容量。

[0137] 具有E1和E2b区缺失的基于Ad5的载体(Ad5[E1-,E2b-])(后者编码DNA聚合酶和前末端蛋白),凭借降低的晚期病毒蛋白表达,提供机会来避免免疫学清除,并诱导针对Ad-免疫宿主中编码的埃博拉抗原转基因的更有效的免疫应答。新的Ad5平台在E2b区有额外的缺失,从而去除DNA聚合酶和前末端蛋白基因。Ad5[E1-,E2b-]平台具有扩展的克隆容量,该克隆容量足以允许包含许多可能的基因。与Ad5[E1-]载体的7kb容量相比,Ad5[E1-,E2b-]载体具有高达约12kb的基因承载容量,从而为多个基因提供空间(如有需要)。在一些实施方案中,将多于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11kb的插入片段引入到Ad5载体中,如Ad5[E1-,E2b-]载体中。E2b区的缺失赋予本发明的Ad5载体有利的免疫特性,通常引发对靶转基因抗原的有效免疫应答,同时使对Ad病毒蛋白的免疫应答最小化。

[0138] 在各个实施方案中,本发明的Ad5[E1-,E2b-]载体即使在Ad免疫力存在的情况下也诱导有效的CMI以及抗该载体表达的疫苗抗原的抗体。与Ad5[E1-]载体相比,Ad5[E1-,E2b-]载体还具有减少的不良反应,特别是肝毒性和组织损伤的出现。这些Ad5载体的一个关键方面是Ad晚期基因的表达大大降低。例如,可在体内检测Ad5[E1-]载体的衣壳纤突蛋白的产生,而纤突表达从Ad5[E1-,E2b-]载体疫苗中去除。对野生型Ad的先天性免疫应答是复杂的。从Ad5[E1-,E2b-]载体删除的蛋白质通常起到重要作用。具体而言,与Ad5[E1-]载

体相比,具有前末端蛋白或DNA聚合酶缺失的Ad5[E1-,E2b-]载体在注射后的第一个24h至72h期间显示出减少的炎症。在各个实施方案中,Ad5基因表达的缺乏使得感染的细胞对抗Ad活性不可见,并且允许感染的细胞在延长的时间段内表达转基因,从而发展出对靶标的免疫力。

[0139] 本发明的各个实施方案考虑增加Ad5[E1-,E2b-]载体转导树突细胞的能力,从而通过利用对Ad5[E1-,E2b-]载体病毒蛋白降低的炎症应答以及所产生的对预先存在的Ad免疫力的规避来改善疫苗中的抗原特异性免疫应答。

复制缺陷型Ad5载体

[0140] 克服抗Ad免疫力的尝试包括使用Ad5病毒衣壳蛋白中的替代性Ad血清型和/或替代物,其中每一种均具有有限的成功和显著改变所得疫苗的生物分布的潜力。因此,通过进一步降低来自E1缺失型Ad5载体的病毒蛋白质,即已知是预先存在的Ad免疫力靶标的蛋白质的表达,来尝试完全新颖的方法。具体而言,已对新型重组Ad5平台在早期1(E1)基因区域中的缺失以及在早期2b(E2b)基因区域中的额外缺失(Ad5[E1-,E2b-])进行了描述。E2b区(编码DNA聚合酶和前末端蛋白)的缺失导致降低的病毒DNA复制和晚期病毒蛋白表达。该载体平台可用于在埃博拉感染的动物模型中诱导CMI应答,并且更重要的是,该重组Ad5基因递送平台克服了Ad5免疫力的屏障,并且可用于预先存在和/或载体诱导的Ad免疫力的环境中,从而能够实现疫苗的多次同源施用。在具体的实施方案中,本发明涉及包含编码免疫原性多肽的序列的血清型5的复制缺陷型腺病毒载体。免疫原性多肽可以是突变体、天然变体或其片段。

[0141] 在一些实施方案中,复制缺陷型腺病毒载体包含编码与野生型免疫原性多肽或其片段具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%的同一性的多肽的修饰序列。在一些实施方案中,复制缺陷型腺病毒载体包含编码野生型多肽亚基的修饰序列。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法涉及包含与SEQ. ID. NO:1、2、4、5或6具有至少60%的序列同一性的腺病毒衍生的载体。

[0142] 在一些实施方案中,任选地涉及复制缺陷型腺病毒的腺病毒衍生的载体包含与SEQ. ID. NO:1、2、4、5或6具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%的同一性的序列或通过备选密码子替换从SEQ. ID. NO:3生成的序列。在各个实施方案中,本文所述的腺病毒衍生的载体在E2b区中以及任选地在E1区中具有缺失,该缺失赋予在本文所述的免疫治疗中使用载体的多种优势。

[0143] 在构建本发明的复制缺陷型腺病毒载体时,腺病毒基因组内的某些区域发挥基本功能,并且对于维持基本上保守可能是必需的。这些区域在Lauer等人,J. Gen. Virol., 85, 2615-25 (2004), Leza等人,J. Virol., p. 3003-13 (1988), 和Miralles等人,J. Bio. Chem., Vol. 264, No. 18, p. 10763-72 (1983)中进一步进行了描述,这些文献通过引用而整体并入本文。包含与SEQ. ID. NO:1、2、4、5或6的一部分,如包含SEQ. ID. NO:1、2、4、5或6的至少约100、250、500、1000个或更多个碱基的部分具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%的同一性值的序列的重组核酸载体在本发明的范围内。

[0144] 本发明考虑E2b缺失型腺病毒载体的使用,如美国专利号6,063,622、6,451,596、6,057,158、6,083,750和8,298,549中描述的那些腺病毒载体。在E2b区具有缺失的载体在许多情况下削弱了病毒蛋白表达并且/或者降低了生成有复制能力的Ad(RCA)的频率。可利

用表达E2b缺失的基因产物的细胞系进行这些E2b缺失型腺病毒载体的繁殖。本文提供了这样的包装细胞系；例如，衍生自HEK-293细胞系的E.C7（正式称为C-7）。

[0145] 此外，E2b基因产物、DNA聚合酶和前末端蛋白可在E.C7或相似细胞中与E1基因产物一起进行组成型表达。基因区段从Ad基因组到生产细胞系的转移具有直接的益处：(1) 增加承载容量；和(2) 降低RCA生成潜力，通常需要两个或更多个独立重组事件来生成RCA。本发明中使用的表达E1、Ad DNA聚合酶和/或前末端蛋白的细胞系可在不需要污染性辅助病毒的情况下使承载容量接近13kb的腺病毒载体能够繁殖。此外，当对病毒生命周期至关重要的基因（例如，E2b基因）被删除时，出现Ad复制或表达其他病毒基因蛋白的进一步削弱。这可以减少感染细胞的免疫识别，并延长外来转基因表达的持续时间。

[0146] E1、DNA聚合酶和前末端蛋白缺失的载体通常不能从E1和E2b区表达相应的蛋白质。此外，它们可显示大部分病毒结构蛋白表达的缺乏。例如，Ad的主要晚期启动子（MLP）负责晚期结构蛋白L1至L5的转录。尽管MLP在Ad基因组复制之前为最低活性，但只有在病毒基因组复制发生后，高毒性Ad晚期基因才能从mLP首先得到转录并翻译。晚期基因转录的这一顺式依赖性活化通常是DNA病毒的特征，如多瘤病毒和SV-40的生长中。DNA聚合酶和前末端蛋白对于Ad复制是重要的（不同于E4蛋白或IX蛋白）。它们的缺失可能极其不利于腺病毒载体晚期基因表达，以及该表达在细胞如APC中的毒性作用。

[0147] 腺病毒载体可在Ad基因组的E2b区和任选的E1区中包含缺失。在一些情况下，这样的载体不具有缺失的Ad基因组的任何其他区域。腺病毒载体可在Ad基因组的E2b区中包含缺失并在E1和E3区中包含缺失。在一些情况下，这样的载体不具有缺失的其他区域。腺病毒载体可在Ad基因组的E2b区中包含缺失并在E1、E3以及部分或完全去除的E4区中包含缺失。在一些情况下，这样的载体不具有其他缺失。腺病毒载体可在Ad基因组的E2b区中包含缺失并在E1和/或E4区中包含缺失。在一些情况下，这样的载体不含有其他缺失。腺病毒载体可在Ad基因组的E2a、E2b和/或E4区中包含缺失。在一些情况下，这样的载体不具有其他缺失。腺病毒载体可缺失E2b区的E1和/或DNA聚合酶功能。在一些情况下，这样的载体不具有其他缺失。腺病毒载体可缺失E2b区的E1和/或前末端蛋白功能。在一些情况下，这样的载体不具有其他缺失。腺病毒载体可缺失E1、DNA聚合酶和/或前末端蛋白功能。在一些情况下，这样的载体不具有其他缺失。腺病毒载体可具有E2b区和/或E1区的至少一部分。在一些情况下，这样的载体不是无内容腺病毒载体。就这点而言，载体的E2b区的DNA聚合酶和前末端蛋白功能均可能缺失。腺病毒载体可在腺病毒基因组的E1、E2b和/或100K区中具有缺失。腺病毒载体可包括E1、E2b和/或蛋白酶功能缺失的载体。在一些情况下，这样的载体不具有其他缺失。腺病毒载体可具有E1和/或E2b区缺失，而纤突基因已通过突变或其他改变（例如改变Ad向性）得到修饰。基因从E3或E4区的去除可被添加到所提及的任何腺病毒载体中。在某些实施方案中，腺病毒载体可以是无内容腺病毒载体。

[0148] Ad基因组的其他区域可以缺失。Ad基因组的特定区域中的“缺失”是指这样的特异性DNA序列，其发生突变或被去除以便阻止由该区域编码的至少一种基因产物的表达和/或功能（例如，DNA聚合酶或前末端蛋白功能的E2b功能）。缺失包括编码蛋白质部分的外显子内的缺失以及启动子和前导序列内的缺失。特定区域内的缺失是指在Ad基因组的该区域内的至少一个碱基对的缺失。可缺失多于一个碱基对。例如，可从特定区域删除至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140或150个碱基对。缺失可以是Ad基因组的特定区

域内的多于150、160、170、180、190、200、250或300个碱基对的缺失。这些缺失可阻止由该区域编码的基因产物的表达和/或功能。例如,Ad基因组的特定区域可包括一个或多个点突变,使得一种或多种编码的蛋白质是非功能性的。这样的突变包括被不同残基取代从而导致氨基酸序列的变化进而产生非功能性蛋白质的残基。Ad基因组中的示例性缺失或突变包括E1a、E1b、E2a、E2b、E3、E4、L1、L2、L3、L4、L5、TP、POL、IV和VA区中的一种或多种。可例如使用重组技术来制备缺失型腺病毒载体。

[0149] 可使用组成型表达E2b基因产物和可能已被删除的任何必需基因的产物的合适包装细胞系,成功地使本发明中使用的Ad载体生长至高滴度。可使用不仅组成型表达E1和DNA聚合酶蛋白而且还表达Ad前末端蛋白的HEK-293衍生的细胞。E.C7细胞可用于例如使腺病毒载体的高滴度原种生长。

[0150] 为了从自我繁殖的腺病毒载体删除关键基因,可首先使由靶基因编码的蛋白质在HEK-293细胞或类似细胞中与E1蛋白一起共表达。例如,可选择性利用组成型共表达时无毒的蛋白质(或可诱导表达的毒性蛋白质)。E1和E4基因在HEK-293细胞中的共表达是可能的(例如利用可诱导、非组成型的启动子)。可共表达E1和蛋白IX基因(一种病毒体结构蛋白)。E1、E4和蛋白IX基因的进一步共表达也是可能的。E1和100K基因可在反式互补细胞系中表达,E1和蛋白酶基因也同样可以。

[0151] 可使用用于使高滴度的E2b缺失的Ad颗粒生长的共表达E1和E2b基因产物的细胞系。有用的细胞系组成型表达大约140kDa的Ad-DNA聚合酶和/或大约90kDa的前末端蛋白。没有毒性、具有E1、DNA聚合酶和前末端蛋白的高水平、组成型共表达的细胞系(例如E.C7)是用于繁殖用于多次疫苗接种的Ad所期望的。这些细胞系允许缺失E1、DNA聚合酶和前末端蛋白的腺病毒载体的繁殖。

[0152] 可使用例如含有在适当的MOI(例如5)下感染有Ad载体病毒原种的E.C7细胞的组织培养板繁殖本发明的重组Ad,并将该重组Ad在37℃下温育40-96h。可收获感染的细胞,将该细胞重悬于10mM Tris-Cl(pH8.0)中,并进行声处理,并可通过两轮氯化铯密度离心来纯化病毒。含有病毒的条带可在柱上脱盐,可加入蔗糖或甘油,并且等分试样可储存在-80℃下。病毒可放置在被设计用来提高其稳定性的溶液如A195中。可测量原种的滴度(例如,通过测量裂解后病毒等分试样在260nm处的光密度)。包含整个重组E2b缺失型腺病毒载体的线性或圆形质粒DNA可转染到E.C7或类似细胞中,并在37℃下温育,直到病毒产生的证据存在(例如细胞病变效应)。来自细胞的条件培养基可用于感染更多的细胞以扩大纯化之前产生的病毒的量。可例如通过两轮氯化铯密度离心或选择性过滤来完成纯化。可使用可商购产品或定制的色谱柱通过色谱法来纯化病毒。

[0153] 本发明的组合物可包含足够的病毒以确保将被感染的细胞面对一定数目的病毒。因此,在各个实施方案中,本发明提供了重组Ad的原种,如不含RCA的重组Ad原种。病毒原种的滴度可以差异很大,这很大程度上取决于病毒基因型以及用来制备它们的方案和细胞系。病毒原种可具有至少约 10^6 、 10^7 或 10^8 pfu/ml或更高如至少约 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 或 10^{12} pfu/mL的滴度。根据重组病毒和包装细胞系的性质,本发明的病毒原种可具有甚至约 10^{13} 个颗粒/ml或更高的滴度。

编码抗原靶标的多核苷酸和变体

[0154] 本公开内容进一步提供了核酸序列(本文也称为多核苷酸),其编码一种或多种感

兴趣的靶抗原或其片段或变体。因此,本发明提供了编码来自如本文进一步描述的任何来源的靶抗原的多核苷酸,包含这样的多核苷酸的载体和用这样的表达载体转化或转染的宿主细胞。为了表达期望的靶抗原多肽,可将编码该多肽的核苷酸序列或功能等同物插入到合适的Ad载体中(例如,使用重组技术)。合适的腺病毒载体可含有对于所插入的编码序列的转录和翻译所必需的元件以及任何所需的连接体。本领域技术人员熟知的方法可用于构建含有编码感兴趣的多肽的序列和适当的转录和翻译控制元件的这些腺病毒载体。这些方法包括体外重组DNA技术、合成技术和体内基因重组。

[0155] 多核苷酸可包含天然序列(即,编码本发明的靶抗原多肽/蛋白质/表位或其一部分的内源序列),或者可包含编码这样的序列的变体、片段或衍生物的序列。多核苷酸序列可编码靶抗原蛋白。在一些实施方案中,多核苷酸代表被优化用于在特定细胞类型中表达的新基因序列,该基因序列可与天然核苷酸序列或变体基本不同,但编码相似的蛋白质抗原。

[0156] 在其他相关实施方案中,多核苷酸变体与编码蛋白质(例如,感兴趣的靶抗原)的天然序列具有基本的同一性,例如,与编码多肽的天然多核苷酸序列相比,多核苷酸变体包含至少70%的序列同一性,优选至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或更高的序列同一性(例如,使用标准参数的BLAST分析)。通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、阅读框定位等,可适当地调整这些值以确定由两个核苷酸序列编码的蛋白质的相应同一性。与由天然多核苷酸序列编码的蛋白质序列相比,多核苷酸可编码包含例如至少70%的序列同一性,优选至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或更高的序列同一性的蛋白质。

[0157] 多核苷酸可包含至少约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1000个或更多个编码多肽(例如,靶蛋白抗原)的连续核苷酸,以及其间的所有中间长度。在上下文中,“中间长度”是指引用值之间的任何长度,如16、17、18、19等;21、22、23等;30、31、32等;50、51、52、53等;100、101、102、103等;150、151、152、153等;包括200-500;500-1,000等的所有整数。可在一端或两端利用未在编码多肽,如表位或异源靶蛋白的天然序列中发现的附加核苷酸对多核苷酸序列进行延伸。该附加序列在所公开序列的任一端或在所公开序列的两端可由1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个核苷酸或更多个核苷酸组成。

[0158] 无论编码序列本身的长度如何,多核苷酸均可与其他DNA序列,如启动子、表达控制序列、多聚腺苷化信号、附加的限制酶位点、多克隆位点、其他编码区段等组合,使得它们的总长度可以差异很大。因此,考虑可使用几乎任何长度的核酸片段,其总长度优选受到制备的容易程度和在预期重组DNA方案中的使用的限制。考虑将总长度约1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000、约500、约200、约100、约50个碱基对长度等(包括所有中间长度)的说明性多核苷酸区段用于本发明的许多实施中。

[0159] 诱变方法如位点特异性诱变可用于制备靶抗原序列。可通过对编码多肽序列的潜在多核苷酸进行诱变来实现多肽序列中的特异性修饰。位点特异性诱变可用于通过使用编码所需突变的DNA序列的寡核苷酸序列以及足够数目的相邻核苷酸来提供足够大小和序列

复杂性的引物序列从而在穿过的缺失连接处的两侧形成稳定的双链体来制备突变体。例如,可使用包含约14至约25个核苷酸左右长度的引物,该引物在被改变的序列连接处的两侧具有约5至约10个残基。可在选择的多核苷酸序列中进行突变以改善、改变、减少、修饰或以其他方式改变多核苷酸的性质,并且/或者改变所编码的多肽的性质、活性、组成、稳定性或一级序列。

[0160] 多核苷酸序列的诱变可用于改变所编码多肽的一种或多种性质,如包含在多肽中的表位的免疫原性或靶抗原的免疫原性。用来测试多肽的免疫原性的测定包括但不限于T细胞的细胞毒性测定(CTL/铬释放测定)、T细胞增殖测定、细胞内细胞因子染色、ELISA、ELISpot等。可使用用于获得肽的序列变体和编码它们的DNA序列的其他方法。例如,可用诱变剂如羟胺处理编码所需肽序列的重组载体,以获得序列变体。

[0161] 可通过例如用化学手段直接合成片段容易地制备编码本发明多肽的多核苷酸区段或片段。可通过应用核酸复制技术如PCR、通过将选择的序列引入到用于重组生产的重组载体中并且通过分子生物学领域技术人员公知的其他重组DNA技术来获得片段。

[0162] 多种载体/宿主系统可用于包含并产生多核苷酸序列。示例性系统包括微生物,如用重组细菌噬菌体、质粒或粘粒DNA载体转化的细菌;用酵母载体转化的酵母;感染有病毒载体(例如,杆状病毒(baculovirus))的昆虫细胞系统;用病毒载体(例如,花椰菜花叶病毒(cauliflower mosaic virus, CaMV);烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV))或细菌载体(例如, Ti或pBR322质粒)转化的植物细胞系统;或动物细胞系统。

[0163] 存在于Ad载体中的控制元件或调控序列可包括载体增强子、启动子以及5'和3'非翻译区的那些非翻译区。这些元件的强度和特异性可以不同。根据所使用的载体系统和宿主,可使用任何数目的合适的转录和翻译元件,包括组成型和诱导型启动子。例如,可将编码感兴趣的多肽的序列连接到由晚期启动子和三联前导序列组成的Ad转录/翻译复合体中。病毒基因组的非必需E1或E3区中的插入可用于获得能够在感染的宿主细胞中表达多肽的活的病毒。此外,转录增强子,如劳斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus, RSV)增强子可用于增强哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0164] 特异性起始信号也可用于实现编码感兴趣多肽的序列的更有效的翻译(例如,ATG起始密码子和相邻序列)。外源翻译元件和起始密码子可以是各种来源(天然的和合成的)。可通过包含适用于所使用的特定细胞系统的增强子来增强表达的效率。还可并入用于转录或翻译的特异性终止序列,以便实现编码所选多肽的序列的有效翻译。

[0165] 可使用用于检测和测量多核苷酸编码的产物(例如,靶抗原)的表达的多种方案(例如,使用对产物特异的多克隆或单克隆抗体)。实例包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和荧光激活细胞分选术(FACS)。利用单克隆抗体对给定多肽上两个非干扰表位的反应性的基于双位点单克隆的免疫测定在一些应用中可能是优选的,但也可采用竞争性结合测定。

[0166] Ad载体可包含可被检测或挑选出来的产物,诸如,其产物可诸如通过荧光、显色或荧光底物上的酶活性等检测到或通过生长条件被挑选出来的报告基因。示例性的报告基因包括绿色荧光蛋白(GFP)、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、萤光素酶、新霉素磷酸转移酶、分泌型碱性磷酸酶(SEAP)和人生长激素(HGH)。示例性的可选择标记包括耐药性,如新霉素(G418)、潮霉素等。

[0167] Ad载体还可包含启动子或表达控制序列。启动子的选择将部分取决于靶向细胞类型和所需控制的程度或类型。适合于本发明的上下文的启动子包括但不限于组成型、诱导型、组织特异性、细胞类型特异性、时间特异性或事件特异性启动子。组成型或非特异性启动子的实例包括SV40早期启动子、SV40晚期启动子、CMV早期基因启动子、牛乳头瘤病毒启动子和腺病毒启动子。除了病毒启动子之外,细胞启动子也可适用于本发明的上下文。特别地,所谓管家基因的细胞启动子是有用的(例如, β -肌动蛋白)。病毒启动子通常是比细胞启动子更强的启动子。也可使用诱导型启动子。这些启动子包括可被地塞米松诱导的MMTV LTR、可被重金属诱导的金属硫蛋白以及可被cAMP诱导的具有cAMP应答元件的启动子、热休克启动子。通过使用诱导型启动子,可将核酸递送至细胞并且核酸将保持静止,直到诱导物的添加。这允许进一步控制感兴趣的蛋白质的产生时间。例如,可使用事件型特异性启动子(例如,HIV LTR),其仅在事件如埃博拉感染发生后是活性的或上调的。HIV LTR启动子是无活性的,除非tat基因产物存在(在病毒感染后发生)。一些事件型启动子也是组织特异性的。优选的事件型特异性启动子包括在病毒感染后激活的启动子。

[0168] 启动子的实例包括 α -甲胎蛋白、 α -肌动蛋白、myo D、癌胚抗原、VEGF受体的启动子;FGF受体;TEK或tie 2;tie;尿激酶受体;E选择蛋白和P选择蛋白;VCAM-1;内皮糖蛋白;内皮唾液酸蛋白; α V- β 3整联蛋白;内皮素1;ICAM-3;E9抗原;冯维勒布兰德因子;CD44;CD40;血管内皮钙粘着蛋白;刻缺蛋白4,高分子量黑素瘤相关抗原;前列腺特异性抗原-1, probasin,FGF受体,VEGF受体,erb B2;erb B3;erb B4;MUC-1;HSP-27;int-1;int-2,CEA, HBEGF受体;EGF受体;酪氨酸酶,MAGE,IL-2受体;前列腺酸性磷酸酶,probasin,前列腺特异性膜抗原, α -晶体蛋白,PDGF受体,整联蛋白受体, α -肌动蛋白,SM1和SM2肌球蛋白重链,钙调蛋白-h1,SM22 α -血管紧张肽受体,IL-1,IL-2,IL-3,IL-4,IL-5,IL-6,IL-7,IL-8,IL-9,IL-10,IL-11,IL-12,IL-13,IL-14,免疫球蛋白重链,免疫球蛋白轻链和CD4。

[0169] 可插入阻抑物序列、负调节基因或组织特异性沉默子以降低多核苷酸的非特异性表达。可在启动子区域插入多个阻抑物元件。转录的抑制与阻抑物元件的取向或距启动子的距离无关。一种类型的阻抑物序列是绝缘子序列。这样的序列抑制转录并且可抑制背景转录。负调节元件可位于许多不同基因的启动子区域中。阻抑物元件可在诸如类固醇等因子不存在的情况下起到转录阻抑物的作用,如同卵清蛋白基因的启动子区域中的NSE一样。这些负调节元件可结合来自输卵管的特异性蛋白复合体,其中没有一种对类固醇敏感。三种不同的元件位于卵清蛋白基因的启动子中。对应于这些元件的部分的寡核苷酸可抑制TK受体的病毒转录。其中一个沉默子元件与其他基因(TCTCTCCNA (SEQ ID NO:7))中的沉默子共享序列同一性。

[0170] 此外,阻抑物元件可位于多种基因,包括例如胶原II基因的启动子区域中。来自HeLa细胞的核因子可与含有沉默子区域的DNA片段特异性结合。阻抑物元件可在调节氨甲酰磷酸合成酶基因转录方面发挥作用。该基因仅在两种不同的细胞类型,即肠粘膜的肝细胞和上皮细胞中表达。在胆碱乙酰转移酶基因的启动子区、白蛋白启动子、磷酸甘油酸激酶(PGK-2)基因启动子和6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶基因中也发现负调控区,在这些区域中负调控元件抑制非肝细胞系中的转录。此外,负调控元件Tse-1位于许多种肝特异性基因中,包括酪氨酸氨基转移酶(TAT)。TAT基因表达是肝特异性的,并且可被糖皮质激素和cAMP信号通路所诱导。cAMP应答元件(CRE)可作为Tse-1和肝细胞特异性元件的阻抑靶

标。因此,显然,各种各样的此类元件是已知的或容易识别的。

[0171] 在某些实施方案中,可将增强所需靶抗原的表达的元件并入到本文所述的Ad载体的核酸序列中。示例性元件包括内部核糖体结合位点(IRES)。IRES可提高翻译效率。同样,其他序列可增强表达。对于一些基因,尤其是在5'端的序列可抑制转录和/或翻译。这些序列通常是可形成发夹结构的回文序列。在一些情况下,删除将要递送的核酸中的这类序列。可测定转录物或翻译产物的表达水平以确认或确定哪些序列影响表达。可通过任何已知的方法,包括RNA印迹杂交、RNA酶探针保护等,来测定转录水平。可通过任何已知的方法,包括ELISA来测定蛋白质水平。

埃博拉抗原特异性免疫治疗和疫苗

[0172] 本公开内容提供了利用这样的载体和如本文提供的其他载体的对埃博拉抗原如GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L的单抗原或组合抗原免疫。本公开内容提供了针对埃博拉抗原的治疗疫苗。本公开内容提供了针对埃博拉抗原的预防性疫苗。此外,在各个实施方案中,本文提供的组合物和方法可导致临床反应,如改变的疾病进展或预期寿命。

[0173] 编码多种抗原的Ad5[E1-]载体可用于将95%的离体暴露的DC有效转导至高滴度的载体。重要的是,本发明人已发现DC中的外来基因表达水平随着载体的感染复数(MOI)的增加而增加。感染有Ad5[E1-]载体的DC可编码在混合淋巴细胞反应中具有诱导抗原特异性CTL应答的倾向、具有增强的抗原呈递能力和/或具有改善的启动T细胞增殖的能力的多种埃博拉抗原。用先前转导了编码肿瘤特异性抗原的Ad5载体的树突细胞(DC)使动物免疫可用于在用表达相应抗原的肿瘤细胞进行攻击时诱导对动物的显著水平的保护。有趣的是,肿瘤内注射编码IL-7的Ad比注射转导有编码IL-7的Ad5载体的DC在诱导抗肿瘤免疫方面效果更差。本公开内容考虑通过Ad5载体进行DC的离体转导。离体DC转导策略可用于诱导受体宿主耐受性。例如,Ad5介导的CTLA4Ig向DC中的递送可阻断DC CD80与存在于T细胞上的CD28分子的相互作用。

[0174] 与DC相互作用的Ad5载体衣壳可触发数个有益的反应,从而可增强DC呈递由Ad5载体编码的抗原的倾向。例如,未成熟的DC尽管专门用于抗原摄取,但却是T细胞活化的效率相对低的效应物。DC成熟与DC驱动T细胞免疫的增强的能力相一致。在一些情况下,本发明的组合物和方法利用Ad5感染,导致直接诱导DC成熟。来自小鼠的未成熟骨髓衍生的DC的Ad载体感染可上调通常与DC成熟相关联的细胞表面标志物(MHC I和MHC II、CD40、CD80、CD86和ICAM-1)以及下调CD11c(在骨髓DC成熟后下调的整联蛋白)。在一些情况下,Ad载体感染触发由DC产生IL-12,IL-12是DC成熟的标志物。不受理论的约束,这些事件可能是由于Ad5触发的NF- κ B途径的激活而引起。如通过成熟的CD83+人DC(衍生自外周血单核细胞)所证明的,成熟的DC可被Ad载体有效转导,并且不会失去其在较低MOI下刺激幼稚T细胞增殖的功能潜力。然而,成熟的DC也可比未成熟的DC较少感染。

[0175] 可例如使用CD40L受体作为病毒载体受体,而不是使用常规的CAR受体感染机制,将衣壳蛋白的修饰用作通过Ad载体以及增强功能成熟优化DC的感染的策略。

[0176] 在各个实施方案中,本发明的组合物和方法包括在技术安全性范围内增加的总存活期(OS)的Ad5[E1-,E2b-]-GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24、L或其任意组合疫苗效果。例如,本发明的组合物和方法可包括在技术安全性范围内增加的总存活期(OS)的Ad5[E1-,E2b-]载体GP疫苗效果。例如,本发明的组合物和方法可包括在技术安全性范围内增加的总存活

期(OS)的Ad5[E1-,E2b-]载体NP疫苗效果。例如,本发明的组合物和方法可包括在技术安全性范围内增加的总存活期(OS)的Ad5[E1-,E2b-]载体VP40疫苗效果。例如,本发明的组合物和方法可包括在技术安全性范围内增加的总存活期(OS)的Ad5[E1-,E2b-]载体VP35疫苗效果。例如,本发明的组合物和方法可包括在技术安全性范围内增加的总存活期(OS)的Ad5[E1-,E2b-]载体VP30疫苗效果。例如,本发明的组合物和方法可包括在技术安全性范围内增加的总存活期(OS)的Ad5[E1-,E2b-]载体VP24疫苗效果。例如,本发明的组合物和方法可包括在技术安全性范围内增加的总存活期(OS)的Ad5[E1-,E2b-]载体L疫苗效果。

[0177] 如上所述,本发明的腺病毒载体包含编码一种或多种感兴趣的靶蛋白或抗原的核酸序列。就这点而言,载体可含有编码1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20种或更多种不同的感兴趣的靶抗原的核酸。靶抗原可以是全长蛋白质,或者可以是其片段(例如,表位)。腺病毒载体可含有编码来自一种感兴趣的靶蛋白的多个片段或表位的核酸序列,或者可含有来自许多不同的感兴趣的靶蛋白的一个或多个片段或表位。

[0178] 靶抗原可包含任何物质,其中期望针对该物质产生免疫应答,但通常,靶抗原是蛋白质。靶抗原可包含全长蛋白质、蛋白质的亚基、诱导免疫应答的蛋白质的同种型或其片段(即,免疫原性片段)。可对靶抗原或其片段进行修饰,例如,以便降低靶抗原的一种或多种生物活性或增强其免疫原性。

[0179] 在某些实施方案中,免疫原性片段与MHC I类或II类分子结合。免疫原性片段可“结合”MHC I类或II类分子,条件是使用本领域已知的任何测定可检测到这样的结合。例如,可通过监测促进¹²⁵I标记的β-2-微球蛋白(β-2m)向MHC I类/β2m/肽异三聚体复合物中并入的能力来间接评估多肽与MHC I类结合的能力(参见Parker等人,J.Immunol.152:163,1994)。或者,可采用本领域已知的功能性肽竞争测定。通常可鉴定多肽的免疫原性片段。用于鉴定免疫原性片段的代表性技术包括筛选多肽与抗原特异性抗血清和/或T细胞系或克隆反应的能力。特定靶多肽的免疫原性片段是以基本上不低于全长靶多肽的反应性的水平与这样的抗血清和/或T细胞反应的片段(例如,在ELISA和/或T细胞反应性测定中)。换句话说,免疫原性片段可以以类似于或高于全长多肽的反应性的水平在这样的测定内进行反应。可使用本领域已知的方法来进行这样的筛选。

[0180] 在一些实施方案中,本发明的病毒载体包含编码可调节免疫应答的一种或多种蛋白质、其变体、其融合物或其片段的异源核酸序列。在一些实施方案中,本发明的病毒载体编码针对特异性抗原如炭疽保护性抗原的一种或多种抗体,从而允许被动免疫治疗。在一些实施方案中,本发明的病毒载体包含编码具有治疗效果(例如,抗病毒、抗细菌、抗寄生或抗埃博拉功能)的一种或多种蛋白质的异源核酸序列。在一些实施方案中,第二代E2b缺失型腺病毒载体包含异源核酸序列。在一些实施方案中,异源核酸序列是GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24、L,其变体、一部分或任意组合。

[0181] 靶抗原包括但不限于衍生自多种埃博拉病毒的抗原。在一些实施方案中,埃博拉蛋白的部分或变体用作靶抗原。在一些实施方案中,用作靶抗原的埃博拉蛋白的部分或变体具有修饰的,例如,增加的对埃博拉蛋白或包含埃博拉蛋白的细胞产生免疫应答的能力。本发明的疫苗可针对抗原进行疫苗接种。疫苗也可靶向表位。抗原可以是埃博拉病毒抗原。表位可以是埃博拉病毒表位。这样的埃博拉病毒表位可衍生自很多种埃博拉病毒,如来自自由突变引起的埃博拉病毒的抗原和共享的埃博拉种特异性抗原。埃博拉抗原(EA)可以由

宿主非正常表达的抗原。埃博拉相关抗原可以是,例如,蛋白质或蛋白质片段、复合碳水化合物、神经节苷脂、半抗原、核酸、其他生物分子或其任意组合。

[0182] 用于本发明的说明性埃博拉蛋白包括但不限于GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和L中的任一种或多种。在一些实施方案中,病毒载体包含编码选自GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和L的修饰多肽的靶抗原序列,其中该多肽或其片段与所描述的序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%的同一性。

[0183] 本发明人已经发现,尽管存在预先存在的或诱导的Ad5中和抗体,但用Ad5[E1-,E2b-]-GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L进行的多次同源免疫在动物中诱导具有抗埃博拉活性的GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L特异性细胞介导的免疫(CMI)应答。可用递增剂量的Ad5[E1-,E2b-]-GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L免疫埃博拉患者的队列。在具有埃博拉感染的受试者中,新型Ad5[E1-,E2b-]基因递送平台在天然获得和免疫诱导的Ad5特异性免疫力的环境中均产生对EA GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L的显著CMI应答。

[0184] GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L抗原特异性CMI可以是,例如,大于10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、5000、10000个或更多个IFN- γ 斑点形成细胞(SFC)/ 10^6 个外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方案中,在具有大于50、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、6000、7000、8000、9000、10000或更高的预先存在的逆Ad5中和抗体滴度的人类受试者中产生免疫应答。免疫应答可包括如本文所述的细胞介导的免疫和/或体液免疫。免疫应答可通过下组中的一种或多种测定来进行测量:如本文所述并达到可被本领域技术人员实现的程度的细胞内细胞因子染色(ICS)、ELISpot、增殖测定、细胞毒性T细胞测定(包括铬释放或等同测定)和使用任何数目的聚合酶链反应(PCR)的基因表达分析或基于RT-PCR的测定,以及本领域已知的用于测量免疫应答的任何其他合适的测定。

[0185] 在一些实施方案中,复制缺陷型腺病毒载体包含编码与野生型多肽亚基具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%的同一性的亚基的修饰序列。该免疫原性多肽可以是突变的GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24或L或其片段。在一些实施方案中,复制缺陷型腺病毒载体包含编码与免疫原性多肽具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%的同一性的多肽的序列。在一些实施方案中,编码免疫原性多肽的序列包括SEQ.ID.NO.:1的序列。

[0186] 在一些实施方案中,编码免疫原性多肽的序列包括与SEQ.ID.NO.:1、2、4、5或6具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%的同一性的序列或通过备选密码子替换从SEQ.ID.NO.:1、2、4、5或6生成的序列。在一些实施方案中,与野生型人GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24或L序列相比,由腺病毒载体编码的免疫原性多肽包含最多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40个或更多个点突变,如单个氨基酸置换或缺失。

[0187] 在某些实施方案中,可直接从感染有埃博拉病毒的个体鉴定埃博拉抗原。在这方面,可使用多种已知的技术进行筛选。例如,在一个实施方案中,从患者取出细胞或组织活检物,从样品细胞分离RNA并使用基因芯片(例如,来自Affymetrix,Santa Clara,Calif.)进行筛选,并鉴定埃博拉病毒抗原。一旦埃博拉病毒靶抗原得以鉴定,则随后可使用本领域已知的技术对其进行克隆、表达和纯化。

[0188] 该靶抗原随后可与一个或多个表位连接,或者并入或连接到本文所述的盒或病毒载体并施用于患者,以便改变对从来自埃博拉感染患者的样品分离的靶分子的免疫应答。以这种方式,在本发明的上下文中考虑了“个性化”免疫治疗和疫苗。在一些实施方案中,涉及SEQ.ID.NO.:1、SEQ.ID.NO.:2、SEQ.ID.NO.:4、SEQ.ID.NO.:5、SEQ.ID.NO.:6或其组合的个性化埃博拉抗原从患者进行表征,并且进一步作为整体、部分或作为变体被用作靶抗原。

联合免疫治疗和疫苗

[0189] 本公开内容提供了用于治疗埃博拉感染的联合免疫治疗和疫苗组合物。在一些方面,本文提供的联合免疫治疗和疫苗可包括针对与埃博拉感染相关抗原的多靶向免疫治疗方法。在一些方面,本文提供的联合免疫治疗和疫苗可包括针对与埃博拉感染相关的抗原的多靶向抗原标签免疫治疗方法。在各个实施方案中,本发明的组合物和方法提供了基于病毒的载体,该载体表达如本文所提供的用于埃博拉免疫的GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L的野生型或变体。这些载体可产生对GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L的免疫应答。

[0190] 在一些方面,载体包含至少一种抗原。在一些方面,载体包含至少两种抗原。在一些方面,载体包含至少三种抗原。在一些方面,载体包含多于三种抗原。在一些方面,疫苗制剂包括1:1比例的载体与抗原。在一些方面,疫苗包括1:2比例的载体与抗原。在一些方面,疫苗包括1:3比例的载体与抗原。在一些方面,疫苗包括1:4比例的载体与抗原。在一些方面,疫苗包括1:5比例的载体与抗原。在一些方面,疫苗包括1:6比例的载体与抗原。在一些方面,疫苗包括1:7比例的载体与抗原。在一些方面,疫苗包括1:8比例的载体与抗原。在一些方面,疫苗包括1:9比例的载体与抗原。在一些方面,疫苗包括1:10比例的载体与抗原。

[0191] 在一些方面,疫苗为组合疫苗,其中该疫苗包含至少两种各自含有至少一种抗原的载体。在一些方面,疫苗为组合疫苗,其中该疫苗包含至少三种各自含有至少一种抗原靶标的载体。在一些方面,疫苗为组合疫苗,其中该疫苗包含多于三种各自含有至少一种抗原的载体。

[0192] 在一些方面,疫苗为组合疫苗,其中该疫苗包含至少两种载体,其中该至少两种载体的第一载体包含至少一种抗原,并且其中该至少两种载体的第二载体包含至少两种抗原。在一些方面,疫苗为组合疫苗,其中该疫苗包含至少三种载体,其中该至少三种载体的第一载体包含至少一种抗原,并且其中该至少三种载体的第二载体包含至少两种抗原。在一些方面,疫苗为组合疫苗,其中该疫苗包含三种或更多种载体,其中该三种或更多种载体的第一载体包含至少一种抗原,并且其中该三种或更多种载体的第二载体包含至少两种抗原。在一些方面,疫苗为组合疫苗,其中该疫苗包含多于三种各自含有至少两种抗原的载体。

[0193] 当不同抗原的混合物被同时施用或从个体中的相同或不同载体同时表达时,它们可能彼此竞争。因此,必须对联合免疫治疗或疫苗中包含不同浓度和比例的表达抗原的制剂进行评估并对其进行调整以适于个体或个体群组,从而确保施用后有效且持续的免疫应答。

[0194] 包含多种抗原的组合物可以以各种比例存在。例如,具有多于一种载体的制剂可具有各种比例。例如,免疫治疗或疫苗可具有化学计量比为1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:15、1:20、1:30、2:1、2:3、2:4、2:5、2:6、2:7、2:8、3:1、3:3、3:4、3:5、3:

6:3:7、3:8、3:1、3:3、3:4、3:5、3:6、3:7、3:8、4:1、4:3、4:5、4:6、4:7、4:8、5:1、5:3、5:4、5:6、5:7、5:8、6:1、6:3、6:4、6:5、6:7、6:8、7:1、7:3、7:4、7:5、7:6、7:8、8:1、8:3、8:4、8:5、8:6或8:7的两种不同的载体。例如,免疫治疗或疫苗可具有以下化学计量比的三种不同的载体:1:1:1、1:2:1、1:3:1、1:4:1、1:5:1、1:6:1、1:7:1、1:8:1、2:1:1、2:3:1、2:4:1、2:5:1、2:6:1、2:7:1、2:8:1、3:1、3:3:1、3:4:1、3:5:1、3:6:1、3:7:1、3:8:1、3:1:1、3:3:1、3:4:1、3:5:1、3:6:1、3:7:1、3:8:1、4:1:1、4:3:1、4:4:1、4:5:1、4:6:1、4:7:1、4:8:1、5:1:1、5:3:1、5:4:1、5:5:1、5:6:1、5:7:1、5:8:1、6:1:1、6:3:1、6:4:1、6:5:1、6:6:1、6:7:1、6:8:1、7:1:1、7:3:1、7:4:1、7:5:1、7:6:1、7:7:1、7:8:1、8:1:1、8:3:1、8:4:1、8:5:1、8:6:1、8:7:1、8:8:1、1:1:2、1:2:2、1:3:2、1:4:2、1:5:2、1:6:2、1:7:2、1:8:2、2:1:2、2:3:2、2:4:2、2:5:2、2:6:2、2:7:2、2:8:2、3:1:2、3:3:2、3:4:2、3:5:2、3:6:2、3:7:2、3:8:2、3:1:2、3:3:2、3:4:2、3:5:2、3:6:2、3:7:2、3:8:2、4:1:2、4:3:2、4:4:2、4:5:2、4:6:2、4:7:2、4:8:2、5:1:2、5:3:2、5:4:2、5:5:2、5:6:2、5:7:2、5:8:2、6:1:2、6:3:2、6:4:2、6:5:2、6:6:2、6:7:2、6:8:2、7:1:2、7:3:2、7:4:2、7:5:2、7:6:2、7:7:2、7:8:2、8:1:2、8:3:2、8:4:2、8:5:2、8:6:2、8:7:2、8:8:2、1:1:3、1:2:3、1:3:3、1:4:3、1:5:3、1:6:3、1:7:3、1:8:3、2:1:3、2:3:3、2:4:3、2:5:3、2:6:3、2:7:3、2:8:3、3:1:3、3:3:3、3:4:3、3:5:3、3:6:3、3:7:3、3:8:3、3:1:3、3:3:3、3:4:3、3:5:3、3:6:3、3:7:3、3:8:3、4:1:3、4:3:3、4:4:3、4:5:3、4:6:3、4:7:3、4:8:3、5:1:3、5:3:3、5:4:3、5:5:3、5:6:3、5:7:3、5:8:3、6:1:3、6:3:3、6:4:3、6:5:3、6:6:3、6:7:3、6:8:3、7:1:3、7:3:3、7:4:3、7:5:3、7:6:3、7:7:3、7:8:3、8:1:3、8:3:3、8:4:3、8:5:3、8:6:3、8:7:3、8:8:3、1:1:4、1:2:4、1:3:4、1:4:4、1:5:4、1:6:4、1:7:4、1:8:4、2:1:4、2:3:4、2:4:4、2:5:4、2:6:4、2:7:4、2:8:4、3:1:4、3:3:4、3:4:4、3:5:4、3:6:4、3:7:4、3:8:4、3:1:4、3:3:4、3:4:4、3:5:4、3:6:4、3:7:4、3:8:4、4:1:4、4:3:4、4:4:4、4:5:4、4:6:4、4:7:4、4:8:4、5:1:4、5:3:4、5:4:4、5:5:4、5:6:4、5:7:4、5:8:4、6:1:4、6:3:4、6:4:4、6:5:4、6:6:4、6:7:4、6:8:4、7:1:4、7:3:4、7:4:4、7:5:4、7:6:4、7:7:4、7:8:4、8:1:4、8:3:4、8:4:3、8:5:4、8:6:4、8:7:4、8:8:4、1:1:5、1:2:5、1:3:5、1:4:5、1:5:5、1:6:5、1:7:5、1:8:5、2:1:5、2:3:5、2:4:5、2:5:5、2:6:5、2:7:5、2:8:5、3:1:5、3:3:5、3:4:5、3:5:5、3:6:5、3:7:5、3:8:5、3:1:5、3:3:5、3:4:5、3:5:5、3:6:5、3:7:5、3:8:5、4:1:5、4:3:5、4:4:5、4:5:5、4:6:5、4:7:5、4:8:5、5:1:5、5:3:5、5:4:5、5:5:5、5:6:5、5:7:5、5:8:5、6:1:5、6:3:5、6:4:5、6:5:5、6:6:5、6:7:5、6:8:5、7:1:5、7:3:5、7:4:5、7:5:5、7:6:5、7:7:5、7:8:5、8:1:5、8:3:5、8:4:5、8:5:5、8:6:5、8:7:5、8:8:5、1:1:6、1:2:6、1:3:6、1:4:6、1:5:6、1:6:6、1:7:6、1:8:6、2:1:6、2:3:6、2:4:6、2:5:6、2:6:6、2:7:6、2:8:6、3:1:6、3:3:6、3:4:6、3:5:6、3:6:6、3:7:6、3:8:6、3:1:6、3:3:6、3:4:6、3:5:6、3:6:6、3:7:6、3:8:6、4:1:6、4:3:6、4:4:6、4:5:6、4:6:6、4:7:6、4:8:6、5:1:6、5:3:6、5:4:6、5:5:6、5:6:6、5:7:6、5:8:6、6:1:6、6:3:6、6:4:6、6:5:6、6:6:6、6:7:6、6:8:6、7:1:6、7:3:6、7:4:6、7:5:6、7:6:6、7:7:6、7:8:6、8:1:6、8:3:6、8:4:6、8:5:6、8:6:5、8:7:6、8:8:6、1:1:7、1:2:7、1:3:7、1:4:7、1:5:7、1:6:7、1:7:7、1:8:7、2:1:7、2:3:7、2:4:7、2:5:7、2:6:7、2:7:7、2:8:7、3:1:7、3:3:7、3:4:7、3:5:7、3:6:7、3:7:7、3:8:7、3:1:7、3:3:7、3:4:7、3:5:7、3:6:7、3:7:7、3:8:7、4:1:7、4:3:7、4:4:7、4:5:7、4:6:7、4:7:7、4:8:7、5:1:7、5:3:7、5:4:7、5:5:7、5:6:7、5:7:7、5:8:7、6:1:7、6:3:7、6:4:7、6:5:7、6:6:7、6:7:7、6:8:7、7:1:7、7:3:7、7:4:7、7:5:7、7:6:7、7:7:7、7:8:7、8:1:7、8:3:7、8:4:7、8:5:7、8:6:5、8:7:7或8:8:7。

[0195] 本公开内容提供了联合免疫治疗或疫苗,其包括:至少两种、至少三种或多于三种不同的包含编码GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L的序列的靶抗原。例如,组合免疫治疗或疫苗可包括至少两种、至少三种或多于三种不同的包含编码野生型或修饰的GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L的序列的靶抗原,其中野生型或修饰的靶抗原包含与SEQ.ID.NO.:1具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.9%的序列同一性的序列。例如,组合免疫治疗或疫苗可包括至少两种、至少三种或多于三种不同的包含编码野生型或修饰的GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L的序列的靶抗原,其中野生型或修饰的靶抗原包含与SEQ.ID.NO.:2具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.9%的序列同一性的序列。例如,组合免疫治疗或疫苗可包括至少两种、至少三种或多于三种不同的包含编码野生型或修饰的GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L的序列的靶抗原,其中野生型或修饰的靶抗原包含与SEQ.ID.NO.:4具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.9%的序列同一性的序列。例如,组合免疫治疗或疫苗可包括至少两种、至少三种或多于三种不同的包含编码野生型或修饰的GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L的序列的靶抗原,其中野生型或修饰的靶抗原包含与SEQ.ID.NO.:5具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.9%的序列同一性的序列。例如,组合免疫治疗或疫苗可包括至少两种、至少三种或多于三种不同的包含编码野生型或修饰的GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L的序列的靶抗原,其中野生型或修饰的靶抗原包含与SEQ.ID.NO.:6具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.9%的序列同一性的序列。

[0196] 在一些方面,本公开内容提供了包括针对EA的多靶向免疫治疗和分子组合物的联合免疫治疗,该分子组合物包含靶向免疫抑制途径的至少一种免疫检查点蛋白的免疫途径检查点调节剂。本公开内容提供了联合免疫治疗或疫苗,其包括:至少两种、至少三种或多于三种不同的包含编码野生型或修饰的GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L的序列的靶抗原和至少一种包含免疫途径检查点调节剂的分子组合物。例如,联合免疫治疗或疫苗可包含至少两种、至少三种或多于三种不同的包含编码修饰的野生型或修饰的GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L的序列的靶抗原,以及至少一种免疫检查点抑制途径的分子组合物,其中该修饰的靶抗原包含与SEQ.ID.NO.:1、2、4、5和/或6具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.9%的序列同一性的序列。

[0197] 在一些实施方案中,所述至少一种分子组合物包含靶向CTLA4的免疫途径检查点调节剂。在一些实施方案中,该至少一种分子包括靶向PD1的免疫途径检查点调节剂。在一些实施方案中,该至少一种分子组合物包含靶向PDL1的免疫途径检查点调节剂。在一些实施方案中,该至少一种分子组合物包含靶向LAG3的免疫途径检查点调节剂。在一些实施方案中,该至少一种分子组合物包含靶向B7-H3的免疫途径检查点调节剂。在一些实施方案中,该至少一种分子组合物包含靶向B7-H4的免疫途径检查点调节剂。在一些实施方案中,该至少一种分子组合物包含靶向TIM3的免疫途径检查点调节剂。在一些实施方案中,该分子组合物包含免疫途径检查点调节剂,该免疫途径检查点调节剂是针对PD1、PDL1、PDL2、CD28、CD80、CD86、CTLA4、B7RP1、ICOS、B7RPI、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、KIR、TCR、LAG3、CD137、CD137L、OX40、OX40L、CD27、CD70、CD40、CD40L、TIM3(即,HAVcr2)、GAL9和A2aR的单克隆或多克隆抗体。

免疫融合配偶体抗原靶标

[0198] 本发明的病毒载体还可包括编码增强靶抗原的免疫原性的蛋白质的核酸序列。在这方面,用含有这样的蛋白质的腺病毒载体免疫后产生的蛋白质可以是融合蛋白,该融合蛋白包含与增强感兴趣的靶抗原的免疫原性的蛋白质融合的感兴趣的靶抗原。

[0199] 在一个实施方案中,这样的免疫融合配偶体衍生自分枝杆菌属,如结核分枝杆菌衍生的Ra12片段。用于增强异源多核苷酸/多肽序列的表达和/或免疫原性的Ra12组合和方法描述于美国专利申请60/158,585和美国专利号7,009,042中。简言之,Ra12是指为结核分枝杆菌MTB32A核酸的子序列的多核苷酸区域。MTB32A是由结核分枝杆菌的有毒和无毒菌株中的基因编码的32kDa的丝氨酸蛋白酶。已经对MTB32A的核苷酸序列和氨基酸序列进行了描述(参见例如,美国专利申请60/158,585;Skeiky等人,Infection and Immun.67:3998-4007 (1999))。MTB32A编码序列的C末端片段以高水平表达并在整个纯化过程中保持为可溶的多肽。此外,Ra12可增强与其融合的异源免疫原性多肽的免疫原性。一个Ra12融合多肽包含对应于MTB32A的氨基酸残基192至323的14kDa C末端片段。其他Ra12多核苷酸通常包含编码Ra12多肽的一部分的至少约15、30、60、100、200、300个或更多个核苷酸。Ra12多核苷酸可包含天然序列(即,编码Ra12多肽或其一部分的内源序列),或者可包含这样的序列的变体。Ra12多核苷酸变体可包含一个或多个置换、添加、缺失和/或插入,使得所编码的融合多肽的生物活性相对于包含天然Ra12多肽的融合多肽基本上不降低。变体可与编码天然Ra12多肽或其一部分的多核苷酸序列具有至少约70%、80%或90%的同一性或更高的同一性。

[0200] 免疫融合配偶体可衍生自蛋白D,即革兰氏阴性细菌流感嗜血菌B的表面蛋白。在一些情况下,蛋白D衍生物包含大约前三分之一的蛋白质(例如,N末端前100-110个氨基酸)。蛋白D衍生物可被脂化。在某些实施方案内,脂蛋白D融合配偶体的前109个残基包含在N末端上,以向多肽提供额外的外源T细胞表位,这些残基可增加大肠杆菌中的表达水平并且可用作表达增强子。脂质尾部可确保抗原向抗原呈递细胞的最佳呈递。其他融合配偶体包括来自流感病毒NS1的非结构蛋白(血凝素)。通常,使用N末端的81个氨基酸,但可以使用包含T辅助表位的不同的片段。

[0201] 免疫融合配偶体可以是称为LYTA的蛋白质或其一部分(优选C末端部分)。LYTA衍生自肺炎链球菌,其合成称为酰胺酶LYTA的N-乙酰基-L-丙氨酸酰胺酶(由LytA基因编码)。LYTA是特异性降解肽聚糖骨架中某些键的自溶素。LYTA蛋白的C末端结构域负责对胆碱或一些胆碱类似物如DEAE的亲和力。已利用该性质来开发用于表达融合蛋白的大肠杆菌C-LYTA表达质粒。可使用在氨基末端含有C-LYTA片段的杂交蛋白的纯化。在另一个实施方案内,LYTA的重复部分可并入到融合多肽中。例如,可在残基178处开始的C末端区域中找到重复部分。一个特定的重复部分合并残基188-305。

[0202] 在一些实施方案中,抗原靶标包含含有细胞因子的免疫原性组分,该细胞因子选自IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13。在一些实施方案中,抗原靶标进一步包含含有细胞因子的一种或多种免疫原性组分,该细胞因子选自IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13。在一些实施方案中,抗原靶标包含免疫原性组分,该免疫原性组分包含编码IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13

的核酸,与IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13具有基本的同一性的蛋白质,以及编码与IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13具有基本的同一性的蛋白质的核酸。

[0203] 在一些实施方案中,抗原靶标与包含细胞因子的免疫原性组分融合或连接,该细胞因子选自IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13。在一些实施方案中,抗原靶标在细胞中与包含细胞因子的免疫原性组分一起共表达,该细胞因子选自IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13。

免疫途径检查点调节剂

[0204] 在一些实施方案中,本发明的组合物与一种或多种免疫途径检查点调节剂一起施用。激活与抑制信号之间的平衡调控T淋巴细胞与病变细胞之间的相互作用,其中通过T细胞受体(TCR)的抗原识别来启动T细胞应答。将抑制途径和信号称为免疫检查点。在正常情况下,免疫检查点在控制和防止自身免疫方面发挥关键作用,并且也保护免受响应于病原性感染而产生的组织损伤。

[0205] 本公开内容提供了用于治疗埃博拉感染的联合免疫治疗,该联合免疫治疗包括基于病毒载体的疫苗和用于调节免疫检查点抑制途径的组合物。在一些实施方案中,调节是增加基因或蛋白质的表达或活性。在一些实施方案中,调节是降低基因或蛋白质的表达或活性。在一些实施方案中,调节影响基因或蛋白质家族。

[0206] 通常,免疫抑制途径由配体-受体相互作用所启动。目前清楚的是,在疾病中,该疾病可指定免疫检查点途径作为诱导受试者的免疫抗性的机制。

[0207] 可通过已知调节一种或多种免疫抑制途径的分子组合物如siRNA、反义、小分子、模拟物、重组形式的配体、受体或蛋白质,或抗体(其可以是Ig融合蛋白)来阻断通过给定疾病诱导的受试者的免疫抗性或免疫抑制途径。例如,采用免疫检查点蛋白,如细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4)和程序性细胞死亡蛋白1(PD1)的阻断剂的初步临床发现已经显示出增强抗肿瘤免疫力的前景。

[0208] 因为病变细胞可表达多种抑制性配体,并且疾病浸润淋巴细胞表达多种抑制性受体,所以免疫检查点蛋白的双重或三重阻断可增强抗疾病免疫力。本文提供的联合免疫治疗可包括一种或多种分子组合物,该组合物包含靶向一种或多种以下免疫检查点蛋白的免疫途径检查点调节剂:PD1、PDL1、PDL2、CD28、CD80、CD86、CTLA4、B7RP1、ICOS、B7RPI、B7-H3(也称为CD276)、B7-H4(也称为B7-S1、B7x和VCTN1)、BTLA(也称为CD272)、HVEM、KIR、TCR、LAG3(也称为CD223)、CD137、CD137L、OX40、OX40L、CD27、CD70、CD40、CD40L、TIM3(也称为HAVcr2)、GAL9、A2aR和腺苷。在一些实施方案中,分子组合物包含siRNA。在一些实施方案中,分子组合物包含小分子。在一些实施方案中,分子组合物包含重组形式的配体。在一些实施方案中,分子组合物包含重组形式的受体。在一些实施方案中,分子组合物包含抗体。在一些实施方案中,联合治疗包括多于一种分子组合物和/或多于一种类型的分子组合物。如本领域技术人员将会理解的,未来发现的免疫检查点抑制途径的蛋白质也被设想为本公开内容所涵盖。

[0209] 在一些实施方案中,联合免疫治疗包括用于调节CTLA4的分子组合物。在一些实施方案中,联合免疫治疗包括用于调节PD1的分子组合物。在一些实施方案中,联合免疫治疗

包括用于调节PDL1的分子组合物。在一些实施方案中,联合免疫治疗包括用于调节LAG3的分子组合物。在一些实施方案中,联合免疫治疗包括用于调节B7-H3的分子组合物。在一些实施方案中,联合免疫治疗包括用于调节B7-H4的分子组合物。在一些实施方案中,联合免疫治疗包括用于调节TIM3的分子组合物。在一些实施方案中,调节是表达的增加或增强。在其他实施方案中,调节是表达的降低或缺失。

[0210] 两种示例性免疫检查点抑制剂包括细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4 (CTLA-4) 和程序性细胞死亡蛋白-1 (PD1)。CTLA-4只可在T细胞上表达,在T细胞中,CTLA-4调节T细胞活化的早期阶段。CTLA-4与共刺激性T细胞受体CD28相互作用,这可导致抑制T细胞活性的信号传导。一旦发生TCR抗原识别,CD28信号传导即可增强TCR信号传导,从而在一些情况下产生活化的T细胞,并且CTLA-4抑制CD28的信号传导活性。本公开内容提供了用于治疗埃博拉的和抗CTLA-4单克隆抗体组合的如本文所提供的免疫治疗。本公开内容提供了用于治疗埃博拉的和CTLA-4分子组合物组合的如本文所提供的免疫治疗。

[0211] 程序性死亡细胞蛋白配体-1 (PDL1) 是B7家族的成员,并且分布在各种组织和细胞类型中。PDL1可与PD1相互作用,从而抑制T细胞活化以及CTL介导的裂解。已经在各种人类肿瘤中证实了PDL1的显著表达,并且PDL1表达是肿瘤逃避宿主抗肿瘤免疫应答的关键机制之一。程序性死亡配体1 (PDL1) 和程序性细胞死亡蛋白-1 (PD1) 作为免疫检查点相互作用。这种相互作用可以是导致抗肿瘤免疫应答钝化和随后的肿瘤进展的主要耐受机制。PD1存在于活化的T细胞上,而PD1的主要配体PDL1往往在肿瘤细胞和抗原呈递细胞 (APC) 以及包括B细胞在内的其他细胞上表达。已经在包括HPV相关的头颈癌在内的各种人类肿瘤中证实了PDL1的显著表达。PDL1在T细胞上与PD1相互作用,从而抑制T细胞活化和细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 介导的裂解。本公开内容提供了用于治疗埃博拉的和抗PD1或抗PDL1单克隆抗体组合的如本文所提供的免疫治疗。本公开内容提供了用于治疗埃博拉的和PD1或抗PDL1分子组合物组合的如本文所提供的免疫治疗。本公开内容提供了用于治疗埃博拉的和抗CTLA-4以及抗PD1单克隆抗体组合的如本文所提供的免疫治疗。本公开内容提供了用于治疗埃博拉的和抗CTLA-4以及PDL1单克隆抗体组合的如本文所提供的免疫治疗。本公开内容提供了用于治疗埃博拉的和抗CTLA-4、抗PD1、PDL1单克隆抗体或其组合相组合的如本文所提供的免疫治疗。

[0212] 免疫检查点分子可由T细胞表达。免疫检查点分子可有效地充当“制动器 (brake)”来下调或抑制免疫应答。免疫检查点分子包括但不限于直接抑制免疫细胞的程序性死亡蛋白1 (PD1, 也称为PDCD1或CD279, 登录号: NM_005018)、细胞毒性T淋巴细胞抗原4 (CTLA-4, 也称为CD152, GenBank登录号: AF414120.1)、LAG3 (也称为CD223, 登录号: NM_002286.5)、Tim3 (也称为HAVCR2, GenBank登录号: JX049979.1)、BTLA (也称为CD272, 登录号: NM_181780.3)、BY55 (也称为CD160, GenBank登录号: CR541888.1)、TIGIT (也称为IVSTM3, 登录号: NM_173799)、LAIR1 (也称为CD305, GenBank登录号: CR542051.1)、SIGLEC10 (GenBank登录号: AY358337.1)、2B4 (也称为CD244, 登录号: NM_001166664.1)、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、CD96、CRTAM、SIGLEC7、SIGLEC9、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、TGFBRII、TGFRBRI、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3。例如, PD1可与本发明的腺病毒疫苗组合以治疗有需

要的患者。

[0213] 表1以未详尽列举的方式示出了可被灭活以改善本发明的腺病毒疫苗的效率的示例性免疫检查点基因。免疫检查点基因可选自表1中列出的这些基因以及涉及共抑制受体功能、细胞死亡、细胞因子信号传导、精氨酸色氨酸饥饿、TCR信号传导、诱导的T-reg抑制、控制转录因子的耗尽或无反应以及缺氧介导的耐受的其他基因。

表1

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

[0214] 与单独的任一种药剂相比,基于腺病毒的疫苗与免疫途径检查点调节剂的组合可导致治疗的患者的埃博拉感染、进展或症状的减少。在本发明的另一个实施方案中,与单独的任一种药剂相比,基于腺病毒的疫苗与免疫途径检查点调节剂的组合可导致治疗的患者的改善的总存活期。在一些情况下,与单独的任一种药剂相比,腺病毒疫苗与免疫途径检查点调节剂的组合可增加治疗的患者中埃博拉特异性T细胞应答的频率或强度。

[0215] 本发明还公开了使用免疫检查点抑制来改善基于腺病毒载体的疫苗的性能。所述免疫检查点抑制可在疫苗接种时施用。所述免疫检查点抑制也可在疫苗后施用。免疫检查点抑制可与腺病毒疫苗施用同时发生。免疫检查点抑制可在疫苗接种后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50或60分钟发生。免疫检查点抑制也可在疫苗接种后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时发生。在一些情况下,免疫抑制可在疫苗接种后1、2、3、4、5、6或7天发生。免疫检查点抑制可在疫苗接种之前或之后任何时间发生。

[0216] 在另一个方面,本发明涉及包含抗原和免疫途径检查点调节剂的疫苗。本发明可涉及用于治疗具有将受益于受试者细胞上的免疫检查点(例如,PD1)及其天然结合配偶体下调的病况的受试者的方法。

[0217] 免疫途径检查点调节剂可与包含任何抗原的腺病毒疫苗组合。例如,抗原可以是

GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L。当与疫苗组合时,免疫途径检查点调节剂可产生协同效应。当与疫苗组合时,免疫途径检查点调节剂还可产生加性效应。

制剂

[0218] 本发明提供了包含可通过任何途径单独或与药学上可接受的载体或赋形剂一起施用的疫苗接种方案的药物组合物,并且可以以单剂量和多剂量进行这样的施用。更具体地,药物组合物可与片剂、胶囊、锭剂、糖锭、手糖(hand candy)、粉末、喷雾剂、水性悬浮剂、可注射溶液、酏剂、糖浆剂等形式的各种药学上可接受的惰性载体组合。这样的载体包括固体稀释剂或填充剂、无菌水性介质和各种无毒有机溶剂等。此外,可借助通常用于此类目的的各种类型的试剂将这样的口服药物制剂适当地变甜和/或调味。全文所述的组合物可配制成药物并用于治疗诊断患有疾病例如埃博拉的有需要的人或哺乳动物。

[0219] 为了施用,可将腺病毒载体原种与合适的缓冲液、生理学上可接受的载体、赋形剂等组合。在某些实施方案中,在合适的缓冲液,如无菌PBS或盐水中施用合适数目的病毒载体颗粒(VP)。在某些实施方案中,在特定的制剂中提供本文公开的病毒载体组合物用于皮下、肠胃外、静脉内、肌内或甚至腹膜内施用。在某些实施方案中,可在与表面活性剂如羟丙基纤维素适当混合的水中制备活性化合物作为游离碱或药理学上可接受的盐的溶液形式的制剂。还可在甘油、液体聚乙二醇、基于角鲨烯的乳液、基于角鲨烯的水包油乳液、油包水乳液、水包油乳液、非水性乳液、石蜡油包水乳液和其混合物以及在油中制备分散体。在其他实施方案中,可在用于通过吞咽或通过栓剂施用的药丸形式的特定的制剂中提供病毒载体。

[0220] 适用于可注射使用的说明性药物形式包括无菌水溶液或分散体以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末(参见例如,美国专利号5,466,468)。达到容易注射程度的流体形式可能是优选的。在制造和储存条件下稳定的形式在本发明的范围内。在各个实施方案中,对各种形式进行保存以防止微生物如细菌、霉菌和真菌的污染作用。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物和/或植物油的溶剂或分散介质。可例如通过使用包衣如卵磷脂,通过在分散体的情况下维持所需的颗粒大小和/或通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。可通过各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸和硫柳汞来促进对微生物作用的预防。可优选地包括等渗剂,例如糖或氯化钠。可通过在组合物中使用延迟吸收剂,例如单硬脂酸铝和明胶来实现可注射组合物的延长吸收。

[0221] 在一个实施方案中,为了在水溶液中进行肠胃外施用,如果需要,可对该溶液进行适当缓冲,并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释液等渗。这些特定的水溶液尤其适用于静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。在这方面,根据本公开内容,可使用的无菌水性介质将是本领域技术人员已知的。例如,可将一个剂量溶解于1mL等渗NaCl溶液中,并加入到1000mL皮下灌注(hypodermoclysis)液体中或在推荐的输注部位进行注射。根据接受治疗的受试者的病况,可在剂量上发生一些变化。

[0222] 制剂的载体可包括任何及所有的溶剂、分散介质、媒介物、包衣材料、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、悬浮剂、胶体等。除非任何常规介质或试剂与活性成分不相容,否则考虑将其用于治疗性组合物中。补充的活性成分也可并入到组合物中。GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和L。

[0223] 在某些实施方案中,本发明的病毒载体可与一种或多种免疫刺激剂如佐剂联合施用。免疫刺激剂是指增强或加强对抗原的免疫应答(抗体和/或细胞介导的)的基本任何物质。一种类型的免疫刺激剂包括佐剂。许多佐剂含有被设计用于保护抗原免于快速分解代谢的物质,如氢氧化铝或矿物油,以及免疫应答的刺激物,如脂质A、百日咳博德特氏菌或结核分枝杆菌衍生的蛋白质。某些佐剂可商购获得,例如,弗氏不完全佐剂和完全佐剂(Difco 实验室);Merck佐剂65(Merck and Company, Inc.);AS-2(SmithKline Beecham);铝盐如氢氧化铝凝胶(明矾)或磷酸铝;钙、铁或锌的盐;酰化酪氨酸的不溶性悬浮剂;酰化糖;阳离子或阴离子衍生的多糖;聚磷腈;可生物降解的微球体;单磷酰脂质A和quil A。细胞因子如GM-CSF、IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和/或IL-13及其他细胞因子,如生长因子也可用作佐剂。

[0224] 在本发明的某些实施方案内,佐剂组合物可以是诱导主要为Th1型免疫应答的组合物。高水平的Th1型细胞因子(例如,IFN- γ 、TNF α 、IL-2和IL-12)倾向于有利于诱导对所施用抗原的细胞介导的免疫应答。相比之下,高水平的Th2型细胞因子(例如,IL-4、IL-5、IL-6和IL-10)倾向于有利于诱导体液免疫应答。在施用如本文所提供的疫苗之后,患者可支持包括Th1型和/或Th2型应答的免疫应答。在其中应答主要为Th1型的某些实施方案中,Th1型细胞因子的水平将比Th2型细胞因子的水平增加到更高的程度。可使用标准测定法容易地评估这些细胞因子的水平。因此,本发明的各个实施方案涉及使用细胞因子,例如与复制缺陷型病毒载体治疗同时提供的IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和/或IL-13增强对靶抗原,例如SEQ.ID.NO.:1、SEQ.ID.NO.:2、SEQ.ID.NO.:4、SEQ.ID.NO.:5或SEQ.ID.NO.:6的免疫应答的治疗。在一些实施方案中,细胞因子或编码细胞因子的核酸与本文所述的复制缺陷型病毒一起施用。在一些实施方案中,在病毒载体施用之前或之后进行细胞因子施用。在一些实施方案中,能够增强对靶抗原,例如SEQ.ID.NO.:1、SEQ.ID.NO.:2、SEQ.ID.NO.:4、SEQ.ID.NO.:5或SEQ.ID.NO.:6的免疫应答的复制缺陷型病毒载体进一步包含编码细胞因子的序列。

[0225] 用于引发主要为Th1型应答的某些说明性佐剂包括例如,单磷酰脂质A,如3-去-O-酰化单磷酰脂质A与铝盐的组合。**MPL**[®]佐剂可商购获得。含CpG的寡核苷酸(其中CpG二核苷酸未甲基化)也诱导主要为Th1的应答。这样的寡核苷酸是公知的且已进行了描述。还描述了免疫刺激性DNA序列。用于本发明的另一种佐剂包括皂苷,如Quil A或其衍生物,包括QS21和QS7、七叶皂苷;毛地黄皂苷;或者石头花属(*Gypsophila*)或奎奴亚藜(*chenopodium quinoa*)皂苷。其他制剂可包括本发明的佐剂组合,例如包含QS21、QS7、Quil A、 β -七叶皂苷或毛地黄皂苷的下组中的至少两种的组合中的多于一种皂苷。

[0226] 在某些实施方案中,可通过鼻内喷雾剂、吸入剂和/或其他气雾剂递送媒介物来递送组合物。使用鼻内微粒树脂和溶血磷脂酰-甘油化合物的药物递送(美国专利号5,725,871)是制药领域公知的。同样地,对聚四氟乙烯支持基质形式的说明性经粘膜药物递送进行了描述。

[0227] 在某些实施方案中,脂质体、纳米胶囊、微粒、脂质颗粒、囊泡等用于将本发明的组合物引入到合适的宿主细胞/生物体中。特别是,可将本发明的组合物配制成包封在脂质颗粒、脂质体、囊泡、纳米球或纳米颗粒等中进行递送。或者,本发明的组合物可与这样的载体媒介物的表面共价或非共价结合。

[0228] 脂质体和脂质体样制剂作为潜在药物载体的形成和使用通常是本领域技术人员已知的(参见,Lasic,Trends Biotechnol 1998年7月;16(7):307-21;Takakura,Nippon Rinsho 1998年3月;56(3):691-5;Chandran等人,Indian J Exp Biol.1997年8月;35(8):801-9;Margalit,Crit.Rev Ther Drug Carrier Syst.1995;12(2-3):233-61;美国专利号5,567,434;美国专利号5,552,157;美国专利号5,565,213;美国专利号5,738,868和美国专利号5,795,587)。

[0229] 脂质体已被成功用于通常难以通过其他程序进行转染的多种细胞类型,包括T细胞悬浮液、原代肝细胞培养物和PC 12细胞。脂质体已经有效地用于将基因、各种药物、放射治疗剂、酶、病毒、转录因子、变构效应物等引入到多种培养的细胞系和动物中。此外,脂质体的使用似乎并不与全身递送后的自身免疫应答或不可接受的毒性相关联。

[0230] 在某些实施方案中,脂质体由分散在水性介质中的磷脂形成,并自发形成多层同心双层囊泡(也称为多层囊泡(MLV))。

[0231] 或者,在一些实施方案中,本发明提供了本发明组合物的药学上可接受的纳米胶囊制剂。纳米胶囊通常可以以稳定且可再现的方式捕获化合物。为了避免由于细胞内聚合物超负荷而引起的副作用,可使用能够在体内降解的聚合物来设计这样的超细颗粒(大小约0.1 μ m)。可如Couvreur等人,Crit.Rev Ther Drug Carrier Syst.1988;5(1):1-20;zur Muhlen等人,Eur J Pharm Biopharm.1998年3月;45(2):149-55;Zambaux等人,J Controlled Release.1998年1月2日;50(1-3):31-40;和美国专利号5,145,684所述制备这样的颗粒。

方法

[0232] 在各个实施方案中,本发明的组合物和方法利用人溶细胞性T细胞(CTL),如识别与所选MHC分子,例如HLA-A2、HLA-A3和HLA-A24结合的GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L表位的那些细胞。可选择表达某些血清型例如HLA-A2、HLA-A3和HLA-A24的MHC分子的个体用于使用本发明的方法和组合物的治疗。例如,可选择表达某些血清型例如HLA-A2、HLA-A3和HLA-A24的MHC分子的个体用于使用本文所述的方法和组合物的治疗,包括增强对GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L的免疫应答。

[0233] 在各个实施方案中,可通过使用经感兴趣的表位脉冲的抗原呈递细胞刺激外周血单核细胞的体外培养来生成这些T细胞。此外,还可在用GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L乳胶珠,GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L蛋白脉冲的可塑贴壁外周血单核细胞,或者经GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L RNA敏化的DC刺激后生成T细胞系。还可从用编码GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L免疫原的疫苗载体免疫的患者生成T细胞。来自GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L的HLA A2呈递的肽可进一步在埃博拉感染的患者中找到。在各个实施方案中,本发明涉及GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L的HLA A2限制性表位,该表位具有刺激用疫苗GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L免疫的患者的CTL的能力。

治疗的方法

[0234] 本发明的腺病毒载体可用于许多种疫苗环境中,以产生针对本文所述的一种或多种靶抗原的免疫应答。本发明提供了产生针对任何靶抗原,如本文别处所述的靶抗原的免疫应答的方法。腺病毒载体由于以下意想不到的发现而特别重要:它们可用于在具有预先存在的对Ad的免疫力的受试者中产生免疫应答,并且可用于包括使用腺病毒载体进行多轮

免疫的疫苗接种方案,使用上一代腺病毒载体是不可能进行这些方案的。

[0235] 通常,产生免疫应答包括诱导体液应答和/或细胞介导的应答。可能期望增加针对感兴趣的靶抗原的免疫应答。产生免疫应答可涉及免疫系统的某些细胞的活性和/或数目的降低或某些细胞因子或其他效应分子的水平或/或活性的降低。用于检测免疫应答中的变化(例如,细胞数目、细胞因子表达、细胞活性)的多种方法是本领域已知的,并且可用于本发明的上下文中。用于本文中的说明性方法包括细胞内细胞因子染色(ICS)、ELISpot、增殖测定、细胞毒性T细胞测定(包括铬释放或等同测定)和使用任何数目的聚合酶链反应(PCR)的基因表达分析或基于RT-PCR的测定。

[0236] 产生免疫应答可包括与对照相比施用本发明腺病毒载体的受试者中1.5至5倍的靶抗原特异性CTL活性增加。在另一个实施方案中,产生免疫应答包括与对照相比施用腺病毒载体的受试者中约2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、15、16、17、18、19、20倍或更多倍的靶标特异性CTL活性增加。

[0237] 产生免疫应答可包括与适当的对照相比施用包含编码靶抗原的核酸的本发明腺病毒载体的受试者中1.5至5倍的靶抗原特异性HTL活性,如辅助性T细胞增殖的增加。在另一个实施方案中,产生免疫应答包括与对照相比约2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、15、16、17、18、19、20倍或更多倍的靶标特异性HTL活性增加。在本文中,HTL活性可包括如上所述的增加或降低特定细胞因子,如干扰素- γ (IFN- γ)、白介素-1 (IL-1)、IL-2、IL-3、IL-6、IL-7、IL-12、IL-15、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或其他细胞因子的产生。在这方面,产生免疫应答可包括从Th2型应答到Th1型应答的转变,或在某些实施方案中,从Th1型应答到Th2型应答的转变。在其他实施方案中,产生免疫应答可包括主要为Th1或Th2型应答的刺激。

[0238] 产生免疫应答可包括与适当的对照相比施用本发明腺病毒载体的受试者中1.5至5倍的靶标特异性抗体产量增加。在另一个实施方案中,产生免疫应答包括与对照相比施用腺病毒载体的受试者中约2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、15、16、17、18、19、20倍或更多倍的靶标特异性抗体产量增加。

[0239] 因此,本发明提供了用于产生针对感兴趣的靶抗原的免疫应答的方法,该方法包括向个体施用腺病毒载体,该腺病毒载体包含:a)复制缺陷型腺病毒载体,其中该腺病毒载体在E2b区具有缺失,和b)编码靶抗原的核酸;以及向个体重复施用腺病毒载体至少一次;从而产生针对靶抗原的免疫应答。在某些实施方案中,本发明提供了其中施用的载体不是无内容载体的方法。在具体的实施方案中,靶抗原可以是野生型蛋白,其片段、变体或变体片段。在一些实施方案中,靶抗原包括GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24、L,其片段、变体或变体片段。

[0240] 在另外的实施方案中,本发明提供了用于通过以下步骤在个体(其中该个体具有预先存在的对Ad的免疫力)中产生针对靶抗原的免疫应答的方法:向个体施用腺病毒载体,该腺病毒载体包含:a)复制缺陷型腺病毒载体,其中该腺病毒载体在E2b区具有缺失,和b)编码靶抗原的核酸;以及向个体重复施用腺病毒载体至少一次;从而产生针对靶抗原的免疫应答。在具体的实施方案中,靶抗原可以是野生型蛋白,其片段、变体或变体片段。在一些实施方案中,靶抗原包括GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24、L,其片段、变体或变体片段。

[0241] 关于预先存在的对Ad的免疫力,可使用本领域已知的方法,如用来测试Ad抗体的存在的基于抗体的测定法来确定。此外,在某些实施方案中,本发明的方法包括首先确定个体具有预先存在的对Ad的免疫力,然后施用如本文所述的本发明的E2b缺失型腺病毒载体。

[0242] 本发明的一个实施方案提供了在个体中产生针对一种或多种靶抗原的免疫应答的方法,该方法包括向个体施用包括复制缺陷型腺病毒载体的第一腺病毒载体,其中该腺病毒载体具有在E2b区的缺失,和编码至少一种靶抗原的核酸;向个体施用包括复制缺陷型腺病毒载体的第二腺病毒载体,其中该腺病毒载体具有在E2b区的缺失,和编码至少一种靶抗原的核酸,其中该第二腺病毒载体的至少一种靶抗原与该第一腺病毒载体的至少一种靶抗原相同或不同。在具体的实施方案中,靶抗原可以是野生型蛋白,其片段、变体或变体片段。在一些实施方案中,靶抗原包括GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24、L,其片段、变体或变体片段。

[0243] 因此,本发明考虑用相同的E2b缺失型腺病毒载体进行多次免疫,或用不同的E2b缺失型腺病毒载体进行多次免疫。在每种情况下,腺病毒载体可包含编码如本文别处所述的一种或多种靶抗原的核酸序列。在某些实施方案中,所述方法包括用编码一种靶抗原的E2b缺失型腺病毒进行多次免疫,以及重复施用相同的腺病毒载体多次,从而诱导针对靶抗原的免疫应答。在一些实施方案中,靶抗原包括GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24、L,其片段、变体或变体片段。

[0244] 在另外的实施方案中,所述方法包括用编码一种或多种靶抗原的第一腺病毒载体进行免疫,然后用第二腺病毒载体进行施用,该第二腺病毒载体编码可与由第一腺病毒载体编码的那些抗原相同或不同的一种或多种靶抗原。在这方面,其中一种编码的靶抗原可以是不同的,或者所有编码的抗原可以是不同的,或者一些可以是相同的而一些可以是不同的。此外,在某些实施方案中,所述方法包括施用第一腺病毒载体多次,以及施用第二腺病毒多次。在这方面,所述方法包括施用第一腺病毒载体1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15次或更多次,以及施用第二腺病毒载体1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15次或更多次。施用顺序可包括施用第一腺病毒连续一次或多次,然后施用第二腺病毒载体连续一次或多次。在某些实施方案中,所述方法包括如每种施用一次、每种施用两次、每种施用三次等交替施用第一和第二腺病毒载体。在某些实施方案中,同时施用第一和第二腺病毒载体。在其他实施方案中,依次施用第一和第二腺病毒载体。在一些实施方案中,靶抗原包括GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24、L,其片段、变体或变体片段。

[0245] 如熟练的技术人员将会容易理解的,可在本发明的方法中使用多于两种腺病毒载体。可在本发明的方法中使用3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种不同的腺病毒载体。在某些实施方案中,所述方法包括一次施用多于一种E2b缺失型腺病毒载体。在这方面,可通过同时施用多种不同的腺病毒载体来产生针对感兴趣的多种靶抗原的免疫应答,每种腺病毒载体均包含编码一种或多种靶抗原的核酸序列。

[0246] 还提供了用于治疗或改善埃博拉的症状的方法。治疗的方法包括向患有如本文所述的埃博拉感染或处于患有埃博拉感染的风险中的个体一次或多次施用腺病毒载体。就此,本发明提供了用于在处于被这样的病毒感染的风险中的个体中针对埃博拉进行疫苗接种的方法。处于风险中的个体可以是可能在某些时间暴露于埃博拉或先前已暴露但尚未具有埃博拉感染症状或者对埃博拉感染特别敏感的个体。可确定患有埃博拉感染的个体表达

和/或存在靶抗原,从而可用于指导本文的治疗。例如,可找出表达和/或存在靶抗原的实例,随后可施用编码靶抗原、其变体、其片段或其变体片段的腺病毒载体。

[0247] 本发明考虑使用腺病毒载体用于体内递送编码靶抗原或其片段、其变体或其变体片段的核酸。一旦注射到受试者中,核酸序列即被表达,从而导致针对由该序列编码的抗原的免疫应答。可以以“有效量”,即,在选择的途径或施用途径中有效引发如本文别处所述的免疫应答的腺病毒载体的量施用腺病毒载体疫苗。有效量可诱导有效的免疫应答以有助于保护或治疗宿主免受靶埃博拉的侵害。在没有通常与典型疫苗相关的显著不良反应的情况下,选择每种疫苗剂量中的载体量作为诱导免疫、免疫保护或其他免疫治疗应答的量。一旦进行了疫苗接种,即可对受试者进行监测以确定疫苗治疗的功效。监测疫苗接种的功效可通过本领域普通技术人员已知的任何方法来进行。在一些实施方案中,可测定血液或流体样品以检测抗体的水平。在其他实施方案中,可进行ELISpot测定以检测来自循环血细胞或来自淋巴组织细胞的细胞介导的免疫应答。

[0248] 本文所述的治疗性组合物的施用途径和频率以及剂量可因个体与个体以及疾病与疾病的不同而不同,并且可使用标准技术容易地建立。通常,可通过注射(例如,皮内、肌肉内、静脉内或皮下)、鼻内(例如,通过吸入)、以药丸形式(例如,吞咽、用于阴道或直肠递送的栓剂)施用药物组合物和疫苗。在某些实施方案中,可在52周的时间段内施用1至10个剂量。在某些实施方案中,以1个月的间隔施用6个剂量,并且可在此后定期进行进一步的加强疫苗接种。替代方案可能适合于个体患者。因此,可在1年的时间段或者更短或更长的时间段内,如在35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95周或100周的时间段内施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个剂量。可以以1、2、3、4、5或6周的间隔或更长的间隔施用剂量。

[0249] 可在少于约4小时的时间段内,更优选在少于约3小时的时间段内输注疫苗。例如,第一个25-50mg可在30分钟内,优选甚至15min内输注,而剩余的在接下来的2-3hr内输注。更普遍地,施用的疫苗构建体的剂量可以以每2周或3周一个剂量进行施用,重复总计至少3个剂量。或者,可每周施用两次构建体,持续4-6周。可任选地以其他间隔重复给药方案,并且可通过各种肠胃外途径给予剂量,并适当地调整剂量和时间表。本发明的组合可与任何数目的相关治疗方式相结合(例如,在该相关治疗方式之前、与该相关治疗方式同时或在该相关治疗方式之后)施用于患者。

[0250] 合适的剂量是在如上所述施用能够促进如本文别处所述的靶抗原免疫应答的腺病毒载体的量。在某些实施方案中,免疫应答比基线(即,未处理的)水平高至少10-50%。在某些实施方案中,免疫应答是基线水平的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、110、125、150、200、250、300、400、500倍或更多倍。可通过测量患者的靶抗原抗体或通过能够在体外杀死患者感染细胞的溶细胞性效应细胞的疫苗依赖性生成或本领域已知的用于监测免疫应答的其他方法来监测这样的应答。与未接种疫苗的患者相比,这样的疫苗还应能够引起免疫应答,从而导致接种疫苗的患者的有问题的疾病的改善的临床结果。在一些实施方案中,改善的临床结果包括治疗疾病、减少疾病症状、改变疾病进展或延长寿命。

[0251] 通常,适当的剂量和治疗方案提供足以提供治疗和/或预防益处的量的腺病毒载体。可通过建立与未治疗患者相比治疗的患者正在治疗的特定疾病的改善的临床结果来监

测这样的应答。可随时间评估监测数据。随着时间的推移,疾病的进展可以改变。治疗医师将会容易地认识到临床结果的这些改善。对靶蛋白的预先存在的免疫应答的增加通常可能与改善的临床结果相关。通常可使用标准增殖、细胞毒性或细胞因子测定来评估这样的免疫应答,并且可使用在治疗之前和之后从患者获得的样品来进行这些测定。

[0252] 虽然本发明的一个优点是能够用相同或不同的腺病毒载体,尤其是在对Ad具有预先存在的免疫力的个体中施用多次疫苗接种,但本发明的腺病毒疫苗还可作为初次和加强方案的一部分进行施用。混合方式的初次和加强接种方案可导致增强的免疫应答。因此,本发明的一个方面是采用质粒疫苗,如包含感兴趣的靶抗原的质粒载体通过以下步骤引发受试者的方法:施用质粒疫苗至少一次,允许预定的时间长度过去,然后通过施用腺病毒载体进行加强。可采用多次引发,例如,1-4次,但也可使用更多次。引发与加强之间的时间长度通常可在约四个月至一年之间变化,但也可使用其他时间范围。在某些实施方案中,可用质粒疫苗引发受试者1、2、3、4、5、6、7、8、9、10次或更多次,然后用腺病毒载体在4个月后进行加强。

患者选择

[0253] 本发明的各个实施方案涉及用于在所选患者群体中引起针对一种或多种SEQ.ID.NO.:1、SEQ.ID.NO.:2、SEQ.ID.NO.:4、SEQ.ID.NO.:5或SEQ.ID.NO.:6抗原的免疫应答的组合物和方法。本文提供的任何组合物可施用于个体。“个体”可与“受试者”或“患者”互换使用。个体可以是哺乳动物,例如人或动物,如非人灵长类动物、啮齿动物、兔、大鼠、小鼠、马、驴、山羊、猫、狗、牛、猪或绵羊。在实施方案中,个体是人。在实施方案中,个体是胎儿、胚胎或儿童。在一些情况下,本文提供的组合物施用于离体细胞。在一些情况下,本文提供的组合物作为治疗埃博拉的方法施用于个体。

[0254] 在一些情况下,受试者没有埃博拉感染。在一些情况下,本发明的治疗在埃博拉感染之前施用。受试者可患有未检测到的埃博拉感染。受试者可具有低埃博拉感染负担。受试者也可具有高埃博拉感染负担。

[0255] 在一些实施方案中,可要求患者已经接受过其他治疗并且任选地通过其他治疗发生进展。在一些情况下,个体拒绝接受这样的治疗可使患者被纳入采用本发明的方法和组合物的治疗合格库中。在一些实施方案中,可要求接受使用本发明的方法和组合物的治疗的个体具有至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、18、21或24个月的估计寿命。接受使用本发明的方法和组合物的治疗的患者库可受年龄限制。例如,大于2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、25、30、35、40、50、60岁或更大年龄的个体可符合采用本发明的方法和组合物进行治疗的条件。对于另一个实例,小于75、70、65、60、55、50、40、35、30、25、20岁或更小年龄的个体可符合采用本发明的方法和组合物进行治疗的条件。

[0256] 在一些实施方案中,接受使用本发明的方法和组合物的治疗的患者限于具有足够的血液学功能的个体,例如具有每微升至少1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000或更多的WBC计数,至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14g/dL或更高的血红蛋白水平,每微升至少50,000、60,000、70,000、75,000、90,000、100,000、110,000、120,000、130,000、140,000、150,000或更多的血小板计数中的一种或多种;具有小于或等于0.8、1.0、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.8、2.0、2.5、3.0或更高的PT-INR值,小于或等于1.2、1.4、1.5、1.6、1.8、2.0X ULN或更高的PTT值的个体。在各个实施方案中,针对不同性别和年龄组中的个体,例

如0-5、5-10、10-15、15-18、18-21、21-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80或大于80岁的个体差异性地选择血液学功能指标限制。

[0257] 在各个实施方案中,可收集来自使用本发明的方法和组合物进行治疗的个体或候选个体的样品,例如血清或尿液样品。可在治疗之前、期间和/或之后收集样品,例如,在治疗开始之前2、4、6、8、10周内,在从治疗开始的1周、10天、2周、3周、4周、6周、8周或12周内,在治疗开始之前2、4、6、8、10周内,在从治疗开始的1周、10天、2周、3周、4周、6周、8周、9周或12周内,在治疗期间以1周、10天、2周、3周、4周、6周、8周、9周或12周的间隔,在治疗后以1个月、3个月、6个月、1年、2年的间隔,在治疗后1个月、3个月、6个月、1年、2年或更长的时间内,持续收集6个月、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年或更长时间。可针对本文所述的血液学、肾或肝功能指标以及本领域已知的合适的其他指标,例如具有生育潜力的女性的 β -HCG中的任一种对样品进行测试。在这方面,血液学和生化测试,包括分类、PT、INR和PTT的血细胞计数,测量Na、K、Cl、CO₂、BUN、肌酐、Ca、总蛋白、白蛋白、总胆红素、碱性磷酸酶、AST、ALT和葡萄糖的测试在本发明的范围内。在一些实施方案中,在来自使用本发明的方法和组合物进行治疗的个体或候选个体的样品中确定HIV抗体、肝炎BsAg (Hepatitis BsAg) 或丙型肝炎抗体的存在或量。可在来自使用本发明的方法和组合物进行治疗的个体或候选个体的样品,如血清中测试生物标志物,如针对SEQ. ID. NO.: 1、SEQ. ID. NO.: 2、SEQ. ID. NO.: 4、SEQ. ID. NO.: 5、SEQ. ID. NO.: 6的抗体或针对Ad5载体的中和抗体。在一些情况下,可从使用本发明的方法和组合物进行治疗的个体或候选个体收集一种或多种样品如血液样品并将其归档。可对收集的样品进行测定以用于免疫评估。可在成像研究,例如使用胸部、腹部或骨盆的CT扫描或MRI中对使用本发明的方法和组合物进行治疗的个体或候选个体进行评估。可在使用本发明的方法和组合物进行治疗之前、期间或之后进行成像研究,例如,在治疗开始之前2、4、6、8、10周内,在从治疗开始的1周、10天、2周、3周、4周、6周、8周或12周内,在治疗开始之前2、4、6、8、10周内,从治疗开始的1周、10天、2周、3周、4周、6周、8周、9周或12周内,在治疗期间以1周、10天、2周、3周、4周、6周、8周、9周或12周的间隔,在治疗后以1个月、3个月、6个月、1年、2年的间隔,在治疗后1个月、3个月、6个月、1年、2年或更长的时间内,持续成像研究6个月、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年或更长时间。

剂量和施用

本发明的组合物和方法考虑了治疗期间的各种剂量和施用方案。患者可接受能够在个体中引起针对本文所述靶抗原例如SEQ. ID. NO.: 1、SEQ. ID. NO.: 2、SEQ. ID. NO.: 4、SEQ. ID. NO.: 5或SEQ. ID. NO.: 6的免疫应答的一种或多种复制缺陷型腺病毒或腺病毒载体,例如,Ad5[E1-,E2B-]-SEQ. ID. NO.: 1、Ad5[E1-,E2b-]-SEQ. ID. NO.: 2、Ad5[E1-,E2b-]-SEQ. ID. NO.: 4、Ad5[E1-,E2b-]-SEQ. ID. NO.: 5、Ad5[E1-,E2b-]-SEQ. ID. NO.: 6。在各个实施方案中,以适于影响这样的免疫应答的剂量施用复制缺陷型腺病毒。在一些情况下,以每次免疫大于或等于 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1.5×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 个或更多病毒颗粒(VP)的剂量施用复制缺陷型腺病毒。在一些情况下,以每次免疫小于或等于 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、

6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1.5×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 个或更多个病毒颗粒的剂量施用复制缺陷型腺病毒。在各个实施方案中,以合适体积的制剂缓冲液,例如约0.1–10mL、0.2–8mL、0.3–7mL、0.4–6mL、0.5–5mL、0.6–4mL、0.7–3mL、0.8–2mL、0.9–1.5mL、0.95–1.2mL或1.0–1.1mL的体积施用本文所述的期望剂量。本领域技术人员认识到该体积可落入由这些值中的任何值所限定的任何范围(例如,约0.5mL至约1.1mL)内。可通过多种合适的递送途径进行病毒颗粒的施用,例如,可通过注射(例如,皮内、肌内、静脉内或皮下)、鼻内(例如,通过吸入)、以药丸形式(例如,吞咽、用于阴道或直肠递送的栓剂)施用病毒颗粒。在一些实施方案中,皮下递送可能是优选的,并且可提供更加接近树突细胞的途径。

[0258] 可重复进行病毒颗粒向个体的施用。病毒颗粒的重复递送可遵循时间表,或备选地可根据需要进行。例如,可对个体对靶抗原,例如SEQ.ID.NO.:1、SEQ.ID.NO.:2、SEQ.ID.NO.:4、SEQ.ID.NO.:5或SEQ.ID.NO.:6的免疫力进行测试并根据需要用额外的递送补充。在一些实施方案中,递送时间表包括以规律的间隔施用病毒颗粒。可设计联合递送方案,其包括具有时间表的周期和/或在施用之前评估的基于需要的施用的周期中的一种或多种。例如,治疗方案可包括施用,如每三周一次皮下施用,然后每三个月再进行一次另外的免疫治疗,直到由于包括死亡在内的任何原因而从治疗中去除。另一个示例性方案包括每三周施用三次,然后进行另一组的每三个月三次免疫治疗。另一个示例性方案包括以第一频率进行第一数目的施用的第一周期,以第二频率进行第二数目的施用的第二周期,以第三频率进行第三数目的施用的第三周期等,以及任选的根据需要进行不确定数目的施用的一个或多个周期。每个周期中的施用数目可独立地进行选择,并且可以例如为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20次或更多次。每个周期中的施用频率也可独立地进行选择,可以例如为约每天一次、每隔一天一次、每三天一次、每周两次、每周一次、每隔一周一次、每三周一次、每月一次、每六周一次、每隔一个月一次、每三个月一次、每四个月一次、每五个月一次、每六个月一次、每年一次等。治疗可需要最长1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、30、36个月或更长的总时间段。可对免疫之间的预定间隔进行修改,使得免疫之间的间隔被修改了该间隔的最长五分之一、四分之一、三分之一或一半。例如,对于3周间隔的时间表,可在20至28天之间(3周–1天至3周+7天)进行重复免疫。对于前3次免疫,如果第二次和/或第三次免疫延迟,则可改变随后的免疫,从而允许免疫之间的最小量的缓冲。例如,对于三周间隔的时间表,如果免疫延迟,则可安排随后的免疫在不早于先前免疫后17、18、19或20天发生。

[0259] 可以以各种状态,例如,在室温下、在冰上或以冷冻状态,提供本发明的组合物,如Ad5[E1–,E2B–]–SEQ.ID.NO.:1、Ad5[E1–,E2B–]–SEQ.ID.NO.:2、Ad5[E1–,E2B–]–SEQ.ID.NO.:4、Ad5[E1–,E2B–]–SEQ.ID.NO.:5和Ad5[E1–,E2B–]–SEQ.ID.NO.:6载体和使用这些载体产生的病毒颗粒。可在合适大小的容器中,例如2mL的小瓶中提供组合物。在一个实施方案中,具有1.0mL可提取疫苗的12mL小瓶含有 5×10^{11} 个总病毒颗粒/mL。储存条件,包括温度和湿度,可以变化。例如,用于治疗的组合物可储存在室温、4℃、–20℃或更低的温度下。

[0260] 在各个实施方案中,对接受根据本发明的方法和组合物的治疗的个体进行总体评估。可根据需要或按照时间表,如在第0周、第3周、第6周等,进行任何测试中的一种或多种。

不同组的测试可与免疫同时进行以及在不进行免疫的时间点进行。

[0261] 总体评估可包括病史、ECOG表现得分、Karnofsky功能状态和由主治医生进行的包括体重的完整身体检查中的一项或多项。可记录患者正在接受的或自上次随访以来一直接受的任何其他治疗、药物、生物制品或血液产品。可在患者接受疫苗后,在诊所跟随其适当的时间段,例如大约30分钟,以监测任何不良反应。可每天对每个剂量疫苗后的局部和全身反应原性进行评估,并持续选定的时间,例如3天(在免疫当天和其后的2天)。可使用日记卡来报告症状,并且可使用标尺来测量局部反应原性。可对免疫注射部位进行评估。可进行胸部、腹部和骨盆的CT扫描或MRI。

[0262] 在各个实施方案中,对接受根据本发明的方法和组合物的治疗的个体进行血液学和生物化学评估。可根据需要或按照时间表,如在第0周、第3周、第6周等,进行任何测试中的一种或多种。不同组的测试可与免疫同时进行以及在不进行免疫的时间点进行。血液学和生物化学评估可包括化学和血液学血液测试,分类CBC,Na、K、Cl、CO₂、BUN、肌酐、Ca、总蛋白、白蛋白、总胆红素、碱性磷酸酶、AST、ALT、葡萄糖和ANA中的一种或多种。

[0263] 在各个实施方案中,评估接受根据本发明的方法和组合物的治疗的个体的生物标志物。可根据需要或按照时间表,如在第0周、第3周、第6周等,进行任何测试中的一种或多种。不同组的测试可与免疫同时进行以及在不进行免疫的时间点进行。

[0264] 生物标志物评估可包括来自足够体积的血清样品的针对SEQ.ID.NO.:1、SEQ.ID.NO.:2、SEQ.ID.NO.:4、SEQ.ID.NO.:5、SEQ.ID.NO.:6或Ad5载体的测量抗体中的一种或多种,例如,如果约5mL的生物标志物已被确定并且可获得,则可对其进行检查。

[0265] 在各个实施方案中,对接受根据本发明的方法和组合物的治疗的个体进行免疫学评估。可根据需要或按照时间表,如在第0周、第3周、第6周等,进行任何测试中的一种或多种。不同组的测试可与免疫同时进行以及在不进行免疫的时间点进行。

[0266] 可在每次免疫之前和在至少一些免疫之后的时间抽取例如约90mL的外周血,以确定在研究期间和/或在特定数目的免疫之后的特定时间点是否对免疫应答存在影响。免疫学评估可包括使用ELISpot、增殖测定、多参数流式细胞术分析和细胞毒性测定来测定外周血单核细胞(PBMC)对SEQ.ID.NO.:1、SEQ.ID.NO.:2、SEQ.ID.NO.:4、SEQ.ID.NO.:5或SEQ.ID.NO.:6的T细胞应答中的一种或多种。可将来自每次血液抽取的血清归档、发送并确定。

[0267] 在各个实施方案中,对接受根据本发明的方法和组合物的治疗的个体进行埃博拉感染评估或埃博拉复制测定。可根据需要或按照时间表,如在治疗之前、在第0周、第3周、第6周等,进行任何测试中的一种或多种。不同组的测试可与免疫同时进行以及在不进行免疫的时间点进行。埃博拉感染可包括在治疗之前、在至少一些免疫之后的时间以及在选定数目完成后(例如第一治疗的2、3或4次,并且例如直到从治疗中去除)大约每周至每三个月进行的一种或多种埃博拉免疫特异性测试。

[0268] 可使用一种或多种适用于免疫应答的测试,如ELISpot、细胞因子流式细胞术或抗体应答,从样品如个体的外周血样品评估对本文所述的靶抗原如SEQ.ID.NO.:1、SEQ.ID.NO.:2、SEQ.ID.NO.:4、SEQ.ID.NO.:5或SEQ.ID.NO.:6的免疫应答。可通过测量T细胞应答来确定阳性免疫应答。如果具有抗原的六个孔中调整了背景的斑点的平均数目比六个对照孔中的斑点的数目大10,则T细胞应答可被视为阳性,并且含有抗原的六个孔和六个

对照孔的单个值之间的差异在使用Student t检验的 $p \leq 0.05$ 的水平下具有统计学上的显著性。可在每次免疫之前和在治疗周期期间的预定时间点进行免疫原性测定。例如,可在治疗的约第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、18、20、24、30、36或48周安排免疫原性测定的时间点,甚至在该时间不进行预定的免疫。在一些情况下,如果个体接受至少最少数目的免疫,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9次或更多次免疫,则个体可被视为可对免疫应答进行评估。

临床反应的测定

[0269] 在一些实施方案中,根据患有可测量/可评估疾病的患者中的RECIST 1.1标准进行疾病进展或临床反应测定。在一些实施方案中,使用本发明的方法和组合物的治疗影响接受治疗的个体的完全反应(CR;对于靶部位的所有抗原或症状的消失或所有非靶部位的消失以及非靶部位的抗原或症状水平的正常化)。在一些实施方案中,使用本发明的方法和组合物的治疗影响接受治疗的个体的部分反应(PR;靶部位的LD总和至少30%的降低,以靶部位的基线总LD作为参考)。

[0270] 在一些实施方案中,使用本发明的方法和组合物的治疗影响接受治疗的个体的疾病稳定(SD;既没有抗原或症状的足够减少以符合PR,也没有足够的增加以符合PD,以靶部位治疗开始以来的最小总LD作为参考)。在一些实施方案中,使用本发明的方法和组合物的治疗影响接受治疗的个体的不完全反应/疾病稳定(SD;一种或多种非靶部位的持续或/和高于非靶部位正常限值的抗原或症状的维持)。在一些实施方案中,使用本发明的方法和组合物的治疗影响接受治疗的个体的疾病进展(PD;抗原或症状的LD总和至少20%的增加,以治疗开始以来记录的最小总LD作为参考,或者一种或多种新抗原或症状的出现,或者一种或多种非靶抗原或症状的持续或/和高于正常限值的抗原水平的维持)。

试剂盒

[0271] 可以以试剂盒的形式提供组合物、免疫治疗或疫苗。本公开内容的试剂盒可进一步包含包括治疗方案信息在内的关于剂量和/或施用的说明书。

[0272] 在一些实施方案中,试剂盒包括用于提供组合多靶向埃博拉免疫治疗的组合物和方法。在一些实施方案中,试剂盒包括用于埃博拉感染的组合多靶向治疗的组合物和方法。在一些实施方案中,试剂盒可进一步包括用于施用试剂盒组分的组分和如何制备组分的说明书。在一些实施方案中,试剂盒可进一步包括用于采用适当的实验室测试在治疗之前和之后执行监测患者或与医务人员交流结果和患者数据的软件。试剂盒包含的组分可以为干燥或液体形式。如果它们是干燥形式,则试剂盒可包括溶解该干燥物质的溶液。试剂盒还可包括液体或干燥形式的转移因子。如果转移因子为干燥形式,则试剂盒将包括溶解该转移因子的溶液。试剂盒还可包括用于混合和制备组分的容器。试剂盒还可包括用于协助施用的仪器,例如针、管、涂抹器、吸入器、注射器、移液管、镊子、测量勺、滴眼器或任何这样的医学上批准的递送载具。本发明的试剂盒或药物递送系统通常还将包括用于以紧密约束方式容纳本公开内容的组合物以供商业销售和分布的装置。

实施例

实施例1:Ad5空壳腺病毒载体的多次注射产生抗腺病毒抗体

[0273] 该实施例显示,Ad5空壳的多次注射导致在注射的受试者中产生抗腺病毒抗体。

[0274] 已经证明,不含任何异源核酸序列的Ad5空壳腺病毒载体在小鼠中产生中和免疫

应答。在一个实验中,用Ad5空壳病毒颗粒以14天的间隔对年龄5-7周的雌性Ba1b/c小鼠进行免疫。为了确定抗腺病毒抗体的存在,使用酶联免疫吸附测定(ELISA)。对于该ELISA,将 10^9 个病毒颗粒涂布到在100 μ L、pH 9.6的0.05M碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液中的微量滴定板孔上,并在室温下温育过夜。对于标准免疫球蛋白G(IgG)参考曲线,如上所述将200ng、100ng、50ng、25ng和0ng的纯化的小鼠IgG涂布到微量滴定板孔上。温育后,用250 μ L、pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的1%牛血清白蛋白(BSA)将所有孔洗涤3次。洗涤后,向所有孔加入250 μ L的BSA/PBS,并在室温下温育30分钟以封闭未结合的位点。温育后,用250 μ L的BSA/PBS将所有孔洗涤3次。洗涤后,向孔中加入200 μ L在BSA/PBS中的1/100血清稀释液,并在室温下温育1小时。对于阳性对照,向孔中加入200 μ L在BSA/PBS中的抗腺病毒抗血清的1/10000稀释液。对照孔仅含有BSA/PBS。温育后,用250 μ L的BSA/PBS将所有孔洗涤3次。洗涤后,向各孔加入200 μ L在BSA/PBS中的过氧化物酶偶联的 γ 链特异性山羊抗小鼠IgG(Sigma Chemicals)的1/10000稀释液,并在室温下温育1小时。温育后,用250 μ L的BSA/PBS将所有孔洗涤3次。洗涤后,向各孔加入200 μ L显影试剂(在0.2M磷酸钾缓冲液中的0.5mg/mL 1,2-苯二胺,pH 5.0,含有0.06%过氧化氢),并在室温下温育30-40分钟。温育后,通过向各孔加入50 μ L 5N HCl使显色反应停止。然后在微孔板读数器中在492nm下读取各孔读数。获得读数后,将未知样品的光密度读数与标准IgG曲线关联起来,以获得每个孔结合的IgG的纳克数。这是使用INSTAT统计软件包来执行的。

ELISA检测抗EA抗体

[0275] 用在0.05M、pH 9.6的碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中的100ng GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24或L涂布ELISA板,并将该板在室温下温育过夜。用含有1%吐温-20的磷酸盐缓冲盐水(PBS-T)将板洗涤3次,然后用含有1%BSA的PBS在室温下封闭60min。在另外3次洗涤后,向孔中加入在PBS-T中1/50稀释的血清,并将板在室温下温育1小时。在洗涤后以1:5000稀释度将过氧化物酶标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G(γ -链特异性)(Sigma-Aldrich)抗体加入孔中,并将板温育1小时。将板洗涤3次,并向各孔加入1,2-苯二胺底物溶液。通过加入10%磷酸使反应停止。在SpectraMax 190ELISA读数器上测量492nm处的吸光度。通过参照使用纯化的小鼠IgG而生成的、与GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24或L ELISA同时生成的标准曲线来获得每个孔中与GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24或L结合的IgG纳克当量。使用SoftMax Pro 6.3软件对结果进行分析和定量。

[0276] 在用 10^{10} Ad-5空壳进行第一次注射后2周,在小鼠中检测到显著水平($P<0.001$)的抗腺病毒IgG抗体(图1)。在用 10^{10} 腺病毒进行第二次注射后2周观察到显著更高的水平($P<0.001$)。在用 10^{10} Ad5空壳进行第三次注射后2周继续观察到显著更高的抗体水平($P<0.001$)。每个值代表来自各组中5只小鼠的合并血清的一式三份测定的平均值。Ad5空壳的多次注射导致在受试者中产生抗腺病毒抗体。

[0277] 为了确定针对Ad的中和抗体的存在,使用以下测定法。在微孔组织培养板中的200 μ L由含有10%胎牛血清的DMEM(DMEM/FCS)组成的培养基中,以 2×10^3 个细胞/孔的细胞浓度将HEK-293T细胞系在37 $^{\circ}$ C下、5%CO₂中培养24小时。温育后,从一式三份的孔中取出100 μ L培养基,并与20 μ L含有病毒颗粒(VP)的DMEM/FCS混合。混合后,将120 μ L混合物加回到各自的微孔中。在另一组一式三份的孔中,取出100 μ L培养基,并与先前与VP在室温下一起温育1小时的20 μ L热灭活(56 $^{\circ}$ C 1h)的Ad免疫小鼠血清混合。混合后,将120 μ L混合物加回到各自的

孔中。在一式三份的细胞对照孔中,将20 μ L的DMEM/FCS加入对照孔达到总培养基体积。一式三份仅含培养基的对照孔含有220 μ L的DMEM/FCS。将组织培养板在37 $^{\circ}$ C下、5%CO₂中再温育3天。温育后,向所有孔中加入40 μ L的PROMEGA细胞活力试剂(Owen试剂),并在37 $^{\circ}$ C下、5%CO₂中温育75分钟。在该测定中,Owen试剂(MTS四唑化合物)被活细胞生物还原成可溶于组织培养基的有色甲瓚产物。通过在490nm处的吸光度所测量的甲瓚产物的数量与培养物中活细胞的数目成正比。温育后,从各孔取出150 μ L,并转移到另一个微孔板用于光密度读数。随后使用微孔板读数器获得492nm处的光密度读数。

[0278] 为了检测针对Ad的中和抗体的存在,以两周的间隔用10¹⁰Ad5空壳将5只小鼠的组注射一次、两次或三次。在最后一次病毒注射后两周,将小鼠放血,合并,并使用与或不与热灭活血清一起温育的4 $\times$ 10⁷个VP评估如上所述的中和抗体。只进行培养的细胞用作对照组。正常小鼠和用Ad5空壳注射一次的小鼠未显示出显著水平的中和抗体(图2)。与仅与病毒一起温育的细胞相比,用Ad注射两次的小鼠显示出显著(P<0.05)水平的中和抗体。与仅与病毒一起温育的细胞相比,用Ad5空壳注射三次的小鼠也显示出显著(P<0.01)水平的中和抗体。

实施例2:Ad5[E1-]-EA载体疫苗在Ad5免疫小鼠再免疫后诱导EA特异性免疫应答

[0279] 该实施例显示,Ad5[E1-,E2b-]载体平台在小鼠中预先存在的Ad5免疫力存在的情况下诱导对埃博拉相关抗原GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L的CMI应答。

[0280] 构建并产生Ad5[E1-,E2B-]-GP、Ad5[E1-,E2B-]-NP、Ad5[E1-,E2B-]-VP40、Ad5[E1-,E2B-]-VP35、Ad5[E1-,E2b-]-VP30、[E1-,E2b-]-VP24和/或[E1-,E2b-]-L。简言之,使用基于同源重组的方法将转基因亚克隆至Ad5[E1-,E2b-]载体的E1区内。该复制缺陷型病毒在E.C7包装细胞系中繁殖,CsCl₂纯化,并滴定。以E.C7细胞单层上的空斑形成单位(PFU)测定病毒感染滴度。通过十二烷基硫酸钠(SDS)破坏和260nm和280nm下的分光光度法测定VP浓度

Ad5 CEA载体的表征

[0281] 进行初步研究以确认两种Ad5-GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L载体平台的GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L基因表达。首先确定抗原可在用疫苗载体平台转染的细胞上表达。A549细胞获自ATCC,并用Ad5[E1-]-GP、Ad5[E1-]-NP、Ad5[E1-]-VP40、Ad5[E1-]-VP35、Ad5[E1-]-VP30、[E1-]-VP24和/或[E1-]-L;或Ad5[E1-,E2B-]-GP、Ad5[E1-,E2B-]-NP、Ad5[E1-,E2B-]-VP40、Ad5[E1-,E2B-]-VP35、Ad5[E1-,E2b-]-VP30、[E1-,E2b-]-VP24和/或[E1-,E2b-]-L进行转染。蛋白质印迹分析显示,用载体平台转染的细胞表达所示抗原。

方法

[0282] 用Ad5[E1-,E2B-]-GP、Ad5[E1-,E2B-]-NP、Ad5[E1-,E2B-]-VP40、Ad5[E1-,E2B-]-VP35、Ad5[E1-,E2b-]-VP30、[E1-,E2b-]-VP24和/或[E1-,E2b-]-L以555个VP/细胞的MOI接种A549细胞。将细胞在37 $^{\circ}$ C下、5%CO₂中温育48小时。48小时后,收获细胞并将细胞用PBS洗涤并冷冻/解冻三次。将全细胞裂解物在70 $^{\circ}$ C下加热10min,然后加载到凝胶上。以30ng/泳道加载重组GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L对照,并以20 μ L/泳道加载制备的裂解物。包含样品加载缓冲液作为额外的阴性对照,而阳性对照为Magic Mark CP Western标志物和重组GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和/或L。将凝胶转移到硝酸纤维素膜,并用SuperBlock

封闭溶液封闭60min。用小鼠单克隆抗GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24或L第一抗体(1:1000)和第二抗小鼠HRP(1:2500)偶联抗体探测该膜。将该膜洗涤3次,然后与SuperSignal化学发光试剂一起温育,并通过使X射线胶片暴露于膜,随后进行显影而使条带可视化。

小鼠中Ad5免疫力的诱导

[0283] 为了评估可被诱导的Ad5免疫力的水平,用Ad5载体平台(VP)皮下注射Ad5未处理(naive)C57B1/6小鼠组。28至42天后,收集血清样品并评估终点Ad5NAb滴度。在正常对照小鼠中可能观察到不可检测的Ad5NAb滴度(终点Ad5NAb滴度 $<1/25$)。Ad5NAb(1/25至1/50的终点滴度)在一次注射后可检测到,但在三次注射 10^{10} Ad5后可显著增加。因此,在额外的Ad5免疫研究中,用 10^{10} Ad5VP注射小鼠两次以使动物对Ad5免疫。

用Ad5[E1-]-EA或Ad5[E1-,E2b-]-EA进行Ad5免疫小鼠的免疫

[0284] 设计这些实验来确定并比较Ad5[E1-]-EA和Ad5[E1-,E2b-]-EA疫苗在Ad5免疫小鼠中的免疫诱导潜力。用 10^{10} Ad5空壳VP以2周间隔将4至8周龄的雌性C57B1/6小鼠组免疫2次。在最后一次Ad5空壳免疫后两周,用 10^{10} VP的Ad5[E1-]-EA或Ad5[E1-,E2b-]-EA以一周间隔将小鼠免疫3次。在最后一次免疫后两周,使小鼠安乐死,并收获小鼠的脾和血清用于分析。

[0285] 通过对暴露于完整EA抗原的脾细胞进行的ELISpot测定来评估CMI应答。收获来自用Ad5E1-]-EA或Ad5[E1-,E2b-]-EA皮下免疫的Ad5免疫C57B1/6小鼠的脾细胞,并评估分泌IFN- γ 和IL-2的细胞的数目。与免疫的Ad5[E1-]-EA小鼠相比,在用Ad5[E1-,E2b-]-EA免疫的小鼠的测定的脾中可观察到分泌IFN- γ 和IL-2的细胞的数目均显著增加。可显示用Ad5[E1-,E2b-]-CEA对Ad5免疫小鼠进行的免疫诱导显著更高的CMI应答。

免疫小鼠中缺乏不良肝反应

[0286] 对来自如上所述用Ad5[E1-]-EA、Ad5[E1-,E2b-]-EA免疫的Ad5免疫雌性C57B1/6小鼠的血清进行毒性研究。Ad5未处理小鼠或只注射缓冲液的Ad5免疫小鼠作为对照。在第三次免疫后三天,评估血液样品的天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平,以确定由于治疗而引起的肝毒性。在用任一种载体免疫后,AST水平可能相对于对照均未升高。还对丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平进行了评估,并可观察到相似的结果。

携带Ad5免疫埃博拉感染的小鼠的Ad5[E1-,E2b-]-CEA免疫治疗

[0287] 基于以上观察到的成功的免疫学结果,如下所述进行在小鼠中建立埃博拉感染然后进行治疗的研究。埃博拉感染后,用新型Ad5[E1-,E2b-]-EA载体平台治疗小鼠。为了确定是否可用Ad5[E1-,E2b-]-EA载体治疗Ad5免疫埃博拉感染的小鼠,将C57B1/6小鼠用 10^{10} Ad5[E1-]-空壳VP以14天的间隔皮下注射两次,以使小鼠对Ad5免疫。在最后一次注射后两周,用 10^6 个表达EA的细胞皮下注射两组的7只C57B1/6小鼠。七天后,当埃博拉感染可显现时,通过在第7、13和19天远端皮下注射 10^{10} VP的Ad5[E1-,E2b-]-EA来治疗一组小鼠。一组的仅注射缓冲液处理的C57B1/6小鼠作为未治疗对照。在21天的时间段内监测所有小鼠的埃博拉感染进展,并确定埃博拉病毒感染滴度。在研究终止时,从小鼠收集脾,并通过ELISpot测定来确定CEA特异性CMI应答。

通过ELISpot测定分析CMI应答

[0288] 进行针对分泌IFN- γ 的淋巴细胞的ELISpot测定。简言之,将来自个体患者样品的分离的PBMC(2×10^5 个细胞/孔)与EA肽库一起温育36-40h,以刺激产生IFN- γ 的T细胞。在患

者PBMC暴露于Ad5空壳(空载体)后,确定对Ad5的CMI应答。将用0.25 μ g/孔浓度的伴刀豆球蛋白A(Con A)刺激的细胞作为阳性对照。使用Immunospot ELISpot板读数器对着色的斑点形成细胞(SFC)进行计数,如果减去阴性对照后检测到50个SFC/ 10^6 个细胞,并且SFC为阴性对照孔SFC的 ≥ 2 倍,则应答被视为是阳性的。

Ad5中和抗体(NAb)滴度的确定

[0289] 确定终点Ad5NAb滴度。简言之,将在100 μ L含有10%胎牛血清的DMEM中的热灭活测试血清稀释液与 4×10^7 VP的Ad5[E1-]-空壳混合,并在室温下温育60分钟。将样品加入到含有HEK293细胞的微孔中,在含有10%热灭活小牛血清的DMEM中以 2×10^3 个细胞/孔在37 $^{\circ}$ C下、5%CO₂中培养24小时。将混合物在37 $^{\circ}$ C下、5%CO₂中再温育72小时。使用MTS四唑生物还原测定法来测定细胞杀伤和终点Ad5NAb滴度。值小于1:25的终点滴度被赋值为0。

统计学

[0290] 采用Mann-Whitney检验(PRISM, Graph Pad)进行比较免疫应答的统计分析。采用Kaplan-Meier图(PRISM, Graph Pad)进行存活期比较。将Ad5NAb滴度和EA特异性CMI作为连续变量进行分析。用斯皮尔曼相关系数检验Ad5NAb滴度与EA特异性CMI变化的关系。用比例风险模型的Wald检验来检验Ad5NAb滴度与存活期的关系。

[0291] 第二个目的是评估用产品进行免疫治疗后的EA特异性免疫应答。

[0292] 从埃博拉感染的受试者的外周血单核细胞(PBMC)生成树突细胞;使用来自该患者接种疫苗后的PBMC,试图建立对EA具有特异性的个体T细胞系。简言之,使用淋巴细胞分离培养基梯度分离PBMC,将PBMC重悬于AIM-V培养基(2×10^7 个细胞)中,并使其在6孔板中贴壁2小时。在含有100ng/ml重组人(rh)GM-CSF和20ng/ml rhIL-4的AIM-V培养基中将贴壁细胞培养5天。每3天补充一次培养基。

实施例3:临床级多靶向疫苗的GLP生产

[0293] 该实施例示出了使用良好实验室规范(GLP)标准的临床级多靶向疫苗的生产。先前,根据良好生产规范标准,在GLP条件下使用5L细胞生物反应器生产Ad5[E1-, E2b-]-CEA(6D)产品。该实施例可显示,可使用类似的方法在5L细胞生物反应器中生产Ad5[E1-, E2b-]-EA产品GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和L。

[0294] 简言之,将小瓶的E.C7生产细胞系解冻,转移到T225烧瓶中,并在含有10%FBS/4mM L-谷氨酰胺的DMEM中,在37 $^{\circ}$ C下、5%CO₂中进行初始培养。扩增后,将使用10层的CellSTACKS(CS-10)扩增E.C7细胞,并将其转移到FreeStyle无血清培养基(SFM)中。在细胞生物反应器中,在37 $^{\circ}$ C下、5%CO₂中将E.C7细胞在SFM中培养24小时,达到 5×10^5 个细胞/mL的目标密度。然后将分别用Ad5[E1-, E2B-]-GP、Ad5[E1-, E2B-]-NP、Ad5[E1-, E2B-]-VP40、Ad5[E1-, E2B-]-VP35、Ad5[E1-, E2b-]-VP30、[E1-, E2b-]-VP24和/或[E1-, E2b-]-L感染E.C7细胞,并将该细胞培养48小时。

[0295] 将根据IND14325以与用来制备临床级Ad5[E1-, E2B-]-GP、Ad5[E1-, E2B-]-NP、Ad5[E1-, E2B-]-VP40、Ad5[E1-, E2B-]-VP35、Ad5[E1-, E2b-]-VP30、[E1-, E2b-]-VP24和/或[E1-, E2b-]-L产品相同的方式进行中流处理。在收获前30分钟,将向培养物中加入Benzonase核酸酶以促进更好的细胞沉淀以进行浓缩。通过离心而沉淀后,将弃去上清液,并将沉淀在室温下重悬于含有1%聚山梨醇酯-20的裂解缓冲液中90分钟。然后将用Benzonase处理裂解物,并通过加入5M NaCl而使反应猝灭。将浆液离心并弃去沉淀。将通过

过滤使裂解物变澄清并使裂解物经历双柱离子交换程序。

[0296] 为了纯化疫苗产物,将进行双柱阴离子交换程序。将用Q Sepharose XL树脂填充第一柱,将该柱消毒,并用加载缓冲液进行平衡。将澄清的裂解物加载到柱上并用加载缓冲液洗涤。将洗脱疫苗产物,并将含有Ad5[E1-,E2B-]-GP、Ad5[E1-,E2B-]-NP、Ad5[E1-,E2B-]-VP40、Ad5[E1-,E2B-]-VP35、Ad5[E1-,E2b-]-VP30、[E1-,E2b-]-VP24和/或[E1-,E2b-]-L的主要洗脱峰(洗出液)转移到下一步。将用Source 15Q树脂填充第二柱,将该柱消毒,并用加载缓冲液进行平衡。将来自第一阴离子交换柱的洗出液加载到第二柱上,并用开始为100%缓冲液A(20mM Tris,1mM MgCl₂,pH 8.0),然后转变为50%缓冲液B(20mM Tris,1mM MgCl₂,2M NaCl,pH 8.0)的梯度洗脱疫苗产物。将收集含有Ad5[E1-,E2B-]-GP、Ad5[E1-,E2B-]-NP、Ad5[E1-,E2B-]-VP40、Ad5[E1-,E2B-]-VP35、Ad5[E1-,E2b-]-VP30、[E1-,E2b-]-VP24和/或[E1-,E2b-]-L的洗脱峰,并在2-8℃下储存过夜。将通过用于对制剂缓冲液(20mM Tris,25mM NaCl,2.5% (v/v) 甘油,pH 8.0)进行浓缩和渗滤的切向流过滤(TFF)系统处理峰洗脱级分。处理后,将对最终的疫苗产物进行无菌过滤,分装成等分试样,并在≤-60℃下储存。通常产生接近100%纯度的高纯度产物,并对这些产物的相似结果进行预测。

[0297] 将通过分光光度法测定产生的VP产物的浓度和总数目。通过HPLC评估产物纯度。通过使用试剂盒对感染性颗粒进行Ad5六邻体染色测定来确定感染活性。

[0298] 将使用来自载体转染的细胞的裂解物进行蛋白质印迹,以验证EA表达。将进行质量控制测试,以确定最终的疫苗产物无支原体,没有微生物生物负载,并显示出小于2.5内毒素单位(EU)/mL的内毒素水平。为了确认免疫原性,在小鼠中测试单个载体。

实施例7:单靶向和多靶向GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24、L病毒载体的免疫原性

[0299] 用10¹⁰VP的Ad5[E1-,E2B-]-GP、Ad5[E1-,E2B-]-NP、Ad5[E1-,E2B-]-VP40、Ad5[E1-,E2B-]-VP35、Ad5[E1-,E2b-]-VP30、[E1-,E2b-]-VP24或[E1-,E2b-]-L,或者1:1:1比例的10¹⁰VP的两种或更多种病毒的组合皮下注射雌性C57BL/6小鼠。用3x 10¹⁰VP的Ad-空壳(无转基因插入片段)注射对照小鼠。在25μl注射缓冲液(具有3%蔗糖的20mM HEPES)中施用剂量,并以14天的间隔对小鼠进行三次疫苗接种。在最后一次注射后14天收集脾和血清。将血清在-20℃下冷冻。通过经由70μm尼龙细胞过滤器(BD Falcon, San Jose, CA)轻柔地破碎脾而生成脾细胞悬浮液。通过添加红细胞裂解缓冲液(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)去除红细胞,并将脾细胞洗涤两次并重悬于R10(补充有L-谷氨酰胺(2mM)、HEPES(20mM)、青霉素100U/mL和链霉素100μg/ml,以及10%胎牛血清的RPMI 1640)中。通过ELISPOT和流式细胞术测定脾细胞的细胞因子产生。

免疫原性研究:

[0300] 最后一次免疫后两周,在脾细胞分别暴露于EA肽库之后,采用针对分泌IFN-γ的细胞(SFC)的ELISpot测定来确定CMI活性。

[0301] 简言之,在多靶向免疫小鼠而非对照小鼠(注射有Ad5-空壳空载体)中,检测到如通过针对分泌IFN-γ的脾细胞(SFC)的ELISpot测定所评估的对EA的CMI应答。通过对不相关SIV-nef或SIV-vif肽抗原的反应性的缺乏来确认ELISpot测定反应的特异性。阳性对照包括暴露于伴刀豆球蛋白A(Con A)的细胞。

ELISPOT测定

[0302] 通过来自新鲜分离的小鼠脾细胞的ELISPOT测定来确定GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24或L特异性的分泌IFN- γ 或IL-2的T细胞。简言之,用0.2 μ g/孔的衍生自GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24或L的单个库中的重叠15-mer肽刺激 2×10^5 个脾细胞。用浓度为0.0625 μ g/孔的Con A作为阳性对照刺激细胞,并将衍生自SIV-Nef和SIV-Vif的重叠15-mer完整肽库用作不相关的肽对照。使用Immunospot ELISpot板读数器确定SFC的数目,并将结果报告为每 10^6 个脾细胞的SFC数目。为了确定补体依赖性细胞毒性(CDCC)的水平,使用EA靶细胞进行CDCC测试。

细胞内细胞因子刺激

[0303] 制备脾细胞。在96孔U底板中使用每个孔 1×10^6 个活脾细胞进行刺激测定。合成跨越GP、NP、VP40、VP35、VP30、VP24和L的整个编码序列的重叠肽库作为具有11个氨基酸重叠的15-mer,并将冻干的肽库溶解于DMSO中。将对应于SIV-Vif和SIV-Nef的类似构建的肽库用作离靶(off-target)对照。通过以2 μ g/mL/肽添加肽库并在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下温育6h,并向该温育物中添加蛋白质转运抑制剂(GolgiStop)维持2h来刺激R10培养基(RPMI 1640、10%胎牛血清和抗生素)中的脾细胞。然后对刺激的脾细胞的淋巴细胞表面标志物CD8 α 和CD4进行染色,将该脾细胞固定,透化,然后对细胞内累积的IFN- γ 和TNF α 进行染色。使用抗小鼠CD8 α 、CD4、IFN- γ 和TNF α 的抗体,并在抗CD16/CD32存在的情况下进行染色。进行流式细胞术并在BD Accuri C6软件中进行分析。

补体依赖性细胞毒性(CDC)测定

[0304] 在96孔组织培养微板中以 2×10^4 个细胞/孔的密度将EA细胞培养过夜。以1:50稀释度添加合并的热灭活小鼠血清,并在37 $^{\circ}$ C下温育1小时。然后以1:50稀释度添加兔血清作为补体来源,并在37 $^{\circ}$ C下将细胞再温育2.5小时。根据制造商的说明书,使用Promega Cytotox 96非放射性细胞毒性测定法测定细胞培养上清液。通过公式%裂解=(实验-靶标自发)/(靶标最大值-靶标自发) $\times$ 100%来计算EA细胞的裂解百分比。

抗埃博拉免疫治疗研究:

[0305] 将进行研究以在具有已建立的埃博拉感染的小鼠中测试免疫治疗研究中的基于Ad5[E1-,E2b-]的多重疫苗的抗埃博拉能力。在该研究中,将对基于Ad5[E1-,E2b-]的多重疫苗的各个组分的抗埃博拉活性进行评估。

[0306] 将C57B1/6小鼠组在右肋皮下注射 5×10^5 个表达EA的细胞。将分别通过用Ad5[E1-,E2b-]-空壳(无转基因,例如空载体)、Ad5[E1-,E2B-]-GP、Ad5[E1-,E2B-]-NP、Ad5[E1-,E2B-]-VP40、Ad5[E1-,E2B-]-VP35、Ad5[E1-,E2b-]-VP30、[E1-,E2b-]-VP24和[E1-,E2b-]-L各 1×10^{10} 个VP皮下注射3次来治疗小鼠。

实施例8:埃博拉病毒GP和NP用作疫苗靶标

[0307] 已在实验室环境中对含有埃博拉病毒基因组分,包括GP和/或NP的早期一代基于重组Ad5的载体(Ad5[E1-])疫苗进行了构建、产生和测试。已在使用这些疫苗的小鼠和非人灵长类动物(NHP)中获得了有希望的临床前保护作用,但当动物表现出预先存在的或Ad5载体诱导的对腺病毒的免疫力时,该有效性被否定。

[0308] 在该实施例中,将在疫苗中使用埃博拉病毒的GP和NP组分。由于扎伊尔和苏丹菌株导致大多数物种特异性病例死亡,因此将最先使用来自这两种菌株的病毒组分。将使用GP,因为其是可被靶向的表面糖蛋白。将使用来自两种埃博拉分离菌株的GP基因,以便诱导

针对埃博拉的广泛反应性免疫应答。由于NP与VP35、VP30以及RNA依赖性RNA聚合酶联合形成功能性转录酶-复制酶复合体,因此将会在疫苗中使用NP以诱导干扰和/或阻止病毒复制的免疫应答。以这种方式,将开发基于将会诱导针对埃博拉的体液免疫和细胞介导的免疫(CMI)应答的Ad5[E1-,E2b-]平台的广泛反应性疫苗。

基于重组Ad5[E1-,E2b-]的载体用作疫苗

[0309] 将通过皮下注射直接递送疫苗,以将限定的埃博拉抗原暴露于诱导有效免疫应答的抗原呈递细胞(APC)。

基于Ad5[E1-,E2b-]的载体埃博拉疫苗的扩增

[0310] 构建了四种基于Ad5[E1-,E2b-]的疫苗(图8)。对于扎伊尔菌株疫苗,将来自当前疫情爆发(扎伊尔埃博拉病毒分离株人属智人(*H.sapiens*)-wt/GIN/2014/Gueckedou-C07, GeneBank登录号KJ660347)的GP和NP的核苷酸序列针对人密码子使用进行优化,并将其克隆到CMV启动子调控下的Ad5[E1-,E2b-]载体中。通过用线性化的Ad5[E1-,E2b-]质粒构建体转染稳定表达腺病毒E1和E2b基因的E.C7细胞来拯救病毒颗粒,从而产生Ad5[E1-,E2b-]-GP_{EZ}产物和Ad5[E1-,E2b-]-NP_{EZ}产物。

[0311] 对于苏丹菌株疫苗,将埃博拉病毒苏丹菌株的GP和NP核苷酸序列(苏丹埃博拉病毒分离株EboSud-682 2012,完整基因组GenBank:KC545392.1)针对人密码子使用进行优化,并将其克隆到CMV启动子调控下的Ad5[E1-,E2b-]载体中。通过用线性化的Ad5[E1-,E2b-]质粒构建体转染稳定表达腺病毒E1和E2b基因的E.C7细胞来拯救病毒颗粒,从而产生Ad5[E1-,E2b-]-GP_{ES}产物和Ad5[E1-,E2b-]-NP_{ES}产物。基于重组Ad5[E1-,E2b-]的疫苗的产生、纯化和测试

[0312] 将制备其他疫苗用于采用NHP的后续研究。E.C7细胞系允许Ad5[E1-,E2b-]载体以高且可再现的产量生长。将通过使用Triton X-100从E.C7人细胞释放,在CsCl梯度或离子交换色谱下纯化,以及针对含有5%蔗糖的20mM HEPES (pH 7.4)的透析来制造并生产Ad5[E1-,E2b-]载体。将对纯化的基于重组Ad5[E1-,E2b-]的病毒疫苗进行等分并在干冰-乙醇浴中冷冻。使用空斑测定来测量病毒颗粒的感染性。将从260nm处的吸光度计算病毒颗粒(VP)浓度,并使用该浓度确定用于体内免疫的病毒量。来自转染的A549细胞裂解物的蛋白质印迹将验证抗原转基因表达。用Ad5[E1-,E2b-]-GP_{EZ}转染24小时后,E.C7细胞的细胞裂解物中埃博拉GP(扎伊尔菌株)表达的实例在图9中示出。

剂量递增免疫原性研究

[0313] 将使用临床相关的Ad5免疫小鼠模型进行这些研究。将通过用 10^{10} VP的Ad5-空壳以两周的间隔进行两次皮下注射将BALB/c小鼠制成Ad5免疫的。在第二次注射后两周,将对血清的Ad5中和Ab(NAb)进行测试,以验证该小鼠是Ad5免疫的。以这种方式处理的小鼠和猴达到1/100至1/200的Ad5NAb滴度,并且在临床试验中,所有患者中的平均预先存在的Ad5NAb滴度为 $1:189 \pm 1:71$ (平均值 $\pm$ SEM)。将对用增加剂量的Ad5[E1-,E2b-]-GP_{EZ}/NP_{EZ}和Ad5[E1-,E2b-]-GP_{ES}/NP_{ES}(相等组合的混合物)免疫后所诱导的免疫应答进行评估。将使用递增剂量的 4×10^8 、 4×10^9 或 4×10^{10} 个VP(含有等量的Ad5[E1-,E2b-]-GP_{EZ}/NP_{EZ}和Ad5[E1-,E2b-]-GP_{ES}/NP_{ES}的疫苗混合物)通过皮下途径每两周一次对Ad5免疫小鼠组($n=5$ /组)进行两次免疫。将以相同的时间表向对照小鼠($n=5$)注射 4×10^{10} VP的Ad5[E1-,E2b-]-空壳。在最终免疫后十四天,将对抗体(Ab)和细胞介导的免疫(CMI)应答进行评估。对于CMI评估,将使

用之前描述的ELISpot测定对来自个体小鼠的脾细胞进行评估,以测量暴露于GP或NP肽库后分泌干扰素- γ (IFN- γ) 和IL-2的淋巴样细胞的数目。将使用纯化的可商购产品对血清样品的Ab活性进行评估。

[0314] 使用最高的免疫原性剂量,将进行采用一次或两次皮下免疫的研究,以确定一次或两次剂量对于有效的疫苗接种是否是必需的。将使用最有效剂量的疫苗每两周对小鼠组 ($n=5$ /组) 进行一次或两次免疫。将以相同的时间表向对照小鼠 ($n=5$) 注射Ad5 [E1-, E2b-]-空壳 (VP数量与疫苗相同)。在最终免疫后十四天,将如上所述对Ab和CMI应答进行评估。这些研究将允许确定一次或两次免疫是否是诱导显著的免疫应答所必需的。

通过ELISA、ELISpot和流式细胞术进行的Ad5免疫小鼠的免疫原性研究

[0315] 对于这些研究,将使用上文所确定的接种疫苗的最有效剂量和频率。在使用流感疫苗的猴中的概念验证研究中,观察到,如通过血细胞凝集抑制 (HAI) 测定所评估的Ab应答可能需要最长30天以产生最大水平 (图9)。因此,将以接种疫苗 (含有等量的Ad5 [E1-, E2b-]-GP_{EZ}/NP_{EZ}和Ad5 [E1-, E2b-]-GP_{ES}/NP_{ES}的疫苗混合物) 的最有效剂量和频率评估Ad5免疫BALB/c小鼠 ($n=5$ /组) 在皮下接种疫苗后两周、30天和60天的Ab活性和CMI应答。将以相同的时间表向对照小鼠注射Ad5 [E1-, E2b-]-空壳 (VP数量与疫苗相同)。疫苗接种后两周、30天或60天,将从个体小鼠收集血清和脾细胞。将使用ELISpot测定对来自个体小鼠的脾细胞的CMI应答进行评估,以测量暴露于GP或NP肽库后分泌IFN- γ 和IL-2的淋巴样细胞的数目。由于细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 应答在疫苗的评估中也将是重要的,因此,将通过对暴露于GP或NP肽库后的脾细胞的CTL活性进行ELISpot测定来分析粒酶B分泌,因为这是测量CD8功能性CTL活性的良好测定法。将采用ELISA技术评估血清样品对纯化的可商购埃博拉病毒蛋白的Ab活性。对于病毒中和活性,还将对来自个体小鼠的血清进行空斑减少中和测定。

[0316] 基于观察到最高CMI应答的上述研究,还将进行流式细胞术研究以对由采用疫苗的免疫所诱导的T细胞免疫应答进行表征。将使用接种疫苗的最有效剂量和频率采用疫苗对Ad5免疫BALB/c小鼠 ($n=5$) 进行免疫。将以相同的时间表向对照小鼠 ($n=5$) 注射Ad5 [E1-, E2b-]-空壳 (VP数量与疫苗相同)。基于疫苗接种后的最佳时间,将收获脾,并将在暴露于GP或NP肽库后,通过流式细胞术确定CD4⁺和CD8⁺T细胞中的表达IFN- γ 和/或TNF- α 的细胞。简言之,将收获来自免疫和对照小鼠的脾细胞,并在蛋白质转运抑制剂GolgiStop存在的情况下,用0.5 μ g/ml的GP或NP肽库温育5hr。然后将对CD4⁺或CD8⁺T细胞进行固定、透化、针对IFN- γ 或TNF- α 进行染色,并通过流式细胞术进行分析。

保护接种疫苗的Ad5免疫小鼠免受病毒攻击

[0317] 在原理验证试验中,将在小鼠中进行攻击研究。将如上所述将两组BALB/c小鼠 ($n=15$ /组) 制成Ad5免疫的。使用接种疫苗的最有效剂量和频率,将采用疫苗 (含有等量的Ad5 [E1-, E2b-]-GP_{EZ}/NP_{EZ}和Ad5 [E1-, E2b-]-GP_{ES}/NP_{ES}的疫苗混合物) 对一组进行免疫。将以相同的时间表向对照组注射Ad5 [E1-, E2b-]-空壳 (VP数量与疫苗相同)。当达到诱导的病毒中和滴度时,将通过用致死小鼠适合的埃博拉菌株进行接种来攻击小鼠。将监测终点的重量减轻和死亡时间。将在攻击后超过21天,每天对小鼠的发病临床体征进行观察。

2期研究

[0318] 在2期研究中,将对NHP中埃博拉疫苗的免疫原性进行评估。将确定适当的免疫剂量、加强时间表和活埃博拉攻击潜力。此外,将对含有来自扎伊尔和苏丹埃博拉病毒菌株的

融合GP和NP基因的基于Ad5[E1-,E2b-]的平台进行评估。以这种方式,将产生两种重组载体,即Ad5[E1-,E2b-]-GP_{EZ}/NP_{EZ}产物和Ad5[E1-,E2b-]-GP_{ES}/NP_{ES}产物。与产生并组合4种单独的重组载体中的每一种相比,通过将多种基因引入到一种基于重组Ad5[E1-,E2b-]的载体中,需要的病毒颗粒的数目将显著减少。

[0319] 可以组合上述各个实施方案以提供进一步的实施方案。本说明书中提及的和/或申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物均通过引用而整体并入本文,其程度如同特别地且单独地指出每个单独的出版物、专利或专利申请通过引用而并入。

[0320] 如果需要使用各个专利、申请和出版物的概念以提供另外的实施方案,则可对实施方案的各个方面进行修改。

[0321] 可以根据以上的详述描述对实施方案进行这些及其他改变。总之,在以下权利要求中,所使用的术语不应被理解为将权利要求限制于说明书和权利要求中所公开的具体实施方案,而应被理解为包括所有可能的实施方案连同这样的权利要求所具有的等同项的全部范围。因此,权利要求不受本公开内容的限制。

SEQ. ID. NO: 1

cggacacacaaaaaagaagaagaatTTTTtaggatcTTTTgtgtgcgaataactatgaggaagattaataatTT
tcctctcattgaaatttatatcggaatttaaattgaaattgttactgtaatcatacctggTTTgtttcagagccata
tcaccaagatagagaacaacctaggtctccggagggggcaagggcatcagtggtcagttgaaaatcccttgTcaa
catctaggccttatcacatcacaagttccgccttaaactctgcagggtgatccaacaaccttaatagcaacattatt
gttaaaggacagcatttagttcacagtcaaacaagcaagattgagaattaactTTTgattTTTgaacctgaacaccaga
ggactggagactcaacaacctaaagcctggggtaaaacattagaaaatagTTTaaagacaaattgctcggaaTcaca
aaattccgagtatggattctcgtcctcagaaagctggatgacgccgagtcctcactgaatctgacatggattaccac
aagatcttgacagcaggtctgtccgttcaacaggggattgttcggcaaagagtcacccagtgatcaagtaaacaa
tcttgaggaaatttgccaacttatcatacaggcctTTTgaagctggTgttgattTTTcaagagagtgccgacagTTTcc
ttctcatgctTTTgtcttcatcatgcgtaccaaggagattacaaactTTTcttggaagtgggcgagtcaggtatttg
gaagggcacgggttccgtTTTgaagtcaagaagcgtgatggagtgaagcgcttgaggaattgctgccagcagtatc
tagtgggagaaacattaagagaacacttgctgccatgccggaagaggagacgactgaagctaattgccggtcagttcc
tctcctTTTgcaagtcatttccTTTccgaaattggtagtaggagaaaaggcttgccTTGagaaggttcaaaggcaaatt
caagtacatgcagagcaaggactgatacaatatccaacagcttgccaatcagtaggacacatgatggTgattTTTccg
TTTgatgcgaacaaatTTTTgatcaaatttcttctaatacaccaagggatgcacatggTTgccggacatgatgcc
acgatgctgtgatttcaaattcagtggtcgaagctcgTTTTcaggtctattgattgtcaaaacagtacttgatcat
atcctacaaaagacagaacgaggagttcgtctccatcctcttgcaaggaccgccaaggtaaaaaatgaggtgaactc
cttcaaggtgcactcagctccctggccaagcatggagagtatgctcctTTTgccccgactTTTgaacctTTTctggag
taaataatcttgagcatggTctTTTccctcaactgtcggcaattgcactcggagtcgccacagcccacgggagcacc
ctcgcaggagtaaatgttggagaacagtatcaacagctcagagaggcagccactgaggtgagaagcaactccaaca
atatgcggagtcctcgtgaacttgaccatcttggacttgatgatcaggaaaagaaaattcttatgaacttccatcaga
aaaagaacgaaatcagcttccagcaacaaacgcgatggtaactctaagaaaagagcgcctggccaagctgacagaa
gctatcactgctgcatactgccccaaaacaagtggacattacgatgatgatgacgacattccctTTTccaggacccat
caatgatgacgacaatcttgccatcaagatgatgatccgactgactcacaggatacgaccattcccgatgtggtag
ttgatcccgatgatggaggctacggcgaataccaaagttactcggaaaacggcatgagtgcaccagatgacttggtc
ctattcgatctagacgaggacgacgaggacaccaagccagtgccTaaacagatcgaccaagggtggacaacagaaaaa
cagTcaaaagggccagcatacagagggcagacagacacaatccacgccaaactcaaaacgtcacaggccctcgagaa
caatccaccatgccagtgctccactcacggacaatgacagaagaacgaacctccggctcaaccagccctcgcatg
ctgaccccaatcaacgaagaggcagaccactggacgatgccgacgacgagacgtctagccttccgcccttagagtc
agatgatgaagaacaggacagggacggaaacttctaaccgcacaccactgtcgcceccacgggtcccgTatacagag
atcactccgaaaagaaagaactcccgcaagatgaacaacaagatcaggaccacattcaagaggccaggaaccaagac
agtgaacaacaccagccagaaacattctTTTgaggagatgtatcgccacattctaagatcacagggggccatttgatgc
cgTTTTgtattatcatatgatgaaggatgagcctgtagTTTTcagtaccagtgtgTaaagagtacacgtatccgg
actcccttgaagaggaatatccaccatggctcactgaaaaagaggccatgaatgatgagaatagatttgTTTactg
gatggtcaacaatTTTTattggccagtaatgaatcacaggaaataaattcatggcaatcctgcaacatcatcagtgaat
gagcatgtaataatgggatgatttaatcgacaaatagctaacattaaatagtcaaggaacgcaaacaggaagaattt
ttgatgtctaaggTgtgaattattatcacaataaaaagtattcttagTTTTgaattTaaagctagcttattattact

agccgtttttcaaagttcaatttgagtccttaatgcaaataagcgtaagccacagttatagccataatggtaactca
atatcttagccagegatttatctaaattaaattacattatgcttttataacttacctactagcctgcccacattta
cacgatcgttttataattaagaaaaactaatgatgaagattaaaaccttcattcatccttacgtcaattgaattctc
tagcactagaagcttattgtcttcaatgtaaaagaaaagctggcctaacaagatgacaactagaacaaagggcaggg
gccatactgttgccacgactcaaaacgacagaatgccaggccctgagctttcgggctggatctctgagcagctaatg
accggaaggatttctgtaaacgacatcttctgtgatattgagaacaatccaggattatgctacgcatcccaaatgca
acaaacgaagccaaacccgaagatgcgcaacagtcacacccaaacggacceatttgcaatcatagttttgaggagg
tagtacaacatttggttcatgttggtactgtgtgcaacaacaaaccatcgcatcagaatcattagaacaacgcatt
acgagtccttgagaatggctctaaagccagtttatgatattggcaaaaacaatctcctcattgaacagggtttgtgctga
gatggttgcaaaatatgatcttctgggtgatgacaaccggtcgggcaacagcaaccgctcgggcaactgaggcttatt
gggctgaacatgggtcaaccaccacctggaccatcactttatgaagaaagtgcgattcggggtaagattgaatctaga
gatgagactgtccctcaaagtggttagggaggcattcaacaatctagacagtaccacttcactaactgaggaaaattt
tgggaaacctgacatttcggcaaaaggatttgagaacattatgtatgatcacttgctgggttttggaactgctttcc
accaattagtagaagtgatttgtaaattgggaaaagatagcaattcattggacattattcatgctgagttccagggc
agcctggctgaaggagactcccccaatgtgccctaattcaaattacaaaaagagttccaatcttccaagatgctgc
tccacctgtcatccacatccgctctcgagggtgacattccccgagcttgccagaagagcttgcgctccagtcaccat
caccgaagattgatcgagggttggtatgtgttttcagcttcaagatggtaaaacacttggaactcaaaatttgagcc
aatctcttttccctccgaaagaggcaactaatagcagaggcttcaactgctgaactatagggtatgttacattaatg
atacacttgtagtatcagccctagataataataagtcattaaacaaccaagataaaattgttcataatcccgctagc
agctttaagataaatgtaataggagctataaccttgacagtattataattaattgttattaagtaaccacaaacaa
aatgatgaagattaagaaaaacctacctcgactgagagagtggtttttcattaaccttcattctgtaaacgttgag
caaaattgttaaaaatatgaggcgggttatattgcctactgctcctcctgaatatatggaggccatataacctgcc
ggtcaaatcaacaattgctaggggtggcaacagcaatacaggcttctgacaccggagtcagtcattggagacact
ccatcgaatccactcaggccaattgctgatgacaccatcgaccatgccagccacacaccaggcagtggtgtcatcagc
attcatcctcgaagctatgggtgaatgtcatatcgggccccaagtgtctaatgaagcaaattccaatttggttccctc
taggtgtcgctgatcaaaagacctacagctttgactcaactacggccgccatcatgcttgcttcataactatcacc
catttcggcaaggcaaccaatccgcttgctcagagtcaatcggtcgggtcctggaatccccgatccccctcaggct
cctgcgaatttgaaaccaggctttccctccaggagttcggttcttccaccagtccaactaccccagtatttcaccttg
atttgacagcactcaaaactgatcactcaaccactgcctgctgcaacatggaccgatgacactccaactggatcaaat
ggagcgttgcgctccaggaatttcatttcattccaaaacttcgccccattcttttaccacaaaagtgggaagaagg
gaacagtgccgatctaacaatctccggagaaaaatccaagcaataatgacttcaactccaggactttaagatcggttcaa
ttgatccaacaaaaatatcatgggtatcgaaagtgcagaaactctggtccacaagctgaccggtaagaagggtgact
tccaaaaatggacaaccaatcatccctgttcttttgccaaagtacattgggttggaaccgggtggctccaggagacct
caccatggtaatcacacaggattgtgacacgtgtcattctcctgcaagcttccagctgtggttgagaagtaattgc
aataattgactcagatccagttttacagaatcttctcagggtagtgataacatctttttaataatccgtctactag
aagagatacttctaattgatcaatataactaaagggtgctttacaccattgtctcttttctctcctaaatgtagagctt
aacaaaagactcataatataacctgttttttaaagattgattgatgaaagatcatgactaataacattacaaacaatc
ctactataatcaatacgggtgattcaaatgtcaatcttctcattgcacatactctttgtccttatectcaaatggcc
tacatgcttacatctgaggacagccagtggtgacttggaattggagatgtggaggaaaaatcggggccatttctaagt

tgttcacaatctaagtacagacattgctcttctaattaagaaaaatcggcgatgaagattaagccgacagttagcgc
taatcttcatctctcttagattatgttcttccagagtaggggtcatcaggtccttttcaattggataaccaaata
agcttcactagaaggatattgtgaggcgacaacacaatgggtgttacaggaatattgcagttacctcgtgatcgatt
caagaggacatcattcttcttgggtaattatccttttccaaagaacattttccatcccgttggagtatatccaca
atagtacattacaggttagtgatgtcgacaaactagtttgtcgtgacaaactgtcatccacaaatcaattgagatca
gttggactgaatctcgaggggaatggagtggaactgacgtgccatctgcgactaaaagatggggcttcaggtccgg
tgtcccaccaaagggtggtaattatgaagctgggtgaatgggctgaaaactgctacaatcttgaaatcaaaaaacctg
acgggagttagtgctaccagcagcgccagacgggattcggggcttccccgggtgccggtatgtgcacaaagtatca
ggaacgggacctgtgccggagactttgccttccacaaagagggtgctttcttctgtatgatcgacttgcctccac
agttatctaccgaggaacgactttcgctgaagggtgtcgttgcatcttctgatactgccccagctaagaaggacttct
tcagctcacaccccttgagagagcgggtcaatgcaacggaggaccgctcgagtggctattattctaccacaattaga
tatcaggctaccggttttggaaactaatgagacagagtacttgttcgaggttgacaatttgacctacgtccaacttga
atcaagattcacaccacagtttctgctccagctgaatgagacaatatatgcaagtgggaagaggagcaacaccacgg
gaaaactaatttggaaaggtcaaccccgaaattgatacaacaatcggggagtgggcttcttgggaaactaaaaaaccc
tactagaaaaattcgcagtgaagagttgtctttcacagctgtatcaaacggacccaaaaacatcagtggtcagagt
ccggcggaacttcttccgaccagagaccaacacacaaaatgaagaccacaaaatcatggcttcagaaaattctct
tgcaatggttcaagtgcacagtcaaggaaggaaagctgcagtgctcgcatctgacaacccttgccacaatctccacga
gtctcaacctcccacaaccaaacagggtccggacaacagcacccataatacacccgtgtataaacttgacatctct
gaggcaactcaagttggacaacatcacgtagagcagacaacgacagcacagcctccgacactcccccgccacgac
cgcagccggacccttaaaagcagagaacaccaacacgagtaagagcgtgactccctggacctcgccaccacgacaa
gccccaaaactacagcgagactgctggcaacaacaacactcatcaccaagataccggagaagagagtgcacgacgc
gggaagctaggcttaattaccaatactattgctggagtagcaggactgatcacaggcgggagaaggactcgaagaga
agtaattgtcaatgtctcaacccaaatgcaaccccaatttacattactggactactcaggatgaaggtgctgcaatcg
gattggcctggataccatatttccggccagcagccgaaggaatttacacagaggggctaattgcacaaccaagatggt
ttaatctgtgggttgaggcagctggccaacgaaacgactcaagctctccaactgttcttgagagccacaactgagct
gcgaaccttttcaatctcaaccgtaaggcaattgacttctgctgcagcgatgggggtggcacatgccacattttgg
gaccggactgctgtatcgaaaccatgattggaccaagaacataacagacaaaattgatcagattattcatgatttt
gttgataaaaccttccgaccagggggacaatgacaattgggtggacaggatggagacaatggataccggcaggtat
tggagttacaggtgttataattgcagttatcgctttattctgtatatgcaaatttgtcttttagtctttcttcagat
tgtttcacggcaaaactcaacctcaaatcaatgaaactaggatttaattatatgaatcacttgaatctaagattact
tgacaaatgataacataatacactggagcttcaaacatagccaatgtgattctaaactcctttaaactcacagttaat
cataaacaagggttgacatcaatctagctatatctttaagaatgataaacttgatgaagattaagaaaaaggtaatc
tttcgattatctttagtcttcatccttgattctacaatcatgacagttgtctttaatgaaaaaggaaaaaaccttt
ttattaagttgtaataatcagatctgcaaaccggtagaatttagttgtaacctaacacacacaaagcatttggtaaaa
aagtcaatagaaatttaaacagtgagtgacagacaactcttaaatggaagcttcatatgagagaggacgccccgagc
tgccagacagcattcaagggtatggacacgaccacatgttcgagcagcatcatccagagagaattatcgaggtg
agtaccgtcaatcaaggagcgctcacaagtgcgcgttctactgtatttcataagaagagagttgaaccattaaca
gttctctcagcacctaaagacatatgtccgaccttgaaaaaggatttttgtgtgacagtagtttttgcaaaaaaga
ccaccagttagaaagtttaactgatagggaattactcctactaatcgcccgtagacttgtggatcagtagaacaac

aattaaatataactgcaccaaggactcgcgcttagcaaatccaacggctgatgatttccagcaagaggaagggtcca
aaaattaccttgttgacactgatcaagacggcagaacactgggcgagacaagacatccgaaccatagaggattccaa
attaagggcattgttaactctatgtgctgtgatgacgaggaaattctcaaaatcccagctgagtcctttgtgtgaga
cacacctaaggecggaagggttgggcaagatcaggcagaacccgttctcgaagtatatcaacgattacacagtgat
aaaggaggcagttttgaagctgcactatggcaacaatgggaccgacaatccctaattatgtttatcactgcattctt
gaatatcgctctccagttaccgtgtgaaagtctgtgctgttgtttcagggttaagaacattggttcctcaatcag
ataatgaggaagcttcaaccaaccggggacatgctcatggctgtgatgagggtacccttaataaggctgactaaaa
cactatataaccttctacttgatcacaatactccgtataacctatcatcatatatttaatacagacgatatcctttaa
aacttattcagtgactataatcactctcatcttcaaatgtataagatatgcataattgccttaatatataaagaggat
gatataacccaaacattgaccaaaagaaaatcataatctcgatatcgctcgcaatataacctgccaagcatacctcttg
caciaagtgattcttgtacacaaataatgtttgactctacaggaggttagcaacgatccatctcatcaaaaaataagt
attttatgatttactaatgatctcttaaaatatgaaaaaactgacggaacataaattctttctgcttcaagttgt
ggaggaggtctatggtattcgctattgttatattacaatcaataacaagcttgtaaaaaatattgttcttgtttcagg
aggatatattgtgaccggaaaagctaaactaatgatgaagattaatgcggaggtctgatgagaataaacctcattatt
cagattaggecccaagaggcattcttcatctccttttagcaaaaatactatttcaggatagtcagctagtgcacgt
cttttagctgtataaccagttgccccgagatacgccacaaaagtgtctctgagctaaagtggctctgtacacatctca
tacattgtattaggggcaataatatctaattgaacttagccattttaaatttagtgcataaatctgggctaactcca
ccagggtcaactccattggctgaaaagaagcccacctacaacgaacattactttgagcgccctcacaattaaaaaata
agagcgctcgttccaacaatcgagcgcaaggttacaaggtgaactgagagtgtctagacaacaaaatatcgatactc
cagacaccaagcaagacctgagaaaaaacatggccaaagctacgggacgatacaatctaatatcgcccaaaaagga
cctggagaaaaggggttgtcttaagcgacctctgtaacttcttagtttagtcaaactattcaagggtggaagtttatt
gggctgggtattgagtttgatgtgactcaciaaaggaaatggccctattgcatagactgaaaactaatgactttgcccc
gcatgggtcaatgacaaggaacctatttccccatttatttcaaaatccgaattccactattgaatcacgcgtgtgggc
actgagagtcatecttgcagcagggtacaggaccagtttaattgaccagtccttgattgaacccttagcaggagccc
ttggctctgatctctgattggctgctaacaaccaacactaaccatttcaacatgcgaacacaacgtgtcaaggaacaa
ttgagcctaataatgtgtcggttgattcgatccaatattctcaagtttattaacaaattggatgctctacatgtcgt
gaactacaatggattattgagcagtttgaaattggaactcaaaatcatacaatcatcataactcgaactaacttg
gttttctgggtggagctccaagaaccgacaaatcggcaatgaaccgcaagaagcctgggcccggcgaaattttccctc
cttcatgagtcacactgaaagcatttacacaagggtcctcgacacgaatgcaaagtttaattcttgaattcaatag
ctctcttgccttcaatacagatatataagcataataaaataaatactcatatttcttgataatttgtttaaccacaga
taaactctcactgtaagecagcttccaagttgacacccttcaaaaaaccaggactcagaatccctcaataagagat
tccaagacaacatcatagaattgctttattatattaataagcattttatcactagaaatccaatatagcaaatgggtt
aattgtaactaaaccgcaggtcatgtgtgttaggtttcaciaaattatataattactaactccatactcgtaacta
acattagataagtaggttaagaaaaagcttgaggaagattaagaaaaactgcttattgggtctttccgtgttttag
atgaagcagttgacattcttctcttgatattaaatggctacacaacatacccaatacccagacgccaggttatcat
caccaattgtattggaccaatgtgacctgtcactagagcttgcggttgattcatcatactcccttaatecgcaa
ctacgcaactgtaaaactcccgaacatatataaccgtttaaataatgatgtaactgttaccaggttcttaagtgtgt
accagtggcgacattgcccatagatttcatagtcceaatcttctcaaggcactatcaggcaatgggttctgtcctg

ttgagccgcggtgccaacagttcttagatgaaattattaagtacacaatgcaagatgctctcttctgaaatattat
ctcaaaaatgtgggtgctcaagaagactgtgttgatgaccactttcaagaaaaatcttatcttcaattcagggcaa
tgaatttttacatcaaatgtttttctggtatgacctggctattttaactcgaagggtagattaaatcgaggaaact
ctagatcaacgtgggttggttcatgatgatttaatagacatcttaggctatggggactatgttttttgaagatccca
atttcaactgtttaccactgaacacacaaggaatccccatgctgctatggattgggtatcagacatcagtattcaaaga
agcggttcaagggcatacacacattgtttctgtttctactgccgatgtcttgataatgtgcaaagatttaattacat
gtcgattcaacacaactctaatactcaaaaatagcagaggttgaggaccagtttgctctgattatcccaattttaag
attgtgtctatgctttaccagagcgagattacttactctccatattagggctgatgggtataaaatcattaagtt
tctcgaaccattgtgcttggctaaaattcaattgtgtctcaaagtacaccgagaggaagggccgattcttaacacaaa
tgcatttagctgtaaatcacaccttggaagaaattacagaaatacgtgcactaaagccttcacagggtcacaagatc
cgtgaattccatagaacattgataaggctggagatgacgccacaacaactttgtgagctattttccatacaaaaaaca
ctggggggcactcctgtgtctacatagtgaaacagcaatccaaaaagttaaaaaacatgctacgggtgctaaaagcattac
gccctatcgtgattttcgagacatatgtgtttttaatatagcattgcaaaacattattttgatagtcaggatct
tggtacagtgttacctcagatagaaatctaaccagggtcttaattcttatatacaaaagaaatcaattccctccgtt
gccaatgattaaagaactgctatgggaattttaccacctgaccatctccacttttctcaaccaaattatttagtg
acttaagtatttttataaaagacagagctactgcagtagaaaggacatgctgggatgcagtattcgagcctaagtgtt
ctgggatataatccacctcacaaattcagtaccaaacgtgtaccggaacaattttagagcaagaaaacttttctat
tgagaatgttctttctacgcgcaaaaactcgagtatctactaccacaatatcggaattttctttctcattgaaag
agaaagagttgaatgtaggtagaactttcggaaaattgccttatccgactcgcaatgttcaaacactttgtgaagct
ctgttagctgatggctcttgctaaagcatttccctagcaatatgatggtagttacggaacgtgaacaaaaagaaagcctt
attgcatcaagcatcatggcaccacacaagtgatgatttcggtagcatgccacagttagagggagtagctttgtaa
ctgatttagagaaatacaatcttgcatttaggtatgagtttacagcaccttttatagaatattgcaaccgttgctat
gggtgttaagaatgtttttaattggatgcattatacaatcccacagtggtatatgcatgtcagtgattattataatcc
accgcataacctcacactggaaaatcgaaacaacccccctgaagggcctagttcatacaggggtcataatgggagggga
ttgaaggactgcaacaaaaactctggacaagtattcatgtgtctcaaatttcttttagttgaaattaagactggtttt
aagttgcgctcagctgtgatgggtgacaatcagtgcatcaccgttttatcagcttcccccttagagactgatgcaga
cgagcaggaacagagcgccgaggacaatgcagcgaggggtggccgcagcctagcaaaagttacaagtgccgttgaa
tcttttttaaaacctgatgaaacattgtacattcaggttttatctattttggaaaaaacaatatgtgaatggggctc
caattgcctcagtcctttaaacggctacaagaatggcaccattgtctgatgcaatttttgatgatcttcaagggac
cctggctagtataggtactgcttttgagcgatccatctctgagacacgacatatctttccttgagaataaccgcag
ctttccatacgttcttttcggtgagaatcttgcaatatcatcacctcggatttaataaaggttttgaccttgacag
ttaacactcggcaaacctctggatttcggaacaatatcattggcactagcggtagcggcaggtgcttgagggttatac
cttcttgaatcctgagaaatgtttctaccggaatctaggagatccagttacctcaggtttattccagttaaaaactt
atctccgaatgattgagatggatgatttattcttacctttaattgcgaagaacctgggaactgcactgccattgac
tttgtgtctaaatcctagcggattaaatgttccctgggtcgcaagacttaacttcatttctgcgccagattgtacgtag
gactataccctaagtgcgaaaaacaaacttattaataaccttatttcatgcatcagctgacttcgaagacgaaatgg
tttghtaagtggctcttatacatcaactcctgttatgagtcgtttcgagccgatatattttcacgcacgccgagcggg
aagcgattgcaaatcttaggatacttggaaggaacacgcacattattagcctctaagatcatcaacaataatacaga
gacgcgggttttgacagactgaggaagataacattgcaaaggtggagtctatggtttagttatcttgatcattgtg

ataatatcctggcggaggtttaacccaaataacttgcacagttgatttagcacagatcctgagggaaatattcatgg
gcacatatatttagaggggagacctcttattggagccacactcccatgtatgattgagcaattcaaagtggtttggct
gaaaccctacgaacaatgtccgcagtggttcaaatgccaaagcaacctgggtgggaaaccattcgtgtcagtagcagtc
agaacatatattgttagtgcattggccaaatgcatcccgaaataagctggactatcggggatggaatcccatattgga
tcaaggacagaagataagatagggaacctgctattaaacaaaaatgtccttccgcagccttaagagaggccattga
attggcgtcccgtttaacatgggtaactcaaggcagttcgaacagtgacttgctaataaaaccatttttgggaagcac
gagtaaatttaagtgttcaagaaatacttcaaatgaccccttcacattactcgggaaatatgtttcataggtacaac
gatcaatacagtcctcattctttcatggccaatcgatgagtaactcagcaacgcgattgattgtttctacaaacac
tttaggtgagttttcaggaggtggccaatcggcacgcgacagcaatatattttccagaatgttataaattatgcag
ttgcactgttcgatattaaatttagaaacactgaggctacagatatccagtataatcgtgctcaccttcattcact
aagtgttgcacccgggaggtaccagctcagtatttaacatacacatctacattggatttagatttaacaagataccg
agaaaatgaattgatttatgacaataatcctctaaaaggaggactcaattgcaatatctcatttgataacccatttt
tccaaggcaaacagctgaacattatagaagatgaccttatctgactgctcacttatctggatgggagctagctaag
accatcatgcaatcaattatttcagatagcaataatcgtctacagaccaattagcagtgagaaacaagatcatt
cactaccattttcttaacttatcccaagataggacttctgtacagttttggggcctttgtaagttattatcttggca
atacaattcttcggactaagaaattaacacttgacaattttttatattacttaactacccaaattcataatctacca
categtctcattgcaataacttaagccaacattcaaacatgcaagcgttatgtcacgattaatgagtattgatccca
tttttctattttacataggcgtgctgcaggtgacagaggactctcagatgcggccaggttatttttgagaacgtcca
tttcatcttttcttacatttgtaaaggaatggataattaatcgcggaacaattgtccctttatggatagtatatcca
tttagagggtcaaaatccaacacctgttaataatttcttccatcagatcgtagaactgctgggtgcatgattcatcaag
acaccaggtttttaaaactaccataaatgatcatgtacatctcagacaatcttggtttacacatgtaagagtacag
ccagcaattttcttccatgcgtcattggcgtactggaggagcaggcacagaaacagcaaccgaaaagacttgacaaga
aactcttcaactggatcaagcacaaacaacagtgatgggtcatattaagagaagtcaagaacaaaccaccagagatcc
acatgatggcactgaacggagcttagtcctgcaaatgagccatgaaaataaaaagaacgacaattccacaagagaaca
cgcaccagggtccgtcgttccagtcattttctaagtgactctgcttgcggtacagcaaaccctaaatcttgat
agatcgagacacaatgtgaaatctcaggatcataactcagcatccaagagggaaggtcatcaataatctcacatcg
tctagtcctacctttctttacattatctcaagggacacgccaattaacgtcatccaatgagtcacaaaccctaatg
agatatcaaagtaacttacggcaattgagatccgtcattgataccacagtttattgttaggtttaccgggtatagtcctg
tccatgcattacaaacttgatgaggtcctttgggaaatagagaatttttaagtcggctgtgacgctggcagagggaga
agggtgctgggtgccttactattgattcagaaataccaagttaagaccttatttttcaacacgctagctactgagtcca
gtatagagtcagaaatagtatcaggaatgactactcctaggatgcttctacctgttatgtcaaaattccataatgac
caaattgagattattcttaacaactcagcaagccaaaataacagacataacaaatcttacttgggtttaagaccaag
agcaaggctacctaggcaagtcgaggttataaccaatggatgcagagacgacagagaatataaacagatcgaaattgt
acgaagctgtacataaatatgatcttacaccatgttgatcccagcgtattgaaagcagtggtccttaagtccttct
agtataccgaggggtatgttatggctaaatgataatctagccccgttttttggcactgggtatttaattagccaat
aacgtcaagtgccaggcttagtgagtggtatcttctgtcaggaacttcttataactacacgtaagatgccacacc
aaaaccatctcagttgtaagcaggttaatacttacggcattgcaactgcaattcaacggagcccatactggctaagt
catttaactcagtatgctgactgcgatttacatttaagctatatccgccttggttttccatcattagagaaagtact
ataccacaggtataaccttgctgattcaaaaagagggtccactagtcctgtcactcagcacttagcacatcttaggg

cagagattcgagaattgaccaatgattataatcaacagcgacaaagtcggactcaaacatatcactttattcgtact
gcaaaaggacgaatcacaaaactagtcattgattatttaaaattctttcttattgtacaagcattaaaacataatgg
gacatggcaagctgagtttaagaaattaccagagttgattagtggtgcaataggttctatcatattagagattgta
attgtgaagaacgtttcttagttcaaaccttatatttacatagaatgcaggattctgaagttaagcttatcgaaagg
ctgacagggtctctgagtttatttccagatgggtctctacagggtcgattgaataaccgtgcatagtattttgatact
tgtaaagggttggttatcaacatacagattataaaaaactcataaattgctctcatacatcttgatctgatttca
ataaataactatttagataacgaaaggagtccttacattatacactataatttgacctctctccctgcgtgataatca
aaaaattcacatacagcatgtgtgacatattactgctgcaatgagtcacgcaacataataaactccgcactctt
tataattaagctttaacgataggctctgggctcatattgttattgatataagtaattgtgtatcaatatcttgccagat
ggaatagtgcttttggttgataacacgacttcttaaaacaaaactgatctttaagattaagttttttataattgtcat
tgctttaatttgctgatttaaaaatgggtgatagccttaattctttgtgtaaaataagagattaggtgtaataacttta
acatttttgtctagtaagctactattccattcagaatgataaaattaaaagaaaagacatgactgtaaaatcagaaa
taccttctttacaatatagcagactagataataatcttcgtgttaattgataattaaggcattgaccacgctcatcag
aaggtcactagaataaacgttgcaaaaaggatccctggaaaaatggtcgcacacaaaaatttaaaaataaatctat
ttcttcttttttgtgtgtcca, (SEQ. ID. NO.:1).

SEQ. ID. NO: 2

CGGACACACAAAAAGAAAGAAAAGTTTTTTAGACTTTTTGTGTGCGAATAACTATGAGGAAGATTAATCATTT
TCCTCAAACCTCAAACCTAATATTAACATTGAGATTGATCTCATCATTTACCAATTGGAGACAATTTAACTAGTCAATC
CCCCATTTGGGGGCATTCTAAAGTGTTGCAAAGGTATGTGGGTCGTATTGTTTTGCCTTTTCTAACCTGGCTCCT
CCTACAATTCTAACCTGCTTGATAAGTGTGATTACCTGAGTAATAGACTAATTCGTCCTGGTAATTAGCATTCTCT
AGCAAAACCAATACTATCTCAAGTCCTAAGAGAAGGTGAGAAGAGGGTCCCGAGGTATCCCTCCAGTCCACAAAATC
TAGCTAATTTTAGCTGAGTGGACTGATTACTCTCATCACACGCTAACTACTAAGGGTTTACCTGAGAGCCTACAACA
TGGATAAACGGGTGAGAGGTTTCATGGGCCCTGGGAGGACAATCTGAAGTTGATCTTGACTACCACAAAATATTAACA
GCCGGGCTTTCCGTCCAACAAGGGATTGTGCGACAAAGAGTCATCCCGGTATATGTTGTGAGTGATCTTGAGGGTAT
TTGTCAACATATCATTACGGCCTTTGAAGCAGGCGTAGATTTCCAAGATAATGCTGACAGCTTCCTTTTACTTTTAT
GTTTACATCATGCTTACCAAGGAGATCATAGGCTCTTCCTCAAAAGTGATGCAGTTCAATACTTAGAGGGCCATGGT
TTCAGGTTTGAGGTCCGAGAAAAGGAGAATGTGCACCGTCTGGATGAATTGTTGCCAATGTCACCGGTGGAACAAA
TCTTAGGAGAACATTGGCTGCAATGCCTGAAGAGGAGACAACAGAAGCTAATGCTGGTCAGTTTTTATCCTTTGCCA
GTTTGTCTTACCCAACTTGTCGTTGGGGAGAAAGCGTGTCTGGAAAAAGTACAAAGGCAGATTACAGGTCCATGCA
GAACAAGGGCTCATTCAATATCCAACCTTCCTGGCAATCAGTTGGACACATGATGGTGATCTTCCGTTTGATGAGAAC
AACTTTTTTAATCAAGTTCCTACTAATACATCAGGGGATGCACATGGTCGCAGGCCATGATGCGAACGACACAGTAA
TATCTAATTCTGTTGCCAAGCAAGGTTCTCTGGTCTTCTGATTGTAAAGACTGTTCTGGACCACATCCTACAAAAA
ACCGATCTTGAGTACGACTTCATCCACTGGCCAGGACAGCAAAAGTCAAGAATGAGGTCAGTTCATTCAAGGCAGC
TCTTGGCTCACTTGCCAAGCATGGAGAATATGCTCCATTTGCACGTCTCCTCAATCTTTCTGGAGTCAACAACCTTGG
AACATGGGCTTTATCCACAACCTCTCAGCCATTGCTTTGGGTGTTGCAACTGCCCACGGGAGCACGCTGGCTGGTGTT
AATGTAGGGGAGCAATATCAGCAACTGCGTGAGGCTGCTACTGAAGCTGAAAAGCAACTCCAACAATATGCTGAGAC
ACGTGAGTTGGACAACCTTGGGCTTGATGAGCAGGAAAAGAAGATTCTCATGAGCTTCCACCAGAAGAAGAATGAGA
TCAGCTTCCAGCAAACTAACGCAATGGTAACCTTGAGGAAAAGAGCGGCTGGCCAACTGACCGAAGCCATCACGACT
GCATCAAAGATCAAGGTTGGAGATCGTTATCCTGATGACAATGATATTCCATTTCCCGGGCCGATCTATGATGAAAC

CCACCCCAACCCTTCTGATGATAATCCTGATGATTCACGTGATACAACCTATCCCAGGTGGTGTGTTGACCCGTATG
ATGATGAGAGTAATAATTATCCTGACTACGAGGATTTCGGCTGAAGGCACCACAGGAGATCTTGATCTCTTCAATTTG
GACGACGACGATGACGACAGCCAACCAGGACCACCAGACAGGGGGCAGAGCAAGGAGAGAGCGGCTCGACACATGG
CCTCCAAGATCCGACCTTGGACGGAGCGAAAAAGGTGCCGGAGTTAACCCAGGTTCCCACCAACCAGGCAACCTCC
ACATCACCAAGCCGGGTTCAAAACACCAACCAACCACAAGGCAATATGTCATCTACTCTCCAGAGTATGACCCCTATA
CAGGAAGAATCAGAGCCCGATGATCAGAAAGATGATGATGACGAGAGTCTCACATCCCTTGACTCTGAAGGTGACGA
AGATGTTGAGAGCGTATCAGGGGAGAACAACCCAACTGTAGCTCCACCAGCACCAGTCTACAAAGATACTGGAGTAG
ACACTAATCAGCAAAATGGACCAAGCAATGCTGTAGATGGTCAAGGTTCTGAAAGTGAAGCTCTCCCAATCAACCCC
GAAAAGAGATCTGCACTGGAAGAAACATATTATCATCTCCTAAAAACACAGGGTCCATTTGAGGCAATCAATTATTA
TCACCTAATGAGTGATGAGCCCATTTGCTTTTAGCACTGAAAGTGGCAAGGAATATCTCTTCCCAGATTCTCTTGAAG
AAGCCTACCCGCTTGGTTGAGTGAGAAGGAGGCCCTAGAGAAAGAAAATCGTTATCTGGTCATTGATGGCCAGCAA
TTCTTCTGGCCAGTAATGAGCCTACAGGACAAGTTCCTTGCTGTTCTTCAACATGACTGAGGACCCATGATTAGTAG
ATTTTGTATTATTCTGAGCTTGATTATAATTGTTTTGATAATTCAAGTATGAGCACCCAACCCGAAATATAAACCTA
TTTTAGTTATGAGGAAATTAATAAATAATCTGTAAGTTGTAGGACTATGAAGAGCTGCTTGTGTCAATTTATCACG
GGTTAATACCCATACCGCAAGAATAATTATTTAGTAATTTTGATCAGCTTATGATATGTACCAATAGGAAAACATTA
TAGCATTAAACATAAAGTATCCTTCGATGAGCTTAGGAGGATAATATCCTGATGAATTCTATAGAATTAGGATTA
AGAAAAAATTCATGATGAAGATTAAAACCTTCATCATCCTTTAAAAAGAGAGCTATTCTTTATCTGAATGCCCTTAT
TAATGTCTAAGAGCTATTATTTTGTACCCTCTTAGCCTAGACACTGCCCAACATATAAATCATGCAGCAGGATAGGA
CTTATAGACATCATGGACCCGAAGTGTCTGGCTGGTTTTCTGAGCAATTAATGACCGGCAAAATACCGCTAACAGAG
GTGTTTGTGATGTTGAAAACAAACCAAGTCCCTGCCCCGATAACCATTATTAGTAAGAATCCCAAGACAACACGTAA
AAGTGATAAGCAAGTCCAAACAGATGATGCCAGTAGCTTATTGACAGAAGAAGTCAAGGCTGCCATAAATTCGGTGA
TATCAGCTGTGCGTCGGCAAAACCAATGCTATTGAATCACTAGAAGGTCGAGTAACAACCTCTTGAGGCCAGCTTAAAA
CCAGTTCAAGACATGGCAAAGACCATATCATCCCTGAATCGCAGCTGTGCCGAAATGGTTGCAAAATACGACCTACT
GGTGATGACCACTGGGCGAGCAACTGCCACTGCTGCAGCAACAGAAGCATATTGGAATGAACATGGACAAGCACCTC
CAGGCCCATCATTGTACGAGGATGATGCTATTAAGGCTAAATTGAAAGATCCGAACGGGAAGGTTCCAGAAAGTGTC
AAACAGGCCTACACAAATCTAGATAGCACAGTGCCCTCAATGAGGAAAATTTGGGCGACCTTACATTTTCAGCAAA
AGATCTCAAGGAAATCATCTATGACCATCTCCCAGGATTTGGGACAGCTTTTCATCAGTTGGTGCAGGTTATCTGCA
AAATTGGTAAGGATAATAATATCCTAGACATAATTCATGCAGAATTCCAAGCAAGCTTGGCTGAGGGAGACTCCCC
CAGTGTGCATTAATCCAGATAACAAAACGGATCCCTGCTTTCCAAGATGCCTCTCCTCCAATTGTGCATATCAAGTC
TCGAGGAGATATACCCAAAGCCTGTGAGAAAAGCCTCCGGCCGGTCCCGCCGTCACCAAGATCGATAGAGGTTGGG
TCTGTATTTTTCAATTCCAAGACGGGAAGGCCCTTGGGCTAAAAATATGATACAGAAGCAAGGTAAGCTCATTTTGC
GATGGCCAAATGATACTTATGACTGTTTAAAAATCAAGTTAGACTAATAGTCTATCATGTCATAAGCTTATAAGTCAG
TTTTAAATTTCCCCTCTATCCTAATCAATTGATAATGCTGTCAATAGGAAAATTTCCCCTGTATTGTAATAAGACCTC
ATTAACACATTTCTCTGCTTAGTACTATGCAGAAAACCCCGAGCAAATTTAAATTTGATGAAGATTAAGAAAAAGAG
GGATTTTCTCAGGAAAAATCTTTTTCTTACCTTCATCTCATTTAAACAAATTTAGGACTCAGGAAAAATGAAAAGG
GTCATGTGCCGACTGCACCACCTGCCTATGCTGACATTGGCTATCCTATGAGCATGCTTCCCATCAAGTCAAGCAG
GGCTGTGAGTGGAATTCAACAGAAACAAGAGGTCCTTCCTGGAATGGATACACCATCAAATTCATGAGACCTGTTG
CTGATGATAACATTGATCATACAAGTCATACCCGAAACGGAGTGGCCTCAGCATTTCATCTGGAGGCAACTGTCAAT
GTGATCTCGGGGCCAAAGTCCTCATGAAACAAATCCCTATTTGGTTGCCACTCGGAATTGCTGACCAAAAAACGTA

CAGTTTTGACTCAACAACAGCAGCAATTATGCTCGCATCTTATACGATCACCCATTTTGAAAAGGCCAACAACCCCC
TCGTTAGAGTGAATCGACTTGGTCAGGGAATACCGGATCACCCACTCAGATTGCTCAGGATGGGGAACCAGGCTTTC
CTTCAAGAGTTTGTGCTACCACCAGTTCAACTGCCGCAATATTTCACTTTTGATCTGACTGCACTCAAATTAGTGAC
ACAGCCTCTCCCTGCTGCGACATGGACAGATGAGACTCCGAGCAACCTTTCAGGAGCACTTCGTCCCGGGCTTTCAT
TTCACCCAAAGCTGAGACCCGTTCTACTTCCAGGCAAAACGGGAAAGAAAGGGCATGTTTCTGATCTGACTGCTCCA
GACAAAATTCAGACAATTGTGAACCTGATGCAAGATTTCAAAATCGTGCCAATTGATCCAGCTAAGAGTATCATTGG
GATCGAGGTTCCAGAATTGCTGGTCCACAAGCTCACTGGGAAGAAAATGAGTCAGAAGAATGGACAGCCTATAATTC
CTGTCTTACTTCCAAAATACATTGGGCTAGATCCAATCTCACCTGGAGACCTGACTATGGTCATAACACCAGATTAT
GATGATTGTCATTACCTGCCAGTTGCTCTTATCTCAGTGAAAAGTGATTCTCACAAAGTGAGAGAAACACCTCCAG
TAAAGAAATCAAATCTTATCTATAGCAACTCAATCGACTTTTAGGAAGCTAGCAGTACATATACTATGGGACAACCTC
AACCTCTTGTTAAAATGTACTAATCGGGTCAAAGAACTCTCACTGATCAAGCCTGAATCCAAGATAGAACCAGCCC
AAAGGGCCTCCCCAGAGTCTCTTACAACTTAGCCAATCAATTAACATGCATAAGCGATCCATACTTCACCCAATCA
GTGTCCGATGTTACCCCTTCAAGCCTCCTTCCTAGCAAATGAACTAGCTGTACCAAGAGGTTCCCTCAGCCTCCT
TCTCAAATAACCTGATCCTTGAGGGTTACACCTTACCCTCTATGCTCATTTACCCAAACATAAAATGAAATGTC
TTAACATGATTGCACCATTAAGAAAAACAAATCTGATGAAGATTAAGCCTGATTAAGGCCCAACCTTCATCTTTTAA
CCATAATCTTGTCTCAGTACCATTTGATAAGGGTACACTTGCCAAAACGCCCCATCCTAAGGGTCTCGCAATGGG
GGGTCTTAGCCTACTCCAATTGCCAGGGACAAGTTTCGGAAGGCTCTTCTTTGTTTGGGTGCATCATCTTATTCC
AAAAGGCCTTTTCCATGCCTTTGGGTGTTGTGACTAACAGCACTTTAGAAGTAACAGAGATTGACCAGCTAGTCTGC
AAGGATCATCTTGCATCTACTGACCAGCTGAAATCAGTTGGTCTCAACCTCGAGGGGAGCGGAGTATCTACTGATAT
CCCATCTGCAACAAAGCGTTGGGGCTTCAGATCTGGTGTTCCTCCCAAGGTGGTCAGCTATGAAGCGGGAGAATGGG
CTGAAAATTGCTACAATCTTGAAATAAAGAAGCCGGACGGGAGCGAATGCTTACCCCCACCGCCAGATGGTGTGAGA
GGCTTTCCAAGGTGCCGCTATGTGCACAAAGCCCAAGGAACCGGGCCCTGCCAGGTGACTACGCCTTTCACAAGGA
TGGAGCTTTCTTTCTCTATGACAGGCTGGCTTCAACTGTAATTTACAGAGGAGTCAATTTTGCTGAGGGGGTGATTG
CATTCTTGATATTGGCTAAACCAAAAAGAAACGTTCCCTCAGTCACCCCCCATTCGAGAGGCAGTAACTACACTGAA
AATACATCAAGTTATTATGCCACATCCTACTTGGAGTATGAAATCGAAAATTTTGGTGCTCAACACTCCACGACCCT
TTTCAAAATTGACAATAATACTTTTGTTCGTCTGGACAGGCCCCACACGCCTCAGTTCCCTTTTCAGCTGAACGACA
CCATTACCTTCACCAACAGTTGAGTAATACAACCTGGGAGACTAATTTGGACACTAGATGCTAATATCAATGCTGAT
ATTGGTGAATGGGCTTTTGGGAAAAATAAAAAAATCTCTCCGAACAACTACGTGGAGAAGAGCTGTCTTTCGAAGCT
TTATCGCTCAACGAGACAGAAGACGATGATGCGGCATCGTCGAGAATTACAAAGGGAAGAATCTCCGACCGGGCCAC
CAGGCAGTATTCGACCTGGTTCCAAAGAATCCCCCTGGGATGGTTCCATTGCACATACCAGAAGGGGAAACAACAT
TGCCGTCTCAGAATTCGACAGAAGGTGAAGAGTAAGTGTGAACACTCAGGAGACCATCACAGAGACAGCTGCAACA
ATTATAGGCACTAACGGCAACCATATGCAGATCTCCACCATCGGGATAAGACCGAGCTCCAGCCAAATCCCGAGTTC
CTCACCGACCACGGCACCAAGCCCTGAGGCTCAGACCCCCACAACCCACACATCAGGTCCATCAGTGATGGCCACCG
AGGAACCAACAACACCACCGGAAGCTCCCCGGCCCAACAACAGAAGCACCCACTCTCACCACCCAGAAAATATA
ACAACAGCGGTTAAACTGTCTGCCACAGGAGTCCACAAGCAACGGTCTAATAACTTCAACAGTAACAGGGATTCT
TGGGAGTCTTGGGCTTCGAAAACGCAGCAGAAGACAACTAACACCAAAGCCACGGGTAAGTGCAATCCCAACTTAC
ACTACTGGACTGCACAAGAACAACATAATGCTGCTGGGATTGCCTGGATCCCGTACTTTGGACCGGGTGCGGAAGGC
ATATACACTGAAGGCCTGATGCATAACCAAAATGCCTTAGTCTGTGGACTTAGGCAACTTGCAAATGAAACAACCTCA
AGCTCTGCAGCTTTTCTTAAGAGCCACAACGGAGCTGCGGACATATACCATACTCAACAGGAAGGCCATAGATTTC

TTCTGCGACGATGGGGCGGGACATGCAGGATCCTGGGACCAGATTGTTGCATTGAGCCACATGATTGGACAAAAAC
ATCACTGATAAAATCAACCAAATCATCCATGATTTTCATCGACAACCCCTTACCTAATCAGGATAATGATGATAATTG
GTGGACAGGCTGGAGACAGTGGATCCCTGCAGGAATAGGCATTACTGGAATTATTATTGCAATTATTGCTCTTCTTT
GCGTTTGCAAGCTGCTTTGCTGAATATCAATTTGAATCATCAATTTAAGCTTGATACATTTCTAGCATTTTAAATTA
TAAACCGATACTGATACTTGAAAAATCAGGCTAATGCCAAGTTCTGTGCAAACTTGAAAGTAAGCTTACAAAAATCC
TTTGAAGTGAATGCTTTGATACTCTTTCTCAATACTATATAAGTTCCTTCCCAAGAATAATATTGATGAAGATTAA
GAAAAAGTGACATTGTGCCCACTTTTGTAATCTTCATCCACCTACACATTCATATTCAGGAATCTTTGAATTAACCC
TCACACTTGCTTAGGAAAGAGCCTATCCTCTACAAGAATCCCGAGGCGGCAATTCAGTTAATTTTCATATCAAGATAA
CATCCATTTCCAAGACCACAGATAACTATATTATTAATCTTTACCACAAATATGGAGAGGGGTCTGTGAGCGCGGGAG
ATCAAGGAATTCACGTGCCGACCAGCAAAATTCACAGGTCCTCAATTTAGGACAAGATCCATTTCCCGGGATAAGA
CAACAACAGACTACCGTAGTAGTCAAGTACTTCGCAAGTTAGAGTCCCTACGGTTTTCCATAAGAAAGGTACTGGG
ACCCTTACTGTCCCTCCAGCACCTAAGGATATTTGTCCTACTCTCAGAAAAGGATTTCTATGTGACAGTAATTTCTG
TAAAAAGGACCATCAACTTGAAAGCCTAACCGACCGGGAGCTCCTACTTCTTATAGCACGGAAGACCTGTGGATCAA
CTGATTCATCGCTTAATATAGCTGCTCCTAAAGACCTAAGACTAGCAAATCCTACGGCTGATGACTTCAAGCAAGAC
GGCAGTCCAAAATTAACCTAAAATTAAGTCTGAGACTGCTGAGTTTTGGGCCAATCAGAATATTAATGAAGTAGA
TGATGCAAACTCCGTGCTCTCTTGACGTTGAGTGCTGTCTTAGTGCGGAAATTCCTAAGTCACAGCTTAGTCAAT
TATGTGAGAGTCATCTTAGGAGGGAAAACTTAGGACAAGACCAAGCTGAATCAGTTCTCGAGGTTTATCAACGTTTA
CATAGTGATAAAGGAGGTGCTTTTGAGGCAGCACTATGGCAACAGTGGGATAGACAATCATTAAGTATGTTTATATC
TGCTTTTCTCCATGTAGCATTGCAACTTTCTGTGAGAGCTCCACTGTAGTGATATCAGGCCTACGCTTACTTGCCC
CCCCAAGCGTTAATGAAGGGCTCCCTCCTGCACCAGGGGAATATACTTGGTCAGAAGATAGTACAAGTTAGCCTATA
GGGAGGACAAGTAAAACAAGATGCCCTTATCCTCTATAGATGGTATTTTAAAGAGGGGGACAGGATAGGAATAAAG
ATAATGACTAAAGCCAATATAAAGATACGAACACAAGTAGAAATTTAAATAGAAATCAAAACAATCTCCCCTTGTTT
AATATGAAATATAATAGTGAGTATTTGTTTCATGATGTCAATCATTATTTGTTAAAAATAAACAAAGTCAGTAAGAG
TGTTAGGATCGTTATATTGCAAGGATCCTCCCTAGAAGCGTTGAATCATCTCAAGTAGCCTAGAACAAGAACAGCAG
AGCATTAAATTGAAATAGATAATAAGGATATTGCTTGTTTTTAAGATAGTTTTAGGAAGTTTAAATTAAGAAAAAG
AAGCCATGGACACACTCTAGCATTGAGGATGGGGTTCCCTTGATGATAGTATAGTCTTAGGTATAGGGTAGTCTAC
ACGTCCTATATTATACAGTCTAACTTGTAATAATTAAGTACAAGAACATGATGAAAATTAATGAGAAGGTTCCAAG
ATTGACTTCAATCCAAACACCTTGCTCTGCCAATTTTCATCTCCTTAAGATATATGATTTTGTTCCTGCGAGATAAG
GTTATCAAATAGGGTGTGTATCTCTTTTACATATTTGGGCTCCCACTAGGCTAGGGTTTATAGTTAAGGAAGACTCA
TCACATTTTTTAATTGAAGTACTCTACTCGCAGAATCCTACCGGAATAGAAATTAGAACATTTGTGATACTTTGACT
ATAGGAAATAATTTTCAACACTACCTGAGATCAGGTTATTCTTCCAACTTATTCTGCAAGTAATTGTTTAGCATCAT
AACAACAACGTTATAATTTAAGAATCAAGTCTGTAAACAGAAATAAAGATAACAGAAAGAACCTTTATTATACGGGT
CCATTAATTTTATAGGAGAAGCTCCTTTTACAAGCCTAAGATTCCATTAGAGATAACCAGAATGGCTAAAGCCACAG
GCCGTTACAAGTTGGTAACACCAAAACGGGAGCTAGAGCAAGGAGTTGTGTTTAGCGACCTATGCAACTTCCTAGTG
ACTCCAAGTGTGCAAGGATGGAAGGTTTACTGGGCTGGACTTGAGTTTGATGTCAACCAAAAGGGTATTACCCTGTT
AAATCGTCTTAAAGTGAATGATTTTGCTCCTGCATGGGCGATGACCCGGAACCTCTTCCCACACTTGTTCAAAAACC
AACAGTCTGAAGTCCAACTCCCATTTGGGCCTTAAGGGTAATCTTGCCGCCGGGATTCTTGACCAATTAATGGAT
CATTCCCTCATTGAGCCGCTATCAGGGGCCCTGAACCTAATGCTGATTGGTTACTAACAACATCTACTAATCACTT
CAACATGAGAACTCAACGAGTAAAGGACCAACTGAGTATGAGGATGTTATCTCTTATAAGGTCAAATATTATTAAGT

TTATAAATAAGCTCGAGACTCTTCATGTCGTTAATTACAAGGGACTTCTAAGCAGTGTTGAGATAGGAACACCAAGC
TATGCAATCATCATTACCAGGACTAATATGGGTTATCTTGTGCGAAGTTCAGGAACCAGATAAATCTGCAATGGATAT
ACGACACCCTGGTCTGTCAAATTCTCCCTACTACATGAATCGACACTTAAACCTGTTGCCACTCCTAAACCGTCAA
GCATTACTTCATTGATCATGGAGTTCAACAGTTCTTTGGCAATTTAATTGCCGTAATAACAATTGTACGATAGGGCT
AACATTGATTCCATAATCCATCGTAGGACAGAATCATTTTCCTGTATGATCTTAGTTTAATCTCTCTTTATACAATG
ATTAATAAGGAGCTTGTTTAGAATGTTACAAAAGTATACTGTTTGACCCCCTAGTATCCCTGTAAATATCCTCATTC
AATTTTTTGCTTTTACATGTGTAGTCACCTGTATAGCATGACCCTAGTCATGCCTTTAATTAATACTTAATCTAACA
GTTAATATAATGTATAACTTTCCATGTTCAAAGAGTAGTCAAAACAATGTGAGATCCAGTTTCACTCACAGCATCTA
TTCCTACTATTTACAGTATGATGAGCCCAAATTAACACAGTAGAGGTCTAGATTTATTAATAGAATGAGGAAGATTAAG
AAAAAGTCCATAATGCTGGGGAGGCAATCCTTGCCACCATAGGACTTTTTCAATTCCTCTATTTTATGATGGCTACC
CAACATACACAATATCCTGATGCAAGATTGTCTTCCCCAATTGTCTTAGACCAATGTGACCTAGTGACAAGAGCTTG
TGGACTTTACTCTGAGTATTCGCTGAACCCTAAACTAAGGACATGCCGTTTACCGAAACATATCTACAGATTAATAAT
ATGACACTATTGTTTTACGATTTATCAGTGATGTCCCTGTAGCTACAATCCCAATAGACTACATTGCTCCGATGTTA
ATAAATGTTCTGGCAGATAGTAAAAATGTACCATTGGAACCTCCCTGCTTGAGTTTCTTGATGAAATAGTCAATTA
TACCGTGCAGGATGCAGCATTCTTAATTATTACATGAATCAGATTAACACAGGAAGGAGTAATTACAGATCAAT
TGAAACAGAACATTTCGTAGGGTCATTACAAAAACAGATATCTATCTGCTCTATTCTTCTGGCATGATCTTGCCATC
CTCACCCGTCGAGGGAGAATGAACCGAGGAAATGTGCGCTCTACTTGGTTTGTAAACGAATGAGGTTGTTGACATTCT
AGGATATGGTGATTATATCTTCTGGAAGATCCCTATTGCTCTATTACCAATGAACACAGCTAATGTTCCACATGCAT
CAACTGACTGGTACCAACCTAATATCTTCAAGGAGGCTATTCAAGGACACACACATATTATTTTCAGTCTCTACAGCC
GAGGTCTTATTATGTGTAAGGATCTTGTCAACAAGTCGTTTTAATACCCTTCTGATTGCTGAGTTAGCCAGGTTGGA
AGATCCAGTGTCTGCTGATTATCCACTAGTAGATAATATTCAATCTCTGTATGACGCAGGAGACTACCTGTTGTCCA
TATTGGGATCAGAGGGGTACAAAATAATCAAATATCTCGAACCTCTGTGTTTGGCTAAGATTCAACTATGTTCCCAA
TATACAGAACGAAAAGGGCGGTTTTTAACCCAGATGCATCTTGCAAGTTATTTCAGACATTGCGTGAACCTCCTCCTAA
TAGAGGGTTGAAAAAATCACAATTGTCTAAAAATCCGCGAGTTTCACCAACTGTTGCTCAGACTCCGATCTACACCAC
AACAATTATGTGAATTATTTTCAATCCAAAAACACTGGGGCCACCCAGTTCTGCATAGTGAAGGCCATCCAAAAG
GTTAAAAATCATGCAACAGTTCTAAAGGCATTGCGGCCGATTATCATCTTTGAAACGTATTGTGTGTTCAAGTATAG
TGTTGCAAAACATTTCTTTGATAGTCAAGGCACTTGGTACAGTGTGATATCAGACCGATGTTTAAACGCCGGGATTGA
ATTCTACATTAGGCGAAATCAATTCCTCCACTTCCAATGATCAAAGATCTTTTATGGGAATTTTACCATTGTTGAT
CATCCTCCATTATTCTCCACGAAGATCATTAGTGACCTCAGCATTTTCATTAAAGACCGCGCAACAGCAGTTGAACA
GACCTGTTGGGATGCAGTTTTTGTAGCCTAACGTTTTGGGCTACAGTCCACCTTATCGATTCAATACCAAACGTGTAC
CTGAACAATTCTGGAGCAAGAGGATTTTTCTATTGAGAGTGTCTTACAATACGCCCCAAGAACTTAGGTACTTATTG
CCCCAGAATCGAAATTTTTCTTTTTTCAATTGAAGGAAAAAGAATTAAATGTTGGTAGGACATTTGGAAAAATTGCCTTA
TTTAACCAGGAATGTCCAAACCCTCTGCGAAGCATTACTTGCAAGTGGTTTGGCTAAAGCCTTTCCAAGCAATATGA
TGGTGGTTCACAGAGAGGGAACAAAAGGAGAGCCTCCTTCACCAAGCATCCTGGCACCATAACAAGTGATGATTTCCGA
GAGCATGCCACAGTTCGTGGAAGTAGTTTTGTACAGACCTGGAAAAATACAATCTGGCCTTCAGGTATGAATTCAC
AGCTCCCTTCATCAAATATTGCAACCAATGCTATGGGGTTCGCAATGTCTTTGATTGGATGCACTTCCTAATTCCAC
AGTGTTACATGCATGTTAGTGATTATTATAACCCACCACATAATGTAACCTTAGAGAATAGGGAATATCCCCCGAA
GGACCAAGTGCTTATAGAGGCCACCTTGCGGGTATTGAGGGGCTTCAACAAAAGTTATGGACTAGTATCTCATGTGC
TCAAATCTCATTGGTAGAGATCAAGACCGGGTTCAAATGCGATCAGCAGTCATGGGGGATAATCAATGTATTACAG

TATTATCAGTCTTTCCACTAGAACTCTAGTCCGAATGAGCAGGAGAGATGCGCAGAAGACAATGCAGCCAGAGTGGCT
GCTAGCTTGGCCAAAAGTCACAAGTGCTGTGGGATATTCCTCAAGCCTGATGAGACTTTCGTACACTCAGGCTTTAT
CTATTTTGGCAAAAAGCAATACTTGAACGGAATTCAATTACCTCAATCACTCAAGACAGCAGCTAGGATGGCCCCCTC
TCTCAGATGCAATTTTTGATGACTTGCAAGGTACACTTGCTAGTATAGGAACTGCCTTTGAGCGATCAATCTCCGAA
ACTAGACATATTTTACCATGTCGTGTTGCAGCTGCCTTTCATACATATTTCTCTGTTCCGGATCTTACAACATCATCA
CCTTGGTTTTCCATAAGGGTTCAGACCTTGGACAATTGGCAATCAATAAACCTCTTGATTTCCGGGACCATTGCACTAT
CCCTAGCAGTTCCTCAGGTATTGGGTGGATTATCCTTCCTAAATCCAGAAAAGTGCCTTTATCGCAACTTGGGTGAT
CCTGTAACCTCAGGCCTATTCCAGTTGAAGCATTATCTGTCAATGGTGGGTATGAGTGATATCTTTCATGCACTTGT
TGCAAAAAGCCCAGGGAATTGTAGCGCGATTGACTTTGTTCTAAACCCAGGCGGGTTAAATGTCCCTGGATCACAGG
ATTTAACATCTTTCCCTTCGTGAGATTGTCAGAAGGAGTATCACACTTTCGGCAAGGAACAAGTTAATCAACACGTTA
TTTCACGCTTCTGCAGATCTTGAAGACGAATTAGTATGTAAATGGTTACTTTCTTCAACGCCCGTGATGAGTCGTTT
CGCAGCCGATATTTTCTCACGAACACCAAGCGGGAAAAGATTACAAATCTTGGGATACCTCGAGGGAACCAGAACTT
TATTAGCATCTAAAATGATAAGCAATAATGCAGAGACACCAATCTTGGAGAGGCTCAGAAAAATAACACTTCAAAGA
TGGAATCTATGGTTTTAGTTACCTAGACCATTGTGACCCAGCTTTAATGGAAGCAATTCAACCAATTAAGTGTACTGT
TGATATTGCTCAAATTTCTAGAGAATACTCCTGGGCTCATATTCTTGATGGTAGACAGTTAATAGGGGCAACACTGC
CATGTATACCTGAGCAGTTCCAAACCACATGGTTAAAACCTTACGAGCAATGTGTGGAATGTTTCATCCACAAACAAT
ACTAGTCCATATGTATCAGTTGCATTAAAAAGGAACGTGGTTAGTGCTTGGCCTGATGCATCTAGATTGGGGTGGAC
GATTGGTGATGGGATTCCCTACATAGGCTCAAGAACTGAGGACAAGATAGGTCAGCCCGCTATTAAGCCGAGGTGCC
CATCAGCTGCATTAAAGAGAAGCTATTGAATTGACCTCTAGGTTGACCTGGGTCACCTCAAGGTAGTGCAAACAGCGAT
CAGTTAATTCGCCCTTTTCTTGAGGCAAGAGTAACTTGAGTGTACAAGAGATTCTTCAAATGACCCCCTCACATTA
CTCCGGTAATATTGTGCATCGGTATAATGATCAGTATAGCCCTCACTCCTTTATGGCTAACCGCATGAGTAACACAG
CAACGCGCTTGATGGTATCTACCAACACACTAGGAGAGTTTTCCGGAGGGGGTCAGGCTGCACGTGATAGCAACATT
ATATTTCAAATGTGATTAACTTTGCAGTGGCCTTGATGACATTAGGTTTCGGAACACTGTACATCTTCTATTCA
ATATCACAGGGCCCATATTCACCTGACGAATTGTTGTACGAGGGAAGTACCGGCCAATACTTAACATACACAACCA
CGCTAAATCTAGATTTGAGTAAGTACCGTAATAATGAACTGATTTATGATTCAGAGCCACTAAGAGGAGGTCTCAAC
TGCAACTTATCGATTGACAGTCCCTTGATGAAGGGCCACGTTTAAATATTATTGAGGATGACTTAATACGGTTGCC
ACATTTATCCGGCTGGGAATTAGCAAAAACAGTCTTGCAATCAATAATCTCTGATAGTAGCAATTTCATCAACAGATC
CCATTAGCAGCGGTGAAACAAGATCCTTCACAACCCACTTCTTAACGTATCCCAAAATAGGGCTCCTATACAGTTTT
GGAGCCCTCATAAGTTTTTATTTGGGTAATACTATTCTGTGCACGAAAAGATCGGACTCACAGAATTTCTATACTA
TCTCCAGAATCAGATCCACAACCTTATCACATAGATCCCTTCGAATCTTCAAACCGACATTTAGACACTCAAGTGTC
TGTCCAGGTTGATGGATATAGACCCCACTTCTCAATATATATTGGTGGGACTGCAGGTGACCGTGGATTATCGGAC
GCTGCAAGATTATTTCTCCGAATTGCAATTTCAACTTCTTGAGCTTTGTTGAGGAGTGGGTATCTTTAGGAAGGC
AAACATCCCACTATGGGTATCTATCCTCTCGAAGGCCAACGCCCTGATCCTCCTGGCGAATTTTTGAACCGAGTAA
AATCTCTAATTGTTGGGACTGAAGATGATAAAAAATAAAGGCTCTATACTTTCAAGATCTGGAGAGAAATGCTCTTCA
AATCTAGTTTATAATTGCAAGAGTACAGCAAGCAATTTTTTCCATGCATCATTGGCTTATTGGAGAGGTGACACAG
ACCTAAGAAGACTATAGGTGCAACCAACGCGACAACAGCTCCACACATCATCCTGCCACCAGGAACTCTGATCGAC
CGCCTGGCCTAGACCTTAATAGGAACGATGATACTTTCATTCCCTACCAGAATTAAACAGATAGTCCAAGGAGACTCT
AGAAACGACAGAACGACCACCAGAGATTTCCACCCAAAAGTAGGTCCACTCCAACATCAGCAACCGAGCCTCCTAC
AAAAATGTATGAGGGTTCGACAACCCACCAAGGGAAATTAACAGATACACATTTGGATGAGGATCACAATGCCAAAG

AGTTCCCATCCAATCCGCATCGTTTAGTAGTACCATTCTTTAAATTAACAAAAGATGGGGAATACAGTATCGAACCT
TCTACTGAAGAAAGCCGCAGTAATATAAAAGGGTACTTCAACATTTAAGAACCATGGTTGATACTACCATATATTG
TCGCTTCACTGGAATTGTTTCATCAATGCATTATAAGTTAGATGAAGTACTATGGGAATATAATAAATTTGAATCAG
CTGTAACCCTAGCAGAAGGGGAGGGTTCAGGTGCCTTACTACTGATCCAAAAATACGGCGTTAAGAAGTTATTTTG
AATACACTTGCTACTGAACATAGTATTGAGAGTGAAGTTATATCAGGTTACACCACTCCAAGGATGCTACTCTCAAT
TATGCCTAAAACACATCGTGGTGAGCTAGAGGTCATATTAAATAACTCAGCTAGTCAAATAACTGACATTACACACC
GAGATTGGTTTTCAAATCAAAAAAATAGGATTCCAAATGATGCTGATATTATTACCATGGATGCTGAAACTACAGAA
AACTTAGATCGTTCCAGATTATATGAAGCAGTATATACGATTATTTGTAATCATATCAATCCTAAAACCTTTGAAAGT
GGTCATCTTAAAGTCTTCCTCAGCGATTTGGATGGGATGTGCTGGATTAACAATTATCTTGCTCCTATGTTTGAT
CAGGATATTTAATCAAACCTATAACATCAAGTGCAAAGTCAAGTGAGTGGTATTTATGCTTATCTAATCTACTTTCA
ACCTTGAGAACTACTCAGCATCAAACCCAGGCAAACCTGTCTCCATGTCGTACAATGTGCTCTTCAACAGCAAGTACA
AAGAGGGTCATACTGGCTAAGTCATCTTACCAAATACACCACAAGTAGATTGCACAATAGTTATATCGTATTTGGTT
TTCTTCATTAGAGAAGGTCTATATCATAGGTATAACCTCGTTGATTCGAGAAACGGACCATTAGTTTCTATAACG
AGACACCTTGCCCTCCTCCAACTGAGATCCGGGAGTTGGTAACTGATTATAATCAGCTGCGACAAAGTCGAACCCA
GACTTATCATTTTATAAAAAACATCCAAGGGACGGATAACTAACTAGTGAATGATTATCTAAGATTTGAGTTGGTTA
TACGGGCTCTTAAAAATAATTCTACATGGCACCATGAGTTATACTTGCTACCAGAACTTATAGGTGTTTGCCATCGA
TTTAATCATACACGTAACCTGTACATGCAGTGAAAGGTTCTGGTTCAAACCTTTATATCTACACCGAATGAGTGATGC
TGAGATAAACTTATGGACCGGCTCACCAGCCTAGTCAATATGTTTCTGAAGGTTTCAGGTCTAGTTCAGTCTAAT
TCTAACTGCACCAAAGGCTCTAGAAATATTTTAAATAACCAGGTGTATATCAAAGTCAATACAAGTGTA AAAACAAT
ATGCAAGGGACCACATTTAGGATCAGTTTATTGACTCTTCCAATACACAGAGTTGGAAGCACCGATTCAAGGTTTCT
AAGACGCTCTATCAATTATGTTGATAATGTAAATAATAGCTTTTCTGTCTATTATGACTTAAATAAACATATCTAT
AACGACCATCACAGCTAAGTCGTTGCCCTAGTTCATATATTTAAATTTAAATTTGGAAGCTAGGTTAACTCTAATTAC
ATAAGTATTAAGAAAAAATTACTAAGACTAATACTCTCATGCCAAGAACTAGTAATGTGTTTCACATGACAGATTAT
TTCTAACACTAAATTGCAATTTCAATTTTAAAGCTAAGTTTAAACACCTATACAGCCAAAATATTTCATAGGGCCGAT
GGGAATAACATAAGAGGAACATGATCAATGAACCCTTTATTCCAACCTAGGCAGTTGATTGATAATCTACAAATTTCCA
TAAGATGTTCTTACGATATTCTTTTGTTTTAATCTCAATGTCAATGATTTAATAAGTAATAATAAAAAAATCATAT
TAAAGATGCAGGAAGATCTTGACCTCGCCAGGAAAAATTAAGCGCACACAAATAAATTA AAAAATCTGTATTTTCTCT
TTTTTGTTGTGCC, (SEQ. ID. NO.:2).

SEQ. ID. NO: 3

CATCATCAATAATATACCTTATTTTGGATTGAAGCCAATATGATAATGAGGGGTGGAGTTTGTGACGTGGCG
CGGGGCGTGGGAACGGGGCGGGTGACGTAGTAGTGTGGCGGAAGTGTGATGTTGCAAGTGTGGCGGAACACATGTAA
GCGACGGATGTGGCAAAAGTGACGTTTTTGGTGTGCGCCGGTGTACACAGGAAGTGACAATTTTCGCGCGGTTTTAG
GCGGATGTTGTAGTAAATTTGGGCGTAACCGAGTAAGATTTGGCCATTTTCGCGGGA AAACCTGAATAAGAGGAAGTG
AAATCTGAATAATTTTGTGTTACTCATAGCGGTAATACTGTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGC
CCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATT
GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTAC
GGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAA
TGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAT
CGCTATTACCATGGTGATGCGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGTTTGA CTACGGGGATTTCCAA

GTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGT TTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAAC
TCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCG
TCAGATCCGCTAGAGATCTGGTACCGTCGACGCGGCCGCTCGAGCCTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGT
AACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAAGGTACCCAGAGCAGACAGCCGCCACCATGGAGTCTCCCTCGGCC
CCTCCCCACAGATGGTGCATCCCCTGGCAGAGGCTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCGCCAC
CACTGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCGTTCAATGTCGCAGAGGGGAAGGAGGTGCTTCTACTTGTCCACAATC
TGCCCCAGCATCTTTTTGGCTACAGCTGGTACAAAGGTGAAAGAGTGGATGGCAACCGTCAAATTATAGGATATGTA
ATAGGAACTCAACAAGCTACCCAGGGCCCGCATACAGTGGTTCGAGAGATAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGAT
CCAGAACATCATCCAGAATGACACAGGATTCTACACCCTACACGTCATAAAGTCAGATCTTGTGAATGAAGAAGCAA
CTGGCCAGTTCCGGGTATACCCGGAGCTGCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTCCAAACCCGTGGAGGACAAG
GATGCTGTGGCCTTACCTGTGAACCTGAGACTCAGGACGCAACCTACCTGTGGTGGGTAAACAATCAGAGCCTCCC
GGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCACAAGAAATGACACAGCAA
GCTACAAATGTGAAACCCAGAACCCAGTGAGTGCCAGGCGCAGTGATTCAAGTCATCCTGAATGTCCTCTATGGCCCG
GATGCCCCCACCATTTCCCCTCTAAACACATCTTACAGATCAGGGGAAAATCTGAACCTCTCCTGCCACGCAGCCTC
TAACCCACCTGCACAGTACTCTTGGTTTGTCAATGGGACTTTCCAGCAATCCACCCAAGAGCTCTTTATCCCCAACA
TCACTGTGAATAATAGTGGATCCTATACGTGCCAAGCCCATAACTCAGACACTGGCCTCAATAGGACCACAGTCACG
ACGATCACAGTCTATGCAGAGCCACCCAAACCTTTCATCACCAGCAACAACCTCCAACCCCGTGGAGGATGAGGATGC
TGTAGCCTTAACCTGTGAACCTGAGATTGAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATAATCAGAGCCTCCCGGTCA
GTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGACAACAGGACCCTCACTCTACTCAGTGTCAAGGAATGATGTAGGACCCTAT
GAGTGTGGAATCCAGAACGAATTAAGTGTGACCACAGCGACCCAGTCATCCTGAATGTCCTCTATGGCCAGACGA
CCCCACCATTTCCCCTCATACACCTATTACCGTCCAGGGGTGAACCTCAGCCTCTCCTGCCATGCAGCCTCTAACC
CACCTGCACAGTATTCTTGGCTGATTGATGGGAACATCCAGCAACACACACAAGAGCTCTTTATCTCCAACATCACT
GAGAAGAACAGCGGACTCTATACCTGCCAGGCCAATAACTCAGCCAGTGGCCACAGCAGGACTACAGTCAAGACAAT
CACAGTCTCTGCGGAGCTGCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTCCAAACCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGG
CCTTACCTGTGAACCTGAGGCTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAGAGCCTCCCAGTCAGTCCC
AGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCACAAGAAATGACGCAAGAGCCTATGTATG
TGGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCAAAACGCAGTGACCCAGTCACCTGGATGTCCTCTATGGGCCGGACACCCCCA
TCATTTCCCCCCCAGACTCGTCTTACCTTTTCGGGAGCGGACCTCAACCTCTCCTGCCACTCGGCCTCTAACCCATCC
CCGCAGTATTCTTGGCGTATCAATGGGATACCGCAGCAACACACACAAGTTCTCTTTATCGCCAAAATCACGCCAAA
TAATAACGGGACCTATGCCTGTTTTGTCTCTAACTGGGCTACTGGCCGCAATAATTCCATAGTCAAGAGCATCACAG
TCTCTGCATCTGGAACCTTCTCCTGGTCTCTCAGCTGGGGCCACTGTCGGCATCATGATTGGAGTGTGTTGGGGTT
GCTCTGATATAGCAGCCCTGGTGTAGTTTCTTCATTTACAGGAAGACTGACAGTTGTTTTGCTTCTTCTTAAAGCAT
TTGCAACAGCTACAGTCTAAAATTGCTTCTTTACCAAGGATATTTACAGAAAAGACTCTGACCAGAGATCGAGACCA
TCCTCTAGATAAGATATCCGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTT
ACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGT
TTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCAT
TCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTAACGCGGATCTGGGCGTGGTTAAGGGTGGGAAAGAATATA
TAAGGTGGGGGTCTTATGTAGTTTTGTATCTGTTTTGCAGCAGCCGCCGCCATGAGCACCAACTCGTTTGATGG
AAGCATTGTGAGCTCATATTTGACAACGCGCATGCCCCATGGGCCGGGTGCGTCAGAATGTGATGGGCTCCAGCA

TTGATGGTTCGCCCCGTCCCTGCCCGCAAACCTCTACTACCTTGACCTACGAGACCGTGTCTGGAACGCCGTTGGAGACT
GCAGCCTCCGCCGCCGCTTCAGCCGCTGCAGCCACCGCCCCGCGGATTTGTGACTGACTTTGCTTTCTTGAGCCCCGCT
TGCAAGCAGTGCAGCTTCCCGTTCATCCGCCCGCGATGACAAGTTGACGGCTCTTTTGGCACAATTGGATTCTTTGA
CCCCGGAACCTTAATGTCGTTTCTCAGCAGCTGTTGGATCTGCGCCAGCAGGTTTCTGCCCTGAAGGCTTCCTCCCCCT
CCCAATGCGGTTTAAAAACATAAAATAAAAAACCAGACTCTGTTTGGATTTGGATCAAGCAAGTGTCTTGCTGTCTTTA
TTTAGGGGTTTTTGCGCGCGCGGTAGGCCCGGGACCAGCGGTCTCGGTGCTTGAGGGTCCTGTGTATTTTTTCCAGGA
CGTGGTAAAGGTGACTCTGGATGTTTTCAGATACATGGGCATAAGCCCGTCTCTGGGGTGGAGGTAGCACCAGTGCAG
GCTTCATGCTGCGGGGTGGTGTGTGTAGATGATCCAGTCGTAGCAGGAGCGCTGGGCGTGGTGCCTAAAAATGTCTTT
CAGTAGCAAGCTGATTGCCAGGGGCAGGCCCTTGGTGTAAGTGTTTACAAAGCGGTAAAGCTGGGATGGGTGCATAC
GTGGGGATATGAGATGCATCTTGGACTGTATTTTTAGGTTGGCTATGTTCCAGCCATATCCCTCCGGGGATTTCATG
TTGTGCAGAACACCAGCACAGTGTATCCGGTGCACCTGGGAAATTTGTTCATGTAGCTTAGAAGGAAATGCGTGGAA
GAACTTGAGACGCCCTTGTGACCTCCAAGATTTTCCATGCATTTCGTCCATAATGATGGCAATGGGCCACGGGCGG
CGGCCCTGGGCGAAGATATTTCTGGGATCACTAACGTCATAGTTGTGTTCCAGGATGAGATCGTCATAGGCCATTTTT
ACAAAGCGCGGGCGGAGGGTGCCAGACTGCGGTATAATGGTTCCATCCGGCCCAGGGGCGTAGTTACCTCACAGAT
TTGCATTTCCCACGCTTTGAGTTCAGATGGGGGGATCATGTCTACCTGCGGGGCGATGAAGAAAACGGTTTCCGGGG
TAGGGGAGATCAGCTGGGAAGAAAGCAGGTTCTTGAGCAGCTGCGACTTACCGCAGCCGGTGGGCCCCGTAAATCACA
CCTATTACCGGCTGCAACTGGTAGTTAAGAGAGCTGCAGCTGCCGTTCATCCCTGAGCAGGGGGGCCACTTCGTTAAG
CATGTCCCTGACTCGCATGTTTTCCCTGACCAAATCCGCCAGAAGGCGCTCGCCGCCAGCGATAGCAGTTCTTGCA
AGGAAGCAAAGTTTTTCAACGGTTTGAGACCGTCCGCCGTAGGCATGCTTTTGAGCGTTTGACCAAGCAGTTCCAGG
CGGTCCCACAGCTCGGTACCTGCTCTACGGCATCTCGATCCAGCATATCTCCTCGTTTCGCGGGTTGGGGCGGCTT
TCGCTGTACGGCAGTAGTCGGTGCTCGTCCAGACGGGCCAGGGTCATGTCTTTCCACGGGCGCAGGGTCCCTCGTCAG
CGTAGTCTGGGTACCGGTGAAGGGGTGCGCTCCGGGCTGCGCGCTGGCCAGGGTGCCTTGAGGCTGGTCCCTGCTGG
TGCTGAAGCGCTGCCGGTCTTCGCCCTGCGCGTCCGGCCAGGTAGCATTTGACCATGGTGTTCATAGTCCAGCCCCCTCC
GCGGCGTGGCCCTTGGCGCGCAGCTTGCCCTTGGAGGAGGCGCCGCACGAGGGGCAGTGCAGACTTTTGAGGGCGTA
GAGCTTGGGCGCGAGAAATACCGATTCCGGGGAGTAGGCATCCGCGCCGCAGGCCCCGCAGACGGTCTCGCATTCCA
CGAGCCAGGTGAGCTCTGGCCGTTCCGGGTCAAAAACCAGGTTTCCCCCATGCTTTTTTGATGCGTTTCTTACCTCTG
GTTTCCATGAGCCGGTGTCCACGCTCGGTGACGAAAAGGCTGTCCGTGTCCCCGTATACAGACTTGAGAGGCCTGTCT
CTCGAGCGGTGTTCCGCGGTCCCTCCTCGTATAGAACTCGGACCACTCTGAGACAAAGGCTCGCGTCCAGGCCAGCA
CGAAGGAGGCTAAGTGGGAGGGGTAGCGGTGTTGTCCACTAGGGGGTCCACTCGCTCCAGGGTGTGAAGACACATG
TCGCCCCTCTTCGGCATCAAGGAAGGTGATTGGTTTGTAGGTGTAGGCCACGTGACCGGGTGTTCCTGAAGGGGGGCT
ATAAAAGGGGGTGGGGGCGCGTTCGTCCCTCACTCTCTTCCGCATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGGTGAGT
ACTCCCTCTGAAAAGCGGGCATGACTTCTGCGCTAAGATTGTTCAGTTTCCAAAAACGAGGAGGATTTGATATTACC
TGGCCCGCGGTGATGCCTTTGAGGGTGGCCGCATCCATCTGGTCAGAAAAGACAATCTTTTTGTTGTCAAGCTTGGT
GGCAAACGACCCGTAGAGGGCGTTGGACAGCAACTTGGCGATGGAGCGCAGGGTTTGGTTTTTGTTCGCGATCGGCGC
GCTCCTTGGCCGCGATGTTTAGCTGCACGTATTCGCGCGCAACGCACCGCCATTTCGGAAAGACGGTGGTGCCTCG
TCGGGCACCAGGTGCACGCGCCAACCGCGTTGTGCAGGGTGACAAGGTCAACGCTGGTGGCTACCTCTCCGCGTAG
GCGCTCGTTGGTCCAGCAGAGGCGGCCGCCCTTGCGCGAGCAGAATGGCGGTAGGGGGTCTAGCTGCGTCTCGTCCG
GGGGGTCTGCGTCCACGGTAAAGACCCCGGGCAGCAGGCGCGCGTCAAGTAGTCTATCTTGTCATCCTTGCAAGTCT
AGCGCCTGCTGCCATGCGCGGGCGGCAAGCGCGCGCTCGTATGGGTTGAGTGGGGGACCCCATGGCATGGGGTGGGT

GAGCGCGGAGGCGTACATGCCGCAAATGTCGTAAACGTAGAGGGGCTCTCTGAGTATTCCAAGATATGTAGGGTAGC
ATCTTCCACCGCGGATGCTGGCGGCACGTAATCGTATAGTTTCGTGCGAGGGAGCGAGGAGGTCTGGGACCGAGGTTG
CTACGGGCGGGCTGCTCTGCTCGGAAGACTATCTGCCTGAAGATGGCATGTGAGTTGGATGATATGGTTGGACGCTG
GAAGACGTTGAAGCTGGCGTCTGTGAGACCTACCGCGTCACGCACGAAGGAGGCGTAGGAGTCGCGCAGCTTGTTGA
CCAGCTCGGCGGTGACCTGCACGTCTAGGGCGCAGTAGTCCAGGGTTTCCTTGATGATGTCATACTTATCCTGTCCC
TTTTTTTTCCACAGCTCGCGGTTGAGGACAACTCTTCGCGGTCTTCCAGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGC
CTCCGAACGGTAAGAGCCTAGCATGTAGAAGTGGTTGACGGCCTGGTAGGCGCAGCATCCCTTTTCTACGGGTAGCG
CGTATGCCTGCGCGGCCTTCCGGCATGACCAGCATGAAGGGCACGAGCTGCTTCCCAAAGGCCCCCATCCAAGTATA
GGTCTCTACATCGTAGGTGACAAAGAGACGCTCGGTGCGAGGATGCGAGCCGATCGGGAAGAACTGGATCTCCCGCC
ACCAATTGGAGGAGTGGCTATTGATGTGGTGAAAGTAGAAGTCCCTGCGACGGGCCGAACACTCGTGCTGGCTTTTG
TAAAAACGTGCGCAGTACTGGCAGCGGTGCACGGGCTGTACATCCTGCACGAGTTGACCTGACGACCGCGCACAAG
GAAGCAGAGTGGGAATTTGAGCCCCCTGCCTGGCGGGTTTGGCTGGTGGTCTTCTACTTCGGCTGCTTGTCCTTGAC
CGTCTGGCTGCTCGAGGGGAGTTACGGTGGATCGGACCACCGCCGCGAGCCCAAAGTCCAGATGTCCGCGCGC
GGCGGTGCGAGCTTGATGACAACATCGCGCAGATGGGAGCTGTCCATGGTCTGGAGCTCCCGCGGCGTCAGGTCAGG
CGGGAGCTCCTGCAGGTTTACCTCGCATAGACGGGTCAGGGCGCGGGCTAGATCCAGGTGATACCTAATTTCCAGGG
GCTGGTTGGTGGCGGCGTCGATGGCTTGCAAGAGGCCGCATCCCCGCGGCGGACTACGGTACCGCGCGGCGGGCGG
TGGGCGCGGGGGTGTCTTTGGATGATGCATCTAAAAGCGGTGACGCGGGCGAGCCCCCGAGGTAGGGGGGGCTCC
GGACCCGCGGGGAGAGGGGGCAGGGGCACGTCCGCGCCGCGCGGGCAGGAGCTGGTGCTGCGCGCGTAGGTTGCT
GGCGAACGCGACGACGCGGCGGTTGATCTCCTGAATCTGGCGCCTCTGCGTGAAGACGACGGGCCCGGTGAGCTTGA
ACCTGAAAGAGAGTTCGACAGAATCAATTTCCGTGTCTGTTGACGGCGGCCTGGCGCAAAATCTCCTGCACGTCTCCT
GAGTTGTCTTGATAGGCGATCTCGGCCATGAACTGCTCGATCTCTCCTCCTGGAGATCTCCGCGTCCGGCTCGCTC
CACGGTGGCGGCGAGGTCGTTGAAAATGCGGGCCATGAGCTGCGAGAAGGCGTTGAGGCCTCCCTCGTTCCAGACGC
GGCTGTAGACCACGCCCCCTTCGGCATCGCGGGCGCGCATGACCACCTGCGCGAGATTGAGCTCCACGTGCCGGGCG
AAGACGGCGTAGTTTCGAGGCGCTGAAAGAGGTAGTTGAGGGTGGTGGCGGTGTGTTCTGCCACGAAGAAGTACAT
AACCCAGCGTCGCAACGTGGATTCTGTTGATAATTGTTGTGTAGGTACTCCGCCGCCGAGGGACCTGAGCGAGTCCGC
ATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGAGAAAGGCGTCTAACCAAGTCACAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACCGTGGCGG
GCGGCAGCGGGCGGCGGTGCGGGTTGTTTCTGGCGGAGGTGCTGCTGATGATGTAATTAAAGTAGGCGGTCTTGAGA
CGGCGGATGGTCGACAGAAGCACCATGTCCTTGGGTCCGGCCTGCTGAATGCGCAGGCGGTGCGCCATGCCCCAGGC
TTCGTTTTGACATCGGCGCAGGTCTTTGTAGTAGTCTTGATGAGCCTTTCTACCGGCACTTCTTCTTCTCCTTCTCCT
CTTGCTCTGCATCTCTTGATCTATCGCTGCGGCGGCGGCGGAGTTGGCCGTAGGTGGCGCCCTCTTCTCCTCCATG
CGTGTGACCCCGAAGCCCCTCATCGGCTGAAGCAGGGCTAGGTGCGGACAACGCGCTCGGCTAATATGGCCTGCTG
CACCTGCGTGAGGGTAGACTGGAAGTCATCCATGTCCACAAAGCGGTGGTATGCGCCCGTGTGATGGTGTAAGTGC
AGTTGGCCATAACGGACCAGTTAACGGTCTGGTGACCCGGCTGCGAGAGCTCGGTGTACCTGAGACGCGAGTAAGCC
CTCGAGTCAAATACGTAGTCGTTGCAAGTCCGCACCAGGTACTGGTATCCCAACAAAAGTGCGGCGGCGGCTGGCG
GTAGAGGGGCCAGCGTAGGGTGGCCGGGGCTCCGGGGGCGAGATCTTCCAACATAAGGCGATGATATCCGTAGATGT
ACCTGGACATCCAGGTGATGCCGGCGGCGGTGGTGAGGCGCGCGGAAAGTCGCGGACGCGGTTCCAGATGTTGCGC
AGCGGCAAAAAGTGCTCCATGGTCGGGACGCTCTGGCCGGTCAGGCGCGCGCAATCGTTGACGCTCTAGCGTGCAAA
AGGAGAGCCTGTAAGCGGGCACTCTTCCGTGGTCTGGTGGATAAATTCGCAAGGGTATCATGGCGGACGACCGGGGT
TCGAGCCCCGTATCCGGCCGTCCGCCGTGATCCATGCGGTTACCGCCCGGTGTCGAACCCAGGTGTGCGACGTGAG

ACAACGGGGAGTGCTCCTTTTGGCTTCCTTCCAGGCGGGCGGCTGCTGCGCTAGCTTTTTTGGCCACTGGCCGCG
CGCAGCGTAAGCGTTAGGCTGGAAGCGAAAGCATTAAGTGGCTCGCTCCCTGTAGCCGAGGGTTATTTTCCAAG
GGTTGAGTCGCGGGACCCCCGGTTCGAGTCTCGGACCGGCCGACTGCGGCGAACGGGGGTTTGCTCCCCGTCATG
CAAGACCCCGCTTGCAAATTCCTCCGGAACAGGGACGAGCCCCTTTTTTGCTTTTCCCAGATGCATCCGGTGCTGC
GGCAGATGCGCCCCCTCTCAGCAGCGGCAAGAGCAAGAGCAGCGGCAGACATGCAGGGCACCTCCCCTCCTCCT
ACCGCGTCAGGAGGGGCGACATCCGCGGTTGACGCGGCAGCAGATGGTGATTACGAACCCCGCGGCGCGGGGCCG
GCACTACCTGGACTTGAGAGAGGGCGAGGGCCTGGCGCGGCTAGGAGCGCCCTCTCCTGAGCGGCACCCAAGGTGC
AGCTGAAGCGTGATACGCGTGAGGCGTACGTGCCGCGGCAGAACCTGTTTCGCGACCGCGAGGGAGAGGCCGAG
GAGATGCGGGATCGAAAGTTCCACGCAGGGCGCGAGCTGCGGCATGGCCTGAATCGCGAGCGGTTGCTGCGCGAGGA
GGACTTTGAGCCCGACGCGCGAACCGGGATTAGTCCCGCGCGCGCACACGTGGCGGCCCGACCTGGTAACCGCAT
ACGAGCAGACGGTGAACCAGGAGATTAACCTTTCAAAAAAGCTTTAACAACCACGTGCGTACGCTTGTTGGCGCGCAG
GAGGTGGCTATAGGACTGATGCATCTGTGGGACTTTGTAAGCGCGCTGGAGCAAAACCCAAATAGCAAGCCGCTCAT
GGCGCAGCTGTTCTTATAGTGACGACAGCAGGGACAACGAGGCATTCAGGGATGCGTGCTAAACATAGTAGAGC
CCGAGGGCCGCTGGCTGCTCGATTTGATAAACATCCTGCAGAGCATAGTGGTGCAGGAGCGCAGCTTGAGCCTGGCT
GACAAGGTGGCCGCCATCAACTATTCCATGCTTAGCCTGGGCAAGTTTTACGCCCAGCAAGATATACCATACCCCTTA
CGTTCCCATAGACAAGGAGGTAAAGATCGAGGGGTTCTACATGCGCATGGCGCTGAAGGTGCTTACCTTGAGCGACG
ACCTGGGCGTTTATCGCAACGAGCGCATCCACAAGGCCGTGAGCGTGAGCCGGCGGCGGAGCTCAGCGACCGCGAG
CTGATGCACAGCCTGCAAAGGGCCCTGGCTGGCACGGGCAGCGGCGATAGAGAGGCCGAGTCTACTTTGACGCGGG
CGCTGACCTGCGCTGGGCCCCAAGCCGACGCGCCCTGGAGGCAGCTGGGGCCGACCTGGGCTGGCGGTGGCACCCG
CGCGCGCTGGCAACGTGCGCGCGTGAGGAATATGACGAGGACGATGAGTACGAGCCAGAGGACGGCGAGTACTAA
GCGGTGATGTTTCTGATCAGATGATGCAAGACGCAACGAGCCCGCGGTGCGGGCGGCGCTGCAGAGCCAGCCGTCC
GGCCTTAACCTCCACGGACGACTGGCGCCAGGTCATGGACCGCATCATGTGCTGACTGCGCGCAATCCTGACGCGTT
CCGGCAGCAGCCGAGGCCAACCGGCTCTCCGCAATTCTGGAAGCGGTGGTCCCGGCGCGCGCAAACCCACGCACG
AGAAGGTGCTGGCGATCGTAAACGCGCTGGCCGAAAAACAGGGCCATCCGGCCCGACGAGGCCGGCCTGGTCTACGAC
GCGCTGCTTCAGCGCGTGGCTCGTTACAACAGCGGCAACGTGCAGACCAACCTGGACCGGCTGGTGGGGGATGTGCG
CGAGGCCGTGGCGCAGCGTGAGCGCGCAGCAGGGAACCTGGGCTCCATGGTTGCACTAAACGCCTTCTGTA
GTACACAGCCCGCCAACGTGCCGCGGGACAGGAGGACTACACCAACTTTGTGAGCGCACTGCGGCTAATGGTGACT
GAGACACCGCAAAGTGAGGTGTACCAGTCTGGGCCAGACTATTTTTTCCAGACCAGTAGACAAGGCCTGCAGACCGT
AAACCTGAGCCAGGCTTTCAAAAACTTGACAGGGGCTGTGGGGGTGCGGGCTCCACAGGCGACCGCGCGACCGTGT
CTAGCTTGCTGACGCCCAACTCGCGCCTGTTGCTGCTGCTAATAGCGCCCTTCACGGACAGTGGCAGCGTGTCCCGG
GACACATACCTAGGTCACTTGCTGACACTGTACCGCGAGGCCATAGGTCAGGCGCATGTGGACGAGCATACTTTCCA
GGAGATTACAAGTGTCAGCCGCGCGCTGGGGCAGGAGGACAGGGCAGCCTGGAGGCAACCCTAAACTACCTGCTGA
CCAACCGGCGGCAGAAGATCCCCTCGTTGCACAGTTTAAACAGCGAGGAGGAGCGCATTTTTCGCTACGTGCAGCAG
AGCGTGAGCCTTAACCTGATGCGCGACGGGTAACGCCAGCGTGGCGCTGGACATGACCGCGCGCAACATGGAACC
GGGCATGTATGCCTCAAACCGGCCGTTTATCAACCGCCTAATGGACTACTTGATCGCGCGGCCCGTGAACCCCG
AGTATTTTACCAATGCCATCTTGAACCCGCACTGGCTACCGCCCCCTGGTTTCTACACCGGGGATTTCGAGGTGCCC
GAGGGTAACGATGGATTCTCTGGGACGACATAGACGACAGCGTGTTCCTCCCGCAACCGCAGACCCTGCTAGAGTT
GCAACAGCGCGAGCAGGCAGAGGCGGCGCTGCGAAAGGAAAGCTTCCGAGGCCAAGCAGCTTGTCCGATCTAGGCG
CTGCGGCCCCGCGGTCAGATGCTAGTAGCCCATTTCCAAGCTTGATAGGGTCTCTTACCAGCACTCGCACCAACCCG

CCGCGCTGCTGGGCGAGGAGGAGTACCTAAACAACCTCGCTGCTGCAGCCGCAGCGCGAAAAAACCTGCCTCCGGC
ATTTCCCAACAACGGGATAGAGAGCCTAGTGGAACAAGATGAGTAGATGGAAGACGTACGCGCAGGAGCACAGGGACG
TGCCAGGCCCCGCGCCCGCCACCCGTCGTCAAAGGCACGACCGTCAGCGGGGTCTGGTGTGGGAGGACGATGACTCG
GCAGACGACAGCAGCGTCCTGGATTTGGGAGGGAGTGGCAACCCGTTTGCGCACCTTCGCCCCAGGCTGGGGAGAAT
GTTTTAAAAAAGCATGATGCAAAATAAAAACTCACCAAGGCCATGGCACCGAGCGTTGGTTTTCTTGTAT
TCCCCTTAGTATGCGGCGCGGGCGATGTATGAGGAAGGTCCCTCCCTCCCTACGAGAGTGTGGTGAGCGCGGGCGC
CAGTGGCGGGCGGCGCTGGGTTCTCCCTTCGATGCTCCCTGGACCCGCGTTTGTGCCTCCGCGGTACCTGCGGCCT
ACCGGGGGGAGAAACAGCATCCGTTACTCTGAGTTGGCACCCCTATTTCGACACCACCCGTGTGTACCTGGTGGACAA
CAAGTCAACGGATGTGGCATCCCTGAACTACCAGAACGACCACAGCAACTTCTGACCACGGTCATTCAAAACAATG
ACTACAGCCCGGGGAGGCAAGCACACAGACCATCAATCTTGACGACCGGTTCGCACTGGGGCGGCGACCTGAAAACC
ATCCTGCATACCAACATGCCAAATGTGAACGAGTTCATGTTTACCAATAAGTTTAAGGCGCGGGTGATGGTGTGCGG
CTTGCTACTAAGGACAATCAGGTGGAGCTGAAATACGAGTGGGTGGAGTTCACGCTGCCCCAGGGCAACTACTCCG
AGACCATGACCATAGACCTTATGAACAACGCGATCGTGAGCACTACTTGAAAGTGGGCAGACAGAACGGGGTTCTG
GAAAGCGACATCGGGGTAAAGTTTGACACCCGCAACTTCAGACTGGGGTTTGACCCCGTCACTGGTCTTGTATGCC
TGGGGTATATACAAACGAAGCCTTCCATCCAGACATCATTTTGCTGCCAGGATGCGGGGTGGACTTCACCCACAGCC
GCCTGAGCAACTTGTTGGGCATCCGCAAGCGGCAACCCCTCCAGGAGGGCTTTAGGATCACCTACGATGATCTGGAG
GGTGGTAACATTCCCGCACTGTTGGATGTGGACGCCTACCAGGCGAGCTTGAAAGATGACACCGAACAGGGCGGGGG
TGGCGCAGGCGGCAGCAACAGCAGTGGCAGCGGCGCGAAGAGAACTCCAACGCGGCAGCCGCGGCAATGCAGCCGG
TGGAGGACATGAACGATCATGCCATTTCGCGGCGACACCTTTGCCACACGGGCTGAGGAGAAGCGCGCTGAGGCCGAA
GCAGCGGCCGAAGCTGCCGCCCCCGCTGCGCAACCCGAGGTGAGAAAGCCTCAGAAGAAACCGGTGATCAAACCCCT
GACAGAGGACAGCAAGAAACGCAGTTACAACCTAATAAGCAATGACAGCACCTTCACCCAGTACCGCAGCTGGTACC
TTGCATACAACCTACGGCGACCCTCAGACCGGAATCCGCTCATGGACCCTGCTTTGCACTCCTGACGTAACCTGCGGC
TCGGAGCAGGTCTACTGGTCGTTGCCAGACATGATGCAAGACCCCGTGACCTTCCGCTCCACGCGCCAGATCAGCAA
CTTTCCGGTGGTGGGCGCCGAGCTGTTGCCCGTGCACTCCAAGAGCTTCTACAACGACCAGGCCGTCTACTCCCAAC
TCATCCGCCAGTTTACCTCTCTGACCCACGTGTTCAATCGCTTTCCCGAGAACCAGATTTTGCGCGCCCGCCAGCC
CCCACCATCACCACCGTCAGTGAACACGTTCTGCTCTCACAGATCACGGGACGCTACCGCTGCGCAACAGCATCGG
AGGAGTCCAGCGAGTGACCATTAAGTACGCCAGACGCCGACCTGCCCTACGTTTACAAGGCCCTGGGCATAGTCT
CGCCGCGCTCTATCGAGCCGCACTTTTGTAGCAAGCATGTCCATCCTTATATCGCCAGCAATAACACAGGCTGG
GGCCTGCGCTTCCCAAGCAAGATGTTTGGCGGGGCCAAGAAGCGCTCCGACCAACACCCAGTGCGCGTGCGCGGGCA
CTACCGCGCGCCCTGGGGCGCGCAAAACGCGGCCGCACTGGGCGCACCACCGTCGATGACGCCATCGACGCGGTGG
TGGAGGAGGCGCGCAACTACACGCCCACGCCGCCACCAGTGTCACAGTGGACGCGGCCATTTCAGACCGTGGTGC
GGAGCCCGGCGCTATGCTAAAATGAAGAGACGGCGGAGGCGCGTAGCACGTGCGCACCGCCGCGGACCCGGCACTGC
CGCCCAACGCGCGGCGGCGGCCCTGCTTAACCGCGCACGTGCGACCGGCCGACGGGCGGCCATGCGGGCCGCTCGAA
GGCTGGCCGCGGGTATTGTCACTGTGCCCCCAGGTCCAGGCGACGAGCGGCCGCGCAGCAGCCGCGGCCATTAGT
GCTATGACTCAGGGTCGCAGGGGCAACGTGTATTGGGTGCGGACTCGGTTAGCGGCCTGCGCGTGCCGTGCGCAC
CCGCCCCCGCGCAACTAGATTGCAAGAAAAAATACTTAGACTCGTACTGTTGTATGTATCCAGCGGCGGCGGCGC
GCAACGAAGCTATGTCCAAGCGCAAAATCAAAGAAGAGATGCTCCAGGTCATCGCGCCGAGATCTATGGCCCCCG
AAGAAGGAAGAGCAGGATTACAAGCCCCGAAAGCTAAAGCGGGTCAAAAAGAAAAAGAAAGATGATGATGATGA
TGACGACGAGGTGGAAGTCTGTCACGCTACCGCGCCAGGCGACGGGTACAGTGGAAGGTGACGCGTAAACGTG

TTTTGCGACCCGGCACCACCGTAGTCTTTACGCCCGGTGAGCGCTCCACCCGCACCTACAAGCGCGTGTATGATGAG
GTGTACGGCGACGAGGACCTGCTTGAGCAGGCCAACGAGCGCCTCGGGGAGTTTGCCTACGAAAAGCGGCATAAGGA
CATGCTGGCGTTGCCGCTGGACGAGGGCAACCCAACCTAGCCTAAAGCCCGTAACACTGCAGCAGGTGCTGCCCCG
CGCTTGCAACCGTCCGAAGAAAAGCGCGGCCTAAAGCGCGAGTCTGGTGAAGTGGCACCCACCGTGCAGCTGATGGTA
CCCAAGCGCCAGCGACTGGAAGATGTCTTGGAATAATGACCGTGGAACCTGGGCTGGAGCCCGAGGTCCGCGTGCG
GCCAATCAAGCAGGTGGCGCCGGGACTGGGCGTGACAGCCGTGGACGTTTACATACCCACTACCAGTAGCACCAGTA
TTGCCACCGCCACAGAGGGCATGGAGACACAAACGTCCCCGGTTGCCTCAGCGGTGGCGGATGCCGCGGTGCAGGCG
GTCGCTGCGGCCGCGTCCAAGACCTCTACGGAGGTGCAAACGGACCCGTGGATGTTTCGCGTTTCAGCCCCCGGGCG
CCCCGCGCGTTTCGAGGAAGTACGGCGCCGACGCGCTACTGCCGAATATGCCCTACATCCTTCCATTGCGCCTA
CCCCCGGCTATCGTGGCTACACCTACCGCCCCAGAAGACGAGCAACTACCCGACGCCGAACCACCACTGGAACCCGC
CGCCGCGCGTCCGCGTCCGACGCCGCGTGGCCCCGATTCCGTGCGCAGGGTGGCTCGCGAAGGAGGCAGGACCCT
GGTGTGCCAACAGCGCGCTACCACCCAGCATCGTTTAAAGCCGGTCTTTGTGGTTCTTGAGATATGGCCCTCA
CCTGCGCGCTCCGTTTCCCGGTGCGGGGATTCCGAGGAAGAATGCACCGTAGGAGGGGCATGGCCGGCCACGGCCTG
ACGGGCGGCATGCGTCTGCGCACACCGGCGGCGCGCGTCCGACCGTCGCATGCGCGGCGGTATCCTGCCCCCT
CCTTATTCCACTGATCGCCGCGCGATTGGCGCGTGCCCGGAATTGCATCCGTGGCCTTGAGGCGCAGAGACACT
GATTAATAACAAGTTGCATGTGGAATAATCAATAATAAGTCTGGACTCTACGCTCGCTTGGTCTGTAACTATT
TTGTAGAATGGAAGACATCAACTTTGCGTCTCTGGCCCCGCGACACGGCTCGCGCCCGTTCATGGGAACTGGCAAG
ATATCGGCACCAGCAATATGAGCGGTGGCGCCTTCAGCTGGGGCTCGCTGTGGAGCGGCATTAAAAATTTTCGTTCC
ACCGTTAAGAAGTATGGCAGCAAGGCCTGGAACAGCAGCACAGGCCAGATGCTGAGGGATAAGTTGAAAGAGCAAAA
TTTCCAACAAAAGGTGGTAGATGGCCTGGCCTCTGGCATTAGCGGGGTGGTGGACCTGGCCAACCAGGCAGTGCAAA
ATAAGATTAAACAGTAAGCTTGATCCCCGCCCTCCCGTAGAGGAGCTCCACCGGCCGTGGAGACAGTGTCTCCAGAG
GGGCGTGGCGAAAAGCGTCCGCGCCCCGACAGGGAAGAACTCTGGTGACGCAAATAGACGAGCCTCCCTCGTACGA
GGAGGCACTAAAGCAAGGCCTGCCCACCACCCGTCCCATCGCGCCCATGGCTACCGAGTGTGGGCCAGCACACAC
CCGTAACGCTGGACCTGCCTCCCCCGCCGACCCAGCAGAAACCTGTGCTGCCAGGCCCGACCGCGTTGTTGTA
ACCCGTCTAGCCGCGCGTCCCTGCGCCGCGCCGAGCGGTCCGCGATCGTTGCGGCCCGTAGCCAGTGGCAACTG
GCAAAGCACACTGAACAGCATCGTGGGTCTGGGGGTGCAATCCCTGAAGCGCCGACGATGCTTCTGATAGCTAACGT
GTCGTATGTGTGTCATGTATGCGTCCATGTGCGCGCCAGAGGAGCTGCTGAGCCGCCGCGCGCCCGCTTTCCAAGAT
GGCTACCCCTTCGATGATGCCGAGTGGTCTTACATGCACATCTCGGGCCAGGACGCCTCGGAGTACCTGAGCCCCG
GGCTGGTGCAGTTTGCCCGCGCCACCGAGACGTACTTCAGCCTGAATAACAAGTTTAGAAAACCCACGGTGGCGCCT
ACGCACGACGTGACCACAGACCGGTCCAGCGTTTGACGCTGCGGTTTCATCCCTGTGGACCGTGAGGATACTGCGTA
CTCGTACAAGGCGCGGTTACCCCTAGCTGTGGGTGATAACCGTGTGCTGGACATGGCTTCCACGTACTTTGACATCC
GCGGCGTGCTGGACAGGGGCCCTACTTTTAAGCCCTACTCTGGCACTGCCTACAACGCCCTGGCTCCCAAGGGTGCC
CCAAATCCTTGCGAATGGGATGAAGCTGCTACTGCTCTTGAAATAAACCTAGAAGAAGAGGACGATGACAACGAAGA
CGAAGTAGACGAGCAAGCTGAGCAGCAAAAACTCACGTATTTGGGCAGGCGCCTTATTCTGGTATAAATATTACAA
AGGAGGGTATTCAAATAGGTGTGAAGGTCAAAACCTAAATATGCCGATAAAACATTTCAACCTGAACCTCAAATA
GGAGAATCTCAGTGGTACGAAACAGAAATTAATCATGCAGCTGGGAGAGTCCATAAAAAAGACTACCCCAATGAAACC
ATGTTACGGTTCATATGCAAAACCCACAAATGAAAATGGAGGGCAAGGCATTCTTGTAAGCAACAAAATGGAAAGC
TAGAAAGTCAAGTGGAATGCAATTTTTCTCAACTACTGAGGCAGCCGAGGCAATGGTGATAACTTGACTCCTAAA
GTGGTATTGTACAGTGAAGATGTAGATATAGAAACCCAGACACTCATATTTCTTACATGCCCACTATTAAGGAAGG

TAAC TCACGAGAACTAATGGGCCAACAACTCTATGCCCAACAGGCCTAATTACATTGCTTTTAGGGACAATTTTATTG
GTCTAATGTATTACAACAGCACGGGTAAATATGGGTGTTCTGGCGGGCCAAGCATCGCAGTTGAATGCTGTTGTAGAT
TTGCAAGACAGAAACACAGAGCTTTCATACCAGCTTTTGCTTGATTCCATTGGTGATAGAACCAGGTACTTTTCTAT
GTGGAATCAGGCTGTTGACAGCTATGATCCAGATGTTAGAAATTATTGAAAATCATGGAAGTGAAGATGAAGTCCAA
ATTACTGCTTTCCACTGGGAGGTGTGATTAATACAGAGACTCTTACCAAGGTAAAACCTAAAACAGGTGAGGAAAAT
GGATGGGAAAAAGATGCTACAGAATTTTCAGATAAAAAATGAAATAAGAGTTGGAAATAATTTTGCCATGGAAATCAA
TCTAAATGCCAACCTGTGGAGAAATTTCTGTACTCCAACATAGCGCTGTATTTGCCCGACAAGCTAAAGTACAGTC
CTTCCAACGTAAAAATTTCTGATAACCCAAACACCTACGACTACATGAACAAGCGAGTGGTGGCTCCCGGGCTAGTG
GACTGCTACATTAACCTTGAGACAGCTGGTCCCTTGACTATATGGACAACGTCAACCCATTTAACCACCACCGCAA
TGCTGGCCTGCGCTACCGCTCAATGTTGCTGGGCAATGGTCGCTATGTGCCCTTCCACATCCAGGTGCCTCAGAAGT
TCTTTGCCATTAAAAAACCTCCTTCTCCTGCCGGGCTCATACACCTACGAGTGGAAGTTCAGGAAGGATGTTAACATG
GTTCTGCAGAGCTCCCTAGGAAATGACCTAAGGGTTGACGGAGCCAGCATTAAGTTTGATAGCATTTCCTTTACGC
CACCTTCTTCCCCATGGCCCAACACCGCCTCCACGCTTGAGGCCATGCTTAGAAACGACACCAACGACCAGTCCT
TTAACGACTATCTCTCCGCCGCCAACATGCTCTACCCTATACCCGCCAACGCTACCAACGTGCCCATATCCATCCCC
TCCCGCAACTGGGCGGCTTTCCGCGGCTGGGCCTTCACGCGCCTTAAGACTAAGGAAACCCCATCACTGGGCTCGGG
CTACGACCCTTATTACACCTACTCTGGCTCTATACCCTACCTAGATGGAACCTTTTACCTCAACCACACCTTTAAGA
AGGTGGCCATTACCTTTGACTCTTCTGTCAGCTGGCCTGGCAATGACCGCCTGCTTACCCCAACGAGTTTGAAATT
AAGCGCTCAGTTGACGGGGAGGGTTACAACGTTGCCAGTGTAACATGACCAAAGACTGGTTCCTGGTACAAATGCT
AGCTAACTATAACATTGGCTACCAGGGCTTCTATATCCCAGAGAGCTACAAGGACCGCATGTACTCCTTCTTTAGAA
ACTTCCAGCCCATGAGCCGTCAGGTGGTGGATGATACTAAATACAAGGACTACCAACAGGTGGGCATCCTACACCAA
CACAACAACCTCTGGATTTGTTGGCTACCTTGCCCCACCATGCGCGAAGGACAGGCCTACCCTGCTAACTTCCCCTA
TCCGCTTATAGGCAAGACCGCAGTTGACAGCATTACCCAGAAAAAGTTTCTTTGCGATCGCACCTTTGGCGCATCC
CATTCTCCAGTAACCTTTATGTCCATGGGCGCACTCACAGACCTGGGCCAAAACCTTCTCTACGCCAACTCCGCCCAC
GCGCTAGACATGACTTTTGAGGTGGATCCCATGGACGAGCCCACCCTTCTTTATGTTTTGTTTGAAGTCTTTGACGT
GGTCCGTGTGCACCAGCCGACCGCGGCGTCATCGAAACCGTGTACCTGCGCACGCCCTTCTCGGCCGGCAACGCCA
CAACATAAAGAAGCAAGCAACATCAACAACAGCTGCCGCCATGGGCTCCAGTGAGCAGGAAGTGAAGCCATTGTCA
AAGATCTTGTTGTGGGCCATATTTTTTGGGCACCTATGACAAGCGCTTTCAGGCTTTGTTTCTCCACACAAGCTC
GCCTGCGCCATAGTCAATACGGCCGGTCGCGAGACTGGGGGCGTACACTGGATGGCCTTTGCCTGGAACCCGCACTC
AAAAACATGCTACCTCTTTGAGCCCTTTGGCTTTTCTGACCAGCGACTCAAGCAGGTTTACCAGTTTGAGTACGAGT
CACTCCTGCGCCGTAGCGCCATTGCTTCTTCCCCGACCGCTGTATAACGCTGGAAAAGTCCACCCAAAGCGTACAG
GGGCCCAACTCGGCCGCTGTGGACTATTCTGCTGCATGTTTCTCCACGCTTTGCCAACTGGCCCCAACTCCCAT
GGATCACAACCCCAACCATGAACCTTATTACCGGGGTACCCAACTCCATGCTCAACAGTCCCCAGGTACAGCCCACCC
TGCGTCGCAACCAGGAACAGCTCTACAGCTTCTGGAGCGCCACTCGCCCTACTTCCGCAGCCACAGTGCGCAGATT
AGGAGCGCCACTTCTTTTTGTCACTTGAAAAACATGTAAAAATAATGTACTAGAGACACTTTCAATAAAGGCAAATG
CTTTTATTTGTACACTCTCGGGTGATTATTTACCCCCACCCTTGCCGCTGCGCCGTTTAAAAATCAAAGGGGTTCT
GCCGCGCATCGCTATGCGCCACTGGCAGGGACAGCTTGCGATACTGGTGTGTTAGTGCTCCACTTAAACTCAGGCACA
ACCATCCGCGGCAGCTCGGTGAAGTTTTCACTCCACAGGCTGCGCACCATCACCACGCGTTTAGCAGGTGCGGCGC
CGATATCTTGAAGTCGAGTTGGGGCCTCCGCCCTGCGCGCGGAGTTGCGATACACAGGGTTGCAGCACTGGAACA
CTATCAGCGCCGGGTGGTGACGCTGGCCAGCACGCTCTGTGCGAGATCAGATCCGCGTCCAGGTCTCCGCGTTG

CTCAGGGCGAACGGAGTCAACTTTGGTAGCTGCCTTCCCAAAAAGGGCGCGTGCCCAGGCTTTGAGTTGCACTCGCA
CCGTAGTGGCATCAAAAAGGTGACCGTGCCCGGTCTGGGCGTTAGGATACAGCGCCTGCATAAAAGCCTTGATCTGCT
TAAAAGCCACCTGAGCCTTTGCGCCTTCAGAGAAGAACATGCCGCAAGACTTGCCGAAAACCTGATTGGCCGGACAG
GCCGCGTCGTGCACGCAGCACCTTGCGTCGGTGTGGAGATCTGCACCACATTTCCGGCCCCACCGGTTCTTCACGAT
CTTGGCCTTGCTAGACTGCTCCTTCAGCGCGCGCTGCCCGTTTTCGCTCGTCACATCCATTTCAATCACGTGCTCCT
TATTTATCATAATGCTTCCGTGTAGACACTTAAGCTCGCCTTCGATCTCAGCGCAGCGGTGCAGCCACAACGCGCAG
CCCGTGGGCTCGTGATGCTTGTAGGTCACCTCTGCAAACGACTGCAGGTACGCCTGCAGGAATCGCCCCATCATCGT
CACAAAGGTCTTGTGCTGGTGAAGGTGAGCTGCAACCCGCGGTGCTCCTCGTTCAGCCAGGTCTTGCATACGGCCG
CCAGAGCTTCCACTTGGTCAGGCAGTAGTTTGAAGTTCGCCTTTAGATCGTTATCCACGTGGTACTTGTCCATCAGC
GCGCGCGCAGCCTCCATGCCCTTCTCCACGCAGACACGATCGGCACACTCAGCGGGTTCATCACCGTAATTTCACT
TTCCGCTTCGCTGGGCTCTTCTCTTCTTCTTGCGTCCGCATACCACGCGCCACTGGGTGCTCTTCATTACGCCGCC
GCACTGTGCGCTTACCTCCTTTGCCATGCTTGATTAGCACCGGTGGGTGCTGAAACCCACCATTTGTAGCGCCACA
TCTTCTCTTTCTTCTCGCTGTCCACGATTACCTCTGGTGATGGCGGGCGCTCGGGCTTGGGAGAAGGGCGCTTCTT
TTTCTTCTTGGGCGCAATGGCCAAATCCGCCGCCGAGGTGATGGCCGCGGGCTGGGTGTGCGCGGCACCAGCGCGT
CTTGATGAGTCTTCTCGTCTCGGACTCGATACGCCGCTCATCCGCTTTTTTGGGGGCGCCCGGGGAGGCGGC
GGCGACGGGGACGGGGACGACACGTCTCCATGGTTGGGGGACGTGCGCGCCGACCGCGTCCGCGCTCGGGGGTGGT
TTCGCGCTGCTCCTCTTCCCGACTGGCCATTTCTTCTCTCTATAGGCAGAAAAAGATCATGGAGTCAGTCGAGAAGA
AGGACAGCCTAACCGCCCCCTCTGAGTTCCGCCACCACCGCTCCACCGATGCCGCCAACGCGCCTACCACCTTCCCC
GTGAGGACCCCCGCTTGAGGAGGAGGAAGTGATTATCGAGCAGGACCCAGGTTTTGTAAAGCGAAGACGACGAGGA
CCGCTCAGTACCAACAGAGGATAAAAAGCAAGACCAGGACAACGCAGAGGCAAACGAGGAACAAGTCGGGCGGGGG
ACGAAAGGCATGGCGACTACCTAGATGTGGGAGACGACGTGCTGTTGAAGCATCTGCAGCGCCAGTGCGCCATTATC
TGCGACGCGTTGCAAGAGCGCAGCGATGTGCCCTCGCCATAGCGGATGTCAGCCTTGCTACGAACGCCACCTATT
CTCACCGCGGTACCCCCCAAACGCCAAGAAAAACGGCACATGCGAGCCCAACCGCGCCTCAACTTCTACCCGTAT
TTGCCGTGCCAGAGGTGCTTGCCACCTATCACATCTTTTTCCAAAACCTGCAAGATACCCCTATCCTGCCGTGCCAAC
CGCAGCCGAGCGGACAAGCAGCTGGCCTTGCGGCAGGGCGCTGTACACCTGATATCGCCTCGCTCAACGAAGTGCC
AAAAATCTTTGAGGGTCTTGACGCGACGAGAAGCGCGCGGCAAACGCTCTGCAACAGGAAAACAGCGAAAATGAAA
GTCACTCTGGAGTGTTGGTGGAACTCGAGGGTGACAACGCGCGCCTAGCCGTAATAAACGCAGCATCGAGGTACCC
CACTTTGCCTACCCGGCACTTAACCTACCCCCCAAGTTCATGAGCACAGTCATGAGTGAGCTGATCGTGCGCCGTGC
GCAGCCCCTGGAGAGGGATGCAAATTTGCAAGAACAAACAGAGGAGGGCCTACCCGCAGTTGGCGACGAGCAGCTAG
CGCGCTGGCTTCAAACGCGCGAGCCTGCCGACTTGAGGAGCGACGAACTAATGATGGCCGAGTGCTCGTTACC
GTGGAGCTTGAGTGATGCAGCGGTTCTTTGCTGACCCGGAGATGCAGCGCAAGCTAGAGGAAACATTGCACTACAC
CTTTCGACAGGGCTACGTACGCCAGGCCTGCAAGATCTCCAACGTGGAGCTCTGCAACCTGGTCTCCTACCTTGAA
TTTTGCACGAAAACCGCCTTGGGCAAAACGTGCTTCATTCCACGCTCAAGGGCGAGGCGCGCCGCGACTACGTCCGC
GACTGCGTTTACTTATTTCTATGCTACACCTGGCAGACGGCCATGGGCGTTTGGCAGCAGTGCTTGGAGGAGTGCAA
CCTCAAGGAGCTGCAGAACTGCTAAAGCAAAAACCTGAAGGACCTATGGACGGCCTTCAACGAGCGCTCCGTGGCCG
CGCACCTGGCGGACATCATTTTCCCGAACGCTGCTTAAACCCCTGCAACAGGGTCTGCCAGACTTACCAGTCAA
AGCATGTTGCAGAACTTTAGGAACTTTATCCTAGAGCGCTCAGGAATCTTGCCCGCCACCTGCTGTGCACTTCCTAG
CGACTTTGTGCCATTAAGTACCGGAATGCCCTCCGCCGCTTGGGGCCACTGCTACCTTCTGCAGCTAGCCAAC
ACCTTGCTTACCACTCTGACATAATGGAAGACGTGAGCGGTGACGGTCTACTGGAGTGTCAGTGCTGCAACCTA

TGCACCCCGCACCGCTCCCTGGTTTGCAATTCGCAGCTGCTTAACGAAAGTCAAATTATCGGTACCTTTGAGCTGCA
GGGTCCCTCGCCTGACGAAAAGTCCGCGGCTCCGGGTTGAACTCACTCCGGGGCTGTGGACGTGGGCTTACCTTC
GCAAATTTGTACCTGAGGACTACCACGCCACGAGATTAGGTTCTACGAAGACCAATCCCGCCCGCCTAATGCGGAG
CTTACCGCTGCGTCATTACCCAGGGCCACATTCTTGGCCAATTGCAAGCCATCAACAAAGCCCGCCAAGAGTTTCT
GCTACGAAAGGGACGGGGGTTTACTTGGACCCCCAGTCCGGCGAGGAGCTCAACCCAATCCCCCGCCGCGCAGC
CCTATCAGCAGCAGCCGCGGGCCCTTGCTTCCCAGGATGGCACCACAAAAGAAGCTGCAGCTGCCGCGCCACCCAC
GGACGAGGAGGAATACTGGGACAGTCAGGCAGAGGAGGTTTTGGACGAGGAGGAGGAGGACATGATGGAAGACTGGG
AGAGCCTAGACGAGGAAGCTTCCGAGGTGCAAGAGGTGTCAGACGAAACACCGTCACCCTCGGTGCGATTCCCCTCG
CCGGCGCCCCAGAAATCGGCAACCGGTTCCAGCATGGCTACAACCTCCGCTCCTCAGGCGCCGCGGCACTGCCCGT
TCGCCGACCCAACCGTAGATGGGACACCACTGGAACCAGGGCCGGTAAGTCCAAGCAGCCGCGCCGTTAGCCCAAG
AGCAACAACAGCGCCAAGGCTACCGCTCATGGCGCGGGCACAAGAACGCCATAGTTGCTTGCTTGCAAGACTGTGGG
GGCAACATCTCCTTCGCCGCGGCTTTCTTCTCTACCATCACGGCGTGGCCTTCCCCCGTAACATCCTGCATTACTA
CCGTCTCTCTACAGCCATACTGCACCGGCGGCAGCGGCAGCAACAGCAGCGGCCACACAGAAGCAAAGGCGACCG
GATAGCAAGACTCTGACAAAGCCCAAGAAATCCACAGCGGCGGCAGCAGCAGGAGGAGGAGCGCTGCGTCTGGCGCC
CAACGAACCCGTATCGACCCGCGAGCTTAGAAACAGGATTTTTCCCCTCTGTATGCTATATTTCAACAGAGCAGGG
GCCAAGAACAAGAGCTGAAAATAAAAAACAGGTCTCTGCGATCCCTCACCCGCGAGCTGCCTGTATCACAAAAGCGAA
GATCAGCTTCGGCGCAGCTGGAAGACGCGGAGGCTCTCTCAGTAAATACTGCGCGCTGACTCTTAAGGACTAGTT
TCGCGCCCTTTCTCAAATTTAAGCGCGAAAACTACGTCATCTCCAGCGGCCACACCCGCGCCAGCACCTGTTGTCA
GCGCCATTATGAGCAAGGAAATTTCCACGCCCTACATGTGGAGTTACCAGCCACAAATGGGACTTGCGGCTGGAGCT
GCCAAGACTACTCAACCCGAATAAACTACATGAGCGCGGGACCCACATGATATCCCGGGTCAACGGAATACGCGC
CCACCGAAACCGAATTCTCCTGGAACAGGCGGCTATTACCACCACACCTCGTAATAACCTTAATCCCCGTAGTTGGC
CCGCTGCCCTGGTGTACCAGGAAAGTCCCGCTCCCACCACTGTGGTACTTCCCAGAGACGCCAGGCCGAAGTTCAG
ATGACTAACTCAGGGGCGCAGCTTGCGGGCGGCTTTCGTCACAGGTGCGGTGCGCCGGGAGGGTATAACTCACCT
GACAATCAGAGGGCGAGGTATTGAGCTCAACGACGAGTCGGTGAGCTCCTCGCTTGGTCTCCGTCCGGACGGGACAT
TTCAGATCGGCGGCGCCGGCCGCTCTTCATTACGCCCTCGTCAGGCAATCCTAACTCTGCAGACCTCGTCCTCTGAG
CCGCGCTCTGGAGGCATTGGAACCTTGCAATTTATTGAGGAGTTTGTGCCATCGGTCTACTTTAACCCTTCTCGGG
ACCTCCCGGCCACTATCCGGATCAATTTATTCTAACTTTGACGCGGTAAAGGACTCGGCGGACGGCTACGACTGAA
TGTTAAGTGAGAGGCAGAGCAACTGCGCCTGAAACACCTGGTCCACTGTGCGCGCCACAAGTGCTTTGCCGCGAC
TCCGGTGAGTTTTGCTACTTTGAATTGCCCGAGGATCATATCGAGGGCCCGCGCACGGCGTCCGGCTTACCGCCCA
GGGAGAGCTTGCCGTAGCCTGATTCGGGAGTTTACCAGCGCCCCCTGCTAGTTGAGCGGGACAGGGGACCCTGTG
TTCTCACTGTGATTTGCAACTGTCCTAACCTGGATTACATCAAGATCCTCTAGTTAATGTCAGGTGCGCTAAGTCG
ATTAAGTAGAGTACCCGGGGATCTTATTCCCTTTAACTAATAAAAAAATAATAAAGCATCACTTACTTAAATCA
GTTAGCAAATTTCTGTCCAGTTTATTGAGCAGCACCTCCTTGCCCTCCTCCCAGCTCTGGTATTGCAGCTTCCTCCT
GGCTGCAAATTTCTCCACAATCTAAATGGAATGTCAGTTTCCTCCTGTTCCTGTCCATCCGCACCCACTATCTTCA
TGTTGTTGCAGATGAAGCGCGCAAGACCGTCTGAAGATACCTTCAACCCCGTGTATCCATATGACACGGAACCGGT
CCTCCAAGTGTGCCTTTTCTTACTCCTCCCTTTGTATCCCCCAATGGGTTTCAAGAGAGTCCCCCTGGGGTACTCTC
TTTGCGCCTATCCGAACCTCTAGTTACCTCCAATGGCATGCTTGCGCTCAAAATGGGCAACGGCCTCTCTCTGGACG
AGGCCGGCAACCTTACCTCCCCAAATGTAACCACTGTGAGCCCACCTCTCAAAAAACCAAGTCAAACATAAACCTG
GAAATATCTGCACCCCTCACAGTTACCTCAGAAGCCCTAACTGTGGCTGCCGCGCACCTCTAATGGTTCGCGGGCAA

CACACTCACCATGCAATCACAGGCCCCGCTAACCGTGACGACTCCAACTTAGCATTGCCACCCAAGGACCCCTCA
CAGTGTGAGAAGGAAAGCTAGCCCTGCAAACATCAGGCCCCCTCACCACCACCGATAGCAGTACCCTTACTATCACT
GCCTCACCCCTCTAACTACTGCCACTGGTAGCTTGGGCATTGACTTGAAAGAGCCCATTATACACAAAATGGAAA
ACTAGGACTAAAGTACGGGGCTCCTTTGCATGTAACAGACGACCTAAACACTTTGACCGTAGCAACTGGTCCAGGTG
TGACTATTAATAATACTTCCTTGCAAACATAAGTTACTGGAGCCTTGGGTTTTGATTACAAAGGCAATATGCAACTT
AATGTAGCAGGAGGACTAAGGATTGATTCTCAAAACAGACGCCTTATACTTGATGTTAGTTATCCGTTTGATGCTCA
AAACCAACTAAATCTAAGACTAGGACAGGGCCCTCTTTTATAAACTCAGCCCACAACCTGGATATTAATAACA
AAGGCCTTTACTTGTTTACAGCTTCAAAACAATTCAAAAAGCTTGAGGTAAACCTAAGCACTGCCAAGGGGTTGATG
TTTGACGCTACAGCCATAGCCATTAATGCAGGAGATGGGCTTGAATTTGGTTTACCTAATGCACCAAACACAAATCC
CCTCAAAACAAAAATTGGCCATGGCCTAGAAATTTGATTCAAAACAAGGCTATGGTTCCTAACTAGGAAGTGGCCTTA
GTTTTGACAGCACAGGTGCCATTACAGTAGGAAACAAAAATAATGATAAGCTAACTTTGTGGACCACACCAGCTCCA
TCTCCTAACTGTAGACTAAATGCAGAGAAAGATGCTAACTCACTTTGGTCTTAACAAAATGTGGCAGTCAAATACT
TGCTACAGTTTTAGTTTTGGCTGTTAAAGGCAGTTGGCTCCAATATCTGGAACAGTTCAAAGTGCTCATCTTATTA
TAAGATTTGACGAAAATGGAGTGCTACTAAACAATTCCTTCCTGGACCCAGAATATTGGAACCTTAGAAATGGAGAT
CTTACTGAAGGCACAGCCTATACAAACGCTGTTGGATTTATGCCTAACCTATCAGCTTATCCAAAATCTCAGGTAA
AACTGCCAAAAGTAACATTGTCAGTCAAGTTTACTTAAACGGAGACAAAACCTAAACCTGTAACACTAACCATTACAC
TAAACGGTACACAGGAAACAGGAGACACAACCTCAAGTGCATACTCTATGTCATTTTCATGGGACTGGTCTGGCCAC
AACTACATTAATGAAATATTTGCCACATCCTCTTACACTTTTTCATACATTGCCCAAGAATAAAGAATCGTTTGTGT
TATGTTTTCAACGTGTTTTATTTTTCAATTGCAGAAAATTTCAAGTCATTTTTTCATTAGTAGTATAGCCCCACCACCA
CATAGCTTATACAGATCACCGTACCTTAATCAAACTCACAGAACCTAGTATTCAACCTGCCACCTCCCTCCCAACA
CACAGAGTACACAGTCCCTTCTCCCCGGCTGGCCTTAAAAAGCATCATATCATGGGTAACAGACATATTCTTAGGTG
TTATATTCCACACGGTTTCCTGTGAGCCAAACGCTCATCAGTGATATTAATAAACTCCCCGGGCAGCTCACTTAAG
TTCATGTGCTGTCCAGCTGCTGAGCCACAGGCTGCTGTCCAACCTTGCGGTTGCTTAACGGGCGGCGAAGGAGAAGT
CCACGCCTACATGGGGGTAGAGTCATAATCGTGCATCAGGATAGGGCGGTGGTGTGCTGCAGCAGCGCGGAATAAACT
GCTGCCGCCGCCGCTCCGTCTGCAGGAATACAACATGGCAGTGGTCTCCTCAGCGATGATTCGCACCGCCCGCAGC
ATAAGGCGCCTTGTCTCCGGGCACAGCAGCGCACCCCTGATCTCACTTAAATCAGCACAGTAACTGCAGCACAGCAC
CACAATATTGTTCAAAATCCCACAGTGCAAGGCGCTGTATCCAAAGCTCATGGCGGGGACCACAGAACCCACGTGGC
CATCATACCACAAGCGCAGGTAGATTAAGTGGCGACCCCTCATAAACACGCTGGACATAAACATTACCTCTTTTGGC
ATGTTGTAATTCACCACCTCCCGGTACCATATAAACCTCTGATTAAACATGGCGCCATCCACCACCATCCTAAACCA
GCTGGCCAAAACCTGCCCGCGGCTATACACTGCAGGGAACCGGGACTGGAACAATGACAGTGAGAGCCCAGGACT
CGTAACCATGGATCATCATGCTCGTCATGATATCAATGTTGGCACAACACAGGCACACGTGCATACACTTCCTCAGG
ATTACAAGCTCCTCCCGGTTAGAACCATATCCAGGGAACAACCCATTCTGAATCAGCGTAAATCCACACTGCA
GGGAAGACCTCGCACGTAACCTCACGTTGTGCATTGTCAAAGTGTTACATTCGGGCAGCAGCGGATGATCCTCCAGTA
TGGTAGCGCGGGTTTTCTGTCTCAAAGGAGGTAGACGATCCCTACTGTACGGAGTGCGCCGAGACAACCGAGATCGT
GTTGGTGTAGTGTGTCATGCCAAATGGAACGCCGGACGTAGTCATATTTCTGAAGCAAAACCAGGTGCGGGCGTGAC
AAACAGATCTGCGTCTCCGGTCTCGCCGCTTAGATCGCTCTGTGTAGTAGTTGTAGTATATCCACTCTCTCAAAGCA
TCCAGGCGCCCCCTGGCTTCGGGTTCTATGTAACTCCTTCATGCGCCGCTGCCCTGATAACATCCACCACCGCAGA
ATAAGCCACACCCAGCCAACCTACACATTGTTCTGCGAGTCACACACGGGAGGAGCGGAAGAGCTGGAAGAACCA
TGTTTTTTTTTTTTATTCCAAAAGATTATCCAAAACCTCAAAATGAAGATCTATTAAGTGAACGCGCTCCCCTCCGGT

GGCGTGGTCAAACCTCTACAGCCAAAGAACAGATAATGGCATTGTGTAAGATGTTGCACAATGGCTTCCAAAAGGCAAA
CGGCCCTCACGTCCAAGTGGACGTAAAGGCTAAACCCCTCAGGGTGAATCTCCTCTATAAACATTCCAGCACCTTCA
ACCATGCCCAAATAATTCTCATCTCGCCACCTTCTCAATATATCTCTAAGCAAATCCCGAATATTAAGTCCGGCCAT
TGTA AAAAATCTGCTCCAGAGCGCCCTCCACCTTCAGCCTCAAGCAGCGAATCATGATTGCAAAAATTTCAGGTTCCCTC
ACAGACCTGTATAAGATTCAAAAAGCGGAACATTAACAAAAATACCGCGATCCCGTAGGTCCCTTCGCAGGGCCAGCT
GAACATAATCGTGCAGGTCTGCACGGACCAGCGCGGCCACTTCCCCGCCAGGAACCATGACAAAAGAACCCCACTG
ATTATGACACGCATACTCGGAGCTATGCTAACCAGCGTAGCCCCGATGTAAGCTTGTGTCATGGGCGGCGATATAAA
ATGCAAGGTGCTGCTCAAAAAATCAGGC AAAAGCCTCGCGCAAAAAAGAAAGCACATCGTAGTCATGCTCATGCAGAT
AAAGGCAGGTAAGCTCCGGAACCACCACAGAAAAAGACACCATTTTTCTCTCAAACATGTCTGCGGTTTTCTGCATA
AACACAAAATAAAATAACAAAAAACATTTAAACATTAGAAGCCTGTCTTACAACAGGAAAAACAACCCTTATAAGC
ATAAGACGGACTACGGCCATGCCGGCGTGACCGTAAAAAACTGGTCACCGTGATTAAAAAGCACCACCGACAGCTC
CTCGGT CATGTCCGGAGTCATAATGTAAGACTCGGTAAACACATCAGGTTGATTCACATCGGT CAGTGCTAAAAAGC
GACCGAAATAGCCCGGGGAATACATACCCG CAGGCGTAGAGACAACATTACAGCCCCATAGGAGGTATAACAAAA
TTAATAGGAGAGAAAAACACATAAACACCTGAAAAACCCTCCTGCCTAGGCAAAATAGCACCTCCCGCTCCAGAAC
AACATACAGCGCTTCCACAGCGGCAGCCATAACAGTCAGCCTTACCAGTAAAAAAGAAAACCTATTA AAAAAACACC
ACTCGACACGGCACCAGCTCAATCAGTCACAGTGTA AAAAAGGGCCAAGTGCAGAGCGAGTATATATAGGACTAAAA
AATGACGTAACGGTTAAAGTCCACAAAAAACCCAGAAAACCGCACGCGAACCTACGCCCAGAAACGAAAGCCAAA
AAACCCACA ACTTCTCAAATCGTCACTTCCGTTTTCCACGTTACGTC ACTTCCCATTTTAAGAAA ACTACAATTC
CCAACACATACAAGTTACTCCGCCCTAAAACCTACGTCACCCGCCCGTCCCACGCCCCGCGCCACGTCACAACT
CCACCCCTCATTATCATATTGGCTTCAATCCAAAATAAGGTATATTATTGATGAT (SEQ. ID. NO:3) .

SEQ. ID. NO: 4

CGGACACACAAAAAGAAAGAGGTTTTTTGATCTTTATTGTGTGCGAATAACTATGAGGAAGATTAATAATTT
TCCTCTCATTGACACTTACATTAAGATTAAGATTCTCATTGATCTGTTACTTACTCTGAGGATAATAATTGGTGTT
AGAAGTACCCCATTTCCCAAGTGGGGCAAAGACAGTCCAAAAGACTCAACTTGTCTATTCAACTAATCTGTTTTGT
CTCAGTAGTTCACATATTGATCATACCCAGGAGTTGGACCTAATTCCAAAGCTTAGAGTGGGACCTAGTGTATCCTC
GGGGCTGTAATATAATCAGCCATTTAACACATAACAAGCCCTACTGTTTTCTGTTTTGCCGTGCATTTAGAATAAG
AGACAACTTAAACCTCCGATTCGGCAACACAGGGAATAATCTCACCAGACCCGGCAGTGTCTTCAGGCTTCATAGCC
CCAAGATGGAGAGTCGGGCCACAAAGCATGGATGACGCACACCGCATCAGGTTTCGAAACAGATTACCATAAGATT
TTAACAGCAGGATTGTCAGTCCAACAAGGCATTGTGAGACAACGGGTCATTCAAGTCCACCAGGTTACAAACCTAGA
AGAAATATGCCAATTGATCATTCAAGCCTTTGAAGCTGGTGTTGATTTTCAAGAGAGTGCAGACAGTTTCTTGCTGA
TGCTATGTTTACATCATGCTTATCAGGGTGACTACAAGCAATTCTTGGAAGCAATGCAGTCAAGTACCTTGAGGGT
CATGGCTTTTCGCTTTGAGGT CAGGAAAAAGGAAGGAGTCAAGCGACTCGAAGAATTGCTTCCTGCTGCATCCAGTGG
CAAGAGCATCAGGAGAACTGGCTGCAATGCCTGAAGAGGAGACAACAGAAGCAAATGCCGGACAGTTCTCTCTTT
TTGCTAGCTTATTTCTTCTAAGCTAGTTGTGCGAGAAAAAGCCTGTCTAGAAAAGGTGCAGCGGCAAAATTCAAGTT
CATTCTGAGCAGGGATTGATCCAATACCCACAGCCTGGCAGTCAGTTGGACACATGATGGTCATTTTCAGACTGAT
GAGAACAAATTTTCTAATTAAGTTCTCTCTTATACATCAAGGGATGCATATGGTAGCAGGACACGATGCTAACGATG
CTGTCATCGCAA ACTCTGTAGCTCAAGCACGTTTTTCAGGATTATTGATCGTTAAAACAGTGCTAGATCACATCCTT
CAGAAAACAGAGCACGGAGTGCCTTTCATCCTTTGGCAAGAACTGCTAAGGTCAAGAACGAAGTAAATTCCTTTAA
GGCTGCCCTTAGCTCGCTAGCACAAACATGGAGAGTATGCTCCTTTTGCTCGCTTGCTGAATCTTTCTGGAGTCAACA

ATCTCGAGCACGGACTGTTTCCTCAGCTTTCTGCAATTGCCCTAGGTGTGCAACGGCACACGGCAGTACCCTGGCA
GGAGTAAATGTGGGGGAACAGTATCAGCAACTACGAGAAGCAGCCACTGAGGCAGAAAAACAATTGCAGAAATACGC
TGAATCTCGCGAGCTTGACCATCTAGGTCTCGATGATCAAGAGAAGAAGATCTTGAAAGACTTCCATCAGAAGAAAA
ATGAAATCAGCTTCCAGCAGACAACAGCCATGGTCACACTACGGAAGGAAAGGCTAGCCAAGCTCACTGAGGCAATC
ACCTCCACATCCCTTCTCAAGACAGGAAAAACAGTATGATGATGACAACGATATCCCCTTTCCTGGGCCCATCAATGA
TAACGAAAACCTCAGAACAGCAAGACGATGATCCAACAGATTCTCAGGACACTACCATCCCTGATATCATTGTTGACC
CGGATGATGGCAGATACAACAATTATGGAGACTATCCTAGTGAGACGGCGAATGCCCCTGAAGACCTTGTTCTTTTT
GACCTTGAAGATGGTGACGAGGATGATCACCGACCGTCAAGTTCATCAGAGAACAACAACAAACACAGTCTTACAGG
AACTGACAGTAACAAAAACAAGTAACTGGAATCGAAACCCGACTAATATGCCAAAGAAAGACTCCACACAAAAACAATG
ACAATCCTGCACAGCGGGCTCAAGAATACGCCAGGGATAACATCCAGGATACACCAACACCCCATCGAGCTCTAACT
CCCATCAGCGAAGAAACCGGCTCCAATGGTCACAATGAAGATGACATTGATAGCATCCCTCCTTTGGAATCAGACGA
AGAAAAACAACACTGAGACAACCATACCACCACAAAAAATACCACTGCTCCACCAGCACCTGTTTATCGGAGTAATT
CAGAAAAGGAGCCCCTCCCGCAAGAAAAATCCCAGAAGCAACCAACCAAGTGAGTGGTAGTGAGAATACCGACAAT
AAACCTCACTCAGAGCAATCAGTGAAGAAATGTATCGACACATCCTCCAAACACAAGGACCATTGATGCCATCCT
ATACTATTACATGATGACGGAGGAGCCGATTGTCTTTAGCACTAGTGATGGGAAAGAATACGTATACCCTGATTCTC
TTGAAGGGGAGCATCCACCGTGGCTCAGTGAAAAAGAGGCCTGAATGAGGACAATAGGTTTATCACAATGGATGAT
CAACAATTCTACTGGCCTGTAATGAATCACAGGAACAAAATTCATGGCTATCCTTCAGCACCACAAGTAATTTCTTCA
TAATGACAGATCATTGTAAGGTTATTACCACCATCCCTGCAACAAAGCATGAAAACCACACTCAACAACGCCCTACC
ACAGGATACCTTGGAGACCATAACCAAGATCAGCAGCTGTGCAACCACCCCATGCGAATCCACCACCACAACCAC
CAAACAATAATCCCAAGACCAACCGCACACATCCAGATCAACCCAAACCTCAAACACCACCCCACTCCGCGATCC
CAGACCAAACCTCCGCCCCAGACAAGCACCCACCCATCCCAGAAACCGCACGGCCGAGAATCGATCCCCAGCATTCA
AAATGCGTTATTAAGAAAAAACATATGATGAAGATTAACCTTCATCAACATTGCACAGACTTTGATCCTTAGGAG
TTTATTCTAGCTATCTACAAAACGGGTCCAAAACGGAATGATTTCCACTAGGGCTGCAGCAATCAATGATCCTTCAT
TACCAATCAGAAACCAGTGACACGTGGCCCTGAACTATCAGGATGGATCTCCGAACAATTAATGACAGGCAAAATT
CCGGTACATGAAATCTTCAACGACACTGAGCCCCACATAAGCTCAGGGTCCGACTGCCTTCCCAGACCCAAAAACAC
GGCCCCCGGACTCGCAACACCCAGACACAGACCGATCCGGTTTGCAATCACAATTTTGAAGACGTTACACAAGCAC
TAACATCATTAACCAATGTCATACAAAAACAGGCTCTTAACTTAGAGTCTCTCGAACAACGCATCATAGATCTAGAG
AATGGCTTAAAGCCAATGTATGACATGGCTAAAGTCATTTCTGCATTGAATAGATCTTGTGCTGAGATGGTAGCAAA
ATATGATCTCCTGGTGATGACAACCTGGCCGCGCAACCGCCACCGCCGCTGCAACTGAGGCTTATTGGGAGGAACATG
GACAACCACCACCTGGACCATCACTTTATGAAGAGAGTGCGATTAGAGGCAAGATTAACAAGCAAGAGGATAAAGTA
CCTAAGGAAGTTCAAGAAGCTTTTCGTAATCTGGACAGTACCAGCTCACTAACAGAAGAGAACTTTGGCAAGCCAGA
TATATCTGCAAAGGACCTACGAGACATCATGTATGACCACCTACCAGGCTTCGGTACGGCTTTTACCAACTGGTCC
AGGTAATTTGCAAGCTAGGAAAAGACAATTCTGCATTGGACATTATTCATGCTGAGTTCCAAGCCAGCCTTGCTGAA
GGTGATTCTCCCCAATGTGCCCTGATCCAAATAACAAAACGGATCCCATCTTCCAGGATGCCACTCCGCCACAAT
TCACATCCGCTCTCGTGGTGACATCCCACGTGCCTGCCAAAAAAGTCTCCGTCCAGTTCCTCCATCACAAAAATAG
ACAGAGGTTGGGTTTGCATTTTCCAATTGCAGGACGGGAAGACACTTGGGCTCAAGATATAGGGTCCCCCAGTCAAA
GACACGTGCGGTCCCATCCTCCCTCACCTTCAGACATCAACGCATGGCAGTCCCAAACACCGGTGAGGGAGGCGCCC
GGCGACAACACATGATGATAGGCTGATCTTCGGGATAAGAGACATGAAAAACCAAAAAGCCGTTTACATCCAGATCC
AAGATCAAGAGTGGCTTGGAATAAGGGGCACTTGTTCTTTGTCTCAAAGGACTTACAAAAACAAGGTGATGAAGA

TTAAGAAAAAGCCTCCTTCAGTTGCAAGGAGCTAATTCTTAAAACTTCATCTAGACTAAGGATAAATCGATTCCAAT
CACGATGAGGAGAATCATCCTACCCACGGCACCACCTGAATACATGGAGGCTGTTTACCCAATGAGAACAATGAATT
CTGGTGCAGACAACACTGCCAGTGGCCCTAATTACACAACAACTGGTGTGATGACAAATGATACTCCCTCTAATTCA
CTCCGACCAGTTGCAGATGATAATATTGATCATCCGAGCCACACGCCTAACAGTGTGCTCTGCATTTATATTGGA
AGCTATGGTGAATGTAATATCTGGCCCCGAAAGTGCTGATGAAGCAAATCCCAATCTGGCTTCCTCTGGGTGTCTCTG
ACCAGAAGACATATAGCTTTGATTCAACCACTGCTGCCATTATGCTAGCATCATATACCATCACTCATTTTGGCAAA
ACCTCAAATCCCCTTGTGAGAATCAACCGACTTGGTCCTGGCATACTGATCACCCACTACGACTCCTAAGAATAGG
AAATCAAGCCTTCCTACAAGAGTTTGTGCTACCTCCTGTACAACCTGCCACAATACTTCACTTTTGATCTGACAGCGC
TGAAGCTGATCACCCAGCCACTCCCAGCGGCAACCTGGACAGATGAAACTCCAGCTGTGTCAACTGGCAGCTCCGC
CCAGGGATCTCATTCCATCCCAAATTAAGGCCTATCCTGCTACCAGGAAGAGCTGGAAAGAAGGGCTCCAACCTCCGA
TCTAACATCTCCTGACAAAATCCAGGCTATAATGAATTTCTTACAAGACCTCAAAATTGTACCAATCGATCCAACCA
AGAATATCATGGGTATTGAAGTGCCAGAACTCCTGGTTCACAGGCTGACTGGGAAGAAGACAACCTACCAAGAATGGT
CAACCAATCATTCCAATTCTGCTACCAAAGTACATTGGTCTTGATCCTCTATCTCAAGGTGATCTCACAATGGTGTGAT
CACTCAGGACTGTGATTCTGCCACTCCCCGGCCAGTCTTCCCCCAGTCAATGAAAAATGACCATGAGACTCAACAT
CACACTGCCAGAGCACCTCACCGCAAGTCTATACAACAATCAACCCCGGCATCTACAACCTGCAAAAACCAGCCCAT
CTGATACTCCTGGCATCGGGGGCAAGACAAGGCAGCCAAGCAGCAGCCCCGAGCCGAGCCCAAACCCATTACACCC
GAGCCCAACACCCATCCAGCAACCCACAACCGTCAAACGCACAGATGGACAAGCAAAGAACATCAAGCCAGGAGCAA
CACAGACCCCAAGTCTAAGCTGATCAACCCCTCCCGCAATCCCACCAACGCCAGCAAAAATCCCCCAACTCGATACC
AACCCCAAGCAAATCAGCTCAAACCGTCTATCTCTCCCCGCTTCACTCCACACCCAGATTGAGCAACGATCAACG
CACTTCTTATGCCACAGCTTATATTAAGAAAAAGAACTTGATGAAGATTAAGGCAACCAGTGGTGTCTATCTTCATCT
CTTTGATTTGAGTCTTAAGTGAATACACAGGTTCTAATACTGTTCTTCTGTCCAACGGTATAATTGAGCCAGGCCTA
AGACAGTAGCTAATCACAGTCATCATGGGAGCGTCAGGGATTCTGCAATTGCCCCGTGAGCGCTTCAGGAAAACATC
TTTCTTTGTTTGGGTAATAATCCTATTCCATAAAGTCTTTTCAATCCCGTTGGGGGTGTGACACAACAATACCCTAC
AAGTGAGTGATATTGACAAGTTTGTGTGCCGAGACAACTCTCTTCAACTAGCCAATTGAAGTCAGTCGGGTGTAAC
TTGGAGGGCAATGGAGTAGCAACTGATGTACCAACGGCAACCAAAAGATGGGGTTTTGAGCTGGTGTCCACCAAA
GGTGGTAAATTGCGAAGCTGGAGAATGGGCTGAGAACTGTTATAACCTGGCTATAAAGAAAGTTGATGGTAGTGAGT
GCCTACCAGAAGCCCCTGAGGGAGTGAGGGATTTTCCCCGTGCGGCTATGTACACAAAGTCTCAGGAACTGGACCA
TGCCCAGGAGGACTCGCCTTTACAAAAGAGGAGCCTTCTTCTGTATGACCGACTCGCATCAACAATCATTTATCG
GGGTACAACCTTTGCCGAAGGAGTTATTGCATTTCTGATCTTGCTTAAGGCGCGAAAGGATTTTTTCCAGTCTCCTC
CATTGCATGAGCCTGCCAACATGACCACGGATCCCTCCAGTTACTATCACACGACAACAATAAACTACGTGGTTGAT
AATTTTGGAACCAACACCACAGAGTTTCTGTTCCAAGTCGATCATTTGACGTATGTGCAGCTCGAGGCAAGATTCAC
ACCACAATTCCTTGTCTCCTAAATGAAACCATCTACTCTGATAACCGCAGAAGTAACACAACAGGAAAACTAATCT
GGAAAATAAATCCCACTGTTGATACCAGCATGGGTGAGTGGGCTTTCTGGGAAAATAAAAAAACTTCACAAAAACCC
TTTCAAGTGAAGAGTTGTCTTTTCGTACCTGTACCAGAAACCCAGAACAGGTCCTTGACACGACAGCGACGGTCTCT
CCTCCCATCTCCGCCCACAACCACGCAGCCGAAGACCACAAAGAATTGGTTTCAGAGGATTCCACTCCAGTGGTTCA
GATGCAAAACATCAAGGGAAAGGACACAATGCCAACACAGTGACGGGTGTACCAACAACCACACCCTCTCCATTTT
CAATCAATGCTCGCAACACTGATCATACCAAATCATTTATCGGCCTGGAGGGGCCCCAAGAAGACCACAGCACCACA
CAGCCTGCCAAGACCACCAGCCAACCAACCAACAGCACAGAATCGACGACACTAAACCCAACATCAGAGCCCTCCAG
TAGAGGCACGGGACCATCCAGCCCCACGGTCCCCAACACCACAGAAAGCCACGCCGAACCTGGCAAGACAACCCCAA

CCCACTCCCAGAACAGCACACTGCCGCCAGTGCCATTCCAAGAGCCGTGCACCCCGACGAACCTCAGTGGACCTGGC
TTCCTGACGAACACAATACGGGGGGTTACAAATCTCCTGACAGGATCCAGAAGAAAGCGAAGGGATGTCACTCCCAA
TACACAACCCAAATGCAACCCAAACCTGCACTATTGGACAGCCTTGGATGAGGGTGCTGCCATAGGTTTAGCCTGGA
TACCATACTTCGGGCCAGCAGCTGAGGGAATTTACTGAAAGGCATAATGGAGAATCAAAATGGATTGATCTGTGGA
TTGAGGCAGCTGGCCAACGAAACGACACAAGCTCTTCAATTGTTCTTAAGGGCAACTACTGAGTTGCGTACATTCTC
TATACTAAATCGGAAAGCAATAGACTTCTTGCTCCAAAGATGGGGAGGAACATGTCACATTCTAGGGCCTGATTGTT
GCATTGAACCCCAAGATTGGACCAAAAAATATCACTGATAAAATTGATCAAATAATCCATGACTTTGTGATAATAAT
CTTCCAAATCAGAATGATGGCAGCAACTGGTGGACTGGATGGAAACAATGGGTTCCTGCTGGAATAGGAATCACAGG
AGTAATCATTGCTATTATTGCTTTGCTGTGCATTTGCAAATTCATGCTTTGAACTAATATAGCATCATACTTTCTAA
TATTCCCCCAATATGAATTTTTGTTTTGATTTTATTTAATGATATATCCTCTGTATACCTCACTAATGTACTCGAG
CATAATTTCCCTGATAGACTTGATTGTATTTGATGATTAAGGACCTCACAAAATTCCTGGGGATTGAAAAGAACTGG
ATAACTCAATAAAATTTTATGCTAGGACCACAAATACACTTGATGAAGATTAAGAAAAAGATAATCTTATGATTATCA
TTGATCTTCATCTATACCTTAAATACTCTATTCAAGGAGAGTATGACAAAACCAAGTAGTATTGGATAAACTTGTC
TGCATTCAAATCTGAAGACATACGGCTTATCTATTCACTATTGTATTAGAAAATCTAGGGAATATCATTTGAAACTA
ATTAGTGACTAAAACACACAACCTCAAGTCGGCCAGAATGGAAGTTGTTTCATGAAAGAGGTCGCTCCAGGATCTCCCG
ACAAAACACAAGGGATGGACCTAGTCATTTAGTACGGGCGAGATCATCCTCTCGAGCTAGTTATCGAAGTGAATACC
ATACACCAAGGAGTGCCTCGCAGATCCGTGTCCCCACTGTCTTCATCGGAAAAAGACAGATTTATTGACAGTTCCA
CCAGCACCTAAAGATGTATGCCCCACTTTAAAGAAAGGGTTTCTATGTGACAGCAATTTCTGTAAAAAGGATCACCA
ACTTGAAAGCTTAACAGATAGAGAGTTACTCTTGCTGATTGCACGCAAGACATGTGGATCCACGGAACAACAATAA
GCATAGTTGCTCCAAAAGATTCACGTCTGGCTAATCCTATTGCTGAGGATTTCCAACAAAAAGATGGGCCTAAGGTA
ACACTGTCGATGCTTATAGAGACAGCAGAGTATTGGTCCAAACAGGACATTAAGAACATCGATGATTCAAGATTAAG
AGCTTTATTGACCCTTTGTGCTGTTATGACGCGCAAAATTTCAAAATCTCAACTTAGCTTGCTATGTGAAAGCCACT
TACGGCGAGAAGGACTTGGTCAAGACCAATCAGAGTCAGTTCTGGAGGTATATCAACGCTTACACAGCGATAAAGGT
GGGAATTTGAGGCAGCACTATGGCAGCAGTGGGATCGGCAATCATTGATAATGTTTCATAACAGCATTTTAAATAT
TGCATTACAATTACCATGTGAGAGTTCATCTGTTGTTATTTCAAGTTTGAGAATGCTGATACCCAGTCGGAAGCCA
CTGAGGTTGTAACCCCTCCGAAACCTGCACATGGTCAGAAGGAGGAAGTTCCCATGAAAGCCCAATCACAAGGC
GAGCTAAAAAATCCCTTTTGAACATGCATAACATCACATACAATTTCAAAGGCATTGGAATAAATGGTGATTTCAAG
AAGATTAGTGTTTGCCCTCAAAATCAGATCCGAGCAATAATCATCTACTCTACAGCCAGTTAATTTCTAATATAAAG
GTTAAAAAATGCTGCAGGCCAGCTATTGTTCCACAGGTCCCAATCTTCTTGTTAAATTGTAGGAGCTAGCACAAAG
TGATGCAATTAATGATACTAGTATATACAATGCCACCAACTTAATTCTAAGATTTTGTATATCTCGGAAATTCAAA
ATTAAATGCTACGTTATTGATTCAATTAAGAAAAAGACAATGGACCATCAAAATTAGTTCAATACCTGAACTAATGC
ACTTATAGAAACAGGAGAACCAGCCAGACAGCAGACAAAATAACAATGAACCACAATATGTTACTGCTATAATGAAGT
TCGTTAATTCAAAAACAAATGATGAAGATTAATGCAGATGTCTAAAGGATAAACTCCATGCATCAGTGTTATAAT
TGGGCTCTGTAGAAAATCTTCATCTCCTCCAACCTACCTCAAAGAAGGATTTTACCGCGATTGGGAGTTATAACGAC
AATAGGGACAACCACCTTTGACACTAGCCAAGCTTGTCGTGGGCACACAGCATTTTATCTTGCAACGTCGACATTCC
CATCAATCTGAGGAGTAACAGCTATCAAAACAACGCATATGTAGACATTGTTCGGTAATAGTACTGCCTAAGACAAC
ATTTATAATAACAGTTGGAATTCATTTTTTACCCAAGCTATTCTCAAGTTAACAGTTGAAACAGGACTCGACCCAG
GACAACCTCCGATACGTAACATAAGAAAAAGAACACCCTTGACCCAGAGTGAACAAGCTCATACTATCAAGGCTAAT
CCTCGGGCCTGCCTGGAGTCCACAATGGCCAAGGCTACTGGGAGGTACAACCTTATCTCCCCAAAGAAAGATCTTGA

AAAAGGGCTGGTTCTGAATGACCTTTGCACTCTCTCAGTGGCCCAGACGGTCCAGGGATGGAAGGTTACCTGGGCTG
GGATTGAATTTGATGTTACACAGAAAGGGATGGCCTTATTGCACAGGCTCAAGACCAGTGATTTTGCTCCAGCCTGG
TCAATGACCAGGAAGTTATTTCCACATCTCTTTCAAAACCCGAAGTCTACAATTGAGTCGCCACTTTGGGCACTGCG
GGTCATACTAGCAGCAGGTATTCAAGATCAGCTAATTGATCAATCGTTGATCGAACCTTGGCAGGAGCGCTAGGCT
TAATTGCTGATTGGCTTCTTACTACTGGAACAAACCACTTTCAAATGCGCACACAACAGGCTAAGGAGCAACTAAGT
CTAAAAATGTTGTCCCTGGTGCGATCAAACATCCTAAAGTTCATCAACCACTAGATGCACTACATGTTGTGAATTA
CAATGGACTTCTCAGTAGCATTGAAATTGGCACCAGGCAATACAATTATAATTACCCGGACAAATATGGGTTTTT
TGGTAGAGTTGCAAGAGCCTGACAAATCAGCCATGAACACCAGAAACAGGACCAGTCAAATTCTCCCTCCTCCAT
GAATCAACCTTGAAGACACTTGCTAAAAAACCTGCGACCCAGATGCAAGCACTAATCTTAGAATTCAATAGTTCTCT
CGCTATTTAACTCAACTCATCAAAATGCTAACTTGTGATCCTTAAGCTGCACCTTAGACTTTTGATAAGAATACTAA
CTATTGATGATTGTCTTTGACATGAGGATAAGAACACTGCCCATTAGATAGATGGGGTTCACCATTAATACACAATT
ACCCAATCATGTTAACAGCAGTTAGATCCCTCAAGTATATCAAGTTCATTCTACCCTTTGCATTGTCACTCTAATTA
AATCACCTGATACAATTATGTTAATTAGCTAGATTCTCTCATTTTTAGACTTGTTTGCTAGAATAATTGATCATCCA
CTTGATTACACATCCAAGTCTAGTTTCTAGATTGCTAATAATCTTTAGTTCAATACTAATGACAAAGAGATT
AGATTAGCTATAGCTTGAGGAAGATTAAGAAAAAGTGCTGTGGGGTCTTTCCGTGTAGAAGGGCACACAGCCATAA
TTCTTCTCTTTTATACAACATGGCTACACAACATACGCAATATCCAGACGCAAGGTTATCATCACCTATAGTTTTAG
ATCAGTGTGATCTTGTCACTCGTGCTTGTGGATTGTATTCCGCATACTCCTTAAATCCCCAACTAAAGAACTGTAGA
CTACCGAAACATATATACCGACTAAAAATATGACACCACTGTTACAGAGTTTTTGAGTGATGTGCCGGTAGCAACATT
GCCAGCGGATTTTTTAGTACCTACATTTCTTAGGACTCTATCAGGAAATGGTTCTTGTCCAATTGATCCAAAATGCA
GTCAATTTTTAGAAGAAATTGTCAATTATACTCTACAAGATATTCGCTTCTAACTATTACCTCAATCGAGCCGGA
GTGCATAACGATCATGTGGATAGGGATTTTGGACAAAAAATTCGCAATCTAATTTGCGACAATGAGGTTTTACATCA
AATGTTTCACTGGTATGATCTTGCAATTCTAGCACGTAGAGGGCGACTAAATAGAGGGAATAATCGCTCAACATGGT
TTGCAAGTGATAATTTGGTAGATATCCTAGGTTATGGAGATTATTTTTTTGGAAAATACCATTATCACTACTACCA
GTGGATACACAAGGCCTCCACATGCAGCCAAGGACTGGTATCATGAATCGGTTTTCAAGGAGGCTATTCAAGGCCA
TACACACATCGTGCCATCTCTACAGCAGATGTCTTAATCATGTGTAAGGACATAATCACCTGTGCTGTTAATACTT
TACTGATTGCTGCTGTGGCAAATCTAGAGGATTCAGTTCATTTCAGATTACCCTTTACCAGAAACAGTGTCTGACCTA
TACAAAGCAGGAGATTATTTAATCTCATTGCTAGGATCAGAAGGTTACAAAGTCATAAAATTCCTTGAGCCGTTATG
CTTAGCAAAGATCCAAGTCTGCTCAAAATTAAGTGTGAGAGGAAAGGAAAGATTTCCTCACTCAAATGCATTTAGCTGTAA
ATCATACACTTGAGGAAGTTACAGGGTCCCGAGAATTAAGGCCACAACAGATTTCGGAAGGTAAGGGAATTCCATCAA
ATGCTGATAAACCTTAAGGCAACTCCTCAACAACTCTGTGAGTTGTTTTTCAGTGCAAAAGCATTGGGGGCACCCTGT
CTTGATAGCGAAAAGGCTATCCAAAAAGTAAAGAAGCATGCAACAGTGATAAAAGCATTGCGCCCAATAATAATCT
TTGAAACATATTGTGTGTTTAAATACAGCATTGCAAAACATTATTTTGATAGTCAGGGTACGTGGTACAGTGTGACT
TCTGACAGATGCTTAACACCAGGCCTTTCTCTTACATCAAAAGAAACCAATTTCTCCACTACCTATGATCAAAGA
ACTTTTGTGGGAATTTTATCACTTAGATCATCTCCGTTATTCTCCACCAAAGTGATTAGTGATTTGAGTATCTTTA
TTAAAGATCGTGCTACTGCAGTCGAGAAAACATGCTGGGACGCAGTTTTTGAACCAATGTTCTTGTTATAACCCA
CCGAATAAATTTGCTACAAAAAGGGTACCTGAGCAATTCCTTGAACAGGAGAATTTCTCAATAGAGAGTGTCTTACA
TTATGCTCAACGTCTGGAATATCTTCTCCCGAGTACCGGAAGTCTCTTTTTCACTCAAGGAGAAGGAGTTAAACA
TTGGACGAGCTTTTGGGAAATTGCCATATCCAACACGCAATGTTCAAAGTCTGTGCGAAGCTTTGTTAGCAGATGGT
TTGGCGAAAGCATTCCCAAGCAATATGATGGTTGTGACAGAGCGCGAGCAAAAGAAAGCCTTTTGCATCAAGCGTC

TTGGCATCACACAAGTGATGATTTTGGTGAGAATGCTACTGTTAGAGGCAGTAGTTTGTAAACAGACTTGAAAAAT
ACAATTTAGCATTCCGATATGAGTTTACAGCTCCTTTTATTGAATACTGTAATCGTTGTTACGGTGTAAAGAAATTTG
TTTAATTGGATGCACTACACTATAACCACAGTGTTATATACATGTGAGTGATTATTATAACCCCCACATGGAGTCTC
TCTCGAAAACCGAGAAAAATCCACCAGAAGGTCCAAGCTCTTACCGTGGTCATCTAGGCGGGATTGAGGGACTTCAAC
AAAACTCTGGACAAGCATCTCATGTGCACAGATTTTATTAGTTGAAATCAAAACCGGTTTTAACTGCGATCTGCG
GTAATGGGTGACAATCAATGTATAACTGTACTCTCTGTATTTCCCTCGAACTGAGTCTAGTGAGCAAGAATTAAG
TTCTGAAGATAATGCCGCTAGAGTAGCTGCTAGCTTAGCAAAAGTCACAAGTGCCTGCGGCATCTTTTTAAACCTG
ATGAACTTTTGTTCACCTCAGGTTTCATTTATTTTGGCAAAAAACAATTTTGAATGGAGTACAATTACCTCAATCA
CTGAAACTGCTACTAGAATTGCACCCTTGTGAGATGCTATCTTTGATGATCTTCAAGGGACACTAGCTAGCATAGG
CACGGCTTTTGAAAGATCTATCTCCGAACTAGGCACGTAGTCCCTTGTAGAGTAGCAGCTGCATTCCATACCTTTT
TTTCCGTAAGAATCTTACAATATCATCATCTTGGCTTCAACAAGGGAACAGACCTGGGTCAATTGTCATTAAGCAAG
CCATTAGATTTTGGAACTATACTTTGGCCTTGGCAGTACCACAAGTCTTGGGTGGCTTATCATTCTAAATCCAGA
AAAATGTTTTTATAGAAATCTGGGTGATCCTGTTACTTCAGGGCTGTTTCAGCTCAAGACATATCTTCAAATGATCC
ACATGGATGATTTGTTTTTACCTTTGATCGCAAAGAACCAGGGAAGTGTAGCGCAATTGACTTTGTGTTAAACCCT
AGTGGGTAAACGTACCGGGGTACAGGATTTGACATCCTTCTACGTGAGTAGTGCGCCGAACAATTACTCTAAG
TGCTAAAAATAAATTAATAAACACTTTGTTCCATTCTTCTGCTGATTTAGAAGATGAAATGGTTTGCAAATGGTTGC
TTTCTTCTACACCAGTCATGAGTAGGTTTGCCGCCGATATATTTCTCGCACTCCCAGTGGGAAACGTTTACAGATC
TTAGGTTACCTTGAAGGGACTAGAACATTGTTAGCCTCTAAAAATTATAAATCATAATACTGAGACACCTATCCTAGA
TCGATTGAGGAAAATTACGCTGCAAAGGTGGAGCCTGTGGTTTAGTTATCTCGACCACTGTGATCAAGTTCTGGCTG
ATGCCCTAACTCAGATAACCTGCACTGTGGACTTAGCACAGATTCTTCGCGAGTACACCTGGGCACACATACTAGAG
GGAAGGCAGCTCATTGGAGCAACACTTCCTTGTATACTAGAACAATAAATGTCATCTGGCTCAAACCATATGAGCA
TTGCCCTAAATGTGCAAAGTCAGCAAACCCTAAAGGGGAACCTTTTGTCTATTGCAATTAACCAATGATGTAGTAA
GTGCTTGGCCTGATCAATCACGACTTAGTTGGACAATTGGAGATGGCATCCCTTATATCGGATCTCGAACAGAGGAT
AAGATTGGGCAGCCAGCCATCAAACCAAAATGCCCTTCAGCAGCCTTACGTGAAGCAATTGAGTTGACATCAAGATT
GACTTGGGTACTCAAGGTGGAGCAACAGCGACTTACTAGTTAAACCCTTCATAGAAGCAGAGTAAATTTAAGCG
TACAGGAAATTCTCAAATGACACCTTCTCATTACTCCGGCAACATTGTGCATCGATATAATGATCAATATAGTCCA
CACTCATTTATGGCAAATAGGATGAGTAATTCTGCTACTAGGTTAGTTGTTTCGACAAACACTCTTGGAGAATTTTC
AGGAGGAGGTGAGTCAGCAAGAGATAGTAATATTATCTTCCAGAATGTCATTAATTTTGCTGTTGCACTTTTTGATC
TACGATTTAGGAACGTGGCTACTTCTTCTATAACAATCATCGGGCTCATCTTCATTTGTCAAAGTGTGACGCGA
GAGGTTCCAGCCCAATATTTAGTTTATACATCAACATTGCCATTGGACCTTACACGGTATCGGGATAATGAGTTGAT
TTACGATGACAATCCATTAAGAGGTGGTTTAAATTGCAATCTTCTTTTGATAATCCGCTTTTCAAGGGCCAGAGAC
TTAACATAATTGAAGAAGACTTGATTAGACTACCTTACTTATCAGGATGGGAGCTAGCTAAAAGTGTATCCAATCT
ATAATTTCTGACAGCAACAATTCATCAACGGATCCAATCAGTAGTGGGGAACACGATCATTCACCACTCACTTCTT
GACATATCCTAAGATTGGACTACTATATAGTTTTGGTGCACTCATCAGTTATTATCTAGGCAACACCATTATTAGAA
CCAAAAAATTGACTCTTAACAACCTTCATATATTACCTAGCTACTCAAATACATAATTTACCTCATCGCTCGTTGAGA
ATCCTTAAACCTACTTTGAAACACGCTAGTGTTATCTCGAGATTAATAAGTATTGACTCTCACTTCTCAATTTATAT
TGGAGGAAGTCTGGTGATCGAGGACTTCCGATGCGGCAAGATTGTTTCTTAGAACTGCCATTACTGTCTTCCTTC
AATTGCTTAGAAAGTGGATAGTTGAACGCAAGACAGCTATTCCACTGTGGGTCTATCTACCCTCTAGAAGGTCAAAGT
CCTAGTCCGATCAACAGTTTTCTACACCACGTATCGCATTGTTGCAACATGAGTCCTCCACGATCATGTTTGTGC

TGCAGAAGCCCACAGTCGAGTGGAGACATTTGATAATTTAGTTTATATGTGTAAAAGCACAGCAAGTAACTTCTTTC
ATGCTTCATTAGCATACTGGAGAAGTCGATCTAAAAATCAAGACAAAAGAGAGATGACAAAGATATTATCTTTGACG
CAAACGGAAAAGAAAAATTCATTCGGCTATACAGCACATCCAGAAAGCACTGCTGTTCTTGGTTCCTCCAGACCAG
CCTTGCTCCACCTCCATCTGCTGACGAGGCTACATATGATAGGAAAAACAAAGTTTTGAAAGCTTCCAGACCTGGCA
AGTATTCCCAGAATACAACCAAGCCCCACCCAACCAACCAGTTGTGCGGATGTATCTCCCAATATCACAGGCACA
GATGGGTGCCCTTCTGCCAATGAGGGTTCTAACAGCAATAACAATAATTTAGTCTCGCACAGAATTGTACTGCCGTT
TTTTACATTGTCTCATAATTATAACGAAAGACCTCTATCAGAAAGTCTGAGGGGACAACAGAGATTGTAAGGCTTA
CTCGGCAGCTGAGGGCAATACCAGACACCACAATATATTGCCGCTTCACGGGAATAGTTTCTTCAATGCACTATAAG
CTCGATGAAGTCCTTTGGGAATTTGATAATTTTAAGTCTGCTATAACACTTGCCGAAGGTGAAGGTTGGGTGCATT
ACTCTTATTACAAAAATATAAAGTAGAAACCTTGTTTTTTAATACTAGCCACAGAACACAGCATTGAAGCAGAAA
TTATTTCTGGAATAACTACACCAAGAATGCTTCTCCCTATTATGTCTAGGTTCCATGGTGGACAAATAAAAGTCACT
TTAAACAATTCTGCAAGCCAGATTACCGATATTACTAATCCAAGTTGGTTGGCAGACCAAAAATCTAGGATCCCTAA
GCAAGTAGAGATTATAACCATGGATGCTGAAACAACAGAAAACATTAATCGGTCAAAATTGTACGAAGCAGTCCAAC
AGCTGATTGTCTCACATATTGATCCGAATGCACTCAAAGTTGTGGTTCTTAAAGTTTTCTTAAGTGACATTGATGGA
ATCCTATGGCTGAATGATAACCTTACCCCTTTGTTTGGGCTGGGTACTTGATCAAGCCGATCACCTCTAGCCCCAA
ATCTAGTGAGTGGTACCTATGTCTCTCAAACCTTCTTTCAACTTCAAGACGATTACCTCATCAGAGTCATACTACTT
GCATGCATGTTATTCAAACAGCACTCCAGCTACAAATTCAGAGGAGCTCATATTGGCTTAGCCACCTTGTCCAGTAT
GCCAATCATAATTTGCATTTAGATTATATTAATCTCGGTTTCCCTTCATTGGAGAGGGTTTTATACCATAGATACAA
TTTAGTCGATTCTCAGAAAGGCCCTTTGACTTCCATTGTCCAACATCTAGCGCACCTGCAGACCGAGATTAGGGAGT
TGGTTAATGACTATAATCAACAAAGACAAAGTCGAACCCAAACATATCATTTCATTAAACAATAAAAGGTGCTATT
ACAAAATTGGTAAATGATTACCTTAAGTTCTTTCTAATAATACAAGCCTTAAAGCACAATTGCACATGGCAAGAGGA
ACTAAGAGCTCTTCCAGATCTAATTAGTGTCTGCACTCGATTCTATCATACTCGAACTGTTTCATGTGAAAACCGGT
TCCTAGTACAGACTTTATACTTATCACGCATGCAGGATTCGGAATCAAATAAGATAGATTGACCGGCCTTCTT
AGTCTATGTCCAAATGGTTTTTTTCGGTAAGGACTCTTGACGTACAACTCCACATAGTTATACAATGGTACCAGGA
CACTATATGTAAATTGACCCTAAGAAAAGAGTAATTCGACACACAGAGTTCTCAAGTGAAACCCCTCATCTCAGATTA
TCTGTGGTTGCAATTCTAATATCCGATTGTTACCCCGTGAGTATAACTCCAGATTAATATAAGAAAATACCTTTTGT
CCTGCAAATTTATCTTAAATTCAAGTACATACGCTCCAAATCGTATAAAATATTAAGAAAAGTTAATCTGCTTGCT
TTAATTATACTTTAATATTCGACAAATAGTTAACGGTCTCATCACTCAAAAATTTCAATTAACAAAAGAAGTACTCT
GAGTATATTCACATATCATATGTGATTAACATATAAGCAACGCATGATGCGCCTTCCTCTTACTTATTGTGTTGTCA
CGCAGTCGTTGTACTACCTCGAAAATTCCAAACAATAAATCGTGTCTATCCCGCATTTAGTGTCTTTAATTTAAGAT
CTCAAATCCAAAAAACTGGGTTTATGTTGATGTAAATCAATAATACCGAAATTGCTTGATATTAATAAAAGCTTAA
AGGATTTTTCTTAAACGGTGATGTTAGGTATATAGGAAAGCTCGATCACGATGTCCCTTACTCAGAAAAAGAAAA
CGGAAGCCCTATTGGCCATTTAATCGTACACAAAAATATCTTTACCAAATTGTTTTCTTTTTTGTGTGTCCA,
(SEQ ID. NO.:4).

SEQ. ID. NO: 5

CGGACACACAAAAAGAATGAAGGATTTTGAATCTTTATTGTGTGCGAGTAACTACGAGGAAGATTAAAGATTT
TCCTCTCATTGAAATTGAAATTGAGATTCTAATCTCGACGGATCGATCCCCAATACCAACACTGAGAATTGGCCTGA
AGAAGTCATCTGCTCCTTGGCAAAACCAAGAGCAGGCCCAAAGGGCCATTAGGCCACATCTGCTGAGCCTGCAGAAC
ACGCAGGACTTACTTAGCAGAAGAGAGCGGTGCCGAAACCAGCCAACAAATTGACACAGCTGCTCACTCTGACCCT

GAATTCATAAACAAATATTAAGTTGACAACAGAGATACTAATCCAATATTTGGATCAAGAATCAAAATAGTGAAACGA
CTGACTATCCCTCCTTAGAATTAGCAAAGATCCTTTTGTAGACTATTGTGCTACATTCTCTATCCAAGACCTCAAAA
TGGATCCTCGTCCAATCAGAACCTGGATGATGCATAACACATCTGAAGTTGAAGCAGACTACCATAAGATTCTAACT
GCCGGATTGTCCGTCCAGCAAGGCATTGTGAGACAAAAGAATCATTCCCTGTTTACCAAATCTCAAACCTGGAGGAAGT
ATGTCAACTCATCATACAGGCATTTCGAGGCTGGCGTCGACTTCCAGGATAGTGCAGATAGCTTTTTGTTAATGCTAT
GTCTGCATCATGCCTATCAAGGGGATTATAAACAAATTTTGGAAAAGTAATGCGGTAAAATACCTTGAAGGTCATGGA
TTCCGTTTTGTAGATGAAGAAAAAGGAAGGTGTCAAGCGCCTGGAGGAACTACTCCCTGCTGCCTCGAGTGGAAGAA
CATCAAGAGAACATTGGCTGCAATGCCCCGAGGAGGAAACAACAGAAGCAAATGCTGGACAATTTCTTTCAATTTGCTA
GTCTGTTTTCTCCCAAAATTGGTTGTGCGAGAAAAAGGCCTGTCTGGAGAAGGTTCAACGACAAATCCAAGTGCACGCA
GAACAAGGTCTGATTCAATACCCGACATCTTGGCAATCGGTGGGACATATGATGGTCATCTTCAGACTAATGCGAAC
CAACTTCCTGATTAAGTTCCCTCCTAATACATCAAGGAATGCATATGGTTGCAGGGCATGATGCTAATGATGCCGTCA
TTGCCAACTCTGTAGCTCAAGCTCGTTTTCTCCGGATTGTTGATAGTCAAAACAGTGCTTGATCATATCCTCCAAAAA
ACAGAGCACGGAGTTCGCCTGCATCCCTTGGCGCGAACAGCCAAAGTCAAAAATGAGGTGAGCTCTTTTAAGGCCGC
TTTAGCCTCACTAGCACAAACATGGAGAATATGCCCCGTTTGCTCGTCTGCTGAATCTATCTGGGGTTAATAATCTTG
AGCATGGGCTTTTTCCCTCAACTTTCTGCAATTGCTTTGGGAGTAGCAACTGCACATGGGAGCACTCTGGCTGGAGTC
AATGTAGGAGAGCAATACCAACAACCTGCGAGAAGCAGCCACTGAGGCCGAAAAGCAGTTGCAGAAATATGCTGAATC
TCGTGAACCTTGATCACCTAGGTCTTGATGATCAGGAAAAAGAAATCCTAAAAGACTTCCATCAGAAAAAGAATGAGA
TCAGCTTCCAGCAGACGACAGCCATGGTCACACTGCGGAAAAGAGAGATTGGCCAAATTGACCGAAGCTATTACTTCC
ACCTCTATCCTCAAAACAGGAAGGCGGTATGATGATGACAAATGACATACCCTTTCAGGGCCAATCAATGATAACGA
GAACTCTGGTCAGAACGATGACGATCCAACAGACTCCCAGGATACCACAATCCCGGATGTAATAATCGATCCAAACG
ATGGTGGGTATAATAATTACAGCGATTATGCAAATGATGCTGCAAGTGCTCCTGATGACCTAGTTCTTTTTGACCTT
GAGGACGAGGATGATGCTGATAACCCGGCTCAAAACACGCCAGAAAAAATGATAGACCAGCAACAACAAAGCTGAG
AAATGGACAGGACCAGGATGGAACCAAGGCGAAACTGCATCCCCACGGGTAGCCCCAACCAATACAGAGACAAGC
CAATGCCACAAGTACAGGACAGATCCGAAAATCATGACCAAACCTTCAAACACAGTCCAGGGTTTTGACTCCTATC
AGCGAGGAAGCAGACCCAGCGACCACAACGATGGTGACAAATGAAAGCATTCCCTCCCCTGGAATCAGACGACGAGGG
TAGCACTGATACTACTGCAGCAGAAACAAAGCCTGCCACTGCACCTCCCGTCCCGTCTACCGAAGTATCTCCGTAG
ATGATTCTGTCCCCTCAGAGAACATTCCCGCACAGTCCAATCAAACGAACAATGAGGACAATGTCAGGAACAATGCT
CAGTCGGAGCAATCCATTGCAGAAATGTATCAACATATCTTGAAAACACAAGGACCTTTTGATGCCATCCTTTACTA
CCATATGATGAAAGAAGAGCCCATCATTTTCAGCACTAGTGATGGGAAGGAGTATACATATCCAGACTCTCTTGAAG
ATGAGTATCCACCCTGGCTCAGCGAGAAGGAAGCCATGAACGAAGACAATAGATTTCATAACCATGGATGGTCAGCAG
TTTTACTGGCCTGTGATGAATCATAGAAATAAATTCATGGCAATCCTCCAGCATCACAGGTGATCCGACCTCTAAAA
CTGAGCTCCTAACTACAAGCTACCCCATCACTCTGCCGGAATGCCAGAACCTCCCTCCAAAACAGCTCCACATCGAG
AACCTCCGACGCGGTACACAGGCAAGACAGGCAACCTAATGATGTTCCCTGTTCACCCACAACCGCAACCAACACTTG
ATCGACTTCCAAGACAACCTACAACCCCCTTAGCCAACTCCACCACAGAAGCACCACCCCATACAACAACCCCAAC
CAACAACACTGCATGTAAGTATTGTCTACCCCAAGATGATCCCTGGACACCAACAACCCCTAACCTCCCCAAGTT
GTCATTAAGAAAAAATATATGATGAAGATTAACCTTCATCAGAGCTATTTCTTCTACGCTTGTTAGGACCAGTA
TTCACAACTATTTTACAATCCCTACCCAATATGACCTCTAACAGAGCAAGGGTGACTTACAACCCACCACCAACAA
CCACAGGCACACGATCGTGTGGGCGGAACTTCCGGGTGGATCTCTGAGCAATTGATGACAGGCAAGATTCCGATT
ACCGATATCTTCAATGAAATTGAAACCTTACCTAGTATAAGTCCCTCGATCCACTCCAAAATCAAAACCCCAAGTGT

TCAAACACGCAGTGTCCAGACCCAAACTGACCCAAATTGTAATCATGATTTTGCAGAGGTTGTGAAAATGCTAACAT
CTCTAACCCCTTGTCGTACAAAAACAAACCCCTTGCAACTGAATCACTTGAGCAACGCATTACTGACCTGGAAGGTAGC
CTGAAACCAGTGTCTGAGATCACCAAGATTGTTTCTGCACTAAATAGATCCTGTGCAGAGATGGTGGCCAAATATGA
TCTTCTAGTAATGACGACTGGTCGTGCAACTGCCACTGCTGCAGCTACTGAAGCATACTGGGCAGAACATGGACGTC
CTCCACCGGGGCCCTCATTGTACGAGGAGGATGCAATCAGGACTAAAATTGGAAAACAAGGGATATGGTACCCAAG
GAAGTGCAAGAGGCCTTCCGTAATCTGGATAGTACTGCCCTTCTAACGGAAGAGAATTTTGGGAAACCAGACATATC
CGCAAAAGACTTGCGCAATATCATGTATGATCACCTCCCAGGTTTTTGGCACAGCATTTCATCAACTAGTGCAAGTTA
TCTGCAAGTTAGGGAAGGACAATTCCTCACTTGATGTAATTCATGCAGAATTTCAGGCCAGCCTTGCTGAAGGAGAC
TCTCCTCAGTGTGCCCTGATTGAGATAACCAAACGGATTCCCTATTTTCCAAGATGCAGCACCACCCGTAATCCATAT
TCGGTCACGCGGTGATATACCAAAGGCGTGTCAAAAGAGCCTCCGCCCTGTTCCACCATCACCAAAGATTGATAGGG
GTTGGGTATGCATATTCCAGCTACAAGACGGAAAAACACTCGGACTCAAAATCTAAGGTGAACAATTGCGCAACCTC
CACAGTCGCCTATATTGCTTCCTTCCGGAATCAGGGTATGATCGCGTAAAAAATAAGCTTCCAACATATTGATACAC
GATCCATATCCATAATGCCATCTCCAGGAATATGAGAACGCAAGGCCATATCAGGACCCGATCTCAATTCCAATGCA
ACCTACTGTTAAGAATAAAATAACCAATGTCCTCTAGCCTTATATGTTCTCAAAAATACAAGTGATGAAGATTAAGA
AAAAGCATCCTTTACTTGAGAGGAGCTAATTCCTTATACTTCATCTAATCTTTAAGTAAGTTGATCACTACCACCAT
GAGGAGGGCAATTCTACCTACTGCACCGCCAGAATACATAGAGGCTGTCTACCCAATGAGAACGGTTAGTACTAGTA
TCAACAGTACTGCCAGTGGTCCGAACCTTTCCAGCACC GGATGTAATGATGAGTGATACACCCTCCAACCTACTCCGA
CCAATTGCTGATGATAACATCGATCATCCAAGTCATACCAACCAGTGTTTCATCAGCCTTTATACTCGAGGCAAT
GGTGAATGTGATATCGGGGCCGAAGGTACTAATGAAGCAAATTCCTATATGGCTCCCCTTGGGTGTTGCTGATCAAA
AAACATATAGTTTTGACTCAACTACAGCTGCAATTATGCTCGCATCGTACACCATCACTCACTTTGGCAAAACCTCC
AATCCGCTTGTGAGAATCAATCGACTTGGTCCTGGGATCCCCGATCACC CGTTGCGGCTTCTAAGAATAGGAAATCA
AGCCTTCTTGCAAGAGTTTGTGCTGCCTCCAGTTCAATTGCCGCAGTATTTCACTTTTGACCTGACGGCTCTAAAGC
TGATCACTCAACCTCTCCCGGCAGCAACCTGGACGGATGATACTCCGACCGGTCCTACAGGAATACTTCGTCTCTGGA
ATTTCTTTTCATCCCAAACCTGAGACCTATCCTATTGCCAGGGAAGACCGGGAAAAGAGGATCCAGCTCCGATCTTAC
TTCTCCTGATAAAATACAAGCAATAATGAACTTTCTCCAAGACCTCAAACCTCGTGCCGATTGATCCAGCCAAGAACA
TTATGGGTATTGAAGTGCCGGAACCTTTGGTCCACAGACTAACTGGAAAGAAAATCACAACAAAAAATGGTCAACCA
ATAATTCCTATTCTTCTACCAAAGTATATTGGCATGGATCCCATTTCTCAGGGAGACCTCACAATGGTCATCACTCA
AGACTGTGACACTTGCCATTCTCCTGCTAGTCTTCTCCAGTCAGCGAGAAATGAGCATGAAGTCCGAGGCTGCCCCG
GCCCACACGACCCCCAGGGCCTTCGTCCGGCTACCGAACCAACCATCCGACCTTCATCAAAACCAAAAAATACCGCC
ACGCGAAAGCTAAAATGCAGGACCACAATCCAACCAGCAACACCATCCATACACAGGTATCAATTGGGCTGCCGCAG
CATATAGACCCAATAGCAAGCTGCTGTCCAGAAAAATAGTTCCGGAAAGTAACTCAACCATCGCAAGCCCAATGCAGC
TTTCAGAAATCCGCCAGCAACCCAACTCCACTGTACCCCAATATTAACCTGAATCGACTAACCGCACTTTAATTTG
AAGTACATTTGTTCAATGGGTTCAATTATTAACAGTGTTGCTTTTAGATTGTACCTTTGCTCACAGATAGTAAATTGT
TATGGTATCAAATCTTATTAAGAAAAAGAACACGATGAAGATTAACGCGACCTAGAGCGCTGCCTTCATCTCATCAA
TTTAACTTGTCAATAGAGCAACCTAGTTTGTGATTACTCATCTTCCGTAGTTGACAAACACTTTGCTGGTTAATTGT
AAATATACCACAGTCATCATGGTTACATCAGGAATTCTACAATTGCCCGTGAACGCTTCAGAAAAACATCATTTTT
TGTTTGGGTAATAATCCTATTTTCAAAAGTTTTCCCTATCCCATTGGGCGTAGTTCACAACAACACTCTCCAGGTAA
GTGATATAGATAAATTGGTGTGCCGGGATAAACTTTCTCCACAAGTCAGCTGAAATCGGTGCGGCTTAATCTAGAA
GGTAATGGAGTTGCCACAGATGTACCAACAGCAACGAAGAGATGGGGATTCCGAGCTGGTGTTCACCCAAAGTGGT

GAACTACGAAGCTGGGGAGTGGGCTGAAAACCTGCTACAACCTGGACATCAAGAAAGCAGATGGTAGCGAATGCCTAC
CTGAAGCCCCTGAGGGTGTAAAGAGGCTTCCCTCGCTGCCGTTATGTGCACAAGGTTTCTGGAACAGGGCCGTGCCCT
GAAGGTTACGCTTTCCACAAAGAAGGCGCTTTCTTCCCTGTATGATCGACTGGCATCAACAATCATCTATCGAAGCAC
CACGTTTTTCAGAAGGTGTTGTGGCTTTCTTGATCCTCCCCGAAACTAAAAAGGACTTTTTCCAATCGCCACCACTAC
ATGAACCGGCCAATATGACAACAGACCCATCCAGCTACTACCACACAGTCACACTTAATTATGTGGCTGACAATTTT
GGGACCAATATGACTAACTTTCTGTTTCAAGTGGATCATCTAACTTATGTGCAACTTGAACCAAGATTCACACCACA
ATTTCTTGTTCCAATCAATGAGACCATTTATACTAATGGGCGTCGCAGCAACACCACAGGAACACTAATTTGGAAAG
TAAATCCTACTGTTGACACCGGCGTAGGTGAATGGGCCTTCTGGGAAAATAAAAAAACTTCACAAAAACCTTTCAA
GTGAAGAGCTGTCTGTCATATTTGTACCAAGAGCCCAGGATCCAGGCAGCAACCAGAAGACGAAGGTCACTCCCACC
AGCTTCGCCAACAACCAAAACCTCCAAGAACCACGAAGACTTGGTTCCAGAGGATCCCGCTCAGTGGTTCAAGTGCG
AGACCTCCAGAGGGAAAAACACAGTGCCGACCCCCACCCACAGACACAGTCCCCACAACCTCTGATCCCCGACACAATGG
AGGAACAAACCACCAGCCACTACGAACCACCAAAACATTTCCAGAAACCATCAAGAGAGGAACAACACCGCACACCCC
GAAACTCTCGCCAACAATCCCCCAGACAACACAACCCCGTCGACACCACCTCAAGACGGTGAGCGGACAAGTTCCCA
CACAACACCCTCCCCCGCCCAGTCCCAACCAGCACAATCCATCCCACCACACGAGAGACTCACATTCCCACCACAA
TGACAACAAGCCATGACACCGACAGCAATCGACCCAACCAATTGACATCAGCGAGTCTACAGAGCCAGGACCACTC
ACCAACACCACAAGAGGGGGCTGCAAATCTGCTGACAGGCTCAAGAAGAACCCGAAGGGAAATCACCTGAGAACACA
AGCCAAATGCAACCCAAACCTACACTATTGGACAACCCAAGATGAAGGGGGTGCCATTGGTTTAGCCTGGATACCTT
ACTTCGGGCCCCGAGCAGAGGGAATTTATACGGAAGGGATAATGCACAATCAAAATGGGCTAATTTGCGGGTTGAGG
CAGCTAGCAAATGAGACGACTCAAGCCCTACAGTTATTCTTGCGTGCTACCACGGAATTGCGCACTTTCTCTATATT
GAATCGAAAAGCCATCGACTTTTTACTCCAAAGATGGGGAGGAACGTGCCACATCTTAGGCCCAGATTGCTGTATTG
AGCCCCATGATTGGACTAAGAACATTACTGACAAAATAGATCAAATCATTCATGATTTCATTGATAAACCTCTACCA
GATCAAACAGATAATGACAATTGGTGGACAGGGTGGAGGCAATGGGTTCCCTGCCGGGATCGGGATCACGGGGGTAAT
AATCGCAGTTATAGCACTGCTGTGTATTTGCAAATTTCTACTCTAATCTAGTCCGACTCTGTACCAGCATAATGGCC
TCTAAATAAGCTTTTGCTTCTGCTTCCCTATAGTTAATACATTTTCAGCAAAAATCAACTATTAAGTCAAAAGAAGAT
CCCTCTAATAATCCTAATTACCTTCAAAAATCTAGAACTTTATTAATTCTCAGGGTATTTAGAACAGCCAGATGACT
TGACTAAGTTTGTACTGTAATAAAAAAGATACTTGATGAAGATTAAGAAAAAGACAGTCTTGTGATTGTCACTAATCT
TCATCTCAAAACATATTATTTTACCAGAAGCTACTATAGCCTACCTCCTTGACACATAGCAAACCTTACTCATGTTG
ATAATTGTTTGCTGCTATTTACATATTTACTAACTTACAAAATTATCTTGGGGATTTCTCTGAACATATAATCAGA
ATTGGCATTTAAACACAAGTTAGTCCTAATGGACTCATTTTCATGAGAGAGGGCGTAGCAGAACTATTCGACAGAGT
GCAAGAGATGGGCCGAGTCATCAAGTAAGAACAAGATCATCCTCCAGAGACAGCCACCGCAGCGAATATCATAACCC
TAGGAGCTCTTCCCAAGTTCGAGTCCCGACTGTGTTTCATCGGAAGCGTACTGATTCTTTGACAGTTCCACCAGCAC
CAAAGGACATATGTCCTACCTTAAGGAAAGGATTTTTGTGTGACAGCAATTTTTGTAAAAAGGACCATCAACTAGAA
AGTTTAAACAGATAGGGAGCTGCTTTTGCTGATTGCACGGAAAACCTGCGGCTCCCTTGAACAACAATTGAACATCAC
TGCTCCTAAAGATACAGATTAGCAAATCCAATTGCAGATGATTTCCAACAAAAAGACGGCCCAAAATTACACTAT
TGACACTTTTGGAGACTGCGGAGTATTGGTCAAAACAAGATATCAAGGGCATTGATGACTCAAGACTAAGAGCATT
CTAACCCTTTGTGCCGTATGACGAGGAAATTTCTAAAAATCCCAGCTTAGTCTATTGTGTGAGAGTCATCTACGACG
AGAAGGGCTAGGACAGGATCAATCAGAATCTGTTCTTGAAGTGTATCAGCGCTTACATAGCGACAAAGGCGGAAATT
TTGAGGCAGCCCTATGGCAACAATGGGACCGACAGTCCTTGATCATGTTTATAACAGCATTTCTTAATATTGCTTTA
CAATTACCCTGTGAAAGTTCATCTGTTGTTATTTTCAGGATTAAGGCTGCTAGTGCCTCAATCAGAAGATACCGAGAC

CTCAACCTACACCGAGACACGTGCATGGTCAGAGGAAGGTGGCCCCCATTAACATCTTCCACAGTCGAATCTACCAT
AATTTCCCTATTCAACGCAGATAAGAATCAGTACTAAACCACAAGTGCAAAAATTAACAAAACACCAGCATAAGTGA
AATCCTGTCTGTGATTAGCAACACGAATGATCTTCAATCCTGTTGCAATTCGCCAGTGATAATTGTATTACATTGT
GGCCACAATATACTGTCTTTTCCCATTTGAAAAATAAGGCTGAATCTATTACGCTACACAACTTACAGGATTAGCAC
CACGACGGCTCAATACTATACCTATTGGTCACGGCTCGATGTGTTAATCACTTATATTGTATTCAATTTGAAATTACT
CATTAGGCAAATACTTTGATTAAGAAAAATAATTGGAACCAGAAAATCCCTAGGTATTTAAATTCCTATCTCCG
GAGATCCGAGATAATTAATCAAGCAATGAGGGAACAATGGTGAACAACAACATATTGTTGCCCCCTTTAGATTGGTC
AGTTCCAAAAACAAGTGATGAAGATTAATGCAGATGTCCAAGGAACACATATTTGTGATTTAAACGTTCCAGTTAGA
CTCTGTTCAAGGATCTTCATCTTTTGTAGCTCCACTCTGAGTCACAACATAATTGAGTTTTTGTCTCAGAACAGTTAT
CAGGATTAAATTCTCTCAAATAACTGAACTACTAGCATCACTCTCAATTTCACTTACGACAATCATTATCTTA
ATAATATTTCTCTAAATTACTGACTTAATTAGCTTGTAATCAGATAATATCGAAACCAATTTATCATAAGGCATAAT
TTGTATAAGTGATTTAGGATTTACCCAGAGTGAAATAATTCTTAGAATAAAAGACCGACTAGAATATCCTTAAGG
CTGTCTAACGTGCCACACAGCTAGGGTTAGCCTGACATCTGGAACAAGATCGATACTAATATAGGGATTTGTTTCAT
ACTAGCTCTCTGCAAACACAATGGCTAAGGCAACAGGTAGGTACAACCTGGTTTCACCTAAAAAGGACCTCGAGAGG
GGGCTTGTTTTGAGTGATTTGTGCACGTTTTTAGTTGATCAGACTATCCAGGGGTGGCGGGTGACTTGGGTTGGGAT
TGAATTTGACATCGCCCAGAAAGGGATGGCTCTACTGCATCGGTTAAAACTGCTGACTTCGCTCCTGCATGGTCGA
TGACAAGGAATTTATTTCTCATTTATTTCAAAATTCAAATCTACTATTGAGTCTCCCTCTGGGCATTACGAGTG
ATTCTGGCAGCTGGTATTCAAGACCAGTTAATTGACCAATCCTTGGTAGAACCGTTGGCCGGAGCCCTGAGCTTAGT
CTCCGATTGGCTTCTTACAACAAACACAAACCATTTTCAAAATGCGCACGCAGCACGCTAAAGAGCAACTGAGCTTGA
AGATGCTATCATTAGTGCCTCTAATATCTTGAAATTCATCAGTCAATTGGACGCACTACATGTCGTGAACCTACAAT
GGACTCTTGAGCAGTATCGAAATTGGCACTAGAAATCATACCATTATCATCACAAGAACCAACATGGGTTTCCTGGT
AGAATTACAGGAGCCTGATAAATCTGCCATGAATCAAAAGAAACCAGGACCAGTCAAGTTCTCCCTCCTGCATGAAT
CAACCTTCAAGGCTCTAATCAAAAAACCCGCAACTAAGATGCAGGCCTTGATTCTGGAATTTAACAGCTCCCTGGCA
ATATAGTCCAACGCTACCAACCATCATTTTTTGTAACTGCATCTCTTTATTTCCCTTCTAACTTGATACAATTATA
ATCAAGATCCCTAATCCCTTTTGACGAAGTGGGCTAATTTTTGCTCATTCTAATAATAAATCATAACCTGAATAAAA
GACACCACAATATTATAACCCAATAACACCTAGAGAATTTCTGAATTGCTAAAGATTATATACTCGCACTAAGAGAC
AAGTTAATCAATCTTTACTTAATAATACTAAATGCTAGATAGCTCTGGCTAACTAACCTGAGTTGTGGATTACTC
CTTTTAAAGTCTATCAATTTAAGCTTATCACTAATATTAAGGAGGACTTTTTAAATAAGAGCAAGTGTTATGTAGT
CTTACTAAGAATGATTTGAGGAAGATTAAGAAAAAGTGCTTGTTGGGGTCTTTCCGTTGTAGAGGACACACGAGCAAA
CTTCTTCCTCTAATTTTAATATGGCAACTCAACATACACAATATCCAGATGCAAGATTATCTTCACCCATTGTCTTA
GATCAATGTGATCTTGTACCCGTGCTTGCGGTCTGTATTCTTCATACTCATTAATCCTCAGTTGAAAAATTGTAG
ACTACCAAAACATATTTACCGCTCAAATTTGATGCTACGGTTACAAAATTTTAAAGCGATGTTCCAATAGTTACAT
TGCCGATAGATTACTTGACCCCTTTACTTTTACGAACTTTATCCGGGGAGGGCTTATGCCCTGTGCAACCAAAGTGC
AGCCAATTCTTAGATGAAATAGTAAGTTATGTTTTGCAGGATGCACGTTTTTTAAGATACTATTTTAGGCATGTTGG
AGTACACGATGACAATGTTGAAAAAATTTGAGCCAAAGATTAAGGCTTTGATTTATGATAATGAATTTCTGCAAC
AATTGTTTTATTGGTACGATTTAGCAATCCTAACGCGTAGAGGGCGCTGAATCGAGGGAATAACCGTTCAACATGG
TTTGCAAATGACGATTTAATAGACATTCTCGGGTACGGTGATTATATTTCTGGAAAATACCGTTGTCATTGTTGTC
ACTCAACACAGAGGGGATTCTCATGCAGCTAAGGACTGGTATCACGCATCAATCTTCAAAGAAGCGGTTCAAGGTC
ACACACATATCGTGTGAGTTTCCACTGCAGATGTTTTAATTATGTGTAAGGACATCATAACCTGTCGTTTCAATACC

ACACTCATTGCAGCATTGGCAAATTTAGAAGATTCTATCTGTTCTGACTATCCACAACCTGAAACAATCTCTAATCT
GTATAAGGCAGGGGATTACTTAATCTCGATACTGGGTTTCAGAAAGTTATAAGGTCATAAAGTTTTTAGAACCACTAT
GTTTAGCTAAGATCCAATTGTGCTCAAATTACACTGAGAGGAAAGGGAGATTCCTTACTCAAATGCATTTGGCCGTT
AATCACACACTTGAAGAACTTATTGAGGGCCGGGATTGAAGTCACAACAAGACTGGAAGATGAGGGAATTTACCCG
AATCTTAGTAAATTTAAAGTCAACACCACAACAACCTCTGTGAATTGTTTTTCAGTGCAAAAGCATTGGGGGCATCCTG
TGCTACATAGCGAGAAGGCTATTTCAGAAAGTAAAGAAACATGCAACCGTAATAAAAGCATTGCGTCCCGTAATCATC
TTTGAGACATATTGTGTGTTCAAGTACAGCATTGCCAAACATTATTTTGATAGCCAAGGGTCATGGTATAGTGTAAT
CTCAGATAAACATCTAACACCAGGTTTACACTCTTACATTAAGAGGAACCAATTTCCGCCACTGCCTATGATTAAAG
ACTTATTGTGGGAATTCTATCACCTTGATCATCCTCCCTTATTTCCACCAAGATTATTAGTGACTTGAGTATTTTC
ATTAAGGATCGCGCTACCGCAGTGGAAAAACATGTTGGGATGCAGTTTTTCGAGCCTAATGTTCTTGATATAGTCC
TCCAAACAAGTTCTCAACTAAGAGGGTTCTGAACAGTTTCTGAACAAGAAAATTTCTCGATTGATAGTGTTCTCA
CTTATGCCCAGCGCTGGATTATCTACTTCCACAATACCGGAATTTTCTTTCTCACTTAAGGAAAAAGAATTAAT
GTAGGACGAGCTTTTGGTAAGCTACCTTATCCTACACGTAATGTTCAAACCTTATGTGAAGCCTTATTGGCAGATGG
ATTAGCTAAAGCCTTTCCTAGTAACATGATGGTTGTAACAGAGCGTGAGCAGAAGGAAAGCCTCTTGCACCAGGCGT
CGTGGCACCACACAAGTGACGATTTTCGGTGAGAATGCCACTGTTAGAGGCAGCAGTTTTGTTACCGACCTAGAAAAA
TACAACCTGGCATTTAGATATGAGTTTACAGCTCCATTTATTGAATACTGTAATCGATGTTATGGTGTAAAAAATTT
ATTCAATTGGATGCATTATACGATACCGCAATGTTATATACATGTAAGTGATTATTATAATCCCCCTCATGGAGTTT
CGCTAGAAAATCGGGAAGATCCCCCGGAAGGCCCTAGCTCTTACCGTGGTCATCTTGGGGGAATTGAGGGACTCCAA
CAGAAACTCTGGACCAGCATTTTCATGTGCACAAATCTCATTAGTTGAGATCAAGACTGGTTTTCAAATTGAGATCTGC
GGTAATGGGTGATAATCAATGCATCACAGTTCTTTCCGTATTTCTCTAGAGACAGATTCCAATGAGCAAGAGCATA
GCTCCGAGGACAATGCTGCTCGGTAGCAGCCAGTTTAGCCAAAGTCACGAGTGCCGTGTGGCATCTTCTTAAACCA
GATGAGACTTTTGTGCATTCAGGCTTTATTTATTTTCGGTAAGAAGCAATATTTAAATGGCGTTCAATTGCCACAATC
ACTCAAGACTGCTACCAGGATTGCTCCCTTGTGAGATGCAATCTTTGATGACCTTCAGGGAACCTCTGGCTAGTATAG
GAACGGCATTGAGAGATCTATATCCGAGACTAGACATGTATACCCTTGCCGGTGGTTGCCGCATTCCATACATTC
TTCTCCGTAGGATCCTCCAATACCACCACCTTGGTTTCAACAAAGGAACCGATCTAGGTCAACTATCACTAAGCAA
ACCGTTGGATTTTCGGAACCTATCACTCTTGCTTTAGCGGTACCTCAAGTTCTAGGAGGTTTATCGTTTTTAAACCCAG
AGAAATGTTTTTATCGCAACCTTGGAGACCCGTGACCTCCGGCCTATTCCAACCTTAGGACTTACCTGCAATGATC
AACATGGACGACTTATTTCTACCTTTAATTGCCAAGAACCCCGGGAACCTGTAGTGCAATTGACTTTGTACTCAACCC
AAGCGGATTGAATGTCCCTGGGTCAACAAGACCTAACATCTTTTTTACGTCAGATAGTGCGTAGAACAAATCACATTGA
GTGCAAAAAATAAGCTAATAAACACATTGTTTCACTCCTCAGCCGATTTAGAAGATGAGATGGTATGTAAATGGCTA
CTTTCTTCAACACCTGTAATGAGTCGGTTTGCTGCTGATATATTCTCTCGTACTCCGAGTGGGAAGCGCTTGCAGAT
CCTAGGTTATTTAGAAGGGACTAGAACCTTGCTAGCCTCCAAAGTCATCAATAACAATGCAGAGACTCCTATTTTAG
ATAGGTTGAGGAAAAATCACACTGCAGAGATGGAGTTTGTGGTTTAGCTACCTAGACCACTGTGATCAGGTTCTAGCA
GATGCTTTAATAAAAGTTTTCTGTACAGTTGATTTGGCGCAAATTTTACGTGAATATACCTGGGCACACATACTAGA
GGGAAGACAGCTCATTGGTGCAACACTTCCTTGATGTTAGAACAATTTAATGTGTTTTGGCTCAAATCGTACGAAC
AATGCCCTAAATGTGCAAAATCTAGAAATCCAAAAGGAGAGCCATTTGTGTCAATTGCAATTAAGAAACAAGTTGTG
AGTGATGGCCGAATCAGTCACGGTTAAATTGGACCATTGGGGACGGTGACCTTACATCGGGTCTCGAACAGAGGA
CAAGATTGGGCAGCCAGCAATCAAGCCTAAGTGCCCTCTGCTGCCTTACGTGAAGCAATAGAGTTGACATCTAGAC
TAACATGGGTACCCAAGGTGGTGCCAATAGTGATTGCTAGTTAAACCTTTTGTAGAGGCACGAGTAAACCTGAGT

GTGCAGGAGATCCTTCAAATGACGCCTTCTCATTATTCAGGGAACATCGTACATCGGTATAATGACCAATACAGCCC
TCATTCTTTTCATGGCAAATAGAATGAGTAATTCCGCGACGAGATTGGTGGTGTGACAAATACTCTCGGGGAGTTCT
CAGGTGGGGGGCAATCAGCAAGGGACAGCAATATCATCTTTCAAATGTAATCAATTTTCGGTTGCCCTATTTGAT
TTACGATTTTCGGAACACCGAAACATCCTCCATTCAGCATAATCGTGCCCATCTCCATCTTTCACAGTGTTCACACG
GGAAGTCCCAGCTCAATACCTAACCTACACGTCTACGCTTTCCTTGGATCTCACAAGGTACCGAGAGAATGAGTTAA
TTTATGATAACAATCCGTTAAAGGTGGACTTAATTGCAACCTATCCTTTGATAATCCACTTTTCAAGGGCCAAAGG
CTCAATATCATAGAGGAGGATTTGATTAGATTTCTCATCTATCTGGGTGGGAACCTGCGAAAACCATCATTTCAGTC
CATTATCTCAGACAGCAATAACTCATCCACAGACCCCATTAGCAGTGGAGAAACACGATCATTACAACTCACTTTC
TCACATATCCTAAGGTTGGGCTCCTCTATAGTTTCGGCGCCATCGTGAGTTATTACTTAGGGAATACCATTATTAGG
ACCAAAAAGCTAGACCTCAGTCATTTTATGTATTACTTAACAACTCAAATCCATAATTTGCCACATCGCTCGTTGAG
GATACTTAAGCCCACCTTTAAACATGTTAGTGTGATATCAAGACTAATGAGTATTGATCCTCATTTTTTCAATCTACA
TCGGGGGTACGGCAGGTGATCGAGGGCTTTCGGATGCTACCAGACTATTCCTTCGAGTGGCCATTTCTTCCTTCCTT
CAATTTATCAAAAAATGGATCGTGGAATACAAGACAGCTATTCCTCTGTGGGTATATACCTTTGGAGGGACAAAA
TCCAGATCCAATTAATAGCTTTCTACATCTGATTATAGCCTTACTGCAAAATGAATCCCCTCAAAACAACATCCAAT
TCCAAGAAGACAGAAATAATCAACAGTTGTCCGATAATCTAGTTTACATGTGCAAGAGCACTGCCAGTAATTTCTTC
CATGCATCACTTGCTTATTGGAGGAGCCGGCACAAAGGACGGCCCCAAAAATCGATCGACCGAAGAACAGACAGTTAA
ACCCATACCATATGATAATTTTCATTCTGTAAATGTGCCTCAAACCCACCAAGCATCCCCAAATCTAAGTCAGGAA
CTCAAGGTTCAAGCGCATTTTTTGGAGAACTTGAATATGATAAAGAAAGAGAATTGCCAACAGCTTCCACACCAGCC
GAACAATCCAAGACCTATATCAAGGCCCTATCCAGCCGAATTTATCATGGTAAAACACCATCCAATGCCGCAAAAGA
TGATTCAACAACCTCCAAGGGCTGCGATTCCAAAGAAGAAAAATGCCGTTCAAGCTTCACACCGAATTGTCCTACCAT
TTTTTACATTGTACAGAACGACTACAGAACTCCCTCAGCTAAAAAGTCAGAGTATATAACTGAAATCACAAACTA
ATTCGACAATTAAGGCAATTCCAGATACCACTGTATACTGTGCTTTACAGGGGTGTATCTTCAATGCATTATAA
GCTTGATGAGGTTCTCTGGGAATTCGATAGTTTCAAACCTGCTGTGACTCTAGCTGAAGGAGAAGGGTCAGGTGCCT
TATTACTACTACAAAAATATAAGGTCAGAACAATCTTTTTTAACACTTTAGCTACAGAGCATAGCATCGAGGCAGAA
ATAGTTTCTGGGACAACCACACCTCGAATGCTCCTTCCTGTAATGGCCAACTTCATGATGATCAAATAAATGTAAT
ATTAAACAATTCTGCTAGCCAGGTACTGATATCACTAACCTGCATGGTTCAGTACCAGAAATCTAGAATCCCCA
CACAAGTTGAGATTATGACTATGGATGCTGAAACGACAGAAAATATTAATCGGTCAAATTTATATGAGGCTATTCAG
CAATTAATTGTTTCACACATTGATACAAGGGTGCTAAAGATTGTTATTATAAAGGTTTTTTTAAGTGATATTGAAGG
TCTCCTGTGGCTTAATGACCATCTTGCCCTTTATTCGGATCCGGCTATTTAATTAAACCTATTACTTCGAGTCCAA
AGTCAAGCGAATGGTACTTATGTCTTTCAAATTTCTTTTCAGCCTCTCGACGACGGCCTCATCAGGGTCATGCTACC
TGATATGCAAGTCATCCAAACAGCGCTACGACTCCAAGTTCAAAGGAGTTCATACTGGCTTAGCCATTTAGTGCAATA
TGCTGATATTAATTTGCACTTGAGTTATGTTAATTTGGGTTTCCCTTCATTGGAAAAGGTTCTTTACCATCGATATA
ACCTAGTTGATTCACGGAAGGGTCCACTGGTCTCGATCCTTTACCATTTAACACACTTGCAAGCAGAGATTAGAGAA
TTAGTGTGTGACTATAATCAGCAACGACAAAGTCGAACCCAAACATACCACTTCATCAAACGACAAAGGGCCGGAT
TACAAAATTAGTCAATGACTACCTTAAATTTTATCTCGTAGTGCAAGCACTGAAGCATAATTGTCTTTGGCAGGAAG
AACTCAGAACACTTCCTGACTTAATCAATGTTTGCAATCGATTTTACCATATAAGGGACTGCTCATGTGAAGATCGA
TTTTTAATTCAAACCTTTTACTTAACCCGTATGCAAGACTCAGAAGCAAAATTAATGGAGAGATTAACCGGGTTTCT
AGGATTGTATCCTAATGGTATTAACGCTTAAGATCCCCTTAGAGGCATCGCAATATGACTCCAAACATTAAATGATA
TTGCTGTCAATACATCTACCTGACCGAGAGCAAGGTTTATTATAAAAAACCTATACACATGACTGCAATGCGTAATT

TATACCGAAACACAGTGAGGGCTGCACATGCAGGTTCCCTGTTGAGCTTTAAAAGATCATGCAATATAAAATGATATT
TGTATACTAATCATGTTAGTACTAATAACAGTACTCACTGCATATACTCTATCAATTAAGAAAAATTACTGTGGTT
TATGCATTTAAATGACATCACAGATGGATATAATATAGTTAATTCTTACCTAAATGTTGAGTTATAGTAATTTGAAG
TTATAATTATGATTAGTGCTTATACTATAAAATAATAGCTATACCAAGTATACACAAGAAGTTATGATTTTGTATTCA
AATTATATTCACAGGAACCTTGTGATTAATAATAAAAGTCTCAGTTGTTGGTTGTTGAGTTGTAAACTCCCGTTAAA
AATTTATTTTCCACTTATACTAATAATAATCATAGATCAGTATGAGTTGAGGCTATTCAAACCTTAGAAAAATTGT
GCGATGTTTTTTACCATGTCAATCTTGATTTCAATGATATTGGAGGGCTTGTCGATAAATTCAGTAATTAACATTAA
GTCAGTGTGGAACCTCATTGGATATTTGATCGTACACAAAATATCTTTACAAAATTGTTTTCTCTTTTTTGTGTGTC
CA, (SEQ ID. NO: 5).

SEQ. ID. NO: 6

CGGACACACAAAAAGAAAAAGGTTTTTTAAGATTTTTTGTGTGCGAGTAACTATGAGGAAGATTAACAGTTT
TCCTCAGTTTAAGGTATACACTGAAATTGAGATTGAGATTCTCCTCTTTGCTATTCTGTAACCTTCCCTGGTTGTGA
CAATTGAATCAGTTTTATCTATTACCAATTACCATCAACATGGTATGTCTAGTGATCTTGGGACTCTTCTTCATCTG
GTTTTTCTAGAGCTCTGAATCTATTTTGTGAGAAGTTCATCCAAACGACCCAGTGTCTGAAAATACAAGAGGTTCC
CCTTTCCGTCAAGTTTAAGGGTTGTTTTGATTGTGTGTAGATTTTATAATCCTAGAGTGCCAAGGAGTTGCGTGTC
ATCATTAAATTGGGAAGATCAAGGAAACAATTTGTTCCAATAATATCGTACATCTTGAATAAGTGAACAAGGGGAAG
TCGATATGGATCGTGGGACCAGAAGAATCTGGGTGTCGAAAAATCAAGGTGATACTGATTTAGATTATCATAAAATT
TTGACAGCTGGCCTTACTGTTCAACAGGGAATTGTCAGGCAGAAAATAATTTCTGTATATCTTGTGATAACTTGGA
GGCTATGTGTCAATTGGTAATACAAGCCTTTGAGGCCGGAATTGATTTCCAAGAAAATGCCGACAGCTTCCTTCTGA
TGCTTTGCCTACATCATGCTTACCAAGGTGACTATAAATTGTTCTTGGAGAGCAATGCTGTACAGTATTTGGAAGGT
CATGGATTCAAATTTGAGCTCCGGAAGAAGGACGGTGCAATCGGCTCGAGGAATTGCTTCCTGCTGCAACGAGTG
AAAAACATCAGGCGTACGTTGGCCGCACTGCCTGAAGAGGAGACTACAGAAGCAAATGCAGGGCAATTTCTCTCAT
TTGCGAGTTTGTCTTCCCAAACTGGTTGTGGGAGAGAAGGCTTGCTTGAAAAAGTCCAGCGACAAATTCAGGTT
CATGCAGAACAGGGTTTAATTCAATATCCCACTGCATGGCAATCAGTTGGACACATGATGGTAATCTTCAGATTGAT
GAGGACTAATTTCTTGATTAATATTTACTGATCCACCAGGTATGCATATGGTAGCTGGCCACGATGCCAATGATG
CTGTCAATTGCTAATTCAGTTGCTCAGGCTCGCTTTTCAGGACTCCTAATTGTCAAACCGTTCTTGATCATATTCTG
CAGAAAACCGACCAAGGAGTAAGACTTCACCCCTTTGGCCCGAACAGCCAAAGTGCGTAATGAGGTTAATGCATTTAA
GGCCGCCCTAAGCTCACTTGCTAAGCATGGGGAATATGCCCTTTTGCTCGCCTTCTCAATCTCTCGGGAGTTAACA
ACCTAGAACATGGTCTCTACCCACAGTTATCAGCAATTGCTCTTGGAGTTGCCACAGCACATGGTAGCACCTTGCA
GGAGTTAATGTTGGTGAGCAGTATCAGCAGCTTAGAGAGGCTGCCACTGAAGCTGAGAAGCAACTCCAACAATATGC
TGAGTCCAGAGAACTCGACAGCCTAGGCCTAGACGATCAGGAAAGAAGAATACTAATGAACTTCCATCAGAAGAAAA
ATGAAATTAGTTTCCAGCAGACCAATGCAATGGTAACCTTAGGAAAGAGCGACTGGCCAAATTAACAGAAGCTATA
ACGCTGGCCTCAAGACCTAACCTCGGGTCTAGACAAGACGACGACAATGAAATACCGTTCCCTGGGCCTATAAGCAA
CAACCCAGACCAAGATCATCTGGAGGATGATCCTAGAGACTCCAGAGACACTATCATTCCTAATAGTGCAATTGACC
CCGAGGATGGTGATTTTGAATAATACAATGGCTATCATGATGATGAAGTTGGGACGGCAGGTGACTTGGTCTTGTTT
GATCTTGACGATCATGAGGATGACAATAAAGCTTTTGAGCTACAGGACAGCTCACCACAATCCCAAAGGGAAATAGA
GAGAGAAAGATTAATTCATCCACCCCCAGGCAACAACAAGGACGACAATCGGGCCTCAGACAACAATCAACAATCAG
CAGATTCTGAGGAACAAGAAGGTCAATACAACAGGCACCGAGGCCAGAACGTACGACCGCCAATCGAAGACTCTCA
CCAGTGCACGAAGAGGACACCCCTATAGATCAAGGCGATGATGATCCCTCAAGCCCACCTCCGCTGGAATCTGATGA

TGACGATGCATCAAGTAGCCAACAAGATCCCGATTATACAGCTGTTGCCCCCTCTGCTCCTGTATACCGCAGTGCAG
AAGCCCACGAGCCTCCCCACAAATCCTCGAACGAGCCAGCTGAAACATCACAATTGAATGAAGACCCTGATATCGGT
CAATCAAAGTCTATGCAAAAATTAGAAGAGACATATCACCATCTGCTGAGAACTCAAGGTCCATTTGAAGCTATCAA
TTATTATCACATGATGAAGGATGAGCCGGTAATATTTAGCACTGATGATGGGAAGGAATACACCTACCCGATTAC
TTGAGGAAGCCTATCCTCCATGGCTCACCGAGAAAGAACGACTGGACAATGAAAATCGATACATTTACATAAATAAT
CAACAGTTCTTCTGGCCTGTCATGAGTCCCAGAGACAAATTTCTTGCAATCTTGACGACCATCAGTAACCACAGCA
CAAAGCGCGGTCCACTTCGTAAAGCTAAATACACTTAAAGCTTGACCGATTATCTACAAAACTAATCCATTATAA
CTTATTAGTGCTACTTTTCTATAAGTGATTCTCAATCTAAGGCCATTAAGAGTTTAAGCAATATACATATACACTTA
CACCGGTCTATCCAAGATGTGGCTCAATGTTCTTAATTTGAACATAGTCATAAGGGGATAAATAATACTTTATATTT
CTGATTGTGGATTGACCCATTCTGCTTAAAAATGCTTCGCCCATTA AAAATGTGATCTAATAGATAGCCCTGACTAGA
CCAATTAAGAAAAACATTTGATGAAGATTA AAAACCTTCATCGCCAGTAAATGATTATATTGTCTGTAGGCAGGTGTT
TACTCCACCTTAAAGTCGGAAATATCCTACCTTAGGACCATTGTTAAGAGGTGCATAGGCATTACCATCCTTGAGAA
CATGTATAATAATAAATTGAAGATATGTTCAGGCCAGAAAACAACTGGATGGATTTCTGAGCAACTAATGACAGGTA
AGATTCCAGTAACTGATATATTCATTGATATTGATAACAAGCCAGATCAAATGGAAGTCCGGCTCAAACCATCATCA
AGGAGCTCAACCAGA ACTTGTACAAGTAGCAGTCAGACGGAGGTCAACTATGTACCTCTCCTTAAAAAGGTTGAGGA
TACATTA ACTATGCTAGTGAGTGCAACCAGTCGTCAGAATGCTGCAATCGAGGCCCTTGAAAACCGCCTCAGCACAC
TTGAGAGTAGCTTAAAGCCAATCCAAGACATGGGTAAAGTGATTTTCATCATTGAATCGCAGTTGTGCCGAAATGGTG
GCAAAATATGATCTTCTAGTTATGACAACTGGACGGGCTACTTCAACCGCAGCTGCAGTAGATGCGTACTGGAAAGA
GCACAAACAGCCACCACCAGGGCCAGCGTTGTATGAAGAGAATGCGCTTAAAGGAAAAATCGATGATCCAAACAGCT
ATGTACCAGATGCTGTGCAGGAGGCTTACAAGAACCTTGACAGTACATCGACCCTGACCGAGGAAAATTTGGGAAA
CCTTATATATCTGCTAAAGATCTGAAGGAGATCATGTATGATCATCTACCTGGTTTTGGGACTGCCTTTCACCAACT
TGTTCAAGTGATTTGTAAAAATAGGAAAGGATAACAACCTCTTGGACACAATCCATGCTGAGTTCCAGGCAAGTCTAG
CAGATGGTGACTCTCCCCAATGTGCACTCATACAGATAACCAAAAAGAGTCCCAATCTTTCAGGATGTGCCGCCCCCG
ACAATCCACATTAGATCCCGTGGTGATATCCCACGAGCATGCCAAAAGAGTCTCCGACCAGCACCACCATCACCCAA
AATTGATCGTGGTTGGGTTTGTGTTTAAAGATGCAAGATGGTAAAACGCTTGGA CTTAAGATCTAAGGATCAAGAT
TTATTTAACAAGGCAAGCCACAACCTTAGATAGAACCTCAGCCAGACTATTGAACTATTGACGCTGTTGATGATAAT
ATATAATTAATGGTCATATTTGAATATGACAACATCTTGCTTCTTGTTTTGCCTTGATCTCTTTGAGTTGGAAGAT
CATTCCAAACTTACAAACATGCACAAGATGTTATGGTTTTAGCAAAGAATTGATAGGAGTACTGGTATATAATGTAAA
TATAACAAGTGATGAAGATTAAGAAAAACCAGTCGGTATTTTCCAGACTTGGCATTCTTATCTTCATCTTCTAAAG
TGAGATATTTTATCATCAAAAAATGAGACGCGGAGTGTTACCAACGGCTCCTCCAGCATATAATGATATTGCATACT
CTATGAGCATACTCCCAACCCGACCAAGTGTCATAGTCAATGAGACCAAAATCAGATGTACTGGCAGTGCCAGGAGCA
GATGTTCCATCAAACCTCCATGAGACCAGTGGCTGATGATAACATTGATCACTCAAGCCATACTCCAAGCGGAGTAGC
TTCTGCCTTTATATTGGAAGCTAAAGTGAATGTAATTTTCGGGAACAAAAGTCCTGATGAAGCAAATACCTATTTGGC
TTCCACTGGGTGTAGCTGATCAGAAGATATACAGCTTTGATTCAACAACAGCCGCAATTATGTTGGCTTCCTACACA
GTGACACACTTCGGGAAGATATCTAACCCGCTGGTACGTGTCAACAGGCTAGGCCAGGAATACCCGATCATCCGCT
ACGACTCCTAAGGTTGGGCAATCAGGCATTCTTCAAGAGTTTGTCTTCCACCAGTCCAGCTTCCCCAGTATTTCA
CATTTGATCTAACAGCTCTAAAGCTCATCACTCAACCATTGCCAGCTGCAACCTGGACAGACGAACTCCAGCAGGA
GCAGTCAATGCTCTTCGTCCTGGGCTCTCACTCCATCCCAAGCTTCGTCCAATCTTCTACCGGGGAAGATAGGAAA
GAAAGGTCATGCTTCAGACTTAACATCACCTGACAAAATTCAAACAATCATGAATGCAATACCGGACCTCAAAATTG

TCCCGATTGATCCAATCAAGAACATAGTTGGAATTGAGGTTCCAGAATTACTAGTTCAAAGGCTGACCGGCAAAAA
CCACAACCAAAAAATGGCCAACCAATTATTCCAGTTCTTCTTCCGAAATATGTTGGACTTGATCCTATATCGCCAGG
GGACTTAACTATGGTTATCACCCAGGATTGTGATTTCATGCCACTCTCCAGCCAGCCATCCGTATCACATGGACAAGC
AGGATAGTTACCAATAATTTAAATTCATTTCGAGCTATTATTCTGCTAGTAATTCGGACGGGATCAATAGACTAAAA
ATCTGATTGTATAGAATTATAAAAGAATCAAGCAGAGGCAACAGACTCACAGCTTACGCCTAGATGACTAATATTAA
GGAGTTTTTTAATCTAATTTTCCAGTCTTAAGTAATAATCATTCTTTTGTAAATTAATTATGCATTTGTAACTTAT
CGGTGCGAGATTTCTTGAGAACCCGGCGGGCTTCTACTATCTGTAGTAACCAGAAGAGAAGTTCAACCCAGTCAA
AACTAAACCAAGCAATATTCTGAATGCTCTATAGTCTATTCTAATCAGAGGTATAACAATGGCTAAGATTTCAATGA
CTCGTTAACAATCGCTAGTAATTTTAATCTCCAGATTAAGAAAAAGATATACGATGAAGATTAAGGCGACAACGAGT
CGAAACTTCATCTCTTTTAAAGATCTAACATTATCTGTTCCAAAGTCATACAAGGACACATTCAAATCAGGGATTGT
AAGCTGCTATTTCTTACCTCCCCAAATCACCTATACAACATGGGGTCAGGATATCAACTTCTCCAATTGCCTCGGGA
ACGTTTTTCGTAAACTTCGTTCTTAGTATGGGTAATCATCCTCTTCCAGCGAGCAATCTCCATGCCGCTTGGTATAG
TGACAAATAGCACTCTCAAAGCAACAGAAATTGATCAATTGGTTTGTCTGGGACAACTGTCATCAACCAGTCAGCTC
AAGTCTGTGGGGCTGAATCTGGAAGGAAATGGAATTGCAACCGATGTCCCATCAGCAACAAAACGCTGGGGATTCCG
TTCAGGTGTGCCTCCCAAGGTGGTCAGCTATGAAGCCGGAGAATGGGCAGAAAATTGCTACAATCTGGAGATCAAAA
AGTCAGACGGAAGTGAGTGCCTCCCTCTCCCTCCCGACGGTGTACGGGGATTCCCTAGATGTGCTATGTCCACAAA
GTTCAAGGAACAGGTCTTGTCCCGGTGACTTAGCTTTCCATAAAAAATGGGGCTTTTTTCTTGTATGATAGATTGGC
CTCAACTGTCATCTACCGTGGGACAACCTTTTGTCTGAAGGTGTCATAGCTTTTTTAATTCTGTCAGAGCCCAAGAAGC
ATTTTTGGAAGGTACACCAGCTCATGAACCGGTGAACACAACAGATGATTCCACAAGCTACTACATGACCCTGACA
CTCAGCTACGAGATGTCAAATTTTGGAGGCGAGGAAAGTAACACCCTTTTTAAGGTAGACAACCACACATATGTGCA
ACTAGATCGTCCACACACTCCGCAGTTCCTTGTTCAGCTCAATGAAACACTTCGAAGAAATAATCGCCTTAGCAACA
GTACAGGGAGATTGACTTGGACATTGGATCCCAAAATTGAACCAGATGTTGGTGAGTGGGCCCTTCTGGGAACTAAA
AAAACCTTTTCCCAACAACCTTCATGGAGAAAACTTGCATTTCCAAATTCTATCAACCCACACCAACAACCTCCTCAGAT
CAGAGCCCGGCGGGAACGTCCAAGGAAAAATTAGCTACCACCCACCCACCAACAACCTCCGAGCTGGTTCCAACGGA
TTCCCCTCCAGTGGTTTCAGTGCTCACTGCAGGACGGACAGAGGAAATGTCGACCCAAGGTCTAACTAACGGAGAGA
CAATCACAGGTTTCACCGCGAACCAATGACAACCACCATTTGCCCCAAGTCCAACCATGACAAGCGAGGTTGATAAC
AATGTACCAAGTGAACAACCGAACAACACAGCATCCATTGAAGACTCCCCCCCATCGGCAAGCAACGAGACAATTGA
CCACTCCGAAATGAATTCGATCCAAGGCTCGAACAACCTCCGCCAGAGCCACAGACCAAGGCCACGCCAGCGCCCA
CAGCATCCCCGATGACCCTGGACCCGCAAGAGACGGCCAACAGCAGCAAACCAGGAACCAGCCCAGGAAGCGCAGCC
GAACCAAGTCAGCCCGGACTCACTATAAATAACAATAAGTAAGGTAGCTGATTCAGTGTGAGTCCCACCAGGAAACAAAA
GCGATCGGTTTCGACAAAACACCGCTAATAAATGTAACCCAGATCTTCACTATTGGACAGCTGTTGATGAGGGGGCAG
CAGTAGGATTGGCATGGATTCCATATTTTGGACCTGCAGCAGAAGGCATCTACATTGAGGGTGTAATGCATAATCAG
AATGGGCTTATTTGCGGGCTACGTCAGCTAGCCAATGAACTACCCAGGCTCTTCAATTATTTCTGCGGGCCACAAC
AGAACTGAGGACTTACTCACTTCTTAACAGAAAAAGCTATTGATTTTCTTCTTCAACGATGGGGAGGTACCTGTGAA
TCCTAGGACCATCTTGTTGCATTGAGCCACATGATTGGACAAAAAATATTACTGATGAAATTAACCAAATTAACAT
GACTTTATTGACAATCCCTACCAGACCACGGAGATGATCTTAATCTATGGACAGGTTGGAGACAATGGATCCCGGC
TGGAATTGGGATTATTGGAGTTATAATTGCTATAATAGCCCTACTTTGTATATGTAAGATTTTGTGTTGATTTATTC
TGAGATCTGAGAGAAAAAATCTCAGGGTTACTCTAAGGAGAAATATTATTTTAAATTTACTTAAATGCTGACCA
CTTATCTTAAATGAGCAATTAATAATATGTTTTTCTGCTTCTTGCTTGATTACAATATGATATTTCTCTTAATAA

TGATTAATATATTAAGAAAACTTATGACGAAGATTAAAGGGGAGGATCGTTAACGGGAAAATCTCCCATCTCGTTC
GTCGAAGCCACGTTGGTGGTGCTTGACGCTGAGAACAACCTCCAGAGATTGTAGGTAGAAAGGACCAGCATTATAGG
TAGGGGTCAGAAAGCAACAATAGCCATAAAAGGAGAGCCTGACATTGCTATTTAATATCCTAGAACCTGATTTCTAG
GTTCTAGTTGTACAATCCGGATGATGGAGCATTCAAGAGAACGGGGTAGATCTAGCAACATGCGACATAATAGCCGG
GAACCATACGAAAATCCATCAAGGTCTCGCTCATTATCTCGGGACCCTAATCAGGTTGATCGTAGGCAGCCTCGAAG
TGCATCCCAAATTCGTGTTCCGAATCTGTTCCATCGGAAAAAGACTGATGCACTCATAGTTCCTCCGGCTCCCAAAG
ATATATGCCCAACACTCAAAAAAGGATTCCTCTGCGATAGTAAATTTTGCAAAAAAGATCACCAATTGGATAGCTTA
AATGATCATGAATTACTACTGCTAATTGCAAGAAGACATGTGGAATTATCGAGAGCAATTTCGAGATTACATCCCC
AAAAGATATGCGGTTAGCGAATCCAACAGCTGAAGACTTCTCACAAGGTAATAGTCCTAAATTAACACTTGCAGTCC
TTCTTCAAATTGCTGAACATTGGGCAACCAGAGACCTAAGGCAAATTGAGGACTCTAACTTAGAGCTCTTTTAACC
CTTTGTGCCGTATTAACAAGGAAATTTTCTAAATCCCAACTGGGTCTTCTATGTGAGACCCACCTACGGCATGAGGG
CCTCGGACAGGACCAAGCTGATTCTGTATTAGAGGTCTACCAAAGACTCCACAGTGATAAAGGAGGGAATTTGAGG
CTGCCCTGTGGCAACAATGGGACCGACAGTCGTTAATAATGTTTCATCTCTGCTTTTCTCAACATTGCTCTCCAGACA
CCTTGTGAAAGTTCTAGTGTCTAGTCTCAGGTCTTGCCACATTGTACCCAGCACAAAGACAATTCTACACCATCCGA
GGCAACTAATGATACCACCTGGTCAAGTACAGTTGAATAGAAAACCACTGGAGCTATTTTTCCACGATTGCTCTCAG
TCAATAAATTAATATAGATATAATACGACTTCGGTGTGCAATTGTCAAGGGTTCATTTGGTAATAATGATTCTTAA
AACAATCTACTATCGTAATTATCGATGGATCTACCCTATTTGACGGTACATGACTTGAATGTAATAAGGTAAGTTGG
TATCTGAGGTATTTTGTCTAGAGTATACTCAAAATCGTATGTCTAGCAAATTATCAATAGCAAAGTTAAATTCTCCT
AACCTCATATTTTGTATCAAGTAATCATGATTTTATGGTAATTCCTTGCAGATTATCGGTTTAAATCTTTATTAAGAAA
AAATCATGATTGTAGACAATTTACTGGTAGTCCCTGGGTATCCAAGTTTATGAACAGAGCTAGAGAGAATTTGCTAC
TTCCGAGGTATAACTTTATTATTTGCTACTTCGAATGCCTAAAACCAAGTAATGCAGGATGAAGATTAATTGCGGAGG
AATCAGGAATTCAACTTTAGTTCCTTAAGGCCTCGTCTGAATCTTCATCAGTTAGTAAGTTCTTTTATAGAAGTCAT
TAGCTTCTAAGGTGATTATATTTTAGTATTAAATTTTGTTAATTGCTTGCTATAAAGTTGAAGTGTCTAATGCTTAA
ATGAACATTTCTTTGAAGCTGACATACGAATACATCATATCATATGAAAACATCGCAATTAGAGCGTCCTTGAAGTC
TGGCATTGACAGTCACCAGGCTGTTCTCAGTAGTCTGTCCCTTGGGAAGCTCTTGGGGAGACAAGAAGAGGTCCCAGAG
AGTCCCAACAGGTTGGCATAAGGTCATTAACACCAGCATAGTCAGCTCGATCAAGACTGTAAGCGAGTCGATTGCAA
CTAAAAAGATTATTTCTTGTGTTTAAACAAATTCCTTTTGTGTGAGACACCCTCAAGGCACAAGATGGCTAAAGCC
ACAGGCCGATACAATCTCGTGCCCCAAAGAAAGATATGGAAAAGGGAGTGATTTTGTAGTATCTTTGTAATTTCTT
GATTACTCAAACCCTGCAAGGTTGGAAGGTTTATTGGGCAGGAATTGAGTTTGATGTAAGTCAAAAAGGCATGGCTC
TTCTGACAAGACTCAAAACAAATGACTTTGCTCCTGCCTGGGCGATGACAAGAAATCTCTTCCCACATCTGTTCCAA
AACCCAAATTCGGTTATTCAATCTCCCATCTGGGCTTTGAGGGTAATTTTGGCAGCCGGATTGCAGGATCAGTTGTT
AGACCATTCAATTGGTTGAGCCATTGACAGGGGCTCTCGGTCTAATTTCTGATTGGCTCCTAACTACAACGTCAACAC
ATTTCAATCTTCGTACTAGAAGCGTAAAGGACCAGCTTAGTTTTCGTATGTTATCTTTGATCAGGTCAAACATCTTG
CAGTTCATCAACAAGCTTGACGCCCTGCATGTTGTCAATTACAATGGTTTACTCAGTAGTATTGAGATCGGGACTTC
TACACACACAATCATTATAACTCGTACAAATATGGGTTTTCTCGTGGAAGTTCAGGAGCCTGACAAATCAGCTATGA
ATTCTAAGCGCCCAGGACCAGTCAAGTTCTCATTACTTCATGAGTCTGCCTTCAAACCTTTCACTCGTGTTCCACAA
TCTGGGATGCAATCATTAAATAATGGAGTTCAACAGTTTGTGGCAATTTAACAAGGTGATCTTAAAATAAGTACATG
AATGAGAATTAGTTGTGGGTCTTACCTAGCATTGTTGAGTTAGCTATCTAATCTATTTTCACTAATTGCATTGAGCA
CTGCTAGTAGGTTTGCACCACGTTAAAGATTGAGAGTGATGAATTGTGCAGATTTAACTTGGGTTTTGCCTTATG

CTTCATAGGTGGTCTTTTTAAATGGAGATTATCAGCATTCTTCAATGGGAGGAGTTAGCAATCAGAAATTGGAGA
TAAATGGACATCGGGATAGAACAATGCCTAACTATTGGGCGGCTTTCATTTTTAAATGTGTATATAACCAATCTTTT
CCTATCTTTGCTTATATTGGTGTAACCTTTACTTTAATAACATGTCAATGCTATACTGTTAAGAGAAGGTCTGAGGAA
GATTAAGAAAAAGGTCTCGTGTTCACTTGGTTGCCGTCAAGTATCCTGTGGTTTTTTTCTACCTAACTTCCTCATGC
CATATGGCTACCCAGCATACCCAGTACCCGGATGCACGTTTATCTTCACCTATAGTCTGGATCAATGTGATTTGGT
AACTCGAGCATGTGGTTATATTCATCTTATTCTCTAAATCCTCAGCTAAGGCAATGTAAATTACCAAAACATATAT
ATCGACTTAAGTTCGACACAATAGTATCCAAATTCCTAAGTGATACACCTGTAGCAACACTGCCGATAGACTATTTA
GTACCAATTCTCCTGCGTTCCCTAACGGGGCACGGTGATAGGCCGTTGACCCCGACTTGTAATCAATTCCTTGATGG
AATTATTAATTACACTCTTCATGATGCAGCCTTTCTTGATTACTATCTCAAGGCAACAGGTGCACAGGACCATTGGA
CAAACATTACAAC TAGAGAGAAGCTTAAAAACGAAATTC TAAACAATGATTATGTCCATCAATTGTTCTTCTGGCAT
GACCTGTCTATTTTGGCTCGACGTGGGCGTCTGAATCGCGGGAACAACCGTTCAACCTGGTTTGTTTCATGATGAATT
CATTGATATTTTAGGATATGGCGATTATATTTTTTGGAAAAACCTTTATCATTATTACCAGTTACTATAGACGGGG
TCCACACGCGGCAACTGACTGGTATCAACCGACTCTTTTTAAAGAATCCATCCTAGGGCACAGCCAAATCCTATCT
GTGTGACAGCTGAAATACTAATTATGTGTAAAGATATTATCACCTGTAGGTTTAATACATCACTGATTGCATCCAT
TGCAAAATTAGAGGATGTAGATGTGTCTGATTATCCTGACCCGAGTGATATTCTTAAGATATACAATGCTGGAGACT
ATGTAATATCTATTCTTGGCTCAGAAGGTTATAAGATAATAAAGTACCTTGAACCACTTTGTTTGGCCAAAATCCAA
CTTTGCTCTAAATTCACAGAAAGAAAAGGTCGTTTCCCTCACACAGATGCATTTATCAGTAATAAATGATCTTCGGGA
GTTGATTTCTAACCGCAGGTAAAGGACTATCAGCAAGAGAAGATTAGGGATTTTCACAAAATATTATTACAATTGC
AATTATCTCCTCAACAGTTTTGTGAATTATTCTCTGTTCAAAAACATTGGGGGCATCCAATTTTACATAGTGAGAAA
GCTATACAAAAAGTAAAACGGCATGCAACCATCCTTAAGGCTCTCAGACCTAATGTCATTTTGGAGACATATTGTGT
ATTCAAGTACAATATTGCCAAGCACTATTTTCGACAGCCAAGGAACCTGGTACAGTGTAATCTCAGACAGGAATTTAA
CTCCAGGACTCAACTCCTTCATAAAACGTAATCACTTTCCTTCACTACCCATGATTAAGGATCTTCTATGGGAATTC
TATCATCTTAATCACCTCCGTTATTCTCTACAAAGGTGATTAGTGACTTAAGTATTTTCATCAAGGATAGGGCCAC
AGCTGTTGAACAGACATGTTGGGATGCAGTCTTTGAACCCAATGTGCTAGGTTACAATCCTCCAAACAAATCTCCA
CTAAAAGGGTGCCGGAACAATTTCTAGAACAGGAGGATTTTCAATCGAAAGTGTCCTGAATTATGCACAGGAATTA
CATTATTTATTACCACAGAATAGGAATTTTCTTTTCTCTTAAAGAAAAAGAATTAAATATTGGACGAACATTTGG
TAAGCTACCATATCTCACACGGAATGTCCAACTTTATGTGAGGCTCTGTTAGCAGATGGACTGGCTAAGGCCTTCC
CCAGTAACATGATGGTAGTAACCTGAACGTGAACAAAAAGAGAGCCTTCTTCATCAGGCATCATGGCACCACACCAGT
GATGATTTTGGAGAGAATGCTACCGTTCGAGGGAGTAGTTTTGTAAC TGATTTAGAGAAGTACAATCTTGCAATTCG
CTATGAGTTCACTGCACCATTTATTGAGTACTGCAACCATTGCTATGGTGTGCGTAATGTCTTTAATTGGATGCATT
ATTTAATCCCGCAGTGTTACATGCATGTAAGTGATTATTATAATCCGCCTCACAATGTTAATCTTAGCAATCGAGAA
TATCCTCCTGAAGGCCCCGAGTTCGTACCGAGGGCACTTAGGAGGCATAGAGGGATTACAACAAAACTGTGGACGAG
TATATCCTGTGCACAAATCTCCTTAGTGGAATTA AAACTGGTTTTAAGTTACGATCAGCGGT CATGGGAGACAATC
AGTGTATAACCGTATTGTCTGTTTTTCCACTTGAAACAGACCCTGAAGAGCAGGAGCAAAGCGCCGAAGACAATGCT
GCAAGAGTAGCAGCAAGTCTTGCAAAAGTAACCAGTGCATGTGGGATCTTTCTTAAACCAGAAGAGACATTGCTACA
CTCAGGTTTTCATTTATTTTCGAAAAAAAACAATATCTCAATGGTGTACAATTACCGCAATCACTCAAAACAGCAGCAA
GAATGGCGCCACTCTCTGATGCTATATTCGATGATCTACAAGGAACACTTGCCAGTATTGGAAGTGCCTTCGAACGT
GCTATATCGGAAACGCGACATATCCTCCCATGTCGTATTGTAGCAGCTTCCATACGTATTTGCGCGTTTCGATTTT
ACAATATCACCATCTTGGATTTAATAAAGGCATCGATTTAGGGCAGTTGTCACCTTAGTAAACCATTAGACTATGGGA

CTATTACTCTAACATTGGCGGTTCCACAAGTCCTTGGGGGATTGTCTTTTCTAAATCCAGAAAAGTGTTTTATCGA
AACTTCGGAGATCCTGTGACTTCTGGACTTTTCCAGCTACGGGTGTACCTAGAAAATGGTTAACATGAAAGACCTATT
TTATCCATTAATATCGAAAAATCCAGGAAATTGTAGTGCCATTGATTTTGTCTTAAATCCATCCGGATTAAATGTTC
CAGGATCACAAGACTTGACATCCTTTTTGCGACAGATCGTTAGGCGTAGTATTACACTAACTGCAAGAAATAAGTTA
ATTAACACTCTCTTCCATGCCTCTGCTGATTTGGAAGATGAGATGGTTTGTAAATGGCTCCTTTTCATCAAACCCTGT
CATGAGTCGCTTTGCAGCGGATATTTTTTCCAGGACACCTAGTGGTAAACGTCTCCAAATATTAGGTTATCTTGAAG
GGACCAGGACTCTATTGGCCTCCAAAATCATAAACAACAACAGTGAGACACCTGTACTTGATAAGCTGAGGAAGATC
ACCCTACAAAGATGGAATCTGTGGTTCAGTTATTTGGACCATTGTGACCAATTACTAGCAGATGCTCTACAGAAAAT
TAGTTGCACAGTGGATTTGGCCCAGATTTTTCGTGAGTATACATGGTCACACATCTTAGAGGGTAGACCATTGATCG
GAGCGACATTACCATGTATGGTGGAGCAATTCAAAGTTAAGTGGCTAAGACAATATGAACCTTGTCCAGAATGCCTC
AACAAAAAGGCTCAAATGCTTATGTCTCAGTTGCAGTCAAAGATCAAGTGGTCAGTGCTTGGCCTAATACTTCTCG
AATAAGTTGGACAATAGGGAGTGGTGTCCCCTATATAGGGTCAAGAACCGAGGATAAAATCGGACAGCCTGCAATCA
AGCCGCGATGCCCTTCATCTGCCCTCAAGGAGGCTATAGAATTAGCATCAAGGCTCACTTGGGTTACACAAGGAAGT
TCTAATAGTGAACAATTAATCCGGCCTTTCTTAGAAGCGAGAGTCAACCTTAGTGTCAGTGAAGTCCTGCAAATGAC
ACCATCACATTATTCAGGAAATATTGTCCATCGATATAACGACCAATATAGCCCGCACTCATTTATGGCGAATCGCA
TGAGCAATACTGCGACCCGTCTCATAGTGTCAACTAATACACTTGGAGAATTTTCAGGTGGAGGGCAGGCCGCCAGG
GATAGCAATATAATTTTTCCAGAATGTTATAAATTTAGCAGTTGCCCTTTATGATATTAGATTCGGGAATACGAACAC
CTCTGATATAAGGCATAATAGGGCTCATCTTCACCTGACAGAGTGCTGTACTAAAGAGGTCCCGGCCAGTATTTGA
CATATACAAGTGCCTCAATCTGGATTTAAGCCGTTATCGTGATAATGAACATAATATGACTCAAATCCACTGAGG
GGAGGATTGAACTGCAATTTAACAATGGATAGTCCTTTAGTGAAGGGTCCTAGGCTTAACATGATTGAAGATGATCT
TCTCCGCTTTCCACACCTTTCTGGATGGGAGTTAGCGAAAACGGTGGTACAATCCATCATCTCAGACAATAGCAACT
CATCAACAGATCCAATCAGTAGCGGAGAAACACGCTCTTTCACAACTCATTTTCTCACTTACCCTCAGATTGGCCTT
CTTTACAGTTTCGGGGCAGTATTATGCTTTTATCTAGGCAATACTATCCTATGGACTAAAAAACTTGATTATGAACA
GTTTCTATATTATTTGCATAACCAGCTGCACAACCTACCTCATCGAGCACTCCGTGTTTTTAAACCAACATTTAAGC
ATGCCAGTGTGATGTCCCGATTAATGGAATTTGATTCCAACCTCTCAATTTATATTGGCGGGACATCTGGAGATCGA
GGGCTGTCTGATGCTGCTCGACTGTTTCTTCGGACAGCAATCGCGAGTTTTTTACAATTTCTTAAAAGCTGGATCAT
CGATCGCCAAAAGACAATTCCTTTATGGATAGTATATCCGCTTGAAGGTCAACAGCCGGAATCCATCAATGAATTC
TACATAAAATTTTTGGTCTGCTCAAAACAAGGCCCAAAAATATTCCAAAGGAGGTCAGCATTCAAAATGATGGACAT
TTGGATTTGGCAGAAAATAATTATGTTTACAATAGTAAGAGCACTGCTAGTAATTTCTTCCATGCATCCTTAGCTTA
CTGGAGAAGTAGGAAATCTCGGAAAACCTCAAGACCATAATGATTTCTCAAGAGGGGATGGAACACTTACAGAACCCG
TGTGTAAGTTCTCAAGCAATCATCAGTCAGATGAAAAGTACTACAATGTGACATGTGGAAAGTCACCGAAGCCGCAA
GAACGCAAAGACTTCTCGCAATACAGACTCAGCAATAACGGGCAAACAATGAGTAATCATCGTAAGAAAGGGAAGTT
CCACAAGTGAATCCCTGCAAAGTGTTAATGGAGAGTCAAAGGGGAAGTGTCTAAAAGAGGGTGACTACTTTCAAA
ACAATACTCCACCAACAGATGATGTATCAAGTCCTACCGACTCATTCTACCATTTTTTAAATTGGGAAATCACAAC
CATGCACATGATCAAGATGCCCAAGAATTGATAAATCAAAATATTAAACAGTACCTACATCAGCTAAGGTCTATGTT
GGACACCACTATATATTGTAGATTACAGGGATTGTCTCATCCATGCATTACAAATTGGACGAAGTTCTTCTAGAAT
ACAATGGTTTCGATTCAGCTATCACATTAGCTGAAGGTGAGGGGTCAGGGGCTCTATTACTTTTGCAGAAATATAGT
ACAAGTTATTATTTTTGAACACATTGGCAACAGAACACAGTATAGAGTCAGAAGTTGTATCAGGTTTTTCTACTCC
GAGAATGTTGTTACCAATAATGCAAAAGGTTTCATGAAGGACAAGTCACTGTTATCTTAAATAATTCAGCAAGTCAGA

TAACTGACATAACTAGCTCAATGTGGTTAAGTAATCAAAAATATAATCTACCTGTCAAGTTGAAATCATTACGATG
GATGCTGAAACAACAGAGAACTTAAACAGGTCCCAACTCTACCGAGCAGTATATAACTTAATACTTGATCACATTGA
TCCGCAGTATCTCAAGGTGGTGGTACTCAAAGTATTTCTGAGTGATATAGAAGGAATATTATGGATTAATGATTACT
TGGCTCCATTATTCGGGGCTGGTTACTTGATTAAACCGATTACATCAAGTGCCCGGTCAAGTGAATGGTACCTTTGC
TTATCAAATTTGATATCTACTAACAGGAGATCGGCCCATCAGACTCACAAGGCATGTCTTGGTGTATCAGAGATGC
TTTGCAAGCACAAGTCCAGCGAGGCGTGTACTGGTTGAGTCACATCGCACAGTATGCTACAAAGAATCTCCATTGTG
AATACATATGCCTTGGTTTCCACCTCTAGAAAAGGTCCTATATCACAGGTATAATCTAGTTGATACTGGACTCGGT
CCATTGTCGTCAGTTATTAGACATTTAACTAACCTCCAGGCAGAGATACGAGACTTAGTATTAGATTATACCCTGAT
GAGAGAGAGTCGCACTCAAACGTACCATTTTATTAAGACTGCAAAAGGCAGAATCACAAAGTTAGTCAATGACTTTC
TGAAGTTTTCTTTAATTGTCCAGGCACTCAAAAATAATTCTTCTTGGTATACTGAGCTTAAAAATTACCTGAGGTG
ATTAATGTGTGTAATCGATTTTATCATACTCACAGTTGCGAATGTCAGGAAAAATTCTTTGTCCAGACGCTTTATTT
ACAACGCCTACGCGATGCAGAAATCAAGCTAATTGAACGCCTTACCGGGTTAATGCGATTTTATCCAGAAGGGTTAA
TATATTCCAATCACACATAGGTACTAAATCATCATAGTATGAGGAATAAAATAATGATAATTCCTGACGACAGTTTT
AGTTCCGATTCTAAGTATATCGGAAGAGAGTATGCCAATCTTAATTATTAAGGTAACAAGCTATTAGTTATTACTT
ATTGATAAGAATAAACTTTATCATAGCGTAACACATCATAACTTTATAGCGATTTTGCATTTCTAATCCTAGTATTT
ATTAGAATGTACTATCAGAGAAATGACCCCAGTTCCTATCTTTAAATAATGATTGTGTGTATTAAATTATTAGTTTA
TTAGGTTTATGAGTTGGTTACACAGTGAGTATTAGTAATTGAGGATTATGTAGATAGGTAATCTAACACTGAATCAC
CCATCTGATGTCACCATATCCAAATATTGTGCTAGTCGCATTTAAACATGCTATCTTCAGTTAAGTAACATAGACTG
AAAATGCTAAGAAGAGATTGGAGTAAAAGTATAAAATAAATTTAATTAAACTTCAAAGTGATTAAATGATAATGATC
TTGGGAACCTCGATATGACCTCAAGTCAAAAATAATGTCAATATAATTGTTTAGTAATATGAGTTATAATGTGAATTT
TGATAACTAAGTCTTTAGTAGTTAAGATCAAATGCAAACATTCTAAGAATGTTAAGCGCACACAAAAACATTATA
AAAAACCAATTTTTTCTTTTTGTGTGTCC, (SEQ. ID. NO: 6).

SEQ ID NO: 7

TCTCTCCNA (SEQ ID NO: 7)

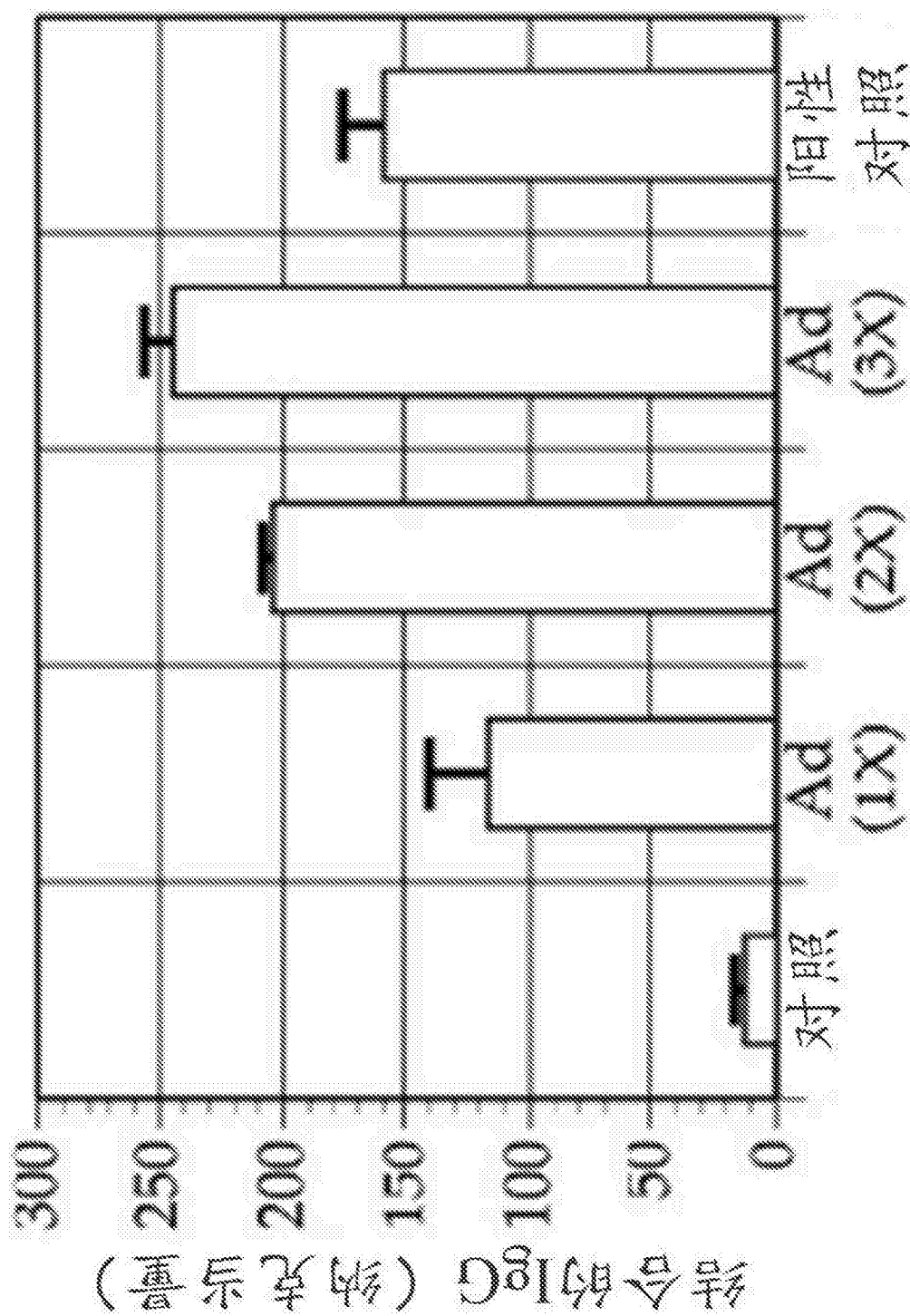


图1

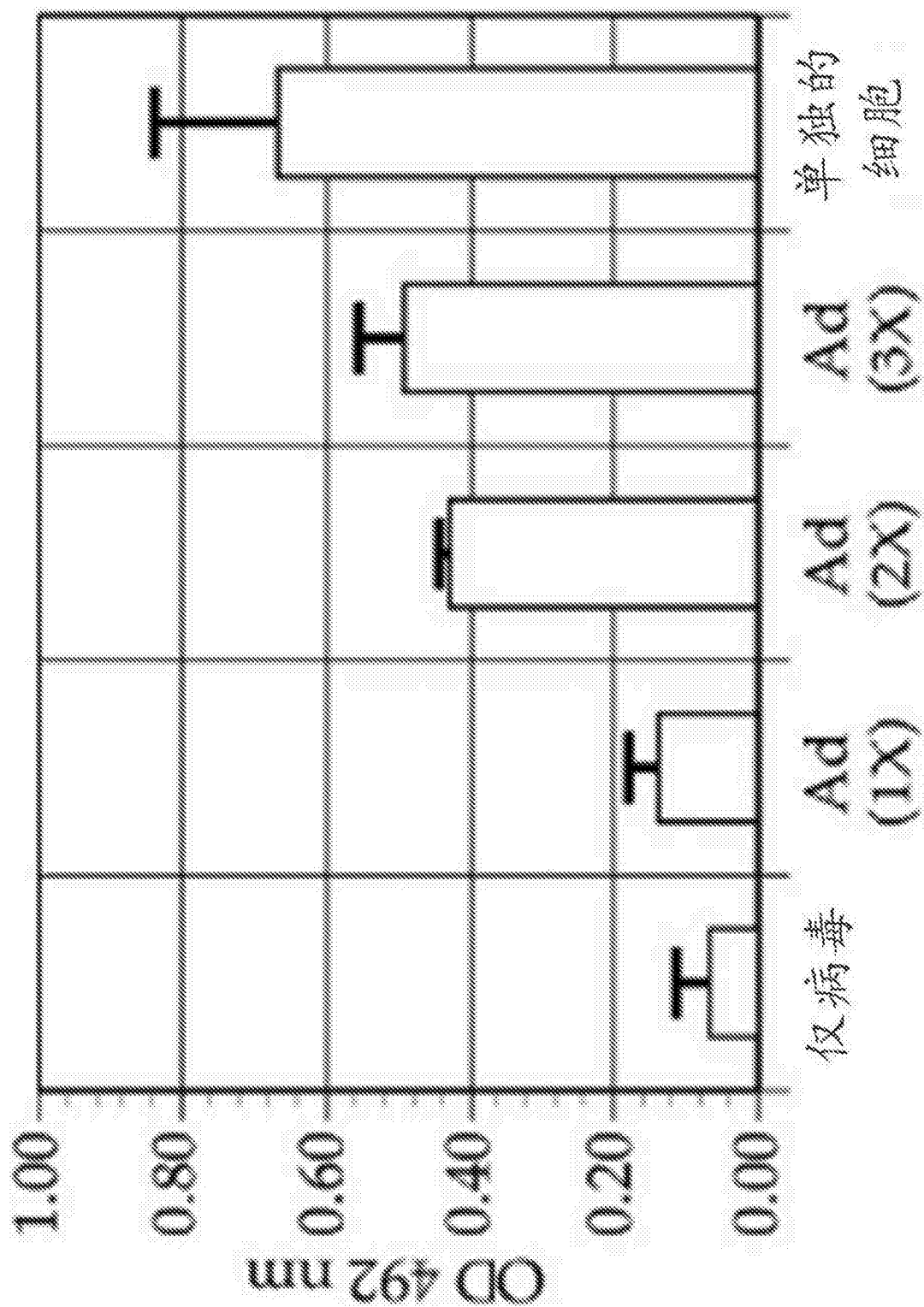


图2

埃博拉病毒基因组的结构

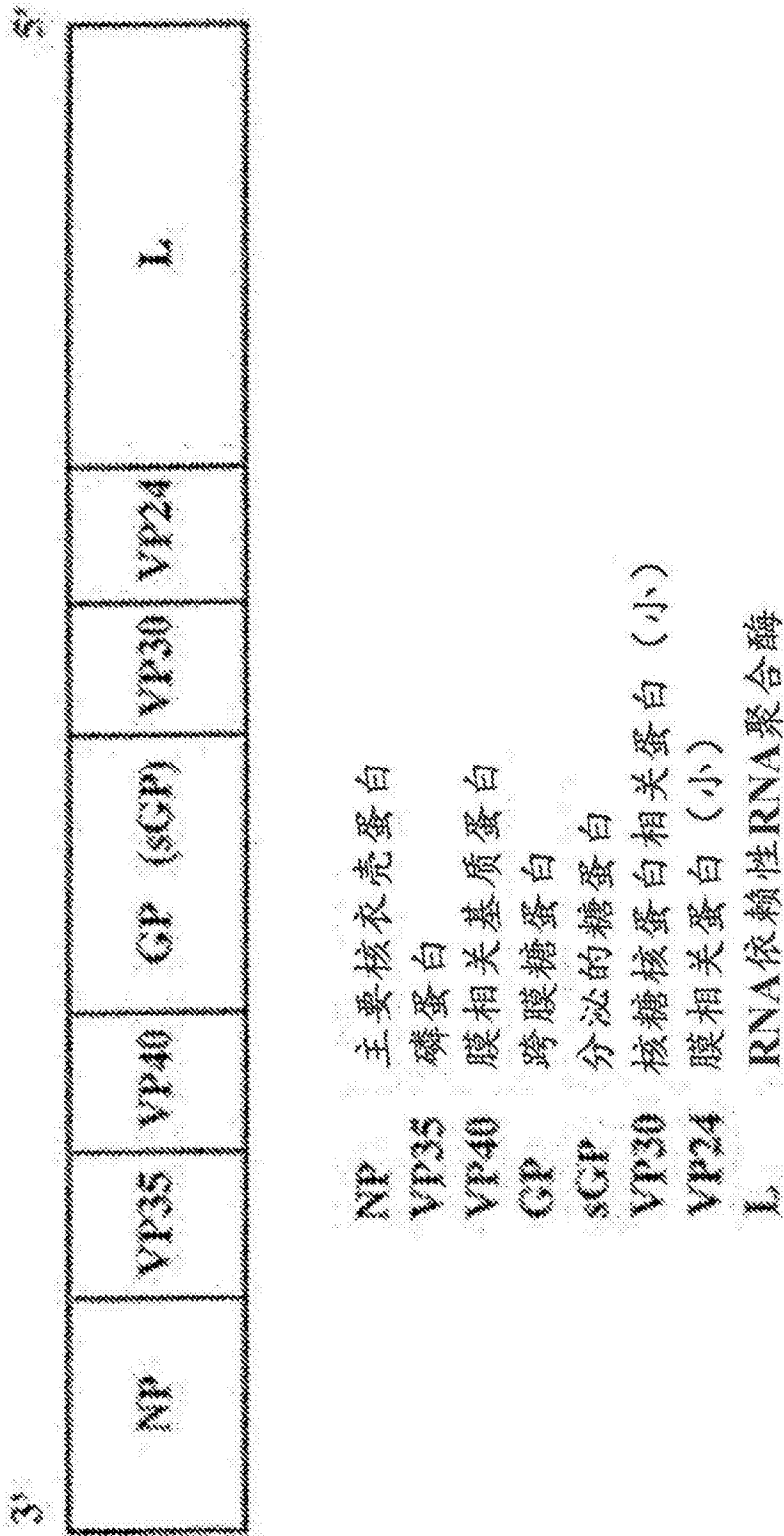


图3

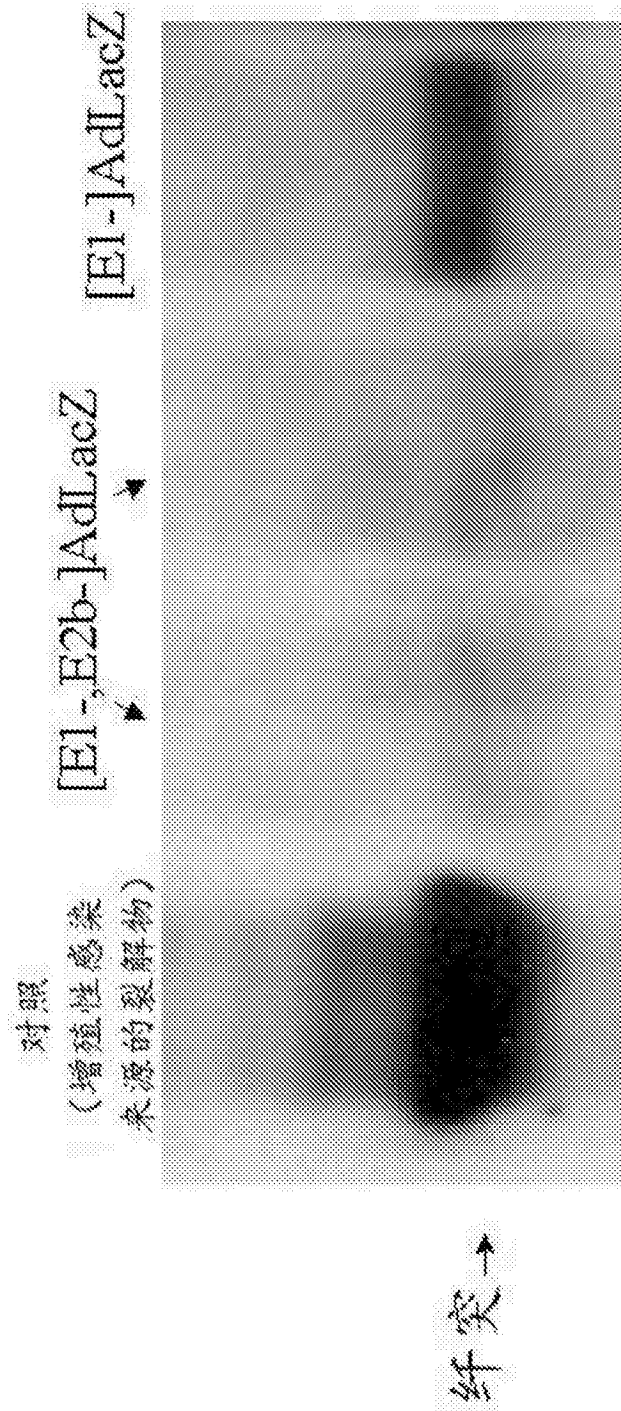


图4

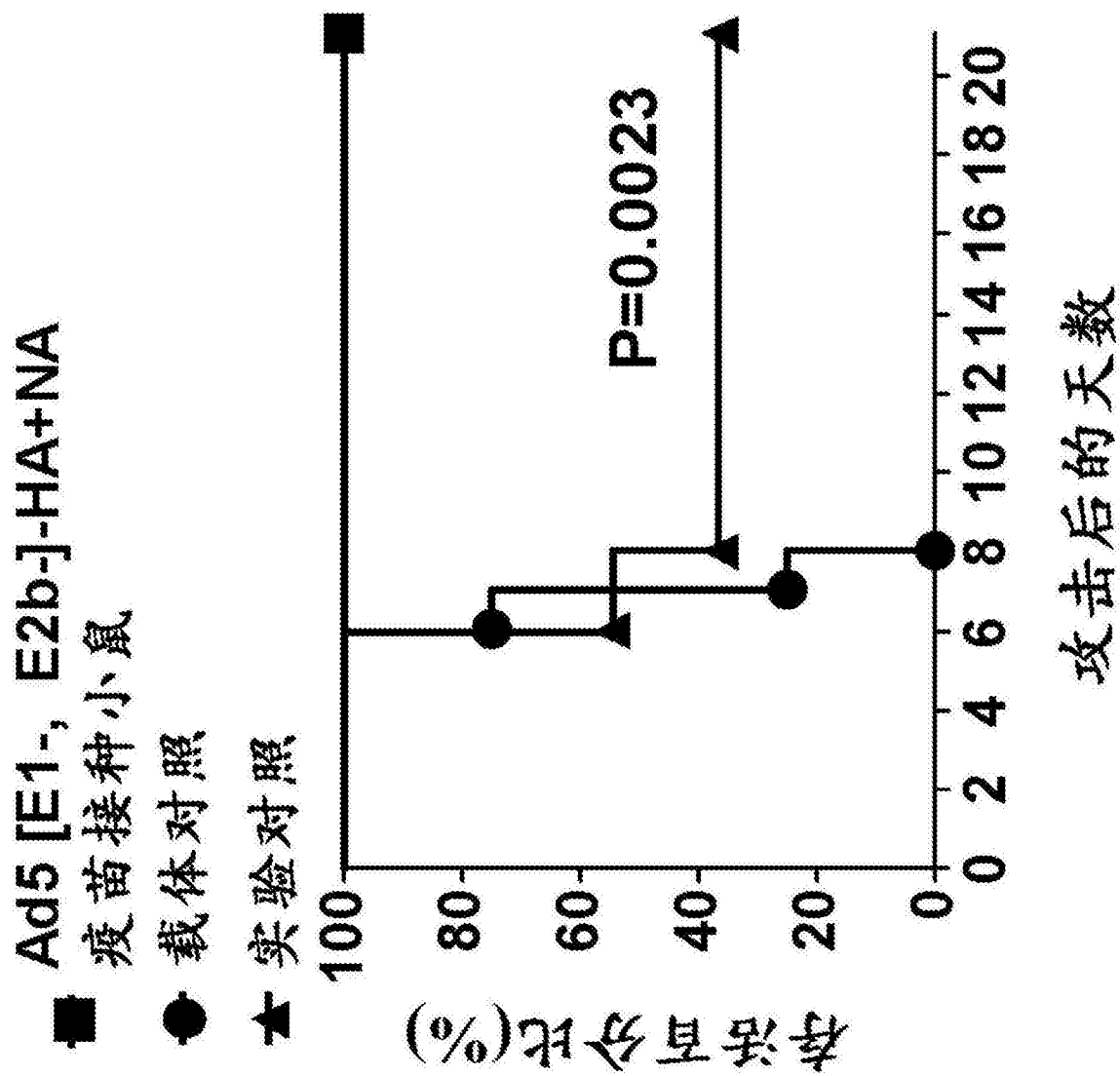


图5

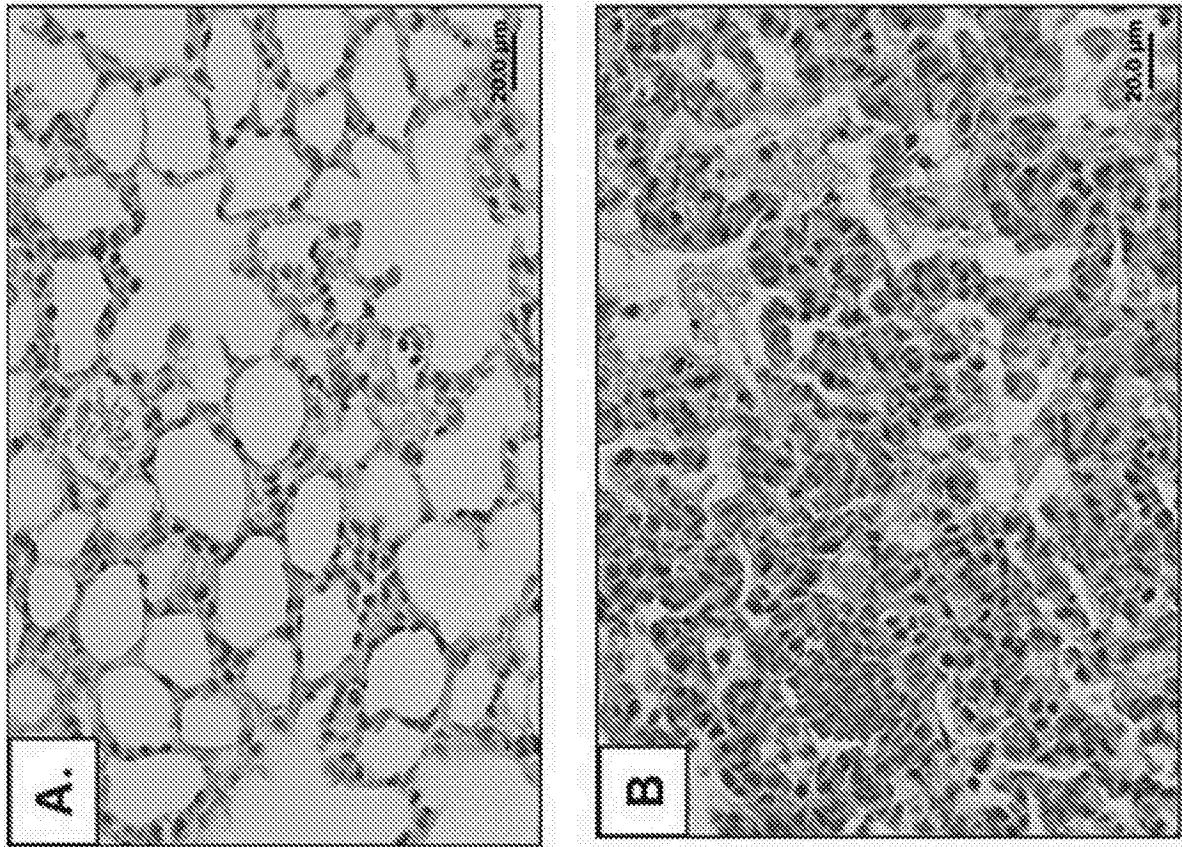


图6

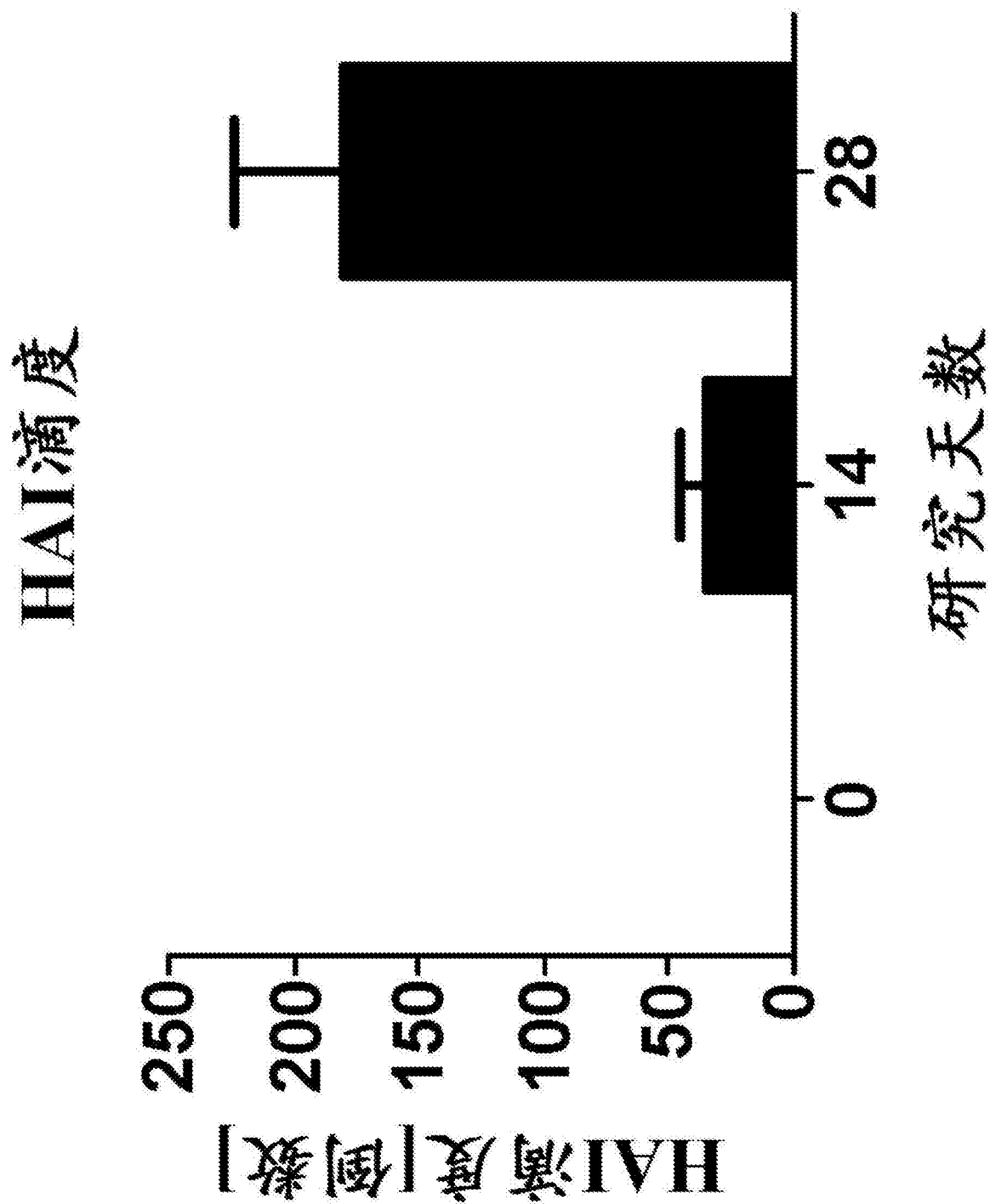


图7

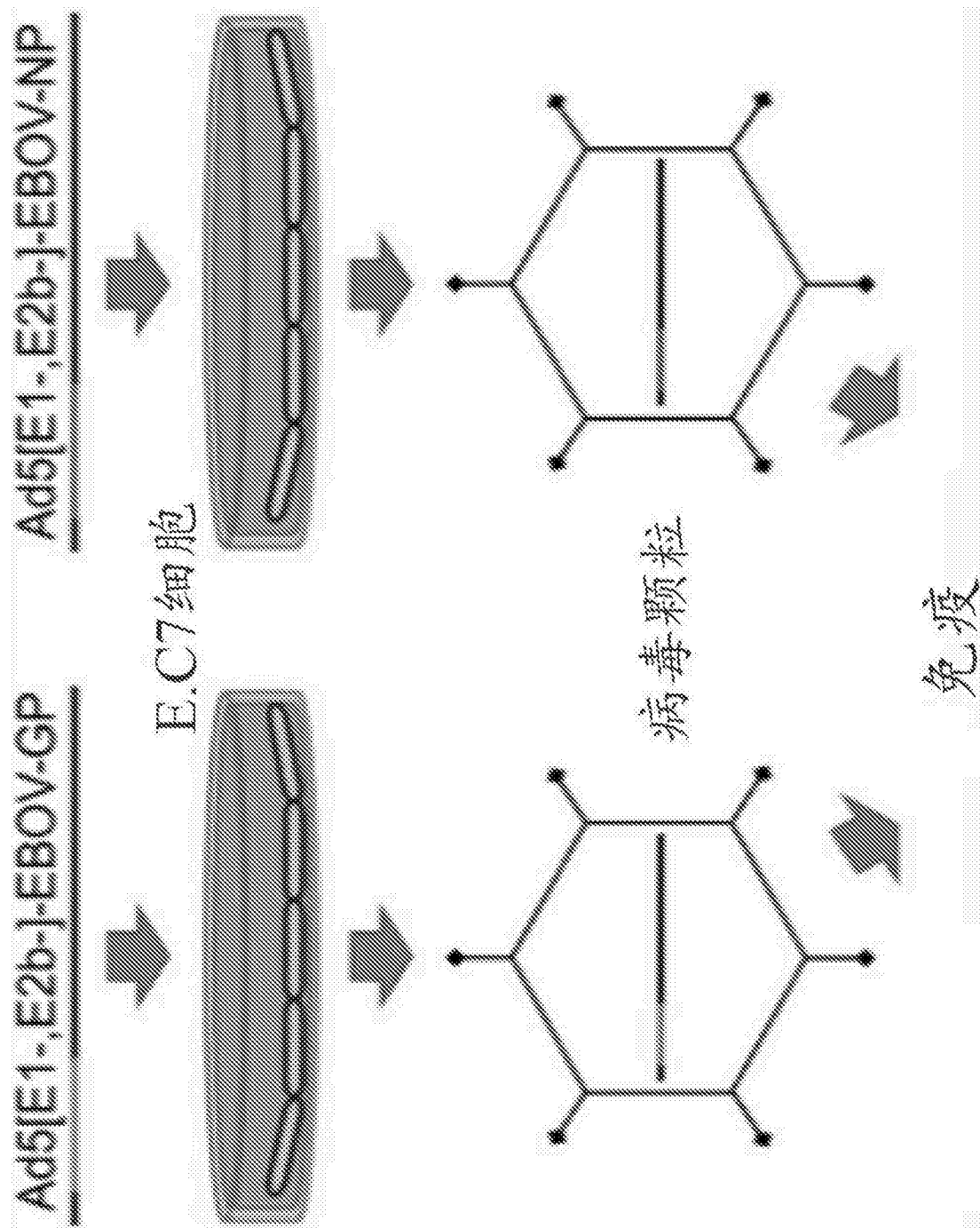


图8

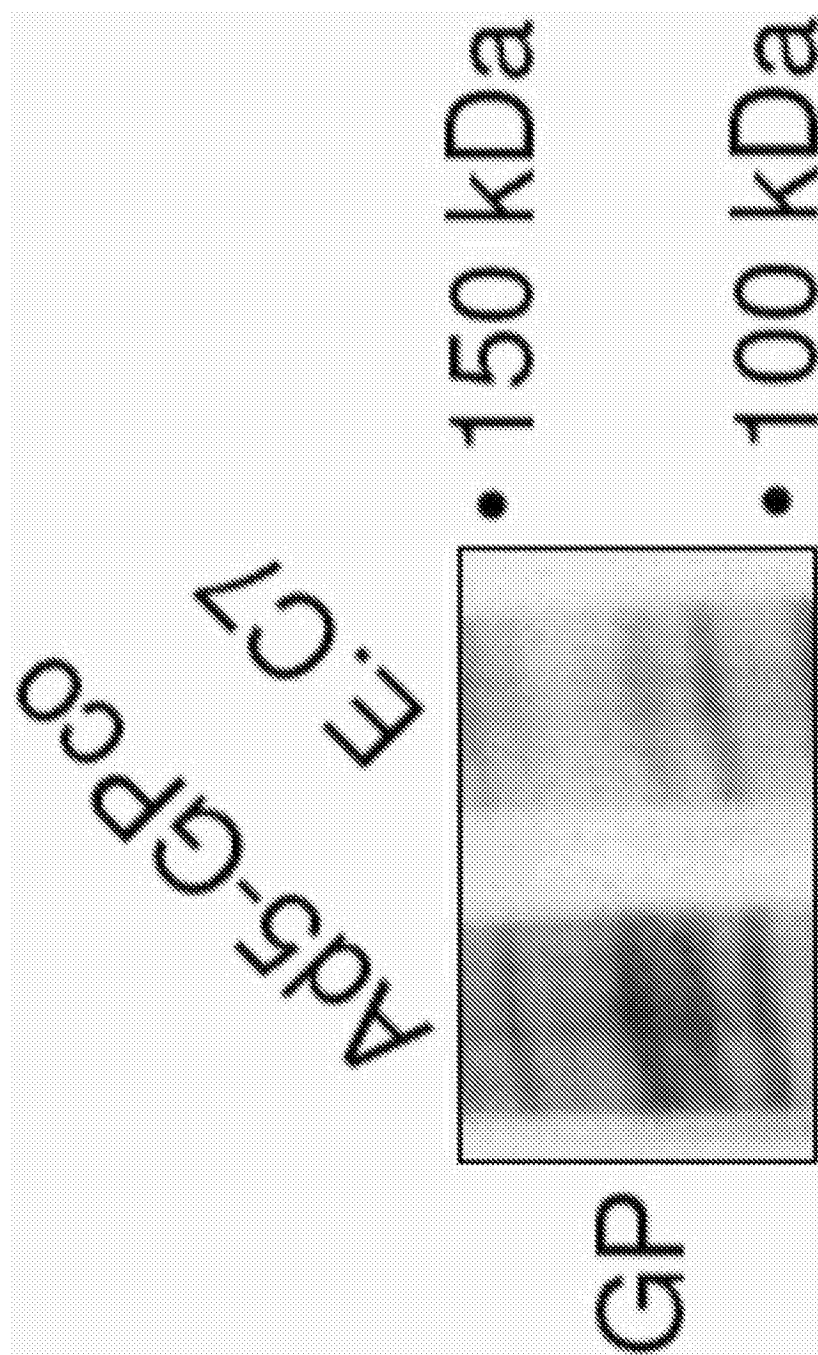


图9