(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7457733号
(P7457733)

(45)発行日　令和6年3月28日(2024.3.28)

(24)登録日　令和6年3月19日(2024.3.19)

(51)国際特許分類		FI		
Ｃ１２Ｎ　15/861 (2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/861	Ｚ ＺＮＡ
Ｃ１２Ｎ　15/34　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/34	
Ａ６１Ｋ　35/761 (2015.01)		Ａ６１Ｋ	35/761	
Ａ６１Ｋ　39/00　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	39/00	Ｚ
Ａ６１Ｐ　35/00　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	35/00	

請求項の数　29　（全262頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-570743(P2021-570743)
(86)(22)出願日　令和2年6月1日(2020.6.1)
(65)公表番号　特表2022-534282(P2022-534282A)
(43)公表日　令和4年7月28日(2022.7.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/035591
(87)国際公開番号　WO2020/243719
(87)国際公開日　令和2年12月3日(2020.12.3)
審査請求日　令和5年6月1日(2023.6.1)
(31)優先権主張番号　62/854,865
(32)優先日　令和1年5月30日(2019.5.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
早期審査対象出願

(73)特許権者　518213307
グリットストーン バイオ インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 ９４６０８ カリフォルニア州 エメリービル ホートン ストリート ５９５９ スイート ３００
(74)代理人　100102978
弁理士　清水 初志
(74)代理人　100160923
弁理士　山口 裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部 俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上 隆一
(74)代理人　100148699

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　改変アデノウイルス

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

アデノウイルスベクターであって、

アデノウイルスゲノムの１つ以上の遺伝子または調節配列を含むアデノウイルス骨格を含み、

前記アデノウイルス骨格が、前記アデノウイルスゲノムに関して部分欠失Ｅ４遺伝子を含み、

前記部分欠失Ｅ４遺伝子が、部分欠失Ｅ４ｏｒｆ２領域、欠失Ｅ４ｏｒｆ３領域、及び部分欠失Ｅ４ｏｒｆ４領域を含む、

前記アデノウイルスベクター。

【請求項２】

請求項１に記載のベクターであって、

（ａ）部分欠失Ｅ４遺伝子が、部分欠失Ｅ４ｏｒｆ２領域、欠失Ｅ４ｏｒｆ３領域、及び部分欠失Ｅ４ｏｒｆ４領域を欠いていることを除いて、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列を含み、かつ

（ｂ）アデノウイルスゲノムの１つ以上の遺伝子または調節配列が、配列番号１に示されるＣｈＡｄＶ６８配列の１つ以上の遺伝子または調節配列を含む、

前記ベクター。

【請求項３】

改変ＣｈＡｄＶ６８配列を含むチンパンジーアデノウイルスベクターであって、前記改

変ＣｈＡｄＶ６８配列が、
（ａ）部分欠失Ｅ４ｏｒｆ２領域、欠失Ｅ４ｏｒｆ３領域、及び部分欠失Ｅ４ｏｒｆ４領域を欠いていることを除く、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列を含む部分欠失Ｅ４遺伝子と、
（ｂ）配列番号１に示されるＣｈＡｄＶ６８配列の１つ以上の遺伝子または調節配列を含む、アデノウイルスゲノムの１つ以上の遺伝子または調節配列と
を含む、前記チンパンジーアデノウイルスベクター。
【請求項４】
配列番号１に示されるＣｈＡｄＶ６８配列の前記１つ以上の遺伝子または調節配列が、以下を含む、請求項２または３に記載のベクター：
Ａ）配列番号１に示される配列のヌクレオチド２～３４，９１５；または
Ｂ）（ｉ）配列番号１に示されるＥ１遺伝子における欠失に相当するヌクレオチド；及び／もしくは（ｉｉ）配列番号１に示されるＥ３遺伝子における欠失に相当するヌクレオチドを欠いていることを除く、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２～３４，９１５。
【請求項５】
前記部分欠失Ｅ４ｏｒｆ２領域、欠失Ｅ４ｏｒｆ３領域、及び部分欠失Ｅ４ｏｒｆ４領域が、配列番号１に示される配列のヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２の欠失である、請求項２～４のいずれか１項に記載のベクター。
【請求項６】
Ａ）部分欠失Ｅ４遺伝子に相当する配列番号１に示される配列のヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いていることを除く、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド２～３６，５１８、
Ｂ）部分欠失Ｅ４遺伝子に相当するヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いていること、及び配列番号１に示される配列のヌクレオチド５７７～３４０３を欠いていることを除く、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド２～３６，５１８、
Ｃ）部分欠失Ｅ４遺伝子に相当するヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いていること、及び配列番号１に示される配列のヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５を欠いていることを除く、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド２～３６，５１８、または
Ｄ）部分欠失Ｅ４遺伝子に相当するヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いていること、ヌクレオチド５７７～３４０３を欠いていること、及び配列番号１に示される配列のヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５を欠いていることを除く、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド２～３６，５１８
を含む、請求項２～５のいずれか１項に記載のベクター。
【請求項７】
前記アデノウイルスベクターがカセットをさらに含み、前記カセットが少なくとも１つのペイロード核酸配列を含み、かつ前記カセットが、前記少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列を含む、請求項１～６のいずれか１項に記載のベクター。
【請求項８】
前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、以下をコードする、請求項７に記載のベクター：
（ａ）病原体由来ペプチド、ウイルス由来ペプチド、細菌由来ペプチド、真菌由来ペプチド、及び寄生虫由来ペプチドからなる群から選択される、感染症生物ペプチド；
（ｂ）少なくとも１つの変更を有するエピトープであって、前記変更が、コードされたエピトープ配列を野生型核酸配列によってコードされる対応するペプチド配列とは異なるものにする、エピトープ；ならびに／または
（ｃ）Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープを含むポリペプチド配列もしくはその部分であって、完全長タンパク質、タンパク質ドメイン、タンパク質サブユニット、もしくは抗体が結合できることが予測されるかもしくは知られている抗原性フラグメントを

含む、ポリペプチド配列またはその部分。
【請求項９】
前記カセットが、Ｅ１領域、Ｅ３領域、及び／または、前記カセットの組み込みが可能な任意の欠失されたＡｄＶ領域においてベクター中に挿入されている、請求項７または８に記載のベクター。
【請求項１０】
前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、エピトープへの抗原のプロセシングを受けることが可能なポリペプチド配列をコードしており、前記エピトープが、細胞の表面上のＭＨＣクラスＩにより提示されることが知られているかまたは疑われており、前記細胞の表面が腫瘍細胞表面である、請求項７～９のいずれか１項に記載のベクター。
【請求項１１】
前記少なくとも１つのペイロード核酸配列の１つ以上が、アミノ酸２５個の長さのペプチドをコードする、５’リンカー配列及び３’リンカー配列を含むＭＨＣ　Ｉエピトープコード核酸配列をコードする、請求項７～１０のいずれか１項に記載のベクター。
【請求項１２】
前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、リンカーをコードする核酸配列によって、異なるペイロード核酸配列と連結されている、請求項７～１１のいずれか１項に記載のベクター。
【請求項１３】
前記リンカーが、同種由来タンパク質に由来する抗原に隣接する、少なくともアミノ酸残基２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、または２～２０個の長さの１つ以上の天然配列を含む、請求項１２に記載のベクター。
【請求項１４】
前記アデノウイルスベクターが、
Ａ）改変ＣｈＡｄＶ６８配列であって、
（ｉ）配列番号１に示される配列のヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いていることを除く、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列を含む部分欠失Ｅ４遺伝子と、
（ｉｉ）
（１）配列番号１に示される配列のヌクレオチド２～３４，９１５、または
（２）ａ）Ｅ１欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド５７７～３４０３、及び／もしくはｂ）Ｅ３欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５を欠いていることを除く、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２～３４，９１５であって、前記部分欠失Ｅ４遺伝子が配列番号１に示される配列のヌクレオチド３４，９１５の３’である、前記ヌクレオチド２～３４，９１５と、
（ｉｉｉ）配列番号１に示される配列のヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８であって、前記部分欠失Ｅ４遺伝子が配列番号１に示される配列の前記ヌクレオチド３５，６４３の５’である、前記ヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８と、
を含む前記改変ＣｈＡｄＶ６８配列と、
Ｂ）ＣＭＶ由来プロモーター配列と、
Ｃ）ＳＶ４０ポリアデニル化シグナルヌクレオチド配列と、
Ｄ）少なくとも１つのＭＨＣクラスＩエピトープをコードする少なくとも１つのペイロード核酸配列を含む、カセットと
を含み、
前記カセットがＣｈＡｄＶ６８の欠失領域内に挿入され、前記ＣＭＶ由来プロモーター配列が前記カセットに機能的に連結されている、請求項１～１３のいずれか１項に記載のベクター。
【請求項１５】
アデノウイルスベクターを含む、がんを有する対象を治療するための免疫療法剤であっ

て、
前記アデノウイルスベクターが、アデノウイルスゲノムの１つ以上の遺伝子または調節配列を含むアデノウイルス骨格を含み、
前記アデノウイルス骨格が、前記アデノウイルスゲノムに関して部分欠失Ｅ４遺伝子を含み、
前記部分欠失Ｅ４遺伝子が、部分欠失Ｅ４ｏｒｆ２領域、欠失Ｅ４ｏｒｆ３領域、及び部分欠失Ｅ４ｏｒｆ４領域を含み、
前記アデノウイルスベクターが、少なくとも１つのペイロード核酸配列を含むカセットをさらに含む、
前記免疫療法剤。
【請求項１６】
（ａ）前記部分欠失Ｅ４遺伝子が、部分欠失Ｅ４ｏｒｆ２領域、欠失Ｅ４ｏｒｆ３領域、及び部分欠失Ｅ４ｏｒｆ４領域を欠いていることを除いて、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列を含み、
（ｂ）前記アデノウイルスゲノムの前記１つ以上の遺伝子または調節配列が、配列番号１に示されるＣｈＡｄＶ６８配列の１つ以上の遺伝子または調節配列を含む、
請求項１５に記載の免疫療法剤。
【請求項１７】
配列番号１に示されるＣｈＡｄＶ６８配列の前記１つ以上の遺伝子または調節配列が、以下を含む、請求項１６に記載の免疫療法剤：
Ａ）配列番号１に示される配列のヌクレオチド２～３４，９１５；または
Ｂ）（ｉ）配列番号１に示されるＥ１遺伝子における欠失に相当するヌクレオチド；及び／もしくは（ｉｉ）配列番号１に示されるＥ３遺伝子における欠失に相当するヌクレオチドを欠いていることを除く、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２～３４，９１５。
【請求項１８】
前記部分欠失Ｅ４ｏｒｆ２領域、欠失Ｅ４ｏｒｆ３領域、及び部分欠失Ｅ４ｏｒｆ４領域が、配列番号１に示される配列のヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２の欠失である、請求項１６または１７に記載の免疫療法剤。
【請求項１９】
前記アデノウイルス骨格が、
Ａ）部分欠失Ｅ４遺伝子に相当する配列番号１に示される配列のヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いていることを除く、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド２～３６，５１８、
Ｂ）部分欠失Ｅ４遺伝子に相当するヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いていること、及び配列番号１に示される配列のヌクレオチド５７７～３４０３を欠いていることを除く、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド２～３６，５１８、
Ｃ）部分欠失Ｅ４遺伝子に相当するヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いていること、及び配列番号１に示される配列のヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５を欠いていることを除く、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド２～３６，５１８、または
Ｄ）部分欠失Ｅ４遺伝子に相当するヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いていること、ヌクレオチド５７７～３４０３を欠いていること、及び配列番号１に示される配列のヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５を欠いていることを除く、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド２～３６，５１８
を含む、請求項１６～１８のいずれか１項に記載の免疫療法剤。
【請求項２０】
前記カセットが、Ｅ１領域、Ｅ３領域、及び／または、前記カセットの組み込みが可能な任意の欠失されたＡｄＶ領域においてベクター中に挿入されている、請求項１５～１９のいずれか１項に記載の免疫療法剤。
【請求項２１】

前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、エピトープへの抗原のプロセシングを受けることが可能なポリペプチド配列をコードしており、前記エピトープが、細胞の表面上のＭＨＣクラスＩにより提示されることが知られているかまたは疑われており、前記細胞の表面が腫瘍細胞表面である、請求項１５～２０のいずれか１項に記載の免疫療法剤。

【請求項２２】

前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、少なくとも１つの変更を有するエピトープをコードし、前記変更が、コードされたエピトープ配列を野生型核酸配列によってコードされる対応するペプチド配列とは異なるものにする、請求項１５～２１のいずれか１項に記載の免疫療法剤。

【請求項２３】

前記少なくとも１つのペイロード核酸配列の１つ以上が、アミノ酸２５個の長さのペプチドをコードする、５’リンカー配列及び３’リンカー配列を含むＭＨＣ　Ｉエピトープコード核酸配列をコードする、請求項１５～２２のいずれか１項に記載の免疫療法剤。

【請求項２４】

前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、リンカーをコードする核酸配列によって、異なるペイロード核酸配列と連結されている、請求項１５～２３のいずれか１項に記載の免疫療法剤。

【請求項２５】

前記リンカーが、同種由来タンパク質に由来する抗原に隣接する、少なくともアミノ酸残基２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、または２～２０個の長さの１つ以上の天然配列を含む、請求項２４に記載の免疫療法剤。

【請求項２６】

第２のワクチン組成物と組み合わせて使用される、請求項１５～２５のいずれか１項に記載の免疫療法剤。

【請求項２７】

前記第２のワクチン組成物が、少なくとも１つのペイロード核酸配列をコードする自己複製ＲＮＡ（ｓａｍＲＮＡ）ベクターを含む、請求項２６に記載の免疫療法剤。

【請求項２８】

前記ｓａｍＲＮＡベクターによってコードされる前記少なくとも１つのペイロード核酸配列が、請求項１５の少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つと同じである、請求項２７に記載の免疫療法剤。

【請求項２９】

前記アデノウイルスベクターが、

Ａ）改変ＣｈＡｄＶ６８配列であって、

（ｉ）配列番号１に示される配列のヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いていることを除く、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列を含む部分欠失Ｅ４遺伝子と、

（ｉｉ）

（１）配列番号１に示される配列のヌクレオチド２～３４，９１５、または

（２）ａ）Ｅ１欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド５７７～４０３、及び／もしくはｂ）Ｅ３欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５を欠いていることを除く、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２～３４，９１５であって、前記部分欠失Ｅ４遺伝子が配列番号１に示される配列のヌクレオチド３４，９１５の３’である、前記ヌクレオチド２～３４，９１５と、

（ｉｉｉ）配列番号１に示される配列のヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８であって、前記部分欠失Ｅ４遺伝子が配列番号１に示される配列の前記ヌクレオチド３５，６４３の５’である、前記ヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８と、

を含む前記改変ＣｈＡｄＶ６８配列と、

Ｂ）ＣＭＶ由来プロモーター配列と、

Ｃ）ＳＶ４０ポリアデニル化シグナルヌクレオチド配列と、
Ｄ）少なくとも１つのＭＨＣクラスＩエピトープをコードする少なくとも１つのペイロード核酸配列を含む、カセットと
を含み、
前記カセットがＣｈＡｄＶ６８の欠失領域内に挿入され、前記ＣＭＶ由来プロモーター配列が前記カセットに機能的に連結されている、請求項１５に記載の免疫療法剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願の相互参照）
本出願は、その全容を参照により本明細書に援用するところの２０１９年５月３０日出願の米国特許仮出願第６２／８５４，８６５号の利益を主張する。
【０００２】
配列表
本出願は、ＡＳＣＩＩフォーマットで電子的に提出される配列表を含み、その全容を参照によって本明細書に援用する。２０１９年５月３０日に作成された前記ＡＳＣＩＩコピーは、ＧＳＯ＿０３３ＰＲ＿Ｓｅｑｕｅｎｃｅ＿Ｌｉｓｔｉｎｇ．ｔｘｔの名前が付けられており、そのサイズは４２２，１３６バイトである。
【背景技術】
【０００３】
腫瘍特異的な抗原に基づいた治療用ワクチンは、次世代の個別化がん免疫療法として極めて有望である。[1～3]例えば、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）及びメラノーマなどの高い遺伝子変異量を有するがんは、新生抗原を生じる可能性が比較的高いことから、かかる治療法の特に有望な標的である。[4，5]初期の証拠により、新生抗原に基づいたワクチン接種がＴ細胞応答を誘発し[6]、新生抗原を標的とした細胞療法が、選択された患者において腫瘍退縮を引き起こしうる[7]ことが示されている。
【０００４】
がん及び感染症の両方の状況における抗原ワクチン設計における疑問の１つは、存在する多くのコーディング変異のどれが、「最良の」治療抗原、例えば、免疫を誘発することができる抗原を生じるかというものである。
【０００５】
現行の抗原予測法の課題に加えて、その多くがヒト由来のものである、ヒトにおける抗原送達に使用することができる既存のベクター系にもやはり特定の課題が存在する。例えば、多くのヒトは、過去の自然の曝露の結果としてヒトウイルスに対する既存の免疫を有しており、この免疫ががん治療または感染症に対するワクチン接種などのワクチン接種戦略における抗原送達用の組換えヒトウイルスの使用にとって大きな障害となりうる。上記の課題を解決するためのワクチン接種戦略には一定の進歩があったものの、ワクチンの効能及び有効性の改善など、特に臨床用途における改良が依然求められている。
【発明の概要】
【０００６】
アデノウイルスベクターであって、アデノウイルスゲノムの１つ以上の遺伝子または調節配列を含むアデノウイルス骨格を含み、アデノウイルス骨格が、アデノウイルスゲノムに関して部分欠失Ｅ４遺伝子を含み、部分欠失Ｅ４遺伝子が、欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ２領域、及び欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ３領域、及び場合により、欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ４領域を含み、場合により、アデノウイルスベクターがさらに、カセットであって、（１）少なくとも１つのペイロード核酸配列であって、場合により少なくとも１つのペイロード核酸配列がポリペプチドをコードし、場合によりポリペプチドが抗原を含み、場合により抗原が、ＭＨＣクラスＩエピトープ、ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、またはこれらの組み合わせを含み、場合により少なくとも１つのペイロード核酸配列が、５’リンカー配列及び／または３’リンカ

ー配列をさらに含む、少なくとも１つのペイロード核酸配列と、場合により、（２）少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列と、（３）場合により、少なくとも１つのユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列と、（４）場合により、少なくとも１つのＧＰＧＰＧコードリンカー配列（配列番号５６）と、（５）場合により、少なくとも１つのポリアデニル化配列と、を含むカセットを含む、アデノウイルスベクターである。

【０００７】

また、本明細書では、改変ＣｈＡｄＶ６８配列を含むチンパンジーアデノウイルスベクターであって、改変ＣｈＡｄＶ６８配列が、（ａ）配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列の部分欠失Ｅ４遺伝子と、（ｂ）配列番号１に示されるＣｈＡｄＶ６８配列の１つ以上の遺伝子または調節配列であって、場合により、前記１つ以上の遺伝子または調節配列が、配列番号１に示される配列のチンパンジーアデノウイルス末端逆位反復配列（ＩＴＲ）、Ｅ１Ａ、Ｅ１Ｂ、Ｅ２Ａ、Ｅ２Ｂ、Ｅ３、Ｅ４、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４、及びＬ５遺伝子のうちの少なくとも１つを含む、前記１つ以上の遺伝子または調節配列と、を含み、場合により、チンパンジーアデノウイルスベクターがさらにカセットを含み、カセットが少なくとも１つのペイロード核酸配列を含み、カセットが、少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列を含む、チンパンジーアデノウイルスベクターも開示される。

【０００８】

また、本明細書では、改変ＣｈＡｄＶ６８配列を含むチンパンジーアデノウイルスベクターであって、改変ＣｈＡｄＶ６８配列が、（ａ）配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列の部分欠失Ｅ４遺伝子と、（ｂ）配列番号１に示される配列のヌクレオチド２～３４，９１６であって、部分欠失Ｅ４遺伝子がヌクレオチド２～３４，９１６の３’であり、場合により、ヌクレオチド２～３４，９１６はさらに、Ｅ１欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド５７７～３４０３を欠いており、かつ／または、Ｅ３欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５を欠いている、ヌクレオチド２～３４，９１６と、（ｃ）配列番号１に示される配列のヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８であって、部分欠失Ｅ４遺伝子がヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８の５’である、ヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８と、を含み、場合により、チンパンジーアデノウイルスベクターがカセットをさらに含み、カセットが少なくとも１つのペイロード核酸配列を含み、カセットが、少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列を含む、チンパンジーアデノウイルスベクターも開示される。

【０００９】

また、本明細書では、チンパンジーアデノウイルスベクターであって、ａ．改変ＣｈＡｄＶ６８配列であって、（ｉ）配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列の部分欠失Ｅ４遺伝子と、（ii）配列番号１に示される配列のヌクレオチド２～３４，９１６であって、部分欠失Ｅ４遺伝子がヌクレオチド２～３４，９１６の３’であり、場合により、ヌクレオチド２～３４，９１６はさらに、Ｅ１欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド５７７～３４０３を欠いており、かつ／または、Ｅ３欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５を欠いている、ヌクレオチド２～３４，９１６と、（ｉｉｉ）配列番号１に示される配列のヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８であって、部分欠失Ｅ４遺伝子がヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８の５’である、ヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８と、を含む改変ＣｈＡｄＶ６８配列と、ｂ．ＣＭＶ由来プロモーター配列と、ｃ．ＳＶ４０ポリアデニル化シグナルヌクレオチド配列と、ｄ．カセットであって、少なくとも１つのＭＨＣクラスＩエピトープであって、場合により、少なくとも１つのＭＨＣクラスＩエピトープが、互いに直線

的に連結された少なくとも２個の異なるＭＨＣクラスＩエピトープを含み、異なるＭＨＣクラスＩエピトープのそれぞれが場合により、（Ａ）コードされたペプチド配列を野生型核酸配列によってコードされる対応するペプチド配列とは異なるものとする少なくとも１つの変更であって、異なるＭＨＣクラスＩエピトープがアミノ酸７～１５個の長さである、少なくとも１つの変更、（Ｂ）少なくともアミノ酸３個の長さである異なるＭＨＣクラスＩエピトープの天然のＮ末端アミノ酸配列を含むＮ末端リンカー、（Ｃ）少なくともアミノ酸３個の長さである異なるＭＨＣクラスＩエピトープの天然のＣ末端アミノ酸配列を含むＣ末端リンカー、または（Ｄ）これらの組み合わせ、を含む、少なくとも１つのＭＨＣクラスＩエピトープ、少なくとも１つのＭＨＣクラスＩＩエピトープであって、場合により少なくとも２個の異なるＭＨＣクラスＩＩエピトープを含む、少なくとも１つのＭＨＣクラスＩＩエピトープ、Ｂ細胞応答を刺激することができる少なくとも１つのエピトープ、または、これらの組み合わせ、をコードする少なくとも１つのペイロード核酸配列を含む、カセットと、を含み、カセットがＣｈＡｄＶ６８の欠失領域内に挿入され、ＣＭＶ由来プロモーター配列がカセットに機能的に連結されている、チンパンジーアデノウイルスベクターも開示される。

【００１０】

また、本明細書では、対象の免疫応答を刺激するための方法であって、対象に、アデノウイルスゲノムの１つ以上の遺伝子または調節配列を含むアデノウイルス骨格を含むアデノウイルスベクターを投与することを含み、アデノウイルス骨格が、アデノウイルスゲノムに関して部分欠失Ｅ４遺伝子を含み、部分欠失Ｅ４遺伝子が、欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ２領域、及び欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ３領域、及び場合により、欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ４領域を含み、アデノウイルスベクターがカセットをさらに含み、カセットが、（１）少なくとも１つのペイロード核酸配列であって、場合により少なくとも１つのペイロード核酸配列がポリペプチドをコードし、場合によりポリペプチドが抗原を含み、場合により抗原が、ＭＨＣクラスＩエピトープ、ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、またはこれらの組み合わせを含み、場合により少なくとも１つのペイロード核酸配列が、５’リンカー配列及び／または３’リンカー配列をさらに含む、少なくとも１つのペイロード核酸配列と、場合により、（２）少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列と、（３）場合により、少なくとも１つのユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列と、（４）場合により、少なくとも１つのＧＰＧＰＧコードリンカー配列（配列番号５６）と、（５）場合により、少なくとも１つのポリアデニル化配列と、を含む、方法も開示される。

【００１１】

また、本明細書では、場合によりがんまたは感染症である疾患を有する対象を治療するための方法であって、対象に、アデノウイルスゲノムの１つ以上の遺伝子または調節配列を含むアデノウイルス骨格を含むアデノウイルスベクターを投与することを含み、アデノウイルス骨格が、アデノウイルスゲノムに関して部分欠失Ｅ４遺伝子を含み、部分欠失Ｅ４遺伝子が、欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ２領域、及び欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ３領域、及び場合により、欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ４領域を含み、アデノウイルスベクターがカセットをさらに含み、カセットが、（１）少なくとも１つのペイロード核酸配列であって、場合により少なくとも１つのペイロード核酸配列がポリペプチドをコードし、場合によりポリペプチドが抗原を含み、場合により抗原が、ＭＨＣクラスＩエピトープ、ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、またはこれらの組み合わせを含み、場合により少なくとも１つのペイロード核酸配列が、５’リンカー配列及び／または３’リンカー配列をさらに含む、少なくとも１つのペイロード核酸配列と、場合により、（２）少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列と、（３）場合により、少なくとも１つのユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列と、（４）場合により、少なくとも１つのＧＰＧＰＧコードリンカー配列（配列番号５６）と、（５）場合により、少なくとも１つのポリ

アデニル化配列と、を含む、方法も開示される。

【００１２】

また、本明細書では、対象の免疫応答を刺激するための方法であって、対象に、改変ＣｈＡｄＶ６８配列を含むアデノウイルスベクターを投与することを含み、改変ＣｈＡｄＶ６８配列が、（ａ）配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列の部分欠失Ｅ４遺伝子と、（ｂ）配列番号１に示されるＣｈＡｄＶ６８配列の１つ以上の遺伝子または調節配列であって、場合により、前記１つ以上の遺伝子または調節配列が、配列番号１に示される配列のチンパンジーアデノウイルス末端逆位反復配列（ＩＴＲ）、Ｅ１Ａ、Ｅ１Ｂ、Ｅ２Ａ、Ｅ２Ｂ、Ｅ３、Ｅ４、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４、及びＬ５遺伝子のうちの少なくとも１つを含む、前記１つ以上の遺伝子または調節配列と、を含み、チンパンジーアデノウイルスベクターがカセットをさらに含み、カセットが少なくとも１つのペイロード核酸配列を含み、カセットが、少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列を含む、方法も開示される。

【００１３】

また、本明細書では、がんまたは感染症である疾患を有する対象を治療するための方法であって、対象に、改変ＣｈＡｄＶ６８配列を含むアデノウイルスベクターを投与することを含み、改変ＣｈＡｄＶ６８配列が、（ａ）配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列の部分欠失Ｅ４遺伝子と、（ｂ）配列番号１に示されるＣｈＡｄＶ６８配列の１つ以上の遺伝子または調節配列であって、場合により、前記１つ以上の遺伝子または調節配列が、配列番号１に示される配列のチンパンジーアデノウイルス末端逆位反復配列（ＩＴＲ）、Ｅ１Ａ、Ｅ１Ｂ、Ｅ２Ａ、Ｅ２Ｂ、Ｅ３、Ｅ４、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４、及びＬ５遺伝子のうちの少なくとも１つを含む、前記１つ以上の遺伝子または調節配列と、を含み、チンパンジーアデノウイルスベクターがカセットをさらに含み、カセットが少なくとも１つのペイロード核酸配列を含み、カセットが、少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列を含む、方法も開示される。

【００１４】

また、本明細書では、ウイルスを生産する方法であって、ａ．カセットを含むウイルスベクターを与える工程であって、カセットが、（ｉ）少なくとも１つのペイロード核酸配列であって、場合により少なくとも１つのペイロード核酸配列がポリペプチドをコードし、場合によりポリペプチドが抗原を含み、場合により抗原が、ＭＨＣクラスＩエピトープ、ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、またはこれらの組み合わせを含み、場合により少なくとも１つのペイロード核酸配列が、５’リンカー配列及び／または３’リンカー配列をさらに含む、少なくとも１つのペイロード核酸配列と、場合により、（ｉｉ）少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列であって、少なくとも１つのプロモーターが、テトラサイクリン（ＴＥＴ）リプレッサータンパク質（ＴＥＴｒ）制御プロモーターである、少なくとも１つのプロモーター配列と、（ｉｉｉ）場合により、少なくとも１つのＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列と、（ｉｖ）場合により、少なくとも１つのＧＰＧＰＧコードリンカー配列（配列番号５６）と、（ｖ）場合により、少なくとも１つのポリアデニル化配列と、を含む、工程と、ｂ．ＴＥＴｒタンパク質を発現するように操作された細胞を与える工程と、ｃ．ウイルスベクターを、ウイルスの生産に充分な条件下で細胞と接触させる工程と、を含む、方法も開示される。

【００１５】

いくつかの態様では、ウイルスベクターがチンパンジーアデノウイルスベクターを含み、場合によりチンパンジーアデノウイルスベクターがＣｈＡｄＶ６８ベクターである。いくつかの態様では、ウイルスの生産が、ＴＥＴｒ制御プロモーターを含まないベクターを使用して生産されるウイルスの生産に対して、ＴＥＴｒ制御プロモーターを含むベクターを使用して増加する。いくつかの態様では、増加した生産が、ＴＥＴｒ制御プロモーター

を含まないベクターを使用した生産に対して少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、少なくとも２．５倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、少なくとも９倍、または少なくとも１０倍増加している。いくつかの態様では、増加した生産が、ＴＥＴｒ制御プロモーターを含まないベクターを使用した生産に対して少なくとも１５倍、少なくとも２０倍、少なくとも２５倍、少なくとも３０倍、少なくとも３５倍、少なくとも４０倍、少なくとも５０倍、少なくとも６０倍、少なくとも７０倍、少なくとも８０倍、少なくとも９０倍、または少なくとも１００倍増加している。いくつかの態様では、ウイルスの生産が、ＴＥＴｒタンパク質を発現するように操作されていない細胞を使用して生産されるウイルスの生産に対して、ＴＥＴｒ制御プロモーターを含むベクターを使用して増加する。いくつかの態様では、増加した生産が、ＴＥＴｒタンパク質を発現するように操作されていない細胞を使用した生産に対して少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、少なくとも２．５倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、少なくとも９倍、または少なくとも１０倍増加している。

【００１６】

また、本明細書では、カセットを含むウイルスベクターであって、カセットが、（ｉ）少なくとも１つのペイロード核酸配列であって、場合により少なくとも１つのペイロード核酸配列がポリペプチドをコードし、場合によりポリペプチドが抗原を含み、場合により抗原が、ＭＨＣクラスＩエピトープ、ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、またはこれらの組み合わせを含み、場合により少なくとも１つのペイロード核酸配列が、５’リンカー配列及び／または３’リンカー配列をさらに含む、少なくとも１つのペイロード核酸配列と、場合により、（ｉｉ）少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列であって、少なくとも１つのプロモーターが、テトラサイクリン（ＴＥＴ）リプレッサータンパク質（ＴＥＴｒ）制御プロモーター配列である、少なくとも１つのプロモーターと、（ｉｉｉ）場合により、少なくとも１つのＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列と、（ｉｖ）場合により、少なくとも１つのＧＰＧＰＧコードリンカー配列（配列番号５６）と、（ｖ）場合により、少なくとも１つのポリアデニル化配列と、を含む、ウイルスベクターも提供される。

【００１７】

いくつかの態様では、ＴＥＴｒ制御プロモーターが１つ以上のＴＥＴオペレーター（ＴＥＴｏ）核酸配列を含み、場合により１つ以上のＴＥＴｏ核酸配列が、配列番号６０に示されるヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、１つ以上のＴＥＴｏ核酸配列が、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個またはそれ以上のＴＥＴｏ核酸配列を含み、場合によりＴＥＴｏ核酸配列のそれぞれが、配列番号６０に示されるヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、２つ以上のＴＥＴｏ核酸配列が互いに連結されている。いくつかの態様では、２つ以上のＴＥＴｏ核酸配列が互いに直接連結されている。いくつかの態様では、２つ以上のＴＥＴｏ核酸配列がリンカー配列によって互いに連結され、リンカーが、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個以上のヌクレオチドを含み、場合により、リンカー配列が、配列番号６１に示されるリンカーヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、１つ以上のＴＥＴｏ核酸配列が、プロモーター配列のＲＮＡポリメラーゼ結合配列の５’である。いくつかの態様では、１つ以上のＴＥＴｏ核酸配列が、プロモーター配列のＲＮＡポリメラーゼ結合配列の3’である。いくつかの態様では、少なくとも１つのプロモーター配列は、ＣＭＶ、ＳＶ４０、ＥＦ－１、ＲＳＶ、ＰＧＫ、ＨＳＡ、ＭＣＫまたはＥＢＶプロモーター配列を含む。いくつかの態様では、少なくとも１つのプロモーター配列が、ＣＭＶプロモーター配列であり、場合によりＣＭＶ由来プロモーター配列が、配列番号６４に示されるＣＭＶプロモーターヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、ＣＭＶ由来プロモーター配列が最小ＣＭＶプロモーター配列であり、場合により最小ＣＭＶプロモーター配列が、配列番号６１に示される最小ＣＭＶプロモーターヌクレオチド配列を含む。

【００１８】
いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結されたＴＥＴｒ制御プロモーターは、５’から３’に向けて以下を含む式：（Ｔ－Ｌ）$_{X}$－Ｐ－Ｎ［式中、Ｎは、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの１つを含み、場合により、各Ｎは、場合により、コードされたエピトープ配列を野生型核酸配列によってコードされる対応するペプチド配列とは異なるものとする少なくとも１つの変更を有する、ＭＨＣクラスＩエピトープ、ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、またはこれらの組み合わせをコードし、Ｐは、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つに機能的に連結されたプロモーター配列のＲＮＡポリメラーゼ結合配列を含み、Ｔは、配列番号６０に示されるヌクレオチド配列を含むＴＥＴｏ核酸配列を含み、Ｌは、リンカー配列を含み、ただし各ＸについてＹ＝０または１であり、Ｘ＝１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０である］に記述される順序付けられた配列を含む。いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結されたＴＥＴｒ制御プロモーターが、５’から３’に向けて以下を含む式：Ｐ－（Ｔ－Ｌ）$_{X}$－Ｎ［式中、Ｎは、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの１つを含み、場合により、各Ｎは、場合により、コードされたエピトープ配列を野生型核酸配列によってコードされる対応するペプチド配列とは異なるものとする少なくとも１つの変更を有する、ＭＨＣクラスＩエピトープ、ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、またはこれらの組み合わせをコードし、Ｐは、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つに機能的に連結されたプロモーター配列のＲＮＡポリメラーゼ結合配列を含み、Ｔは、配列番号６０に示されるヌクレオチド配列を含むＴＥＴｏ核酸配列を含み、Ｌは、リンカー配列を含み、ただし各ＸについてＹ＝０または１であり、Ｘ＝１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０である］に記述される順序付けられた配列を含む。
【００１９】
いくつかの態様では、ＴＥＴｒ制御プロモーターは、（１）最小ＣＭＶプロモーター配列と、（２）そのそれぞれが配列番号６０に示されるヌクレオチド配列を含む、７個のＴＥＴｏ核酸配列と、を含み、ＴＥＴｏ核酸配列のそれぞれがリンカー配列によって互いに連結され、７個のＴＥＴｏ核酸配列が最小ＣＭＶプロモーター配列の５’であり、場合によりＴＥＴｒ制御プロモーターが、配列番号６１に示されるヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、ＴＥＴｒ制御プロモーターは、（１）ＣＭＶプロモーター配列と、（２）そのそれぞれが配列番号６０に示されるヌクレオチド配列を含む、２個のＴＥＴｏ核酸配列と、を含み、ＴＥＴｏ核酸配列のそれぞれが互いに直接連結され、２個のＴＥＴｏ核酸配列がＣＭＶプロモーター配列の３’であり、場合によりＴＥＴｒ制御プロモーターが、配列番号６４に示されるヌクレオチド配列を含む。
【００２０】
いくつかの態様では、ウイルスベクターがベクター骨格を含み、ベクター骨格がチンパンジーアデノウイルスベクターを含み、場合によりチンパンジーアデノウイルスベクターがＣｈＡｄＶ６８ベクターである。
【００２１】
いくつかの態様では、カセットが、５’から３’に向けて以下を含む式：$_{a}$Ｐ－（Ｌ５$_{b}$－Ｎ$_{c}$－Ｌ３$_{d}$）$_{X}$－（Ｇ５$_{e}$－Ｕ$_{f}$）$_{Y}$－Ｇ３$_{g}$－Ａ$_{h}$［式中、Ｎは、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの１つを含み、場合により、各Ｎは、場合により、コードされたエピトープ配列を野生型核酸配列によってコードされる対応するペプチド配列とは異なるものとする少なくとも１つの変更を有する、ＭＨＣクラスＩエピトープ、ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、またはこれらの組み合わせをコードし、ただしｃ＝１であり、Ｐは、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つに機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列を含み、ただしａ＝１であり、Ｌ５は、５’リンカー配列を含み、ただしｂ＝０または１であり、Ｌ３は

、３’リンカー配列を含み、ただしｄ＝０または１であり、Ｇ５は、ＧＰＧＰＧアミノ酸リンカー（配列番号５６）をコードする少なくとも１つの核酸配列のうちの１つを含み、ただしｅ＝０または１であり、Ｇ３は、ＧＰＧＰＧアミノ酸リンカー（配列番号５６）をコードする少なくとも１つの核酸配列のうちの１つを含み、ただしｇ＝０または１であり、Ｕは、少なくとも１つのユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列のうちの１つを含み、ただしｆ＝１であり、Ａは、少なくとも１つのポリアデニル化配列を含み、ただしｈ＝０または１であり、Ｘ＝２～４００であり、各Ｘについて、対応するN_cは、ペイロード核酸配列であり、場合により、各Ｘについて、対応するN_cは異なるペイロード核酸配列であり、Ｙ＝０～２であり、各Ｙについて、対応するU_fは、ユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列であり、場合により、各Ｙについて、対応するU_fは異なるユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード配列である］に示される順序付けられた配列を含む。

【００２２】

いくつかの態様では、カセットは、順序付けられた配列にコードされない少なくとも１つのさらなるペイロード核酸配列を含む。いくつかの態様では、ｂ＝１、ｄ＝１、ｅ＝１、ｇ＝１、ｈ＝１、Ｘ＝１０、Ｙ＝２であり、Ｐが、ＣＭＶ由来プロモーター配列であり、各Ｎが、ＭＨＣクラスＩエピトープ、ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、またはこれらの組み合わせをコードし、Ｌ５が、エピトープの天然のＮ末端アミノ酸配列をコードし、５’リンカー配列が、少なくともアミノ酸３個の長さであるペプチドをコードし、Ｌ３が、エピトープの天然のＣ末端アミノ酸配列をコードし、３’リンカー配列が、少なくともアミノ酸３個の長さであるペプチドをコードし、Ｕが、ＰＡＤＲＥクラスＩＩ配列及び破傷風毒素ＭＨＣクラスＩＩ配列のそれぞれであり、ベクターが改変ＣｈＡｄＶ６８配列を含み、改変ＣｈＡｄＶ６８配列が、（ａ）配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列の部分欠失Ｅ４遺伝子と、（ｂ）配列番号１に示される配列のヌクレオチド２～３４，９１６であって、部分欠失Ｅ４遺伝子がヌクレオチド２～３４，９１６の３’であり、場合により、ヌクレオチド２～３４，９１６はさらに、Ｅ１欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド５７７～３４０３を欠いており、かつ／または、Ｅ３欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５を欠いている、ヌクレオチド２～３４，９１６と、（ｃ）配列番号１に示される配列のヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８であって、部分欠失Ｅ４遺伝子がヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８の５’である、ヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８と、を含む。

【００２３】

いくつかの態様では、ベクターがチンパンジーアデノウイルスベクターであり、場合によりチンパンジーアデノウイルスベクターがＣｈＡｄＶ６８ベクターである。

【００２４】

いくつかの態様では、部分欠失Ｅ４遺伝子は、Ａ．配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列、Ｂ．配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９１６～３４，９４２、ヌクレオチド３４，９５２～３５，３０５、配列番号１に示される配列のヌクレオチド３５，３０２～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列であって、ベクターが、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド２～３６，５１８を含む、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列、Ｃ．配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９８０～３６，５１６を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列であって、ベクターが、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド２～３６，５１８を含む、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列、Ｄ．配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９７９～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列であって、ベクターが、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド２～３６，５１８を含む、配列番号１に示されるＥ４遺伝子

配列、Ｅ．Ｅ４Ｏｒｆ２の少なくとも部分欠失、完全欠失したＥ４Ｏｒｆ３、及びＥ４Ｏｒｆ４の少なくとも部分欠失のＥ４欠失、Ｆ．Ｅ４Ｏｒｆ２の少なくとも部分欠失、Ｅ４Ｏｒｆ３の少なくとも部分欠失、及びＥ４Ｏｒｆ４の少なくとも部分欠失のＥ４欠失、Ｇ．Ｅ４Ｏｒｆ１の少なくとも部分欠失、完全欠失したＥ４Ｏｒｆ２、及びＥ４Ｏｒｆ３の少なくとも部分欠失のＥ４欠失、またはＨ．Ｅ４Ｏｒｆ２の少なくとも部分欠失及びＥ４Ｏｒｆ３の少なくとも部分欠失のＥ４欠失を含む。

【００２５】

いくつかの態様では、ベクターは、配列番号１に示されるＣｈＡｄＶ６８配列の１つ以上の遺伝子または調節配列を含み、場合により、１つ以上の遺伝子または調節配列が、配列番号１に示される配列のチンパンジーアデノウイルスの末端逆位繰り返し配列（ＩＴＲ）、Ｅ１Ａ、Ｅ１Ｂ、Ｅ２Ａ、Ｅ２Ｂ、Ｅ３、Ｅ４、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４、及びＬ５遺伝子からなる群から選択される。いくつかの態様では、アデノウイルス骨格または改変ＣｈＡｄＶ６８配列が、アデノウイルスゲノムに関して、または配列番号１に示される配列に関して、アデノウイルスＥ１Ａ、Ｅ１Ｂ、Ｅ２Ａ、Ｅ２Ｂ、Ｅ３、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４、及びＬ５遺伝子からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子に機能的欠失をさらに含み、場合により、アデノウイルス骨格もしくは改変ＣｈＡｄＶ６８配列が完全に欠失しているか、またはアデノウイルスゲノムに関して、もしくは配列番号１に示される配列に関して、（１）Ｅ１Ａ及びＥ１Ｂ、または（２）Ｅ１Ａ、Ｅ１Ｂ、及びＥ３に機能的欠失を有し、場合により、Ｅ１遺伝子が、配列番号１に示される配列に関して少なくともヌクレオチド５７７～３４０３のＥ１欠失により機能的に欠失しており、場合により、Ｅ３遺伝子が、配列番号１に示される配列に関して少なくともヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５のＥ３欠失により機能的に欠失している。

【００２６】

いくつかの態様では、カセットが、Ｅ１領域、Ｅ３領域、及び／または、カセットの組み込みが可能な任意の欠失されたＡｄＶ領域においてベクター中に存在しかつ挿入されている。

【００２７】

いくつかの態様において、ベクターは、第１世代、第２世代、またはヘルパー依存型のアデノウイルスベクターのうちの１つから生成される。

【００２８】

いくつかの態様では、改変ＣｈＡｄＶ６８配列が、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２～３４，９１６を含み、部分欠失Ｅ４遺伝子がヌクレオチド２～３４，９１６の３’である。いくつかの態様では、ヌクレオチド２～３４，９１６が、Ｅ１欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド５７７～３４０３を欠いている。いくつかの態様では、ヌクレオチド２～３４，９１６が、配列番号１に示される配列に関してヌクレオチド４５６～３０１４を欠いている。いくつかの態様では、ヌクレオチド２～３４，９１６が、Ｅ３欠失に相当する、配列番号１に示される配列に関してヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５を欠いている。いくつかの態様では、ヌクレオチド２～３４，９１６が、配列番号１に示される配列に関してヌクレオチド２７，８１６～３１，３３３を欠いている。いくつかの態様では、ヌクレオチド２～３４，９１６が、Ｅ１欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド５７７～３４０３を欠いており、かつ、Ｅ３欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５を欠いている。いくつかの態様では、ヌクレオチド２～３４，９１６がさらに、配列番号１に示される配列に関してヌクレオチド３９５７～１０３４６、ヌクレオチド２１７８７～２３３７０、ヌクレオチド３３４８６～３６１９３、またはこれらの組み合わせを欠いている。

【００２９】

いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが抗原をコードし、抗原が、ＭＨＣクラスＩエピトープ、ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、またはこれらの組み合わせを含む。いくつ

かの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、エピトープへの抗原のプロセシングを受けることが可能なポリペプチド配列をコードしており、場合により、エピトープが、細胞の表面上のＭＨＣクラスＩにより提示されることが知られているかまたは疑われており、場合により、細胞の表面が腫瘍細胞表面または感染細胞表面である。

【００３０】

いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、細胞の表面上のＭＨＣクラスＩ及び／またはＭＨＣクラスＩＩにより提示されるポリペプチド配列またはその部分をコードしており、場合により、細胞の表面が腫瘍細胞表面または感染細胞表面である。いくつかの態様において、腫瘍細胞は、肺がん、メラノーマ、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、腎臓がん、胃がん、結腸がん、精巣がん、頭頸部がん、膵臓がん、脳がん、Ｂ細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、Ｔ細胞リンパ球性白血病、非小細胞肺がん、及び小細胞肺がんからなる群から選択され、または、感染細胞は、病原体感染細胞、ウイルス感染細胞、細菌感染細胞、真菌感染細胞、及び寄生虫感染細胞からなる群から選択され、場合により、ウイルス感染細胞が、ＨＩＶ感染細胞、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス（ＳＡＲＳ）感染細胞、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２型（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）感染細胞、エボラ感染細胞、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）感染細胞、インフルエンザ感染細胞、及びＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）感染細胞からなる群から選択される。

【００３１】

いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープを含むポリペプチド配列またはその部分をコードし、場合により、ポリペプチド配列またはその部分が、完全長タンパク質、タンパク質ドメイン、タンパク質サブユニット、または抗原が結合できることが予測されるかまたは知られている抗原性フラグメントを含む。

【００３２】

いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、病原体由来ペプチド、ウイルス由来ペプチド、細菌由来ペプチド、真菌由来ペプチド、及び寄生虫由来ペプチドからなる群から選択される感染症生物ペプチドをコードする。いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、コードされたエピトープ配列を野生型核酸配列によってコードされる対応するペプチド配列とは異なるものとする少なくとも１つの変更を有するエピトープをコードする。いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、コードされたエピトープ配列を野生型核酸配列によってコードされる対応するペプチド配列とは異なるものとする少なくとも１つの変更を有するＭＨＣクラスＩエピトープまたはＭＨＣクラスＩＩエピトープをコードし、場合により、コードされたポリペプチド配列またはその部分が、翻訳された対応する野生型核酸配列と比較してその対応するＭＨＣアレルに対する増加した結合親和性、ＭＨＣアレルに対する増加した結合安定性、及び／またはＭＨＣアレル上への提示の増加した尤度を有する。いくつかの態様では、少なくとも１つの変更は、点変異、フレームシフト変異、非フレームシフト変異、欠失変異、挿入変異、スプライスバリアント、ゲノム再編成、またはプロテアソームにより生成されたスプライス抗原を含む。

【００３３】

いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、完全長タンパク質、タンパク質ドメイン、またはタンパク質サブユニットをコードする。いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、抗体、サイトカイン、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、Ｔ細胞受容体、及びゲノム編集システムのヌクレアーゼをコードする。

【００３４】

いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが

、非コード核酸配列を含む。いくつかの態様では、非コード核酸配列が、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）ポリヌクレオチドまたはゲノム編集システムのポリヌクレオチドを含む。

【００３５】

いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列のそれぞれは互いに直接連結される。いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、リンカーをコードする核酸配列によって、異なるペイロード核酸配列と連結されている。いくつかの態様では、リンカーが、ＭＨＣクラスＩエピトープをコードする２個のペイロード核酸配列同士を連結するか、またはＭＨＣクラスＩエピトープをコードする第１のペイロード核酸配列とＭＨＣクラスＩＩエピトープをコードするかもしくはＢ細胞応答を刺激することができるエピトープ配列をコードする第２のペイロード核酸配列とを連結する。いくつかの態様では、リンカーは、（１）少なくとも残基２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の長さの連続したグリシン残基、（２）少なくとも残基２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の長さの連続したアラニン残基、（３）２個のアルギニン残基（ＲＲ）、（４）アラニン、アラニン、チロシン（ＡＡＹ）、（５）哺乳動物プロテアソームによって効率的にプロセシングされる、少なくともアミノ酸残基２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の長さのコンセンサス配列、及び（６）同種由来タンパク質に由来する抗原に隣接する、少なくともアミノ酸残基２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、または２～２０個の長さの１つ以上の天然配列からなる群から選択される。いくつかの態様では、リンカーが、ＭＨＣクラスＩエピトープをコードする２個のペイロード核酸配列同士を連結するか、またはＭＨＣクラスＩエピトープをコードする第１のペイロード核酸配列とＭＨＣクラスIエピトープをコードするかもしくはＢ細胞応答を刺激することができるエピトープ配列をコードする第２のペイロード核酸配列とを連結する。いくつかの態様では、リンカーは、配列ＧＰＧＰＧ（配列番号５６）を含む。

【００３６】

いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、少なくとも１つのペイロード核酸配列の発現、安定性、細胞トラフィッキング、プロセシング及び提示、ならびに／または免疫原性を高める、かつ、場合により、少なくとも１つのペイロード核酸配列によってコードされるポリペプチドの発現、安定性、細胞トラフィッキング、プロセシング及び提示、ならびに／または免疫原性を高める、分離したまたは連続した配列に機能的または直接的に連結されている。いくつかの態様では、分離したまたは連続した配列が、ユビキチン配列、プロテアソームターゲティング性を高めるように改変され、場合により、７６位にＧｌｙ→Ａｌａ置換を有するユビキチン配列、場合によりＩｇＫを含む、免疫グロブリンシグナル配列、主要組織適合性クラスＩ配列、リソソーム関連膜タンパク質（ＬＡＭＰ）－１、ヒト樹状細胞リソソーム関連膜タンパク質、及び主要組織適合性クラスＩＩ配列のうちの少なくとも１つを含み、場合により、プロテアソームターゲティング性を高めるように改変されたユビキチン配列がＡ７６である。

【００３７】

いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列のそれぞれの発現が、少なくとも１つのプロモーターによって駆動される。

【００３８】

いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列が、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のペイロード核酸配列を含む。いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列が、少なくとも１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、または最大４００個のペイロード核酸配列を含む。いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列が、少なくとも２～４００個のペイロード核酸配列を含み、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、ＭＨＣクラスＩエピトープ、ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、またはそれらの組み合わせをコードする。いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列が少なくとも２～４００個のペイロード核酸配列を

含み、対象に投与されて翻訳された場合、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが抗原提示細胞上に提示される抗原をコードし、抗原を標的とする免疫応答をもたらす。いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列が少なくとも２～４００個のＭＨＣクラスＩ及び／またはＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列を含み、対象に投与されて翻訳された場合、ＭＨＣクラスＩまたはＭＨＣクラスＩＩ抗原のうちの少なくとも１つが抗原提示細胞上に提示され、細胞表面上の抗原のうちの少なくとも１つを標的とする免疫応答をもたらし、場合により、少なくとも２～４００個のＭＨＣクラスＩまたはＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列のそれぞれの発現が、少なくとも１つのプロモーターによって駆動される。

【００３９】

いくつかの態様では、各ＭＨＣクラスＩエピトープが独立して、アミノ酸８～３５個の長さ、場合により、アミノ酸７～１５個、９～１７個、９～２５個、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４または３５個の長さである。いくつかの態様では、少なくとも１つのユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列が存在する。いくつかの態様では、少なくとも１つのユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列が存在し、かつこれが、コードされたペプチド配列を野生型核酸配列によってコードされる対応するペプチド配列とは異なるものとする少なくとも１つの変更を含む少なくとも１つのユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列を含む。いくつかの態様では、少なくとも１つのユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列は、アミノ酸１２～２０個、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０，または２０～４０個の長さである。いくつかの態様では、少なくとも１つのユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列が存在し、少なくとも１つのユニバーサル配列が、破傷風毒素及びＰＡＤＲＥの少なくとも一方を含む。

【００４０】

いくつかの態様では、少なくとも１つのプロモーター配列が、調節可能なプロモーターであり、場合により、調節可能なプロモーターがテトラサイクリン（ＴＥＴ）リプレッサータンパク質（ＴＥＴｒ）制御プロモーターであり、場合により、調節可能なプロモーターが、プロモーターのＲＮＡポリメラーゼ結合配列の５’または３’に複数のＴＥＴオペレーター（ＴＥＴｏ）配列を含む。複数のＴＥＴオペレーター（ＴＥＴｏ）配列がＲＮＡの５’または３’にある。少なくとも１つのプロモーター配列は、構成的である。複数のＴＥＴオペレーター（ＴＥＴｏ）配列がＲＮＡの５’または３’にある。少なくとも１つのプロモーター配列は、ＣＭＶ、ＳＶ４０、ＥＦ－１、ＲＳＶ、ＰＧＫ、ＨＳＡ、ＭＣＫまたはＥＢＶプロモーター配列である。

【００４１】

いくつかの態様では、カセットが、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つに機能的に連結された少なくとも１つのポリアデニル化（ポリＡ）配列をさらに含み、場合により、ポリＡ配列が、少なくとも１つのペイロード核酸配列の３’に位置する。いくつかの態様において、ポリＡ配列は、ＳＶ４０またはウシ成長ホルモン（ＢＧＨ）ポリＡ配列を含む。

【００４２】

いくつかの態様では、カセットが、イントロン配列、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節因子（ＷＰＲＥ）配列、内部リボソーム進入配列（ＩＲＥＳ）配列、２Ａ自己切断ペプチド配列をコードするヌクレオチド配列、フーリン切断部位をコードするヌクレオチド配列、ＴＥＶ切断部位をコードするヌクレオチド配列、または、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つに機能的に連結された、ｍＲＮＡの核輸送、安定性、または翻訳効率を向上させることが知られている５’または３’の非コード領域内の配列のうちの少なくとも１つをさらに含む。

【００４３】

いくつかの態様では、カセットが、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、ＧＦＰ変異体、分

泌型アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、またはルシフェラーゼ変異体を含むがこれらに限定されないレポーター遺伝子を含む。

【００４４】

いくつかの態様では、ベクターが、少なくとも１つの免疫調節物質をコードする１つ以上のペイロード核酸配列をさらに、場合により、少なくとも１つの免疫調節物質が免疫チェックポイント分子を阻害する。いくつかの態様では、免疫調節物質は、抗ＣＴＬＡ４抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗ＰＤ－１抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗ＰＤ－Ｌ１抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗４－１ＢＢ抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または抗ＯＸ－４０抗体もしくはその抗原結合フラグメントである。いくつかの態様では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、単一特異性抗体もしくは互いに連結された多重特異性抗体としての単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）（例えば、ラクダ科動物の抗体ドメイン）、または完全長の一本鎖抗体（例えば、柔軟なリンカーによって重鎖と軽鎖が連結された完全長ＩｇＧ）である。いくつかの態様では、抗体の重鎖配列と軽鎖配列とは、２Ａなどの自己切断配列またはＩＲＥＳ配列によって分離された連続的配列であり、場合により、自己切断配列は自己切断配列の５’にフーリン切断部位配列を有し、あるいは、抗体の重鎖配列と軽鎖配列とが、連続したグリシン残基のような柔軟なリンカーによって連結されている。いくつかの態様では、免疫調節物質はサイトカインである。いくつかの態様では、サイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、もしくはＩＬ－２１、またはそれぞれのその変異体である。

【００４５】

いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、（ａ）腫瘍細胞、感染細胞、または感染症生物からエクソーム、トランスクリプトーム、または全ゲノムヌクレオチドシークエンシングデータのうちの少なくとも１つを取得する工程であって、ヌクレオチドシークエンシングデータが、抗原のセットのそれぞれのペプチド配列を表すデータを取得するために用いられる、工程と、（ｂ）各抗原のペプチド配列を提示モデルに入力して、抗原のそれぞれが細胞表面上、場合により腫瘍細胞表面上または感染細胞表面上のＭＨＣアレルのうちの１つ以上によって提示される数値的尤度のセットを生成する工程であって、数値的尤度のセットが、受け取られた質量分析データに少なくとも基づいて特定されたものである、工程と、（ｃ）抗原のセットのサブセットを数値的尤度のセットに基づいて選択して、少なくとも１つのペイロード核酸配列を生成するために用いられる選択された抗原のセットを生成する工程と、を実施することによって選択される。

【００４６】

いくつかの態様では、少なくとも１つのペイロード核酸配列のそれぞれが、（ａ）腫瘍細胞、感染細胞、または感染症生物からエクソーム、トランスクリプトーム、または全ゲノムヌクレオチドシークエンシングデータのうちの少なくとも１つを取得する工程であって、ヌクレオチドシークエンシングデータが、抗原のセットのそれぞれのペプチド配列を表すデータを取得するために用いられる、工程と、（ｂ）各抗原のペプチド配列を提示モデルに入力して、抗原のそれぞれが細胞表面上、場合により腫瘍細胞表面上または感染細胞表面上のＭＨＣアレルのうちの１つ以上によって提示される数値的尤度のセットを生成する工程であって、数値的尤度のセットが、受け取られた質量分析データに少なくとも基づいて特定されたものである、工程と、（ｃ）抗原のセットのサブセットを数値的尤度のセットに基づいて選択して、少なくとも１つのペイロード核酸配列のそれぞれを生成するために用いられる選択された抗原のセットを生成する工程と、を実施することによって選択される。いくつかの態様では、選択された抗原のセットの数は、２～２０である。いくつかの態様では、提示モデルは、(ａ)ＭＨＣアレルのうちの特定の１つとペプチド配列の特定の位置の特定のアミノ酸とのペアの存在と、（ｂ）ペアのＭＨＣアレルのうちの特定の１つによる、特定の位置に特定のアミノ酸を含むそのようなペプチド配列の細胞表面上、場合により腫瘍細胞表面上または感染細胞表面上での提示の尤度との間の依存性を表す

。いくつかの態様では、選択された抗原のセットを選択することが、提示モデルに基づいて選択されない抗原に対して、細胞表面上に提示される尤度が増大している抗原を選択することを含む。いくつかの態様では、選択された抗原のセットを選択することは、提示モデルに基づいて選択されない抗原に対して、対象における細胞特異的な免疫応答を誘導することができる尤度が増大している抗原を選択することを含む。いくつかの態様では、選択された抗原のセットを選択することは、提示モデルに基づいて選択されない抗原に対して、プロフェッショナル抗原提示細胞（ＡＰＣ）によってナイーブＴ細胞に対して提示されることができる尤度が増大している抗原を選択することを含み、場合により、ＡＰＣは樹状細胞（ＤＣ）である。いくつかの態様では、選択された抗原のセットを選択することは、提示モデルに基づいて選択されない抗原に対して、中枢性寛容または末梢性寛容による阻害に供される尤度が減少している抗原を選択することを含む。いくつかの態様では、選択された抗原のセットを選択することは、提示モデルに基づいて選択されない抗原に対して、対象における正常組織に対する自己免疫応答を誘導することができる尤度が減少している抗原を選択することを含む。いくつかの態様では、エクソームまたはトランスクリプトームのヌクレオチドシークエンシングデータが、腫瘍細胞もしくは組織、感染細胞、または感染症生物でシークエンシングを行うことによって取得される。いくつかの態様では、シークエンシングは、次世代シークエンシング（ＮＧＳ）または任意の大規模並列処理シークエンシングアプローチである。

【００４７】

いくつかの態様では、カセットは、抗原カセット内の隣接配列によって形成されたジャンクションエピトープ配列を含む。いくつかの態様では、少なくとも１つのまたはそれぞれのジャンクションエピトープ配列は、ＭＨＣに対して５００ｎＭよりも高い親和性を有する。いくつかの態様では、それぞれのジャンクションエピトープ配列は、非自己である。いくつかの態様では、カセットが、非治療的なＭＨＣクラスＩまたはクラスＩＩエピトープをコードしておらず、非治療的エピトープが、対象のＭＨＣアレル上に提示されると予測される。いくつかの態様では、非治療的な予測されたＭＨＣクラスＩまたはクラスＩＩエピトープ配列は、カセット内の隣接配列によって形成されたジャンクションエピトープ配列である。いくつかの態様では、予測は、非治療的エピトープの配列を提示モデルに入力することによって生成される提示尤度に基づいたものである。いくつかの態様では、カセット内における少なくとも１つのペイロード核酸配列の順序は、ｉ．少なくとも１つのペイロード核酸配列の異なる順序に対応した候補カセット配列のセットを生成する工程と、ｉｉ．各候補カセット配列について、候補カセット配列内の非治療的エピトープの提示に基づいた提示スコアを決定する工程と、ｉｉｉ．所定の閾値を下回る提示スコアに関連する候補カセット配列をカセット配列として選択する工程と、を含む一連の工程によって決定される。

【００４８】

いくつかの態様では、ＭＨＣクラスＩ及び／またはクラスＩＩエピトープのそれぞれが、ヒト集団の少なくとも５％に存在する少なくとも１つのＨＬＡアレルによって提示可能であると予測または検証されている。いくつかの態様では、ＭＨＣクラスＩ及び／またはクラスＩＩエピトープのそれぞれが、少なくとも１つのＨＬＡアレルによって提示可能であると予測または検証されており、各抗原／ＨＬＡペアが、ヒト集団において少なくとも０．０１％の抗原／ＨＬＡ存在率（prevalence）を有する。いくつかの態様では、ＭＨＣクラスＩ及び／またはクラスＩＩエピトープのそれぞれが、少なくとも１つのＨＬＡアレルによって提示可能であると予測または検証されており、各抗原／ＨＬＡペアが、ヒト集団において少なくとも0．1％の抗原／ＨＬＡ存在率を有する。いくつかの態様では、ポリペプチドをコードする少なくとも１つのペイロード核酸配列が、対象の組織または試料から直接抽出された天然核酸配列に対してコドン最適化されている。

【００４９】

また、本明細書では、本明細書に記載されるベクターのいずれかと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物も提供される。いくつかの態様では、組成物は、アジュバント

をさらに含む。いくつかの態様では、組成物は、免疫調節物質をさらに含む。いくつかの態様では、免疫調節物質は、抗ＣＴＬＡ４抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗ＰＤ－１抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗ＰＤ－Ｌ１抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗４－１ＢＢ抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または抗ＯＸ－４０抗体もしくはその抗原結合フラグメントである。

【００５０】

また、本明細書では、本明細書に記載されるベクターのいずれかのカセットと、配列番号１の配列の遺伝子と、を含む単離ヌクレオチド配列であって、場合により、遺伝子が、配列番号１に示される配列のチンパンジーアデノウイルスのＩＴＲ、Ｅ１Ａ、Ｅ１Ｂ、Ｅ２Ａ、Ｅ２Ｂ、Ｅ３、Ｅ４、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４、及びＬ５遺伝子からなる群から選択され、場合により、ヌクレオチド配列がｃＤＮＡである、単離ヌクレオチド配列も開示される。

【００５１】

また、本明細書では、本明細書に記載される単離ヌクレオチド配列のいずれかを含む単離細胞であって、場合により細胞が、ＣＨＯ、ＨＥＫ２９３もしくはその変異体、９１１、ＨｅＬａ、Ａ５４９、ＬＰ－２９３、ＰＥＲ．Ｃ６、またはＡＥ１－２ａ細胞である、単離細胞も開示される。

【００５２】

また、本明細書に記載される単離ヌクレオチド配列のいずれかを含むベクターも開示される。

【００５３】

また、本明細書では、本明細書に記載されるベクターまたは組成物のいずれかと、使用説明書と、を含むキットも開示される。

【００５４】

また、本明細書では、対象の免疫応答を刺激するための方法であって、対象に、本明細書に記載されるベクターまたは組成物のいずれかを投与することを含む方法も開示される。いくつかの態様では、ベクターまたは組成物は、筋肉内（ＩＭ）、皮内（ＩＤ）、または皮下（ＳＣ）に投与される。いくつかの態様では、方法は、対象に免疫調節物質を投与することをさらに含み、場合により、免疫調節物質はベクターまたは医薬組成物の投与前、投与と同時、または投与後に投与される。いくつかの態様では、免疫調節物質は、抗ＣＴＬＡ４抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗ＰＤ－１抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗ＰＤ－Ｌ１抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗４－１ＢＢ抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または抗ＯＸ－４０抗体もしくはその抗原結合フラグメントである。いくつかの態様では、免疫調節物質は、静脈内（ＩＶ）、筋肉内（ＩＭ）、皮内（ＩＤ）、または皮下（ＳＣ）に投与される。いくつかの態様では、皮下投与は、ベクターもしくは組成物の投与部位の近くであるか、または１つ以上のベクターもしくは組成物の流入領域リンパ節に近接している。

【００５５】

いくつかの態様では、方法は、対象に第２のワクチン組成物を投与することをさらに含む。いくつかの態様では、第２のワクチン組成物は、本明細書に記載されるベクターまたは組成物のいずれかの投与の前に投与される。いくつかの態様では、第２のワクチン組成物は、本明細書に記載されるベクターまたは組成物のいずれかの投与の後に投与される。いくつかの態様では、第２のワクチン組成物は、本明細書に記載されるベクターまたは組成物のいずれかと同じである。いくつかの態様では、第２のワクチン組成物は、本明細書に記載されるベクターまたは組成物のいずれとも異なる。いくつかの態様では、第２のワクチン組成物が、少なくとも１つのペイロード核酸配列をコードする自己複製ＲＮＡ（ｓａｍＲＮＡ）ベクターを含む。いくつかの態様では、ｓａｍＲＮＡベクターによってコードされる少なくとも１つのペイロード核酸配列が、先行するベクターの請求項のいずれかに記載の少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つと同じである。

【００５６】

また、本明細書では、先行するベクターの請求項のいずれかに記載のベクターを製造する方法であって、アデノウイルスベクターまたはチンパンジーアデノウイルスベクターを含むプラスミド配列を得ることと、プラスミド配列を１つ以上の宿主細胞にトランスフェクトすることと、１つ以上の宿主細胞からベクターを単離することと、を含む、方法も提供される。いくつかの態様では、単離することは、１つ以上の宿主細胞を溶解させてベクターを含む細胞ライセートを得ることと、細胞ライセートから、および、場合により１つ以上の宿主細胞を培養するために用いた培地からも、ベクターを精製することと、を含む。いくつかの態様では、プラスミド配列は、ＤＮＡ組換え、または細菌組換え、または全ゲノムＤＮＡ合成、または細菌細胞内で合成されたＤＮＡの増幅を伴う全ゲノムＤＮＡ合成、のうちの１つを用いて生成される。いくつかの態様では、１つ以上の宿主細胞は、ＣＨＯ、ＨＥＫ２９３もしくはその変異体、９１１、ＨｅＬａ、Ａ５４９、ＬＰ－２９３、ＰＥＲ．Ｃ６、及びＡＥ１－２ａ細胞のうちの少なくとも１つである。いくつかの態様では、細胞ライセートからベクターを精製することは、クロマトグラフィー分離、遠心分離、ウイルス沈殿、及び濾過のうちの１つ以上を伴う。

【００５７】

また、本明細書では、ウイルスを生産する方法であって、ウイルスが本明細書に記載されるベクターのいずれかを用いて生産される、方法も提供される。いくつかの態様では、ウイルスの生産が、部分欠失Ｅ４遺伝子を含まないベクターを使用して生産されるウイルスの生産に対して、部分欠失Ｅ４遺伝子を含むベクターを使用して増加する。いくつかの態様では、ウイルスの感染単位の力価が、部分欠失Ｅ４遺伝子を含まないベクターを使用して生産されるウイルスの感染単位の力価に対して、部分欠失Ｅ４遺伝子を含むベクターを使用して増加する。いくつかの態様では、増加した生産が、部分欠失Ｅ４遺伝子を含まないベクターを使用した生産に対して少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、少なくとも２．５倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、または少なくとも９倍増加している。いくつかの態様では、増加した生産が、部分欠失Ｅ４遺伝子を含まないベクターを使用した生産に対して少なくとも１０倍、少なくとも１８倍、少なくとも２０倍、少なくとも２５倍、または少なくとも２７倍増加している。

[本発明１００１]

アデノウイルスベクターであって、

アデノウイルスゲノムの１つ以上の遺伝子または調節配列を含むアデノウイルス骨格を含み、

前記アデノウイルス骨格が、前記アデノウイルスゲノムに関して部分欠失Ｅ４遺伝子を含み、前記部分欠失Ｅ４遺伝子が、欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ２領域、及び欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ３領域、及び場合により、欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ４領域を含み、

場合により、前記アデノウイルスベクターがカセットをさらに含み、前記カセットが、

（１）少なくとも１つのペイロード核酸配列であって、場合により前記少なくとも１つのペイロード核酸配列がポリペプチドをコードし、場合により前記ポリペプチドが抗原を含み、場合により前記抗原が、

－ＭＨＣクラスＩエピトープ、

－ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、

－Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、または

－これらの組み合わせ

を含み、

場合により前記少なくとも１つのペイロード核酸配列が、５’リンカー配列及び／または３’リンカー配列をさらに含む、

前記少なくとも１つのペイロード核酸配列と、場合により、

（２）前記少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列と、

（３）場合により、少なくとも１つのユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列と、
（４）場合により、少なくとも１つのＧＰＧＰＧコードリンカー配列（配列番号５６）と、
（５）場合により、少なくとも１つのポリアデニル化配列と
を含む、前記アデノウイルスベクター。
[本発明１００２]
改変ＣｈＡｄＶ６８配列を含むチンパンジーアデノウイルスベクターであって、前記改変ＣｈＡｄＶ６８配列が、
（ａ）配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列の部分欠失Ｅ４遺伝子と、
（ｂ）配列番号１に示されるＣｈＡｄＶ６８配列の１つ以上の遺伝子または調節配列であって、場合により、前記１つ以上の遺伝子または調節配列が、配列番号１に示される配列のチンパンジーアデノウイルス末端逆位反復配列（ＩＴＲ）、Ｅ１Ａ、Ｅ１Ｂ、Ｅ２Ａ、Ｅ２Ｂ、Ｅ３、Ｅ４、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４、及びＬ５遺伝子のうちの少なくとも１つを含む、前記１つ以上の遺伝子または調節配列と
を含み、
場合により、前記チンパンジーアデノウイルスベクターがカセットを含み、前記カセットが、少なくとも１つのペイロード核酸配列を含み、前記カセットが、前記少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列を含む、前記チンパンジーアデノウイルスベクター。
[本発明１００３]
改変ＣｈＡｄＶ６８配列を含むチンパンジーアデノウイルスベクターであって、前記改変ＣｈＡｄＶ６８配列が、
（ａ）配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列の部分欠失Ｅ４遺伝子と、
（ｂ）配列番号１に示される配列のヌクレオチド２～３４，９１６であって、前記部分欠失Ｅ４遺伝子が前記ヌクレオチド２～３４，９１６の３’であり、場合により、前記ヌクレオチド２～３４，９１６はさらに、Ｅ１欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド５７７～３４０３を欠いており、かつ／または、Ｅ３欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５を欠いている、前記ヌクレオチド２～３４，９１６と、
（ｃ）配列番号１に示される配列のヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８であって、前記部分欠失Ｅ４遺伝子が前記ヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８の５’である、前記ヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８と
を含み、
場合により、前記チンパンジーアデノウイルスベクターがカセットをさらに含み、前記カセットが少なくとも１つのペイロード核酸配列を含み、前記カセットが、前記少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列を含む、
前記チンパンジーアデノウイルスベクター。
[本発明１００４]
チンパンジーアデノウイルスベクターであって、
ａ．改変ＣｈＡｄＶ６８配列であって、
（ｉ）配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列の部分欠失Ｅ４遺伝子と、
（ｉｉ）配列番号１に示される配列のヌクレオチド２～３４，９１６であって、前記部分欠失Ｅ４遺伝子が前記ヌクレオチド２～３４，９１６の３’であり、場合により、前記ヌクレオチド２～３４，９１６はさらに、Ｅ１欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド５７７～３４０３を欠いており、かつ／または、Ｅ３欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５を欠いている、前記ヌ

クレオチド２～３４，９１６と、
（ｉｉｉ）配列番号１に示される配列のヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８であって、前記部分欠失Ｅ４遺伝子が前記ヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８の５’である、前記ヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８と
を含む前記改変ＣｈＡｄＶ６８配列と、
ｂ．ＣＭＶ由来プロモーター配列と、
ｃ．ＳＶ４０ポリアデニル化シグナルヌクレオチド配列と、
ｄ．カセットであって、
－少なくとも１つのＭＨＣクラスＩエピトープであって、場合により、前記少なくとも１つのＭＨＣクラスＩエピトープが、互いに直線的に連結された少なくとも２個の異なるＭＨＣクラスＩエピトープを含み、前記異なるＭＨＣクラスＩエピトープのそれぞれが場合により、
（Ａ）コードされたペプチド配列を野生型核酸配列によってコードされる対応するペプチド配列とは異なるものとする少なくとも１つの変更であって、前記異なるＭＨＣクラスＩエピトープがアミノ酸７～１５個の長さである、前記少なくとも１つの変更、
（Ｂ）少なくともアミノ酸３個の長さである前記異なるＭＨＣクラスＩエピトープの天然のＮ末端アミノ酸配列を含むＮ末端リンカー、
（Ｃ）少なくともアミノ酸３個の長さである前記異なるＭＨＣクラスＩエピトープの天然のＣ末端アミノ酸配列を含むＣ末端リンカー、または
（Ｄ）これらの組み合わせ
を含む、前記少なくとも１つのＭＨＣクラスＩエピトープ、
－少なくとも１つのＭＨＣクラスＩＩエピトープであって、場合により、少なくとも２個の異なるＭＨＣクラスＩＩエピトープを含む、前記少なくとも１つのＭＨＣクラスＩＩエピトープ、
－Ｂ細胞応答を刺激することができる少なくとも１つのエピトープ、または
－これらの組み合わせ
をコードする少なくとも１つのペイロード核酸配列
を含む、前記カセットと
を含み、
前記カセットがＣｈＡｄＶ６８の欠失領域内に挿入され、前記ＣＭＶ由来プロモーター配列が前記カセットに機能的に連結されている、
前記チンパンジーアデノウイルスベクター。
[本発明１００５]
前記カセットが、５’から３’に向けて、下式：
$P_a-(L5_b-N_c-L3_d)_x-(G5_e-U_f)_y-G3_g-A_h$
[式中、
Ｎは、前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの１つを含み、場合により、各Ｎは、場合により、前記コードされたエピトープ配列を野生型核酸配列によってコードされる対応するペプチド配列とは異なるものとする少なくとも１つの変化を有する、ＭＨＣクラスＩエピトープ、ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、またはこれらの組み合わせをコードし、ただしｃ＝１であり、
Ｐは、前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つに機能的に連結された前記少なくとも１つのプロモーター配列を含み、ただしａ＝１であり、
Ｌ５は、前記５’リンカー配列を含み、ただしｂ＝０または１であり、
Ｌ３は、前記３’リンカー配列を含み、ただしｄ＝０または１であり、
Ｇ５は、ＧＰＧＰＧアミノ酸リンカー（配列番号５６）をコードする前記少なくとも１つの核酸配列のうちの１つを含み、ただしｅ＝０または１であり、
Ｇ３は、ＧＰＧＰＧアミノ酸リンカー（配列番号５６）をコードする前記少なくとも１つの核酸配列のうちの１つを含み、ただしｇ＝０または１であり、
Ｕは、前記少なくとも１つのユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列のうち

の１つを含み、ただしｆ＝１であり、
Ａは、前記少なくとも１つのポリアデニル化配列を含み、ただしｈ＝０または１であり、
Ｘ＝２～４００であり、各Ｘについて、対応するＮ$_c$は、ペイロード核酸配列であり、場合により、各Ｘについて、対応するＮ$_c$は異なるペイロード核酸配列であり、
Ｙ＝０～２であり、各Ｙについて、対応するＵ$_f$は、ユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列であり、場合により、各Ｙについて、対応するＵ$_f$は異なるユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード配列である］
に示される順序付けられた配列を含む、本発明１００１～１００４のいずれかのベクター。
［本発明１００６］
前記カセットが、前記順序付けられた配列にコードされない少なくとも１つのさらなるペイロード核酸配列をさらに含む、本発明１００５のベクター。
［本発明１００７］
ｂ＝１、ｄ＝１、ｅ＝１、ｇ＝１、ｈ＝１、Ｘ＝１０、Ｙ＝２であり、
Ｐが、ＣＭＶ由来プロモーター配列であり、
各Ｎが、ＭＨＣクラスＩエピトープ、ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、またはこれらの組み合わせをコードし、
Ｌ５が、前記エピトープの天然のＮ末端アミノ酸配列をコードし、前記５’リンカー配列が、少なくともアミノ酸３個の長さであるペプチドをコードし、
Ｌ３が、前記エピトープの天然のＣ末端アミノ酸配列をコードし、前記３’リンカー配列が、少なくともアミノ酸３個の長さであるペプチドをコードし、
Ｕが、ＰＡＤＲＥクラスＩＩ配列及び破傷風毒素ＭＨＣクラスＩＩ配列のそれぞれであり、
前記ベクターが改変ＣｈＡｄＶ６８配列を含み、前記改変ＣｈＡｄＶ６８配列が、
（ａ）配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列の部分欠失Ｅ４遺伝子と、
（ｂ）配列番号１に示される配列のヌクレオチド２～３４，９１６であって、前記部分欠失Ｅ４遺伝子が前記ヌクレオチド２～３４，９１６の３’であり、場合により、ヌクレオチド２～３４，９１６はさらに、Ｅ１欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド５７７～３４０３を欠いており、かつ／または、Ｅ３欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５を欠いている、前記ヌクレオチド２～３４，９１６と、
（ｃ）配列番号１に示される配列のヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８であって、前記部分欠失Ｅ４遺伝子が前記ヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８の５’である、前記ヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８と
を含む、本発明１００５または１００６のベクター。
［本発明１００８］
前記ベクターがチンパンジーアデノウイルスベクターであり、場合により前記チンパンジーアデノウイルスベクターがＣｈＡｄＶ６８ベクターである、本発明１００２～１００４または１００７を除く先行本発明のいずれかのベクター。
［本発明１００９］
前記部分欠失Ｅ４遺伝子が、
Ａ．配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列、
Ｂ．配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９１６～３４，９４２、ヌクレオチド３４，９５２～３５，３０５、配列番号１に示される配列のヌクレオチド３５，３０２～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列であって、前記ベクターが、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド２～３６，５１８を含む、前記配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列、
Ｃ．配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９８０～３６，５１６を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列であって、前記ベクターが、配列番号

１に示される配列の少なくともヌクレオチド２～３６，５１８を含む、前記配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列、
Ｄ．配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９７９～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列であって、前記ベクターが、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド２～３６，５１８を含む、前記配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列、
Ｅ．Ｅ４Ｏｒｆ２の少なくとも部分欠失、完全欠失したＥ４Ｏｒｆ３、及びＥ４Ｏｒｆ４の少なくとも部分欠失のＥ４欠失、
Ｆ．Ｅ４Ｏｒｆ２の少なくとも部分欠失、Ｅ４Ｏｒｆ３の少なくとも部分欠失、及びＥ４Ｏｒｆ４の少なくとも部分欠失のＥ４欠失、
Ｇ．Ｅ４Ｏｒｆ１の少なくとも部分欠失、完全欠失したＥ４Ｏｒｆ２、及びＥ４Ｏｒｆ３の少なくとも部分欠失のＥ４欠失、または
Ｈ．Ｅ４Ｏｒｆ２の少なくとも部分欠失及びＥ４Ｏｒｆ３の少なくとも部分欠失のＥ４欠失を含む、本発明１００２～１００４または１００７を除く先行本発明のいずれかのベクター。

[本発明１０１０]

前記ベクターが、配列番号１に示されるＣｈＡｄＶ６８配列の１つ以上の遺伝子または調節配列を含み、場合により、前記１つ以上の遺伝子または調節配列が、配列番号１に示される配列のチンパンジーアデノウイルスの末端逆位繰り返し配列（ＩＴＲ）、Ｅ１Ａ、Ｅ１Ｂ、Ｅ２Ａ、Ｅ２Ｂ、Ｅ３、Ｅ４、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４、及びＬ５遺伝子からなる群から選択される、本発明１００２～１００４または１００７を除く先行本発明のいずれかのベクター。

[本発明１０１１]

前記アデノウイルス骨格または改変ＣｈＡｄＶ６８配列が、アデノウイルスゲノムに関して、または配列番号１に示される配列に関して、アデノウイルスＥ１Ａ、Ｅ１Ｂ、Ｅ２Ａ、Ｅ２Ｂ、Ｅ３、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４、及びＬ５遺伝子からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子に機能的欠失をさらに含み、

場合により、前記アデノウイルス骨格もしくは改変ＣｈＡｄＶ６８配列が完全に欠失しているか、またはアデノウイルスゲノムに関して、もしくは配列番号１に示される配列に関して、（１）Ｅ１Ａ及びＥ１Ｂ、または（２）Ｅ１Ａ、Ｅ１Ｂ、及びＥ３に機能的欠失を有し、

場合により、Ｅ１遺伝子が、配列番号１に示される配列に関して少なくともヌクレオチド５７７～３４０３のＥ１欠失により機能的に欠失しており、

場合により、Ｅ３遺伝子が、配列番号１に示される配列に関して少なくともヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５のＥ３欠失により機能的に欠失している、
先行本発明のいずれかのベクター。

[本発明１０１２]

前記カセットが、Ｅ１領域、Ｅ３領域、及び／または、前記カセットの組み込みが可能な任意の欠失されたＡｄＶ領域においてベクター中に存在しかつ挿入されている、先行本発明のいずれかのベクター。

[本発明１０１３]

第１世代、第２世代、またはヘルパー依存型のアデノウイルスベクターのうちの１つから生成される、本発明１００２～１００４または１００７を除く先行本発明のいずれかのベクター。

[本発明１０１４]

前記改変ＣｈＡｄＶ６８配列が、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２～３４，９１６を含み、前記部分欠失Ｅ４遺伝子が前記ヌクレオチド２～３４，９１６の３’である、本発明１００２～１０１３のいずれかのベクター。

[本発明１０１５]

前記ヌクレオチド２～３４，９１６が、Ｅ１欠失に相当する、配列番号１に示される配

列のヌクレオチド５７７～３４０３を欠いている、本発明１０１４のベクター。
[本発明１０１６]
前記ヌクレオチド２～３４，９１６が、配列番号１に示される配列に関してヌクレオチド４５６～３０１４を欠いている、本発明１０１４のベクター。
[本発明１０１７]
前記ヌクレオチド２～３４，９１６が、Ｅ３欠失に相当する、配列番号１に示される配列に関してヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５を欠いている、本発明１０１４～１０１６のいずれかのベクター。
[本発明１０１８]
前記ヌクレオチド２～３４，９１６が、配列番号１に示される配列に関してヌクレオチド２７，８１６～３１，３３３を欠いている、本発明１０１４～１０１６のいずれかのベクター。
[本発明１０１９]
前記ヌクレオチド２～３４，９１６が、Ｅ１欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド５７７～３４０３を欠いており、かつ、Ｅ３欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５を欠いている、本発明１０１４～１０１６のいずれかのベクター。
[本発明１０２０]
前記ヌクレオチド２～３４，９１６がさらに、配列番号１に示される配列に関してヌクレオチド３９５７～１０３４６、ヌクレオチド２１７８７～２３３７０、ヌクレオチド３３４８６～３６１９３、またはこれらの組み合わせを欠いている、本発明１０１４～１０１９のいずれかのベクター。
[本発明１０２１]
前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが抗原をコードし、前記抗原が、
－ＭＨＣクラスＩエピトープ、
－ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、
－Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、または
－これらの組み合わせ
を含む、先行本発明のいずれかのベクター。
[本発明１０２２]
前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、エピトープへの抗原のプロセシングを受けることが可能なポリペプチド配列をコードしており、場合により、前記エピトープが、細胞の表面上のＭＨＣクラスＩにより提示されることが知られているかまたは疑われており、場合により、前記細胞の表面が腫瘍細胞表面または感染細胞表面である、先行本発明のいずれかのベクター。
[本発明１０２３]
前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、細胞の表面上のＭＨＣクラスＩ及び／またはＭＨＣクラスＩＩにより提示されるポリペプチド配列またはその部分をコードしており、場合により、前記細胞の表面が腫瘍細胞表面または感染細胞表面である、先行本発明のいずれかのベクター。
[本発明１０２４]
前記腫瘍細胞が、肺がん、メラノーマ、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、腎臓がん、胃がん、結腸がん、精巣がん、頭頸部がん、膵臓がん、脳がん、Ｂ細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、Ｔ細胞リンパ球性白血病、非小細胞肺がん、及び小細胞肺がんからなる群から選択されるか、または
前記感染細胞が、病原体感染細胞、ウイルス感染細胞、細菌感染細胞、真菌感染細胞、及び寄生虫感染細胞からなる群から選択され、場合により、前記ウイルス感染細胞が、ＨＩＶ感染細胞、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス（ＳＡＲＳ）感染細胞、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２型（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）感染細胞、エボラ感染細胞、

Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）感染細胞、インフルエンザ感染細胞、及びＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）感染細胞からなる群から選択される、本発明１０２２または１０２３のベクター。

[本発明１０２５]

前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープを含むポリペプチド配列またはその部分をコードし、場合により、前記ポリペプチド配列またはその部分が、完全長タンパク質、タンパク質ドメイン、タンパク質サブユニット、または抗原が結合できることが予測されるかまたは知られている抗原性フラグメントを含む、先行本発明のいずれかのベクター。

[本発明１０２６]

前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、病原体由来ペプチド、ウイルス由来ペプチド、細菌由来ペプチド、真菌由来ペプチド、及び寄生虫由来ペプチドからなる群から選択される感染症生物ペプチドをコードする、先行本発明のいずれかのベクター。

[本発明１０２７]

前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、前記コードされたエピトープ配列を野生型核酸配列によってコードされる対応するペプチド配列とは異なるものとする少なくとも１つの変更を有するエピトープをコードする、先行本発明のいずれかのベクター。

[本発明１０２８]

前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、前記コードされたエピトープ配列を野生型核酸配列によってコードされる対応するペプチド配列とは異なるものとする少なくとも１つの変更を有するＭＨＣクラスＩエピトープまたはＭＨＣクラスＩＩエピトープをコードし、場合により、前記コードされたポリペプチド配列またはその部分が、翻訳された対応する野生型核酸配列と比較してその対応するＭＨＣアレルに対する増加した結合親和性、前記ＭＨＣアレルに対する増加した結合安定性、及び／または前記ＭＨＣアレル上への提示の増加した尤度を有する、先行本発明のいずれかのベクター。

[本発明１０２９]

前記少なくとも１つの変更が、点変異、フレームシフト変異、非フレームシフト変異、欠失変異、挿入変異、スプライスバリアント、ゲノム再編成、またはプロテアソームにより生成されたスプライス抗原を含む、本発明１００４、１０１１～１０１２、または１０１４～１０２８のベクター。

[本発明１０３０]

前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、完全長タンパク質、タンパク質ドメイン、またはタンパク質サブユニットをコードする、先行本発明のいずれかのベクター。

[本発明１０３１]

前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、抗体、サイトカイン、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、Ｔ細胞受容体、及びゲノム編集システムのヌクレアーゼをコードする、先行本発明のいずれかのベクター。

[本発明１０３２]

前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、非コード核酸配列を含む、先行本発明のいずれかのベクター。

[本発明１０３３]

前記非コード核酸配列が、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）ポリヌクレオチドまたはゲノム編集システムのポリヌクレオチドを含む、本発明１０３２のベクター。

[本発明１０３４]

前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のそれぞれが互いに直接連結されている、本発明１００４または１００７を除く先行本発明のいずれかのベクター。

[本発明１０３５]

前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、リンカーをコードする核酸配列によって、異なるペイロード核酸配列と連結されている、本発明１００４または１００７を除く先行本発明のいずれかのベクター。

[本発明１０３６]

前記リンカーが、ＭＨＣクラスＩエピトープをコードする２個のペイロード核酸配列同士を連結するか、またはＭＨＣクラスＩエピトープをコードする第１のペイロード核酸配列とＭＨＣクラスＩＩエピトープをコードするかもしくはＢ細胞応答を刺激することができるエピトープ配列をコードする第２のペイロード核酸配列とを連結する、本発明１０３５のベクター。

[本発明１０３７]

前記リンカーが、（１）少なくとも残基２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の長さの連続したグリシン残基、（２）少なくとも残基２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の長さの連続したアラニン残基、（３）２個のアルギニン残基（ＲＲ）、（４）アラニン、アラニン、チロシン（ＡＡＹ）、（５）哺乳動物プロテアソームによって効率的にプロセシングされる、少なくともアミノ酸残基２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の長さのコンセンサス配列、及び（６）同種由来タンパク質に由来する抗原に隣接する、少なくともアミノ酸残基２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、または２～２０個の長さの１つ以上の天然配列からなる群から選択される、本発明１０３６のベクター。

[本発明１０３８]

前記リンカーが、ＭＨＣクラスＩＩエピトープをコードする２個のペイロード核酸配列同士を連結するか、またはＭＨＣクラスＩＩエピトープをコードする第１のペイロード核酸配列とＭＨＣクラスＩエピトープをコードするかもしくはＢ細胞応答を刺激することができるエピトープ配列をコードする第２のペイロード核酸配列とを連結する、本発明１０３５のベクター。

[本発明１０３９]

前記リンカーが、配列ＧＰＧＰＧ（配列番号５６）を含む、本発明１０３８のベクター。

[本発明１０４０]

前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、前記少なくとも１つのペイロード核酸配列の発現、安定性、細胞トラフィッキング、プロセシング及び提示、ならびに／または免疫原性を高める、かつ、場合により、前記少なくとも１つのペイロード核酸配列によってコードされるポリペプチドの発現、安定性、細胞トラフィッキング、プロセシング及び提示、ならびに／または免疫原性を高める、分離したまたは連続した配列に機能的または直接的に連結されている、本発明１００４または１００７を除く先行本発明のいずれかのベクター。

[本発明１０４１]

前記分離したまたは連続した配列が、
ユビキチン配列、プロテアソームターゲティング性を高めるように改変され、場合により７６位にＧｌｙ→Ａｌａ置換を有するユビキチン配列、場合によりＩｇＫを含む、免疫グロブリンシグナル配列、主要組織適合性クラスＩ配列、リソソーム関連膜タンパク質（ＬＡＭＰ）－１、ヒト樹状細胞リソソーム関連膜タンパク質、及び主要組織適合性クラスＩＩ配列
のうちの少なくとも１つを含み、場合により、プロテアソームターゲティング性を高めるように改変された前記ユビキチン配列がＡ７６である、本発明１０４０のベクター。

[本発明１０４２]

前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のそれぞれの発現が、前記少なくとも１つのプロモーターによって駆動される、先行本発明のいずれかのベクター。

[本発明１０４３]

前記少なくとも１つのペイロード核酸配列が、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のペイロード核酸配列を含む、本発明１００７を除く先行本発明のい

ずれかのベクター。
[本発明１０４４]
前記少なくとも１つのペイロード核酸配列が、少なくとも１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、または最大４００個のペイロード核酸配列を含む、本発明１００７を除く先行本発明のいずれかのベクター。
[本発明１０４５]
前記少なくとも１つのペイロード核酸配列が、少なくとも２～４００個のペイロード核酸配列を含み、前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、ＭＨＣクラスＩエピトープ、ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、またはそれらの組み合わせをコードする、本発明１００７を除く先行本発明のいずれかのベクター。
[本発明１０４６]
前記少なくとも１つのペイロード核酸配列が少なくとも２～４００個のペイロード核酸配列を含み、
前記対象に投与されて翻訳された場合、前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが抗原提示細胞上に提示される抗原をコードし、前記抗原を標的とする免疫応答をもたらす、
本発明１００４または１００７を除く先行本発明のいずれかのベクター。
[本発明１０４７]
前記少なくとも１つのペイロード核酸配列が少なくとも２～４００個のＭＨＣクラスＩ及び／またはＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列を含み、
前記対象に投与されて翻訳された場合、前記ＭＨＣクラスＩまたはＭＨＣクラスＩＩ抗原のうちの少なくとも１つが抗原提示細胞上に提示され、細胞表面上の前記抗原のうちの少なくとも１つを標的とする免疫応答をもたらし、
場合により、前記少なくとも２～４００個のＭＨＣクラスＩまたはＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列のそれぞれの発現が、前記少なくとも１つのプロモーターによって駆動される、先行本発明のいずれかのベクター。
[本発明１０４８]
各ＭＨＣクラスＩエピトープが独立して、アミノ酸８～３５個の長さ、場合により、アミノ酸７～１５個、９～１７個、９～２５個、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４または３５個の長さである、先行本発明のいずれかのベクター。
[本発明１０４９]
前記少なくとも１つのユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列が存在している、本発明１００７を除く先行本発明のいずれかのベクター。
[本発明１０５０]
前記少なくとも１つのユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列が存在し、かつこれが、前記コードされたペプチド配列を野生型核酸配列によってコードされる対応するペプチド配列とは異なるものとする少なくとも１つの変更を含む少なくとも１つのユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列を含む、本発明１００７を除く先行本発明のいずれかのベクター。
[本発明１０５１]
前記少なくとも１つのユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列が、アミノ酸１２～２０個、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、または２０～４０個の長さである、本発明１００７を除く先行本発明のいずれかのベクター。
[本発明１０５２]
前記少なくとも１つのユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列が存在し、前記少なくとも１つのユニバーサル配列が、破傷風毒素及びＰＡＤＲＥの少なくとも一方を含む、本発明１００７を除く先行本発明のいずれかのベクター。

[本発明１０５３]
前記少なくとも１つのプロモーター配列が、調節可能なプロモーターであり、場合により、前記調節可能なプロモーターがテトラサイクリン（ＴＥＴ）リプレッサータンパク質（ＴＥＴｒ）制御プロモーターであり、場合により、前記調節可能なプロモーターが、前記プロモーターのＲＮＡポリメラーゼ結合配列の５’または３’に複数のＴＥＴオペレーター（ＴＥＴｏ）配列を含む、先行本発明のいずれかのベクター。
[本発明１０５４]
前記少なくとも１つのプロモーター配列が、構成的である、先行本発明のいずれかのベクター。
[本発明１０５５]
前記少なくとも１つのプロモーター配列が、ＣＭＶ、ＳＶ４０、ＥＦ－１、ＲＳＶ、ＰＧＫ、ＨＳＡ、ＭＣＫまたはＥＢＶプロモーター配列である、本発明１００４または１００７を除く先行本発明のいずれかのベクター。
[本発明１０５６]
前記カセットが、前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つに機能的に連結された少なくとも１つのポリアデニル化（ポリＡ）配列をさらに含み、場合により、前記ポリＡ配列が、前記少なくとも１つのペイロード核酸配列の３’に位置する、先行本発明のいずれかのベクター。
[本発明１０５７]
前記ポリＡ配列が、ＳＶ４０またはウシ成長ホルモン（ＢＧＨ）のポリＡ配列を含む、本発明１０５６のベクター。
[本発明１０５８]
前記カセットが、
イントロン配列、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節因子（ＷＰＲＥ）配列、内部リボソーム進入配列（ＩＲＥＳ）配列、２Ａ自己切断ペプチド配列をコードするヌクレオチド配列、フーリン切断部位をコードするヌクレオチド配列、ＴＥＶ切断部位をコードするヌクレオチド配列、または、前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つに機能的に連結された、ｍＲＮＡの核輸送、安定性、または翻訳効率を向上させることが知られている５’または３’の非コード領域内の配列
のうちの少なくとも１つをさらに含む、先行本発明のいずれかのベクター。
[本発明１０５９]
前記カセットが、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、ＧＦＰ変異体、分泌型アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、またはルシフェラーゼ変異体を含むがこれらに限定されないレポーター遺伝子を含む、先行本発明のいずれかのベクター。
[本発明１０６０]
前記ベクターが、少なくとも１つの免疫調節物質をコードする１つ以上のペイロード核酸配列をさらに含み、場合により、前記少なくとも１つの免疫調節物質が免疫チェックポイント分子を阻害する、先行本発明のいずれかのベクター。
[本発明１０６１]
前記免疫調節物質が、抗ＣＴＬＡ４抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗ＰＤ－１抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗ＰＤ－Ｌ１抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗４－１ＢＢ抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または抗ＯＸ－４０抗体もしくはその抗原結合フラグメントである、本発明１０６０のベクター。
[本発明１０６２]
前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、単一特異性抗体もしくは互いに連結された多重特異性抗体としての単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）（例えば、ラクダ科動物の抗体ドメイン）、または完全長の一本鎖抗体（例えば、柔軟なリンカーによって重鎖と軽鎖が連結された完全長ＩｇＧ）である、本発明１０６１のベクター。
[本発明１０６３]

前記抗体の前記重鎖配列と前記軽鎖配列とが、２Ａなどの自己切断配列またはＩＲＥＳ配列によって分離された連続的配列であり、場合により、前記自己切断配列が前記自己切断配列の５’にフーリン切断部位配列を有し、あるいは、前記抗体の前記重鎖配列と前記軽鎖配列とが、連続したグリシン残基のような柔軟なリンカーによって連結されている、本発明１０６１または１０６２のベクター。

[本発明１０６４]

前記免疫調節物質がサイトカインである、本発明１０６０のベクター。

[本発明１０６５]

前記サイトカインが、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、もしくはＩＬ－２１の少なくとも１つ、またはそれぞれのその変異体である、本発明１０６４のベクター。

[本発明１０６６]

前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つが、

（ａ）腫瘍細胞、感染細胞、または感染症生物からエクソーム、トランスクリプトーム、または全ゲノムヌクレオチドシークエンシングデータのうちの少なくとも１つを取得する工程であって、前記ヌクレオチドシークエンシングデータが、抗原のセットのそれぞれのペプチド配列を表すデータを取得するために用いられる、前記工程と、

（ｂ）各抗原の前記ペプチド配列を提示モデルに入力して、前記抗原のそれぞれが細胞表面上、場合により腫瘍細胞表面上または感染細胞表面上のＭＨＣアレルのうちの１つ以上によって提示される数値的尤度のセットを生成する工程であって、前記数値的尤度のセットが、受け取られた質量分析データに少なくとも基づいて特定されたものである、前記工程と、

（ｃ）前記抗原のセットのサブセットを前記数値的尤度のセットに基づいて選択して、前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のそれぞれを生成するために用いられる選択された抗原のセットを生成する工程と

を実施することによって選択される、先行本発明のいずれかのベクター。

[本発明１０６７]

前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のそれぞれが、

（ａ）腫瘍細胞、感染細胞、または感染症生物からエクソーム、トランスクリプトーム、または全ゲノムヌクレオチドシークエンシングデータのうちの少なくとも１つを取得する工程であって、前記ヌクレオチドシークエンシングデータが、抗原のセットのそれぞれのペプチド配列を表すデータを取得するために用いられる、前記工程と、

（ｂ）各抗原の前記ペプチド配列を提示モデルに入力して、前記抗原のそれぞれが細胞表面上、場合により腫瘍細胞表面上または感染細胞表面上のＭＨＣアレルのうちの１つ以上によって提示される数値的尤度のセットを生成する工程であって、前記数値的尤度のセットが、受け取られた質量分析データに少なくとも基づいて特定されたものである、前記工程と、

（ｃ）前記抗原のセットのサブセットを前記数値的尤度のセットに基づいて選択して、前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のそれぞれを生成するために用いられる選択された抗原のセットを生成する工程と

を実施することによって選択される、先行本発明のいずれかのベクター。

[本発明１０６８]

前記選択された抗原のセットの数が、２～２０である、本発明１０６６または１０６７のベクター。

[本発明１０６９]

前記提示モデルが、

（ａ）前記ＭＨＣアレルのうちの特定の１つとペプチド配列の特定の位置の特定のアミノ酸とのペアの存在と、

（ｂ）前記ペアの前記ＭＨＣアレルのうちの前記特定の１つによる、前記特定の位置に前記特定のアミノ酸を含むそのようなペプチド配列の細胞表面上、場合により腫瘍細胞表面上または感染細胞表面上での提示の尤度と

の間の依存性を表す、本発明１０６６または１０６７のベクター。
[本発明１０７０]
前記選択された抗原のセットを選択することが、前記提示モデルに基づいて選択されない抗原に対して、前記細胞表面上に提示される尤度が増大している抗原を選択することを含む、本発明１０６６または１０６７のベクター。
[本発明１０７１]
前記選択された抗原のセットを選択することが、前記提示モデルに基づいて選択されない抗原に対して、前記対象における細胞特異的な免疫応答を誘導することができる尤度が増大している抗原を選択することを含む、本発明１０６６または１０６７のベクター。
[本発明１０７２]
前記選択された抗原のセットを選択することが、前記提示モデルに基づいて選択されない抗原に対して、プロフェッショナル抗原提示細胞（ＡＰＣ）によってナイーブＴ細胞に対して提示されることができる尤度が増大している抗原を選択することを含み、場合により、前記ＡＰＣは樹状細胞（ＤＣ）である、本発明１０６６または１０６７のベクター。
[本発明１０７３]
前記選択された抗原のセットを選択することが、前記提示モデルに基づいて選択されない抗原に対して、中枢性寛容または末梢性寛容による阻害に供される尤度が減少している抗原を選択することを含む、本発明１０６６または１０６７のベクター。
[本発明１０７４]
前記選択された抗原のセットを選択することが、前記提示モデルに基づいて選択されない抗原に対して、前記対象における正常組織に対する自己免疫応答を誘導することができる尤度が減少している抗原を選択することを含む、本発明１０６６または１０６７のベクター。
[本発明１０７５]
エクソームまたはトランスクリプトームのヌクレオチドシークエンシングデータが、腫瘍細胞もしくは組織、感染細胞、または感染症生物でシークエンシングを行うことによって取得される、本発明１０６６または１０６７のベクター。
[本発明１０７６]
前記シークエンシングが、次世代シークエンシング（ＮＧＳ）または任意の大規模並列処理シークエンシングアプローチである、本発明１０６６または１０６７のベクター。
[本発明１０７７]
前記カセットが、前記カセット内の隣接配列によって形成されたジャンクションエピトープ配列を含む、先行本発明のいずれかのベクター。
[本発明１０７８]
少なくとも１つのまたはそれぞれのジャンクションエピトープ配列が、ＭＨＣに対して５００ｎＭよりも高い親和性を有する、本発明１０７７のベクター。
[本発明１０７９]
それぞれのジャンクションエピトープ配列が、非自己である、本発明１０７７または１０７８のベクター。
[本発明１０８０]
前記カセットが、非治療的なＭＨＣクラスＩまたはクラスＩＩエピトープをコードしておらず、前記非治療的エピトープが、前記対象のＭＨＣアレル上に提示されると予測される、先行本発明のいずれかのベクター。
[本発明１０８１]
前記非治療的な予測されたＭＨＣクラスＩまたはクラスＩＩエピトープ配列が、前記カセット内の隣接配列によって形成されたジャンクションエピトープ配列である、本発明１０８０のベクター。
[本発明１０８２]
前記予測が、前記非治療的エピトープの配列を提示モデルに入力することによって生成される提示尤度に基づいたものである、本発明１０７７～１０８１のいずれかのベクター。

[本発明１０８３]
前記カセット内における前記少なくとも１つのペイロード核酸配列の順序が、
ｉ．前記少なくとも１つのペイロード核酸配列の異なる順序に対応した候補カセット配列のセットを生成する工程と、
ｉｉ．前記各候補カセット配列について、候補カセット配列内の非治療的エピトープの提示に基づいた提示スコアを決定する工程と、
ｉｉｉ．所定の閾値を下回る提示スコアに関連する候補カセット配列を前記カセット配列として選択する工程と
を含む一連の工程によって決定される、本発明１０７７～１０８２のいずれかのベクター。
[本発明１０８４]
前記ＭＨＣクラスＩ及び／またはクラスＩＩエピトープのそれぞれが、ヒト集団の少なくとも５％に存在する少なくとも１つのＨＬＡアレルによって提示可能であると予測または検証されている、先行本発明のいずれかの組成物。
[本発明１０８５]
前記ＭＨＣクラスＩ及び／またはクラスＩＩエピトープのそれぞれが、少なくとも１つのＨＬＡアレルによって提示可能であると予測または検証されており、各抗原／ＨＬＡペアが、ヒト集団において少なくとも０．０１％の抗原／ＨＬＡ存在率（prevalence）を有する、先行本発明のいずれかの組成物。
[本発明１０８６]
前記ＭＨＣクラスＩ及び／またはクラスＩＩエピトープのそれぞれが、少なくとも１つのＨＬＡアレルによって提示可能であると予測または検証されており、各抗原／ＨＬＡペアが、ヒト集団において少なくとも０．１％の抗原／ＨＬＡ存在率を有する、先行本発明のいずれかの組成物。
[本発明１０８７]
前記ポリペプチドをコードする前記少なくとも１つのペイロード核酸配列が、対象の組織または試料から直接抽出された天然核酸配列に対してコドン最適化されている、先行本発明のいずれかの組成物。
[本発明１０８８]
先行本発明のいずれかのベクターと、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。
[本発明１０８９]
アジュバントをさらに含む、本発明１０８８の医薬組成物。
[本発明１０９０]
免疫調節物質をさらに含む、本発明１０８８または１０８９の医薬組成物。
[本発明１０９１]
前記免疫調節物質が、抗ＣＴＬＡ４抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗ＰＤ－１抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗ＰＤ－Ｌ１抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗４－１ＢＢ抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または抗ＯＸ－４０抗体もしくはその抗原結合フラグメントである、本発明１０９０の医薬組成物。
[本発明１０９２]
先行するベクターの発明のいずれかのカセットと、配列番号１の配列の遺伝子と、を含む、単離ヌクレオチド配列であって、場合により、前記遺伝子が、配列番号１に示される配列のチンパンジーアデノウイルスのＩＴＲ、Ｅ１Ａ、Ｅ１Ｂ、Ｅ２Ａ、Ｅ２Ｂ、Ｅ３、Ｅ４、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４、及びＬ５遺伝子からなる群から選択され、場合により、前記ヌクレオチド配列がｃＤＮＡである、前記単離ヌクレオチド配列。
[本発明１０９３]
本発明１０９２のヌクレオチド配列を含む単離細胞であって、場合により前記細胞が、ＣＨＯ、ＨＥＫ２９３もしくはその変異体、９１１、ＨｅＬａ、Ａ５４９、ＬＰ－２９３、ＰＥＲ．Ｃ６、またはＡＥ１－２ａ細胞である、前記単離細胞。
[本発明１０９４]
本発明１０９２のヌクレオチド配列を含むベクター。

[本発明１０９５]
先行するベクターの発明のいずれかのベクターと、使用説明書と、を含むキット。
[本発明１０９６]
対象の免疫応答を刺激するための方法であって、前記対象に、先行するベクターの発明のいずれかのベクター、または本発明１０８８～１０９１のいずれかの医薬組成物を投与することを含む、前記方法。
[本発明１０９７]
前記ベクターまたは組成物が、筋肉内（ＩＭ）、皮内（ＩＤ）、または皮下（ＳＣ）に投与される、本発明１０９６の方法。
[本発明１０９８]
前記対象に免疫調節物質を投与することをさらに含み、場合により、前記免疫調節物質が前記ベクターまたは医薬組成物の投与前、投与と同時、または投与後に投与される、本発明１０９６または１０９７の方法。
[本発明１０９９]
前記免疫調節物質が、抗ＣＴＬＡ４抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗ＰＤ－１抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗ＰＤ－Ｌ１抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗４－１ＢＢ抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または抗ＯＸ－４０抗体もしくはその抗原結合フラグメントである、本発明１０９８の方法。
[本発明１１００]
前記免疫調節物質が、静脈内（ＩＶ）、筋肉内（ＩＭ）、皮内（ＩＤ）、または皮下（ＳＣ）に投与される、本発明１０９８の方法。
[本発明１１０１]
前記皮下投与が、前記ベクターもしくは組成物の投与部位の近くであるか、または１つ以上のベクターもしくは組成物の流入領域リンパ節に近接している、本発明１１００の方法。
[本発明１１０２]
前記対象に第２のワクチン組成物を投与することをさらに含む、本発明１０９６～１１０１のいずれかの方法。
[本発明１１０３]
前記第２のワクチン組成物が、本発明１０８８～１０９１のいずれかのベクターまたは医薬組成物の投与の前に投与される、本発明１１０２の方法。
[本発明１１０４]
前記第２のワクチン組成物が、本発明１０８８～１０９１のいずれかのベクターまたは医薬組成物の投与の後に投与される、本発明１１０２の方法。
[本発明１１０５]
前記第２のワクチン組成物が、本発明１０８８～１０９１のいずれかのベクターまたは医薬組成物と同じである、本発明１１０３または１１０４の方法。
[本発明１１０６]
前記第２のワクチン組成物が、本発明１０８８～１０９１のいずれかのベクターまたは医薬組成物と異なる、本発明１１０３または１１０４の方法。
[本発明１１０７]
前記第２のワクチン組成物が、少なくとも１つのペイロード核酸配列をコードする自己複製ＲＮＡ（ｓａｍＲＮＡ）ベクターを含む、本発明１１０６の方法。
[本発明１１０８]
前記ｓａｍＲＮＡベクターによってコードされる前記少なくとも１つのペイロード核酸配列が、先行するベクターの発明のいずれかの少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つと同じである、本発明１１０７の方法。
[本発明１１０９]
先行するベクターの発明のいずれかのベクターを製造する方法であって、
前記アデノウイルスベクターまたはチンパンジーアデノウイルスベクターを含むプラス

ミド配列を得ることと、
　前記プラスミド配列を１つ以上の宿主細胞にトランスフェクトすることと、
　前記１つ以上の宿主細胞から前記ベクターを単離することと
を含む、前記方法。
[本発明１１１０]
　前記単離することが、
　前記１つ以上の宿主細胞を溶解させて前記ベクターを含む細胞ライセートを得ることと、
　前記細胞ライセートから、および、場合により前記１つ以上の宿主細胞を培養するために用いた培地からも、前記ベクターを精製することと
を含む、本発明１１０９の方法。
[本発明１１１１]
　前記プラスミド配列が、
ＤＮＡ組換え、または細菌組換え、または全ゲノムＤＮＡ合成、または細菌細胞内で合成されたＤＮＡの増幅を伴う全ゲノムＤＮＡ合成
のうちの１つを用いて生成される、本発明１１０９または１１１０の製造方法。
[本発明１１１２]
　前記１つ以上の宿主細胞が、ＣＨＯ、ＨＥＫ２９３もしくはその変異体、９１１、ＨｅＬａ、Ａ５４９、ＬＰ－２９３、ＰＥＲ．Ｃ６、及びＡＥ１－２ａ細胞のうちの少なくとも１つである、本発明１１０９～１１１１のいずれかの製造方法。
[本発明１１１３]
　前記細胞ライセートから前記ベクターを精製することが、クロマトグラフィー分離、遠心分離、ウイルス沈殿、及び濾過のうちの１つ以上を伴う、本発明１１１０～１１１２のいずれかの製造方法。
[本発明１１１４]
　対象の免疫応答を刺激するための方法であって、前記対象に、アデノウイルスゲノムの１つ以上の遺伝子または調節配列を含むアデノウイルス骨格を含むアデノウイルスベクターを投与することを含み、
　前記アデノウイルス骨格が、前記アデノウイルスゲノムに関して部分欠失Ｅ４遺伝子を含み、前記部分欠失Ｅ４遺伝子が、欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ２領域、及び欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ３領域、及び場合により、欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ４領域を含み、
　前記アデノウイルスベクターがカセットをさらに含み、前記カセットが、
（１）少なくとも１つのペイロード核酸配列であって、場合により前記少なくとも１つのペイロード核酸配列がポリペプチドをコードし、場合により前記ポリペプチドが抗原を含み、場合により前記抗原が、
－ＭＨＣクラスＩエピトープ、
－ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、
－Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、または
－これらの組み合わせ
を含み、
　場合により前記少なくとも１つのペイロード核酸配列が、５’リンカー配列及び／または３’リンカー配列をさらに含む、
前記少なくとも１つのペイロード核酸配列と、場合により、
（２）前記少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列と、
（３）場合により、少なくとも１つのユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列と、
（４）場合により、少なくとも１つのＧＰＧＰＧコードリンカー配列（配列番号５６）と、
（５）場合により、少なくとも１つのポリアデニル化配列と
を含む、前記方法。

[本発明１１１５]
場合によりがんまたは感染症である疾患を有する対象を治療するための方法であって、前記対象に、アデノウイルスゲノムの１つ以上の遺伝子または調節配列を含むアデノウイルス骨格を含むアデノウイルスベクターを投与することを含み、
前記アデノウイルス骨格が、前記アデノウイルスゲノムに関して部分欠失Ｅ４遺伝子を含み、前記部分欠失Ｅ４遺伝子が、欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ２領域、及び欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ３領域、及び場合により、欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ４領域を含み、
前記アデノウイルスベクターがカセットをさらに含み、前記カセットが、
（１）少なくとも１つのペイロード核酸配列であって、場合により前記少なくとも１つのペイロード核酸配列がポリペプチドをコードし、場合により前記ポリペプチドが抗原を含み、場合により前記抗原が、
－ＭＨＣクラスＩエピトープ、
－ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、
－Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、または
－これらの組み合わせ
を含み、
場合により前記少なくとも１つのペイロード核酸配列が、５’リンカー配列及び／または３’リンカー配列をさらに含む、
前記少なくとも１つのペイロード核酸配列と、場合により、
（２）前記少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列と、
（３）場合により、少なくとも１つのユニバーサルＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列と、
（４）場合により、少なくとも１つのＧＰＧＰＧコードリンカー配列（配列番号５６）と、
（５）場合により、少なくとも１つのポリアデニル化配列と
を含む、前記方法。
[本発明１１１６]
対象の免疫応答を刺激するための方法であって、前記対象に、改変ＣｈＡｄＶ６８配列を含むアデノウイルスベクターを投与することを含み、
前記改変ＣｈＡｄＶ６８配列が、
（ａ）配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列の部分欠失Ｅ４遺伝子と、
（ｂ）配列番号１に示されるＣｈＡｄＶ６８配列の１つ以上の遺伝子または調節配列であって、場合により、前記１つ以上の遺伝子または調節配列が、配列番号１に示される配列のチンパンジーアデノウイルス末端逆位反復配列（ＩＴＲ）、Ｅ１Ａ、Ｅ１Ｂ、Ｅ２Ａ、Ｅ２Ｂ、Ｅ３、Ｅ４、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４、及びＬ５遺伝子のうちの少なくとも１つを含む、前記１つ以上の遺伝子または調節配列と
を含み、
前記チンパンジーアデノウイルスベクターがカセットをさらに含み、前記カセットが少なくとも１つのペイロード核酸配列を含み、前記カセットが、前記少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列を含む、前記方法。
[本発明１１１７]
場合によりがんまたは感染症である疾患を有する対象を治療するための方法であって、前記対象に、改変ＣｈＡｄＶ６８配列を含むアデノウイルスベクターを投与することを含み、
前記改変ＣｈＡｄＶ６８配列が、
（ａ）配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列の部分欠失Ｅ４遺伝子と、

（ｂ）配列番号１に示されるＣｈＡｄＶ６８配列の１つ以上の遺伝子または調節配列であって、場合により、前記１つ以上の遺伝子または調節配列が、配列番号１に示される配列のチンパンジーアデノウイルス末端逆位反復配列（ＩＴＲ）、Ｅ１Ａ、Ｅ１Ｂ、Ｅ２Ａ、Ｅ２Ｂ、Ｅ３、Ｅ４、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４、及びＬ５遺伝子のうちの少なくとも１つを含む、前記１つ以上の遺伝子または調節配列と
を含み、
前記チンパンジーアデノウイルスベクターがカセットをさらに含み、前記カセットが少なくとも１つのペイロード核酸配列を含み、前記カセットが、前記少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列を含む、前記方法。

[本発明１１１８]
前記ウイルスが、先行するベクターの発明のいずれかを用いて生産される、ウイルスを生産する方法。

[本発明１１１９]
前記ウイルスの生産が、前記部分欠失Ｅ４遺伝子を含まないベクターを使用して生産されるウイルスの生産に対して、前記部分欠失Ｅ４遺伝子を含むベクターを使用して増加する、本発明１１１８の方法。

[本発明１１２０]
前記ウイルスの感染単位の力価が、前記部分欠失Ｅ４遺伝子を含まないベクターを使用して生産されるウイルスの感染単位の力価に対して、前記部分欠失Ｅ４遺伝子を含むベクターを使用して増加する、本発明１１１８または１１１９の方法。

[本発明１１２１]
前記増加した生産が、前記部分欠失Ｅ４遺伝子を含まないベクターを使用した生産に対して少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、少なくとも２．５倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、または少なくとも９倍増加している、本発明１１２０の方法。

[本発明１１２２]
前記増加した生産が、前記部分欠失Ｅ４遺伝子を含まないベクターを使用した生産に対して少なくとも１０倍、少なくとも１８倍、少なくとも２０倍、少なくとも２５倍、または少なくとも２７倍増加している、本発明１１２１の方法。

[本発明１１２３]
ウイルスを生産する方法であって、
ａ．カセットを含むウイルスベクターを与える工程であって、前記カセットが、
（ｉ）少なくとも１つのペイロード核酸配列であって、場合により前記少なくとも１つのペイロード核酸配列がポリペプチドをコードし、場合により前記ポリペプチドが抗原を含み、場合により前記抗原が、
－ＭＨＣクラスＩエピトープ、
－ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、
－Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、または
－これらの組み合わせ
を含み、
場合により前記少なくとも１つのペイロード核酸配列が、５’リンカー配列及び／または３’リンカー配列をさらに含む、
前記少なくとも１つのペイロード核酸配列と、場合により、
（ｉｉ）前記少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列であって、前記少なくとも１つのプロモーターが、テトラサイクリン（ＴＥＴ）リプレッサータンパク質（ＴＥＴｒ）制御プロモーターである、前記少なくとも１つのプロモーター配列と、
（ｉｉｉ）場合により、少なくとも１つのＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列と、
（ｉｖ）場合により、少なくとも１つのＧＰＧＰＧコードリンカー配列（配列番号５６）

と、
（ｖ）場合により、少なくとも１つのポリアデニル化配列と
を含む、前記工程と、
ｂ．前記ＴＥＴｒタンパク質を発現するように操作された細胞を与える工程と、
ｃ．前記ウイルスベクターを、前記ウイルスの生産に充分な条件下で前記細胞と接触させる工程と
を含む、前記方法。
[本発明１１２４]
前記ウイルスベクターがチンパンジーアデノウイルスベクターを含み、場合により前記チンパンジーアデノウイルスベクターがＣｈＡｄＶ６８ベクターである、本発明１１２３の方法。
[本発明１１２５]
前記ウイルスの生産が、前記ＴＥＴｒ制御プロモーターを含まないベクターを使用して生産されるウイルスの生産に対して、前記ＴＥＴｒ制御プロモーターを含むベクターを使用して増加する、本発明１１２３または１１２４の方法。
[本発明１１２６]
前記増加した生産が、前記ＴＥＴｒ制御プロモーターを含まないベクターを使用した生産に対して少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、少なくとも２．５倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、少なくとも９倍、または少なくとも１０倍増加している、本発明１１２５の方法。
[本発明１１２７]
前記増加した生産が、前記ＴＥＴｒ制御プロモーターを含まないベクターを使用した生産に対して少なくとも１５倍、少なくとも２０倍、少なくとも２５倍、少なくとも３０倍、少なくとも３５倍、少なくとも４０倍、少なくとも５０倍、少なくとも６０倍、少なくとも７０倍、少なくとも８０倍、少なくとも９０倍、または少なくとも１００倍増加している、本発明１１２５の方法。
[本発明１１２８]
前記ウイルスの生産が、前記ＴＥＴｒタンパク質を発現するように操作されていない細胞を使用して生産されるウイルスの生産に対して、前記ＴＥＴｒ制御プロモーターを含むベクターを使用して増加する、本発明１１２３～１１２７のいずれかの方法。
[本発明１１２９]
前記増加した生産が、前記ＴＥＴｒタンパク質を発現するように操作されていない細胞を使用した生産に対して少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、少なくとも２．５倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、少なくとも９倍、または少なくとも１０倍増加している、本発明１１２８の方法。
[本発明１１３０]
カセットを含むウイルスベクターであって、前記カセットが、
（ｉ）少なくとも１つのペイロード核酸配列であって、場合により前記少なくとも１つのペイロード核酸配列がポリペプチドをコードし、場合により前記ポリペプチドが抗原を含み、場合により前記抗原が、
－ＭＨＣクラスＩエピトープ、
－ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、
－Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、または
－これらの組み合わせ
を含み、
場合により前記少なくとも１つのペイロード核酸配列が、５’リンカー配列及び／または３’リンカー配列をさらに含む、
前記少なくとも１つのペイロード核酸配列と、場合により、
（ｉｉ）前記少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列であって、前記少なくとも１つのプロモーターが、テトラサイクリン

（ＴＥＴ）リプレッサータンパク質（ＴＥＴｒ）制御プロモーターである、前記少なくとも１つのプロモーター配列と、
（ｉｉｉ）場合により、少なくとも１つのＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列と、
（ｉｖ）場合により、少なくとも１つのＧＰＧＰＧコードリンカー配列（配列番号５６）と、
（ｖ）場合により、少なくとも１つのポリアデニル化配列と
を含む、前記ウイルスベクター。
[本発明１１３１]
前記ＴＥＴｒ制御プロモーターが１つ以上のＴＥＴオペレーター（ＴＥＴｏ）核酸配列を含み、場合により前記１つ以上のＴＥＴｏ核酸配列が、配列番号６０に示されるヌクレオチド配列を含む、本発明１１２３～１１３０のいずれかの方法またはベクター。
[本発明１１３２]
前記１つ以上のＴＥＴｏ核酸配列が、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個またはそれ以上のＴＥＴｏ核酸配列を含み、場合によりＴＥＴｏ核酸配列のそれぞれが、配列番号６０に示されるヌクレオチド配列を含む、本発明１１３１のベクター。
[本発明１１３３]
前記２つ以上のＴＥＴｏ核酸配列が互いに連結されている、本発明１１３２のベクター。
[本発明１１３４]
前記２つ以上のＴＥＴｏ核酸配列が互いに直接連結されている、本発明１１３３のベクター。
[本発明１１３５]
前記２つ以上のＴＥＴｏ核酸配列がリンカー配列によって互いに連結され、前記リンカーが、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個以上のヌクレオチドを含み、場合により、前記リンカー配列が、配列番号７０に示されるリンカーヌクレオチド配列を含む、本発明１１３３のベクター。
[本発明１１３６]
前記１つ以上のＴＥＴｏ核酸配列が、前記プロモーター配列のＲＮＡポリメラーゼ結合配列の５’である、本発明１１３１～１１３５のいずれかのベクター。
[本発明１１３７]
前記１つ以上のＴＥＴｏ核酸配列が、前記プロモーター配列のＲＮＡポリメラーゼ結合配列の３’である、本発明１１３１～１１３５のいずれかのベクター。
[本発明１１３８]
前記少なくとも１つのプロモーター配列が、ＣＭＶ、ＳＶ４０、ＥＦ－１、ＲＳＶ、ＰＧＫ、ＨＳＡ、ＭＣＫまたはＥＢＶプロモーター配列を含む、本発明１１３０～１１３７のいずれかのベクター。
[本発明１１３９]
前記少なくとも１つのプロモーター配列が、ＣＭＶ由来プロモーター配列であり、場合により前記ＣＭＶ由来プロモーター配列が、配列番号６４に示されるＣＭＶプロモーターヌクレオチド配列を含む、本発明１１３０～１１３７のいずれかのベクター。
[本発明１１４０]
前記ＣＭＶ由来プロモーター配列が最小ＣＭＶプロモーター配列であり、場合により前記最小ＣＭＶプロモーター配列が、配列番号６１に示される最小ＣＭＶプロモーターヌクレオチド配列を含む、本発明１１３９のベクター。
[本発明１１４１]
前記少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された前記ＴＥＴｒ制御プロモーターが、５’から３’に向けて以下を含む式：
（Ｔ－Ｌγ）χ－Ｐ－Ｎ
[式中、
Ｎは、前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの１つを含み、場合により、各

Ｎは、場合により、前記コードされたエピトープ配列を野生型核酸配列によってコードされる対応するペプチド配列とは異なるものとする少なくとも１つの変更を有する、ＭＨＣクラスＩエピトープ、ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、またはこれらの組み合わせをコードし、
Ｐは、前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つに機能的に連結された前記プロモーター配列のＲＮＡポリメラーゼ結合配列を含み、
Ｔは、配列番号６０に示されるヌクレオチド配列を含むＴＥＴｏ核酸配列を含み、
Ｌは、リンカー配列を含み、ただし各ＸについてＹ＝０または１であり、
Ｘ＝１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０である］
に記述される順序付けられた配列を含む、本発明１１３０～１１４０のいずれかのベクター。

［本発明１１４２］
前記少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された前記ＴＥＴｒ制御プロモーターが、５’から３’に向けて以下を含む式：
$P-(T-L_Y)_X-N$
［式中、
Ｎは、前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの１つを含み、場合により、各Ｎは、場合により、前記コードされたエピトープ配列を野生型核酸配列によってコードされる対応するペプチド配列とは異なるものとする少なくとも１つの変更を有する、ＭＨＣクラスＩエピトープ、ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、Ｂ細胞応答を刺激することができるエピトープ、またはこれらの組み合わせをコードし、
Ｐは、前記少なくとも１つのペイロード核酸配列のうちの少なくとも１つに機能的に連結された前記プロモーター配列のＲＮＡポリメラーゼ結合配列を含み、
Ｔは、配列番号６０に示されるヌクレオチド配列を含むＴＥＴｏ核酸配列を含み、
Ｌは、リンカー配列を含み、ただし各ＸについてＹ＝０または１であり、
Ｘ＝１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０である］
に記述される順序付けられた配列を含む、本発明１１３０～１１４０のいずれかのベクター。

［本発明１１４３］
前記ＴＥＴｒ制御プロモーターが、
（１）最小ＣＭＶプロモーター配列と、
（２）そのそれぞれが配列番号６０に示されるヌクレオチド配列を含む、７個のＴＥＴｏ核酸配列と
を含み、
前記ＴＥＴｏ核酸配列のそれぞれがリンカー配列によって互いに連結され、前記７個のＴＥＴｏ核酸配列が前記最小ＣＭＶプロモーター配列の５’であり、場合により前記ＴＥＴｒ制御プロモーターが、配列番号６１に示されるヌクレオチド配列を含む、
本発明１１３０のベクター。

［本発明１１４４］
前記ＴＥＴｒ制御プロモーターが、
（１）ＣＭＶプロモーター配列と、
（２）そのそれぞれが配列番号６０に示されるヌクレオチド配列を含む、２個のＴＥＴｏ核酸配列と
を含み、
前記ＴＥＴｏ核酸配列のそれぞれが互いに直接連結され、前記２個のＴＥＴｏ核酸配列が前記ＣＭＶプロモーター配列の３’であり、場合により前記ＴＥＴｒ制御プロモーターが、配列番号６４に示されるヌクレオチド配列を含む、
本発明１１３０のベクター。

[本発明１１４５]
前記ウイルスベクターがベクター骨格を含み、前記ベクター骨格がチンパンジーアデノウイルスベクターを含み、場合により前記チンパンジーアデノウイルスベクターがＣｈＡｄＶ６８ベクターである、本発明１１３０～１１４４のいずれかのベクター。
【図面の簡単な説明】
【００５８】
本発明のこれらの、ならびに他の特徴、態様、及び利点は、以下の説明文、及び添付図面を参照することでより深い理解がなされるであろう。
【００５９】
【図１】インビトロＴ細胞活性化合物アッセイの開発を説明する。抗原提示細胞へのワクチンカセットの送達が、異なるペプチド抗原の発現、プロセシング、及びＭＨＣ制限提示につながるアッセイの概略。特異的なペプチド－ＭＨＣの組み合わせに一致するＴ細胞受容体を有するように操作されたレポーターＴ細胞が活性化され、ルシフェラーゼが発現される。
【図２】（Ａ）短いカセット内のリンカー配列の評価を説明し、互いに対して同じ位置で連結された５個のクラスＩ　ＭＨＣクラス制限エピトープ（エピトープ１～５）に２個の普遍的クラスＩＩ　ＭＨＣエピトープ（ＭＨＣ－ＩＩ）が繋げられたものを示す。異なるリンカーを用いて種々の繰り返しが生成された。場合によっては、Ｔ細胞エピトープは互いに直接連結される。他の場合では、Ｔ細胞エピトープの片側または両側にその天然配列が隣接する。他の繰り返しでは、Ｔ細胞エピトープは、非天然配列ＡＡＹ、ＲＲ、及びＤＰＰにより連結される。（Ｂ）短いカセット内のリンカー配列の評価を説明し、短いカセット内に埋め込まれたＴ細胞エピトープの配列情報を示す。図２Ｂは、示される順に、配列番号７８～７９、８２、８１、８０、４９、及び１９４をそれぞれ開示する。
【図３】モデルワクチンカセットに付加された細胞ターゲティング配列の評価を説明する。ターゲティングカセットは、短いカセット設計を、ユビキチン（Ｕｂ）、シグナルペプチド（ＳＰ）及び膜貫通（ＴＭ）ドメインによって延長し、５個のマーカーヒトＴ細胞エピトープ（エピトープ１～５）の隣に２個のマウスＴ細胞エピトープＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号７２）（ＳＩＩ）及びＳＰＳＹＡＹＨＱＦ（配列番号７３）（Ａ５）をさらに有し、Ｔ細胞エピトープの両側に隣接する非天然リンカーＡＡＹ－または天然リンカー配列を用いている（２５マー）。
【図４】短いカセット内のリンカー配列のインビボ評価を説明する。Ａ）ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックマウスを使用したワクチンカセットのインビボ評価の実験計画。
【図５Ａ】長い２１ｍｅｒカセット内のエピトープ位置の影響のインビボ評価を説明し、長いカセットの設計が、それらの２５マー天然配列（リンカー＝天然フランキング配列）に含まれる５個のマーカークラスＩエピトープ（エピトープ１～５）であって、それらの２５マー天然配列に含まれるさらなる周知のＴ細胞クラスＩエピトープ（エピトープ６～２１）によって隔てられたマーカークラスＩエピトープと、２個の普遍的クラスエピトープＩＩ（ＭＨＣ－ＩＩ０）とを含み、各クラスＩエピトープの相対位置のみが異なることを示す。
【図５Ｂ】長い２１ｍｅｒカセット内のエピトープ位置の影響のインビボ評価を説明し、使用されるＴ細胞エピトープの配列情報を示す。図５Ｂは、示される順に、配列番号７８～７９、８２、８１、８０、１９５～１９７、８３、及び１９８～２０９をそれぞれ開示する。
【図６Ａ】前臨床的ＩＮＤ申請実験用の最終カセット設計を説明し、最終カセットの設計が、それらの２５マー天然配列（リンカー＝天然フランキング配列）に含まれる２０個のＭＨＣＩエピトープを含み、６個の非ヒト霊長類（ＮＨＰ）エピトープ、５個のヒトエピトープ、９個のマウスエピトープ、及び２個の普遍的ＭＨＣクラスＩＩエピトープで構成されることを示す。
【図６Ｂ】前臨床的ＩＮＤ申請実験用の最終カセット設計を説明し、非ヒト霊長類、マウス、及びヒト由来のクラスＩ　ＭＨＣ上に提示される、使用されるＴ細胞エピトープの配

列情報、ならびに２個の普遍的ＭＨＣクラスＩＩエピトープＰＡＤＲＥ及び破傷風毒素の配列を示す。図６Ｂは、列の順に、配列番号１１２～１１７、８０～８２、７８～７９、７２～７３、１４２、２１０、１４６～１４８、１４４～１４５、４９、及び４７をそれぞれ開示する。

【図７】（Ａ）トランスフェクション後のＣｈＡｄＶ６８．４ＷＴｎｔ．ＧＦＰウイルスの生成を説明する。リン酸カルシウムプロトコールを用いてＨＥＫ２９３Ａ細胞にＣｈＡｄＶ６８．４ＷＴｎｔ．ＧＦＰ　ＤＮＡをトランスフェクトした。ウイルス複製がトランスフェクションの１０日後に観察され、ＣｈＡｄＶ６８．４ＷＴｎｔ．ＧＦＰウイルスプラークを光学顕微鏡（倍率４０倍）を使用して可視化した。（Ｂ）トランスフェクション後のＣｈＡｄＶ６８．４ＷＴｎｔ．ＧＦＰウイルスの生成を説明する。リン酸カルシウムプロトコールを用いてＨＥＫ２９３Ａ細胞にＣｈＡｄＶ６８．４ＷＴｎｔ．ＧＦＰ ＤＮＡをトランスフェクトする。ウイルス複製がトランスフェクションの１０日後に観察され、ＣｈＡｄＶ６８．４ＷＴｎｔ．ＧＦＰウイルスプラークを蛍光顕微鏡（倍率４０倍）を使用して可視化した。（Ｃ）トランスフェクション後のＣｈＡｄＶ６８．４ＷＴｎｔ．ＧＦＰウイルスの生成を説明する。リン酸カルシウムプロトコールを用いてＨＥＫ２９３Ａ細胞にＣｈＡｄＶ６８．４ＷＴｎｔ．ＧＦＰ ＤＮＡをトランスフェクトする。ウイルス複製がトランスフェクションの１０日後に観察され、ＣｈＡｄＶ６８．４ＷＴｎｔ．ＧＦＰウイルスプラークを蛍光顕微鏡を使用して倍率１００倍で可視化した。

【図８】（Ａ）トランスフェクション後のＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＧＦＰウイルスの生成を説明する。リポフェクタミンプロトコールを用いてＨＥＫ２９３Ａ細胞にＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＧＦＰ　ＤＮＡをトランスフェクトした。ウイルス複製（プラーク）がトランスフェクションの１０日後に観察された。ライセートを調製し、Ｔ２５フラスコの２９３Ａ細胞に再感染させるのに用いた。ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＧＦＰウイルスプラークを可視化し、光学顕微鏡（倍率４０倍）を使用して３日後に撮影した。（Ｂ）トランスフェクション後のＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＧＦＰウイルスの生成を説明する。リポフェクタミンプロトコールを用いてＨＥＫ２９３Ａ細胞にＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＧＦＰ　ＤＮＡをトランスフェクトした。ウイルス複製（プラーク）がトランスフェクションの１０日後に観察された。ライセートを調製し、Ｔ２５フラスコの２９３Ａ細胞に再感染させるのに用いた。ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＧＦＰウイルスプラークを可視化し、蛍光顕微鏡を倍率４０倍で使用して３日後に撮影した。（Ｃ）トランスフェクション後のＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＧＦＰウイルスの生成を説明する。リポフェクタミンプロトコールを用いてＨＥＫ２９３Ａ細胞にＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＧＦＰ　ＤＮＡをトランスフェクトした。ウイルス複製（プラーク）がトランスフェクションの１０日後に観察された。ライセートを調製し、Ｔ２５フラスコの２９３Ａ細胞に再感染させるのに用いた。ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＧＦＰウイルスプラークを可視化し、蛍光顕微鏡を倍率１００倍で使用して３日後に撮影した。

【図９】ウイルス粒子の生成スキームを説明する。

【図１０】アルファウイルス由来ＶＥＥ自己複製ＲＮＡ（ｓｒＲＮＡ）ベクターを説明する。

【図１１】Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ系マウスにＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡを接種した後のインビボのレポーター発現を説明する。異なる時点でＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡでＣ５７ＢＬ／６Ｊ系マウスを免疫した（ＭＣ３に封入したものを１０ｕｇ／マウスで両側性に筋肉内注射）後のルシフェラーゼシグナルの代表的イメージを示す。

【図１２Ａ】Ｂ１６－ＯＶＡ腫瘍保有マウスにおける、ＭＣ３　ＬＮＰにより製剤化したＶＥＥ　ｓｒＲＮＡで免疫した１４日後に測定されたＴ細胞応答を説明する。Ｂ１６－ＯＶＡ腫瘍保有Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ系マウスに、１０ｕｇのＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡ（コントロール）、ＶＥＥ－ＵｂＡＡＹ　ｓｒＲＮＡ（Ｖａｘ）、ＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡと抗ＣＴＬＡ－４（ａＣＴＬＡ－４）、またはＶＥＥ－ＵｂＡＡＹ ｓｒＲＮＡと抗ＣＴＬＡ－４（Ｖａｘ＋ａＣＴＬＡ－４）を注射した。さらに、すべてのマウスを７日目に開始して抗ＰＤ－１　ｍＡｂで処置した。各グループは８匹のマウスで構成し

た。免疫の１４日後にマウスを　　殺し、脾臓及びリンパ節を採取した。ＳＩＩＮＦＥＫＬ特異的Ｔ細胞（「ＳＩＩＮＦＥＫＬ」は配列番号７２として開示されている）応答をＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴにより評価し、脾細胞１０^{6}個当たりのスポット形成細胞（ＳＦＣ）として報告する。各線は中央値を示す。

【図１２Ｂ】Ｂ１６－ＯＶＡ腫瘍保有マウスにおける、ＭＣ３　ＬＮＰにより製剤化したＶＥＥ　ｓｒＲＮＡで免疫した１４日後に測定されたＴ細胞応答を説明する。Ｂ１６－ＯＶＡ腫瘍保有Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ系マウスに、１０ｕｇのＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡ（コントロール）、ＶＥＥ－ＵｂＡＡＹ　ｓｒＲＮＡ（Ｖａｘ）、ＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡと抗ＣＴＬＡ－４（ａＣＴＬＡ－４）、またはＶＥＥ－ＵｂＡＡＹ　ｓｒＲＮＡと抗ＣＴＬＡ－４（Ｖａｘ＋ａＣＴＬＡ－４）を注射した。さらに、すべてのマウスを７日目に開始して抗ＰＤ－１ｍＡｂで処置した。各グループは８匹のマウスで構成した。免疫の１４日後にマウスを　　殺し、脾臓及びリンパ節を採取した。ＳＩＩＮＦＥＫ特異的Ｔ細胞（「ＳＩＩＮＦＥＫＬ」は配列番号７２として開示されている）応答をＭＨＣＩペンタマー染色により評価し、ペンタマー陽性細胞としてＣＤ８陽性細胞の割合（％）として報告する。各線は中央値を示す。

【図１３Ａ】Ｂ１６－ＯＶＡ腫瘍保有マウスにおける異種プライム／ブースト後の抗原特異的Ｔ細胞応答を説明する。Ｂ１６－ＯＶＡ腫瘍保有Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ系マウスに、アデノウイルス発現ＧＦＰ（Ａｄ５－ＧＦＰ）を注射し、ＭＣ３　ＬＮＰで製剤化したＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡでブーストする（コントロール）か、またはＡｄ５－ＵｂＡＡＹを注射し、ＶＥＥ－ＵｂＡＡＹ　ｓｒＲＮＡでブーストした（Ｖａｘ）。コントロール及びＶａｘのグループの両方を、ＩｇＧコントロールｍＡｂでも処置した。第３のグループは、Ａｄ５－ＧＦＰプライム／ＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡブーストと抗ＣＴＬＡ－４（ａＣＴＬＡ－４）との組み合わせで処置し、第４のグループは、Ａｄ５－ＵｂＡＡＹプライム／ＶＥＥ－ＵｂＡＡＹブーストと抗ＣＴＬＡ－４（Ｖａｘ＋ａＣＴＬＡ－４）との組み合わせで処置した。さらに、すべてのマウスを２１日目に開始して抗ＰＤ－１　ｍＡｂで処置した。Ｔ細胞応答をＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴにより測定した。アデノウイルスによる免疫の１４日後にマウスを　　殺し、脾臓及びリンパ節を採取した。

【図１３Ｂ】Ｂ１６－ＯＶＡ腫瘍保有マウスにおける異種プライム／ブースト後の抗原特異的Ｔ細胞応答を説明する。Ｂ１６－ＯＶＡ腫瘍保有Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ系マウスに、アデノウイルス発現ＧＦＰ（Ａｄ５－ＧＦＰ）を注射し、ＭＣ３　ＬＮＰで製剤化したＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡでブーストする（コントロール）か、またはＡｄ５－ＵｂＡＡＹを注射し、ＶＥＥ－ＵｂＡＡＹ　ｓｒＲＮＡでブーストした（Ｖａｘ）。コントロール及びＶａｘのグループの両方を、ＩｇＧコントロールｍＡｂでも処置した。第３のグループは、Ａｄ５－ＧＦＰプライム／ＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡブーストと抗ＣＴＬＡ－４（ａＣＴＬＡ－４）との組み合わせで処置し、第４のグループは、Ａｄ５－ＵｂＡＡＹプライム／ＶＥＥ－ＵｂＡＡＹブーストと抗ＣＴＬＡ－４（Ｖａｘ＋ａＣＴＬＡ－４）との組み合わせで処置した。さらに、すべてのマウスを２１日目に開始して抗ＰＤ－１ｍＡｂで処置した。Ｔ細胞応答をＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴにより測定した。アデノウイルスによる免疫の１４日後及びｓｒＲＮＡによるブーストの１４日後（プライムの２８日後）にマウスを　　殺し、脾臓及びリンパ節を採取した。

【図１３Ｃ】Ｂ１６－ＯＶＡ腫瘍保有マウスにおける異種プライム／ブースト後の抗原特異的Ｔ細胞応答を説明する。Ｂ１６－ＯＶＡ腫瘍保有Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ系マウスに、アデノウイルス発現ＧＦＰ（Ａｄ５－ＧＦＰ）を注射し、ＭＣ３　ＬＮＰで製剤化したＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡでブーストする（コントロール）か、またはＡｄ５－ＵｂＡＡＹを注射し、ＶＥＥ－ＵｂＡＡＹ　ｓｒＲＮＡでブーストした（Ｖａｘ）。コントロール及びＶａｘのグループの両方を、ＩｇＧコントロールｍＡｂでも処置した。第３のグループは、Ａｄ５－ＧＦＰプライム／ＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡブーストと抗ＣＴＬＡ－４（ａＣＴＬＡ－４）との組み合わせで処置し、第４のグループは、Ａｄ５－ＵｂＡＡＹプライム／ＶＥＥ－ＵｂＡＡＹブーストと抗ＣＴＬＡ－４（Ｖａｘ＋ａＣＴＬＡ－４）との組み合わせで処置した。さらに、すべてのマウスを２１日目に開始して抗ＰＤ－

１ｍＡｂで処置した。Ｔ細胞応答をＭＨＣクラスＩペンタマー染色により測定した。アデノウイルスによる免疫の１４日後にマウスを　　殺し、脾臓及びリンパ節を採取した。
【図１３Ｄ】Ｂ１６－ＯＶＡ腫瘍保有マウスにおける異種プライム／ブースト後の抗原特異的Ｔ細胞応答を説明する。Ｂ１６－ＯＶＡ腫瘍保有Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ系マウスに、アデノウイルス発現ＧＦＰ（Ａｄ５－ＧＦＰ）を注射し、ＭＣ３　ＬＮＰで製剤化したＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡでブーストする（コントロール）か、またはＡｄ５－ＵｂＡＡＹを注射し、ＶＥＥ－ＵｂＡＡＹ　ｓｒＲＮＡでブーストした（Ｖａｘ）。コントロール及びＶａｘのグループの両方を、ＩｇＧコントロールｍＡｂでも処置した。第３のグループは、Ａｄ５－ＧＦＰプライム／ＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡブーストと抗ＣＴＬＡ－４（ａＣＴＬＡ－４）との組み合わせで処置し、第４のグループは、Ａｄ５－ＵｂＡＡＹプライム／ＶＥＥ－ＵｂＡＡＹブーストと抗ＣＴＬＡ－４（Ｖａｘ＋ａＣＴＬＡ－４）との組み合わせで処置した。さらに、すべてのマウスを２１日目に開始して抗ＰＤ－１ｍＡｂで処置した。Ｔ細胞応答をＭＨＣクラスＩペンタマー染色により測定した。アデノウイルスによる免疫の１４日後及びｓｒＲＮＡによるブーストの１４日後（プライムの２８日後）にマウスを　　殺し、脾臓及びリンパ節を採取した。
【図１４Ａ】ＣＴ２６（Ｂａｌｂ／ｃ系）腫瘍保有マウスにおける異種プライム／ブースト後の抗原特異的Ｔ細胞応答を説明する。マウスを、Ａｄ５－ＧＦＰで免疫し、アデノウイルスプライムの１５日後にＭＣ３　ＬＮＰで製剤化したＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡでブーストする（コントロール）か、またはＡｄ５－ＵｂＡＡＹでプライムし、ＶＥＥ－ＵｂＡＡＹ　ｓｒＲＮＡでブーストした（Ｖａｘ）。コントロール及びＶａｘのグループの両方を、ＩｇＧコントロールｍＡｂでも処置した。別のグループに、Ａｄ５－ＧＦＰ／ＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡプライム／ブーストと抗抗ＰＤ－１（ａＰＤ１）との組み合わせを投与し、第４のグループに、Ａｄ５－ＵｂＡＡＹ／ＶＥＥ－ＵｂＡＡＹプライム／ブーストと抗抗ＰＤ－１（Ｖａｘ＋ａＰＤ１）との組み合わせを投与した。ＡＨ１ペプチドに対するＴ細胞応答をＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴを用いて測定した。アデノウイルスによる免疫の１２日後にマウスを　　殺し、脾臓及びリンパ節を採取した。
【図１４Ｂ】ＣＴ２６（Ｂａｌｂ／ｃ系）腫瘍保有マウスにおける異種プライム／ブースト後の抗原特異的Ｔ細胞応答を説明する。マウスを、Ａｄ５－ＧＦＰで免疫し、アデノウイルスプライムの１５日後にＭＣ３　ＬＮＰで製剤化したＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡでブーストする（コントロール）か、またはＡｄ５－ＵｂＡＡＹでプライムし、ＶＥＥ－ＵｂＡＡＹ　ｓｒＲＮＡでブーストした（Ｖａｘ）。コントロール及びＶａｘのグループの両方を、ＩｇＧコントロールｍＡｂでも処置した。別のグループに、Ａｄ５－ＧＦＰ／ＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡプライム／ブーストと抗抗ＰＤ－１（ａＰＤ１）との組み合わせを投与し、第４のグループに、Ａｄ５－ＵｂＡＡＹ／ＶＥＥ－ＵｂＡＡＹプライム／ブーストと抗抗ＰＤ－１（Ｖａｘ＋ａＰＤ１）との組み合わせを投与した。ＡＨ１ペプチドに対するＴ細胞応答をＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴを用いて測定した。アデノウイルスによる免疫の１２日後及びｓｒＲＮＡによるブーストの６日後（プライムの２１日後）にマウスを　　殺し、脾臓及びリンパ節を採取した。
【図１５】マウスにおけるマウス腫瘍抗原に対するＣｈＡｄＶ６８誘発Ｔ細胞応答を説明する。マウスをＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーで免疫し、ＭＨＣクラスＩエピトープＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号７２）（ＯＶＡ）に対するＴ細胞応答をＣ５７ＢＬ／６Ｊ系雌性マウスで測定し、ＭＨＣクラスＩエピトープＡＨ１－Ａ５をＢａｌｂ／ｃ系マウスで測定した。ＥＬＩＳｐｏｔアッセイで測定された脾細胞10^6個当たりの平均のスポット形成細胞（ＳＦＣ）を示した。エラーバーは、標準偏差を示す。
【図１６】ＣｈＡｄＶ６、ＣｈＡｄＶ＋抗ＰＤ－１、ｓｒＲＮＡ、ｓｒＲＮＡ＋抗ＰＤ－１、または抗ＰＤ－１単独のいずれかによる１回の免疫後のＣＴ２６腫瘍モデルにおける細胞性免疫応答を説明する。抗原特異的ＩＦＮ－γ産生を、ＥＬＩＳｐｏｔを用い、各グループから６匹のマウスの脾細胞で測定した。結果を、脾細胞10^6個当たりのスポット形成細胞（ＳＦＣ）で示す。各グループの中央値を横線で示す。Ｐ値は、ダネット多重比較検定を用いて求めた。すなわち、＊＊＊Ｐ＜０．０００１、＊＊Ｐ＜０．００１、＊Ｐ

＜０．０５。ＣｈＡｄＶ＝ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー、ｓｒＲＮＡ＝ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡ。

【図１７】ＣｈＡｄＶ６、ＣｈＡｄＶ＋抗ＰＤ－１、ｓｒＲＮＡ、ｓｒＲＮＡ＋抗ＰＤ－１、または抗ＰＤ－１単独のいずれかによる１回の免疫後のＣＴ２６腫瘍モデルにおけるＣＤ８　Ｔ細胞免疫応答を説明する。ＣＤ８　Ｔ細胞の抗原特異的ＩＦＮ－γ産生をＩＣＳを用いて測定し、結果を、抗原特異的ＣＤ８　Ｔ細胞として全ＣＤ８　Ｔ細胞の割合（％）として示す。各グループの中間値を横線で示す。Ｐ値は、ダネット多重比較検定を用いて求めた。すなわち、＊＊＊Ｐ＜０．０００１、＊＊Ｐ＜０．００１、＊Ｐ＜０．０５。ＣｈＡｄＶ＝ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー、ｓｒＲＮＡ＝ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡ。

【図１８】ＣｈＡｄＶ／ｓｒＲＮＡ異種プライム／ブースト、ｓｒＲＮＡ／ＣｈＡｄＶ異種プライム／ブースト、またはｓｒＲＮＡ／ｓｒＲＮＡ同種プライマー／ブーストによる免疫後のＣＴ２６腫瘍モデルにおける腫瘍増殖を説明する。プライム及びブーストにおいて抗ＰＤ－１の投与を行った、または行わない場合のプライム／ブースト免疫も比較として示す。腫瘍体積を週２回測定し、平均腫瘍体積を実験の最初の２１日間について示す。実験開始時に各グループは２２～２８匹のマウスで構成された。エラーバーは平均の標準誤差（ＳＥＭ）を示す。Ｐ値は、ダネット検定を用いて求めた。すなわち、＊＊＊Ｐ＜０．０００１、＊＊Ｐ＜０．００１、＊Ｐ＜０．０５。ＣｈＡｄＶ＝ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー、ｓｒＲＮＡ＝ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡ。

【図１９】ＣｈＡｄＶ／ｓｒＲＮＡ異種プライム／ブースト、ｓｒＲＮＡ／ＣｈＡｄＶ異種プライム／ブースト、またはｓｒＲＮＡ／ｓｒＲＮＡ同種プライマー／ブーストによる免疫後のＣＴ２６腫瘍モデルにおける生存率を説明する。プライム及びブーストにおいて抗ＰＤ－１の投与を行った、または行わない場合のプライム／ブースト免疫も比較として示す。Ｐ値は、ログランク検定を用いて求めた。すなわち、＊＊＊Ｐ＜０．０００１、＊＊Ｐ＜０．００１、＊Ｐ＜０．０１。ＣｈＡｄＶ＝ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー、ｓｒＲＮＡ＝ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡ。

【図２０Ａ】ＥＬＩＳｐｏｔを用いて測定した抗原特異的細胞性免疫応答を示す。６種類の異なるｍａｍｕＡ０１制限エピトープに対する抗原特異的ＩＦＮ－γ産生を、初期免疫化の１、２、３、４、５、６、８、９、または１０週間後にＥＬＩＳｐｏｔを用いてＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡ－ＬＮＰ１（３０μｇ）についてＰＢＭＣ中で測定した（各群６匹のアカゲザル）。結果を、積み上げバーグラフフォーマットで、各エピトープについて、ＰＢＭＣ10^6個当たりの平均スポット形成細胞（ＳＦＣ）として示す。各動物の値は、プレブリード（０週目）のレベルに対して正規化した。

【図２０Ｂ】ＥＬＩＳｐｏｔを用いて測定した抗原特異的細胞性免疫応答を示す。６種類の異なるｍａｍｕＡ０１制限エピトープに対する抗原特異的ＩＦＮ－γ産生を、初期免疫化の１、２、３、４、５、６、８、９、または１０週間後にＥＬＩＳｐｏｔを用いてＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡ－ＬＮＰ１（１００μｇ）についてＰＢＭＣ中で測定した（各群６匹のアカゲザル）。結果を、積み上げバーグラフフォーマットで、各エピトープについて、ＰＢＭＣ10^6個当たりの平均スポット形成細胞（ＳＦＣ）として示す。各動物の値は、プレブリード（０週目）のレベルに対して正規化した。

【図２０Ｃ】ＥＬＩＳｐｏｔを用いて測定した抗原特異的細胞性免疫応答を示す。６種類の異なるｍａｍｕＡ０１制限エピトープに対する抗原特異的ＩＦＮ－γ産生を、初期免疫化の１、２、３、４、５、６、８、９、または１０週間後にＥＬＩＳｐｏｔを用いてＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡ－ＬＮＰ２（１００μｇ）による同種プライム／ブーストについてＰＢＭＣ中で測定した（各群６匹のアカゲザル）。結果を、積み上げバーグラフフォーマットで、各エピトープについて、ＰＢＭＣ10^6個当たりの平均スポット形成細胞（ＳＦＣ）として示す。各動物の値は、プレブリード（０週目）のレベルに対して正規化した。

【図２０Ｄ】ＥＬＩＳｐｏｔを用いて測定した抗原特異的細胞性免疫応答を示す。６種類の異なるｍａｍｕＡ０１制限エピトープに対する抗原特異的ＩＦＮ－γ産生を、初期免疫

化の１、２、３、４、５、６、８、９、または１０週間後にＥＬＩＳｐｏｔを用いてＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー／ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡによる異種プライム／ブースト群についてＰＢＭＣ中で測定した（各群６匹のアカゲザル）。結果を、積み上げバーグラフフォーマットで、各エピトープについて、ＰＢＭＣ１０^{6}個当たりの平均スポット形成細胞（ＳＦＣ）として示す。各動物の値は、プレブリード（０週目）のレベルに対して正規化した。

【図２１】ＥＬＩＳｐｏｔを用いて測定した抗原特異的細胞性免疫応答を示す。６種類の異なるｍａｍｕＡ０１制限エピトープに対する抗原特異的ＩＦＮ－γ産生を、免疫化の前、及び初期免疫化の４、５、６、７、８、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３または２４週後にＥＬＩＳｐｏｔを用いて、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー／ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡによる異種プライム／ブーストレジメンによる免疫化後にＰＢＭＣ中で測定した。結果を、積み上げバーグラフフォーマットで、各エピトープ（各群６匹のアカゲザル）について、ＰＢＭＣ１０^{6}個当たりの平均スポット形成細胞（ＳＦＣ）として示す。

【図２２】ＥＬＩＳｐｏｔを用いて測定した抗原特異的細胞性免疫応答を示す。６種類の異なるｍａｍｕＡ０１制限エピトープに対する抗原特異的ＩＦＮ－γ産生を、免疫化の前、及び初期免疫化の４、５、６、７、８、１０、１１、１２、１３、１４、または１５週後にＥＬＩＳｐｏｔを用いて、ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡ　ＬＮＰ２による同種プライム／ブーストレジメンによる免疫化後にＰＢＭＣ中で測定した。結果を、積み上げバーグラフフォーマットで、各エピトープ（各群６匹のアカゲザル）について、ＰＢＭＣ１０^{6}個当たりの平均スポット形成細胞（ＳＦＣ）として示す。

【図２３】ＥＬＩＳｐｏｔを用いて測定した抗原特異的細胞性免疫応答を示す。６種類の異なるｍａｍｕＡ０１制限エピトープに対する抗原特異的ＩＦＮ－γ産生を、免疫化の前、及び初期免疫化の４、５、６、７、８、１０、１１、１２、１３、１４、または１５週後にＥＬＩＳｐｏｔを用いて、ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡ　ＬＮＰ１による同種プライム／ブーストレジメンによる免疫化後にＰＢＭＣ中で測定した。結果を、積み上げバーグラフフォーマットで、各エピトープ（各群６匹のアカゲザル）について、ＰＢＭＣ１０^{6}個当たりの平均スポット形成細胞（ＳＦＣ）として示す。

【図２４Ａ】Ｐｒｏｍｅｇａ社のダイナミックレンジ標準から生成された、例示的なペプチドスペクトルを示す。図２４Ａは配列番号７７を開示している。

【図２４Ｂ】Ｐｒｏｍｅｇａ社のダイナミックレンジ標準から生成された、例示的なペプチドスペクトルを示す。

【図２５】８個の選択されたＣｈＡｄＶ６８－ＭＡＧ急速増殖プラークのＩＵ力価により評価した生産性を未精製のプールされたウイルスと比較して示す。グラフの柱の上に示された数字は、ＭＯＩ＝０．１での制御された感染におけるプールされたウイルスに対する改善倍率を示す。

【図２６】Ｅ４遺伝子座及びクローン１Ａで特定されたＥ４Ｏｒｆ２～Ｅ４Ｏｒｆ４間の７２７ｂｐの欠失の概略図を示す。

【図２７】Ｅ４欠失を有するウイルス及び有さないウイルスによるウイルス生産性を示す。棒の上に示された数字は、Ｅ４欠失のないウイルスに対する改善倍率を示す。ＣｈＡｄＶ６８－ＭＡＧ－Ｅ４に対するＣｈＡｄＶ６８－ＭＡＧの比較を３つの別々の場合で行った。それぞれの場合で両方のウイルスを用いた４００ｍＬの生産ランをＭＯＩ＝１．０で行った。ウイルス粒子（ＶＰ）の力価（左パネル）及び感染単位（ＩＵ）の力価（右パネル）を示す。

【図２８】ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー（「ＭＡＧ」）及びＣｈＡｄＶ６８－ＭＡＧ－Ｅ４欠失（「ＭＡＧ－Ｅ４」）ウイルスを感染させた細胞におけるウサギ抗クラスＩＩエピトープ抗体を使用したＭＡＧ発現のウェスタンブロット分析を示す。各試料は、＋及び－符合で示されるようにプロテアーゼ阻害剤ＭＧ－１３２の存在下及び非存在下で処理した。

【図２９】３０個（Ｌ）、４０個（ＸＬ）または５０（ＸＸＬ）個のエピトープを有する

大きな抗原カセットにおける異なる腫瘍由来のモデルエピトープの一般的な編成を示す。
【図３０】ＣｈＡｄベクターが、すべてのカセットに共通の配列を認識する抗クラスＩＩ（ＰＡＤＲＥ）抗体を使用した上記のウェスタンブロットによって示されるように長いカセットを発現することを示す。ＨＥＫ細胞に異なるサイズの大きなカセット（ＣｈＡｄＶ６８－５０ＸＸＬ、ＣｈＡｄＶ６８－４０ＸＬ及びＣｈＡｄＶ６８－３０Ｌ）を発現するＣｈＡｄＶ６８ベクターを感染させた。感染はＭＯＩ＝０．２に設定した。感染２４時間後にプロテアソーム阻害剤であるＭＧ１３２を、感染させたウェルのセットに加えた（＋符合で示す）。ウイルス処理したウェルの別のセットはＭＧ１３２で処理しなかった（－符合で示す）。非感染ＨＥＫ２９３細胞（２９３Ｆ）をネガティブコントロールとして用いた。感染４８時間後に細胞ペレットを回収し、ＳＤＳ／ＰＡＧＥ電気泳動で分析し、ウサギ抗クラスＩＩ ＰＡＤＲＥ抗体を用いてイムノブロッティングした。ＨＲＰ抗ラビット抗体及びＥＣＬ化学発光基質を検出に用いた。
【図３１】ＩＣＳによりＡＨ１（上図）及びＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号７２）（下図）に対して検出された、ＣｈＡｄＶ６８の大きなカセットで免疫したマウスにおけるＣＤ８＋免疫反応を示す。データは、全ＣＤ８細胞の％としてモデルエピトープに対するＩＦＮｇ＋細胞として示す。
【図３２】ＣｈＡｄＶ６８の大きなカセットによるワクチン接種後のＬＤ－ＡＨ１＋（上図）及びＫｂ－ＳＩＩＮＦＥＫＬ＋（下図）（「ＳＩＩＮＦＥＫＬ」は配列番号７２として開示されている）テトラマーに対するＣＤ８＋応答を示す。データは、モデルテトラマーペプチド複合体に対する反応性を有する全ＣＤ８細胞の％として示す。テューキー検定を用いたＡＮＯＶＡによる＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１。すべてのｐ値をＭＡＧ２０抗原カセットと比較した。
【図３３】ＩＣＳによりＡＨ１（上図）及びＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号７２）（下図）に対して検出された、アルファウイルスの大きなカセットで処置したマウスにおけるＣＤ８＋免疫反応を示す。データは、全ＣＤ８細胞の％としてモデルエピトープに対するＩＦＮｇ＋細胞として示す。テューキー検定を用いたＡＮＯＶＡによる＊ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊Ｐ＜０．０１。すべてのｐ値をＭＡＧ２０抗原カセットと比較した。
【図３４】アカゲザルにおける抗原カセット含有ベクターの免疫原性を評価するためのワクチン接種手法を示す。三角は、０及び３２週目におけるＣｈＡｄＶ６８によるワクチン接種（１ｅ１２ｖｐ／動物）を示す。丸は、０、４、１２、１２、２０、２８、及び３２週目におけるアルファウイルスワクチン接種を表す。四角は、抗ＣＴＬＡ－４抗体の投与を表す。
【図３５】ｃｈＡｄ－ＭＡＧを投与したアカゲザル単独（グループ４）におけるＣＤ８＋抗エピトープ応答の時間的推移を示す。平均のＳＦＣ／１ｅ６脾細胞を示す。
【図３６】ｃｈＡｄ－ＭＡＧ及びＩＶ投与により抗ＣＴＬＡ４抗体（イピリムマブ）を投与したアカゲザル（グループ５）におけるＣＤ８＋抗エピトープ応答の時間的推移を示す。平均のＳＦＣ／１ｅ６脾細胞を示す。
【図３７】ｃｈＡｄ－ＭＡＧ及びＳＣ投与により抗ＣＴＬＡ４抗体（イピリムマブ）を投与したアカゲザル（グループ６）におけるＣＤ８＋抗エピトープ応答の時間的推移を示す。平均のＳＦＣ／１ｅ６脾細胞を示す。
【図３８】ＥＬＩＳｐｏｔにより測定したｃｈＡｄＶ６８／ｓａｍＲＮＡワクチンプロトコールによって生じた抗原特異的メモリー応答を示す。結果は各ドットが１匹の動物を表す個別のドットプロットとして示す。免疫前のベースライン（左パネル）及びプライム１８ヶ月後のメモリー反応（右パネル）を示す。
【図３９】コンビナトリアルテトラマー染色及びＣＤ４５ＲＡ／ＣＣＲ７共染色を用いたフローサイトメトリーによる抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のメモリー細胞表現型判定を示す。
【図４０】実験１８ヶ月目における４種類のＭａｍｕ－Ａ＊０１テトラマー＋ＣＤ８＋Ｔ細胞集団の総和中のメモリー細胞タイプの分布を示す。メモリー細胞は以下のようにキャラクタライズした。ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＣＲ７＋＝ナイーブ、ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＣＲ７－＝エフェクター（Ｔｅｆｆ）、ＣＤ４５ＲＡ－ＣＣＲ７＋＝セントラルメモリー（Ｔｃｍ）

、ＣＤ４５ＲＡ－ＣＣＲ７－＝エフェクターメモリー（Ｔｅｍ）。
【図４１】ＣＴ２６腫瘍保有マウスにおけるＣＴ２６腫瘍抗原ＡＨ１を認識するＣＤ８＋Ｔ細胞の頻度を示す。テューキーの多重比較検定による１元配置ＡＮＯＶＡを用いてＰ値を求めた（＊＊Ｐ＜０．００１、＊Ｐ＜０．０５）。ＣｈＡｄＶ＝ ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー；ａＣＴＬＡ４＝抗ＣＴＬＡ４抗体、クローン９Ｄ９。
【図４２Ａ】ＣｈＡｄＶ６８－ＭＡＧ及びＣｈＡｄＶ６８－Ｅ４Δ－ＭＡＧベクターで処理したＢａｌｂ／ｃ系マウスでＡＨ１（マウス白血病ウイルスエンベロープタンパク質ｇｐ７０からの主要エピトープ）による刺激後にＩＣＳによってＩＦＮ－γ産生を評価することによるＣＤ８＋免疫応答を示す。Ｂａｌｂ／ｃ系マウスを、大腿四頭筋への５０μＬのウイルスの両側注射によって免疫した（合計１００μＬ、５０μＬ／脚）。
【図４２Ｂ】ＣｈＡｄＶ６８－ＭＡＧ（左パネル）及びＣｈＡｄＶ６８－Ｅ４Δ－ＭＡＧ（右パネル）で免疫し、どちらの条件も抗ＣＴＬＡ４抗体（イピリムマブ）を投与したアカゲザルにおいて２週目に６種類の異なるアカゲザルＭａｍｕ－Ａ＊０１クラスＩエピトープで刺激した後、ＥＬＩＳｐｏｔによってＩＦＮ－γ産生を評価することによるＴ細胞応答を示す。
【図４２Ｃ】ＣｈＡｄＶ６８－ＭＡＧ（左パネル）及びＣｈＡｄＶ６８－Ｅ４Δ－ＭＡＧ（右パネル）で免疫し、どちらの条件も抗ＣＴＬＡ４抗体（イピリムマブ）を投与したアカゲザルにおいて一定期間にわたって６種類の異なるアカゲザルＭａｍｕ－Ａ＊０１クラスＩエピトープで刺激した後、ＥＬＩＳｐｏｔによってＩＦＮ－γ産生を評価することによるＴ細胞応答を示す。
【図４３】抗原コードワクチンの例を使用したテトラサイクリン制御ウイルス生産システムの一般的なストラテジーを示す。
【図４４Ａ】プロモーター及び発現させようとするカセットに関して、「ＴＥＴｏ」応答領域の配置を示す概略図を示す。
【図４４Ｂ】プロモーター及び発現させようとするカセットに関して、「ＣＭＴ」応答領域の配置を示す概略図を示す。
【図４５Ａ】ＴＥＴｏ配列を有するＣｈＡｄＶ６８ベクターから発現されたＧＦＰのＴＥＴｒ介在調節を示す。ＧＦＰは、親２９３Ｆ細胞株（左パネル）と比較してＴＥＴｒを発現する２９３Ｆ細胞（クローン１７、右パネル）で有意に減少している。細胞をＣｈＡｄＶ６８－ＴＥＴｏ－ＧＦＰにＭＯＩ＝１で感染させ、２４時間後にＧＦＰを対物レンズ１０倍の蛍光顕微鏡によって評価した。
【図４５Ｂ】ＣＭＴ配列を有するＣｈＡｄＶ６８ベクターから発現されたＳＥＡＰのＴＥＴｒ介在調節を示す。ＳＥＡＰは、親２９３Ｆ細胞株（左の柱）と比較してＴＥＴｒを発現する２９３Ｆ細胞（クローン１７、左から２番目の柱）で有意に減少している。コントロール発現カセットを発現するＣｈＡｄＶ６８ベクターを使用してバックグラウンドシグナルを確立した（右の２本の柱）。２９３Ｆ細胞に０．３のＭＯＩで感染させ、２４時間後に培地を収穫して製造者の記載に従ってＳＥＡＰアッセイを行った（分泌されたアルカリホスファターゼの検出用に化学発光基質を使用するＰｈｏｓｐｈａ－Ｌｉｇｈｔ（商標）Ｓｙｓｔｅｍ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ））。
【図４６】親２９３Ｆ株における生産に対する、２９３Ｆ ＴＥＴｒリプレッサー株（クローン１７）におけるＣｈＡｄＶ６８－ＴＥＴｏ－ＭＡＧベクターのウイルス生産を示す。実験は３重に行った（実験１～３）。各実験で、４００ｍＬの２９３Ｆ細胞をＭＯＩ＝約３で感染させ、４８～７２時間インキュベートした後、収穫した。ウイルスを２回の断続的なＣｓＣｌ超遠心分離工程により精製し、保存バッファー中に透析した。ウイルス粒子を２６０ｎｍの吸光度で測定した。ウイルス粒子（ＶＰ、上のパネル）及び感染単位（ＩＵ、下のパネル）の力価を示す。
【図４７Ａ】２９３Ｆ ＴＥＴｒ株（クローン１７）におけるＴｅｔ調節ウイルス（「ＴＥＴｏ－ＭＡＧ」）の全体の生産性を、通常の２９３Ｆ細胞株で同じカセットを用いた非調節ウイルス（「ＭＡＧ」）に対して示す。複数の４００ｍＬ生産実験後に遠心分離を行ったデータを示す。Ｔｅｔ調節ウイルスによる改善倍率をグラフの上に数字で示す。

【図４７Ｂ】ＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＶ－ＴＳＮＡに対するＣｈＡｄＶ６８－ＣＴ－ＴＳＮＡ、ＣｈＡｄＶ６８－ＴＥＴｏ－ＴＳＮＡ、ＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＴ－ＴＳＮＡ、及びＣｈＡｄＶ６８－Ｅ４ｄ－ＣＭＴ－ＴＳＮＡウイルスのウイルス生産を示す。
【図４７Ｃ】ｔＴｓ発現細胞株でＣＭＴ応答領域を有するアデノウイルスベクターを使用した、モデル抗原カセット５０ＸＸＬ及びＭ２．２のウイルス生産を示す。
【図４８】非調節ベクターに対する調節ベクターによるワクチン接種後の抗原特異的Ｔ細胞応答を示す。ＣＤ８　Ｔ細胞の抗原特異的ＩＦＮ－γ産生をＩＣＳを用いて測定し、結果を、抗原特異的ＣＤ８　Ｔ細胞として全ＣＤ８　Ｔ細胞の割合（％）として示す。各グループの中央値を横線で示す。Ｂａｌｂ／ｃ系マウスを、通常のＣＭＶプロモーター（ＣｈＡｄＶ－ＭＡＧ）またはＴＥＴｏ調節されたプロモーター（ＴＥＴ－ＣｈＡｄＶ－ＭＡＧ）の制御下でモデル抗原カセットを発現する１×１０^{10}ＶＰのＣｈＡｄＶ６８ワクチンで免疫した。ワクチン接種の１２日後に脾臓を収穫し、単一の細胞懸濁液を調製した。
【発明を実施するための形態】
【００６０】
Ｉ．定義
一般に、特許請求の範囲及び明細書において使用される用語は、当業者により理解される通常の意味を有するものとして解釈されるものとする。特定の用語を、さらなる明確性を与えるために下記に定義する。通常の意味と与えられる定義との間に矛盾が存在する場合、与えられる定義が用いられるものとする。
【００６１】
本明細書で使用するところの「抗原」という用語は、免疫反応を誘導する物質のことである。抗原は新生抗原であってよい。抗原は、特定の集団、例えば、がん患者または感染した対象の特定の集団間にみられる抗原である「共有抗原」であってよい。抗原は、感染症生物に関連したもの、またはそれに由来するものであってよい。
【００６２】
本明細書で使用するところの「新生抗原」という用語は、例えば、腫瘍細胞の変異、または腫瘍細胞に特異的な翻訳後修飾によって、抗原を対応する野生型抗原とは異なるものとする少なくとも１つの変更を有する抗原のことである。新生抗原は、ポリペプチド配列または核酸配列を含んでよい。変異は、フレームシフトもしくは非フレームシフト挿入欠失（ｉｎｄｅｌ）、ミスセンスもしくはナンセンス置換、スプライス部位改変、ゲノム再編成もしくは遺伝子融合、または、新生ＯＲＦを生じる任意のゲノム改変もしくは発現改変を含むことができる。変異はまた、スプライス変異体も含むことができる。腫瘍細胞に特異的な翻訳後修飾は、異常リン酸化を含むことができる。腫瘍細胞に特異的な翻訳後修飾はまた、プロテアソームによって生成されるスプライス抗原も含むことができる。Ｌｉｅｐｅ ｅｔ ａｌ．，Ａ ｌａｒｇｅ ｆｒａｃｔｉｏｎ ｏｆＨＬＡｃｌａｓｓ Ｉ ｌｉｇａｎｄｓａｒｅ ｐｒｏｔｅａｓｏｍｅ－ ｇｅｎｅｒａｔｅｄ ｓｐｌｉｃｅｄ ｐｅｐｔｉｄｅｓ；Ｓｃｉｅｎｃｅ．２０１６ Ｏｃｔ ２１；３５４（６３１０）：３５４－３５８を参照されたい。対象は、例えば下記にさらに述べる患者選択方法のようなさまざまな診断法によって投与を行うために特定することができる。
【００６３】
本明細書で使用するところの「腫瘍抗原」という用語は、対象の腫瘍細胞もしくは組織中に存在するが、対象の対応する正常細胞もしくは組織中には存在しない抗原、または正常細胞もしくは組織と比較して腫瘍細胞もしくはがん性組織中で発現が変更されていることが知られているかまたは見出されているポリペプチドに由来する抗原である。
【００６４】
本明細書において使用するところの「抗原ベースワクチン」という用語は、１つ以上の抗原、例えば複数の抗原に基づいたワクチン組成物のことである。ワクチンは、ヌクレオチドベース（例えば、ウイルスベース、ＲＮＡベース、またはＤＮＡベース）、タンパク質ベース（例えば、ペプチドベース）、またはこれらの組み合わせであってよい。
【００６５】

本明細書において使用される場合、「候補抗原」という用語は、抗原を表しうる配列を生じる変異、または他の異常のことである。

【００６６】

本明細書において使用される場合、「コード領域」という用語は、タンパク質をコードする遺伝子の部分のことである。

【００６７】

本明細書において使用される場合、「コード変異」という用語は、コード領域で生じる変異のことである。

【００６８】

本明細書において使用される場合、「ＯＲＦ」という用語は、オープンリーディングフレームを意味する。

【００６９】

本明細書において使用される場合、「新生ＯＲＦ」という用語は、変異またはスプライシングなどの他の異常により生じる腫瘍特異的なＯＲＦのことである。

【００７０】

本明細書において使用される場合、「ミスセンス変異」という用語は、１つのアミノ酸から別のアミノ酸への置換を引き起こす変異である。

【００７１】

本明細書において使用される場合、「ナンセンス変異」という用語は、アミノ酸から終止コドンへの置換を引き起こすか、または基準開始コドンの除去を引き起こす変異である。

【００７２】

本明細書において使用される場合、「フレームシフト変異」という用語は、タンパク質のフレームに変化を引き起こす変異である。

【００７３】

本明細書において使用される場合、「挿入欠失」という用語は、１つ以上の核酸の挿入または欠失である。

【００７４】

本明細書において使用される場合、２つ以上の核酸またはポリペプチドの配列との関連での「同一率」（％）という用語は、下記の配列比較アルゴリズム（例えば、ＢＬＡＳＴＰ及びＢＬＡＳＴＮ、または当業者が利用可能な他のアルゴリズム）のうちの１つを用いて、または目視検査により測定される、最大の一致について比較し、整列させた場合に、ヌクレオチドまたはアミノ酸残基の特定の比率（％）が同じである２つ以上の配列または部分配列のことを指す。用途に応じて、「同一率」（％）は、比較される配列の領域にわたって、例えば、機能ドメインにわたって存在するか、あるいは、比較される２つの配列の完全長にわたって存在することができる。

【００７５】

配列比較では、一般的に、１つの配列が、試験配列が比較される参照配列として機能する。配列比較アルゴリズムを用いる場合、試験配列及び参照配列をコンピュータに入力し、必要な場合には部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムのパラメータを指定する。次いで、配列比較アルゴリズムが、指定されたプログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列の配列同一率（％）を算出する。あるいは、配列の類似性または相違性は、選択された配列位置（例えば、配列モチーフ）における特定のヌクレオチドの、または翻訳後の配列ではアミノ酸の有無の組み合わせによって確立することもできる。

【００７６】

比較を行うための配列の最適なアラインメントは、例えば、Ｓｍｉｔｈ　＆　Ｗａｔｅｒｍａｎ，Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．２：４８２（１９８１）の局所相同性アルゴリズムによって、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ　＆　Ｗｕｎｓｃｈ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３（１９７０）の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Ｐｅａｒｓｏｎ　＆　Ｌｉｐｍａｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８５：２４４４（１９８８

）の類似性の探索法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ処理による実行（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓ．におけるＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡ、及びＴＦＡＳＴＡ）によって、または目視検査によって実施することができる（一般的には、下記のＡｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．を参照）。

【００７７】

配列同一率（％）及び配列類似率（％）を決定するのに適したアルゴリズムの１つの例として、Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０（１９９０）に記載されるＢＬＡＳＴアルゴリズムがある。ＢＬＡＳＴ解析を行うためのソフトウェアは、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎを通して公に入手可能である。

【００７８】

本明細書において使用される場合、「ノンストップまたはリードスルー」という用語は、天然の終止コドンの除去を引き起こす変異のことである。

【００７９】

本明細書において使用される場合、「エピトープ」という用語は、抗体またはＴ細胞受容体が一般的に結合する、抗原の特異的な部分のことである。

【００８０】

本明細書において使用される場合、「免疫原性」という用語は、例えば、Ｔ細胞、Ｂ細胞、またはその両方を介して免疫応答を誘発する能力のことである。

【００８１】

本明細書において使用される場合、「ＨＬＡ結合親和性」、「ＭＨＣ結合親和性」という用語は、特異的な抗原と特異的なＭＨＣアレルとの結合の親和性を意味する。

【００８２】

本明細書において使用される場合、「ベイト」という用語は、ＤＮＡまたはＲＮＡの特異的な配列を試料から濃縮するために使用される核酸プローブのことである。

【００８３】

本明細書において使用される場合、「変異」という用語は、対象の核酸と、対照として使用される参照ヒトゲノムとの差である。

【００８４】

本明細書において使用される場合、「変異コール」という用語は、典型的にはシークエンシングからの、変異の存在のアルゴリズム的決定である。

【００８５】

本明細書において使用される場合、「多型」という用語は、生殖細胞系列変異、すなわち、個体のすべてのＤＮＡ保有細胞において見出される変異である。

【００８６】

本明細書において使用される場合、「体細胞変異」という用語は、個体の非生殖系列細胞において生じる変異である。

【００８７】

本明細書において使用される場合、「アレル」という用語は、遺伝子の１つのバージョンまたは遺伝子配列の１つのバージョンまたはタンパク質の１つのバージョンのことである。

【００８８】

本明細書において使用される場合、「ＨＬＡ型」という用語は、ＨＬＡ遺伝子アレルの相補体のことである。

【００８９】

本明細書において使用される場合、「ナンセンス変異依存分解機構」または「ＮＭＤ」という用語は、未成熟な終止コドンに起因する細胞によるｍＲＮＡの分解のことである。

【００９０】

本明細書において使用される場合、「トランカル変異（ｔｒｕｎｃａｌ　ｍｕｔａｔｉｏｎ）」という用語は、腫瘍の発生の初期に生じ、腫瘍の細胞の大部分に存在する変異である。

【００９１】

本明細書において使用される場合、「サブクローナル変異」という用語は、腫瘍の発生において後期に生じ、腫瘍の細胞の一部のみに存在する変異である。

【００９２】

本明細書において使用される場合、「エクソーム」という用語は、タンパク質をコードするゲノムのサブセットである。エクソームは、ゲノムの集合的なエクソンでありうる。

【００９３】

本明細書において使用される場合、「ロジスティック回帰」という用語は、従属変数が１に等しい確率のロジットが従属変数の線形関数としてモデル化される、統計からのバイナリデータ用の回帰モデルである。

【００９４】

本明細書において使用される場合、「ニューラルネットワーク」という用語は、多層の線形変換に続いて一般的に確率的勾配降下法及び逆伝搬により訓練された要素ごとの非線形変換を行うことからなる分類または回帰のための機械学習モデルである。

【００９５】

本明細書において使用される場合、「プロテオーム」という用語は、細胞、細胞の群、または個体によって発現される、及び／または翻訳されるすべてのタンパク質のセットのことである。

【００９６】

本明細書において使用される場合、「ペプチドーム」という用語は、細胞表面上のＭＨＣ－ＩまたはＭＨＣ－ＩＩによって提示されるすべてのペプチドのセットのことである。ペプチドームは、細胞または細胞の集合の性質を指す場合もある（例えば、腫瘍ペプチドームは、腫瘍を含むすべての細胞のペプチドームの和集合を意味する）。

【００９７】

本明細書において使用される場合、「ＥＬＩＳＰＯＴ」という用語は、ヒト及び動物において免疫応答を観察するための一般的な方法である、酵素結合免疫吸着スポットアッセイを意味する。

【００９８】

本明細書において使用される場合、「デキサトラマー」という用語は、フローサイトメトリーにおいて抗原特異的Ｔ細胞染色に使用される、デキストランベースのペプチド－ＭＨＣマルチマーである。

【００９９】

本明細書において使用される場合、「寛容または免疫寛容」という用語は、１つ以上の抗原、例えば、自己抗原に対する免疫不応答の状態のことである。

【０１００】

本明細書において使用される場合、「中枢性寛容」という用語は、自己反応性Ｔ細胞クローンを欠失させること、または自己反応性Ｔ細胞クローンの免疫抑制性制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）への分化を促進することのいずれかにより、胸腺において与えられる寛容である。

【０１０１】

本明細書において使用される場合、「末梢性寛容」という用語は、中枢性寛容を生き延びた自己反応性Ｔ細胞を下方制御もしくはアネルギー化すること、またはこれらのＴ細胞のＴｒｅｇへの分化を促進することにより、末梢系において与えられる寛容である。

【０１０２】

「試料」という用語は、静脈穿刺、排泄、射精、マッサージ、生検、針吸引、洗浄試料、擦過、外科的切開、もしくは介入、または当技術分野において公知の他の手段を含む手段によって対象から採取された、単一細胞、または複数の細胞、または細胞の断片、また

は体液のアリコートを含むことができる。
【０１０３】
「対象」という用語は、インビボ、エクスビボ、またはインビトロ、雄または雌のいずれかの、細胞、組織、または生物体、ヒトまたは非ヒトを包含する。対象という用語は、ヒトを含む哺乳動物を含める。
【０１０４】
「哺乳動物」という用語は、ヒト及び非ヒトの両方を包含し、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、マウス、ウシ、ウマ、及びブタを含むが、それらに限定されない。
【０１０５】
「臨床的因子」という用語は、対象の状態、例えば、疾患の活性または重症度の測定を指す。「臨床的因子」は、非試料マーカーを含む、対象の健康状態のすべてのマーカー、ならびに／または、非限定的に年齢及び性別などの、対象の他の特徴を包含する。臨床的因子は、対象または所定の条件下の対象由来の試料（または試料の集団）の評定から取得され得るスコア、値、または値のセットであることができる。臨床的因子はまた、マーカー、及び／または遺伝子発現代替物などの他のパラメータによっても予測することができる。臨床的因子は、腫瘍タイプ、腫瘍サブタイプ、及び喫煙歴を含むことができる。
【０１０６】
「由来する」という用語は、対象の組織または試料（例えば、腫瘍、細胞、感染細胞、または感染症生物）から例えばＲＴ－ＰＣＲにより直接抽出された配列、または対象の組織または試料をシークエンシングした後、シークエンシングデータを用いて、例えば当該技術分野では周知の各種の合成またはＰＣＲベースの方法によって核酸配列を合成することにより得られる配列データを指す。「由来する」は、例えば対応する天然の感染症生物の核酸配列などの対応する天然核酸配列と同じポリペプチド配列をコードする、コドン最適化された核酸配列変異体などの核酸配列変異体を含む場合もある。「由来する」には、天然の感染症生物のポリペプチド配列などの天然ポリペプチド配列に対して１つ以上の（例えば、１、２、３、４、または５個の）変異を有する、感染症生物のポリペプチド配列などの改変ポリペプチド配列をコードする変異体も含まれる場合がある。例えば、改変ポリペプチド配列は、天然ポリペプチド配列に対して１つ以上のミスセンス変異（例えば、遺伝子操作により導入された変異）を有することができる。
【０１０７】
「アルファウイルス」という用語は、トガウイルス科のメンバーのことを指し、一本鎖プラス鎖ＲＮＡウイルスである。アルファウイルスは、一般的に、シンドビス、ロスリバー、マヤロ、チクングニア、及びセムリキ森林ウイルスなどの旧世界型、または、東部ウマ脳炎ウイルス、アウラ、フォートモルガン、もしくはベネズエラウマ脳炎ウイルス及びその誘導株ＴＣ－８３などの新世界型に分類される。アルファウイルスは一般的には自己複製ＲＮＡウイルスである。
【０１０８】
「アルファウイルス骨格」という用語は、ウイルスゲノムの自己複製を可能とするアルファウイルスの最小配列（複数可）のことを指す。最小配列としては、非構造タンパク質媒介増幅用の保存配列、非構造タンパク質１（ｎｓＰ１）遺伝子、ｎｓＰ２遺伝子、ｎｓＰ３遺伝子、ｎｓＰ４遺伝子、及びポリＡ配列、ならびに、２６Ｓプロモーター因子をはじめとするサブゲノミックウイルスＲＮＡの発現用の配列を挙げることができる。
【０１０９】
「非構造タンパク質媒介増幅用の保存配列」という用語には、当該技術分野では周知のアルファウイルス保存配列因子（ＣＳＥ）が含まれる。ＣＳＥとしては、これらに限定されるものではないが、アルファウイルス５’ＵＴＲ、５１－ｎｔ　ＣＳＥ、２４－ｎｔ　ＣＳＥ、または他の２６Ｓサブゲノミックプロモーター配列、１９－ｎｔ　ＣＳＥ、及びアルファウイルス３’ＵＴＲが挙げられる。
【０１１０】
「ＲＮＡポリメラーゼ」という用語には、ＤＮＡ鋳型からのＲＮＡポリヌクレオチドの

生成を触媒するポリメラーゼが含まれる。ＲＮＡポリメラーゼとしては、これらに限定されるものではないが、Ｔ３、Ｔ７、及びＳＰ６を含むバクテリオファージ由来ポリメラーゼが挙げられる。

【０１１１】

「脂質」という用語には、疎水性及び／または両親媒性分子が含まれる。脂質は、カチオン性、アニオン性、または中性であってよい。脂質は、合成または天然由来のものであってよく、特定の例では生分解性であってよい。脂質は、コレステロール、リン脂質、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）複合体（ＰＥＧ化脂質）を含む（ただしこれに限定されない）脂質複合体、ワックス、油類、グリセリド、脂肪、及び脂溶性ビタミンを含みうる。脂質には、ジリノレイルメチル－４－ジメチルアミノブチレート（ＭＣ３）及びＭＣ３様分子も含まれうる。

【０１１２】

「脂質ナノ粒子」または「ＬＮＰ」という用語には、リポソームとも呼ばれる、水性の内部を包囲する脂質含有膜を用いて形成された小胞様構造が含まれる。脂質ナノ粒子は、界面活性剤により安定化された固体脂質コアを有する脂質ベースの組成物を含む。コア脂質は、脂肪酸、アシルグリセロール、ワックス、及びこれらの界面活性剤の混合物であってよい。リン脂質、スフィンゴミエリン、胆汁酸（タウロコール酸）、及びステロール類（コレステロール）のような生体膜脂質を安定化剤として用いることができる。脂質ナノ粒子は、１種類以上のカチオン性、アニオン性、または中性脂質の規定の比率を含む（ただし、これに限定されない）、規定の比率の異なる脂質分子を用いて形成することができる。脂質ナノ粒子は、外膜シェル内に分子を封入することができ、その後、標的細胞と接触させて封入分子を宿主細胞のサイトゾルに送達することができる。脂質ナノ粒子は、それらの表面などを非脂質分子で修飾または官能化することができる。脂質ナノ粒子は、単一層（単層）または多層（複層）とすることができる。脂質ナノ粒子は、核酸と複合体化することができる。単層脂質ナノ粒子を核酸と複合体化することができ、その場合、核酸は水性の内部となる。複層脂質ナノ粒子を核酸と複合体化することができ、その場合、核酸は水性の内部となるか、またはその間を形成するかまたはその間に挟まれる。

【０１１３】

略語：ＭＨＣ：主要組織適合性複合体；ＨＬＡ：ヒト白血球抗原、またはヒトＭＨＣ遺伝子座；ＮＧＳ：次世代シークエンシング；ＰＰＶ：陽性適中率；ＴＳＮＡ：腫瘍特異的新生抗原；ＦＦＰＥ：ホルマリン固定パラフィン包埋；ＮＭＤ：ナンセンス変異依存分解機構；ＮＳＣＬＣ：非小細胞肺癌；ＤＣ：樹状細胞。

【０１１４】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、文脈によってそうでない旨が明示されない限り、複数の指示物を含む点に留意されたい。

【０１１５】

特に断らない限り、または文脈から明らかでない限り、本明細書において使用される「約」という用語は、例えば、平均から標準偏差２つ分以内など、当該技術分野における公称公差の範囲内にあるものとして理解される。「約」は、記載される値の１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．１％、０．０５％、または０．０１％以内として理解することができる。文脈から明らかでない限り、本明細書に示される全ての数値は「約」という語によって修飾されている。

【０１１６】

本明細書において直接定義されていない用語は、本発明の技術分野の範囲内で理解されるような、一般的にそれらに付随する意味を有するものとして理解されるべきである。本発明の態様の組成物、装置、方法など、ならびにそれらの製造または使用法を説明するうえで実施者にさらなる手引きを与える目的で特定の用語が本明細書で検討される。同じものについて複数の言い方がなされうる点は認識されるであろう。したがって、代替的な語及び同義語が、本明細書で検討される用語の任意の１つ以上について用いられる場合があ

る。本明細書においてある用語が詳述または検討されているか否かに重きが置かれるべきではない。いくつかの同義語または代用可能な方法、材料などが提供される。１つまたは数個の同義語または均等物の記載は、明確に述べられない限り、他の同義語または均等物の使用を除外しない。用語の例を含む例の使用は、あくまで説明を目的としたものにすぎず、本明細書における発明の態様の範囲及び意味を限定しない。

【０１１７】

本明細書の本文において引用されるすべての参照文献、発行特許、及び特許出願は、あらゆる目的でそれらの全容を参照により本明細書に援用するものである。

【０１１８】

ＩＩ．抗原を特定する方法

抗原（例えば、腫瘍または感染症生物に由来する抗原）を特定するための方法は、細胞表面上に提示される（例えば、腫瘍細胞、感染細胞、または、樹状細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞を含む免疫細胞上のＭＨＣにより提示される）可能性が高い、及び／または免疫原性を有する可能性が高い抗原を特定することを含む。例として、かかる方法の１つは、腫瘍、感染細胞、または感染症生物からエクソーム、トランスクリプトーム、または全ゲノムのヌクレオチドシークエンシング及び／または発現データのうちの少なくとも１つを取得する工程であって、前記ヌクレオチドシークエンシング及び／または発現データを用いて抗原（例えば、腫瘍または感染症生物に由来する抗原）のセットのそれぞれのペプチド配列を表すデータが得られる、前記工程と、各抗原のペプチド配列を１つ以上の提示モデルに入力して抗原のそれぞれが、対象の腫瘍細胞または感染細胞などの細胞表面の１つ以上のＭＨＣアレルによって提示される数値的尤度のセットを生成する工程であって、前記数値的尤度のセットが、受け取られた質量分析データに少なくとも基づいて特定されたものである、前記工程と、前記数値的尤度のセットに基づいて抗原のセットのサブセットを選択して、選択された抗原のセットを生成する工程と、を含む。

【０１１９】

腫瘍ワクチンに関し、また、感染症ワクチンに適用することができる１つの例において、提示モデルは、対応するラベルのセットを含む参照データのセット（訓練データセットとも呼ばれる）で訓練された、統計学的回帰または機械学習（例えば、ディープラーニング）モデルを含むことができ、前記参照データのセットは、場合により一部の対象が腫瘍を有しうる複数の別個の対象の各々から取得され、また、前記参照データのセットは、腫瘍組織由来のエクソーム核酸配列を表すデータ、正常組織由来のエクソーム核酸配列を表すデータ、腫瘍組織由来のトランスクリプトーム核酸配列を表すデータ、腫瘍組織由来のプロテオーム配列を表すデータ、及び腫瘍組織由来のＭＨＣペプチドーム配列を表すデータ、及び正常組織由来のＭＨＣペプチドーム配列を表すデータのうちの少なくとも１つを含む。参照データは、合成タンパク質、正常及び腫瘍ヒト細胞株、ならびに新鮮な及び凍結された初代試料に対してその後曝露される所定のＭＨＣアレルを発現するように操作された単一アレル細胞株の質量分析データ、シークエンシングデータ、ＲＮＡシークエンシングデータ、発現プロファイリングデータ、及びプロテオミクスデータ、ならびにＴ細胞アッセイ（例えば、ＥＬＩＳＰＯＴ）をさらに含むことができる。特定の態様では、参照データのセットは、参照データの各形態を含む。

【０１２０】

提示モデルは、参照データのセットに少なくとも一部由来する特性のセットを含むことができ、前記特性のセットは、アレル依存的特性及びアレル非依存的特性のうちの少なくとも１つを含む。特定の態様では、各特性が含まれる。

【０１２１】

抗原を特定するための方法はまた、腫瘍細胞または感染細胞などの対象の細胞の表面上に提示される可能性が高い１つ以上の抗原を特定することにより、個別化ワクチンを構築するための出力を生成することを含む。腫瘍ワクチンに関し、また、感染症ワクチンに適用することができる１つの例として、かかる方法の１つは、対象の腫瘍細胞及び正常細胞からエクソーム、トランスクリプトーム、または全ゲノムヌクレオチドシークエンシング

及び／または発現データのうちの少なくとも１つを取得する工程であって、前記ヌクレオチドシークエンシング及び／または発現データが、腫瘍細胞からのヌクレオチドシークエンシング及び／または発現データと正常細胞からのヌクレオチドシークエンシング及び／または発現データとを比較することにより特定された抗原のセットのそれぞれのペプチド配列（例えば、新生抗原の場合では、各新生抗原のペプチド配列はペプチド配列を対応する野生型の親ペプチド配列とは異なるものにする少なくとも１つの変更を含み、または変異のない抗原の場合では、ペプチドは正常細胞または組織と比較して腫瘍細胞またはがん性組織中で発現が変更されていることが知られているかまたは見出されている任意のポリペプチドに由来する）、対象の正常細胞から特定されたペプチド配列を表すデータを取得するために用いられる、前記工程と、前記抗原のそれぞれのペプチド配列を対応する数値ベクトルにコード化する工程であって、各数値ベクトルはペプチド配列を構成する複数のアミノ酸及びペプチド配列内のアミノ酸の位置のセットに関する情報を含む、前記工程と、コンピュータプロセッサを使用して前記数値ベクトルを深層学習提示モデルに入力して前記抗原のセットについて提示尤度のセットを生成する工程であって、前記セット内の各提示尤度が対応する抗原が１つ以上のクラスＩＩ　ＭＨＣアレルによって対象の腫瘍細胞の表面上に提示される尤度を表す、前記工程と、前記提示尤度のセットに基づいて前記抗原のセットのサブセットを選択して、選択された抗原のセットを生成する工程と、前記選択された抗原のセットに基づいて個別化がんワクチンを構築するための出力を生成する工程と、を含む

【０１２２】

新生抗原を含む抗原を同定するための具体的な方法は当業者には周知のものであり、こうした方法は、例えば、あらゆる目的で本明細書に参照によりその全容をそれぞれ援用する国際特許出願公開第ＷＯ／２０１７／１０６６３８号、同第ＷＯ／２０１８／１９５３５７号、及び同第ＷＯ／２０１８／２０８８５６号により詳細に記載されている。

【０１２３】

本明細書では、本明細書に記載される抗原の特定方法のいずれかの工程を行うことを含み、選択された抗原のセットを含む腫瘍ワクチンを得る工程と、腫瘍ワクチンを対象に投与する工程と、をさらに含む、腫瘍を有する対象を治療する方法が開示される。

【０１２４】

本明細書に開示される方法はまた、サブセットの中の抗原のうちの少なくとも１つに対して抗原特異的な１つ以上のＴ細胞を同定することをさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、同定は、１つ以上の抗原特異的Ｔ細胞を増殖させる条件下で１つ以上のＴ細胞をサブセットの中の抗原のうちの１つ以上と共培養することを含む。さらなる実施形態では、同定は、１つ以上のＴ細胞を、サブセットの中の抗原のうちの１つ以上を含むテトラマーと、Ｔ細胞とテトラマーとの結合が可能な条件下で接触させることを含む。いっそうさらなる実施形態では、本明細書に開示される方法はまた、前記１つ以上の同定されたＴ細胞の１つ以上のＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を同定することをさらに含むことができる。特定の実施形態では、１つ以上のＴ細胞受容体を同定することは、前記１つ以上の同定されたＴ細胞のＴ細胞受容体配列をシークエンシングすることを含む。本明細書に開示される方法は、前記１つ以上の同定されたＴ細胞受容体のうちの少なくとも１つを発現するように複数のＴ細胞を遺伝子操作することと、前記複数のＴ細胞を増殖させる条件下で前記複数のＴ細胞を培養することと、増殖させたＴ細胞を対象に注入することと、をさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、１つ以上の同定されたＴ細胞受容体の少なくとも１つを発現するように複数のＴ細胞を遺伝子操作することは、前記１つ以上の同定されたＴ細胞の前記Ｔ細胞受容体配列を発現ベクターにクローニングすることと、前記複数のＴ細胞のそれぞれに発現ベクターをトランスフェクトすることと、を含む。特定の実施形態では、本明細書に開示される方法は、さらに、前記１つ以上のＴ細胞を増殖させる条件下で前記１つ以上の同定されたＴ細胞を培養することと、増殖させたＴ細胞を対象に注入することと、をさらに含む。

【０１２５】

本明細書ではまた、前記サブセットの中の少なくとも１つの選択された抗原に対して抗原特異的である単離Ｔ細胞も開示される。

【０１２６】

本明細書ではまた、腫瘍ワクチンを製造するための方法であって、対象の腫瘍細胞から、エクソーム、トランスクリプトーム、または全ゲノムの腫瘍ヌクレオチドシークエンシング及び／または発現データのうちの少なくとも１つを取得する工程であって、前記腫瘍ヌクレオチドシークエンシング及び／または発現データが、抗原のセット（例えば、新生抗原の場合では各新生抗原のペプチド配列がペプチド配列を対応する野生型の親ペプチド配列とは異なるものにする少なくとも１つの変更を含み、または変異のない共有抗原の場合では、ペプチドは正常細胞または組織と比較して腫瘍細胞またはがん性組織中で発現が変更されていることが知られているかまたは見出されている任意のポリペプチドに由来する）のそれぞれのペプチド配列を表すデータを取得するために用いられる、前記工程と、各抗原のペプチド配列を１つ以上の提示モデルに入力して、前記抗原のそれぞれが前記対象の前記腫瘍細胞の前記腫瘍細胞表面上の１つ以上のＭＨＣアレルによって提示される数値的尤度のセットを生成する工程であって、前記数値的尤度のセットが、受け取られた質量分析データに少なくとも基づいて特定されたものである、前記工程と、前記抗原のセットのサブセットを、前記数値的尤度のセットに基づいて選択して、選択された抗原のセットを生成する工程と、前記選択された抗原のセットを含む腫瘍ワクチンを生産するか、またはこれまでに生産している工程と、を含む方法も開示される。

【０１２７】

本明細書ではまた、対象の腫瘍細胞からエクソーム、トランスクリプトーム、または全ゲノム腫瘍ヌクレオチドシークエンシング及び／または発現データのうちの少なくとも１つを取得する工程であって、腫瘍ヌクレオチドシークエンシング及び／または発現データが、抗原のセットのそれぞれのペプチド配列を表すデータを取得するために用いられ、各抗原のペプチド配列（例えば、新生抗原の場合では、各新生抗原のペプチド配列がペプチド配列を対応する野生型の親ペプチド配列とは異なるものにする少なくとも１つの変更を含み、または変異のない共有抗原の場合では、ペプチドは正常細胞または組織と比較して腫瘍細胞またはがん性組織中で発現が変更されていることが知られているかまたは見出されている任意のポリペプチドに由来する）、工程と、各抗原のペプチド配列を１つ以上の提示モデルに入力して、前記抗原のそれぞれが前記対象の前記腫瘍細胞の前記腫瘍細胞表面上の１つ以上のＭＨＣアレルによって提示される数値的尤度のセットを生成する工程であって、前記数値的尤度のセットが、受け取られた質量分析データに少なくとも基づいて特定されたものである、前記工程と、前記抗原のセットのサブセットを、前記数値的尤度のセットに基づいて選択して、選択された抗原のセットを生成する工程と、前記選択された抗原のセットを含む腫瘍ワクチンを生産するか、またはこれまでに生産している工程と、を含む方法を実行することによって選択される、選択された抗原のセットを含む腫瘍ワクチンも開示される。

【０１２８】

腫瘍ワクチンは、核酸配列、ポリペプチド配列、ＲＮＡ、ＤＮＡ、細胞、プラスミド、またはベクターのうちの１つ以上を含んでもよい。

【０１２９】

腫瘍ワクチンは、腫瘍細胞表面上に提示された１つ以上の抗原を含んでもよい。

【０１３０】

腫瘍ワクチンは、対象において免疫原性を示す１つ以上の抗原を含んでもよい。

【０１３１】

腫瘍ワクチンは、対象において正常組織に対する自己免疫応答を誘導する、１つ以上の抗原を含まなくともよい。

【０１３２】

腫瘍ワクチンは、アジュバントを含んでもよい。

【０１３３】

腫瘍ワクチンは、賦形剤を含んでもよい。

【０１３４】

本明細書に開示される方法はまた、提示モデルに基づいて選択されない抗原に対して、腫瘍細胞表面上に提示される尤度が増大している抗原を選択することを含んでもよい。

【０１３５】

本明細書に開示される方法はまた、提示モデルに基づいて選択されない抗原に対して、対象に腫瘍特異的な免疫応答を誘導することができる尤度が増大している抗原を選択することを含んでもよい。

【０１３６】

本明細書に開示される方法はまた、提示モデルに基づいて選択されない抗原に対して、プロフェッショナル抗原提示細胞（ＡＰＣ）によってナイーブＴ細胞に対して提示されることができる尤度が増大している抗原を選択することを含んでもよく、場合により、ＡＰＣは樹状細胞（ＤＣ）である。

【０１３７】

本明細書に開示される方法はまた、提示モデルに基づいて選択されない抗原に対して、中枢性寛容または末梢性寛容による阻害に供される尤度が減少している抗原を選択することを含んでもよい。

【０１３８】

本明細書に開示される方法はまた、提示モデルに基づいて選択されない抗原に対して、対象における正常組織に対する自己免疫応答を誘導することができる尤度が減少している抗原を選択することを含んでもよい。

【０１３９】

エクソームまたはトランスクリプトームのヌクレオチドシークエンシング及び／または発現データは、腫瘍組織でシークエンシングを行うことによって取得することができる。

【０１４０】

シークエンシングは、次世代シークエンシング（ＮＧＳ）または任意の大規模並列処理シークエンシングアプローチであってもよい。

【０１４１】

数値的尤度のセットは、以下のうちの少なくとも１つを含む少なくともＭＨＣアレル相互作用特性によってさらに特定することができる。すなわち、ＭＨＣアレルと抗原コード化ペプチドとが結合する予測親和性；抗原コード化ペプチド－ＭＨＣ複合体の予測安定性；抗原コード化ペプチドの配列及び長さ；質量分析プロテオミクスまたは他の手段によって評価される、特定のＭＨＣアレルを発現する他の個体由来の細胞の類似した配列を有する抗原コード化ペプチドの提示の確率；対象とされる対象の特定のＭＨＣアレルの発現レベル（例えば、ＲＮＡ－ｓｅｑまたは質量分析によって測定される）；特定のＭＨＣアレルを発現する他の別個の個体における、特定のＭＨＣアレルによる提示の、全体的な新生抗原コード化ペプチド配列とは独立した確率；他の別個の対象における、同じ分子のファミリー（例えば、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－ＤＱ、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＰ）のＭＨＣアレルによる提示の、全体的な新生抗原コード化ペプチド配列とは独立した確率。

【０１４２】

数値的尤度のセットは、以下のうちの少なくとも１つを含む少なくともＭＨＣアレル非相互作用特性によってさらに特定される。すなわち、その由来源タンパク質配列内の、新生抗原コード化ペプチドに隣接するＣ末端及びＮ末端配列；場合により、腫瘍細胞内の対応するプロテアーゼの発現（ＲＮＡ－ｓｅｑまたは質量分析によって測定される）にしたがって重み付けされる、新生抗原コード化ペプチド内のプロテアーゼ切断モチーフの存在；適切な細胞タイプにおいて測定される由来源タンパク質の代謝回転速度；ＲＮＡ－ｓｅｑもしくはプロテオーム質量分析によって測定される、または、ＤＮＡもしくはＲＮＡ配列データにおいて検出される生殖細胞系列もしくは体細胞系列スプライシング変異のアノテーションから予測される、腫瘍細胞に最も高発現している特定のスプライス変異体（「

アイソフォーム」）を場合により考慮した、由来源タンパク質の長さ；腫瘍細胞におけるプロテアソーム、イムノプロテアソーム、胸腺プロテアソーム、または他のプロテアーゼの発現のレベル（ＲＮＡ－ｓｅｑ、プロテオーム質量分析、または免疫組織化学によって測定することができる）；新生抗原コード化ペプチドの由来源遺伝子の発現（例えば、ＲＮＡ－ｓｅｑまたは質量分析によって測定される）；細胞周期の異なる段階における新生抗原コード化ペプチドの由来源遺伝子の典型的な組織特異的発現；例えば、ｕｎｉＰｒｏｔまたはＰＤＢ　ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｒｃｓｂ．ｏｒｇ／ｐｄｂ／ｈｏｍｅ／ｈｏｍｅ．ｄｏにみることができるような、由来源タンパク質及び／またはそのドメインの特性の包括的なカタログ；ペプチドを含む由来源タンパク質のドメインの性質を説明する特性、例えば、二次構造または三次構造（例えば、βシートに対するαヘリックス）；選択的スプライシング；他の別個の対象における、対象とされる新生抗原コード化ペプチドの由来源タンパク質に由来するペプチドの提示の確率；ペプチドが、技術的バイアスのために質量分析によって検出されないか、または過剰に表現される確率；腫瘍細胞、間質、または腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の状態について情報を与える、ＲＮＡＳｅｑによって測定される、種々の遺伝子モジュール／経路の発現（ペプチドの由来源タンパク質を含む必要はない）；腫瘍細胞内の新生抗原コード化ペプチドの由来源遺伝子のコピー数；ペプチドがＴＡＰに結合する確率、またはＴＡＰに対するペプチドの測定または予測される結合親和性；腫瘍細胞におけるＴＡＰの発現レベル（ＲＮＡ－ｓｅｑ、プロテオーム質量分析、免疫組織化学によって測定することができる）；以下を含むがただしこれらに限定されない、腫瘍変異の有無：ＥＧＦＲ、ＫＲＡＳ、ＡＬＫ、ＲＥＴ、ＲＯＳ１、ＴＰ５３、ＣＤＫＮ２Ａ、ＣＤＫＮ２Ｂ、ＮＴＲＫ１、ＮＴＲＫ２、ＮＴＲＫ３などの公知のがんドライバー遺伝子におけるドライバー変異、及び抗原提示マシナリーに関与するタンパク質をコードする遺伝子（例えば、Ｂ２Ｍ、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＴＡＰ－１、ＴＡＰ－２、ＴＡＰＢＰ、ＣＡＬＲ、ＣＮＸ、ＥＲＰ５７、ＨＬＡ－ＤＭ、ＨＬＡ－ＤＭＡ、ＨＬＡ－ＤＭＢ、ＨＬＡ－ＤＯ、ＨＬＡ－ＤＯＡ、ＨＬＡ－ＤＯＢ、ＨＬＡ－ＤＰ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、ＨＬＡ－ＤＰＢ１、ＨＬＡ－ＤＱ、ＨＬＡ－ＤＱＡ１、ＨＬＡ－ＤＱＡ２、ＨＬＡ－ＤＱＢ１、ＨＬＡ－ＤＱＢ２、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＲＢ１、ＨＬＡ－ＤＲＢ３、ＨＬＡ－ＤＲＢ４、ＨＬＡ－ＤＲＢ５、または、プロテアソームもしくはイムノプロテアソームの構成要素をコードする遺伝子のいずれか）における変異。その提示が、腫瘍において機能喪失変異を生ずる抗原提示マシナリーの構成要素に依存するペプチドは、提示の確率が低い；以下を含むがただしこれらに限定されない、機能的生殖細胞系列多型の有無：抗原提示マシナリーに関与するタンパク質をコードする遺伝子（例えば、Ｂ２Ｍ、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＴＡＰ－１、ＴＡＰ－２、ＴＡＰＢＰ、ＣＡＬＲ、ＣＮＸ、ＥＲＰ５７、ＨＬＡ－ＤＭ、ＨＬＡ－ＤＭＡ、ＨＬＡ－ＤＭＢ、ＨＬＡ－ＤＯ、ＨＬＡ－ＤＯＡ、ＨＬＡ－ＤＯＢ、ＨＬＡ－ＤＰ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、ＨＬＡ－ＤＰＢ１、ＨＬＡ－ＤＱ、ＨＬＡ－ＤＱＡ１、ＨＬＡ－ＤＱＡ２、ＨＬＡ－ＤＱＢ１、ＨＬＡ－ＤＱＢ２、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＲＢ１、ＨＬＡ－ＤＲＢ３、ＨＬＡ－ＤＲＢ４、ＨＬＡ－ＤＲＢ５、または、プロテアソームもしくはイムノプロテアソームの構成要素をコードする遺伝子のいずれか）における多型；腫瘍タイプ（例えば、ＮＳＣＬＣ、メラノーマ）；臨床的腫瘍サブタイプ（例えば、扁平上皮肺癌対非扁平上皮）；喫煙歴；場合によりドライバー変異によって層別化される、関連する腫瘍タイプまたは臨床的サブタイプにおけるペプチドの由来源遺伝子の典型的な発現。

【０１４３】

少なくとも１つの変異は、フレームシフトもしくは非フレームシフト挿入欠失、ミスセンスもしくはナンセンス置換、スプライス部位改変、ゲノム再編成もしくは遺伝子融合、または、新生ＯＲＦを生じる任意のゲノム改変もしくは発現改変であってよい。

【０１４４】

腫瘍細胞は、肺癌、メラノーマ、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、腎臓癌、胃癌、結腸癌、精巣癌、頭頸部癌、膵臓癌、脳癌、Ｂ細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病

、慢性リンパ球性白血病、及びＴ細胞リンパ球性白血病、非小細胞肺癌、及び小細胞肺癌からなる群から選択することができる。

【０１４５】

本明細書に開示される方法はまた、選択された新生抗原のセットまたはそのサブセットを含む腫瘍ワクチンを得ることを含んでもよく、場合により腫瘍ワクチンを対象に投与することをさらに含む。

【０１４６】

選択された新生抗原のセット内の新生抗原の少なくとも１つは、ポリペプチド形態である場合、以下のうちの少なくとも１つを含んでもよい：ＩＣ５０値が１０００ｎＭ未満のＭＨＣとの結合親和性、ＭＨＣクラスＩのポリペプチドではアミノ酸８～１５個、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５個の長さ、ＭＨＣクラスＩＩのポリペプチドではアミノ酸６～３０個、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８，１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、または３０個の長さ、プロテアソーム切断を促進する、親タンパク質配列中のポリペプチド内またはその近くの配列モチーフの存在、及び、ＴＡＰ輸送を促進する配列モチーフの存在、ＭＨＣクラスＩＩでは、細胞外もしくはリソソームプロテアーゼ（例えば、カテプシン）によるペプチド促進切断部位またはＨＬＡ－ＤＭにより触媒されるＨＬＡ結合部位内またはその近くの配列モチーフの存在。

【０１４７】

本明細書では、腫瘍細胞の腫瘍細胞表面上に提示される可能性が高い１つ以上の新生抗原を特定するための方法であって、複数の新鮮なまたは凍結得様試料に由来する主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）から溶出された複数の単離ペプチドに関連するデータを含む質量分析データを受け取る工程と、腫瘍試料中に存在し、各訓練ペプチド配列に関連する１つ以上のＭＨＣアレル上に提示される訓練ペプチド配列のセットを少なくとも特定することにより、訓練データセットを取得する工程と、前記訓練ペプチド配列に基づいて、訓練タンパク質配列のセットを取得する工程と、前記訓練タンパク質配列及び前記訓練ペプチド配列を用いて、提示モデルの数値的パラメータのセットを訓練する工程であって、前記提示モデルが、腫瘍細胞表面上の１つ以上のＭＨＣアレルによって腫瘍細胞由来のペプチド配列が提示される複数の数値的尤度を与える、工程と、を含む方法が開示される。

【０１４８】

提示モデルは、ＭＨＣアレルのうちの特定の１つとペプチド配列の特定の位置の特定のアミノ酸とのペアの存在と、前記ペアの前記ＭＨＣアレルのうちの特定の１つによる、前記特定の位置に前記特定のアミノ酸を含むそのようなペプチド配列の腫瘍細胞表面上での提示の尤度と、の間の依存性を表すことができる。

【０１４９】

本明細書に開示される方法はまた、新生抗原のサブセットを選択することを含んでもよく、新生抗原のサブセットは、それぞれが１つ以上の別個の腫瘍新生抗原に対して、腫瘍の細胞表面上に提示される尤度が増大していることから選択される。

【０１５０】

本明細書に開示される方法はまた、新生抗原のサブセットを選択することを含んでもよく、新生抗原のサブセットは、それぞれが１つ以上の別個の腫瘍新生抗原に対して、対象に腫瘍特異的な免疫応答を誘導することができる尤度が増大していることから選択される。

【０１５１】

本明細書に開示される方法はまた、新生抗原のサブセットを選択することを含んでもよく、新生抗原のサブセットは、それぞれが１つ以上の別個の腫瘍新生抗原に対して、プロフェッショナル抗原提示細胞（ＡＰＣ）によってナイーブＴ細胞に対して提示されることができる尤度が増大していることから選択され、場合により、ＡＰＣは樹状細胞（ＤＣ）である。

【０１５２】

本明細書に開示される方法はまた、新生抗原のサブセットを選択することを含んでもよ

く、新生抗原のサブセットは、それぞれが１つ以上の別個の腫瘍新生抗原に対して、中枢性寛容または末梢性寛容により阻害される尤度が減少していることから選択される。

【０１５３】

本明細書に開示する方法はまた、新生抗原のサブセットを選択することを含んでもよく、新生抗原のサブセットは、それぞれが１つ以上の別個の腫瘍新生抗原に対して、対象における正常組織に対する自己免疫応答を誘導することができる尤度が減少していることから選択される。

【０１５４】

本明細書に開示する方法はまた、新生抗原のサブセットを選択することを含んでもよく、新生抗原のサブセットは、それぞれがＡＰＣに対して腫瘍細胞において差次的に翻訳後修飾される尤度が減少していることから選択され、場合により、ＡＰＣは樹状細胞（ＤＣ）である。

【０１５５】

本明細書における方法の実施においては、特に断らない限り、当該技術分野における技能の範囲内のタンパク質化学、生化学、組換えＤＮＡ技術及び薬理学の従来の方法を使用する。かかる技術は文献に充分な説明がなされている。例えば、Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ（Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，１９９３）；Ａ．Ｌ．Ｌｅｈｎｉｎｇｅｒ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（Ｗｏｒｔｈ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｉｎｃ．，ｃｕｒｒｅｎｔ ａｄｄｉｔｉｏｎ）；Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，１９８９）；Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ｓ．Ｃｏｌｏｗｉｃｋ ａｎｄ Ｎ．Ｋａｐｌａｎ ｅｄｓ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）；Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｅａｓｔｏｎ，Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ：Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，１９９０）；Ｃａｒｅｙ ａｎｄ Ｓｕｎｄｂｅｒｇ Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３ｒｄ Ｅｄ．（Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ）Ｖｏｌｓ Ａ ａｎｄ Ｂ（１９９２）を参照されたい。

【０１５６】

ＩＩＩ．新生抗原における腫瘍特異的変異の特定

また、ある特定の変異（例えば、がん細胞中に存在する変異またはアレル）の特定のための方法も、本明細書に開示する。特に、これらの変異は、がんを有する対象のがん細胞のゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、またはエクソーム中に存在し得るが、対象由来の正常組織には存在し得ない。腫瘍に特異的な、共有新生抗原を含む抗原を同定するための具体的な方法は当業者には周知のものであり、こうした方法は、例えば、あらゆる目的で本明細書に参照によりその全容をそれぞれ援用する米国特許第１０，０５５，５４０号、米国特許出願公開第ＵＳ２０２０００１０８４９Ａ１号、ならびに国際公開第ＷＯ／２０１８／１９５３５７号、及び同第ＷＯ／２０１８／２０８８５６号により詳細に記載されている。

【０１５７】

腫瘍における遺伝子変異は、それらが腫瘍において排他的にタンパク質のアミノ酸配列における変化をもたらす場合、腫瘍の免疫学的ターゲティングに有用と考えることができる。有用な変異は、以下を含む：（１）タンパク質において異なるアミノ酸をもたらす非同義変異；（２）Ｃ末端に新規の腫瘍特異的配列を有する、より長いタンパク質の翻訳をもたらす、終止コドンが修飾されているかまたは欠失しているリードスルー変異；（３）成熟ｍＲＮＡにおけるイントロンの包含、したがって固有の腫瘍特異的タンパク質配列をもたらす、スプライス部位変異；（４）２種類のタンパク質の接合部に腫瘍特異的配列を有するキメラタンパク質を生じる、染色体再編成（すなわち、遺伝子融合）；（５）新規の腫瘍特異的タンパク質配列を有する新たなオープンリーディングフレームをもたらす、フレームシフト変異または欠失。変異はまた、非フレームシフト挿入欠失、ミスセンスも

しくはナンセンス置換、スプライス部位改変、ゲノム再編成もしくは遺伝子融合、または、新生ＯＲＦを生じる任意のゲノム改変もしくは発現改変のうちの１つ以上も含むことができる。

【０１５８】

例えば、腫瘍細胞におけるスプライス部位、フレームシフト、リードスルー、または遺伝子融合の変異から生じた、変異を有するペプチドまたは変異したポリペプチドは、腫瘍対正常細胞において、ＤＮＡ、ＲＮＡ、またはタンパク質をシークエンシングすることによって特定することができる。

【０１５９】

また、変異は、以前に特定された腫瘍特異的変異を含むことができる。公知の腫瘍変異は、Ｃａｔａｌｏｇｕｅ ｏｆ Ｓｏｍａｔｉｃ Ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ（ＣＯＳＭＩＣ）データベースで見出すことができる。

【０１６０】

様々な方法を、個体のＤＮＡまたはＲＮＡにおいて特定の変異またはアレルの存在を検出するために利用可能である。この分野における進歩は、正確で、容易な、かつ安価な大規模ＳＮＰ遺伝子型判定を提供している。例えば、動的アレル特異的ハイブリダイゼーション（ＤＡＳＨ）、マイクロプレートアレイ対角線ゲル電気泳動（ＭＡＤＧＥ）、パイロシークエンシング、オリゴヌクレオチド特異的ライゲーション、ＴａｑＭａｎシステム、及びＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ ＳＮＰチップなどの種々のＤＮＡ「チップ」技術を含むいくつかの技法が、記載されている。これらの方法は、典型的にはＰＣＲによる、標的遺伝子領域の増幅を利用する。さらに他の方法は、侵襲性切断による小さなシグナル分子の生成及びその後の質量分析、または、固定化されたパッドロックプローブ及びローリングサークル増幅に基づく。特異的な変異を検出するための、当技術分野において公知の方法のいくつかを、下記に要約する。

【０１６１】

ＰＣＲベースの検出手段は、多数のマーカーの多重増幅を同時に含むことができる。例えば、サイズがオーバーラップせず、同時に解析することができるＰＣＲ産物を生成するようにＰＣＲプライマーを選択することが、当技術分野において周知である。あるいは、差次的にラベル化され、したがって、各々を差次的に検出することができるプライマーで異なるマーカーを増幅することが可能である。当然、ハイブリダイゼーションベースの検出手段により、試料における複数のＰＣＲ産物の差次的な検出が可能になる。複数のマーカーの多重解析を可能にする他の技法が、当技術分野において公知である。

【０１６２】

いくつかの方法が、ゲノムＤＮＡまたは細胞ＲＮＡにおける単一ヌクレオチド多型の解析を容易にするために開発されている。例えば、一塩基多型は、例えば、Ｍｕｎｄｙ，Ｃ．Ｒ．（米国特許第４，６５６，１２７号）において開示されているような、特化されたエキソヌクレアーゼ抵抗性ヌクレオチドを用いることによって検出することができる。この方法にしたがって、多型部位のすぐ３’のアレル配列に対して相補的なプライマーを、特定の動物またはヒトから取得された標的分子に対してハイブリダイズさせる。標的分子上の多型部位が、存在する特定のエキソヌクレアーゼ抵抗性ヌクレオチド誘導体に対して相補的であるヌクレオチドを含有する場合、その誘導体は、ハイブリダイズされたプライマーの末端上に組み込まれる。そのような組み込みのために、プライマーはエキソヌクレアーゼに対して抵抗性になり、それによりその検出が可能になる。試料のエキソヌクレアーゼ抵抗性誘導体の同一性は既知であるため、プライマーがエキソヌクレアーゼに対して抵抗性になったという知見により、標的分子の多型部位に存在するヌクレオチドが、反応において使用されたヌクレオチド誘導体のものに対して相補的であることが明らかになる。この方法は、多量の外来性配列データの決定を必要としないという利点を有する。

【０１６３】

多型部位のヌクレオチドの同一性を決定するために、溶液ベースの方法を使用することができる（Ｃｏｈｅｎ，Ｄ．ｅｔ ａｌ．（フランス国特許第２，６５０，８４０号；Ｐ

ＣＴ出願第ＷＯ９１／０２０８７号）。米国特許第４，６５６，１２７号のＭｕｎｄｙの方法におけるように、多型部位のすぐ３’のアレル配列に対して相補的であるプライマーを使用する。この方法は、多型部位のヌクレオチドに対して相補的である場合は、プライマーの末端上に組み込まれるようになる、ラベル化ジデオキシヌクレオチド誘導体を用いて、その部位のヌクレオチドの同一性を決定する。

【０１６４】

Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｂｉｔ ＡｎａｌｙｓｉｓまたはＧＢＡとして公知である代替的な方法が、Ｇｏｅｌｅｔ，Ｐ．ｅｔ ａｌ．（ＰＣＴ出願第９２／１５７１２号）により記載されている。Ｇｏｅｌｅｔ，Ｐ．ｅｔ ａｌ．の方法は、ラベル化ターミネーターと、多型部位の３’の配列に対して相補的であるプライマーとの混合物を使用する。Ｇｏｅｌｅｔ，Ｐ．ｅｔ ａｌ．の方法は、ラベル化ターミネーターと、多型部位の３’の配列に対して相補的であるプライマーとの混合物を使用する。Ｃｏｈｅｎ ｅｔ ａｌ．（フランス国特許第２，６５０，８４０号；ＰＣＴ出願第ＷＯ９１／０２０８７号）の方法とは対照的に、Ｇｏｅｌｅｔ，Ｐ．ｅｔ ａｌ．の方法は、プライマーまたは標的分子が固相に固定化される、不均一相アッセイであることができる。

【０１６５】

ＤＮＡにおいて多型部位をアッセイするための、いくつかのプライマーガイドヌクレオチド組み込み手順が、記載されている（Ｋｏｍｈｅｒ，Ｊ．Ｓ．ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．１７：７７７９－７７８４（１９８９）；Ｓｏｋｏｌｏｖ，Ｂ．Ｐ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１８：３６７１（１９９０）；Ｓｙｖａｎｅｎ，Ａ．－Ｃ．，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ８：６８４－６９２（１９９０）；Ｋｕｐｐｕｓｗａｍｙ，Ｍ．Ｎ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（Ｕ．Ｓ．Ａ．）８８：１１４３－１１４７（１９９１）；Ｐｒｅｚａｎｔ，Ｔ．Ｒ．ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｍｕｔａｔ．１：１５９－１６４（１９９２）；Ｕｇｏｚｚｏｌｉ，Ｌ．ｅｔ ａｌ．，ＧＡＴＡ ９：１０７－１１２（１９９２）；Ｎｙｒｅｎ，Ｐ．ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２０８：１７１－１７５（１９９３））。これらの方法は、それらが、多型部位で塩基間を識別するためにラベル化デオキシヌクレオチドの組み込みを利用する点で、ＧＢＡとは異なる。そのような形式において、シグナルは、組み込まれたデオキシヌクレオチドの数に比例するため、同じヌクレオチドのランにおいて起こる多型は、ランの長さに比例するシグナルを結果としてもたらすことができる（Ｓｙｖａｎｅｎ，Ａ．－Ｃ．，ｅｔ ａｌ．，Ａｍｅｒ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．５２：４６－５９（１９９３））。

【０１６６】

数多くのイニシアティブは、ＤＮＡまたはＲＮＡの何百万もの個々の分子から並行して直接、配列情報を取得する。リアルタイムの単一分子の合成によるシークエンシング技術は、シークエンシングされる鋳型に対して相補的であるＤＮＡの新生鎖の中に組み込まれる際の、蛍光ヌクレオチドの検出に依拠する。１つの方法において、長さが３０～５０塩基のオリゴヌクレオチドを、ガラスのカバーガラスに、５’端で共有結合性に固着させる。これらの固着した鎖は、２つの機能を果たす。第１に、それらは、鋳型が、表面結合オリゴヌクレオチドに対して相補的な捕捉尾部を有して構成されている場合に、標的鋳型鎖の捕捉部位として作用する。それらはまた、配列読み取りの基礎を形成する、鋳型指向性プライマー伸長のためのプライマーとしても作用する。捕捉プライマーは、複数サイクルの合成、検出、及び、色素を除去するための色素－リンカーの化学的切断を用いた、配列決定のための、固定された位置部位として機能する。各サイクルは、ポリメラーゼ／ラベル化ヌクレオチド混合物の添加、リンス、画像化、及び色素の切断からなる。代替的な方法において、ポリメラーゼは、蛍光ドナー分子で修飾されてスライドガラス上に固定化され、他方、各ヌクレオチドは、γ－ホスファートに付着したアクセプター蛍光部分で色分けされている。ヌクレオチドが、新規の鎖の中に組み込まれるようになる際に、システムが、蛍光タグ付加されたポリメラーゼと蛍光修飾されたヌクレオチドとの間の相互作用を検出する。他の合成によるシークエンシング技術もまた、存在する。

【０１６７】
任意の適している合成によるシークエンシングプラットフォームを、変異を特定するために使用することができる。上記のように、４種類の主要な合成によるシークエンシングプラットフォームを、現在利用可能である：Ｒｏｃｈｅ／４５４ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓより販売されるＧｅｎｏｍｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｒ、Ｉｌｌｕｍｉｎａ／Ｓｏｌｅｘａより販売される１Ｇ Ａｎａｌｙｚｅｒ、Ａｐｐｌｉｅｄ ＢｉｏＳｙｓｔｅｍｓより販売されるＳＯＬｉＤシステム、及びＨｅｌｉｃｏｓ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅより販売されるＨｅｌｉｓｃｏｐｅシステム。合成によるシークエンシングプラットフォームはまた、Ｐａｃｉｆｉｃ ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ及びＶｉｓｉＧｅｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによっても記載されている。いくつかの実施形態において、シークエンシングされる多数の核酸分子は、支持体（例えば、固体支持体）に結合している。核酸を支持体上に固定化するために、捕捉配列／万能プライミング部位を、鋳型の３’端及び／または５’端に付加することができる。核酸は、支持体に共有結合性に付着した相補的配列に対して捕捉配列をハイブリダイズすることによって、支持体に結合させることができる。捕捉配列（万能捕捉配列とも呼ばれる）は、万能プライマーとして二重に働き得る、支持体に付着した配列に対して相補的な核酸配列である。

【０１６８】
捕捉配列に対する代替物として、カップリングペア（例えば、抗体／抗原、受容体／リガンド、または、例えば米国特許出願第２００６／０２５２０７７号に記載されているようなアビジン－ビオチンペアなど）のメンバーを、各断片に連結させて、そのカップリングペアのそれぞれの第２のメンバーでコーティングされた表面上に捕捉させることができる。

【０１６９】
捕捉に続いて、配列を、例えば、鋳型依存性の合成によるシークエンシングを含む、例えば、実施例及び米国特許第７，２８３，３３７号に記載されているような、単一分子検出／シークエンシングによって解析することができる。合成によるシークエンシングにおいて、表面に結合した分子は、ポリメラーゼの存在下で、多数のラベル化ヌクレオチド三リン酸に曝露される。鋳型の配列は、成長する鎖の３’端の中に組み込まれるラベル化ヌクレオチドの順序によって決定される。これは、リアルタイムで行うことができ、ステップ・アンド・リピートモードで行うことができる。リアルタイム解析のために、各ヌクレオチドに対して異なる光ラベルを組み込むことができ、複数のレーザーを、組み込まれたヌクレオチドの刺激のために利用することができる。

【０１７０】
シークエンシングはまた、他の大規模並列処理シークエンシング、または次世代シークエンシング（ＮＧＳ）技法及びプラットフォームも含むことができる。大規模並列処理シークエンシング技法及びプラットフォームの追加的な例は、Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＨｉＳｅｑまたはＭｉＳｅｑ、ＴｈｅｒｍｏＰＧＭまたはＰｒｏｔｏｎ、Ｐａｃ Ｂｉｏ ＲＳ ＩＩまたはＳｅｑｕｅｌ、ＱｉａｇｅｎのＧｅｎｅ Ｒｅａｄｅｒ、及びＯｘｆｏｒｄ Ｎａｎｏｐｏｒｅ ＭｉｎＩＯＮである。追加的な類似した現在の大規模並列処理シークエンシング技術、及びこれらの技術の将来世代を、使用することができる。

【０１７１】
任意の細胞タイプまたは組織を利用して、本明細書に記載した方法における使用のための核酸試料を取得することができる。例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ試料を、腫瘍または体液、例えば、公知の技法（例えば、静脈穿刺）によって取得された血液、もしくは唾液から取得することができる。あるいは、核酸試験を、乾燥試料（例えば、髪または皮膚）に対して行うことができる。加えて、試料を、シークエンシングのために腫瘍から取得することができ、別の試料を、正常組織が腫瘍と同じ組織タイプのものである場合に、シークエンシングのために正常組織から取得することができる。試料を、シークエンシングのために腫瘍から取得することができ、別の試料を、正常試料が腫瘍とは別個の組織タイプのものである場合に、シークエンシングのために正常組織から取得することができる。

【０１７２】
腫瘍は、肺癌、黒色腫、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、腎臓癌、胃癌、結腸癌、精巣癌、頭頸部癌、膵臓癌、脳癌、Ｂ細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、及びＴ細胞リンパ球性白血病、非小細胞肺癌、及び小細胞肺癌のうちの１つ以上を含むことができる。
【０１７３】
あるいは、タンパク質質量分析を使用して、腫瘍細胞上のＭＨＣタンパク質に結合した変異したペプチドの存在を特定または実証することができる。ペプチドは、腫瘍細胞から、または腫瘍から免疫沈降させたＨＬＡ分子から酸溶出することができ、次いで、質量分析を用いて特定することができる。
【０１７４】
ＩＶ．抗原
抗原は、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを含むことができる。例えば、抗原は、ポリペプチド配列をコードするＲＮＡ配列であることができる。ワクチンにおいて有用な抗原は、したがって、核酸配列またはポリペプチド配列を含むことができる。
【０１７５】
本明細書に開示する方法によって特定された腫瘍特異的変異を含む単離されたペプチド、公知の腫瘍特異的変異を含むペプチド、及び、本明細書に開示する方法によって特定された変異ポリペプチドまたはその断片を、本明細書に開示する。新生抗原ペプチドは、新生抗原が関連するポリペプチド配列をコードする核酸配列（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）を含む場合に、それらのコード配列の文脈において記載することができる。
【０１７６】
本明細書はまた、正常細胞または組織と比較して腫瘍細胞またはがん性組織中で発現が変更されていることが知られているかまたは見出されている任意のポリペプチド、例えば、正常細胞または組織と比較して腫瘍細胞またはがん性組織中で異常に発現することが知られているかまたは見出されている任意のポリペプチドに由来するペプチドも開示する。抗原性ペプチドが由来しうる適当なポリペプチドは、例えば、ＣＯＳＭＩＣデータベースに見出すことができる。ＣＯＳＭＩＣは、ヒトのがんにおける体細胞変異に関する包括的な情報をキュレートしたものである。ペプチドは、腫瘍特異的変異を含む。
【０１７７】
本明細書に記載される改変アデノウイルスベクター及び他のコンストラクトを使用して、それらの毒素または他の副産物を含む任意の生物由来の抗原を送達して感染症またはその生物またはその副産物に関連する他の有害反応を予防及び／または治療することができる。
【０１７８】
ワクチンに組み込む（例えば、カセットにコードする）ことができる抗原には、ヒト及び非ヒト脊椎動物に感染する病原性ウイルスなどのウイルスに対してヒトまたは非ヒト動物を免疫化するうえで有用な免疫原が含まれる。抗原はさまざまなウイルス科から選択することができる。それに対する免疫応答が望ましい所望のウイルス科の例としては、一般的な風邪の症例の約５０％の原因であるライノウイルス属；ポリオウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、及びＡ型肝炎ウイルスなどのヒトエンテロウイルスを含むエンテロウイルス属；ならびに、主に非ヒト動物における手足口病の原因であるアフトウイルス属を含むピコルナウイルス科が挙げられる。ピコルナウイルス科のウイルスの中では、標的抗原として、ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３、ＶＰ４、及びＶＰＧが挙げられる。別のウイルス科としてカリシウイルス科が挙げられ、流行胃腸炎の重要な病原体であるノーウォークウイルス群を含む。ヒト及び非ヒト動物に免疫応答を誘発するために抗原を標的化するうえでの使用に望ましい更に別のウイルス科としてトガウイルス科があり、アルファウイルス属を含み、アルファウイルス属には、シンドビスウイルス、ロスリバーウイルス、ならびにベネズエラウマ脳炎、東部ウマ脳炎及び西部ウマ脳炎ウイルス、ならびに風疹ウイルスを含むルビウイルスが含まれる。フラビウイルス科は、デング熱、黄熱、日本脳

炎、セントルイス脳炎及びダニ媒介性脳炎ウイルスを含む。他の標的抗原がＣ型肝炎及びコロナウイルス科から生成されうるが、これらのウイルスには、多くの非ヒトウイルス、例えば、伝染性気管支炎ウイルス（家禽）、ブタ伝染性胃腸炎ウイルス（ブタ）、ブタ血球凝集脳脊髄炎ウイルス（ブタ）、ネコ伝染性腹膜炎ウイルス（ネコ）、ネコ腸コロナウイルス（ネコ）、イヌコロナウイルス（イヌ）、及びヒト呼吸器コロナウイルスが含まれ、これらは風邪及び／又は非Ａ、Ｂ又はＣ型肝炎を引き起こすことがある。コロナウイルス科内では、標的抗原には、Ｅ１（Ｍ又はマトリックスタンパク質とも呼ばれる）、Ｅ２（Ｓ又はスパイクタンパク質とも呼ばれる）、Ｅ３（ＨＥ又はヘマグルチン－エルテロースとも呼ばれる）糖タンパク質（すべてのコロナウイルスに存在するわけではない）またはＮ（ヌクレオキャプシド）が含まれる。更に他の抗原をラブドウイルス科に対して標的化することができるが、ラブドウイルス科にはベシキュロウイルス属（例えば、水泡性口内炎ウイルス）及び狂犬病ウイルス属（例えば、狂犬病）が含まれる。ラブドウイルス科内では、適当な抗原はＧタンパク質又はＮタンパク質由来のものとすることができる。マールブルグウイルス及びエボラウイルスなどの出血熱ウイルスを包含するフィロウイルス科は適当な抗原のソースとなりうる。パラミクソウイルス科には、パラインフルエンザウイルス１型、パラインフルエンザウイルス３型、ウシパラインフルエンザウイルス３型、ルブラウイルス（ムンプスウイルス）、パラインフルエンザウイルス２型、パラインフルエンザウイルス４型、ニューカッスル病ウイルス（ニワトリ）、牛疫、モルビリウイルス（はしか及びイヌジステンバーを包含する）、及び呼吸合胞体ウイルスを含むニューモウイルスが含まれる（他、糖（Ｇ）タンパク質及び融合（Ｆ）タンパク質、これらの配列はＧｅｎＢａｎｋより入手可能である）。インフルエンザウイルスは、オルソミクソウイルス科内に分類され、適当な抗原（例えば、ＨＡタンパク質、Ｎ１タンパク質）のソースとなりうる。ブンヤウイルス科は、ブンヤウイルス属、（カリフォルニア脳炎、ラ・クロッス）、フレボウイルス（リフトバレー熱）、ハンタウイルス（プレマラ（ｐｕｒｅｍａｌａ）はヘマハギン熱ウイルスである）、ナイロウイルス（ナイロビヒツジ病）及び種々の非指定ブンヤウイルスを含む。アレナウイルス科はＬＣＭ及びラッサ熱ウイルスに対する抗原のソースを与える。レオウイルス科は、レオウイルス属、ロタウイルス属（子供の急性胃腸炎を引き起こす）、オルビウイルス属及びカルチウイルス属（コロラドダニ熱、レボンボ（Ｌｅｂｏｍｂｏ）（ヒト）、ウマ脳炎、ブルータング）を含む。レトロウイルス科は、ネコ白血病ウイルス、ＨＴＬＶＩ及びＨＴＬＶＩＩのようなヒト及び獣医学的疾患を包含するオンコウイルス亜科、レンチウイルス亜科（ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）、ネコ免疫不全ウイルス（ＦＩＶ）、ウマ伝染性貧血ウイルス及びスプマウイルス亜科を含む）を含む。レンチウイルス間では、多くの適当な抗原が記載されており、容易に選択することができる。適当なＨＩＶ及びＳＩＶ抗原の例としては、これらに限定されるものではないが、ｇａｇ、ｐｏｌ、Ｖｉｆ、Ｖｐｘ、ＶＰＲ、Ｅｎｖ、Ｔａｔ、Ｎｅｆ、及びＲｅｖタンパク質、ならびにそれらの種々の断片が挙げられる。例えば、Ｅｎｖタンパク質の適当な断片には、ｇｐ１２０、ｇｐ１６０、ｇｐ４１などのそのサブユニットのいずれか、または例えば少なくともアミノ酸約８個の長さのそれらのより小さい断片が含まれ得る。同様に、ｔａｔタンパク質の断片も選択することができる［米国特許第５，８９１，９９４号及び米国特許第６，１９３，９８１号を参照］。Ｄ．Ｈ．Ｂａｒｏｕｃｈ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７５（５）：２４６２－２４６７（Ｍａｒｃｈ ２００１）、及びＲ．Ｒ．Ａｍａｒａ，ｅｔ ａｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２９２：６９－７４（６ Ａｐｒ．２００１）に記載されるＨＩＶ及びＳＩＶタンパク質についても参照されたい。別の例では、ＨＩＶ及び／またはＳＩＶ免疫原性タンパク質またはペプチドを用いて、融合タンパク質または他の免疫原性分子を形成することができる。例えば、２００１年８月２日公開のＷＯ０１／５４７１９及び１９９９年４月８日公開のＷＯ９９／１６８８４に記載されるＨＩＶ－１ Ｔａｔ及び／またはＮｅｆ融合タンパク質及び免疫化のレジメンを参照されたい。本発明は、本明細書に記載されるＨＩＶ及び／またはＳＩＶ免疫原性タンパク質またはペプチドに限定されない。さらに、これらのタンパク質に対するさまざまな改変がこれまでに記載されているか、または当業者によっ

て容易に行うことができる。例えば、米国特許第５，９７２，５９６号に記載される改変ｇａｇタンパク質を参照されたい。さらに、あらゆる所望のＨＩＶ及び／またはＳＩＶ免疫原を単独でまたは組み合わせて投与することができる。かかる組み合わせには、単一のベクターからの、または複数のベクターからの発現が含まれ得る。パポバウイルス科はポリオーマウイルス亜科（ＢＫＵ及びＪＣＵウイルス）及びパピローマウイルス亜科（がん又は乳頭腫の悪性進行に関連する）を含む。アデノウイルス科は呼吸疾患及び／又は腸炎を引き起こすウイルス（ＥＸ、ＡＤ７、ＡＲＤ、Ｏ．Ｂ．）を含む。パルボウイルス科は、ネコパルボウイルス（ネコ腸炎）、ネコ汎白血球減少症ウイルス、イヌパルボウイルス及びブタパルボウイルスを含む。ヘルペスウイルス科は、シンプレックスウイルス属（ＨＳＶＩ、ＨＳＶＩＩ）、バリセロウイルス（仮性狂犬病、水痘帯状疱疹）を含むアルファヘルペスウイルス亜科及び、サイトメガロウイルス属（ヒトＣＭＶ、ムロメガロウイルス）を含むベータヘルペスウイルス亜科、ならびに、リンフォクリプトウイルス属、ＥＢＶ（バーキットリンパ腫）、伝染性鼻気管炎、マレック病ウイルス及びラジノウイルスを包含するガンマヘルペスウイルス亜科を含む。ポックスウイルス科は、オルソポックスウイルス属（痘瘡（天然痘）及びワクシニア（牛痘））、パラポックスウイルス、アビポックスウイルス、カプリポックスウイルス、ウサギポックスウイルス、スイポックスウイルスを包含する脊椎動物ポックスウイルス亜科、及び昆虫ポックスウイルス亜科を含む。ヘパドナウイルス科はＢ型肝炎ウイルスを含む。抗原の適切なソースとなりうる未分類のウイルスの１つに、デルタ型肝炎ウイルスがある。更に他のウイルス源としては、ニワトリ伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス及びブタ呼吸繁殖障害症候群ウイルスが含まれうる。アルファウイルス科はウマ動脈炎ウイルス及び種々の脳炎ウイルスを含む。

【０１７９】

ワクチンに組み込む（例えば、カセットにコードする）ことができる抗原には、ヒト及び非ヒト脊椎動物に感染する細菌、真菌、寄生性微生物または多細胞寄生生物を含む病原体に対してヒトまたは非ヒト動物を免疫化するうえで有用な免疫原も含まれる。細菌病原体の例としては、肺炎球菌、ブドウ球菌、及び連鎖球菌を含む病原性グラム陽性球菌が挙げられる。病原性グラム陰性球菌は髄膜炎菌、淋菌を含む。病原性腸グラム陰性桿菌は、腸内細菌科；シュードモナス、アシネトバクテリア及びエイケネラ；類鼻疽；サルモネラ；赤痢菌；ヘモフィルス（ヘモフィルス・インフルエンザエ、ヘモフィルス・ソムナス）；モラクセラ；Ｈ．デュクレイ（Ｈ．ｄｕｃｒｅｙｉ）（軟性下疳を引き起こす）；ブルセラ；フランシセラ・ツラレンシス（Ｆｒａｎｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ）（野兎病を引き起こす）；エルシニア（パスツレラ）；ストレプトバシラス・モニリフォルミス及びスピリルムを含む。グラム陽性桿菌は、リステリア・モノサイトゲネス；ブタ丹毒菌；コリネバクテリウム・ジフテリア（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａ）（ジフテリア）；コレラ；Ｂ．アントラシス（Ｂ．ａｎｔｈｒａｃｉｓ）（炭疽菌）；ドノヴァン症（鼠径肉芽腫）；及びバルトネラ症を含む。病原性嫌気性菌により引き起こされる疾患として、破傷風、ボツリヌス中毒、その他のクロストリジウム症、結核、ハンセン病及びその他のマイコバクテリアが挙げられる。具体的な細菌種の例としては、これらに限定されるものではないが、肺連レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、化膿レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）、ストレプトコッカス・アガラクチア（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ａｇａｌａｃｔｉａｅ）、大便レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｆａｅｃａｌｉｓ）、カタル球菌（Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｃａｔａｒｒｈａｌｉｓ）、ピロリ菌（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｐｙｌｏｒｉ）、髄膜炎菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）、淋菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）、クラミジア・トラコマティス（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）、クラミジア・ニューモニエ（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、オウム病クラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｐｓｉｔｔａｃｉ）、百日咳菌（Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ｐｅｒｔｕｓｓｉｓ）、チフス菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉ）、ネズミチフス菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）、サルモネラ・コレレスイス（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｃｈｏｌｅ

ｒａｅｓｕｉｓ）、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、赤痢菌（Ｓｈｉｇｅｌｌａ）、コレラ菌（Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ）、ジフテリア菌（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａｅ）、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、マイコバクテリウム・アビウム（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｖｉｕｍ）、マイコバクテリウム細胞内複合体（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒｅｃｏｍｐｌｅｘ）、プロテウス・ミラビリス（Ｐｒｏｔｅｕｓ ｍｉｒａｂｉｌｉｓ）、プロテウス・ブルガリス（Ｐｒｏｔｅｕｓ ｖｕｌｇａｒｉｓ）、黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ）、破傷風菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｔｅｔａｎｉ）、レプトスピラ・インターロガンス（Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ ｉｎｔｅｒｒｏｇａｎｓ）、ライム病菌（Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ）、ヘモリチカ菌（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃａ）、パスツレラ・マルトシダ（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ ｍｕｌｔｏｃｉｄａ）、アクチノバチルス・プルロニューモニア（Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｐｌｅｕｒｏｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）及びマイコプラズマ・ガリセプチカム（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ）が挙げられる。病原性スピロヘータ疾患として、梅毒；トレポネーマ症；イチゴ腫、ピンタ及び地方病性梅毒；並びにレプトスピラ症が挙げられる。より高等な病原性細菌および病原性真菌により引き起こされるその他の感染として、放線菌症；ノカルジア症；クリプトコッカス症（クリプトコッカス）、ブラストミセス症（ブラストミセス）、ヒストプラスマ症（ヒストプラスマ）及びコクシジオイデス症（コクシジオイデス）；カンジダ症（カンジダ）、アスペルギルス症（アスペルギルス）及びムコール症；スポロトリクム症；パラコクシジオイドミコーシス、ペトリエリオジオーシス（ｐｅｔｒｉｅｌｌｉｄｉｏｓｉｓ）、トルロプシス症、菌腫及び黒色真菌症；ならびに皮膚糸状菌症が挙げられる。リケッチア感染症として、発疹チフス、ロッキー山紅斑熱、Ｑ熱およびリケッチア痘症が挙げられる。マイコプラズマ及びクラミジア感染症の例としては、肺炎マイコプラズマ、鼠径リンパ肉芽腫症、オウム病及び周産期のクラミジア感染症が挙げられる。病原性真核生物には病原性原生動物及び蠕虫が包含され、これによる感染症としては、アメーバ症、マラリア、リーシュマニア症（例えば、大形リーシュマニアにより引き起こされる）、トリパノソーマ症、トキソプラズマ症（例えば、Ｔｏｘｏｐｌａｓｍａ ｇｏｎｄｉｉにより引き起こされる）、ニューモシスチス・カリニ、トリカンス（Ｔｒｉｃｈａｎｓ）、トキソプラズマ（Ｔｏｘｏｐｌａｓｍａ ｇｏｎｄｉｉ）、バベシア症、ジアルジア症（例えば、Ｇｉａｒｄｉａにより引き起こされる）、旋毛虫症（例えば、トリコモナスにより引き起こされる）、フィラリア症、住血吸虫症（例えば、住血吸虫により引き起こされる）、線虫、吸虫（ｔｒｅｍａｔｏｄｅ）すなわち吸虫（ｆｌｕｋｅ）、及び条虫（サナダムシ）感染症が挙げられる。他の寄生虫感染症には、特に、回虫、鞭虫、クリプトスポリジウム、及びニューモシスチス・カリニにより引き起こされるものがある。

【０１８０】

本明細書では、感染症生物、対象の感染症、または対象の感染細胞に関連する任意のポリヌクレオチドに由来するペプチドも開示される。抗原は、感染症生物の核酸配列またはポリペプチド配列に由来するものであってよい。感染症生物のポリペプチド配列としては、これらに限定されるものではないが、病原体由来ペプチド、ウイルス由来ペプチド、細菌由来ペプチド、真菌由来ペプチド、及び／または寄生虫由来ペプチドが挙げられる。感染症生物としては、これらに限定されるものではないが、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス（ＳＡＲＳ）、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２型（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、エボラ、ＨＩＶ、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、インフルエンザ、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、及び結核菌が挙げられる。

【０１８１】

腫瘍細胞、感染細胞、または、樹状細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞を含む免疫細胞などの細胞の細胞表面状に提示されることが予測される抗原を選択することができる。免疫原性を有することが予測される抗原を選択することができる。

【０１８２】

抗原核酸配列によってコードされる１つ以上のポリペプチドは、以下のうちの少なくとも１つを含むことができる：１０００ｎＭ未満のＩＣ５０値でのＭＨＣとの結合親和性、ＭＨＣクラスＩペプチドについてはアミノ酸８～１５個、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５個の長さ、プロテアソーム切断を促進するペプチド内またはその近くの配列モチーフの存在、及び、ＴＡＰ輸送を促進する配列モチーフの存在、ＭＨＣクラスＩＩのポリペプチドについてはアミノ酸６～３０個、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８，１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、または３０個の長さ、細胞外もしくはリソソームプロテアーゼ（例えば、カテプシン）によるペプチド促進切断部位またはＨＬＡ－ＤＭにより触媒されるＨＬＡ結合部位内またはその近くの配列モチーフの存在。

【０１８３】

１つ以上の抗原が腫瘍の表面上に提示されうる。１つ以上の抗原が感染細胞の表面上に提示されうる。

【０１８４】

１つ以上の抗原が、腫瘍を有する対象で免疫原性でありうる（例えば、対象にＴ細胞応答またはＢ細胞応答を誘発することができる）。１つ以上の抗原が、感染症を有するか有することが疑われる対象で免疫原性でありうる（例えば、対象にＴ細胞応答またはＢ細胞応答を誘発することができる）。１つ以上の抗原が、感染症のリスクがある対象で免疫原性でありうる（例えば、感染症に特異的なメモリーＴ細胞、メモリーＢ細胞、または抗体の産生を刺激するなど、感染症に対する免疫学的防御（すなわち、免疫）を与えるＴ細胞応答またはＢ細胞応答を対象に誘発することができる）。

【０１８５】

１つ以上の抗原が、１つ以上の抗原を認識する抗体の産生などのＢ細胞応答を誘発することが可能な場合がある。抗体は、直鎖状ポリペプチド配列を認識するか、または二次及び三次構造を認識することができる。したがって、Ｂ細胞の抗原としては、これらに限定されるものではないが、完全長タンパク質、タンパク質サブユニット、タンパク質ドメイン、または二次及び三次構造を有することが知られているかもしくは予測される任意のポリペプチドを含む直鎖状ポリペプチド配列または二次及び三次構造を有するポリペプチドを挙げることができる。

【０１８６】

対象において自己免疫応答を誘導する１つ以上の抗原は、対象のためのワクチン生成の文脈において、考察から排除することができる。

【０１８７】

少なくとも１つの抗原性ペプチド分子（例えば、エピトープ配列）のサイズは、約５個、約６個、約７個、約８個、約９個、約１０個、約１１個、約１２個、約１３個、約１４個、約１５個、約１６個、約１７個、約１８個、約１９個、約２０個、約２１個、約２２個、約２３個、約２４個、約２５個、約２６個、約２７個、約２８個、約２９個、約３０個、約３１個、約３２個、約３３個、約３４個、約３５個、約３６個、約３７個、約３８個、約３９個、約４０個、約４１個、約４２個、約４３個、約４４個、約４５個、約４６個、約４７個、約４８個、約４９個、約５０個、約６０個、約７０個、約８０個、約９０個、約１００個、約１１０個、約１２０個、またはそれよりも多いアミノ分子残基、及びこれらの範囲から導出される任意の範囲を含むことができるが、それらに限定されない。具体的な実施形態において、抗原性ペプチド分子は、アミノ酸５０個以下である。

【０１８８】

抗原性ペプチド及びポリペプチドは、ＭＨＣクラスＩについては長さが１５残基以下で、通常約８～約１１残基の間からなり、特に９または１０残基であることができ；ＭＨＣクラスＩＩについては、６～３０残基であることができる。

【０１８９】

望ましい場合、より長いペプチドを、いくつかのやり方において設計することができる。１つの例において、ＨＬＡアレル上のペプチドの提示尤度が予測されるかまたは公知で

ある場合、より長いペプチドは、（１）各々の対応する遺伝子産物のＮ末端及びＣ末端に向かって２～５アミノ酸の伸長を有する個々の提示されるペプチド；（２）各々について伸長した配列を有する、提示されるペプチドのいくつかまたはすべての連鎖のいずれかからなることができる。別の例において、シークエンシングにより、腫瘍中に存在する長い（１０残基より長い）新生エピトープ配列（例えば、新規のペプチド配列をもたらすフレームシフト、リードスルー、またはイントロンの包含による）が明らかになる場合、より長いペプチドは、（３）新規の腫瘍特異的または感染症特異的アミノ酸のストレッチ全体からなることになり、したがって、最強のＨＬＡに提示されるより短いペプチドの計算的なまたはインビトロ試験ベースの選択の必要を回避する。いずれの例においても、より長いペプチドの使用によって、患者細胞による内因性のプロセシングが可能になり、より有効な抗原提示及びＴ細胞応答の誘導がもたらされ得る。

【０１９０】

抗原性ペプチド及びポリペプチドは、ＨＬＡタンパク質上に提示されることができる。いくつかの態様において、抗原性ペプチド及びポリペプチドは、野生型ペプチドよりも強い親和性でＨＬＡタンパク質上に提示される。いくつかの態様において、新生抗原性ペプチドまたはポリペプチドは、少なくとも５０００ｎＭ未満、少なくとも１０００ｎＭ未満、少なくとも５００ｎＭ未満、少なくとも２５０ｎＭ未満、少なくとも２００ｎＭ未満、少なくとも１５０ｎＭ未満、少なくとも１００ｎＭ未満、少なくとも５０ｎＭ未満、またはそれよりも小さいＩＣ５０を有することができる。

【０１９１】

いくつかの態様において、抗原性ペプチド及びポリペプチドは、対象に投与された場合に、自己免疫応答を誘導せず、及び／または免疫寛容を引き起こさない。

【０１９２】

また、少なくとも２種類以上の抗原性ペプチドを含む組成物も提供する。いくつかの実施形態において、組成物は、少なくとも２種類の異なるペプチドを含有する。少なくとも２種類の異なるペプチドは、同じポリペプチドに由来することができる。異なるポリペプチドとは、ペプチドが、長さ、アミノ酸配列、またはその両方において異なることを意味する。ペプチドは、正常細胞または組織と比較して腫瘍細胞またはがん性組織中で発現が変更されていることが知られているかまたは見出されている任意のポリペプチド、例えば、正常細胞または組織と比較して腫瘍細胞またはがん性組織中で異常に発現することが知られているかまたは見出されている任意のポリペプチドに由来する腫瘍特異的変異またはペプチドを含むことが知られているかまたは見出されている任意のポリペプチドに由来するものとすることができる。抗原性ペプチドが由来しうる適当なポリペプチドは、例えば、ＣＯＳＭＩＣデータベースまたはＡＡＣＲ ＧＥＮＩＥ（Ｇｅｎｏｍｉｃｓ Ｅｖｉｄｅｎｃｅ Ｎｅｏｐｌａｓｉａ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ Ｅｘｃｈａｎｇｅ）データベースに見出すことができる。ＣＯＳＭＩＣは、ヒトのがんにおける体細胞変異に関する包括的な情報をキュレートしたものである。ＡＡＣＲ ＧＥＮＩＥは、数万人のがん患者からの臨床成績を用いた臨床グレードのがんゲノムデータを集約及びリンクしたものである。いくつかの態様において、腫瘍特異的変異は、特定のがんタイプについてのドライバー変異である。ペプチドは、感染症生物に関連することが知られているかもしくは疑われる任意のポリペプチドに由来するものとするか、またはペプチドは、正常細胞または組織と比較して感染細胞で発現が変更されていることが知られているかもしくは見出されている任意のポリペプチド（例えば、宿主細胞に発現が制限されている感染症ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを含む感染症ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）に由来するものとすることができる。

【０１９３】

望ましい活性または性質を有する抗原性ペプチド及びポリペプチドは、望ましいＭＨＣ分子に結合して適切なＴ細胞を活性化する非改変ペプチドの生物学的活性を増大させるかまたは実質的にそのすべてを少なくとも保持しつつ、特定の望ましい属性、例えば、改善された薬理学的特徴を与えるように改変することができる。例として、抗原性ペプチド及

びポリペプチドを、保存的または非保存的のいずれかの置換などの、種々の改変にさらに供することができ、そのような改変は、改善されたＭＨＣ結合、安定性、または提示などの、それらの使用におけるある特定の利点を提供し得る。保存的置換とは、アミノ酸残基を、生物学的及び／または化学的に類似している別のもので、例えば、１つの疎水性残基を別の疎水性残基、または１つの極性残基を別の極性残基で置き換えることを意味する。置換は、Ｇｌｙ、Ａｌａ；Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ；Ａｓｐ、Ｇｌｕ；Ａｓｎ、Ｇｌｎ；Ｓｅｒ、Ｔｈｒ；Ｌｙｓ、Ａｒｇ；及びＰｈｅ、Ｔｙｒなどの組み合わせを含む。単一アミノ酸置換の効果はまた、Ｄ－アミノ酸を用いて探査してもよい。そのような改変は、例えば、Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３２：３４１－３４７（１９８６），Ｂａｒａｎｙ ＆ Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ，Ｔｈｅ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ，Ｇｒｏｓｓ ＆ Ｍｅｉｅｎｈｏｆｅｒ，ｅｄｓ．（Ｎ．Ｙ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ），ｐｐ．１－２８４（１９７９）；及びＳｔｅｗａｒｔ ＆ Ｙｏｕｎｇ，Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，Ｉｌｌ．，Ｐｉｅｒｃｅ），２ｄ Ｅｄ．（１９８４）に記載されているように、周知のペプチド合成手順を用いて行うことができる。

【０１９４】

種々のアミノ酸模倣物または非天然アミノ酸でのペプチド及びポリペプチドの改変は、インビボでのペプチド及びポリペプチドの安定性の増大に特に有用である場合がある。安定性は多くの方法でアッセイすることができる。例として、ペプチダーゼ、ならびに、ヒト血漿及び血清などの種々の生物学的媒質が、安定性を試験するために使用されている。例えば、Ｖｅｒｈｏｅｆ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｄｒｕｇ Ｍｅｔａｂ Ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎ．１１：２９１－３０２（１９８６）を参照されたい。ペプチドの半減期は、２５％ヒト血清（ｖ／ｖ）アッセイを用いて好都合に決定することができる。プロトコールは、概して以下のようなものである。プールしたヒト血清（タイプＡＢ、非熱不活性化）を、使用前に遠心分離によって脱脂する。次いで、血清を、ＲＰＭＩ組織培養培地で２５％に希釈し、ペプチド安定性を試験するために使用する。あらかじめ決定された時間間隔で、少量の反応溶液を取り出して、６％水性トリクロロ酢酸またはエタノールのいずれかに添加する。濁った反応試料を１５分間冷却（４℃）し、次いで、スピンして沈降血清タンパク質を沈殿させる。次いで、ペプチドの存在を、安定性特異的クロマトグラフィー条件を用いた逆相ＨＰＬＣによって決定する。

【０１９５】

ペプチド及びポリペプチドを、改善された血清半減期以外の望ましい属性を提供するために修飾することができる。例として、ＣＴＬ活性を誘導するペプチドの能力を、Ｔヘルパー細胞応答を誘導することができる少なくとも１つのエピトープを含有する配列への連結によって増強することができる。免疫原性ペプチド／Ｔヘルパーコンジュゲートは、スペーサー分子によって連結することができる。スペーサーは、典型的には、生理学的条件下で実質的に無電荷である、アミノ酸またはアミノ酸模倣物などの相対的に小さな中性分子から構成される。スペーサーは、典型的には、例えば、Ａｌａ、Ｇｌｙ、または、非極性アミノ酸もしくは中性極性アミノ酸の他の中性スペーサーから選択される。任意で存在するスペーサーは、同じ残基から構成される必要はなく、したがって、ヘテロオリゴマーまたはホモオリゴマーであり得ることが、理解されるであろう。存在する場合、スペーサーは、通常、少なくとも１または２残基、より通常は、３～６残基であろう。あるいは、ペプチドを、スペーサーなしでＴヘルパーペプチドに連結することができる。

【０１９６】

抗原性ペプチドは、ペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかで、直接またはスペーサーを介してのいずれかでＴヘルパーペプチドに連結することができる。抗原性ペプチドまたはＴヘルパーペプチドのいずれかのアミノ末端を、アシル化することができる。例示的なＴヘルパーペプチドは、破傷風毒素の８３０～８４３、インフルエンザの３０７～３１９、マラリアスポロゾイトの周囲３８２～３９８及び３７８～３８９を含む。

【０１９７】

タンパク質またはペプチドは、標準的な分子生物学的技法を通したタンパク質、ポリペプチド、もしくはペプチドの発現、天然由来源からのタンパク質もしくはペプチドの単離、またはタンパク質もしくはペプチドの化学合成を含む、当業者に公知の任意の技法によって作製することができる。種々の遺伝子に対応する、ヌクレオチドならびにタンパク質、ポリペプチド及びペプチドの配列は、以前に開示されており、当業者に公知のコンピュータ処理されたデータベースで見出すことができる。１つのそのようなデータベースは、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈのウェブサイトに位置する、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ＩｎｆｏｒｍａｔｉｏｎのＧｅｎｂａｎｋ及びＧｅｎＰｅｐｔデータベースである。公知の遺伝子のコード領域は、本明細書に開示する技法を用いて、または当業者に公知であるように、増幅及び／または発現させることができる。あるいは、タンパク質、ポリペプチド、及びペプチドの種々の商業的調製物が、当業者に公知である。

【０１９８】

さらなる態様において、抗原は、抗原性ペプチドまたはその一部をコードする核酸（例えば、ポリヌクレオチド）を含む。ポリヌクレオチドは、例えば、ＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＰＮＡ、ＣＮＡ、ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）、例えば、ホスホロチオアートバックボーンを有するポリヌクレオチドなどの、ポリヌクレオチドの一本鎖及び／もしくは二本鎖、または天然形態もしくは安定化形態のいずれか、または、それらの組み合わせであることができ、イントロンを含有してもよく、または含有しなくてもよい。またさらなる態様は、ポリペプチドまたはその一部を発現することができる発現ベクターを提供する。様々な細胞タイプ用の発現ベクターが、当技術分野において周知であり、過度の実験なしで選択することができる。概して、ＤＮＡを、プラスミドなどの発現ベクター中に、発現のための適正な方向及び正確なリーディングフレームで挿入する。必要な場合は、ＤＮＡを、望ましい宿主によって認識される適切な転写及び翻訳調節性制御核酸配列に連結することができるが、そのような制御は、概して発現ベクターにおいて利用可能である。次いで、ベクターを、標準的な技法を通して宿主中に導入する。手引きは、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．において見出すことができる。

【０１９９】

Ｖ．送達組成物

また、特異的な免疫応答、例えば、腫瘍特異的な免疫応答または感染症生物に特異的な免疫応答を生じることができる免疫原性組成物、例えば、ワクチン組成物も、本明細書に開示する。ワクチン組成物は、典型的に、例えば、本明細書に記載される方法を用いて選択された１つまたは多数の抗原を含む。ワクチン組成物はまた、ワクチンと呼ぶこともできる。

【０２００】

ワクチンは、１～３０種類のペプチド、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、もしくは３０種類の異なるペプチド、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、もしくは１４種類の異なるペプチド、または１２、１３、もしくは１４種類の異なるペプチドを含有することができる。ペプチドは、翻訳後修飾を含むことができる。ワクチンは、１～１００種類もしくはそれよりも多い核酸配列、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９

９、１００種類もしくはそれよりも多い異なる核酸配列、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、もしくは１４種類の異なる核酸配列、または１２、１３、もしくは１４種類の異なる核酸配列を含有することができる。ワクチンは、１～３０種類の抗原配列、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００種類もしくはそれよりも多い異なる抗原配列、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、もしくは１４種類の異なる抗原配列、または１２、１３、もしくは１４種類の異なる抗原配列を含有することができる。

【０２０１】

ワクチンは、１～３０個の抗原コード核酸配列、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４，９５、９６、９７、９８、９９、１００個、もしくはそれよりも多くの異なる抗原コード核酸配列、６、７、８、９、１０ １１、１２、１３、もしくは１４個の異なる抗原コード核酸配列、または１２、１３もしくは１４個の異なる抗原コード核酸配列を含むことができる。抗原コード核酸配列は、抗原「カセット」の抗原コード部分を指す場合もある。カセットの特徴については、下記により詳細に述べる。

【０２０２】

ワクチンは、１～３０個の異なるエピトープコード核酸配列、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４，９５、９６、９７、９８、９９、１００個、もしくはそれよりも多くの異なるエピトープコード核酸配列、６、７、８、９、１０ １１、１２、１３、もしくは１４個の異なるエピトープコード核酸配列、または１２、１３もしくは１４個の異なるエピトープコード核酸配列を含むことができる。エピトープコード核酸配列は、個別のエピトープ配列の配列を指す場合もある。

【０２０３】

ワクチンは、エピトープコード核酸配列の少なくとも２個の反復配列を含むことができる。本明細書で使用される「反復配列」とは、抗原コード核酸配列内の同じ核酸エピトープコード核酸配列（本明細書に記載される任意の５’リンカー配列及び／または任意の３’リンカー配列を含む）の２個以上の繰り返しを指す。１つの例では、カセットの抗原コード核酸配列部分は、エピトープコード核酸配列の少なくとも２個の反復配列をコードする。さらなる非限定的な例では、カセットの抗原コード核酸配列部分は複数の異なるエピトープをコードし、異なるエピトープのうちの少なくとも１つは、異なるエピトープをコードした核酸配列の少なくとも２個の反復（すなわち、少なくとも２個の異なるエピトープコード核酸配列）によってコードされる。例示的な非限定例では、抗原コード核酸配列は、エピトープコード核酸配列Ａ（E_A）、エピトープコード配列Ｂ（E_B）、及びエピト

ープコード配列Ｃ（E_C）によってコードされるエピトープＡ、Ｂ、及びＣをコードし、異なるエピトープのうちの少なくとも１つの反復配列を有する例示的な抗原コード核酸配列は、これらに限定されるものではないが、下式によって示される。
－１つの異なるエピトープの反復配列（エピトープＡの反復配列）：
$E_A－E_B－E_C－E_A$、または
$E_A－E_A－E_B－E_C$
－複数の異なるエピトープの反復配列（エピトープＡ、Ｂ、及びＣの反復配列）：
$E_A－E_B－E_C－E_A－E_B－E_C$、または
$E_A－E_A－E_B－E_B－E_C－E_C$
－複数の異なるエピトープの複数の反復配列（エピトープＡ、Ｂ、及びＣの反復配列）：
$E_A－E_B－E_C－E_A－E_B－E_C－E_A－E_B－E_C$、または
$E_A－E_A－E_A－E_B－E_B－E_B－E_C－E_C－E_C$

【０２０４】

上記の例は限定的なものではなく、異なるエピトープのうちの少なくとも１つの反復配列を有する抗原コード核酸配列は、異なるエピトープのそれぞれを任意の順序または頻度でコードすることができる。例えば、順序及び頻度は、例えば式$E_A－E_B－E_C－E_C－E_A－E_B－E_A－E_C－E_A－E_C－E_C－E_B$によるエピトープＡ、Ｂ、及びＣを有する例におけるように、異なるエピトープのランダムな配置とすることができる。

【０２０５】

本明細書では、５’から３’に向けて下式によって記述される少なくとも１つの抗原コード核酸配列を有する抗原コードカセットが提供される。
$(E_x－(E^N_n)_y)_z$
式中、Ｅは、少なくとも１つの異なるエピトープコード核酸配列を含む核酸配列を表し、ｎは、別個の異なるエピトープコード核酸配列の数を表し、０を含む任意の整数であり、E^Nは、それぞれの対応するｎについて別個の異なるエピトープコード核酸配列を含む核酸配列を表し、
ｚのそれぞれの繰り返しについて、各ｎにおいてｘ＝０または１、ｙ＝０または１であり、ｘまたはｙの少なくとも一方は１であり、
ｚ＝２以上であり、抗原コード核酸配列は、Ｅ、特定のE^N、またはこれらの組み合わせの少なくとも１つの２回の繰り返しを含む。

【０２０６】

各ＥまたはE^Nは、本明細書に記載されるエピトープコード核酸配列を独立して含むことができる。例えば、各ＥまたはE^Nは、５’から３’に向けて式（$L_{b5}－N_c－L3_d$）によって記述される核酸配列を独立して含むことができ、式中、Ｎは、各ＥまたはE_Nに関連付けられた異なるエピトープコード核酸配列を含み、ただしｃ＝１であり、Ｌ５は５’リンカー配列を含み、ただしｂ＝０または１であり、Ｌ３は３’リンカー配列を含み、ただしｄ＝０または１である。使用することができるエピトープ及びリンカーについては本明細書でさらに述べる（例えば、「Ｖ．Ａ．カセット」のセクションを参照）。

【０２０７】

エピトープコード核酸配列（任意の５’リンカー配列及び／または任意の３’リンカー配列を含む）の反復配列は互いに直接連結されてもよい（例えば、上記に示したように、$E_A－E_A－…$）。エピトープコード核酸配列の反復配列は、１つ以上のさらなるヌクレオチド配列によって分離されてもよい。一般的に、エピトープコード核酸配列の反復配列は、本明細書に記載される組成物に適用可能な任意のサイズの核酸配列によって分離されうる。１つの例では、エピトープコード核酸配列の反復配列は、別個の異なるエピトープコード核酸配列によって分離されうる（例えば、上記に示したように、$E_A－E_B－E_C－E_A…$）。反復配列が単一の別個の異なるエピトープコード核酸配列によって分離されており、各エピトープコード核酸配列（任意の５’リンカー配列及び／または任意の３’リンカー配列を含む）がアミノ酸２５個の長さのペプチドをコードする例では、反復配列は、例えば$E_A－E_B－E_A…$（E_Aは７５個のヌクレオチドによって分離されている）により表

される抗原コード核酸におけるように７５個のヌクレオチドによって分離されうる。例示的な１つの例では、２５マーの抗原Ｔｒｐ１（ＶＴＮＴＥＭＦＶＴＡＰＤＮＬＧＹＭＹＥＶＱＷＰＧＱ（配列番号７５））及びＴｒｐ２（ＴＱＰＱＩＡＮＣＳＶＹＤＦＦＶＷＬＨＹＹＳＶＲＤＴ（配列番号７６））の反復配列をコードした配列ＶＴＮＴＥＭＦＶＴＡＰＤＮＬＧＹＭＹＥＶＱＷＰＧＱＴＱＰＱＩＡＮＣＳＶＹＤＦＦＶＷＬＨＹＹＳＶＲＤＴＶＴＮＴＥＭＦＶＴＡＰＤＮＬＧＹＭＹＥＶＱＷＰＧＱＴＱＰＱＩＡＮＣＳＶＹＤＦＦＶＷＬＨＹＹＳＶＲＤＴ（配列番号７４）を有する抗原コード核酸であり、Ｔｒｐ１の反復配列が２５マーのＴｒｐ２によって分離されており、したがって、Ｔｒｐ１エピトープコード核酸配列の反復配列は、ヌクレオチド７５個のＴｒｐ２エピトープコード核酸配列によって分離される。反復配列が２、３、４、５、６、７、８、または９個の別個の異なるエピトープコード核酸配列によって分離されており、各エピトープコード核酸配列（任意の５’リンカー配列及び／または任意の３’リンカー配列を含む）がアミノ酸２５個の長さのペプチドをコードする例では、反復配列は、それぞれ、１５０、２２５、３００、３７５、４５０、５２５、６００、または６７５個のヌクレオチドによって分離されうる。

【０２０８】

一実施形態では、異なるペプチド及び／もしくはポリペプチド、またはそれらをコードする核酸配列は、ペプチド及び／またはポリペプチドが、異なるＭＨＣクラスＩ分子及び／または異なるＭＨＣクラスＩＩ分子などの異なるＭＨＣ分子と結合することができるように選択される。いくつかの態様において、１つのワクチン組成物は、最も頻繁に存在するＭＨＣクラスＩ分子及び／または異なるＭＨＣクラスＩＩ分子と結合することができるペプチド及び／またはポリペプチドのコード配列を含む。したがって、ワクチン組成物は、少なくとも２種類の好ましい、少なくとも３種類の好ましい、または少なくとも４種類の好ましいＭＨＣクラスＩ分子及び／または異なるＭＨＣクラスＩＩ分子と結合することができる異なる断片を含むことができる。

【０２０９】

ワクチン組成物は、特異的な細胞傷害性Ｔ細胞応答、及び／または特異的なヘルパーＴ細胞応答を生じることができる。

【０２１０】

ワクチン組成物は、アジュバント及び／または担体をさらに含むことができる。有用なアジュバント及び担体の例を、本明細書の下記に示す。組成物は、例えば、タンパク質などの担体、または、例えば、Ｔ細胞に対してペプチドを提示することができる樹状細胞（ＤＣ）などの抗原提示細胞と結合することができる。

【０２１１】

アジュバントは、ワクチン組成物中へのその混合が、抗原に対する免疫応答を増大させるか、または別の方法で修飾する任意の物質である。担体は、抗原がそれに結合することができる足場構造、例えば、ポリペプチドまたは多糖であることができる。任意で、アジュバントは、共有結合性または非共有結合性にコンジュゲートされる。

【０２１２】

抗原に対する免疫応答を増大させるアジュバントの能力は、典型的に、免疫媒介性反応の有意なもしくは実質的な増大、または疾患症候の低減によって明示される。例えば、体液性免疫の増大は、典型的に、抗原に対して生じた抗体の力価の有意な増大によって明示され、Ｔ細胞活性の増大は、典型的に、細胞増殖、または細胞性細胞傷害、またはサイトカイン分泌の増大において明示される。アジュバントはまた、例えば、主として体液性またはＴｈ応答を、主として細胞性またはＴｈ応答へと変化させることによって、免疫応答を変更し得る。

【０２１３】

適しているアジュバントは、１０１８　ＩＳＳ、アラム、アルミニウム塩、Ａｍｐｌｉｖａｘ、ＡＳ１５、ＢＣＧ、ＣＰ－８７０，８９３、ＣｐＧ７９０９、ＣｙａＡ、ｄＳＬＩＭ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＣ３０、ＩＣ３１、イミキモド、ＩｍｕＦａｃｔ　ＩＭＰ３２１、ＩＳ　Ｐａｔｃｈ、ＩＳＳ、ＩＳＣＯＭＡＴＲＩＸ、ＪｕｖＩｍｍｕｎｅ、ＬｉｐｏＶ

ａｃ、ＭＦ５９、モノホスホリル脂質Ａ、Ｍｏｎｔａｎｉｄｅ ＩＭＳ １３１２、ＭｏｎｔａｎｉｄｅＩＳＡ２０６、Ｍｏｎｔａｎｉｄｅ ＩＳＡ ５０Ｖ、Ｍｏｎｔａｎｉｄｅ ＩＳＡ－５１、ＯＫ－４３２、ＯＭ－１７４、ＯＭ－１９７－ＭＰ－ＥＣ、ＯＮＴＡＫ、ＰｅｐＴｅｌベクターシステム、ＰＬＧマイクロ粒子、レシキモド、ＳＲＬ１７２、ビロソーム及び他のウイルス様粒子、ＹＦ－１７Ｄ、ＶＥＧＦトラップ、Ｒ８４８、β－グルカン、Ｐａｍ３Ｃｙｓ、サポニンに由来するＡｑｕｉｌａ’ｓ ＱＳ２１ ｓｔｉｍｕｌｏｎ（Ａｑｕｉｌａ Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ、Ｍａｓｓ．、ＵＳＡ）、マイコバクテリア抽出物及び合成細菌細胞壁模倣物、及びＲｉｂｉ’ｓ Ｄｅｔｏｘ．ＱｕｉｌまたはＳｕｐｅｒｆｏｓなどの他の専売アジュバントを含むが、それらに限定されない。不完全フロインドまたはＧＭ－ＣＳＦなどのアジュバントが、有用である。樹状細胞に特異的ないくつかの免疫学的アジュバント（例えば、ＭＦ５９）及びそれらの調製物が、以前に記載されている（Ｄｕｐｕｉｓ Ｍ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９８；１８６（１）：１８－２７；Ａｌｌｉｓｏｎ Ａ Ｃ；Ｄｅｖ Ｂｉｏｌ Ｓｔａｎｄ．１９９８；９２：３－１１）。また、サイトカインを使用することもできる。いくつかのサイトカインは、リンパ組織に対する樹状細胞の遊走への影響（例えば、ＴＮＦ－α）、Ｔリンパ球に対する効率的な抗原提示細胞への樹状細胞の成熟の加速化（例えば、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－１、及びＩＬ－４）（具体的にその全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第５，８４９，５８９号）、及び免疫アジュバントとしての作用（例えば、ＩＬ－１２）に直接結び付けられている（Ｇａｂｒｉｌｏｖｉｃｈ Ｄ Ｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ ＩｍｍｕｎｏｔｈｅｒＥｍｐｈａｓｉｓ Ｔｕｍｏｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９６（６）：４１４－４１８）。

【０２１４】

ＣｐＧ免疫刺激性オリゴヌクレオチドもまた、ワクチン設定においてアジュバントの効果を増強することが報告されている。ＴＬＲ ７、ＴＬＲ ８、及び／またはＴＬＲ ９に結合するＲＮＡなどの他のＴＬＲ結合分子がまた、使用されてもよい。

【０２１５】

有用なアジュバントの他の例は、化学的に修飾されたＣｐＧ（例えば、ＣｐＲ、Ｉｄｅｒａ）、Ｐｏｌｙ（Ｉ：Ｃ）（例えば、ｐｏｌｙｉ：ＣＩ２Ｕ）、非ＣｐＧ細菌ＤＮＡまたはＲＮＡ、ならびに、治療的に及び／またはアジュバントとして作用し得る、シクロホスファミド、スニチニブ、ベバシズマブ、セレブレックス、ＮＣＸ－４０１６、シルデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、ソラフィニブ、ＸＬ－９９９、ＣＰ－５４７６３２、パゾパニブ、ＺＤ２１７１、ＡＺＤ２１７１、イピリムマブ、トレメリムマブ、及びＳＣ５８１７５などの免疫活性小分子及び抗体を含むが、それらに限定されない。アジュバント及び添加物の量及び濃度は、当業者が過度の実験なしで容易に決定することができる。追加的なアジュバントは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ、サルグラモスチム）などのコロニー刺激因子を含む。

【０２１６】

ワクチン組成物は、１種類よりも多い異なるアジュバントを含むことができる。さらに、治療用組成物は、上記の任意またはそれらの組み合わせを含む、任意のアジュバント物質を含むことができる。ワクチン及びアジュバントを、任意の適切な配列において、一緒にまたは別々に投与できることもまた、企図される。

【０２１７】

担体（または賦形剤）は、アジュバントから独立して存在することができる。担体の機能は、例えば、活性または免疫原性を増大させるため、安定性を与えるため、生物学的活性を増大させるため、または血清半減期を増大させるために、特に変異体の分子量を増大させることであり得る。さらに、担体は、Ｔ細胞に対してペプチドを提示するのを助けることができる。担体は、当業者に公知の任意の適している担体、例えば、タンパク質または抗原提示細胞であることができる。担体タンパク質は、キーホールリンペットヘモシアニン、トランスフェリンなどの血清タンパク質、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、サイログロブリンもしくはオボアルブミン、免疫グロブリン、またはインスリンなど

のホルモン、またはパルミチン酸であることができるが、それらに限定されない。ヒトの免疫化のためには、担体は概して、ヒトに許容されかつ安全な、生理学的に許容される担体である。しかし、破傷風トキソイド及び／またはジフテリアトキソイドは、適している担体である。あるいは、担体は、デキストラン、例えばセファロースであることができる。

【０２１８】

細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）は、無傷の外来抗原自体よりも、ＭＨＣ分子に結合したペプチドの形態において抗原を認識する。ＭＨＣ分子自体は、抗原提示細胞の細胞表面に位置する。したがって、ＣＴＬの活性化は、ペプチド抗原、ＭＨＣ分子、及びＡＰＣのトリマー複合体が存在する場合に可能である。対応して、ペプチドがＣＴＬの活性化のために使用される場合だけではなく、追加的にそれぞれのＭＨＣ分子を有するＡＰＣが添加される場合に、それは免疫応答を増強し得る。したがって、いくつかの実施形態において、ワクチン組成物は、追加的に、少なくとも１つの抗原提示細胞を含有する。

【０２１９】

抗原はまた、ワクシニア、鶏痘、自己複製アルファウイルス、マラバウイルス、アデノウイルス（例えば、Ｔａｔｓｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｅｎｏｖｉｒｕｓｅｓ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ（２００４）１０，６１６－６２９を参照されたい）、または、第２、第３、もしくはハイブリッド第２／第３世代のレンチウイルス、及び特異的な細胞タイプもしくは受容体を標的とするように設計された任意の世代の組換えレンチウイルスを含むがそれらに限定されないレンチウイルス（例えば、Ｈｕ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｚａｔｉｏｎ Ｄｅｌｉｖｅｒｅｄ ｂｙ Ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ Ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ ａｎｄ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ Ｄｉｓｅａｓｅｓ，Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｒｅｖ．（２０１１）２３９（１）：４５－６１、Ｓａｋｕｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ ｖｅｃｔｏｒｓ：ｂａｓｉｃｔｏ ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ．（２０１２）４４３（３）：６０３－１８、Ｃｏｏｐｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｒｅｓｃｕｅ ｏｆ ｓｐｌｉｃｉｎｇ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｉｎｔｒｏｎ ｌｏｓｓ ｍａｘｉｍｉｚｅｓ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ ｖｅｃｔｏｒｓ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｔｈｅ ｈｕｍａｎ ｕｂｉｑｕｉｔｉｎ Ｃ ｐｒｏｍｏｔｅｒ，Ｎｕｃｌ．ＡｃｉｄｓＲｅｓ．（２０１５）４３（１）：６８２－６９０、Ｚｕｆｆｅｒｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｌｆ－Ｉｎａｃｔｉｖａｔｉｎｇ Ｌｅｎｔｉｖｉｒｕｓ Ｖｅｃｔｏｒ ｆｏｒ Ｓａｆｅ ａｎｄ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ Ｉｎ Ｖｉｖｏ Ｇｅｎｅ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．（１９９８）７２（１２）：９８７３－９８８０を参照されたい）などの、ウイルスベクターベースのワクチンプラットフォームに含めることもできる。上述のウイルスベクターベースのワクチンプラットフォームのパッケージング能力に依存して、このアプローチは、１つ以上の抗原性ペプチドをコードする１つ以上の核酸配列を送達することができる。配列は、非変異配列が隣接していてもよく、リンカーによって分離されていてもよく、または、細胞内区画を標的とする１つもしくは複数の配列が先行していてもよい（例えば、Ｇｒｏｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｓｐｅｃｔｉｖｅ ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｎｅｏａｎｔｉｇｅｎ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅｓ ｉｎ ｔｈｅ ｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ ｂｌｏｏｄ ｏｆ ｍｅｌａｎｏｍａ ｐａｔｉｅｎｔｓ，Ｎａｔ Ｍｅｄ．（２０１６）２２（４）：４３３－８、Ｓｔｒｏｎｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｏｆ ｃａｎｃｅｒ ｎｅｏａｎｔｉｇｅｎｓ ｗｉｔｈ ｄｏｎｏｒ－ｄｅｒｉｖｅｄ Ｔ ｃｅｌｌ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｒｅｐｅｒｔｏｉｒｅｓ，Ｓｃｉｅｎｃｅ．（２０１６）３５２（６２９１）：１３３７－４１、Ｌｕ ｅｔ ａｌ．，Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｍｕｔａｔｅｄ ｃａｎｃｅｒ ａｎｔｉｇｅｎｓ ｒｅｃｏｇｎｉｚｅｄ ｂｙ Ｔ ｃｅｌｌｓ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ ｄｕｒａｂｌｅ ｔｕｍｏｒ ｒｅｇｒｅｓｓｉｏｎｓ，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．（２０１４）２０（ １３）：３４０１－１０を参照されたい）。宿主中への導入時に、感染した細胞は、抗原を発現し、それにより、ペプチドに対する宿主免疫（例えば、ＣＴＬ）応答を惹起する。免疫化プロトコールにおいて有用なワクシニアベクター及び方法は、例えば、米国特許第４，７２２，８４８号に記載さ

れている。別のベクターは、ＢＣＧ（カルメット・ゲラン桿菌）である。ＢＣＧベクターは、Ｓｔｏｖｅｒ ｅｔ ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ ３５１：４５６－４６０（１９９１））に記載されている。抗原の治療的投与または免疫化に有用な、多種多様の他のワクチンベクター、例えば、チフス菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉ）ベクターなどが、本明細書における記載から当業者に明らかであろう。

【０２２０】

本明細書では、１つ以上のペイロード核酸配列を送達することができるアデノウイルスベクター送達組成物も開示する。ペイロード核酸配列は、目的の細胞に送達されることが望ましい任意の核酸配列とすることができる。一般的にペイロードは、核酸配列の発現を誘導するためのプロモーターに連結された核酸配列である。ペイロード核酸配列は、ポリペプチドをコードすることができる（すなわち、転写され、タンパク質に翻訳されることが可能な核酸配列）。一般的に、ペプチドをコードするペイロード核酸配列は、細胞内で発現されることが望ましい任意のタンパク質をコードすることができる。タンパク質の例としては、これらに限定されるものではないが、抗原（例えば、ＭＨＣクラスＩエピトープ、ＭＨＣクラスＩＩエピトープ、またはＢ細胞応答を刺激することが可能なエピトープ）、抗体、サイトカイン、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、Ｔ細胞受容体、またはゲノム編集システムの構成成分（例えば、ゲノム編集システムで使用されるヌクレアーゼ）が挙げられる。ゲノム編集システムとしては、これらに限定されるものではないが、ＣＲＩＳＰＲシステム、ジンクフィンガーシステム、またはＴＡＬＥＮシステムが挙げられる。ペイロード核酸配列は、非コード配列であってもよい（すなわち、転写はされうるがタンパク質に翻訳されない核酸配列）。一般的に、非コードペイロード核酸配列は、細胞内で発現されることが望ましい任意の非コードポリヌクレオチドをコードすることができる。非コードポリヌクレオチドの例としては、これらに限定されるものではないが、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）ポリヌクレオチド（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｈＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡなど）またはゲノム編集システムのポリヌクレオチド（例えば、ガイド［ｇＲＮＡ］、シングルガイドＲＮＡ［ｓｇＲＮＡ］、トランス活性化ＣＲＩＳＰＲ［ｔｒａｃｒＲＮＡ］、及び／またはＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ［ｃｒＲＮＡ］）が挙げられる。ペイロード核酸配列は、２個以上（例えば、２、３、４、５個以上）の異なるポリペプチド（例えば、互いに連結された２個以上の異なるエピトープ配列）をコードすることができるか、または２個以上の異なる非コード核酸配列（例えば、２個以上の異なるＲＮＡｉポリペプチド）を含むことができる。ペイロード核酸配列は、ポリペプチドコード核酸配列と非コード核酸配列との組み合わせを有してもよい。

【０２２１】

Ｖ．Ａ．１ カセット

１つ以上の抗原の選択に用いられる方法、「カセット」のクローニング及び構築、ならびにウイルスベクターへのその挿入は本明細書に与えられる教示を考慮すれば当該技術分野の範囲内である。カセットは、それぞれが独立して別個のプロモーターに機能的に連結されるか、かつ／または、２Ａリボソームスキッピング配列エレメント（例えば、Ｅ２Ａ、Ｐ２Ａ、Ｆ２Ａ、またはＴ２Ａ配列）または内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）配列エレメントなどの他のマルチシストロニックシステムを用いて互いに連結された複数のペイロード核酸配列を含むカセットなどの１つ以上のペイロード核酸配列を有することができる。複数のペイロード核酸配列を含むカセットにおいて、各ペイロード核酸配列は１つ以上のペイロードを含むことができる（例えば、各ペイロード核酸配列は２個以上のポリペプチドをコードするかまたは２個以上の非コード核酸配列を含むことができる）。カセットは、ポリペプチドコード核酸配列と非コード核酸配列との組み合わせを有してもよい。

【０２２２】

カセットは、抗原カセットとすることができる。「抗原カセット」とは、選択された抗原または複数の抗原と、この抗原（複数可）を転写し、転写産物を発現するために必要とされる他の調節エレメントとの組み合わせを意味する。抗原カセットは、１つ以上の抗原を含むことができる。選択された抗原または複数の抗原とは、異なるエピトープ配列を指

す場合がある（例えば、カセット内の抗原コード核酸配列は、エピトープが転写されて発現されるようにエピトープコード核酸配列（または複数のエピトープコード核酸配列）をコードすることができる）。

【０２２３】

ペイロード核酸配列または複数のペイロード核酸配列は、転写と可能とする形で調節要素に機能的に連結することができる。かかる要素としては、ウイルスベクターをトランスフェクトした細胞内で抗原（複数可）の発現を誘導することができる従来の調節エレメントが挙げられる。したがって、カセットは、ペイロード核酸配列（複数可）に連結され、組換えベクターの選択されたウイルス配列内に他の任意の調節エレメントとともに配置された選択されたプロモーターも含むことができる。

【０２２４】

有用なプロモーターは、発現させようとするペイロード核酸配列（複数可）の量、及び一般的にはコーディングペイロード核酸配列の場合ではペプチド（例えば抗原）の量の制御を可能とする構成的プロモーターまたは調節された（例えば、誘導性）プロモーターであってよい。例えば、望ましいプロモーターとして、サイトメガロウイルス最初期プロモーター／エンハンサーのものがある［例えば、Ｂｏｓｈａｒｔ ｅｔ ａｌ，Ｃｅｌｌ，４１：５２１－５３０（１９８５）を参照］。別の望ましいプロモーターとしては、ラウス肉腫ウイルスＬＴＲプロモーター／エンハンサーが挙げられる。さらに別のプロモーター／エンハンサー配列は、ニワトリβアクチンプロモーターである［Ｔ．Ａ．Ｋｏｓｔ ｅｔ ａｌ，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１１（２３）：８２８７（１９８３）］。当業者であれば、ＣＭＶ、ＳＶ４０、ＥＦ－１、ＲＳＶ、ＰＧＫ、ＨＳＡ、ＭＣＫまたはＥＢＶプロモーター配列などの他の適当な、または望ましいプロモーターも選択することができる。

【０２２５】

カセットは、転写産物の効率的なポリアデニル化（ポリ（Ａ）、ポリＡまたはｐＡ）のためのシグナルを与える配列ならびに機能的スプライスドナー及びアクセプター部位を含むイントロンを含む、ウイルスベクター配列に対して異種の核酸配列も含みうる。本明細書の例示的なベクターに用いられる一般的なポリＡ配列は、パポバウイルスＳＶ－４０由来のものである。ポリＡ配列は、ペイロード核酸配列の後で、ウイルスベクター配列の前にカセットに挿入することができる。一般的なイントロン配列もまたＳＶ－４０由来のものでよく、ＳＶ－４０Ｔイントロン配列と呼ばれる。カセットは、プロモーター／エンハンサー配列とペイロード核酸配列（複数可）との間に位置するイントロンを含んでもよい。これら及び他の一般的なベクターエレメントの選択は従来のものであり［例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ，“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ．Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．”，２ｄ ｅｄｉｔ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ， Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８９）及び本明細書に引用される参照文献を参照］、多くのかかる配列が商業的及び産業的供給元、ならびにＧｅｎｂａｎｋより入手可能である。

【０２２６】

カセットは、１つ以上のペイロード核酸配列を有することができる。例えば、特定のカセットは、１～１０個、１～２０個、１～３０個、１０～２０個、１５～２５個、１５～２０個、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、またはそれよりも多くのペイロード核酸配列を含むことができる。ペイロード核酸配列同士は互いに直接連結されてもよい。ペイロード核酸配列同士はリンカーによって互いに連結されてもよい。

【０２２７】

カセットは、ポリペプチドをコードする１つ以上のペイロード核酸配列を有することができる。例えば、特定のカセットは、ポリペプチドをコードする１～１０個、１～２０個、１～３０個、１０～２０個、１５～２５個、１５～２０個、１個、２個、３個、４個、

５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、またはそれよりも多くのペイロード核酸配列を含むことができる。カセットは、それぞれが異なるポリペプチドをコードする１つ以上のペイロード核酸配列を有することができる。カセットは、それぞれが１つ以上のポリペプチドをコードする１つ以上のペイロード核酸配列を有することができる。カセットは、１つ以上のポリペプチドをコードする１つ以上のペイロード核酸配列を有することができる。ペイロード核酸配列によってコードされるポリペプチドはＮ～ＣまたはＣ～Ｎを含む、互いに対して任意の方向とすることができる。

【０２２８】

抗原カセットは、１つ以上の抗原を有することができる。例えば、特定のカセットは、１～１０個、１～２０個、１～３０個、１０～２０個、１５～２５個、１５～２０個、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、またはそれよりも多くの抗原を含むことができる。抗原同士は互いに直接連結されてもよい。抗原同士はリンカーによって互いに連結されてもよい。抗原は、Ｎ～ＣまたはＣ～Ｎを含む、互いに対して任意の方向とすることができる。

【０２２９】

上記に述べたように、カセットは、選択することができるものの中でもとりわけ、例えばＥ１遺伝子領域の欠失、またはＥ３遺伝子領域の欠失などのウイルスベクター内の任意の選択された欠失部位内に配置することができる。

【０２３０】

カセットは、５’から３’に向けて各要素の順序付けられた配列を記述する下式を用いて記述することができる。すなわち、

$$(P_a-(L5_b-N_c-L3_d)_X)_Z-(P2_h-(G5_e-U_f)_Y)_W-G3_g$$

【０２３１】

[式中、Ｐ及びＰ２は、プロモーター核酸配列を含み、Ｎは、異なるエピトープコード核酸配列を含み、Ｌ５は、５’リンカー配列を含み、Ｌ３は、３’リンカー配列を含み、Ｇ５は、アミノ酸リンカーをコードする核酸配列を含み、Ｇ３は、アミノ酸リンカーをコードする少なくとも１つの核酸配列のうちの１つを含み、Ｕは、ＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列を含み、ただし、各Ｘについて、対応するＮｃは、エピトープコード核酸配列であり、各Ｙについて、対応するＵｆは、抗原コード核酸配列である]。組成物及び順序付けられた配列は、存在する要素の数を選択することによってさらに定義することができ、例えば、ａ＝０または１である場合、ｂ＝０または１である場合、ｃ＝１である場合、ｄ＝０または１である場合、ｅ＝０または１である場合、ｆ＝１である場合、ｇ＝０または１である場合、ｈ＝０または１である場合、Ｘ＝１～４００であり、Ｙ＝０、１、２、３、４または５であり、Ｚ＝１～４００であり、かつＷ＝０、１、２、３、４または５である。

【０２３２】

１つの例では、存在する要素は、ａ＝０、ｂ＝１、ｄ＝１、ｅ＝１、ｇ＝１、ｈ＝０、Ｘ＝１０、Ｙ＝２、Ｚ＝１、かつＷ＝１であり、さらなるプロモーターが存在しない場合が記述される場合（すなわち、ＲＮＡアルファウイルス骨格によって与えられるプロモーター核酸配列のみが存在する）、２０個のＭＨＣクラスＩエピトープが存在し、各Ｎについて５’リンカーが存在し、各Ｎについて３’リンカーが存在し、２個のＭＨＣクラスＩＩエピトープが存在し、２個のＭＨＣクラスＩＩエピトープを連結するリンカーが存在し、２個のＭＨＣクラスＩＩエピトープの５’末端を最後のＭＨＣクラスＩエピトープの３’リンカーに連結するリンカーが存在し、２個のＭＨＣクラスＩＩエピトープの３’末端をＲＮＡアルファウイルス骨格に連結するリンカーが存在する。カセットの３’末端の、ＲＮＡアルファウイルス骨格との連結の例としては、３’の１９ｎｔのＣＳＥのような、ＲＮＡアルファウイルス骨格によって与えられる３’ＵＴＲ要素に直接連結することが挙げられる。カセットの５’末端の、ＲＮＡアルファウイルス骨格との連結の例としては、２６Ｓプロモー

ター配列、アルファウイルスの５’ＵＴＲ、５１ｎｔのＣＳＥ、または２４ｎｔのＣＳＥに直接連結することが挙げられる。

【０２３３】

他の例としては、ａ＝１であり、ＲＮＡアルファウイルス骨格によって与えられるプロモーター核酸配列以外のプロモーターが存在する場合が記述される場合；ａ＝１かつＺが１よりも大きく、それぞれが１つ以上の異なるＭＨＣクラスＩエピトープコード核酸配列の発現をもたらす、ＲＮＡアルファウイルス骨格によって与えられるプロモーター核酸配列以外の複数のプロモーターが存在する場合；ｈ＝１であり、ＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列の発現をもたらす別のプロモーターが存在することが記述される場合；及び、ｇ＝０であり、ＭＨＣクラスＩＩ抗原コード核酸配列（存在する場合）がＲＮＡアルファウイルス骨格に直接連結される場合などが挙げられる。

【０２３４】

他の例としては、存在する各ＭＨＣクラスＩエピトープが、５’リンカーを有する、３’リンカーを有する、どちらも有さない、または両方を有する場合が挙げられる。複数のＭＨＣクラスＩエピトープが同じカセット内に存在する例では、一部のＭＨＣクラスＩエピトープが５’リンカー及び３’リンカーの両方を有してよく、他のＭＨＣクラスＩエピトープが、５’リンカーまたは３’リンカーを有するか、またはどちらも有さなくてもよい。複数のＭＨＣクラスＩエピトープが同じカセット内に存在するその他の例では、一部のＭＨＣクラスＩエピトープが５’リンカーまたは３’リンカーのどちらかを有してよく、他のＭＨＣクラスＩエピトープが５’リンカーまたは３’リンカーを有するか、またはどちらも有さなくてもよい。

【０２３５】

複数のＭＨＣクラスＩＩエピトープが同じカセット内に存在する例では、一部のＭＨＣクラスＩＩエピトープが５’リンカー及び３’リンカーの両方を有してよく、他のＭＨＣクラスＩＩエピトープが５’リンカーまたは３’リンカーを有するか、またはどちらも有さなくてもよい。複数のＭＨＣクラスＩＩエピトープが同じカセット内に存在するその他の例では、一部のＭＨＣクラスＩＩエピトープが５’リンカーまたは３’リンカーのどちらかを有してよく、他のＭＨＣクラスＩＩエピトープが５’リンカーまたは３’リンカーを有するか、またはどちらも有さなくてもよい。

【０２３６】

プロモーター核酸配列Ｐ及び／またはＰ２は、ＲＮＡアルファウイルス骨格によって与えられるプロモーター核酸配列と同じであってよい。例えば、ＲＮＡアルファウイルス骨格によって与えられるプロモーター配列であるＰｎ及びＰ２が、それぞれ２６Ｓのサブゲノミックプロモーターを含むことができる。プロモーター核酸配列Ｐ及び／またはＰ２は、ＲＮＡアルファウイルス骨格によって与えられるプロモーター核酸配列と異なっていてもよく、また、互いと異なっていてもよい。

【０２３７】

５’リンカーＬ５は、天然配列または非天然配列であってよい。非天然配列としては、これらに限定されるものではないが、ＡＡＹ、ＲＲ、及びＤＰＰが挙げられる。３’リンカーＬ３もまた、天然配列または非天然配列であってよい。さらに、Ｌ５及びＬ３は、いずれも天然配列であってよく、いずれも非天然配列であってよく、または一方が天然で他方が非天然であってもよい。各Ｘについて、アミノ酸リンカーは、アミノ酸２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、２１個、２２個、２３個、２４個、２５個、２６個、２７個、２８個、２９個、３０個、３１個、３２個、３３個、３４個、３５個、３６個、３７個、３８個、３９個、４０個、４１個、４２個、４３個、４４個、４５個、４６個、４７個、４８個、４９個、５０個、５１個、５２個、５３個、５４個、５５個、５６個、５７個、５８個、５９個、６０個、６１個、６２個、６３個、６４個、６５個、６６個、６７個、６８個、６９個、７０個、７１個、７２個、７３個、７４個、７５個、７６個、７７個、７８個、７９個、８０個、８１個、８２個、８３個、８４個、８５個、

８６個、８７個、８８個、８９個、９０個、９１個、９２個、９３個、９４個、９５個、９６個、９７個、９８個、９９個、１００個、またはそれ以上の長さであってよい。各Ｘについて、アミノ酸リンカーはまた、アミノ酸が少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１１個、少なくとも１２個、少なくとも１３個、少なくとも１４個、少なくとも１５個、少なくとも１６個、少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、少なくとも２０個、少なくとも２１個、少なくとも２２個、少なくとも２３個、少なくとも２４個、少なくとも２５個、少なくとも２６個、少なくとも２７個、少なくとも２８個、少なくとも２９個、または少なくとも３０個の長さであってもよい。

【０２３８】

各Ｙについて、アミノ酸リンカーＧ５は、アミノ酸２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、２１個、２２個、２３個、２４個、２５個、２６個、２７個、２８個、２９個、３０個、３１個、３２個、３３個、３４個、３５個、３６個、３７個、３８個、３９個、４０個、４１個、４２個、４３個、４４個、４５個、４６個、４７個、４８個、４９個、５０個、５１個、５２個、５３個、５４個、５５個、５６個、５７個、５８個、５９個、６０個、６１個、６２個、６３個、６４個、６５個、６６個、６７個、６８個、６９個、７０個、７１個、７２個、７３個、７４個、７５個、７６個、７７個、７８個、７９個、８０個、８１個、８２個、８３個、８４個、８５個、８６個、８７個、８８個、８９個、９０個、９１個、９２個、９３個、９４個、９５個、９６個、９７個、９８個、９９個、１００個、またはそれ以上の長さであってよい。各Ｙについて、アミノ酸リンカーはまた、アミノ酸が少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１１個、少なくとも１２個、少なくとも１３個、少なくとも１４個、少なくとも１５個、少なくとも１６個、少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、少なくとも２０個、少なくとも２１個、少なくとも２２個、少なくとも２３個、少なくとも２４個、少なくとも２５個、少なくとも２６個、少なくとも２７個、少なくとも２８個、少なくとも２９個、または少なくとも３０個の長さであってもよい。

【０２３９】

アミノ酸リンカーＧ３は、アミノ酸２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、２１個、２２個、２３個、２４個、２５個、２６個、２７個、２８個、２９個、３０個、３１個、３２個、３３個、３４個、３５個、３６個、３７個、３８個、３９個、４０個、４１個、４２個、４３個、４４個、４５個、４６個、４７個、４８個、４９個、５０個、５１個、５２個、５３個、５４個、５５個、５６個、５７個、５８個、５９個、６０個、６１個、６２個、６３個、６４個、６５個、６６個、６７個、６８個、６９個、７０個、７１個、７２個、７３個、７４個、７５個、７６個、７７個、７８個、７９個、８０個、８１個、８２個、８３個、８４個、８５個、８６個、８７個、８８個、８９個、９０個、９１個、９２個、９３個、９４個、９５個、９６個、９７個、９８個、９９個、１００個、またはそれ以上の長さであってよい。Ｇ３はまた、アミノ酸が少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１１個、少なくとも１２個、少なくとも１３個、少なくとも１４個、少なくとも１５個、少なくとも１６個、少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、少なくとも２０個、少なくとも２１個、少なくとも２２個、少なくとも２３個、少なくとも２４個、少なくとも２５個、少なくとも２６個、少なくとも２７個、少なくとも２８個、少なくとも２９個、または少なくとも３０個の長さであってもよい。

【０２４０】

各Ｘについて、各Ｎは、アミノ酸７～１５個の長さのＭＨＣクラスＩエピトープをコードすることができる。各Ｘについて、各Ｎは、アミノ酸５個、６個、７個、８個、９個、

１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、２１個、２２個、２３個、２４個、２５個、２６個、２７個、２８個、２９個、または３０個の長さのＭＨＣクラスＩエピトープをコードしてもよい。各Ｘについて、各Ｎはまた、アミノ酸が、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１１個、少なくとも１２個、少なくとも１３個、少なくとも１４個、少なくとも１５個、少なくとも１６個、少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、少なくとも２０個、少なくとも２１個、少なくとも２２個、少なくとも２３個、少なくとも２４個、少なくとも２５個、少なくとも２６個、少なくとも２７個、少なくとも２８個、少なくとも２９個、または少なくとも３０個の長さのＭＨＣクラスＩエピトープをコードしてもよい。

【０２４１】

ペイロード核酸配列をコードするカセットは、７００ヌクレオチド以下であってよい。ペイロード核酸配列をコードするカセットは、７００ヌクレオチド以下であってよく、２個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。ペイロード核酸配列をコードするカセットは、７００ヌクレオチド以下であってよく、少なくとも２個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。ペイロード核酸配列をコードするカセットは、７００ヌクレオチド以下であってよく、３個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。ペイロード核酸配列をコードするカセットは、７００ヌクレオチド以下であってよく、少なくとも３個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。ペイロード核酸配列をコードするカセットは、７００ヌクレオチド以下であってよく、１～１０個、１～５個、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個、またはそれよりも多い抗原を含むことができる。

【０２４２】

ペイロード核酸配列をコードするカセットは、３７５～７００ヌクレオチドの長さであってよい。ペイロード核酸配列をコードするカセットは、３７５～７００ヌクレオチドの長さであってよく、２個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。ペイロード核酸配列をコードするカセットは、３７５～７００ヌクレオチドの長さであってよく、少なくとも２個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。ペイロード核酸配列をコードするカセットは、３７５～７００ヌクレオチドの長さであってよく、３個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。ペイロード核酸配列をコードするカセットは、３７５～７００ヌクレオチドの長さであってよく、少なくとも３個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることできる。ペイロード核酸配列をコードするカセットは、３７５～７００ヌクレオチドの長さであってよく、１～１０個、１～５個、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個、またはそれよりも多い抗原を含むことができる。

【０２４３】

ペイロード核酸配列をコードするカセットは、６００、５００、４００、３００、２００、または１００ヌクレオチドの長さであってよい。ペイロード核酸配列をコードするカセットは、６００、５００、４００、３００、２００、または１００ヌクレオチドの長さであってよく、２個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。ペイロード核酸配列をコードするカセットは、６００、５００、４００、３００、２００、または１００ヌクレオチドの長さであってよく、少なくとも２個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。ペイロード核酸配列をコードするカセットは、６００、５００、４００、３００、２００、または１００ヌクレオチドの長さであってよく、３個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。ペイロード核酸配列をコードするカセットは、６００、５００、４００、３００、２００、または１００ヌクレオチドの長さであってよく、少なくとも３個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。ペイロード核酸配列をコードするカセットは、６００、５００、４００、３００、２００、または１００ヌクレオチド以下の長さであってよく、１～１０個、１～５個、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個、またはそれよりも多い抗原

を含むことができる。
【０２４４】
ペイロード核酸配列をコードするカセットは、３７５～６００、３７５～５００、または３７５～４００ヌクレオチドの長さであってよい。ペイロード核酸配列をコードするカセットは、３７５～６００、３７５～５００、または３７５～４００ヌクレオチドの長さであってよく、２個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。ペイロード核酸配列をコードするカセットは、３７５～６００、３７５～５００、または３７５～４００ヌクレオチドの長さであってよく、少なくとも２個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。ペイロード核酸配列をコードするカセットは、３７５～６００、３７５～５００、または３７５～４００ヌクレオチドの長さであってよく、３個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。ペイロード核酸配列をコードするカセットは、３７５～６００、３７５～５００、または３７５～４００ヌクレオチドの長さであってよく、少なくとも３個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。ペイロード核酸配列をコードするカセットは、３７５～６００、３７５～５００、または３７５～４００ヌクレオチドの長さであってよく、１～１０個、１～５個、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個、またはそれよりも多い抗原を含むことができる。
【０２４５】
Ｖ．Ａ．２ ＴＥＴプロモーターシステム
本明細書では、ＴＥＴ－ＯｎシステムまたはＴＥＴ－ＯｆｆシステムのようなＴＥＴプロモーターシステムである調節可能なプロモーターに機能的に連結された少なくとも１つのペイロード配列を有するカセットを含むウイルスベクターも開示する。理論に束縛されることを望まずに言えば、ＴＥＴプロモーターシステムを用いることで、ウイルス生産時における、ワクチンカセットにコードされた抗原などのカセットにコードされたペイロード核酸配の転写を最小限に抑えることができる。ＴＥＴプロモーターシステムは、テトラサイクリン（ＴＥＴ）リプレッサータンパク質（ＴＥＴｒ）により制御されるプロモーターを含むことができる。したがって、本明細書では、テトラサイクリン（ＴＥＴ）リプレッサータンパク質（ＴＥＴｒ）により制御されるプロモーターに機能的に連結された少なくとも１つのペイロード配列を有するカセットを含むウイルスベクターも開示される。ＴＥＴｒ配列（ｔＴＳ）は、配列番号６３に示され、かつ／または配列番号６２に示されるヌクレオチド配列によりコードされたアミノ酸配列を含むことができる。ＴＥＴｒ制御プロモーターは、１９ｂｐのＴＥＴオペレーター（ＴＥＴｏ）配列ＴＣＣＣＴＡＴＣＡＧＴＧＡＴＡＧＡＧＡ（配列番号６０）を含むことができる。ＴＥＴｒ制御プロモーターは、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個またはそれ以上のＴＥＴｏ核酸配列を含むことができる。２個以上のＴＥＴｏ核酸配列を有するＴＥＴｒ制御プロモーターでは、ＴＥＴｏ配列同士は互いに連結されてもよい。２個以上のＴＥＴｏ核酸配列を有するＴＥＴｒ制御プロモーターでは、ＴＥＴｏ配列同士は互いに直接連結されてもよい。２個以上のＴＥＴｏ核酸配列を有するＴＥＴｒ制御プロモーターでは、ＴＥＴｏ配列同士は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個以上のヌクレオチドを有するリンカー配列などのリンカー配列によって互いに連結されてもよい。１つの例では、リンカー配列は配列番号６１に示されるリンカーヌクレオチド配列を有する。一般的に、ＴＥＴｒ制御プロモーターは、ＳＶ４０、ＥＦ－１、ＲＳＶ、ＰＧＫ、ＨＳＡ、ＭＣＫまたはＥＢＶプロモーター配列などの任意の望ましいプロモーター配列を用いることができる。ＴＥＴｒ制御プロモーターはＣＭＶプロモーター配列を用いることができる。ＴＥＴｒ制御プロモーターは最小ＣＭＶプロモーター配列を用いることができる。ＴＥＴｏ配列は、ＲＮＡポリメラーゼが結合するプロモーター配列領域の上流（５’）にあってよい。例示的な１つの例では、７個のＴＥＴｏ配列が、プロモーター配列の上流（５’）にある。ＴＥＴｏ配列がプロモーター配列領域の上流にある、少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結されたＴＥＴｒ制御プロモーターは、５’から３’に向けて下式に記述される順序付けられた配列を有することが

できる。すなわち、
（Ｔ－Ｌ$_{Y}$）$_{X}$－Ｐ－Ｎ
式中、Ｎは、ペイロード核酸配列であり、Ｐは、ペイロード核酸配列に機能的に連結されたプロモーター配列のＲＮＡポリメラーゼ結合配列であり、Ｔは、配列番号６０に示されるヌクレオチド配列を含むＴＥＴｏ核酸配列であり、Ｌは、リンカー配列であり、ただし、各ＸについてＹ＝０または１であり、Ｘ＝１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０である。例示的な１つの例では、各ＸについてＸ＝７かつＹ＝１とは、７個のＴＥＴｏ配列がプロモーター配列の上流（５’）にあり、各ＴＥＴｏ配列がリンカーによって分離されている場合を記述している。

【０２４６】

ＴＥＴｏ配列は、ＲＮＡポリメラーゼが結合するプロモーター配列領域の下流（３’）にあってもよい。別の例示的な例では、２個のＴＥＴｏ配列が、プロモーター配列の下流（３’）にある。ＴＥＴｏ配列がプロモーター配列領域の下流にある、少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結されたＴＥＴｒ制御プロモーターは、５’から３’に向けて下式に記述される順序付けられた配列を有することができる。すなわち、
Ｐ－（Ｔ－Ｌ$_{Y}$）$_{X}$－Ｎ
式中、Ｎは、ペイロード核酸配列であり、Ｐは、ペイロード核酸配列に機能的に連結されたプロモーター配列のＲＮＡポリメラーゼ結合配列であり、Ｔは、配列番号６０に示されるヌクレオチド配列を含むＴＥＴｏ核酸配列であり、Ｌは、リンカー配列であり、ただし、各ＸについてＹ＝０または１であり、Ｘ＝１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０である。例示的な１つの例では、各ＸについてＸ＝２かつＹ＝１とは、２個のＴＥＴｏ配列がプロモーター配列の下流（３’）にあり、各ＴＥＴｏ配列がリンカーによって分離されている場合を記述している。

【０２４７】

ＴＥＴｒ制御プロモーターを有するベクターのウイルス生産では、ＴＥＴｒ配列（ｔＴＳ）を発現するように操作された２９３細胞株またはその誘導株（例えば、２９３Ｆ細胞）など、ｔＴＳを発現するように操作されたあらゆるウイルス産生細胞株を使用することができる。ｔＴＳ発現細胞内でのＴＥＴｒ制御プロモーターを有するベクターのウイルス生産により、ウイルス生産を改善することができる。ｔＴＳ発現細胞内でのＴＥＴｒ制御プロモーターを有するベクターのウイルス生産により、感染単位（ＩＵ）当たりのウイルス粒子（ＶＰ）として定義されるウイルス感染性を改善することができる。ｔＴＳ発現細胞内でのＴＥＴｒ制御プロモーターを有するベクターのウイルス生産により、非ｔＴＳ発現細胞内での生産と比較してウイルス生産及び／またはウイルス感染性を少なくとも１．５、少なくとも２、少なくとも２．５、少なくとも３、少なくとも３．５、少なくとも４、少なくとも４．５、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、または少なくとも１０倍改善することができる。ｔＴＳ発現細胞内でのＴＥＴｒ制御プロモーターを有するベクターのウイルス生産により、非ｔＴＳ発現細胞内での生産と比較してウイルス生産及び／またはウイルス感染性を少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも３５、少なくとも４０、少なくとも４５、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも８０、少なくとも９０、または少なくとも１００倍改善することができる。ｔＴＳ発現細胞内でのＴＥＴｒ制御プロモーターを有するベクターのウイルス生産により、ＴＥＴｒ制御プロモーターを有さないベクターの生産と比較してウイルス生産及び／またはウイルス感染性を少なくとも１．５、少なくとも２、少なくとも２．５、少なくとも３、少なくとも３．５、少なくとも４、少なくとも４．５、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、または少なくとも１０倍改善することができる。ｔＴＳ発現細胞内でのＴＥＴｒ制御プロモーターを有するベクターのウイルス生産により、ＴＥＴｒ制御プロモーターを有さないベクターの生産と比較してウイルス生産及び／またはウイルス感染性を少

なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも３５、少なくとも４０、少なくとも４５、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも８０、少なくとも９０、または少なくとも１００倍改善することができる。

【０２４８】

Ｖ．Ｂ．免疫チェックポイント

本明細書に記載されるベクター、例えば本明細書に記載されるＣ６８ベクター、または本明細書に記載されるアルファウイルスベクターは少なくとも１つの抗原をコードする核酸を含むことができ、また、同じまたは別のベクターが、免疫チェックポイント分子に結合してその活性を遮断する少なくとも１つの免疫調節因子（例えばｓｃＦｖなどの抗体）をコードする核酸を含むことができる。ベクターは、カセットと、チェックポイント阻害剤をコードする１つ以上の核酸分子とを含むことができる。

【０２４９】

遮断または阻害するための標的となりうる例示的な免疫チェックポイント分子としては、これらに限定されるものではないが、ＣＴＬＡ－４、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、４－１ＢＢＬ（ＣＤ１３７Ｌ）、ＰＤＬ１、ＰＤＬ２、ＰＤ１、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＢＴＬＡ、ＨＶＥＭ、ＴＩＭ３、ＧＡＬ９、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、Ｂ７Ｈ３、Ｂ７Ｈ４、ＶＩＳＴＡ、ＫＩＲ、２Ｂ４（ＣＤ２ファミリーの分子に属し、すべてのＮＫ（γδ）及びメモリーＣＤ８＋（αβ）Ｔ細胞で発現する）、ＣＤ１６０（ＢＹ５５とも呼ばれる）、及びＣＧＥＮ－１５０４９が挙げられる。免疫チェックポイント阻害剤には、ＣＴＬＡ－４、ＰＤＬ１、ＰＤＬ２、ＰＤ１、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＢＴＬＡ、ＨＶＥＭ、ＴＩＭ３、ＧＡＬ９、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、Ｂ７Ｈ３、Ｂ７Ｈ４、ＶＩＳＴＡ、ＫＩＲ、２Ｂ４、ＣＤ１６０、及びＣＧＥＮ－１５０４９の１つ以上に結合してその活性を遮断または阻害する抗体、またはその抗原結合フラグメント、または他の結合タンパク質が挙げられる。例示的な免疫チェックポイント阻害剤としては、トレメリムマブ（ＣＴＬＡ－４遮断抗体）、抗ＯＸ４０、ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体（抗Ｂ７－Ｈ１；ＭＥＤＩ４７３６）、イピリムマブ、ＭＫ－３４７５（ＰＤ－１ｂｌｏｃｋｅｒ）、ニボルマブ（抗ＰＤ１抗体）、ＣＴ－０１１（抗ＰＤ１抗体）、ＢＹ５５モノクローナル抗体、ＡＭＰ２２４（抗ＰＤＬ１抗体）、ＢＭＳ－９３６５５９（抗ＰＤＬ１抗体）、ＭＰＬＤＬ３２８０Ａ（抗ＰＤＬ１抗体）、ＭＳＢ００１０７１８Ｃ（抗ＰＤＬ１抗体）、及びヤーボイ／イピリムマブ（抗ＣＴＬＡ－４チェックポイント阻害剤）が挙げられる。抗体をコードする配列は、当該技術分野における通常の技能を用いてベクターに操作により組み込むことができる。例示的な方法の１つが、あらゆる目的で参照により本明細書に援用する、Ｆａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｓｔａｂｌｅ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ａｔ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｌｅｖｅｌｓ ｕｓｉｎｇ ｔｈｅ ２Ａ ｐｅｐｔｉｄｅ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００５ Ｍａｙ；２３（５）：５８４－９０．Ｅｐｕｂ ２００５ Ａｐｒ １７；に記載されている。

【０２５０】

Ｖ．Ｃ．ワクチン設計及び製造のさらなる考慮事項

Ｖ．Ｃ．１．すべての腫瘍サブクローンをカバーするペプチドのセットの決定

すべてのまたは大部分の腫瘍サブクローンによって提示されるものを意味するトランカルペプチド（ｔｒｕｎｃａｌ ｐｅｐｔｉｄｅ）が、ワクチン中への包含について優先される[53]。任意で、高い確率で提示されかつ免疫原性であることが予測されるトランカルペプチドがない場合、または、高い確率で提示されかつ免疫原性であることが予測されるトランカルペプチドの数が、追加的な非トランカルペプチドをワクチンに含めることができるほど少ない場合には、腫瘍サブクローンの数及び同一性を推定すること、及びワクチンによってカバーされる腫瘍サブクローンの数を最大化するようにペプチドを選ぶことによって、さらなるペプチドを優先順位付けすることができる[54]。

【０２５１】

Ｖ．Ｃ．２．抗原の優先順位決定

上記の抗原フィルターのすべてを適用した後、ワクチン技術が対応できるよりも多くの

候補抗原が、依然としてワクチン包含に利用可能である可能性がある。追加的に、抗原解析の種々の態様についての不確定度が残っている可能性があり、候補ワクチン抗原の様々な性状の間にトレードオフが存在する可能性がある。したがって、選択プロセスの各段階でのあらかじめ決定されたフィルターの代わりに、少なくとも以下の軸を有する空間に候補抗原を置き、積分アプローチを用いて選択を最適化する、積分多次元モデルを考えることができる。

１．　自己免疫または寛容のリスク（生殖細胞系列のリスク）（より低い自己免疫のリスクが、典型的に好ましい）

２．　シークエンシングアーチファクトの確率（より低いアーチファクトの確率が、典型的に好ましい）

３．　免疫原性の確率（より高い免疫原性の確率が、典型的に好ましい）

４．　提示の確率（より高い提示の確率が、典型的に好ましい）

５．　遺伝子発現（より高い発現が、典型的に好ましい）

６．　ＨＬＡ遺伝子のカバレッジ（抗原のセットの提示に関与する、より多い数のＨＬＡ分子は、腫瘍が、ＨＬＡ分子の下方制御または変異を介して免疫攻撃を回避するであろう確率を低くする可能性がある）

７．ＨＬＡクラスのカバレッジ（ＨＬＡ－Ｉ及びＨＬＡ－ＩＩの両方をカバーすることで、治療応答の確率が高まり、腫瘍の免疫回避の確率が低くなる可能性がある）

【０２５２】

さらに、場合によっては、抗原が患者の腫瘍または感染細胞のすべてまたは一部において喪失するかまたは不活性化されたＨＬＡアレルによって提示されることが予想される場合には、これらの新生抗原のワクチン接種における優先順位を下げる（例えば除外）することができる。ＨＬＡアレルの喪失は、体細胞変異、ヘテロ接合性の喪失、または遺伝子座のホモ接合欠失のいずれかによって生じうる。ＨＬＡアレルの体細胞変異の検出方法は当該技術分野では周知のものである（例えば、Ｓｈｕｋｌａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１５）。体細胞ＬＯＨ及びホモ接合欠失（ＨＬＡ遺伝子座を含む）の検出方法についても同様に述べられている（Ｃａｒｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２；ＭｃＧｒａｎａｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７；Ｖａｎ　Ｌｏｏ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０）。抗原は、質量分析データが、予測された抗原が予測されたＨＬＡアレルによって提示されないことを示す場合には優先順位付けを外してもよい。

【０２５３】

Ｖ．Ｄ．アルファウイルス

Ｖ．Ｄ．１．アルファウイルスの生物学

アルファウイルスは、トガウイルス科のメンバーであり、一本鎖プラス鎖ＲＮＡウイルスである。メンバーは、一般的に、シンドビス、ロスリバー、マヤロ、チクングニア、及びセムリキ森林ウイルスなどの旧世界型、または、東部ウマ脳炎ウイルス、アウラ、フォートモルガン、もしくはベネズエラウマ脳炎ウイルス及びその誘導株ＴＣ－８３などの新世界型に分類される（Ｓｔｒａｕｓｓ　Ｍｉｃｒｏｂｒｉａｌ　Ｒｅｖｉｅｗ　１９９４）。天然のアルファウイルスゲノムは、通常、長さ約１２ｋｂであり、その最初の２／３は、ウイルスゲノムを自己複製するためのＲＮＡ複製複合体を形成する非構造タンパク質（ｎｓＰ）をコードする遺伝子を含んでおり、最後の１／３は、ビリオンを産生するための構造タンパク質をコードするサブゲノム発現カセットを含んでいる（Ｆｒｏｌｏｖ　ＲＮＡ　２００１）。

【０２５４】

アルファウイルスのモデル生活環は、複数の異なるステップを含む（Ｓｔｒａｕｓｓ　Ｍｉｃｒｏｂｒｉａｌ　Ｒｅｖｉｅｗ　１９９４，Ｊｏｓｅ　Ｆｕｔｕｒｅ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ　２００９）。宿主細胞にウイルスが吸着した後、ビリオンが細胞内区画内の膜と融合し、最終的にゲノムＲＮＡをサイトゾル中に放出する。プラス鎖の向きを有し、５’メチルグアニル酸キャップ及び３’ポリＡテールを有するゲノムＲＮＡは、翻訳されて非構造タンパク質ｎｓＰ１－４を生成し、これが複製複合体を形成する。感染初期には、プラス

鎖はこの複合体によってマイナス鎖の鋳型に複製される。現在のモデルでは、複製複合体は感染が進行するにつれてさらにプロセシングされ、生じたプロセス後の複合体はマイナス鎖の完全長プラス鎖ゲノムＲＮＡ及び構造遺伝子を含む２６Ｓのサブゲノムプラス鎖ＲＮＡへの転写に切り替わる。アルファウイルスのいくつかの保存配列エレメント（ＣＳＥ）が、マイナス鎖鋳型からのプラス鎖ＲＮＡの複製における５’ＵＴＲの相補体、ゲノム鋳型からのマイナス鎖合成の複製における５１ｎｔのＣＳＥ、マイナス鎖からのサブゲノムＲＮＡの転写におけるｎｓＰと２６Ｓ　ＲＮＡとのジャンクション領域内の２４ｎｔのＣＳＥ、及び、プラス鎖鋳型からのマイナス鎖合成における３’の１９ｎｔのＣＳＥを含む様々なＲＮＡ合成ステップにおいて潜在的に一定の役割を担っているものとして同定されている。

【０２５５】

ウイルスの自然の生活環では、異なるＲＮＡ種の複製後、ウイルス粒子が通常、アセンブルされる。２６Ｓ　ＲＮＡは翻訳され、生じたタンパク質はさらにプロセシングされて、カプシドタンパク質、糖タンパク質Ｅ１及びＥ２、ならびに２種類の小ポリペプチドＥ３及び６Ｋを含む構造タンパク質を生成する（Ｓｔｒａｕｓｓ　１９９４）。ウイルス粒子のカプシド形成が生じ、通常はゲノムＲＮＡのみに特異的なカプシドタンパク質がパッケージングされた後、ビリオンがアセンブルされ、膜表面に出芽する。

【０２５６】

Ｖ．Ｄ．２．送達ベクターとしてのアルファウイルス

アルファウイルス（アルファウイルス配列、特徴、及び、他の要素）を使用してアルファウイルスベースの送達ベクター（アルファウイルスベクター、アルファウイルスウイルスベクター、アルファウイルスワクチンベクター、自己複製ＲＮＡ（ｓｒＲＮＡ）ベクター、または自己増幅ＲＮＡ（ｓａｍＲＮＡ）ベクターとも称される）を作製することができる。アルファウイルスは、発現ベクター系として使用するために従来、遺伝子操作がなされている（Ｐｕｓｈｋｏ　１９９７，Ｒｈｅｍｅ　２００４）。アルファウイルスは、異種抗原の発現が望ましい場合があるワクチン設定においていくつかの長所を有する。アルファウイルスは、宿主のサイトゾル中で自己複製するその能力のため、細胞内の発現カセットの高いコピー数を一般的に得ることができることから、高いレベルの異種抗原の産生を実現することができる。さらに、ベクターは一般的に一過性であるため、バイオセーフティーが高く、ベクターに対する免疫寛容の誘導は低い。また、一般公衆は、一般的にヒトアデノウイルスのような他の標準的ウイルスベクターと比較してアルファウイルスに対する既存の免疫を有していない。アルファウイルスに基づくベクターはまた、感染細胞に対する細胞毒性反応を一般的に生じる。細胞毒性は、発現された異種抗原に対して免疫応答を適性に誘発するためにワクチン設定においてある程度の重要性を有しうる。しかしながら、所望の細胞毒性の程度はバランスの問題であり、そのため、ＶＥＥのＴＣ－８３株をはじめとするいくつかの弱毒化されたアルファウイルスが開発されている。したがって、本明細書に記載される抗原発現ベクターの一例では、高いレベルの抗原発現を可能とし、抗原に対する強い免疫応答を誘発し、ベクター自体に対する免疫応答は誘発せず、安全に使用することができるアルファウイルス骨格を用いることができる。さらに、抗原発現カセットは、ベクターが、ＶＥＥまたはその弱毒化誘導株ＴＣ－８３に由来する配列を含む（ただしこれらに限定されない）どのアルファウイルス配列を用いるかを最適化することを通じて異なるレベルの免疫応答を誘発するように設計することができる。

【０２５７】

アルファウイルス配列を用いたいくつかの発現ベクターの設計戦略が開発されている（Ｐｕｓｈｋｏ　１９９７）。１つの戦略では、アルファウイルスベクターの設計は、構造タンパク質遺伝子の下流に２６Ｓプロモーター配列因子の第２のコピーを挿入した後、異種遺伝子を挿入することを含む（Ｆｒｏｌｏｖ　１９９３）。これにより、天然の非構造及び構造タンパク質以外に、さらなる異種タンパク質を発現するサブゲノムＲＮＡが産生される。このシステムでは、感染性ビリオンを産生するためのすべての因子が存在し、したがって、非感染細胞において発現ベクターの繰り返しの感染のラウンドが行われうる。

【０２５８】
別の発現ベクターの設計では、ヘルパーウイルスシステムを利用する（Ｐｕｓｈｋｏ　１９９７）。この戦略では、構造タンパク質は異種遺伝子によって置換される。したがって、依然としてインタクトな非構造遺伝子によって媒介されるウイルスＲＮＡの自己複製の後、２６Ｓサブゲノムの発現をもたらす。従来、構造タンパク質を発現するさらなるベクターが、例えば、細胞株の同時トランスフェクションなどによってイン・トランスで与えられることで感染性ウイルスを生じる。１つのシステムが米国特許第８，０９３，０２１号に記載されており、当該特許の全容をあらゆる目的で参照によって本明細書に援用する。ヘルパーベクターシステムは、感染性粒子を形成する可能性を制限するという長所をもたらし、したがってバイオセーフティーを改善する。さらに、ヘルパーベクターシステムは、全ベクター長を短縮し、複製及び発現の効率を改善する可能性がある。したがって、本明細書に記載される抗原発現ベクターの一例では、構造タンパク質がカセットで置換されたアルファウイルス骨格を用いることができ、得られるベクターはバイオセーフティーの問題が低減されるのと同時に全体的な発現ベクターのサイズの減少により、効率的な発現を促進する。
【０２５９】
Ｖ．Ｄ．３．インビトロでのアルファウイルスの生成
アルファウイルス送達ベクターは、一般的に、プラス鎖のＲＮＡポリヌクレオチドである。ＲＮＡ生成のための当該技術分野では周知の従来の方法として、インビトロ翻訳ＩＶＴがある。この方法では、所望のベクターのＤＮＡ鋳型が、クローニング、制限消化、ライゲーション、遺伝子合成、及びポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）などの標準的な分子生物学的方法を含む当該技術分野では周知の方法によって最初に生成される。このＤＮＡ鋳型は、ＲＮＡに転写されることが望ましい配列の５’末端にＲＮＡポリメラーゼのプロモーターを有している。プロモーターとしては、これらに限定されるものではないが、Ｔ３、Ｔ７、またはＳＰ６などのバクテリオファージポリメラーゼのプロモーターが挙げられる。次に、ＤＮＡ鋳型は、適当なＲＮＡポリメラーゼ酵素、バッファー剤、及びヌクレオチド（ＮＴＰ）とインキュベートされる。得られたＲＮＡポリヌクレオチドは、７－メチルグアノシンまたは関連する構造などの５’キャップ構造の付加、及び場合によりポリアデニル化（ポリＡ）テールを有するように３’末端を改変することを含む（ただしこれらに限定されない）方法によって、場合によりさらに改変することができる。次に、ＲＮＡをフェノールクロロホルム抽出などの当該技術分野では周知の方法を用いて精製することができる。
【０２６０】
Ｖ．Ｄ．４．脂質ナノ粒子による送達
ワクチンベクターの設計において考慮すべき重要な側面の１つとして、ベクター自体に対する免疫がある（Ｒｉｌｅｙ　２０１７）。これは、例えば特定のヒトアデノウイルス系などのベクター自体に対する既存の免疫の形である場合もあり、またはワクチンの投与後に生じるベクターに対する免疫の形である場合もある。後者は、例えば別々のプライミング及びブースター投与のように同じワクチンの複数回の投与が行われる場合、または異なるカセットを送達するために同じワクチンベクターシステムが用いられるような場合に重要な考慮事項となる。
【０２６１】
アルファウイルスベクターの場合では、標準的な送達方法は、カプシド、Ｅ１、及びＥ２タンパク質をイン・トランスで与えることによって感染性のウイルス粒子を生じる上記に述べたヘルパーウイルスシステムである。しかしながら、Ｅ１及びＥ２タンパク質は、しばしば中和抗体の主要な標的である点に留意することが重要である（Ｓｔｒａｕｓｓ　１９９４）。したがって、対象とする抗原を標的細胞に送達するためにアルファウイルスベクターを使用することの有効性は、感染性粒子が中和抗体の標的とされる場合に低下する可能性がある。
【０２６２】

ウイルス粒子を媒介とする遺伝子送達に代わる代替的手法として、ナノ粒子を用いた発現ベクターの送達がある（Ｒｉｌｅｙ　２０１７）。重要な点として、ナノ材料担体は、非免疫原性材料で形成することができ、送達ベクター自体に対する免疫の誘発を一般的に回避することができる。これらの材料としては、これらに限定されるものではないが、脂質、無機ナノ材料、及び他のポリマー材料を挙げることができる。脂質は、カチオン性、アニオン性、または中性であってよい。かかる材料は、合成または天然由来のものであってよく、特定の例では生分解性であってよい。脂質は、脂肪、コレステロール、リン脂質、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）複合体（ＰＥＧ化脂質）を含む（ただしこれに限定されない）脂質複合体、ワックス、油類、グリセリド、及び脂溶性ビタミンを含みうる。

【０２６３】

脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）は、膜及び小胞状構造の形成を可能とする脂質の両親媒性の性質のために魅力的な送達システムである（Ｒｉｌｅｙ　２０１７）。一般的にこれらの小胞は、標的細胞の膜内に吸収され、サイトゾル中に核酸を放出することによって発現ベクターを送達する。さらに、ＬＮＰは特定の細胞種のターゲティングを促すようにさらに改変または官能化することができる。ＬＮＰの設計における別の考慮事項は、ターゲティングの効率と細胞毒性との間のバランスである。脂質の組成は一般的に、カチオン性、中性、アニオン性、及び両親媒性脂質の規定の混合物を含む。いくつかの例では、ＬＮＰの凝集を防止するか、脂質の酸化を防止するか、またはさらなる部分の付着を促す化学官能基を与えるために特定の脂質が含まれる。脂質の組成は、全体のＬＮＰのサイズ及び安定性に影響しうる。１つの例では、脂質の組成は、ジリノレイルメチル－４－ジメチルアミノブチレート（ＭＣ３）またはＭＣ３様分子を含む。ＭＣ３及びＭＣ３様脂質の組成物は、例えばＰＥＧまたはＰＥＧ複合化脂質、ステロール、または中性脂質などの１種類以上の他の脂質を含むように製剤化することができる。

【０２６４】

血清に直接曝露された発現ベクターなどの核酸ベクターは、血清中のヌクレアーゼによる核酸の分解、または遊離核酸による免疫系のオフターゲットの刺激を含むいくつかの望ましくない影響を有しうる。したがって、アルファウイルスベクターの封入を利用して分解を防止する一方で、潜在的なオフターゲット効果も防止することができる。特定の例では、アルファウイルスベクターは、ＬＮＰの水性の内部など、送達担体内に完全に封入される。ＬＮＰ内へのアルファウイルスベクターの封入は、微小流体液滴生成装置で行われる微小流体混合及び液滴生成などの当該技術分野では周知の方法によって実施することができる。かかる装置としては、これらに限定されるものではないが、標準的なＴジャンクション装置またはフローフォーカシング装置が挙げられる。１つの例では、ＭＣ３またはＭＣ３様分子含有組成物などの所望の脂質製剤を、アルファウイルス送達ベクター及び他の所望の物質と並行して液滴生成装置に供給することで、送達ベクター及び所望の物質がＭＣ３またはＭＣ３様分子ベースのＬＮＰの内部に完全に封入される。１つの例では、液滴生成装置は、生成されたＬＮＰの粒径範囲及び粒度分布を制御することができる。例えば、ＬＮＰは、直径１～１０００ｎｍの範囲の粒径、例えば、１、１０、５０、１００、５００、または１０００ｎｍの粒径を有することができる。液滴生成の後、発現ベクターを封入した送達ベクターを、投与に備えてさらに処理または改変することができる。

【０２６５】

Ｖ．Ｅ．チンパンジーアデノウイルス（ＣｈＡｄ）

Ｖ．Ｅ．１．チンパンジーアデノウイルスによるウイルス送達

１つ以上の抗原を送達するためのワクチン組成物（例えば、１つ以上の抗原または新生抗原をコードするカセットを介して）は、チンパンジー由来のアデノウイルスヌクレオチド配列、各種の新規ベクター、及びチンパンジーアデノウイルス遺伝子を発現する細胞株を与えることにより作出することができる。チンパンジーＣ６８アデノウイルス（本明細書ではＣｈＡｄＶ６８とも呼ぶ）の核酸配列を、抗原を送達するためのワクチン組成物中に使用することができる（配列番号１を参照）。Ｃ６８アデノウイルス由来ベクターの使用については米国特許第６，０８３，７１６号にさらに詳細に記載されており、当該特許

の全容をあらゆる目的で参照によって本明細書に援用する。

【０２６６】

さらなる態様において、本明細書では、Ｃ６８などのチンパンジーアデノウイルスのＤＮＡ配列と、発現を誘導する調節配列に機能的に連結されたカセットとを含む組換えアデノウイルスが提供される。この組換えウイルスは、哺乳動物、好ましくはヒトの細胞に感染させることが可能であり、細胞内でカセットのペイロードを発現することが可能である。このベクターでは、天然のチンパンジーＥ１遺伝子、及び／またはＥ３遺伝子、及び／またはＥ４遺伝子を欠失させることができる。カセットを、これらの遺伝子欠失部位のいずれに挿入することもできる。カセットは、それに対するプライミングされた免疫応答が望ましい抗原を含むことができる。

【０２６７】

別の態様において、本明細書では、Ｃ６８などのチンパンジーアデノウイルスを感染させた哺乳動物細胞が提供される。

【０２６８】

さらなる別の態様では、チンパンジーアデノウイルス遺伝子（例えばＣ６８由来の）またはその機能的フラグメントを発現する新規な哺乳動物細胞株が提供される。

【０２６９】

いっそうさらなる態様において、本明細書では、哺乳動物細胞内にカセットを送達するための方法であって、細胞内に、抗原カセットを発現するように操作された、有効量のＣ６８などのチンパンジーアデノウイルスを導入する工程を含む方法が提供される。

【０２７０】

さらなる別の態様は、哺乳動物宿主に免疫応答を誘発してがんを治療するための方法を提供する。この方法は、免疫応答が標的とする腫瘍に由来する１種類以上の抗原をコードするカセットを含む、有効量のＣ６８などの組換えチンパンジーアデノウイルスを宿主に投与する工程を含むことができる。

【０２７１】

さらなる別の態様は、哺乳動物宿主に免疫応答を誘発して、感染症などの対象の疾患を治療または予防するための方法を提供する。この方法は、免疫応答が標的とする感染症に由来する抗原などの１つ以上の抗原をコードする抗原カセットを含む、有効量のＣ６８などの組換えチンパンジーアデノウイルスを宿主に投与する工程を含むことができる。

【０２７２】

さらに、配列番号１の配列から得られるチンパンジーアデノウイルス遺伝子を発現する非サル哺乳動物細胞も開示される。この遺伝子は、配列番号１のアデノウイルスＥ１Ａ、Ｅ１Ｂ、Ｅ２Ａ、Ｅ２Ｂ、Ｅ３、Ｅ４、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４及びＬ５からなる群から選択することができる。

【０２７３】

さらに、配列番号１の配列から得られる遺伝子を含むチンパンジーアデノウイルスのＤＮＡ配列を含む核酸分子も開示される。この遺伝子は、配列番号１の前記チンパンジーアデノウイルスＥ１Ａ、Ｅ１Ｂ、Ｅ２Ａ、Ｅ２Ｂ、Ｅ３、Ｅ４、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４及びＬ５遺伝子からなる群から選択することができる。いくつかの態様において、核酸分子は、配列番号１を含む。いくつかの態様において、核酸分子は、配列番号１のＥ１Ａ、Ｅ１Ｂ、Ｅ２Ａ、Ｅ２Ｂ、Ｅ３、Ｅ４、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４及びＬ５遺伝子からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子が欠失した、配列番号１の配列を含む。

【０２７４】

さらに、配列番号１から得られるチンパンジーアデノウイルスＤＮＡ配列と、異種宿主細胞内でカセットの発現を誘導する１つ以上の調節配列に機能的に連結されたカセットとを含むベクターであって、場合により、チンパンジーアデノウイルスＤＮＡ配列が、複製及びカプシド形成に必要とされる少なくともシスエレメントを含み、シスエレメントがカセット及び調節配列に隣接している、ベクターも開示される。いくつかの態様において、チンパンジーアデノウイルスＤＮＡ配列は、配列番号１のＥ１Ａ、Ｅ１Ｂ、Ｅ２Ａ、Ｅ２

Ｂ、Ｅ３、Ｅ４、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４及びＬ５遺伝子配列から選択される遺伝子を含む。いくつかの態様において、ベクターは、Ｅ１Ａ及び／またはＥ１Ｂ遺伝子を欠失していてもよい。

【０２７５】

さらに、カセットを発現するように操作されたＣ６８ベクターなどの本明細書に開示されるベクターをトランスフェクトした宿主細胞も開示される。さらに、細胞内に本明細書に開示されるベクターを導入することによって細胞内に導入された選択された遺伝子を発現するヒト細胞も開示される。

【０２７６】

本明細書では、欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ２領域及び欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ３領域、及び場合により、欠失または部分欠失Ｅ４ｏｒｆ４領域を含む部分欠失Ｅ４遺伝子を含むアデノウイルスベクターも開示される。部分欠失Ｅ４は、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２のＥ４欠失を含むことができ、ベクターは、配列番号１に記載される配列の少なくともヌクレオチド２～３６，５１８を含む。部分欠失Ｅ４は、配列番号１に示される配列のヌクレオチド３４，９１６～３４，９４２の少なくとも部分欠失、配列番号１に示される配列のヌクレオチド３４，９５２～３５，３０５の少なくとも部分欠失、及び配列番号１に示される配列のヌクレオチド３５，３０２～３５，６４２の少なくとも部分欠失のＥ４欠失を含むことができ、ベクターは、配列番号１に記載される配列の少なくともヌクレオチド２～３６，５１８を含む。部分欠失Ｅ４は、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９８０～３６，５１６のＥ４欠失を含むことができ、ベクターは、配列番号１に記載される配列の少なくともヌクレオチド２～３６，５１８を含む。部分欠失Ｅ４は、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９７９～３５，６４２のＥ４欠失を含むことができ、ベクターは、配列番号１に記載される配列の少なくともヌクレオチド２～３６，５１８を含む。部分欠失Ｅ４は、Ｅ４Ｏｒｆ２の少なくとも部分欠失、完全欠失したＥ４Ｏｒｆ３、及びＥ４Ｏｒｆ４の少なくとも部分欠失のＥ４欠失を含むことができる。部分欠失Ｅ４は、Ｅ４Ｏｒｆ２の少なくとも部分欠失、Ｅ４Ｏｒｆ３の少なくとも部分欠失、及びＥ４Ｏｒｆ４の少なくとも部分欠失のＥ４欠失を含むことができる。部分欠失Ｅ４は、Ｅ４Ｏｒｆ１の少なくとも部分欠失、完全欠失したＥ４Ｏｒｆ２、及びＥ４Ｏｒｆ３の少なくとも部分欠失のＥ４欠失を含むことができる。部分欠失Ｅ４は、Ｅ４Ｏｒｆ２の少なくとも部分欠失及びＥ４Ｏｒｆ３の少なくとも部分欠失のＥ４欠失を含むことができる。部分欠失Ｅ４は、Ｅ４Ｏｒｆ１の開始部位からＥ４Ｏｒｆ５の開始部位までのＥ４欠失を含むことができる。部分欠失Ｅ４は、Ｅ４Ｏｒｆ１の開始部位に隣接したＥ４欠失であってよい。部分欠失Ｅ４は、Ｅ４Ｏｒｆ２の開始部位に隣接したＥ４欠失であってよい。部分欠失Ｅ４は、Ｅ４Ｏｒｆ３の開始部位に隣接したＥ４欠失であってよい。部分欠失Ｅ４は、Ｅ４Ｏｒｆ４の開始部位に隣接したＥ４欠失であってよい。Ｅ４欠失は、少なくとも５０、少なくとも１００、少なくとも２００、少なくとも３００、少なくとも４００、少なくとも５００、少なくとも６００、少なくとも７００、少なくとも８００、少なくとも９００、少なくとも１０００、少なくとも１１００、少なくとも１２００、少なくとも１３００、少なくとも１４００、少なくとも１５００、少なくとも１６００、少なくとも１７００、少なくとも１８００、少なくとも１９００、ｏｒ 少なくとも２０００ヌクレオチドであってよい。Ｅ４欠失は、少なくとも７００ヌクレオチドであってよい。Ｅ４欠失は、少なくとも１５００ヌクレオチドであってよい。Ｅ４欠失は、５０以下、１００以下、２００以下、３００以下、４００以下、５００以下、６００以下、７００以下、８００以下、９００以下、１０００以下、１１００以下、１２００以下、１３００以下、１４００以下、１５００以下、１６００以下、１７００以下、１８００以下、１９００以下、または２０００ヌクレオチド以下であってよい。Ｅ４欠失は、７５０ヌクレオチド以下であってよい。Ｅ４欠失は、少なくとも１５５０ヌクレオチドまたはそれ以下であってよい。

【０２７７】

部分欠失Ｅ４遺伝子は、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９

１６～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列であってよい。部分欠失Ｅ４遺伝子は、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列を欠いており、かつ、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９１６～３４，９４２、ヌクレオチド３４，９５２～３５，３０５、及び配列番号１に示される配列のヌクレオチド３５，３０２～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列であってよい。部分欠失Ｅ４遺伝子は、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９８０～３６，５１６を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列であってよい。部分欠失Ｅ４遺伝子は、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９７９～３５，６４２を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列であってよい。部分欠失Ｅ４遺伝子を有するアデノウイルスベクターは、カセットを含むことができ、カセットは少なくとも１つのペイロード核酸配列を含み、さらにカセットは、少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列を含む。部分欠失Ｅ４遺伝子を有するアデノウイルスベクターは、配列番号１に示されるＣｈＡｄＶ６８配列の１つ以上の遺伝子または調節配列を有することができ、場合により、１つ以上の遺伝子または調節配列は、配列番号１に示される配列のチンパンジーアデノウイルス末端逆位反復配列（ＩＴＲ）、Ｅ１Ａ、Ｅ１Ｂ、Ｅ２Ａ、Ｅ２Ｂ、Ｅ３、Ｅ４、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４、及びＬ５遺伝子のうちの少なくとも１つを含む。部分欠失Ｅ４遺伝子を有するアデノウイルスベクターは配列番号１に示される配列のヌクレオチド２～３４，９１６を有することができ、部分欠失Ｅ４遺伝子は、ヌクレオチド２～３４，９１６の３’であり、場合により、ヌクレオチド２～３４，９１６はさらに、Ｅ１欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド５７７～３４０３を欠いており、かつ／または、Ｅ３欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５を欠いている。部分欠失Ｅ４遺伝子を有するアデノウイルスベクターは、配列番号１に示される配列のヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８を有することができ、部分欠失Ｅ４遺伝子はヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８の５’である。部分欠失Ｅ４遺伝子を有するアデノウイルスベクターは配列番号１に示される配列のヌクレオチド２～３４，９１６を有することができ、部分欠失Ｅ４遺伝子は、ヌクレオチド２～３４，９１６の３’であり、ヌクレオチド２～３４，９１６はさらに、Ｅ１欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド５７７～３４０３を欠いており、かつＥ３欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５を欠いている。部分欠失Ｅ４遺伝子を有するアデノウイルスベクターは配列番号１に示される配列のヌクレオチド２～３４，９１６を有することができ、部分欠失Ｅ４遺伝子は、ヌクレオチド２～３４，９１６の３’であり、ヌクレオチド２～３４，９１６はさらに、Ｅ１欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド５７７～３４０３を欠いており、かつ、Ｅ３欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５を欠いており、かつ配列番号１に示される配列のヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８を有し、部分欠失Ｅ４遺伝子は、ヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８の５’である。

【０２７８】

部分欠失Ｅ４遺伝子は、配列番号１に示される配列の少なくともヌクレオチド３４，９１６～３５，６４２、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２～３４，９１６を欠いている、配列番号１に示されるＥ４遺伝子配列であってよく、部分欠失Ｅ４遺伝子は、ヌクレオチド２～３４，９１６の３’であり、ヌクレオチド２～３４，９１６はさらに、Ｅ１欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド５７７～３４０３を欠いており、かつＥ３欠失に相当する、配列番号１に示される配列のヌクレオチド２７，１２５～３１，８２５を欠いており、かつ配列番号１に示される配列のヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８を有し、部分欠失Ｅ４遺伝子は、ヌクレオチド３５，６４３～３６，５１８の５’である。

【０２７９】

部分欠失Ｅ４遺伝子を有するアデノウイルスベクターは、を有することができる。

【０２８０】

さらに、哺乳動物細胞にカセットを送達するための方法であって、前記細胞内に、カセットを発現するように操作された有効量のＣ６８ベクターなどの本明細書に開示されるベクターを導入することを含む方法も提供される。

【０２８１】

さらに、哺乳動物細胞内に本明細書に開示されるベクターを導入することと、適当な条件下で細胞を培養することと、抗原を産生することと、を含む、カセットを産生するための方法も開示される。

【０２８２】

Ｖ．Ｅ．２．Ｅ１を発現する相補性細胞株

本明細書に記載される遺伝子のいずれかにおいて欠失を有する組換えチンパンジーアデノウイルス（Ａｄ）を作製するため、欠失させた遺伝子領域の機能（ウイルスの複製及び感染性に不可欠である場合）をヘルパーウイルスまたは細胞株（すなわち、相補性またはパッケージング細胞株）によって組換えウイルスに供給することができる。例えば、複製欠損チンパンジーアデノウイルスベクターを作製するには、ヒトまたはチンパンジーアデノウイルスのＥ１遺伝子産物を発現する細胞株を使用することができ、そのような細胞株にはＨＥＫ２９３またはその変異体が含まれうる。チンパンジーＥ１遺伝子を発現する細胞株の作製のプロトコール（米国特許第６，０８３，７１６号の実施例３及び４）にしたがって任意の選択されたチンパンジーアデノウイルス遺伝子を発現する細胞株を作製することができる。

【０２８３】

ＡＡＶ強化アッセイを用いてチンパンジーアデノウイルスＥ１発現細胞株を同定することができる。このアッセイは、他の特性評価されていないアデノウイルス（例えば他の種由来）のＥ１遺伝子を使用して作製された細胞株においてＥ１の機能を同定するうえで有用である。このアッセイは米国特許第６，０８３，７１６号の実施例４Ｂに記載されている。

【０２８４】

選択されたチンパンジーアデノウイルス遺伝子（例えばＥ１）は、選択された親細胞株で発現するためのプロモーターの転写制御下にある可能性がある。この目的で誘導性または構成性プロモーターを用いることができる。誘導性プロモーターには、亜鉛によって誘導されるヒツジメタロチオニンプロモーター、または糖質コルチコイド、特にデキサメタゾンによって誘導されるマウス哺乳動物腫瘍ウイルス（ＭＭＴＶ）がある。本明細書に参照により援用するところの国際出願第ＷＯ９５／１３３９２号において特定されるものなどの他の誘導性プロモーターもパッケージング細胞株の作製に使用することができる。チンパンジーアデノウイルス遺伝子の発現を制御する構成性プロモーターも用いることができる。

【０２８５】

任意の所望のＣ６８遺伝子を発現する新規な細胞株を作製するために親細胞を選択することができる。限定されることなく、かかる親細胞株は、ＨｅＬａ［ＡＴＣＣ寄託番号ＣＣＬ２］、Ａ５４９［ＡＴＣＣ寄託番号ＣＣＬ１８５］、ＫＢ［ＣＣＬ１７］、Ｄｅｔｒｏｉｔ［例えばＤｅｔｒｏｉｔ５１０、ＣＣＬ７２］、及びＷＩ－３８［ＣＣＬ７５］細胞であってよい。他の適当な親細胞株を他の供給元から入手することができる。親細胞株としては、ＣＨＯ、ＨＥＫ２９３またはその変異体、９１１、ＨｅＬａ、Ａ５４９、ＬＰ－２９３、ＰＥＲ．Ｃ６、またはＡＥ１－２ａを挙げることができる。

【０２８６】

Ｅ１発現細胞株は、組換えチンパンジーアデノウイルスＥ１欠失ベクターの作製において有用となりうる。１つ以上の他のチンパンジーアデノウイルス遺伝子産物を発現する基本的に同じ手順を用いて構築された細胞株は、これらの産物をコードする遺伝子に欠失を有する組換えチンパンジーアデノウイルスベクターの作製において有用である。さらに、他のヒトＡｄＥ１遺伝子産物を発現する細胞株も、チンパンジー組換えＡｄを作製するうえで有用である。

【０２８７】
Ｖ．Ｅ．３．ベクターとしての組換えウイルス粒子
本明細書に開示される組成物は、少なくとも１種類の抗原を細胞に送達するウイルスベクターを含むことができる。かかるベクターは、Ｃ６８のようなチンパンジーアデノウイルスＤＮＡ配列と、カセットを直接発現するための調節配列に機能的に連結されたカセットとを含む。Ｃ６８ベクターは、感染した哺乳動物細胞内でカセットを発現することが可能である。Ｃ６８ベクターは１つ以上のウイルス遺伝子に機能的欠失を有することができる。カセットは、プロモーターなどの１つ以上の調節配列の制御下にある少なくとも１つの抗原を含む。任意選択的なヘルパーウイルス及び／またはパッケージング細胞株によって、チンパンジーウイルスベクターに、欠失させたアデノウイルス遺伝子の任意の必要な産物を供給することができる。
【０２８８】
「機能的に欠失された」という用語は、その遺伝子領域の充分な量が除去または例えば変異もしくは改変により他の形で変更されていることにより、その遺伝子領域が遺伝子発現の１つ以上の機能的産物を産生できなくなっていることを意味する。機能的欠失につながりうる変異または改変としては、これらに限定されるものではないが、未成熟終止コドンの導入及び基準及び非基準開始コドンの除去のようなナンセンス変異、ｍＲＮＡスプライシングまたは他の転写プロセシングを変化させる変異、またはこれらの組み合わせが挙げられる。必要な場合、遺伝子領域全体を除去することができる。
【０２８９】
配列の欠失、挿入、及び他の変異を含む、本明細書に開示されるベクターを形成する核酸配列の改変は、標準的な分子生物学的手法を用いて生成することができるものであり、本明細書の範囲内である。
【０２９０】
Ｖ．Ｅ．４．ウイルスプラスミドベクターの構築
本発明において有用なチンパンジーアデノウイルスＣ６８ベクターには、組換え欠損アデノウイルス、すなわち、Ｅ１ａまたは Ｅ１ｂ遺伝子に機能的欠失を有し、場合により例えば温度感受性変異または他の遺伝子における欠失などの他の変異を有するチンパンジーアデノウイルス配列が含まれる。これらのチンパンジー配列は、他のアデノウイルス及び／またはアデノ随伴ウイルス配列からハイブリッドベクターを形成するうえでも有用であると予想される。ヒトアデノウイルスから調製された同種アデノウイルスベクターについては、刊行文献に記載されている［例えば、上記に引用のＫｏｚａｒｓｋｙ　Ｉ及びＩＩ、ならびに同文献に引用された参照文献、米国特許第５，２４０，８４６号を参照］。
【０２９１】
抗原カセットをヒト（または他の哺乳動物）細胞に送達するための有用なチンパンジーアデノウイルスＣ６８ベクターの構築において、広範囲のアデノウイルス核酸配列をベクターに用いることができる。最小のチンパンジーＣ６８アデノウイルス配列を含むベクターをヘルパーウイルスとともに使用して感染性の組換えウイルス粒子を作製することができる。ヘルパーウイルスは、最小のチンパンジーアデノウイルスベクターのウイルス感染性及び増殖に必要な基本的な遺伝子産物を提供する。チンパンジーアデノウイルス遺伝子の１つ以上の選択された欠失のみが、欠失がなければ機能性のウイルスベクターに導入される場合、欠失された遺伝子産物は、欠失された遺伝子機能をイン・トランスで与えるウイルスを選択されたパッケージング細胞株内で増殖させることによるウイルスベクター作製プロセスで供給することができる。
【０２９２】
Ｖ．Ｅ．５．組換え最小アデノウイルス
最小チンパンジーＡｄ　Ｃ６８ウイルスとしては、複製及びビリオンのカプシド形成に必要なアデノウイルスのシスエレメントのみを含むウイルス粒子がある。すなわち、このベクターは、アデノウイルスのシス作用性の５’及び３’の末端逆位繰り返し配列（ＩＴＲ）（複製起点として機能する）と、天然の５’パッケージング／エンハンサードメイン（直

鎖状のＡｄのゲノム及びＥ１プロモーターのエンハンサーエレメントをパッケージングするために必要な配列を含む）とを含む。例えば、国際出願第ＷＯ９６／１３５９７号において「最小」ヒトＡｄベクターの調製について述べられ、本明細書に参照によって援用する方法を参照されたい。

【０２９３】

Ｖ．Ｅ．６．他の欠損アデノウイルス

組換え複製不全アデノウイルスは、最小チンパンジーアデノウイルス配列以上のものを含んでもよい。これらの他のＡｄベクターは、ウイルスの遺伝子領域の異なる部分の欠失、ならびに、必要に応じたヘルパーウイルス及び／またはパッケージング細胞株の使用によって形成される感染性ウイルス粒子によって特徴づけることができる。

【０２９４】

１つの例として、適当なベクターは、Ｃ６８アデノウイルスの最初期遺伝子Ｅ１ａ及び後初期遺伝子Ｅ１ｂの全体または充分な部分を欠失させることにより、それらの正常な生物学的機能を失わせることによって形成することができる。複製不全Ｅ１欠失ウイルスは、対応する遺伝子産物をイン・トランスで与える機能的アデノウイルスＥ１ａ及びＥ１ｂ遺伝子を含むチンパンジーのアデノウイルス形質転換相補性細胞株で増殖させた場合に感染性のウイルスを複製及び生成することが可能である。既知のアデノウイルス配列に対する相同性に基づけば、得られる組換えチンパンジーアデノウイルスは、当該技術分野のヒト組換えＥ１欠失アデノウイルスでそうであるように多くの細胞種に感染することが可能であり、抗原（複数可）を発現することができるが、チンパンジーＥ１領域ＤＮＡを有していない多くの細胞では、細胞が極めて高い感染多重度で感染していないかぎりは複製できないものと予想される。

【０２９５】

別の例として、Ｃ６８アデノウイルス後初期遺伝子Ｅ３の全体または一部を、組換えウイルスの一部を形成するチンパンジーアデノウイルス配列から除去することができる。

【０２９６】

チンパンジーアデノウイルスＣ６８ベクターは、Ｅ４遺伝子の欠失を有するように構築することもできる。さらに別のベクターは、後初期遺伝子Ｅ２ａに欠失を有することができる。

【０２９７】

欠失は、チンパンジーＣ６８アデノウイルスゲノムの後期遺伝子Ｌ１～Ｌ５のいずれに導入することもできる。同様に、中期遺伝子ＩＸ及びＩＶａ２内の欠失も特定の目的では有用となりうる。他の欠失を他の構造または非構造アデノウイルス遺伝子に導入することもできる。

【０２９８】

上記に述べた欠失は、個々に用いることもできる。すなわち、アデノウイルス配列はＥ１のみの欠失を有してもよい。また、それらの生物学的活性を破壊または低減するうえで効果的な遺伝子全体またはその一部を任意の組み合わせで用いることもできる。例えば、１つの例示的なベクターでは、アデノウイルスＣ６８配列は、Ｅ１遺伝子及びＥ４遺伝子、またはＥ１、Ｅ２ａ、及びＥ３遺伝子、またはＥ１及びＥ３遺伝子、または、Ｅ３の欠失をともなうかまたはともなわない、Ｅ１、Ｅ２ａ、及びＥ４遺伝子の欠失を有することができる。上記に述べたように、かかる欠失は、所望の結果を得るために温度感受性変異などの他の変異と組み合わせて用いることができる。

【０２９９】

抗原（複数可）を含むカセットを場合によりチンパンジーＣ６８Ａｄウイルスの任意の欠失領域に挿入することができる。また、必要に応じて既存の遺伝子領域内にカセットを挿入することでその領域の機能を破壊することもできる。

【０３００】

Ｖ．Ｅ．７．ヘルパーウイルス

カセットを送達するために用いられるウイルスベクターのチンパンジーアデノウイルス

遺伝子の含量に応じて、ヘルパーアデノウイルスまたは非複製ウイルスフラグメントを用いて、カセットを含む感染性の組換えウイルス粒子を生成するのに充分なチンパンジーアデノウイルス遺伝子配列を与えることができる。

【０３０１】

有用なヘルパーウイルスは、アデノウイルスベクターコンストラクト中に存在しない、及び／またはベクターをトランスフェクトしたパッケージング細胞株によって発現されない選択されたアデノウイルス遺伝子配列を含む。ヘルパーウイルスは複製不全であってよく、上記に述べた配列以外の様々なアデノウイルス遺伝子を含むことができる。ヘルパーウイルスは、本明細書に記載されるＥ１発現細胞株と組み合わせて用いることができる。

【０３０２】

Ｃ６８では、「ヘルパー」ウイルスは、Ｃ６８ゲノムのＣ末端を、ウイルスの左端から約１３００ｂｐを除去するＳｓｐＩによって短縮することによって形成されるフラグメントとすることができる。次に、この短縮されたウイルスをプラスミドＤＮＡとともにＥ１発現細胞株内に同時トランスフェクトすることにより、プラスミド内のＣ６８配列との相同組み換えによって組換えウイルスを形成する。

【０３０３】

ヘルパーウイルスは、Ｗｕ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６４：１６９８５－１６９８７ （１９８９）；Ｋ．Ｊ．Ｆｉｓｈｅｒ ａｎｄ Ｊ．Ｍ．Ｗｉｌｓｏｎ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．，２９９：４９（Ａｐｒ．１，１９９４）に記載されるようなポリカチオン複合体として形成することもできる。ヘルパーウイルスは、場合によりレポーター遺伝子を含んでもよい。多くのかかるレポーター遺伝子が当該技術分野で知られている。アデノウイルスベクター上のカセットとは異なるヘルパーウイルス上のレポーター遺伝子の存在によって、Ａｄベクターとヘルパーウイルスを独立して観察することが可能となる。この第２のレポーター遺伝子を用いることで、精製時に得られた組換えウイルスとヘルパーウイルスとを分離することが可能である。

【０３０４】

Ｖ．Ｅ．８．ウイルス粒子のアセンブリと細胞株の感染

アデノウイルス、カセット、及び他のベクター因子の選択されたＤＮＡ配列の様々な中間プラスミド及びシャトルベクターへのアセンブリ、ならびに組換えウイルス粒子を作製するためのプラスミド及びシャトルベクターの使用は、従来の手法を用いてすべて実現することができる。かかる手法としては、従来のｃＤＮＡのクローニング法、インビトロ組換え法（例えば、ギブソンアセンブリ）、アデノウイルスゲノムの重複するオリゴヌクレオチド配列の使用、ポリメラーゼ連鎖反応、及び所望の核酸配列を与える任意の適当な方法が挙げられる。標準的なトランスフェクション及び同時トランスフェクションの手法、例えば、ＣａＰＯ４沈殿法またはリポフェクタミンなどのリポソーム媒介トランスフェクション法が用いられる。用いられる他の従来の方法としては、ウイルスゲノムの相同組み換え、アガーオーバーレイ中でのウイルスのプラーク形成、シグナル発生測定の方法などが挙げられる。

【０３０５】

例えば、所望のカセットを含むウイルスベクターの構築及びアセンブリの後、ベクターをインビトロでヘルパーウイルスの存在下でパッケージング細胞株にトランスフェクトすることができる。ヘルパーとベクター配列との間で相同組み換えが起こり、これによりベクター内のアデノウイルス－抗原配列が複製されてビリオンカプシド内にパッケージングされ、組換えウイルスベクター粒子が得られる。

【０３０６】

得られた組換えチンパンジーＣ６８アデノウイルスは、カセットを選択された細胞に導入するうえで有用である。パッケージング細胞株内で増殖させた組換えウイルスを用いたインビボ実験において、Ｅ１欠失組換えチンパンジーアデノウイルスが、カセットを非チンパンジー細胞、好ましくはヒト細胞に導入するうえで実用性を有することが実証されている。

【０３０７】
Ｖ．Ｅ．９．組換えウイルスベクターの使用
したがって、抗原カセットを含む得られた組換えチンパンジーＣ６８アデノウイルス（上記に述べたように、アデノウイルスベクターとヘルパーウイルスとの協同、またはアデノウイルスベクターとパッケージング細胞株との協同により作製される）は、抗原（複数可）をインビボまたはエクスビボで対象に送達することができる効率的な遺伝子導入担体を与えるものである。
【０３０８】
上記に述べた組換えベクターは、遺伝子治療について公開されている方法にしたがってヒトに投与される。カセットを有するチンパンジーウイルスベクターは、好ましくは生体適合性溶液または薬学的に許容される送達溶媒中に懸濁させて患者に投与することができる。適当な溶媒としては滅菌生理食塩水が挙げられる。薬学的に許容される担体として知られ、当業者には周知のものである他の水性及び非水性等張滅菌注射溶液、ならびに水性及び非水性滅菌懸濁液をこの目的で使用することもできる。
【０３０９】
チンパンジーアデノウイルスベクターは、ヒト細胞を形質転換し、医療分野の当業者によって判定することが可能な有害作用をともなわずに、または医学的に許容される生理学的作用をともなって、治療効果を与えるうえで充分なレベルの抗原の導入及び発現をもたらすのに充分な量で投与される。従来の薬学的に許容される投与経路としては、これらに限定されるものではないが、肝臓、鼻腔内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、経口、及び他の非経口の投与経路が挙げられる。投与経路は必要に応じて組み合わせることができる。
【０３１０】
ウイルスベクターの用量は、治療される状態、患者の年齢、体重、及び健康状態などの因子に主として依存し、したがって患者間で異なりうる。用量は、あらゆる副作用に対して治療効果のバランスが取れるように調節され、かかる用量は、組換えベクターが用いられる治療用途に応じて異なりうる。抗原（複数可）の発現レベルを観察することにより、投与頻度を決定することができる。
【０３１１】
組換え複製不全アデノウイルスは、「薬学的有効量」、すなわち、所望の細胞をトランスフェクトし、ワクチン効果、すなわち一定の測定可能なレベルの防御免疫をもたらすような選択された遺伝子の充分な発現レベルを与えるのにある投与経路で有効な組換えアデノウイルスの量で投与することができる。カセットを含むＣ６８ベクターは、アジュバントと同時投与することができる。アジュバントは、ベクターとは別のモノマーの出会ってもよく（例えばミョウバン）または特にアジュバントがタンパク質である場合にはベクター内にコードされてもよい。アジュバントは当該技術分野では周知のものである。
【０３１２】
従来の薬学的に許容される投与経路としては、これらに限定されるものではないが、鼻腔内、筋肉内、気管内、皮下、皮内、直腸内、経口、及び他の非経口の投与経路が挙げられる。投与経路は必要に応じて組み合わせるか、または免疫原もしくは疾患に応じて調節することができる。例えば、狂犬病の予防では、皮下、気管内、及び鼻腔内経路が好ましい。投与経路は、主として治療される疾患の性質によって決められる。
【０３１３】
抗原（複数可）の発現レベルを観察することにより、ブースターの必要性（ある場合）を決定することができる。例えば、血清中の抗体力価の評価の後、必要に応じてブースター免疫が望ましい場合がある。
【０３１４】
ＶＩ．治療及び製造方法
本明細書に開示する方法を用いて特定された複数の抗原などの１つ以上の抗原を対象に投与することにより、対象に腫瘍特異的な免疫応答を誘導し、腫瘍に対するワクチン接種を行い、対象のがんの症状を治療及び／または緩和する方法も提供される。

【０３１５】
本明細書に開示する方法を用いて特定された複数の抗原などの１つ以上の抗原を対象に投与することにより、対象に感染症生物特異的な免疫応答を誘導し、感染症生物に対するワクチン接種を行い、対象の感染症生物に関連した感染症の症状を治療及び／または緩和する方法も提供される。
【０３１６】
いくつかの態様において、対象は、がんと診断されているか、またはがんを発症するリスクにある。対象は、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、または、腫瘍特異的な免疫応答が望ましい任意の動物であることができる。腫瘍は、乳、卵巣、前立腺、肺、腎臓、胃、結腸、精巣、頭頸部、膵臓、脳、黒色腫、及び他の組織器官の腫瘍などの、任意の固形腫瘍、ならびに、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、Ｔ細胞リンパ球性白血病、及びＢ細胞リンパ腫を含むリンパ腫及び白血病などの、血液腫瘍であることができる。
【０３１７】
いくつかの態様では、対象は、感染症を診断されているかまたは感染症のリスクを有する（例えば、年齢、地理的／移動、及び／または仕事に関連した感染症の高いリスクまたは素因、または季節性及び／または新規の疾患感染のリスクを有する）。
【０３１８】
抗原は、ＣＴＬ応答を誘導するのに充分な量で投与することができる。抗原は、Ｔ細胞応答を誘導するのに充分な量で投与することができる。抗原は、Ｂ細胞応答を誘導するのに充分な量で投与することができる。
【０３１９】
抗原は、単独で、または他の治療薬と併用して投与することができる。治療薬は、例えば、化学療法薬、放射線治療、または免疫療法である。特定のがんに対する任意の適当な治療を投与することができる。治療薬は、抗ウイルス剤または抗生剤などの感染症生物を標的とするものを含みうる。
【０３２０】
加えて、対象に、チェックポイント阻害因子などの抗免疫抑制性／免疫刺激性物質をさらに投与することができる。例えば、対象に、抗ＣＴＬＡ抗体または抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１をさらに投与することができる。抗体によるＣＴＬＡ－４またはＰＤ－Ｌ１の遮断は、患者においてがん性細胞に対する免疫応答を増強することができる。特に、ＣＴＬＡ－４遮断は、ワクチン接種プロトコールを採用した場合に有効であることが示されている。
【０３２１】
ワクチン組成物に含まれるべき各抗原の最適量、及び最適投薬レジメンを、決定することができる。例えば、抗原またはその変異体は、静脈内（ｉ．ｖ．）注射、皮下（ｓ．ｃ．）注射、皮内（ｉ．ｄ．）注射、腹腔内（ｉ．ｐ．）注射、筋肉内（ｉ．ｍ．）注射のために調製することができる。注射の方法は、ｓ．ｃ．、ｉ．ｄ．、ｉ．ｐ．、ｉ．ｍ．、及びｉ．ｖ．を含む。ＤＮＡまたはＲＮＡ注射の方法は、ｉ．ｄ．、ｉ．ｍ．、ｓ．ｃ．、ｉ．ｐ．、及びｉ．ｖ．を含む。ワクチン組成物の投与の他の方法は、当業者に公知である。
【０３２２】
ワクチンは、組成物中に存在する抗原の選択、数、及び／または量が、組織、がん、感染症、及び／または患者に特異的であるように編集することができる。例として、ペプチドの厳密な選択は、所定の組織における親タンパク質の発現パターンによって手引きさるか、または患者の変異または疾患状態によって手引きされ得る。選択は、特定のがんの種類、特定の感染症、疾患の状態、ワクチン接種の目標（例えば、予防的なものか、または進行中の疾患を標的とするものか）、より早期の処置レジメン、患者の免疫状態、及び当然、患者のＨＬＡハロタイプに依存し得る。さらに、ワクチンは、特定の患者の個人的な必要にしたがって、個別化された構成要素を含有することができる。例は、特定の患者に

おける抗原の発現にしたがって抗原の選択を変えること、または、処置の第１のラウンドまたはスキームの後の二次的処置についての調整を含む。

【０３２３】

抗原ワクチンの投与を行うための患者は、さまざまな診断方法、例えば、下記でさらに述べる患者選択方法の使用により特定することができる。患者選択では、１つ以上の遺伝子の変異または発現パターンを特定することを含むことができる。患者選択は、進行中の感染の感染症を特定することを含むことができる。患者選択は、感染症による感染のリスクを特定することを含むことができる。場合により、患者選択では、患者のハプロタイプを特定することを含む。さまざまな患者選択方法を並行して行うことができ、例えば、シークエンシング診断によって患者の変異及びハプロタイプの両方を特定することができる。さまざまな患者選択方法を順次行うこともでき、例えば、１つの診断検査で変異を特定し、別の診断検査で患者のハプロタイプを特定し、その場合、各検査は、同じ（例えば、両方ともハイスループットシークエンシング）か、または異なる（例えば、一方がハイスループットシークエンシングで他方がサンガーシークエンシング）診断方法であってよい。

【０３２４】

がんまたは感染症のワクチンとして使用されるべき組成物について、正常組織において多量に発現している類似した正常な自己ペプチドを有する抗原は、本明細書に記載した組成物において、避けられるか、または少量で存在することができる。他方で、患者の腫瘍または感染細胞が、多量のある特定の抗原を発現することが公知である場合、このがんまたは感染の処置のためのそれぞれの薬学的組成物は、多量に存在することができ、及び／または、この特定の抗原もしくはこの抗原の経路に特異的な１種類よりも多い抗原を含めることができる。

【０３２５】

抗原を含む組成物を、既にがんまたは感染を患っている個体に投与することができる。治療的適用において、組成物は、腫瘍抗原または感染症生物抗原に対する有効なＣＴＬ応答を惹起し、かつ、症候及び／または合併症を治癒するかまたは少なくとも部分的に停止するのに充分な量で、患者に投与される。これを達成するのに妥当な量を、「治療的有効用量」として定義する。この用途のために有効な量は、例えば、組成物、投与の様式、処置される疾患の病期及び重症度、患者の体重及び健康の全身状態、ならびに処方医の判断に依存するであろう。組成物は、概して、重篤な疾患状態、すなわち、命に関わるか、または潜在的に命に関わる状況、特にがんが転移している場合に使用できることを、心に留めるべきである。そのような例において、外来性物質の最小化、及び抗原の相対的な非毒性の性質を考慮して、実質的過剰量のこれらの組成物を投与することが、可能であり、かつ処置する医師が望ましいと感じることができる。

【０３２６】

治療的用途のために、投与は、腫瘍の検出もしくは外科的除去時に開始するかまたは感染の検出もしくは治療時に開始することができる。これに続いて、少なくとも症候が実質的に減ずるまで、及びその後ある期間にわたって、ブースト投与を行うことができる。

【０３２７】

治療的処置のための薬学的組成物（例えば、ワクチン組成物）は、非経口、局部、経鼻、経口、または局所投与について意図される。薬学的組成物は、非経口的に、例えば、静脈内、皮下、皮内、または筋肉内に投与することができる。組成物は、腫瘍に対する局所免疫応答を誘導するために、外科的切除の部位に投与することができる。組成物は、対象の特定の感染組織及び／または細胞（例えば、抗原提示細胞）を標的とするように投与することができる。抗原の溶液を含む非経口投与用の組成物を、本明細書に開示し、ワクチン組成物は、許容される担体、例えば、水性担体に溶解または懸濁される。様々な水性担体、例えば、水、緩衝水、０．９％食塩水、０．３％グリシン、ヒアルロン酸などを使用することができる。これらの組成物は、従来の周知の滅菌技法によって滅菌することができ、または滅菌濾過することができる。結果として生じた水溶液を、そのままで使用のためにパッケージングするか、または凍結乾燥することができ、凍結乾燥調製物は、投与前

に滅菌溶液と組み合わされる。組成物は、ｐＨ調整剤及び緩衝剤、等張化剤、湿潤剤など、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウラート、トリエタノールアミンオレアートなどのような、生理学的条件に近づけるために必要とされる、薬学的に許容される補助物質を含有してもよい。

【０３２８】

抗原はまた、それらをリンパ組織などの特定の細胞組織にターゲティングする、リポソームを介して投与することもできる。リポソームはまた、半減期を増大させるのにも有用である。リポソームは、エマルジョン、フォーム、ミセル、不溶性単層、液晶、リン脂質分散物、ラメラ層などを含む。これらの調製物において、送達されるべき抗原は、単独で、または、ＣＤ４５抗原に結合するモノクローナル抗体などの、例えば、リンパ系細胞の間で優性な受容体に結合する分子、または他の治療用組成物もしくは免疫原性組成物と共に、リポソームの一部として組み込まれる。したがって、所望の抗原で満たされたリポソームは、リンパ系細胞の部位へ方向付けられることができ、そこで、リポソームは次いで、選択された治療用／免疫原性組成物を送達する。リポソームは、概して、中性及び負電荷を有するリン脂質、及びコレステロールなどのステロールを含む、標準的な小胞形成脂質から形成され得る。脂質の選択は、概して、例えば、リポソームサイズ、酸不安定性、及び血流におけるリポソームの安定性の考慮により手引きされる。例えば、Ｓｚｏｋａ ｅｔ ａｌ．， Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｂｉｏｅｎｇ．９；４６７ （１９８０）、米国特許第４，２３５，８７１号、第４，５０１，７２８号、第４，５０１，７２８号、第４，８３７，０２８号、及び第５，０１９，３６９号に記載されているように、様々な方法を、リポソームを調製するために利用可能である。

【０３２９】

免疫細胞へのターゲティングのために、リポソーム中に組み込まれるべきリガンドは、例えば、所望の免疫系細胞の細胞表面決定基に特異的な抗体またはその断片を含むことができる。リポソーム懸濁液は、とりわけ、投与の様式、送達されるペプチド、及び処置される疾患の病期にしたがって変動する用量で、静脈内、局所、局部などに投与することができる。

【０３３０】

治療目的または免疫化目的で、本明細書に記載したペプチド、及び任意でペプチドの１つ以上をコードする核酸をまた、患者に投与することもできる。数多くの方法が、核酸を患者に送達するために好都合に使用される。例として、核酸を、「裸のＤＮＡ」として直接送達することができる。このアプローチは、例として、Ｗｏｌｆｆ ｅｔ ａｌ．， Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４７：１４６５－１４６８ （１９９０）、ならびに米国特許第５，５８０，８５９号及び第５，５８９，４６６号に記載されている。核酸はまた、例として、米国特許第５，２０４，２５３号に記載されているような弾道送達を用いて投与することもできる。単にＤＮＡからなる粒子を、投与することができる。あるいは、ＤＮＡを、金粒子などの粒子に接着させることができる。核酸配列を送達するためのアプローチは、エレクトロポレーションを伴うかまたは伴わない、ウイルスベクター、ｍＲＮＡベクター、及びＤＮＡベクターを含むことができる。

【０３３１】

核酸はまた、カチオン性脂質などのカチオン性化合物に複合体化させて送達することもできる。脂質媒介性遺伝子送達法は、例として、９６１８３７２ＷＯＡＷＯ ９６／１８３７２；９３２４６４０ＷＯＡＷＯ ９３／２４６４０；Ｍａｎｎｉｎｏ ＆ Ｇｏｕｌｄ－Ｆｏｇｅｒｉｔｅ， ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ６（７）： ６８２－６９１ （１９８８）；米国特許第５，２７９，８３３号 Ｒｏｓｅ、米国特許第５，２７９，８３３号；９１０６３０９ＷＯＡＷＯ ９１／０６３０９；及びＦｅｌｇｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４： ７４１３－７４１４ （１９８７）に記載されている。

【０３３２】

抗原はまた、ワクシニア、鶏痘、自己複製アルファウイルス、マラバウイルス、アデノウイルス（例えば、Ｔａｔｓｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｅｎｏｖｉｒｕｓｅｓ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ（２００４） １０，６１６－６２９を参照されたい）、または、第２、第３、もしくはハイブリッド第２／第３世代のレンチウイルス、及び特異的な細胞タイプもしくは受容体を標的とするように設計された任意の世代の組換えレンチウイルスを含むがそれらに限定されないレンチウイルス（例えば、Ｈｕ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｚａｔｉｏｎ Ｄｅｌｉｖｅｒｅｄ ｂｙ Ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ Ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ ａｎｄ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ Ｄｉｓｅａｓｅｓ，Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｒｅｖ．（２０１１） ２３９（１）：４５－６１、Ｓａｋｕｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ ｖｅｃｔｏｒｓ：ｂａｓｉｃｔｏ ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ．（２０１２） ４４３（３）：６０３－１８、Ｃｏｏｐｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｒｅｓｃｕｅ ｏｆ ｓｐｌｉｃｉｎｇ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｉｎｔｒｏｎ ｌｏｓｓ ｍａｘｉｍｉｚｅｓ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ ｖｅｃｔｏｒｓ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｔｈｅ ｈｕｍａｎ ｕｂｉｑｕｉｔｉｎ Ｃ ｐｒｏｍｏｔｅｒ，Ｎｕｃｌ．ＡｃｉｄｓＲｅｓ．（２０１５） ４３（１）：６８２－６９０、Ｚｕｆｆｅｒｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｌｆ－Ｉｎａｃｔｉｖａｔｉｎｇ Ｌｅｎｔｉｖｉｒｕｓ Ｖｅｃｔｏｒ ｆｏｒ Ｓａｆｅ ａｎｄ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ Ｉｎ Ｖｉｖｏ Ｇｅｎｅ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．（１９９８） ７２（１２）：９８７３－９８８０を参照されたい）などの、ウイルスベクターベースのワクチンプラットフォームに含めることもできる。上述のウイルスベクターベースのワクチンプラットフォームのパッケージング能力に依存して、このアプローチは、１つ以上の抗原ペプチドをコードする１つ以上の核酸配列を送達することができる。配列は、非変異配列が隣接していてもよく、リンカーによって分離されていてもよく、または、細胞内区画を標的とする１つもしくは複数の配列が先行していてもよい（例えば、Ｇｒｏｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｓｐｅｃｔｉｖｅ ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｎｅｏａｎｔｉｇｅｎ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅｓ ｉｎ ｔｈｅ ｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ ｂｌｏｏｄ ｏｆ ｍｅｌａｎｏｍａ ｐａｔｉｅｎｔｓ，Ｎａｔ Ｍｅｄ．（２０１６） ２２（４）：４３３－８、Ｓｔｒｏｎｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｏｆ ｃａｎｃｅｒ ｎｅｏａｎｔｉｇｅｎｓ ｗｉｔｈ ｄｏｎｏｒ－ｄｅｒｉｖｅｄ Ｔ ｃｅｌｌ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｒｅｐｅｒｔｏｉｒｅｓ，Ｓｃｉｅｎｃｅ．（２０１６） ３５２（６２９１）：１３３７－４１、Ｌｕ ｅｔ ａｌ．，Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｍｕｔａｔｅｄ ｃａｎｃｅｒ ａｎｔｉｇｅｎｓ ｒｅｃｏｇｎｉｚｅｄ ｂｙ Ｔ ｃｅｌｌｓ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ ｄｕｒａｂｌｅ ｔｕｍｏｒ ｒｅｇｒｅｓｓｉｏｎｓ，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．（２０１４） ２０（１３）：３４０１－１０を参照されたい）。宿主中への導入時に、感染した細胞は、抗原を発現し、それにより、ペプチドに対する宿主免疫（例えば、ＣＴＬ）応答を惹起する。免疫化プロトコールにおいて有用なワクシニアベクター及び方法は、例えば、米国特許第４，７２２，８４８号に記載されている。別のベクターは、ＢＣＧ（カルメット・ゲラン桿菌）である。ＢＣＧベクターは、Ｓｔｏｖｅｒ ｅｔ ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ ３５１：４５６－４６０ （１９９１））に記載されている。抗原の治療的投与または免疫化に有用な、多種多様の他のワクチンベクター、例えば、チフス菌ベクターなどが、本明細書における記載から当業者に明らかであろう。

【０３３３】

核酸を投与する手段は、１つ以上のエピトープをコードするミニ遺伝子構築物を使用する。ヒト細胞における発現のための、選択されたＣＴＬエピトープをコードするＤＮＡ配列（ミニ遺伝子）を作製するために、エピトープのアミノ酸配列を逆翻訳する。各アミノ酸に対するコドン選択を手引きするために、ヒトコドン使用頻度表を使用する。これらのエピトープをコードするＤＮＡ配列を、直接隣り合わせて、連続的なポリペプチド配列を作製する。発現及び／または免疫原性を最適化するために、追加の要素を、ミニ遺伝子設計中に組み入れることができる。逆翻訳して、ミニ遺伝子配列に含めることができるアミ

ノ酸配列の例は、ヘルパーＴリンパ球エピトープ、リーダー（シグナル）配列、及び小胞体保持シグナルを含む。加えて、ＣＴＬエピトープのＭＨＣ提示は、ＣＴＬエピトープに近接した合成の（例えば、ポリアラニン）または天然に存在する隣接配列を含むことによって、改善することができる。ミニ遺伝子配列は、ミニ遺伝子のプラス鎖及びマイナス鎖をコードするオリゴヌクレオチドをアセンブルすることによって、ＤＮＡに変換される。オーバーラップするオリゴヌクレオチド（３０～１００塩基長）を、周知の技法を用いて適切な条件下で、合成し、リン酸化し、精製し、アニーリングする。オリゴヌクレオチドの端は、Ｔ４ＤＮＡリガーゼを用いて連結する。ＣＴＬエピトープポリペプチドをコードするこの合成ミニ遺伝子を、次いで、望ましい発現ベクター中にクローニングすることができる。

【０３３４】

精製プラスミドＤＮＡは、様々な製剤を用いて、注射のために調製することができる。これらのうちでもっとも単純なものは、滅菌リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）における凍結乾燥ＤＮＡの再構成である。様々な方法が記載されており、新たな技法が利用可能になり得る。上記で言及したように、核酸は、カチオン性脂質で好都合に製剤化される。加えて、糖脂質、融合性リポソーム、ペプチド、及び保護的、相互作用的、非縮合性（ＰＩＮＣ）と集合的に呼ばれる化合物もまた、精製プラスミドＤＮＡと複合体化させて、安定性、筋肉内分散、または特異的な器官もしくは細胞タイプへの輸送などの変数に影響を及ぼすことができる。

【０３３５】

本明細書に開示される方法の各工程を実施することと、複数の抗原または複数の抗原のサブセットを含むワクチンを生産することと、を含む、ワクチンの製造方法も提供される。本明細書に開示される方法の各工程を実施することと、カセットを含むアデノウイルスベクターを生産することと、を含む、アデノウイルスベクターの製造方法も提供される。例えば、本明細書に記載されるＴＥＴｒ制御プロモーターシステムなどのＴＥＴプロモーターシステムを使用してアデノウイルスベクターを製造する方法が開示される。ＴＥＴｒ制御プロモーターシステムを用いたウイルス生産は、ａ．カセットを含むウイルスベクターを与えることであって、カセットが、（ｉ）少なくとも１つのペイロード核酸配列と、（ｉｉ）少なくとも１つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも１つのプロモーター配列であって、少なくとも１つのプロモーターが、テトラサイクリン（ＴＥＴ）リプレッサータンパク質（ＴＥＴｒ）制御プロモーターである、少なくとも１つのプロモーター配列と、を含む、ことと、ｂ．ＴＥＴｒタンパク質を発現するように操作された細胞を与えることと、ｃ．ウイルスベクターを、ウイルスの生産に充分な条件下で細胞と接触させることと、を含むことができる。

【０３３６】

本明細書に開示する抗原は、当技術分野において公知の方法を用いて製造することができる。例えば、本明細書に開示する抗原またはベクター（例えば、１つ以上の抗原をコードする少なくとも１つの配列を含むベクター）を生産する方法は、抗原またはベクターを発現するのに適している条件下で宿主細胞を培養する工程であって、宿主細胞が、抗原またはベクターをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドを含む工程、及び、抗原またはベクターを精製する工程を含むことができる。標準的な精製法は、クロマトグラフィー技法、電気泳動技法、免疫学的技法、沈降技法、透析技法、濾過技法、濃縮技法、及びクロマトフォーカシング技法を含む。

【０３３７】

宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＮＳ０細胞、酵母、またはＨＥＫ２９３細胞を含むことができる。宿主細胞は、本明細書に開示する抗原またはベクターをコードする少なくとも１つの核酸配列を含む、１つ以上のポリヌクレオチドで形質転換することができ、任意で、単離されたポリヌクレオチドは、抗原またはベクターをコードする少なくとも１つの核酸配列に機能的に連結されたプロモーター配列をさらに含む。ある特定の実施形態において、単離されたポリヌクレオチドは、ｃＤＮＡであることが

できる。
【０３３８】
ＶＩＩ．抗原の使用及び投与
ワクチン接種プロトコールを用いて対象に１つ以上の抗原を投与することができる。プライミングワクチン及びブースターワクチンを用いて対象への投与を行うことができる。プライミングワクチンは、Ｃ６８（例えば、配列番号１または２に示される配列）またはｓｒＲＮＡ（例えば、配列番号３または４に示される配列）に基づいたものとすることができ、ブースターワクチンは、Ｃ６８（例えば、配列番号１または２に示される配列）またはｓｒＲＮＡ（例えば、配列番号３または４に示される配列）に基づいたものとすることができる。各ベクターは、通常、抗原を含むカセットを含んでいる。カセットは、各抗原を通常取り囲む天然の配列、またはＡＡＹなどの他の非天然のスペーサー配列などのスペーサーによって分離された約２０個の抗原を含むことができる。カセットは、破傷風毒素抗原などのＭＨＣＩＩ抗原、及び普遍的なクラスＩＩ抗原とみなされるＰＡＤＲＥ抗原を含んでもよい。カセットは、ユビキチンターゲティング配列などのターゲティング配列を含んでもよい。さらに、各ワクチン用量は、チェックポイント阻害剤（ＣＰＩ）と組み合わせて（例えば、同時、その前、またはその後で）対象に投与することができる。ＣＰＩは、抗体またはその抗原結合部分など、ＣＴＬＡ４、ＰＤ１、及び／またはＰＤＬ１を阻害するものを含むことができる。かかる抗体としては、トレメリムマブまたはデュルバルマブを挙げることができる。
【０３３９】
プライミングワクチンは、対象に注射（例えば筋肉内に）することができる。用量ごとに両側性注射を用いることができる。例えば、ＣｈＡｄＶ６８（Ｃ６８）の１回以上の注射を用いることができ(例えば、総用量１×１０^{12}個のウイルス粒子）、０．００１～１ｕｇのＲＮＡの範囲から選択される低ワクチン用量、詳細には０．１もしくは１ｕｇの自己複製ＲＮＡ（ｓｒＲＮＡ）の１回以上の注射を用いることができ、または、１～１００ｕｇのＲＮＡの範囲から選択される高ワクチン用量、詳細には１０もしくは１００ｕｇのｓｒＲＮＡの１回以上の注射を用いることができる。
【０３４０】
プライムワクチン接種後に、ワクチンブースト（ブースターワクチン）を注射（例えば筋肉内に）することができる。ブースターワクチンは、プライム後の約１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０週間ごと、例えば、４週間ごと、及び／または８週間ごとに投与することができる。用量ごとに両側性注射を用いることができる。例えば、ＣｈＡｄＶ６８（Ｃ６８）の１回以上の注射を用いることができ(例えば、総用量１×１０^{12}個のウイルス粒子）、０．００１～１ｕｇのＲＮＡの範囲から選択される低ワクチン用量、詳細には０．１もしくは１ｕｇの自己複製ＲＮＡ（ｓｒＲＮＡ）の１回以上の注射を用いることができ、または、１～１００ｕｇのＲＮＡの範囲から選択される高ワクチン用量、詳細には１０もしくは１００ｕｇのｓｒＲＮＡの１回以上の注射を用いることができる。
【０３４１】
抗ＣＴＬＡ－４（例えばトレメリムマブ）を対象に投与することもできる。例えば、抗ＣＴＬＡ４を筋肉内ワクチン注射（ＣｈＡｄＶ６８プライムまたはｓｒＲＮＡ低用量）の部位の近くに皮下投与することで同じリンパ節内に確実に送り込むことができる。トレメリムマブは、ＣＴＬＡ－４の選択的ヒトＩｇＧ２ｍＡｂ阻害剤である。標的抗ＣＴＬＡ－４（トレメリムマブ）皮下用量は、通常、７０～７５ｍｇ（詳細には７５ｍｇ）であり、例えば、１～１００ｍｇまたは５～４２０ｍｇの用量範囲である。
【０３４２】
特定の場合では、デュルバルマブ（ＭＥＤＩ４７３６）などの抗ＰＤ－Ｌ１抗体を使用することができる。デュルバルマブは、ＰＤ－１及びＣＤ８０へのＰＤ－Ｌ１の結合を阻害する選択的な高親和性のヒトＩｇＧ１　ｍＡｂである。デュルバルマブは一般的に４週間ごとに２０ｍｇ／ｋｇが静脈内投与される。
【０３４３】

免疫モニタリングを、ワクチン投与の前、その間、及び／またはその後に行うことができる。かかるモニタリングは、他のパラメータの中でもとりわけ、安全性及び有効性についての情報を与えることができる。

【０３４４】

免疫モニタリングを行うには、ＰＢＭＣが一般的に用いられる。ＰＢＭＣは、プライムワクチン接種の前、及びプライムワクチン接種の後（例えば、４週間及び８週間）に単離することができる。ＰＢＭＣは、ブーストワクチン接種の直前、及び各ブーストワクチン接種の後（例えば、４週間及び８週間）に採取することができる。

【０３４５】

Ｔ細胞応答を、免疫モニタリングプロトコールの一環として評価することができる。例えば、本明細書に記載されるワクチン組成物が免疫応答を刺激する能力を監視及び／または評価することができる。本明細書で使用する「免疫応答を刺激する」とは、免疫応答を開始させること（例えば、ナイーブな対象において免疫応答の開始を刺激するプライミングワクチン）、または免疫応答の増強（例えば、プライミングワクチンにより開始された既存の免疫応答などの抗原に対する既存の免疫応答を有する対象における免疫応答の増強を刺激するブースターワクチン）などの免疫応答のあらゆる増加を指す。Ｔ細胞応答は、ＥＬＩＳｐｏｔ、細胞内サイトカイン染色、サイトカイン分泌、及び細胞表面捕捉、Ｔ細胞増殖、ＭＨＣマルチマー染色、または細胞毒性アッセイなどの当業者には周知の１つ以上の方法を用いて測定することができる。ワクチンにコードされたエピトープに対するＴ細胞応答は、ＥＬＩＳｐｏｔアッセイを用いて、ＩＦＮ－γなどのサイトカインの誘導を測定することによりＰＢＭＣから監視することができる。ワクチンにコードされたエピトープに対する特異的なＣＤ４またはＣＤ８　Ｔ細胞応答は、フローサイトメトリーを用いて、ＩＦＮ－γなどの細胞内または細胞外で捕捉されたサイトカインの誘導を測定することによりＰＢＭＣから監視することができる。ワクチンにコードされたエピトープに対する特異的なＣＤ４またはＣＤ８　Ｔ細胞応答は、ＭＨＣマルチマー染色を用い、エピトープ／ＭＨＣクラスＩ複合体に対して特異的なＴ細胞受容体を発現するＴ細胞集団を測定することによりＰＢＭＣから監視することができる。ワクチンにコードされたエピトープに対する特異的なＣＤ４またはＣＤ８　Ｔ細胞応答は、３Ｈチミジン、ブロモデオキシウリジン、及びカルボキシフルオロセインジアセテートスクシンイミジルエステル（ＣＦＳＥ）の取り込み後に、Ｔ細胞集団のエクスビボ増殖を測定することによりＰＢＭＣから監視することができる。ワクチンにコードされたエピトープに特異的なＰＢＭＣ由来Ｔ細胞の抗原認識能及び溶解活性は、クロム放出アッセイまたは代替的な比色細胞毒性アッセイにより機能的に評価することができる。

【０３４６】

Ｂ細胞応答は、Ｂ細胞の分化（例えば、形質細胞への分化）、Ｂ細胞または形質細胞の増殖、Ｂ細胞または形質細胞の活性化（例えば、ＣＤ８０またはＣＤ８６などの共刺激マーカーの増加）、抗体のクラススイッチ、及び／または抗体産生（例えば、ＥＬＩＳＡ）を判定するために用いられるアッセイなど、当該技術分野では周知の１つ以上の方法を用いて測定することができる。

【０３４７】

ＶＩＩＩ．抗原の特定

ＶＩＩＩ．Ａ．抗原候補の特定

腫瘍及び正常のエクソーム及びトランスクリプトームのＮＧＳ解析のための研究法を、抗原の特定のスペースに記載し、適用している[6，14，15]。臨床設定における抗原の特定において、より大きな感度及び特異性のためのある特定の最適化を考慮することができる。これらの最適化は、実験室プロセスに関連するもの及びＮＧＳデータ解析に関連するものの、２つの区域にグループ化することができる。記載される研究法は、感染症生物、対象の感染症、または対象の感染細胞からの特定など、他の状況での抗原の特定にも適用することができる。最適化の例は当業者には周知のものであり、例えば、そのような方法が、あらゆる目的で本明細書に参照によりその全容をそれぞれ援用する米国特許第１０，

０５５，５４０号、米国特許出願公開第ＵＳ２０２０００１０８４９Ａ１号、ならびに国際特許出願公開第ＷＯ／２０１８／１９５３５７号及び同第ＷＯ／２０１８／２０８８５６号により詳細に記載されている。

【０３４８】

ＶＩＩＩ．Ｂ．ＨＬＡペプチドの単離及び検出

ＨＬＡペプチド分子の単離は、組織試料の溶解及び可溶化後に、古典的な免疫沈降（ＩＰ）法を用いて行った（５５～５８）。清澄化した溶解物を、ＨＬＡ特異的ＩＰに使用した。

【０３４９】

免疫沈降は、抗体がＨＬＡ分子に特異的である、ビーズにカップリングした抗体を用いて行った。汎クラスＩ　ＨＬＡ免疫沈降のためには、汎クラスＩ　ＣＲ抗体を使用し、クラスＩＩ　ＨＬＡ－ＤＲのためには、ＨＬＡ－ＤＲ抗体を使用する。抗体を、一晩インキュベーション中に、ＮＨＳ－セファロースビーズに共有結合で付着させる。共有結合性の付着後、ビーズを洗浄して、ＩＰのために等分した（５９、６０）。免疫沈降は、ビーズに共有結合されていない抗体を用いて行うこともできる。一般的に、これは、抗体をカラムに保持するためにＰｒｏｔｅｉｎＡ及び／またはＰｒｏｔｅｉｎＧでコーティングしたセファロースまたは磁気ビーズを使用して行われる。ＭＨＣ／ペプチド複合体を選択的に濃縮するために使用することができるいくつかの抗体を下記に示す。

抗体名	特異性
W6/32	クラスI HLA-A, B, C
L243	クラスII - HLA-DR
Tu36	クラスII - HLA-DR
LN3	クラスII - HLA-DR
Tu39	クラスII - HLA-DR, DP, DQ

【０３５０】

清澄化した組織溶解物を、免疫沈降のために抗体ビーズに添加する。免疫沈降後、ビーズを溶解物から除去し、追加的なＩＰを含む追加的な実験のために、溶解物を保存する。標準的な技法を用いて、ＩＰビーズを洗浄して非特異的結合を除去し、ＨＬＡ／ペプチド複合体をビーズから溶出する。分子量スピンカラムまたはＣ１８分画を用いて、タンパク質構成要素をペプチドから除去する。結果として生じたペプチドを、ＳｐｅｅｄＶａｃ蒸発によって乾燥させ、いくつかの場合には、ＭＳ解析の前に－２０℃で保存する。

【０３５１】

乾燥したペプチドを、逆相クロマトグラフィーに適しているＨＰＬＣ緩衝液において再構成し、Ｆｕｓｉｏｎ　Ｌｕｍｏｓ質量分析計（Ｔｈｅｒｍｏ）における勾配溶出のために、Ｃ－１８マイクロキャピラリーＨＰＬＣカラム上にロードする。ペプチド質量／電荷（ｍ／ｚ）のＭＳ１スペクトルを、Ｏｒｂｉｔｒａｐ検出器において高解像度で収集し、その後、ＭＳ２低解像度スキャンを、選択イオンのＨＣＤフラグメンテーション後にイオントラップ検出器において収集した。追加的に、ＭＳ２スペクトルは、ＣＩＤもしくはＥＴＤフラグメンテーション法、または、ペプチドのより大きなアミノ酸カバレッジを獲得するための３つの技法の任意の組み合わせのいずれかを用いて、取得することができる。ＭＳ２スペクトルはまた、Ｏｒｂｉｔｒａｐ検出器において高解像度質量精度で測定することもできる。

【０３５２】

各解析由来のＭＳ２スペクトルを、Ｃｏｍｅｔ（６１、６２）を用いてタンパク質データベースに対して検索し、ペプチド特定を、Ｐｅｒｃｏｌａｔｏｒ（６３～６５）を用いてスコア化する。ＰＥＡＫＳ　ｓｔｕｄｉｏ（Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ　Ｉｎｃ．）及び他のサーチエンジンを用いてさらなるシークエンシングを行うか、またはスペクトルマッチング及びデノボシークエンシング（９７）を含むシークエン

シング法を用いることができる。

【０３５３】

ＶＩＩＩ．Ｂ．１．総合的ＨＬＡペプチドシークエンシングのためのＭＳ検出限界の研究

ペプチドＹＶＹＶＡＤＶＡＡＫ（配列番号７７）を用いて、何が検出の限界かを、ＬＣカラム上にロードした様々な量のペプチドを用いて決定した。試験したペプチドの量は、１ｐｍｏｌ、１００ｆｍｏｌ、１０ｆｍｏｌ、１ｆｍｏｌ、及び１００ａｍｏｌであった。（表１）結果を図２４Ａ及び２４Ｂに示す。これらの結果は、検出の最低限界（ＬｏＤ）がアトモルの範囲（10^{-18}）にあること、ダイナミックレンジが５桁に及ぶこと、及び、シグナル対ノイズが、低いフェムトモル範囲（10^{-15}）でシークエンシングに充分であるように見えることを示す。

【表１】

表１

ペプチドm／z	カラムへのロード	１ｅ９個の細胞中のコピー／細胞
５６６．８３０	１ｐｍｏｌ	６００
５６２．８２３	１００ｆｍｏｌ	６０
５５９．８１６	１０ｆｍｏｌ	６
５５６．８１０	１ｆｍｏｌ	０．６
５５３．８０２	１００ａｍｏｌ	０．０６

【０３５４】

ＩＸ．提示モデル

提示モデルを用いて、患者におけるペプチド提示の尤度を特定することができる。さまざまな提示モデルが当業者には周知であり、例えば、そのような提示モデルが、あらゆる目的で本明細書に参照によりそれらの全容をそれぞれ援用する米国特許第１０，０５５，５４０号、米国特許出願公開第ＵＳ２０２０００１０８４９Ａ１号及び同第ＵＳ２０１１０２９３６３７号、ならびに国際特許出願公開第ＷＯ／２０１８／１９５３５７号、同第ＷＯ／２０１８／２０８８５６号、及び同第ＷＯ２０１６１８７５０８号により詳細に記載されている。

【０３５５】

Ｘ．訓練モジュール

訓練モジュールを用いて、ペプチド配列がそのペプチド配列に関連したＭＨＣアレルによって提示される尤度を生成する１つ以上の提示モデルを訓練データセットに基づいて構築することができる。さまざまな訓練モジュールが当業者には周知であり、例えば、そのような訓練モジュールが、あらゆる目的で本明細書に参照によりそれらの全容をそれぞれ援用する米国特許第１０，０５５，５４０号、米国特許出願公開第ＵＳ２０２０００１０８４９Ａ１号、ならびに国際特許出願公開第ＷＯ／２０１８／１９５３５７号、及び同第ＷＯ／２０１８／２０８８５６号により詳細に記載されている。訓練モジュールは、アレル毎ベースでペプチドの提示尤度を予測するための予測モデルを構築することができる。訓練モジュールは、２つ以上のＭＨＣアレルが存在する複数アレル場面においてペプチドの提示尤度を予測するための提示モデルも構築することができる。

【０３５６】

ＸＩ．予測モジュール

予測モジュールを用いて、配列データを受け取って、提示モデルを用いて配列データ中の候補抗原を選択することができる。具体的には、配列データは、患者の腫瘍組織細胞から抽出されたＤＮＡ配列、ＲＮＡ配列、及び／またはタンパク質配列、患者感染細胞、ま

たは感染症生物自体であってよい。予測モジュールは、患者の正常組織細胞から抽出された配列データをその患者の腫瘍組織細胞から抽出された配列データと比較して１つ以上の変異を有する部分を特定することによって、変異したペプチド配列である候補新生抗原を特定することができる。予測モジュールは、例えば、患者の正常組織の細胞から抽出された配列データを、患者の感染細胞から抽出された配列データと比較して１つ以上の感染症生物関連抗原を含む部分を特定することにより、病原体由来ペプチド、ウイルス由来ペプチド、細菌由来ペプチド、真菌由来ペプチド、及び寄生虫由来ペプチドである候補抗原を特定することができる。予測モジュールは、患者の正常組織細胞から抽出された配列データをその患者の腫瘍組織細胞から抽出された配列データと比較して不適切に発現している候補抗原を特定することにより、正常細胞または組織と比較して腫瘍細胞またはがん性組織で発現が変更されている候補抗原を特定することができる。予測モジュールは、患者の正常組織の細胞から抽出された配列データをその患者の感染組織の細胞から抽出された配列データと比較して、発現される候補抗原を特定する（例えば、感染症で特異的に発現されるポリヌクレオチド及び／またはポリペプチドを特定する）ことにより、正常細胞または組織と比較して感染細胞または感染組織で発現される候補抗原を特定することができる。

【０３５７】

提示モジュールは、１つ以上の提示モデルを処理されたペプチド配列に適用してペプチド配列の提示尤度を推定することができる。具体的には、予測モジュールは、提示モデルを候補抗原に適用することによって、腫瘍ＨＬＡ分子または感染細胞ＨＬＡ分子上に提示される可能性が高い１つ以上の候補抗原ペプチド配列を選択することができる。一実現形態では、提示モジュールは、あらかじめ決定された閾値を上回る推定提示尤度を有する候補抗原配列を選択する。別の実現形態では、提示モデルは、最も高い推定提示尤度を有するＮ個の候補抗原配列を選択する（Ｎは、一般的に、ワクチン中で送達することができるエピトープの最大数である）。所定の患者について選択された候補抗原を含むワクチンを患者に注射して免疫応答を誘導することができる。

【０３５８】

ＸＩ．Ｂ．　カセット設計モジュール

ＸＩ．Ｂ．１　概要

カセット設計モジュールを用いて、患者に注射するために選択された候補ペプチドに基づいてワクチンカセット配列を生成することができる。さまざまなカセット設計モジュールが当業者には周知であり、例えば、そのようなカセット設計訓練モジュールが、あらゆる目的で本明細書に参照によりそれらの全容をそれぞれ援用する米国特許第１０，０５５，５４０号、米国特許出願公開第ＵＳ２０２０００１０８４９Ａ１号、ならびに国際特許出願公開第ＷＯ／２０１８／１９５３５７号、及び同第ＷＯ／２０１８／２０８５６号により詳細に記載されている。

【０３５９】

治療エピトープのセットは、所定の閾値を上回る提示尤度（提示尤度は、提示モデルにより決定される）に関連付けられた予測モジュールによって決定された選択されたペプチドに基づいて生成することができる。しかしながら、他の実施形態では、治療エピトープのセットは、多くの方法の任意の１つ以上（単独または組み合わせ）に基づいて、例えば、患者のＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩアレルに対する結合親和性もしくは予測される結合親和性、患者のＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩアレルに対する結合安定性もしくは予測される結合安定性、ランダムサンプリングなどに基づいて、生成することができる。

【０３６０】

治療エピトープはそれ自体が選択されたペプチドに相当してもよい。治療エピトープは、選択されたペプチド以外にＣ及び／またはＮ末端フランキング配列を含むこともできる。Ｎ及びＣ末端フランキング配列は、その由来源タンパク質との関連において治療ワクチンエピトープの天然のＮ及びＣ末端フランキング配列であってよい。治療エピトープは固定長のエピトープを表してもよい。治療エピトープは、可変長のエピトープを表してもよく、エピトープの長さは例えばＣまたはＮ末端フランキング配列の長さによって異なりう

る。例えば、Ｃ末端フランキング配列及びＮ末端フランキング配列は、それぞれ２～５残基の異なる長さを有してよく、これによりエピトープの１６種類の可能な選択肢が与えられる。

【０３６１】

カセット設計モジュールは、カセット内の２個の治療エピトープ間の連結部にまたがるジャンクションエピトープの提示を考慮することによってカセット配列を生成することもできる。ジャンクションエピトープは、カセット内で治療エピトープ及びリンカー配列を連結するプロセスによってカセット内に生じる新規な非自己であるが無関係なエピトープ配列である。ジャンクションエピトープの新規な配列は、カセットの治療エピトープ自体とは異なる。

【０３６２】

カセット設計モジュールは、ジャンクションエピトープがその患者において提示される尤度を低下させるカセット配列を生成することができる。具体的には、カセットが患者に注射される際、ジャンクションエピトープは、患者のＨＬＡクラスＩまたはＨＬＡクラスＩＩアレルによって提示される可能性を有し、それぞれＣＤ８またはＣＤ４　Ｔ細胞応答を刺激する。かかる応答は、ジャンクションエピトープに対する反応性を有するＴ細胞は治療効果を有さないことから望ましくなく、抗原競合によりカセット内の選択された治療エピトープに対する免疫応答を消失させる可能性がある[７６]。

【０３６３】

カセット設計モジュールは、１つ以上の候補カセットについて繰り返し処理を行って、そのカセット配列に関連付けられたジャンクションエピトープの提示スコアが数値閾値を下回るカセット配列を決定することができる。ジャンクションエピトープ提示スコアは、カセット内のジャンクションエピトープの提示尤度に関連付けられた量であり、ジャンクションエピトープ提示スコアの値が高いほど、カセットのジャンクションエピトープがＨＬＡクラスＩまたはＨＬＡクラスＩＩまたはその両方によって提示されやすいことを示す。

【０３６４】

一実施形態では、カセット設計モジュールは、候補カセット配列間で最も低いジャンクションエピトープ提示スコアに関連付けられたカセット配列を決定することができる。

【０３６５】

カセット設計モジュールは、１つ以上の候補カセット配列について繰り返し処理を行い、各候補カセットのジャンクションエピトープ提示スコアを決定し、閾値を下回るジャンクションエピトープ提示スコアに関連付けられた最適なカセット配列を特定することができる。

【０３６６】

カセット設計モジュールは、候補カセット配列内のジャンクションエピトープのいずれかが、ワクチンを設計しようとする特定の患者の自己エピトープであるかどうかを識別するために１つ以上の候補カセット配列をさらに確認することができる。これを行うには、カセット設計モジュールは、ＢＬＡＳＴなどの既知のデータベースに対してジャンクションエピトープを確認する。一実施形態では、カセット設計モジュールは、ジャンクション自己エピトープを防止するカセットを設計するように構成することができる。

【０３６７】

カセット設計モジュールは、ブルートフォースアプローチを実行して、すべての、または大部分の可能な候補カセット配列について繰り返し処理を行うことで最小のジャンクションエピトープ提示スコアを有する配列を選択することができる。しかしながら、かかる候補カセットの数は、ワクチンの容量が大きくなるにしたがって途方もなく大きくなりうる。例えば、２０個のエピトープのワクチン容量では、カセット設計モジュールは、最小のエピトープ提示スコアを有するカセットを決定するために約10^{18}個の可能な候補カセットについて繰り返し処理を行わなければならない。この決定は、カセット設計モジュールが妥当な長さの時間内で患者に対するワクチンを生成するには計算の負荷（必要とされる計算処理リソースの点で）が大きくなり、時として処理不能となりうる。さらに、各

候補カセットについて可能なジャンクションエピトープを処理することはよりいっそうの負荷となりうる。したがって、カセット設計モジュールは、ブルートフォースアプローチにおける候補カセット配列の数よりも大幅に小さい候補カセット配列の数について繰り返し処理を行う方法に基づいてカセット配列を選択することができる。

【０３６８】

カセット設計モジュールは、ランダムに、または少なくとも疑似ランダムに生成された候補カセットを生成し、所定の閾値を下回るジャンクションエピトープ提示スコアに関連付けられた候補カセットをカセット配列として選択することができる。さらに、カセット設計モジュールは、最小のジャンクションエピトープ提示スコアを有するサブセットからの候補カセットをカセット配列として選択することができる。例えば、カセット設計モジュールは、２０個の選択されたエピトープのセットについて約１００万の候補カセットのサブセットを生成し、最小のジャンクションエピトープ提示スコアを有する候補カセットを選択することができる。ランダムカセット配列のサブセットを生成し、このサブセットからジャンクションエピトープ提示スコアの低いカセット配列を選択することはブルートフォースアプローチと比べて最適とはいえないが、これは、必要な計算リソースが大幅に少なく、そのため、その実施が技術的に可能である。さらに、このより効率的な手法に対してブルートフォース法を行うことは、ジャンクションエピトープ提示スコアのわずかな、またはさらには無視される程度の改善しかもたらされない可能性があるため、リソースの配分の観点からはあまり価値がない。カセット設計モジュールは、カセットのエピトープ配列を非対称巡回セールスマン問題（ＴＳＰ）として定式化することにより、改善されたカセット構成を決定することができる。ノードのリスト、及び各ノードのペア間の距離が与えられた場合、ＴＳＰは、各ノードをちょうど１回ずつ訪問して元のノードに戻るための最小の総距離に関連付けられたノードの配列を決定する。例えば、互いの間の距離が既知である都市Ａ、Ｂ、及びＣが与えられた場合、ＴＳＰの解は、可能な巡回路のうちで各都市をちょうど１回ずつ訪問するのに移動する総距離が最小となるような都市の閉じた配列を生成する。ＴＳＰの非対称バージョンは、ノードのペア間の距離が非対象である場合の最適なノードの配列を決定する。例えば、ノードＡからノードＢに移動するための「距離」は、ノードＢからノードＡに移動するための「距離」と異なる場合がある。非対称ＴＳＰを用いて改善された最適カセットについて解くことにより、カセット設計モジュールは、カセットの各エピトープ間のジャンクションにわたって低い提示スコアを与えるカセット配列を見つけることができる。非対称ＴＳＰの解は、カセットの各ジャンクションにわたったジャンクションエピトープ提示スコアを最小とするために各エピトープが連結されなければならない順序に対応した治療エピトープの配列を示す。このアプローチによって決定されたカセット配列は、ジャンクションエピトープの提示が大幅に低い配列を与える一方で、特に生成される候補カセット配列の数が大きい場合に、必要とされる計算リソースがランダムサンプリングアプローチよりも大幅に少なくなる可能性がある。カセット設計を最適化するための異なる計算アプローチ及び比較の例示的な例が、あらゆる目的で本明細書に参照によりそれらの全容をそれぞれ援用する米国特許第１０，０５５，５４０号、米国特許出願公開第ＵＳ２０２０００１０８４９Ａ１号、ならびに国際特許出願公開第ＷＯ／２０１８／１９５３５７号、及び同第ＷＯ／２０１８／２０８８５６号により詳細に記載されている。

【０３６９】

ＸＩ．Ｂ．２ 共有抗原ワクチン配列の選択

共有抗原ワクチンに含めるための共有抗原の配列及びかかるワクチンによる治療に適当な患者は、本明細書に示される詳細な開示を用いることで当業者が選択することができる。特定の場合では、特定の変異とＨＬＡアレルの組み合わせが好ましい場合があり（例えば、それぞれが対象に存在することを示す特定の対象から得られるシークエンシングデータに基づき）、次にこれらを組み合わせて用い、共有新生抗原配列を同定することができる。

【０３７０】

ＸＩＩＩ．例示的なコンピュータ

本明細書に記載される計算方法のいずれにおいてもコンピュータを使用することができる。当業者には、コンピュータは異なるアーキテクチャを有し得る点が認識されよう。コンピュータの例は当業者には周知のものであり、例えば、そのようなコンピュータが、あらゆる目的で本明細書に参照によりその全容をそれぞれ援用する米国特許第１０，０５５，５４０号、米国特許出願公開第ＵＳ２０２０００１０８４９Ａ１号、ならびに国際特許出願公開第ＷＯ／２０１８／１９５３５７号及び同第ＷＯ／２０１８／２０８８５６号により詳細に記載されている。

【０３７１】

ＸＩＶ．抗原送達ベクターの例

【０３７２】

以下は、本明細書を実施するための具体的な実施形態の例である。これらの例はあくまで例示の目的で示されるものにすぎず、本発明の範囲をいかなる意味においても限定しようとするものではない。用いられる数値（例えば、量、温度など）に関して精度を確実とするべく努力に努めてはいるが、ある程度の実験的誤差及び偏差は無論のこと許容されなければならない。

【０３７３】

本発明の実施では、特に断らない限りは、当該技術分野の技術の範囲内で、タンパク質化学、生化学、組換えＤＮＡ技術、及び薬理学の従来の方法を用いている。かかる技術は文献に完全に説明されている（例えば、Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ（Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，１９９３）；Ａ．Ｌ．Ｌｅｈｎｉｎｇｅｒ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（Ｗｏｒｔｈ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｉｎｃ．，ｃｕｒｒｅｎｔ ａｄｄｉｔｉｏｎ）；Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ： Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，１９８９）；Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ｓ．Ｃｏｌｏｗｉｃｋ ａｎｄ Ｎ．Ｋａｐｌａｎ ｅｄｓ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）；Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｅａｓｔｏｎ，Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ：Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，１９９０）；Ｃａｒｅｙ ａｎｄ Ｓｕｎｄｂｅｒｇ Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３ｒｄ Ｅｄ．（Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ） Ｖｏｌｓ Ａ ａｎｄ Ｂ（１９９２）を参照されたい）。

【０３７４】

ＸＩＶ．Ａ．新生抗原カセットの設計

ワクチン接種によって、対応する細胞免疫応答（複数可）を刺激するクラスＩ ＭＨＣに制限された複数の腫瘍特異的新生抗原（ＴＳＮＡ）を送達することができる。１つの例では、複数のエピトープを単一の遺伝子産物をしてコードするようにワクチンカセットを操作しているが、ここで各エピトープはそれらの天然の包囲ペプチド配列内に埋め込まれるか、または非天然リンカー配列によって分離されている。抗原のプロセシング及び提示、ひいてはＴＳＮＡ特異的ＣＤ８ Ｔ細胞応答の程度及び幅に潜在的に影響を及ぼしうるいくつかの設計パラメータが特定されている。本例では、いくつかのモデルカセットを設計及び構築して以下を評価した。すなわち、（１）１個の発現カセットに組み込まれた複数のエピトープに対する強いＴ細胞応答を生じることができるかどうか、（２）どのような条件が、すべてのエピトープの最適なプロセシング及び提示につながる、発現カセット内のＴＳＮＡ間に配置される最適リンカーを作るか、（３）カセット内の各エピトープの相対位置がＴ細胞応答に影響するか、（４）カセット内のエピトープの数が個々のエピトープに対するＴ細胞応答の程度または質に影響するかどうか、（５）細胞ターゲティング配列の付加がＴ細胞応答を向上させるか。

【０３７５】

抗原提示及びモデルカセット内のマーカーエピトープに特異的なＴ細胞応答を評価する

ために以下の２つの指標が開発された。すなわち、（１）特殊な操作を行ったレポーターＴ細胞の活性化によって測定される抗原提示の評価を可能としたインビトロ細胞ベーススクリーン（Ａａｒｎｏｕｄｓｅ　ｅｔ　ａｌ．，２００２；Ｎａｇａｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２）、及び（２）対応するエピトープ特異的Ｔ細胞応答によるヒト由来のカセットから誘導されたエピトープのワクチン接種後の免疫原性を評価するためにＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックマウス（Ｖｉｔｉｅｌｌｏ　ｅｔ　ａｌ．，１９９１）を使用したインビボアッセイ（Ｃｏｒｎｅｔ　ｅｔ　ａｌ．，２００６；Ｄｅｐｌａ　ｅｔ　ａｌ．，２００８；Ｉｓｈｉｏｋａ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９）。

【０３７６】

ＸＩＶ．Ｂ．抗原カセット設計の評価

ＸＩＶ．Ｂ．１．方法及び材料

ＴＣＲ及びカセット設計及びクローニング

選択されたＴＣＲは、Ａ＊０２０１により提示される場合にペプチドＮＬＶＰＭＶＡＴＶ（配列番号７８）（ＰＤＢ番号５Ｄ２Ｎ）、ＣＬＧＧＬＬＴＭＶ（配列番号７９）（ＰＤＢ番号３ＲＥＶ）、ＧＩＬＧＦＶＦＴＬ（配列番号８０）（ＰＤＢ番号１ＯＧＡ）ＬＬＦＧＹＰＶＹＶ（配列番号８１）（ＰＤＢ番号１ＡＯ７）を認識する。２Ａペプチド連結ＴＣＲサブユニット（βに続きα）、ＥＭＣＶＩＲＥＳ、及び２Ａ連結ＣＤ８サブユニット（βに続きα及びプロマイシン耐性遺伝子）を含むトランスファーベクターを構築した。オープンリーディングフレーム配列は、コドン最適化され、ＧｅｎｅＡｒｔ社により合成されたものである。

【０３７７】

インビトロエピトーププロセシング及び提示実験用の細胞株の作製

ペプチドは、ＰｒｏＩｍｍｕｎｅ社またはＧｅｎｓｃｒｉｐｔ社より購入し、水／ＤＭＳＯ（２：８，ｖ／ｖ）に加えた１０ｍＭ　ｔｒｉｓ（２－カルボキシルエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）で１０ｍｇ／ｍＬに希釈した。細胞培地及び補助添加物質は特に断らない限りはＧｉｂｃｏ社より入手した。熱不活化ウシ胎児血清（ＦＢＳｈｉ）はＳｅｒａｄｉｇｍ社より入手した。ＱＵＡＮＴＩ－Ｌｕｃ基質、ゼオシン、及びプロマイシンはＩｎｖｉｖｏＧｅｎ社より入手した。Ｊｕｒｋａｔ－Ｌｕｃｉａ　ＮＦＡＴ細胞（ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ社）を１０％ ＦＢＳｈｉ、ピルビン酸ナトリウム、及び１００μｇ／ｍＬのゼオシンを添加したＲＰＭＩ１６４０中で維持した。形質導入した後、これらの細胞にさらに０．３μｇ／ｍＬのプロマイシンを加えた。Ｔ２細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１９９２）をＩｓｃｏｖｅ培地（ＩＭＤＭ）＋２０％ＦＢＳｈｉ中で培養した。Ｕ－８７　ＭＧ（ＡＴＣＣ　ＨＴＢ－１４）細胞を、１０％ＦＢＳｈｉを添加したＭＥＭ　Ｅａｇｌｅｓ培地中で維持した。

【０３７８】

Ｊｕｒｋａｔ－Ｌｕｃｉａ　ＮＦＡＴ細胞は、ＮＦＡＴ誘導性Ｌｕｃｉａレポーターコンストラクトを含んでいる。Ｌｕｃｉａ遺伝子は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合によって活性化されると、セレンテラジンを利用するルシフェラーゼを培地中に分泌させる。このルシフェラーゼは、ＱＵＡＮＴＩ－Ｌｕｃルシフェラーゼ検出試薬を用いて測定することができる。Ｊｕｒｋａｔ－Ｌｕｃｉａ細胞をレンチウイルスで形質導入して抗原特異的ＴＣＲを発現させた。ＨＩＶ由来レンチウイルストランスファーベクターをＧｅｎｅＣｏｐｏｅｉａ社より入手し、ＶＳＶ－Ｇ（ｐＣＭＶ－ＶｓｖＧ）、Ｒｅｖ（ｐＲＳＶ－Ｒｅｖ）及びＧａｇ－ｐｏｌ（ｐＣｇｐＶ）を発現するレンチウイルス支持プラスミドをＣｅｌｌ　Ｄｅｓｉｇｎ　Ｌａｂｓ社より入手した。

【０３７９】

レンチウイルスを、４０μＬのリポフェクタミン及び２０μｇのＤＮＡミクスチャー（重量比４：２：１：１のトランスファープラスミドｐＣｇｐＶ：ｐＲＳＶ－Ｒｅｖ：ｐＣＭＶ－ＶｓｖＧ）を使用し、ＨＥＫ２９３細胞の５０～８０％コンフルエンスにあるＴ７５フラスコをリポフェクタミン２０００（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ社）でトランスフェクトすることにより調製した。８～１０ｍＬのウイルス含有培地をＬｅｎｔｉ－Ｘシス

テム（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社）を用いて濃縮し、ウイルスを１００～２００μｌの新鮮培地中に再懸濁した。この体積を用いて等しい体積のＪｕｒｋａｔ－Ｌｕｃｉａ細胞（５×１０Ｅ４～１×１０Ｅ６個の細胞を異なる実験で使用した）にオーバーレイした。０．３μｇ／ｍｌのプロマイシン含有培地中での培養後、細胞をソートしてクロナリティーを得た。これらのＪｕｒｋａｔ－Ｌｕｃｉａ　ＴＣＲクローンを、ペプチドを取り込ませたＴ２細胞を用いて活性及び選択性について試験した。

【０３８０】

インビトロエピトーププロセシング及び提示アッセイ

Ｔ２細胞はＴＣＲによる抗原認識を調べる目的で日常的に使用されている。Ｔ２細胞は、抗原プロセシング用のペプチドトランスポーターを欠失しており（ＴＡＰ欠損）、内因性のペプチドをＭＨＣ上に提示するために小胞体に取り込むことができない。しかしながら、Ｔ２細胞には外因性のペプチドを容易に取り込ませることができる。５種類のマーカーペプチド（ＮＬＶＰＭＶＡＴＶ（配列番号７８）、ＣＬＧＧＬＬＴＭＶ（配列番号７９）、ＧＬＣＴＬＶＡＭＬ（配列番号８２）、ＬＬＦＧＹＰＶＹＶ（配列番号８１）、ＧＩＬＧＦＶＦＴＬ（配列番号８０）及び２種類の無関係のペプチドＷＬＳＬＬＶＰＦＶ（配列番号８３）、ＦＬＬＴＲＩＣＴ（配列番号８４）をＴ２細胞に取り込ませた。簡単に述べると、Ｔ２細胞をカウントし、ＩＭＤＭ＋１％ＦＢＳｈｉで1×10^{6}細胞／ｍＬに希釈した。各ペプチドは１０μｇペプチド／1×10^{6}細胞となるように加えた。次いで細胞を３７℃で９０分間インキュベートした。細胞をＩＭＤＭ＋２０％ＦＢＳｈｉで２回洗浄し、５×１０Ｅ５細胞／ｍＬに希釈し、１００μＬを９６ウェルＣｏｓｔａｒ組織培養プレートにプレーティングした。Ｊｕｒｋａｔ－Ｌｕｃｉａ　ＴＣＲクローンをカウントし、ＲＰＭＩ１６４０＋１０％ＦＢＳｈｉ中で５×１０Ｅ５細胞／ｍＬに希釈し、１００μＬをＴ２細胞に加えた。プレートを３７℃、５％CO_2で一晩インキュベートした。次いでプレートを４００ｇで３分間遠心し、２０μＬの上清を白色平底Ｇｒｅｉｎｅｒプレートに取った。指示にしたがってＱＵＡＮＴＩ－Ｌｕｃ基質を調製し、５０μＬ／ウェルで加えた。ルシフェラーゼ発現をＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ　ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　ｉＥ３ｘで読み取った。

【０３８１】

アデノウイルスカセットによるマーカーエピトープ提示を試験するため、Ｕ－８７　ＭＧ細胞を代理抗原提示細胞（ＡＰＣ）として用い、アデノウイルスベクターで形質導入した。Ｕ－８７　ＭＧ細胞を収穫し、９６ウェルＣｏｓｔａｒ組織培養プレート中で培地中に５×１０Ｅ５細胞／１００μｌでプレーティングした。プレートを３７℃で約２時間インキュベートした。アデノウイルスカセットをＭＥＭ＋１０％ＦＢＳｈｉでＭＯＩ１００、５０、１０、５、１及び０に希釈し、Ｕ－８７　ＭＧ細胞に５μｌ／ウェルで加えた。プレートを再び３７℃で約２時間インキュベートした。Ｊｕｒｋａｔ－Ｌｕｃｉａ　ＴＣＲクローンをカウントし、ＲＰＭＩ＋１０％ＦＢＳｈｉ中で５×１０Ｅ５細胞／ｍＬに希釈し、Ｕ－８７　ＭＧ細胞に１００μＬ／ウェルで加えた。次いでプレートを３７℃、５％CO_2で約２４時間インキュベートした。プレートを４００ｇで３分間遠心し、２０μＬの上清を白色平底Ｇｒｅｉｎｅｒプレートに取った。指示にしたがってＱＵＡＮＴＩ－Ｌｕｃ基質を調製し、５０μＬ／ウェルで加えた。ルシフェラーゼ発現をＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ　ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　ｉＥ３ｘで読み取った。

【０３８２】

免疫原性実験用のマウス系統

トランスジェニックＨＬＡ－Ａ２．１（ＨＬＡ－Ａ２　Ｔｇ）マウスをＴａｃｏｎｉｃ　Ｌａｂｓ，Ｉｎｃ社より入手した。これらのマウスは、ヒトＨＬＡ－Ａ２．１リーダードメイン、α１ドメイン、及びα２ドメインと、マウスＨ２－Ｋｂ　α３ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインからなる導入遺伝子を有するものである（Ｖｉｔｉｅｌｌｏ　ｅｔ　ａｌ．，１９９１）。これらの実験で使用したマウスは、Ｃ５７Ｂｌ／６バックグラウンドの野生型ＢＡＬＢ／ｃＡｎＮＴａｃの雌及びホモ接合型ＨＬＡ－Ａ２．１Ｔｇの雌の第１世代子孫（Ｆ１）である。

【０３８３】
アデノウイルスベクター（Ａｄ５ｖ）による免疫化
ＨＬＡ－Ａ２ Ｔｇマウスを、前脛骨筋の両側性の筋肉内注射により１×１０^{10}～１×１０^{6}個のアデノウイルスベクターのウイルス粒子で免疫化した。免疫応答を免疫化の１２日後に測定した。
【０３８４】
リンパ球の単離
免疫化したマウスの新しく収穫した脾臓及びリンパ節からリンパ球を単離した。ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ組織解離装置を製造者の指示にしたがって使用して、１０％ウシ胎児血清をペニシリン及びストレプトマイシンとともに含むＲＰＭＩ（完全ＲＰＭＩ）中で組織を解離させた。
【０３８５】
エクスビボ酵素結合免疫スポット（ＥＬＩＳＰＯＴ）分析
マウスＩＦＮｇ ＥＬＩＳｐｏｔＰＬＵＳキット（ＭＡＢＴＥＣＨ社）を使用し、ＥＬＩＳＰＯＴハーモナイゼーションガイドライン（Ｊａｎｅｔｚｋｉ ｅｔ ａｌ．，２０１５）にしたがってＥＬＩＳＰＯＴ分析を行った。１×１０^{5}個の脾細胞を、９６ウェルＩＦＮｇ抗体コーティングプレート中で、１０ｕＭの示したペプチドと１６時間インキュベートした。スポットをアルカリホスファターゼを用いて現像した。反応時間を１０分間計り、プレートに水道水を流して反応を停止させた。スポットをＡＩＤ ｖＳｐｏｔ Ｒｅａｄｅｒ Ｓｐｅｃｔｒｕｍを用いてカウントした。ＥＬＩＳＰＯＴ分析を行うため、飽和度が５０％よりも高いウェルを「多すぎてカウント不能」として記録した。複製ウェルの偏差が１０％よりも大きい試料は分析から除外した。次いでスポットのカウントを、式：スポットカウント＋２×（スポットカウント×コンフルエンス（％）／［１００％－コンフルエンス（％）］）を用いてウェルのコンフルエンシーについて補正した。ネガティブペプチド刺激ウェル中のスポットカウントを抗原刺激したウェルから引くことによってネガティブバックグラウンドを補正した。最後に、多すぎてカウント不能として示したウェルを、最も高い観察された補正値に設定し、１００の位までの概数に四捨五入した。
【０３８６】
エクスビボ細胞内サイトカイン染色（ＩＣＳ）及びフローサイトメトリー分析
新しく単離したリンパ球を２～５×１０^{6}細胞／ｍＬの密度で１０ｕＭの示したペプチドと２時間インキュベートした。２時間後、ブレフェルジンＡを５ｕｇ／ｍｌの濃度にまで加え、細胞を刺激物質とさらに４時間インキュベートした。刺激後、生細胞を製造者のプロトコールにしたがって固定可能な生存率解析用色素ｅＦｌｕｏｒ７８０で標識し、抗ＣＤ８ ＡＰＣ（クローン５３－６．７，ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ社）により１：４００の希釈率で染色した。細胞内染色には抗ＩＦＮｇ ＰＥ（クローンＸＭＧ１．２，ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ社）を１：１００で使用した。試料をＡｔｔｕｎｅ ＮｘＴ Ｆｌｏｗ Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）で収集した。ＦｌｏｗＪｏを使用してフローサイトメトリーデータをプロットし、分析を行った。抗原特異的応答の程度を評価するため、ＣＤ８＋細胞のＩＦＮｇ＋の割合（％）及び全ＩＦＮｇ＋細胞数／１×１０^{6}個の生細胞の両方を、各ペプチド刺激物質に対して計算した。
【０３８７】
ＸＩＶ．Ｂ．２．抗原カセット設計のインビトロ評価
抗原カセットの設計の評価の一例として、インビトロの細胞ベースのアッセイを開発し、モデルワクチンカセット内の選択されたヒトエピトープが抗原提示細胞によって発現、プロセシング、及び提示されるかどうかを評価した（図１）。認識後、特性がよく知られているペプチド－ＨＬＡの組み合わせに特異的な５種類のＴＣＲのうちの１つを発現するように操作されたＪｕｒｋａｔ－ＬｕｃｉａレポーターＴ細胞が活性化され、活性化Ｔ細胞の核因子（ＮＦＡＴ）を核内に移行させると、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の転写が活性化される。個々のレポーターＣＤ８ Ｔ細胞株の抗原刺激をバイオルミネッセンスによって定量した。

【０３８８】
個々のＪｕｒｋａｔ－Ｌｕｃｉａレポーター株は、等モル量の翻訳産物が得られるようにＰ２Ａリボソームスキップ配列によって分離された抗原特異的ＴＣＲβ鎖とＴＣＲα鎖を含む発現コンストラクトによるレンチウイルス形質導入によって改変されたものである（Ｂａｎｕ ｅｔ ａｌ．，２０１４）。細胞表面上のＣＤ８は標的ｐＭＨＣ分子に対する結合親和性にとって重要であり、その細胞質テールの結合を介してシグナル伝達を促進する（Ｌｙｏｎｓ ｅｔ ａｌ．，２００６；Ｙａｃｈｉ ｅｔ ａｌ．，２００６）ことから、レンチウイルスコンストラクトへの第２のＣＤ８β－Ｐ２Ａ－ＣＤ８α因子の付加によって、親レポーター細胞株に欠損しているＣＤ８共受容体の発現がもたらされる。

【０３８９】
レンチウイルスによる形質導入の後、Ｊｕｒｋａｔ－Ｌｕｃｉａレポーターをプロマイシン選択下で増殖させ、ＦＡＣＳ（ｓｉｎｇｌｅ ｃｅｌｌ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ａｓｓｉｓｔｅｄ ｃｅｌｌ ｓｏｒｔｉｎｇ）（単一細胞蛍光支援細胞選別）に供し、モノクローナル集団をルシフェラーゼ発現について試験した。これにより、機能的細胞応答を有する特異的ペプチド抗原１、２、４、及び５について安定的に形質導入されたレポーター細胞株が得られた（表２）。

【表２】
表２：インビトロＴ細胞活性化アッセイの開発ルシフェラーゼの誘導によって測定されるペプチド特異的Ｔ細胞認識は、ワクチンカセット抗原の効果的なプロセシング及び提示を示す。

	短いカセット設計
エピトープ	AAY
1	24.5 ± 0.5
2	11.3 ± 0.4
3*	n/a
4	26.1 ± 3.1
5	46.3 ± 1.9

*エピトープ３のレポーターＴ細胞はまだ生成されていない。

【０３９０】
別の例では、一連の短いカセットにおいて、すべてのマーカーエピトープを同じ位置に組み込み（図２Ａ）、ＨＬＡ－Ａ＊０２０１制限エピトープ（図２Ｂ）を分離するリンカーのみを変えた。レポーターＴ細胞を、これらの短いカセットを発現するアデノウイルスコンストラクトを感染させたＵ－８７抗原提示細胞（ＡＰＣ）と個々に混合し、ルシフェラーゼ発現を非感染コントロールに対して測定した。モデルカセット内の４つすべての抗原が、一致するレポーターＴ細胞により認識され、複数の抗原が効率的にプロセシング及び提示されていることが示された。Ｔ細胞応答の程度は、天然及びＡＡＹリンカーについて概ね同様の傾向にしたがった。ＲＲリンカーベースのカセットから放出された抗原は、低いルシフェラーゼの誘導を示す（表３）。抗原プロセシングを阻害するように設計されたＤＰＰリンカーは、エピトープ提示が低いワクチンカセットを生じた（表３）。

【表３】

表３：短いカセット内のリンカー配列の評価。

インビトロＴ細胞活性化アッセイにおけるルシフェラーゼ誘導は、ＤＰＰベースのカセットと異なり、すべてのリンカーがカセット抗原の効率的な放出を促進したことを示した。Ｔ細胞エピトープのみ（リンカー無し）＝９ＡＡ、片側に天然リンカー＝１７ＡＡ、両側に天然リンカー＝２５ＡＡ、非天然リンカー＝ＡＡＹ、ＲＲ、ＤＰＰ

	短いカセット設計					
エピトープ	9AA	17AA	25AA	AAY	RR	DPP
1	33.6 ± 0.9	42.8 ± 2.1	42.3 ± 2.3	24.5 ± 0.5	21.7 ± 0.9	0.9 ± 0.1
2	12.0 ± 0.9	10.3 ± 0.6	14.6 ± 04	11.3 ± 0.4	8.5 ± 0.3	1.1 ± 0.2
3*	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
4	26.6 ± 2.5	16.1 ± 0.6	16.6 ± 0.8	26.1 ± 3.1	12.5 ± 0.8	1.3 ± 0.2
5	29.7 ± 0.6	21.2 ± 0.7	24.3 ± 1.4	46.3 ± 1.9	19.7 ± 0.4	1.3 ± 0.1

*エピトープ３のレポーターＴ細胞はまだ生成されていない。

【０３９１】

別の例では、ヒト及びマウスのエピトープ以外に、カセットのＮ末端またはＣ末端のいずれかに配置された、ユビキチン（Ｕｂ）、ＭＨＣ及びＩｇ－κシグナルペプチド（ＳＰ）、及び／またはＭＨＣ膜貫通（ＴＭ）モチーフなどのターゲティング配列を含むさらなる一連の短いカセットを構築した（図３）。アデノウイルスベクターによってＵ－８７ＡＰＣに送達されると、レポーターＴ細胞は、複数のカセット由来の抗原の効率的なプロセシング及び提示を示した。しかしながら、Ｔ細胞応答の程度は、異なるターゲティング機構によって大きく影響されなかった（表４）。

【表４】

表４：モデルワクチンカセットに付加された細胞ターゲティング配列の評価インビトロＴ細胞活性化アッセイを用いることにより、４つのＨＬＡ－Ａ*０２０１制限マーカーエピトープがモデルカセットから効率的に放出され、ターゲティング配列がＴ細胞の認識及び活性化を大幅に向上させないことが示された。

	短いカセット設計									
エピトープ	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	32.5 ± 1.5	31.8 ± 0.8	29.1 ± 1.2	29.1 ± 1.1	28.4 ± 0.7	20.4 ± 0.5	35.0 ± 1.3	30.3 ± 2.0	22.5 ± 0.9	38.1 ± 1.6
2	6.1 ± 0.2	6.3 ± 0.2	7.6 ± 0.4	7.0 ± 0.5	5.9 ± 0.2	3.7 ± 0.2	7.6 ± 0.4	5.4 ± 0.3	6.2 ± 0.4	6.4 ± 0.3
3*	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
4	12.3 ± 1.1	14.1 ± 0.7	12.2 ± 0.8	13.7 ± 1.0	11.7 ± 0.8	10.6 ± 0.4	11.0 ± 0.6	7.6 ± 0.6	16.1 ± 0.5	8.7 ± 0.5
5	44.4 ± 2.8	53.6 ± 1.6	49.9 ± 3.3	50.5 ± 2.8	41.7 ± 2.8	36.1 ± 1.1	46.5 ± 2.1	31.4 ± 0.6	75.4 ± 1.6	35.7 ± 2.2

*エピトープ３のレポーターＴ細胞はまだ生成されていない。

【０３９２】

ＸＩＶ．Ｂ．３．抗原カセット設計のインビボ評価

抗原カセット設計の評価の別の例として、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１に制限された形でＣＤ８　Ｔ細胞を刺激することが知られている、特性がよく知られた５つのヒトクラスＩ　ＭＨＣエピトープを含むようにワクチンカセットを設計した（図２Ａ、３、５Ａ）。それら

のインビボ免疫原性の評価を行うため、これらのマーカーエピトープを含むワクチンカセットをアデノウイルスベクターに組み込み、ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックマウスに感染させるのに使用した（図４）。このマウスモデルは、ヒトＨＬＡ－Ａ＊０２０１及びマウスＨ２－Ｋｂから一部が構成された導入遺伝子を保有しており、したがって、ヒトＨＬＡ－Ａ２．１のリーダー、マウスα３に連結されたα１及びα２ドメイン、膜貫通及び細胞質Ｈ２－Ｋｂドメインで構成されたキメラクラスＩ　ＭＨＣ分子をコードしている（Ｖｉｔｉｅｌｌｏ ｅｔ ａｌ．，１９９１）。このキメラ分子は、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１に制限された抗原提示を可能とする一方で、ＣＤ８共受容体とＭＨＣ上のα３ドメインとの種の一致した相互作用を維持する。

【０３９３】

短いカセットでは、すべてのマーカーエピトープが、一般的に報告されているもの（Ｃｏｒｎｅｔ ｅｔ ａｌ．，２００６；Ｄｅｐｌａ ｅｔ ａｌ．，２００８；Ｉｓｈｉｏｋａ ｅｔ ａｌ．，１９９９）よりも約１０～５０倍強い、Ｔ細胞応答を生じた。評価を行ったすべてのリンカーのうち、それぞれにその天然のアミノ酸配列が隣接した最小エピトープを含む２５マー配列のコンカテマーが、最大かつ最も広いＴ細胞応答を生じた（表５）。細胞内サイトカイン染色（ＩＣＳ）及びフローサイトメトリーにより、抗原特異的Ｔ細胞応答がＣＤ８　Ｔ細胞から誘導されることが示された。

【表５】

表５：短いカセット内のリンカー配列のインビボ評価。ＥＬＩＳＰＯＴデータは、ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックマウスが１×ｅ１１個のアデノウイルス粒子による感染１７日後にカセット内のすべてのクラスＩ　MHC制限エピトープに対してＴ細胞応答を生じたことを示した。

	短いカセット設計					
エピトープ	9AA	17AA	25AA	AAY	RR	DPP
1	2020+/-583	2505+/-1281	6844+/-956	1489+/-762	1675+/-690	1781+/-774
2	4472+/-755	3792+/-1319	7629+/-996	3851+/-1748	4726+/-1715	5868+/-1427
3	5830+/-315	3629+/-862	7253+/-491	4813+/-1761	6779+/-1033	7328+/-1700
4	5536+/-375	2446+/-955	2961+/-1487	4230+/-1759	6518+/-909	7222+/-1824
5	8800+/-0	7943+/-821	8423+/-442	8312+/-696	8800+/-0	1836+/-328

【０３９４】

別の例では、元の５つのマーカーエピトープの隣に、既知のＣＤ８　Ｔ細胞反応性を有するさらに１６個のＨＬＡ－Ａ＊０２：０１、Ａ＊０３：０１及びＢ＊４４：０５エピトープを含む一連の長いワクチンカセットを構築し、アデノウイルスベクターに組み込んだ（図５Ａ、５Ｂ）。これらの長いカセットのサイズは、最終的な臨床用のカセット設計によく似たものとし、各エピトープの互いに対する位置のみを変えた。ＣＤ８　Ｔ細胞応答は、長いワクチンカセット及び短いワクチンカセットの両方でその程度及び幅において同等であり、（ａ）さらなるエピトープの追加が元のエピトープのセットに対する免疫応答の程度に大きく影響せず、また、（ｂ）カセット内のエピトープの位置はそれに続くＴ細胞応答に大きく影響しないことを示すものである（表６）。

【表６】

表６：長いカセット内のエピトープの位置の影響のインビボ評価。

ＥＬＩＳＰＯＴデータは、ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックマウスが５ｅ１０アデノウイルス粒子による感染１７日後に長いワクチンカセット及び短いワクチンカセットの両方で同等の大きさのＴ細胞応答を生じたことを示した。

	長いカセット設計		
エピトープ	標準	スクランブルしたもの	短い
1	863+/-1080	804+/-1113	1871+/-2859
2	6425+/-1594	28+/-62	5390+/-1357
3*	23+/-30	36+/-18	0+/-48
4	2224+/-1074	2727+/-644	2637+/-1673
5	7952+/-297	8100+/-0	8100+/-0

*技術的なエラーによりＴ細胞応答が見られなかったと疑われる。

【０３９５】

ＸＩＶ．Ｂ．４．免疫原性及び毒性試験用の抗原カセットの設計

要約すると、モデルカセット評価による知見（図２～５、表２～６）によって、モデルワクチンカセットでは、アデノウイルスベースのベクターとの関連で約２０個のエピトープをコードする「数珠つなぎ」アプローチを用いた場合に強い免疫原性が得られることが実証された。エピトープは、両側にその天然の周辺ペプチド配列（例えば、両側に８個のアミノ酸残基）が隣接した最小のＣＤ８　Ｔ細胞エピトープ（例えば、９個のアミノ酸残基）をそれぞれが埋め込んだ２５マー配列を連結することによって最も効果的にアセンブルされる。本明細書において使用される場合、「天然」または「自然」のフランキング配列とは、その由来源タンパク質内のそのエピトープの天然に存在するという文脈で特定のエピトープのＮ末端及び／またはＣ末端側のフランキング配列のことを指す。例えば、ＨＣＭＶ　ｐｐ６５　ＭＨＣ　ＩのエピトープＮＬＶＰＭＶＡＴＶ（配列番号７８）は、その５’末端側に天然の５’配列ＷＱＡＧＩＬＡＲ（配列番号85）が、その３’末端側に天然の３’配列ＱＧＱＮＬＫＹＱ（配列番号８６）が隣接し、それによりＨＣＭＶ　ｐｐ６５由来源タンパク質内にみられるＷＱＡＧＩＬＡＲＮＬＶＰＭＶＡＴＶＱＧＱＮＬＫＹＱ（配列番号８７）という２５マーペプチドを生成する。天然または自然の配列は、天然のフランキング配列（複数可）が隣接したエピトープをコードする核酸配列のことを指す場合もある。各２５マー配列は、それに続く２５マー配列に直接連結される。最小のＣＤ８　Ｔ細胞エピトープがアミノ酸９個よりも大きいかまたは小さい場合、フランキングペプチドの長さは、全体の長さが依然２５マーのペプチド配列となるように調節することができる。例えば、アミノ酸１０個のＣＤ８　Ｔ細胞エピトープには、アミノ酸８個とアミノ酸７個の配列を隣接させることができる。このコンカテマーの後には、ＣＤ４　Ｔヘルパー細胞を刺激し、ワクチンカセット抗原の全体のインビボ免疫原性を改善するため（Ａｌｅｘａｎｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９４；Ｐａｎｉｎａ－Ｂｏｒｄｉｇｎｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９）に含ませた２個の普遍的クラスＩＩ　ＭＨＣエピトープを繋げた。これらのクラスＩＩエピトープは、ＧＰＧＰＧアミノ酸リンカー（配列番号５６）によって最後のクラスＩエピトープに連結した。２個のクラスＩＩエピトープは、ＧＰＧＰＧアミノ酸リンカー（配列番号５６）によって互いに対しても連結し、さらにＣ末端側にＧＰＧＰＧアミノ酸リンカー（配列番号５６）を隣接させた。エピトープの位置もその数もＴ細胞の認識または応答に大きく影響しないようであった。ターゲティング配列も、カセットに由来する抗原の免疫原性に大きく影響しないようであった。

【０３９６】

さらなる例として、モデルカセットにより得られたインビトロ及びインビボデータ（図２～５、表２～６）に基づき、非ヒト霊長類（ＮＨＰ）、マウス及びヒトで免疫原性を示

すことが知られている、特性のよく知られたＴ細胞エピトープを交互に配したカセット設計を生成した。いずれもそれらの天然の２５マー配列に埋め込まれた２０個のエピトープの後に、評価を行ったすべてのモデルカセットに存在する２個の普遍的クラスＩＩ　ＭＨＣエピトープを繋げた（図６）。このカセット設計を用いて、複数種における免疫原性を調べ、ならびに薬理学的及び毒物学的研究を行った。

【０３９７】

ＸＩＶ．Ｂ．５．抗原カセットの設計ならびに３０個、４０個、及び５０個の抗原の評価

それぞれがアミノ酸２５個の長さである３０個（Ｌ）、４０個（ＸＬ）、または５０個（ＸＸＬ）のエピトープを有する大きな抗原カセットを設計した。これらのエピトープは、腫瘍抗原を含む疾患抗原をモデル化するためのヒト、ＮＨＰ、及びマウスのエピトープの混合である。図２９に、異なる種からのエピトープの一般的な編成を示す。使用したモデル抗原は、ヒト、霊長類、及びマウスモデルについて表３２、３３、及び３４にそれぞれ記載されている。表３２、３３、及び３４のそれぞれは、エピトープの位置、名前、最小エピトープの記述、及びＭＨＣクラスを記載している。表３２は、列の順に、配列番号８０～８２、７８～７９、８８～１００、８７、及び１０１～１１１をそれぞれ開示する。表３３は、列の順に、配列番号１１２～１４１をそれぞれ開示する。表３４は、列の順に、配列番号７２、１４２～１４４、７３、１４５～１６１、７５～７６、及び１６２～１７７をそれぞれ開示する。

【０３９８】

これらのカセットを記載したようにＣｈＡｄＶ６８及びアルファウイルスベクターにクローニングし、より長い複数エピトープのカセットの有効性の評価を行った。図３０は、ウェスタンブロットによる、予想されたサイズの少なくとも１つの大きなバンドによって示されるように、大きな抗原カセットのそれぞれがＣｈＡｄＶベクターから発現されたことを示している。

【０３９９】

マウスを記載したように免疫して大きなカセットの有効性の評価を行った。Ｔ細胞応答を、エピトープＡＨ１（上のパネル）及びＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号７２）（下のパネル）について、ＣｈＡｄＶ６８ベクターによる免疫後にＩＣＳ及びテトラマー染色することにより（それぞれ図３１／表３５及び図３２／表３６）、また、ｓｒＲＮＡベクターによる免疫後にＩＣＳ染色することにより（図３３／表３７）分析した。３０個（Ｌ）、４０個（ＸＬ）、または５０個（ＸＸＬ）のエピトープを発現するＣｈＡｄＶ６８及びｓｒＲＮＡワクチンベクターを用いた免疫により、モデル疾患エピトープに対するＣＤ８＋免疫応答が誘導された。

【表３２】

表３２：大きなカセット内のヒトエピトープ

各カセット内のエピトープ位置									
L	XL	XXL		名前	最小エピトープ	25マー	MHC	制限	系統	種
3	3	3	3	5.インフルエンザM	GILGFVFTL	PILSPLTKGILGFVFTLTVPSERGL	クラスI	A*02:01	ヒト	ヒト
6	6	6	6	4.HTLV-1 Tax	LLFGYPVYV	HFPGFGQSLLFGYPVYVFGDCVQGD	クラスI	A*02:01	ヒト	ヒト
9	9	9	9	3.EBV BMLF1	GLCTLVAML	RMQAIQNAGLCTLVAMLEETIFWLQ	クラスI	A*02:01	ヒト	ヒト
12	12	12	12	1.HCMV pp65	NLVPMVATV	WQAGILARNLVPMVATVQGQNLKYQ	クラスI	A*02:01	ヒト	ヒト
15	15	15	15	2.EBV LMP2A	CLGGLLTMV	RTYGPVFMCLGGLLTMVAGAVWLTV	クラスI	A*02:01	ヒト	ヒト
18	18	18	18	CT83	NTDNNLAVY	SSSGLINSNTDNNLAVYDLSRDILN	クラスI	A*01:01	ヒト	ヒト
		21	21	MAGEA6	EVDPIGHVY	LVFGIELMEVDPIGHVYIFATCLGL	クラスI	B*35:01	ヒト	ヒト
21	25	25	25	CT83	LLASSILCA	MNFYLLASSILCALIVFWKYRRFQ	クラスI	A*02:01	ヒト	ヒト
24	31	31	28	FOXE1	AIFPGAVPAA	AAAAAAAAAIFPGAVPAARPPYPGAV	クラスI	A*02:01	ヒト	ヒト
27	35	35	32	CT83	VYDLSRDIL	SNTDNNLAVYDLSRDILNNFPHSIA	クラスI	A*24:02	ヒト	ヒト
	38	38	36	MAGE3/6	ASSLPTTMNY	DPPQSPQGASSLPTTMNYPLWSQSY	クラスI	A*01:01	ヒト	ヒト
30	40	40	40	インフルエンザHA	PKYVKQNTLKLAT	ITYGACPKYVKQNTLKLATGMRNVP	クラスII	DRB1*0101 /	ヒト	ヒト
			44	CMV pp65	LPLKMLNIPSINVH	SIYVYALPLKMLNIPSINVHHYPSA	クラスII	DRB1*0101	ヒト	ヒト
			47	EBV EBNA3A	PEQWMFQGAPPSQGT	EGPWVPEQWMFQGAPPSQGTDVVQH	クラスII	DRB1*0102	ヒト	ヒト
			50	CMV pp65	EHPTFTSQYRIQGKL	RGPQYSEHPTFTSQYRIQGKLEYRH	クラスII	DRB1*1101	ヒト	ヒト

【表３３】

表３３：大きなカセット内のＮＨＰエピトープ

各カセット内のエピトープ位置									
L	XL	XXL		名前	最小エピトープ	25マー	MHC	制限	系統	種
	1	1	1	Gag CM9	CTPYDINQM	MFQALSEGCTPYDINQMLNVLGDHQ	クラスI	Mamu-A*01	Rhesus	NHP
	4	4	4	Tat TL8	TTPESANL	SCISEADATTPESANLGEEILSQLY	クラスI	Mamu-A*01	Rhesus	NHP
	7	7	7	Env CL9	CAPPGYALL	WDAIRFRYCAPPGYALLRCNDTNYS	クラスI	Mamu-A*01	Rhesus	NHP
	10	10	10	Pol SV9	SGPKTNIIV	AFLMALTDSGPKTNIIVDSQYVMGI	クラスI	Mamu-A*01	Rhesus	NHP
	13	13	13	Gag LW9	LSPRTLNAW	GNVWVHTPLSPRTLNAWVKAVEEKK	クラスI	Mamu-A*01	Rhesus	NHP
			16	Env_TL9	TVPWPNASL	AFRQVCHTTVPWPNASLTPKWNNET	クラスI	Mamu-A*01	Rhesus	NHP
	16	16	19	Ag85B	PNGTHSWEYWGAQLN	VFNFPPNGTHSWEYWGAQLNAMKGD	クラスII	Mamu-DR*ψ	Rhesus	NHP
	19	19	23	HIV-1 Env	YKYKVVKIEPLGV	NWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTKAK	クラスII	Mamu-DR*ψ	Rhesus	NHP
			26	Gag TE15	TEEAKQIVQRHLVVE	EKVKHTEEAKQIVQRHLVVETGTTE	クラスII	Mamu-DRB*	Rhesus	NHP
		23	30	CFP-10 36-48	AGSLQGQWRGAAG	DQVESTAGSLQGQWRGAAGTAAQAA	クラスII	Mafa-DRB1*	Cyno	NHP
		27	34	CFP-10 71-86	EISTNIRQAGVQYSRA	QELDEISTNIRQAGVQYSRADEEQQ	クラスII	Mafa-DRB1*	Cyno	NHP
	22	29	38	Env 338–346	RPKQAWCWF	FHSQPINERPKQAWCWFGGSWKEAI	クラスI	Mafa-A1*06:	Cyno	NHP
	25	33	42	Nef 103–111	RPKVPLRTM	DDIDEEDDDLVGVSVRPKVPLRTMS	クラスI	Mafa-A1*06:	Cyno	NHP
	28	37	45	Gag 386–394	GPRKPIKCW	PFAAAQQRGPRKPIKCWNCGKEGHS	クラスI	Mafa-A1*06:	Cyno	NHP
			48	Nef LT9	LNMADKKET	RRLTARGLLNMADKKETRTPKKAKA	クラスI	Mafa-B*104:	Cyno	NHP

【表３４】

表３４：大きなカセット内のマウスエピトープ

各カセット内のエピトープ位置								
L	XL	XXL	名前	最小エピトープ	25マー	MHC	制限	系統	種
	2	2	2 OVA257	SIINFEKL	VSGLEQLESIINFEKLTEWTSSNVM	クラスI	H2-Kb	B6	マウス
			5 B16-EGP	EGPRNQDWL	ALLAVGALEGPRNQDWLGVPRQLVT	クラスI	H2-Db	B6	マウス
			8 B16-TRP1 455-463	TAPDNLGYM	VTNTEMFVTAPDNLGYMYEVQWPGQ	クラスI	H2-Db	B6	マウス
			11 Trp2180-188	SVYDFFVWL	TQPQIANCSVYDFFVWLHYYSVRDT	クラスI	H2-Kb	B6	マウス
	5	5	14 CT26 AH1-A5	SPSYAYHQF	LWPRVTYHSPSYAYHQFERRAKYKR	クラスI	H2-Ld	Balb/C	マウス
		8	17 CT26 AH1-39	MNKYAYHML	LWPRVTYHMNKYAYHMLERRAKYKR	クラスI	H2-Ld	Balb/C	マウス
		11	20 MC38 Dpagt1	SIIVFNLL	GQSLVISASIIVFNLLELEGDYRDD	クラスI	H2-Kb	B6	マウス
		14	22 MC38 Adpgk	ASMTNMELM	GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQV	クラスI	H2-Db	B6	マウス
		17	24 MC38 Reps1	AQLANDVVL	RVLELFRAAQLANDVVLQIMELCGA	クラスI	H2-Db	B6	マウス
	8	20	27 P815 P1A 35-44	LPYLGWLVF	HRYSLEEILPYLGWLVFAVVTTSFL	クラスI	H2-Ld	DBA/2	マウス
	11	22	29 P815 P1E	GYCGLRGTGV	YLSKNPDGYCGLRGTGVSCPMAIKK	クラスI	H2-Kd	DBA/2	マウス
	14	24	31 Panc02 Mesothelin	LSIFKHKL	NEIPFTYEQLSIFKHKLDKTYPQGY	クラスI	H2-Kb	B6	マウス
	17	26	33 Panc02 Mesothelin	LIWIPALL	SRASLLGPGFVLIWIPALLPALRLS	クラスI	H2-Kb	B6	マウス
	20	28	35 ID8 FRa 161-169	SSGHNECPV	NWHKGWNWSSGHNECPVGASCHPFT	クラスI	H2-Kb	B6	マウス
	23	30	37 ID8 Mesothelin 401	GQKMNAQAI	KTLLKVSKGQKMNAQAIALVACYLR	クラスI	H2-Db	B6	マウス
	26	32	39 OVA-II	ISQAVHAAHAEINEAGR	ESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVG	クラスII	I-Ab, I-Ad	B6	マウス
	29	34	41 ESAT-6	MTEQQWNFAGIEAAASAIQ	MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSI	クラスII	I-Ab	B6	マウス
		36	43 TT p30	FNNFTVSFWLRVPKVSASHL	DMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEQY	クラスII	I-Ad	Balb/C	マウス
		39	46 HEL	DGSTDYGILQINSRW	TNRNTDGSTDYGILQINSRWWCNDG	クラスII	I-Ak	CBA	マウス
			49 MOG	MEVGWYRSPFSRVVHLYRN	TGMEVGWYRSPFSRVVHLYRNGKDQ	クラスII	I-Ab	B6	マウス

【表３５】

表３５：ＣｈＡｄの大きなカセットで処置したマウスにおけるＡＨ１及びＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号７２）ペプチドに応答した平均のＩＦＮｇ＋細胞データは、全ＣＤ８＋細胞の％として示す。各グループ当たりの平均及び標準偏差、ならびにテューキーの検定を用いたＡＮＯＶＡによるｐ値を示す。すべてのｐ値をＭＡＧ２０抗原カセットと比較した。

抗原の数	抗原	平均	標準偏差	ｐ値	N
20	SIINFEKL（配列番号72）	5.308	0.660	n/a	8
30	SIINFEKL（配列番号72）	4.119	1.019	0.978	8
40	SIINFEKL（配列番号72）	6.324	0.954	0.986	8
50	SIINFEKL（配列番号72）	8.169	1.469	0.751	8
20	AH1	6.405	2.664	n/a	8
30	AH1	4.373	1.442	0.093	8
40	AH1	4.126	1.135	0.050	8
50	AH1	4.216	0.808	0.063	8

【表３６】

表３６：ＣｈＡｄの大きなカセットで処置したマウスにおけるＡＨ１及びＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号７２）抗原に対する平均のテトラマー＋細胞データは、全ＣＤ８＋細胞の％として示す。各グループ当たりの平均及び標準偏差、ならびにテューキーの検定を用いたＡＮＯＶＡによるｐ値を示す。すべてのｐ値をＭＡＧ２０抗原カセットと比較した。

抗原の数	抗原	平均	標準偏差	ｐ値	N
20	SIINFEKL（配列番号72）	10.314	2.384	n/a	8
30	SIINFEKL（配列番号72）	4.551	2.370	0.003	8
40	SIINFEKL（配列番号72）	5.186	3.254	0.009	8
50	SIINFEKL（配列番号72）	14.113	3.660	0.072	8
20	AH1	6.864	2.207	n/a	8
30	AH1	4.713	0.922	0.036	8
40	AH1	5.393	1.452	0.223	8
50	AH1	5.860	1.041	0.543	8

【表３７】

表３７：ＳＡＭの大きなカセットで処置したマウスにおけるＡＨ１及びＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号７２）ペプチドに応答した平均のＩＦＮｇ＋細胞データは、全ＣＤ８＋細胞の％として示す。各グループ当たりの平均及び標準偏差、ならびにテューキーの検定を用いたＡＮＯＶＡによるｐ値を示す。すべてのｐ値をＭＡＧ２０抗原カセットと比較した。

抗原の数	抗原	平均	標準偏差	ｐ値	N
20	SIINFEKL（配列番号72）	1.843	0.422	n/a	8
30	SIINFEKL（配列番号72）	2.112	0.522	0.879	7
40	SIINFEKL（配列番号72）	1.754	0.978	0.995	7
50	SIINFEKL（配列番号72）	1.409	0.766	0.606	8
20	AH1	3.050	0.909	n/a	8
30	AH1	0.618	0.427	1.91E-05	7
40	AH1	1.286	0.284	0.001	7
50	AH1	1.309	1.149	0.001	8

【０４００】

ＸＶ．ＣｈＡｄ抗原カセット送達ベクター

ＸＶ．Ａ．ＣｈＡｄ抗原カセット送達ベクターの構築

１つの例では、チンパンジーアデノウイルス（ＣｈＡｄ）を操作して抗原カセットの送達ベクターとした。さらなる例では、完全長ＣｈＡｄＶ６８ベクターを、ＡＣ＿０００００１１．１（米国特許第６０８３７１６号に記載の配列番号２）に基づいて合成し、Ｅ１（ｎｔ４５７～３０１４）及びＥ３（ｎｔ２７，８１６～３１，３３２）配列を欠失させた。ＣＭＶプロモーター／エンハンサーの制御下にあるレポーター遺伝子を欠失させたＥ１配列の代わりに挿入した。このクローンをＨＥＫ２９３細胞にトランスフェクトしたところ、感染性のウイルスは生成されなかった。野生型Ｃ６８ウイルスの配列を確認するため、単離ＶＲ－５９４をＡＴＣＣより入手して継代した後、個々に配列決定した（配列番号１０）。ＡＣ＿０００００１１．１配列を野生型ＣｈＡｄＶ６８ウイルスのＡＴＣＣ　ＶＲ－５９４配列（配列番号１０）と比較したところ、６個のヌクレオチドの相違が特定された。１つの例では、改変ＣｈＡｄＶ６８ベクターを、ＡＣ＿０００００１１．１に基づいて作製し、対応するＡＴＣＣ　ＶＲ－５９４ヌクレオチドを５つの位置で置換した（ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ　配列番号１）。

【０４０１】

別の例では、改変ＣｈＡｄＶ６８ベクターを、ＡＣ＿０００００１１．１に基づいて作製し、Ｅ１（ｎｔ５７７～３４０３）及びＥ３（ｎｔ２７，８１６～３１，３３２）配列を欠失させ、対応するＡＴＣＣ　ＶＲ－５９４ヌクレオチドを４つの位置で置換した。ＣＭＶプロモーター／エンハンサーの制御下にあるＧＦＰレポーター（ＣｈＡｄＶ６８．４ＷＴｎｔ．ＧＦＰ；配列番号１１）またはモデル新生抗原カセット（ＣｈＡｄＶ６８．４ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー；配列番号１２）を、欠失させたＥ１配列の代わりに挿入した。

【０４０２】

別の例では、改変ＣｈＡｄＶ６８ベクターを、ＡＣ＿０００００１１．１に基づいて作製し、Ｅ１（ｎｔ５７７～３４０３）及びＥ３（ｎｔ２７，１２５～３１，８２５）配列を欠失させ、対応するＡＴＣＣ　ＶＲ－５９４ヌクレオチドを５つの位置で置換した。ＣＭＶプロモーター／エンハンサーの制御下にあるＧＦＰレポーター（ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＧＦＰ；配列番号１３）またはモデル新生抗原カセット（ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー；配列番号２）を欠失させたＥ１配列の代わりに挿入した。

【０４０３】

関連するベクターを下記に示す。

－完全長ＣｈＡｄＶＣ６８配列「ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ」（配列番号１）；対応するＡＴＣＣ　ＶＲ－５９４ヌクレオチドを５つの位置で置換したＡＣ＿０００００１１．１配列

－ＡＴＣＣ　ＶＲ－５９４　Ｃ６８（配列番号１０）；独立してシークエンシングしたもの；完全長Ｃ６８

－ＣｈＡｄＶ６８．４ＷＴｎｔ．ＧＦＰ（配列番号１１）；ＡＣ＿０００００１１．１のＥ１（ｎｔ　５７７～３４０３）及びＥ３（ｎｔ　２７，８１６～３１，３３２）配列を欠失させたもの；対応するＡＴＣＣ　ＶＲ－５９４ヌクレオチドを４つの位置で置換；ＧＦＰレポーターは、欠失させたＥ１の代わりに挿入されたＣＭＶプロモーター／エンハンサーの制御下にある

－ＣｈＡｄＶ６８．４ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー（配列番号１２）；ＡＣ＿０００００１１．１のＥ１（ｎｔ　５７７～３４０３）及びＥ３（ｎｔ　２７，８１６～３１，３３２）配列を欠失させたもの；対応するＡＴＣＣ ＶＲ－５９４ヌクレオチドを４つの位置で置換；モデル新生抗原カセットは、欠失させたＥ１の代わりに挿入されたＣＭＶプロモーター／エンハンサーの制御下にある

－ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＧＦＰ（配列番号１３）；ＡＣ＿０００００１１．１のＥ１（ｎｔ　５７７～３４０３）及びＥ３（ｎｔ　２７，１２５～３１，８２５）配列を欠失させたもの；対応するＡＴＣＣ　ＶＲ－５９４ヌクレオチドを５つの位置で置換；ＧＦＰレポーターは、欠失させたＥ１の代わりに挿入されたＣＭＶプロモーター／エンハンサーの制御下にある

【０４０４】
ＸＶ．Ｂ．ＣｈＡｄ抗原カセット送達ベクターの試験
ＸＶ．Ｂ．１．ＣｈＡｄベクターの評価方法及び材料
リポフェクタミンを用いたＨＥＫ２９３Ａ細胞のトランスフェクション
ＣｈＡｄＶ６８コンストラクト（ＣｈＡｄＶ６８．４ＷＴｎｔ．ＧＦＰ、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＧＦＰ、ＣｈＡｄＶ６８．４ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー、及びＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー）のＤＮＡを調製し、以下のプロトコールを用いてＨＥＫ２９３Ａ細胞にトランスフェクトした。
【０４０５】
１０ｕｇのプラスミドＤＮＡをＰａｃＩで消化してウイルスゲノムを遊離させた。次いでＧｅｎｅＪｅｔ ＤＮＡ ｃｌｅａｎｕｐ Ｍｉｃｒｏカラム（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ社）を製造者の指示にしたがって使用してＤＮＡを長いＤＮＡフラグメントについて精製し、２０ｕｌの予め加熱した水中に溶出した。溶出工程の前にカラムを３７℃で０．５～１時間放置した。
【０４０６】
トランスフェクションの１４～１８時間前にＨＥＫ２９３Ａ細胞を10^6細胞／ウェルの細胞密度で６ウェルプレートに導入した。各ウェルごとに細胞に新鮮な培地（ペニシリン／ストレプトマイシン及びグルタミン酸を含む１ｍｌのＤＭＥＭ－１０％ｈｉＦＢＳ）を被せた。トランスフェクションでは、各ウェル当たり１～２ｕｇの精製したＤＮＡを製造者のプロトコールにしたがってｕｌ体積の２倍（２～４ｕｌ）のリポフェクタミン２０００とともに用いた。トランスフェクションミックスを含む０．５ｍｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ培地を、各ウェル内で１ｍｌの通常の培地に加え、細胞上で一晩放置した。
【０４０７】
トランスフェクトした細胞培養物を３７℃で少なくとも５～７日間インキュベートした。ウイルスプラークがトランスフェクションの７日後に視認されなかった場合、細胞を１：４または１：６に分割し、３７℃でインキュベートしてプラーク生成について監視した。あるいは、トランスフェクトした細胞を収穫し、３サイクルの凍結と解凍に供し、細胞ライセートを用いてＨＥＫ２９３Ａ細胞に感染させ、ウイルスプラークが観察されるまで細胞をインキュベートしてもよい。
【０４０８】
リン酸カルシウムを用いたＨＥＫ２９３Ａ細胞へのＣｈＡｄＶ６８ベクターのトランスフェクション及び三次ウイルスストックの生成
ＣｈＡｄＶ６８コンストラクト（ＣｈＡｄＶ６８．４ＷＴｎｔ．ＧＦＰ、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＧＦＰ、ＣｈＡｄＶ６８．４ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー）のＤＮＡを調製し、以下のプロトコールを用いてＨＥＫ２９３Ａ細胞にトランスフェクトした。
【０４０９】
トランスフェクションの１日前にＨＥＫ２９３Ａ細胞を５％ＢＳ／ＤＭＥＭ／１ＸＰ／Ｓ，１×Ｇｌｕｔａｍａｘ中で、６ウェルプレートの各ウェル当たり10^6細胞で播種した。トランスフェクション当たり２個のウェルが必要とされる。トランスフェクションの２～４時間前に培地を新鮮な培地に交換した。ＣｈＡｄＶ６８．４ＷＴｎｔ．ＧＦＰプラスミドをＰａｃＩで直鎖状とした。次いで、直鎖状とされたＤＮＡをフェノールクロロホルム抽出し、１／１０体積の３Ｍ酢酸ナトリウム、ｐＨ５．３、及び２体積の１００％エタノールを用いて沈殿させた。沈殿したＤＮＡを１２，０００×ｇで５分間遠心することによってペレット化した後、７０％エタノールで１回洗浄した。ペレットを風乾し、５０μＬの滅菌水に再懸濁した。ＮａｎｏＤｒｏｐ（商標）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社）を使用してＤＮＡ濃度を決定し、体積を５μｇのＤＮＡ／５０μＬに調整した。
【０４１０】
１６９μＬの滅菌水をマイクロチューブに加えた。次いで５μＬの２Ｍ $CaCl_2$ をこの水に加え、ピペッティングして静かに混合した。５０μＬのＤＮＡを$CaCl_2$溶液

に滴下した。次いで２６μＬの２Ｍ　ＣａＣｌ$_2$を加えてμピペッターで２回ピペッティングして静かに混合した。この最終溶液は、２５０μＬの０．２５Ｍ　ＣａＣｌ$_2$中の５μｇのＤＮＡからなるはずである。次いで２５０μＬの２×ＨＢＳ（Ｈｅｐｅｓ緩衝液）の入った第２のチューブを用意した。ピペットエイドに取り付けた２ｍＬ滅菌ピペットを使用して２×ＨＢＳ溶液に空気を徐々にバブリングした。同時に、０．２５Ｍ　ＣａＣｌ$_2$溶液中のＤＮＡ溶液を滴下した。最後のＤＮＡの液滴の滴下後、約５秒間、バブリングを継続した。次いで溶液を室温で最大２０分間インキュベートした後、２９３Ａ細胞に加えた。６ウェルプレートの各ウェル当たり１０^{6}細胞で１日前に播種した２９３Ａ細胞の単層に２５０μｌのＤＮＡ／リン酸カルシウム溶液を滴下した。細胞をインキュベーターに戻して一晩インキュベートした。２４時間後に培地を交換した。７２時間後に細胞を６ウェルプレート内に１：６に分割した。単層を細胞変性効果（ＣＰＥ）の証拠について光学顕微鏡によって毎日監視した。トランスフェクションの７～１０日後にウイルスプラークを観察し、ウェル内の培地をピペッティングして細胞を浮かせることにより単層を収穫した。収穫した細胞及び培地を５０ｍＬの遠心チューブに移した後、凍結解凍を３ラウンド行った（－８０℃及び３７℃）。その後得られた、一次ウイルスストックと呼ばれるライセートを、ベンチトップ遠心分離器上で最大速度（４３００×ｇ）で遠心することにより清澄化させ、ライセートの一定の割合（１０～５０％）を使用してＴ２５フラスコ中で２９３Ａ細胞に感染させた。感染細胞を４８時間インキュベートした後、細胞及び培地を完全なＣＰＥで収穫した。細胞を再び収穫し、凍結解凍して清澄化した後、この二次ウイルスストックを使用して、フラスコ当たり１．５×１０^{7}細胞で播種されたＴ１５０フラスコに感染させた。７２時間後に完全ＣＰＥが得られた時点で細胞を収穫し、上記のウイルスストックと同様に処理して三次ストックを生成した。

【０４１１】

２９３Ｆ細胞内での生成

８％ＣＯ$_2$のインキュベーター内の２９３ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ（商標）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社）培地中で増殖させた２９３Ｆ細胞内でＣｈＡｄＶ６８ウイルス生成を行った。感染の当日、細胞を生存率９８％で１ｍＬ当たり１０^{6}細胞に希釈し、１ＬのＳｈａｋｅフラスコ（Ｃｏｒｎｉｎｇ社）中、１回の生成操作当たり４００ｍＬを使用した。１回の感染当たり目標ＭＯＩが３．３よりも高い４ｍＬの三次ウイルスストックを使用した。トリパンブルーによって測定される生存率が７０％を下回るまで４８～７２時間にわたって細胞をインキュベートした。次いで感染細胞をベンチトップ遠心分離器で最大速度で遠心して収穫し、１×ＰＢＳ中で洗浄し、再び遠心してから２０ｍＬの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ７．４に再懸濁した。細胞ペレットを、凍結解凍を３回行って溶解し、４，３００×ｇで５分間遠心して清澄化した。

【０４１２】

ＣｓＣｌ遠心分離による精製

ウイルスＤＮＡをＣｓＣｌ遠心分離により精製した。２つの不連続な勾配の操作を行った。第１の遠心は、細胞成分からウイルスを精製するためのもので、第２の遠心は、細胞成分からの分離物をさらに精製し、感染性粒子から機能不全粒子を分離するためのものである。

【０４１３】

１０ｍＬの１．２（２６．８ｇのＣｓＣｌを９２ｍＬの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ８．０に溶かしたもの）ＣｓＣｌをポリアロマー製チューブに加えた。次いで、８ｍＬの１．４ＣｓＣｌ（５３ｇのＣｓＣｌを８７ｍＬの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ８．０に溶かしたもの）をピペットを用いてチューブの底に届けるように慎重に加えた。清澄化したウイルスをこの１．２の層の上に層をなすように慎重に加えた。必要な場合、さらに１０ｍＭ　Ｔｒｉｓを加えてチューブのバランスを取った。次いでチューブをＳＷ－３２Ｔｉローターに入れて、１０℃で２時間３０分遠心した。次いでチューブを層流キャビネットに取り出して、１８ゲージの針と１０ｍＬの注射器を使用してウイルスバンドを引き抜いた。夾雑した宿主細胞ＤＮＡ及びタンパク質を除去しないように注意を払った。次いでバンドを少な

くとも１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ８．０で希釈し、上記に述べた不連続勾配で上記と同様に層をなすように加えた。今回は操作を一晩行った以外は上記と同様にして遠心操作を行った。翌日、機能不全の粒子バンドを引き抜かないように注意しながらバンドを引き抜いた。次いでカセット（Ｐｉｅｒｃｅ社）を使用してＡＲＭバッファー（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　Ｓｌｉｄｅ－ａ－Ｌｙｚｅｒ（商標）ｐＨ８．０，２５ｍＭ　ＮａＣｌ，２．５％グリセロール）に対してウイルスを透析した。これをバッファーを１回交換するごとに３回、１時間行った。次いでウイルスを一定分量に分けて－８０℃で保存した。

【０４１４】

ウイルスアッセイ

１．１×１０^{12}個のウイルス粒子（ＶＰ）の消光係数はＯＤ２６０ｎｍの吸光度の値＝１に相当することに基づき、ＯＤ２６０アッセイを用いてＶＰ濃縮を行った。アデノウイルスの２つの希釈度（１：５と１：１０）をウイルス溶解バッファー（０．１％ＳＤＳ，１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ７．４，１ｍＭ　ＥＤＴＡ）中で作った。両方の希釈度でＯＤを２重に測定し、ＯＤ２６０値×希釈係数×１．１×１０^{12}ＶＰを掛けることによりＶＰ濃度／ｍＬを測定した。

【０４１５】

感染単位（ＩＵ）力価を、ウイルスストックの限界希釈アッセイによって計算した。ウイルスを最初にＤＭＥＭ／５％ＮＳ／１×ＰＳ中で１００倍に希釈した後、１０倍希釈率を用いて１×１０$^{-7}$にまで希釈した。次いで１００μＬのこれらの希釈液を、２４ウェルプレートのウェル当たり３ｅ５細胞で少なくとも１時間前に播種した２９３Ａ細胞に加えた。これを２重に行った。プレートを４８時間、３７℃のＣＯ２インキュベーター内でインキュベートした。次いで細胞を、１×ＰＢＳで洗浄した後、１００％の冷却メタノール（－２０℃）で固定した。次いでプレートは最小で２０分間にわたって－２０℃でインキュベートした。各ウェルを１×ＰＢＳで洗浄した後、１×ＰＢＳ／０．１％ＢＳＡ中で１時間、室温でブロッキングした。ウサギ抗Ａｄ抗体（Ａｂｃａｍ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）をブロッキングバッファー（ウェル当たり０．２５ｍＬ）中に１：８，０００の希釈率で加え、室温で１時間インキュベートした。各ウェルをウェル当たり０．５ｍＬのＰＢＳで４回洗浄した。１０００倍に希釈したＨＲＰ結合ヤギ抗ウサギ抗体（Ｂｅｔｈｙｌ　Ｌａｂｓ，Ｍｏｎｔｇｏｍｅｒｙ　Ｔｅｘａｓ）を各ウェルに加え、最終回の洗浄の１時間前にインキュベートした。ＰＢＳでの洗浄を５回行い、０．０１％H_2O_2を含むＴｒｉｓ緩衝生理食塩水中、ＤＡＢ（ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリド）基質を使用して現像した（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ７．５，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ中、０．６７ｍｇ／ｍＬ　ＤＡＢ）。各ウェルをカウントの５分前に現像した。視野当たり４～４０個の染色された細胞を与えるような希釈率を用いて１０倍の対物レンズ下で細胞をカウントした。使用した視野は０．３２ｍｍ^{2}の格子とし、２４ウェルプレート上の視野当たり６２５個に相当した。１ｍＬ当たりの感染性ウイルスの数は、格子１個当たりの染色細胞の数×視野当たりの格子の数×希釈係数１０によって求めることができる。同様に、ＧＦＰ発現細胞を扱う場合には、カプシド染色の代わりに蛍光を用いて１ｍＬ当たりのＧＦＰ発現ビリオンの数を決定することができる。

【０４１６】

免疫化

Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ系の雌性マウス及びＢａｌｂ／ｃ系の雌性マウスに、１×１０^{8}個のＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーのウイルス粒子（ＶＰ）を、１００ｕＬ体積中で両側性の筋肉内注射（各脚５０ｕＬ）により注射した。

【０４１７】

脾細胞の解離

各マウスの脾臓及びリンパ節を、３ｍＬの完全ＲＰＭＩ（ＲＰＭＩ、１０％ＦＢＳ、ペニシリン／ストレプトマイシン）中にプールした。ｇｅｎｔｌｅＭＡＣＳ組織解離装置（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ社）を製造者の指示にしたがって使用して、機械的解離を行った。解離した細胞を４０ミクロンのフィルターに通して濾過し、赤血球をＡＣＫ溶

解バッファー（１５０ｍＭ NH_4Cl，１０ｍＭ $KHCO_3$，０．１ｍＭ Na_2EDTA）で溶解した。細胞を３０ミクロンのフィルターに通して再び濾過した後、完全ＲＰＭＩ中に再懸濁した。細胞を、死細胞及びアポトーシス細胞を除外するためのヨウ化プロピジウム染色を使用してＡｔｔｕｎｅ ＮｘＴフローサイトメーター（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ社）でカウントした。次に、その後の分析用に細胞を適当な生細胞の濃度に調整した。

【０４１８】

エクスビボ酵素結合免疫スポット（ＥＬＩＳＰＯＴ）分析

マウスＩＦＮｇ ＥＬＩＳｐｏｔＰＬＵＳキット（ＭＡＢＴＥＣＨ社）を使用し、ＥＬＩＳＰＯＴハーモナイゼーションガイドライン｛ＤＯＩ： １０．１０３８／ｎｐｒｏｔ．２０１５．０６８｝にしたがってＥＬＩＳＰＯＴ分析を行った。５×10^4個の脾細胞を、９６ウェルＩＦＮｇ抗体コーティングプレート中で、１０ｕＭの示したペプチドと１６時間インキュベートした。スポットをアルカリホスファターゼを用いて現像した。反応時間を１０分間計り、プレートに水道水を流して反応を停止させた。スポットをＡＩＤ ｖＳｐｏｔ Ｒｅａｄｅｒ Ｓｐｅｃｔｒｕｍを用いてカウントした。ＥＬＩＳＰＯＴ分析を行うため、飽和度が５０％よりも高いウェルを「多すぎてカウント不能」として記録した。複製ウェルの偏差が１０％よりも大きい試料は分析から除外した。次いでスポットのカウントを、式：スポットカウント＋２×（スポットカウント×コンフルエンス（％）／［１００％－コンフルエンス（％）］）を用いてウェルのコンフルエンシーについて補正した。ネガティブペプチド刺激ウェル中のスポットカウントを抗原刺激したウェルから引くことによってネガティブバックグラウンドを補正した。最後に、多すぎてカウント不能として示したウェルを、最も高い観察された補正値に設定し、１００の位までの概数に四捨五入した。

【０４１９】

ＸＶ．Ｂ．２．ＤＮＡトランスフェクション後のＣｈＡｄＶ６８ウイルス送達粒子の生成

１つの例において、ＣｈＡｄＶ６８．４ＷＴｎｔ．ＧＦＰ（図７）及びＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＧＦＰ（図８）のＤＮＡを、ＨＥＫ２９３Ａ細胞にトランスフェクトし、ウイルス複製（ウイルスプラーク）をトランスフェクションの７～１０日後に観察した。ＣｈＡｄＶ６８ウイルスプラークを光学（図７Ａ及び８Ａ）及び蛍光顕微鏡法（図７Ｂ～Ｃ、及び図８Ｂ～Ｃ）を使用して可視化した。ＧＦＰは、増殖性ＣｈＡｄＶ６８ウイルス送達粒子の生成を示す。

【０４２０】

ＸＶ．Ｂ．３．ＣｈＡｄＶ６８ウイルス送達粒子の増殖

１つの例において、ＣｈＡｄＶ６８．４ＷＴｎｔ．ＧＦＰ、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＧＦＰ、及びＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーウイルスをＨＥＫ２９３Ｆ細胞内で増殖させ、精製ウイルスストックをトランスフェクションの１８日後に生成した（図９）。精製ＣｈＡｄＶ６８ウイルスストック中のウイルス粒子を定量し、同じプロトコールを使用して生成されたアデノウイルス５型（Ａｄ５）及びＣｈＡｄＶＹ２５（近縁のＣｈＡｄＶ；Ｄｉｃｋｓ，２０１２，ＰｌｏＳ ＯＮＥ７，ｅ４０３８５）ウイルスストックと比較した。ＣｈＡｄＶ６８ウイルス力価は、Ａｄ５及びＣｈＡｄＶＹ２５と同等であった（表７）。

【表７】
表７．２９３Ｆ懸濁細胞内でのアデノウイルスベクターの生成

コンストラクト	平均VP/細胞+/- SD
Ad5-ベクター(複数ベクター)	2.96e4+/- 2.26e4
Ad5-GFP	3.89e4
chAdY25-GFP	1.75e3+/-6.03e1
ChAdV68.4WTnt.GFP	1.2e4 +/-6.5e3
ChAdV68.5WTnt.GFP	1.8e3
ChAdV68.5WTnt.MAG25マー	1.39e3+/-1.1e3

＊ＳＤは、複数回の生成工程が行われた場合にのみ報告している。

【０４２１】
ＸＶ．Ｂ．４．腫瘍モデルにおける免疫原性の評価
マウス腫瘍抗原を発現するＣ６８ベクターを、マウス免疫原性実験で評価して、Ｃ６８ベクターがＴ細胞応答を誘発することを実証する。ＭＨＣクラスＩエピトープＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号７２）に対するＴ細胞応答Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ系雌性マウスで測定し、ＭＨＣクラスＩエピトープＡＨ１－Ａ５（Ｓｌａｎｓｋｙ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ１３：５２９－５３８）に対するＴ細胞応答をＢａｌｂ／ｃ系マウスで測定した。図１５に示されるように、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーによるマウスの免疫後にコントロールに対して強いＴ細胞応答が測定された。脾細胞10^6個当たり、８９５７個及び４０１９個のスポット形成細胞（ＳＦＣ）の平均の細胞性免疫応答が、ＥＬＩＳｐｏｔアッセイにおいて、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ系またはＢａｌｂ／ｃ系マウスをそれぞれＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーで免疫した場合に免疫の１０日後に観察された。

【０４２２】
腫瘍浸潤リンパ球についても、ＣｈＡｄＶ及び抗ＣＴＬＡ４抗体の共投与を評価するＣＴ２６腫瘍モデルにおいて評価した。マウスにＣＴ２６腫瘍細胞を移植し、移植７日後にＣｈＡｄＶワクチンで免疫し、抗ＣＴＬＡ４抗体（クローン９Ｄ９）またはコントロールとしてＩｇＧで処置した。免疫１４日後に腫瘍浸潤リンパ球を分析した。各マウスからの腫瘍をｇｅｎｔｌｅＭＡＣＳ Ｄｉｓｓｏｃｉａｔｏｒ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）及びマウス腫瘍解離キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）を用いて解離させた。解離した細胞を３０ミクロンのフィルターに通して濾過し、完全ＲＰＭＩ中に再懸濁した。細胞を、死細胞及びアポトーシス細胞を除外するためのヨウ化プロピジウム染色を使用してＡｔｔｕｎｅ ＮｘＴフローサイトメーター（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ社）でカウントした。次に、その後の分析用に細胞を適当な生細胞の濃度に調整した。抗原特異的細胞をＭＨＣ－テトラマー複合体によって同定し、抗ＣＤ８及び生細胞マーカーで共染色した。プライム免疫の１２日後に腫瘍を回収した。

【０４２３】
腫瘍内の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞は、それぞれ、ＣｈＡｄＶ、抗ＣＴＬＡ４、及びＣｈＡｄＶ＋抗ＣＴＬＡ４処置群において、全生細胞集団の中央値で３．３％、２．２％、または８．１％を構成していた（図４１及び表４０）。活性ＣｈＡｄＶ免疫と組み合わせた抗ＣＴＬＡによる処置により、ＣｈＡｄＶ単独及び抗ＣＴＬＡ４単独のいずれよりも抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の頻度が統計的に有意に増大し、抗ＣＴＬＡ４はＣｈＡｄＶ６８ワクチンと共投与される場合に腫瘍内の浸潤Ｔ細胞の数を増大させることが示された。

【表４０】
表４０．ＣＴ２６腫瘍中のテトラマー＋浸潤ＣＤ８Ｔ細胞の頻度

処置	テトラマー＋の中央値（%）
ChAdV68.5WTnt.MAG25マー(ChAdV)	3.3
抗CTLA4	2.2
ChAdV68.5WTnt.MAG25マー(ChAdV)＋抗CTLA4	8.1

【０４２４】
ＸＶＩ．アルファウイルス抗原送達ベクター
ＸＶＩ．Ａ．アルファウイルス送達ベクター評価の材料及び方法
ＲＮＡを生成するためのインビトロ転写
インビトロ試験を行うため、プラスミドＤＮＡをＰｍｅＩによる制限消化によって直鎖状とし、カラムを製造者の指示にしたがって洗浄し（ＧｅｎｅＪｅｔ ＤＮＡ ｃｌｅａｎｕｐ ｋｉｔ，Ｔｈｅｒｍｏ社）、テンプレートとして使用した。ＲｉｂｏＭＡＸ Ｌａｒｇｅ Ｓｃａｌｅ ＲＮＡ ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｒｏｍｅｇａ社）をm^7Ｇキャップアナログ（Ｐｒｏｍｅｇａ）とともに製造者の指示にしがって使用してインビトロ転写を行った。ＲＮｅａｓｙ ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ社）を製造者の指示にしがって使用してｍＲＮＡを精製した。
【０４２５】
インビボ実験を行うには、ＴｒｉＬＩｎｋ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社によって生成され、精製されたＲＮＡをＥｎｚｙｍａｔｉｃ Ｃａｐ１でキャップした。
【０４２６】
ＲＮＡのトランスフェクション
ＨＥＫ２９３Ａ細胞を、９６ウェルのウェル当たり６ｅ４細胞で、２４ウェルのウェル当たり２ｅ５細胞で、トランスフェクションの約１６時間前に播種した。細胞にＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸリポフェクタミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を製造者のプロトコールにしたがって使用してｍＲＮＡをトランスフェクションした。９６ウェルでは、ウェル当たり０．１５ｕＬのリポフェクタミン及び１０ ｎｇ のｍＲＮＡを使用し、２４ウェルでは、ウェル当たり０．７５ｕＬのリポフェクタミン及び１５０ｎｇのｍＲＮＡを使用した。ＧＦＰを発現するｍＲＮＡ（ＴｒｉＬｉｎｋ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）をトランスフェクションのコントロールとして使用した。
【０４２７】
ルシフェラーゼアッセイ
ルシフェラーゼレポーターアッセイを、白い壁の９６ウェルプレートで、ＯＮＥ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ社）を製造者のプロトコールにしたがって使用して各条件を三重にして行った。発光度をＳｐｅｃｔｒａＭａｘを使用して測定した。
【０４２８】
ｑＲＴ－ＰＣＲ
トランスフェクトした細胞をトランスフェクションの２時間後に新鮮な培地で洗い、新鮮な培地に交換してトランスフェクトしなかったｍＲＮＡをすべて除去した。次いで細胞を異なる時点でＲＬＴ ｐｌｕｓ ｌｙｓｉｓ ｂｕｆｆｅｒ（Ｑｉａｇｅｎ社）中に収穫し、いずれも製造者のプロトコールにしたがってＱｉａＳｈｒｅｄｄｅｒ（Ｑｉａｇｅｎ社）を使用してホモジナイズし、ＲＮｅａｓｙ ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ社）を使用して抽出した。Ｎａｎｏｄｒｏｐ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を使用して全ＲＮＡを定量した。製造者のプロトコールにしたがってｑＴｏｗｅｒ^3 （ＡｎａｌｙｔｉｋＪｅｎａ）でＱｕａｎｔｉｔｅｃｔ Ｐｒｏｂｅ Ｏｎｅ－Ｓｔｅｐ ＲＴ－ＰＣＲ ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ社）を使用し、反応当たり２０ｎｇの全ＲＮＡを使用してｑＲＴ－ＰＣ

Ｒを行った。各試料を各プローブについて三重に試験した。ＡｃｔｉｎまたはＧｕｓＢを参照遺伝子として用いた。カスタムプライマー／プローブはＩＤＴ社により生成されたものである（表８）。

【表８】

表８．ｑＰＣＲプライマー／プローブ

標的			配列番号
Luci	プライマー１	GTGGTGTGCAGCGAGAATAG	178
	プライマー２	CGCTCGTTGTAGATGTCGTTAG	179
	プローブ	/56-FAM/TTGCAGTTC/ZEN/TTCATGCCCGTGTTG/3IABkFQ/	180
GusB	プライマー１	GTTTTTGATCCAGACCCAGATG	181
	プライマー２	GCCCATTATTCAGAGCGAGTA	182
	プローブ	/56-FAM/TGCAGGGTT/ZEN/TCACCAGGATCCAC/3IABkFQ/	183
ActB	プライマー１	CCTTGCACATGCCGGAG	184
	プライマー２	ACAGAGCCTCGCCTTTG	185
	プローブ	/56-FAM/TCATCCATG/ZEN/GTGAGCTGGCGG/3IABkFQ/	186
MAG-25マー	プライマー１	CTGAAAGCTCGGTTTGCTAATG	187
セット１	プライマー２	CCATGCTGGAAGAGACAATCT	188
	プローブ	/56-FAM/CGTTTCTGA/ZEN/TGGCGCTGACCGATA/3IABkFQ/	189
MAG-25マー	プライマー１	TATGCCTATCCTGTCTCCTCTG	190
セット２	プライマー２	GCTAATGCAGCTAAGTCCTCTC	191
	プローブ	/56-FAM/TGTTTACCC/ZEN/TGACCGTGCCTTCTG/3IABkFQ/	192

【０４２９】

ＢＬ６－ＯＶＡ腫瘍モデル

Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ系マウスの左下脇腹に10^5個のＢ１６－ＯＶＡ細胞／動物を注射した。腫瘍を免疫化の前、３日間にわたって増殖させた。

【０４３０】

ＣＴ２６腫瘍モデル

Ｂａｌｂ／ｃ系マウスの左下脇腹に10^6個／動物のＣＴ２６細胞を注射した。腫瘍を免疫化の前、７日間にわたって増殖させた。

【０４３１】

免疫化

ｓｒＲＮＡワクチンについては、マウスに１００ｕＬ体積中、１０ｕｇのＲＮＡを、両側性に筋肉内注射（各脚５０ｕＬ）により注射した。Ａｄ５ワクチンについては、マウスに5×10^{10}個のウイルス粒子（ＶＰ）を、１００ｕＬ体積中で両側性に筋肉内注射（各脚５０ｕＬ）により注射した。各動物に、抗ＣＴＬＡ－４（クローン９Ｄ９，ＢｉｏＸｃｅｌｌ社）、抗ＰＤ－１（クローンＲＭＰ１－１４，ＢｉｏＸｃｅｌｌ社）、または抗ＩｇＧ（クローンＭＰＣ－１１，ＢｉｏＸｃｅｌｌ社）を、用量２５０ｕｇで、週２回、腹腔内注射により注射した。

【０４３２】

インビボ生物発光イメージング

各時点においてマウスに腹腔内注射により１５０ｍｇ／ｋｇのルシフェリン基質を注射し、注射の１０～１５分後にＩＶＩＳインビボイメージングシステム（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ社）を使用して生物発光を測定した。

【０４３３】

脾細胞の解離

各マウスの脾臓及びリンパ節を、３ｍＬの完全ＲＰＭＩ（ＲＰＭＩ、１０％ＦＢＳ、ペニシリン／ストレプトマイシン）中にプールした。ｇｅｎｔｌｅＭＡＣＳ組織解離装置（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ社）を製造者の指示にしたがって使用して、機械的解離を行った。解離した細胞を４０ミクロンのフィルターに通して濾過し、赤血球をＡＣＫ溶解バッファー（１５０ｍＭ NH_4Cl，１０ｍＭ $KHCO_3$，０．１ｍＭ Na_2EDTA）で溶解した。細胞を３０ミクロンのフィルターに通して再び濾過した後、完全ＲＰＭＩ中に再懸濁した。細胞を、死細胞及びアポトーシス細胞を除外するためのヨウ化プロピジウム染色を使用してＡｔｔｕｎｅ ＮｘＴフローサイトメーター（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ社）でカウントした。次に、その後の分析用に細胞を適当な生細胞の濃度に調整した。

【０４３４】

エクスビボ酵素結合免疫スポット（ＥＬＩＳＰＯＴ）分析

マウスＩＦＮｇ ＥＬＩＳｐｏｔＰＬＵＳキット（ＭＡＢＴＥＣＨ社）を使用し、ＥＬＩＳＰＯＴハーモナイゼーションガイドライン｛ＤＯＩ：１０．１０３８／ｎｐｒｏｔ．２０１５．０６８｝にしたがってＥＬＩＳＰＯＴ分析を行った。5×10^4個の脾細胞を、９６ウェルＩＦＮｇ抗体コーティングプレート中で、１０ｕＭの示したペプチドと１６時間インキュベートした。スポットをアルカリホスファターゼを用いて現像した。反応時間を１０分間計り、プレートに水道水を流して反応を停止させた。スポットをＡＩＤ ｖＳｐｏｔ Ｒｅａｄｅｒ Ｓｐｅｃｔｒｕｍを用いてカウントした。ＥＬＩＳＰＯＴ分析を行うため、飽和度が５０％よりも高いウェルを「多すぎてカウント不能」として記録した。複製ウェルの偏差が１０％よりも大きい試料は分析から除外した。次いでスポットのカウントを、式：スポットカウント＋２×（スポットカウント×コンフルエンス（％）／［１００％－コンフルエンス（％）］）を用いてウェルのコンフルエンシーについて補正した。ネガティブペプチド刺激ウェル中のスポットカウントを抗原刺激したウェルから引くことによってネガティブバックグラウンドを補正した。最後に、多すぎてカウント不能として示したウェルを、最も高い観察された補正値に設定し、１００の位までの概数に四捨五入した。

【０４３５】

ＸＶＩ．Ｂ．アルファウイルスベクター

ＸＶＩ．Ｂ．１．アルファウイルスベクターのインビトロ評価

本明細書の一実現形態では、抗原発現システム用のアルファウイルス骨格を、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（ＶＥＥ）（Ｖｅｎｅｚｕｅｌａｎ Ｅｑｕｉｎｅ Ｅｎｃｅｐｈａｌｉｔｉｓ（ＶＥＥ）（Ｋｉｎｎｅｙ，１９８６，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １５２：４００－４１３）ベースの自己複製ＲＮＡ（ｓｒＲＮＡ）ベクターから生成した。１つの例では、２６Ｓサブゲノムプロモーターの３’側に位置するＶＥＥの構造タンパク質をコードする配列を欠失させ（ＶＥＥ配列の７５４４～１１，１７５を欠失させた。番号付けはＫｉｎｎｅｙ ｅｔ ａｌ １９８６に基づく。配列番号６）、抗原配列（配列番号１４及び配列番号４）またはルシフェラーゼレポーター（例えばＶＥＥ－ルシフェラーゼ、配列番号１５）に置き換えた（図１０）。ＲＮＡをインビトロでｓｒＲＮＡ ＤＮＡベクターから転写させ、ＨＥＫ２９３Ａ細胞にトランスフェクトしてルシフェラーゼレポーターの発現を測定した。さらに、ルシフェラーゼをコードする（非複製）ｍＲＮＡを比較のためにトランスフェクトした。ＶＥＥ－ルシフェラーゼのｓｒＲＮＡでは、２時間の測定値を２３時間の測定値と比較した場合にｓｒＲＮＡレポーターシグナルの約３０，０００倍の増大が観察された（表９）。これに対して、同じ時間でのｍＲＮＡレポーターのシグナルの増大は１０倍未満であった（表９）。

【表９】

表９．ＶＥＥ自己複製ベクターからのルシフェラーゼの発現は経時的に増大する。

９６ウェル中、ウェル当たり１０ｎｇのＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡまたは１０ｎｇの非複製ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ＴｒｉＬｉｎｋ　Ｌ－６３０７）をＨＥＫ２９３Ａ細胞にトランスフェクトした。トランスフェクト後の異なる時点で発光を測定した。ルシフェラーゼ発現を相対発光単位（ＲＬＵ）として報告する。各データポイントは、３つのトランスフェクトしたウェルの平均±ＳＤである。

コンストラクト	時点(時間)	平均RLU	標準偏差(三重のウェル)
mRNA	2	878.6666667	120.7904522
mRNA	5	1847.333333	978.515372
mRNA	9	4847	868.3271273
mRNA	23	8639.333333	751.6816702
SRRNA	2	27	15
SRRNA	5	4884.333333	2955.158935
SRRNA	9	182065.5	16030.81784
SRRNA	23	783658.3333	68985.05538

【０４３６】

別の例では、ｓｒＲＮＡの複製を、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ｑＲＴ－ＰＣＲ）を使用して、ルシフェラーゼをコードしたｓｒＲＮＡ（ＶＥＥ－ルシフェラーゼ）または複数のエピトープカセット（ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー）をコードしたｓｒＲＮＡのいずれかのトランスフェクション後のＲＮＡレベルを測定することにより確認した。ＶＥＥ－ルシフェラーゼでは約１５０倍のＲＮＡの増大が観察された（表１０）のに対して、ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡでは３０～５０倍のＲＮＡの増大が観察された（表１１）。これらのデータは、ＶＥＥ　ｓｒＲＮＡベクターが細胞にトランスフェクトされると複製されることを示すものである。

【表１０】

表１０．ＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡをトランスフェクトした細胞におけるＲＮＡ複製の直接測定。ＨＥＫ２９３Ａ細胞にＶＥＥ－ルシフェラーゼｓｒＲＮＡをトランスフェクトし（２４ウェルのウェル当たり１５０ｎｇ）、トランスフェクション後の異なる時間にｑＲＴ－ＰＣＲによりＲＮＡレベルを定量した。各測定値はアクチン参照遺伝子に対して正規化し、２時間の時点に対する倍率変化を示す。

時点(時間)	ルシフェラーゼCt	アクチンCt	dCt	参照dCt	ddCt	相対倍率変化
2	20.51	18.14	2.38	2.38	0.00	1.00
4	20.09	18.39	1.70	2.38	-0.67	1.59
6	15.50	18.19	-2.69	2.38	-5.07	33.51
8	13.51	18.36	-4.85	2.38	-7.22	149.43

【表１１】

表１１．ＶＥＥ－MAG２５マーｓｒＲＮＡをトランスフェクトした細胞におけるＲＮＡ複製の直接測定。ＨＥＫ２９３細胞にＶＥＥ－MAG２５マーｓｒＲＮＡをトランスフェクトし（２４ウェルのウェル当たり１５０ｎｇ）、トランスフェクション後の異なる時間にｑＲＴ－ＰＣＲによりＲＮＡレベルを定量した。各測定値はＧｕｓＢ参照遺伝子に対して正規化し、２時間の時点に対する倍率変化を示す。グラフ上の異なる線は、いずれもｓｒＲＮＡのエピトープカセット領域を検出する２つの異なるｑＰＣＲプライマー／プローブのセットを表す。

プライマー/プローブ	時点(時間)	Ct	GusB Ct	dCt	参照dCt	ddCt	相対倍率変化
セット1	2	18.96	22.41	-3.45	-3.45	0.00	1.00
セット1	4	17.46	22.27	-4.81	-3.45	-1.37	2.58
セット1	6	14.87	22.04	-7.17	-3.45	-3.72	13.21
セット1	8	14.16	22.19	-8.02	-3.45	-4.58	23.86
セット1	24	13.16	22.01	-8.86	-3.45	-5.41	42.52
セット1	36	13.53	22.63	-9.10	-3.45	-5.66	50.45
セット2	2	17.75	22.41	-4.66	-4.66	0.00	1.00
セット2	4	16.66	22.27	-5.61	-4.66	-0.94	1.92
セット2	6	14.22	22.04	-7.82	-4.66	-3.15	8.90
セット2	8	13.18	22.19	-9.01	-4.66	-4.35	20.35
セット2	24	12.22	22.01	-9.80	-4.66	-5.13	35.10
セット2	36	13.08	22.63	-9.55	-4.66	-4.89	29.58

【０４３７】

ＸＶＩ．Ｂ．２．アルファウイルスベクターのインビボ評価

別の例において、ＶＥＥ－ルシフェラーゼレポーターの発現をインビボで評価した。マウスに、脂質ナノ粒子（ＭＣ３）に封入された１０ｕｇのＶＥＥ－ルシフェラーゼを注射し、注射の２４及び４８時間後、ならびに７及び１４日後に撮影して生物発光シグナルを測定した。ルシフェラーゼシグナルが注射の２４時間後に検出され、時間とともに増大し、ｓｒＲＮＡ注射の７日後にピークとなった（図１１）。

【０４３８】

ＸＶＩ．Ｂ．３．アルファウイルスベクター腫瘍モデルの評価

１つの実現形態において、ＶＥＥ　ｓｒＲＮＡベクターがインビボで抗原特異的免疫応答を誘導するかを調べるため、２つの異なるＭＨＣクラスＩマウス腫瘍エピトープであるＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号７２）及びＡＨ１－Ａ５（Ｓｌａｎｓｋｙ　ｅｔ　ａｌ．，２０００，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　１３：５２９－５３８）を発現するＶＥＥ　ｓｒＲＮＡベクターを作製した（ＶＥＥ－ＵｂＡＡＹ，配列番号１４）。ＳＦＬ（ＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号７２））エピトープは、Ｂ１６－ＯＶＡメラノーマ細胞株によって発現され、ＡＨ１－Ａ５（ＳＰＳＹＡＹＨＱＦ（配列番号７３）；Ｓｌａｎｓｋｙ　ｅｔ　ａｌ．，２０００，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ）エピトープは、ＣＴ２６結腸癌細胞株によって発現される関連エピトープを標的とするＴ細胞を誘導する（ＡＨ１／ＳＰＳＹＶＹＨＱＦ（配列番号１９３）；Ｈｕａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　９３：９７３０－９７３５）。１つの例では、インビボ実験において、ＶＥＥ－ＵｂＡＡＹ　ｓｒＲＮＡが、Ｔ７ポリメラーゼ（ＴｒｉＬｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用したインビトロ転写によって生成され、脂質ナノ粒子（ＭＣ３）に封入された。

【０４３９】

ＳＦＬを標的とした、コントロールに対して強い抗原特異的Ｔ細胞応答が、ＭＣ３で製剤化したＶＥＥ－ＵｂＡＡＹ　ｓｒＲＮＡによる、Ｂ１６－ＯＶＡ腫瘍を有するマウスの免疫化の２週間後に観察された。１つの例では、脾細胞10^6個当たり中央値で３８３５

個のスポット形成細胞（ＳＦＣ）が、ＥＬＩＳｐｏｔアッセイにおいてＳＦＬペプチドによる刺激後に測定され（図１２Ａ、表１２）、ペンタマー染色により測定した場合に、ＣＤ８　Ｔ細胞の１．８％（中央値）がＳＦＬ抗原特異的であった（図１２Ｂ、表１２）。別の例では、抗ＣＴＬＡ－４モノクローナル抗体（ｍＡｂ）とＶＥＥ　ｓｒＲＮＡワクチンとの同時投与によって、全体のＴ細胞応答の中度の増大が認められ、脾細胞10^6個当たり中央値で４７９４．５個のＳＦＣがＥＬＩＳｐｏｔアッセイで測定された（図１２Ａ、表１２）。

【表１２】

表１２．Ｂ１６－ＯＶＡ腫瘍を有するＣ５７ＢＬ／６Ｊ系マウスにおけるＶＥＥ　ｓｒＲＮＡ免疫化の１４日後のＥＬＩＳＰＯＴ及びMHCＩペンタマー染色アッセイの結果。

群	マウス	SFC/脾臓細胞1e6個	ペンタマー陽性(CD8の%)	群	マウス	SFC/脾臓細胞1e6個	ペンタマー陽性(CD8の%)
コントロール	1	47	0.22	Vax	1	6774	4.92
	2	80	0.32		2	2323	1.34
	3	0	0.27		3	2997	1.52
	4	0	0.29		4	4492	1.86
	5	0	0.27		5	4970	3.7
	6	0	0.25		6		4.13
	7	0	0.23		7	3835	1.66
	8	87	0.25		8	3119	1.64
aCTLA4	1	0	0.24	Vax＋aCTLA4	1	6232	2.16
	2	0	0.26		2	4242	0.82
	3	0	0.39		3	5347	1.57
	4	0	0.28		4	6568	2.33
	5	0	0.28		5	6269	1.55
	6	0	0.28		6	4056	1.74
	7	0	0.31		7	4163	1.14
	8	6	0.26		8	3667	1.01

*Ｖａｘ群のマウス＃６からの結果は、三重のウェル間のばらつきが大きいことから分析から除外した。

【０４４０】

別の実現形態では、臨床アプローチを反映するため、Ｂ１６－ＯＶＡ及びＣＴ２６マウス腫瘍モデルにおいて異種プライム／ブーストを行い、腫瘍を有するマウスを、同じ抗原カセット（Ａｄ５－ＵｂＡＡＹ）を発現するアデノウイルスベクターで最初に免疫した後、Ａｄ５－ＵｂＡＡＹプライムの１４日後にＶＥＥ－ＵｂＡＡＹ　ｓｒＲＮＡワクチンでブースト免疫を行った。１つの例では、Ａｄ５－ＵｂＡＡＹワクチンによって抗原特異的免疫応答が誘導され、脾細胞10^6個当たり７３３０個（中央値）のＳＦＣがＥＬＩＳｐｏｔアッセイで測定され（図１３Ａ、表１３）、ペンタマー染色により測定した場合にＣＤ８　Ｔ細胞の２．９％（中央値）がＳＦＬ抗原を標的化していた（図１３Ｃ、表１３）。別の例では、Ｔ細胞応答は、Ｂ１６－ＯＶＡモデルにおいてＶＥＥ－ＵｂＡＡＹ　ｓｒＲＮＡによるブーストの２週間後に維持され、脾細胞10^6個当たり３９６０個（中央値）のＳＦＣがＥＬＩＳｐｏｔアッセイで測定され（図１３Ｂ、表１３）、ペンタマー染色により測定した場合にＣＤ８　Ｔ細胞の３．１％（中央値）がＳＦＬを標的化していた（図１３Ｄ、表１３）。

【表１３】

表１３．Ａｄ５ワクチンプライム及びｓｒＲＮＡブーストによる異種プライム／ブースト後のＢ１６－ＯＶＡマウスの免疫モニタリング。

１４日目

グループ	マウス	SFC/脾臓細胞1e6個	ペンタマー陽性(CD8の%)	群	マウス	SFC/脾臓細胞1e6個	ペンタマー陽性(CD8の%)
コントロール	1	0	0.10	Vax	1	8514	1.87
	2	0	0.09		2	7779	1.91
	3	0	0.11		3	6177	3.17
	4	46	0.18		4	7945	3.41
	5	0	0.11		5	8821	4.51
	6	16	0.11		6	6881	2.48
	7	0	0.24		7	5365	2.57
	8	37	0.10		8	6705	3.98
aCTLA4	1	0	0.08	Vax＋aCTLA4	1	9416	2.35
	2	29	0.10		2	7918	3.33
	3	0	0.09		3	10153	4.50
	4	29	0.09		4	7212	2.98
	5	0	0.10		5	11203	4.38
	6	49	0.10		6	9784	2.27
	7	0	0.10		8	7267	2.87
	8	31	0.14				

２８日目

群	マウス	SFC/脾臓細胞1e6個	ペンタマー陽性(CD8の%)	群	マウス	SFC/脾臓細胞1e6個	ペンタマー陽性(CD8の%)
コントロール	2	0	0.17	Vax	1	5033	2.61
	4	0	0.15		2	3958	3.08
	6	20	0.17		4	3960	3.58
aCTLA4	1	7	0.23	Vax＋aCTLA4	4	3460	2.44
	2	0	0.18		5	5670	3.46
	3	0	0.14				

【０４４１】

別の実現形態では、同様の結果が、ＣＴ２６マウスモデルにおけるＡｄ５－ＵｂＡＡＹによるプライム及びＶＥＥ－ＵｂＡＡＹ　ｓｒＲＮＡによるブースト後に観察された。１つの例では、Ａｄ５－ＵｂＡＡＹによるプライム後（１４日目）にＡＨ１抗原特異的応答が観察され、脾細胞10^6個当たり平均で５１８７個のＳＦＣがＥＬＩＳｐｏｔアッセイで測定され（図１４Ａ、表１４）、ＶＥＥ－ＵｂＡＡＹ　ｓｒＲＮＡによるブースト後（２８日目）には脾細胞10^6個当たり３７９９個のＳＦＣがＥＬＩＳｐｏｔアッセイで測定された（図１４Ｂ、表１４）。

【表１４】

表１４．ＣＴ２６腫瘍マウスモデルにおける異種プライム／ブースト後の免疫モニタリング。

１２日目			２１日目		
群	マウス	SFC/脾臓細胞1e6個	群	マウス	SFC/脾臓細胞1e6個
コントロール	1	1799	コントロール	9	167
	2	1442		10	115
	3	1235		11	347
aPD1	1	737	aPD1	8	511
	2	5230		11	758
	3	332	Vax	9	3133
Vax	1	6287		10	2036
	2	4086		11	6227
Vax＋aPD1	1	5363	Vax＋aPD1	8	3844
	2	6500		9	2071
				11	4888

【０４４２】

ＸＶＩＩ．ＣｈＡｄＶ／ｓｒＲＮＡの組み合わせの腫瘍モデル評価

ＣｈＡｄＶ６８及び自己複製ＲＮＡ（ｓｒＲＮＡ）を用いた異なる投与プロトコールを、マウスＣＴ２６腫瘍モデルで評価した。

【０４４３】

ＸＶＩＩ．Ａ ＣｈＡｄＶ／ｓｒＲＮＡの組み合わせの腫瘍モデル評価の方法及び材料

腫瘍の注入

Ｂａｌｂ／ｃ系マウスにＣＴ２６細胞株を注射した。腫瘍細胞注射の７日後にマウスを異なる実験アーム（各群当たりマウス２８～４０匹）をランダムカセット配列し、処置を開始した。Ｂａｌｂ／ｃ系マウスの左下脇腹に10^6個／動物のＣＴ２６細胞を注射した。腫瘍を免疫化の前、７日間にわたって増殖させた。各実験アームは表１５に詳細に記載したとおりである。

【表１５】
表１５－ＣｈＡｄＶ／ｓｒＲＮＡの組み合わせの腫瘍モデル評価の実験アーム

グループ	N	処置	用量	体積	スケジュール	経路
1	40	ChAdV68コントロール	1e11 vp	2x 50 uL	day 0	IM
		srRNAコントロール	10 ug	50 uL	14, 28, 42日目	IM
		抗PD1	250 ug	100 uL	2x /週(0日目に開始)	IP
2	40	ChAdV68コントロール	1e11 vp	2x 50 uL	0日目	IM
		srRNAコントロール	10 ug	50 uL	14, 28, 42日目	IM
		抗IgG	250 ug	100 uL	2x /週(0日目に開始)	IP
3	28	ChAdV68ワクチン	1e11 vp	2x 50 uL	day 0	IM
		srRNAワクチン	10 ug	50 uL	14, 28, 42日目	IM
		抗PD1	250 ug	100 uL	2x /週(0日目に開始)	IP
4	28	ChAdV68ワクチン	1e11 vp	2x 50 uL	day 0	IM
		srRNAワクチン	10 ug	50 uL	14, 28, 42日目	IM
		抗IgG	250 ug	100 uL	2x /週(0日目に開始)	IP
5	28	srRNAワクチン	10 ug	50 uL	0, 28, 42日目	IM
		ChAdV68ワクチン	1e11 vp	2x 50 uL	day 14	IM
		抗PD1	250 ug	100 uL	2x /週(0日目に開始)	IP
6	28	srRNAワクチン	10 ug	50 uL	0, 28, 42日目	IM
		ChAdV68ワクチン	1e11 vp	2x 50 uL	day 14	IM
		抗IgG	250 ug	100 uL	2x /週(0日目に開始)	IP
7	40	srRNAワクチン	10 ug	50 uL	0, 14, 28, 42日目	IM
		抗PD1	250 ug	100 uL	2x /週(0日目に開始)	IP
8	40	srRNAワクチン	10 ug	50 uL	0, 14, 28, 42日目	IM
		抗IgG	250 ug	100 uL	2x /週(0日目に開始)	IP

【０４４４】
免疫化
ｓｒＲＮＡワクチンについては、マウスに１００ｕＬ体積中、１０ｕｇのＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡを、両側性に筋肉内注射（各脚５０ｕＬ）により注射した。Ｃ６８ワクチンについては、マウスに１×１０^{11}個のＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡのウイルス粒子（ＶＰ）を、１００ｕＬ体積中で両側性に筋肉内注射（各脚５０ｕＬ）により注射した。各動物に、抗ＰＤ－１（クローンＲＭＰ１－１４，ＢｉｏＸｃｅｌｌ社）、または抗ＩｇＧ（クローンＭＰＣ－１１，ＢｉｏＸｃｅｌｌ社）を、用量２５０ｕｇで、週２回、腹腔内注射により注射した。
【０４４５】
脾細胞の解離
各マウスの脾臓及びリンパ節を、３ｍＬの完全ＲＰＭＩ（ＲＰＭＩ、１０％ＦＢＳ、ペニシリン／ストレプトマイシン）中にプールした。ｇｅｎｔｌｅＭＡＣＳ組織解離装置（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ社）を製造者の指示にしたがって使用して、機械的解離を行った。解離した細胞を４０ミクロンのフィルターに通して濾過し、赤血球をＡＣＫ溶解バッファー（１５０ｍＭ NH_4Cl，１０ｍＭ $KHCO_3$，０．１ｍＭ Na_2EDT

Ａ）で溶解した。細胞を３０ミクロンのフィルターに通して再び濾過した後、完全ＲＰＭＩ中に再懸濁した。細胞を、死細胞及びアポトーシス細胞を除外するためのヨウ化プロピジウム染色を使用してＡｔｔｕｎｅ　ＮｘＴフローサイトメーター（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ社）でカウントした。次に、その後の分析用に細胞を適当な生細胞の濃度に調整した。

【０４４６】

エクスビボ酵素結合免疫スポット（ＥＬＩＳＰＯＴ）分析

マウスＩＦＮｇ　ＥＬＩＳｐｏｔＰＬＵＳキット（ＭＡＢＴＥＣＨ社）を使用し、ＥＬＩＳＰＯＴハーモナイゼーションガイドライン｛ＤＯＩ：１０．１０３８／ｎｐｒｏｔ．２０１５．０６８｝にしたがってＥＬＩＳＰＯＴ分析を行った。５×１０^{4}個の脾細胞を、９６ウェルＩＦＮｇ抗体コーティングプレート中で、１０ｕＭの示したペプチドと１６時間インキュベートした。スポットをアルカリホスファターゼを用いて現像した。反応時間を１０分間計り、プレートに水道水を流して反応を停止させた。スポットをＡＩＤ　ｖＳｐｏｔ　Ｒｅａｄｅｒ　Ｓｐｅｃｔｒｕｍを用いてカウントした。ＥＬＩＳＰＯＴ分析を行うため、飽和度が５０％よりも高いウェルを「多すぎてカウント不能」として記録した。複製ウェルの偏差が１０％よりも大きい試料は分析から除外した。次いでスポットのカウントを、式：スポットカウント＋２×（スポットカウント×コンフルエンス（％）／［１００％－コンフルエンス（％）］）を用いてウェルのコンフルエンシーについて補正した。ネガティブペプチド刺激ウェル中のスポットカウントを抗原刺激したウェルから引くことによってネガティブバックグラウンドを補正した。最後に、多すぎてカウント不能として示したウェルを、最も高い観察された補正値に設定し、１００の位までの概数に四捨五入した。

【０４４７】

ＸＶＩＩ．Ｂ　ＣＴ２６腫瘍モデルにおけるＣｈＡｄＶ／ｓｒＲＮＡの組み合わせの評価

ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー／ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡの異種プライム／ブースト、またはＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡの同種プライム／ブーストワクチンの免疫原性及び有効性をＣＴ２６マウス腫瘍モデルで評価した。Ｂａｌｂ／ｃ系マウスにＣＴ２６細胞株を注射した。腫瘍細胞注射の７日後にマウスを異なる実験アームをランダムカセット配列し、処置を開始した。各実験アームは表１５に詳細に、また表１６により一般的に記載したとおりである。

【表１６】

表１６－プライム／ブースト実験アーム

群	プライム	ブースト
1	コントロール	コントロール
2	コントロール+抗PD-1	コントロール+抗PD-1
3	ChAdV68.5WTnt.MAG25マー	VEE-MAG25マー srRNA
4	ChAdV68.5WTnt.MAG25マー+抗PD-1	VEE-MAG25マー srRNA+抗PD-1
5	VEE-MAG25マー srRNA	ChAdV68.5WTnt.MAG25マー
6	VEE-MAG25マー srRNA +抗PD-1	ChAdV68.5WTnt.MAG25マー+抗PD-1
7	VEE-MAG25マー srRNA	VEE-MAG25マー srRNA
8	VEE-MAG25マー srRNA+抗PD-1	VEE-MAG25マー srRNA+抗PD-1

【０４４８】

脾臓をプライムワクチン接種の１４日後に収穫して免疫モニタリングを行った。腫瘍及び体重測定値を週２回測定し、生存率を監視した。すべての活性ワクチン群でコントロールに対する強い免疫応答が観察された。

【０４４９】

それぞれ、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー（ＣｈＡｄＶ／グループ３）、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー＋抗ＰＤ－１（ＣｈＡｄＶ＋ＰＤ－１／グループ４）、ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡ（ｓｒＲＮＡ／グループ５と７を合わせた中央値）、またはＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡ＋抗ＰＤ－１（ｓｒＲＮＡ＋ＰＤ－１／グループ６と８を合わせた中央値）で免疫したマウスのＥＬＩＳｐｏｔアッセイにおいて、最初の免疫の１４日後に、脾細胞10^6個当たり、中央値で１０，６３０個、１２，９７６個、３３１９個、または３７４５個のスポット形成細胞（ＳＦＣ）の細胞性免疫応答が観察された（図１６及び表１７）。これに対して、ワクチンコントロール（グループ１）または抗ＰＤ－１をともなうワクチンコントロール（グループ２）は、それぞれ、脾細胞10^6個当たり中央値で２９６個または２８５個のＳＦＣの細胞性免疫応答を示した。

【表１７】

表１７－ＣＴ２６腫瘍モデルにおける細胞性免疫応答

処置	SFC中央値/脾細胞10^6個
コントロール	296
PD1	285
ChAdV68.5WTnt.MAG25マー (ChAdV)	10630
ChAdV68.5WTnt.MAG25マー＋PD1 (ChAdV＋PD-1)	12976
VEE-MAG25マー srRNA (srRNA)	3319
VEE-MAG25マー srRNA＋PD-1 (srRNA＋PD1)	3745

【０４５０】

ＥＬＩＳｐｏｔのデータと一致して、それぞれ、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー（ＣｈＡｄＶ／グループ３）、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー＋抗ＰＤ－１（ＣｈＡｄＶ＋ＰＤ－１／グループ４）、ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡ（ｓｒＲＮＡ／グループ５と７を合わせた中央値）、またはＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡ＋抗ＰＤ－１（ｓｒＲＮＡ＋ＰＤ－１／グループ６と８を合わせた中央値）で免疫したマウスの細胞内サイトカイン染色（ＩＣＳ）分析において、最初の免疫の１４日後にＣＤ８　Ｔ細胞の５．６、７．８、１．８、または１．９％が抗原特異的応答を示した（図１７及び表１８）。ワクチンコントロール、またはワクチンコントロールと抗ＰＤ－１との組み合わせで免疫したマウスは、それぞれ、０．２及び０．１％の抗原特異的ＣＤ８応答を示した。

【表１８】
表１８－ＣＴ２６腫瘍モデルにおけるＣＤ８　Ｔ細胞応答

処置	IFN-γ陽性のCD8の割合(%)の中央値
コントロール	0.21
PD1	0.1
ChAdV68.5WTnt.MAG25マー(ChAdV)	5.6
ChAdV68.5WTnt.MAG25マー＋PD1 (ChAdV＋PD-1)	7.8
VEE-MAG25マー srRNA (srRNA)	1.8
VEE-MAG25マー srRNA＋PD-1 (srRNA＋PD1)	1.9

【０４５１】
ＣＴ２６結腸腫瘍モデルのすべてのグループで腫瘍増殖が測定され、腫瘍増殖は処置開始の２１日後（ＣＴ２６腫瘍細胞の注射の２８日後）までみられる。大きな腫瘍サイズ（＞２５００ｍｍ^3）に基づいて処置開始の２１日後にマウスを　　殺したため、分析のバイアスを避けるために最初の２１日間のみを示している。２１日目における平均腫瘍体積は、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マープライム／ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡブースト（グループ３）、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マープライム／ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡブースト＋抗ＰＤ－１（グループ４）、ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡプライム／ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーブースト（グループ５）、ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡプライム／ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーブースト＋抗ＰＤ－１（グループ６）、ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡプライム／ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡブースト（グループ７）、及びＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡプライム／ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡブースト＋抗ＰＤ－１（グループ８）でそれぞれ、１１２９、８４８、２１４２、１４１８、２１９８及び１６０６ ｍｍ^{3}であった（図１８及び表１９）。ワクチンコントロール、またはワクチンコントロールと抗ＰＤ－１との組み合わせにおける平均腫瘍体積は、それぞれ、２３６１または２０６７ｍｍ^{3}であった。これらのデータに基づけば、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー／ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡ（グループ３）、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー／ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡ＋抗ＰＤ－１（グループ４）、ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡ／ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー＋抗ＰＤ－１（グループ６）、及びＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡ／ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡ＋抗ＰＤ－１（グループ８）は、コントロール（グループ１）と有意に異なる腫瘍増殖の低下を２１日目にもたらした。

【表１９】
表１９－ＣＴ２６モデルで測定された腫瘍サイズ

処置	腫瘍サイズ(mm^3)	SEM
コントロール	2361	235
PD1	2067	137
chAdV/srRNA	1129	181
chAdV/srRNA+PD1	848	182
srRNA/chAdV	2142	233
srRNA/chAdV+PD1	1418	220
srRNA	2198	134
srRNA+PD1	1606	210

【０４５２】
ＣＴ２６腫瘍モデルにおいて処置開始後３５日間（ＣＴ２６腫瘍細胞の注射後４２日間）にわたって生存率を監視した。改善された生存率が、試験した組み合わせのうちの４つでマウスをワクチン接種した後に観察された。ワクチン接種後、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マープライム／ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡブーストと抗ＰＤ－１との組み合わせ（グループ４；コントロールグループ１に対してＰ＜０．０００１）、ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡプライム／ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡブーストと抗ＰＤ－１との組み合わせ（グループ８；コントロールグループ１に対してＰ＝０．０００６）、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マープライム／ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡブースト（グループ３；コントロールグループ１に対してＰ＝０．０００３）、及び、ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡプライム／ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーブーストと抗ＰＤ－１との組み合わせ（グループ６；コントロールグループ１に対してＰ＝０．００１６）を用いたマウスの、それぞれ、６４％，４６％，４１％及び３６％が生存した（図１９及び表２０）。生存率は、残りの処置群［ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡプライム／ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーブースト（グループ５）、ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡプライム／ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡ（グループ７）、及び抗ＰＤ－１単独（グループ２）］ではコントロールグループ１（≦１４％）と有意差は認められなかった。

【表２０】
表２０－ＣＴ２６モデルにおける生存率

時点	コントロール	PD1	chAdV/srRNA	chAdV/srRNA+PD1	srRNA/chAdV	srRNA/chAdV+PD1	srRNA	srRNA+PD1
0	100	100	100	100.00	100.00	100	100	100
21	96	100	100	100	100	95	100	100
24	54	64	91	100	68	82	68	71
28	21	32	68	86	45	68	21	64
31	7	14	41	64	14	36	11	46
35	7	14	41	64	14	36	11	46

【０４５３】
結論として、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー及びＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡは、コントロールに対して、各ワクチンによりコードされたマウス腫瘍抗原に対する強いＴ細胞応答を誘発した。腫瘍を有するマウスへの、抗ＰＤ－１の同時投与をともなう、もしくはともなわないＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マープライム及びＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡブーストの投与、ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲ

ＮＡプライム及びＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーと抗ＰＤ－１との組み合わせの投与、または、同種プライムブースト免疫としてのＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡと抗ＰＤ－１との組み合わせの投与は、高い生存率につながった。

【０４５４】

ＸＶＩＩＩ．非ヒト霊長類実験

ＣｈＡｄＶ６８及び自己複製ＲＮＡ（ｓｒＲＮＡ）を用いた異なる投与プロトコールを、非ヒト霊長類（ＮＨＰ）ＮＨＰで評価した。

【０４５５】

材料及び方法

プライミングワクチンを各ＮＨＰで筋肉内（ＩＭ）注射して実験を開始した（ワクチンプライム）。１回以上のブースターワクチン（ワクチンブースト）も各ＮＨＰに筋肉内注射した。下記表に概略を示し、下記に要約した各グループにしたがって、投与ごとに両側性注射で投与した。

【０４５６】

免疫化

Ｍａｍｕ　Ａ＊０１インドアカゲザルを、ＬＮＰ－１またはＬＮＰ－２中で製剤化した１×１０^{12}個のウイルス粒子（注射１回当たり５×１０^{11}個のウイルス粒子）のＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー、３０ｕｇのＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡ、１００ｕｇのＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡ、または３００ｕｇのＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーｓｒＲＮＡで両側性に免疫した。３０ｕｇ、１００ｕｇまたは３００ｕｇのＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー ｓｒＲＮＡのワクチンブーストをプライムワクチン接種後の示した時間に筋肉内投与した。

【０４５７】

免疫モニタリング

ＰＢＭＣを、プライムワクチン接種後の示した時間にＬｙｍｐｈｏｃｙｔｅ　Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎ　Ｍｅｄｉｕｍ（ＬＳＭ，ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ社）及びＬｅｕｃｏＳｅｐ分離チューブ（Ｇｒｅｉｎｅｒ　Ｂｉｏ－Ｏｎｅ社）を使用して単離し、１０％ＦＢＳ及びペニシリン／ストレプトマイシンを含んだＲＰＭＩに再懸濁した。細胞を、死細胞及びアポトーシス細胞を除外するためのヨウ化プロピジウム染色を使用してＡｔｔｕｎｅ　ＮｘＴフローサイトメーター（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ社）でカウントした。次に、その後の分析用に細胞を適当な生細胞の濃度に調整した。実験に用いたそれぞれのサルについて、ＥＬＩＳｐｏｔまたはフローサイトメトリー法を用いてＴ細胞応答を測定した。ワクチンにコードされた６種類の異なるアカゲザルＭａｍｕ－Ａ＊０１クラスＩエピトープに対するＴ細胞応答を、ＥＬＩＳｐｏｔ（ｅｘ　ｖｉｖｏ　ｅｎｚｙｍｅ－ｌｉｎｋｅｄ　ｉｍｍｕｎｏｓｐｏｔ）（エクスビボ酵素結合免疫スポット）分析を用いてＩＦＮ－γなどのサイトカインの誘導を測定することにより、ＰＢＭＣから観測した。サルＩＦＮｇ　ＥＬＩＳｐｏｔＰＬＵＳキット（ＭＡＢＴＥＣＨ社）を使用し、ＥＬＩＳＰＯＴハーモナイゼーションガイドライン｛ＤＯＩ：１０．１０３８／ｎｐｒｏｔ．２０１５．０６８｝にしたがってＥＬＩＳｐｏｔ分析を行った。２００，０００個のＰＢＭＣを、９６ウェルＩＦＮｇ抗体コーティングプレート中で、１０ｕＭの示したペプチドと１６時間インキュベートした。スポットをアルカリホスファターゼを用いて現像した。反応時間を１０分間計り、プレートに水道水を流して反応を停止させた。スポットをＡＩＤ　ｖＳｐｏｔ　Ｒｅａｄｅｒ　Ｓｐｅｃｔｒｕｍを用いてカウントした。ＥＬＩＳＰＯＴ分析を行うため、飽和度が５０％よりも高いウェルを「多すぎてカウント不能」として記録した。複製ウェルの偏差が１０％よりも大きい試料は分析から除外した。次に、スポットのカウントを、式：スポットカウント＋２×（スポットカウント×コンフルエンス（％）／［１００％－コンフルエンス（％）］）を用いてウェルのコンフルエンシーについて補正した。ネガティブペプチド刺激ウェル中のスポットカウントを抗原刺激したウェルから引くことによってネガティブバックグラウンドを補正した。最後に、多すぎてカウント不能として示したウェルを、最も高い観察された補正値に設定し、１００の位までの概数に四捨五入した。

【０４５８】
ワクチンにコードされた６種類の異なるアカゲザルＭａｍｕ－Ａ＊０１クラスＩエピトープに対する特異的ＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞応答を、フローサイトメトリーを用いてＩＦＮ－γなどの細胞内サイトカインの誘導を測定することにより、ＰＢＭＣから観測した。いずれの方法の結果も、サイトカインが、エピトープに対して抗原特異的な形で誘導したことを示している。
【０４５９】
アカゲザルにおける免疫原性
この実験は、（ａ）同種のプライム／ブーストまたは異種のプライム／ブーストとしてのＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡの３０μｇ及び１００μｇの用量とＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーとの組み合わせの免疫原性及び予備的安全性を評価し、（ｂ）ＬＮＰ２に対してＬＮＰ１を使用した脂質ナノ粒子中のＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡの免疫応答を比較し、（ｃ）ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡ及びＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーによる免疫化に対するＴ細胞応答の速度論を評価するように設計した。
【０４６０】
この実験アームを、免疫原性を実証するためにＭａｍｕ－Ａ＊０１インドアカゲザルで行った。この実験で使用される選択抗原は、アカゲザル、具体的にはＭａｍｕ－Ａ＊０１ＭＨＣクラスＩハプロタイプを有するものにおいてのみ認識される。Ｍａｍｕ－Ａ＊０１インドアカゲザルを異なる実験アーム（各群６匹のアカゲザル）にランダム化し、複数のＭａｍｕ－Ａ＊０１制限エピトープを含むモデル抗原をコードしたＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーまたはＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡベクターのいずれかを筋肉内注射により両側性に投与した。各実験アームは下記に記載したとおりである。
【表２１】
表２１：インドアカゲザルにおける非ＧＬＰ免疫原性の実験

グループ	プライム	ブースト1	ブースト2
1	VEE-MAG25マー srRNA -LNP1(30 μg)	VEE-MAG25マー srRNA -LNP1 (30 μg)	VEE-MAG25マー srRNA -LNP1 (30 μg)
2	VEE-MAG25マー srRNA -LNP1 (100 μg)	VEE-MAG25マー srRNA -LNP1 (100 μg)	VEE-MAG25マー srRNA -LNP1 (100 μg)
3	VEE-MAG25マー srRNA -LNP2 (100 μg)	VEE-MAG25マー srRNA -LNP2 (100 μg)	VEE-MAG25マー srRNA -LNP2 (100 μg)
4	ChAdV68.5WTnt.MAG25マー	VEE-MAG25マー srRNA -LNP1 (100 μg)	VEE-MAG25マー srRNA -LNP1 (100 μg)

【０４６１】
免疫化の前及び初期免疫化の１、２、３、４、５、６、８、９、及び１０週後にＰＢＭＣを採取して免疫モニタリングを行った。
【０４６２】
結果
６種類の異なるＭａｍｕ－Ａ＊０１制限エピトープに対する末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）中の抗原特異的細胞性免疫応答を、免疫化の前、及び初期免疫化の１、２、３、４、５、６、８、９、及び１０日後に測定した。表２１に示すように、各動物に、４及び８週目に、ＬＮＰ１またはＬＮＰ２のいずれかと製剤化した用量３０μｇまたは１００μｇのＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡによるブースト免疫を行った。６種類のエピトープす

べてに対する複合的な免疫応答を、それぞれの免疫モニタリング時点についてプロットした（図２０Ａ～Ｄ及び表２２～２５）。

【０４６３】

複合的な抗原特異的免疫応答が、最初のＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡ－ＬＮＰ１（３０μｇ）によるプライム免疫化の１、２、３、４、５、６、８、９、または１０週後にそれぞれ、ＰＢＭＣ１０^{6}個当たり１７０、１４、１５、１１、７、８、１４、１７、１２ＳＦＣ（６つのエピトープの合計）ですべての測定において観察された（図２０Ａ）。複合的な抗原特異的免疫応答が、最初のＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡ－ＬＮＰ１（１００μｇ）によるプライム免疫化の１、２、３、４、５、６、８、９、または１０週後にそれぞれ、ＰＢＭＣ１０^{6}個当たり１０８、－３、１４、１、３７、４、１０５、１７、２５ＳＦＣ（６つのエピトープの合計）ですべての測定において観察された（図２０Ｂ）。複合的な抗原特異的免疫応答が、最初のＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡ－ＬＮＰ２（１００μｇ）によるプライム免疫化の１、２、３、４、５、６、８、９、または１０週後にそれぞれ、ＰＢＭＣ１０^{6}個当たり－１７、３８、１４、－２、８７、２１、１０４、１２９、８９ＳＦＣ（６つのエピトープの合計）ですべての測定において観察された（図２０Ｃ）。負の値は、各エピトープ／動物のプレブリード値に対して正規化した結果である。

【０４６４】

複合的な抗原特異的免疫応答が、最初のＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーによるプライム免疫化の１、２、３、４、５、６、８、９、または１０週後にそれぞれ、ＰＢＭＣ１０^{6}個当たり１２１８、１７８４、１８６６、９７３、１８１３、７４７、７９７、１２４９、及び５４７ＳＦＣ（６つのエピトープの合計）ですべての測定において観察された（図２０Ｄ）。免疫応答は、予想されたプロファイルを示し、ピーク免疫応答がプライム免疫化の約２～３週後に測定され、４週後に免疫応答が退縮した。ＰＢＭＣ１０^{6}個当たり１８１３ＳＦＣ（６つのエピトープの合計）の複合的な抗原特異的免疫応答が、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーによる最初の免疫化の５週後に測定された（すなわち、ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡによる最初のブーストの１週後）。ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡによる最初のブーストの１週後（５週目）に測定された免疫応答は、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーによるプライム免疫化（３週目）について測定されたピーク免疫応答と同等であった（図２０Ｄ）。ＰＢＭＣ１０^{6}個当たり１２４９ＳＦＣ（６つのエピトープの合計）の複合的な抗原特異的免疫応答がそれぞれ、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーによる最初の免疫化の９週後に測定された（すなわち、ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡによる２度目のブーストの１週後）。ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡによる２度目のブーストの１週後（９週目）に測定された免疫応答は、ブースト免疫化の直前に測定された免疫応答よりも約２倍高かった（図２０Ｄ）。

【表２２】

表２２：ＶＥＥ－MAG２５マー　ｓｒＲＮＡ－ＬＮＰ１（３０μｇ）（グループ１）についての各エピトープに対するＰＭＢＣ１０^{6}個当たりの平均スポット形成細胞（ＳＦＣ）±ＳＥＭ

週	抗原					
	Env CL9	Env TL9	Gag CM9	Gag LW9	Pol SV9	Tat TL8
1	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
2	39.7±22.7	35.4±25.1	3.2±3.6	33±28.1	30.9±20.3	28.3±17.5
3	2±2.4	0.2±1.8	1.8±2.4	3.7±1.9	1.7±2.8	4.9±2.3
4	1±1.8	0.3±1.2	5.5±3.6	2.3±2.2	5.7±2.7	0.8±0.8
5	0.5±0.9	1.4±3.8	3.1±1.6	2.3±2.7	1.9±2	1.4±1.2
6	1.9±1.8	-0.3±3	1.7±1.2	1.4±1.4	0.8±1.1	1.1±1
8	-0.4±0.8	-0.9±2.9	0.5±1.3	3±1.1	2.2±2.1	3.7±2
9	1±1.7	1.2±4.2	7.2±3.9	0.5±0.7	1.6±3	3±1
10	3.8±1.8	11±5	-1.1±1.1	1.9±0.9	1.3±1.6	0.2±0.5

【表２３】

表２３：ＶＥＥ－MAG２５マー　ｓｒＲＮＡ－ＬＮＰ１（１００μｇ）（グループ２）についての各エピトープに対するＰＭＢＣ１０^{6}個当たりの平均スポット形成細胞（ＳＦＣ）±ＳＥＭ

週	抗原					
	Env CL9	Env TL9	Gag CM9	Gag LW9	Pol SV9	Tat TL8
1	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
2	7.9±17.2	23.2±17.4	11.4±4.9	41.7±16.5	15±13.5	8.9±6.2
3	-3.1±4.6	-7.2±6.5	2.3±2.3	-0.3±2.7	2.7±5.1	2.2±1.4
4	1.9±3.8	-6.2±7.6	10.5±4.1	1.2±2.9	5.6±4.9	1.1±0.8
5	-2.6±7	-8±5.9	1.5±1.7	6.4±2.3	0.7±4.3	3.3±1.3
6	6.3±6.3	4.4±8.3	6.6±4.4	5.2±5.2	3.9±5	10.8±6.9
8	-3.6±7.2	-6.8±7.3	-0.8±1.2	3.4±4.2	6.4±7.5	5.7±2.7
9	8.1±2.4	20.6±23.4	18.9±5.7	8.1±8.9	9±11.2	40±17.6
10	3.1±8	-3.9±8.5	3.3±1.8	0.6±2.9	7.4±6.4	6.1±2.5

【表２４】

表２４：ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡ－ＬＮＰ２（１００μｇ）（グループ３）についての各エピトープに対するＰＭＢＣ１０^{6}個当たりの平均スポット形成細胞（ＳＦＣ）±ＳＥＭ

週	抗原					
	Env CL9	Env TL9	Gag CM9	Gag LW9	Pol SV9	Tat TL8
1	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
2	-5.9±3.8	-0.3±0.5	-0.5±1.5	-5.7±6.1	-1±1.3	-3.2±5.5
3	0.7±5.2	3.4±2.4	4.2±4.6	18.3±15.5	11.9±5.1	-0.4±8.2
4	-3.8±5.5	2.3±1.8	11.3±6.1	-3.1±5.6	8.5±4	-1.5±6.1
5	-3.7±5.7	-0.1±0.7	-0.2±1.6	3.4±8.5	3±3.1	-4.6±5
6	12.3±15	7.8±4.9	24.7±19.8	23.2±22.5	18.7±15.8	0.5±6.2
8	5.9±12.3	-0.1±0.7	-0.5±1.3	8.8±14.4	8.7±8	-1.3±4
9	16.1±13.4	16.5±4	22.9±4.2	13±13.2	16.4±7.8	19.6±9.2
10	29.9±21.8	22±19.5	0.5±2.6	22.2±22.6	35.3±15.8	19.4±17.3

【表２５】

表２５：ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー　プライムについての各エピトープに対するＰＭＢＣ１０^{6}個当たりの平均スポット形成細胞（ＳＦＣ）±ＳＥＭ

週	抗原					
	Env CL9	Env TL9	Gag CM9	Gag LW9	Pol SV9	Tat TL8
1	178±68.7	206.5±94.8	221.2±120	15.4±16.7	33.3±25.9	563.5±174.4
2	311.2±165.5	278.8±100.9	344.6±110.8	46.3±13.5	181.6±76.8	621.4±220.9
3	277.3±101.1	359.6±90.5	468.2±106.6	41.7±11.1	169.8±57.8	549.4±115.7
4	140±46.5	169.6±46.8	239.4±37	26.5±11.4	75±31.6	322.2±50.7
5	155.6±62.1	406.7±96.4	542.7±143.3	35.1±16.6	134.2±53.7	538.5±91.9
6	78.9±42.5	95.5±29.4	220.9±75.3	-1.4±5.3	43.4±19.6	308.1±42.6
8	88.4±30.4	162.1±30.3	253.4±78.6	21.4±11.2	53.7±22.3	217.8±45.2
9	158.5±69	322.3±87.2	338.2±137.1	5.6±12.4	109.2±17.9	314.8±43.4
10	97.3±32.5	133.2±27	154.9±59.2	10±6	26±16.7	125.5±27.7

【０４６５】

結果

Ｍａｍｕ－Ａ＊０１インドアカゲザルを、ＣｈＡｄＶ６８．５－ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーで免疫化した。６種類の異なるＭａｍｕ－Ａ＊０１制限エピトープに対する末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）中の抗原特異的細胞性免疫応答を、免疫化の前、及び初期免疫化の４、５、６、７、８、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３及び２４週後に測定した（図２１及び表２７）。動物に、４、１２、及び２０週目にＬＮＰ２製剤を用いてＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡによる免疫化を行った。最初のＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーによる初期免疫化の４、５、６、７、８、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３または２４週後に、ＰＢＭＣ１０^{6}個当たり１７５０、４２２５、１１００、２５２９、３２１８、１９１５、１７０８、１５６１、５０７７、４５４３、

４９２０、５８２０、３３９５、２７２８、１９９６、１４６５、４７３０、２９８４、２８２８、または３０４３ＳＦＣ（６つのエピトープの合計）の複合的な抗原特異的免疫応答が観察された（図２１）。ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡによる２度目のブースト免疫化の１週後（１３週目）に測定された免疫応答は、ブースト免疫化の直前（１２週目）に測定された免疫応答よりも約３倍高かった。ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡによる３度目のブースト免疫化の１週後（２１週目）に測定された免疫応答は、２度目のブーストで観察された応答と同様、ブースト免疫化の直前（２０週目）に測定された免疫応答よりも約３倍高かった。

【０４６６】

Ｍａｍｕ－Ａ＊０１インドアカゲザルを、さらに、２種類の異なるＬＮＰ製剤（ＬＮＰ１及びＬＮＰ２）を用いてＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡで免疫化した。６種類の異なるＭａｍｕ－Ａ＊０１制限エピトープに対する末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）中の抗原特異的細胞性免疫応答を、免疫化の前、及び初期免疫化の４、５、６、７、８、１０、１１、１２、１３、１４、または１５週後に測定した（図２２及び２３、表２８及び２９）。動物に、４及び１２週目にＬＮＰ１またはＬＮＰ２製剤を用いてＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡによる免疫化を行った。複合的な抗原特異的免疫応答が、ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡ－ＬＮＰ２による免疫化の４、５、７、８、１０、１１、１３、１４、１５週後にそれぞれ、ＰＢＭＣ10^6個当たり１６８、２０４、１０３、１２６、１４０、１４５、３３０、２０３、及び１６２ＳＦＣ（６つのエピトープの合計）ですべての測定において観察された（図２２）。ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡ－ＬＮＰ１による免疫化の４、５、７、８、１０、１１、１２、１３、１４、１５週後に、ＰＢＭＣ10^6個当たり１８９、１８５、３４９、４３７、４９２、５７０、２３３、８８６、３６９、及び３８１ＳＦＣ（６つのエピトープの合計）の複合的な抗原特異的免疫応答が観察された（図２３）。

【表２７】

表２７：ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー（グループ１）によるプライミングワクチン接種における各エピトープに対するＰＭＢＣ１０^{6}個当たりの平均スポット形成細胞（ＳＦＣ）±ＳＥＭ

週	抗原					
	Env CL9	Env TL9	Gag CM9	Gag LW9	Pol SV9	Tat TL8
4	173±41.6	373.5±87.3	461.4±74.2	38.4±26.1	94.5±26	609.2±121.9
5	412.7±138.4	987.8±283.3	1064.4±266.9	85.6±31.2	367.2±135.2	1306.8±332.8
6	116.2±41.2	231.1±46.3	268.3±90.7	86.1±42	174.3±61	223.9±38.1
7	287.4±148.7	588.9±173.9	693.2±224.8	92.1±33.5	172.9±55.6	694.6±194.8
8	325.4±126.6	735.8±212	948.9±274.5	211.3±62.7	179.1±50	817.3±185.2
10	312±129.7	543.2±188.4	618.6±221.7	-5.7±4.1	136.5±51.3	309.9±85.6
11	248.5±81.1	348.7±129.8	581.1±205.5	-3.1±4.4	119±51.2	413.7±144.8
12	261.9±68.2	329.9±83	486.5±118.6	-1.2±5.1	132.8±31.8	350.9±69.3
13	389.3±167.7	1615.8±418.3	1244.3±403.6	1.3±8.1	522.5±155	1303.3±385.6
14	406.3±121.6	1616±491.7	1142.3±247.2	6.6±11.1	322.7±94.1	1048.6±215.6
15	446.8±138.7	1700.8±469.1	1306.3±294.4	43±24.5	421.2±87.9	1001.5±236.4
16	686.8±268.8	1979.5±541.7	1616.8±411.8	2.4±7.8	381.9±116.4	1152.8±352.7
17	375.8±109.3	1378.6±561.2	773.1±210.3	-1.4±4.3	177.6±93.7	691.7±245
18	255.9±99.7	1538.4±498.1	498.7±152.3	-5.3±3.3	26.2±13.4	413.9±164.8
19	133±62.6	955.9±456.8	491.1±121.8	-5.7±4.1	50.3±25.4	371.2±123.7
20	163.7±55.8	641.7±313.5	357.9±91.1	2.6±7.5	41.4±24.2	257.8±68.9
21	319.9±160.5	2017.1±419.9	1204.8±335.2	-3.7±5.1	268.1±109.6	924.1±301
22	244.7±105.6	1370.9±563.5	780.3±390	-3.6±5.1	118.2±68.1	473.3±249.3
23	176.7±81.8	1263.7±527.3	838.6±367.9	-5.7±4.1	73.6±49	480.9±163.9
24	236.5±92	1324.7±589.3	879.7±321	-0.4±5.7	104±53.1	498±135.8

【表２８】

表２８：ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡ－ＬＮＰ２（３００μｇ）（グループ２）によるプライミングワクチン接種における各エピトープに対するＰＭＢＣ１０^{6}個当たりの平均スポット形成細胞（ＳＦＣ）±ＳＥＭ

週	抗原					
	Env CL9	Env TL9	Gag CM9	Gag LW9	Pol SV9	Tat TL8
4	46±27.1	18.4±6.8	58.3±45.8	29.9±20.8	4.9±2.3	10.7±4
5	85.4±54	5.2±5.8	52.4±51.2	34.5±35	11.8±12.2	14.4±7.9
7	18.6±32.5	1.9±1.7	59.4±55.7	9.3±10.7	3.3±3	10.7±6.1
8	36.6±39.4	6.3±3.9	48.7±39.9	13.5±8.8	3.8±3.6	17.2±9.7
10	69.1±59.1	4.4±1.9	39.3±38	14.7±10.8	4.4±5.3	8.5±5.3
11	43±38.8	22.6±21.1	30.2±26.2	3.3±2.2	5.8±3.5	40.3±25.5
13	120.4±78.3	68.2±43.9	54.2±36.8	21.8±7.4	17.7±6.1	47.4±27.3
14	76±44.8	28±19.5	65.9±64.3	-0.3±1.3	2.5±2	31.1±26.5
15	58.9±41.4	19.5±15.1	55.4±51	2.5±2	5.5±3.6	20.1±15.7

【表２９】

表２９：ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡ－ＬＮＰ１（３００μｇ）（グループ３）によるプライミングワクチン接種における各エピトープに対するＰＭＢＣ１０^{6}個当たりの平均スポット形成細胞（ＳＦＣ）±ＳＥＭ

週	抗原					
	Env CL9	Env TL9	Gag CM9	Gag LW9	Pol SV9	Tat TL8
4	19.5±8.7	13.3±13.1	16.5±15.3	10.5±7.3	35.9±24.8	92.9±91.6
5	87.9±43.9	12.7±11.7	37.2±31.9	21.1±23.8	13.2±13.7	12.6±13.7
7	21.1±13.3	48.8±48.4	51.7±39.5	9.1±10.5	58.6±55.8	159.4±159
8	47.7±21.7	66.4±52.2	59.8±57.4	49.4±28	79.4±63	133.8±132.1
10	49±30.2	42.2±41.1	139.3±139.3	51.6±51.2	78.2±75.8	131.7±131.6
11	42±26.8	20.9±21.4	177.1±162	-6.3±4.3	104.3±104.1	231.5±230.1
12	40.2±19	20.3±11.9	42.2±46.7	3.7±6.7	57±44.7	70±69.2
13	81.2±48.9	38.2±37.6	259.4±222.2	-4±4.1	164.1±159.3	347.3±343.5
14	34.5±31.8	5.3±11.6	138.6±137.3	-4.7±5.2	52.3±52.9	142.6±142.6
15	49±24	6.7±9.8	167.1±163.8	-6.4±4.2	47.8±42.3	116.6±114.5

【０４６７】

ｓｒＲＮＡの用量範囲実験

本発明の一実現形態では、ｓｒＲＮＡの用量範囲実験を、ＭａｍｕＡ０１インドアカゲザルで実施することによって、どのｓｒＲＮＡ用量をＮＨＰ免疫原性実験に進めるべきかを特定することができる。１つの例では、ＭａｍｕＡ０１インドアカゲザルに、複数のＭａｍｕＡ０１制限エピトープを含むモデル抗原をコードしたｓｒＲＮＡベクターを筋肉内注射により投与することができる。別の例では、抗ＣＴＬＡ－４モノクローナル抗体を、筋肉内ワクチン注射の部位の近位に皮下投与することで１つの動物群でワクチン流入領域のリンパ節をターゲティングすることができる。最初の免疫化後、２週間ごとにＰＢＭＣ

を採取して免疫モニタリングを行うことができる。各実験アームを下記に記載する（表３０）。

【表３０】

表３０：インドアカゲザルにおける非ＧＬＰ　ＲＮＡ用量範囲実験

グループ	プライム	ブースト1	ブースト2
1	srRNA-LNP(低用量)	srRNA-LNP(低用量)	srRNA-LNP (低用量)
2	srRNA-LNP(中用量)	srRNA-LNP(中用量)	srRNA-LNP (中用量)
3	srRNA-LNP(高用量)	srRNA-LNP(高用量)	srRNA-LNP (高用量)
4	srRNA-LNP(高用量)+ 抗CTLA-4	srRNA-LNP(高用量)+ 抗CTLA-4	srRNA-LNP (高用量)+ 抗CTLA-4

*ｓｒＲＮＡの用量範囲は３００μｇ以下の高用量で決定される。

【０４６８】

インドアカゲザルにおける免疫原性の実験

抗原ベクターを用いて免疫原性を実証するため、ＭａｍｕＡ０１のインドアカゲザル（ＮＨＰ）でワクチン実験を行った。図３４は、ワクチン接種の手法を示す。ＮＨＰの３つのグループを、チェックポイント阻害剤として抗ＣＴＬＡ－４抗体であるイピリムマブ（グループ５及び６）とともに、またはチェックポイント阻害剤なし（グループ４）で、ＣｈＡｄＶ６８．５－ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーで免疫した。抗体は、静脈内（グループ５）または皮下（グループ６）投与した。三角は、０週目及び３２週目におけるＣｈＡｄＶ６８によるワクチン接種（１ｅ１２ｖｐ／動物）を示す。丸は、０、４、１２、２０、２８、及び３２週目におけるアルファウイルスワクチン接種を示す。

【０４６９】

免疫したＮＨＰにおけるＣＤ８＋抗エピトープ応答の時間的経過を、ＣｈＡｄＶ－ＭＡＧによる免疫単独（図３５及び表３１Ａ）、ＣｈＡｄＶ－ＭＡＧによる免疫とチェックポイント阻害剤の静脈内（ＩＶ）投与（図３６及び表３１Ｂ）、及びＣｈＡｄＶ－ＭＡＧによる免疫とチェックポイント阻害剤の皮下（ＳＣ）投与（図３７及び表３１Ｃ）について示す。これらの結果は、ＣｈＡｄＶ６８ベクターが霊長類においてＣＤ８＋応答を効率的にプライミングし、アルファウイルスベクターがＣｈＡｄＶ６８ワクチンのプライミング応答を効率的にブーストし、チェックポイント阻害剤は静脈内または皮下投与のいずれでもプライミング及びブースト応答の両方を増幅し、ワクチン接種後のＣｈＡｄＶ６８ベクターの再投与が免疫応答を効果的にブーストしたことを示している。

【表３１Ａ】

表３１Ａ：ＣｈＡｄＶ－ＭＡＧを投与したアカゲザル（グループ４）におけるＣＤ８＋抗エピトープ応答。平均ＳＦＣ／１ｅ６脾細胞＋／－標準誤差を示す。

週	抗原					
	Env CL9	Env TL9	Gag CM9	Gag LW9	Pol SV9	Tat TL8
4	173±41.6	373.5±87.3	461.4±74.2	38.4±26.1	94.5±26	609.2±121.9
5	412.7±138.4	987.8±283.3	1064.4±266.9	85.6±31.2	367.2±135.2	1306.8±332.8
6	116.2±41.2	231.1±46.3	268.3±90.7	86.1±42	174.3±61	223.9±38.1
7	287.4±148.7	588.9±173.9	693.2±224.8	92.1±33.5	172.9±55.6	694.6±194.8
8	325.4±126.6	735.8±212	948.9±274.5	211.3±62.7	179.1±50	817.3±185.2
10	312±129.7	543.2±188.4	618.6±221.7	-5.7±4.1	136.5±51.3	309.9±85.6
11	248.5±81.1	348.7±129.8	581.1±205.5	-3.1±4.4	119±51.2	413.7±144.8
12	261.9±68.2	329.9±83	486.5±118.6	-1.2±5.1	132.8±31.8	350.9±69.3
13	389.3±167.7	1615.8±418.3	1244.3±403.6	1.3±8.1	522.5±155	1303.3±385.6
14	406.3±121.6	1616±491.7	1142.3±247.2	6.6±11.1	322.7±94.1	1048.6±215.6
15	446.8±138.7	1700.8±469.1	1306.3±294.4	43±24.5	421.2±87.9	1001.5±236.4
16	686.8±268.8	1979.5±541.7	1616.8±411.8	2.4±7.8	381.9±116.4	1152.8±352.7
17	375.8±109.3	1378.6±561.2	773.1±210.3	-1.4±4.3	177.6±93.7	691.7±245
18	255.9±99.7	1538.4±498.1	498.7±152.3	-5.3±3.3	26.2±13.4	413.9±164.8
19	133±62.6	955.9±456.8	491.1±121.8	-5.7±4.1	50.3±25.4	371.2±123.7
20	163.7±55.8	641.7±313.5	357.9±91.1	2.6±7.5	41.4±24.2	257.8±68.9
21	319.9±160.5	2017.1±419.9	1204.8±335.2	-3.7±5.1	268.1±109.6	924.1±301
22	244.7±105.6	1370.9±563.5	780.3±390	-3.6±5.1	118.2±68.1	473.3±249.3
23	176.7±81.8	1263.7±527.3	838.6±367.9	-5.7±4.1	73.6±49	480.9±163.9
24	236.5±92	1324.7±589.3	879.7±321	-0.4±5.7	104±53.1	498±135.8
25	136.4±52.6	1207.1±501.6	924±358.5	6.2±10.5	74.1±34.4	484.6±116.7
26	278.2±114.4	1645±661.7	1170.2±469.9	-2.9±5.7	80.6±55.8	784.4±214.1
27	159±56.8	961.7±547.1	783.6±366.4	-5±4.3	63.6±27.5	402.9±123.4
28	189.6±75.7	1073.1±508.8	668.3±312.5	-5.7±4.1	80.3±38.3	386.4±122
29	155.3±69.1	1102.9±606.1	632.9±235	34.5±24.2	80±35.5	422.5±122.9
30	160.2±59.9	859±440.9	455±209.1	-3±5.3	60.5±28.4	302.7±123.2
31	122.2±49.7	771.1±392.7	582.2±233.5	-5.7±4.1	55.1±27.3	295.2±68.3
32	119.3±28.3	619.4±189.7	566±222.1	-3.7±5.1	21.9±4.5	320.5±76.4
33	380.5±122	1636.1±391.4	1056.2±205.7	-5.7±4.1	154.5±38.5	988.4±287.7
34	1410.8±505.4	972.4±301.5	319.6±89.6	-4.8±4.2	141.1±49.8	1375.5±296.7
37	130.8±29.2	500±156.9	424.9±148.9	-3.5±4.7	77.7±24.6	207.1±42.4
38	167.7±54.8	1390.8±504.7	830.4±329.1	-5.5±4.1	111.8±43.2	516±121.7

【表３１Ｂ】

表３１Ｂ：ＣｈＡｄＶ－ＭＡＧ及びＩＶ投与による抗ＣＴＬＡ４抗体（イピリムマブ）を投与したアカゲザル（グループ５）におけるＣＤ８＋抗エピトープ応答。平均ＳＦＣ／１ｅ６脾細胞＋／－標準誤差を示す。

週	抗原					
	Env CL9	Env TL9	Gag CM9	Gag LW9	Pol SV9	Tat TL8
4	1848.1±432.2	1295.7±479.7	1709.8±416.9	513.7±219.8	838.5±221.1	2514.6±246.5
5	1844.1±410.2	2367.5±334.4	1983.1±370.7	732.1±249.4	1429.7±275.3	2517.7±286.5
6	822.4±216.7	1131.2±194.7	796.8±185.8	226.8±70	802.2±101.4	913.5±222.7
7	1147.2±332.9	1066±311.2	1149.8±467.3	267.4±162.6	621.5±283.2	1552.2±395.1
8	1192.7±188.8	1461.5±237.7	1566.9±310.5	522.5±118.6	662.3±142.4	1706±216.7
10	1249±220.3	1170.6±227.7	1297.3±264.7	-0.3±4.4	551.8±90.5	1425.3±142.6
11	934.2±221.7	808±191.3	1003.1±293.4	1.9±4.3	364.2±76.6	1270.8±191.6
12	1106.2±216.6	896.7±190.7	1020.1±243.3	1.3±3.9	436.6±90	1222±155.4
13	2023.8±556.3	3696.7±1.7	2248.5±436.4	-4.5±3.5	2614±406.1	3700±0
14	1278.7±240	2639.5±387	1654.6±381.1	-6±2.1	988.8±197.9	2288.3±298.7
15	1458.9±281.8	2932.5±488.7	1893.4±499	74.6±15.6	1657.8±508.9	2709.1±428.7
16	1556.8±243	2143.8±295.2	2082.8±234.2	-5.8±2.5	1014.6±161.4	2063.7±86.7
17	1527±495.1	2213±677.1	1767.7±391.8	15.1±5.9	633.8±133.9	2890.8±433.9
18	1068.2±279.9	1940.9±204.1	1114.1±216.1	-5.8±2.5	396.6±77.6	1659.4±171.7
19	760.7±362.2	1099.5±438.4	802.7±192.5	-2.4±3.3	262.2±62.2	1118.6±224.2
20	696.3±138.2	954.9±198	765.1±248.4	-1.4±4.4	279.6±89.3	1139±204.5
21	1201.4±327.9	3096±1.9	1901±412.1	-5.8±2.5	1676.3±311.5	2809.3±195.8
22	1442.5±508.3	2944.7±438.6	1528.4±349.6	2.8±5.1	940.7±160.5	2306.3±218.6
23	1400.4±502.2	2757.1±452.9	1604.2±450.1	-5.1±2.3	708.1±162.6	2100.4±362.9
24	1351±585.1	2264.5±496	1080.6±253.8	0.3±6.5	444.2±126.4	1823.7±306.5
25	1211.5±505.2	2160.4±581.8	970.8±235.9	2.5±3.8	450.4±126.9	1626.2±261.3
26	1443±492.5	2485±588	1252.5±326.4	-0.2±6	360.2±92.3	2081.9±331.1
27	896.2±413.3	1686±559.5	751±192.1	-3.7±2.5	247.4±82.8	1364.1±232
28	1147.8±456.9	1912.1±417.1	930.3±211.4	-5.8±2.5	423.9±79.6	1649.3±315
29	1038.5±431.9	1915.2±626.1	786.8±205.9	23.5±8.3	462.8±64	1441.5±249.7
30	730.5±259.3	1078.6±211.5	699.1±156.2	-4.4±2.7	234.4±43.9	1160.6±112.6
31	750.4±328.3	1431±549.9	650.6±141.1	-5.2±3	243.4±56.4	868.9±142.8
32	581.4±227.7	1326.6±505.2	573.3±138	-3.2±4.2	160.8±49.2	936.4±110.4
33	2198.4±403.8	3093.4±123.3	2391.8±378.4	7.1±8.5	1598.1±343.1	2827.5±289.5
34	2654.3±337	2709.9±204.3	1297.5±291.4	0.4±4.2	1091.8±242.9	1924±245.7
37	846.8±301.7	1706.9±196	973.6±149.3	50.5±45.2	777.3±140.2	1478.8±94.3

【表３１Ｃ】

表３１Ｃ：ｃｈＡｄ－MAG及びＳＣ投与により抗ＣＴＬＡ４抗体（イピリムマブ）を投与したアカゲザル（グループ６）におけるＣＤ８＋抗エピトープ応答。平均ＳＦＣ／１ｅ６脾細胞＋／－標準誤差を示す。

週	抗原					
	Env CL9	Env TL9	Gag CM9	Gag LW9	Pol SV9	Tat TL8
4	598.3±157.4	923.7±306.8	1075.6±171.8	180.5±74.1	752.3±245.8	1955.3±444.4
5	842.2±188.5	1703.7±514.2	1595.8±348.4	352.7±92.3	1598.9±416.8	2163.7±522.1
6	396.4±45.3	728.3±232.7	503.8±151.9	282±69	463.1±135.7	555.2±191.5
7	584.2±177	838.3±254.9	1013.9±349.4	173.6±64.3	507.4±165.7	1222.8±368
8	642.9±134	1128.6±240.6	1259.1±163.8	366.1±72.8	726.7±220.9	1695.6±359.4
10	660.4±211.4	746.9±222.7	944.8±210.2	-1.2±1.9	523.4±230.7	787.3±308.3
11	571.2±162	609.4±194.3	937.9±186.5	-8.9±2.3	511.6±229.6	1033.3±315.7
12	485.3±123.7	489.4±142.7	919.3±214.1	-8.9±2.3	341.6±139.4	1394.7±432.1
13	986.9±154.5	2811.9±411.3	1687.7±344.3	-4.1±5.1	1368.5±294.2	2751±501.9
14	945.9±251.4	2027.7±492.8	1386.7±326.7	-5.7±2.8	708.9±277.1	1588.2±440.1
15	1075.2±322.4	2386±580.7	1606.3±368.1	-5.4±3.2	763.3±248.8	1896.5±507.8
16	1171.8±341.6	2255.1±439.6	1672.2±342.3	-7.8±2.4	1031.6±228.8	1896.4±419.9
17	1118.2±415.4	2156.3±476	1345.3±377.7	-1.1±6.7	573.7±118.8	1614.4±382.3
18	861.3±313.8	2668.2±366.8	1157.2±259.6	-8.9±2.3	481.2±164	1725.8±511.4
19	719.2±294.2	1447.2±285	968±294.5	-2.2±4.6	395.6±106.1	1199.6±289.2
20	651.6±184	1189.8±242.8	947.4±249.8	-8.9±2.3	355±106.3	1234.7±361.7
21	810.3±301.9	2576.2±283.7	1334±363.1	-8.9±2.3	892.2±305	1904.4±448.1
22	775±196.4	2949±409.7	1421.8±309.7	38±27.8	577±144.2	2330.6±572.3
23	584.9±240.2	1977.9±361.4	1209.8±405.1	-7.3±3.2	273.7±93.3	1430.6±363.9
24	485.4±194.4	1819.8±325.5	837.2±261.4	-3.4±4.1	234.4±71.1	943.9±243.3
25	452.3±175	2072±405.7	957.1±293.1	-8.9±2.3	163±43.2	1341.2±394.7
26	517.9±179.1	2616±567.5	1126.6±289	-8.3±2.3	199.9±89.2	1615.7±385.6
27	592.8±171.7	1838.3±372.4	749.3±170.4	-7.3±2.5	325.5±98.7	1110.7±308.8
28	793±228.5	1795.4±332.3	1068.7±210.3	2.5±4.1	553.1±144.3	1480.8±357.1
29	661.8±199.9	2140.6±599.3	1202.7±292.2	-8.7±2.8	558.9±279.2	1424.2±408.6
30	529.1±163.3	1528.2±249.8	840.5±218.3	-8.9±2.3	357.7±149.4	1029.3±335
31	464.8±152.9	1332.2±322.7	726.3±194.3	-8.9±2.3	354.3±158.6	884.4±282
32	612.9±175.3	1584.2±390.2	1058.3±219.8	-8.7±2.8	364.6±149.8	1388.8±467.3
33	1600.2±416.7	2597.4±367.9	2086.4±414.8	-6.3±3.3	893.8±266	2490.6±416.4
34	2814.6±376.2	2713.6±380.8	1888.8±499.4	-7.5±3.1	1288.9±438.9	2428.1±458.9
37	1245.9±471.7	1877.7±291.2	1606.6±441.9	14.2±13	1227.5±348.1	1260.7±342

【０４７０】

インドアカゲザルにおけるメモリー表現型の判定

アカゲザルを、抗ＣＴＬＡ４と、または抗ＣＴＬＡ４なしで、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー／ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーのｓｒＲＮＡ異種プライミング／ブーストレジメンで免疫してから、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーで再びブーストした。各グループを、最後のｃｈＡｄＶ６８の投与の１１ヶ月後（実験１８ヶ月目）に、記載されるようにＥＬＩＳｐｏｔを行って評価した。図３８及び表３８は、免疫前（左パネル）及び１８ヶ月後（右パネル）にＥＬＩＳｐｏｔにより測定した６種類の異なるＭａｍｕ－Ａ＊０１制限エピトープに対する細胞応答を示す。制限エピトープに対する応答の検出は、ｃｈＡｄＶ６８／ｓａｍＲＮＡワクチンプロトコールによって抗原特異的メモ

リー応答が生じたことを示す。

【０４７１】

メモリーを評価するため、ワクチンにコードされた４種類の異なるアカゲザルＭａｍｕ－Ａ＊０１クラスＩエピトープを認識するＣＤ８＋Ｔ細胞を、各抗原が固有のダブルポジティブの組み合わせによって示されることで、単一の試料中の４つの抗原特異的集団のすべてを特定することができる、２色Ｍａｍｕ－Ａ＊０１テトラマー標識を用いて観測した。メモリー細胞の表現型判定を、細胞表面マーカーＣＤ４５ＲＡ及びＣＣＲ７で共染色することにより行った。図３９及び表３９は、４種類の異なるＭａｍｕ－Ａ＊０１制限エピトープを認識するメモリーＴ細胞についてコンビナトリアルテトラマー染色及びＣＤ４５ＲＡ／ＣＣＲ７共染色の結果を示す。Ｔ細胞表現型をフローサイトメトリーによっても評価した。図４０は、実験１８ヶ月目における４種類のＭａｍｕ－Ａ＊０１テトラマー＋ＣＤ８＋Ｔ細胞集団の総和中のメモリー細胞タイプの分布を示す。メモリー細胞は以下のようにキャラクタライズした。ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＣＲ７＋＝ナイーブ、ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＣＲ７－＝エフェクター（Ｔｅｆｆ）、ＣＤ４５ＲＡ－ＣＣＲ７＋＝セントラルメモリー（Ｔｃｍ）、ＣＤ４５ＲＡ－ＣＣＲ７－＝エフェクターメモリー（Ｔｅｍ）。まとめると、これらの結果は、最後のブーストの少なくとも１年後にメモリー応答が検出されたことを示し、エフェクター、セントラルメモリー、及びエフェクターメモリーを含む、長期的に持続する免疫を示すものである。

【表３８】

表３８　プライミング前及びメモリー評価の時点（１８ヶ月）における各動物のＰＢＭＣ１０^{6}個当たりの平均のスポット形成細胞（ＳＦＣ）。

動物	プライミング前のベースライン						１８ヶ月					
	Tat TL8	Gag CM9	Env TL9	Env CL9	Gag LW9	Pol SV9	Tat TL8	Gag CM9	Env TL9	Env CL9	Gag LW9	Pol SV9
1	1.7	0.0	0.0	5.0	0.0	13.7	683.0	499.2	1100.3	217.5	47.7	205.3
2	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0	773.4	ND	1500.0	509.3	134.5	242.5
3	0.0	0.0	6.7	6.8	10.2	3.3	746.3	167.5	494.1	402.8	140.6	376.0
4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	47.6	1023.9	85.1	44.2	44.2	47.6
5	15.3	6.7	18.6	15.6	5.2	12.1	842.4	467.7	1500.0	805.9	527.8	201.8
6	3.1	0.0	0.0	15.5	6.9	5.3	224.3	720.3	849.0	296.9	32.4	121.9

ND=技術的排除により測定されず。

【表３９】

表３９　生ＣＤ８＋細胞に占めるＭａｍｕ－Ａ＊０１テトラマー陽性の割合（%）

動物	Tat TL8	Gag CM9	Env TL9	Env CL9
1	0.42	0.11	0.19	0.013
2	0.36	0.048	0.033	0.00834
3	0.97	0.051	0.35	0.048
4	0.46	0.083	0.17	0.028
5	0.77	0.45	0.14	0.2
6	0.71	0.16	0.17	0.04

【０４７２】

インドアカゲザルにおける非ＧＬＰ　ＲＮＡ用量範囲実験（より高い用量）

この実験は、（ａ）同種のプライム／ブーストまたは異種のプライム／ブーストとしての用量３００μｇのＶＥＥ－ＭＡＧ２５マーとＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーとの組み合わせの免疫原性を評価し、（ｂ）用量３００μｇで、ＬＮＰ２に対してＬＮＰ１を使用した脂質ナノ粒子中のＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡの免疫応答を比較し、（ｃ）ＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡ及びＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．Ｍ

ＡＧ２５マーによる免疫化に対するＴ細胞応答の速度論を評価するように設計した。

【０４７３】

この実験アームを、免疫原性を実証するためにＭａｍｕ－Ａ＊０１インドアカゲザルで行った。アカゲザルなどの非ヒト霊長類におけるワクチン免疫原性は、ヒトにおけるワクチン効力の最良の予測因子である。さらに、この実験で使用される選択抗原は、アカゲザル、具体的にはＭａｍｕＡ＊０１　ＭＨＣクラスＩハプロタイプを有するものにおいてのみ認識される。Ｍａｍｕ－Ａ＊０１インドアカゲザルを異なる実験アーム（各グループ６匹のアカゲザル）にランダム化し、複数のＭａｍｕ－Ａ＊０１制限抗原を含むモデル抗原をコードしたＣｈＡｄＶ６８．５－ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マーまたはＶＥＥ－ＭＡＧ２５マー　ｓｒＲＮＡベクターのいずれかを筋肉内注射により両側性に投与した。各実験アームは下記に記載したとおりである。

【０４７４】

グループ１については、免疫化の前及び初期免疫化の４、５、６、７、８、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３または２４週後にＰＢＭＣを採取して免疫モニタリングを行った（異種のプライム／ブースト）。グループ２及び３については、免疫化の前及び初期免疫化の５、７、８、１０、１１、１２、１３、１４、または１５週後にＰＢＭＣを採取して免疫モニタリングを行った（同種のプライム／ブースト）。

【表２６】

表２６：インドアカゲザルにおける非ＧＬＰ免疫原性の実験

群	プライム	ブースト１	ブースト2	ブースト3
1	ChAdV68.5WTnt. MAG25マー	VEE-MAG25マー srRNA-LNP2 (300 μg)	VEE-MAG25マー srRNA-LNP2 (300 μg)	VEE-MAG25マー srRNA-LNP2 (300 μg)
2	VEE-MAG25マー srRNA-LNP2 (300 μg)	VEE-MAG25マー srRNA-LNP2 (300 μg)	VEE-MAG25マー srRNA-LNP2 (300 μg)	
3	VEE-MAG25マー srRNA-LNP1 (300 μg)	VEE-MAG25マー srRNA-LNP1 (300 μg)	VEE-MAG25マー srRNA-LNP1 (300 μg)	

【０４７５】

ＸＩＸ．ＭＨＣ／ペプチド標的反応性Ｔ細胞及びＴＣＲの同定

標的応答性Ｔ細胞及びＴＣＲを、腫瘍関連抗原または感染症関連抗原などの本明細書に記載されるあらゆる抗原を含む、抗原／ＨＬＡペプチドのペアのうちの１つ以上のものについて同定する。

【０４７６】

Ｔ細胞は、患者の血液、リンパ節、または腫瘍から単離することができる。Ｔ細胞は、例えば、抗原－ＭＨＣテトラマー結合細胞を分取することにより、またはＴ細胞と抗原でパルスした抗原提示細胞とのインビトロ共培養物中で刺激した活性化された細胞を分取することにより、抗原特異的Ｔ細胞について濃縮することができる。抗原ロードテトラマー及び他のＭＨＣベースの試薬をはじめとする、抗原特異的Ｔ細胞の同定のためのさまざまな試薬が当該技術分野で知られている。

【０４７７】

抗原関連αβ（またはγδ）ＴＣＲダイマーを、抗原特異的Ｔ細胞のＴＣＲのシングルセルシークエンシングによって同定することができる。また、抗原特異的Ｔ細胞のバルクＴＣＲシークエンシングを行ってもよく、マッチングの確率が高いαβのペアを当該技術分野では周知のＴＣＲペアリング法を用いて決定することができる。

【０４７８】

これに代えるかまたはこれに加えて、健康なドナーから得たナイーブＴ細胞のインビトロプライミングによって抗原特異的Ｔ細胞を得ることもできる。ＰＢＭＣ、リンパ節、または臍帯血から得られたＴ細胞を抗原でパルスした抗原提示細胞によって繰り返し刺激することにより、抗原経験Ｔ細胞の分化を開始させることができる。この後、ＴＣＲを患者からの抗原特異的Ｔ細胞について上記に述べたのと同様にして同定することができる。

【０４７９】

ＸＸ．ＣｈＡｄＶ６８ベクターのＥ４欠失は、改善された生産性を示す

ＣｈＡｄＶ６８アデノウイルスベクターのクローンを、改善されたウイルス生産性について選択した。モデルＴＳＮＡカセットＭＡＧを発現する急速増殖／適合ＣｈＡｄＶ６８ウイルスをプラーク単離中に選択し、下記に述べるように分析した。

【０４８０】

材料及び方法

ＣｈＡｄＶ６８のプラーク単離

ＣｈＡｄＶ６８－ＭＡＧウイルスの段階希釈（１０$^{-2}$～１０$^{-9}$）を行い、１００μＬを、６０ｍＭプレート当たり１ｅ６細胞で播種したＨＥＫ２９３Ａ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒカタログ番号Ｒ７０５０７）細胞上にプレーティングした。感染の２４時間後に培地を除去し、感染細胞を覆うようにＤＭＥＭ／１．２５％アガロースを加え、プラークを１０～１５日間増殖させた。この期間中に７２個のウイルスプラークを拾った。ウイルスを０．５ｍＬのＤＭＥＭ／５％ＦＢＳ培地中で一晩溶出し、溶出液の半分（０．２５ｍＬ）を用いて２４ウェルのウェル当たり１ｅ５細胞で播種した２９３Ａ細胞に再感染させた。ウイルスを２９３Ａ細胞で増幅させ、感染させた。急速に増殖するクローンをウイルス生産用に４００ｍＬの２９３Ｆ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒカタログ番号Ａ１４５２８）浮遊培養中に選択した。ウイルスを２×ＣｓＣｌ勾配精製により精製し、３ラウンドの透析によりＡＲＭバッファー（２５ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍｍ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ８．０、２．５％グリセロール）中に配合した。ウイルス粒子の力価を、５６℃での０．１％ＳＤＳによる溶解後、２６０ｎＭで吸光度を測定することによって決定した。感染力価を抗カプシド免疫染色アッセイを用いて決定した。

【０４８１】

次世代シークエンシング

ＱｉＡｍｐウイルスＤＮＡキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して精製されたウイルスからＤＮＡを精製し、Ｉｌｌｕｍｉｎａプラットフォームを用いたＮＧＳを行った。

【０４８２】

クローン生産性のＭＯＩ評価

精製されたウイルスを０．１ＩＵのＭＯＩで用いて制御された感染を確立し、９６時間インキュベートした。感染単位を細胞ライセート中で測定した。生産量を非プラーク選択ウイルス（プール）と比較した。

【０４８３】

免疫化

Ｂａｌｂ／ｃ系雌性マウスに１００μｌ体積中、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー（配列番号２）またはＣｈＡｄＶ６８－ＭＡＧ－Ｅ４欠失（配列番号５７；「ＭＡＧ Ｅ４Δ」 及び「ＣｈＡｄＶ６８－ＭＡＧ－Ｅ４」）の１×１０^{9}または１×１０^{10}個のウイルス粒子（ＶＰ）を両側筋肉内注射（各脚に５０μＬ）により注射した。

【０４８４】

Ｍａｍｕ－Ａ＊０１インドアカゲザルを、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー（「ＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＶ－ＭＡＧ」；配列番号２；Ｅ４欠失またはＴＥＴ応答エレメントなし）またはＣｈＡｄＶ６８－Ｅ４ｄ－ＣＭＴ－ＭＡＧ（配列番号７１；Ｅ４欠失及びＣＭＴ　ＴＥＴ応答エレメント［下記参照］）の１×１０^{12}個（注射１回当たり、５×１０^{11} 個のウイルス粒子）のウイルス粒子を大腿四頭筋に両側筋肉注射して免疫した。アカゲザルに、注射日に５０ｍｇの抗ＣＴＬＡ４抗体（イピリムマブ）も皮下投与した。

ChAdV68-E4d-CMT-MAG; 配列番号 71

CATCATCAATAATATACCTCAAACTTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTGAATTTGGGGAGGA
AGGGCGGTGATTGGTCGAGGGATGAGCGACCGTTAGGGGCGGGGCGAGTGACGTTTTGATGACGTGGTTG
CGAGGAGGAGCCAGTTTGCAAGTTCTCGTGGGAAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTTGAACACGGAA
ATACTCAATTTTCCCGCGCTCTCTGACAGGAAATGAGGTGTTTCTGGGCGGATGCAAGTGAAAACGGGCCA
TTTTCGCGCGAAAACTGAATGAGGAAGTGAAAATCTGAGTAATTTCGCGTTTATGGCAGGGAGGAGTATTT
GCCGAGGGCCGAGTAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTACCGTGTTTTTCACCTAAATTTCCGC
GTACGGTGTCAAAGTCCGGTGTTTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGCCAGGGTATTTAAACCTGCGCTCTCC
AGTCAAGAGGCCACTCTTGAGTGCCAGCGAGAAGAGTTTTCTCCTCCGCGCCGCGAGTCAGATCTACACTT
TGAAAGTAGGGATAACAGGGTAATGACATTGATTATTGACTAGTTGTTAATAGTAATCAATTACGGGGTCA
TTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCC
AACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTG
ACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTC
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGAC
TTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACC
AATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTT
GTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCG
GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGATCTCCCTATCAGT
GATAGAGATCGTCGACGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAACGCCATCCACGCTGTTTTGAC

CTCCATAGAAGACAGCGATCGCGCCACCATGGCCGGGATGTTCCAGGCACTGTCCGAAGGCTGCACACCCT
ATGATATTAACCAGATGCTGAATGTCCTGGGAGACCACCAGGTCTCTGGCCTGGAGCAGCTGGAGAGCATC
ATCAACTTCGAGAAGCTGACCGAGTGGACAAGCTCCAATGTGATGCCTATCCTGTCCCCACTGACCAAGGG
CATCCTGGGCTTCGTGTTTACCCTGACAGTGCCTTCTGAGCGGGGCCTGTCTTGCATCAGCGAGGCAGACGC
AACCACACCAGAGTCCGCCAATCTGGGCGAGGAGATCCTGTCTCAGCTGTACCTGTGGCCCCGGGTGACAT
ATCACTCCCCTTCTTACGCCTATCACCAGTTCGAGCGGAGAGCCAAGTACAAGAGACACTTCCCAGGCTTT
GGCCAGTCTCTGCTGTTCGGCTACCCCGTGTACGTGTTCGGCGATTGCGTGCAGGGCGACTGGGATGCCATC
CGGTTTAGATACTGCGCACCACCTGGATATGCACTGCTGAGGTGTAACGACACCAATTATTCCGCCCTGCTG
GCAGTGGGCGCCCTGGAGGGCCCTCGCAATCAGGATTGGCTGGGCGTGCCAAGGCAGCTGGTGACACGCA
TGCAGGCCATCCAGAACGCAGGCCTGTGCACCCTGGTGGCAATGCTGGAGGAGACAATCTTCTGGCTGCAG
GCCTTTCTGATGGCCCTGACCGACAGCGGCCCCAAGACAAACATCATCGTGGATTCCCAGTACGTGATGGG
CATCTCCAAGCCTTCTTTCCAGGAGTTTGTGGACTGGGAGAACGTGAGCCCAGAGCTGAATTCCACCGATC
AGCCATTCTGGCAGGCAGGAATCCTGGCAAGGAACCTGGTGCCTATGGTGGCCACAGTGCAGGGCCAGAA
TCTGAAGTACCAGGGCCAGAGCCTGGTCATCAGCGCCTCCATCATCGTGTTTAACCTGCTGGAGCTGGAGG
GCGACTATCGGGACGATGGCAACGTGTGGGTGCACACCCCACTGAGCCCCAGAACACTGAACGCCTGGGT
GAAGGCCGTGGAGGAGAAGAAGGGCATCCCAGTGCACCTGGAGCTGGCCTCCATGACCAATATGGAGCTG
ATGTCTAGCATCGTGCACCAGCAGGTGAGGACATACGGACCCGTGTTCATGTGCCTGGGAGGCCTGCTGAC
CATGGTGGCAGGAGCCGTGTGGCTGACAGTGCGGGTGCTGGAGCTGTTCAGAGCCGCCCAGCTGGCCAAC
GATGTGGTGCTGCAGATCATGGAGCTGTGCGGAGCAGCCTTTCGCCAGGTGTGCCACACCACAGTGCCATG
GCCCAATGCCTCCCTGACCCCCAAGTGGAACAATGAGACAACACAGCCTCAGATCGCCAACTGTAGCGTGT
ACGACTTCTTCGTGTGGCTGCACTACTATAGCGTGAGGGATACCCTGTGGCCCCGCGTGACATACCACATG
AATAAGTACGCCTATCACATGCTGGAGAGGCGCGCCAAGTATAAGAGAGGCCCTGGCCCAGGCGCAAAGT
TTGTGGCAGCATGGACCCTGAAGGCCGCCGCCGGCCCCGGCCCCGGCCAGTATATCAAGGCTAACAGTAAG
TTCATTGGAATCACAGAGCTGGGACCCGGACCTGGATAATGAGTTTAAACTCCCATTTAAATGTGAGGGTT
AATGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAA
AAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTT
AACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTA
AAACCTCTACAAATGTGGTAAAATAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAGTGAGTAGTGTTCTGGGGCGGG
GGAGGACCTGCATGAGGGCCAGAATAACTGAAATCTGTGCTTTTCTGTGTGTTGCAGCAGCATGAGCGGAA
GCGGCTCCTTTGAGGGAGGGGTATTCAGCCCTTATCTGACGGGGCGTCTCCCCTCCTGGGCGGGAGTGCGT
CAGAATGTGATGGGATCCACGGTGGACGGCCGGCCCGTGCAGCCCGCGAACTCTTCAACCCTGACCTATGC
AACCCTGAGCTCTTCGTCGTTGGACGCAGCTGCCGCCGCAGCTGCTGCATCTGCCGCCAGCGCCGTGCGCG
GAATGGCCATGGGCGCCGGCTACTACGGCACTCTGGTGGCCAACTCGAGTTCCACCAATAATCCCGCCAGC
CTGAACGAGGAGAAGCTGTTGCTGCTGATGGCCCAGCTCGAGGCCTTGACCCAGCGCCTGGGCGAGCTGAC
CCAGCAGGTGGCTCAGCTGCAGGAGCAGACGCGGGCCGCGGTTGCCACGGTGAAATCCAAATAAAAAATG
AATCAATAAATAAACGGAGACGGTTGTTGATTTTAACACAGAGTCTGAATCTTTATTTGATTTTTCGCGCGC
GGTAGGCCCTGGACCACCGGTCTCGATCATTGAGCACCCGGTGGATCTTTTCCAGGACCCGGTAGAGGTGG
GCTTGGATGTTGAGGTACATGGGCATGAGCCCGTCCCGGGGGTGGAGGTAGCTCCATTGCAGGGCCTCGTG
CTCGGGGGGTGGTGTTGTAAATCACCCAGTCATAGCAGGGGCGCAGGGCATGGTGTTGCACAATATCTTTGA
GGAGGAGACTGATGGCCACGGGCAGCCCTTTGGTGTAGGTGTTTACAAATCTGTTGAGCTGGGAGGGATGC
ATGCGGGGGGAGATGAGGTGCATCTTGGCCTGGATCTTGAGATTGGCGATGTTACCGCCCAGATCCCGCCT
GGGGTTCATGTTGTGCAGGACCACCAGCACGGTGTATCCGGTGCACTTGGGGAATTTATCATGCAACTTGG
AAGGGAAGGCGTGAAAGAATTTGGCGACGCCTTTGTGCCCGCCCAGGTTTTCCATGCACTCATCCATGATG
ATGGCGATGGGCCCGTGGGCGGCGGCCTGGGCAAAGACGTTTCGGGGGTCGGACACATCATAGTTGTGGTC
CTGGGTGAGGTCATCATAGGCCATTTTAATGAATTTGGGGCGGAGGGTGCCGGACTGGGGGACAAAGGTTC
CCTCGATCCCGGGGGCGTAGTTCCCCTCACAGATCTGCATCTCCCAGGCTTTGAGCTCGGAGGGGGGGATC
ATGTCCACCTGCGGGGCGATAAAGAACACGGTTTCCGGGGCGGGGGAGATGAGCTGGGCCGAAAGCAAGT
TCCGGAGCAGCTGGGACTTGCCGCAGCCGGTGGGGCCGTAGATGACCCCGATGACCGGCTGCAGGTGGTA
GTTGAGGGAGAGACAGCTGCCGTCCTCCCGGAGGAGGGGGGCCACCTCGTTCATCATCTCGCGCACGTGCA
TGTTCTCGCGCACCAGTTCCGCCAGGAGGCGCTCTCCCCCCAGGGATAGGAGCTCCTGGAGCGAGGCGAAG
TTTTTCAGCGGCTTGAGTCCGTCGGCCATGGGCATTTTGGAGAGGGTTTGTTGCAAGAGTTCCAGGCGGTCC
CAGAGCTCGGTGATGTGCTCTACGGCATCTCGATCCAGCAGACCTCCTCGTTTCGCGGGTTGGGACGGCTG
CGGGAGTAGGGCACCAGACGATGGGCGTCCAGCGCAGCCAGGGTCCGGTCCTTCCAGGGTCGCAGCGTCC
GCGTCAGGGTGGTCTCCGTCACGGTGAAGGGGTGCGCGCCGGGCTGGGCGCTTGCGAGGGTGCGCTTCAGG
CTCATCCGGCTGGTCGAAAACCGCTCCCGATCGGCGCCCTGCGCGTCGGCCAGGTAGCAATTGACCATGAG
TTCGTAGTTGAGCGCCTCGGCCGCGTGGCCTTTGGCGCGGAGCTTACCTTTGGAAGTCTGCCCGCAGGCGG
GACAGAGGAGGGACTTGAGGGCGTAGAGCTTGGGGGCGAGGAAGACGGACTCGGGGGCGTAGGCGTCCG
CGCCGCAGTGGGCGCAGACGGTCTCGCACTCCACGAGCCAGGTGAGGTCGGGCTGGTCGGGGTCAAAAAC
CAGTTTCCCGCCGTTCTTTTTGATGCGTTTCTTACCTTTGGTCTCCATGAGCTCGTGTCCCCGCTGGGTGACA
AAGAGGCTGTCCGTGTCCCCGTAGACCGACTTTATGGGCCGGTCCTCGAGCGGTGTGCCGCGGTCCTCCTC
GTAGAGGAACCCCGCCCACTCCGAGACGAAAGCCCGGGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCCACGTGGGAC
GGGTAGCGGTCGTTGTCCACCAGCGGGTCCACCTTTTCCAGGGTATGCAAACACATGTCCCCCTCGTCCACA
TCCAGGAAGGTGATTGGCTTGTAAGTGTAGGCCACGTGACCGGGGGGTCCCGGCCGGGGGGGGTATAAAAGG
GTGCGGGTCCCTGCTCGTCCTCACTGTCTTCCGGATCGCTGTCCAGGAGCGCCAGCTGTTGGGGTAGGTATT
CCCTCTCGAAGGCGGGCATGACCTCGGCACTCAGGTTGTCAGTTTCTAGAAACGAGGAGGATTTGATATTG
ACGGTGCCGGCGGAGATGCCTTTCAAGAGCCCCTCGTCCATCTGGTCAGAAAAGACGATCTTTTTGTTGTCG
AGCTTGGTGGCGAAGGAGCCGTAGAGGGCGTTGGAGAGGAGCTTGGCGATGGAGCGCATGGTCTGGTTTTT

TTCCTTGTCGGCGCGCTCCTTGGCGGCGATGTTGAGCTGCACGTACTCGCGCGCCACGCACTTCCATTCGGG
GAAGACGGTGGTCAGCTCGTCGGGCACGATTCTGACCTGCCAGCCCCGATTATGCAGGGTGATGAGGTCCA
CACTGGTGGCCACCTCGCCGCGCAGGGGCTCATTAGTCCAGCAGAGGCGTCCGCCCTTGCGCGAGCAGAAG
GGGGGCAGGGGGTCCAGCATGACCTCGTCGGGGGGGTCGGCATCGATGGTGAAGATGCCGGGCAGGAGGT
CGGGGTCAAAGTAGCTGATGGAAGTGGCCAGATCGTCCAGGGCAGCTTGCCATTCGCGCACGGCCAGCGC
GCGCTCGTAGGGACTGAGGGGCGTGCCCCAGGGCATGGGATGGGTAAGCGCGGAGGCGTACATGCCGCAG
ATGTCGTAGACGTAGAGGGGCTCCTCGAGGATGCCGATGTAGGTGGGGTAGCAGCGCCCCCCGCGGATGCT
GGCGCGCACGTAGTCATACAGCTCGTGCGAGGGGGCGAGGAGCCCCGGGCCCAGGTTGGTGCGACTGGGC
TTTTCGGCGCGGTAGACGATCTGGCGGAAAATGGCATGCGAGTTGGAGGAGATGGTGGGCCTTTGGAAGAT
GTTGAAGTGGGCGTGGGGCAGTCCGACCGAGTCGCGGATGAAGTGGGCGTAGGAGTCTTGCAGCTTGGCG
ACGAGCTCGGCGGTGACTAGGACGTCCAGAGCGCAGTAGTCGAGGGTCTCCTGGATGATGTCATACTTGAG
CTGTCCCTTTTGTTTCCACAGCTCGCGGTTGAGAAGGAACTCTTCGCGGTCCTTCCAGTACTCTTCGAGGGG
GAACCCGTCCTGATCTGCACGGTAAGAGCCTAGCATGTAGAACTGGTTGACGGCCTTGTAGGCGCAGCAGC
CCTTCTCCACGGGGAGGGCGTAGGCCTGGGCGGCCTTGCGCAGGGAGGTGTGCGTGAGGGCGAAAGTGTC
CCTGACCATGACCTTGAGGAACTGGTGCTTGAAGTCGATATCGTCGCAGCCCCCCTGCTCCCAGAGCTGGA
AGTCCGTGCGCTTCTTGTAGGCGGGGTTGGGCAAAGCGAAAGTAACATCGTTGAAGAGGATCTTGCCCGCG
CGGGGCATAAAGTTGCGAGTGATGCGGAAAGGTTGGGGCACCTCGGCCCGGTTGTTGATGACCTGGGCGGC
GAGCACGATCTCGTCGAAGCCGTTGATGTTGTGGCCCACGATGTAGAGTTCCACGAATCGCGGACGGCCCT
TGACGTGGGGCAGTTTCTTGAGCTCCTCGTAGGTGAGCTCGTCGGGGTCGCTGAGCCCGTGCTGCTCGAGC
GCCCAGTCGGCGAGATGGGGGTTGGCGCGGAGGAAGGAAGTCCAGAGATCCACGGCCAGGGCGGTTTGCA
GACGGTCCCGGTACTGACGGAACTGCTGCCCGACGGCCATTTTTTCGGGGGTGACGCAGTAGAAGGTGCGG
GGGTCCCCGTGCCAGCGATCCCATTTGAGCTGGAGGGCGAGATCGAGGGCGAGCTCGACGAGCCGGTCGT
CCCCGGAGAGTTTCATGACCAGCATGAAGGGGACGAGCTGCTTGCCGAAGGACCCCATCCAGGTGTAGGTT
TCCACATCGTAGGTGAGGAAGAGCCTTTCGGTGCGAGGATGCGAGCCGATGGGGAAGAACTGGATCTCCTG
CCACCAATTGGAGGAATGGCTGTTGATGTGATGGAAGTAGAAATGCCGACGGCGCGCCGAACACTCGTGCT
TGTGTTTATACAAGCGGCCACAGTGCTCGCAACGCTGCACGGGATGCACGTGCTGCACGAGCTGTACCTGA
GTTCCTTTGACGAGGAATTTCAGTGGGAAGTGGAGTCGTGGCGCCTGCATCTCGTGCTGTACTACGTCGTGG
TGGTCGGCCTGGCCCTCTTCTGCCTCGATGGTGGTCATGCTGACGAGCCCGCGCGGGAGGCAGGTCCAGAC
CTCGGCGCGAGCGGGTCGGAGAGCGAGGACGAGGGCGCGCAGGCCGGAGCTGTCCAGGGTCCTGAGACGC
TGCGGAGTCAGGTCAGTGGGCAGCGGCGGCGCGCGGTTGACTTGCAGGAGTTTTTCCAGGGCGCGCGGGA
GGTCCAGATGGTACTTGATCTCCACCGCGCCATTGGTGGCGACGTCGATGGCTTGCAGGGTCCCGTGCCCCT
GGGGTGTGACCACCGTCCCCCGTTTCTTCTTGGGCGGCTGGGGCGACGGGGGCGGTGCCTCTTCCATGGTTA
GAAGCGGCGGCGAGGACGCGCGCCGGGCGGCAGGGGCGGCTCGGGGCCCGGAGGCAGGGGCGGCAGGGG
CACGTCGGCGCCGCGCGCGGGTAGGTTCTGGTACTGCGCCCGGAGAAGACTGGCGTGAGCGACGACGCGA
CGGTTGACGTCCTGGATCTGACGCCTCTGGGTGAAGGCCACGGGACCCGTGAGTTTGAACCTGAAAGAGAG
TTCGACAGAATCAATCTCGGTATCGTTGACGGCGGCCTGCCGCAGGATCTCTTGCACGTCGCCCGAGTTGTC
CTGGTAGGCGATCTCGGTCATGAACTGCTCGATCTCCTCCTCTTGAAGGTCTCCGCGGCCGGCGCGCTCCAC
GGTGGCCGCGAGGTCGTTGGAGATGCGGCCCATGAGCTGCGAGAAGGCGTTCATGCCCGCCTCGTTCCAGA
CGCGGCTGTAGACCACGACGCCCTCGGGATCGCGGGCGCGCATGACCACCTGGGCGAGGTTGAGCTCCAC
GTGGCGCGTGAAGACCGCGTAGTTGCAGAGGCGCTGGTAGAGGTAGTTGAGCGTGGTGGCGATGTGCTCG
GTGACGAAGAAATACATGATCCAGCGGCGGAGCGGCATCTCGCTGACGTCGCCCAGCGCCTCCAAACGTTC
CATGGCCTCGTAAAAGTCCACGGCGAAGTTGAAAAACTGGGAGTTGCGCGCCGAGACGGTCAACTCCTCCT
CCAGAAGACGGATGAGCTCGGCGATGGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAGGCCCCCGGGAGTTCCTCCACT
TCCTCTTCTTCCTCCTCCACTAACATCTCTTCTACTTCCTCCTCAGGCGGCAGTGGTGGCGGGGGAGGGGGC
CTGCGTCGCCGGCGGCGCACGGGCAGACGGTCGATGAAGCGCTCGATGGTCTCGCCGCGCCGGCGTCGCAT
GGTCTCGGTGACGGCGCGCCCGTCCTCGCGGGGCCGCAGCGTGAAGACGCCGCCGCGCATCTCCAGGTGGC
CGGGGGGGTCCCCGTTGGGCAGGGAGAGGGCGCTGACGATGCATCTTATCAATTGCCCCGTAGGGACTCCG
CGCAAGGACCTGAGCGTCTCGAGATCCACGGGATCTGAAAACCGCTGAACGAAGGCTTCGAGCCAGTCGC
AGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACGGTTTCTTCTGGCGGGTCATGTTGGTTGGGAGCGGGGCGGGCGATGCTG
CTGGTGATGAAGTTGAAATAGGCGGTTCTGAGACGGCGGATGGTGGCGAGGAGCACCAGGTCTTTGGGCCC
GGCTTGCTGGATGCGCAGACGGTCGGCCATGCCCCAGGCGTGGTCCTGACACCTGGCCAGGTCCTTGTAGT
AGTCCTGCATGAGCCGCTCCACGGGCACCTCCTCCTCGCCCGCGCGGCCGTGCATGCGCGTGAGCCCGAAG
CCGCGCTGGGGCTGGACGAGCGCCAGGTCGGCGACGACGCGCTCGGCGAGGATGGCTTGCTGGATCTGGG
TGAGGGTGGTCTGGAAGTCATCAAAGTCGACGAAGCGGTGGTAGGCTCCGGTGTTGATGGTGTAGGAGCA
GTTGGCCATGACGGACCAGTTGACGGTCTGGTGGCCCGGACGCACGAGCTCGTGGTACTTGAGGCGCGAGT
AGGCGCGCGTGTCGAAGATGTAGTCGTTGCAGGTGCGCACCAGGTACTGGTAGCCGATGAGGAAGTGCGG
CGGCGGCTGGCGGTAGAGCGGCCATCGCTCGGTGGCGGGGGCGCCGGGCGCGAGGTCCTCGAGCATGGTG
CGGTGGTAGCCGTAGATGTACCTGGACATCCAGGTGATGCCGGCGGCGGTGGTGGAGGCGCGCGGGAACT
CGCGGACGCGGTTCCAGATGTTGCGCAGCGGCAGGAAGTAGTTCATGGTGGGCACGGTCTGGCCCGTGAGG
CGCGCGCAGTCGTGGATGCTCTATACGGGCAAAAACGAAAGCGGTCAGCGGCTCGACTCCGTGGCCTGGA
GGCTAAGCGAACGGGTTGGGCTGCGCGTGTACCCCGGTTCGAATCTCGAATCAGGCTGGAGCCGCAGCTAA
CGTGGTATTGGCACTCCCGTCTCGACCCAAGCCTGCACCAACCCTCCAGGATACGGAGGCGGGTCGTTTTG
CAACTTTTTTTTGGAGGCCGGATGAGACTAGTAAGCGCGGAAAGCGGCCGACCGCGATGGCTCGCTGCCGT
AGTCTGGAGAAGAATCGCCAGGGTTGCGTTGCGGTGTGCCCCGGTTCGAGGCCGGCCGGATTCCGCGGCTA
ACGAGGGCGTGGCTGCCCCGTCGTTTCCAAGACCCCATAGCCAGCCGACTTCTCCAGTTACGGAGCGAGCC
CCTCTTTTGTTTTGTTTGTTTTTGCCAGATGCATCCCGTACTGCGGCAGATGCGCCCCCACCACCCTCCACCG
CAACAACAGCCCCCTCCACAGCCGGCGCTTCTGCCCCCGCCCCAGCAGCAACTTCCAGCCACGACCGCCGC

10 20 30 40 50

GGCCGCCGTGAGCGGGGCTGGACAGAGTTATGATCACCAGCTGGCCTTGGAAGAGGGCGAGGGGCTGGCG
CGCCTGGGGGCGTCGTCGCCGGAGCGGCACCCGCGCGTGCAGATGAAAAGGGACGCTCGCGAGGCCTACG
TGCCCAAGCAGAACCTGTTCAGAGACAGGAGCGGCGAGGAGCCCGAGGAGATGCGCGCGGCCCGGTTCCA
CGCGGGGCGGGAGCTGCGGCGCGGCCTGGACCGAAAGAGGGTGCTGAGGGACGAGGATTTCGAGGCGGA
CGAGCTGACGGGGATCAGCCCCGCGCGCGCGCACGTGGCCGCGGCCAACCTGGTCACGGCGTACGAGCAG
ACCGTGAAGGAGGAGAGCAACTTCCAAAAATCCTTCAACAACCACGTGCGCACCCTGATCGCGCGCGAGG
AGGTGACCCTGGGCCTGATGCACCTGTGGGACCTGCTGGAGGCCATCGTGCAGAACCCCACCAGCAAGCCG
CTGACGGCGCAGCTGTTCCTGGTGGTGCAGCATAGTCGGGACAACGAAGCGTTCAGGGAGGCGCTGCTGAA
TATCACCGAGCCCGAGGGCCGCTGGCTCCTGGACCTGGTGAACATTCTGCAGAGCATCGTGGTGCAGGAGC
GCGGGCTGCCGCTGTCCGAGAAGCTGGCGGCCATCAACTTCTCGGTGCTGAGTTTGGGCAAGTACTACGCT
AGGAAGATCTACAAGACCCCGTACGTGCCCATAGACAAGGAGGTGAAGATCGACGGGTTTTACATGCGCA
TGACCCTGAAAGTGCTGACCCTGAGCGACGATCTGGGGGTGTACCGCAACGACAGGATGCACCGTGCGGT
GAGCGCCAGCAGGCGGCGCGAGCTGAGCGACCAGGAGCTGATGCATAGTCTGCAGCGGGCCCTGACCGGG
GCCGGGACCGAGGGGGAGAGCTACTTTGACATGGGCGCGGACCTGCACTGGCAGCCCAGCCGCCGGGCCT
TGGAGGCGGCGGCAGGACCCTACGTAGAAGAGGTGGACGATGAGGTGGACGAGGAGGGCGAGTACCTGG
AAGACTGATGGCGCGACCGTATTTTTGCTAGATGCAACAACAACAGCCACCTCCTGATCCCGCGATGCGGG
CGGCGCTGCAGAGCCAGCCGTCCGGCATTAACTCCTCGGACGATTGGACCCAGGCCATGCAACGCATCATG
GCGCTGACGACCCGCAACCCCGAAGCCTTTAGACAGCAGCCCCAGGCCAACCGGCTCTCGGCCATCCTGGA
GGCCGTGGTGCCCTCGCGCTCCAACCCCACGCACGAGAAGGTCCTGGCCATCGTGAACGCGCTGGTGGAGA
ACAAGGCCATCCGCGGCGACGAGGCCGGCCTGGTGTACAACGCGCTGCTGGAGCGCGTGGCCCGCTACAA
CAGCACCAACGTGCAGACCAACCTGGACCGCATGGTGACCGACGTGCGCGAGGCCGTGGCCCAGCGCGAG
CGGTTCCACCGCGAGTCCAACCTGGGATCCATGGTGGCGCTGAACGCCTTCCTCAGCACCCAGCCCGCCAA
CGTGCCCCGGGGCCAGGAGGACTACACCAACTTCATCAGCGCCCTGCGCCTGATGGTGACCGAGGTGCCCC
AGAGCGAGGTGTACCAGTCCGGGCCGGACTACTTCTTCCAGACCAGTCGCCAGGGCTTGCAGACCGTGAAC
CTGAGCCAGGCTTTCAAGAACTTGCAGGGCCTGTGGGGCGTGCAGGCCCCGGTCGGGGACCGCGCGACGG
TGTCGAGCCTGCTGACGCCGAACTCGCGCCTGCTGCTGCTGCTGGTGGCCCCCTTCACGGACAGCGGCAGC
ATCAACCGCAACTCGTACCTGGGCTACCTGATTAACCTGTACCGCGAGGCCATCGGCCAGGCGCACGTGGA
CGAGCAGACCTACCAGGAGATCACCCACGTGAGCCGCGCCCTGGGCCAGGACGACCCGGGCAACCTGGAA
GCCACCCTGAACTTTTTGCTGACCAACCGGTCGCAGAAGATCCCGCCCCAGTACGCGCTCAGCACCGAGGA
GGAGCGCATCCTGCGTTACGTGCAGCAGAGCGTGGGCCTGTTCCTGATGCAGGAGGGGGCCACCCCCAGCG
CCGCGCTCGACATGACCGCGCGCAACATGGAGCCCAGCATGTACGCCAGCAACCGCCCGTTCATCAATAAA
CTGATGGACTACTTGCATCGGGCGGCCGCCATGAACTCTGACTATTTCACCAACGCCATCCTGAATCCCCAC
TGGCTCCCGCCGCCGGGGTTCTACACGGGCGAGTACGACATGCCCGACCCCAATGACGGGTTCCTGTGGGA
CGATGTGGACAGCAGCGTGTTCTCCCCCCGACCGGGTGCTAACGAGCGCCCCTTGTGGAAGAAGGAAGGC
AGCGACCGACGCCCGTCCTCGGCGCTGTCCGGCCGCGAGGGTGCTGCCGCGGCGGTGCCCGAGGCCGCCA
GTCCTTTCCCGAGCTTGCCCTTCTCGCTGAACAGTATCCGCAGCAGCGAGCTGGGCAGGATCACGCGCCCG
CGCTTGCTGGGCGAAGAGGAGTACTTGAATGACTCGCTGTTGAGACCCGAGCGGGAGAAGAACTTCCCCAA
TAACGGGATAGAAAGCCTGGTGGACAAGATGAGCCGCTGGAAGACGTATGCGCAGGAGCACAGGGACGAT
CCCCGGGCGTCGCAGGGGGCCACGAGCCGGGGCAGCGCCGCCCGTAAACGCCGGTGGCACGACAGGCAGC
GGGGACAGATGTGGGACGATGAGGACTCCGCCGACGACAGCAGCGTGTTGGACTTGGGTGGGAGTGGTAA
CCCGTTCGCTCACCTGCGCCCCCGTATCGGGCGCATGATGTAAGAGAAACCGAAAATAAATGATACTCACC
AAGGCCATGGCGACCAGCGTGCGTTCGTTTCTTCTCTGTTGTTGTTGTATCTAGTATGATGAGGCGTGCGTA
CCCGGAGGGTCCTCCTCCCTCGTACGAGAGCGTGATGCAGCAGGCGATGGCGGCGGCGGCGATGCAGCCC
CCGCTGGAGGCTCCTTACGTGCCCCCGCGGTACCTGGCGCCTACGGAGGGGCGGAACAGCATTCGTTACTC
GGAGCTGGCACCCTTGTACGATACCACCCGGTTGTACCTGGTGGACAACAAGTCGGCGGACATCGCCTCGC
TGAACTACCAGAACGACCACAGCAACTTCCTGACCACCGTGGTGCAGAACAATGACTTCACCCCCACGGAG
GCCAGCACCCAGACCATCAACTTTGACGAGCGCTCGCGGTGGGGCGGCCAGCTGAAAACCATCATGCACA
CCAACATGCCCAACGTGAACGAGTTCATGTACAGCAACAAGTTCAAGGCGCGGGTGATGGTCTCCCGCAAG
ACCCCCAATGGGGTGACAGTGACAGAGGATTATGATGGTAGTCAGGATGAGCTGAAGTATGAATGGGTGG
AATTTGAGCTGCCCGAAGGCAACTTCTCGGTGACCATGACCATCGACCTGATGAACAACGCCATCATCGAC
AATTACTTGGCGGTGGGGCGGCAGAACGGGGTGCTGGAGAGCGACATCGGCGTGAAGTTCGACACTAGGA
ACTTCAGGCTGGGCTGGGACCCCGTGACCGAGCTGGTCATGCCCGGGGTGTACACCAACGAGGCTTTCCAT
CCCGATATTGTCTTGCTGCCCGGCTGCGGGGTGGACTTCACCGAGAGCCGCCTCAGCAACCTGCTGGGCAT
TCGCAAGAGGCAGCCCTTCCAGGAAGGCTTCCAGATCATGTACGAGGATCTGGAGGGGGGCAACATCCCC
GCGCTCCTGGATGTCGACGCCTATGAGAAAAGCAAGGAGGATGCAGCAGCTGAAGCAACTGCAGCCGTAG
CTACCGCCTCTACCGAGGTCAGGGGCGATAATTTTGCAAGCGCCGCAGCAGTGGCAGCGGCCGAGGCGGCT
GAAACCGAAAGTAAGATAGTCATTCAGCCGGTGGAGAAGGATAGCAAGAACAGGAGCTACAACGTACTAC
CGGACAAGATAAACACCGCCTACCGCAGCTGGTACCTAGCCTACAACTATGGCGACCCCGAGAAGGGCGT
GCGCTCCTGGACGCTGCTCACCACCTCGGACGTCACCTGCGGCGTGGAGCAAGTCTACTGGTCGCTGCCCG
ACATGATGCAAGACCCGGTCACCTTCCGCTCCACGCGTCAAGTTAGCAACTACCCGGTGGTGGGCGCCGAG
CTCCTGCCCGTCTACTCCAAGAGCTTCTTCAACGAGCAGGCCGTCTACTCGCAGCAGCTGCGCGCCTTCACC
TCGCTTACGCACGTCTTCAACCGCTTCCCCGAGAACCAGATCCTCGTCCGCCCGCCCGCGCCCACCATTACC
ACCGTCAGTGAAAACGTTCCTGCTCTCACAGATCACGGGACCCTGCCGCTGCGCAGCAGTATCCGGGGAGT
CCAGCGCGTGACCGTTACTGACGCCAGACGCCGCACCTGCCCCTACGTCTACAAGGCCCTGGGCATAGTCG
CGCCGCGCGTCCTCTCGAGCCGCACCTTCTAAATGTCCATTCTCATCTCGCCCAGTAATAACACCGGTTGGG
GCCTGCGCGCGCCCAGCAAGATGTACGGAGGCGCTCGCCAACGCTCCACGCAACACCCCGTGCGCGTGCGC
GGGCACTTCCGCGCTCCCTGGGGCGCCCTCAAGGGCCGCGTGCGGTCGCGCACCACCGTCGACGACGTGAT

10 20 30 40 50

CGACCAGGTGGTGGCCGACGCGCGCAACTACACCCCCGCCGCCGCGCCCCGTCTCCACCGTGGACGCCGTCA
TCGACAGCGTGGTGGCCGACGCGCGCCGGTACGCCCGCGCCAAGAGCCGGCGGCGGCGCATCGCCCGGCG
GCACCGGAGCACCCCCGCCATGCGCGCGGCGCGAGCCTTGCTGCGCAGGGCCAGGCGCACGGGACGCAGG
GCCATGCTCAGGGCGGCCAGACGCGCGGCTTCAGGCGCCAGCGCCGGCAGGACCCGGAGACGCGCGGCCA
CGGCGGCGGCAGCGGCCATCGCCAGCATGTCCCGCCCGCGGCGAGGGAACGTGTACTGGGTGCGCGACGC
CGCCACCGGTGTGCGCGTGCCCGTGCGCACCCGCCCCCCTCGCACTTGAAGATGTTCACTTCGCGATGTTGA
TGTGTCCCAGCGGCGAGGAGGATGTCCAAGCGCAAATTCAAGGAAGAGATGCTCCAGGTCATCGCGCCTG
AGATCTACGGCCCTGCGGTGGTGAAGGAGGAAAGAAAGCCCCGCAAAATCAAGCGGGTCAAAAAGGACA
AAAAGGAAGAAGAAAGTGATGTGGACGGATTGGTGGAGTTTGTGCGCGAGTTCGCCCCCCGGCGGCGCGT
GCAGTGGCGCGGGCGGAAGGTGCAACCGGTGCTGAGACCCGGCACCACCGTGGTCTTCACGCCCGGCGAG
CGCTCCGGCACCGCTTCCAAGCGCTCCTACGACGAGGTGTACGGGGATGATGATATTCTGGAGCAGGCGGC
CGAGCGCCTGGGCGAGTTTGCTTACGGCAAGCGCAGCCGTTCCGCACCGAAGGAAGAGGCGGTGTCCATCC
CGCTGGACCACGGCAACCCCACGCCGAGCCTCAAGCCCGTGACCTTGCAGCAGGTGCTGCCGACCGCGGCG
CCGCGCCGGGGGTTCAAGCGCGAGGGCGAGGATCTGTACCCCACCATGCAGCTGATGGTGCCCAAGCGCC
AGAAGCTGGAAGACGTGCTGGAGACCATGAAGGTGGACCCGGACGTGCAGCCCGAGGTCAAGGTGCGGCC
CATCAAGCAGGTGGCCCCGGGCCTGGGCGTGCAGACCGTGGACATCAAGATTCCCACGGAGCCCATGGAA
ACGCAGACCGAGCCCATGATCAAGCCCAGCACCAGCACCATGGAGGTGCAGACGGATCCCTGGATGCCAT
CGGCTCCTAGTCGAAGACCCCGGCGCAAGTACGGCGCGGCCAGCCTGCTGATGCCCAACTACGCGCTGCAT
CCTTCCATCATCCCCACGCCGGGCTACCGCGGCACGCGCTTCTACCGCGGTCATACCAGCAGCCGCCGCCG
CAAGACCACCACTCGCCGCCGCCGTCGCCGCACCGCCGCTGCAACCACCCCTGCCGCCCTGGTGCGGAGAG
TGTACCGCCGCGGCCGCGCACCTCTGACCCTGCCGCGCGCGCGCTACCACCCGAGCATCGCCATTTAAACT
TTCGCCTGCTTTGCAGATCAATGGCCCTCACATGCCGCCTTCGCGTTCCCATTACGGGCTACCGAGGAAGAA
AACCGCGCCGTAGAAGGCTGGCGGGGAACGGGATGCGTCGCCACCACCACCGGCGGCGGCGCGCCATCAG
CAAGCGGTTGGGGGGGAGGCTTCCTGCCCGCGCTGATCCCCATCATCGCCGCGGCGATCGGGGCGATCCCCG
GCATTGCTTCCGTGGCGGTGCAGGCCTCTCAGCGCCACTGAGACACACTTGGAAACATCTTGTAATAAACC
AATGGACTCTGACGCTCCTGGTCCTGTGATGTGTTTTCGTAGACAGATGGAAGACATCAATTTTTCGTCCCT
GGCTCCGCGACACGGCACGCGGCCGTTCATGGGCACCTGGAGCGACATCGGCACCAGCCAACTGAACGGG
GGCGCCTTCAATTGGAGCAGTCTCTGGAGCGGGCTTAAGAATTTCGGGTCCACGCTTAAAACCTATGGCAG
CAAGGCGTGGAACAGCACCACAGGGCAGGCGCTGAGGGATAAGCTGAAAGAGCAGAACTTCCAGCAGAA
GGTGGTCGATGGGCTCGCCTCGGGCATCAACGGGGTGGTGGACCTGGCCAACCAGGCCGTGCAGCGGCAG
ATCAACAGCCGCCTGGACCCGGTGCCGCCCGCCGGCTCCGTGGAGATGCCGCAGGTGGAGGAGGAGCTGC
CTCCCCTGGACAAGCGGGGCGAGAAGCGACCCCGCCCCGATGCGGAGGAGACGCTGCTGACGCACACGGA
CGAGCCGCCCCCGTACGAGGAGGCGGTGAAACTGGGTCTGCCCACCACGCGGCCCATCGCGCCCCTGGCCA
CCGGGGTGCTGAAACCCGAAAAGCCCGCGACCCTGGACTTGCCTCCTCCCCAGCCTTCCCGCCCCTCTACA
GTGGCTAAGCCCCTGCCGCCGGTGGCCGTGGCCCGCGCGCGACCCGGGGGCACCGCCCGCCCTCATGCGAA
CTGGCAGAGCACTCTGAACAGCATCGTGGGTCTGGGAGTGCAGAGTGTGAAGCGCCGCCGCTGCTATTAAA
CCTACCGTAGCGCTTAACTTGCTTGTCTGTGTGTGTATGTATTATGTCGCCGCCGCCGCTGTCCACCAGAAG
GAGGAGTGAAGAGGCGCGTCGCCGAGTTGCAAGATGGCCACCCCATCGATGCTGCCCCAGTGGGCGTACA
TGCACATCGCCGGACAGGACGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTGGTGCAGTTTGCCCGCGCCCACAGAC
ACCTACTTCAGTCTGGGGAACAAGTTTAGGAACCCCACGGTGGCGCCCACGCACGATGTGACCACCGACCG
CAGCCAGCGGCTGACGCTGCGCTTCGTGCCCGTGGACCGCGAGGACAACACCTACTCGTACAAAGTGCGCT
ACACGCTGGCCGTGGGCGACAACCGCGTGCTGGACATGGCCAGCACCTACTTTGACATCCGCGGCGTGCTG
GATCGGGGCCCTAGCTTCAAACCCTACTCCGGCACCGCCTACAACAGTCTGGCCCCCAAGGGAGCACCCAA
CACTTGTCAGTGGACATATAAAGCCGATGGTGAAACTGCCACAGAAAAAACCTATACATATGGAAATGCAC
CCGTGCAGGGCATTAACATCACAAAAGATGGTATTCAACTTGGAACTGACACCGATGATCAGCCAATCTAC
GCAGATAAAACCTATCAGCCTGAACCTCAAGTGGGTGATGCTGAATGGCATGACATCACTGGTACTGATGA
AAAGTATGGAGGCAGAGCTCTTAAGCCTGATACCAAAATGAAGCCTTGTTATGGTTCTTTTGCCAAGCCTA
CTAATAAAGAAGGAGGTCAGGCAAATGTGAAAACAGGAACAGGCACTACTAAAGAATATGACATAGACAT
GGCTTTCTTTGACAACAGAAGTGCGGCTGCTGCTGGCCTAGCTCCAGAAATTGTTTTGTATACTGAAAATGT
GGATTTGGAAACTCCAGATACCCATATTGTATACAAAGCAGGCACAGATGACAGCAGCTCTTCTATTAATT
TGGGTCAGCAAGCCATGCCCAACAGACCTAACTACATTGGTTTCAGAGACAACTTTATCGGGCTCATGTAC
TACAACAGCACTGGCAATATGGGGGTGCTGGCCGGTCAGGCTTCTCAGCTGAATGCTGTGGTTGACTTGCA
AGACAGAAACACCGAGCTGTCCTACCAGCTCTTGCTTGACTCTCTGGGTGACAGAACCCGGTATTTCAGTAT
GTGGAATCAGGCGGTGGACAGCTATGATCCTGATGTGCGCATTATTGAAAATCATGGTGTGGAGGATGAAC
TTCCCAACTATTGTTTCCCTCTGGATGCTGTTGGCAGAACAGATACTTATCAGGGAATTAAGGCTAATGGAA
CTGATCAAACCACATGGACCAAAGATGACAGTGTCAATGATGCTAATGAGATAGGCAAGGGTAATCCATTC
GCCATGGAAATCAACATCCAAGCCAACCTGTGGAGGAACTTCCTCTACGCCAACGTGGCCCTGTACCTGCC
CGACTCTTACAAGTACACGCCGGCCAATGTTACCCTGCCCACCAACACCAACACCTACGATTACATGAACG
GCCGGGTGGTGGCGCCCTCGCTGGTGGACTCCTACATCAACATCGGGGCGCGCTGGTCGCTGGATCCCATG
GACAACGTGAACCCCTTCAACCACCACCGCAATGCGGGGCTGCGCTACCGCTCCATGCTCCTGGGCAACGG
GCGCTACGTGCCCTTCCACATCCAGGTGCCCCAGAAATTTTTCGCCATCAAGAGCCTCCTGCTCCTGCCCGG
GTCCTACACCTACGAGTGGAACTTCCGCAAGGACGTCAACATGATCCTGCAGAGCTCCCTCGGCAACGACC
TGCGCACGGACGGGGCCTCCATCTCCTTCACCAGCATCAACCTCTACGCCACCTTCTTCCCCATGGCGCACA
ACACGGCCTCCACGCTCGAGGCCATGCTGCGCAACGACACCAACGACCAGTCCTTCAACGACTACCTCTCG
GCGGCCAACATGCTCTACCCCATCCCGGCCAACGCCACCAACGTGCCCATCTCCATCCCCTCGCGCAACTG
GGCCGCCTTCCGCGGCTGGTCCTTCACGCGTCTCAAGACCAAGGAGACGCCCTCGCTGGGCTCCGGGTTCG
ACCCCTACTTCGTCTACTCGGGCTCCATCCCCTACCTCGACGGCACCTTCTACCTCAACCACACCTTCAAGA

AGGTCTCCATCACCTTCGACTCCTCCGTCAGCTGGCCCGGCAACGACCGGCTCCTGACGCCCAACGAGTTC
GAAATCAAGCGCACCGTCGACGGCGAGGGCTACAACGTGGCCCAGTGCAACATGACCAAGGACTGGTTCC
TGGTCCAGATGCTGGCCCACTACAACATCGGCTACCAGGGCTTCTACGTGCCCGAGGGCTACAAGGACCGC
ATGTACTCCTTCTTCCGCAACTTCCAGCCCATGAGCCGCCAGGTGGTGGACGAGGTCAACTACAAGGACTA
CCAGGCCGTCACCCTGGCCTACCAGCACAACAACTCGGGCTTCGTCGGCTACCTCGCGCCCACCATGCGCC
AGGGCCAGCCCTACCCCGCCAACTACCCCTACCCGCTCATCGGCAAGAGCGCCGTCACCAGCGTCACCCAG
AAAAAGTTCCTCTGCGACAGGGTCATGTGGCGCATCCCCTTCTCCAGCAACTTCATGTCCATGGGCGCGCTC
ACCGACCTCGGCCAGAACATGCTCTATGCCAACTCCGCCCACGCGCTAGACATGAATTTCGAAGTCGACCC
CATGGATGAGTCCACCCTTCTCTATGTTGTCTTCGAAGTCTTCGACGTCGTCCGAGTGCACCAGCCCCACCG
CGGCGTCATCGAGGCCGTCTACCTGCGCACCCCCTTCTCGGCCGGTAACGCCACCACCTAAGCTCTTGCTTC
TTGCAAGCCATGGCCGCGGGCTCCGGCGAGCAGGAGCTCAGGGCCATCATCCGCGACCTGGGCTGCGGGC
CCTACTTCCTGGGCACCTTCGATAAGCGCTTCCCGGGATTCATGGCCCCGCACAAGCTGGCCTGCGCCATCG
TCAACACGGCCGGCCGCGAGACCGGGGGCGAGCACTGGCTGGCCTTCGCCTGGAACCCGCGCTCGAACAC
CTGCTACCTCTTCGACCCCTTCGGGTTCTCGGACGAGCGCCTCAAGCAGATCTACCAGTTCGAGTACGAGG
GCCTGCTGCGCCGCAGCGCCCTGGCCACCGAGGACCGCTGCGTCACCCTGGAAAAGTCCACCCAGACCGTG
CAGGGTCCGCGCTCGGCCGCCTGCGGGCTCTTCTGCTGCATGTTCCTGCACGCCTTCGTGCACTGGCCCGAC
CGCCCCATGGACAAGAACCCCACCATGAACTTGCTGACGGGGGTGCCCAACGGCATGCTCCAGTCGCCCCA
GGTGGAACCCACCCTGCGCCGCAACCAGGAGGCGCTCTACCGCTTCCTCAACTCCCACTCCGCCTACTTTCG
CTCCCACCGCGCGCGCATCGAGAAGGCCACCGCCTTCGACCGCATGAATCAAGACATGTAAACCGTGTGTG
TATGTTAAATGTCTTTAATAAACAGCACTTTCATGTTACACATGCATCTGAGATGATTTATTTAGAAATCGA
AAGGGTTCTGCCGGGTCTCGGCATGGCCCGCGGGCAGGGACACGTTGCGGAACTGGTACTTGGCCAGCCAC
TTGAACTCGGGGATCAGCAGTTTGGGCAGCGGGGTGTCGGGGAAGGAGTCGGTCCACAGCTTCCGCGTCAG
TTGCAGGGCGCCCAGCAGGTCGGGCGCGGAGATCTTGAAATCGCAGTTGGGACCCGCGTTCTGCGCGCGGG
AGTTGCGGTACACGGGGTTGCAGCACTGGAACACCATCAGGGCCGGGTGCTTCACGCTCGCCAGCACCGTC
GCGTCGGTGATGCTCTCCACGTCGAGGTCCTCGGCGTTGGCCATCCCGAAGGGGGTCATCTTGCAGGTCTG
CCTTCCCATGGTGGGCACGCACCCGGGCTTGTGGTTGCAATCGCAGTGCAGGGGGATCAGCATCATCTGGG
CCTGGTCGGCGTTCATCCCCGGGTACATGGCCTTCATGAAAGCCTCCAATTGCCTGAACGCCTGCTGGGCCT
TGGCTCCCTCGGTGAAGAAGACCCCGCAGGACTTGCTAGAGAACTGGTTGGTGGCGCACCCGGCGTCGTGC
ACGCAGCAGCGCGCGTCGTTGTTGGCCAGCTGCACCACGCTGCGCCCCCAGCGGTTCTGGGTGATCTTGGC
CCGGTCGGGGTTCTCCTTCAGCGCGCGCTGCCCGTTCTCGCTCGCCACATCCATCTCGATCATGTGCTCCTTC
TGGATCATGGTGGTCCCGTGCAGGCACCGCAGCTTGCCCTCGGCCTCGGTGCACCCGTGCAGCCACAGCGC
GCACCCGGTGCACTCCCAGTTCTTGTGGGCGATCTGGGAATGCGCGTGCACGAAGCCCTGCAGGAAGCGGC
CCATCATGGTGGTCAGGGTCTTGTTGCTAGTGAAGGTCAGCGGAATGCCGCGGTGCTCCTCGTTGATGTACA
GGTGGCAGATGCGGCGGTACACCTCGCCCTGCTCGGGCATCAGCTGGAAGTTGGCTTTCAGGTCGGTCTCC
ACGCGGTAGCGGTCCATCAGCATAGTCATGATTTCCATACCCTTCTCCCAGGCCGAGACGATGGGCAGGCT
CATAGGGTTCTTCACCATCATCTTAGCGCTAGCAGCCGCGGCCAGGGGGTCGCTCTCGTCCAGGGTCTCAA
AGCTCCGCTTGCCGTCCTTCTCGGTGATCCGCACCGGGGGGGTAGCTGAAGCCCACGGCCGCCAGCTCCTCCT
CGGCCTGTCTTTCGTCCTCGCTGTCCTGGCTGACGTCCTGCAGGACCACATGCTTGGTCTTGCGGGGTTTCTT
CTTGGGCGGCAGCGGCGGCGGAGATGTTGGAGATGGCGAGGGGGAGCGCGAGTTCTCGCTCACCACTACT
ATCTCTTCCTCTTCTTGGTCCGAGGCCACGCGGCGGTAGGTATGTCTCTTCGGGGGCAGAGGCGGAGGCGA
CGGGCTCTCGCCGCCGCGACTTGGCGGATGGCTGGCAGAGCCCCTTCCGCGTTCGGGGGTGCGCTCCCGGC
GGCGCTCTGACTGACTTCCTCCGCGGCCGGCCATTGTGTTCTCCTAGGGAGGAACAACAAGCATGGAGACT
CAGCCATCGCCAACCTCGCCATCTGCCCCCACCGCCGACGAGAAGCAGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAA
CCGCCCCCGCCGCCCAGCCCCGCCACCTCCGACGCGGCCGTCCCAGACATGCAAGAGATGGAGGAATCCATC
GAGATTGACCTGGGCTATGTGACGCCCGCGGAGCACGAGGAGGAGCTGGCAGTGCGCTTTTCACAAGAAG
AGATACACCAAGAACAGCCAGAGCAGGAAGCAGAGAATGAGCAGAGTCAGGCTGGGCTCGAGCATGACG
GCGACTACCTCCACCTGAGCGGGGGGGAGGACGCGCTCATCAAGCATCTGGCCCGGCAGGCCACCATCGTC
AAGGATGCGCTGCTCGACCGCACCGAGGTGCCCCTCAGCGTGGAGGAGCTCAGCCGCGCCTACGAGTTGA
ACCTCTTCTCGCCGCGCGTGCCCCCCAAGCGCCAGCCCAATGGCACCTGCGAGCCCAACCCGCGCCTCAAC
TTCTACCCGGTCTTCGCGGTGCCCGAGGCCCTGGCCACCTACCACATCTTTTTCAAGAACCAAAAGATCCCC
GTCTCCTGCCGCGCCAACCGCACCCGCGCCGACGCCCTTTTCAACCTGGGTCCCGGCGCCCGCCTACCTGAT
ATCGCCTCCTTGGAAGAGGTTCCCAAGATCTTCGAGGGTCTGGGCAGCGACGAGACTCGGGCCGCGAACGC
TCTGCAAGGAGAAGGAGGAGAGCATGAGCACCACAGCGCCCTGGTCGAGTTGGAAGGCGACAACGCGCGG
CTGGCGGTGCTCAAACGCACGGTCGAGCTGACCCATTTCGCCTACCCGGCTCTGAACCTGCCCCCCAAAGT
CATGAGCGCGGTCATGGACCAGGTGCTCATCAAGCGCGCGTCGCCCATCTCCGAGGACGAGGGCATGCAA
GACTCCGAGGAGGGCAAGCCCGTGGTCAGCGACGAGCAGCTGGCCCGGTGGCTGGGTCCTAATGCTAGTC
CCCAGAGTTTGGAAGAGCGGCGCAAACTCATGATGGCCGTGGTCCTGGTGACCGTGGAGCTGGAGTGCCTG
CGCCGCTTCTTCGCCGACGCGGAGACCCTGCGCAAGGTCGAGGAGAACCTGCACTACCTCTTCAGGCACGG
GTTCGTGCGCCAGGCCTGCAAGATCTCCAACGTGGAGCTGACCAACCTGGTCTCCTACATGGGCATCTTGC
ACGAGAACCGCCTGGGGCAGAACGTGCTGCACACCACCCTGCGCGGGGAGGCCCGGCGCGACTACATCCG
CGACTGCGTCTACCTCTACCTCTGCCACACCTGGCAGACGGGCATGGGCGTGTGGCAGCAGTGTCTGGAGG
AGCAGAACCTGAAAGAGCTCTGCAAGCTCCTGCAGAAGAACCTCAAGGGTCTGTGGACCGGGTTCGACGA
GCGCACCACCGCCTCGGACCTGGCCGACCTCATTTTCCCCGAGCGCCTCAGGCTGACGCTGCGCAACGGCC
TGCCCGACTTTATGAGCCAAAGCATGTTGCAAAACTTTCGCTCTTTCATCCTCGAACGCTCCGGAATCCTGC
CCGCCACCTGCTCCGCGCTGCCCTCGGACTTCGTGCCGCTGACCTTCCGCGAGTGCCCCCCGCCGCTGTGGA
GCCACTGCTACCTGCTGCGCCTGGCCAACTACCTGGCCTACCACTCGGACGTGATCGAGGACGTCAGCGGC
GAGGGCCTGCTCGAGTGCCACTGCCGCTGCAACCTCTGCACGCCGCACCGCTCCCTGGCCTGCAACCCCCA

GCTGCTGAGCGAGACCCAGATCATCGGCACCTTCGAGTTGCAAGGGCCCAGCGAAGGCGAGGGTTCAGCC
GCCAAGGGGGGTCTGAAACTCACCCCGGGGCTGTGGACCTCGGCCTACTTGCGCAAGTTCGTGCCCGAGGA
CTACCATCCCTTCGAGATCAGGTTCTACGAGGACCAATCCCATCCGCCCAAGGCCGAGCTGTCGGCCTGCG
TCATCACCCAGGGGGCGATCCTGGCCCAATTGCAAGCCATCCAGAAATCCCGCCAAGAATTCTTGCTGAAA
AAGGGCCGCGGGGTCTACCTCGACCCCCAGACCGGTGAGGAGCTCAACCCCGGCTTCCCCCAGGATGCCCC
GAGGAAACAAGAAGCTGAAAGTGGAGCTGCCGCCCGTGGAGGATTTGGAGGAAGACTGGGAGAACAGCA
GTCAGGCAGAGGAGGAGGAGATGGAGGAAGACTGGGACAGCACTCAGGCAGAGGAGGACAGCCTGCAAG
ACAGTCTGGAGGAAGACGAGGAGGAGGCAGAGGAGGAGGTGGAAGAAGCAGCCGCCGCCAGACCGTCGT
CCTCGGCGGGGGAGAAAGCAAGCAGCACGGATACCATCTCCGCTCCGGGTCGGGGTCCCGCTCGACCACA
CAGTAGATGGGACGAGACCGGACGATTCCCGAACCCCACCACCCAGACCGGTAAGAAGGAGCGGCAGGGA
TACAAGTCCTGGCGGGGGCACAAAAACGCCATCGTCTCCTGCTTGCAGGCCTGCGGGGGCAACATCTCCTT
CACCCGGCGCTACCTGCTCTTCCACCGCGGGGTGAACTTTCCCCGCAACATCTTGCATTACTACCGTCACCT
CCACAGCCCCTACTACTTCCAAGAAGAGGCAGCAGCAGCAGAAAAAGACCAGCAGAAAACCAGCAGCTAG
AAAATCCACAGCGGCGGCAGCAGGTGGACTGAGGATCGCGGCGAACGAGCCGGCGCAAACCCGGGAGCT
GAGGAACCGGATCTTTCCCACCCTCTATGCCATCTTCCAGCAGAGTCGGGGGCAGGAGCAGGAACTGAAAG
TCAAGAACCGTTCTCTGCGCTCGCTCACCCGCAGTTGTCTGTATCACAAGAGCGAAGACCAACTTCAGCGC
ACTCTCGAGGACGCCGAGGCTCTCTTCAACAAGTACTGCGCGCTCACTCTTAAAGAGTAGCCCGCGCCCGC
CCAGTCGCAGAAAAAGGCGGGAATTACGTCACCTGTGCCCTTCGCCCTAGCCGCCTCCACCCATCATCATG
AGCAAAGAGATTCCCACGCCTTACATGTGGAGCTACCAGCCCCAGATGGGCCTGGCCGCCGGTGCCGCCCA
GGACTACTCCACCCGCATGAATTGGCTCAGCGCCGGGCCCGCGATGATCTCACGGGTGAATGACATCCGCG
CCCACCGAAACCAGATACTCCTAGAACAGTCAGCGCTCACCGCCACGCCCCGCAATCACCTCAATCCGCGT
AATTGGCCCGCCGCCCTGGTGTACCAGGAAATTCCCCAGCCCACGACCGTACTACTTCCGCGAGACGCCCA
GGCCGAAGTCCAGCTGACTAACTCAGGTGTCCAGCTGGCGGGCGGCGCCACCCTGTGTCGTCACCGCCCCG
CTCAGGGTATAAAGCGGCTGGTGATCCGGGGCAGAGGCACACAGCTCAACGACGAGGTGGTGAGCTCTTC
GCTGGGTCTGCGACCTGACGGAGTCTTCCAACTCGCCGGATCGGGGAGATCTTCCTTCACGCCTCGTCAGG
CCGTCCTGACTTTGGAGAGTTCGTCCTCGCAGCCCCGCTCGGGTGGCATCGGCACTCTCCAGTTCGTGGAGG
AGTTCACTCCCTCGGTCTACTTCAACCCCTTCTCCGGCTCCCCCGGCCACTACCCGGACGAGTTCATCCCGA
ACTTCGACGCCATCAGCGAGTCGGTGGACGGCTACGATTGAAACTAATCACCCCCTTATCCAGTGAAATAA
AGATCATATTGATGATGATTTTACAGAAATAAAAAATAATCATTTGATTTGAAATAAAGATACAATCATAT
TGATGATTTGAGTTTAACAAAAAAATAAAGAATCACTTACTTGAAATCTGATACCAGGTCTCTGTCCATGTT
TTCTGCCAACACCACTTCACTCCCCTCTTCCCAGCTCTGGTACTGCAGGCCCCGGCGGGCTGCAAACTTCCT
CCACACGCTGAAGGGGATGTCAAATTCCTCCTGTCCCTCAATCTTCATTTTATCTTCTATCAGATGTCCAAA
AAGCGCGTCCGGGTGGATGATGACTTCGACCCCGTCTACCCCTACGATGCAGACAACGCACCGACCGTGCC
CTTCATCAACCCCCCCTTCGTCTCTTCAGATGGATTCCAAGAGAAGCCCCTGGGGGTGTTGTCCCTGCGACT
GGCCGACCCCGTCACCACCAAGAACGGGGAAATCACCCTCAAGCTGGGAGAGGGGGTGGACCTCGATTCC
TCGGGAAAACTCATCTCCAACACGGCCACCAAGGCCGCCGCCCCTCTCAGTTTTTCCAACAACACCATTTCC
CTTAACATGGATCACCCCTTTTACACTAAAGATGGAAAATTATCCTTACAAGTTTCTCCACCATTAAATATA
CTGAGAACAAGCATTCTAAACACACTAGCTTTAGGTTTTGGATCAGGTTTAGGACTCCGTGGCTCTGCCTTG
GCAGTACAGTTAGTCTCTCCACTTACATTTGATACTGATGGAAACATAAAGCTTACCTTAGACAGAGGTTTG
CATGTTACAACAGGAGATGCAATTGAAAGCAACATAAGCTGGGCTAAAGGTTTAAAATTTGAAGATGGAG
CCATAGCAACCAACATTGGAAATGGGTTAGAGTTTGGAAGCAGTAGTACAGAAACAGGTGTTGATGATGCT
TACCCAATCCAAGTTAAACTTGGATCTGGCCTTAGCTTTGACAGTACAGGAGCCATAATGGCTGGTAACAA
AGAAGACGATAAACTCACTTTGTGGACAACACCTGATCCATCACCAAACTGTCAAATACTCGCAGAAAATG
ATGCAAAACTAACACTTTGCTTGACTAAATGTGGTAGTCAAATACTGGCCACTGTGTCAGTCTTAGTTGTAG
GAAGTGGAAACCTAAACCCCATTACTGGCACCGTAAGCAGTGCTCAGGTGTTTCTACGTTTTGATGCAAAC
GGTGTTCTTTTAACAGAACATTCTACACTAAAAAAATACTGGGGGTATAGGCAGGGAGATAGCATAGATGG
CACTCCATATACCAATGCTGTAGGATTCATGCCCAATTTAAAAGCTTATCCAAAGTCACAAAGTTCTACTAC
TAAAAATAATATAGTAGGGCAAGTATACATGAATGGAGATGTTTCAAAACCTATGCTTCTCACTATAACCC
TCAATGGTACTGATGACAGCAACAGTACATATTCAATGTCATTTTCATACACCTGGACTAATGGAAGCTATG
TTGGAGCAACATTTGGGGCTAACTCTTATACCTTCTCATACATCGCCCAAGAATGAACACTGTATCCCACCC
TGCATGCCAACCCTTCCCACCCCACTCTGTGGAACAAACTCTGAAACACAAAATAAAATAAAGTTCAAGTG
TTTTATTGATTCAACAGTTTTACAGGATTCGAGCAGTTATTTTTCCTCCACCCTCCCAGGACATGGAATACA
CCACCCTCTCCCCCCCGCACAGCCTTGAACATCTGAATGCCATTGGTGATGGACATGCTTTTGGTCTCCACGT
TCCACACAGTTTCAGAGCGAGCCAGTCTCGGGTCGGTCAGGGAGATGAAACCCTCCGGGGCACTCCCGCATC
TGCACCTCACAGCTCAACAGCTGAGGATTGTCCTCGGTGGTCGGGATCACGGTTATCTGGAAGAAGCAGAA
GAGCGGCGGTGGGAATCATAGTCCGCGAACGGGATCGGCCGGTGGTGTCGCATCAGGCCCCGCAGCAGTC
GCTGCCGCCGCCGCTCCGTCAAGCTGCTGCTCAGGGGGTCCGGGTCCAGGGACTCCCTCAGCATGATGCCC
ACGGCCCTCAGCATCAGTCGTCTGGTGCGGCGGGCGCAGCAGCGCATGCGGATCTCGCTCAGGTCGCTGCA
GTACGTGCAACACAGAACCACCAGGTTGTTCAACAGTCCATAGTTCAACACGCTCCAGCCGAAACTCATCG
CGGGAAGGATGCTACCCACGTGGCCGTCGTACCAGATCCTCAGGTAAATCAAGTGGTGCCCCCTCCAGAAC
ACGCTGCCCACGTACATGATCTCCTTGGGCATGTGGCGGTTCACCACCTCCCGGTACCACATCACCCTCTGG
TTGAACATGCAGCCCCGGATGATCCTGCGGAACCACAGGGCCAGCACCGCCCCGCCCGCCATGCAGCGAA
GAGACCCCGGGTCCCGGCAATGGCAATGGAGGACCCACCGCTCGTACCCGTGGATCATCTGGGAGCTGAA
CAAGTCTATGTTGGCACAGCACAGGCATATGCTCATGCATCTCTTCAGCACTCTCAACTCCTCGGGGGTCAA
AACCATATCCCAGGGCACGGGGAACTCTTGCAGGACAGCGAACCCCGCAGAACAGGGCAATCCTCGCACA
GAACTTACATTGTGCATGGACAGGGTATCGCAATCAGGCAGCACCGGGTGATCCTCCACCAGAGAAGCGC
GGGTCTCGGTCTCCTCACAGCGTGGTAAGGGGGCCGGCCGATACGGGTGATGGCGGGACGCGGCTGATCGT

GTTCGCGACCGTGTCATGATGCAGTTGCTTTCGGACATTTTCGTACTTGCTGTAGCAGAACCTGGTCCGGGC
GCTGCACACCGATCGCCGGCGGCGGTCTCGGCGCTTGGAACGCTCGGTGTTGAAATTGTAAAACAGCCACT
CTCTCAGACCGTGCAGCAGATCTAGGGCCTCAGGAGTGATGAAGATCCCATCATGCCTGATGGCTCTGATC
ACATCGACCACCGTGGAATGGGCCAGACCCAGCCAGATGATGCAATTTTGTTGGGTTTCGGTGACGGCGAG
CCTCGGGAACAACGATGAAGTAAATGCAAGCGGTGCGTTCCAGCATGGTTAGTTAGCTGATCTGTAGAAAA
AACAAAAATGAACATTAAACCATGCTAGCCTGGCGAACAGGTGGGTAAATCGTTCTCTCCAGCACCAGGCA
GGCCACGGGGTCTCCGGCGCGACCCTCGTAAAAATTGTCGCTATGATTGAAAACCATCACAGAGAGACGTT
CCCGGTGGCCGGCGTGAATGATTCGACAAGATGAATACACCCCCGGAACATTGGCGTCCGCGAGTGAAAA
AAAGCGCCCGAGGAAGCAATAAGGCACTACAATGCTCAGTCTCAAGTCCAGCAAAGCGATGCCATGCGGA
TGAAGCACAAAATTCTCAGGTGCGTACAAAATGTAATTACTCCCCTCCTGCACAGGCAGCAAAGCCCCCGA
TCCCTCCAGGTACACATACAAAGCCTCAGCGTCCATAGCTTACCGAGCAGCAGCACACAACAGGCGCAAG
AGTCAGAGAAAGGCTGAGCTCTAACCTGTCCACCCGCTCTCTGCTCAATATATAGCCCAGATCTACACTGA
CGTAAAGGCCAAAGTCTAAAAATACCCGCCAAATAATCACACACGCCCAGCACACGCCCAGAAACCGGTG
ACACACTCAAAAAAATACGCGCACTTCCTCAAACGCCCAAAACTGCCGTCATTTCCGGGTTCCCACGCTAC
GTCATCAAAACACGACTTTCAAATTCCGTCGACCGTTAAAAACGTCACCCGCCCCGCCCCTAACGGTCGCC
CGTCTCTCAGCCAATCAGCGCCCCGCATCCCCAAATTCAAACACCTCATTTGCATATTAACGCGCACAAAA
AGTTTGAGGTATATTATTGATGATG

【０４８５】

マウスの免疫監視

免疫したマウスの新しく収穫した脾臓及びリンパ節からリンパ球を単離した。ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ組織解離装置を製造者の指示にしたがって使用して、１０％ウシ胎児血清をペニシリン及びストレプトマイシンとともに含むＲＰＭＩ（完全ＲＰＭＩ）中で組織を解離させた。新しく単離したリンパ球を２～５×１０^{6}細胞／ｍＬの密度で１０ｕＭの示したペプチドと２時間インキュベートした。２時間後、ブレフェルジンＡを５ｕｇ／ｍｌの濃度にまで加え、細胞を刺激物質とさらに４時間インキュベートした。刺激後、生細胞を製造者のプロトコールにしたがって固定可能な生存率解析用色素ｅＦｌｕｏｒ７８０で標識し、抗ＣＤ８　ＡＰＣ（クローン５３－６．７，ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ社）により１：４００の希釈率で染色した。細胞内染色には抗ＩＦＮｇ　ＰＥ（クローンＸＭＧ１．２，ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ社）を１：１００で使用した。試料をＡｔｔｕｎｅ　ＮｘＴ Ｆｌｏｗ Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）で収集した。ＦｌｏｗＪｏを使用してフローサイトメトリーデータをプロットし、分析を行った。抗原特異的応答の程度を評価するため、ＣＤ８＋細胞のＩＦＮｇ＋の割合（％）及び全ＩＦＮｇ＋細胞数／１×１０^{6}個の生細胞の両方を、各ペプチド刺激物質に対して計算した。

【０４８６】

免疫監視ＮＨＰ

ＰＢＭＣを、プライムワクチン接種後の示された時点でＬｙｍｐｈｏｃｙｔｅ　Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎ　Ｍｅｄｉｕｍ（ＬＳＭ，ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ社）及びＬｅｕｃｏＳｅｐ分離チューブ（Ｇｒｅｉｎｅｒ　Ｂｉｏ－Ｏｎｅ社）を使用して単離し、１０％ＦＢＳ及びペニシリン／ストレプトマイシンを含んだＲＰＭＩに再懸濁した。細胞を、死細胞及びアポトーシス細胞を除外するためのヨウ化プロピジウム染色を使用してＡｔｔｕｎｅ　ＮｘＴフローサイトメーター（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ社）でカウントした。次に、その後の分析用に細胞を適当な生細胞の濃度に調整した。実験に用いたそれぞれのサルについて、ＥＬＩＳｐｏｔまたはフローサイトメトリー法を用いてＴ細胞応答を測定した。ワクチンにコードされた６種類の異なるアカゲザルＭａｍｕ－Ａ＊０１クラスＩエピトープに対するＴ細胞応答を、ＥＬＩＳｐｏｔ（ｅｘ ｖｉｖｏ ｅｎｚｙｍｅ－ｌｉｎｋｅｄ ｉｍｍｕｎｏｓｐｏｔ）（エクスビボ酵素結合免疫スポット）分析を用いてＩＦＮ－γなどのサイトカインの誘導を測定することにより、ＰＢＭＣから観測した。サルＩＦＮｇＥＬＩＳｐｏｔＰＬＵＳキット（ＭＡＢＴＥＣＨ社）を使用し、ＥＬＩＳＰＯＴハーモナイゼーションガイドライン｛ＤＯＩ：１０．１０３８／ｎｐｒｏｔ．２０１５．０６８｝にしたがってＥＬＩＳｐｏｔ分析を行った。２００，０００個のＰＢＭＣを、９６ウェルＩＦＮｇ抗体コーティングプレート中で、１０ｕＭの示したペプチドと１６時間インキュベートした。スポットをアルカリホスファターゼを用いて現像した。反応時間を１０分間計り、プレートに水道水を流して反応を停止させた。スポットをＡＩＤ ｖＳｐｏｔ Ｒｅ

ａｄｅｒ　Ｓｐｅｃｔｒｕｍを用いてカウントした。ＥＬＩＳＰＯＴ分析を行うため、飽和度が５０％よりも高いウェルを「多すぎてカウント不能」として記録した。複製ウェルの偏差が１０％よりも大きい試料は分析から除外した。次いでスポットのカウントを、式：スポットカウント＋２×（スポットカウント×コンフルエンス（％）／［１００％－コンフルエンス（％）］）を用いてウェルのコンフルエンシーについて補正した。ネガティブペプチド刺激ウェル中のスポットカウントを抗原刺激したウェルから引くことによってネガティブバックグラウンドを補正した。最後に、多すぎてカウント不能として示したウェルを、最も高い観察された補正値に設定し、１００の位までの概数に四捨五入した。

【０４８７】

結果

記載したように、モデルＴＳＮＡカセットＭＡＧ（ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー；配列番号２）を発現する急速増殖／適合ＣｈＡｄＶ６８ウイルスをプラーク単離で選択した。７０個の最初のプラークのうち、３３個が、ＣＰＥ（細胞変性効果）の何らかの徴候により示されるようにウイルスを産生し、これらのうち、８個が、７日間のインキュベーション後の顕著なプラーク数またはプラークのサイズによって示されるように残りのものよりも急速に増殖した。急速に増殖するクローンをウイルス生産用に４００ｍＬの２９３Ｆ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒカタログ番号Ａ１４５２８）浮遊培養中に選択した。感染単位（ＩＵ）力価を８個のクローンについて決定した。図２５に示されるように、選択したすべてのクローンが、未精製のプールされた基準ウイルス以上のＩＵ力価を示した。クローン１、２４、及び６０は、未精製のプールされた基準ウイルスに対してＩＵ力価の少なくとも９倍の増加を示した。

【０４８８】

クローン１、２４、及び６０（最も生産性の高いクローン）をＮＧＳによりさらに分析したところ、それぞれがＥ４領域に欠失を有することが示された。２つのクローン（クローン１Ａとクローン２４）がＥ４Ｏｒｆ２～Ｅ４Ｏｒｆ４の間、詳細には野生型ＣｈＡｄＶ６８ウイルス（配列番号１）の３４，９１６～３５，６４２ｂｐ間の同じ７２７ｂｐの変異（図２６）を共有していた。クローン６０は、Ｅ４Ｏｒｆ１～Ｅ４Ｏｒｆ３領域（３４，９８０～３６，５１６）に欠失があったが、欠失はより大きかった（１５３９ｂｐ）。これらの欠失に基づけば、Ｏｒｆ２及び３の欠失（３４，９７９～３５，６４２）は両方のクローンの組に共通であり、Ｏｒｆ２及び３の欠失が生産性の向上に寄与することが示唆された。

【０４８９】

クローン１Ａ及び２４で欠失されたＥ４領域の部分を欠失させた３つのＥ４欠失ウイルスベクターを作製し、Ｅ４を欠失させていないそれらの元のベクターと比較した。選択されたベクターは、１）カセットも調節領域（プロモーターまたはポリＡ）も有さないＣｈＡｄＶ－Ｅｍｐｔｙ（「Ｅｍｐｔｙ」）、２）ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＧＦＰ（配列番号１３；「ＧＦＰ」）、及び３）ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー（配列番号２；「ＭＡＧ」）であった。これらはいずれも、配列ＡＣ＿０００００１１．１に基づいたものであり、Ｅ１（ｎｔ５７７～３４０３）及びＥ３（ｎｔ２７，１２５～３１，８２５）を欠失させたものである［配列番号１］。これらを、本発明者らが特定したＥ４領域（配列番号１の３４，９１６～３５，６４２）を欠失させた同じベクターであるＣｈＡｄＶ６８－Ｅｍｐｔｙ－Ｅ４欠失（配列番号５９；「Ｅ４Δ」）、ＣｈＡｄＶ６８－ＧＦＰ－Ｅ４欠失（配列番号５８；「ＧＦＰ　Ｅ４Δ」）、及びＣｈＡｄＶ６８－ＭＡＧ－Ｅ４欠失（配列番号５７；「ＭＡＧ　Ｅ４Δ」及び「ＣｈＡｄＶ６８－ＭＡＧ－Ｅ４」）と、それぞれ比較した。これら６つのベクターを作製し、ウイルス粒子（ＶＰ）及び感染単位（ＩＵ）力価を決定した。生産性を４００ｍＬの生産スケールで評価した。図２７に示されるように、それぞれの比較で、Ｅ４欠失体は高いウイルス粒子力価（左パネル）及び感染単位力価（右パネル）を示した。

【０４９０】

ＭＡＧカセットの発現をＥ４欠失ベクターと非欠失ベクターとの間で比較した。図２８

に示されるように、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー（「ＭＡＧ」）及びＣｈＡｄＶ６８－ＭＡＧ－Ｅ４欠失（「ＭＡＧ－Ｅ４」）ウイルスを感染させたＨＥＫ２９３Ｆ細胞ライセートに対するウェスタン分析により、Ｅ４欠失ウイルスが非Ｅ４欠失ウイルスと比較してより高いレベルのＭＡＧカセットを発現することが示された。

【０４９１】

次いで、マウスを免疫してＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー（「ＣｈＡｄＶ６８－ＭＡＧ」）とそのＥ４欠失体であるＣｈＡｄＶ６８－ＭＡＧ－Ｅ４欠失（「ＣｈＡｄＶ６８－Ｅ４Δ」）とを比較した。Ｔ細胞応答を、ＡＨ１ペプチドによる刺激後にＩＣＳによりＩＦＮ－γの産生について分析した。図４２Ａ及び表４１Ａに示されるように、Ｅ４欠失ベクターは、試験した両方の用量（１×１０^{9} 左パネル、１×１０^{10}右パネル）で少なくとも同等の免疫応答を示し、Ｅ４欠失ベクターでは応答が高くなる正の傾向がみられた。

【表４１Ａ】

表４１Ａ－Ｅ４欠失ＣｈＡｄＶ６８によるＩＦＮ－γの産生（ＩＣＳ）

処理	用量	ＣＤ８の％としての平均ＩＦＮｇ＋	標準偏差	N
ChAdV68-MAG	1.00E+10	1.040875	0.211938	8
ChAdV68-E4Δ	1.00E+10	1.084125	0.213109	8
ChAdV68-MAG	1.00E+09	0.61575	0.202046	8
ChAdV68-E4Δ	1.00E+09	0.800125	0.189558	8

【０４９２】

次いで、アカゲザルをＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー（「ＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＶ－ＭＡＧ」；配列番号２）またはＣｈＡｄＶ６８－Ｅ４ｄ－ＣＭＴ－ＭＡＧ（配列番号７１）で免疫し、各群に抗ＣＴＬＡ４抗体（イピリムマブ）も投与した。Ｔ細胞応答を、６つの異なるアカゲザルＭａｍｕ－Ａ＊０１クラスＩエピトープによる刺激後に、ＥＬＩＳｐｏｔによりＩＦＮ－γの産生について分析した。図４２Ｂ及び図４２Ｃに示されるように、また、表４１Ｂ（ＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＶ－ＭＡＧ）及び表４１Ｃ（ＣｈＡｄＶ６８－Ｅ４ｄ－ＣＭＴ－ＭＡＧ）に定量化されているように、Ｅ４欠失ベクターによる免疫は少なくとも同等の免疫応答を示し、Ｅ４欠失ベクターでは応答が高くなる正の傾向がみられた。

【表４１Ｂ】

表４１Ｂ：表２５：ＣｈＡｄＶ６８－CMV－MAGについての各エピトープに対するＰＭＢＣ１０^{6}個当たりの平均スポット形成細胞（ＳＦＣ）±ＳＥＭ

週	抗原					
	Env CL9	Env TL9	Gag CM9	Gag LW9	Pol SV9	Tat TL8
1	531+/-131	950+/-215	654+/-216	14+/-6	12+/-0	1460+/-272
2	399+/-74	887+/-159	924+/-351	0+/-0	0+/-0	1986+/-434
3	312+/-101	616+/-155	675+/-212	0+/-0	0+/-0	1795+/-481
4	533+/-151	851+/-129	1011+/-207	10+/-7	73+/-12	2290+/-729

【表４１Ｃ】
表４１Ｃ：ＣｈＡｄＶ６８－Ｅ４ｄ－ＣＭＴ－ＭＡＧについての各エピトープに対するＰＭＢＣ１０^{6}個当たりの平均スポット形成細胞（ＳＦＣ）±ＳＥＭ

週	抗原					
	Env CL9	Env TL9	Gag CM9	Gag LW9	Pol SV9	Tat TL8
1	1037+/-285	966+/-287	1341+/-470	20+/-13	10+/-9	2777+/-1180
2	707+/-376	905+/-343	1217+/-543	0+/-0	0+/-0	1805+/-681
3	612+/-302	1038+/-361	1040+/-474	0+/-0	0+/-0	1906+/-462
4	1237+/-722	1282+/-665	1487+/-760	3+/-2	183+/-122	2084+/-943

【０４９３】
ＸＸＩ．ＴＥＴｒ－調節カセット発現システムの構築
ウイルス生産時のカセット（ワクチン中の抗原コードカセットなど）内にコードされた核酸の転写が最小となるようにＴＥＴｒ－調節ウイルス発現システムを確立した。図４３は、抗原コードワクチンの例を使用したテトラサイクリン制御ウイルス生産システムの一例の一般的なストラテジーを示す。すなわち、
－ＴＥＴリプレッサータンパク質（ＴＥＴｒ）を発現する２９３Ｆ細胞は、最小ＣＭＶプロモーターの上流のＴＥＴオペレーター配列に結合することによりワクチンカセットの発現を抑制する。
－カセット配列の転写は、カセット発現に影響することなくアデノウイルス産生を促進する。
－インビボ投与後、リプレッサーは存在せず、カセットの転写は阻害されることなく進行する。
【０４９４】
図４４Ａは、プロモーター及び発現させようとするカセットに関して、ＴＥＴ応答領域（「ＴＥＴｏ」応答領域と呼ばれる）の一例の配置を示す概略図を示す。ＴＥＴ応答領域は、各ＴＥＴｏ間のスペーサー（ａａａｇｔｇａａａｇｔｃｇａｇｔｔｔａｃｃａｃ；配列番号７０）で連結された１９ｂｐのＴＥＴオペレーター（ＴＥＴｏ）配列（ＴＣＣＣＴＡＴＣＡＧＴＧＡＴＡＧＡＧＡ；配列番号６０）の７個の反復配列で構成されている。ＴＥＴ応答領域は、最小ＣＭＶプロモーター（６７ｂｐ；配列番号６１を参照）及びカセット位置の開始点の上流（５’）にある。ＴＥＴｏ応答領域と各プロモーター配列の配置を、配列番号６１に示し、説明する。
【０４９５】
図４４Ｂは、プロモーター及び発現させようとするカセットに関して、ＴＥＴ応答領域（「ＣＭＴ」応答領域と呼ばれる）の一例の配置を示す概略図を示す。ＴＥＴ応答領域は、ヌクレオチド２個のスペーサーによって互いに連結された１９ｂｐのＴＥＴオペレーター（ＴＥＴｏ）配列（ＴＣＣＣＴＡＴＣＡＧＴＧＡＴＡＧＡＧＡ；配列番号６０）の２個の反復配列を含む。ＴＥＴ応答領域は完全長ＣＭＶプロモーター（６０５ｂｐ；配列番号６４を参照）の下流（３’）かつカセット位置の開始点の下流（５’）にある。ＣＭＴ応答領域と各プロモーター配列の配置を、配列番号６４に示し、説明する。
【０４９６】
ＴＥＴｏ応答領域を、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＧＦＰ（配列番号１３）のＩ－ＳｃｅＩとＡｓｉＳＩ部位の間に挿入してＣｈＡｄＶ６８－ＴＥＴｏ－ＧＦＰを作製した。ＴＥＴｒ配列（ｔＴＳ；配列番号６２）をレンチウイルスｐＬＸベクターにクローニングしてｐＬＸＣＭＶ－ｔＴＳ－ｉＰｕｒｏを作製し、２９３Ｆ細胞の形質導入に用いた。系の構築に用いた配列を下記に示す。クローン２９３Ｆ　ＴＥＴｒ株がプロマイシン選択後に生成された。ＧＦＰ導入遺伝子の発現を評価して、インビトロでＴＥＴｒ株による発現調節を評価した。図４５に示されるように、ＣｈＡｄＶ６８－ＴＥＴｏ－ＧＦＰウイルスによる感染後、ＧＦＰは、親２９３Ｆ細胞株（左パネル）と比較してＴＥＴｒを発現する２９３Ｆ細胞（クローン１７、右パネル）で有意に減少した。

【０４９７】

分泌型胎盤アルカリホスファターゼＳＥＡＰレポーターコンストラクトを、ＣｈＡｄＶ６８－Ｅｍｐｔｙ－Ｅ４欠失（配列番号５９）のＩ－ＳｃｅＩとＡｓｉＳＩ部位の間に挿入されたＣＭＴ応答領域、及び欠失させたＥ１の代わりに挿入されたＳＥＡＰ（「ＣｈＡｄＶ６８－Ｅ４ｄ－ＣＭＴ－ＳＥＡＰ」）を用いて作製した。２９３Ｆ細胞に０．３のＭＯＩで感染させ、２４時間後に培地を収穫して製造者の記載に従ってＳＥＡＰアッセイを行った（分泌されたアルカリホスファターゼの検出用に化学発光基質を使用するＰｈｏｓｐｈａ－Ｌｉｇｈｔ（商標）Ｓｙｓｔｅｍ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ））。図４５Ｂに示されるように、ＣｈＡｄＶ６８－Ｅ４ｄ－ＣＭＴ－ＳＥＡＰウイルスによる感染後、ＳＥＡＰ分泌は、ＴＥＴｒを発現する２９３Ｆ細胞（「ｔＴＳクローン１７」）でバックグラウンドレベルに対して１２０倍減少した。バックグラウンドレベルは親２９３Ｆ細胞株（「２９３Ｆ」）に対して、コントロール発現カセットを発現するＣｈＡｄＶ６８ベクターを使用して設定した。したがって、ＴＥＴｒ制御プロモーターから発現されたアデノウイルスカセットは、インビトロでＴＥＴｒ発現細胞株で使用した場合にカセット発現の減少を示している。

ＣｈＡｄＶ６８ベクター骨格のＩ－ＳｃｅＩとＡｓｉＳＩ部位間のＴＥＴｏ応答領域(配列番号61) １９ｂｐのＴＥＴｏ配列の７個の反復配列のうちの１つを太字のイタリック体で示す。最小ＣＭＶプロモーターを太字で示す。
Ccatgttgacattgattattgactagttattaaagtact***tccctatcagtgatagaga***aaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagctcggtacccgggtcga**ggtaggcgtgtacggtgggaggcctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgcctggag**
TETr配列(tTS)の核酸配列(配列番号62)
ATGAGCAGACTGGACAAGAGCAAAGTGATCAACAGCGCCCTGGAACTGCTGAACGAAGTGGGCATCGAGGGCCTGACAACCAGAAAGCTGGCCCAGAAGCTGGGCGTTGAGCAGCCTACACTGTATTGGCACGTGCGGAACAAGCAGACCCTGATGAATATGCTGAGCGAGGCCATCCTGGCCAAGCACCATACAAGATCTGCCCCTCTGCCAACCGAGAGCTGGCAGCAGTTTCTGCAAGAGAACGCCCTGAGCTTCAGAAAGGCCCTGCTGGTGCATAGAGATGGCGCCAGACTGCACATCGGCACATCTCCCACACCTCCACAGTTTGAGCAGGCTGAGGCACAGCTGAGATGTCTGTGTGATGCCGGCTTTAGCGTGGAAGAGGCCCTGTTCATCCTGCAGTCCATCAGCCACTTTACACTGGGCGCCGTGCTGGAAGAACAGGCCACCAACCAGATCGAGAACAACCACGTGATCGACGCTGCCCCTCCACTGCTGCAAGAGGCCTTCAATATCCAAGCCAGAACCAGCGCCGAGATGGCCTTCCACTTTGGCCTGAAGTCCCTGATCTTTGGCTTCAGCGCCCAGCTGGACGAGAAGAAGCACACACCTATCGAGGACGGCAACAAGCCCAAGAAGAAGCGGAAGCTGGCCGTCAGCGTGACCTTTGAAGATGTGGCCGTGCTGTTCACCCGGGACGAGTGGAAGAAACTGGACCTGAGCCAGCGGAGCCTGTACCGGGAAGTGATGCTGGAAAACTACAGCAACCTGGCCTCCATGGCCGGCTTTCTGTTCACCAAGCCTAAAGTGATCTCCCTGCTTCAGCAGGGCGAAGATCCTTGGTAA
TETr配列(tTS)のアミノ酸配列(配列番号63)
MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVRNKQTLMNMLSEAILAKHHTRSAPLPTESWQQFLQENALSFRKALLVHRDGARLHIGTSPTPPQFEQAEAQLRCLCDAGFSVEEALFILQSISHFTLGAVLEEQATNQIENNHVIDAAPPLLQEAFNIQARTSAEMAFHFGLKSLIFGFSAQLDEKKHTPIEDGNKPKKKRKLAVSVTFEDVAVLFTRDEWKKLDLSQRSLYREVMLENYSNLASMAGFLFTKPKVISLLQQGEDPW
ＣｈＡｄＶ６８ベクター骨格のＩ－ＳｃｅＩとＡｓｉＳＩ部位間のＣＭＴ応答領域(配列番号64) １９ｂｐのＴＥＴｏ配列の２個の反復配列を太字で示す。完全長ＣＭＶプロモーターをイタリック体で示す。
GACATTGATTATTGACTAGTTGTTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCG*CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT*C**TCCCTATCAGTGATAGAGA**TC**TCCCTATCAGTGATAGAGA**TC

【０４９８】

ＸＸＩＩ．ＴＥＴｒ調節カセット発現系におけるウイルス生産

ＴＥＴｏ応答領域を、ＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー（「ＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＶ－ＭＡＧ」；配列番号２）のＩ－ＳｃｅＩとＡｓｉＳＩ部位の間に挿入して、ＴＥＴ調節プロモーターの制御下でモデル抗原カセットを発現するＣｈＡｄＶ６８－Ｔ

ＥＴｏ－ＭＡＧウイルス（配列番号６５）を作製した。ウイルス生産をＴＥＴｒを発現する細胞株（クローン１７）とＴＥＴｒを発現しない親細胞株（２９３Ｆ）との間で比較した。図４６に示されるように、ウイルス生産は３つの独立した複製実験でウイルス粒子（ＶＰ；上のパネル）及び感染単位（ＩＵ；下のパネル）により評価されるように向上した。

【０４９９】

ＴＥＴｒを発現する細胞株（クローン１７）で産生されたＣｈＡｄＶ６８－ＴＥＴｏ－ＭＡＧウイルスのウイルス生産を、ＴＥＴｏ配列を欠くウイルス（「ＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＶ－ＭＡＧ」）に対しても比較した。図４７Ａに示されるように、ウイルス生産は、ＣｈＡｄＶ６８－ＴＥＴｏ－ＭＡＧでは、ｈＡｄＶ６８－ＣＭＶ－ＭＡＧに対して３．４倍向上した。これらの結果は、送達されたカセット導入遺伝子のインビトロ発現の減少が、より安定し、改善されたウイルス生産性を示しているを示すものである。

【０５００】

ＴＥＴｒを発現する細胞株（ｔＴｓクローン１７）で産生されるウイルス生産を、Ｅ４欠失及びＴＥＴ応答エレメントを有するコンストラクトを含む一連のウイルスコンストラクトにおいてさらに比較した。これらのコンストラクトはいずれも、同じコントロール腫瘍特異的新生抗原（ＴＳＮＡ）カセットを発現するものとした。Ｅ１／Ｅ３欠失及び／または５個のヌクレオチド置換を有する一般的な骨格はＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー　（配列番号２）と同じであり、示されるようにＩ－ＳｃｅＩとＡｓｉＳＩ部位の間にＴＥＴｏ及びＣＭＴ応答領域を挿入し、ＭＡＧ２５マーカセットをＴＳＮＡカセットに置換した。欠失させたＥ４領域は上記で特定されたものとした（配列番号１の欠失３４，９１６～３５，６４２）。検討した異なるコンストラクトを以下に示す。

－ＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＶ－ＴＳＮＡ：Ｅ１／Ｅ３欠失、完全長ＣＭＶプロモーター

－ＣｈＡｄＶ６８－ＣＴ－ＴＳＮＡ：Ｅ１／Ｅ３欠失、完全長ＣＭＶプロモーター、代替的コドン最適化を用いてコドン最適化されたＴＳＮＡカセット（配列番号６６）

－ＣｈＡｄＶ６８－ＴＥＴｏ－ＴＳＮＡｄ：Ｅ１／Ｅ３欠失、最小ＣＭＶプロモーターの上流（５’）の、スペーサーにより連結されたＴＥＴｏの７個の反復配列（「ＴＥＴｏ」応答領域）（配列番号６７）

－ＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＴ－ＴＳＮＡ：Ｅ１／Ｅ３欠失、完全長ＣＭＶプロモーターの下流（３’）の、互いに直接連結されたＴＥＴｏの２個の反復配列（「ＣＭＴ」応答領域）（配列番号６８）

－ＣｈＡｄＶ６８－Ｅ４ｄ－ＣＭＴ－ＴＳＮＡ：Ｅ１／Ｅ３／Ｅ４欠失、完全長ＣＭＶプロモーターの下流（３’）の、互いに直接連結されたＴＥＴｏの２個の反復配列（配列番号６９）

【０５０１】

図４７Ｂに示されるように、ＣｈＡｄＶ６８－ＣＴ－ＴＳＮＡ、ＣｈＡｄＶ６８－ＴＥＴｏ－ＴＳＮＡ、ＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＴ－ＴＳＮＡ、及びＣｈＡｄＶ６８－Ｅ４ｄ－ＣＭＴ－ＴＳＮＡウイルスのウイルス生産は、ＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＶ－ＴＳＮＡに対してそれぞれ、約６倍、３９倍、１３７倍、または３００倍、向上した。ウイルスの感染能力を測定するために感染単位に対するウイルス粒子の比をさらに評価し、ウイルス粒子（ＶＰ）力価／ｍＬを感染単位（ＩＵ）力価／ｍＬで割ることによって計算した。この比が低いほど、粒子当たりの感染性が高いことを示す（１：１の比は、すべての粒子が感染性である完全比を示す）。表４２Ａに示されるように、ＴＥＴ制御されたベクターであるＣｈＡｄＶ６８－ＴＥＴｏ－ＴＳＮＡ、ＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＴ－ＴＳＮＡ、及びＣｈＡｄＶ６８－Ｅ４ｄ－ＣＭＴ－ＴＳＮＡはいずれも、ＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＶ－ＴＳＮＡと比較して向上した感染能力を示し、ＣＭＴベクターが最も高い感染能力を示した。

【０５０２】

Ｅ４欠失及びＴＥＴ応答領域を有するコンストラクトを含む、別の一連のウイルスコンストラクトのウイルス生産を、大型のモデル抗原カセット（５０ＸＸＬ；図２９及び表３２～３４を参照）またはＭ２．２モデル抗原カセットのいずれかを有するコンストラクトについて評価した。Ｅ１／Ｅ３欠失及び／または５個のヌクレオチド置換を有する一般的

な骨格はＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー （配列番号２）と同じであり、示されるようにＩ－ＳｃｅＩとＡｓｉＩ部位の間にＴＥＴｏ及びＣＭＴ応答領域を挿入し、ＭＡＧ２５マーカセットを、示したカセットに置換した。欠失させたＥ４領域は上記で特定されたものとした（配列番号１の欠失３４，９１６～３５，６４２）。検討した異なるコンストラクトを以下に示す。

－ＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＶ－５０ＸＸＬ：Ｅ１／Ｅ３欠失、完全長ＣＭＶプロモーター、Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔコドン最適化ツールを用いてコドン最適化された５０ＸＸＬカセット

－ＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＴ－５０ＸＸＬ：Ｅ１／Ｅ３欠失、完全長ＣＭＶプロモーターの下流（３’）の、互いに直接連結されたＴＥＴｏの２個の反復配列、Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔコドン最適化ツールを用いてコドン最適化された５０ＸＸＬカセット

－ＣｈＡｄＶ６８－ＣＴ－５０ＸＸＬ：Ｅ１／Ｅ３欠失、完全長ＣＭＶプロモーター、代替的コドン最適化ツールを用いてコドン最適化された５０ＸＸＬカセット

－ＣｈＡｄＶ６８－Ｅ４ｄ－ＣＭＴ－５０ＸＸＬ：Ｅ１／Ｅ３／Ｅ４欠失、完全長ＣＭＶプロモーターの下流（３’）の、互いに直接連結されたＴＥＴｏの２個の反復配列、Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔコドン最適化ツールを用いてコドン最適化された５０ＸＸＬカセット

－ＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＶ－Ｍ２．２：Ｅ１／Ｅ３欠失、完全長ＣＭＶプロモーター、Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔコドン最適化ツールを用いてコドン最適化されたＭ２．２カセット

－ＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＴ－Ｍ２．２：Ｅ１／Ｅ３欠失、完全長ＣＭＶプロモーターの下流（３’）の、互いに直接連結されたＴＥＴｏの２個の反復配列、Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔコドン最適化ツールを用いてコドン最適化されたＭ２．２カセット

－ＣｈＡｄＶ６８－Ｅ４ｄ－ＣＭＴ－Ｍ２．２：Ｅ１／Ｅ３／Ｅ４欠失、完全長ＣＭＶプロモーターの下流（３’）の、互いに直接連結されたＴＥＴｏの２個の反復配列、Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔコドン最適化ツールを用いてコドン最適化されたＭ２．２カセット

【０５０３】

図４７Ｃに示されるように、モデル抗原カセット５０ＸＸＬ及びＭ２．２のウイルス生産は、ｔＴｓ発現細胞株でＣＭＴ応答領域を有するアデノウイルスベクターを使用することにより改善された。例えば、ウイルス生産は、ＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＴ－５０ＸＸＬでは親２９３Ｆ細胞株（左パネル、左から２番目の柱）に対してｔＴｓ発現細胞株でおよそ１０倍高く（左パネル、中央の柱）、親２９３Ｆ細胞株におけるＣＭＴ応答領域を欠くベクター（右パネル；左の柱）に対してＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＴ－Ｍ２．２では１５倍高かった（右パネル、中央の柱）。５０ＸＸＬコンストラクトの場合、ＣＭＴ応答領域をＥ４欠失と組み合わせることにより、ウイルス生産のさらなる改善が実現された（左パネルの右の柱に対して左パネルの中央の柱）。改善は代替的コドン最適化により特定の状況下でも実現された（ＣｈＡｄＶ６８－ＣＴ－５０ＸＸＬに示される）。感染単位に対するウイルス粒子の比も評価した。表４２Ｃに示されるように、Ｅ４欠失バックグラウンドでのＴＥＴ制御されたベクターはいずれも、Ｅ４欠失及びＴＥＴ応答エレメントのないベクターと比較して改善された感染能力を示した。

【表４２Ａ】

表４２Ａ－ＴＳＮＡコンストラクトのウイルス粒子／感染単位比

コンストラクト	VP:IU比
ChAdV68-CMV-TSNA	591:1
ChAdV68-CT-TSNA	63:1
ChAdV68-TETo-TSNA	135:1
ChAdV68-CMT-TSNA	22:1
ChAdV68-E4d-CMT-TSNA	34:1

【表４２Ｂ】

表４２Ｂ－５０ＸＸＬコンストラクトのウイルス粒子／感染単位比

コンストラクト	VP:IU比
ChAdV68-CMV-50XXL	260:1
ChAdV68-E4d-CMT-50XXL	32:1
ChAdV68-CMV-M2.2	662:1
ChAdV68-E4d-CMT-M2.2	50:1

ChAdV68-TETo-MAG (配列番号65)
CATCATCAATAATATACCTCAAACTTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTGAATTTGGGGAGGA AGGGCGGTGATTGGTCGAGGGATGAGCGACCGTTAGGGGCGGGGCGAGTGACGTTTTGATGACGTGGTTG CGAGGAGGAGCCAGTTTGCAAGTTCTCGTGGGAAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTTGAACACGGAA ATACTCAATTTTCCCGCGCTCTCTGACAGGAAATGAGGTGTTTCTGGGCGGATGCAAGTGAAAACGGGCCA TTTTCGCGCGAAAACTGAATGAGGAAGTGAAAATCTGAGTAATTTCGCGTTTATGGCAGGGAGGAGTATTT GCCGAGGGCCGAGTAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTACCGTGTTTTTCACCTAAATTTCCGC GTACGGTGTCAAAGTCCGGTGTTTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGCCAGGGTATTTAAACCTGCGCTCTCC AGTCAAGAGGCCACTCTTGAGTGCCAGCGAGAAGAGTTTTCTCCTCCGCGCCGCGAGTCAGATCTACACTT TGAAAGTAGGGATAACAGGGTAATCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAAAGTACTTCCCTATCA

10

20

30

40

50

GTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTA
CCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTG
AAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTG
ATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGCTCGGT
ACCCGGGTCGAGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC
GCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACAGCGATCGCGCCACCATGGCCGGGATGT
TCCAGGCACTGTCCGAAGGCTGCACACCCTATGATATTAACCAGATGCTGAATGTCCTGGGAGACCACCAG
GTCTCTGGCCTGGAGCAGCTGGAGAGCATCATCAACTTCGAGAAGCTGACCGAGTGGACAAGCTCCAATGT
GATGCCTATCCTGTCCCCACTGACCAAGGGCATCCTGGGCTTCGTGTTTACCCTGACAGTGCCTTCTGAGCG
GGGCCTGTCTTGCATCAGCGAGGCAGACGCAACCACACCAGAGTCCGCCAATCTGGGCGAGGAGATCCTGT
CTCAGCTGTACCTGTGGCCCCGGGTGACATATCACTCCCCTTCTTACGCCTATCACCAGTTCGAGCGGAGAG
CCAAGTACAAGAGACACTTCCCAGGCTTTGGCCAGTCTCTGCTGTTCGGCTACCCCGTGTACGTGTTCGGCG
ATTGCGTGCAGGGCGACTGGGATGCCATCCGGTTTAGATACTGCGCACCACCTGGATATGCACTGCTGAGG
TGTAACGACACCAATTATTCCGCCCTGCTGGCAGTGGGCGCCCTGGAGGGCCCTCGCAATCAGGATTGGCT
GGGCGTGCCAAGGCAGCTGGTGACACGCATGCAGGCCATCCAGAACGCAGGCCTGTGCACCCTGGTGGCA
ATGCTGGAGGAGACAATCTTCTGGCTGCAGGCCTTTCTGATGGCCCTGACCGACAGCGGCCCCAAGACAAA
CATCATCGTGGATTCCCAGTACGTGATGGGCATCTCCAAGCCTTCTTTCCAGGAGTTTGTGGACTGGGAGAA
CGTGAGCCCAGAGCTGAATTCCACCGATCAGCCATTCTGGCAGGCAGGAATCCTGGCAAGGAACCTGGTGC
CTATGGTGGCCACAGTGCAGGGCCAGAATCTGAAGTACCAGGGCCAGAGCCTGGTCATCAGCGCCTCCATC
ATCGTGTTTAACCTGCTGGAGCTGGAGGGCGACTATCGGGACGATGGCAACGTGTGGGTGCACACCCCACT
GAGCCCCAGAACACTGAACGCCTGGGTGAAGGCCGTGGAGGAGAAGAAGGGCATCCCAGTGCACCTGGAG
CTGGCCTCCATGACCAATATGGAGCTGATGTCTAGCATCGTGCACCAGCAGGTGAGGACATACGGACCCGT
GTTCATGTGCCTGGGAGGCCTGCTGACCATGGTGGCAGGAGCCGTGTGGCTGACAGTGCGGGTGCTGGAGC
TGTTCAGAGCCGCCCAGCTGGCCAACGATGTGGTGCTGCAGATCATGGAGCTGTGCGGAGCAGCCTTTCGC
CAGGTGTGCCACACCACAGTGCCATGGCCCAATGCCTCCCTGACCCCCAAGTGGAACAATGAGACAACACA
GCCTCAGATCGCCAACTGTAGCGTGTACGACTTCTTCGTGTGGCTGCACTACTATAGCGTGAGGGATACCCT
GTGGCCCCGCGTGACATACCACATGAATAAGTACGCCTATCACATGCTGGAGAGGCGCGCCAAGTATAAG
AGAGGCCCTGGCCCAGGCGCAAAGTTTGTGGCAGCATGGACCCTGAAGGCCGCCGCCGGCCCCGGCCCCG
GCCAGTATATCAAGGCTAACAGTAAGTTCATTGGAATCACAGAGCTGGGACCCGGACCTGGATAATGAGTT
TAAACTCCCATTTAAATGTGAGGGTTAATGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACA
AACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAAC
CATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGA
TGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATAACTATAACGGTCCTAAGGTAG
CGAGTGAGTAGTGTTCTGGGGCGGGGGAGGACCTGCATGAGGGCCAGAATAACTGAAATCTGTGCTTTTCT
GTGTGTTGCAGCAGCATGAGCGGAAGCGGCTCCTTTGAGGGAGGGGTATTCAGCCCTTATCTGACGGGGCG
TCTCCCCTCCTGGGCGGGAGTGCGTCAGAATGTGATGGGATCCACGGTGGACGGCCGGCCCGTGCAGCCCG
CGAACTCTTCAACCCTGACCTATGCAACCCTGAGCTCTTCGTCGTTGGACGCAGCTGCCGCCGCAGCTGCTG
CATCTGCCGCCAGCGCCGTGCGCGGAATGGCCATGGGCGCCGGCTACTACGGCACTCTGGTGGCCAACTCG
AGTTCCACCAATAATCCCGCCAGCCTGAACGAGGAGAAGCTGTTGCTGCTGATGGCCCAGCTCGAGGCCTT
GACCCAGCGCCTGGGCGAGCTGACCCAGCAGGTGGCTCAGCTGCAGGAGCAGACGCGGGCCGCGGTTGCC
ACGGTGAAATCCAAATAAAAAATGAATCAATAAATAAACGGAGACGGTTGTTGATTTTAACACAGAGTCTG
AATCTTTATTTGATTTTTCGCGCGCGGTAGGCCCTGGACCACCGGTCTCGATCATTGAGCACCCGGTGGATC
TTTTCCAGGACCCGGTAGAGGTGGGCTTGGATGTTGAGGTACATGGGCATGAGCCCGTCCCGGGGGTGGAG
GTAGCTCCATTGCAGGGCCTCGTGCTCGGGGGTGGTGTTGTAAATCACCCAGTCATAGCAGGGGCGCAGGG
CATGGTGTTGCACAATATCTTTGAGGAGGAGACTGATGGCCACGGGCAGCCCTTTGGTGTAGGTGTTTACA
AATCTGTTGAGCTGGGAGGGATGCATGCGGGGGGAGATGAGGTGCATCTTGGCCTGGATCTTGAGATTGGC
GATGTTACCGCCCAGATCCCGCCTGGGGTTCATGTTGTGCAGGACCACCAGCACGGTGTATCCGGTGCACT
TGGGGAATTTATCATGCAACTTGGAAGGGAAGGCGTGAAAGAATTTGGCGACGCCTTTGTGCCCGCCCAGG
TTTTCCATGCACTCATCCATGATGATGGCGATGGGCCCGTGGGCGGCGGCCTGGGCAAAGACGTTTCGGGG
GTCGGACACATCATAGTTGTGGTCCTGGGTGAGGTCATCATAGGCCATTTTAATGAATTTGGGGCGGAGGG
TGCCGGACTGGGGGACAAAGGTACCCTCGATCCCGGGGGCGTAGTTCCCCTCACAGATCTGCATCTCCCAG
GCTTTGAGCTCGGAGGGGGGGATCATGTCCACCTGCGGGGCGATAAAGAACACGGTTTCCGGGGCGGGGG
AGATGAGCTGGGCCGAAAGCAAGTTCCGGAGCAGCTGGGACTTGCCGCAGCCGGTGGGGCCGTAGATGAC
CCCGATGACCGGCTGCAGGTGGTAGTTGAGGGAGAGACAGCTGCCGTCCTCCCGGAGGAGGGGGGCCACC
TCGTTCATCATCTCGCGCACGTGCATGTTCTCGCGCACCAGTTCCGCCAGGAGGCGCTCTCCCCCCAGGGAT
AGGAGCTCCTGGAGCGAGGCGAAGTTTTTCAGCGGCTTGAGTCCGTCGGCCATGGGCATTTTGGAGAGGGT
TTGTTGCAAGAGTTCCAGGCGGTCCCAGAGCTCGGTGATGTGCTCTACGGCATCTCGATCCAGCAGACCTC
CTCGTTTCGCGGGTTGGGACGGCTGCGGGAGTAGGGCACCAGACGATGGGCGTCCAGCGCAGCCAGGGTC
CGGTCCTTCCAGGGTCGCAGCGTCCGCGTCAGGGTGGTCTCCGTCACGGTGAAGGGGTGCGCGCCGGGCTG
GGCGCTTGCGAGGGTGCGCTTCAGGCTCATCCGGCTGGTCGAAAACCGCTCCCGATCGGCGCCCTGCGCGT
CGGCCAGGTAGCAATTGACCATGAGTTCGTAGTTGAGCGCCTCGGCCGCGTGGCCTTTGGCGCGGAGCTTA
CCTTTGGAAGTCTGCCCGCAGGCGGGACAGAGGAGGGACTTGAGGGCGTAGAGCTTGGGGGCGAGGAAGA
CGGACTCGGGGGCGTAGGCGTCCGCGCCGCAGTGGGCGCAGACGGTCTCGCACTCCACGAGCCAGGTGAG
GTCGGGCTGGTCGGGGTCAAAAACCAGTTTCCCGCCGTTCTTTTTGATGCGTTTCTTACCTTTGGTCTCCATG
AGCTCGTGTCCCCGCTGGGTGACAAAGAGGCTGTCCGTGTCCCCGTAGACCGACTTTATGGGCCGGTCCTC
GAGCGGTGTGCCGCGGTCCTCCTCGTAGAGGAACCCCGCCCACTCCGAGACGAAAGCCCGGGTCCAGGCC
AGCACGAAGGAGGCCACGTGGGACGGGTAGCGGTCGTTGTCCACCAGCGGGTCCACCTTTTCCAGGGTATG

CAAACACATGTCCCCCTCGTCCACATCCAGGAAGGTGATTGGCTTGTAAGTGTAGGCCACGTGACCGGGGG
TCCCGGCCGGGGGGGTATAAAAGGGTGCGGGTCCCTGCTCGTCCTCACTGTCTTCCGGATCGCTGTCCAGG
AGCGCCAGCTGTTGGGGTAGGTATTCCCTCTCGAAGGCGGGCATGACCTCGGCACTCAGGTTGTCAGTTTCT
AGAAACGAGGAGGATTTGATATTGACGGTGCCGGCGGAGATGCCTTTCAAGAGCCCCTCGTCCATCTGGTC
AGAAAAGACGATCTTTTTGTTGTCGAGCTTGGTGGCGAAGGAGCCGTAGAGGGCGTTGGAGAGGAGCTTGG
CGATGGAGCGCATGGTCTGGTTTTTTTCCTTGTCGGCGCGCTCCTTGGCGGCGATGTTGAGCTGCACGTACT
CGCGCGCCACGCACTTCCATTCGGGGAAGACGGTGGTCAGCTCGTCGGGCACGATTCTGACCTGCCAGCCC
CGATTATGCAGGGTGATGAGGTCCACACTGGTGGCCACCTCGCCGCGCAGGGGCTCATTAGTCCAGCAGAG
GCGTCCGCCCTTGCGCGAGCAGAAGGGGGGCAGGGGGTCCAGCATGACCTCGTCGGGGGGGTCGGCATCG
ATGGTGAAGATGCCGGGCAGGAGGTCGGGGTCAAAGTAGCTGATGGAAGTGGCCAGATCGTCCAGGGCAG
CTTGCCATTCGCGCACGGCCAGCGCGCGCTCGTAGGGACTGAGGGGCGTGCCCCAGGGCATGGGATGGGT
AAGCGCGGAGGCGTACATGCCGCAGATGTCGTAGACGTAGAGGGGCTCCTCGAGGATGCCGATGTAGGTG
GGGTAGCAGCGCCCCCCGCGGATGCTGGCGCGCACGTAGTCATACAGCTCGTGCGAGGGGGCGAGGAGCC
CCGGGCCCAGGTTGGTGCGACTGGGCTTTTCGGCGCGGTAGACGATCTGGCGGAAAATGGCATGCGAGTTG
GAGGAGATGGTGGGCCTTTGGAAGATGTTGAAGTGGGCGTGGGGCAGTCCGACCGAGTCGCGGATGAAGT
GGGCGTAGGAGTCTTGCAGCTTGGCGACGAGCTCGGCGGTGACTAGGACGTCCAGAGCGCAGTAGTCGAG
GGTCTCCTGGATGATGTCATACTTGAGCTGTCCCTTTTGTTTCCACAGCTCGCGGTTGAGAAGGAACTCTTC
GCGGTCCTTCCAGTACTCTTCGAGGGGGAACCCGTCCTGATCTGCACGGTAAGAGCCTAGCATGTAGAACT
GGTTGACGGCCTTGTAGGCGCAGCAGCCCTTCTCCACGGGGAGGGCGTAGGCCTGGGCGGCCTTGCGCAGG
GAGGTGTGCGTGAGGGCGAAAGTGTCCCTGACCATGACCTTGAGGAACTGGTGCTTGAAGTCGATATCGTC
GCAGCCCCCCTGCTCCCAGAGCTGGAAGTCCGTGCGCTTCTTGTAGGCGGGGTTGGGCAAAGCGAAAGTAA
CATCGTTGAAGAGGATCTTGCCCGCGCGGGGCATAAAGTTGCGAGTGATGCGGAAAGGTTGGGGCACCTCG
GCCCGGTTGTTGATGACCTGGGCGGCGAGCACGATCTCGTCGAAGCCGTTGATGTTGTGGCCCACGATGTA
GAGTTCCACGAATCGCGGACGGCCCTTGACGTGGGGCAGTTTCTTGAGCTCCTCGTAGGTGAGCTCGTCGG
GGTCGCTGAGCCCGTGCTGCTCGAGCGCCCAGTCGGCGAGATGGGGGTTGGCGCGGAGGAAGGAAGTCCA
GAGATCCACGGCCAGGGCGGTTTGCAGACGGTCCCGGTACTGACGGAACTGCTGCCCGACGGCCATTTTTT
CGGGGGTGACGCAGTAGAAGGTGCGGGGGTCCCCGTGCCAGCGATCCCATTTGAGCTGGAGGGCGAGATC
GAGGGCGAGCTCGACGAGCCGGTCGTCCCCGGAGAGTTTCATGACCAGCATGAAGGGGACGAGCTGCTTG
CCGAAGGACCCCATCCAGGTGTAGGTTTCCACATCGTAGGTGAGGAAGAGCCTTTCGGTGCGAGGATGCGA
GCCGATGGGGAAGAACTGGATCTCCTGCCACCAATTGGAGGAATGGCTGTTGATGTGATGGAAGTAGAAAT
GCCGACGGCGCGCCGAACACTCGTGCTTGTGTTTATACAAGCGGCCACAGTGCTCGCAACGCTGCACGGGA
TGCACGTGCTGCACGAGCTGTACCTGAGTTCCTTTGACGAGGAATTTCAGTGGGAAGTGGAGTCGTGGCGC
CTGCATCTCGTGCTGTACTACGTCGTGGTGGTCGGCCTGGCCCTCTTCTGCCTCGATGGTGGTCATGCTGAC
GAGCCCGCGCGGGAGGCAGGTCCAGACCTCGGCGCGAGCGGGTCGGAGAGCGAGGACGAGGGCGCGCAG
GCCGGAGCTGTCCAGGGTCCTGAGACGCTGCGGAGTCAGGTCAGTGGGCAGCGGCGGCGCGCGGTTGACT
TGCAGGAGTTTTTCCAGGGCGCGCGGGAGGTCCAGATGGTACTTGATCTCCACCGCGCCATTGGTGGCGAC
GTCGATGGCTTGCAGGGTCCCGTGCCCCTGGGGTGTGACCACCGTCCCCCGTTTCTTCTTGGGCGGCTGGGG
CGACGGGGGCGGTGCCTCTTCCATGGTTAGAAGCGGCGGCGAGGACGCGCGCCGGGCGGCAGGGGCGGCT
CGGGGCCCGGAGGCAGGGGCGGCAGGGGCACGTCGGCGCCGCGCGCGGGTAGGTTCTGGTACTGCGCCCG
GAGAAGACTGGCGTGAGCGACGACGCGACGGTTGACGTCCTGGATCTGACGCCTCTGGGTGAAGGCCACG
GGACCCGTGAGTTTGAACCTGAAAGAGAGTTCGACAGAATCAATCTCGGTATCGTTGACGGCGGCCTGCCG
CAGGATCTCTTGCACGTCGCCCGAGTTGTCCTGGTAGGCGATCTCGGTCATGAACTGCTCGATCTCCTCCTC
TTGAAGGTCTCCGCGGCCGGCGCGCTCCACGGTGGCCGCGAGGTCGTTGGAGATGCGGCCCATGAGCTGCG
AGAAGGCGTTCATGCCCGCCTCGTTCCAGACGCGGCTGTAGACCACGACGCCCTCGGGATCGCGGGCGCGC
ATGACCACCTGGGCGAGGTTGAGCTCCACGTGGCGCGTGAAGACCGCGTAGTTGCAGAGGCGCTGGTAGA
GGTAGTTGAGCGTGGTGGCGATGTGCTCGGTGACGAAGAAATACATGATCCAGCGGCGGAGCGGCATCTC
GCTGACGTCGCCCAGCGCCTCCAAACGTTCCATGGCCTCGTAAAAGTCCACGGCGAAGTTGAAAAACTGGG
AGTTGCGCGCCGAGACGGTCAACTCCTCCTCCAGAAGACGGATGAGCTCGGCGATGGTGGCGCGCACCTCG
CGCTCGAAGGCCCCCGGGAGTTCCTCCACTTCCTCTTCTTCCTCCTCCACTAACATCTCTTCTACTTCCTCCT
CAGGCGGCAGTGGTGGCGGGGGAGGGGGCCTGCGTCGCCGGCGGCGCACGGGCAGACGGTCGATGAAGC
GCTCGATGGTCTCGCCGCGCCGGCGTCGCATGGTCTCGGTGACGGCGCGCCCGTCCTCGCGGGGCCGCAGC
GTGAAGACGCCGCCGCGCATCTCCAGGTGGCCGGGGGGGTCCCCGTTGGGCAGGGAGAGGGCGCTGACGA
TGCATCTTATCAATTGCCCCGTAGGGACTCCGCGCAAGGACCTGAGCGTCTCGAGATCCACGGGATCTGAA
AACCGCTGAACGAAGGCTTCGAGCCAGTCGCAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACGGTTTCTTCTGGCGGGTC
ATGTTGGTTGGGAGCGGGGCGGGCGATGCTGCTGGTGATGAAGTTGAAATAGGCGGTTCTGAGACGGCGG
ATGGTGGCGAGGAGCACCAGGTCTTTGGGCCCGGCTTGCTGGATGCGCAGACGGTCGGCCATGCCCCAGGC
GTGGTCCTGACACCTGGCCAGGTCCTTGTAGTAGTCCTGCATGAGCCGCTCCACGGGCACCTCCTCCTCGCC
CGCGCGGCCGTGCATGCGCGTGAGCCCGAAGCCGCGCTGGGGCTGGACGAGCGCCAGGTCGGCGACGACG
CGCTCGGCGAGGATGGCTTGCTGGATCTGGGTGAGGGTGGTCTGGAAGTCATCAAAGTCGACGAAGCGGTG
GTAGGCTCCGGTGTTGATGGTGTAGGAGCAGTTGGCCATGACGGACCAGTTGACGGTCTGGTGGCCCGGAC
GCACGAGCTCGTGGTACTTGAGGCGCGAGTAGGCGCGCGTGTCGAAGATGTAGTCGTTGCAGGTGCGCACC
AGGTACTGGTAGCCGATGAGGAAGTGCGGCGGCGGCTGGCGGTAGAGCGGCCATCGCTCGGTGGCGGGGG
CGCCGGGCGCGAGGTCCTCGAGCATGGTGCGGTGGTAGCCGTAGATGTACCTGGACATCCAGGTGATGCCG
GCGGCGGTGGTGGAGGCGCGCGGGAACTCGCGGACGCGGTTCCAGATGTTGCGCAGCGGCAGGAAGTAGT
TCATGGTGGGCACGGTCTGGCCCGTGAGGCGCGCGCAGTCGTGGATGCTCTATACGGGCAAAAACGAAAG
CGGTCAGCGGCTCGACTCCGTGGCCTGGAGGCTAAGCGAACGGGTTGGGCTGCGCGTGTACCCCGGTTCGA
ATCTCGAATCAGGCTGGAGCCGCAGCTAACGTGGTATTGGCACTCCCGTCTCGACCCAAGCCTGCACCAAC

CCTCCAGGATACGGAGGCGGGTCGTTTTGCAACTTTTTTTTGGAGGCCGGATGAGACTAGTAAGCGCGGAA
AGCGGCCGACCGCGATGGCTCGCTGCCGTAGTCTGGAGAAGAATCGCCAGGGTTGCGTTGCGGTGTGCCCC
GGTTCGAGGCCGGCCGGATTCCGCGGCTAACGAGGGCGTGGCTGCCCCGTCGTTTCCAAGACCCCATAGCC
AGCCGACTTCTCCAGTTACGGAGCGAGCCCCTCTTTTGTTTTGTTTGTTTTTGCCAGATGCATCCCGTACTGC
GGCAGATGCGCCCCCACCACCCTCCACCGCAACAACAGCCCCCTCCACAGCCGGCGCTTCTGCCCCCGCCC
CAGCAGCAACTTCCAGCCACGACCGCCGCGGCCGCCGTGAGCGGGGCTGGACAGAGTTATGATCACCAGC
TGGCCTTGGAAGAGGGCGAGGGGCTGGCGCGCCTGGGGGCGTCGTCGCCGGAGCGGCACCCGCGCGTGCA
GATGAAAAGGGACGCTCGCGAGGCCTACGTGCCCAAGCAGAACCTGTTCAGAGACAGGAGCGGCGAGGAG
CCCGAGGAGATGCGCGCGGCCCGGTTCCACGCGGGGCGGGAGCTGCGGCGCGGCCTGGACCGAAAGAGGG
TGCTGAGGGACGAGGATTTCGAGGCGGACGAGCTGACGGGGATCAGCCCCGCGCGCGCGCACGTGGCCGC
GGCCAACCTGGTCACGGCGTACGAGCAGACCGTGAAGGAGGAGAGCAACTTCCAAAAATCCTTCAACAAC
CACGTGCGCACCCTGATCGCGCGCGAGGAGGTGACCCTGGGCCTGATGCACCTGTGGGACCTGCTGGAGGC
CATCGTGCAGAACCCCACCAGCAAGCCGCTGACGGCGCAGCTGTTCCTGGTGGTGCAGCATAGTCGGGACA
ACGAAGCGTTCAGGGAGGCGCTGCTGAATATCACCGAGCCCGAGGGCCGCTGGCTCCTGGACCTGGTGAA
CATTCTGCAGAGCATCGTGGTGCAGGAGCGCGGGCTGCCGCTGTCCGAGAAGCTGGCGGCCATCAACTTCT
CGGTGCTGAGTTTGGGCAAGTACTACGCTAGGAAGATCTACAAGACCCCGTACGTGCCCATAGACAAGGAG
GTGAAGATCGACGGGTTTTACATGCGCATGACCCTGAAAGTGCTGACCCTGAGCGACGATCTGGGGGTGTA
CCGCAACGACAGGATGCACCGTGCGGTGAGCGCCAGCAGGCGGCGCGAGCTGAGCGACCAGGAGCTGATG
CATAGTCTGCAGCGGGCCCTGACCGGGGCCGGGACCGAGGGGGAGAGCTACTTTGACATGGGCGCGGACC
TGCACTGGCAGCCCAGCCGCCGGGCCTTGGAGGCGGCGGCAGGACCCTACGTAGAAGAGGTGGACGATGA
GGTGGACGAGGAGGGCGAGTACCTGGAAGACTGATGGCGCGACCGTATTTTTGCTAGATGCAACAACAAC
AGCCACCTCCTGATCCCGCGATGCGGGCGGCGCTGCAGAGCCAGCCGTCCGGCATTAACTCCTCGGACGAT
TGGACCCAGGCCATGCAACGCATCATGGCGCTGACGACCCGCAACCCCGAAGCCTTTAGACAGCAGCCCCA
GGCCAACCGGCTCTCGGCCATCCTGGAGGCCGTGGTGCCCTCGCGCTCCAACCCCACGCACGAGAAGGTCC
TGGCCATCGTGAACGCGCTGGTGGAGAACAAGGCCATCCGCGGCGACGAGGCCGGCCTGGTGTACAACGC
GCTGCTGGAGCGCGTGGCCCGCTACAACAGCACCAACGTGCAGACCAACCTGGACCGCATGGTGACCGAC
GTGCGCGAGGCCGTGGCCCAGCGCGAGCGGTTCCACCGCGAGTCCAACCTGGGATCCATGGTGGCGCTGA
ACGCCTTCCTCAGCACCCAGCCCGCCAACGTGCCCCGGGGCCAGGAGGACTACACCAACTTCATCAGCGCC
CTGCGCCTGATGGTGACCGAGGTGCCCCAGAGCGAGGTGTACCAGTCCGGGCCGGACTACTTCTTCCAGAC
CAGTCGCCAGGGCTTGCAGACCGTGAACCTGAGCCAGGCTTTCAAGAACTTGCAGGGCCTGTGGGGCGTGC
AGGCCCCGGTCGGGGACCGCGCGACGGTGTCGAGCCTGCTGACGCCGAACTCGCGCCTGCTGCTGCTGCTG
GTGGCCCCCTTCACGGACAGCGGCAGCATCAACCGCAACTCGTACCTGGGCTACCTGATTAACCTGTACCG
CGAGGCCATCGGCCAGGCGCACGTGGACGAGCAGACCTACCAGGAGATCACCCACGTGAGCCGCGCCCTG
GGCCAGGACGACCCGGGCAACCTGGAAGCCACCCTGAACTTTTTGCTGACCAACCGGTCGCAGAAGATCCC
GCCCCAGTACGCGCTCAGCACCGAGGAGGAGCGCATCCTGCGTTACGTGCAGCAGAGCGTGGGCCTGTTCC
TGATGCAGGAGGGGGCCACCCCCAGCGCCGCGCTCGACATGACCGCGCGCAACATGGAGCCCAGCATGTA
CGCCAGCAACCGCCCGTTCATCAATAAACTGATGGACTACTTGCATCGGGCGGCCGCCATGAACTCTGACT
ATTTCACCAACGCCATCCTGAATCCCCACTGGCTCCCGCCGCCGGGGTTCTACACGGGCGAGTACGACATG
CCCGACCCCAATGACGGGTTCCTGTGGGACGATGTGGACAGCAGCGTGTTCTCCCCCCGACCGGGTGCTAA
CGAGCGCCCCTTGTGGAAGAAGGAAGGCAGCGACCGACGCCCGTCCTCGGCGCTGTCCGGCCGCGAGGGT
GCTGCCGCGGCGGTGCCCGAGGCCGCCAGTCCTTTCCCGAGCTTGCCCTTCTCGCTGAACAGTATCCGCAGC
AGCGAGCTGGGCAGGATCACGCGCCCGCGCTTGCTGGGCGAAGAGGAGTACTTGAATGACTCGCTGTTGAG
ACCCGAGCGGGAGAAGAACTTCCCCAATAACGGGATAGAAAGCCTGGTGGACAAGATGAGCCGCTGGAAG
ACGTATGCGCAGGAGCACAGGGACGATCCCCGGGCGTCGCAGGGGGCCACGAGCCGGGGCAGCGCCGCCC
GTAAACGCCGGTGGCACGACAGGCAGCGGGGACAGATGTGGGACGATGAGGACTCCGCCGACGACAGCA
GCGTGTTGGACTTGGGTGGGAGTGGTAACCCGTTCGCTCACCTGCGCCCCCGTATCGGGCGCATGATGTAA
GAGAAACCGAAAATAAATGATACTCACCAAGGCCATGGCGACCAGCGTGCGTTCGTTTCTTCTCTGTTGTT
GTTGTATCTAGTATGATGAGGCGTGCGTACCCGGAGGGTCCTCCTCCCTCGTACGAGAGCGTGATGCAGCA
GGCGATGGCGGCGGCGGCGATGCAGCCCCCGCTGGAGGCTCCTTACGTGCCCCCGCGGTACCTGGCGCCTA
CGGAGGGGCGGAACAGCATTCGTTACTCGGAGCTGGCACCCTTGTACGATACCACCCGGTTGTACCTGGTG
GACAACAAGTCGGCGGACATCGCCTCGCTGAACTACCAGAACGACCACAGCAACTTCCTGACCACCGTGGT
GCAGAACAATGACTTCACCCCCACGGAGGCCAGCACCCAGACCATCAACTTTGACGAGCGCTCGCGGTGG
GGCGGCCAGCTGAAAACCATCATGCACACCAACATGCCCAACGTGAACGAGTTCATGTACAGCAACAAGT
TCAAGGCGCGGGTGATGGTCTCCCGCAAGACCCCCAATGGGGTGACAGTGACAGAGGATTATGATGGTAGT
CAGGATGAGCTGAAGTATGAATGGGTGGAATTTGAGCTGCCCGAAGGCAACTTCTCGGTGACCATGACCAT
CGACCTGATGAACAACGCCATCATCGACAATTACTTGGCGGTGGGGCGGCAGAACGGGGTGCTGGAGAGC
GACATCGGCGTGAAGTTCGACACTAGGAACTTCAGGCTGGGCTGGGACCCCGTGACCGAGCTGGTCATGCC
CGGGGTGTACACCAACGAGGCTTTCCATCCCGATATTGTCTTGCTGCCCGGCTGCGGGGTGGACTTCACCG
AGAGCCGCCTCAGCAACCTGCTGGGCATTCGCAAGAGGCAGCCCTTCCAGGAAGGCTTCCAGATCATGTAC
GAGGATCTGGAGGGGGGCAACATCCCCGCGCTCCTGGATGTCGACGCCTATGAGAAAAGCAAGGAGGATG
CAGCAGCTGAAGCAACTGCAGCCGTAGCTACCGCCTCTACCGAGGTCAGGGGCGATAATTTTGCAAGCGCC
GCAGCAGTGGCAGCGGCCGAGGCGGCTGAAACCGAAAGTAAGATAGTCATTCAGCCGGTGGAGAAGGATA
GCAAGAACAGGAGCTACAACGTACTACCGGACAAGATAAACACCGCCTACCGCAGCTGGTACCTAGCCTA
CAACTATGGCGACCCCGAGAAGGGCGTGCGCTCCTGGACGCTGCTCACCACCTCGGACGTCACCTGCGGCG
TGGAGCAAGTCTACTGGTCGCTGCCCGACATGATGCAAGACCCGGTCACCTTCCGCTCCACGCGTCAAGTT
AGCAACTACCCGGTGGTGGGCGCCGAGCTCCTGCCCGTCTACTCCAAGAGCTTCTTCAACGAGCAGGCCGT
CTACTCGCAGCAGCTGCGCGCCTTCACCTCGCTTACGCACGTCTTCAACCGCTTCCCCGAGAACCAGATCCT

CGTCCGCCCGCCCGCGCCCACCATTACCACCGTCAGTGAAAACGTTCCTGCTCTCACAGATCACGGGACCC
TGCCGCTGCGCAGCAGTATCCGGGGAGTCCAGCGCGTGACCGTTACTGACGCCAGACGCCGCACCTGCCCC
TACGTCTACAAGGCCCTGGGCATAGTCGCGCCGCGCGTCCTCTCGAGCCGCACCTTCTAAATGTCCATTCTC
ATCTCGCCCAGTAATAACACCGGTTGGGGCCTGCGCGCGCCCAGCAAGATGTACGGAGGCGCTCGCCAACG
CTCCACGCAACACCCCGTGCGCGTGCGCGGGCACTTCCGCGCTCCCTGGGGCGCCCTCAAGGGCCGCGTGC
GGTCGCGCACCACCGTCGACGACGTGATCGACCAGGTGGTGGCCGACGCGCGCAACTACACCCCCGCCGCC
GCGCCCGTCTCCACCGTGGACGCCGTCATCGACAGCGTGGTGGCCGACGCGCGCCGGTACGCCCGCGCCAA
GAGCCGGCGGCGGCGCATCGCCCGGCGGCACCGGAGCACCCCCGCCATGCGCGCGGCGCGAGCCTTGCTG
CGCAGGGCCAGGCGCACGGGACGCAGGGCCATGCTCAGGGCGGCCAGACGCGCGGCTTCAGGCGCCAGCG
CCGGCAGGACCCGGAGACGCGCGGCCACGGCGGCGGCAGCGGCCATCGCCAGCATGTCCCGCCCGCGGCG
AGGGAACGTGTACTGGGTGCGCGACGCCGCCACCGGTGTGCGCGTGCCCGTGCGCACCCGCCCCCCTCGCA
CTTGAAGATGTTCACTTCGCGATGTTGATGTGTCCCAGCGGCGAGGAGGATGTCCAAGCGCAAATTCAAGG
AAGAGATGCTCCAGGTCATCGCGCCTGAGATCTACGGCCCTGCGGTGGTGAAGGAGGAAAGAAAGCCCCG
CAAAATCAAGCGGGTCAAAAAGGACAAAAAGGAAGAAGAAAGTGATGTGGACGGATTGGTGGAGTTTGTG
CGCGAGTTCGCCCCCCGGCGGCGCGTGCAGTGGCGCGGGCGGAAGGTGCAACCGGTGCTGAGACCCGGCA
CCACCGTGGTCTTCACGCCCGGCGAGCGCTCCGGCACCGCTTCCAAGCGCTCCTACGACGAGGTGTACGGG
GATGATGATATTCTGGAGCAGGCGGCCGAGCGCCTGGGCGAGTTTGCTTACGGCAAGCGCAGCCGTTCCGC
ACCGAAGGAAGAGGCGGTGTCCATCCCGCTGGACCACGGCAACCCCACGCCGAGCCTCAAGCCCGTGACC
TTGCAGCAGGTGCTGCCGACCGCGGCGCCGCGCCGGGGGTTCAAGCGCGAGGGCGAGGATCTGTACCCCA
CCATGCAGCTGATGGTGCCCAAGCGCCAGAAGCTGGAAGACGTGCTGGAGACCATGAAGGTGGACCCGGA
CGTGCAGCCCGAGGTCAAGGTGCGGCCCATCAAGCAGGTGGCCCCGGGCCTGGGCGTGCAGACCGTGGAC
ATCAAGATTCCCACGGAGCCCATGGAAACGCAGACCGAGCCCATGATCAAGCCCAGCACCAGCACCATGG
AGGTGCAGACGGATCCCTGGATGCCATCGGCTCCTAGTCGAAGACCCCGGCGCAAGTACGGCGCGGCCAG
CCTGCTGATGCCCAACTACGCGCTGCATCCTTCCATCATCCCCACGCCGGGCTACCGCGGCACGCGCTTCTA
CCGCGGTCATACCAGCAGCCGCCGCCGCAAGACCACCACTCGCCGCCGCCGTCGCCGCACCGCCGCTGCAA
CCACCCCTGCCGCCCTGGTGCGGAGAGTGTACCGCCGCGGCCGCGCACCTCTGACCCTGCCGCGCGCGCGC
TACCACCCGAGCATCGCCATTTAAACTTTCGCCTGCTTTGCAGATCAATGGCCCTCACATGCCGCCTTCGCG
TTCCCATTACGGGCTACCGAGGAAGAAAACCGCGCCGTAGAAGGCTGGCGGGGAACGGGATGCGTCGCCA
CCACCACCGGCGGCGGCGCGCCATCAGCAAGCGGTTGGGGGGAGGCTTCCTGCCCGCGCGCTGATCCCCATCA
TCGCCGCGGCGATCGGGGCGATCCCCGGCATTGCTTCCGTGGCGGTGCAGGCCTCTCAGCGCCACTGAGAC
ACACTTGGAAACATCTTGTAATAAACCAATGGACTCTGACGCTCCTGGTCCTGTGATGTGTTTTCGTAGACA
GATGGAAGACATCAATTTTTCGTCCCTGGCTCCGCGACACGGCACGCGGCCGTTCATGGGCACCTGGAGCG
ACATCGGCACCAGCCAACTGAACGGGGGCGCCTTCAATTGGAGCAGTCTCTGGAGCGGGCTTAAGAATTTC
GGGTCCACGCTTAAAACCTATGGCAGCAAGGCGTGGAACAGCACCACAGGGCAGGCGCTGAGGGATAAGC
TGAAAGAGCAGAACTTCCAGCAGAAGGTGGTCGATGGGCTCGCCTCGGGCATCAACGGGGTGGTGGACCT
GGCCAACCAGGCCGTGCAGCGGCAGATCAACAGCCGCCTGGACCCGGTGCCGCCCGCCGGCTCCGTGGAG
ATGCCGCAGGTGGAGGAGGAGCTGCCTCCCCTGGACAAGCGGGGCGAGAAGCGACCCCGCCCCGATGCGG
AGGAGACGCTGCTGACGCACACGGACGAGCCGCCCCCGTACGAGGAGGCGGTGAAACTGGGTCTGCCCAC
CACGCGGCCCATCGCGCCCCTGGCCACCGGGGTGCTGAAACCCGAAAAGCCCGCGACCCTGGACTTGCCTC
CTCCCCAGCCTTCCCGCCCCTCTACAGTGGCTAAGCCCCTGCCGCCGGTGGCCGTGGCCCGCGCGCGACCC
GGGGGCACCGCCCGCCCTCATGCGAACTGGCAGAGCACTCTGAACAGCATCGTGGGTCTGGGAGTGCAGA
GTGTGAAGCGCCGCCGCTGCTATTAAACCTACCGTAGCGCTTAACTTGCTTGTCTGTGTGTGTATGTATTAT
GTCGCCGCCGCCGCTGTCCACCAGAAGGAGGAGTGAAGAGGCGCGTCGCCGAGTTGCAAGATGGCCACCC
CATCGATGCTGCCCCAGTGGGCGTACATGCACATCGCCGGACAGGACGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGT
CTGGTGCAGTTTGCCCGCGCCACAGACACCTACTTCAGTCTGGGGAACAAGTTTAGGAACCCCACGGTGGC
GCCCACGCACGATGTGACCACCGACCGCAGCCAGCGGCTGACGCTGCGCTTCGTGCCCGTGGACCGCGAGG
ACAACACCTACTCGTACAAAGTGCGCTACACGCTGGCCGTGGGCGACAACCGCGTGCTGGACATGGCCAGC
ACCTACTTTGACATCCGCGGCGTGCTGGATCGGGGCCCTAGCTTCAAACCCTACTCCGGCACCGCCTACAA
CAGTCTGGCCCCCAAGGGAGCACCCAACACTTGTCAGTGGACATATAAAGCCGATGGTGAAACTGCCACA
GAAAAAACCTATACATATGGAAATGCACCCGTGCAGGGCATTAACATCACAAAAGATGGTATTCAACTTGG
AACTGACACCGATGATCAGCCAATCTACGCAGATAAAACCTATCAGCCTGAACCTCAAGTGGGTGATGCTG
AATGGCATGACATCACTGGTACTGATGAAAAGTATGGAGGCAGAGCTCTTAAGCCTGATACCAAAATGAA
GCCTTGTTATGGTTCTTTTGCCAAGCCTACTAATAAAGAAGGAGGTCAGGCAAATGTGAAAACAGGAACAG
GCACTACTAAAGAATATGACATAGACATGGCTTTCTTTGACAACAGAAGTGCGGCTGCTGCTGGCCTAGCT
CCAGAAATTGTTTTGTATACTGAAAATGTGGATTTGGAAACTCCAGATACCCATATTGTATACAAAGCAGG
CACAGATGACAGCAGCTCTTCTATTAATTTGGGTCAGCAAGCCATGCCCAACAGACCTAACTACATTGGTTT
CAGAGACAACTTTATCGGGCTCATGTACTACAACAGCACTGGCAATATGGGGGTGCTGGCCGGTCAGGCTT
CTCAGCTGAATGCTGTGGTTGACTTGCAAGACAGAAACACCGAGCTGTCCTACCAGCTCTTGCTTGACTCTC
TGGGTGACAGAACCCGGTATTTCAGTATGTGGAATCAGGCGGTGGACAGCTATGATCCTGATGTGCGCATT
ATTGAAAATCATGGTGTGGAGGATGAACTTCCCAACTATTGTTTCCCTCTGGATGCTGTTGGCAGAACAGAT
ACTTATCAGGGAATTAAGGCTAATGGAACTGATCAAACCACATGGACCAAAGATGACAGTGTCAATGATGC
TAATGAGATAGGCAAGGGTAATCCATTCGCCATGGAAATCAACATCCAAGCCAACCTGTGGAGGAACTTCC
TCTACGCCAACGTGGCCCTGTACCTGCCCGACTCTTACAAGTACACGCCGGCCAATGTTACCCTGCCCACCA
ACACCAACACCTACGATTACATGAACGGCCGGGTGGTGGCGCCCTCGCTGGTGGACTCCTACATCAACATC
GGGGCGCGCTGGTCGCTGGATCCCATGGACAACGTGAACCCCTTCAACCACCACCGCAATGCGGGGCTGCG
CTACCGCTCCATGCTCCTGGGCAACGGGCGCTACGTGCCCTTCCACATCCAGGTGCCCCAGAAATTTTTCGC
CATCAAGAGCCTCCTGCTCCTGCCCGGGTCCTACACCTACGAGTGGAACTTCCGCAAGGACGTCAACATGA

TCCTGCAGAGCTCCCTCGGCAACGACCTGCGCACGGACGGGGCCTCCATCTCCTTCACCAGCATCAACCTCT
ACGCCACCTTCTTCCCCATGGCGCACAACACGGCCTCCACGCTCGAGGCCATGCTGCGCAACGACACCAAC
GACCAGTCCTTCAACGACTACCTCTCGGCGGCCAACATGCTCTACCCCATCCCGGCCAACGCCACCAACGT
GCCCATCTCCATCCCCTCGCGCAACTGGGCCGCCTTCCGCGGCTGGTCCTTCACGCGTCTCAAGACCAAGGA
GACGCCCTCGCTGGGCTCCGGGTTCGACCCCTACTTCGTCTACTCGGGCTCCATCCCCTACCTCGACGGCAC
CTTCTACCTCAACCACACCTTCAAGAAGGTCTCCATCACCTTCGACTCCTCCGTCAGCTGGCCCGGCAACGA
CCGGCTCCTGACGCCCAACGAGTTCGAAATCAAGCGCACCGTCGACGGCGAGGGCTACAACGTGGCCCAG
TGCAACATGACCAAGGACTGGTTCCTGGTCCAGATGCTGGCCCACTACAACATCGGCTACCAGGGCTTCTA
CGTGCCCGAGGGCTACAAGGACCGCATGTACTCCTTCTTCCGCAACTTCCAGCCCATGAGCCGCCAGGTGG
TGGACGAGGTCAACTACAAGGACTACCAGGCCGTCACCCTGGCCTACCAGCACAACAACTCGGGCTTCGTC
GGCTACCTCGCGCCCACCATGCGCCAGGGCCAGCCCTACCCCGCCAACTACCCCTACCCGCTCATCGGCAA
GAGCGCCGTCACCAGCGTCACCCAGAAAAAGTTCCTCTGCGACAGGGTCATGTGGCGCATCCCCTTCTCCA
GCAACTTCATGTCCATGGGCGCGCTCACCGACCTCGGCCAGAACATGCTCTATGCCAACTCCGCCCACGCG
CTAGACATGAATTTCGAAGTCGACCCCATGGATGAGTCCACCCTTCTCTATGTTGTCTTCGAAGTCTTCGAC
GTCGTCCGAGTGCACCAGCCCCACCGCGGCGTCATCGAGGCCGTCTACCTGCGCACCCCCTTCTCGGCCGG
TAACGCCACCACCTAAGCTCTTGCTTCTTGCAAGCCATGGCCGCGGGCTCCGGCGAGCAGGAGCTCAGGGC
CATCATCCGCGACCTGGGCTGCGGGCCCTACTTCCTGGGCACCTTCGATAAGCGCTTCCCGGGATTCATGGC
CCCGCACAAGCTGGCCTGCGCCATCGTCAACACGGCCGGCCGCGAGACCGGGGGCGAGCACTGGCTGGCC
TTCGCCTGGAACCCGCGCTCGAACACCTGCTACCTCTTCGACCCCTTCGGGTTCTCGGACGAGCGCCTCAAG
CAGATCTACCAGTTCGAGTACGAGGGCCTGCTGCGCCGCAGCGCCCTGGCCACCGAGGACCGCTGCGTCAC
CCTGGAAAAGTCCACCCAGACCGTGCAGGGTCCGCGCTCGGCCGCCTGCGGGCTCTTCTGCTGCATGTTCCT
GCACGCCTTCGTGCACTGGCCCGACCGCCCCATGGACAAGAACCCCACCATGAACTTGCTGACGGGGGTGC
CCAACGGCATGCTCCAGTCGCCCCAGGTGGAACCCACCCTGCGCCGCAACCAGGAGGCGCTCTACCGCTTC
CTCAACTCCCACTCCGCCTACTTTCGCTCCCACCGCGCGCGCATCGAGAAGGCCACCGCCTTCGACCGCATG
AATCAAGACATGTAAACCGTGTGTGTATGTTAAATGTCTTTAATAAACAGCACTTTCATGTTACACATGCAT
CTGAGATGATTTATTTAGAAATCGAAAGGGTTCTGCCGGGTCTCGGCATGGCCCGCGGGCAGGGACACGTT
GCGGAACTGGTACTTGGCCAGCCACTTGAACTCGGGGATCAGCAGTTTGGGCAGCGGGGTGTCGGGGAAG
GAGTCGGTCCACAGCTTCCGCGTCAGTTGCAGGGCGCCCAGCAGGTCGGGCGCGGAGATCTTGAAATCGCA
GTTGGGACCCGCGTTCTGCGCGCGGGAGTTGCGGTACACGGGGTTGCAGCACTGGAACACCATCAGGGCCG
GGTGCTTCACGCTCGCCAGCACCGTCGCGTCGGTGATGCTCTCCACGTCGAGGTCCTCGGCGTTGGCCATCC
CGAAGGGGGTCATCTTGCAGGTCTGCCTTCCCATGGTGGGCACGCACCCGGGCTTGTGGTTGCAATCGCAG
TGCAGGGGGATCAGCATCATCTGGGCCTGGTCGGCGTTCATCCCCGGGTACATGGCCTTCATGAAAGCCTC
CAATTGCCTGAACGCCTGCTGGGCCTTGGCTCCCTCGGTGAAGAAGACCCCGCAGGACTTGCTAGAGAACT
GGTTGGTGGCGCACCCGGCGTCGTGCACGCAGCAGCGCGCGTCGTTGTTGGCCAGCTGCACCACGCTGCGC
CCCCAGCGGTTCTGGGTGATCTTGGCCCGGTCGGGGTTCTCCTTCAGCGCGCGCTGCCCGTTCTCGCTCGCC
ACATCCATCTCGATCATGTGCTCCTTCTGGATCATGGTGGTCCCGTGCAGGCACCGCAGCTTGCCCTCGGCC
TCGGTGCACCCGTGCAGCCACAGCGCGCACCCGGTGCACTCCCAGTTCTTGTGGGCGATCTGGGAATGCGC
GTGCACGAAGCCCTGCAGGAAGCGGCCCATCATGGTGGTCAGGGTCTTGTTGCTAGTGAAGGTCAGCGGAA
TGCCGCGGTGCTCCTCGTTGATGTACAGGTGGCAGATGCGGCGGTACACCTCGCCCTGCTCGGGCATCAGC
TGGAAGTTGGCTTTCAGGTCGGTCTCCACGCGGTAGCGGTCCATCAGCATAGTCATGATTTCCATACCCTTC
TCCCAGGCCGAGACGATGGGCAGGCTCATAGGGTTCTTCACCATCATCTTAGCGCTAGCAGCCGCGGCCAG
GGGGTCGCTCTCGTCCAGGGTCTCAAAGCTCCGCTTGCCGTCCTTCTCGGTGATCCGCACCGGGGGGTAGCT
GAAGCCCACGGCCGCCAGCTCCTCCTCGGCCTGTCTTTCGTCCTCGCTGTCCTGGCTGACGTCCTGCAGGAC
CACATGCTTGGTCTTGCGGGGTTTCTTCTTGGGCGGCAGCGGCGGCGGAGATGTTGGAGATGGCGAGGGGG
AGCGCGAGTTCTCGCTCACCACTACTATCTCTTCCTCTTCTTGGTCCGAGGCCACGCGGCGGTAGGTATGTC
TCTTCGGGGGCAGAGGCGGAGGCGACGGGCTCTCGCCGCCGCGACTTGGCGGATGGCTGGCAGAGCCCCTT
CCGCGTTCGGGGGTGCGCTCCCGGCGGCGCTCTGACTGACTTCCTCCGCGGCCGGCCATTGTGTTCTCCTAG
GGAGGAACAACAAGCATGGAGACTCAGCCATCGCCAACCTCGCCATCTGCCCCCACCGCCGACGAGAAGC
AGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAACCGCCCCCGCCCAGCCCCGCCACCTCCGACGCGGCCGTCCCAGA
CATGCAAGAGATGGAGGAATCCATCGAGATTGACCTGGGCTATGTGACGCCCGCGGAGCACGAGGAGGAG
CTGGCAGTGCGCTTTTCACAAGAAGAGATACACCAAGAACAGCCAGAGCAGGAAGCAGAGAATGAGCAGA
GTCAGGCTGGGCTCGAGCATGACGGCGACTACCTCCACCTGAGCGGGGGGGAGGACGCGCTCATCAAGCA
TCTGGCCCGGCAGGCCACCATCGTCAAGGATGCGCTGCTCGACCGCACCGAGGTGCCCCTCAGCGTGGAGG
AGCTCAGCCGCGCCTACGAGTTGAACCTCTTCTCGCCGCGCGTGCCCCCCAAGCGCCAGCCCAATGGCACC
TGCGAGCCCAACCCGCGCCTCAACTTCTACCCGGTCTTCGCGGTGCCCGAGGCCCTGGCCACCTACCACATC
TTTTTCAAGAACCAAAAGATCCCCGTCTCCTGCCGCGCCAACCGCACCCGCGCCGACGCCCTTTTCAACCTG
GGTCCCGGCGCCCGCCTACCTGATATCGCCTCCTTGGAAGAGGTTCCCAAGATCTTCGAGGGTCTGGGCAG
CGACGAGACTCGGGCCGCGAACGCTCTGCAAGGAGAAGGAGGAGAGCATGAGCACCACAGCGCCCTGGTC
GAGTTGGAAGGCGACAACGCGCGGCTGGCGGTGCTCAAACGCACGGTCGAGCTGACCCATTTCGCCTACCC
GGCTCTGAACCTGCCCCCCAAAGTCATGAGCGCGGTCATGGACCAGGTGCTCATCAAGCGCGCGTCGCCCA
TCTCCGAGGACGAGGGCATGCAAGACTCCGAGGAGGGCAAGCCCGTGGTCAGCGACGAGCAGCTGGCCCG
GTGGCTGGGTCCTAATGCTAGTCCCCAGAGTTTGGAAGAGCGGCGCAAACTCATGATGGCCGTGGTCCTGG
TGACCGTGGAGCTGGAGTGCCTGCGCCGCTTCTTCGCCGACGCGGAGACCCTGCGCAAGGTCGAGGAGAAC
CTGCACTACCTCTTCAGGCACGGGTTCGTGCGCCAGGCCTGCAAGATCTCCAACGTGGAGCTGACCAACCT
GGTCTCCTACATGGGCATCTTGCACGAGAACCGCCTGGGGCAGAACGTGCTGCACACCACCCTGCGCGGGG
AGGCCCGGCGCGACTACATCCGCGACTGCGTCTACCTCTACCTCTGCCACACCTGGCAGACGGGCATGGGC
GTGTGGCAGCAGTGTCTGGAGGAGCAGAACCTGAAAGAGCTCTGCAAGCTCCTGCAGAAGAACCTCAAGG

GTCTGTGGACCGGGTTCGACGAGCGCACCACCGCCTCGGACCTGGCCGACCTCATTTTCCCCGAGCGCCTC
AGGCTGACGCTGCGCAACGGCCTGCCCGACTTTATGAGCCAAAGCATGTTGCAAAACTTTCGCTCTTTCATC
CTCGAACGCTCCGGAATCCTGCCCGCCACCTGCTCCGCGCTGCCCTCGGACTTCGTGCCGCTGACCTTCCGC
GAGTGCCCCCCCGCCGCTGTGGAGCCACTGCTACCTGCTGCGCCTGGCCAACTACCTGGCCTACCACTCGGA
CGTGATCGAGGACGTCAGCGGCGAGGGCCTGCTCGAGTGCCACTGCCGCTGCAACCTCTGCACGCCGCACC
GCTCCCTGGCCTGCAACCCCCAGCTGCTGAGCGAGACCCAGATCATCGGCACCTTCGAGTTGCAAGGGCCC
AGCGAAGGCGAGGGTTCAGCCGCCAAGGGGGGTCTGAAACTCACCCCGGGGCTGTGGACCTCGGCCTACT
TGCGCAAGTTCGTGCCCGAGGACTACCATCCCTTCGAGATCAGGTTCTACGAGGACCAATCCCATCCGCCC
AAGGCCGAGCTGTCGGCCTGCGTCATCACCCAGGGGGCGATCCTGGCCCAATTGCAAGCCATCCAGAAATC
CCGCCAAGAATTCTTGCTGAAAAAGGGCCGCGGGGTCTACCTCGACCCCCAGACCGGTGAGGAGCTCAACC
CCGGCTTCCCCCAGGATGCCCCGAGGAAACAAGAAGCTGAAAGTGGAGCTGCCGCCCGTGGAGGATTTGG
AGGAAGACTGGGAGAACAGCAGTCAGGCAGAGGAGGAGGAGATGGAGGAAGACTGGGACAGCACTCAGG
CAGAGGAGGACAGCCTGCAAGACAGTCTGGAGGAAGACGAGGAGGAGGCAGAGGAGGAGGTGGAAGAAG
CAGCCGCCGCCAGACCGTCGTCCTCGGCGGGGGAGAAAGCAAGCAGCACGGATACCATCTCCGCTCCGGG
TCGGGGTCCCGCTCGACCACACAGTAGATGGGACGAGACCGGACGATTCCCGAACCCCACCACCCAGACC
GGTAAGAAGGAGCGGCAGGGATACAAGTCCTGGCGGGGGCACAAAAACGCCATCGTCTCCTGCTTGCAGG
CCTGCGGGGGCAACATCTCCTTCACCCGGCGCTACCTGCTCTTCCACCGCGGGGTGAACTTTCCCCGCAACA
TCTTGCATTACTACCGTCACCTCCACAGCCCCTACTACTTCCAAGAAGAGGCAGCAGCAGCAGAAAAAGAC
CAGCAGAAAACCAGCAGCTAGAAAATCCACAGCGGCGGCAGCAGGTGGACTGAGGATCGCGGCGAACGA
GCCGGCGCAAACCCGGGAGCTGAGGAACCGGATCTTTCCCACCCTCTATGCCATCTTCCAGCAGAGTCGGG
GGCAGGAGCAGGAACTGAAAGTCAAGAACCGTTCTCTGCGCTCGCTCACCCGCAGTTGTCTGTATCACAAG
AGCGAAGACCAACTTCAGCGCACTCTCGAGGACGCCGAGGCTCTCTTCAACAAGTACTGCGCGCTCACTCT
TAAAGAGTAGCCCGCGCCCGCCCAGTCGCAGAAAAAGGCGGGAATTACGTCACCTGTGCCCTTCGCCCTAG
CCGCCTCCACCCATCATCATGAGCAAAGAGATTCCCACGCCTTACATGTGGAGCTACCAGCCCCAGATGGG
CCTGGCCGCCGGTGCCGCCCAGGACTACTCCACCCGCATGAATTGGCTCAGCGCCGGGCCCGCGATGATCT
CACGGGTGAATGACATCCGCGCCCACCGAAACCAGATACTCCTAGAACAGTCAGCGCTCACCGCCACGCCC
CGCAATCACCTCAATCCGCGTAATTGGCCCGCCGCCCTGGTGTACCAGGAAATTCCCCAGCCCACGACCGT
ACTACTTCCGCGAGACGCCCAGGCCGAAGTCCAGCTGACTAACTCAGGTGTCCAGCTGGCGGGCGGCGCCA
CCCTGTGTCGTCACCGCCCCGCTCAGGGTATAAAGCGGCTGGTGATCCGGGGCAGAGGCACACAGCTCAAC
GACGAGGTGGTGAGCTCTTCGCTGGGTCTGCGACCTGACGGAGTCTTCCAACTCGCCGGATCGGGGAGATC
TTCCTTCACGCCTCGTCAGGCCGTCCTGACTTTGGAGAGTTCGTCCTCGCAGCCCCGCTCGGGTGGCATCGG
CACTCTCCAGTTCGTGGAGGAGTTCACTCCCTCGGTCTACTTCAACCCCTTCTCCGGCTCCCCCGGCCACTA
CCCGGACGAGTTCATCCCGAACTTCGACGCCATCAGCGAGTCGGTGGACGGCTACGATTGAAACTAATCAC
CCCCTTATCCAGTGAAATAAAGATCATATTGATGATGATTTTACAGAAATAAAAAATAATCATTTGATTTGA
AATAAAGATACAATCATATTGATGATTTGAGTTTAACAAAAAAATAAAGAATCACTTACTTGAAATCTGAT
ACCAGGTCTCTGTCCATGTTTTCTGCCAACACCACTTCACTCCCCTCTTCCCAGCTCTGGTACTGCAGGCCCC
GGCGGGCTGCAAACTTCCTCCACACGCTGAAGGGGATGTCAAATTCCTCCTGTCCCTCAATCTTCATTTTAT
CTTCTATCAGATGTCCAAAAAGCGCGTCCGGGTGGATGATGACTTCGACCCCGTCTACCCCTACGATGCAG
ACAACGCACCGACCGTGCCCTTCATCAACCCCCCCTTCGTCTCTTCAGATGGATTCCAAGAGAAGCCCCTGG
GGGTGTTGTCCCTGCGACTGGCCGACCCCGTCACCACCAAGAACGGGGAAATCACCCTCAAGCTGGGAGA
GGGGGTGGACCTCGATTCCTCGGGAAAACTCATCTCCAACACGGCCACCAAGGCCGCCGCCCCTCTCAGTT
TTTCCAACAACACCATTTCCCTTAACATGGATCACCCCTTTTACACTAAAGATGGAAAATTATCCTTACAAG
TTTCTCCACCATTAAATATACTGAGAACAAGCATTCTAAACACACTAGCTTTAGGTTTTGGATCAGGTTTAG
GACTCCGTGGCTCTGCCTTGGCAGTACAGTTAGTCTCTCCACTTACATTTGATACTGATGGAAACATAAAGC
TTACCTTAGACAGAGGTTTGCATGTTACAACAGGAGATGCAATTGAAAGCAACATAAGCTGGGCTAAAGGT
TTAAAATTTGAAGATGGAGCCATAGCAACCAACATTGGAAATGGGTTAGAGTTTGGAAGCAGTAGTACAG
AAACAGGTGTTGATGATGCTTACCCAATCCAAGTTAAACTTGGATCTGGCCTTAGCTTTGACAGTACAGGA
GCCATAATGGCTGGTAACAAAGAAGACGATAAACTCACTTTGTGGACAACACCTGATCCATCACCAAACTG
TCAAATACTCGCAGAAAATGATGCAAAACTAACACTTTGCTTGACTAAATGTGGTAGTCAAATACTGGCCA
CTGTGTCAGTCTTAGTTGTAGGAAGTGGAAACCTAAACCCCATTACTGGCACCGTAAGCAGTGCTCAGGTG
TTTCTACGTTTTGATGCAAACGGTGTTCTTTTAACAGAACATTCTACACTAAAAAAATACTGGGGGTATAGG
CAGGGAGATAGCATAGATGGCACTCCATATACCAATGCTGTAGGATTCATGCCCAATTTAAAAGCTTATCC
AAAGTCACAAAGTTCTACTACTAAAAATAATATAGTAGGGCAAGTATACATGAATGGAGATGTTTCAAAAC
CTATGCTTCTCACTATAACCCTCAATGGTACTGATGACAGCAACAGTACATATTCAATGTCATTTTCATACA
CCTGGACTAATGGAAGCTATGTTGGAGCAACATTTGGGGCTAACTCTTATACCTTCTCATACATCGCCCAAG
AATGAACACTGTATCCCACCCTGCATGCCAACCCTTCCCACCCCACTCTGTGGAACAAACTCTGAAACACA
AAATAAAATAAAGTTCAAGTGTTTTATTGATTCAACAGTTTTACAGGATTCGAGCAGTTATTTTTCCTCCAC
CCTCCCAGGACATGGAATACACCACCCTCTCCCCCCGCACAGCCTTGAACATCTGAATGCCATTGGTGATG
GACATGCTTTTGGTCTCCACGTTCCACACAGTTTCAGAGCGAGCCAGTCTCGGGTCGGTCAGGGAGATGAA
ACCCTCCGGGCACTCCCGCATCTGCACCTCACAGCTCAACAGCTGAGGATTGTCCTCGGTGGTCGGGATCA
CGGTTATCTGGAAGAAGCAGAAGAGCGGCGGTGGGAATCATAGTCCGCGAACGGGATCGGCCGGTGGTGT
CGCATCAGGCCCCGCAGCAGTCGCTGCCGCCGCCGCTCCGTCAAGCTGCTGCTCAGGGGGTCCGGGTCCAG
GGACTCCCTCAGCATGATGCCCACGGCCCTCAGCATCAGTCGTCTGGTGCGGCGGGCGCAGCAGCGCATGC
GGATCTCGCTCAGGTCGCTGCAGTACGTGCAACACAGAACCACCAGGTTGTTCAACAGTCCATAGTTCAAC
ACGCTCCAGCCGAAACTCATCGCGGGAAGGATGCTACCCACGTGGCCGTCGTACCAGATCCTCAGGTAAAT
CAAGTGGTGCCCCCTCCAGAACACGCTGCCCACGTACATGATCTCCTTGGGCATGTGGCGGTTCACCACCTC
CCGGTACCACATCACCCTCTGGTTGAACATGCAGCCCCGGATGATCCTGCGGAACCACAGGGCCAGCACCG

10

20

30

40

50

CCCCGCCCGCCATGCAGCGAAGAGACCCCGGGTCCCGGCAATGGCAATGGAGGACCCACCGCTCGTACCC
GTGGATCATCTGGGAGCTGAACAAGTCTATGTTGGCACAGCACAGGCATATGCTCATGCATCTCTTCAGCA
CTCTCAACTCCTCGGGGGTCAAAACCATATCCCAGGGCACGGGGAACTCTTGCAGGACAGCGAACCCCGCA
GAACAGGGCAATCCTCGCACAGAACTTACATTGTGCATGGACAGGGTATCGCAATCAGGCAGCACCGGGT
GATCCTCCACCAGAGAAGCGCGGGTCTCGGTCTCCTCACAGCGTGGTAAGGGGGCCGGCCGATACGGGTG
ATGGCGGGACGCGGCTGATCGTGTTCGCGACCGTGTCATGATGCAGTTGCTTTCGGACATTTTCGTACTTGC
TGTAGCAGAACCTGGTCCGGGCGCTGCACACCGATCGCCGGCGGCGGTCTCGGCGCTTGGAACGCTCGGTG
TTGAAATTGTAAAACAGCCACTCTCTCAGACCGTGCAGCAGATCTAGGGCCTCAGGAGTGATGAAGATCCC
ATCATGCCTGATGGCTCTGATCACATCGACCACCGTGGAATGGGCCAGACCCAGCCAGATGATGCAATTTT
GTTGGGTTTCGGTGACGGCGGGGGAGGGAAGAACAGGAAGAACCATGATTAACTTTTAATCCAAACGGTCT
CGGAGTACTTCAAAATGAAGATCGCGGAGATGGCACCTCTCGCCCCCGCTGTGTTGGTGGAAAATAACAGC
CAGGTCAAAGGTGATACGGTTCTCGAGATGTTCCACGGTGGCTTCCAGCAAAGCCTCCACGCGCACATCCA
GAAACAAGACAATAGCGAAAGCGGGAGGGTTCTCTAATTCCTCAATCATCATGTTACACTCCTGCACCATC
CCCAGATAATTTTCATTTTTCCAGCCTTGAATGATTCGAACTAGTTCCTGAGGTAAATCCAAGCCAGCCATG
ATAAAGAGCTCGCGCAGAGCGCCCTCCACCGGCATTCTTAAGCACACCCTCATAATTCCAAGATATTCTGC
TCCTGGTTCACCTGCAGCAGATTGACAAGCGGAATATCAAAATCTCTGCCGCGATCCCTGAGCTCCTCCCTC
AGCAATAACTGTAAGTACTCTTTCATATCCTCTCCGAAATTTTTAGCCATAGGACCACCAGGAATAAGATTA
GGGCAAGCCACAGTACAGATAAACCGAAGTCCTCCCCAGTGAGCATTGCCAAATGCAAGACTGCTATAAG
CATGCTGGCTAGACCCGGTGATATCTTCCAGATAACTGGACAGAAAATCGCCCAGGCAATTTTTAAGAAAA
TCAACAAAAGAAAAATCCTCCAGGTGGACGTTTAGAGCCTCGGGAACAACGATGAAGTAAATGCAAGCGG
TGCGTTCCAGCATGGTTAGTTAGCTGATCTGTAGAAAAAACAAAAATGAACATTAAACCATGCTAGCCTGG
CGAACAGGTGGGTAAATCGTTCTCTCCAGCACCAGGCAGGCCACGGGGTCTCCGGCGCGACCCTCGTAAAA
ATTGTCGCTATGATTGAAAACCATCACAGAGAGACGTTCCCGGTGGCCGGCGTGAATGATTCGACAAGATG
AATACACCCCCGGAACATTGGCGTCCGCGAGTGAAAAAAAGCGCCCGAGGAAGCAATAAGGCACTACAAT
GCTCAGTCTCAAGTCCAGCAAAGCGATGCCATGCGGATGAAGCACAAAATTCTCAGGTGCGTACAAAATGT
AATTACTCCCCTCCTGCACAGGCAGCAAAGCCCCCGATCCCTCCAGGTACACATACAAAGCCTCAGCGTCC
ATAGCTTACCGAGCAGCAGCACACAACAGGCGCAAGAGTCAGAGAAAGGCTGAGCTCTAACCTGTCCACC
CGCTCTCTGCTCAATATATAGCCCAGATCTACACTGACGTAAAGGCCAAAGTCTAAAAATACCCGCCAAAT
AATCACACACGCCCAGCACACGCCCAGAAACCGGTGACACACTCAAAAAAATACGCGCACTTCCTCAAAC
GCCCAAAACTGCCGTCATTTCCGGGTTCCCACGCTACGTCATCAAAACACGACTTTCAAATTCCGTCGACCG
TTAAAAACGTCACCCGCCCCGCCCCTAACGGTCGCCCGTCTCTCAGCCAATCAGCGCCCCGCATCCCCAAA
TTCAAACACCTCATTTGCATATTAACGCGCACAAAAAGTTTGAGGTATATTATTGATGATGG

ChAdV68-CT-TSNA (配列番号66)

CATCATCAATAATATACCTCAAACTTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTGAATTTGGGGAGGA
AGGGCGGTGATTGGTCGAGGGATGAGCGACCGTTAGGGGCGGGGCGAGTGACGTTTTGATGACGTGGTTG
CGAGGAGGAGCCAGTTTGCAAGTTCTCGTGGGAAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTTGAACACGGAA
ATACTCAATTTTCCCGCGCTCTCTGACAGGAAATGAGGTGTTTCTGGGCGGATGCAAGTGAAAACGGGCCA
TTTTCGCGCGAAAACTGAATGAGGAAGTGAAAATCTGAGTAATTTCGCGTTTATGGCAGGGAGGAGTATTT
GCCGAGGGCCGAGTAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTACCGTGTTTTTCACCTAAATTTCCGC
GTACGGTGTCAAAGTCCGGTGTTTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGCCAGGGTATTTAAACCTGCGCTCTCC
AGTCAAGAGGCCACTCTTGAGTGCCAGCGAGAAGAGTTTTCTCCTCCGCGCCGCGAGTCAGATCTACACTT
TGAAAGTAGGGATAACAGGGTAATGACATTGATTATTGACTAGTTGTTAATAGTAATCAATTACGGGGTCA
TTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCC
AACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTG
ACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTC
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGAC
TTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACC
AATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTT
GTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCG
GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAACGCC
ATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGATCGCGCCACCATGGCTGGCATGACCGAGTACAAGCT
GGTGGTAGTGGGAGCAGGGGATGTTGGAAAATCAGCCTTGACTATTCAGCTCATCCAGGGCACAGATCTGG
ATCACCAGGAGAAATGTCTCTCGCGACTGTACGACCACATGCCTGAGGGTCTGACCCCCCTTATGGGAGTG
TCGTCCTCTTCTGCGCTGGCCCGTCTCGGATTACCCATGGATAAACTCAATAAAATCACCGCCCCGGCGAGC
CAGAAGTTAAGACAACTGCAAAAGATGGAAACTCCTGAACTACTGCCCTGTGGGTATCTTGTAGAAGAAAA
TACCACGATCTCTGTGACAGTGAAGGGCCTGGAGGCTCAGAATAAGATCAAAGGGTGCACTGGGTCGGTG
AACATGACTTTACAGAGAGCCAGCGCAGCTCCTAAGACTGGTGGCGGGGGTGAAGCCGCTGCATACAACA
ACACTCTTGTGGCACGGCACGTGCCCCAGATACCAAAGCCCGATTCCTTGGTGGGGCTTAGTGATGAGTTG
GGGAAGCGGGACACTTTTGCAGAGTCTCTGATTCGTAGGATGGCATCCGCGGGCTACCTGTTCCTGGACAT
CATCACATACGTGGTCTTTGCTGTAACCTTCGTGCTTGGTGTTTTAGGAGGGCTGAACACAGAAACCAATGA
GAAGGCTTTAGAAGCTGTGTTTGGCAAGTATGGAAGAATAGTGGAGGTGCTGGGGGGCCGGTCATGCGAG
GAGCTGACGGCGGTACTTCCTCCACCTCAGCTTTTGGGCAGGAGATTTAACTTCTTCTCATACTCCTATGTG
GCCGCAGGAAGTTCCGGGAATAACTATGACCTCATGGCCCAACCCATCACGCCCGGGCCCGACACAACCCC
GTTACCAGTGACCGATACTAGTTCCGTGAGTACAGGCCACGCCACCAGCCTGCCTGTGACTGACGCTGGAC
TCAGGGTTACAGAGAGTAAGGGGCACAGCGATTCATGGCACCTGTCTTTGGATACGGCCATCAGGGTCAAC
ACCCCTAAACTGGTGTCCGAGGTTGAGGAACTCAACAAAAGCATTACAGCGCTACGAGAAAAGCTACTGC
AGATGGTGGAGGCCGACAGACCCGGAAACCTCTTCATTGGGGGCTTAAATACAGAGACTAATGAAGACAG

CCCGGTCAAGGATGAAGTAGTGGTGAATGATCAGTGGGGACAGAACTGCAGCTGCCACCACGGCGGTTAC
GAGTTTCCGGACCTGCACCGCACCATCGTGTCTGAGTGTGACGTGTACCTCACCTACATGCTGCGCCAGGCC
GCCCTTCAGCTGTTCTTTGATCTCTACCACTCCATTCCGTCAAGCTTCAGCCCCTTAGTCCTCAGCTGTTTAG
TGCAGCCCTTGGAAGATGTGGAGGTCATGGAGAAGGACGGCACCACATTCTCCTGTGAAGTTTCTCATGAC
GAGGTTCCTCGGACATATGGACCCGTGTTTATGTGTCTGGGAGGACTGCTGACCATGGTGGCTGGAGCTGTT
TGGCTGACAGTTGGACCCGGACCAGGCGCCAAATTTGTTGCTGCTTGGACACTGAAAGCTGCTGCTGGGCC
CGGACCAGGCCAGTACATCAAGGCCAACTCTAAGTTTATCGGCATCACCGAATTGGGACCTGGACCCGGCT
AGTAGTGAGTTTAAACTCCCATTTAAATGTGAGGGTTAATGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGAT
GAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGC
TTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGT
TCAGGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATAACTATAACGG
TCCTAAGGTAGCGAGTGAGTAGTGTTCTGGGGCGGGGGAGGACCTGCATGAGGGCCAGAATAACTGAAAT
CTGTGCTTTTCTGTGTGTTGCAGCAGCATGAGCGGAAGCGGCTCCTTTGAGGGAGGGGTATTCAGCCCTTAT
CTGACGGGGCGTCTCCCCTCCTGGGCGGGAGTGCGTCAGAATGTGATGGGATCCACGGTGGACGGCCGGCC
CGTGCAGCCCGCGAACTCTTCAACCCTGACCTATGCAACCCTGAGCTCTTCGTCGTTGGACGCAGCTGCCGC
CGCAGCTGCTGCATCTGCCGCCAGCGCCGTGCGCGGAATGGCCATGGGCGCCGGCTACTACGGCACTCTGG
TGGCCAACTCGAGTTCCACCAATAATCCCGCCAGCCTGAACGAGGAGAAGCTGTTGCTGCTGATGGCCCAG
CTCGAGGCCTTGACCCAGCGCCTGGGCGAGCTGACCCAGCAGGTGGCTCAGCTGCAGGAGCAGACGCGGG
CCGCGGTTGCCACGGTGAAATCCAAATAAAAAATGAATCAATAAATAAACGGAGACGGTTGTTGATTTTAA
CACAGAGTCTGAATCTTTATTTGATTTTTCGCGCGCGGTAGGCCCTGGACCACCGGTCTCGATCATTGAGCA
CCCGGTGGATCTTTTCCAGGACCCGGTAGAGGTGGGCTTGGATGTTGAGGTACATGGGCATGAGCCCGTCC
CGGGGGTGGAGGTAGCTCCATTGCAGGGCCTCGTGCTCGGGGGTGGTGTTGTAAATCACCCAGTCATAGCA
GGGGCGCAGGGCATGGTGTTGCACAATATCTTTGAGGAGGAGACTGATGGCCACGGGCAGCCCTTTGGTGT
AGGTGTTTACAAATCTGTTGAGCTGGGAGGGATGCATGCGGGGGGAGATGAGGTGCATCTTGGCCTGGATC
TTGAGATTGGCGATGTTACCGCCCAGATCCCGCCTGGGGTTCATGTTGTGCAGGACCACCAGCACGGTGTA
TCCGGTGCACTTGGGGAATTTATCATGCAACTTGGAAGGGAAGGCGTGAAAGAATTTGGCGACGCCTTTGT
GCCCGCCCAGGTTTTCCATGCACTCATCCATGATGATGGCGATGGGCCCGTGGGCGGCGGCCTGGGCAAAG
ACGTTTCGGGGGTCGGACACATCATAGTTGTGGTCCTGGGTGAGGTCATCATAGGCCATTTTAATGAATTTG
GGGCGGAGGGTGCCGGACTGGGGGACAAAGGTACCCTCGATCCCGGGGGCGTAGTTCCCCTCACAGATCT
GCATCTCCCAGGCTTTGAGCTCGGAGGGGGGGATCATGTCCACCTGCGGGGCGATAAAGAACACGGTTTCC
GGGGCGGGGGAGATGAGCTGGGCCGAAAGCAAGTTCCGGAGCAGCTGGGACTTGCCGCAGCCGGTGGGGC
CGTAGATGACCCCGATGACCGGCTGCAGGTGGTAGTTGAGGGAGAGACAGCTGCCGTCCTCCCGGAGGAG
GGGGGCCACCTCGTTCATCATCTCGCGCACGTGCATGTTCTCGCGCACCAGTTCCGCCAGGAGGCGCTCTCC
CCCCAGGGATAGGAGCTCCTGGAGCGAGGCGAAGTTTTTCAGCGGCTTGAGTCCGTCGGCCATGGGCATTT
TGGAGAGGGTTTGTTGCAAGAGTTCCAGGCGGTCCCAGAGCTCGGTGATGTGCTCTACGGCATCTCGATCC
AGCAGACCTCCTCGTTTCGCGGGTTGGGACGGCTGCGGGAGTAGGGCACCAGACGATGGGCGTCCAGCGC
AGCCAGGGTCCGGTCCTTCCAGGGTCGCAGCGTCCGCGTCAGGGTGGTCTCCGTCACGGTGAAGGGGTGCG
CGCCGGGCTGGGCGCTTGCGAGGGTGCGCTTCAGGCTCATCCGGCTGGTCGAAAACCGCTCCCGATCGGCG
CCCTGCGCGTCGGCCAGGTAGCAATTGACCATGAGTTCGTAGTTGAGCGCCTCGGCCGCGTGGCCTTTGGC
GCGGAGCTTACCTTTGGAAGTCTGCCCGCAGGCGGGACAGAGGAGGGACTTGAGGGCGTAGAGCTTGGGG
GCGAGGAAGACGGACTCGGGGGCGTAGGCGTCCGCGCCGCAGTGGGCGCAGACGGTCTCGCACTCCACGA
GCCAGGTGAGGTCGGGCTGGTCGGGGTCAAAAACCAGTTTCCCGCCGTTCTTTTTGATGCGTTTCTTACCTT
TGGTCTCCATGAGCTCGTGTCCCCGCTGGGTGACAAAGAGGCTGTCCGTGTCCCCGTAGACCGACTTTATGG
GCCGGTCCTCGAGCGGTGTGCCGCGGTCCTCCTCGTAGAGGAACCCCGCCCACTCCGAGACGAAAGCCCGG
GTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCCACGTGGGACGGGTAGCGGTCGTTGTCCACCAGCGGGTCCACCTTTTC
CAGGGTATGCAAACACATGTCCCCCTCGTCCACATCCAGGAAGGTGATTGGCTTGTAAGTGTAGGCCACGT
GACCGGGGGTCCCGGCCGGGGGGGTATAAAAGGGTGCGGGTCCCTGCTCGTCCTCACTGTCTTCCGGATCG
CTGTCCAGGAGCGCCAGCTGTTGGGGTAGGTATTCCCTCTCGAAGGCGGGCATGACCTCGGCACTCAGGTT
GTCAGTTTCTAGAAACGAGGAGGATTTGATATTGACGGTGCCGGCGGAGATGCCTTTCAAGAGCCCCTCGT
CCATCTGGTCAGAAAAGACGATCTTTTTGTTGTCGAGCTTGGTGGCGAAGGAGCCGTAGAGGGCGTTGGAG
AGGAGCTTGGCGATGGAGCGCATGGTCTGGTTTTTTTCCTTGTCGGCGCGCTCCTTGGCGGCGATGTTGAGC
TGCACGTACTCGCGCGCCACGCACTTCCATTCGGGGAAGACGGTGGTCAGCTCGTCGGGCACGATTCTGAC
CTGCCAGCCCCGATTATGCAGGGTGATGAGGTCCACACTGGTGGCCACCTCGCCGCGCAGGGGCTCATTAG
TCCAGCAGAGGCGTCCGCCCTTGCGCGAGCAGAAGGGGGGCAGGGGGTCCAGCATGACCTCGTCGGGGGG
GTCGGCATCGATGGTGAAGATGCCGGGCAGGAGGTCGGGGTCAAAGTAGCTGATGGAAGTGGCCAGATCG
TCCAGGGCAGCTTGCCATTCGCGCACGGCCAGCGCGCGCTCGTAGGGACTGAGGGGCGTGCCCCAGGGCAT
GGGATGGGTAAGCGCGGAGGCGTACATGCCGCAGATGTCGTAGACGTAGAGGGGCTCCTCGAGGATGCCG
ATGTAGGTGGGGTAGCAGCGCCCCCCGCGGATGCTGGCGCGCACGTAGTCATACAGCTCGTGCGAGGGGG
CGAGGAGCCCCGGGCCCAGGTTGGTGCGACTGGGCTTTTCGGCGCGGTAGACGATCTGGCGGAAAATGGC
ATGCGAGTTGGAGGAGATGGTGGGCCTTTGGAAGATGTTGAAGTGGGCGTGGGGCAGTCCGACCGAGTCG
CGGATGAAGTGGGCGTAGGAGTCTTGCAGCTTGGCGACGAGCTCGGCGGTGACTAGGACGTCCAGAGCGC
AGTAGTCGAGGGTCTCCTGGATGATGTCATACTTGAGCTGTCCCTTTTGTTTCCACAGCTCGCGGTTGAGAA
GGAACTCTTCGCGGTCCTTCCAGTACTCTTCGAGGGGGAACCCGTCCTGATCTGCACGGTAAGAGCCTAGC
ATGTAGAACTGGTTGACGGCCTTGTAGGCGCAGCAGCCCTTCTCCACGGGGAGGGCGTAGGCCTGGGCGGC
CTTGCGCAGGGAGGTGTGCGTGAGGGCGAAAGTGTCCCTGACCATGACCTTGAGGAACTGGTGCTTGAAGT
CGATATCGTCGCAGCCCCCCTGCTCCCAGAGCTGGAAGTCCGTGCGCTTCTTGTAGGCGGGGTTGGGCAAA
GCGAAAGTAACATCGTTGAAGAGGATCTTGCCCGCGCGGGGCATAAAGTTGCGAGTGATGCGGAAAGGTT

10

20

30

40

50

GGGGCACCTCGGCCCGGTTGTTGATGACCTGGGCGGCGAGCACGATCTCGTCGAAGCCGTTGATGTTGTGG
CCCACGATGTAGAGTTCCACGAATCGCGGACGGCCCTTGACGTGGGGCAGTTTCTTGAGCTCCTCGTAGGT
GAGCTCGTCGGGGTCGCTGAGCCCGTGCTGCTCGAGCGCCCAGTCGGCGAGATGGGGGTTGGCGCGGAGG
AAGGAAGTCCAGAGATCCACGGCCAGGGCGGTTTGCAGACGGTCCCGGTACTGACGGAACTGCTGCCCGA
CGGCCATTTTTTCGGGGGTGACGCAGTAGAAGGTGCGGGGGTCCCCGTGCCAGCGATCCCATTTGAGCTGG
AGGGCGAGATCGAGGGCGAGCTCGACGAGCCGGTCGTCCCCGGAGAGTTTCATGACCAGCATGAAGGGGA
CGAGCTGCTTGCCGAAGGACCCCATCCAGGTGTAGGTTTCCACATCGTAGGTGAGGAAGAGCCTTTCGGTG
CGAGGATGCGAGCCGATGGGGAAGAACTGGATCTCCTGCCACCAATTGGAGGAATGGCTGTTGATGTGATG
GAAGTAGAAATGCCGACGGCGCGCCGAACACTCGTGCTTGTGTTTATACAAGCGGCCACAGTGCTCGCAAC
GCTGCACGGGATGCACGTGCTGCACGAGCTGTACCTGAGTTCCTTTGACGAGGAATTTCAGTGGGAAGTGG
AGTCGTGGCGCCTGCATCTCGTGCTGTACTACGTCGTGGTGGTCGGCCTGGCCCTCTTCTGCCTCGATGGTG
GTCATGCTGACGAGCCCGCGCGGGAGGCAGGTCCAGACCTCGGCGCGAGCGGGTCGGAGAGCGAGGACGA
GGGCGCGCAGGCCGGAGCTGTCCAGGGTCCTGAGACGCTGCGGAGTCAGGTCAGTGGGCAGCGGCGGCGC
GCGGTTGACTTGCAGGAGTTTTTCCAGGGCGCGCGGGAGGTCCAGATGGTACTTGATCTCCACCGCGCCAT
TGGTGGCGACGTCGATGGCTTGCAGGGTCCCGTGCCCCTGGGGTGTGACCACCGTCCCCCGTTTCTTCTTGG
GCGGCTGGGGCGACGGGGGCGGTGCCTCTTCCATGGTTAGAAGCGGCGGCGAGGACGCGCGCCGGGCGGC
AGGGGCGGCTCGGGGCCCGGAGGCAGGGGCGGCAGGGGCACGTCGGCGCCGCGCGCGGGTAGGTTCTGGT
ACTGCGCCCGGAGAAGACTGGCGTGAGCGACGACGCGACGGTTGACGTCCTGGATCTGACGCCTCTGGGTG
AAGGCCACGGGACCCGTGAGTTTGAACCTGAAAGAGAGTTCGACAGAATCAATCTCGGTATCGTTGACGGC
GGCCTGCCGCAGGATCTCTTGCACGTCGCCCGAGTTGTCCTGGTAGGCGATCTCGGTCATGAACTGCTCGAT
CTCCTCCTCTTGAAGGTCTCCGCGGCCGGCGCGCTCCACGGTGGCCGCGAGGTCGTTGGAGATGCGGCCCA
TGAGCTGCGAGAAGGCGTTCATGCCCGCCTCGTTCCAGACGCGGCTGTAGACCACGACGCCCTCGGGATCG
CGGGCGCGCATGACCACCTGGGCGAGGTTGAGCTCCACGTGGCGCGTGAAGACCGCGTAGTTGCAGAGGC
GCTGGTAGAGGTAGTTGAGCGTGGTGGCGATGTGCTCGGTGACGAAGAAATACATGATCCAGCGGCGGAG
CGGCATCTCGCTGACGTCGCCCAGCGCCTCCAAACGTTCCATGGCCTCGTAAAAGTCCACGGCGAAGTTGA
AAAACTGGGAGTTGCGCGCCGAGACGGTCAACTCCTCCTCCAGAAGACGGATGAGCTCGGCGATGGTGGC
GCGCACCTCGCGCTCGAAGGCCCCCGGGAGTTCCTCCACTTCCTCTTCTTCCTCCTCCACTAACATCTCTTCT
ACTTCCTCCTCAGGCGGCAGTGGTGGCGGGGGAGGGGGCCTGCGTCGCCGGCGGCGCACGGGCAGACGGT
CGATGAAGCGCTCGATGGTCTCGCCGCGCCGGCGTCGCATGGTCTCGGTGACGGCGCGCCCGTCCTCGCGG
GGCCGCAGCGTGAAGACGCCGCCGCGCATCTCCAGGTGGCCGGGGGGGTCCCCGTTGGGCAGGGAGAGGG
CGCTGACGATGCATCTTATCAATTGCCCCGTAGGGACTCCGCGCAAGGACCTGAGCGTCTCGAGATCCACG
GGATCTGAAAACCGCTGAACGAAGGCTTCGAGCCAGTCGCAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACGGTTTCTTC
TGGCGGGTCATGTTGGTTGGGAGCGGGGCGGGCGATGCTGCTGGTGATGAAGTTGAAATAGGCGGTTCTGA
GACGGCGGATGGTGGCGAGGAGCACCAGGTCTTTGGGCCCGGCTTGCTGGATGCGCAGACGGTCGGCCAT
GCCCCAGGCGTGGTCCTGACACCTGGCCAGGTCCTTGTAGTAGTCCTGCATGAGCCGCTCCACGGGCACCT
CCTCCTCGCCCGCGCGGCCGTGCATGCGCGTGAGCCCGAAGCCGCGCTGGGGCTGGACGAGCGCCAGGTCG
GCGACGACGCGCTCGGCGAGGATGGCTTGCTGGATCTGGGTGAGGGTGGTCTGGAAGTCATCAAAGTCGAC
GAAGCGGTGGTAGGCTCCGGTGTTGATGGTGTAGGAGCAGTTGGCCATGACGGACCAGTTGACGGTCTGGT
GGCCCGGACGCACGAGCTCGTGGTACTTGAGGCGCGAGTAGGCGCGCGTGTCGAAGATGTAGTCGTTGCAG
GTGCGCACCAGGTACTGGTAGCCGATGAGGAAGTGCGGCGGCGGCTGGCGGTAGAGCGGCCATCGCTCGG
TGGCGGGGGCGCCGGGCGCGAGGTCCTCGAGCATGGTGCGGTGGTAGCCGTAGATGTACCTGGACATCCA
GGTGATGCCGGCGGCGGTGGTGGAGGCGCGCGGGAACTCGCGGACGCGGTTCCAGATGTTGCGCAGCGGC
AGGAAGTAGTTCATGGTGGGCACGGTCTGGCCCGTGAGGCGCGCGCAGTCGTGGATGCTCTATACGGGCAA
AAACGAAAGCGGTCAGCGGCTCGACTCCGTGGCCTGGAGGCTAAGCGAACGGGTTGGGCTGCGCGTGTAC
CCCGGTTCGAATCTCGAATCAGGCTGGAGCCGCAGCTAACGTGGTATTGGCACTCCCGTCTCGACCCAAGC
CTGCACCAACCCTCCAGGATACGGAGGCGGGTCGTTTTGCAACTTTTTTTTGGAGGCCGGATGAGACTAGT
AAGCGCGGAAAGCGGCCGACCGCGATGGCTCGCTGCCGTAGTCTGGAGAAGAATCGCCAGGGTTGCGTTG
CGGTGTGCCCCGGTTCGAGGCCGGCCGGATTCCGCGGCTAACGAGGGCGTGGCTGCCCCGTCGTTTCCAAG
ACCCCATAGCCAGCCGACTTCTCCAGTTACGGAGCGAGCCCCTCTTTTGTTTTGTTTGTTTTTGCCAGATGCA
TCCCGTACTGCGGCAGATGCGCCCCCACCACCCTCCACCGCAACAACAGCCCCCTCCACAGCCGGCGCTTC
TGCCCCCGCCCCAGCAGCAACTTCCAGCCACGACCGCCGCGGCCGCCGTGAGCGGGGCTGGACAGAGTTAT
GATCACCAGCTGGCCTTGGAAGAGGGCGAGGGGCTGGCGCGCCTGGGGGCGTCGTCGCCGGAGCGGCACC
CGCGCGTGCAGATGAAAAGGGACGCTCGCGAGGCCTACGTGCCCAAGCAGAACCTGTTCAGAGACAGGAG
CGGCGAGGAGCCCGAGGAGATGCGCGCGGCCCGGTTCCACGCGGGGCGGGAGCTGCGGCGCGGCCTGGAC
CGAAAGAGGGTGCTGAGGGACGAGGATTTCGAGGCGGACGAGCTGACGGGGATCAGCCCCGCGCGCGCGC
ACGTGGCCGCGGCCAACCTGGTCACGGCGTACGAGCAGACCGTGAAGGAGGAGAGCAACTTCCAAAAATC
CTTCAACAACCACGTGCGCACCCTGATCGCGCGCGAGGAGGTGACCCTGGGCCTGATGCACCTGTGGGACC
TGCTGGAGGCCATCGTGCAGAACCCCACCAGCAAGCCGCTGACGGCGCAGCTGTTCCTGGTGGTGCAGCAT
AGTCGGGACAACGAAGCGTTCAGGGAGGCGCTGCTGAATATCACCGAGCCCGAGGGCCGCTGGCTCCTGG
ACCTGGTGAACATTCTGCAGAGCATCGTGGTGCAGGAGCGCGGGCTGCCGCTGTCCGAGAAGCTGGCGGCC
ATCAACTTCTCGGTGCTGAGTTTGGGCAAGTACTACGCTAGGAAGATCTACAAGACCCCGTACGTGCCCAT
AGACAAGGAGGTGAAGATCGACGGGTTTTACATGCGCATGACCCTGAAAGTGCTGACCCTGAGCGACGAT
CTGGGGGTGTACCGCAACGACAGGATGCACCGTGCGGTGAGCGCCAGCAGGCGGCGCGAGCTGAGCGACC
AGGAGCTGATGCATAGTCTGCAGCGGGCCCTGACCGGGGCCGGGACCGAGGGGGAGAGCTACTTTGACAT
GGGCGCGGACCTGCACTGGCAGCCCAGCCGCCGGGCCTTGGAGGCGGCGGCAGGACCCTACGTAGAAGAG
GTGGACGATGAGGTGGACGAGGAGGGCGAGTACCTGGAAGACTGATGGCGCGACCGTATTTTTGCTAGAT
GCAACAACAACAGCCACCTCCTGATCCCGCGATGCGGGCGGCGCTGCAGAGCCAGCCGTCCGGCATTAACT

CCTCGGACGATTGGACCCAGGCCATGCAACGCATCATGGCGCTGACGACCCGCAACCCCGAAGCCTTTAGA
CAGCAGCCCCAGGCCAACCGGCTCTCGGCCATCCTGGAGGCCGTGGTGCCCTCGCGCTCCAACCCCACGCA
CGAGAAGGTCCTGGCCATCGTGAACGCGCTGGTGGAGAACAAGGCCATCCGCGGCGACGAGGCCGGCCTG
GTGTACAACGCGCTGCTGGAGCGCGTGGCCCGCTACAACAGCACCAACGTGCAGACCAACCTGGACCGCA
TGGTGACCGACGTGCGCGAGGCCGTGGCCCAGCGCGAGCGGTTCCACCGCGAGTCCAACCTGGGATCCATG
GTGGCGCTGAACGCCTTCCTCAGCACCCAGCCCGCCAACGTGCCCCGGGGCCAGGAGGACTACACCAACTT
CATCAGCGCCCTGCGCCTGATGGTGACCGAGGTGCCCCAGAGCGAGGTGTACCAGTCCGGGCCGGACTACT
TCTTCCAGACCAGTCGCCAGGGCTTGCAGACCGTGAACCTGAGCCAGGCTTTCAAGAACTTGCAGGGCCTG
TGGGGCGTGCAGGCCCCGGTCGGGGACCGCGCGACGGTGTCGAGCCTGCTGACGCCGAACTCGCGCCTGCT
GCTGCTGCTGGTGGCCCCCTTCACGGACAGCGGCAGCATCAACCGCAACTCGTACCTGGGCTACCTGATTA
ACCTGTACCGCGAGGCCATCGGCCAGGCGCACGTGGACGAGCAGACCTACCAGGAGATCACCCACGTGAG
CCGCGCCCTGGGCCAGGACGACCCGGGCAACCTGGAAGCCACCCTGAACTTTTTGCTGACCAACCGGTCGC
AGAAGATCCCGCCCCAGTACGCGCTCAGCACCGAGGAGGAGCGCATCCTGCGTTACGTGCAGCAGAGCGT
GGGCCTGTTCCTGATGCAGGAGGGGGCCACCCCCAGCGCCGCGCTCGACATGACCGCGCGCAACATGGAG
CCCAGCATGTACGCCAGCAACCGCCCGTTCATCAATAAACTGATGGACTACTTGCATCGGGCGGCCGCCAT
GAACTCTGACTATTTCACCAACGCCATCCTGAATCCCCACTGGCTCCCGCCGCCGGGGTTCTACACGGGCG
AGTACGACATGCCCGACCCCAATGACGGGTTCCTGTGGGACGATGTGGACAGCAGCGTGTTCTCCCCCCGA
CCGGGTGCTAACGAGCGCCCCTTGTGGAAGAAGGAAGGCAGCGACCGACGCCCGTCCTCGGCGCTGTCCG
GCCGCGAGGGTGCTGCCGCGGCGGTGCCCGAGGCCGCCAGTCCTTTCCCGAGCTTGCCCTTCTCGCTGAAC
AGTATCCGCAGCAGCGAGCTGGGCAGGATCACGCGCCCGCGCTTGCTGGGCGAAGAGGAGTACTTGAATG
ACTCGCTGTTGAGACCCGAGCGGGAGAAGAACTTCCCCAATAACGGGATAGAAAGCCTGGTGGACAAGAT
GAGCCGCTGGAAGACGTATGCGCAGGAGCACAGGGACGATCCCCGGGCGTCGCAGGGGGCCACGAGCCGG
GGCAGCGCCGCCCGTAAACGCCGGTGGCACGACAGGCAGCGGGGACAGATGTGGGACGATGAGGACTCCG
CCGACGACAGCAGCGTGTTGGACTTGGGTGGGAGTGGTAACCCGTTCGCTCACCTGCGCCCCCGTATCGGG
CGCATGATGTAAGAGAAACCGAAAATAAATGATACTCACCAAGGCCATGGCGACCAGCGTGCGTTCGTTTC
TTCTCTGTTGTTGTTGTATCTAGTATGATGAGGCGTGCGTACCCGGAGGGTCCTCCTCCCTCGTACGAGAGC
GTGATGCAGCAGGCGATGGCGGCGGCGGCGATGCAGCCCCCGCTGGAGGCTCCTTACGTGCCCCCGCGGTA
CCTGGCGCCTACGGAGGGGCGGAACAGCATTCGTTACTCGGAGCTGGCACCCTTGTACGATACCACCCGGT
TGTACCTGGTGGACAACAAGTCGGCGGACATCGCCTCGCTGAACTACCAGAACGACCACAGCAACTTCCTG
ACCACCGTGGTGCAGAACAATGACTTCACCCCCACGGAGGCCAGCACCCAGACCATCAACTTTGACGAGCG
CTCGCGGTGGGGCGGCCAGCTGAAAACCATCATGCACACCAACATGCCCAACGTGAACGAGTTCATGTACA
GCAACAAGTTCAAGGCGCGGGTGATGGTCTCCCGCAAGACCCCCAATGGGGTGACAGTGACAGAGGATTA
TGATGGTAGTCAGGATGAGCTGAAGTATGAATGGGTGGAATTTGAGCTGCCCGAAGGCAACTTCTCGGTGA
CCATGACCATCGACCTGATGAACAACGCCATCATCGACAATTACTTGGCGGTGGGGCGGCAGAACGGGGT
GCTGGAGAGCGACATCGGCGTGAAGTTCGACACTAGGAACTTCAGGCTGGGCTGGGACCCCGTGACCGAG
CTGGTCATGCCCGGGGTGTACACCAACGAGGCTTTCCATCCCGATATTGTCTTGCTGCCCGGCTGCGGGGTG
GACTTCACCGAGAGCCGCCTCAGCAACCTGCTGGGCATTCGCAAGAGGCAGCCCTTCCAGGAAGGCTTCCA
GATCATGTACGAGGATCTGGAGGGGGGCAACATCCCCGCGCTCCTGGATGTCGACGCCTATGAGAAAAGC
AAGGAGGATGCAGCAGCTGAAGCAACTGCAGCCGTAGCTACCGCCTCTACCGAGGTCAGGGGCGATAATT
TTGCAAGCGCCGCAGCAGTGGCAGCGGCCGAGGCGGCTGAAACCGAAAGTAAGATAGTCATTCAGCCGGT
GGAGAAGGATAGCAAGAACAGGAGCTACAACGTACTACCGGACAAGATAAACACCGCCTACCGCAGCTGG
TACCTAGCCTACAACTATGGCGACCCCGAGAAGGGCGTGCGCTCCTGGACGCTGCTCACCACCTCGGACGT
CACCTGCGGCGTGGAGCAAGTCTACTGGTCGCTGCCCGACATGATGCAAGACCCGGTCACCTTCCGCTCCA
CGCGTCAAGTTAGCAACTACCCGGTGGTGGGCGCCGAGCTCCTGCCCCGTCTACTCCAAGAGCTTCTTCAAC
GAGCAGGCCGTCTACTCGCAGCAGCTGCGCGCCTTCACCTCGCTTACGCACGTCTTCAACCGCTTCCCCGAG
AACCAGATCCTCGTCCGCCCGCCCGCGCCCACCATTACCACCGTCAGTGAAAACGTTCCTGCTCTCACAGAT
CACGGGACCCTGCCGCTGCGCAGCAGTATCCGGGGAGTCCAGCGCGTGACCGTTACTGACGCCAGACGCCG
CACCTGCCCCTACGTCTACAAGGCCCTGGGCATAGTCGCGCCGCGCGTCCTCTCGAGCCGCACCTTCTAAAT
GTCCATTCTCATCTCGCCCAGTAATAACACCGGTTGGGGCCTGCGCGCGCCCAGCAAGATGTACGGAGGCG
CTCGCCAACGCTCCACGCAACACCCCGTGCGCGTGCGCGGGCACTTCCGCGCTCCCTGGGGCGCCCTCAAG
GGCCGCGTGCGGTCGCGCACCACCGTCGACGACGTGATCGACCAGGTGGTGGCCGACGCGCGCAACTACA
CCCCCGCCGCCGCGCCCGTCTCCACCGTGGACGCCGTCATCGACAGCGTGGTGGCCGACGCGCGCCGGTAC
GCCCGCGCCAAGAGCCGGCGGCGGCGCATCGCCCGGCGGCACCGGAGCACCCCCGCCATGCGCGCGGCGC
GAGCCTTGCTGCGCAGGGCCAGGCGCACGGGACGCAGGGCCATGCTCAGGGCGGCCAGACGCGCGGCTTC
AGGCGCCAGCGCCGGCAGGACCCGGAGACGCGCGGCCACGGCGGCGGCAGCGGCCATCGCCAGCATGTCC
CGCCCGCGGCGAGGGAACGTGTACTGGGTGCGCGACGCCGCCACCGGTGTGCGCGTGCCCGTGCGCACCC
GCCCCCCTCGCACTTGAAGATGTTCACTTCGCGATGTTGATGTGTCCCAGCGGCGAGGAGGATGTCCAAGC
GCAAATTCAAGGAAGAGATGCTCCAGGTCATCGCGCCTGAGATCTACGGCCCTGCGGTGGTGAAGGAGGA
AAGAAAGCCCCGCAAAATCAAGCGGGTCAAAAAGGACAAAAAGGAAGAAGAAAGTGATGTGGACGGATT
GGTGGAGTTTGTGCGCGAGTTCGCCCCCCGGCGGCGCGTGCAGTGGCGCGGGCGGAAGGTGCAACCGGTG
CTGAGACCCGGCACCACCGTGGTCTTCACGCCCGGCGAGCGCTCCGGCACCGCTTCCAAGCGCTCCTACGA
CGAGGTGTACGGGGATGATGATATTCTGGAGCAGGCGGCCGAGCGCCTGGGCGAGTTTGCTTACGGCAAGC
GCAGCCGTTCCGCACCGAAGGAAGAGGCGGTGTCCATCCCGCTGGACCACGGCAACCCCACGCCGAGCCT
CAAGCCCGTGACCTTGCAGCAGGTGCTGCCGACCGCGGCGCCGCGCCGGGGGTTCAAGCGCGAGGGCGAG
GATCTGTACCCCACCATGCAGCTGATGGTGCCCAAGCGCCAGAAGCTGGAAGACGTGCTGGAGACCATGA
AGGTGGACCCGGACGTGCAGCCCGAGGTCAAGGTGCGGCCCATCAAGCAGGTGGCCCCGGGCCTGGGCGT
GCAGACCGTGGACATCAAGATTCCCACGGAGCCCATGGAAACGCAGACCGAGCCCATGATCAAGCCCAGC

ACCAGCACCATGGAGGTGCAGACGGATCCCTGGATGCCATCGGCTCCTAGTCGAAGACCCCGGCGCAAGT
ACGGCGCGGCCAGCCTGCTGATGCCCAACTACGCGCTGCATCCTTCCATCATCCCCACGCCGGGCTACCGC
GGCACGCGCTTCTACCGCGGTCATACCAGCAGCCGCCGCCGCAAGACCACCACTCGCCGCCGCCGTCGCCG
CACCGCCGCTGCAACCACCCCTGCCGCCCTGGTGCGGAGAGTGTACCGCCGCGGCCGCGCACCTCTGACCC
TGCCGCGCGCGCGCTACCACCCGAGCATCGCCATTTAAACTTTCGCCTGCTTTGCAGATCAATGGCCCTCAC
ATGCCGCCTTCGCGTTCCCATTACGGGCTACCGAGGAAGAAAACCGCGCCGTAGAAGGCTGGCGGGGAAC
GGGATGCGTCGCCACCACCACCGGCGGCGGCGCGCCATCAGCAAGCGGTTGGGGGGAGGCTTCCTGCCCG
CGCTGATCCCCATCATCGCCGCGGCGATCGGGGCGATCCCCGGCATTGCTTCCGTGGCGGTGCAGGCCTCT
CAGCGCCACTGAGACACACTTGGAAACATCTTGTAATAAACCAATGGACTCTGACGCTCCTGGTCCTGTGA
TGTGTTTTCGTAGACAGATGGAAGACATCAATTTTTCGTCCCTGGCTCCGCGACACGGCACGCGGCCGTTCA
TGGGCACCTGGAGCGACATCGGCACCAGCCAACTGAACGGGGGCGCCTTCAATTGGAGCAGTCTCTGGAG
CGGGCTTAAGAATTTCGGGTCCACGCTTAAAACCTATGGCAGCAAGGCGTGGAACAGCACCACAGGGCAG
GCGCTGAGGGATAAGCTGAAAGAGCAGAACTTCCAGCAGAAGGTGGTCGATGGGCTCGCCTCGGGCATCA
ACGGGGTGGTGGACCTGGCCAACCAGGCCGTGCAGCGGCAGATCAACAGCCGCCTGGACCCGGTGCCGCC
CGCCGGCTCCGTGGAGATGCCGCAGGTGGAGGAGGAGCTGCCTCCCCTGGACAAGCGGGGCGAGAAGCGA
CCCCGCCCCGATGCGGAGGAGACGCTGCTGACGCACACGGACGAGCCGCCCCCGTACGAGGAGGCGGTGA
AACTGGGTCTGCCCACCACGCGGCCCATCGCGCCCCTGGCCACCGGGGTGCTGAAACCCGAAAAGCCCGCG
ACCCTGGACTTGCCTCCTCCCCAGCCTTCCCGCCCCTCTACAGTGGCTAAGCCCCTGCCGCCGGTGGCCGTG
GCCCGCGCGCGACCCGGGGGCACCGCCCGCCCTCATGCGAACTGGCAGAGCACTCTGAACAGCATCGTGG
GTCTGGGAGTGCAGAGTGTGAAGCGCCGCCGCTGCTATTAAACCTACCGTAGCGCTTAACTTGCTTGTCTGT
GTGTGTATGTATTATGTCGCCGCCGCCGCTGTCCACCAGAAGGAGGAGTGAAGAGGCGCGTCGCCGAGTTG
CAAGATGGCCACCCCATCGATGCTGCCCCAGTGGGCGTACATGCACATCGCCGGACAGGACGCTTCGGAGT
ACCTGAGTCCGGGTCTGGTGCAGTTTGCCCGCGCCACAGACACCTACTTCAGTCTGGGGAACAAGTTTAGG
AACCCCACGGTGGCGCCCACGCACGATGTGACCACCGACCGCAGCCAGCGGCTGACGCTGCGCTTCGTGCC
CGTGGACCGCGAGGACAACACCTACTCGTACAAAGTGCGCTACACGCTGGCCGTGGGCGACAACCGCGTG
CTGGACATGGCCAGCACCTACTTTGACATCCGCGGCGTGCTGGATCGGGGCCCTAGCTTCAAACCCTACTC
CGGCACCGCCTACAACAGTCTGGCCCCCAAGGGAGCACCCAACACTTGTCAGTGGACATATAAAGCCGATG
GTGAAACTGCCACAGAAAAAACCTATACATATGGAAATGCACCCGTGCAGGGCATTAACATCACAAAAGA
TGGTATTCAACTTGGAACTGACACCGATGATCAGCCAATCTACGCAGATAAAACCTATCAGCCTGAACCTC
AAGTGGGTGATGCTGAATGGCATGACATCACTGGTACTGATGAAAAGTATGGAGGCAGAGCTCTTAAGCCT
GATACCAAAATGAAGCCTTGTTATGGTTCTTTTGCCAAGCCTACTAATAAAGAAGGAGGTCAGGCAAATGT
GAAAACAGGAACAGGCACTACTAAAGAATATGACATAGACATGGCTTTCTTTGACAACAGAAGTGCGGCT
GCTGCTGGCCTAGCTCCAGAAATTGTTTTGTATACTGAAAATGTGGATTTGGAAACTCCAGATACCCATATT
GTATACAAAGCAGGCACAGATGACAGCAGCTCTTCTATTAATTTGGGTCAGCAAGCCATGCCCAACAGACC
TAACTACATTGGTTTCAGAGACAACTTTATCGGGCTCATGTACTACAACAGCACTGGCAATATGGGGGTGC
TGGCCGGTCAGGCTTCTCAGCTGAATGCTGTGGTTGACTTGCAAGACAGAAACACCGAGCTGTCCTACCAG
CTCTTGCTTGACTCTCTGGGTGACAGAACCCGGTATTTCAGTATGTGGAATCAGGCGGTGGACAGCTATGAT
CCTGATGTGCGCATTATTGAAAATCATGGTGTGGAGGATGAACTTCCCAACTATTGTTTCCCTCTGGATGCT
GTTGGCAGAACAGATACTTATCAGGGAATTAAGGCTAATGGAACTGATCAAACCACATGGACCAAAGATG
ACAGTGTCAATGATGCTAATGAGATAGGCAAGGGTAATCCATTCGCCATGGAAATCAACATCCAAGCCAAC
CTGTGGAGGAACTTCCTCTACGCCAACGTGGCCCTGTACCTGCCCGACTCTTACAAGTACACGCCGGCCAA
TGTTACCCTGCCCACCAACACCAACACCTACGATTACATGAACGGCCGGGTGGTGGCGCCCTCGCTGGTGG
ACTCCTACATCAACATCGGGGCGCGCTGGTCGCTGGATCCCATGGACAACGTGAACCCCTTCAACCACCAC
CGCAATGCGGGGCTGCGCTACCGCTCCATGCTCCTGGGCAACGGGCGCTACGTGCCCTTCCACATCCAGGT
GCCCCAGAAATTTTTCGCCATCAAGAGCCTCCTGCTCCTGCCCGGGTCCTACACCTACGAGTGGAACTTCCG
CAAGGACGTCAACATGATCCTGCAGAGCTCCCTCGGCAACGACCTGCGCACGGACGGGGCCTCCATCTCCT
TCACCAGCATCAACCTCTACGCCACCTTCTTCCCCATGGCGCACAACACGGCCTCCACGCTCGAGGCCATGC
TGCGCAACGACACCAACGACCAGTCCTTCAACGACTACCTCTCGGCGGCCAACATGCTCTACCCCATCCCG
GCCAACGCCACCAACGTGCCCATCTCCATCCCCTCGCGCAACTGGGCCGCCTTCCGCGGCTGGTCCTTCACG
CGTCTCAAGACCAAGGAGACGCCCTCGCTGGGCTCCGGGTTCGACCCCTACTTCGTCTACTCGGGCTCCATC
CCCTACCTCGACGGCACCTTCTACCTCAACCACACCTTCAAGAAGGTCTCCATCACCTTCGACTCCTCCGTC
AGCTGGCCCGGCAACGACCGGCTCCTGACGCCCAACGAGTTCGAAATCAAGCGCACCGTCGACGGCGAGG
GCTACAACGTGGCCCAGTGCAACATGACCAAGGACTGGTTCCTGGTCCAGATGCTGGCCCACTACAACATC
GGCTACCAGGGCTTCTACGTGCCCGAGGGCTACAAGGACCGCATGTACTCCTTCTTCCGCAACTTCCAGCCC
ATGAGCCGCCAGGTGGTGGACGAGGTCAACTACAAGGACTACCAGGCCGTCACCCTGGCCTACCAGCACA
ACAACTCGGGCTTCGTCGGCTACCTCGCGCCCACCATGCGCCAGGGCCAGCCCTACCCCGCCAACTACCCC
TACCCGCTCATCGGCAAGAGCGCCGTCACCAGCGTCACCCAGAAAAAGTTCCTCTGCGACAGGGTCATGTG
GCGCATCCCCTTCTCCAGCAACTTCATGTCCATGGGCGCGCTCACCGACCTCGGCCAGAACATGCTCTATGC
CAACTCCGCCCACGCGCTAGACATGAATTTCGAAGTCGACCCCATGGATGAGTCCACCCTTCTCTATGTTGT
CTTCGAAGTCTTCGACGTCGTCCGAGTGCACCAGCCCCACCGCGGCGTCATCGAGGCCGTCTACCTGCGCA
CCCCCTTCTCGGCCGGTAACGCCACCACCTAAGCTCTTGCTTCTTGCAAGCCATGGCCGCGGGCTCCGGCGA
GCAGGAGCTCAGGGCCATCATCCGCGACCTGGGCTGCGGGCCCTACTTCCTGGGCACCTTCGATAAGCGCT
TCCCGGGATTCATGGCCCCGCACAAGCTGGCCTGCGCCATCGTCAACACGGCCGGCCGCGAGACCGGGGGC
GAGCACTGGCTGGCCTTCGCCTGGAACCCGCGCTCGAACACCTGCTACCTCTTCGACCCCTTCGGGTTCTCG
GACGAGCGCCTCAAGCAGATCTACCAGTTCGAGTACGAGGGCCTGCTGCGCCGCAGCGCCCTGGCCACCGA
GGACCGCTGCGTCACCCTGGAAAAGTCCACCCAGACCGTGCAGGGTCCGCGCTCGGCCGCCTGCGGGCTCT
TCTGCTGCATGTTCCTGCACGCCTTCGTGCACTGGCCCGACCGCCCCATGGACAAGAACCCCACCATGAACT

10

20

30

40

50

TGCTGACGGGGGTGCCCAACGGCATGCTCCAGTCGCCCCAGGTGGAACCCACCCTGCGCCGCAACCAGGA
GGCGCTCTACCGCTTCCTCAACTCCCACTCCGCCTACTTTCGCTCCCACCGCGCGCGCATCGAGAAGGCCAC
CGCCTTCGACCGCATGAATCAAGACATGTAAACCGTGTGTGTATGTTAAATGTCTTTAATAAACAGCACTTT
CATGTTACACATGCATCTGAGATGATTTATTTAGAAATCGAAAGGGTTCTGCCGGGTCTCGGCATGGCCCGC
GGGCAGGGACACGTTGCGGAACTGGTACTTGGCCAGCCACTTGAACTCGGGGATCAGCAGTTTGGGCAGCG
GGGTGTCGGGGAAGGAGTCGGTCCACAGCTTCCGCGTCAGTTGCAGGGCGCCCAGCAGGTCGGGCGCGGA
GATCTTGAAATCGCAGTTGGGACCCGCGTTCTGCGCGCGGGAGTTGCGGTACACGGGGTTGCAGCACTGGA
ACACCATCAGGGCCGGGTGCTTCACGCTCGCCAGCACCGTCGCGTCGGTGATGCTCTCCACGTCGAGGTCC
TCGGCGTTGGCCATCCCGAAGGGGGTCATCTTGCAGGTCTGCCTTCCCATGGTGGGCACGCACCCGGGCTT
GTGGTTGCAATCGCAGTGCAGGGGGATCAGCATCATCTGGGCCTGGTCGGCGTTCATCCCCGGGTACATGG
CCTTCATGAAAGCCTCCAATTGCCTGAACGCCTGCTGGGCCTTGGCTCCCTCGGTGAAGAAGACCCCGCAG
GACTTGCTAGAGAACTGGTTGGTGGCGCACCCGGCGTCGTGCACGCAGCAGCGCGCGTCGTTGTTGGCCAG
CTGCACCACGCTGCGCCCCCAGCGGTTCTGGGTGATCTTGGCCCGGTCGGGGTTCTCCTTCAGCGCGCGCTG
CCCGTTCTCGCTCGCCACATCCATCTCGATCATGTGCTCCTTCTGGATCATGGTGGTCCCGTGCAGGCACCG
CAGCTTGCCCTCGGCCTCGGTGCACCCGTGCAGCCACAGCGCGCACCCGGTGCACTCCCAGTTCTTGTGGG
CGATCTGGGAATGCGCGTGCACGAAGCCCTGCAGGAAGCGGCCCATCATGGTGGTCAGGGTCTTGTTGCTA
GTGAAGGTCAGCGGAATGCCGCGGTGCTCCTCGTTGATGTACAGGTGGCAGATGCGGCGGTACACCTCGCC
CTGCTCGGGCATCAGCTGGAAGTTGGCTTTCAGGTCGGTCTCCACGCGGTAGCGGTCCATCAGCATAGTCAT
GATTTCCATACCCTTCTCCCAGGCCGAGACGATGGGCAGGCTCATAGGGTTCTTCACCATCATCTTAGCGCT
AGCAGCCGCGGCCAGGGGGTCGCTCTCGTCCAGGGTCTCAAAGCTCCGCTTGCCGTCCTTCTCGGTGATCC
GCACCGGGGGGGTAGCTGAAGCCCACGGCCGCCAGCTCCTCCTCGGCCTGTCTTTCGTCCTCGCTGTCCTGGC
TGACGTCCTGCAGGACCACATGCTTGGTCTTGCGGGGTTTCTTCTTGGGCGGCAGCGGCGGCGGAGATGTT
GGAGATGGCGAGGGGGAGCGCGAGTTCTCGCTCACCACTACTATCTCTTCCTCTTCTTGGTCCGAGGCCAC
GCGGCGGTAGGTATGTCTCTTCGGGGGCAGAGGCGGAGGCGACGGGCTCTCGCCGCCGCGACTTGGCGGA
TGGCTGGCAGAGCCCCTTCCGCGTTCGGGGGTGCGCTCCCGGCGGCGCTCTGACTGACTTCCTCCGCGGCC
GGCCATTGTGTTCTCCTAGGGAGGAACAACAAGCATGGAGACTCAGCCATCGCCAACCTCGCCATCTGCCC
CCACCGCCGACGAGAAGCAGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAACCGCCCCGCCGCCCAGCCCCGCCACCTC
CGACGCGGCCGTCCCAGACATGCAAGAGATGGAGGAATCCATCGAGATTGACCTGGGCTATGTGACGCCC
GCGGAGCACGAGGAGGAGCTGGCAGTGCGCTTTTCACAAGAAGAGATACACCAAGAACAGCCAGAGCAG
GAAGCAGAGAATGAGCAGAGTCAGGCTGGGCTCGAGCATGACGGCGACTACCTCCACCTGAGCGGGGGGG
AGGACGCGCTCATCAAGCATCTGGCCCGGCAGGCCACCATCGTCAAGGATGCGCTGCTCGACCGCACCGAG
GTGCCCCTCAGCGTGGAGGAGCTCAGCCGCGCCTACGAGTTGAACCTCTTCTCGCCGCGCGTGCCCCCCAA
GCGCCAGCCCAATGGCACCTGCGAGCCCAACCCGCGCCTCAACTTCTACCCGGTCTTCGCGGTGCCCGAGG
CCCTGGCCACCTACCACATCTTTTTCAAGAACCAAAAGATCCCCGTCTCCTGCCGCGCCAACCGCACCCGCG
CCGACGCCCTTTTCAACCTGGGTCCCGGCGCCCGCCTACCTGATATCGCCTCCTTGGAAGAGGTTCCCAAGA
TCTTCGAGGGTCTGGGCAGCGACGAGACTCGGGCCGCGAACGCTCTGCAAGGAGAAGGAGGAGAGCATGA
GCACCACAGCGCCCTGGTCGAGTTGGAAGGCGACAACGCGCGGCTGGCGGTGCTCAAACGCACGGTCGAG
CTGACCCATTTCGCCTACCCGGCTCTGAACCTGCCCCCCAAAGTCATGAGCGCGGTCATGGACCAGGTGCT
CATCAAGCGCGCGTCGCCCATCTCCGAGGACGAGGGCATGCAAGACTCCGAGGAGGGCAAGCCCGTGGTC
AGCGACGAGCAGCTGGCCCGGTGGCTGGGTCCTAATGCTAGTCCCCAGAGTTTGGAAGAGCGGCGCAAAC
TCATGATGGCCGTGGTCCTGGTGACCGTGGAGCTGGAGTGCCTGCGCCGCTTCTTCGCCGACGCGGAGACC
CTGCGCAAGGTCGAGGAGAACCTGCACTACCTCTTCAGGCACGGGTTCGTGCGCCAGGCCTGCAAGATCTC
CAACGTGGAGCTGACCAACCTGGTCTCCTACATGGGCATCTTGCACGAGAACCGCCTGGGGCAGAACGTGC
TGCACACCACCCTGCGCGGGGAGGCCCGGCGCGACTACATCCGCGACTGCGTCTACCTCTACCTCTGCCAC
ACCTGGCAGACGGGCATGGGCGTGTGGCAGCAGTGTCTGGAGGAGCAGAACCTGAAAGAGCTCTGCAAGC
TCCTGCAGAAGAACCTCAAGGGTCTGTGGACCGGGTTCGACGAGCGCACCACCGCCTCGGACCTGGCCGAC
CTCATTTTCCCCGAGCGCCTCAGGCTGACGCTGCGCAACGGCCTGCCCGACTTTATGAGCCAAAGCATGTTG
CAAAACTTTCGCTCTTTCATCCTCGAACGCTCCGGAATCCTGCCCGCCACCTGCTCCGCGCTGCCCTCGGAC
TTCGTGCCGCTGACCTTCCGCGAGTGCCCCCCGCCGCTGTGGAGCCACTGCTACCTGCTGCGCCTGGCCAAC
TACCTGGCCTACCACTCGGACGTGATCGAGGACGTCAGCGGCGAGGGCCTGCTCGAGTGCCACTGCCGCTG
CAACCTCTGCACGCCGCACCGCTCCCTGGCCTGCAACCCCCAGCTGCTGAGCGAGACCCAGATCATCGGCA
CCTTCGAGTTGCAAGGGCCCAGCGAAGGCGAGGGTTCAGCCGCCAAGGGGGGTCTGAAACTCACCCCGGG
GCTGTGGACCTCGGCCTACTTGCGCAAGTTCGTGCCCGAGGACTACCATCCCTTCGAGATCAGGTTCTACGA
GGACCAATCCCATCCGCCCAAGGCCGAGCTGTCGGCCTGCGTCATCACCCAGGGGGCGATCCTGGCCCAAT
TGCAAGCCATCCAGAAATCCCGCCAAGAATTCTTGCTGAAAAAGGGCCGCGGGGTCTACCTCGACCCCCAG
ACCGGTGAGGAGCTCAACCCCGGCTTCCCCCAGGATGCCCCGAGGAAACAAGAAGCTGAAAGTGGAGCTG
CCGCCCGTGGAGGATTTGGAGGAAGACTGGGAGAACAGCAGTCAGGCAGAGGAGGAGGAGATGGAGGAA
GACTGGGACAGCACTCAGGCAGAGGAGGACAGCCTGCAAGACAGTCTGGAGGAAGACGAGGAGGAGGCA
GAGGAGGAGGTGGAAGAAGCAGCCGCCGCCAGACCGTCGTCCTCGGCGGGGGAGAAAGCAAGCAGCACG
GATACCATCTCCGCTCCGGGTCGGGGTCCCGCTCGACCACACAGTAGATGGGACGAGACCGGACGATTCCC
GAACCCCACCACCCAGACCGGTAAGAAGGAGCGGCAGGGATACAAGTCCTGGCGGGGGCACAAAAACGC
CATCGTCTCCTGCTTGCAGGCCTGCGGGGGCAACATCTCCTTCACCCGGCGCTACCTGCTCTTCCACCGCGG
GGTGAACTTTCCCCGCAACATCTTGCATTACTACCGTCACCTCCACAGCCCCTACTACTTCCAAGAAGAGGC
AGCAGCAGCAGAAAAAGACCAGCAGAAAACCAGCAGCTAGAAAATCCACAGCGGCGGCAGCAGGTGGAC
TGAGGATCGCGGCGAACGAGCCGGCGCAAACCCGGGAGCTGAGGAACCGGATCTTTCCCACCCTCTATGCC
ATCTTCCAGCAGAGTCGGGGGCAGGAGCAGGAACTGAAAGTCAAGAACCGTTCTCTGCGCTCGCTCACCCG
CAGTTGTCTGTATCACAAGAGCGAAGACCAACTTCAGCGCACTCTCGAGGACGCCGAGGCTCTCTTCAACA

10 20 30 40 50

AGTACTGCGCGCTCACTCTTAAAGAGTAGCCCGCGCCCGCCCAGTCGCAGAAAAAGGCGGGAATTACGTCA
CCTGTGCCCTTCGCCCTAGCCGCCTCCACCCATCATCATGAGCAAAGAGATTCCCACGCCTTACATGTGGAG
CTACCAGCCCCAGATGGGCCTGGCCGCCGGTGCCGCCCAGGACTACTCCACCCGCATGAATTGGCTCAGCG
CCGGGCCCGCGATGATCTCACGGGTGAATGACATCCGCGCCCACCGAAACCAGATACTCCTAGAACAGTCA
GCGCTCACCGCCACGCCCCGCAATCACCTCAATCCGCGTAATTGGCCCGCCGCCCTGGTGTACCAGGAAAT
TCCCCAGCCCACGACCGTACTACTTCCGCGAGACGCCCAGGCCGAAGTCCAGCTGACTAACTCAGGTGTCC
AGCTGGCGGGCGGCGCCACCCTGTGTCGTCACCGCCCCGCTCAGGGTATAAAGCGGCTGGTGATCCGGGGC
AGAGGCACACAGCTCAACGACGAGGTGGTGAGCTCTTCGCTGGGTCTGCGACCTGACGGAGTCTTCCAACT
CGCCGGATCGGGGAGATCTTCCTTCACGCCTCGTCAGGCCGTCCTGACTTTGGAGAGTTCGTCCTCGCAGCC
CCGCTCGGGTGGCATCGGCACTCTCCAGTTCGTGGAGGAGTTCACTCCCTCGGTCTACTTCAACCCCTTCTC
CGGCTCCCCCGGCCACTACCCGGACGAGTTCATCCCGAACTTCGACGCCATCAGCGAGTCGGTGGACGGCT
ACGATTGAAACTAATCACCCCCTTATCCAGTGAAATAAAGATCATATTGATGATGATTTTACAGAAATAAA
AAATAATCATTTGATTTGAAATAAAGATACAATCATATTGATGATTTGAGTTTAACAAAAAAATAAAGAAT
CACTTACTTGAAATCTGATACCAGGTCTCTGTCCATGTTTTCTGCCAACACCACTTCACTCCCCTCTTCCCAG
CTCTGGTACTGCAGGCCCCGGCGGGCTGCAAACTTCCTCCACACGCTGAAGGGGATGTCAAATTCCTCCTG
TCCCTCAATCTTCATTTTATCTTCTATCAGATGTCCAAAAAGCGCGTCCGGGTGGATGATGACTTCGACCCC
GTCTACCCCTACGATGCAGACAACGCACCGACCGTGCCCTTCATCAACCCCCCCTTCGTCTCTTCAGATGGA
TTCCAAGAGAAGCCCCTGGGGGTGTTGTCCCTGCGACTGGCCGACCCCGTCACCACCAAGAACGGGGAAAT
CACCCTCAAGCTGGGAGAGGGGGTGGACCTCGATTCCTCGGGAAAACTCATCTCCAACACGGCCACCAAG
GCCGCCGCCCCTCTCAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCCTTAACATGGATCACCCCTTTTACACTAAAGAT
GGAAAATTATCCTTACAAGTTTCTCCACCATTAAATATACTGAGAACAAGCATTCTAAACACACTAGCTTTA
GGTTTTGGATCAGGTTTAGGACTCCGTGGCTCTGCCTTGGCAGTACAGTTAGTCTCTCCACTTACATTTGAT
ACTGATGGAAACATAAAGCTTACCTTAGACAGAGGTTTGCATGTTACAACAGGAGATGCAATTGAAAGCAA
CATAAGCTGGGCTAAAGGTTTAAAATTTGAAGATGGAGCCATAGCAACCAACATTGGAAATGGGTTAGAGT
TTGGAAGCAGTAGTACAGAAACAGGTGTTGATGATGCTTACCCAATCCAAGTTAAACTTGGATCTGGCCTT
AGCTTTGACAGTACAGGAGCCATAATGGCTGGTAACAAAGAAGACGATAAACTCACTTTGTGGACAACACC
TGATCCATCACCAAACTGTCAAATACTCGCAGAAAATGATGCAAAACTAACACTTTGCTTGACTAAATGTG
GTAGTCAAATACTGGCCACTGTGTCAGTCTTAGTTGTAGGAAGTGGAAACCTAAACCCCATTACTGGCACC
GTAAGCAGTGCTCAGGTGTTTCTACGTTTTGATGCAAACGGTGTTCTTTTAACAGAACATTCTACACTAAAA
AAATACTGGGGGTATAGGCAGGGAGATAGCATAGATGGCACTCCATATACCAATGCTGTAGGATTCATGCC
CAATTTAAAAGCTTATCCAAAGTCACAAAGTTCTACTACTAAAAATAATATAGTAGGGCAAGTATACATGA
ATGGAGATGTTTCAAAACCTATGCTTCTCACTATAACCCTCAATGGTACTGATGACAGCAACAGTACATATT
CAATGTCATTTTCATACACCTGGACTAATGGAAGCTATGTTGGAGCAACATTTGGGGCTAACTCTTATACCT
TCTCATACATCGCCCAAGAATGAACACTGTATCCCACCCTGCATGCCAACCCTTCCCACCCCACTCTGTGGA
ACAAACTCTGAAACACAAAATAAAATAAAGTTCAAGTGTTTTATTGATTCAACAGTTTTACAGGATTCGAG
CAGTTATTTTTCCTCCACCCTCCCAGGACATGGAATACACCACCCTCTCCCCCCGCACAGCCTTGAACATCT
GAATGCCATTGGTGATGGACATGCTTTTGGTCTCCACGTTCCACACAGTTTCAGAGCGAGCCAGTCTCGGGT
CGGTCAGGGAGATGAAACCCTCCGGGCACTCCCGCATCTGCACCTCACAGCTCAACAGCTGAGGATTGTCC
TCGGTGGTCGGGATCACGGTTATCTGGAAGAAGCAGAAGAGCGGCGGTGGGAATCATAGTCCGCGAACGG
GATCGGCCGGTGGTGTCGCATCAGGCCCCGCAGCAGTCGCTGCCGCCGCCGCTCCGTCAAGCTGCTGCTCA
GGGGGTCCGGGTCCAGGGACTCCCTCAGCATGATGCCCACGGCCCTCAGCATCAGTCGTCTGGTGCGGCGG
GCGCAGCAGCGCATGCGGATCTCGCTCAGGTCGCTGCAGTACGTGCAACACAGAACCACCAGGTTGTTCAA
CAGTCCATAGTTCAACACGCTCCAGCCGAAACTCATCGCGGGAAGGATGCTACCCACGTGGCCGTCGTACC
AGATCCTCAGGTAAATCAAGTGGTGCCCCCTCCAGAACACGCTGCCCACGTACATGATCTCCTTGGGCATG
TGGCGGTTCACCACCTCCCGGTACCACATCACCCTCTGGTTGAACATGCAGCCCCGGATGATCCTGCGGAA
CCACAGGGCCAGCACCGCCCCGCCCGCCATGCAGCGAAGAGACCCCGGGTCCCGGCAATGGCAATGGAGG
ACCCACCGCTCGTACCCGTGGATCATCTGGGAGCTGAACAAGTCTATGTTGGCACAGCACAGGCATATGCT
CATGCATCTCTTCAGCACTCTCAACTCCTCGGGGGTCAAAACCATATCCCAGGGCACGGGGAACTCTTGCA
GGACAGCGAACCCCGCAGAACAGGGCAATCCTCGCACAGAACTTACATTGTGCATGGACAGGGTATCGCA
ATCAGGCAGCACCGGGTGATCCTCCACCAGAGAAGCGCGGGTCTCGGTCTCCTCACAGCGTGGTAAGGGG
GCCGGCCGATACGGGTGATGGCGGGACGCGGCTGATCGTGTTCGCGACCGTGTCATGATGCAGTTGCTTTC
GGACATTTTCGTACTTGCTGTAGCAGAACCTGGTCCGGGCGCTGCACACCGATCGCCGGCGGCGGTCTCGG
CGCTTGGAACGCTCGGTGTTGAAATTGTAAAACAGCCACTCTCTCAGACCGTGCAGCAGATCTAGGGCCTC
AGGAGTGATGAAGATCCCATCATGCCTGATGGCTCTGATCACATCGACCACCGTGGAATGGGCCAGACCCA
GCCAGATGATGCAATTTTGTTGGGTTTCGGTGACGGCGGGGGAGGGAAGAACAGGAAGAACCATGATTAA
CTTTTAATCCAAACGGTCTCGGAGTACTTCAAAATGAAGATCGCGGAGATGGCACCTCTCGCCCCCGCTGT
GTTGGTGGAAAATAACAGCCAGGTCAAAGGTGATACGGTTCTCGAGATGTTCCACGGTGGCTTCCAGCAAA
GCCTCCACGCGCACATCCAGAAACAAGACAATAGCGAAAGCGGGAGGGTTCTCTAATTCCTCAATCATCAT
GTTACACTCCTGCACCATCCCCAGATAATTTTCATTTTTCCAGCCTTGAATGATTCGAACTAGTTCCTGAGGT
AAATCCAAGCCAGCCATGATAAAGAGCTCGCGCAGAGCGCCCTCCACCGGCATTCTTAAGCACACCCTCAT
AATTCCAAGATATTCTGCTCCTGGTTCACCTGCAGCAGATTGACAAGCGGAATATCAAAATCTCTGCCGCG
ATCCCTGAGCTCCTCCCTCAGCAATAACTGTAAGTACTCTTTCATATCCTCTCCGAAATTTTTAGCCATAGG
ACCACCAGGAATAAGATTAGGGCAAGCCACAGTACAGATAAACCGAAGTCCTCCCCAGTGAGCATTGCCA
AATGCAAGACTGCTATAAGCATGCTGGCTAGACCCGGTGATATCTTCCAGATAACTGGACAGAAAATCGCC
CAGGCAATTTTTAAGAAAATCAACAAAAGAAAAATCCTCCAGGTGGACGTTTAGAGCCTCGGGAACAACG
ATGAAGTAAATGCAAGCGGTGCGTTCCAGCATGGTTAGTTAGCTGATCTGTAGAAAAAACAAAAATGAAC
ATTAAACCATGCTAGCCTGGCGAACAGGTGGGTAAATCGTTCTCTCCAGCACCAGGCAGGCCACGGGGTCT

CCGGCGCGACCCTCGTAAAAATTGTCGCTATGATTGAAAACCATCACAGAGAGACGTTCCCGGTGGCCGGC
GTGAATGATTCGACAAGATGAATACACCCCCGGAACATTGGCGTCCGCGAGTGAAAAAAAGCGCCCGAGG
AAGCAATAAGGCACTACAATGCTCAGTCTCAAGTCCAGCAAAGCGATGCCATGCGGATGAAGCACAAAAT
TCTCAGGTGCGTACAAAATGTAATTACTCCCCTCCTGCACAGGCAGCAAAGCCCCCGATCCCTCCAGGTAC
ACATACAAAGCCTCAGCGTCCATAGCTTACCGAGCAGCAGCACACAACAGGCGCAAGAGTCAGAGAAAGG
CTGAGCTCTAACCTGTCCACCCGCTCTCTGCTCAATATATAGCCCAGATCTACACTGACGTAAAGGCCAAA
GTCTAAAAATACCCGCCAAATAATCACACACGCCCAGCACACGCCCAGAAACCGGTGACACACTCAAAAA
AATACGCGCACTTCCTCAAACGCCCAAAACTGCCGTCATTTCCGGGTTCCCACGCTACGTCATCAAAACAC
GACTTTCAAATTCCGTCGACCGTTAAAAACGTCACCCGCCCCGCCCCTAACGGTCGCCCGTCTCTCAGCCAA
TCAGCGCCCCGCATCCCCAAATTCAAACACCTCATTTGCATATTAACGCGCACAAAAAGTTTGAGGTATATT
ATTGATGATG

ChAdV68-TETo-TSNA (配列番号67)

CCATCTTCAATAATATACCTCAAACTTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTGAATTTGGGGAGG
AAGGGCGGTGATTGGTCGAGGGATGAGCGACCGTTAGGGGCGGGGCGAGTGACGTTTTGATGACGTGGTT
GCGAGGAGGAGCCAGTTTGCAAGTTCTCGTGGGAAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTTGAACACGGA
AATACTCAATTTTCCCGCGCTCTCTGACAGGAAATGAGGTGTTTCTGGGCGGATGCAAGTGAAAACGGGCC
ATTTTCGCGCGAAAACTGAATGAGGAAGTGAAAATCTGAGTAATTTCGCGTTTATGGCAGGGAGGAGTATT
TGCCGAGGGCCGAGTAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTACCGTGTTTTTCACCTAAATTTCCG
CGTACGGTGTCAAAGTCCGGTGTTTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGCCAGGGTATTTAAACCTGCGCTCTC
CAGTCAAGAGGCCACTCTTGAGTGCCAGCGAGAAGAGTTTTCTCCTCCGCGCCGCGAGTCAGATCTACACT
TTGAAAGTAGGGATAACAGGGTAATCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAAAGTACTTCCCTATC
AGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTT
ACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGT
GAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGT
GATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGCTCGG
TACCCGGGTCGAGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAT
CGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACGCGATCGCGCCACCATGGCTGGCATG
ACCGAGTACAAGCTAGTCGTTGTGGGAGCTGGAGATGTGGGCAAATCTGCTCTGACCATTCAGCTGATTCA
GGGCACAGATCTGGATCACCAGGAGAAGTGTCTGAGCAGGCTGTACGACCACATGCCAGAAGGATTAACC
CCTCTTATGGGAGTGAGCTCTTCTTCTGCTCTGGCCAGACTGGGACTGCCTATGGATAAGCTGAACAAGATC
ACAGCTCCTGCCTCTCAGAAACTGAGACAGCTGCAGAAGATGGAGACCCCTGAACTGCTGCCTTGTGGATA
TCTGGTGGAGGAGAATACCACAATCAGCGTGACCGTGAAAGGCCTGGAAGCCCAGAACAAGATCAAAGGC
TGTACCGGCTCTGTGAATATGACACTGCAGAGAGCTTCTGCCGCCCCTAAGACAGGAGGAGGAGGAGAAG
CTGCTGCCTACAATAATACATTAGTGGCCAGACATGTGCCCCAGATCCCTAAGCCTGACAGCCTGGTTGGC
CTGAGCGATGAATTAGGAAAAAGAGACACATTTGCCGAGAGCCTGATCCGGAGAATGGCCTCTGCCGGCT
ACCTGTTCCTGGATATCATCACATATGTTGTGTTTGCCGTGACCTTCGTGCTGGGAGTTCTGGGCGGCCTGA
ATACCGAGACCAATGAAAAAGCTCTTGAAGCCGTGTTTGGCAAGTACGGCAGAATCGTGGAGGTGCTGGG
CGGCAGATCTTGTGAAGAATTAACAGCTGTGTTACCACCTCCTCAGCTGCTTGGCAGACGGTTCAACTTCTT
CAGCTACAGCTACGTTGCTGCTGGCTCTTCTGGCAACAACTACGACCTGATGGCCCAGCCTATTACACCTGG
ACCTGATACAACACCTCTGCCTGTGACCGATACATCTTCTGTGTCTACCGGACACGCCACATCTCTGCCAGT
GACAGATGCTGGACTGAGAGTGACAGAGTCTAAAGGACACAGCGATTCTTGGCACCTGAGCCTGGATACA
GCCATCAGGGTGAATACCCCTAAGCTGGTTTCTGAAGTGGAAGAGCTGAACAAGAGCATCACCGCCCTGAG
GGAGAAGTTACTGCAGATGGTGGAAGCCGATAGACCTGGAAACCTGTTTATTGGAGGCCTGAACACCGAG
ACCAATGAGGACTCTCCCGTGAAGGATGAAGTGGTGGTGAACGATCAATGGGGCCAGAATTGTAGCTGCC
ATCATGGAGGCTACGAGTTCCCTGATCTGCACAGGACAATCGTGTCTGAGTGCGATGTGTATCTGACCTAC
ATGCTGAGACAGGCTGCTCTGCAGCTGTTCTTCGACCTGTATCACAGCATCCCTAGCAGCTTTTCTCCTCTG
GTTCTGAGCTGTCTGGTGCAGCCTCTGGAAGATGTGGAAGTGATGGAGAAGGATGGCACAACCTTTAGCTG
TGAGGTGAGCCACGATGAGGTGCCTCGGACATATGGACCCGTGTTTATGTGTCTGGGAGGACTGCTGACCA
TGGTGGCTGGAGCTGTTTGGCTGACAGTTGGACCCGGACCAGGCGCCAAATTTGTTGCTGCTTGGACACTG
AAAGCTGCTGCTGGGCCCGGACCAGGCCAGTACATCAAGGCCAACTCTAAGTTTATCGGCATCACCGAATT
GGGACCTGGACCCGGCTAGTAGTGAGTTTAAACTCCCATTTAAATGTGAGGGTTAATGCTTCGAGCAGACA
TGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAA
ATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATT
CATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGT
AAAATAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAGTGAGTAGTGTTCTGGGGCGGGGGAGGACCTGCATGAGGG
CCAGAATAACTGAAATCTGTGCTTTTCTGTGTGTTGCAGCAGCATGAGCGGAAGCGGCTCCTTTGAGGGAG
GGGTATTCAGCCCTTATCTGACGGGGCGTCTCCCCTCCTGGGCGGGAGTGCGTCAGAATGTGATGGGATCC
ACGGTGGACGGCCGGCCCGTGCAGCCCGCGAACTCTTCAACCCTGACCTATGCAACCCTGAGCTCTTCGTC
GTTGGACGCAGCTGCCGCCGCAGCTGCTGCATCTGCCGCCAGCGCCGTGCGCGGAATGGCCATGGGCGCCG
GCTACTACGGCACTCTGGTGGCCAACTCGAGTTCCACCAATAATCCCGCCAGCCTGAACGAGGAGAAGCTG
TTGCTGCTGATGGCCCAGCTCGAGGCCTTGACCCAGCGCCTGGGCGAGCTGACCCAGCAGGTGGCTCAGCT
GCAGGAGCAGACGCGGGCCGCGGTTGCCACGGTGAAATCCAAATAAAAAATGAATCAATAAATAAACGGA
GACGGTTGTTGATTTTAACACAGAGTCTGAATCTTTATTTGATTTTTCGCGCGCGGTAGGCCCTGGACCACC
GGTCTCGATCATTGAGCACCCGGTGGATCTTTTCCAGGACCCGGTAGAGGTGGGCTTGGATGTTGAGGTAC
ATGGGCATGAGCCCGTCCCGGGGGTGGAGGTAGCTCCATTGCAGGGCCTCGTGCTCGGGGGTGGTGTTGTA
AATCACCCAGTCATAGCAGGGGCGCAGGGCATGGTGTTGCACAATATCTTTGAGGAGGAGACTGATGGCCA
CGGGCAGCCCTTTGGTGTAGGTGTTTACAAATCTGTTGAGCTGGGAGGGATGCATGCGGGGGGAGATGAGG

TGCATCTTGGCCTGGATCTTGAGATTGGCGATGTTACCGCCCAGATCCCGCCTGGGGTTCATGTTGTGCAGG
ACCACCAGCACGGTGTATCCGGTGCACTTGGGGAATTTATCATGCAACTTGGAAGGGAAGGCGTGAAAGA
ATTTGGCGACGCCTTTGTGCCCGCCCAGGTTTTCCATGCACTCATCCATGATGATGGCGATGGGCCCGTGGG
CGGCGGCCTGGGCAAAGACGTTTCGGGGGTCGGACACATCATAGTTGTGGTCCTGGGTGAGGTCATCATAG
GCCATTTTAATGAATTTGGGGCGGAGGGTGCCGGACTGGGGGACAAAGGTACCCTCGATCCCGGGGGCGTA
GTTCCCCTCACAGATCTGCATCTCCCAGGCTTTGAGCTCGGAGGGGGGGATCATGTCCACCTGCGGGGCGA
TAAAGAACACGGTTTCCGGGGCGGGGGAGATGAGCTGGGCCGAAAGCAAGTTCCGGAGCAGCTGGGACTT
GCCGCAGCCGGTGGGGCCGTAGATGACCCCGATGACCGGCTGCAGGTGGTAGTTGAGGGAGAGACAGCTG
CCGTCCTCCCGGAGGAGGGGGGCCACCTCGTTCATCATCTCGCGCACGTGCATGTTCTCGCGCACCAGTTCC
GCCAGGAGGCGCTCTCCCCCCAGGGATAGGAGCTCCTGGAGCGAGGCGAAGTTTTTCAGCGGCTTGAGTCC
GTCGGCCATGGGCATTTTGGAGAGGGTTTGTTGCAAGAGTTCCAGGCGGTCCCAGAGCTCGGTGATGTGCT
CTACGGCATCTCGATCCAGCAGACCTCCTCGTTTCGCGGGTTGGGACGGCTGCGGGAGTAGGGCACCAGAC
GATGGGCGTCCAGCGCAGCCAGGGTCCGGTCCTTCCAGGGTCGCAGCGTCCGCGTCAGGGTGGTCTCCGTC
ACGGTGAAGGGGTGCGCGCCGGGCTGGGCGCTTGCGAGGGTGCGCTTCAGGCTCATCCGGCTGGTCGAAA
ACCGCTCCCGATCGGCGCCCTGCGCGTCGGCCAGGTAGCAATTGACCATGAGTTCGTAGTTGAGCGCCTCG
GCCGCGTGGCCTTTGGCGCGGAGCTTACCTTTGGAAGTCTGCCCGCAGGCGGGACAGAGGAGGGACTTGAG
GGCGTAGAGCTTGGGGGCGAGGAAGACGGACTCGGGGGCGTAGGCGTCCGCGCCGCAGTGGGCGCAGACG
GTCTCGCACTCCACGAGCCAGGTGAGGTCGGGCTGGTCGGGGTCAAAAACCAGTTTCCCGCCGTTCTTTTTG
ATGCGTTTCTTACCTTTGGTCTCCATGAGCTCGTGTCCCCGCTGGGTGACAAAGAGGCTGTCCGTGTCCCCG
TAGACCGACTTTATGGGCCGGTCCTCGAGCGGTGTGCCGCGGTCCTCCTCGTAGAGGAACCCCGCCCACTC
CGAGACGAAAGCCCGGGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCCACGTGGGACGGGTAGCGGTCGTTGTCCACC
AGCGGGTCCACCTTTTCCAGGGTATGCAAACACATGTCCCCCTCGTCCACATCCAGGAAGGTGATTGGCTT
GTAAGTGTAGGCCACGTGACCGGGGGTCCCGGCCGGGGGGGGTATAAAAGGGTGCGGGTCCCTGCTCGTCCT
CACTGTCTTCCGGATCGCTGTCCAGGAGCGCCAGCTGTTGGGGTAGGTATTCCCTCTCGAAGGCGGGCATG
ACCTCGGCACTCAGGTTGTCAGTTTCTAGAAACGAGGAGGATTTGATATTGACGGTGCCGGCGGAGATGCC
TTTCAAGAGCCCCTCGTCCATCTGGTCAGAAAAGACGATCTTTTTGTTGTCGAGCTTGGTGGCGAAGGAGCC
GTAGAGGGCGTTGGAGAGGAGCTTGGCGATGGAGCGCATGGTCTGGTTTTTTTCCTTGTCGGCGCGCTCCTT
GGCGGCGATGTTGAGCTGCACGTACTCGCGCGCCACGCACTTCCATTCGGGGAAGACGGTGGTCAGCTCGT
CGGGCACGATTCTGACCTGCCAGCCCCGATTATGCAGGGTGATGAGGTCCACACTGGTGGCCACCTCGCCG
CGCAGGGGCTCATTAGTCCAGCAGAGGCGTCCGCCCTTGCGCGAGCAGAAGGGGGGCAGGGGGTCCAGCA
TGACCTCGTCGGGGGGGTCGGCATCGATGGTGAAGATGCCGGGCAGGAGGTCGGGGTCAAAGTAGCTGAT
GGAAGTGGCCAGATCGTCCAGGGCAGCTTGCCATTCGCGCACGGCCAGCGCGCGCTCGTAGGGACTGAGG
GGCGTGCCCCAGGGCATGGGATGGGTAAGCGCGGAGGCGTACATGCCGCAGATGTCGTAGACGTAGAGGG
GCTCCTCGAGGATGCCGATGTAGGTGGGGTAGCAGCGCCCCCCGCGGATGCTGGCGCGCACGTAGTCATAC
AGCTCGTGCGAGGGGGCGAGGAGCCCCGGGCCCAGGTTGGTGCGACTGGGCTTTTCGGCGCGGTAGACGA
TCTGGCGGAAAATGGCATGCGAGTTGGAGGAGATGGTGGGCCTTTGGAAGATGTTGAAGTGGGCGTGGGG
CAGTCCGACCGAGTCGCGGATGAAGTGGGCGTAGGAGTCTTGCAGCTTGGCGACGAGCTCGGCGGTGACTA
GGACGTCCAGAGCGCAGTAGTCGAGGGTCTCCTGGATGATGTCATACTTGAGCTGTCCCTTTTGTTTCCACA
GCTCGCGGTTGAGAAGGAACTCTTCGCGGTCCTTCCAGTACTCTTCGAGGGGGAACCCGTCCTGATCTGCA
CGGTAAGAGCCTAGCATGTAGAACTGGTTGACGGCCTTGTAGGCGCAGCAGCCCTTCTCCACGGGGAGGGC
GTAGGCCTGGGCGGCCTTGCGCAGGGAGGTGTGCGTGAGGGCGAAAGTGTCCCTGACCATGACCTTGAGG
AACTGGTGCTTGAAGTCGATATCGTCGCAGCCCCCCTGCTCCCAGAGCTGGAAGTCCGTGCGCTTCTTGTAG
GCGGGGTTGGGCAAAGCGAAAGTAACATCGTTGAAGAGGATCTTGCCCGCGCGGGGCATAAAGTTGCGAG
TGATGCGGAAAGGTTGGGGCACCTCGGCCCGGTTGTTGATGACCTGGGCGGCGAGCACGATCTCGTCGAAG
CCGTTGATGTTGTGGCCCACGATGTAGAGTTCCACGAATCGCGGACGGCCCTTGACGTGGGGCAGTTTCTTG
AGCTCCTCGTAGGTGAGCTCGTCGGGGTCGCTGAGCCCGTGCTGCTCGAGCGCCCAGTCGGCGAGATGGGG
GTTGGCGCGGAGGAAGGAAGTCCAGAGATCCACGGCCAGGGCGGTTTGCAGACGGTCCCGGTACTGACGG
AACTGCTGCCCGACGGCCATTTTTTCGGGGGTGACGCAGTAGAAGGTGCGGGGGTCCCCGTGCCAGCGATC
CCATTTGAGCTGGAGGGCGAGATCGAGGGCGAGCTCGACGAGCCGGTCGTCCCCGGAGAGTTTCATGACC
AGCATGAAGGGGACGAGCTGCTTGCCGAAGGACCCCATCCAGGTGTAGGTTTCCACATCGTAGGTGAGGA
AGAGCCTTTCGGTGCGAGGATGCGAGCCGATGGGGAAGAACTGGATCTCCTGCCACCAATTGGAGGAATG
GCTGTTGATGTGATGGAAGTAGAAATGCCGACGGCGCGCCGAACACTCGTGCTTGTGTTTATACAAGCGGC
CACAGTGCTCGCAACGCTGCACGGGATGCACGTGCTGCACGAGCTGTACCTGAGTTCCTTTGACGAGGAAT
TTCAGTGGGAAGTGGAGTCGTGGCGCCTGCATCTCGTGCTGTACTACGTCGTGGTGGTCGGCCTGGCCCTCT
TCTGCCTCGATGGTGGTCATGCTGACGAGCCCGCGCGGGAGGCAGGTCCAGACCTCGGCGCGAGCGGGTCG
GAGAGCGAGGACGAGGGCGCGCAGGCCGGAGCTGTCCAGGGTCCTGAGACGCTGCGGAGTCAGGTCAGTG
GGCAGCGGCGGCGCGCGGTTGACTTGCAGGAGTTTTTCCAGGGCGCGCGGGAGGTCCAGATGGTACTTGAT
CTCCACCGCGCCATTGGTGGCGACGTCGATGGCTTGCAGGGTCCCGTGCCCCTGGGGTGTGACCACCGTCC
CCCGTTTCTTCTTGGGCGGCTGGGGCGACGGGGGCGGTGCCTCTTCCATGGTTAGAAGCGGCGGCGAGGAC
GCGCGCCGGGCGGCAGGGGCGGCTCGGGGCCCGGAGGCAGGGGCGGCAGGGGCACGTCGGCGCCGCGCG
CGGGTAGGTTCTGGTACTGCGCCCGGAGAAGACTGGCGTGAGCGACGACGCGACGGTTGACGTCCTGGATC
TGACGCCTCTGGGTGAAGGCCACGGGACCCGTGAGTTTGAACCTGAAAGAGAGTTCGACAGAATCAATCTC
GGTATCGTTGACGGCGGCCTGCCGCAGGATCTCTTGCACGTCGCCCGAGTTGTCCTGGTAGGCGATCTCGGT
CATGAACTGCTCGATCTCCTCCTCTTGAAGGTCTCCGCGGCCGGCGCGCTCCACGGTGGCCGCGAGGTCGTT
GGAGATGCGGCCCATGAGCTGCGAGAAGGCGTTCATGCCCGCCTCGTTCCAGACGCGGCTGTAGACCACGA
CGCCCTCGGGATCGCGGGCGCGCATGACCACCTGGGCGAGGTTGAGCTCCACGTGGCGCGTGAAGACCGC
GTAGTTGCAGAGGCGCTGGTAGAGGTAGTTGAGCGTGGTGGCGATGTGCTCGGTGACGAAGAAATACATG

ATCCAGCGGCGGAGCGGCATCTCGCTGACGTCGCCCAGCGCCTCCAAACGTTCCATGGCCTCGTAAAAGTC
CACGGCGAAGTTGAAAAACTGGGAGTTGCGCGCCGAGACGGTCAACTCCTCCTCCAGAAGACGGATGAGC
TCGGCGATGGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAGGCCCCCGGGAGTTCCTCCACTTCCTCTTCTTCCTCCTCC
ACTAACATCTCTTCTACTTCCTCCTCAGGCGGCAGTGGTGGCGGGGGAGGGGGCCTGCGTCGCCGGCGGCG
CACGGGCAGACGGTCGATGAAGCGCTCGATGGTCTCGCCGCGCCGGCGTCGCATGGTCTCGGTGACGGCGC
GCCCGTCCTCGCGGGGCCGCAGCGTGAAGACGCCGCCGCGCATCTCCAGGTGGCCGGGGGGGGTCCCCGTTG
GGCAGGGAGAGGGCGCTGACGATGCATCTTATCAATTGCCCCGTAGGGACTCCGCGCAAGGACCTGAGCG
TCTCGAGATCCACGGGATCTGAAAACCGCTGAACGAAGGCTTCGAGCCAGTCGCAGTCGCAAGGTAGGCT
GAGCACGGTTTCTTCTGGCGGGTCATGTTGGTTGGGAGCGGGGCGGGCGATGCTGCTGGTGATGAAGTTGA
AATAGGCGGTTCTGAGACGGCGGATGGTGGCGAGGAGCACCAGGTCTTTGGGCCCGGCTTGCTGGATGCGC
AGACGGTCGGCCATGCCCCAGGCGTGGTCCTGACACCTGGCCAGGTCCTTGTAGTAGTCCTGCATGAGCCG
CTCCACGGGCACCTCCTCCTCGCCCGCGCGGCCGTGCATGCGCGTGAGCCCGAAGCCGCGCTGGGGCTGGA
CGAGCGCCAGGTCGGCGACGACGCGCTCGGCGAGGATGGCTTGCTGGATCTGGGTGAGGGTGGTCTGGAA
GTCATCAAAGTCGACGAAGCGGTGGTAGGCTCCGGTGTTGATGGTGTAGGAGCAGTTGGCCATGACGGACC
AGTTGACGGTCTGGTGGCCCGGACGCACGAGCTCGTGGTACTTGAGGCGCGAGTAGGCGCGCGTGTCGAAG
ATGTAGTCGTTGCAGGTGCGCACCAGGTACTGGTAGCCGATGAGGAAGTGCGGCGGCGGCTGGCGGTAGA
GCGGCCATCGCTCGGTGGCGGGGGCGCCGGGCGCGAGGTCCTCGAGCATGGTGCGGTGGTAGCCGTAGAT
GTACCTGGACATCCAGGTGATGCCGGCGGCGGTGGTGGAGGCGCGCGGGAACTCGCGGACGCGGTTCCAG
ATGTTGCGCAGCGGCAGGAAGTAGTTCATGGTGGGCACGGTCTGGCCCGTGAGGCGCGCGCAGTCGTGGAT
GCTCTATACGGGCAAAAACGAAAGCGGTCAGCGGCTCGACTCCGTGGCCTGGAGGCTAAGCGAACGGGTT
GGGCTGCGCGTGTACCCCGGTTCGAATCTCGAATCAGGCTGGAGCCGCAGCTAACGTGGTATTGGCACTCC
CGTCTCGACCCAAGCCTGCACCAACCCTCCAGGATACGGAGGCGGGTCGTTTTGCAACTTTTTTTTGGAGGC
CGGATGAGACTAGTAAGCGCGGAAAGCGGCCGACCGCGATGGCTCGCTGCCGTAGTCTGGAGAAGAATCG
CCAGGGTTGCGTTGCGGTGTGCCCCGGTTCGAGGCCGGCCGGATTCCGCGGCTAACGAGGGCGTGGCTGCC
CCGTCGTTTCCAAGACCCCATAGCCAGCCGACTTCTCCAGTTACGGAGCGAGCCCCTCTTTTGTTTTGTTTGT
TTTTGCCAGATGCATCCCGTACTGCGGCAGATGCGCCCCCACCACCCTCCACCGCAACAACAGCCCCCTCC
ACAGCCGGCGCTTCTGCCCCCGCCCCAGCAGCAACTTCCAGCCACGACCGCCGCGGCCGCCGTGAGCGGGG
CTGGACAGAGTTATGATCACCAGCTGGCCTTGGAAGAGGGCGAGGGGCTGGCGCGCCTGGGGGCGTCGTC
GCCGGAGCGGCACCCGCGCGTGCAGATGAAAAGGGACGCTCGCGAGGCCTACGTGCCCAAGCAGAACCTG
TTCAGAGACAGGAGCGGCGAGGAGCCCGAGGAGATGCGCGCGGCCCGGTTCCACGCGGGGCGGGAGCTGC
GGCGCGGCCTGGACCGAAAGAGGGTGCTGAGGGACGAGGATTTCGAGGCGGACGAGCTGACGGGGATCAG
CCCCGCGCGCGCGCACGTGGCCGCGGCCAACCTGGTCACGGCGTACGAGCAGACCGTGAAGGAGGAGAGC
AACTTCCAAAAATCCTTCAACAACCACGTGCGCACCCTGATCGCGCGCGAGGAGGTGACCCTGGGCCTGAT
GCACCTGTGGGACCTGCTGGAGGCCATCGTGCAGAACCCCACCAGCAAGCCGCTGACGGCGCAGCTGTTCC
TGGTGGTGCAGCATAGTCGGGACAACGAAGCGTTCAGGGAGGCGCTGCTGAATATCACCGAGCCCGAGGG
CCGCTGGCTCCTGGACCTGGTGAACATTCTGCAGAGCATCGTGGTGCAGGAGCGCGGGCTGCCGCTGTCCG
AGAAGCTGGCGGCCATCAACTTCTCGGTGCTGAGTTTGGGCAAGTACTACGCTAGGAAGATCTACAAGACC
CCGTACGTGCCCATAGACAAGGAGGTGAAGATCGACGGGTTTTACATGCGCATGACCCTGAAAGTGCTGAC
CCTGAGCGACGATCTGGGGGTGTACCGCAACGACAGGATGCACCGTGCGGTGAGCGCCAGCAGGCGGCGC
GAGCTGAGCGACCAGGAGCTGATGCATAGTCTGCAGCGGGCCCTGACCGGGGCCGGGACCGAGGGGGAGA
GCTACTTTGACATGGGCGCGGACCTGCACTGGCAGCCCAGCCGCCGGGCCTTGGAGGCGGCGGCAGGACC
CTACGTAGAAGAGGTGGACGATGAGGTGGACGAGGAGGGCGAGTACCTGGAAGACTGATGGCGCGACCGT
ATTTTTGCTAGATGCAACAACAACAGCCACCTCCTGATCCCGCGATGCGGGCGGCGCTGCAGAGCCAGCCG
TCCGGCATTAACTCCTCGGACGATTGGACCCAGGCCATGCAACGCATCATGGCGCTGACGACCCGCAACCC
CGAAGCCTTTAGACAGCAGCCCCAGGCCAACCGGCTCTCGGCCATCCTGGAGGCCGTGGTGCCCTCGCGCT
CCAACCCCACGCACGAGAAGGTCCTGGCCATCGTGAACGCGCTGGTGGAGAACAAGGCCATCCGCGGCGA
CGAGGCCGGCCTGGTGTACAACGCGCTGCTGGAGCGCGTGGCCCGCTACAACAGCACCAACGTGCAGACC
AACCTGGACCGCATGGTGACCGACGTGCGCGAGGCCGTGGCCCAGCGCGAGCGGTTCCACCGCGAGTCCA
ACCTGGGATCCATGGTGGCGCTGAACGCCTTCCTCAGCACCCAGCCCGCCAACGTGCCCCGGGGCCAGGAG
GACTACACCAACTTCATCAGCGCCCTGCGCCTGATGGTGACCGAGGTGCCCCAGAGCGAGGTGTACCAGTC
CGGGCCGGACTACTTCTTCCAGACCAGTCGCCAGGGCTTGCAGACCGTGAACCTGAGCCAGGCTTTCAAGA
ACTTGCAGGGCCTGTGGGGCGTGCAGGCCCCGGTCGGGGACCGCGCGACGGTGTCGAGCCTGCTGACGCC
GAACTCGCGCCTGCTGCTGCTGCTGGTGGCCCCCTTCACGGACAGCGGCAGCATCAACCGCAACTCGTACC
TGGGCTACCTGATTAACCTGTACCGCGAGGCCATCGGCCAGGCGCACGTGGACGAGCAGACCTACCAGGA
GATCACCCACGTGAGCCGCGCCCTGGGCCAGGACGACCCGGGCAACCTGGAAGCCACCCTGAACTTTTTGC
TGACCAACCGGTCGCAGAAGATCCCGCCCCAGTACGCGCTCAGCACCGAGGAGGAGCGCATCCTGCGTTAC
GTGCAGCAGAGCGTGGGCCTGTTCCTGATGCAGGAGGGGCCCACCCCCAGCGCCGCGCTCGACATGACCG
CGCGCAACATGGAGCCCAGCATGTACGCCAGCAACCGCCCGTTCATCAATAAACTGATGGACTACTTGCAT
CGGGCGGCCGCCATGAACTCTGACTATTTCACCAACGCCATCCTGAATCCCCACTGGCTCCCGCCGCCGGG
GTTCTACACGGGCGAGTACGACATGCCCGACCCCAATGACGGGTTCCTGTGGGACGATGTGGACAGCAGCG
TGTTCTCCCCCCGACCGGGTGCTAACGAGCGCCCCTTGTGGAAGAAGGAAGGCAGCGACCGACGCCCGTCC
TCGGCGCTGTCCGGCCGCGAGGGTGCTGCCGCGGCGGTGCCCGAGGCCGCCAGTCCTTTCCCGAGCTTGCC
CTTCTCGCTGAACAGTATCCGCAGCAGCGAGCTGGGCAGGATCACGCGCCCGCGCTTGCTGGGCGAAGAGG
AGTACTTGAATGACTCGCTGTTGAGACCCGAGCGGGAGAAGAACTTCCCCAATAACGGGATAGAAAGCCT
GGTGGACAAGATGAGCCGCTGGAAGACGTATGCGCAGGAGCACAGGGACGATCCCCGGGCGTCGCAGGGG
GCCACGAGCCGGGGCAGCGCCGCCCGTAAACGCCGGTGGCACGACAGGCAGCGGGGACAGATGTGGGAC
GATGAGGACTCCGCCGACGACAGCAGCGTGTTGGACTTGGGTGGGAGTGGTAACCCGTTCGCTCACCTGCG

CCCCCGTATCGGGCGCATGATGTAAGAGAAACCGAAAATAAATGATACTCACCAAGGCCATGGCGACCAG
CGTGCGTTCGTTTCTTCTCTGTTGTTGTTGTATCTAGTATGATGAGGCGTGCGTACCCGGAGGGTCCTCCTCC
CTCGTACGAGAGCGTGATGCAGCAGGCGATGGCGGCGGCGGCGATGCAGCCCCCGCTGGAGGCTCCTTAC
GTGCCCCCGCGGTACCTGGCGCCTACGGAGGGGCGGAACAGCATTCGTTACTCGGAGCTGGCACCCTTGTA
CGATACCACCCGGTTGTACCTGGTGGACAACAAGTCGGCGGACATCGCCTCGCTGAACTACCAGAACGACC
ACAGCAACTTCCTGACCACCGTGGTGCAGAACAATGACTTCACCCCCACGGAGGCCAGCACCCAGACCATC
AACTTTGACGAGCGCTCGCGGTGGGGCGGCCAGCTGAAAACCATCATGCACACCAACATGCCCAACGTGA
ACGAGTTCATGTACAGCAACAAGTTCAAGGCGCGGGTGATGGTCTCCCGCAAGACCCCCAATGGGGTGAC
AGTGACAGAGGATTATGATGGTAGTCAGGATGAGCTGAAGTATGAATGGGTGGAATTTGAGCTGCCCGAA
GGCAACTTCTCGGTGACCATGACCATCGACCTGATGAACAACGCCATCATCGACAATTACTTGGCGGTGGG
GCGGCAGAACGGGGTGCTGGAGAGCGACATCGGCGTGAAGTTCGACACTAGGAACTTCAGGCTGGGCTGG
GACCCCGTGACCGAGCTGGTCATGCCCGGGGTGTACACCAACGAGGCTTTCCATCCCGATATTGTCTTGCTG
CCCGGCTGCGGGGTGGACTTCACCGAGAGCCGCCTCAGCAACCTGCTGGGCATTCGCAAGAGGCAGCCCTT
CCAGGAAGGCTTCCAGATCATGTACGAGGATCTGGAGGGGGGCAACATCCCCGCGCTCCTGGATGTCGACG
CCTATGAGAAAAGCAAGGAGGATGCAGCAGCTGAAGCAACTGCAGCCGTAGCTACCGCCTCTACCGAGGT
CAGGGGCGATAATTTTGCAAGCGCCGCAGCAGTGGCAGCGGCCGAGGCGGCTGAAACCGAAAGTAAGATA
GTCATTCAGCCGGTGGAGAAGGATAGCAAGAACAGGAGCTACAACGTACTACCGGACAAGATAAACACCG
CCTACCGCAGCTGGTACCTAGCCTACAACTATGGCGACCCCGAGAAGGGCGTGCGCTCCTGGACGCTGCTC
ACCACCTCGGACGTCACCTGCGGCGTGGAGCAAGTCTACTGGTCGCTGCCCGACATGATGCAAGACCCGGT
CACCTTCCGCTCCACGCGTCAAGTTAGCAACTACCCGGTGGTGGGCGCCGAGCTCCTGCCCGTCTACTCCAA
GAGCTTCTTCAACGAGCAGGCCGTCTACTCGCAGCAGCTGCGCGCCTTCACCTCGCTTACGCACGTCTTCAA
CCGCTTCCCCGAGAACCAGATCCTCGTCCGCCCGCCCGCGCCCACCATTACCACCGTCAGTGAAAACGTTC
CTGCTCTCACAGATCACGGGACCCTGCCGCTGCGCAGCAGTATCCGGGGAGTCCAGCGCGTGACCGTTACT
GACGCCAGACGCCGCACCTGCCCCTACGTCTACAAGGCCCTGGGCATAGTCGCGCCGCGCGTCCTCTCGAG
CCGCACCTTCTAAATGTCCATTCTCATCTCGCCCAGTAATAACACCGGTTGGGGCCTGCGCGCGCCCAGCAA
GATGTACGGAGGCGCTCGCCAACGCTCCACGCAACACCCCGTGCGCGTGCGCGGGCACTTCCGCGCTCCCT
GGGGCGCCCTCAAGGGCCGCGTGCGGTCGCGCACCACCGTCGACGACGTGATCGACCAGGTGGTGGCCGA
CGCGCGCAACTACACCCCCGCCGCCGCGCCCGTCTCCACCGTGGACGCCGTCATCGACAGCGTGGTGGCCG
ACGCGCGCCGGTACGCCCGCGCCAAGAGCCGGCGGCGGCGCATCGCCCGGCGGCACCGGAGCACCCCCGC
CATGCGCGCGGCGCGAGCCTTGCTGCGCAGGGCCAGGCGCACGGGACGCAGGGCCATGCTCAGGGCGGCC
AGACGCGCGGCTTCAGGCGCCAGCGCCGGCAGGACCCGGAGACGCGCGGCCACGGCGGCGGCAGCGGCCA
TCGCCAGCATGTCCCGCCCGCGGCGAGGGAACGTGTACTGGGTGCGCGACGCCGCCACCGGTGTGCGCGTG
CCCGTGCGCACCCGCCCCCCTCGCACTTGAAGATGTTCACTTCGCGATGTTGATGTGTCCCAGCGGCGAGG
AGGATGTCCAAGCGCAAATTCAAGGAAGAGATGCTCCAGGTCATCGCGCCTGAGATCTACGGCCCTGCGGT
GGTGAAGGAGGAAAGAAAGCCCCGCAAAATCAAGCGGGTCAAAAAGGACAAAAAGGAAGAAGAAAGTGA
TGTGGACGGATTGGTGGAGTTTGTGCGCGAGTTCGCCCCCCGGCGGCGCGTGCAGTGGCGCGGGCGGAAGG
TGCAACCGGTGCTGAGACCCGGCACCACCGTGGTCTTCACGCCCGGCGAGCGCTCCGGCACCGCTTCCAAG
CGCTCCTACGACGAGGTGTACGGGGATGATGATATTCTGGAGCAGGCGGCCGAGCGCCTGGGCGAGTTTGC
TTACGGCAAGCGCAGCCGTTCCGCACCGAAGGAAGAGGCGGTGTCCATCCCGCTGGACCACGGCAACCCC
ACGCCGAGCCTCAAGCCCGTGACCTTGCAGCAGGTGCTGCCGACCGCGGCGCCGCGCCGGGGGTTCAAGC
GCGAGGGCGAGGATCTGTACCCCACCATGCAGCTGATGGTGCCCAAGCGCCAGAAGCTGGAAGACGTGCT
GGAGACCATGAAGGTGGACCCGGACGTGCAGCCCGAGGTCAAGGTGCGGCCCATCAAGCAGGTGGCCCCG
GGCCTGGGCGTGCAGACCGTGGACATCAAGATTCCCACGGAGCCCATGGAAACGCAGACCGAGCCCATGA
TCAAGCCCAGCACCAGCACCATGGAGGTGCAGACGGATCCCTGGATGCCATCGGCTCCTAGTCGAAGACCC
CGGCGCAAGTACGGCGCGGCCAGCCTGCTGATGCCCAACTACGCGCTGCATCCTTCCATCATCCCCACGCC
GGGCTACCGCGGCACGCGCTTCTACCGCGGTCATACCAGCAGCCGCCGCCGCAAGACCACCACTCGCCGCC
GCCGTCGCCGCACCGCCGCTGCAACCACCCCTGCCGCCCTGGTGCGGAGAGTGTACCGCCGCGGCCGCGCA
CCTCTGACCCTGCCGCGCGCGCGCTACCACCCGAGCATCGCCATTTAAACTTTCGCCTGCTTTGCAGATCAA
TGGCCCTCACATGCCGCCTTCGCGTTCCCATTACGGGCTACCGAGGAAGAAAACCGCGCCGTAGAAGGCTG
GCGGGGAACGGGATGCGTCGCCACCACCACCGGCGGCGGCGCGCCATCAGCAAGCGGTTGGGGGGAGGCT
TCCTGCCCGCGCTGATCCCCATCATCGCCGCGGCGATCGGGGCGATCCCCGGCATTGCTTCCGTGGCGGTGC
AGGCCTCTCAGCGCCACTGAGACACACTTGGAAACATCTTGTAATAAACCAATGGACTCTGACGCTCCTGG
TCCTGTGATGTGTTTTCGTAGACAGATGGAAGACATCAATTTTTCGTCCCTGGCTCCGCGACACGGCACGCG
GCCGTTCATGGGCACCTGGAGCGACATCGGCACCAGCCAACTGAACGGGGGCGCCTTCAATTGGAGCAGTC
TCTGGAGCGGGCTTAAGAATTTCGGGTCCACGCTTAAAACCTATGGCAGCAAGGCGTGGAACAGCACCACA
GGGCAGGCGCTGAGGGATAAGCTGAAAGAGCAGAACTTCCAGCAGAAGGTGGTCGATGGGCTCGCCTCGG
GCATCAACGGGGTGGTGGACCTGGCCAACCAGGCCGTGCAGCGGCAGATCAACAGCCGCCTGGACCCGGT
GCCGCCCGCCGGCTCCGTGGAGATGCCGCAGGTGGAGGAGGAGCTGCCTCCCCTGGACAAGCGGGGCGAG
AAGCGACCCCGCCCCGATGCGGAGGAGACGCTGCTGACGCACACGGACGAGCCGCCCCCGTACGAGGAGG
CGGTGAAACTGGGTCTGCCCACCACGCGGCCCATCGCGCCCCTGGCCACCGGGGTGCTGAAACCCGAAAA
GCCCGCGACCCTGGACTTGCCTCCTCCCCAGCCTTCCCGCCCCTCTACAGTGGCTAAGCCCCTGCCGCCGGT
GGCCGTGGCCCGCGCGCGACCCGGGGGCACCGCCCGCCCTCATGCGAACTGGCAGAGCACTCTGAACAGC
ATCGTGGGTCTGGGAGTGCAGAGTGTGAAGCGCCGCCGCTGCTATTAAACCTACCGTAGCGCTTAACTTGC
TTGTCTGTGTGTGTATGTATTATGTCGCCGCCGCCGCTGTCCACCAGAAGGAGGAGTGAAGAGGCGCGTCG
CCGAGTTGCAAGATGGCCACCCCATCGATGCTGCCCCAGTGGGCGTACATGCACATCGCCGGACAGGACGC
TTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTGGTGCAGTTTGCCCGCGCCACAGACACCTACTTCAGTCTGGGGAACA
AGTTTAGGAACCCCACGGTGGCGCCCACGCACGATGTGACCACCGACCGCAGCCAGCGGCTGACGCTGCG

10

20

30

40

50

CTTCGTGCCCGTGGACCGCGAGGACAACACCTACTCGTACAAAGTGCGCTACACGCTGGCCGTGGGCGACA
ACCGCGTGCTGGACATGGCCAGCACCTACTTTGACATCCGCGGCGTGCTGGATCGGGGCCCTAGCTTCAAA
CCCTACTCCGGCACCGCCTACAACAGTCTGGCCCCCAAGGGAGCACCCAACACTTGTCAGTGGACATATAA
AGCCGATGGTGAAACTGCCACAGAAAAAACCTATACATATGGAAATGCACCCGTGCCAGGGCATTAACATC
ACAAAAGATGGTATTCAACTTGGAACTGACACCGATGATCAGCCAATCTACGCAGATAAAACCTATCAGCC
TGAACCTCAAGTGGGTGATGCTGAATGGCATGACATCACTGGTACTGATGAAAAGTATGGAGGCAGAGCTC
TTAAGCCTGATACCAAAATGAAGCCTTGTTATGGTTCTTTTGCCAAGCCTACTAATAAAGAAGGAGGTCAG
GCAAATGTGAAAACAGGAACAGGCACTACTAAAGAATATGACATAGACATGGCTTTCTTTGACAACAGAA
GTGCGGCTGCTGCTGGCCTAGCTCCAGAAATTGTTTTGTATACTGAAAATGTGGATTTGGAAACTCCAGATA
CCCATATTGTATACAAAGCAGGCACAGATGACAGCAGCTCTTCTATTAATTTGGGTCAGCAAGCCATGCCC
AACAGACCTAACTACATTGGTTTCAGAGACAACTTTATCGGGCTCATGTACTACAACAGCACTGGCAATAT
GGGGGTGCTGGCCGGTCAGGCTTCTCAGCTGAATGCTGTGGTTGACTTGCAAGACAGAAACACCGAGCTGT
CCTACCAGCTCTTGCTTGACTCTCTGGGTGACAGAACCCGGTATTTCAGTATGTGGAATCAGGCGGTGGACA
GCTATGATCCTGATGTGCGCATTATTGAAAATCATGGTGTGGAGGATGAACTTCCCAACTATTGTTTCCCTC
TGGATGCTGTTGGCAGAACAGATACTTATCAGGGAATTAAGGCTAATGGAACTGATCAAACCACATGGACC
AAAGATGACAGTGTCAATGATGCTAATGAGATAGGCAAGGGTAATCCATTCGCCATGGAAATCAACATCCA
AGCCAACCTGTGGAGGAACTTCCTCTACGCCAACGTGGCCCTGTACCTGCCCGACTCTTACAAGTACACGC
CGGCCAATGTTACCCTGCCCACCAACACCAACACCTACGATTACATGAACGGCCGGGTGGTGGCGCCCTCG
CTGGTGGACTCCTACATCAACATCGGGGCGCGCTGGTCGCTGGATCCCATGGACAACGTGAACCCCTTCAA
CCACCACCGCAATGCGGGGCTGCGCTACCGCTCCATGCTCCTGGGCAACGGGCGCTACGTGCCCTTCCACA
TCCAGGTGCCCCAGAAATTTTTCGCCATCAAGAGCCTCCTGCTCCTGCCCGGGTCCTACACCTACGAGTGGA
ACTTCCGCAAGGACGTCAACATGATCCTGCAGAGCTCCCTCGGCAACGACCTGCGCACGGACGGGGCCTCC
ATCTCCTTCACCAGCATCAACCTCTACGCCACCTTCTTCCCCATGGCGCACAACACGGCCTCCACGCTCGAG
GCCATGCTGCGCAACGACACCAACGACCAGTCCTTCAACGACTACCTCTCGGCGGCCAACATGCTCTACCC
CATCCCGGCCAACGCCACCAACGTGCCCATCTCCATCCCCTCGCGCAACTGGGCCGCCTTCCGCGGCTGGTC
CTTCACGCGTCTCAAGACCAAGGAGACGCCCTCGCTGGGCTCCGGGTTCGACCCCTACTTCGTCTACTCGGG
CTCCATCCCCTACCTCGACGGCACCTTCTACCTCAACCACACCTTCAAGAAGGTCTCCATCACCTTCGACTC
CTCCGTCAGCTGGCCCGGCAACGACCGGCTCCTGACGCCCAACGAGTTCGAAATCAAGCGCACCGTCGACG
GCGAGGGCTACAACGTGGCCCAGTGCAACATGACCAAGGACTGGTTCCTGGTCCAGATGCTGGCCCACTAC
AACATCGGCTACCAGGGCTTCTACGTGCCCGAGGGCTACAAGGACCGCATGTACTCCTTCTTCCGCAACTTC
CAGCCCATGAGCCGCCAGGTGGTGGACGAGGTCAACTACAAGGACTACCAGGCCGTCACCCTGGCCTACC
AGCACAACAACTCGGGCTTCGTCGGCTACCTCGCGCCCACCATGCGCCAGGGCCAGCCCTACCCCGCCAAC
TACCCCTACCCGCTCATCGGCAAGAGCGCCGTCACCAGCGTCACCCAGAAAAAGTTCCTCTGCGACAGGGT
CATGTGGCGCATCCCCTTCTCCAGCAACTTCATGTCCATGGGCGCGCTCACCGACCTCGGCCAGAACATGCT
CTATGCCAACTCCGCCCACGCGCTAGACATGAATTTCGAAGTCGACCCCATGGATGAGTCCACCCTTCTCTA
TGTTGTCTTCGAAGTCTTCGACGTCGTCCGAGTGCACCAGCCCCACCGCGGCGTCATCGAGGCCGTCTACCT
GCGCACCCCCTTCTCGGCCGGTAACGCCACCACCTAAGCTCTTGCTTCTTGCAAGCCATGGCCGCGGGCTCC
GGCGAGCAGGAGCTCAGGGCCATCATCCGCGACCTGGGCTGCGGGCCCTACTTCCTGGGCACCTTCGATAA
GCGCTTCCCGGGATTCATGGCCCCGCACAAGCTGGCCTGCGCCATCGTCAACACGGCCGGCCGCGAGACCG
GGGGCGAGCACTGGCTGGCCTTCGCCTGGAACCCGCGCTCGAACACCTGCTACCTCTTCGACCCCTTCGGG
TTCTCGGACGAGCGCCTCAAGCAGATCTACCAGTTCGAGTACGAGGGCCTGCTGCGCCGCAGCGCCCTGGC
CACCGAGGACCGCTGCGTCACCCTGGAAAAGTCCACCCAGACCGTGCAGGGTCCGCGCTCGGCCGCCTGCG
GGCTCTTCTGCTGCATGTTCCTGCACGCCTTCGTGCACTGGCCCGACCGCCCCATGGACAAGAACCCCACCA
TGAACTTGCTGACGGGGGTGCCCAACGGCATGCTCCAGTCGCCCCAGGTGGAACCCACCCTGCGCCGCAAC
CAGGAGGCGCTCTACCGCTTCCTCAACTCCCACTCCGCCTACTTTCGCTCCCACCGCGCGCGCATCGAGAAG
GCCACCGCCTTCGACCGCATGAATCAAGACATGTAAACCGTGTGTGTATGTTAAATGTCTTTAATAAACAG
CACTTTCATGTTACACATGCATCTGAGATGATTTATTTAGAAATCGAAAGGGTTCTGCCGGGTCTCGGCATG
GCCCGCGGGCAGGGACACGTTGCGGAACTGGTACTTGGCCAGCCACTTGAACTCGGGGATCAGCAGTTTGG
GCAGCGGGGTGTCGGGGAAGGAGTCGGTCCACAGCTTCCGCGTCAGTTGCAGGGCGCCCAGCAGGTCGGG
CGCGGAGATCTTGAAATCGCAGTTGGGACCCGCGTTCTGCGCGCGGGAGTTGCGGTACACGGGGTTGCAGC
ACTGGAACACCATCAGGGCCGGGTGCTTCACGCTCGCCAGCACCGTCGCGTCGGTGATGCTCTCCACGTCG
AGGTCCTCGGCGTTGGCCATCCCGAAGGGGGTCATCTTGCAGGTCTGCCTTCCCATGGTGGGCACGCACCC
GGGCTTGTGGTTGCAATCGCAGTGCAGGGGGATCAGCATCATCTGGGCCTGGTCGGCGTTCATCCCCGGGT
ACATGGCCTTCATGAAAGCCTCCAATTGCCTGAACGCCTGCTGGGCCTTGGCTCCCTCGGTGAAGAAGACC
CCGCAGGACTTGCTAGAGAACTGGTTGGTGGCGCACCCGGCGTCGTGCACGCAGCAGCGCGCGTCGTTGTT
GGCCAGCTGCACCACGCTGCGCCCCCAGCGGTTCTGGGTGATCTTGGCCCGGTCGGGGTTCTCCTTCAGCGC
GCGCTGCCCGTTCTCGCTCGCCACATCCATCTCGATCATGTGCTCCTTCTGGATCATGGTGGTCCCGTGCAG
GCACCGCAGCTTGCCCTCGGCCTCGGTGCACCCGTGCAGCCACAGCGCGCACCCGGTGCACTCCCAGTTCT
TGTGGGCGATCTGGGAATGCGCGTGCACGAAGCCCTGCAGGAAGCGGCCCATCATGGTGGTCAGGGTCTTG
TTGCTAGTGAAGGTCAGCGGAATGCCGCGGTGCTCCTCGTTGATGTACAGGTGGCAGATGCGGCGGTACAC
CTCGCCCTGCTCGGGCATCAGCTGGAAGTTGGCTTTCAGGTCGGTCTCCACGCGGTAGCGGTCCATCAGCAT
AGTCATGATTTCCATACCCTTCTCCCAGGCCGAGACGATGGGCAGGCTCATAGGGTTCTTCACCATCATCTT
AGCGCTAGCAGCCGCGGCCAGGGGGTCGCTCTCGTCCAGGGTCTCAAAGCTCCGCTTGCCGTCCTTCTCGG
TGATCCGCACCGGGGGGTAGCTGAAGCCCACGGCCGCCAGCTCCTCCTCGGCCTGTCTTTCGTCCTCGCTGT
CCTGGCTGACGTCCTGCAGGACCACATGCTTGGTCTTGCGGGGTTTCTTCTTGGGCGGCAGCGGCGGCGGA
GATGTTGGAGATGGCGAGGGGGAGCGCGAGTTCTCGCTCACCACTACTATCTCTTCCTCTTCTTGGTCCGAG
GCCACGCGGCGGTAGGTATGTCTCTTCGGGGGCAGAGGCGGAGGCGACGGGCTCTCGCCGCCGCGACTTG

GCGGATGGCTGGCAGAGCCCCTTCCGCGTTCGGGGGTGCGCTCCCGGCGGCGCTCTGACTGACTTCCTCCG
CGGCCGGCCATTGTGTTCTCCTAGGGAGGAACAACAAGCATGGAGACTCAGCCATCGCCAACCTCGCCATC
TGCCCCCACCGCCGACGAGAAGCAGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAACCGCCCCGCCGCCCAGCCCCGCC
ACCTCCGACGCGGCCGTCCCAGACATGCAAGAGATGGAGGAATCCATCGAGATTGACCTGGGCTATGTGAC
GCCCGCGGAGCACGAGGAGGAGCTGGCAGTGCGCTTTTCACAAGAAGAGATACACCAAGAACAGCCAGAG
CAGGAAGCAGAGAATGAGCAGAGTCAGGCTGGGCTCGAGCATGACGGCGACTACCTCCACCTGAGCGGGG
GGGAGGACGCGCTCATCAAGCATCTGGCCCGGCAGGCCACCATCGTCAAGGATGCGCTGCTCGACCGCACC
GAGGTGCCCCTCAGCGTGGAGGAGCTCAGCCGCGCCTACGAGTTGAACCTCTTCTCGCCGCGCGTGCCCCC
CAAGCGCCAGCCCAATGGCACCTGCGAGCCCAACCCGCGCCTCAACTTCTACCCGGTCTTCGCGGTGCCCG
AGGCCCTGGCCACCTACCACATCTTTTTCAAGAACCAAAAGATCCCCGTCTCCTGCCGCGCCAACCGCACC
CGCGCCGACGCCCTTTTCAACCTGGGTCCCGGCGCCCGCCTACCTGATATCGCCTCCTTGGAAGAGGTTCCC
AAGATCTTCGAGGGTCTGGGCAGCGACGAGACTCGGGCCGCGAACGCTCTGCAAGGAGAAGGAGGAGAGC
ATGAGCACCACAGCGCCCTGGTCGAGTTGGAAGGCGACAACGCGCGGCTGGCGGTGCTCAAACGCACGGT
CGAGCTGACCCATTTCGCCTACCCGGCTCTGAACCTGCCCCCCAAAGTCATGAGCGCGGTCATGGACCAGG
TGCTCATCAAGCGCGCGTCGCCCATCTCCGAGGACGAGGGCATGCAAGACTCCGAGGAGGGCAAGCCCGT
GGTCAGCGACGAGCAGCTGGCCCGGTGGCTGGGTCCTAATGCTAGTCCCCAGAGTTTGGAAGAGCGGCGC
AAACTCATGATGGCCGTGGTCCTGGTGACCGTGGAGCTGGAGTGCCTGCGCCGCTTCTTCGCCGACGCGGA
GACCCTGCGCAAGGTCGAGGAGAACCTGCACTACCTCTTCAGGCACGGGTTCGTGCGCCAGGCCTGCAAGA
TCTCCAACGTGGAGCTGACCAACCTGGTCTCCTACATGGGCATCTTGCACGAGAACCGCCTGGGGCAGAAC
GTGCTGCACACCACCCTGCGCGGGGAGGCCCGGCGCGACTACATCCGCGACTGCGTCTACCTCTACCTCTG
CCACACCTGGCAGACGGGCATGGGCGTGTGGCAGCAGTGTCTGGAGGAGCAGAACCTGAAAGAGCTCTGC
AAGCTCCTGCAGAAGAACCTCAAGGGTCTGTGGACCGGGTTCGACGAGCGCACCACCGCCTCGGACCTGGC
CGACCTCATTTTCCCCGAGCGCCTCAGGCTGACGCTGCGCAACGGCCTGCCCGACTTTATGAGCCAAAGCA
TGTTGCAAAACTTTCGCTCTTTCATCCTCGAACGCTCCGGAATCCTGCCCGCCACCTGCTCCGCGCTGCCCT
CGGACTTCGTGCCGCTGACCTTCCGCGAGTGCCCCCCGCCGCTGTGGAGCCACTGCTACCTGCTGCGCCTGG
CCAACTACCTGGCCTACCACTCGGACGTGATCGAGGACGTCAGCGGCGAGGGCCTGCTCGAGTGCCACTGC
CGCTGCAACCTCTGCACGCCGCACCGCTCCCTGGCCTGCAACCCCCAGCTGCTGAGCGAGACCCAGATCAT
CGGCACCTTCGAGTTGCAAGGGCCCAGCGAAGGCGAGGGTTCAGCCGCCAAGGGGGGTCTGAAACTCACC
CCGGGGCTGTGGACCTCGGCCTACTTGCGCAAGTTCGTGCCCGAGGACTACCATCCCTTCGAGATCAGGTT
CTACGAGGACCAATCCCATCCGCCCAAGGCCGAGCTGTCGGCCTGCGTCATCACCCAGGGGGCGATCCTGG
CCCAATTGCAAGCCATCCAGAAATCCCGCCAAGAATTCTTGCTGAAAAAGGGCCGCGGGGTCTACCTCGAC
CCCCAGACCGGTGAGGAGCTCAACCCCGGCTTCCCCCAGGATGCCCCGAGGAAACAAGAAGCTGAAAGTG
GAGCTGCCGCCCGTGGAGGATTTGGAGGAAGACTGGGAGAACAGCAGTCAGGCAGAGGAGGAGGAGATG
GAGGAAGACTGGGACAGCACTCAGGCAGAGGAGGACAGCCTGCAAGACAGTCTGGAGGAAGACGAGGAG
GAGGCAGAGGAGGAGGTGGAAGAAGCAGCCGCCGCCAGACCGTCGTCCTCGGCGGGGGAGAAAGCAAGC
AGCACGGATACCATCTCCGCTCCGGGTCGGGGTCCCGCTCGACCACACAGTAGATGGGACGAGACCGGAC
GATTCCCGAACCCCACCACCCAGACCGGTAAGAAGGAGCGGCAGGGATACAAGTCCTGGCGGGGGCACAA
AAACGCCATCGTCTCCTGCTTGCAGGCCTGCGGGGGCAACATCTCCTTCACCCGGCGCTACCTGCTCTTCCA
CCGCGGGGTGAACTTTCCCCGCAACATCTTGCATTACTACCGTCACCTCCACAGCCCCTACTACTTCCAAGA
AGAGGCAGCAGCAGCAGAAAAAGACCAGCAGAAAACCAGCAGCTAGAAAATCCACAGCGGCGGCAGCAG
GTGGACTGAGGATCGCGGCGAACGAGCCGGCGCAAACCCGGGAGCTGAGGAACCGGATCTTTCCCACCCT
CTATGCCATCTTCCAGCAGAGTCGGGGGCAGGAGCAGGAACTGAAAGTCAAGAACCGTTCTCTGCGCTCGC
TCACCCGCAGTTGTCTGTATCACAAGAGCGAAGACCAACTTCAGCGCACTCTCGAGGACGCCGAGGCTCTC
TTCAACAAGTACTGCGCGCTCACTCTTAAAGAGTAGCCCGCGCCCGCCCAGTCGCAGAAAAAGGCGGGAAT
TACGTCACCTGTGCCCTTCGCCCTAGCCGCCTCCACCCATCATCATGAGCAAAGAGATTCCCACGCCTTACA
TGTGGAGCTACCAGCCCCAGATGGGCCTGGCCGCCGGTGCCGCCCAGGACTACTCCACCCGCATGAATTGG
CTCAGCGCCGGGCCCGCGATGATCTCACGGGTGAATGACATCCGCGCCCACCGAAACCAGATACTCCTAGA
ACAGTCAGCGCTCACCGCCACGCCCCGCAATCACCTCAATCCGCGTAATTGGCCCGCCGCCCTGGTGTACC
AGGAAATTCCCCAGCCCACGACCGTACTACTTCCGCGAGACGCCCAGGCCGAAGTCCAGCTGACTAACTCA
GGTGTCCAGCTGGCGGGCGGCGCCACCCTGTGTCGTCACCGCCCCGCTCAGGGTATAAAGCGGCTGGTGAT
CCGGGGCAGAGGCACACAGCTCAACGACGAGGTGGTGAGCTCTTCGCTGGGTCTGCGACCTGACGGAGTCT
TCCAACTCGCCGGATCGGGGAGATCTTCCTTCACGCCTCGTCAGGCCGTCCTGACTTTGGAGAGTTCGTCCT
CGCAGCCCCGCTCGGGTGGCATCGGCACTCTCCAGTTCGTGGAGGAGTTCACTCCCTCGGTCTACTTCAACC
CCTTCTCCGGCTCCCCCGGCCACTACCCGGACGAGTTCATCCCGAACTTCGACGCCATCAGCGAGTCGGTG
GACGGCTACGATTGAAACTAATCACCCCCTTATCCAGTGAAATAAAGATCATATTGATGATGATTTTACAG
AAATAAAAAATAATCATTTGATTTGAAATAAAGATACAATCATATTGATGATTTGAGTTTAACAAAAAAAT
AAAGAATCACTTACTTGAAATCTGATACCAGGTCTCTGTCCATGTTTTCTGCCAACACCACTTCACTCCCCT
CTTCCCAGCTCTGGTACTGCAGGCCCCGGCGGGCTGCAAACTTCCTCCACACGCTGAAGGGGATGTCAAAT
TCCTCCTGTCCCTCAATCTTCATTTTATCTTCTATCAGATGTCCAAAAAGCGCGTCCGGGTGGATGATGACTT
CGACCCCGTCTACCCCTACGATGCAGACAACGCACCGACCGTGCCCTTCATCAACCCCCCCTTCGTCTCTTC
AGATGGATTCCAAGAGAAGCCCCTGGGGGTGTTGTCCCTGCGACTGGCCGACCCCGTCACCACCAAGAACG
GGGAAATCACCCTCAAGCTGGGAGAGGGGGTGGACCTCGATTCCTCGGGAAAACTCATCTCCAACACGGC
CACCAAGGCCGCCGCCCCTCTCAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCCTTAACATGGATCACCCCTTTTACAC
TAAAGATGGAAAATTATCCTTACAAGTTTCTCCACCATTAAATATACTGAGAACAAGCATTCTAAACACAC
TAGCTTTAGGTTTTGGATCAGGTTTAGGACTCCGTGGCTCTGCCTTGGCAGTACAGTTAGTCTCTCCACTTAC
ATTTGATACTGATGGAAACATAAAGCTTACCTTAGACAGAGGTTTGCATGTTACAACAGGAGATGCAATTG
AAAGCAACATAAGCTGGGCTAAAGGTTTAAAATTTGAAGATGGAGCCATAGCAACCAACATTGGAAATGG

10 20 30 40 50

GTTAGAGTTTGGAAGCAGTAGTACAGAAACAGGTGTTGATGATGCTTACCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT
CTGGCCTTAGCTTTGACAGTACAGGAGCCATAATGGCTGGTAACAAAGAAGACGATAAACTCACTTTGTGG
ACAACACCTGATCCATCACCAAACTGTCAAATACTCGCAGAAAATGATGCAAAACTAACACTTTGCTTGAC
TAAATGTGGTAGTCAAATACTGGCCACTGTGTCAGTCTTAGTTGTAGGAAGTGGAAACCTAAACCCCATTA
CTGGCACCGTAAGCAGTGCTCAGGTGTTTCTACGTTTTGATGCAAACGGTGTTCTTTTAACAGAACATTCTA
CACTAAAAAAATACTGGGGGTATAGGCAGGGAGATAGCATAGATGGCACTCCATATACCAATGCTGTAGG
ATTCATGCCCAATTTAAAAGCTTATCCAAAGTCACAAAGTTCTACTACTAAAAATAATATAGTAGGGCAAG
TATACATGAATGGAGATGTTTCAAAACCTATGCTTCTCACTATAACCCTCAATGGTACTGATGACAGCAACA
GTACATATTCAATGTCATTTTCATACACCTGGACTAATGGAAGCTATGTTGGAGCAACATTTGGGGCTAACT
CTTATACCTTCTCATACATCGCCCAAGAATGAACACTGTATCCCACCCTGCATGCCAACCCTTCCCACCCCA
CTCTGTGGAACAAACTCTGAAACACAAAATAAAATAAAGTTCAAGTGTTTTATTGATTCAACAGTTTTACA
GGATTCGAGCAGTTATTTTTCCTCCACCCTCCCAGGACATGGAATACACCACCCTCTCCCCCCGCACAGCCT
TGAACATCTGAATGCCATTGGTGATGGACATGCTTTTGGTCTCCACGTTCCACACAGTTTCAGAGCGAGCCA
GTCTCGGGTCGGTCAGGGAGATGAAACCCTCCGGGCACTCCCGCATCTGCACCTCACAGCTCAACAGCTGA
GGATTGTCCTCGGTGGTCGGGATCACGGTTATCTGGAAGAAGCAGAAGAGCGGCGGTGGGAATCATAGTCC
GCGAACGGGATCGGCCGGTGGTGTCGCATCAGGCCCCGCAGCAGTCGCTGCCGCCGCCGCTCCGTCAAGCT
GCTGCTCAGGGGGTCCGGGTCCAGGGACTCCCTCAGCATGATGCCCACGGCCCTCAGCATCAGTCGTCTGG
TGCGGCGGGCGCAGCAGCGCATGCGGATCTCGCTCAGGTCGCTGCAGTACGTGCAACACAGAACCACCAG
GTTGTTCAACAGTCCATAGTTCAACACGCTCCAGCCGAAACTCATCGCGGGAAGGATGCTACCCACGTGGC
CGTCGTACCAGATCCTCAGGTAAATCAAGTGGTGCCCCCTCCAGAACACGCTGCCCACGTACATGATCTCC
TTGGGCATGTGGCGGTTCACCACCTCCCGGTACCACATCACCCTCTGGTTGAACATGCAGCCCCGGATGATC
CTGCGGAACCACAGGGCCAGCACCGCCCCGCCCGCCATGCAGCGAAGAGACCCCGGGTCCCGGCAATGGC
AATGGAGGACCCACCGCTCGTACCCGTGGATCATCTGGGAGCTGAACAAGTCTATGTTGGCACAGCACAGG
CATATGCTCATGCATCTCTTCAGCACTCTCAACTCCTCGGGGGTCAAAACCATATCCCAGGGCACGGGGAA
CTCTTGCAGGACAGCGAACCCCGCAGAACAGGGCAATCCTCGCACAGAACTTACATTGTGCATGGACAGG
GTATCGCAATCAGGCAGCACCGGGTGATCCTCCACCAGAGAAGCGCGGGTCTCGGTCTCCTCACAGCGTGG
TAAGGGGGCCGGCCGATACGGGTGATGGCGGGACGCGGCTGATCGTGTTCGCGACCGTGTCATGATGCAGT
TGCTTTCGGACATTTTCGTACTTGCTGTAGCAGAACCTGGTCCGGGCGCTGCACACCGATCGCCGGCGGCG
GTCTCGGCGCTTGGAACGCTCGGTGTTGAAATTGTAAAACAGCCACTCTCTCAGACCGTGCAGCAGATCTA
GGGCCTCAGGAGTGATGAAGATCCCATCATGCCTGATGGCTCTGATCACATCGACCACCGTGGAATGGGCC
AGACCCAGCCAGATGATGCAATTTTGTTGGGTTTCGGTGACGGCGGGGGAGGGAAGAACAGGAAGAACCA
TGATTAACTTTTAATCCAAACGGTCTCGGAGTACTTCAAAATGAAGATCGCGGAGATGGCACCTCTCGCCC
CCGCTGTGTTGGTGGAAAATAACAGCCAGGTCAAAGGTGATACGGTTCTCGAGATGTTCCACGGTGGCTTC
CAGCAAAGCCTCCACGCGCACATCCAGAAACAAGACAATAGCGAAAGCGGGAGGGTTCTCTAATTCCTCA
ATCATCATGTTACACTCCTGCACCATCCCCAGATAATTTTCATTTTTCCAGCCTTGAATGATTCGAACTAGTT
CCTGAGGTAAATCCAAGCCAGCCATGATAAAGAGCTCGCGCAGAGCGCCCTCCACCGGCATTCTTAAGCAC
ACCCTCATAATTCCAAGATATTCTGCTCCTGGTTCACCTGCAGCAGATTGACAAGCGGAATATCAAAATCTC
TGCCGCGATCCCTGAGCTCCTCCCTCAGCAATAACTGTAAGTACTCTTTCATATCCTCTCCGAAATTTTTAGC
CATAGGACCACCAGGAATAAGATTAGGGCAAGCCACAGTACAGATAAACCGAAGTCCTCCCCAGTGAGCA
TTGCCAAATGCAAGACTGCTATAAGCATGCTGGCTAGACCCGGTGATATCTTCCAGATAACTGGACAGAAA
ATCGCCCAGGCAATTTTTAAGAAAATCAACAAAAGAAAAATCCTCCAGGTGGACGTTTAGAGCCTCGGGAA
CAACGATGAAGTAAATGCAAGCGGTGCGTTCCAGCATGGTTAGTTAGCTGATCTGTAGAAAAAACAAAAAT
GAACATTAAACCATGCTAGCCTGGCGAACAGGTGGGTAAATCGTTCTCTCCAGCACCAGGCAGGCCACGGG
GTCTCCGGCGCGACCCTCGTAAAAATTGTCGCTATGATTGAAAACCATCACAGAGAGACGTTCCCGGTGGC
CGGCGTGAATGATTCGACAAGATGAATACACCCCCGGAACATTGGCGTCCGCGAGTGAAAAAAAGCGCCC
GAGGAAGCAATAAGGCACTACAATGCTCAGTCTCAAGTCCAGCAAAGCGATGCCATGCGGATGAAGCACA
AAATTCTCAGGTGCGTACAAAATGTAATTACTCCCCTCCTGCACAGGCAGCAAAGCCCCCGATCCCTCCAG
GTACACATACAAAGCCTCAGCGTCCATAGCTTACCGAGCAGCAGCACACAACAGGCGCAAGAGTCAGAGA
AAGGCTGAGCTCTAACCTGTCCACCCGCTCTCTGCTCAATATATAGCCCAGATCTACACTGACGTAAAGGC
CAAAGTCTAAAAATACCCGCCAAATAATCACACACGCCCAGCACACGCCCAGAAACCGGTGACACACTCA
AAAAAATACGCGCACTTCCTCAAACGCCCAAAACTGCCGTCATTTCCGGGTTCCCACGCTACGTCATCAAA
ACACGACTTTCAAATTCCGTCGACCGTTAAAAACGTCACCCGCCCCGCCCCTAACGGTCGCCCGTCTCTCAG
CCAATCAGCGCCCCGCATCCCCAAATTCAAACACCTCATTTGCATATTAACGCGCACAAAAAGTTTGAGGT
ATATTATTGATGATGG

ChAdV68-CMT-TSNA (配列番号68)

CATCATCAATAATATACCTCAAACTTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTGAATTTGGGGAGGA
AGGGCGGTGATTGGTCGAGGGATGAGCGACCGTTAGGGGCGGGGCGAGTGACGTTTTGATGACGTGGTTG
CGAGGAGGAGCCAGTTTGCAAGTTCTCGTGGGAAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTTGAACACGGAA
ATACTCAATTTTCCCGCGCTCTCTGACAGGAAATGAGGTGTTTCTGGGCGGATGCAAGTGAAAACGGGCCA
TTTTCGCGCGAAAACTGAATGAGGAAGTGAAAATCTGAGTAATTTCGCGTTTATGGCAGGGAGGAGTATTT
GCCGAGGGCCGAGTAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTACCGTGTTTTTCACCTAAATTTCCGC
GTACGGTGTCAAAGTCCGGTGTTTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGCCAGGGTATTTAAACCTGCGCTCTCC
AGTCAAGAGGCCACTCTTGAGTGCCAGCGAGAAGAGTTTTCTCCTCCGCGCCGCGAGTCAGATCTACACTT
TGAAAGTAGGGATAACAGGGTAATGACATTGATTATTGACTAGTTGTTAATAGTAATCAATTACGGGGTCA
TTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCC
AACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTG
ACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTC

CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGAC
TTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACC
AATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTT
GTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCG
GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGATCTCCCTATCAGT
GATAGAGATCGTCGACGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAACGCCATCCACGCTGTTTTGAC
CTCCATAGAAGACAGCGATCGCGCCACCATGGCTGGCATGACCGAGTACAAGCTAGTCGTTGTGGGAGCTG
GAGATGTGGGCAAATCTGCTCTGACCATTCAGCTGATTCAGGGCACAGATCTGGATCACCAGGAGAAGTGT
CTGAGCAGGCTGTACGACCACATGCCAGAAGGATTAACCCCTCTTATGGGAGTGAGCTCTTCTTCTGCTCTG
GCCAGACTGGGACTGCCTATGGATAAGCTGAACAAGATCACAGCTCCTGCCTCTCAGAAACTGAGACAGCT
GCAGAAGATGGAGACCCCTGAACTGCTGCCTTGTGGATATCTGGTGGAGGAGAATACCACAATCAGCGTGA
CCGTGAAAGGCCTGGAAGCCCAGAACAAGATCAAAGGCTGTACCGGCTCTGTGAATATGACACTGCAGAG
AGCTTCTGCCGCCCCTAAGACAGGAGGAGGAGGAGAAGCTGCTGCCTACAATAATACATTAGTGGCCAGA
CATGTGCCCCAGATCCCTAAGCCTGACAGCCTGGTTGGCCTGAGCGATGAATTAGGAAAAAGAGACACATT
TGCCGAGAGCCTGATCCGGAGAATGGCCTCTGCCGGCTACCTGTTCCTGGATATCATCACATATGTTGTGTT
TGCCGTGACCTTCGTGCTGGGAGTTCTGGGCGGCCTGAATACCGAGACCAATGAAAAAGCTCTTGAAGCCG
TGTTTGGCAAGTACGGCAGAATCGTGGAGGTGCTGGGCGGCAGATCTTGTGAAGAATTAACAGCTGTGTTA
CCACCTCCTCAGCTGCTTGGCAGACGGTTCAACTTCTTCAGCTACAGCTACGTTGCTGCTGGCTCTTCTGGC
AACAACTACGACCTGATGGCCCAGCCTATTACACCTGGACCTGATACAACACCTCTGCCTGTGACCGATAC
ATCTTCTGTGTCTACCGGACACGCCACATCTCTGCCAGTGACAGATGCTGGACTGAGAGTGACAGAGTCTA
AAGGACACAGCGATTCTTGGCACCTGAGCCTGGATACAGCCATCAGGGTGAATACCCCTAAGCTGGTTTCT
GAAGTGGAAGAGCTGAACAAGAGCATCACCGCCCTGAGGGAGAAGTTACTGCAGATGGTGGAAGCCGATA
GACCTGGAAACCTGTTTATTGGAGGCCTGAACACCGAGACCAATGAGGACTCTCCCGTGAAGGATGAAGTG
GTGGTGAACGATCAATGGGGCCAGAATTGTAGCTGCCATCATGGAGGCTACGAGTTCCCTGATCTGCACAG
GACAATCGTGTCTGAGTGCGATGTGTATCTGACCTACATGCTGAGACAGGCTGCTCTGCAGCTGTTCTTCGA
CCTGTATCACAGCATCCCTAGCAGCTTTTCTCCTCTGGTTCTGAGCTGTCTGGTGCAGCCTCTGGAAGATGT
GGAAGTGATGGAGAAGGATGGCACAACCTTTAGCTGTGAGGTGAGCCACGATGAGGTGCCTCGGACATAT
GGACCCGTGTTTATGTGTCTGGGAGGACTGCTGACCATGGTGGCTGGAGCTGTTTGGCTGACAGTTGGACC
CGGACCAGGCGCCAAATTTGTTGCTGCTTGGACACTGAAAGCTGCTGCTGGGCCCGGACCAGGCCAGTACA
TCAAGGCCAACTCTAAGTTTATCGGCATCACCGAATTGGGACCTGGACCCGGCTAGTAGTGAGTTTAAACT
CCCATTTAAATGTGAGGGTTAATGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCAC
AACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTAT
AAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGATGTGGG
AGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAGTG
AGTAGTGTTCTGGGGCGGGGGAGGACCTGCATGAGGGCCAGAATAACTGAAATCTGTGCTTTTCTGTGTGT
TGCAGCAGCATGAGCGGAAGCGGCTCCTTTGAGGGAGGGGTATTCAGCCCTTATCTGACGGGGCGTCTCCC
CTCCTGGGCGGGAGTGCGTCAGAATGTGATGGGATCCACGGTGGACGGCCGGCCCGTGCAGCCCGCGAAC
TCTTCAACCCTGACCTATGCAACCCTGAGCTCTTCGTCGTTGGACGCAGCTGCCGCCGCAGCTGCTGCATCT
GCCGCCAGCGCCGTGCGCGGAATGGCCATGGGCGCCGGCTACTACGGCACTCTGGTGGCCAACTCGAGTTC
CACCAATAATCCCGCCAGCCTGAACGAGGAGAAGCTGTTGCTGCTGATGGCCCAGCTCGAGGCCTTGACCC
AGCGCCTGGGCGAGCTGACCCAGCAGGTGGCTCAGCTGCAGGAGCAGACGCGGGCCGCGGTTGCCACGGT
GAAATCCAAATAAAAAATGAATCAATAAATAAACGGAGACGGTTGTTGATTTTAACACAGAGTCTGAATCT
TTATTTGATTTTTCGCGCGCGGTAGGCCCTGGACCACCGGTCTCGATCATTGAGCACCCGGTGGATCTTTTC
CAGGACCCGGTAGAGGTGGGCTTGGATGTTGAGGTACATGGGCATGAGCCCGTCCCGGGGGTGGAGGTAG
CTCCATTGCAGGGCCTCGTGCTCGGGGGTGGTGTTGTAAATCACCCAGTCATAGCAGGGGCGCAGGGCATG
GTGTTGCACAATATCTTTGAGGAGGAGACTGATGGCCACGGGCAGCCCTTTGGTGTAGGTGTTTACAAATC
TGTTGAGCTGGGAGGGATGCATGCGGGGGGAGATGAGGTGCATCTTGGCCTGGATCTTGAGATTGGCGATG
TTACCGCCCAGATCCCGCCTGGGGTTCATGTTGTGCAGGACCACCAGCACGGTGTATCCGGTGCACTTGGG
GAATTTATCATGCAACTTGGAAGGGAAGGCGTGAAAGAATTTGGCGACGCCTTTGTGCCCGCCCAGGTTTT
CCATGCACTCATCCATGATGATGGCGATGGGCCCGTGGGCGGCGGCCTGGGCAAAGACGTTTCGGGGGTCG
GACACATCATAGTTGTGGTCCTGGGTGAGGTCATCATAGGCCATTTTAATGAATTTGGGGCGGAGGGTGCC
GGACTGGGGGACAAAGGTTCCCTCGATCCCGGGGGCGTAGTTCCCCTCACAGATCTGCATCTCCCAGGCTT
TGAGCTCGGAGGGGGGGATCATGTCCACCTGCGGGGCGATAAAGAACACGGTTTCCGGGGCGGGGGAGAT
GAGCTGGGCCGAAAGCAAGTTCCGGAGCAGCTGGGACTTGCCGCAGCCGGTGGGGCCGTAGATGACCCCG
ATGACCGGCTGCAGGTGGTAGTTGAGGGAGAGACAGCTGCCGTCCTCCCGGAGGAGGGGGGCCCACCTCGT
TCATCATCTCGCGCACGTGCATGTTCTCGCGCACCAGTTCCGCCAGGAGGCGCTCTCCCCCCAGGGATAGG
AGCTCCTGGAGCGAGGCGAAGTTTTTCAGCGGCTTGAGTCCGTCGGCCATGGGCATTTTGGAGAGGGTTTG
TTGCAAGAGTTCCAGGCGGTCCCAGAGCTCGGTGATGTGCTCTACGGCATCTCGATCCAGCAGACCTCCTC
GTTTCGCGGGTTGGGACGGCTGCGGGAGTAGGGCACCAGACGATGGGCGTCCAGCGCAGCCAGGGTCCGG
TCCTTCCAGGGTCGCAGCGTCCGCGTCAGGGTGGTCTCCGTCACGGTGAAGGGGTGCGCGCCGGGCTGGGC
GCTTGCGAGGGTGCGCTTCAGGCTCATCCGGCTGGTCGAAAACCGCTCCCGATCGGCGCCCTGCGCGTCGG
CCAGGTAGCAATTGACCATGAGTTCGTAGTTGAGCGCCTCGGCCGCGTGGCCTTTGGCGCGGAGCTTACCTT
TGGAAGTCTGCCCGCAGGCGGGACAGAGGAGGGACTTGAGGGCGTAGAGCTTGGGGGCGAGGAAGACGG
ACTCGGGGGGCGTAGGCGTCCGCGCCGCAGTGGGCGCAGACGGTCTCGCACTCCACGAGCCAGGTGAGGTC
GGGCTGGTCGGGGTCAAAAACCAGTTTCCCGCCGTTCTTTTTGATGCGTTTCTTACCTTTGGTCTCCATGAGC
TCGTGTCCCCGCTGGGTGACAAAGAGGCTGTCCGTGTCCCCGTAGACCGACTTTATGGGCCGGTCCTCGAG
CGGTGTGCCGCGGTCCTCCTCGTAGAGGAACCCCGCCCACTCCGAGACGAAAGCCCGGGTCCAGGCCAGCA

10

20

30

40

50

CGAAGGAGGCCACGTGGGACGGGTAGCGGTCGTTGTCCACCAGCGGGTCCACCTTTTTCCAGGGTATGCAAA
CACATGTCCCCCTCGTCCACATCCAGGAAGGTGATTGGCTTGTAAGTGTAGGCCACGTGACCGGGGGTCCC
GGCCGGGGGGGTATAAAAGGGTGCGGGTCCCTGCTCGTCCTCACTGTCTTCCGGATCGCTGTCCAGGAGCG
CCAGCTGTTGGGGTAGGTATTCCCTCTCGAAGGCGGGCATGACCTCGGCACTCAGGTTGTCAGTTTCTAGAA
ACGAGGAGGATTTGATATTGACGGTGCCGGCGGAGATGCCTTTCAAGAGCCCCTCGTCCATCTGGTCAGAA
AAGACGATCTTTTTGTTGTCGAGCTTGGTGGCGAAGGAGCCGTAGAGGGCGTTGGAGAGGAGCTTGGCGAT
GGAGCGCATGGTCTGGTTTTTTTCCTTGTCGGCGCGCTCCTTGGCGGCGATGTTGAGCTGCACGTACTCGCG
CGCCACGCACTTCCATTCGGGGAAGACGGTGGTCAGCTCGTCGGGCACGATTCTGACCTGCCAGCCCCGAT
TATGCAGGGTGATGAGGTCCACACTGGTGGCCACCTCGCCGCGCAGGGGCTCATTAGTCCAGCAGAGGCGT
CCGCCCTTGCGCGAGCAGAAGGGGGGCAGGGGGTCCAGCATGACCTCGTCGGGGGGGTCGGCATCGATGG
TGAAGATGCCGGGCAGGAGGTCGGGGTCAAAGTAGCTGATGGAAGTGGCCAGATCGTCCAGGGCAGCTTG
CCATTCGCGCACGGCCAGCGCGCGCTCGTAGGGACTGAGGGGCGTGCCCCAGGGCATGGGATGGGTAAGC
GCGGAGGCGTACATGCCGCAGATGTCGTAGACGTAGAGGGGCTCCTCGAGGATGCCGATGTAGGTGGGGT
AGCAGCGCCCCCCGCGGATGCTGGCGCGCACGTAGTCATACAGCTCGTGCGAGGGGGCGAGGAGCCCCGG
GCCCAGGTTGGTGCGACTGGGCTTTTCGGCGCGGTAGACGATCTGGCGGAAAATGGCATGCGAGTTGGAGG
AGATGGTGGGCCTTTGGAAGATGTTGAAGTGGGCGTGGGGCAGTCCGACCGAGTCGCGGATGAAGTGGGC
GTAGGAGTCTTGCAGCTTGGCGACGAGCTCGGCGGTGACTAGGACGTCCAGAGCGCAGTAGTCGAGGGTCT
CCTGGATGATGTCATACTTGAGCTGTCCCTTTTGTTTCCACAGCTCGCGGTTGAGAAGGAACTCTTCGCGGT
CCTTCCAGTACTCTTCGAGGGGGAACCCGTCCTGATCTGCACGGTAAGAGCCTAGCATGTAGAACTGGTTG
ACGGCCTTGTAGGCGCAGCAGCCCTTCTCCACGGGGAGGGCGTAGGCCTGGGCGGCCTTGCGCAGGGAGG
TGTGCGTGAGGGCGAAAGTGTCCCTGACCATGACCTTGAGGAACTGGTGCTTGAAGTCGATATCGTCGCAG
CCCCCCTGCTCCCAGAGCTGGAAGTCCGTGCGCTTCTTGTAGGCGGGGTTGGGCAAAGCGAAAGTAACATC
GTTGAAGAGGATCTTGCCCGCGCGGGGCATAAAGTTGCGAGTGATGCGGAAAGGTTGGGGCACCTCGGCC
CGGTTGTTGATGACCTGGGCGGCGAGCACGATCTCGTCGAAGCCGTTGATGTTGTGGCCCACGATGTAGAG
TTCCACGAATCGCGGACGGCCCTTGACGTGGGGCAGTTTCTTGAGCTCCTCGTAGGTGAGCTCGTCGGGGTC
GCTGAGCCCGTGCTGCTCGAGCGCCCAGTCGGCGAGATGGGGGTTGGCGCGGAGGAAGGAAGTCCAGAGA
TCCACGGCCAGGGCGGTTTGCAGACGGTCCCGGTACTGACGGAACTGCTGCCCGACGGCCATTTTTTCGGG
GGTGACGCAGTAGAAGGTGCGGGGGTCCCCGTGCCAGCGATCCCATTTGAGCTGGAGGGCGAGATCGAGG
GCGAGCTCGACGAGCCGGTCGTCCCCGGAGAGTTTCATGACCAGCATGAAGGGGACGAGCTGCTTGCCGA
AGGACCCCATCCAGGTGTAGGTTTCCACATCGTAGGTGAGGAAGAGCCTTTCGGTGCGAGGATGCGAGCCG
ATGGGGAAGAACTGGATCTCCTGCCACCAATTGGAGGAATGGCTGTTGATGTGATGGAAGTAGAAATGCCG
ACGGCGCGCCGAACACTCGTGCTTGTGTTTATACAAGCGGCCACAGTGCTCGCAACGCTGCACGGGATGCA
CGTGCTGCACGAGCTGTACCTGAGTTCCTTTGACGAGGAATTTCAGTGGGAAGTGGAGTCGTGGCGCCTGC
ATCTCGTGCTGTACTACGTCGTGGTGGTCGGCCTGGCCCTCTTCTGCCTCGATGGTGGTCATGCTGACGAGC
CCGCGCGGGAGGCAGGTCCAGACCTCGGCGCGAGCGGGTCGGAGAGCGAGGACGAGGGCGCGCAGGCCG
GAGCTGTCCAGGGTCCTGAGACGCTGCGGAGTCAGGTCAGTGGGCAGCGGCGGCGCGCGGTTGACTTGCA
GGAGTTTTTCCAGGGCGCGCGGGAGGTCCAGATGGTACTTGATCTCCACCGCGCCATTGGTGGCGACGTCG
ATGGCTTGCAGGGTCCCGTGCCCCTGGGGTGTGACCACCGTCCCCCGTTTCTTCTTGGGCGGCTGGGGCGAC
GGGGGCGGTGCCTCTTCCATGGTTAGAAGCGGCGGCGAGGACGCGCGCCGGGCGGCAGGGGCGGCTCGGG
GCCCGGAGGCAGGGGCGGCAGGGGCACGTCGGCGCCGCGCGCGGGTAGGTTCTGGTACTGCGCCCGGAGA
AGACTGGCGTGAGCGACGACGCGACGGTTGACGTCCTGGATCTGACGCCTCTGGGTGAAGGCCACGGGAC
CCGTGAGTTTGAACCTGAAAGAGAGTTCGACAGAATCAATCTCGGTATCGTTGACGGCGGCCTGCCGCAGG
ATCTCTTGCACGTCGCCCGAGTTGTCCTGGTAGGCGATCTCGGTCATGAACTGCTCGATCTCCTCCTCTTGA
AGGTCTCCGCGGCCGGCGCGCTCCACGGTGGCCGCGAGGTCGTTGGAGATGCGGCCCATGAGCTGCGAGA
AGGCGTTCATGCCCGCCTCGTTCCAGACGCGGCTGTAGACCACGACGCCCTCGGGATCGCGGGCGCGCATG
ACCACCTGGGCGAGGTTGAGCTCCACGTGGCGCGTGAAGACCGCGTAGTTGCAGAGGCGCTGGTAGAGGT
AGTTGAGCGTGGTGGCGATGTGCTCGGTGACGAAGAAATACATGATCCAGCGGCGGAGCGGCATCTCGCTG
ACGTCGCCCAGCGCCTCCAAACGTTCCATGGCCTCGTAAAAGTCCACGGCGAAGTTGAAAAACTGGGAGTT
GCGCGCCGAGACGGTCAACTCCTCCTCCAGAAGACGGATGAGCTCGGCGATGGTGGCGCGCACCTCGCGCT
CGAAGGCCCCCGGGAGTTCCTCCACTTCCTCTTCTTCCTCCTCCACTAACATCTCTTCTACTTCCTCCTCAGG
CGGCAGTGGTGGCGGGGGAGGGGGCCTGCGTCGCCGGCGGCGCACGGGCAGACGGTCGATGAAGCGCTCG
ATGGTCTCGCCGCGCCGGCGTCGCATGGTCTCGGTGACGGCGCGCCCGTCCTCGCGGGGCCGCAGCGTGAA
GACGCCGCCGCGCATCTCCAGGTGGCCCGGGGGGGTCCCCGTTGGGCAGGGAGAGGGCGCTGACGATGCAT
CTTATCAATTGCCCCGTAGGGACTCCGCGCAAGGACCTGAGCGTCTCGAGATCCCACGGGATCTGAAAACCG
CTGAACGAAGGCTTCGAGCCAGTCGCAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACGGTTTCTTCTGGCGGGTCATGTT
GGTTGGGAGCGGGGCGGGCGATGCTGCTGGTGATGAAGTTGAAATAGGCGGTTCTGAGACGGCGGATGGT
GGCGAGGAGCACCAGGTCTTTGGGCCCGGCTTGCTGGATGCGCAGACGGTCGGCCATGCCCCAGGCGTGGT
CCTGACACCTGGCCAGGTCCTTGTAGTAGTCCTGCATGAGCCGCTCCACGGGCACCTCCTCCTCGCCCGCGC
GGCCGTGCATGCGCGTGAGCCCGAAGCCGCGCTGGGGCTGGACGAGCGCCAGGTCGGCGACGACGCGCTC
GGCGAGGATGGCTTGCTGGATCTGGGTGAGGGTGGTCTGGAAGTCATCAAAGTCGACGAAGCGGTGGTAG
GCTCCGGTGTTGATGGTGTAGGAGCAGTTGGCCATGACGGACCAGTTGACGGTCTGGTGGCCCGGACGCAC
GAGCTCGTGGTACTTGAGGCGCGAGTAGGCGCGCGTGTCGAAGATGTAGTCGTTGCAGGTGCGCACCAGGT
ACTGGTAGCCGATGAGGAAGTGCGGCGGCGGCTGGCGGTAGAGCGGCCATCGCTCGGTGGCGGGGGCGCC
GGGCGCGAGGTCCTCGAGCATGGTGCGGTGGTAGCCGTAGATGTACCTGGACATCCAGGTGATGCCGGCGG
CGGTGGTGGAGGCGCGCGGGAACTCGCGGACGCGGTTCCAGATGTTGCGCAGCGGCAGGAAGTAGTTCAT
GGTGGGCACGGTCTGGCCCGTGAGGCGCGCGCAGTCGTGGATGCTCTATACGGGCAAAAACGAAAGCGGT
CAGCGGCTCGACTCCGTGGCCTGGAGGCTAAGCGAACGGGTTGGGCTGCGCGTGTACCCCGGTTCGAATCT

CGAATCAGGCTGGAGCCGCAGCTAACGTGGTATTGGCACTCCCGTCTCGACCCAAGCCTGCACCAACCCTC
CAGGATACGGAGGCGGGTCGTTTTGCAACTTTTTTTTGGAGGCCGGATGAGACTAGTAAGCGCGGAAAGCG
GCCGACCGCGATGGCTCGCTGCCGTAGTCTGGAGAAGAATCGCCAGGGTTGCGTTGCGGTGTGCCCCGGTT
CGAGGCCGGCCGGATTCCGCGGCTAACGAGGGCGTGGCTGCCCCGTCGTTTCCAAGACCCCATAGCCAGCC
GACTTCTCCAGTTACGGAGCGAGCCCCTCTTTTGTTTTGTTTGTTTTTGCCAGATGCATCCCGTACTGCGGCA
GATGCGCCCCCACCACCCTCCACCGCAACAACAGCCCCCTCCACAGCCGGCGCTTCTGCCCCCGCCCCAGC
AGCAACTTCCAGCCACGACCGCCGCGGCCGCCGTGAGCGGGGCTGGACAGAGTTATGATCACCAGCTGGC
CTTGGAAGAGGGCGAGGGGCTGGCGCGCCTGGGGGCGTCGTCGCCGGAGCGGCACCCGCGCGTGCAGATG
AAAAGGGACGCTCGCGAGGCCTACGTGCCCAAGCAGAACCTGTTCAGAGACAGGAGCGGCGAGGAGCCCG
AGGAGATGCGCGCGGCCCGGTTCCACGCGGGGCGGGAGCTGCGGCGCGGCCTGGACCGAAAGAGGGTGCT
GAGGGACGAGGATTTCGAGGCGGACGAGCTGACGGGGATCAGCCCCGCGCGCGCGCACGTGGCCGCGGCC
AACCTGGTCACGGCGTACGAGCAGACCGTGAAGGAGGAGAGCAACTTCCAAAAATCCTTCAACAACCACG
TGCGCACCCTGATCGCGCGCGAGGAGGTGACCCTGGGCCTGATGCACCTGTGGGACCTGCTGGAGGCCATC
GTGCAGAACCCCACCAGCAAGCCGCTGACGGCGCAGCTGTTCCTGGTGGTGCAGCATAGTCGGGACAACG
AAGCGTTCAGGGAGGCGCTGCTGAATATCACCGAGCCCGAGGGCCGCTGGCTCCTGGACCTGGTGAACATT
CTGCAGAGCATCGTGGTGCAGGAGCGCGGGCTGCCGCTGTCCGAGAAGCTGGCGGCCATCAACTTCTCGGT
GCTGAGTTTGGGCAAGTACTACGCTAGGAAGATCTACAAGACCCCGTACGTGCCCATAGACAAGGAGGTG
AAGATCGACGGGTTTTACATGCGCATGACCCTGAAAGTGCTGACCCTGAGCGACGATCTGGGGGTGTACCG
CAACGACAGGATGCACCGTGCGGTGAGCGCCAGCAGGCGGCGCGAGCTGAGCGACCAGGAGCTGATGCAT
AGTCTGCAGCGGGCCCTGACCGGGGCCGGGACCGAGGGGGAGAGCTACTTTGACATGGGCGCGGACCTGC
ACTGGCAGCCCAGCCGCCGGGCCTTGGAGGCGGCGGCAGGACCCTACGTAGAAGAGGTGGACGATGAGGT
GGACGAGGAGGGCGAGTACCTGGAAGACTGATGGCGCGACCGTATTTTTGCTAGATGCAACAACAACAGC
CACCTCCTGATCCCGCGATGCGGGCGGCGCTGCAGAGCCAGCCGTCCGGCATTAACTCCTCGGACGATTGG
ACCCAGGCCATGCAACGCATCATGGCGCTGACGACCCGCAACCCCGAAGCCTTTAGACAGCAGCCCCAGG
CCAACCGGCTCTCGGCCATCCTGGAGGCCGTGGTGCCCTCGCGCTCCAACCCCACGCACGAGAAGGTCCTG
GCCATCGTGAACGCGCTGGTGGAGAACAAGGCCATCCGCGGCGACGAGGCCGGCCTGGTGTACAACGCGC
TGCTGGAGCGCGTGGCCCGCTACAACAGCACCAACGTGCAGACCAACCTGGACCGCATGGTGACCGACGT
GCGCGAGGCCGTGGCCCAGCGCGAGCGGTTCCACCGCGAGTCCAACCTGGGATCCATGGTGGCGCTGAAC
GCCTTCCTCAGCACCCAGCCCGCCAACGTGCCCCGGGGCCAGGAGGACTACACCAACTTCATCAGCGCCCT
GCGCCTGATGGTGACCGAGGTGCCCCAGAGCGAGGTGTACCAGTCCGGGCCGGACTACTTCTTCCAGACCA
GTCGCCAGGGCTTGCAGACCGTGAACCTGAGCCAGGCTTTCAAGAACTTGCAGGGCCTGTGGGGCGTGCAG
GCCCCGGTCGGGGACCGCGCGACGGTGTCGAGCCTGCTGACGCCGAACTCGCGCCTGCTGCTGCTGCTGGT
GGCCCCCTTCACGGACAGCGGCAGCATCAACCGCAACTCGTACCTGGGCTACCTGATTAACCTGTACCGCG
AGGCCATCGGCCAGGCGCACGTGGACGAGCAGACCTACCAGGAGATCACCCACGTGAGCCGCGCCCTGGG
CCAGGACGACCCGGGCAACCTGGAAGCCACCCTGAACTTTTTGCTGACCAACCGGTCGCAGAAGATCCCGC
CCCAGTACGCGCTCAGCACCGAGGAGGAGCGCATCCTGCGTTACGTGCAGCAGAGCGTGGGCCTGTTCCTG
ATGCAGGAGGGGGCCACCCCCAGCGCCGCGCTCGACATGACCGCGCGCAACATGGAGCCCAGCATGTACG
CCAGCAACCGCCCGTTCATCAATAAACTGATGGACTACTTGCATCGGGCGGCCGCCATGAACTCTGACTAT
TTCACCAACGCCATCCTGAATCCCCACTGGCTCCCGCCGCCGGGGTTCTACACGGGCGAGTACGACATGCC
CGACCCCAATGACGGGTTCCTGTGGGACGATGTGGACAGCAGCGTGTTCTCCCCCCGACCGGGTGCTAACG
AGCGCCCCTTGTGGAAGAAGGAAGGCAGCGACCGACGCCCGTCCTCGGCGCTGTCCGGCCGCGAGGGTGC
TGCCGCGGCGGTGCCCGAGGCCGCCAGTCCTTTCCCGAGCTTGCCCTTCTCGCTGAACAGTATCCGCAGCA
GCGAGCTGGGCAGGATCACGCGCCCGCGCTTGCTGGGCGAAGAGGAGTACTTGAATGACTCGCTGTTGAGA
CCCGAGCGGGAGAAGAACTTCCCCAATAACGGGATAGAAAGCCTGGTGGACAAGATGAGCCGCTGGAAGA
CGTATGCGCAGGAGCACAGGGACGATCCCCGGGCGTCGCAGGGGGCCACGAGCCGGGGCAGCGCCGCCCG
TAAACGCCGGTGGCACGACAGGCAGCGGGGACAGATGTGGGACGATGAGGACTCCGCCGACGACAGCAGC
GTGTTGGACTTGGGTGGGAGTGGTAACCCGTTCGCTCACCTGCGCCCCCGTATCGGGCGCATGATGTAAGA
GAAACCGAAAATAAATGATACTCACCAAGGCCATGGCGACCAGCGTGCGTTCGTTTCTTCTCTGTTGTTGTT
GTATCTAGTATGATGAGGCGTGCGTACCCGGAGGGTCCTCCTCCCTCGTACGAGAGCGTGATGCAGCAGGC
GATGGCGGCGGCGGCGATGCAGCCCCCGCTGGAGGCTCCTTACGTGCCCCCGCGGTACCTGGCGCCTACGG
AGGGGCGGAACAGCATTCGTTACTCGGAGCTGGCACCCTTGTACGATACCACCCGGTTGTACCTGGTGGAC
AACAAGTCGGCGGACATCGCCTCGCTGAACTACCAGAACGACCACAGCAACTTCCTGACCACCGTGGTGCA
GAACAATGACTTCACCCCCACGGAGGCCAGCACCCAGACCATCAACTTTGACGAGCGCTCGCGGTGGGGC
GGCCAGCTGAAAACCATCATGCACACCAACATGCCCAACGTGAACGAGTTCATGTACAGCAACAAGTTCA
AGGCGCGGGTGATGGTCTCCCGCAAGACCCCCAATGGGGTGACAGTGACAGAGGATTATGATGGTAGTCA
GGATGAGCTGAAGTATGAATGGGTGGAATTTGAGCTGCCCGAAGGCAACTTCTCGGTGACCATGACCATCG
ACCTGATGAACAACGCCATCATCGACAATTACTTGGCGGTGGGGCGGCAGAACGGGGTGCTGGAGAGCGA
CATCGGCGTGAAGTTCGACACTAGGAACTTCAGGCTGGGCTGGGACCCCGTGACCGAGCTGGTCATGCCCG
GGGTGTACACCAACGAGGCTTTCCATCCCGATATTGTCTTGCTGCCCGGCTGCGGGGTGGACTTCACCGAG
AGCCGCCTCAGCAACCTGCTGGGCATTCGCAAGAGGCAGCCCTTCCAGGAAGGCTTCCAGATCATGTACGA
GGATCTGGAGGGGGGCAACATCCCCGCGCTCCTGGATGTCGACGCCTATGAGAAAAGCAAGGAGGATGCA
GCAGCTGAAGCAACTGCAGCCGTAGCTACCGCCTCTACCGAGGTCAGGGGCGATAATTTTGCAAGCGCCGC
AGCAGTGGCAGCGGCCGAGGCGGCTGAAACCGAAAGTAAGATAGTCATTCAGCCGGTGGAGAAGGATAGC
AAGAACAGGAGCTACAACGTACTACCGGACAAGATAAACACCGCCTACCGCAGCTGGTACCTAGCCTACA
ACTATGGCGACCCCGAGAAGGGCGTGCGCTCCTGGACGCTGCTCACCACCTCGGACGTCACCTGCGGCGTG
GAGCAAGTCTACTGGTCGCTGCCCGACATGATGCAAGACCCGGTCACCTTCCGCTCCACGCGTCAAGTTAG
CAACTACCCGGTGGTGGGCGCCGAGCTCCTGCCCGTCTACTCCAAGAGCTTCTTCAACGAGCAGGCCGTCT

ACTCGCAGCAGCTGCGCGCCTTCACCTCGCTTACGCACGTCTTCAACCGCTTCCCCGAGAACCAGATCCTCG
TCCGCCCGCCCGCGCCCACCATTACCACCGTCAGTGAAAACGTTCCTGCTCTCACAGATCACGGGACCCTG
CCGCTGCGCAGCAGTATCCGGGGAGTCCAGCGCGTGACCGTTACTGACGCCAGACGCCGCACCTGCCCCTA
CGTCTACAAGGCCCTGGGCATAGTCGCGCCGCGCGTCCTCTCGAGCCGCACCTTCTAAATGTCCATTCTCAT
CTCGCCCAGTAATAACACCGGTTGGGGCCTGCGCGCGCCCAGCAAGATGTACGGAGGCGCTCGCCAACGCT
CCACGCAACACCCCGTGCGCGTGCGCGGGCACTTCCGCGCTCCCTGGGGCGCCCTCAAGGGCCGCGTGCGG
TCGCGCACCACCGTCGACGACGTGATCGACCAGGTGGTGGCCGACGCGCGCAACTACACCCCCGCCGCCGC
GCCCGTCTCCACCGTGGACGCCGTCATCGACAGCGTGGTGGCCGACGCGCGCCGGTACGCCCGCGCCAAGA
GCCGGCGGCGGCGCATCGCCCGGCGGCACCGGAGCACCCCCGCCATGCGCGCGGCGCGAGCCTTGCTGCG
CAGGGCCAGGCGCACGGGACGCAGGGCCATGCTCAGGGCGGCCAGACGCGCGGCTTCAGGCGCCAGCGCC
GGCAGGACCCGGAGACGCGCGGCCACGGCGGCGGCAGCGGCCATCGCCAGCATGTCCCGCCCGCGGCGAG
GGAACGTGTACTGGGTGCGCGACGCCGCCACCGGTGTGCGCGTGCCCGTGCGCACCCGCCCCCCTCGCACT
TGAAGATGTTCACTTCGCGATGTTGATGTGTCCCAGCGGCGAGGAGGATGTCCAAGCGCAAATTCAAGGAA
GAGATGCTCCAGGTCATCGCGCCTGAGATCTACGGCCCTGCGGTGGTGAAGGAGGAAAGAAAGCCCCGCA
AAATCAAGCGGGTCAAAAAGGACAAAAAGGAAGAAGAAAGTGATGTGGACGGATTGGTGGAGTTTGTGCG
CGAGTTCGCCCCCCGGCGGCGCGTGCAGTGGCGCGGGCGGAAGGTGCAACCGGTGCTGAGACCCGGCACC
ACCGTGGTCTTCACGCCCGGCGAGCGCTCCGGCACCGCTTCCAAGCGCTCCTACGACGAGGTGTACGGGGA
TGATGATATTCTGGAGCAGGCGGCCGAGCGCCTGGGCGAGTTTGCTTACGGCAAGCGCAGCCGTTCCGCAC
CGAAGGAAGAGGCGGTGTCCATCCCGCTGGACCACGGCAACCCCACGCCGAGCCTCAAGCCCGTGACCTT
GCAGCAGGTGCTGCCGACCGCGGCGCCGCCGCCGGGGGTTCAAGCGCGAGGGCGAGGATCTGTACCCCACC
ATGCAGCTGATGGTGCCCAAGCGCCAGAAGCTGGAAGACGTGCTGGAGACCATGAAGGTGGACCCGGACG
TGCAGCCCGAGGTCAAGGTGCGGCCCATCAAGCAGGTGGCCCCGGGCCTGGGCGTGCAGACCGTGGACAT
CAAGATTCCCACGGAGCCCATGGAAACGCAGACCGAGCCCATGATCAAGCCCAGCACCAGCACCATGGAG
GTGCAGACGGATCCCTGGATGCCATCGGCTCCTAGTCGAAGACCCCGGCGCAAGTACGGCGCGGCCAGCCT
GCTGATGCCCAACTACGCGCTGCATCCTTCCATCATCCCCACGCCGGGCTACCGCGGCACGCGCTTCTACCG
CGGTCATACCAGCAGCCGCCGCCGCAAGACCACCACTCGCCGCCGCCGTCGCCGCACCGCCGCTGCAACCA
CCCCTGCCGCCCTGGTGCGGAGAGTGTACCGCCGCGGCCGCGCACCTCTGACCCTGCCGCGCGCGCGCTAC
CACCCGAGCATCGCCATTTAAACTTTCGCCTGCTTTGCAGATCAATGGCCCTCACATGCCGCCTTCGCGTTC
CCATTACGGGCTACCGAGGAAGAAAACCGCGCCGTAGAAGGCTGGCGGGGAACGGGATGCGTCGCCACCA
CCACCGGCGGCGGCGCGCCATCAGCAAGCGGTTGGGGGGAGGCTTCCTGCCCGCGCTGATCCCCATCATCG
CCGCGGCGATCGGGGCGATCCCCGGCATTGCTTCCGTGGCGGTGCAGGCCTCTCAGCGCCACTGAGACACA
CTTGGAAACATCTTGTAATAAACCAATGGACTCTGACGCTCCTGGTCCTGTGATGTGTTTTCGTAGACAGAT
GGAAGACATCAATTTTTCGTCCCTGGCTCCGCGACACGGCACGCGGCCGTTCATGGGCACCTGGAGCGACA
TCGGCACCAGCCAACTGAACGGGGGCGCCTTCAATTGGAGCAGTCTCTGGAGCGGGCTTAAGAATTTCGGG
TCCACGCTTAAAACCTATGGCAGCAAGGCGTGGAACAGCACCACAGGGCAGGCGCTGAGGGATAAGCTGA
AAGAGCAGAACTTCCAGCAGAAGGTGGTCGATGGGCTCGCCTCGGGCATCAACGGGGTGGTGGACCTGGC
CAACCAGGCCGTGCAGCGGCAGATCAACAGCCGCCTGGACCCGGTGCCGCCCGCCGGCTCCGTGGAGATG
CCGCAGGTGGAGGAGGAGCTGCCTCCCCTGGACAAGCGGGGCGAGAAGCGACCCCGCCCCGATGCGGAGG
AGACGCTGCTGACGCACACGGACGAGCCGCCCCCGTACGAGGAGGCGGTGAAACTGGGTCTGCCCACCAC
GCGGCCCATCGCGCCCCTGGCCACCGGGGTGCTGAAACCCGAAAAGCCCGCGACCCTGGACTTGCCTCCTC
CCCAGCCTTCCCGCCCCTCTACAGTGGCTAAGCCCCTGCCGCCGGTGGCCGTGGCCCGCGCGCGACCCGGG
GGCACCGCCCGCCCTCATGCGAACTGGCAGAGCACTCTGAACAGCATCGTGGGTCTGGGAGTGCAGAGTGT
GAAGCGCCGCCGCTGCTATTAAACCTACCGTAGCGCTTAACTTGCTTGTCTGTGTGTGTATGTATTATGTCG
CCGCCGCCGCTGTCCACCAGAAGGAGGAGTGAAGAGGCGCGTCGCCGAGTTGCAAGATGGCCACCCCATC
GATGCTGCCCCAGTGGGCGTACATGCACATCGCCGGACAGGACGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTGG
TGCAGTTTGCCCGCGCCACAGACACCTACTTCAGTCTGGGGAACAAGTTTAGGAACCCCACGGTGGCGCCC
ACGCACGATGTGACCACCGACCGCAGCCAGCGGCTGACGCTGCGCTTCGTGCCCGTGGACCGCGAGGACA
ACACCTACTCGTACAAAGTGCGCTACACGCTGGCCGTGGGCGACAACCGCGTGCTGGACATGGCCAGCACC
TACTTTGACATCCGCGGCGTGCTGGATCGGGGCCCTAGCTTCAAACCCTACTCCGGCACCGCCTACAACAG
TCTGGCCCCCAAGGGAGCACCCAACACTTGTCAGTGGACATATAAAGCCGATGGTGAAACTGCCACAGAA
AAAACCTATACATATGGAAATGCACCCGTGCAGGGCATTAACATCACAAAAGATGGTATTCAACTTGGAAC
TGACACCGATGATCAGCCAATCTACGCAGATAAAACCTATCAGCCTGAACCTCAAGTGGGTGATGCTGAAT
GGCATGACATCACTGGTACTGATGAAAAGTATGGAGGCAGAGCTCTTAAGCCTGATACCAAAATGAAGCCT
TGTTATGGTTCTTTTGCCAAGCCTACTAATAAAGAAGGAGGTCAGGCAAATGTGAAAACAGGAACAGGCAC
TACTAAAGAATATGACATAGACATGGCTTTCTTTGACAACAGAAGTGCGGCTGCTGCTGGCCTAGCTCCAG
AAATTGTTTTGTATACTGAAAATGTGGATTTGGAAACTCCAGATACCCATATTGTATACAAAGCAGGCACA
GATGACAGCAGCTCTTCTATTAATTTGGGTCAGCAAGCCATGCCCAACAGACCTAACTACATTGGTTTCAGA
GACAACTTTATCGGGCTCATGTACTACAACAGCACTGGCAATATGGGGGTGCTGGCCGGTCAGGCTTCTCA
GCTGAATGCTGTGGTTGACTTGCAAGACAGAAACACCGAGCTGTCCTACCAGCTCTTGCTTGACTCTCTGGG
TGACAGAACCCGGTATTTCAGTATGTGGAATCAGGCGGTGGACAGCTATGATCCTGATGTGCGCATTATTG
AAAATCATGGTGTGGAGGATGAACTTCCCAACTATTGTTTCCCTCTGGATGCTGTTGGCAGAACAGATACTT
ATCAGGGAATTAAGGCTAATGGAACTGATCAAACCACATGGACCAAAGATGACAGTGTCAATGATGCTAA
TGAGATAGGCAAGGGTAATCCATTCGCCATGGAAATCAACATCCAAGCCAACCTGTGGAGGAACTTCCTCT
ACGCCAACGTGGCCCTGTACCTGCCCGACTCTTACAAGTACACGCCGGCCAATGTTACCCTGCCCACCAAC
ACCAACACCTACGATTACATGAACGGCCGGGTGGTGGCGCCCTCGCTGGTGGACTCCTACATCAACATCGG
GGCGCGCTGGTCGCTGGATCCCATGGACAACGTGAACCCCTTCAACCACCACCGCAATGCGGGGCTGCGCT
ACCGCTCCATGCTCCTGGGCAACGGGCGCTACGTGCCCTTCCACATCCAGGTGCCCCAGAAATTTTTCGCCA

10

20

30

40

50

TCAAGAGCCTCCTGCTCCTGCCCGGGTCCTACACCTACGAGTGGAACTTCCGCAAGGACGTCAACATGATC
CTGCAGAGCTCCCTCGGCAACGACCTGCGCACGGACGGGGCCTCCATCTCCTTCACCAGCATCAACCTCTA
CGCCACCTTCTTCCCCATGGCGCACAACACGGCCTCCACGCTCGAGGCCATGCTGCGCAACGACACCAACG
ACCAGTCCTTCAACGACTACCTCTCGGCGGCCAACATGCTCTACCCCATCCCGGCCAACGCCACCAACGTG
CCCATCTCCATCCCCTCGCGCAACTGGGCCGCCTTCCGCGGCTGGTCCTTCACGCGTCTCAAGACCAAGGAG
ACGCCCTCGCTGGGCTCCGGGTTCGACCCCTACTTCGTCTACTCGGGCTCCATCCCCTACCTCGACGGCACC
TTCTACCTCAACCACACCTTCAAGAAGGTCTCCATCACCTTCGACTCCTCCGTCAGCTGGCCCGGCAACGAC
CGGCTCCTGACGCCCAACGAGTTCGAAATCAAGCGCACCGTCGACGGCGAGGGCTACAACGTGGCCCAGT
GCAACATGACCAAGGACTGGTTCCTGGTCCAGATGCTGGCCCACTACAACATCGGCTACCAGGGCTTCTAC
GTGCCCGAGGGCTACAAGGACCGCATGTACTCCTTCTTCCGCAACTTCCAGCCCATGAGCCGCCAGGTGGT
GGACGAGGTCAACTACAAGGACTACCAGGCCGTCACCCTGGCCTACCAGCACAACAACTCGGGCTTCGTCG
GCTACCTCGCGCCCACCATGCGCCAGGGCCAGCCCTACCCCGCCAACTACCCCTACCCGCTCATCGGCAAG
AGCGCCGTCACCAGCGTCACCCAGAAAAAGTTCCTCTGCGACAGGGTCATGTGGCGCATCCCCTTCTCCAG
CAACTTCATGTCCATGGGCGCGCTCACCGACCTCGGCCAGAACATGCTCTATGCCAACTCCGCCCACGCGC
TAGACATGAATTTCGAAGTCGACCCCATGGATGAGTCCACCCTTCTCTATGTTGTCTTCGAAGTCTTCGACG
TCGTCCGAGTGCACCAGCCCCACCGCGGCGTCATCGAGGCCGTCTACCTGCGCACCCCCTTCTCGGCCGGT
AACGCCACCACCTAAGCTCTTGCTTCTTGCAAGCCATGGCCGCGGGCTCCGGCGAGCAGGAGCTCAGGGCC
ATCATCCGCGACCTGGGCTGCGGGCCCTACTTCCTGGGCACCTTCGATAAGCGCTTCCCGGGATTCATGGCC
CCGCACAAGCTGGCCTGCGCCATCGTCAACACGGCCGGCCGCGAGACCGGGGGCGAGCACTGGCTGGCCT
TCGCCTGGAACCCGCGCTCGAACACCTGCTACCTCTTCGACCCCTTCGGGTTCTCGGACGAGCGCCTCAAGC
AGATCTACCAGTTCGAGTACGAGGGCCTGCTGCGCCGCAGCGCCCTGGCCACCGAGGACCGCTGCGTCACC
CTGGAAAAGTCCACCCAGACCGTGCAGGGTCCGCGCTCGGCCGCCTGCGGGCTCTTCTGCTGCATGTTCCT
GCACGCCTTCGTGCACTGGCCCGACCGCCCCATGGACAAGAACCCCACCATGAACTTGCTGACGGGGGTGC
CCAACGGCATGCTCCAGTCGCCCCAGGTGGAACCCACCCTGCGCCGCAACCAGGAGGCGCTCTACCGCTTC
CTCAACTCCCACTCCGCCTACTTTCGCTCCCACCGCGCGCGCATCGAGAAGGCCACCGCCTTCGACCGCATG
AATCAAGACATGTAAACCGTGTGTGTATGTTAAATGTCTTTAATAAACAGCACTTTCATGTTACACATGCAT
CTGAGATGATTTATTTAGAAATCGAAAGGGTTCTGCCGGGTCTCGGCATGGCCCGCGGGCAGGGACACGTT
GCGGAACTGGTACTTGGCCAGCCACTTGAACTCGGGGATCAGCAGTTTGGGCAGCGGGGTGTCGGGGAAG
GAGTCGGTCCACAGCTTCCGCGTCAGTTGCAGGGCGCCCAGCAGGTCGGGCGCGGAGATCTTGAAATCGCA
GTTGGGACCCGCGTTCTGCGCGCGGGAGTTGCGGTACACGGGGTTGCAGCACTGGAACACCATCAGGGCCG
GGTGCTTCACGCTCGCCAGCACCGTCGCGTCGGTGATGCTCTCCACGTCGAGGTCCTCGGCGTTGGCCATCC
CGAAGGGGGTCATCTTGCAGGTCTGCCTTCCCATGGTGGGCACGCACCCGGGCTTGTGGTTGCAATCGCAG
TGCAGGGGGATCAGCATCATCTGGGCCTGGTCGGCGTTCATCCCCGGGTACATGGCCTTCATGAAAGCCTC
CAATTGCCTGAACGCCTGCTGGGCCTTGGCTCCCTCGGTGAAGAAGACCCCGCAGGACTTGCTAGAGAACT
GGTTGGTGGCGCACCCGGCGTCGTGCACGCAGCAGCGCGCGTCGTTGTTGGCCAGCTGCACCACGCTGCGC
CCCCAGCGGTTCTGGGTGATCTTGGCCCGGTCGGGGTTCTCCTTCAGCGCGCGCTGCCCGTTCTCGCTCGCC
ACATCCATCTCGATCATGTGCTCCTTCTGGATCATGGTGGTCCCGTGCAGGCACCGCAGCTTGCCCTCGGCC
TCGGTGCACCCGTGCAGCCACAGCGCGCACCCGGTGCACTCCCAGTTCTTGTGGGCGATCTGGGAATGCGC
GTGCACGAAGCCCTGCAGGAAGCGGCCCATCATGGTGGTCAGGGTCTTGTTGCTAGTGAAGGTCAGCGGAA
TGCCGCGGTGCTCCTCGTTGATGTACAGGTGGCAGATGCGGCGGTACACCTCGCCCTGCTCGGGCATCAGC
TGGAAGTTGGCTTTCAGGTCGGTCTCCACGCGGTAGCGGTCCATCAGCATAGTCATGATTTCCATACCCTTC
TCCCAGGCCGAGACGATGGGCAGGCTCATAGGGTTCTTCACCATCATCTTAGCGCTAGCAGCCGCGGCCAG
GGGGTCGCTCTCGTCCAGGGTCTCAAAGCTCCGCTTGCCGTCCTTCTCGGTGATCCGCACCGGGGGGTAGCT
GAAGCCCACGGCCGCCAGCTCCTCCTCGGCCTGTCTTTCGTCCTCGCTGTCCTGGCTGACGTCCTGCAGGAC
CACATGCTTGGTCTTGCGGGGTTTCTTCTTGGGCGGCAGCGGCGGCGGAGATGTTGGAGATGGCGAGGGGG
AGCGCGAGTTCTCGCTCACCACTACTATCTCTTCCTCTTCTTGGTCCGAGGCCACGCGGCGGTAGGTATGTC
TCTTCGGGGGCAGAGGCGGAGGCGACGGGCTCTCGCCGCCGCGACTTGGCGGATGGCTGGCAGAGCCCCTT
CCGCGTTCGGGGGTGCGCTCCCGGCGGCGCTCTGACTGACTTCCTCCGCGGCCGGCCATTGTGTTCTCCTAG
GGAGGAACAACAAGCATGGAGACTCAGCCATCGCCAACCTCGCCATCTGCCCCCACCGCCGACGAGAAGC
AGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAACCGCCCCGCCGCCCAGCCCCGCCACCTCCGACGCGGCCGTCCCAGA
CATGCAAGAGATGGAGGAATCCATCGAGATTGACCTGGGCTATGTGACGCCCGCGGAGCACGAGGAGGAG
CTGGCAGTGCGCTTTTCACAAGAAGAGATACACCAAGAACAGCCAGAGCAGGAAGCAGAGAATGAGCAGA
GTCAGGCTGGGCTCGAGCATGACGGCGACTACCTCCACCTGAGCGGGGGGGAGGACGCGCTCATCAAGCA
TCTGGCCCGGCAGGCCACCATCGTCAAGGATGCGCTGCTCGACCGCACCGAGGTGCCCCTCAGCGTGGAGG
AGCTCAGCCGCGCCTACGAGTTGAACCTCTTCTCGCCGCGCGTGCCCCCCAAGCGCCAGCCCAATGGCACC
TGCGAGCCCAACCCGCGCCTCAACTTCTACCCGGTCTTCGCGGTGCCCGAGGCCCTGGCCACCTACCACATC
TTTTTCAAGAACCAAAAGATCCCCGTCTCCTGCCGCGCCAACCGCACCCGCGCCGACGCCCTTTTCAACCTG
GGTCCCGGCGCCCGCCTACCTGATATCGCCTCCTTGGAAGAGGTTCCCAAGATCTTCGAGGGTCTGGGCAG
CGACGAGACTCGGGCCGCGAACGCTCTGCAAGGAGAAGGAGGAGAGCATGAGCACCACAGCGCCCTGGTC
GAGTTGGAAGGCGACAACGCGCGGCTGGCGGTGCTCAAACGCACGGTCGAGCTGACCCATTTCGCCTACCC
GGCTCTGAACCTGCCCCCCAAAGTCATGAGCGCGGTCATGGACCAGGTGCTCATCAAGCGCGCGTCGCCCA
TCTCCGAGGACGAGGGCATGCAAGACTCCGAGGAGGGCAAGCCCGTGGTCAGCGACGAGCAGCTGGCCCG
GTGGCTGGGTCCTAATGCTAGTCCCCAGAGTTTGGAAGAGCGGCGCAAACTCATGATGGCCGTGGTCCTGG
TGACCGTGGAGCTGGAGTGCCTGCGCCGCTTCTTCGCCGACGCGGAGACCCTGCGCAAGGTCGAGGAGAAC
CTGCACTACCTCTTCAGGCACGGGTTCGTGCGCCAGGCCTGCAAGATCTCCAACGTGGAGCTGACCAACCT
GGTCTCCTACATGGGCATCTTGCACGAGAACCGCCTGGGGCAGAACGTGCTGCACACCACCCTGCGCGGGG
AGGCCCGGCGCGACTACATCCGCGACTGCGTCTACCTCTACCTCTGCCACACCTGGCAGACGGGCATGGGC

10 20 30 40 50

GTGTGGCAGCAGTGTCTGGAGGAGCAGAACCTGAAAGAGCTCTGCAAGCTCCTGCAGAAGAACCTCAAGG
GTCTGTGGACCGGGTTCGACGAGCGCACCACCGCCTCGGACCTGGCCGACCTCATTTTCCCCGAGCGCCTC
AGGCTGACGCTGCGCAACGGCCTGCCCGACTTTATGAGCCAAAGCATGTTGCAAAACTTTCGCTCTTTCATC
CTCGAACGCTCCGGAATCCTGCCCGCCACCTGCTCCGCGCTGCCCTCGGACTTCGTGCCGCTGACCTTCCGC
GAGTGCCCCCCGCCGCTGTGGAGCCACTGCTACCTGCTGCGCCTGGCCAACTACCTGGCCTACCACTCGGA
CGTGATCGAGGACGTCAGCGGCGAGGGCCTGCTCGAGTGCCACTGCCGCTGCAACCTCTGCACGCCGCACC
GCTCCCTGGCCTGCAACCCCCAGCTGCTGAGCGAGACCCAGATCATCGGCACCTTCGAGTTGCAAGGGCCC
AGCGAAGGCGAGGGTTCAGCCGCCAAGGGGGGTCTGAAACTCACCCCGGGGCTGTGGACCTCGGCCTACT
TGCGCAAGTTCGTGCCCGAGGACTACCATCCCTTCGAGATCAGGTTCTACGAGGACCAATCCCATCCGCCC
AAGGCCGAGCTGTCGGCCTGCGTCATCACCCAGGGGGCGATCCTGGCCCAATTGCAAGCCATCCAGAAATC
CCGCCAAGAATTCTTGCTGAAAAAGGGCCGCGGGGTCTACCTCGACCCCCAGACCGGTGAGGAGCTCAACC
CCGGCTTCCCCCAGGATGCCCCGAGGAAACAAGAAGCTGAAAGTGGAGCTGCCGCCCGTGGAGGATTTGG
AGGAAGACTGGGAGAACAGCAGTCAGGCAGAGGAGGAGGAGATGGAGGAAGACTGGGACAGCACTCAGG
CAGAGGAGGACAGCCTGCAAGACAGTCTGGAGGAAGACGAGGAGGAGGCAGAGGAGGAGGTGGAAGAAG
CAGCCGCCGCCAGACCGTCGTCCTCGGCGGGGGAGAAAGCAAGCAGCACGGATACCATCTCCGCTCCGGG
TCGGGGTCCCGCTCGACCACACAGTAGATGGGACGAGACCGGACGATTCCCGAACCCCACCACCCAGACC
GGTAAGAAGGAGCGGCAGGGATACAAGTCCTGGCGGGGGCACAAAAACGCCATCGTCTCCTGCTTGCAGG
CCTGCGGGGGCAACATCTCCTTCACCCGGCGCTACCTGCTCTTCCACCGCGGGGTGAACTTTCCCCGCAACA
TCTTGCATTACTACCGTCACCTCCACAGCCCCTACTACTTCCAAGAAGAGGCAGCAGCAGCAGAAAAAGAC
CAGCAGAAAACCAGCAGCTAGAAAATCCACAGCGGCGGCAGCAGGTGGACTGAGGATCGCGGCGAACGA
GCCGGCGCAAACCCGGGAGCTGAGGAACCGGATCTTTCCCACCCTCTATGCCATCTTCCAGCAGAGTCGGG
GGCAGGAGCAGGAACTGAAAGTCAAGAACCGTTCTCTGCGCTCGCTCACCCGCAGTTGTCTGTATCACAAG
AGCGAAGACCAACTTCAGCGCACTCTCGAGGACGCCGAGGCTCTCTTCAACAAGTACTGCGCGCTCACTCT
TAAAGAGTAGCCCGCGCCCGCCCAGTCGCAGAAAAAGGCGGGAATTACGTCACCTGTGCCCTTCGCCCTAG
CCGCCTCCACCCATCATCATGAGCAAAGAGATTCCCACGCCTTACATGTGGAGCTACCAGCCCCAGATGGG
CCTGGCCGCCGGTGCCGCCCAGGACTACTCCACCCGCATGAATTGGCTCAGCGCCGGGCCCGCGATGATCT
CACGGGTGAATGACATCCGCGCCCACCGAAACCAGATACTCCTAGAACAGTCAGCGCTCACCGCCACGCCC
CGCAATCACCTCAATCCGCGTAATTGGCCCGCCGCCCTGGTGTACCAGGAAATTCCCCAGCCCACGACCGT
ACTACTTCCGCGAGACGCCCAGGCCGAAGTCCAGCTGACTAACTCAGGTGTCCAGCTGGCGGGCGGCGCCA
CCCTGTGTCGTCACCGCCCCGCTCAGGGTATAAAGCGGCTGGTGATCCGGGGCAGAGGCACACAGCTCAAC
GACGAGGTGGTGAGCTCTTCGCTGGGTCTGCGACCTGACGGAGTCTTCCAACTCGCCGGATCGGGGAGATC
TTCCTTCACGCCTCGTCAGGCCGTCCTGACTTTGGAGAGTTCGTCCTCGCAGCCCCGCTCGGGTGGCATCGG
CACTCTCCAGTTCGTGGAGGAGTTCACTCCCTCGGTCTACTTCAACCCCTTCTCCGGCTCCCCCGGCCACTA
CCCGGACGAGTTCATCCCGAACTTCGACGCCATCAGCGAGTCGGTGGACGGCTACGATTGAAACTAATCAC
CCCCTTATCCAGTGAAATAAAGATCATATTGATGATGATTTTACAGAAATAAAAAATAATCATTTGATTTGA
AATAAAGATACAATCATATTGATGATTTGAGTTTAACAAAAAAATAAAGAATCACTTACTTGAAATCTGAT
ACCAGGTCTCTGTCCATGTTTTCTGCCAACACCACTTCACTCCCCTCTTCCCAGCTCTGGTACTGCAGGCCCC
GGCGGGCTGCAAACTTCCTCCACACGCTGAAGGGGATGTCAAATTCCTCCTGTCCCTCAATCTTCATTTTAT
CTTCTATCAGATGTCCAAAAAGCGCGTCCGGGTGGATGATGACTTCGACCCCGTCTACCCCTACGATGCAG
ACAACGCACCGACCGTGCCCTTCATCAACCCCCCCTTCGTCTCTTCAGATGGATTCCAAGAGAAGCCCCTGG
GGGTGTTGTCCCTGCGACTGGCCGACCCCGTCACCACCAAGAACGGGGAAATCACCCTCAAGCTGGGAGA
GGGGGTGGACCTCGATTCCTCGGGAAAACTCATCTCCAACACGGCCACCAAGGCCGCCGCCCCTCTCAGTT
TTTCCAACAACACCATTTCCCTTAACATGGATCACCCCTTTTACACTAAAGATGGAAAATTATCCTTACAAG
TTTCTCCACCATTAAATATACTGAGAACAAGCATTCTAAACACACTAGCTTTAGGTTTTGGATCAGGTTTAG
GACTCCGTGGCTCTGCCTTGGCAGTACAGTTAGTCTCTCCACTTACATTTGATACTGATGGAAACATAAAGC
TTACCTTAGACAGAGGTTTGCATGTTACAACAGGAGATGCAATTGAAAGCAACATAAGCTGGGCTAAAGGT
TTAAAATTTGAAGATGGAGCCATAGCAACCAACATTGGAAATGGGTTAGAGTTTGGAAGCAGTAGTACAG
AAACAGGTGTTGATGATGCTTACCCAATCCAAGTTAAACTTGGATCTGGCCTTAGCTTTGACAGTACAGGA
GCCATAATGGCTGGTAACAAAGAAGACGATAAACTCACTTTGTGGACAACACCTGATCCATCACCAAACTG
TCAAATACTCGCAGAAAATGATGCAAAACTAACACTTTGCTTGACTAAATGTGGTAGTCAAATACTGGCCA
CTGTGTCAGTCTTAGTTGTAGGAAGTGGAAACCTAAACCCCATTACTGGCACCGTAAGCAGTGCTCAGGTG
TTTCTACGTTTTGATGCAAACGGTGTTCTTTTAACAGAACATTCTACACTAAAAAAATACTGGGGGTATAGG
CAGGGAGATAGCATAGATGGCACTCCATATACCAATGCTGTAGGATTCATGCCCAATTTAAAAGCTTATCC
AAAGTCACAAAGTTCTACTACTAAAAATAATATAGTAGGGCAAGTATACATGAATGGAGATGTTTCAAAAC
CTATGCTTCTCACTATAACCCTCAATGGTACTGATGACAGCAACAGTACATATTCAATGTCATTTTCATACA
CCTGGACTAATGGAAGCTATGTTGGAGCAACATTTGGGGCTAACTCTTATACCTTCTCATACATCGCCCAAG
AATGAACACTGTATCCCACCCTGCATGCCAACCCTTCCCACCCCACTCTGTGGAACAAACTCTGAAACACA
AAATAAAATAAAGTTCAAGTGTTTTATTGATTCAACAGTTTTACAGGATTCGAGCAGTTATTTTTCCTCCAC
CCTCCCAGGACATGGAATACACCACCCTCTCCCCCCGCACAGCCTTGAACATCTGAATGCCATTGGTGATG
GACATGCTTTTGGTCTCCACGTTCCACACAGTTTCAGAGCGAGCCAGTCTCGGGTCGGTCAGGGAGATGAA
ACCCTCCGGGCACTCCCGCATCTGCACCTCACAGCTCAACAGCTGAGGATTGTCCTCGGTGGTCGGGATCA
CGGTTATCTGGAAGAAGCAGAAGAGCGGCGGTGGGAATCATAGTCCGCGAACGGGATCGGCCGGTGGTGT
CGCATCAGGCCCCGCAGCAGTCGCTGCCGCCGCCGCTCCGTCAAGCTGCTGCTCAGGGGGTCCGGGTCCAG
GGACTCCCTCAGCATGATGCCCACGGCCCTCAGCATCAGTCGTCTGGTGCGGCGGGCGCAGCAGCGCATGC
GGATCTCGCTCAGGTCGCTGCAGTACGTGCAACACAGAACCACCAGGTTGTTCAACAGTCCATAGTTCAAC
ACGCTCCAGCCGAAACTCATCGCGGGAAGGATGCTACCCACGTGGCCGTCGTACCAGATCCTCAGGTAAAT
CAAGTGGTGCCCCCTCCAGAACACGCTGCCCACGTACATGATCTCCTTGGGCATGTGGCGGTTCACCACCTC

CCGGTACCACATCACCCTCTGGTTGAACATGCAGCCCCGGATGATCCTGCGGAACCACAGGGCCAGCACCG
CCCCGCCCGCCATGCAGCGAAGAGACCCCGGGTCCCGGCAATGGCAATGGAGGACCCACCGCTCGTACCC
GTGGATCATCTGGGAGCTGAACAAGTCTATGTTGGCACAGCACAGGCATATGCTCATGCATCTCTTCAGCA
CTCTCAACTCCTCGGGGGTCAAAACCATATCCCAGGGCACGGGGAACTCTTGCAGGACAGCGAACCCCGCA
GAACAGGGCAATCCTCGCACAGAACTTACATTGTGCATGGACAGGGTATCGCAATCAGGCAGCACCGGGT
GATCCTCCACCAGAGAAGCGCGGGTCTCGGTCTCCTCACAGCGTGGTAAGGGGGCCGGCCGATACGGGTG
ATGGCGGGACGCGGCTGATCGTGTTCGCGACCGTGTCATGATGCAGTTGCTTTCGGACATTTTCGTACTTGC
TGTAGCAGAACCTGGTCCGGGCGCTGCACACCGATCGCCGGCGGCGGTCTCGGCGCTTGGAACGCTCGGTG
TTGAAATTGTAAAACAGCCACTCTCTCAGACCGTGCAGCAGATCTAGGGCCTCAGGAGTGATGAAGATCCC
ATCATGCCTGATGGCTCTGATCACATCGACCACCGTGGAATGGGCCAGACCCAGCCAGATGATGCAATTTT
GTTGGGTTTCGGTGACGGCGGGGGAGGGAAGAACAGGAAGAACCATGATTAACTTTTAATCCAAACGGTCT
CGGAGTACTTCAAAATGAAGATCGCGGAGATGGCACCTCTCGCCCCCGCTGTGTTGGTGGAAAATAACAGC
CAGGTCAAAGGTGATACGGTTCTCGAGATGTTCCACGGTGGCTTCCAGCAAAGCCTCCACGCGCACATCCA
GAAACAAGACAATAGCGAAAGCGGGAGGGTTCTCTAATTCCTCAATCATCATGTTACACTCCTGCACCATC
CCCAGATAATTTTCATTTTTCCAGCCTTGAATGATTCGAACTAGTTCCTGAGGTAAATCCAAGCCAGCCATG
ATAAAGAGCTCGCGCAGAGCGCCCTCCACCGGCATTCTTAAGCACACCCTCATAATTCCAAGATATTCTGC
TCCTGGTTCACCTGCAGCAGATTGACAAGCGGAATATCAAAATCTCTGCCGCGATCCCTGAGCTCCTCCCTC
AGCAATAACTGTAAGTACTCTTTCATATCCTCTCCGAAATTTTTAGCCATAGGACCACCAGGAATAAGATTA
GGGCAAGCCACAGTACAGATAAACCGAAGTCCTCCCCAGTGAGCATTGCCAAATGCAAGACTGCTATAAG
CATGCTGGCTAGACCCGGTGATATCTTCCAGATAACTGGACAGAAAATCGCCCAGGCAATTTTTAAGAAAA
TCAACAAAAGAAAAATCCTCCAGGTGGACGTTTAGAGCCTCGGGAACAACGATGAAGTAAATGCAAGCGG
TGCGTTCCAGCATGGTTAGTTAGCTGATCTGTAGAAAAAACAAAAATGAACATTAAACCATGCTAGCCTGG
CGAACAGGTGGGTAAATCGTTCTCTCCAGCACCAGGCAGGCCACGGGGTCTCCGGCGCGACCCTCGTAAAA
ATTGTCGCTATGATTGAAAACCATCACAGAGAGACGTTCCCGGTGGCCGGCGTGAATGATTCGACAAGATG
AATACACCCCCGGAACATTGGCGTCCGCGAGTGAAAAAAAGCGCCCGAGGAAGCAATAAGGCACTACAAT
GCTCAGTCTCAAGTCCAGCAAAGCGATGCCATGCGGATGAAGCACAAAATTCTCAGGTGCGTACAAAATGT
AATTACTCCCCTCCTGCACAGGCAGCAAAGCCCCCGATCCCTCCAGGTACACATACAAAGCCTCAGCGTCC
ATAGCTTACCGAGCAGCAGCACACAACAGGCGCAAGAGTCAGAGAAAGGCTGAGCTCTAACCTGTCCACC
CGCTCTCTGCTCAATATATAGCCCAGATCTACACTGACGTAAAGGCCAAAGTCTAAAAATACCCGCCAAAT
AATCACACACGCCCAGCACACGCCCAGAAACCGGTGACACACTCAAAAAAATACGCGCACTTCCTCAAAC
GCCCAAAACTGCCGTCATTTCCGGGTTCCCACGCTACGTCATCAAAACACGACTTTCAAATTCCGTCGACCG
TTAAAAACGTCACCCGCCCCGCCCCTAACGGTCGCCCGTCTCTCAGCCAATCAGCGCCCCGCATCCCCAAA
TTCAAACACCTCATTTGCATATTAACGCGCACAAAAAGTTTGAGGTATATTATTGATGATG

ChAdV68-E4d-CMT-TSNA (配列番号69)

CATCATCAATAATATACCTCAAACTTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTGAATTTGGGGAGGA
AGGGCGGTGATTGGTCGAGGGATGAGCGACCGTTAGGGGCGGGGCGAGTGACGTTTTGATGACGTGGTTG
CGAGGAGGAGCCAGTTTGCAAGTTCTCGTGGGAAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTTGAACACGGAA
ATACTCAATTTTCCCGCGCTCTCTGACAGGAAATGAGGTGTTTCTGGGCGGATGCAAGTGAAAACGGGCCA
TTTTCGCGCGAAAACTGAATGAGGAAGTGAAAATCTGAGTAATTTCGCGTTTATGGCAGGGAGGAGTATTT
GCCGAGGGCCGAGTAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTACCGTGTTTTTCACCTAAATTTCCGC
GTACGGTGTCAAAGTCCGGTGTTTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGCCAGGGTATTTAAACCTGCGCTCTCC
AGTCAAGAGGCCACTCTTGAGTGCCAGCGAGAAGAGTTTTCTCCTCCGCGCCGCGAGTCAGATCTACACTT
TGAAAGTAGGGATAACAGGGTAATGACATTGATTATTGACTAGTTGTTAATAGTAATCAATTACGGGGTCA
TTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCC
AACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTG
ACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTC
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGAC
TTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACC
AATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTT
GTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCG
GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGATCTCCCTATCAGT
GATAGAGATCGTCGACGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAACGCCATCCACGCTGTTTTGAC
CTCCATAGAAGACAGCGATCGCGCCACCATGGCTGGCATGACCGAGTACAAGCTAGTCGTTGTGGGAGCTG
GAGATGTGGGCAAATCTGCTCTGACCATTCAGCTGATTCAGGGCACAGATCTGGATCACCAGGAGAAGTGT
CTGAGCAGGCTGTACGACCACATGCCAGAAGGATTAACCCCTCTTATGGGAGTGAGCTCTTCTTCTGCTCTG
GCCAGACTGGGACTGCCTATGGATAAGCTGAACAAGATCACAGCTCCTGCCTCTCAGAAACTGAGACAGCT
GCAGAAGATGGAGACCCCTGAACTGCTGCCTTGTGGATATCTGGTGGAGGAGAATACCACAATCAGCGTGA
CCGTGAAAGGCCTGGAAGCCCAGAACAAGATCAAAGGCTGTACCGGCTCTGTGAATATGACACTGCAGAG
AGCTTCTGCCGCCCCTAAGACAGGAGGAGGAGGAGAAGCTGCTGCCTACAATAATACATTAGTGGCCAGA
CATGTGCCCCAGATCCCTAAGCCTGACAGCCTGGTTGGCCTGAGCGATGAATTAGGAAAAAGAGACACATT
TGCCGAGAGCCTGATCCGGAGAATGGCCTCTGCCGGCTACCTGTTCCTGGATATCATCACATATGTTGTGTT
TGCCGTGACCTTCGTGCTGGGAGTTCTGGGCGGCCTGAATACCGAGACCAATGAAAAAGCTCTTGAAGCCG
TGTTTGGCAAGTACGGCAGAATCGTGGAGGTGCTGGGCGGCAGATCTTGTGAAGAATTAACAGCTGTGTTA
CCACCTCCTCAGCTGCTTGGCAGACGGTTCAACTTCTTCAGCTACAGCTACGTTGCTGCTGGCTCTTCTGGC
AACAACTACGACCTGATGGCCCAGCCTATTACACCTGGACCTGATACAACACCTCTGCCTGTGACCGATAC
ATCTTCTGTGTCTACCGGACACGCCACATCTCTGCCAGTGACAGATGCTGGACTGAGAGTGACAGAGTCTA
AAGGACACAGCGATTCTTGGCACCTGAGCCTGGATACAGCCATCAGGGTGAATACCCCTAAGCTGGTTTCT

GAAGTGGAAGAGCTGAACAAGAGCATCACCGCCCTGAGGGAGAAGTTACTGCAGATGGTGGAAGCCGATA
GACCTGGAAACCTGTTTATTGGAGGCCTGAACACCGAGACCAATGAGGACTCTCCCGTGAAGGATGAAGTG
GTGGTGAACGATCAATGGGGCCAGAATTGTAGCTGCCATCATGGAGGCTACGAGTTCCCTGATCTGCACAG
GACAATCGTGTCTGAGTGCGATGTGTATCTGACCTACATGCTGAGACAGGCTGCTCTGCAGCTGTTCTTCGA
CCTGTATCACAGCATCCCTAGCAGCTTTTCTCCTCTGGTTCTGAGCTGTCTGGTGCAGCCTCTGGAAGATGT
GGAAGTGATGGAGAAGGATGGCACAACCTTTAGCTGTGAGGTGAGCCACGATGAGGTGCCTCGGACATAT
GGACCCGTGTTTATGTGTCTGGGAGGACTGCTGACCATGGTGGCTGGAGCTGTTTGGCTGACAGTTGGACC
CGGACCAGGCGCCAAATTTGTTGCTGCTTGGACACTGAAAGCTGCTGCTGGGCCCGGACCAGGCCAGTACA
TCAAGGCCAACTCTAAGTTTATCGGCATCACCGAATTGGGACCTGGACCCGGCTAGTAGTGAGTTTAAACT
CCCATTTAAATGTGAGGGTTAATGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCAC
AACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTAT
AAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGATGTGGG
AGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAGTG
AGTAGTGTTCTGGGGCGGGGGAGGACCTGCATGAGGGCCAGAATAACTGAAATCTGTGCTTTTCTGTGTGT
TGCAGCAGCATGAGCGGAAGCGGCTCCTTTGAGGGAGGGGTATTCAGCCCTTATCTGACGGGGCGTCTCCC
CTCCTGGGCGGGAGTGCGTCAGAATGTGATGGGATCCACGGTGGACGGCCGGCCCGTGCAGCCCGCGAAC
TCTTCAACCCTGACCTATGCAACCCTGAGCTCTTCGTCGTTGGACGCAGCTGCCGCCGCAGCTGCTGCATCT
GCCGCCAGCGCCGTGCGCGGAATGGCCATGGGCGCCGGCTACTACGGCACTCTGGTGGCCAACTCGAGTTC
CACCAATAATCCCGCCAGCCTGAACGAGGAGAAGCTGTTGCTGCTGATGGCCCAGCTCGAGGCCTTGACCC
AGCGCCTGGGCGAGCTGACCCAGCAGGTGGCTCAGCTGCAGGAGCAGACGCGGGCCGCGGTTGCCACGGT
GAAATCCAAATAAAAAATGAATCAATAAATAAACGGAGACGGTTGTTGATTTTAACACAGAGTCTGAATCT
TTATTTGATTTTTCGCGCGCGGTAGGCCCTGGACCACCGGTCTCGATCATTGAGCACCCGGTGGATCTTTTC
CAGGACCCGGTAGAGGTGGGCTTGGATGTTGAGGTACATGGGCATGAGCCCGTCCCGGGGGTGGAGGTAG
CTCCATTGCAGGGCCTCGTGCTCGGGGGGTGGTGTTGTAAATCACCCAGTCATAGCAGGGGCGCAGGGCATG
GTGTTGCACAATATCTTTGAGGAGGAGACTGATGGCCACGGGCAGCCCTTTGGTGTAGGTGTTTACAAATC
TGTTGAGCTGGGAGGGATGCATGCGGGGGGAGATGAGGTGCATCTTGGCCTGGATCTTGAGATTGGCGATG
TTACCGCCCAGATCCCGCCTGGGGTTCATGTTGTGCAGGACCACCAGCACGGTGTATCCGGTGCACTTGGG
GAATTTATCATGCAACTTGGAAGGGAAGGCGTGAAAGAATTTGGCGACGCCTTTGTGCCCGCCCAGGTTTT
CCATGCACTCATCCATGATGATGGCGATGGGCCCGTGGGCGGCGGCCTGGGCAAAGACGTTTCGGGGGTCG
GACACATCATAGTTGTGGTCCTGGGTGAGGTCATCATAGGCCATTTTAATGAATTTGGGGCGGAGGGTGCC
GGACTGGGGGACAAAGGTTCCCTCGATCCCGGGGGCGTAGTTCCCCTCACAGATCTGCATCTCCCAGGCTT
TGAGCTCGGAGGGGGGGATCATGTCCACCTGCGGGGCGATAAAGAACACGGTTTCCGGGGCGGGGGAGAT
GAGCTGGGCCGAAAGCAAGTTCCGGAGCAGCTGGGACTTGCCGCAGCCGGTGGGGCCGTAGATGACCCCG
ATGACCGGCTGCAGGTGGTAGTTGAGGGAGAGACAGCTGCCGTCCTCCCGGAGGAGGGGGGCCACCTCGT
TCATCATCTCGCGCACGTGCATGTTCTCGCGCACCAGTTCCGCCAGGAGGCGCTCTCCCCCCAGGGATAGG
AGCTCCTGGAGCGAGGCGAAGTTTTTCAGCGGCTTGAGTCCGTCGGCCATGGGCATTTTGGAGAGGGTTTG
TTGCAAGAGTTCCAGGCGGTCCCAGAGCTCGGTGATGTGCTCTACGGCATCTCGATCCAGCAGACCTCCTC
GTTTCGCGGGTTGGGACGGCTGCGGGAGTAGGGCACCAGACGATGGGCGTCCAGCGCAGCCAGGGTCCGG
TCCTTCCAGGGTCGCAGCGTCCGCGTCAGGGTGGTCTCCGTCACGGTGAAGGGGTGCGCGCCGGGCTGGGC
GCTTGCGAGGGTGCGCTTCAGGCTCATCCGGCTGGTCGAAAACCGCTCCCGATCGGCGCCCTGCGCGTCGG
CCAGGTAGCAATTGACCATGAGTTCGTAGTTGAGCGCCTCGGCCGCGTGGCCTTTGGCGCGGAGCTTACCTT
TGGAAGTCTGCCCGCAGGCGGGACAGAGGAGGGACTTGAGGGCGTAGAGCTTGGGGGCGAGGAAGACGG
ACTCGGGGGCGTAGGCGTCCGCGCCGCAGTGGGCGCAGACGGTCTCGCACTCCACGAGCCAGGTGAGGTC
GGGCTGGTCGGGGTCAAAAACCAGTTTCCCGCCGTTCTTTTTGATGCGTTTCTTACCTTTGGTCTCCATGAGC
TCGTGTCCCCGCTGGGTGACAAAGAGGCTGTCCGTGTCCCCGTAGACCGACTTTATGGGCCGGTCCTCGAG
CGGTGTGCCGCGGTCCTCCTCGTAGAGGAACCCCGCCCACTCCGAGACGAAAGCCCGGGTCCAGGCCAGCA
CGAAGGAGGCCACGTGGGACGGGTAGCGGTCGTTGTCCACCAGCGGGTCCACCTTTTCCAGGGTATGCAAA
CACATGTCCCCCTCGTCCACATCCAGGAAGGTGATTGGCTTGTAAGTGTAGGCCACGTGACCGGGGGTCCC
GGCCGGGGGGGTATAAAAGGGTGCGGGTCCCTGCTCGTCCTCACTGTCTTCCGGATCGCTGTCCAGGAGCG
CCAGCTGTTGGGGTAGGTATTCCCTCTCGAAGGCGGGCATGACCTCGGCACTCAGGTTGTCAGTTTCTAGAA
ACGAGGAGGATTTGATATTGACGGTGCCGGCGGAGATGCCTTTCAAGAGCCCCTCGTCCATCTGGTCAGAA
AAGACGATCTTTTTGTTGTCGAGCTTGGTGGCGAAGGAGCCGTAGAGGGCGTTGGAGAGGAGCTTGGCGAT
GGAGCGCATGGTCTGGTTTTTTTCCTTGTCGGCGCGCTCCTTGGCGGCGATGTTGAGCTGCACGTACTCGCG
CGCCACGCACTTCCATTCGGGGAAGACGGTGGTCAGCTCGTCGGGCACGATTCTGACCTGCCAGCCCCGAT
TATGCAGGGTGATGAGGTCCACACTGGTGGCCACCTCGCCGCGCAGGGGCTCATTAGTCCAGCAGAGGCGT
CCGCCCTTGCGCGAGCAGAAGGGGGGCAGGGGGTCCAGCATGACCTCGTCGGGGGGGTCGGCATCGATGG
TGAAGATGCCGGGCAGGAGGTCGGGGTCAAAGTAGCTGATGGAAGTGGCCAGATCGTCCAGGGCAGCTTG
CCATTCGCGCACGGCCAGCGCGCGCTCGTAGGGACTGAGGGGCGTGCCCCAGGGCATGGGATGGGTAAGC
GCGGAGGCGTACATGCCGCAGATGTCGTAGACGTAGAGGGGCTCCTCGAGGATGCCGATGTAGGTGGGGT
AGCAGCGCCCCCCGCGGATGCTGGCGCGCACGTAGTCATACAGCTCGTGCGAGGGGGCGAGGAGCCCCGG
GCCCAGGTTGGTGCGACTGGGCTTTTCGGCGCGGTAGACGATCTGGCGGAAAATGGCATGCGAGTTGGAGG
AGATGGTGGGCCTTTGGAAGATGTTGAAGTGGGCGTGGGGCAGTCCGACCGAGTCGCGGATGAAGTGGGC
GTAGGAGTCTTGCAGCTTGGCGACGAGCTCGGCGGTGACTAGGACGTCCAGAGCGCAGTAGTCGAGGGTCT
CCTGGATGATGTCATACTTGAGCTGTCCCTTTTGTTTCCACAGCTCGCGGTTGAGAAGGAACTCTTCGCGGT
CCTTCCAGTACTCTTCGAGGGGGAACCCGTCCTGATCTGCACGGTAAGAGCCTAGCATGTAGAACTGGTTG
ACGGCCTTGTAGGCGCAGCAGCCCTTCTCCACGGGGAGGGCGTAGGCCTGGGCGGCCTTGCGCAGGGAGG
TGTGCGTGAGGGCGAAAGTGTCCCTGACCATGACCTTGAGGAACTGGTGCTTGAAGTCGATATCGTCGCAG

CCCCCCTGCTCCCAGAGCTGGAAGTCCGTGCGCTTCTTGTAGGCGGGGTTGGGCAAAGCGAAAGTAACATC
GTTGAAGAGGATCTTGCCCGCGCGGGGCATAAAGTTGCGAGTGATGCGGAAAGGTTGGGGCACCTCGGCC
CGGTTGTTGATGACCTGGGCGGCGAGCACGATCTCGTCGAAGCCGTTGATGTTGTGGCCCACGATGTAGAG
TTCCACGAATCGCGGACGGCCCTTGACGTGGGGCAGTTTCTTGAGCTCCTCGTAGGTGAGCTCGTCGGGGTC
GCTGAGCCCGTGCTGCTCGAGCGCCCAGTCGGCGAGATGGGGGTTGGCGCGGAGGAAGGAAGTCCAGAGA
TCCACGGCCAGGGCGGTTTGCAGACGGTCCCGGTACTGACGGAACTGCTGCCCGACGGCCATTTTTTCGGG
GGTGACGCAGTAGAAGGTGCGGGGGTCCCCGTGCCAGCGATCCCATTTGAGCTGGAGGGCGAGATCGAGG
GCGAGCTCGACGAGCCGGTCGTCCCCGGAGAGTTTCATGACCAGCATGAAGGGGACGAGCTGCTTGCCGA
AGGACCCCATCCAGGTGTAGGTTTCCACATCGTAGGTGAGGAAGAGCCTTTCGGTGCGAGGATGCGAGCCG
ATGGGGAAGAACTGGATCTCCTGCCACCAATTGGAGGAATGGCTGTTGATGTGATGGAAGTAGAAATGCCG
ACGGCGCGCCGAACACTCGTGCTTGTGTTTATACAAGCGGCCACAGTGCTCGCAACGCTGCACGGGATGCA
CGTGCTGCACGAGCTGTACCTGAGTTCCTTTGACGAGGAATTTCAGTGGGAAGTGGAGTCGTGGCGCCTGC
ATCTCGTGCTGTACTACGTCGTGGTGGTCGGCCTGGCCCTCTTCTGCCTCGATGGTGGTCATGCTGACGAGC
CCGCGCGGGAGGCAGGTCCAGACCTCGGCGCGAGCGGGTCGGAGAGCGAGGACGAGGGCGCGCAGGCCG
GAGCTGTCCAGGGTCCTGAGACGCTGCGGAGTCAGGTCAGTGGGCAGCGGCGGCGCGCGGTTGACTTGCA
GGAGTTTTTCCAGGGCGCGCGGGAGGTCCAGATGGTACTTGATCTCCACCGCGCCATTGGTGGCGACGTCG
ATGGCTTGCAGGGTCCCGTGCCCCTGGGGTGTGACCACCGTCCCCCGTTTCTTCTTGGGCGGCTGGGGCGAC
GGGGGCGGTGCCTCTTCCATGGTTAGAAGCGGCGGCGAGGACGCGCGCCGGGCGGCAGGGGCGGCTCGGG
GCCCGGAGGCAGGGGCGGCAGGGGCACGTCGGCGCCGCGCGCGGGTAGGTTCTGGTACTGCGCCCGGAGA
AGACTGGCGTGAGCGACGACGCGACGGTTGACGTCCTGGATCTGACGCCTCTGGGTGAAGGCCACGGGAC
CCGTGAGTTTGAACCTGAAAGAGAGTTCGACAGAATCAATCTCGGTATCGTTGACGGCGGCCTGCCGCAGG
ATCTCTTGCACGTCGCCCGAGTTGTCCTGGTAGGCGATCTCGGTCATGAACTGCTCGATCTCCTCCTCTTGA
AGGTCTCCGCGGCCGGCGCGCTCCACGGTGGCCGCGAGGTCGTTGGAGATGCGGCCCATGAGCTGCGAGA
AGGCGTTCATGCCCGCCTCGTTCCAGACGCGGCTGTAGACCACGACGCCCTCGGGATCGCGGGCGCGCATG
ACCACCTGGGCGAGGTTGAGCTCCACGTGGCGCGTGAAGACCGCGTAGTTGCAGAGGCGCTGGTAGAGGT
AGTTGAGCGTGGTGGCGATGTGCTCGGTGACGAAGAAATACATGATCCAGCGGCGGAGCGGCATCTCGCTG
ACGTCGCCCAGCGCCTCCAAACGTTCCATGGCCTCGTAAAAGTCCACGGCGAAGTTGAAAAACTGGGAGTT
GCGCGCCGAGACGGTCAACTCCTCCTCCAGAAGACGGATGAGCTCGGCGATGGTGGCGCGCACCTCGCGCT
CGAAGGCCCCCGGGAGTTCCTCCACTTCCTCTTCTTCCTCCTCCACTAACATCTCTTCTACTTCCTCCTCAGG
CGGCAGTGGTGGCGGGGGAGGGGGCCTGCGTCGCCGGCGGCGCACGGGCAGACGGTCGATGAAGCGCTCG
ATGGTCTCGCCGCGCCGGCGTCGCATGGTCTCGGTGACGGCGCGCCCGTCCTCGCGGGGCCGCAGCGTGAA
GACGCCGCCGCGCATCTCCAGGTGGCCGGGGGGGTCCCCGTTGGGCAGGGAGAGGGCGCTGACGATGCAT
CTTATCAATTGCCCCGTAGGGACTCCGCGCAAGGACCTGAGCGTCTCGAGATCCACGGGATCTGAAAACCG
CTGAACGAAGGCTTCGAGCCAGTCGCAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACGGTTTCTTCTGGCGGGTCATGTT
GGTTGGGAGCGGGGCGGGCGATGCTGCTGGTGATGAAGTTGAAATAGGCGGTTCTGAGACGGCGGATGGT
GGCGAGGAGCACCAGGTCTTTGGGCCCGGCTTGCTGGATGCGCAGACGGTCGGCCATGCCCCAGGCGTGGT
CCTGACACCTGGCCAGGTCCTTGTAGTAGTCCTGCATGAGCCGCTCCACGGGCACCTCCTCCTCGCCCGCGC
GGCCGTGCATGCGCGTGAGCCCGAAGCCGCGCTGGGGCTGGACGAGCGCCAGGTCGGCGACGACGCGCTC
GGCGAGGATGGCTTGCTGGATCTGGGTGAGGGTGGTCTGGAAGTCATCAAAGTCGACGAAGCGGTGGTAG
GCTCCGGTGTTGATGGTGTAGGAGCAGTTGGCCATGACGGACCAGTTGACGGTCTGGTGGCCCGGACGCAC
GAGCTCGTGGTACTTGAGGCGCGAGTAGGCGCGCGTGTCGAAGATGTAGTCGTTGCAGGTGCGCACCAGGT
ACTGGTAGCCGATGAGGAAGTGCGGCGGCGGCTGGCGGTAGAGCGGCCATCGCTCGGTGGCGGGGGCGCC
GGGCGCGAGGTCCTCGAGCATGGTGCGGTGGTAGCCGTAGATGTACCTGGACATCCAGGTGATGCCGGCGG
CGGTGGTGGAGGCGCGCGGGAACTCGCGGACGCGGTTCCAGATGTTGCGCAGCGGCAGGAAGTAGTTCAT
GGTGGGCACGGTCTGGCCCGTGAGGCGCGCGCAGTCGTGGATGCTCTATACGGGCAAAAACGAAAGCGGT
CAGCGGCTCGACTCCGTGGCCTGGAGGCTAAGCGAACGGGTTGGGCTGCGCGTGTACCCCGGTTCGAATCT
CGAATCAGGCTGGAGCCGCAGCTAACGTGGTATTGGCACTCCCGTCTCGACCCAAGCCTGCACCAACCCTC
CAGGATACGGAGGCGGGTCGTTTTGCAACTTTTTTTTGGAGGCCGGATGAGACTAGTAAGCGCGGAAAGCG
GCCGACCGCGATGGCTCGCTGCCGTAGTCTGGAGAAGAATCGCCAGGGTTGCGTTGCGGTGTGCCCCGGTT
CGAGGCCGGCCGGATTCCGCGGCTAACGAGGGCGTGGCTGCCCCGTCGTTTCCAAGACCCCATAGCCAGCC
GACTTCTCCAGTTACGGAGCGAGCCCCTCTTTTGTTTTGTTTGTTTTTGCCAGATGCATCCCGTACTGCGGCA
GATGCGCCCCCACCACCCTCCACCGCAACAACAGCCCCCTCCACAGCCGGCGCTTCTGCCCCCGCCCCAGC
AGCAACTTCCAGCCACGACCGCCGCGGCCGCCGTGAGCGGGGCTGGACAGAGTTATGATCACCAGCTGGC
CTTGGAAGAGGGCGAGGGGCTGGCGCGCCTGGGGGCGTCGTCGCCGGAGCGGCACCCGCGCGTGCAGATG
AAAAGGGACGCTCGCGAGGCCTACGTGCCCAAGCAGAACCTGTTCAGAGACAGGAGCGGCGAGGAGCCCG
AGGAGATGCGCGCGGCCCGGTTCCACGCGGGGCGGGAGCTGCGGCGCGGCCTGGACCGAAAGAGGGTGCT
GAGGGACGAGGATTTCGAGGCGGACGAGCTGACGGGGATCAGCCCCGCGCGCGCGCACGTGGCCGCGGCC
AACCTGGTCACGGCGTACGAGCAGACCGTGAAGGAGGAGAGCAACTTCCAAAAATCCTTCAACAACCACG
TGCGCACCCTGATCGCGCGCGAGGAGGTGACCCTGGGCCTGATGCACCTGTGGGACCTGCTGGAGGCCATC
GTGCAGAACCCCACCAGCAAGCCGCTGACGGCGCAGCTGTTCCTGGTGGTGCAGCATAGTCGGGACAACG
AAGCGTTCAGGGAGGCGCTGCTGAATATCACCGAGCCCGAGGGCCGCTGGCTCCTGGACCTGGTGAACATT
CTGCAGAGCATCGTGGTGCAGGAGCGCGGGCTGCCGCTGTCCGAGAAGCTGGCGGCCATCAACTTCTCGGT
GCTGAGTTTGGGCAAGTACTACGCTAGGAAGATCTACAAGACCCCGTACGTGCCCATAGACAAGGAGGTG
AAGATCGACGGGTTTTACATGCGCATGACCCTGAAAGTGCTGACCCTGAGCGACGATCTGGGGGTGTACCG
CAACGACAGGATGCACCGTGCGGTGAGCGCCAGCAGGCGGCGCGAGCTGAGCGACCAGGAGCTGATGCAT
AGTCTGCAGCGGGCCCTGACCGGGGCCGGGACCGAGGGGGAGAGCTACTTTGACATGGGCGCGGACCTGC
ACTGGCAGCCCAGCCGCCGGGCCTTGGAGGCGGCGGCAGGACCCTACGTAGAAGAGGTGGACGATGAGGT

GGACGAGGAGGGCGAGTACCTGGAAGACTGATGGCGCGACCGTATTTTTGCTAGATGCAACAACAACAGC
CACCTCCTGATCCCGCGATGCGGGCGGCGCTGCAGAGCCAGCCGTCCGGCATTAACTCCTCGGACGATTGG
ACCCAGGCCATGCAACGCATCATGGCGCTGACGACCCGCAACCCCGAAGCCTTTAGACAGCAGCCCCAGG
CCAACCGGCTCTCGGCCATCCTGGAGGCCGTGGTGCCCTCGCGCTCCAACCCCACGCACGAGAAGGTCCTG
GCCATCGTGAACGCGCTGGTGGAGAACAAGGCCATCCGCGGCGACGAGGCCGGCCTGGTGTACAACGCGC
TGCTGGAGCGCGTGGCCCGCTACAACAGCACCAACGTGCAGACCAACCTGGACCGCATGGTGACCGACGT
GCGCGAGGCCGTGGCCCAGCGCGAGCGGTTCCACCGCGAGTCCAACCTGGGATCCATGGTGGCGCTGAAC
GCCTTCCTCAGCACCCAGCCCGCCAACGTGCCCCGGGGCCAGGAGGACTACACCAACTTCATCAGCGCCCT
GCGCCTGATGGTGACCGAGGTGCCCCAGAGCGAGGTGTACCAGTCCGGGCCGGACTACTTCTTCCAGACCA
GTCGCCAGGGCTTGCAGACCGTGAACCTGAGCCAGGCTTTCAAGAACTTGCAGGGCCTGTGGGGCGTGCAG
GCCCCGGTCGGGGACCGCGCGACGGTGTCGAGCCTGCTGACGCCGAACTCGCGCCTGCTGCTGCTGCTGGT
GGCCCCCTTCACGGACAGCGGCAGCATCAACCGCAACTCGTACCTGGGCTACCTGATTAACCTGTACCGCG
AGGCCATCGGCCAGGCGCACGTGGACGAGCAGACCTACCAGGAGATCACCCACGTGAGCCGCGCCCTGGG
CCAGGACGACCCGGGCAACCTGGAAGCCACCCTGAACTTTTTGCTGACCAACCGGTCGCAGAAGATCCCGC
CCCAGTACGCGCTCAGCACCGAGGAGGAGCGCATCCTGCGTTACGTGCAGCAGAGCGTGGGCCTGTTCCTG
ATGCAGGAGGGGGCCACCCCCAGCGCCGCGCTCGACATGACCGCGCGCAACATGGAGCCCAGCATGTACG
CCAGCAACCGCCCGTTCATCAATAAACTGATGGACTACTTGCATCGGGCGGCCGCCATGAACTCTGACTAT
TTCACCAACGCCATCCTGAATCCCCACTGGCTCCCGCCGCCGGGGTTCTACACGGGCGAGTACGACATGCC
CGACCCCAATGACGGGTTCCTGTGGGACGATGTGGACAGCAGCGTGTTCTCCCCCCGACCGGGTGCTAACG
AGCGCCCCTTGTGGAAGAAGGAAGGCAGCGACCGACGCCCGTCCTCGGCGCTGTCCGGCCGCGAGGGTGC
TGCCGCGGCGGTGCCCGAGGCCGCCAGTCCTTTCCCGAGCTTGCCCTTCTCGCTGAACAGTATCCGCAGCA
GCGAGCTGGGCAGGATCACGCGCCCGCGCTTGCTGGGCGAAGAGGAGTACTTGAATGACTCGCTGTTGAGA
CCCGAGCGGGAGAAGAACTTCCCCAATAACGGGATAGAAAGCCTGGTGGACAAGATGAGCCGCTGGAAGA
CGTATGCGCAGGAGCACAGGGACGATCCCCGGGCGTCGCAGGGGGCCACGAGCCGGGGCAGCGCCGCCCG
TAAACGCCGGTGGCACGACAGGCAGCGGGGACAGATGTGGGACGATGAGGACTCCGCCGACGACAGCAGC
GTGTTGGACTTGGGTGGGAGTGGTAACCCGTTCGCTCACCTGCGCCCCCGTATCGGGCGCATGATGTAAGA
GAAACCGAAAATAAATGATACTCACCAAGGCCATGGCGACCAGCGTGCGTTCGTTTCTTCTCTGTTGTTGTT
GTATCTAGTATGATGAGGCGTGCGTACCCGGAGGGTCCTCCTCCCTCGTACGAGAGCGTGATGCAGCAGGC
GATGGCGGCGGCGGCGATGCAGCCCCCGCTGGAGGCTCCTTACGTGCCCCCGCGGTACCTGGCGCCTACGG
AGGGGCGGAACAGCATTCGTTACTCGGAGCTGGCACCCTTGTACGATACCACCCGGTTGTACCTGGTGGAC
AACAAGTCGGCGGACATCGCCTCGCTGAACTACCAGAACGACCACAGCAACTTCCTGACCACCGTGGTGCA
GAACAATGACTTCACCCCCACGGAGGCCAGCACCCAGACCATCAACTTTGACGAGCGCTCGCGGTGGGGC
GGCCAGCTGAAAACCATCATGCACACCAACATGCCCAACGTGAACGAGTTCATGTACAGCAACAAGTTCA
AGGCGCGGGTGATGGTCTCCCGCAAGACCCCCAATGGGGTGACAGTGACAGAGGATTATGATGGTAGTCA
GGATGAGCTGAAGTATGAATGGGTGGAATTTGAGCTGCCCGAAGGCAACTTCTCGGTGACCATGACCATCG
ACCTGATGAACAACGCCATCATCGACAATTACTTGGCGGTGGGGCGGCAGAACGGGGTGCTGGAGAGCGA
CATCGGCGTGAAGTTCGACACTAGGAACTTCAGGCTGGGCTGGGACCCCGTGACCGAGCTGGTCATGCCCG
GGGTGTACACCAACGAGGCTTTCCATCCCGATATTGTCTTGCTGCCCGGCTGCGGGGTGGACTTCACCGAG
AGCCGCCTCAGCAACCTGCTGGGCATTCGCAAGAGGCAGCCCTTCCAGGAAGGCTTCCAGATCATGTACGA
GGATCTGGAGGGGGGCAACATCCCCGCGCTCCTGGATGTCGACGCCTATGAGAAAAGCAAGGAGGATGCA
GCAGCTGAAGCAACTGCAGCCGTAGCTACCGCCTCTACCGAGGTCAGGGGCGATAATTTTGCAAGCGCCGC
AGCAGTGGCAGCGGCCGAGGCGGCTGAAACCGAAAGTAAGATAGTCATTCAGCCGGTGGAGAAGGATAGC
AAGAACAGGAGCTACAACGTACTACCGGACAAGATAAACACCGCCTACCGCAGCTGGTACCTAGCCTACA
ACTATGGCGACCCCGAGAAGGGCGTGCGCTCCTGGACGCTGCTCACCACCTCGGACGTCACCTGCGGCGTG
GAGCAAGTCTACTGGTCGCTGCCCGACATGATGCAAGACCCGGTCACCTTCCGCTCCACGCGTCAAGTTAG
CAACTACCCGGTGGTGGGCGCCGAGCTCCTGCCCGTCTACTCCAAGAGCTTCTTCAACGAGCAGGCCGTCT
ACTCGCAGCAGCTGCGCGCCTTCACCTCGCTTACGCACGTCTTCAACCGCTTCCCCGAGAACCAGATCCTCG
TCCGCCCGCCCGCGCCCACCATTACCACCGTCAGTGAAAACGTTCCTGCTCTCACAGATCACGGGACCCTG
CCGCTGCGCAGCAGTATCCGGGGAGTCCAGCGCGTGACCGTTACTGACGCCAGACGCCGCACCTGCCCCTA
CGTCTACAAGGCCCTGGGCATAGTCGCGCCGCGCGTCCTCTCGAGCCGCACCTTCTAAATGTCCATTCTCAT
CTCGCCCAGTAATAACACCGGTTGGGGCCTGCGCGCGCCCAGCAAGATGTACGGAGGCGCTCGCCAACGCT
CCACGCAACACCCCGTGCGCGTGCGCGGGCACTTCCGCGCTCCCTGGGGCGCCCTCAAGGGCCGCGTGCGG
TCGCGCACCACCGTCGACGACGTGATCGACCAGGTGGTGGCCGACGCGCGCAACTACACCCCCGCCGCCGC
GCCCGTCTCCACCGTGGACGCCGTCATCGACAGCGTGGTGGCCGACGCGCGCCGGTACGCCCGCGCCAAGA
GCCGGCGGCGGCGCATCGCCCGGCGGCACCGGAGCACCCCCGCCATGCGCGCGGCGCGAGCCTTGCTGCG
CAGGGCCAGGCGCACGGGACGCAGGGCCATGCTCAGGGCGGCCAGACGCGCGGCTTCAGGCGCCAGCGCC
GGCAGGACCCGGAGACGCGCGGCCACGGCGGCGGCAGCGGCCATCGCCAGCATGTCCCGCCCGCGGCGAG
GGAACGTGTACTGGGTGCGCGACGCCGCCACCGGTGTGCCGCGTGCCCGTGCGCACCCGCCCCCCTCGCACT
TGAAGATGTTCACTTCGCGATGTTGATGTGTCCCAGCGGCGAGGAGGATGTCCAAGCGCAAATTCAAGGAA
GAGATGCTCCAGGTCATCGCGCCTGAGATCTACGGCCCTGCGGTGGTGAAGGAGGAAAGAAAGCCCCGCA
AAATCAAGCGGGTCAAAAAGGACAAAAAGGAAGAAGAAAGTGATGTGGACGGATTGGTGGAGTTTGTGCG
CGAGTTCGCCCCCCGGCGGCGCGTGCAGTGGCGCGGGCGGAAGGTGCAACCGGTGCTGAGACCCGGCACC
ACCGTGGTCTTCACGCCCGGCGAGCGCTCCGGCACCGCTTCCAAGCGCTCCTACGACGAGGTGTACGGGGA
TGATGATATTCTGGAGCAGGCGGCCGAGCGCCTGGGCGAGTTTGCTTACGGCAAGCGCAGCCGTTCCGCAC
CGAAGGAAGAGGCGGTGTCCATCCCGCTGGACCACGGCAACCCCACGCCGAGCCTCAAGCCCGTGACCTT
GCAGCAGGTGCTGCCGACCGCGGCGCCGCGCCGGGGGTTCAAGCGCGAGGGCGAGGATCTGTACCCCACC
ATGCAGCTGATGGTGCCCAAGCGCCAGAAGCTGGAAGACGTGCTGGAGACCATGAAGGTGGACCCGGACG

TGCAGCCCGAGGTCAAGGTGCGGCCCATCAAGCAGGTGGCCCCGGGCCTGGGCGTGCAGACCGTGGACAT
CAAGATTCCCACGGAGCCCATGGAAACGCAGACCGAGCCCATGATCAAGCCCAGCACCAGCACCATGGAG
GTGCAGACGGATCCCTGGATGCCATCGGCTCCTAGTCGAAGACCCCGGCGCAAGTACGGCGCGGCCAGCCT
GCTGATGCCCAACTACGCGCTGCATCCTTCCATCATCCCCACGCCGGGCTACCGCGGCACGCGCTTCTACCG
CGGTCATACCAGCAGCCGCCGCCGCAAGACCACCACTCGCCGCCGCCGTCGCCGCACCGCCGCTGCAACCA
CCCCTGCCGCCCTGGTGCGGAGAGTGTACCGCCGCGGCCGCGCACCTCTGACCCTGCCGCGCGCGCGCTAC
CACCCGAGCATCGCCATTTAAACTTTCGCCTGCTTTGCAGATCAATGGCCCTCACATGCCGCCTTCGCGTTC
CCATTACGGGCTACCGAGGAAGAAAACCGCGCCGTAGAAGGCTGGCGGGGAACGGGATGCGTCGCCACCA
CCACCGGCGGCGGCGCGCCATCAGCAAGCGGTTGGGGGGAGGCTTCCTGCCCGCGCTGATCCCCATCATCG
CCGCGGCGATCGGGGCGATCCCCGGCATTGCTTCCGTGGCGGTGCAGGCCTCTCAGCGCCACTGAGACACA
CTTGGAAACATCTTGTAATAAACCAATGGACTCTGACGCTCCTGGTCCTGTGATGTGTTTTCGTAGACAGAT
GGAAGACATCAATTTTTCGTCCCTGGCTCCGCGACACGGCACGCGGCCGTTCATGGGCACCTGGAGCGACA
TCGGCACCAGCCAACTGAACGGGGGCGCCTTCAATTGGAGCAGTCTCTGGAGCGGGCTTAAGAATTTCGGG
TCCACGCTTAAAACCTATGGCAGCAAGGCGTGGAACAGCACCACAGGGCAGGCGCTGAGGGATAAGCTGA
AAGAGCAGAACTTCCAGCAGAAGGTGGTCGATGGGCTCGCCTCGGGCATCAACGGGGTGGTGGACCTGGC
CAACCAGGCCGTGCAGCGGCAGATCAACAGCCGCCTGGACCCGGTGCCGCCCGCCGGCTCCGTGGAGATG
CCGCAGGTGGAGGAGGAGCTGCCTCCCCTGGACAAGCGGGGCGAGAAGCGACCCCGCCCCGATGCGGAGG
AGACGCTGCTGACGCACACGGACGAGCCGCCCCCGTACGAGGAGGCGGTGAAACTGGGTCTGCCCACCAC
GCGGCCCATCGCGCCCCTGGCCACCGGGGTGCTGAAACCCGAAAAGCCCGCGACCCTGGACTTGCCTCCTC
CCCAGCCTTCCCGCCCCTCTACAGTGGCTAAGCCCCTGCCGCCGGTGGCCGTGGCCCGCGCGCGACCCGGG
GGCACCGCCCGCCCTCATGCGAACTGGCAGAGCACTCTGAACAGCATCGTGGGTCTGGGAGTGCAGAGTGT
GAAGCGCCGCCGCTGCTATTAAACCTACCGTAGCGCTTAACTTGCTTGTCTGTGTGTGTATGTATTATGTCG
CCGCCGCCGCTGTCCACCAGAAGGAGGAGTGAAGAGGCGCGTCGCCGAGTTGCAAGATGGCCACCCCATC
GATGCTGCCCCAGTGGGCGTACATGCACATCGCCGGACAGGACGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTGG
TGCAGTTTGCCCGCGCCACAGACACCTACTTCAGTCTGGGGAACAAGTTTAGGAACCCCACGGTGGCGCCC
ACGCACGATGTGACCACCGACCGCAGCCAGCGGCTGACGCTGCGCTTCGTGCCCGTGGACCGCGAGGACA
ACACCTACTCGTACAAAGTGCGCTACACGCTGGCCGTGGGCGACAACCGCGTGCTGGACATGGCCAGCACC
TACTTTGACATCCGCGGCGTGCTGGATCGGGGCCCTAGCTTCAAACCCTACTCCGGCACCGCCTACAACAG
TCTGGCCCCCAAGGGAGCACCCAACACTTGTCAGTGGACATATAAAGCCGATGGTGAAACTGCCACAGAA
AAAACCTATACATATGGAAATGCACCCGTGCAGGGCATTAACATCACAAAAGATGGTATTCAACTTGGAAC
TGACACCGATGATCAGCCAATCTACGCAGATAAAACCTATCAGCCTGAACCTCAAGTGGGTGATGCTGAAT
GGCATGACATCACTGGTACTGATGAAAAGTATGGAGGCAGAGCTCTTAAGCCTGATACCAAAATGAAGCCT
TGTTATGGTTCTTTTGCCAAGCCTACTAATAAAGAAGGAGGTCAGGCAAATGTGAAAACAGGAACAGGCAC
TACTAAAGAATATGACATAGACATGGCTTTCTTTGACAACAGAAGTGCGGCTGCTGGCCTAGCTCCAG
AAATTGTTTTGTATACTGAAAATGTGGATTTGGAAACTCCAGATACCCATATTGTATACAAAGCAGGCACA
GATGACAGCAGCTCTTCTATTAATTTGGGTCAGCAAGCCATGCCCAACAGACCTAACTACATTGGTTTCAGA
GACAACTTTATCGGGCTCATGTACTACAACAGCACTGGCAATATGGGGGTGCTGGCCGGTCAGGCTTCTCA
GCTGAATGCTGTGGTTGACTTGCAAGACAGAAACACCGAGCTGTCCTACCAGCTCTTGCTTGACTCTCTGGG
TGACAGAACCCGGTATTTCAGTATGTGGAATCAGGCGGTGGACAGCTATGATCCTGATGTGCGCATTATTG
AAAATCATGGTGTGGAGGATGAACTTCCCAACTATTGTTTCCCTCTGGATGCTGTTGGCAGAACAGATACTT
ATCAGGGAATTAAGGCTAATGGAACTGATCAAACCACATGGACCAAAGATGACAGTGTCAATGATGCTAA
TGAGATAGGCAAGGGTAATCCATTCGCCATGGAAATCAACATCCAAGCCAACCTGTGGAGGAACTTCCTCT
ACGCCAACGTGGCCCTGTACCTGCCCGACTCTTACAAGTACACGCCGGCCAATGTTACCCTGCCCACCAAC
ACCAACACCTACGATTACATGAACGGCCGGGTGGTGGCGCCCTCGCTGGTGGACTCCTACATCAACATCGG
GGCGCGCTGGTCGCTGGATCCCATGGACAACGTGAACCCCTTCAACCACCACCGCAATGCGGGGCTGCGCT
ACCGCTCCATGCTCCTGGGCAACGGGCGCTACGTGCCCTTCCACATCCAGGTGCCCCAGAAATTTTTCGCCA
TCAAGAGCCTCCTGCTCCTGCCCGGGTCCTACACCTACGAGTGGAACTTCCGCAAGGACGTCAACATGATC
CTGCAGAGCTCCCTCGGCAACGACCTGCGCACGGACGGGGCCTCCATCTCCTTCACCAGCATCAACCTCTA
CGCCACCTTCTTCCCCATGGCGCACAACACGGCCTCCACGCTCGAGGCCATGCTGCGCAACGACACCAACG
ACCAGTCCTTCAACGACTACCTCTCGGCGGCCAACATGCTCTACCCCATCCCGGCCAACGCCACCAACGTG
CCCATCTCCATCCCCTCGCGCAACTGGGCCGCCTTCCGCGGCTGGTCCTTCACGCGTCTCAAGACCAAGGAG
ACGCCCTCGCTGGGCTCCGGGTTCGACCCCTACTTCGTCTACTCGGGCTCCATCCCCTACCTCGACGGCACC
TTCTACCTCAACCACACCTTCAAGAAGGTCTCCATCACCTTCGACTCCTCCGTCAGCTGGCCCGGCAACGAC
CGGCTCCTGACGCCCAACGAGTTCGAAATCAAGCGCACCGTCGACGGCGAGGGCTACAACGTGGCCCAGT
GCAACATGACCAAGGACTGGTTCCTGGTCCAGATGCTGGCCCACTACAACATCGGCTACCAGGGCTTCTAC
GTGCCCGAGGGCTACAAGGACCGCATGTACTCCTTCTTCCGCAACTTCCAGCCCATGAGCCGCCAGGTGGT
GGACGAGGTCAACTACAAGGACTACCAGGCCGTCACCCTGGCCTACCAGCACAACAACTCGGGCTTCGTCG
GCTACCTCGCGCCCACCATGCGCCAGGGCCAGCCCTACCCCGCCAACTACCCCTACCCGCTCATCGGCAAG
AGCGCCGTCACCAGCGTCACCCAGAAAAAGTTCCTCTGCGACAGGGTCATGTGGCGCATCCCCTTCTCCAG
CAACTTCATGTCCATGGGCGCGCTCACCGACCTCGGCCAGAACATGCTCTATGCCAACTCCGCCCACGCGC
TAGACATGAATTTCGAAGTCGACCCCATGGATGAGTCCACCCTTCTCTATGTTGTCTTCGAAGTCTTCGACG
TCGTCCGAGTGCACCAGCCCCACCGCGGCGTCATCGAGGCCGTCTACCTGCGCACCCCCTTCTCGGCCGGT
AACGCCACCACCTAAGCTCTTGCTTCTTGCAAGCCATGGCCGCGGGCTCCGGCGAGCAGGAGCTCAGGGCC
ATCATCCGCGACCTGGGCTGCGGGCCCTACTTCCTGGGCACCTTCGATAAGCGCTTCCCGGGATTCATGGCC
CCGCACAAGCTGGCCTGCGCCATCGTCAACACGGCCGGCCGCGAGACCGGGGGCGAGCACTGGCTGGCCT
TCGCCTGGAACCCGCGCTCGAACACCTGCTACCTCTTCGACCCCTTCGGGTTCTCGGACGAGCGCCTCAAGC
AGATCTACCAGTTCGAGTACGAGGGCCTGCTGCGCCGCAGCGCCCTGGCCACCGAGGACCGCTGCGTCACC

CTGGAAAAGTCCACCCAGACCGTGCAGGGTCCGCGCTCGGCCGCCTGCGGGCTCTTCTGCTGCATGTTCCT
GCACGCCTTCGTGCACTGGCCCGACCGCCCCATGGACAAGAACCCCACCATGAACTTGCTGACGGGGGTGC
CCAACGGCATGCTCCAGTCGCCCCAGGTGGAACCCACCCTGCGCCGCAACCAGGAGGCGCTCTACCGCTTC
CTCAACTCCCACTCCGCCTACTTTCGCTCCCACCGCGCGCGCATCGAGAAGGCCACCGCCTTCGACCGCATG
AATCAAGACATGTAAACCGTGTGTGTATGTTAAATGTCTTTAATAAACAGCACTTTCATGTTACACATGCAT
CTGAGATGATTTATTTAGAAATCGAAAGGGTTCTGCCGGGTCTCGGCATGGCCCGCGGGCAGGGACACGTT
GCGGAACTGGTACTTGGCCAGCCACTTGAACTCGGGGATCAGCAGTTTGGGCAGCGGGGTGTCGGGGAAG
GAGTCGGTCCACAGCTTCCGCGTCAGTTGCAGGGCGCCCAGCAGGTCGGGCGCGGAGATCTTGAAATCGCA
GTTGGGACCCGCGTTCTGCGCGCGGGAGTTGCGGTACACGGGGTTGCAGCACTGGAACACCATCAGGGCCG
GGTGCTTCACGCTCGCCAGCACCGTCGCGTCGGTGATGCTCTCCACGTCGAGGTCCTCGGCGTTGGCCATCC
CGAAGGGGGTCATCTTGCAGGTCTGCCTTCCCATGGTGGGCACGCACCCGGGCTTGTGGTTGCAATCGCAG
TGCAGGGGGATCAGCATCATCTGGGCCTGGTCGGCGTTCATCCCCGGGTACATGGCCTTCATGAAAGCCTC
CAATTGCCTGAACGCCTGCTGGGCCTTGGCTCCCTCGGTGAAGAAGACCCCGCAGGACTTGCTAGAGAACT
GGTTGGTGGCGCACCCGGCGTCGTGCACGCAGCAGCGCGCGTCGTTGTTGGCCAGCTGCACCACGCTGCGC
CCCCAGCGGTTCTGGGTGATCTTGGCCCGGTCGGGGTTCTCCTTCAGCGCGCGCTGCCCGTTCTCGCTCGCC
ACATCCATCTCGATCATGTGCTCCTTCTGGATCATGGTGGTCCCGTGCAGGCACCGCAGCTTGCCCTCGGCC
TCGGTGCACCCGTGCAGCCACAGCGCGCACCCGGTGCACTCCCAGTTCTTGTGGGCGATCTGGGAATGCGC
GTGCACGAAGCCCTGCAGGAAGCGGCCCATCATGGTGGTCAGGGTCTTGTTGCTAGTGAAGGTCAGCGGAA
TGCCGCGGTGCTCCTCGTTGATGTACAGGTGGCAGATGCGGCGGTACACCTCGCCCTGCTCGGGCATCAGC
TGGAAGTTGGCTTTCAGGTCGGTCTCCACGCGGTAGCGGTCCATCAGCATAGTCATGATTTCCATACCCTTC
TCCCAGGCCGAGACGATGGGCAGGCTCATAGGGTTCTTCACCATCATCTTAGCGCTAGCAGCCGCGGCCAG
GGGGTCGCTCTCGTCCAGGGTCTCAAAGCTCCGCTTGCCGTCCTTCTCGGTGATCCGCACCGGGGGGTAGCT
GAAGCCCACGGCCGCCAGCTCCTCCTCGGCCTGTCTTTCGTCCTCGCTGTCCTGGCTGACGTCCTGCAGGAC
CACATGCTTGGTCTTGCGGGGTTTCTTCTTGGGCGGCAGCGGCGGCGGAGATGTTGGAGATGGCGAGGGGG
AGCGCGAGTTCTCGCTCACCACTACTATCTCTTCCTCTTCTTGGTCCGAGGCCACGCGGCGGTAGGTATGTC
TCTTCGGGGGCAGAGGCGGAGGCGACGGGCTCTCGCCGCCGCGACTTGGCGGATGGCTGGCAGAGCCCCTT
CCGCGTTCGGGGGTGCGCTCCCGGCGGCGCTCTGACTGACTTCCTCCGCGGCCGGCCATTGTGTTCTCCTAG
GGAGGAACAACAAGCATGGAGACTCAGCCATCGCCAACCTCGCCATCTGCCCCCACCGCCGACGAGAAGC
AGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAACCGCCCCGCCGCCCAGCCCCGCCACCTCCGACGCGGCCGTCCCAGA
CATGCAAGAGATGGAGGAATCCATCGAGATTGACCTGGGCTATGTGACGCCCGCGGAGCACGAGGAGGAG
CTGGCAGTGCGCTTTTCACAAGAAGAGATACACCAAGAACAGCCAGAGCAGGAAGCAGAGAATGAGCAGA
GTCAGGCTGGGCTCGAGCATGACGGCGACTACCTCCACCTGAGCGGGGGGGAGGACGCGCTCATCAAGCA
TCTGGCCCGGCAGGCCACCATCGTCAAGGATGCGCTGCTCGACCGCACCGAGGTGCCCCTCAGCGTGGAGG
AGCTCAGCCGCGCCTACGAGTTGAACCTCTTCTCGCCGCGCGTGCCCCCCAAGCGCCAGCCCAATGGCACC
TGCGAGCCCAACCCGCGCCTCAACTTCTACCCGGTCTTCGCGGTGCCCGAGGCCCTGGCCACCTACCACATC
TTTTTCAAGAACCAAAAGATCCCCGTCTCCTGCCGCGCCAACCGCACCCGCGCCGACGCCCTTTTCAACCTG
GGTCCCGGCGCCCGCCTACCTGATATCGCCTCCTTGGAAGAGGTTCCCAAGATCTTCGAGGGTCTGGGCAG
CGACGAGACTCGGGCCGCGAACGCTCTGCAAGGAGAAGGAGGAGAGCATGAGCACCACAGCGCCCTGGTC
GAGTTGGAAGGCGACAACGCGCGGCTGGCGGTGCTCAAACGCACGGTCGAGCTGACCCATTTCGCCTACCC
GGCTCTGAACCTGCCCCCCAAAGTCATGAGCGCGGTCATGGACCAGGTGCTCATCAAGCGCGCGTCGCCCA
TCTCCGAGGACGAGGGCATGCAAGACTCCGAGGAGGGCAAGCCCGTGGTCAGCGACGAGCAGCTGGCCCG
GTGGCTGGGTCCTAATGCTAGTCCCCAGAGTTTGGAAGAGCGGCGCAAACTCATGATGGCCGTGGTCCTGG
TGACCGTGGAGCTGGAGTGCCTGCGCCGCTTCTTCGCCGACGCGGAGACCCTGCGCAAGGTCGAGGAGAAC
CTGCACTACCTCTTCAGGCACGGGTTCGTGCGCCAGGCCTGCAAGATCTCCAACGTGGAGCTGACCAACCT
GGTCTCCTACATGGGCATCTTGCACGAGAACCGCCTGGGGCAGAACGTGCTGCACACCACCCTGCGCGGGG
AGGCCCGGCGCGACTACATCCGCGACTGCGTCTACCTCTACCTCTGCCACACCTGGCAGACGGGCATGGGC
GTGTGGCAGCAGTGTCTGGAGGAGCAGAACCTGAAAGAGCTCTGCAAGCTCCTGCAGAAGAACCTCAAGG
GTCTGTGGACCGGGTTCGACGAGCGCACCACCGCCTCGGACCTGGCCGACCTCATTTTCCCCGAGCGCCTC
AGGCTGACGCTGCGCAACGGCCTGCCCGACTTTATGAGCCAAAGCATGTTGCAAAACTTTCGCTCTTTCATC
CTCGAACGCTCCGGAATCCTGCCCGCCACCTGCTCCGCGCTGCCCTCGGACTTCGTGCCGCTGACCTTCCGC
GAGTGCCCCCCGCCGCTGTGGAGCCACTGCTACCTGCTGCGCCTGGCCAACTACCTGGCCTACCACTCGGA
CGTGATCGAGGACGTCAGCGGCGAGGGCCTGCTCGAGTGCCACTGCCGCTGCAACCTCTGCACGCCGCACC
GCTCCCTGGCCTGCAACCCCCAGCTGCTGAGCGAGACCCAGATCATCGGCACCTTCGAGTTGCAAGGGCCC
AGCGAAGGCGAGGGTTCAGCCGCCAAGGGGGGTCTGAAACTCACCCCGGGGCTGTGGACCTCGGCCTACT
TGCGCAAGTTCGTGCCCGAGGACTACCATCCCTTCGAGATCAGGTTCTACGAGGACCAATCCCATCCGCCC
AAGGCCGAGCTGTCGGCCTGCGTCATCACCCAGGGGGCGATCCTGGCCCAATTGCAAGCCATCCAGAAATC
CCGCCAAGAATTCTTGCTGAAAAAGGGCCGCGGGGTCTACCTCGACCCCCAGACCGGTGAGGAGCTCAACC
CCGGCTTCCCCCAGGATGCCCCGAGGAAACAAGAAGCTGAAAGTGGAGCTGCCGCCCGTGGAGGATTTGG
AGGAAGACTGGGAGAACAGCAGTCAGGCAGAGGAGGAGGAGATGGAGGAAGACTGGGACAGCACTCAGG
CAGAGGAGGACAGCCTGCAAGACAGTCTGGAGGAAGACGAGGAGGAGGCAGAGGAGGAGGTGGAAGAAG
CAGCCGCCGCCAGACCGTCGTCCTCGGCGGGGGAGAAAGCAAGCAGCACGGATACCATCTCCGCTCCGGG
TCGGGGTCCCGCTCGACCACACAGTAGATGGGACGAGACCGGACGATTCCCGAACCCCACCACCCAGACC
GGTAAGAAGGAGCGGCAGGGATACAAGTCCTGGCGGGGGCACAAAAACGCCATCGTCTCCTGCTTGCAGG
CCTGCGGGGGCAACATCTCCTTCACCCGGCGCTACCTGCTCTTCCACCGCGGGGTGAACTTTCCCCGCAACA
TCTTGCATTACTACCGTCACCTCCACAGCCCCTACTACTTCCAAGAAGAGGCAGCAGCAGCAGAAAAAGAC
CAGCAGAAAACCAGCAGCTAGAAAATCCACAGCGGCGGCAGCAGGTGGACTGAGGATCGCGGCGAACGA
GCCGGCGCAAACCCGGGAGCTGAGGAACCGGATCTTTCCCACCCTCTATGCCATCTTCCAGCAGAGTCGGG

10 20 30 40 50

GGCAGGAGCAGGAACTGAAAGTCAAGAACCGTTCTCTGCGCTCGCTCACCCGCAGTTGTCTGTATCACAAG
AGCGAAGACCAACTTCAGCGCACTCTCGAGGACGCCGAGGCTCTCTTCAACAAGTACTGCGCGCTCACTCT
TAAAGAGTAGCCCGCGCCCGCCCAGTCGCAGAAAAAGGCGGGAATTACGTCACCTGTGCCCTTCGCCCTAG
CCGCCTCCACCCATCATCATGAGCAAAGAGATTCCCACGCCTTACATGTGGAGCTACCAGCCCCAGATGGG
CCTGGCCGCCGGTGCCGCCCAGGACTACTCCACCCGCATGAATTGGCTCAGCGCCGGGCCCGCGATGATCT
CACGGGTGAATGACATCCGCGCCCACCGAAACCAGATACTCCTAGAACAGTCAGCGCTCACCGCCACGCCC
CGCAATCACCTCAATCCGCGTAATTGGCCCGCCGCCCTGGTGTACCAGGAAATTCCCCAGCCCACGACCGT
ACTACTTCCGCGAGACGCCCAGGCCGAAGTCCAGCTGACTAACTCAGGTGTCCAGCTGGCGGGCGGCGCCA
CCCTGTGTCGTCACCGCCCCGCTCAGGGTATAAAGCGGCTGGTGATCCGGGGCAGAGGCACACAGCTCAAC
GACGAGGTGGTGAGCTCTTCGCTGGGTCTGCGACCTGACGGAGTCTTCCAACTCGCCGGATCGGGGAGATC
TTCCTTCACGCCTCGTCAGGCCGTCCTGACTTTGGAGAGTTCGTCCTCGCAGCCCCGCTCGGGTGGCATCGG
CACTCTCCAGTTCGTGGAGGAGTTCACTCCCTCGGTCTACTTCAACCCCTTCTCCGGCTCCCCCGGCCACTA
CCCGGACGAGTTCATCCCGAACTTCGACGCCATCAGCGAGTCGGTGGACGGCTACGATTGAAACTAATCAC
CCCCTTATCCAGTGAAATAAAGATCATATTGATGATGATTTTACAGAAATAAAAAATAATCATTTGATTTGA
AATAAAGATACAATCATATTGATGATTTGAGTTTAACAAAAAAATAAAGAATCACTTACTTGAAATCTGAT
ACCAGGTCTCTGTCCATGTTTTCTGCCAACACCACTTCACTCCCCTCTTCCCAGCTCTGGTACTGCAGGCCCC
GGCGGGCTGCAAACTTCCTCCACACGCTGAAGGGGATGTCAAATTCCTCCTGTCCCTCAATCTTCATTTTAT
CTTCTATCAGATGTCCAAAAAGCGCGTCCGGGTGGATGATGACTTCGACCCCGTCTACCCCTACGATGCAG
ACAACGCACCGACCGTGCCCTTCATCAACCCCCCCTTCGTCTCTTCAGATGGATTCCAAGAGAAGCCCCTGG
GGGTGTTGTCCCTGCGACTGGCCGACCCCGTCACCACCAAGAACGGGGAAATCACCCTCAAGCTGGGAGA
GGGGGTGGACCTCGATTCCTCGGGAAAACTCATCTCCAACACGGCCACCAAGGCCGCCGCCCCTCTCAGTT
TTTCCAACAACACCATTTCCCTTAACATGGATCACCCCTTTTACACTAAAGATGGAAAATTATCCTTACAAG
TTTCTCCACCATTAAATATACTGAGAACAAGCATTCTAAACACACTAGCTTTAGGTTTTGGATCAGGTTTAG
GACTCCGTGGCTCTGCCTTGGCAGTACAGTTAGTCTCTCCACTTAGATACTGATGGAAACATAAAGC
TTACCTTAGACAGAGGTTTGCATGTTACAACAGGAGATGCAATTGAAAGCAACATAAGCTGGGCTAAAGGT
TTAAAATTTGAAGATGGAGCCATAGCAACCAACATTGGAAATGGGTTAGAGTTTGGAAGCAGTAGTACAG
AAACAGGTGTTGATGATGCTTACCCAATCCAAGTTAAACTTGGATCTGGCCTTAGCTTTGACAGTACAGGA
GCCATAATGGCTGGTAACAAAGAAGACGATAAACTCACTTTGTGGACAACACCTGATCCATCACCAAACTG
TCAAATACTCGCAGAAAATGATGCAAAACTAACACTTTGCTTGACTAAATGTGGTAGTCAAATACTGGCCA
CTGTGTCAGTCTTAGTTGTAGGAAGTGGAAACCTAAACCCCATTACTGGCACCGTAAGCAGTGCTCAGGTG
TTTCTACGTTTTGATGCAAACGGTGTTCTTTTAACAGAACATTCTACACTAAAAAAATACTGGGGGTATAGG
CAGGGAGATAGCATAGATGGCACTCCATATACCAATGCTGTAGGATTCATGCCCAATTTAAAAGCTTATCC
AAAGTCACAAAGTTCTACTACTAAAAATAATATAGTAGGGCAAGTATACATGAATGGAGATGTTTCAAAAC
CTATGCTTCTCACTATAACCCTCAATGGTACTGATGACAGCAACAGTACATATTCAATGTCATTTCATACA
CCTGGACTAATGGAAGCTATGTTGGAGCAACATTTGGGGCTAACTCTTATACCTTCTCATACATCGCCCAAG
AATGAACACTGTATCCCACCCTGCATGCCAACCCTTCCCACCCCACTCTGTGGAACAAACTCTGAAACACA
AAATAAAATAAAGTTCAAGTGTTTTATTGATTCAACAGTTTTACAGGATTCGAGCAGTTATTTTTCCTCCAC
CCTCCCAGGACATGGAATACACCACCCTCTCCCCCCGCACAGCCTTGAACATCTGAATGCCATTGGTGATG
GACATGCTTTTGGTCTCCACGTTCCACACAGTTTCAGAGCGAGCCAGTCTCGGGTCGGTCAGGGAGATGAA
ACCCTCCGGGCACTCCCGCATCTGCACCTCACAGCTCAACAGCTGAGGATTGTCCTCGGTGGTCGGGATCA
CGGTTATCTGGAAGAAGCAGAAGAGCGGCGGTGGGAATCATAGTCCGCGAACGGGATCGGCCGGTGGTGT
CGCATCAGGCCCCGCAGCAGTCGCTGCCGCCGCCGCTCCGTCAAGCTGCTGCTCAGGGGGTCCGGGTCCAG
GGACTCCCTCAGCATGATGCCCACGGCCCTCAGCATCAGTCGTCTGGTGCGGCGGGCGCAGCAGCGCATGC
GGATCTCGCTCAGGTCGCTGCAGTACGTGCAACACAGAACCACCAGGTTGTTCAACAGTCCATAGTTCAAC
ACGCTCCAGCCGAAACTCATCGCGGGAAGGATGCTACCCACGTGGCCGTCGTACCAGATCCTCAGGTAAAT
CAAGTGGTGCCCCCTCCAGAACACGCTGCCCACGTACATGATCTCCTTGGGCATGTGGCGGTTCACCACCTC
CCGGTACCACATCACCCTCTGGTTGAACATGCAGCCCCGGATGATCCTGCGGAACCACAGGGCCAGCACCG
CCCCGCCCGCCATGCAGCGAAGAGACCCCGGGTCCCGGCAATGGCAATGGAGGACCCACCGCTCGTACCC
GTGGATCATCTGGGAGCTGAACAAGTCTATGTTGGCACAGCACAGGCATATGCTCATGCATCTCTTCAGCA
CTCTCAACTCCTCGGGGGTCAAAACCATATCCCAGGGCACGGGGAACTCTTGCAGGACAGCGAACCCCGCA
GAACAGGGCAATCCTCGCACAGAACTTACATTGTGCATGGACAGGGTATCGCAATCAGGCAGCACCGGGT
GATCCTCCACCAGAGAAGCGCGGGTCTCGGTCTCCTCACAGCGTGGTAAGGGGGCCGGCCGATACGGGTG
ATGGCGGGACGCGGCTGATCGTGTTCGCGACCGTGTCATGATGCAGTTGCTTTCGGACATTTTCGTACTTGC
TGTAGCAGAACCTGGTCCGGGCGCTGCACACCGATCGCCGGCGGCGGTCTCGGCGCTTGGAACGCTCGGTG
TTGAAATTGTAAAACAGCCACTCTCTCAGACCGTGCAGCAGATCTAGGGCCTCAGGAGTGATGAAGATCCC
ATCATGCCTGATGGCTCTGATCACATCGACCACCGTGGAATGGGCCAGACCCAGCCAGATGATGCAATTTT
GTTGGGTTTCGGTGACGGCGAGCCTCGGGAACAACGATGAAGTAAATGCAAGCGGTGCGTTCCAGCATGGT
TAGTTAGCTGATCTGTAGAAAAAACAAAAATGAACATTAAACCATGCTAGCCTGGCGAACAGGTGGGTAA
ATCGTTCTCTCCAGCACCAGGCAGGCCACGGGGTCTCCGGCGCGACCCTCGTAAAAATTGTCGCTATGATT
GAAAACCATCACAGAGAGACGTTCCCGGTGGCCGGCGTGAATGATTCGACAAGATGAATACACCCCCGGA
ACATTGGCGTCCGCGAGTGAAAAAAAGCGCCCGAGGAAGCAATAAGGCACTACAATGCTCAGTCTCAAGT
CCAGCAAAGCGATGCCATGCGGATGAAGCACAAAATTCTCAGGTGCGTACAAAATGTAATTACTCCCCTCC
TGCACAGGCAGCAAAGCCCCCGATCCCTCCAGGTACACATACAAAGCCTCAGCGTCCATAGCTTACCGAGC
AGCAGCACACAACAGGCGCAAGAGTCAGAGAAAGGCTGAGCTCTAACCTGTCCACCCGCTCTCTGCTCAAT
ATATAGCCCAGATCTACACTGACGTAAAGGCCAAAGTCTAAAAATACCCGCCAAATAATCACACACGCCCA
GCACACGCCCAGAAACCGGTGACACACTCAAAAAAATACGCGCACTTCCTCAAACGCCCAAAACTGCCGT
CATTTCCGGGTTCCCACGCTACGTCATCAAAACACGACTTTCAAATTCCGTCGACCGTTAAAAACGTCACCC

GCCCCGCCCCTAACGGTCGCCCGTCTCTCAGCCAATCAGCGCCCCGCATCCCCAAATTCAAACACCTCATTT
GCATATTAACGCGCACAAAAAGTTTGAGGTATATTATTGATGATG

【０５０４】

ＸＸＩＩＩ．ＴＥＴｒ調節カセット発現系における免疫原性

Ｂａｌｂ／ｃ系マウスを、通常のＣＭＶプロモーター（ＣｈＡｄＶ－ＭＡＧ）またはＴＥＴｏ調節されたプロモーター（ＴＥＴ－ＣｈＡｄＶ－ＭＡＧ）の制御下でモデル抗原カセットを発現する１×１０^{10}ＶＰのＣｈＡｄＶ６８ワクチンで免疫した。ワクチン接種の１２日後に脾臓を収穫し、単一の細胞懸濁液を調製した。ＣＤ８　Ｔ細胞における抗原

特異的ＩＦＮ－γ産生をＩＣＳを用いて測定した。図４８及び表４３に示されるように、インビボでの有効性は、マウスをＴＥＴｏ調節されたプロモーターから発現された抗原カセットで免疫した場合と同じかまたはそれよりも高かった。したがって、調節されたＣｈＡｄベクターは、インビボでワクチン標的にＣＤ８＋免疫応答を誘導するうえで同様に有効であり、より有効である可能性もある。

【０５０５】

上記でより詳細に述べたように、さらにアカゲザルをＣｈＡｄＶ６８．５ＷＴｎｔ．ＭＡＧ２５マー（「ＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＶ－ＭＡＧ」；配列番号２）またはＣｈＡｄＶ６８－Ｅ４ｄ－ＣＭＴ－ＭＡＧ（配列番号７１）で免疫し、各群に抗ＣＴＬＡ４抗体（イピリムマブ）も投与した。Ｔ細胞応答を、６つの異なるアカゲザルＭａｍｕ－Ａ＊０１クラスＩエピトープによる刺激後に、ＥＬＩＳｐｏｔによりＩＦＮ－γの産生について分析した。図４２Ｂ及び図４２Ｃに示されるように、また、表４１Ｂ（ＣｈＡｄＶ６８－ＣＭＶ－ＭＡＧ）及び表４１Ｃ（ＣｈＡｄＶ６８－Ｅ４ｄ－ＣＭＴ－ＭＡＧ）に定量化されているように、Ｅ４欠失ベクターのバックグラウンドで「ＣＭＴ」応答領域を有するコンストラクトによる免疫は少なくとも同等の免疫応答を示し、ＣＭＴ－Ｅ４欠失ベクターでは応答が高くなる正の傾向がみられた。

【表４３】

表４３－ＣｈＡｄＶ６８－MAG及びＣｈＡｄＶ６８－Ｔｅｔｏ－MAG免疫マウスにおけるＣＤ８＋応答（%）

ChAdV68-MAG 1e10 VP	マウス番号	CD8+(%)	ChAdV68-TETo-MAG 1e10 VP	マウス番号	CD8+(%)
	1	9.35		1	17.58
	2	9.31		2	16.88
	3	17.60		3	18.93
	4	10.08		4	9.59
	5	6.06		5	24
	6	8.15		6	16.28
	7	10.08		7	18.92
	8	9.87		8	22.24
中央値		9.61	中央値		18.25

【０５０６】

ＸＸＩＶ．患者集団の選択

１つ以上の抗原を用いて、本明細書に記載されるＥ４改変アデノウイルスなどの改変アデノウイルスを用いてワクチン組成物を配合する。ワクチンを例えばがんを治療する目的で患者に投与する。特定の場合では、患者を、例えば、コンパニオン診断、またはＦｏｕｎｄａｔｉｏｎＯｎｅ、ＦｏｕｎｄａｔｉｏｎＯｎｅ　ＣＤｘ、Ｇｕａｒｄａｎｔ　３６０、Ｇｕａｒｄａｎｔ　ＯＭＮＩ、またはＭＳＫ　ＩＭＰＡＣＴなどの一般的に用いられているがん遺伝子パネルＮＧＳアッセイを用いて選択する。例示的な患者選択基準を下記に述べる。

【０５０７】

患者選択

共有新生抗原をワクチン接種するための患者選択は、腫瘍遺伝子発現、体細胞変異の状態、及び患者のＨＬＡ型を考慮して行われる。具体的には、患者は、以下の場合にワクチン治療に適格であるとみなされる。すなわち、

（ａ）ワクチンに含まれるエピトープを提示することが予測または知られているＨＬＡアレルを患者が有し、患者の腫瘍がそのエピトープ配列を有する遺伝子を発現している、

（ｂ）ワクチンに含まれるエピトープを提示することが予測または知られているＨＬＡアレルを患者が有し、患者の腫瘍がそのエピトープ配列を生じる変異を有している、

（ｃ）（ｂ）と同じであるが、患者の腫瘍が所定の閾値（例えば、１ＴＰＭまたは１０ＴＰＭ）を上回る変異を有する遺伝子を発現していることも求められる、または、
（ｄ）（ｂ）と同じであるが、患者の腫瘍が所定の閾値（例えば、ＲＮＡのレベルで観察される少なくとも１つの変異リード）を上回る変異を発現していることも求められる、
（ｅ）（ｂ）と同じであるが、（ｃ）及び（ｄ）におけるさらなる基準の両方も求められる、
（ｆ）上記のいずれかであるが、提示ＨＬＡアレルの喪失が腫瘍で検出されないことも場合により求められる。

【０５０８】

遺伝子発現は、ＲＮＡＳｅｑ、マイクロアレイ、ＰＣＲ、ナノストリング、ＩＳＨ、質量分析、またはＩＨＣを含む確立された方法のいずれかによってＲＮＡまたはタンパク質レベルで測定される。遺伝子発現の陽性の閾値は、以下を含むいくつかの方法によって確立される。すなわち、（１）異なる遺伝子発現レベルでのＨＬＡアレルによるエピトープの提示の予測される確率、（２）質量分析により測定される遺伝子発現とＨＬＡエピトープ提示との相関、及び／または（３）異なるレベルで遺伝子を発現している患者で得られるワクチン接種の臨床効果。患者選択は、ワクチンに含まれる複数のエピトープ、例えば、少なくとも２、３、４、または５個のエピトープについて陽性が求められるようにさらに広げられる。

【０５０９】

体細胞変異の状態は、エクソームシークエンシング（ＮＧＳ　ＤＮＡＳｅｑ）、標的化エクソームシークエンシング（遺伝子のパネル）、トランスクリプトームシークエンシング（ＲＮＡＳｅｑ）、サンガーシークエンシング、ＰＣＲベースの遺伝子型決定アッセイ（例えば、Ｔａｑｍａｎまたは液滴デジタルＰＣＲ）、質量分析に基づく方法（例えば、Ｓｅｑｕｅｎｏｍによる）、または当業者には周知の他の任意の方法により評価される。

【０５１０】

さらに新たな新生抗原が例えば質量分析により、記載の方法のいずれかを用いて同定される。これらの新たに同定された共有新生抗原は本明細書に記載のワクチンカセットに組み込まれる。

【０５１１】

以前に検証された新生抗原が、さらなるＨＬＡアレルによって提示されるものとしてさらに検証され、ワクチンカセットに新生抗原選択についての情報を与え、及び／または潜在的に治療可能な集団を広げる。

【０５１２】

新たな新生抗原を含めることで、対処可能な腫瘍タイプを広げる（例えば、ＥＧＦＲ変異を有するＮＳＣＬＣ）ことが可能となり、新たな腫瘍タイプを有する患者を含めることが可能となる。

【０５１３】

特定の配列

本明細書で言及するベクター、カセット、及び抗体を以下に記載し、配列番号で呼ぶ。

完全長ChAdVC68配列 “ChAdV68.5WTnt” (配列1);対応するATCC VR-594のヌクレオチドが５個の位置で置換されたAC_000011.1配列; ６位のW＝A または T
CCATCWTCAATAATATACCTCAAACTTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTGAATTTGGGGAGGAAGGGCGGTG
ATTGGTCGAGGGATGAGCGACCGTTAGGGGCGGGGCGAGTGACGTTTTGATGACGTGGTTGCGAGGAGGAGCCAGTTTGC
AAGTTCTCGTGGGAAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTTGAACACGGAAATACTCAATTTTCCCGCGCTCTCTGACAG
GAAATGAGGTGTTTCTGGGCGGATGCAAGTGAAAACGGGCCATTTTCGCGCGAAAACTGAATGAGGAAGTGAAAATCTGA
GTAATTTCGCGTTTATGGCAGGGAGGAGTATTTGCCGAGGGCCGAGTAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTACC
GTGTTTTTCACCTAAATTTCCGCGTACGGTGTCAAAGTCCGGTGTTTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGCCAGGGTATTTAA
ACCTGCGCTCTCCAGTCAAGAGGCCACTCTTGAGTGCCAGCGAGAAGAGTTTTCTCCTCCGCGCCGCGAGTCAGATCTAC
ACTTTGAAAGATGAGGCACCTGAGAGACCTGCCCGATGAGAAAATCATCATCGCTTCCGGGAACGAGATTCTGGAAACTGG
TGGTAAATGCCATGATGGGCGACGACCCTCCGGAGCCCCCCACCCCATTTGAGACACCTTCGCTGCACGATTTGTATGATCT
GGAGGTGGATGTGCCCGAGGACGATCCCAATGAGGAGGCGGTAAATGATTTTTTTAGCGATGCCGCGCTGCTAGCTGCCGA
GGAGGCTTCGAGCTCTAGCTCAGACAGCGACTCTTCACTGCATACCCCTAGACCCGGCAGAGGTGAGAAAAAGATCCCCG
AGCTTAAAGGGGAAGAGATGGACTTGCGCTGCTATGAGGAATGCTTGCCCCCGAGCGATGATGAGGACGAGCAGGCGATC
CAGAACGCAGCGAGCCAGGGAGTGCAAGCCGCCAGCGAGAGCTTTGCGCTGGACTGCCCGCCTCTGCCCGGACACGGCT
GTAAGTCTTGTGAATTTCATCGCATGAATACTGGAGATAAAGCTGTGTTGTGTGCACTTTGCTATATGAGAGCTTACAACCAT
TGTGTTTACAGTAAGTGTGATTAAGTTGAACTTTAGAGGGAGGCAGAGAGCAGGGTGACTGGGCGATGACTGGTTTATTTA
TGTATATATGTTCTTTATATAGGTCCCGTCTCTGACGCAGATGATGAGACCCCCACTACAAAGTCCACTTCGTCACCCCCAGA
AATTGGCACATCTCCACCTGAGAATATTGTTAGACCAGTTCCTGTTAGAGCCACTGGGAGGAGAGCAGCTGTGGAATGTTT
GGATGACTTGCTACAGGGTGGGGTTGAACCTTTGGACTTGTGTACCCGGAAACGCCCCAGGCACTAAGTGCCACACATGT
GTGTTTACTTGAGGTGATGTCAGTATTTATAGGGTGTGGAGTGCAATAAAAAATGTGTTGACTTTAAGTGCGTGGTTTATGAC
TCAGGGGTGGGGACTGTGAGTATATAAGCAGGTGCAGACCTGTGTGGTTAGCTCAGAGCGGCATGGAGATTTGGACGGTC
TTGGAAGACTTTCACAAGACTAGACAGCTGCTAGAGAACGCCTCGAACGGAGTCTCTTACCTGTGGAGATTCTGCTTCGGT
GGCGACCTAGCTAGGCTAGTCTACAGGGCCAAACAGGATTATAGTGAACAATTTGAGGTTATTTTGAGAGAGTGTTCTGGT
CTTTTTGACGCTCTTAACTTGGGCCATCAGTCTCACTTTAACCAGAGGATTTCGAGAGCCCTTGATTTTACTACTCCTGGCAG
AACCACTGCAGCAGTAGCCTTTTTTGCTTTTATTCTTGACAAATGGAGTCAAGAAACCCATTTCAGCAGGGATTACCAGCTG
GATTTCTTAGCAGTAGCTTTGTGGAGAACATGGAAGTGCCAGCGCCTGAATGCAATCTCCGGCTACTTGCCGGTACAGCCG
CTAGACACTCTGAGGATCCTGAATCTCCAGGAGAGTCCCAGGGCACGCCAACGTCGCCAGCAGCAGCAGCAGGAGGAGG
ATCAAGAAGAGAACCCGAGAGCCGGCCTGGACCCTCCGGCGGAGGAGGAGGAGTAGCTGACCTGTTTCCTGAACTGCGC
CGGGTGCTGACTAGGTCTTCGAGTGGTCGGGAGAGGGGGATTAAGCGGGAGAGGCATGATGAGACTAATCACAGAACTG
AACTGACTGTGGGTCTGATGAGTCGCAAGCGCCCAGAAACAGTGTGGTGGCATGAGGTGCAGTCGACTGGCACAGATGA
GGTGTCGGTGATGCATGAGAGGTTTTCTCTAGAACAAGTCAAGACTTGTTGGTTAGAGCCTGAGGATGATTGGGAGGTAGC
CATCAGGAATTATGCCAAGCTGGCTCTGAGGCCAGACAAGAAGTACAAGATTACTAAGCTGATAAATATCAGAAATGCCTG
CTACATCTCAGGGAATGGGGCTGAAGTGGAGATCTGTCTCCAGGAAAGGGTGGCTTTCAGATGCTGCATGATGAATATGTA
CCCGGGAGTGGTGGGCATGGATGGGGTTACCTTTATGAACATGAGGTTCAGGGGAGATGGGTATAATGGCACGGTCTTTATG
GCCAATACCAAGCTGACAGTCCATGGCTGCTCCTTCTTTGGGTTTAATAACACCTGCATCGAGGCCTGGGGTCAGGTCGGT
GTGAGGGGCTGCAGTTTTTCAGCCAACTGGATGGGGGTCGTGGGCAGGACCAAGAGTATGCTGTCCGTGAAGAAATGCTT
GTTTGAGAGGTGCCACCTGGGGGTGATGAGCGAGGGCGAAGCCAGAATCCGCCACTGCGCCTCTACCGAGACGGGCTGC
TTTGTGCTGTGCAAGGGCAATGCTAAGATCAAGCATAATATGATCTGTGGAGCCTCGGACGAGCGCGGCTACCAGATGCTG
ACCTGCGCCGGCGGGAACAGCCATATGCTGGCCACCGTACATGTGGCTTCCCATGCTCGCAAGCCCTGGCCCGAGTTCGAG
CACAATGTCATGACCAGGTGCAATATGCATCTGGGGTCCCGCCGAGGCATGTTCATGCCCTACCAGTGCAACCTGAATTATG
TGAAGGTGCTGCTGGAGCCCGATGCCATGTCCAGAGTGAGCCTGACGGGGGTGTTTGACATGAATGTGGAGGTGTGGAAG
ATTCTGAGATATGATGAATCCAAGACCAGGTGCCGAGCCTGCGAGTGCGGAGGGAAGCATGCCAGGTTCCAGCCCGTGTG
TGTGGATGTGACGGAGGACCTGCGACCCGATCATTTGGTGTTGCCCTGCACCGGGACGGAGTTCGGTTCCAGCGGGGAAG
AATCTGACTAGAGTGAGTAGTGTTCTGGGGCGGGGGAGGACCTGCATGAGGGCCAGAATAACTGAAATCTGTGCTTTTCTG
TGTGTTGCAGCAGCATGAGCGGAAGCGGCTCCTTTGAGGGAGGGGTATTCAGCCCTTATCTGACGGGGCGTCTCCCCTCCT
GGGCGGGAGTGCGTCAGAATGTGATGGGATCCACGGTGGACGGCCGGCCCGTGCAGCCCGCGAACTCTTCAACCCTGACC
TATGCAACCCTGAGCTCTTCGTCGTTGGACGCAGCTGCCGCCGCAGCTGCTGCATCTGCCGCCAGCGCCGTGCGCGGAATG
GCCATGGGCGCCGGCTACTACGGCACTCTGGTGGCCAACTCGAGTTCCACCAATAATCCCGCCAGCCTGAACGAGGAGAA
GCTGTTGCTGCTGATGGCCCAGCTCGAGGCCTTGACCCAGCGCCTGGGCGAGCTGACCCAGCAGGTGGCTCAGCTGCAGG
AGCAGACGCGGGCCGCGGTTGCCACGGTGAAATCCAAATAAAAAATGAATCAATAAATAAACGGAGACGGTTGTTGATTTT
AACACAGAGTCTGAATCTTTATTTGATTTTTCGCGCGCGGTAGGCCCTGGACCACCGGTCTCGATCATTGAGCACCCGGTGG
ATCTTTTCCAGGACCCGGTAGAGGTGGGCTTGGATGTTGAGGTACATGGGCATGAGCCCGTCCCGGGGGTGGAGGTAGCTC
CATTGCAGGGCCTCGTGCTCGGGGGTGGTGTTGTAAATCACCCAGTCATAGCAGGGGCGCAGGGCATGGTGTTGCACAATA
TCTTTGAGGAGGAGACTGATGGCCACGGGCAGCCCTTTGGTGTAGGTGTTTACAAATCTGTTGAGCTGGGAGGGATGCATG
CGGGGGGAGATGAGGTGCATCTTGGCCTGGATCTTGAGATTGGCGATGTTACCGCCCAGATCCCGCCTGGGGTTCATGTTG
TGCAGGACCACCAGCACGGTGTATCCGGTGCACTTGGGGAATTTATCATGCAACTTGGAAGGGAAGGCGTGAAAGAATTT
GGCGACGCCTTTGTGCCCGCCCAGGTTTTCCATGCACTCATCCATGATGATGGCGATGGGCCCGTGGGCGGCGGCCTGGGC
AAAGACGTTTCGGGGGTCGGACACATCATAGTTGTGGTCCTGGGTGAGGTCATCATAGGCCATTTTAATGAATTTGGGGCG
GAGGGTGCCGGACTGGGGGACAAAGGTACCCTCGATCCCGGGGGCGTAGTTCCCCTCACAGATCTGCATCTCCCAGGCTT
TGAGCTCGGAGGGGGGGATCATGTCCACCTGCGGGGCGATAAAGAACACGGTTTCCGGGGCGGGGGAGATGAGCTGGGC
CGAAAGCAAGTTCCGGAGCAGCTGGGACTTGCCGCAGCCGGTGGGGCCGTAGATGACCCCGATGACCGGCTGCAGGTGG
TAGTTGAGGGAGAGACAGCTGCCGTCCTCCCGGAGGAGGGGGGCCACCTCGTTCATCATCTCGCGCACGTGCATGTTCTC
GCGCACCAGTTCCGCCAGGAGGCGCTCTCCCCCCAGGGATAGGAGCTCCTGGAGCGAGGCGAAGTTTTTCAGCGGCTTGA
GTCCGTCGGCCATGGGCATTTTGGAGAGGGTTTGTTGCAAGAGTTCCAGGCGGTCCCAGAGCTCGGTGATGTGCTCTACGG
CATCTCGATCCAGCAGACCTCCTCGTTTCGCGGGTTGGGACGGCTGCGGGAGTAGGGCACCAGACGATGGGCGTCCAGCG
CAGCCAGGGTCCGGTCCTTCCAGGGTCGCAGCGTCCGCGTCAGGGTGGTCTCCGTCACGGTGAAGGGGTGCGCGCCGGG
CTGGGCGCTTGCGAGGGTGCGCTTCAGGCTCATCCGGCTGGTCGAAAACCGCTCCCGATCGGCGCCCTGCGCGTCGGCCA

10

20

30

40

50

GGTAGCAATTGACCATGAGTTCGTAGTTGAGCGCCTCGGCCGCGTGGCCTTTGGCGCGGAGCTTACCTTTGGAAGTCTGCC
CGCAGGCGGGACAGAGGAGGGACTTGAGGGCGTAGAGCTTGGGGGCGAGGAAGACGGACTCGGGGGCGTAGGCGTCCG
CGCCGCAGTGGGCGCAGACGGTCTCGCACTCCACGAGCCAGGTGAGGTCGGGCTGGTCGGGGTCAAAAACCAGTTTCCC
GCCGTTCTTTTTGATGCGTTTCTTACCTTTGGTCTCCATGAGCTCGTGTCCCCGCTGGGTGACAAAGAGGCTGTCCGTGTCC
CCGTAGACCGACTTTATGGGCCGGTCCTCGAGCGGTGTGCCGCGGTCCTCCTCGTAGAGGAACCCCGCCCACTCCGAGAC
GAAAGCCCGGGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCCACGTGGGACGGGTAGCGGTCGTTGTCCACCAGCGGGTCCACCTTT
TCCAGGGTATGCAAACACATGTCCCCCTCGTCCACATCCAGGAAGGTGATTGGCTTGTAAGTGTAGGCCACGTGACCGGGG
GTCCCGGCCGGGGGGGTATAAAAGGGTGCGGGTCCCTGCTCGTCCTCACTGTCTTCCGGATCGCTGTCCAGGAGCGCCAG
CTGTTGGGGTAGGTATTCCCTCTCGAAGGCGGGCATGACCTCGGCACTCAGGTTGTCAGTTTCTAGAAACGAGGAGGATTT
GATATTGACGGTGCCGGCGGAGATGCCTTTCAAGAGCCCCTCGTCCATCTGGTCAGAAAAGACGATCTTTTTGTTGTCGAG
CTTGGTGGCGAAGGAGCCGTAGAGGGCGTTGGAGAGGAGCTTGGCGATGGAGCGCATGGTCTGGTTTTTTCCTTGTCGG
CGCGCTCCTTGGCGGCGATGTTGAGCTGCACGTACTCGCGCGCCACGCACTTCCATTCGGGGAAGACGGTGGTCAGCTCG
TCGGGCACGATTCTGACCTGCCAGCCCCGATTATGCAGGGTGATGAGGTCCACACTGGTGGCCACCTCGCCGCGCAGGGG
CTCATTAGTCCAGCAGAGGCGTCCGCCCTTGCGCGAGCAGAAGGGGGGCAGGGGGTCCAGCATGACCTCGTCGGGGGGG
TCGGCATCGATGGTGAAGATGCCGGGCAGGAGGTCGGGGTCAAAGTAGCTGATGGAAGTGGCCAGATCGTCCAGGGCAG
CTTGCCATTCGCGCACGGCCAGCGCGCGCTCGTAGGGACTGAGGGGCGTGCCCCAGGGCATGGGATGGGTAAGCGCGGA
GGCGTACATGCCGCAGATGTCGTAGACGTAGAGGGGCTCCTCGAGGATGCCGATGTAGGTGGGGTAGCAGCGCCCCCCGC
GGATGCTGGCGCGCACGTAGTCATACAGCTCGTGCGAGGGGGCGAGGAGCCCCGGGCCCAGGTTGGTGCGACTGGGCTTT
TCGGCGCGGTAGACGATCTGGCGGAAAATGGCATGCGAGTTGGAGGAGATGGTGGGCCTTTGGAAGATGTTGAAGTGGGC
GTGGGGCAGTCCGACCGAGTCGCGGATGAAGTGGGCGTAGGAGTCTTGCAGCTTGGCGACGAGCTCGGCGGTGACTAGG
ACGTCCAGAGCGCAGTAGTCGAGGGTCTCCTGGATGATGTCATACTTGAGCTGTCCCTTTTGTTTCCACAGCTCGCGGTTGA
GAAGGAACTCTTCGCGGTCCTTCCAGTACTCTTCGAGGGGGAACCCGTCCTGATCTGCACGGTAAGAGCCTAGCATGTAGA
ACTGGTTGACGGCCTTGTAGGCGCAGCAGCCCTTCTCCACGGGGAGGGCGTAGGCCTGGGCGGCCTTGCGCAGGGAGGT
GTGCGTGAGGGCGAAAGTGTCCCTGACCATGACCTTGAGGAACTGGTGCTTGAAGTCGATATCGTCGCAGCCCCCCTGCTC
CCAGAGCTGGAAGTCCGTGCGCTTCTTGTAGGCGGGGTTGGGCAAAGCGAAAGTAACATCGTTGAAGAGGATCTTGCCCG
CGCGGGGCATAAAGTTGCGAGTGATGCGGAAAGGTTGGGGCACCTCGGCCCGGTTGTTGATGACCTGGGCGGCGAGCAC
GATCTCGTCGAAGCCGTTGATGTTGTGGCCCACGATGTAGAGTTCCACGAATCGCGGACGGCCCTTGACGTGGGGCAGTTT
CTTGAGCTCCTCGTAGGTGAGCTCGTCGGGGTCGCTGAGCCCGTGCTGCTCGAGCGCCCAGTCGGCGAGATGGGGGTTGG
CGCGGAGGAAGGAAGTCCAGAGATCCACGGCCAGGGCGGTTTGCAGACGGTCCCGGTACTGACGGAACTGCTGCCCGAC
GGCCATTTTTTCGGGGGTGACGCAGTAGAAGGTGCGGGGGTCCCCGTGCCAGCGATCCCATTTGAGCTGGAGGGCGAGAT
CGAGGGCGAGCTCGACGAGCCGGTCGTCCCCGGAGAGTTTCATGACCAGCATGAAGGGGACGAGCTGCTTGCCGAAGGA
CCCCATCCAGGTGTAGGTTTCCACATCGTAGGTGAGGAAGAGCCTTTCGGTGCGAGGATGCGAGCCGATGGGGAAGAACT
GGATCTCCTGCCACCAATTGGAGGAATGGCTGTTGATGTGATGGAAGTAGAAATGCCGACGGCGCGCCGAACACTCGTGCT
TGTGTTTATACAAGCGGCCACAGTGCTCGCAACGCTGCACGGGATGCACGTGCTGCACGAGCTGTACCTGAGTTCCTTTGA
CGAGGAATTTCAGTGGGAAGTGGAGTCGTGGCGCCTGCATCTCGTGCTGTACTACGTCGTGGTGGTCGGCCTGGCCCTCTT
CTGCCTCGATGGTGGTCATGCTGACGAGCCCGCGCGGGAGGCAGGTCCAGACCTCGGCGCGAGCGGGTCGGAGAGCGAG
GACGAGGGCGCGCAGGCCGGAGCTGTCCAGGGTCCTGAGACGCTGCGGAGTCAGGTCAGTGGGCAGCGGCGGCGCGCG
GTTGACTTGCAGGAGTTTTTCCAGGGCGCGCGGGAGGTCCAGATGGTACTTGATCTCCACCGCGCCATTGGTGGCGACGTC
GATGGCTTGCAGGGTCCCGTGCCCCTGGGGTGTGACCACCGTCCCCCGTTTCTTCTTGGGCGGCTGGGGCGACGGGGGCG
GTGCCTCTTCCATGGTTAGAAGCGGCGGCGAGGACGCGCGCCGGGCGGCAGGGGCGGCTCGGGGCCCGGAGGCAGGGG
CGGCAGGGGCACGTCGGCGCCGCGCGCGGGTAGGTTCTGGTACTGCGCCCGGAGAAGACTGGCGTGAGCGACGACGCGA
CGGTTGACGTCCTGGATCTGACGCCTCTGGGTGAAGGCCACGGGACCCGTGAGTTTGAACCTGAAAGAGAGTTCGACAG
AATCAATCTCGGTATCGTTGACGGCGGCCTGCCGCAGGATCTCTTGCACGTCGCCCGAGTTGTCCTGGTAGGCGATCTCGGT
CATGAACTGCTCGATCTCCTCCTCTTGAAGGTCTCCGCGGCCGGCGCGCTCCACGGTGGCCGCGAGGTCGTTGGAGATGCG
GCCCATGAGCTGCGAGAAGGCGTTCATGCCCGCCTCGTTCCAGACGCGGCTGTAGACCACGACGCCCTCGGGATCGCgGG
CGCGCATGACCACCTGGGCGAGGTTGAGCTCCACGTGGCGCGTGAAGACCGCGTAGTTGCAGAGGCGCTGGTAGAGGTA
GTTGAGCGTGGTGGCGATGTGCTCGGTGACGAAGAAATACATGATCCAGCGGCGGAGCGGCATCTCGCTGACGTCGCCCA
GCGCCTCCAAACGTTCCATGGCCTCGTAAAAGTCCACGGCGAAGTTGAAAAACTGGGAGTTGCGCGCCGAGACGGTCAA
CTCCTCCTCCAGAAGACGGATGAGCTCGGCGATGGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAGGCCCCCGGGAGTTCCTCCACTT
CCTCTTCTTCCTCCTCCACTAACATCTCTTCTACTTCCTCCTCAGGCGGCAGTGGTGGCGGGGGAGGGGGCCTGCGTCGCC
GGCGGCGCACGGGCAGACGGTCGATGAAGCGCTCGATGGTCTCGCCGCGCCGGCGTCGCATGGTCTCGGTGACGGCGCG
CCCGTCCTCGCGGGGCCGCAGCGTGAAGACGCCGCCGCGCATCTCCAGGTGGCCGGGGGGGTCCCCGTTGGGCAGGGAG
AGGGCGCTGACGATGCATCTTATCAATTGCCCCGTAGGGACTCCGCGCAAGGACCTGAGCGTCTCGAGATCCACGGGATCT
GAAAACCGCTGAACGAAGGCTTCGAGCCAGTCGCAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACGGTTTCTTCTGGCGGGTCATGTTG
GTTGGGAGCGGGGCGGGCGATGCTGCTGGTGATGAAGTTGAAATAGGCGGTTCTGAGACGGCGGATGGTGGCGAGGAGC
ACCAGGTCTTTGGGCCCGGCTTGCTGGATGCGCAGACGGTCGGCCATGCCCCAGGCGTGGTCCTGACACCTGGCCAGGTC
CTTGTAGTAGTCCTGCATGAGCCGCTCCACGGGCACCTCCTCCTCGCCCGCGCGGCCGTGCATGCGCGTGAGCCCGAAGCC
GCGCTGGGGCTGGACGAGCGCCAGGTCGGCGACGACGCGCTCGGCGAGGATGGCTTGCTGGATCTGGGTGAGGGTGGTC
TGGAAGTCATCAAAGTCGACGAAGCGGTGGTAGGCTCCGGTGTTGATGGTGTAGGAGCAGTTGGCCATGACGGACCAGTT
GACGGTCTGGTGGCCCGGACGCACGAGCTCGTGGTACTTGAGGCGCGAGTAGGCGCGCGTGTCGAAGATGTAGTCGTTGC
AGGTGCGCACCAGGTACTGGTAGCCGATGAGGAAGTGCGGCGGCGGCTGGCGGTAGAGCGGCCATCGCTCGGTGGCGGG
GGCGCCGGGCGCGAGGTCCTCGAGCATGGTGCGGTGGTAGCCGTAGATGTACCTGGACATCCAGGTGATGCCGGCGGCGG
TGGTGGAGGCGCGCGGGAACTCGCGGACGCGGTTCCAGATGTTGCGCAGCGGCAGGAAGTAGTTCATGGTGGGCACGGT
CTGGCCCGTGAGGCGCGCGCAGTCGTGGATGCTCTATACGGGCAAAAACGAAAGCGGTCAGCGGCTCGACTCCGTGGCCT
GGAGGCTAAGCGAACGGGTTGGGCTGCGCGTGTACCCCGGTTCGAATCTCGAATCAGGCTGGAGCCGCAGCTAACGTGGT
ATTGGCACTCCCGTCTCGACCCAAGCCTGCACCAACCCTCCAGGATACGGAGGCGGGTCGTTTTGCAACTTTTTTTGGAG
GCCGGATGAGACTAGTAAGCGCGGAAAGCGGCCGACCGCGATGGCTCGCTGCCGTAGTCTGGAGAAGAATCGCCAGGGT
TGCGTTGCGGTGTGCCCCGGTTCGAGGCCGGCCGGATTCCGCGGCTAACGAGGGCGTGGCTGCCCCGTCGTTTCCAAGAC

10

20

30

40

50

CCCATAGCCAGCCGACTTCTCCAGTTACGGAGCGAGCCCCTCTTTTGTTTTGTTTGTTTTTGCCAGATGCATCCCGTACTGCG
GCAGATGCGCCCCCACCACCCTCCACCGCAACAACAGCCCCCTCCACAGCCGGCGCTTCTGCCCCCGCCCCAGCAGCAAC
TTCCAGCCACGACCGCCGCGGCCGCCGTGAGCGGGGCTGGACAGAGTTATGATCACCAGCTGGCCTTGGAAGAGGGCGA
GGGGCTGGCGCGCCTGGGGGCGTCGTCGCCGGAGCGGCACCCGCGCGTGCAGATGAAAAGGGACGCTCGCGAGGCCTAC
GTGCCCAAGCAGAACCTGTTCAGAGACAGGAGCGGCGAGGAGCCCGAGGAGATGCGCGCGGCCCGGTTCCACGCGGGG
CGGGAGCTGCGGCGCGGCCTGGACCGAAAGAGGGTGCTGAGGGACGAGGATTTCGAGGCGGACGAGCTGACGGGGATC
AGCCCCGCGCGCGCGCACGTGGCCGCGGCCAACCTGGTCACGGCGTACGAGCAGACCGTGAAGGAGGAGAGCAACTTC
CAAAAATCCTTCAACAACCACGTGCGCACCCTGATCGCGCGCGAGGAGGTGACCCTGGGCCTGATGCACCTGTGGGACCT
GCTGGAGGCCATCGTGCAGAACCCCACCAGCAAGCCGCTGACGGCGCAGCTGTTCCTGGTGGTGCAGCATAGTCGGGAC
AACGAAGCGTTCAGGGAGGCGCTGCTGAATATCACCGAGCCCGAGGGCCGCTGGCTCCTGGACCTGGTGAACATTCTGCA
GAGCATCGTGGTGCAGGAGCGCGGGCTGCCGCTGTCCGAGAAGCTGGCGGCCATCAACTTCTCGGTGCTGAGTTTGGGCA
AGTACTACGCTAGGAAGATCTACAAGACCCCGTACGTGCCCATAGACAAGGAGGTGAAGATCGACGGGTTTTACATGCGCA
TGACCCTGAAAGTGCTGACCCTGAGCGACGATCTGGGGGTGTACCGCAACGACAGGATGCACCGTGCGGTGAGCGCCAG
CAGGCGGCGCGAGCTGAGCGACCAGGAGCTGATGCATAGTCTGCAGCGGGCCCTGACCGGGGCCGGGACCGAGGGGGA
GAGCTACTTTGACATGGGCGCGGACCTGCACTGGCAGCCCAGCCGCCGGGCCTTGGAGGCGGCGGCAGGACCCTACGTA
GAAGAGGTGGACGATGAGGTGGACGAGGAGGGCGAGTACCTGGAAGACTGATGGCGCGACCGTATTTTTGCTAGATGCA
ACAACAACAGCCACCTCCTGATCCCGCGATGCGGGCGGCGCTGCAGAGCCAGCCGTCCGGCATTAACTCCTCGGACGATT
GGACCCAGGCCATGCAACGCATCATGGCGCTGACGACCCGCAACCCCGAAGCCTTTAGACAGCAGCCCCAGGCCAACCG
GCTCTCGGCCATCCTGGAGGCCGTGGTGCCCTCGCGCTCCAACCCCACGCACGAGAAGGTCCTGGCCATCGTGAACGCGC
TGGTGGAGAACAAGGCCATCCGCGGCGACGAGGCCGGCCTGGTGTACAACGCGCTGCTGGAGCGCGTGGCCCGCTACAA
CAGCACCAACGTGCAGACCAACCTGGACCGCATGGTGACCGACGTGCGCGAGGCCGTGGCCCAGCGCGAGCGGTTCCAC
CGCGAGTCCAACCTGGGATCCATGGTGGCGCTGAACGCCTTCCTCAGCACCCAGCCCGCCAACGTGCCCCGGGGCCAGGA
GGACTACACCAACTTCATCAGCGCCCTGCGCCTGATGGTGACCGAGGTGCCCCAGAGCGAGGTGTACCAGTCCGGGCCGG
ACTACTTCTTCCAGACCAGTCGCCAGGGCTTGCAGACCGTGAACCTGAGCCAGGCTTTCAAGAACTTGCAGGGCCTGTGG
GGCGTGCAGGCCCCGGTCGGGGACCGCGCGACGGTGTCGAGCCTGCTGACGCCGAACTCGCGCCTGCTGCTGCTGCTGG
TGGCCCCCTTCACGGACAGCGGCAGCATCAACCGCAACTCGTACCTGGGCTACCTGATTAACCTGTACCGCGAGGCCATCG
GCCAGGCGCACGTGGACGAGCAGACCTACCAGGAGATCACCCACGTGAGCCGCGCCCTGGGCCAGGACGACCCGGGCA
ACCTGGAAGCCACCCTGAACTTTTTGCTGACCAACCGGTCGCAGAAGATCCCGCCCCAGTACGCGCTCAGCACCGAGGAG
GAGCGCATCCTGCGTTACGTGCAGCAGAGCGTGGGCCTGTTCCTGATGCAGGAGGGGGCCACCCCCAGCGCCGCGCTCGA
CATGACCGCGCGCAACATGGAGCCCAGCATGTACGCCAGCAACCGCCCGTTCATCAATAAACTGATGGACTACTTGCATCG
GGCGGCCGCCATGAACTCTGACTATTTCACCAACGCCATCCTGAATCCCCACTGGCTCCCGCCGCCGGGGTTCTACACGGG
CGAGTACGACATGCCCGACCCCAATGACGGGTTCCTGTGGGACGATGTGGACAGCAGCGTGTTCTCCCCCCGACCGGGTG
CTAACGAGCGCCCCTTGTGGAAGAAGGAAGGCAGCGACCGACGCCCGTCCTCGGCGCTGTCCGGCCGCGAGGGTGCTGC
CGCGGCGGTGCCCGAGGCCGCCAGTCCTTTCCCGAGCTTGCCCTTCTCGCTGAACAGTATCCGCAGCAGCGAGCTGGGCA
GGATCACGCGCCCGCGCTTGCTGGGCGAAGAGGAGTACTTGAATGACTCGCTGTTGAGACCCGAGCGGGAGAAGAACTT
CCCCAATAACGGGATAGAAAGCCTGGTGGACAAGATGAGCCGCTGGAAGACGTATGCGCAGGAGCACAGGGACGATCCC
CGGGCGTCGCAGGGGGCCACGAGCCGGGGCAGCGCCGCCCGTAAACGCCGGTGGCACGACAGGCAGCGGGACAGATG
TGGGACGATGAGGACTCCGCCGACGACAGCAGCGTGTTGGACTTGGGTGGGAGTGGTAACCCGTTCGCTCACCTGCGCCC
CCGTATCGGGCGCATGATGTAAGAGAAACCGAAAATAAATGATACTCACCAAGGCCATGGCGACCAGCGTGCGTTCGTTTC
TTCTCTGTTGTTGTTGTATCTAGTATGATGAGGCGTGCGTACCCGGAGGGTCCTCCTCCCTCGTACGAGAGCGTGATGCAGC
AGGCGATGGCGGCGGCGGCGATGCAGCCCCCGCTGGAGGCTCCTTACGTGCCCCCGCGGTACCTGGCGCCTACGGAGGGG
CGGAACAGCATTCGTTACTCGGAGCTGGCACCCTTGTACGATACCACCCGGTTGTACCTGGTGGACAACAAGTCGGCGGA
CATCGCCTCGCTGAACTACCAGAACGACCACAGCAACTTCCTGACCACCGTGGTGCAGAACAATGACTTCACCCCCACGG
AGGCCAGCACCCAGACCATCAACTTTGACGAGCGCTCGCGGTGGGGCGGCCAGCTGAAAACCATCATGCACACCAACATG
CCCAACGTGAACGAGTTCATGTACAGCAACAAGTTCAAGGCGCGGGTGATGGTCTCCCGCAAGACCCCCAATGGGGTGAC
AGTGACAGAGGATTATGATGGTAGTCAGGATGAGCTGAAGTATGAATGGGTGGAATTTGAGCTGCCCGAAGGCAACTTCTC
GGTGACCATGACCATCGACCTGATGAACAACGCCATCATCGACAATTACTTGGCGGTGGGGCGGCAGAACGGGGTGCTGG
AGAGCGACATCGGCGTGAAGTTCGACACTAGGAACTTCAGGCTGGGCTGGGACCCCGTGACCGAGCTGGTCATGCCCGG
GGTGTACACCAACGAGGCTTTCCATCCCGATATTGTCTTGCTGCCCGGCTGCGGGGTGGACTTCACCGAGAGCCGCCTCAG
CAACCTGCTGGGCATTCGCAAGAGGCAGCCCTTCCAGGAAGGCTTCCAGATCATGTACGAGGATCTGGAGGGGGGCAACA
TCCCCGCGCTCCTGGATGTCGACGCCTATGAGAAAAGCAAGGAGGATGCAGCAGCTGAAGCAACTGCAGCCGTAGCTACC
GCCTCTACCGAGGTCAGGGGCGATAATTTTGCAAGCGCCGCAGCAGTGGCAGCGGCCGAGGCGGCTGAAACCGAAAGTA
AGATAGTCATTCAGCCGGTGGAGAAGGATAGCAAGAACAGGAGCTACAACGTACTACCGGACAAGATAAACACCGCCTAC
CGCAGCTGGTACCTAGCCTACAACTATGGCGACCCCGAGAAGGGCGTGCGCTCCTGGACGCTGCTCACCACCTCGGACGT
CACCTGCGGCGTGGAGCAAGTCTACTGGTCGCTGCCCGACATGATGCAAGACCCGGTCACCTTCCGCTCCACGCGTCAAG
TTAGCAACTACCCGGTGGTGGGCGCCGAGCTCCTGCCCGTCTACTCCAAGAGCTTCTTCAACGAGCAGGCCGTCTACTCGC
AGCAGCTGCGCGCCTTCACCTCGCTTACGCACGTCTTCAACCGCTTCCCCGAGAACCAGATCCTCGTCCGCCCGCCCGCGC
CCACCATTACCACCGTCAGTGAAAACGTTCCTGCTCTCACAGATCACGGGACCCTGCCGCTGCGCAGCAGTATCCGGGGA
GTCCAGCGCGTGACCGTTACTGACGCCAGACGCCGCACCTGCCCCTACGTCTACAAGGCCCTGGGCATAGTCGCGCCGCG
CGTCCTCTCGAGCCGCACCTTCTAAATGTCCATTCTCATCTCGCCCAGTAATAACACCGGTTGGGGCCTGCGCGCGCCCAGC
AAGATGTACGGAGGCGCTCGCCAACGCTCCACGCAACACCCCGTGCGCGTGCGCGGGCACTTCCGCGCTCCCTGGGGCGC
CCTCAAGGGCCGCGTGCGGTCGCGCACCACCGTCGACGACGTGATCGACCAGGTGGTGGCCGACGCGCGCAACTACACC
CCCGCCGCCGCGCCCGTCTCCACCGTGGACGCCGTCATCGACAGCGTGGTGGCcGACGCGCGCCGGTACGCCCGCGCCAA
GAGCCGGCGGCGGCGCATCGCCCGGCGGCACCGGAGCACCCCCGCCATGCGCGCGGCGCGAGCCTTGCTGCGCAGGGCC
AGGCGCACGGGACGCAGGGCCATGCTCAGGGCGGCCAGACGCGCGGCTTCAGGCGCCAGCGCCGGCAGGACCCGGAGA
CGCGCGGCCACGGCGGCGGCAGCGGCCATCGCCAGCATGTCCCGCCCGCGGCGAGGGAACGTGTACTGGGTGCGCGACG
CCGCCACCGGTGTGCGCGTGCCCGTGCGCACCCGCCCCCCTCGCACTTGAAGATGTTCACTTCGCGATGTTGATGTGTCCC
AGCGGCGAGGAGGATGTCCAAGCGCAAATTCAAGGAAGAGATGCTCCAGGTCATCGCGCCTGAGATCTACGGCCCTGCGG

10

20

30

40

50

TGGTGAAGGAGGAAAGAAAGCCCCGCAAAATCAAGCGGGTCAAAAAGGACAAAAAGGAAGAAGAAAGTGATGTGGAC
GGATTGGTGGAGTTTGTGCGCGAGTTCGCCCCCCGGCGGCGCGTGCAGTGGCGCGGGCGGAAGGTGCAACCGGTGCTGA
GACCCGGCACCACCGTGGTCTTCACGCCCGGCGAGCGCTCCGGCACCGCTTCCAAGCGCTCCTACGACGAGGTGTACGGG
GATGATGATATTCTGGAGCAGGCGGCCGAGCGCCTGGGCGAGTTTGCTTACGGCAAGCGCAGCCGTTCCGCACCGAAGGA
AGAGGCGGTGTCCATCCCGCTGGACCACGGCAACCCCACGCCGAGCCTCAAGCCCGTGACCTTGCAGCAGGTGCTGCCG
ACCGCGGCGCCCGCGCCGGGGGTTCAAGCGCGAGGGCGAGGATCTGTACCCCACCATGCAGCTGATGGTGCCCAAGCGCC
AGAAGCTGGAAGACGTGCTGGAGACCATGAAGGTGGACCCGGACGTGCAGCCCGAGGTCAAGGTGCGGCCCATCAAGC
AGGTGGCCCCGGGCCTGGGCGTGCAGACCGTGGACATCAAGATTCCCACGGAGCCCATGGAAACGCAGACCGAGCCCAT
GATCAAGCCCAGCACCAGCACCATGGAGGTGCAGACGGATCCCTGGATGCCATCGGCTCCTAGTCGAAGACCCCGGCGCA
AGTACGGCGCGGCCAGCCTGCTGATGCCCAACTACGCGCTGCATCCTTCCATCATCCCCACGCCGGGCTACCGCGGCACGC
GCTTCTACCGCGGTCATACCAGCAGCCGCCGCCGCAAGACCACCACTCGCCGCCGCCGTCGCCGCACCGCCGCTGCAACC
ACCCCTGCCGCCCTGGTGCGGAGAGTGTACCGCCGCGGCCCGCGCACCTCTGACCCTGCCGCGCGCGCGCTACCACCCGAG
CATCGCCATTTAAACTTTCGCCtGCTTTGCAGATCAATGGCCCTCACATGCCGCCTTCGCGTTCCCATTACGGGCTACCGAGG
AAGAAAACCGCGCCGTAGAAGGCTGGCGGGGAACGGGATGCGTCGCCACCACCACCGGCGGCGGCGCGCCATCAGCAA
GCGGTTGGGGGGAGGCTTCCTGCCCGCGCTGATCCCCATCATCGCCGCGGCGATCGGGGCGATCCCCGGCATTGCTTCCGT
GGCGGTGCAGGCCTCTCAGCGCCACTGAGACACACTTGGAAACATCTTGTAATAAACCaATGGACTCTGACGCTCCTGGTC
CTGTGATGTGTTTTCGTAGACAGATGGAAGACATCAATTTTTCGTCCCTGGCTCCGCGACACGGCACGCGGCCGTTCATGG
GCACCTGGAGCGACATCGGCACCAGCCAACTGAACGGGGGCGCCTTCAATTGGAGCAGTCTCTGGAGCGGGCTTAAGAAT
TTCGGGTCCACGCTTAAAACCTATGGCAGCAAGGCGTGGAACAGCACCACAGGGCAGGCGCTGAGGGATAAGCTGAAAG
AGCAGAACTTCCAGCAGAAGGTGGTCGATGGGCTCGCCTCGGGCATCAACGGGGTGGTGGACCTGGCCAACCAGGCCGT
GCAGCGGCAGATCAACAGCCGCCTGGACCCGGTGCCGCCCGCCGGCTCCGTGGAGATGCCGCAGGTGGAGGAGGAGCTG
CCTCCCCTGGACAAGCGGGGCGAGAAGCGACCCCGCCCCGATGCGGAGGAGACGCTGCTGACGCACACGGACGAGCCG
CCCCCGTACGAGGAGGCGGTGAAACTGGGTCTGCCCACCACGCGGCCCATCGCGCCCCTGGCCACCGGGGTGCTGAAAC
CCGAAAAGCCCGCGACCCTGGACTTGCCTCCTCCCCAGCCTTCCCGCCCCTCTACAGTGGCTAAGCCCCTGCCGCCGGTGG
CCGTGGCCCGCGCGCGACCCGGGGGCACCGCCCGCCCTCATGCGAACTGGCAGAGCACTCTGAACAGCATCGTGGGTCTG
GGAGTGCAGAGTGTGAAGCGCCGCCGCTGCTATTAAACCTACCGTAGCGCTTAACTTGCTTGTCTGTGTGTGTATGTATTAT
GTCGCCGCCGCCGCTGTCCACCAGAAGGAGGAGTGAAGAGGCGCGTCGCCGAGTTGCAAGATGGCCACCCCATCGATGC
TGCCCCAGTGGGCGTACATGCACATCGCCGGACAGGACGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTGGTGCAGTTTGCCCGC
GCCACAGACACCTACTTCAGTCTGGGGAACAAGTTTAGGAACCCCACGGTGGCGCCCACGCACGATGTGACCACCGACCG
CAGCCAGCGGCTGACGCTGCGCTTCGTGCCCGTGGACCGCGAGGACAACACCTACTCGTACAAAGTGCGCTACACGCTGG
CCGTGGGCGACAACCGCGTGCTGGACATGGCCAGCACCTACTTTGACATCCGCGGCGTGCTGGATCGGGGCCCTAGCTTC
AAACCCTACTCCGGCACCGCCTACAACAGTCTGGCCCCCAAGGGAGCACCCAACACTTGTCAGTGGACATATAAAGCCGA
TGGTGAAACTGCCACAGAAAAAACCTATACATATGGAAATGCACCCGTGCAGGGCATTAACATCACAAAAGATGGTATTCA
ACTTGGAACTGACACCGATGATCAGCCAATCTACGCAGATAAAACCTATCAGCCTGAACCTCAAGTGGGTGATGCTGAATG
GCATGACATCACTGGTACTGATGAAAAGTATGGAGGCAGAGCTCTTAAGCCTGATACCAAAATGAAGCCTTGTTATGGTTCT
TTTGCCAAGCCTACTAATAAAGAAGGAGGTCAGGCAAATGTGAAAACAGGAACAGGCACTACTAAAGAATATGACATAGA
CATGGCTTTCTTTGACAACAGAAGTGCGGCTGCTGCTGGCCTAGCTCCAGAAATTGTTTTGTATACTGAAAATGTGGATTTG
GAAACTCCAGATACCCATATTGTATACAAAGCAGGCACAGATGACAGCAGCTCTTCTATTAATTTGGGTCAGCAAGCCATGC
CCAACAGACCTAACTACATTGGTTTCAGAGACAACTTTATCGGGCTCATGTACTACAACAGCACTGGCAATATGGGGGTGCT
GGCCGGTCAGGCTTCTCAGCTGAATGCTGTGGTTGACTTGCAAGACAGAAACACCGAGCTGTCCTACCAGCTCTTGCTTG
ACTCTCTGGGTGACAGAACCCGGTATTTCAGTATGTGGAATCAGGCGGTGGACAGCTATGATCCTGATGTGCGCATTATTGA
AAATCATGGTGTGGAGGATGAACTTCCCAACTATTGTTTCCCTCTGGATGCTGTTGGCAGAACAGATACTTATCAGGGAATT
AAGGCTAATGGAACTGATCAAACCACATGGACCAAAGATGACAGTGTCAATGATGCTAATGAGATAGGCAAGGGTAATCCA
TTCGCCATGGAAATCAACATCCAAGCCAACCTGTGGAGGAACTTCCTCTACGCCAACGTGGCCCTGTACCTGCCCGACTCT
TACAAGTACACGCCGGCCAATGTTACCCTGCCCACCAACACCAACACCTACGATTACATGAACGGCCGGGTGGTGGCGCCC
TCGCTGGTGGACTCCTACATCAACATCGGGGCGCGCTGGTCGCTGGATCCCATGGACAACGTGAACCCCTTCAACCACCAC
CGCAATGCGGGGCTGCGCTACCGCTCCATGCTCCTGGGCAACGGGCGCTACGTGCCCTTCCACATCCAGGTGCCCCAGAAA
TTTTTCGCCATCAAGAGCCTCCTGCTCCTGCCCGGGTCCTACACCTACGAGTGGAACTTCCGCAAGGACGTCAACATGATC
CTGCAGAGCTCCCTCGGCAACGACCTGCGCACGGACGGGGCCTCCATCTCCTTCACCAGCATCAACCTCTACGCCACCTTC
TTCCCCATGGCGCACAACACGGCCTCCACGCTCGAGGCCATGCTGCGCAACGACACCAACGACCAGTCCTTCAACGACTA
CCTCTCGGCGGCCAACATGCTCTACCCCATCCCGGCCAACGCCACCAACGTGCCCATCTCCATCCCCTCGCGCAAACTGGGC
CGCCTTCCGCGGCTGGTCCTTCACGCGTCTCAAGACCAAGGAGACGCCCTCGCTGGGCTCCGGGTTCGACCCCTACTTCGT
CTACTCGGGCTCCATCCCCTACCTCGACGGCACCTTCTACCTCAACCACACCTTCAAGAAGGTCTCCATCACCTTCGACTCC
TCCGTCAGCTGGCCCGGCAACGACCGGCTCCTGACGCCCAACGAGTTCGAAATCAAGCGCACCGTCGACGGCGAGGGCT
ACAACGTGGCCCAGTGCAACATGACCAAGGACTGGTTCCTGGTCCAGATGCTGGCCCACTACAACATCGGCTACCAGGGC
TTCTACGTGCCCGAGGGCTACAAGGACCGCATGTACTCCTTCTTCCGCAACTTCCAGCCCATGAGCCGCCAGGTGGTGGAC
GAGGTCAACTACAAGGACTACCAGGCCGTCACCCTGGCCTACCAGCACAACAACTCGGGCTTCGTCGGCTACCTCGCGCC
CACCATGCGCCAGGGCCAGCCCTACCCCGCCAACTACCCCTACCCGCTCATCGGCAAGAGCGCCGTCACCAGCGTCACCC
AGAAAAAGTTCCTCTGCGACAGGGTCATGTGGCGCATCCCCTTCTCCAGCAACTTCATGTCCATGGGCGCGCTCACCGACC
TCGGCCAGAACATGCTCTATGCCAACTCCGCCCACGCGCTAGACATGAATTTCGAAGTCGACCCCATGGATGAGTCCACCC
TTCTCTATGTTGTCTTCGAAGTCTTCGACGTCGTCCGAGTGCACCAGCCCCACCGCGGCGTCATCGAGGCCGTCTACCTGCG
CACCCCCTTCTCGGCCGGTAACGCCACCACCTAAGCTCTTGCTTCTTGCAAGCCATGGCCGCGGGCTCCGGCGAGCAGGA
GCTCAGGGCCATCATCCGCGACCTGGGCTGCGGGCCCTACTTCCTGGGCACCTTCGATAAGCGCTTCCCGGGATTCATGGC
CCCGCACAAGCTGGCCTGCGCCATCGTCAACACGGCCGGCCGCGAGACCGGGGGCGAGCACTGGCTGGCCTTCGCCTGG
AACCCGCGCTCGAACACCTGCTACCTCTTCGACCCCTTCGGGTTCTCGGACGAGCGCCTCAAGCAGATCTACCAGTTCGAG
TACGAGGGCCTGCTGCGCCGCAGCGCCCTGGCCACCGAGGACCGCTGCGTCACCCTGGAAAAGTCCACCCAGACCGTGC
AGGGTCCGCGCTCGGCCGCCTGCGGGCTCTTCTGCTGCATGTTCCTGCACGCCTTCGTGCACTGGCCCGACCGCCCCATGG
ACAAGAACCCCACCATGAACTTGCTGACGGGGGTGCCCAACGGCATGCTCCAGTCGCCCCAGGTGGAACCCACCCTGCGC

10 20 30 40 50

CGCAACCAGGAGGCGCTCTACCGCTTCCTCAACTCCCACTCCGCCTACTTTCGCTCCCACCGCGCGCGCATCGAGAAGGCC
ACCGCCTTCGACCGCATGAATCAAGACATGTAAACCGTGTGTGTATGTTAAATGTCTTTAATAAACAGCACTTTCATGTTACA
CATGCATCTGAGATGATTTATTTAGAAATCGAAAGGGTTCTGCCGGGTCTCGGCATGGCCCGCGGGCAGGGACACGTTGCG
GAACTGGTACTTGGCCAGCCACTTGAACTCGGGGATCAGCAGTTTGGGCAGCGGGGTGTCGGGGAAGGAGTCGGTCCAC
AGCTTCCGCGTCAGTTGCAGGGCGCCCAGCAGGTCGGGCGCGGAGATCTTGAAATCGCAGTTGGGACCCGCGTTCTGCGC
GCGGGAGTTGCGGTACACGGGGTTGCAGCACTGGAACACCATCAGGGCCGGGTGCTTCACGCTCGCCAGCACCGTCGCG
TCGGTGATGCTCTCCACGTCGAGGTCCTCGGCGTTGGCCATCCCGAAGGGGGTCATCTTGCAGGTCTGCCTTCCCATGGTG
GGCACGCACCCGGGCTTGTGGTTGCAATCGCAGTGCAGGGGGATCAGCATCATCTGGGCCTGGTCGGCGTTCATCCCCGG
GTACATGGCCTTCATGAAAGCCTCCAATTGCCTGAACGCCTGCTGGGCCTTGGCTCCCTCGGTGAAGAAGACCCCGCAGG
ACTTGCTAGAGAACTGGTTGGTGGCGCACCCGGCGTCGTGCACGCAGCAGCGCGCGTCGTTGTTGGCCAGCTGCACCACG
CTGCGCCCCCAGCGGTTCTGGGTGATCTTGGCCCGGTCGGGGTTCTCCTTCAGCGCGCGCTGCCCGTTCTCGCTCGCCACA
TCCATCTCGATCATGTGCTCCTTCTGGATCATGGTGGTCCCGTGCAGGCACCGCAGCTTGCCCTCGGCCTCGGTGCACCCGT
GCAGCCACAGCGCGCACCCGGTGCACTCCCAGTTCTTGTGGGCGATCTGGGAATGCGCGTGCACGAAGCCCTGCAGGAA
GCGGCCCATCATGGTGGTCAGGGTCTTGTTGCTAGTGAAGGTCAGCGGAATGCCGCGGTGCTCCTCGTTGATGTACAGGTG
GCAGATGCGGCGGTACACCTCGCCCTGCTCGGGCATCAGCTGGAAGTTGGCTTTCAGGTCGGTCTCCACGCGGTAGCGGT
CCATCAGCATAGTCATGATTTCCATACCCTTCTCCCAGGCCGAGACGATGGGCAGGCTCATAGGGTTCTTCACCATCATCTTA
GCGCTAGCAGCCGCGGCCAGGGGGTCGCTCTCGTCCAGGGTCTCAAAGCTCCGCTTGCCGTCCTTCTCGGTGATCCGCACC
GGGGGGTAGCTGAAGCCCACGGCCGCCAGCTCCTCCTCGGCCTGTCTTTCGTCCTCGCTGTCCTGGCTGACGTCCTGCAGG
ACCACATGCTTGGTCTTGCGGGGTTTCTTCTTGGGCGGCAGCGGCGGCGGAGATGTTGGAGATGGCGAGGGGAGCGCGA
GTTCTCGCTCACCACTACTATCTCTTCCTCTTCTTGGTCCGAGGCCACGCGGCGGTAGGTATGTCTCTTCGGGGGCAGAGGC
GGAGGCGACGGGCTCTCGCCGCCGCGACTTGGCGGATGGCTGGCAGAGCCCCTTCCGCGTTCGGGGGTGCGCTCCCGGC
GGCGCTCTGACTGACTTCCTCCGCGGCCGGCCATTGTGTTCTCCTAGGGAGGAACAACAAGCATGGAGACTCAGCCATCG
CCAACCTCGCCATCTGCCCCCACCGCCGACGAGAAGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAACCGCCCCGCCGCCCAGCC
CCGCCACCTCCGACGCGGCCGTCCCAGACATGCAAGAGATGGAGGAATCCATCGAGATTGACCTGGGCTATGTGACGCCC
GCGGAGCACGAGGAGGAGCTGGCAGTGCGCTTTTCACAAGAAGAGATACCACCAAGAACAGCCAGAGCAGGAAGCAGAG
AATGAGCAGAGTCAGGCTGGGCTCGAGCATGACGGCGACTACCTCCACCTGAGCGGGGGGGAGGACGCGCTCATCAAGC
ATCTGGCCCGGCAGGCCACCATCGTCAAGGATGCGCTGCTCGACCGCACCGAGGTGCCCCTCAGCGTGGAGGAGCTCAGC
CGCGCCTACGAGTTGAACCTCTTCTCGCCGCGCGTGCCCCCCAAGCGCCAGCCCAATGGCACCTGCGAGCCCAACCCGCG
CCTCAACTTCTACCCGGTCTTCGCGGTGCCCGAGGCCCTGGCCACCTACCACATCTTTTTCAAGAACCAAAAGATCCCCGT
CTCCTGCCGCGCCAACCGCACCCGCGCCGACGCCCTTTTCAACCTGGGTCCCGGCGCCCGCCTACCTGATATCGCCTCCTT
GGAAGAGGTTCCCAAGATCTTCGAGGGTCTGGGCAGCGACGAGACTCGGGCCGCGAACGCTCTGCAAGGAGAAGGAGG
AGAGCATGAGCACCACAGCGCCCTGGTCGAGTTGGAAGGCGACAACGCGCGGCTGGCGGTGCTCAAACGCACGGTCGA
GCTGACCCATTTCGCCTACCCGGCTCTGAACCTGCCCCCCAAAGTCATGAGCGCGGTCATGGACCAGGTGCTCATCAAGCG
CGCGTCGCCCATCTCCGAGGACGAGGGCATGCAAGACTCCGAGGAGGGCAAGCCCGTGGTCAGCGACGAGCAGCTGGCC
CGGTGGCTGGGTCCTAATGCTAGTCCCCAGAGTTTGGAAGAGCGGCGCAAACTCATGATGGCCGTGGTCCTGGTGACCGT
GGAGCTGGAGTGCCTGCGCCGCTTCTTCGCCGACGCGGAGACCCTGCGCAAGGTCGAGGAGAACCTGCACTACCTCTTCA
GGCACGGGTTCGTGCGCCAGGCCTGCAAGATCTCCAACGTGGAGCTGACCAACCTGGTCTCCTACATGGGCATCTTGCAC
GAGAACCGCCTGGGGCAGAACGTGCTGCACACCACCCTGCGCGGGGAGGCCCGGCGCGACTACATCCGCGACTGCGTCT
ACCTCTACCTCTGCCACACCTGGCAGACGGGCATGGGCGTGTGGCAGCAGTGTCTGGAGGAGCAGAACCTGAAAGAGCT
CTGCAAGCTCCTGCAGAAGAACCTCAAGGGTCTGTGGACCGGGTTCGACGAGCGCACCACCGCCTCGGACCTGGCCGAC
CTCATTTTCCCCGAGCGCCTCAGGCTGACGCTGCGCAACGGCCTGCCCGACTTTATGAGCCAAAGCATGTTGCAAAACTTT
CGCTCTTTCATCCTCGAACGCTCCGGAATCCTGCCCGCCACCTGCTCCGCGCTGCCCTCGGACTTCGTGCCGCTGACCTTCC
GCGAGTGCCCCCCGCCGCTGTGGAGCCACTGCTACCTGCTGCGCCTGGCCAACTACCTGGCCTACCACTCGGACGTGATCG
AGGACGTCAGCGGCGAGGGCCTGCTCGAGTGCCACTGCCGCTGCAACCTCTGCACGCCGCACCGCTCCCTGGCCTGCAAC
CCCCAGCTGCTGAGCGAGACCCAGATCATCGGCACCTTCGAGTTGCAAGGGCCCAGCGAAGGCGAGGGTTCAGCCGCCA
AGGGGGGTCTGAAACTCACCCCGGGGCTGTGGACCTCGGCCTACTTGCGCAAGTTCGTGCCCGAGGACTACCATCCCTTC
GAGATCAGGTTCTACGAGGACCAATCCCATCCGCCCAAGGCCGAGCTGTCGGCCTGCGTCATCACCCAGGGGGCGATCCT
GGCCCAATTGCAAGCCATCCAGAAATCCCGCCAAGAATTCTTGCTGAAAAAGGGCCGCGGGGTCTACCTCGACCCCCAGA
CCGGTGAGGAGCTCAACCCCGGCTTCCCCCAGGATGCCCCGAGGAAACAAGAAGCTGAAAGTGGAGCTGCCGCCCGTGG
AGGATTTGGAGGAAGACTGGGAGAACAGCAGTCAGGCAGAGGAGGAGGAGATGGAGGAAGACTGGGACAGCACTCAG
GCAGAGGAGGACAGCCTGCAAGACAGTCTGGAGGAAGACGAGGAGGAGGCAGAGGAGGAGGTGGAAGAAGCAGCCGC
CGCCAGACCGTCGTCCTCGGCGGGGGAGAAAGCAAGCAGCACGGATACCATCTCCGCTCCGGGTCGGGGTCCCGCTCGA
CCACACAGTAGATGGGACGAGACCGGACGATTCCCGAACCCCACCACCCAGACCGGTAAGAAGGAGCGGCAGGGATACA
AGTCCTGGCGGGGGCACAAAAACGCCATCGTCTCCTGCTTGCAGGCCTGCGGGGGCAACATCTCCTTCACCCGGCGCTAC
CTGCTCTTCCACCGCGGGGTGAACTTTCCCCGCAACATCTTGCATTACTACCGTCACCTCCACAGCCCCTACTACTTCCAAG
AAGAGGCAGCAGCAGCAGAAAAAGACCAGCAGAAAACCAGCAGCTAGAAAATCCACAGCGGCGGCAGCAGGTGGACT
GAGGATCGCGGCGAACGAGCCGGCGCAAACCCGGGAGCTGAGGAACCGGATCTTTCCCACCCTCTATGCCATCTTCCAGC
AGAGTCGGGGGCAGGAGCAGGAACTGAAAGTCAAGAACCGTTCTCTGCGCTCGCTCACCCGCAGTTGTCTGTATCACAA
GAGCGAAGACCAACTTCAGCGCACTCTCGAGGACGCCGAGGCTCTCTTCAACAAGTACTGCGCGCTCACTCTTAAAGAGT
AGCCCGCGCCCGCCCAGTCGCAGAAAAAGGCGGGAATTACGTCACCTGTGCCCTTCGCCCTAGCCGCCTCCACCCATCATC
ATGAGCAAAGAGATTCCCACGCCTTACATGTGGAGCTACCAGCCCCAGATGGGCCTGGCCGCCGGTGCCGCCCAGGACTA
CTCCACCCGCATGAATTGGCTCAGCGCCGGGCCCGCGATGATCTCACGGGTGAATGACATCCGCGCCCACCGAAACCAGAT
ACTCCTAGAACAGTCAGCGCTCACCGCCACGCCCCGCAATCACCTCAATCCGCGTAATTGGCCCGCCGCCCTGGTGTACCA
GGAAATTCCCCAGCCCACGACCGTACTACTTCCGCGAGACGCCCAGGCCGAAGTCCAGCTGACTAACTCAGGTGTCCAGC
TGGCGGGCGGCGCCACCCTGTGTCGTCACCGCCCCGCTCAGGGTATAAAGCGGCTGGTGATCCGGGGCAGAGGCACACAG
CTCAACGACGAGGTGGTGAGCTCTTCGCTGGGTCTGCGACCTGACGGAGTCTTCCAACTCGCCGGATCGGGGAGATCTTC
CTTCACGCCTCGTCAGGCCGTCCTGACTTTGGAGAGTTCGTCCTCGCAGCCCCGCTCGGGTGGCATCGGCACTCTCCAGTT
CGTGGAGGAGTTCACTCCCTCGGTCTACTTCAACCCCTTCTCCGGCTCCCCCGGCCACTACCCGGACGAGTTCATCCCGAA

50

CTTCGACGCCATCAGCGAGTCGGTGGACGGCTACGATTGAATGTCCCATGGTGGCGCAGCTGACCTAGCTCGGCTTCGACA
CCTGGACCACTGCCGCCGCTTCCGCTGCTTCGCTCGGGATCTCGCCGAGTTTGCCTACTTTGAGCTGCCCGAGGAGCACCC
TCAGGGCCCGGCCCACGGAGTGCGGATCGTCGTCGAAGGGGGCCTCGACTCCCACCTGCTTCGGATCTTCAGCCAGCGTC
CGATCCTGGTCGAGCGCGAGCAAGGACAGACCCTTCTGACTCTGTACTGCATCTGCAACCACCCCGGCCTGCATGAAAGT
CTTTGTTGTCTGCTGTGTACTGAGTATAATAAAAGCTGAGATCAGCGACTACTCCGGACTTCCGTGTGTTCCTGAATCCATCA
ACCAGTCTTTGTTCTTCACCGGGAACGAGACCGAGCTCCAGCTCCAGTGTAAGCCCCACAAGAAGTACCTCACCTGGCTG
TTCCAGGGCTCCCCGATCGCCGTTGTCAACCACTGCGACAACGACGGAGTCCTGCTGAGCGGCCCTGCCAACCTTACTTTT
TCCACCCGCAGAAGCAAGCTCCAGCTCTTCCAACCCTTCCTCCCCGGGACCTATCAGTGCGTCTCGGGACCCTGCCATCAC
ACCTTCCACCTGATCCCGAATACCACAGCGTCGCTCCCCGCTACTAACAACCAAACTAACCTCCACCAACGCCACCGTCGC
GACCTTTCTGAATCTAATACTACCACCCACACCGGAGGTGAGCTCCGAGGTCAACCAACCTCTGGGATTTACTACGGCCCC
TGGGAGGTGGTTGGGTTAATAGCGCTAGGCCTAGTTGCGGGTGGGCTTTTGGTTCTCTGCTACCTATACCTCCCTTGCTGTTC
GTACTTAGTGGTGCTGTGTTGCTGGTTTAAGAAATGGGGAAGATCACCCTAGTGAGCTGCGGTGCGCTGGTGGCGGTGTTG
CTTTCGATTGTGGGACTGGGCGGTGCGGCTGTAGTGAAGGAGAAGGCCGATCCCTGCTTGCATTTCAATCCCAACAAATGC
CAGCTGAGTTTTCAGCCCGATGGCAATCGGTGCGCGGTACTGATCAAGTGCGGATGGGAATGCGAGAACGTGAGAATCGA
GTACAATAACAAGACTCGGAACAATACTCTCGCGTCCGTGTGGCAGCCCGGGGACCCCGAGTGGTACACCGTCTCTGTCCC
CGGTGCTGACGGCTCCCCGCGCACCGTGAATAATACTTTCATTTTTGCGCACATGTGCGACACGGTCATGTGGATGAGCAA
GCAGTACGATATGTGGCCCCCCACGAAGGAGAACATCGTGGTCTTCTCCATCGCTTACAGCCTGTGCACGGCGCTAATCAC
CGCTATCGTGTGCCTGAGCATTCACATGCTCATCGCTATTCGCCCCAGAAATAATGCCGAAAAAGAAAAACAGCCATAACGT
TTTTTTTCACACCTTTTTCAGACCATGGCCTCTGTTAAATTTTTGCTTTTATTTGCCAGTCTCATTGCCGTCATTCATGGAATGA
GTAATGAGAAAATTACTATTTACACTGGCACTAATCACACATTGAAAGGTCCAGAAAAAGCCACAGAAGTTTCATGGTATTG
TTATTTTAATGAATCAGATGTATCTACTGAACTCTGTGGAAACAATAACAAAAAAAATGAGAGCATTACTCTCATCAAGTTTC
AATGTGGATCTGACTTAACCCTAATTAACATCACTAGAGACTATGTAGGTATGTATTATGGAACTACAGCAGGCATTTCGGAC
ATGGAATTTTATCAAGTTTCTGTGTCTGAACCCACCACGCCTAGAATGACCACAACCACAAAAACTACACCTGTTACCACTA
TGCAGCTCACTACCAATAACATTTTTGCCATGCGTCAAATGGTCAACAATAGCACTCAACCCACCCCACCCAGTGAGGAAA
TTCCCAAATCCATGATTGGCATTATTGTTGCTGTAGTGGTGTGCATGTTGATCATCGCCTTGTGCATGGTGTACTATGCCTTCT
GCTACAGAAAGCACAGACTGAACGACAAGCTGGAACACTTACTAAGTGTTGAATTTTAATTTTTTAGAACCATGAAGATCC
TAGGCCTTTTAATTTTTTCTATCATTACCTCTGCTCTATGCAATTCTGACAATGAGGACGTTACTGTCGTTGTCGGATCAAATTA
TACACTGAAAGGTCCAGCGAAGGGTATGCTTTCGTGGTATTGCTATTTTGGATCTGACACTACAGAAACTGAATTATGCAAT
CTTAAGAATGGCAAAATTCAAAATTCTAAAATTAACAATTATATATGCAATGGTACTGATCTGATACTCCTCAATATCACGAAA
TCATATGCTGGCAGTTACACCTGCCCTGGAGATGATGCTGACAGTATGATTTTTTACAAAGTAACTGTTGTTGATCCCACTAC
TCCACCTCCACCCACCACAACTACTCACACCACACACACAGATCAAACCGCAGCAGAGGAGGCAGCAAAGTTAGCCTTG
CAGGTCCAAGACAGTTCATTTGTTGGCATTACCCCTACACCTGATCAGCGGTGTCCGGGGCTGCTAGTCAGCGGCATTGTC
GGTGTGCTTTCGGGATTAGCAGTCATAATCATCTGCATGTTCATTTTTGCTTGCTGCTATAGAAGGCTTTACCGACAAAAATC
AGACCCACTGCTGAACCTCTATGTTTAATTTTTTCCAGAGTCATGAAGGCAGTTAGCGCTCTAGTTTTTTGTTCTTTGATTGG
CATTGTTTTTTGCAATCCTATTCCTAAAGTTAGCTTTATTAAAGATGTGAATGTTACTGAGGGGGGCAATGTGACACTGGTAG
GTGTAGAGGGTGCTGAAAACACCACCTGGACAAAATACCACCTCAATGGGTGGAAAGATATTTGCAATTGGAGTGTATTAG
TTTATACATGTGAGGGAGTTAATCTTACCATTGTCAATGCCACCTCAGCTCAAAATGGTAGAATTCAAGGACAAAGTGTCAG
TGTATCTAATGGGTATTTACCCAACATACTTTTATCTATGACGTTAAAGTCATACCACTGCCTACGCCTAGCCCACCTAGCAC
TACCACACAGACAACCCACACTACACAGACAACCACATACAGTACATTAAATCAGCCTACCACCACTACAGCAGCAGAGG
TTGCCAGCTCGTCTGGGGTCCGAGTGGCATTTTTGATGTGGGCCCCATCTAGCAGTCCCACTGCTAGTACCAATGAGCAGA
CTACTGAATTTTTGTCCACTGTCGAGAGCCACACCACAGCTACCTCCAGTGCCTTCTCTAGCACCGCCAATCTCTCCTCGCT
TTCCTCTACACCAATCAGTCCCGCTACTACTCCTAGCCCCGCTCCTCTTCCCACTCCCCTGAAGCAAACAGACGGCGGCATG
CAATGGCAGATCACCCTGCTCATTGTGATCGGGTTGGTCATCCTGGCCGTGTTGCTCTACTACATCTTCTGCCGCCGCATTCC
CAACGCGCACCGCAAGCCGGTCTACAAGCCCATCATTGTCGGGCAGCCGGAGCCGCTTCAGGTGGAAGGGGGTCTAAGG
AATCTTCTCTTCTCTTTTACAGTATGGTGATTGAACTATGATTCCTAGACAATTCTTGATCACTATTCTTATCTGCCTCCTCCAA
GTCTGTGCCACCCTCGCTCTGGTGGCCAACGCCAGTCCAGACTGTATTGGGCCCTTCGCCTCCTACGTGCTCTTTGCCTTCA
CCACCTGCATCTGCTGCTGTAGCATAGTCTGCCTGCTTATCACCTTCTTCCAGTTCATTGACTGGATCTTTGTGCGCATCGCCT
ACCTGCGCCACCACCCCCAGTACCGCGACCAGCGAGTGGCGCGGCTGCTCAGGCTCCTCTGATAAGCATGCGGGCTCTGCT
ACTTCTCGCGCTTCTGCTGTTAGTGCTCCCCCGTCCCGTCGACCCCCGGTCCCCCACCCAGTCCCCCGAGGAGGTCCGCAA
ATGCAAATTCCAAGAACCCTGGAAATTCCTCAAATGCTACCGCCAAAAATCAGACATGCATCCCAGCTGGATCATGATCATT
GGGATCGTGAACATTCTGGCCTGCACCCTCATCTCCTTTGTGATTTACCCCTGCTTTGACTTTGGTTGGAACTCGCCAGAGG
CGCTCTATCTCCCGCCTGAACCTGACACACCACCACAGCAACCTCAGGCACACGCACTACCACCACTACAGCCTAGGCCA
CAATACATGCCCATATTAGACTATGAGGCCGAGCCACAGCGACCCATGCTCCCCGCTATTAGTTACTTCAATCTAACCGGCGG
AGATGACTGACCCACTGGCCAACAACAACGTCAACGACCTTCTCCTGGACATGGACGGCCGCGCCTCGGAGCAGCGACTC
GCCCAACTTCGCATTCGCCAGCAGCAGGAGAGAGCCGTCAAGGAGCTGCAGGATGCGGTGGCCATCCACCAGTGCAAGA
GAGGCATCTTCTGCCTGGTGAAACAGGCCAAGATCTCCTACGAGGTCACTCCAAACGACCATCGCCTCTCCTACGAGCTCC
TGCAGCAGCGCCAGAAGTTCACCTGCCTGGTCGGAGTCAACCCCATCGTCATCACCCAGCAGTCTGGCGATACCAAGGGG
TGCATCCACTGCTCCTGCGACTCCCCCGACTGCGTCCACACTCTGATCAAGACCCTCTGCGGCCTCCGCGACCTCCTCCCCA
TGAACTAATCACCCCCTTATCCAGTGAAATAAAGATCATATTGATGATGATTTTACAGAAATAAAAAATAATCATTTGATTTGA
AATAAAGATACAATCATATTGATGATTTGAGTTTAACAAAAAAATAAAGAATCACTTACTTGAAATCTGATACCAGGTCTCTG
TCCATGTTTTCTGCCAACACCACTTCACTCCCCTCTTCCCAGCTCTGGTACTGCAGGCCCCGGCGGGCTGCAAACTTCCTCC
ACACGCTGAAGGGGATGTCAAATTCCTCCTGTCCCTCAATCTTCATTTTATCTTCTATCAGATGTCCAAAAAGCGCGTCCGG
GTGGATGATGACTTCGACCCCGTCTACCCCTACGATGCAGACAACGCACCGACCGTGCCCTTCATCAACCCCCCCTTCGTCT
CTTCAGATGGATTCCAAGAGAAGCCCCTGGGGGTGTTGTCCCTGCGACTGGCCGACCCCGTCACCACCAAGAACGGGGAA
ATCACCCTCAAGCTGGGAGAGGGGGTGGACCTCGATTCCTCGGGAAAACTCATCTCCAACACGGCCACCAAGGCCGCCGC
CCCTCTCAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCCTTAACATGGATCACCCCTTTTACACTAAAGATGGAAAATTATCCTTACAAG
TTTCTCCACCATTAAATATACTGAGAACAAGCATTCTAAACACACTAGCTTTAGGTTTTGGATCAGGTTTAGGACTCCGTGGC
TCTGCCTTGGCAGTACAGTTAGTCTCTCCACTTACATTTGATACTGATGGAAACATAAAGCTTACCTTAGACAGAGGTTTGCA

10

20

30

40

50

TGTTACAACAGGAGATGCAATTGAAAGCAACATAAGCTGGGCTAAAGGTTTAAAATTTGAAGATGGAGCCATAGCAACCA ACATTGGAAATGGGTTAGAGTTTGGAAGCAGTAGTACAGAAACAGGTGTTGATGATGCTTACCCAATCCAAGTTAAACTTG GATCTGGCCTTAGCTTTGACAGTACAGGAGCCATAATGGCTGGTAACAAAGAAGACGATAAACTCACTTTGTGGACAACAC CTGATCCATCACCAAACTGTCAAATACTCGCAGAAAATGATGCAAAACTAACACTTTGCTTGACTAAATGTGGTAGTCAAAT ACTGGCCACTGTGTCAGTCTTAGTTGTAGGAAGTGGAAACCTAAACCCCATTACTGGCACCGTAAGCAGTGCTCAGGTGTT TCTACGTTTTGATGCAAACGGTGTTCTTTTAACAGAACATTCTACACTAAAAAAATACTGGGGGTATAGGCAGGGAGATAGC ATAGATGGCACTCCATATACCAATGCTGTAGGATTCATGCCCAATTTAAAAGCTTATCCAAAGTCACAAAGTTCTACTACTAA AAATAATATAGTAGGGCAAGTATACATGAATGGAGATGTTTCAAAACCTATGCTTCTCACTATAACCCTCAATGGTACTGATG ACAGCAACAGTACATATTCAATGTCATTTTCATACACCTGGACTAATGGAAGCTATGTTGGAGCAACATTTGGGGCTAACTCT TATACCTTCTCATACATCGCCCAAGAATGAACACTGTATCCCACCCTGCATGCCAACCCTTCCCACCCCACTCTGTGGAACA AACTCTGAAACACAAAATAAAATAAAGTTCAAGTGTTTTATTGATTCAACAGTTTTACAGGATTCGAGCAGTTATTTTTCCTC CACCCTCCCAGGACATGGAATACACCACCCTCTCCCCCCCGCACAGCCTTGAACATCTGAATGCCATTGGTGATGGACATGCT TTTGGTCTCCACGTTCCACACAGTTTCAGAGCGAGCCAGTCTCGGGTCGGTCAGGGAGATGAAACCCTCCGGGCACTCCC GCATCTGCACCTCACAGCTCAACAGCTGAGGATTGTCCTCGGTGGTCGGGATCACGGTTATCTGGAAGAAGCAGAAGAGC GGCGGTGGGAATCATAGTCCGCGAACGGGATCGGCCGGTGGTGTCGCATCAGGCCCCGCAGCAGTCGCTGCCGCCGCCGC TCCGTCAAGCTGCTGCTCAGGGGGTCCGGGTCCAGGGACTCCCTCAGCATGATGCCCACGGCCCTCAGCATCAGTCGTCTG GTGCGGCGGGCGCAGCAGCGCATGCGGATCTCGCTCAGGTCGCTGCAGTACGTGCAACACAGAACCACCAGGTTGTTCAA CAGTCCATAGTTCAACACGCTCCAGCCGAAACTCATCGCGGGAAGGATGCTACCCACGTGGCCGTCGTACCAGATCCTCAG GTAAATCAAGTGGTGCCCCCTCCAGAACACGCTGCCCACGTACATGATCTCCTTGGGCATGTGGCGGTTCACCACCTCCCG GTACCACATCACCCTCTGGTTGAACATGCAGCCCCGGATGATCCTGCGGAACCACAGGGCCAGCACCGCCCCGCCCGCCAT GCAGCGAAGAGACCCCGGGTCCCGGCAATGGCAATGGAGGACCCACCGCTCGTACCCGTGGATCATCTGGGAGCTGAAC AAGTCTATGTTGGCACAGCACAGGCATATGCTCATGCATCTCTTCAGCACTCTCAACTCCTCGGGGGTCAAAACCATATCCC AGGGCACGGGGAACTCTTGCAGGACAGCGAACCCCGCAGAACAGGGCAATCCTCGCACAGAACTTACATTGTGCATGGA CAGGGTATCGCAATCAGGCAGCACCGGGTGATCCTCCACCAGAGAAGCGCGGGTCTCGGTCTCCTCACAGCGTGGTAAGG GGGCCGGCCGATACGGGTGATGGCGGGACGCGGCTGATCGTGTTCGCGACCGTGTCATGATGCAGTTGCTTTCGGACATTT TCGTACTTGCTGTAGCAGAACCTGGTCCGGGCGCTGCACACCGATCGCCGGCGGCGGTCTCGGCGCTTGGAACGCTCGGT GTTGAAATTGTAAAACAGCCACTCTCTCAGACCGTGCAGCAGATCTAGGGCCTCAGGAGTGATGAAGATCCCATCATGCCT GATGGCTCTGATCACATCGACCACCGTGGAATGGGCCAGACCCAGCCAGATGATGCAATTTTGTTGGGTTTCGGTGACGGC GGGGGAGGGAAGAACAGGAAGAACCATGATTAACTTTTAATCCAAACGGTCTCGGAGTACTTCAAAATGAAGATCGCGGA GATGGCACCTCTCGCCCCCCGCTGTGTTGGTGGAAAATAACAGCCAGGTCAAAGGTGATACGGTTCTCGAGATGTTCCACGG TGGCTTCCAGCAAAGCCTCCACGCGCACATCCAGAAACAAGACAATAGCGAAAGCGGGAGGGTTCTCTAATTCCTCAATC ATCATGTTACACTCCTGCACCATCCCCAGATAATTTTCATTTTTCCAGCCTTGAATGATTCGAACTAGTTCcTGAGGTAAATCC AAGCCAGCCATGATAAAGAGCTCGCGCAGAGCGCCCTCCACCGGCATTCTTAAGCACACCCTCATAATTCCAAGATATTCTG CTCCTGGTTCACCTGCAGCAGATTGACAAGCGGAATATCAAAATCTCTGCCGCGATCCCTGAGCTCCTCCCTCAGCAATAAC TGTAAGTACTCTTTCATATCCTCTCCGAAATTTTTAGCCATAGGACCACCAGGAATAAGATTAGGGCAAGCCACAGTACAGAT AAACCGAAGTCCTCCCCAGTGAGCATTGCCAAATGCAAGACTGCTATAAGCATGCTGGCTAGACCCGGTGATATCTTCCAG ATAACTGGACAGAAAATCGCCCAGGCAATTTTTAAGAAAATCAACAAAAGAAAAATCCTCCAGGTGGACGTTTAGAGCCT CGGGAACAACGATGAAGTAAATGCAAGCGGTGCGTTCCAGCATGGTTAGTTAGCTGATCTGTAGAAAAAACAAAAATGAA CATTAAACCATGCTAGCCTGGCGAACAGGTGGGTAAATCGTTCTCTCCAGCACCAGGCAGGCCACGGGGTCTCCGGCGCG ACCCTCGTAAAAATTGTCGCTATGATTGAAAACCATCACAGAGAGACGTTCCCGGTGGCCGGCGTGAATGATTCGACAAGA TGAATACACCCCCGGAACATTGGCGTCCGCGAGTGAAAAAAAGCGCCCGAGGAAGCAATAAGGCACTACAATGCTCAGTC TCAAGTCCAGCAAAGCGATGCCATGCGGATGAAGCACAAAATTCTCAGGTGCGTACAAAATGTAATTACTCCCCTCCTGCA CAGGCAGCAAAGCCCCCGATCCCTCCAGGTACACATACAAAGCCTCAGCGTCCATAGCTTACCGAGCAGCAGCACACAAC AGGCGCAAGAGTCAGAGAAAGGCTGAGCTCTAACCTGTCCACCCGCTCTCTGCTCAATATATAGCCCAGATCTACACTGAC GTAAAGGCCAAAGTCTAAAAATACCCGCCAAATAATCACACACGCCCAGCACACGCCCAGAAACCGGTGACACACTCAA AAAAATACGCGCACTTCCTCAAACGCCCAAAACTGCCGTCATTTCCGGGTTCCCACGCTACGTCATCAAAACACGACTTTC AAATTCCGTCGACCGTTAAAAACGTCACCCGCCCCGCCCCTAACGGTCGCCCGTCTCTCAGCCAATCAGCGCCCCGCATCC CCAAATTCAAACACCTCATTTGCATATTAACGCGCACAAAAAGTTTGAGGTATATTATTGATGATGG
トレメリムマブVL(配列番号16)
トレメリムマブ VH(配列番号17)
トレメリムマブ VH CDR1 (配列番号18)
トレメリムマブ VH CDR2 (配列番号19)
トレメリムマブ VH CDR3 (配列番号20)
トレメリムマブ VL CDR1 (配列番号21)
トレメリムマブ VL CDR2 (配列番号22)
トレメリムマブ VL CDR3 (配列番号23)
デュルバルマブ(MEDI4736) VL (配列番号 24)
MEDI4736 VH (配列番号 25)
MEDI4736 VH CDR1 (配列番号 26)
MEDI4736 VH CDR2 (配列番号 27)
MEDI4736 VH CDR3 (配列番号 28)
MEDI4736 VL CDR1 (配列番号29)
MEDI4736 VL CDR2 (配列番号30)
MEDI4736 VL CDR3 (配列番号31)

UbA76-25 マーPDTT ヌクレオチド (配列番号 32)
UbA76-25マーPDTT polypeptide (配列番号33)
MAG-25マーPDTT ヌクレオチド (配列番号34)
MAG-25マーPDTT polypeptide (配列番号35)
Ub7625マーPDTT_NoSFL ヌクレオチド (配列番号36)
Ub7625マーPDTT_NoSFL polypeptide (配列番号37)
ChAdV68.5WTnt.MAG25マー (配列番号2); E1 (nt 577〜3403) 及びE3 (nt 27,125〜31,825) 配列を欠失させた AC_000011.1; 対応するATCC VR-594のヌクレオチドが５個の位置で置換されている; モデル新生抗原カセットは欠失させたＥ１の代わりに挿入されたCMVプロモーター／エンハンサーの制御下にある;カセットの３’ に SV40 のpolyA
ベネズエラウマ脳炎ウイルス[VEE] (配列番号 3) GenBank: L01442.2
VEE-MAG25マー (配列番号4); MAG-25マーPDTT ヌクレオチドを含む (塩基 30〜1755)
ベネズエラウマ脳炎ウイルス TC-83 株 [TC-83](配列番号 5) GenBank: L01443.1
VEE 送達ベクター(配列番号 6);ヌクレオチド 7544〜11175 を欠失させた VEE ゲノム [アルファウイルス構造タンパク質を除去した]
TC-83 送達ベクター(配列番号 7);ヌクレオチド 7544〜11175 を欠失させた TC-83 ゲノム [アルファウイルス構造タンパク質を除去した]
VEE 生産ベクター (配列番号 8); ヌクレオチド 7544〜11175 を欠失させた VEE ゲノム＋5’ T7 プロモーター＋3’ 制限部位
TC-83 生産ベクター(配列番号 9); ヌクレオチド 7544〜11175 を欠失させた TC-83 ゲノム＋ 5’ T7 プロモーター＋ 3’ 制限部位
VEE-UbAAV (配列番号14); MHC class I マウス腫瘍エピトープSIINFEKL (配列番号72)及びAH1-A5を挿入したVEE送達ベクター
VEE-ルシフェラーゼ(配列番号15); 7545にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したVEE送達ベクター
ユビキチン(配列番号 38)>UbG76 0-228
ユビキチン A76 (配列番号 39)>UbA76 0-228
HLA-A2 (MHC クラス I) シグナルペプチド(配列番号 40)>MHC SignalPep 0-78
HLA-A2 (MHC クラス I) 膜貫通ドメイン (配列番号 41)>HLA A2 TM ドメイン 0-201
IgK リーダー配列(配列番号 42)>IgK リーダー配列 0-60
ヒト DC Lamp (配列番号 43)>ヒト DCLAMP 0-3178
マウス LAMP1 (配列番号 44)>マウス Lamp1 0-1858
ヒト Lamp1 cDNA (配列番号 45)> ヒト Lamp1 0-2339
破傷風毒素の核酸配列(配列番号 46)
破傷風毒素のアミノ酸配列(配列番号 47)
PADRE 核酸配列(配列番号 48)
PADRE アミノ酸配列 (配列番号 49)
WPRE (配列番号 50)>WPRE 0〜593
IRES (配列番号 51)>eGFP_IRES_SEAP_Insert 1746〜2335
GFP (配列番号 52)
SEAP (配列番号 53)
ホタルルシフェラーゼ(配列番号 54)
FMDV 2A (配列番号 55)
ChAdV68-MAG-E4deleted (配列番号 57)
CATCaTCAATAATATACCTCAAACTTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTGAATTTGGGGAGGA AGGGCGGTGATTGGTCGAGGGATGAGCGACCGTTAGGGGCGGGGCGAGTGACGTTTTGATGACGTGGTT GCGAGGAGGAGCCAGTTTGCAAGTTCTCGTGGGAAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTTGAACACG GAAATACTCAATTTTCCCGCGCTCTCTGACAGGAAATGAGGTGTTTCTGGGCGGATGCAAGTGAAAACGG GCCATTTTCGCGCGAAAACTGAATGAGGAAGTGAAAATCTGAGTAATTTCGCGTTTATGGCAGGGAGGAG TATTTGCCGAGGGCCGAGTAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTACCGTGTTTTTCACCTAAATT TCCGCGTACGGTGTCAAAGTCCGGTGTTTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGCCAGGGTATTTAAACCTGCG CTCTCCAGTCAAGAGGCCACTCTTGAGTGCCAGCGAGAAGAGTTTTCTCCTCCGCGCCGCGAGTCAGATC TACACTTTGAAAGTAGGGATAACAGGGTAATgacattgattattgactagttGttaaTAGTAATCAATTACGGGGTCATTAG TTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAAC GACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACG TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGC

CCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTT
CCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGgTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATG
GGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTT
TGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTA
GGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAgcTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAACGCCATC
CACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACAGCGATCGCGccaccATGGCCGGGATGTTCCAGGCACTGTCCGAA
GGCTGCACACCCTATGATATTAACCAGATGCTGAATGTCCTGGGAGACCACCAGGTCTCTGGCCTGGAGC
AGCTGGAGAGCATCATCAACTTCGAGAAGCTGACCGAGTGGACAAGCTCCAATGTGATGCCTATCCTGTC
CCCACTGACCAAGGGCATCCTGGGCTTCGTGTTTACCCTGACAGTGCCTTCTGAGCGGGGCCTGTCTTGC
ATCAGCGAGGCAGACGCAACCACACCAGAGTCCGCCAATCTGGGCGAGGAGATCCTGTCTCAGCTGTAC
CTGTGGCCCCGGGTGACATATCACTCCCCTTCTTACGCCTATCACCAGTTCGAGCGGAGAGCCAAGTACA
AGAGACACTTCCCAGGCTTTGGCCAGTCTCTGCTGTTCGGCTACCCCGTGTACGTGTTCGGCGATTGCGTG
CAGGGCGACTGGGATGCCATCCGGTTTAGATACTGCGCACCACCTGGATATGCACTGCTGAGGTGTAACG
ACACCAATTATTCCGCCCTGCTGGCAGTGGGCGCCCTGGAGGGCCCTCGCAATCAGGATTGGCTGGGCGT
GCCAAGGCAGCTGGTGACACGCATGCAGGCCATCCAGAACGCAGGCCTGTGCACCCTGGTGGCAATGCT
GGAGGAGACAATCTTCTGGCTGCAGGCCTTTCTGATGGCCCTGACCGACAGCGGCCCCAAGACAAACAT
CATCGTGGATTCCCAGTACGTGATGGGCATCTCCAAGCCTTCTTTCCAGGAGTTTGTGGACTGGGAGAAC
GTGAGCCCAGAGCTGAATTCCACCGATCAGCCATTCTGGCAGGCAGGAATCCTGGCAAGGAACCTGGTG
CCTATGGTGGCCACAGTGCAGGGCCAGAATCTGAAGTACCAGGGCCAGAGCCTGGTCATCAGCGCCTCCA
TCATCGTGTTTAACCTGCTGGAGCTGGAGGGCGACTATCGGGACGATGGCAACGTGTGGGTGCACACCCC
ACTGAGCCCCAGAACACTGAACGCCTGGGTGAAGGCCGTGGAGGAGAAGAAGGGCATCCCAGTGCACC
TGGAGCTGGCCTCCATGACCAATATGGAGCTGATGTCTAGCATCGTGCACCAGCAGGTGAGGACATACGG
ACCCGTGTTCATGTGCCTGGGAGGCCTGCTGACCATGGTGGCAGGAGCCGTGTGGCTGACAGTGCGGGT
GCTGGAGCTGTTCAGAGCCGCCCAGCTGGCCAACGATGTGGTGCTGCAGATCATGGAGCTGTGCGGAGC
AGCCTTTCGCCAGGTGTGCCACACCACAGTGCCATGGCCCAATGCCTCCCTGACCCCCAAGTGGAACAAT
GAGACAACACAGCCTCAGATCGCCAACTGTAGCGTGTACGACTTCTTCGTGTGGCTGCACTACTATAGCG
TGAGGGATACCCTGTGGCCCCGCGTGACATACCACATGAATAAGTACGCCTATCACATGCTGGAGAGGCG
CGCCAAGTATAAGAGAGGCCCTGGCCCAGGCGCAAAGTTTGTGGCAGCATGGACCCTGAAGGCCGCCGC
CGGCCCCGGCCCCGGCCAGTATATCAAGGCTAACAGTAAGTTCATTGGAATCACAGAGCTGGGACCCGGA
CCTGGATAATGAGTTTAAACTCCCATTTAAATGTGAGGGTTAATGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATT
GATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTAT
TGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAG
GTTCAGGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATAACTATAA
CGGTCCTAAGGTAGCGAGTGAGTAGTGTTCTGGGGCGGGGGAGGACCTGCATGAGGGCCAGAATAACTG
AAATCTGTGCTTTTCTGTGTGTTGCAGCAGCATGAGCGGAAGCGGCTCCTTTGAGGGAGGGGTATTCAGC
CCTTATCTGACGGGGCGTCTCCCCTCCTGGGCGGGAGTGCGTCAGAATGTGATGGGATCCACGGTGGACG
GCCGGCCCGTGCAGCCCGCGAACTCTTCAACCCTGACCTATGCAACCCTGAGCTCTTCGTCGTTGGACGC
AGCTGCCGCCGCAGCTGCTGCATCTGCCGCCAGCGCCGTGCGCGGAATGGCCATGGGCGCCGGCTACTAC
GGCACTCTGGTGGCCAACTCGAGTTCCACCAATAATCCCGCCAGCCTGAACGAGGAGAAGCTGTTGCTGC
TGATGGCCCAGCTCGAGGCCTTGACCCAGCGCCTGGGCGAGCTGACCCAGCAGGTGGCTCAGCTGCAGG
AGCAGACGCGGGCCGCGGTTGCCACGGTGAAATCCAAATAAAAAATGAATCAATAAATAAACGGAGACG
GTTGTTGATTTTAACACAGAGTCTGAATCTTTATTTGATTTTTCGCGCGCGGTAGGCCCTGGACCACCGGT
CTCGATCATTGAGCACCCGGTGGATCTTTTCCAGGACCCGGTAGAGGTGGGCTTGGATGTTGAGGTACATG
GGCATGAGCCCGTCCCGGGGGTGGAGGTAGCTCCATTGCAGGGCCTCGTGCTCGGGGGTGGTGTTGTAAA
TCACCCAGTCATAGCAGGGGCGCAGGGCATGGTGTTGCACAATATCTTTGAGGAGGAGACTGATGGCCAC
GGGCAGCCCTTTGGTGTAGGTGTTTACAAATCTGTTGAGCTGGGAGGGATGCATGCGGGGGGAGATGAGG
TGCATCTTGGCCTGGATCTTGAGATTGGCGATGTTACCGCCCAGATCCCGCCTGGGGTTCATGTTGTGCAG
GACCACCAGCACGGTGTATCCGGTGCACTTGGGGAATTTATCATGCAACTTGGAAGGGAAGGCGTGAAAG
AATTTGGCGACGCCTTTGTGCCCGCCCAGGTTTTCCATGCACTCATCCATGATGATGGCGATGGGCCCGTG
GGCGGCGGCCTGGGCAAAGACGTTTCGGGGGTCGGACACATCATAGTTGTGGTCCTGGGTGAGGTCATCA
TAGGCCATTTTAATGAATTTGGGGCGGAGGGTGCCGGACTGGGGGACAAAGGTtCCCTCGATCCCGGGGG
CGTAGTTCCCCTCACAGATCTGCATCTCCCAGGCTTTGAGCTCGGAGGGGGGGATCATGTCCACCTGCGG
GGCGATAAAGAACACGGTTTCCGGGGCGGGGGAGATGAGCTGGGCCGAAAGCAAGTTCCGGAGCAGCT
GGGACTTGCCGCAGCCGGTGGGGCCGTAGATGACCCCGATGACCGGCTGCAGGTGGTAGTTGAGGGAGA
GACAGCTGCCGTCCTCCCGGAGGAGGGGGGCCACCTCGTTCATCATCTCGCGCACGTGCATGTTCTCGCG
CACCAGTTCCGCCAGGAGGCGCTCTCCCCCCAGGGATAGGAGCTCCTGGAGCGAGGCGAAGTTTTTCAG
CGGCTTGAGTCCGTCGGCCATGGGCATTTTGGAGAGGGTTTGTTGCAAGAGTTCCAGGCGGTCCCAGAGC
TCGGTGATGTGCTCTACGGCATCTCGATCCAGCAGACCTCCTCGTTTCGCGGGTTGGGACGGCTGCGGGA
GTAGGGCACCAGACGATGGGCGTCCAGCGCAGCCAGGGTCCGGTCCTTCCAGGGTCGCAGCGTCCGCGT
CAGGGTGGTCTCCGTCACGGTGAAGGGGTGCGCGCCGGGCTGGGCGCTTGCGAGGGTGCGCTTCAGGCT
CATCCGGCTGGTCGAAAACCGCTCCCGATCGGCGCCCTGCGCGTCGGCCAGGTAGCAATTGACCATGAGT
TCGTAGTTGAGCGCCTCGGCCGCGTGGCCTTTGGCGCGGAGCTTACCTTTGGAAGTCTGCCCGCAGGCGG
GACAGAGGAGGGACTTGAGGGCGTAGAGCTTGGGGGCGAGGAAGACGGACTCGGGGGCGTAGGCGTCC
GCGCCGCAGTGGGCGCAGACGGTCTCGCACTCCACGAGCCAGGTGAGGTCGGGCTGGTCGGGGTCAAA
AACCAGTTTCCCGCCGTTCTTTTTGATGCGTTTCTTACCTTTGGTCTCCATGAGCTCGTGTCCCCGCTGGGT
GACAAAGAGGCTGTCCGTGTCCCCGTAGACCGACTTTATGGGCCGGTCCTCGAGCGGTGTGCCGCGGTCC
TCCTCGTAGAGGAACCCCGCCCACTCCGAGACGAAAGCCCGGGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCCAC
GTGGGACGGGTAGCGGTCGTTGTCCACCAGCGGGTCCACCTTTTCCAGGGTATGCAAACACATGTCCCCC

TCGTCCACATCCAGGAAGGTGATTGGCTTGTAAGTGTAGGCCACGTGACCGGGGGTCCCGGCCGGGGGG
GTATAAAAGGGTGCGGGTCCCTGCTCGTCCTCACTGTCTTCCGGATCGCTGTCCAGGAGCGCCAGCTGTT
GGGGTAGGTATTCCCTCTCGAAGGCGGGCATGACCTCGGCACTCAGGTTGTCAGTTTCTAGAAACGAGGA
GGATTTGATATTGACGGTGCCGGCGGAGATGCCTTTCAAGAGCCCCTCGTCCATCTGGTCAGAAAAGACG
ATCTTTTTGTTGTCGAGCTTGGTGGCGAAGGAGCCGTAGAGGGCGTTGGAGAGGAGCTTGGCGATGGAG
CGCATGGTCTGGTTTTTTTCCTTGTCGGCGCGCTCCTTGGCGGCGATGTTGAGCTGCACGTACTCGCGCGC
CACGCACTTCCATTCGGGGAAGACGGTGGTCAGCTCGTCGGGCACGATTCTGACCTGCCAGCCCCGATTA
TGCAGGGTGATGAGGTCCACACTGGTGGCCACCTCGCCGCGCAGGGGCTCATTAGTCCAGCAGAGGCGT
CCGCCCTTGCGCGAGCAGAAGGGGGGCAGGGGGTCCAGCATGACCTCGTCGGGGGGGTCGGCATCGATG
GTGAAGATGCCGGGCAGGAGGTCGGGGTCAAAGTAGCTGATGGAAGTGGCCAGATCGTCCAGGGCAGCT
TGCCATTCGCGCACGGCCAGCGCGCGCTCGTAGGGACTGAGGGGCGTGCCCCAGGGCATGGGATGGGTA
AGCGCGGAGGCGTACATGCCGCAGATGTCGTAGACGTAGAGGGGCTCCTCGAGGATGCCGATGTAGGTG
GGGTAGCAGCGCCCCCCGCGGATGCTGGCGCGCACGTAGTCATACAGCTCGTGCGAGGGGGCGAGGAGC
CCCGGGCCCAGGTTGGTGCGACTGGGCTTTTCGGCGCGGTAGACGATCTGGCGGAAAATGGCATGCGAG
TTGGAGGAGATGGTGGGCCTTTGGAAGATGTTGAAGTGGGCGTGGGGCAGTCCGACCGAGTCGCGGATG
AAGTGGGCGTAGGAGTCTTGCAGCTTGGCGACGAGCTCGGCGGTGACTAGGACGTCCAGAGCGCAGTAG
TCGAGGGTCTCCTGGATGATGTCATACTTGAGCTGTCCCTTTTGTTTCCACAGCTCGCGGTTGAGAAGGAA
CTCTTCGCGGTCCTTCCAGTACTCTTCGAGGGGGAACCCGTCCTGATCTGCACGGTAAGAGCCTAGCATGT
AGAACTGGTTGACGGCCTTGTAGGCGCAGCAGCCCTTCTCCACGGGGAGGGCGTAGGCCTGGGCGGCCT
TGCGCAGGGAGGTGTGCGTGAGGGCGAAAGTGTCCCTGACCATGACCTTGAGGAACTGGTGCTTGAAGT
CGATATCGTCGCAGCCCCCCTGCTCCCAGAGCTGGAAGTCCGTGCGCTTCTTGTAGGCGGGGTTGGGCAA
AGCGAAAGTAACATCGTTGAAGAGGATCTTGCCCGCGCGGGGCATAAAGTTGCGAGTGATGCGGAAAGG
TTGGGGCACCTCGGCCCGGTTGTTGATGACCTGGGCGGCGAGCACGATCTCGTCGAAGCCGTTGATGTTG
TGGCCCACGATGTAGAGTTCCACGAATCGCGGACGGCCCTTGACGTGGGGCAGTTTCTTGAGCTCCTCGT
AGGTGAGCTCGTCGGGGTCGCTGAGCCCGTGCTGCTCGAGCGCCCAGTCGGCGAGATGGGGGTTGGCGC
GGAGGAAGGAAGTCCAGAGATCCACGGCCAGGGCGGTTTGCAGACGGTCCCGGTACTGACGGAACTGCT
GCCCGACGGCCATTTTTTCGGGGGTGACGCAGTAGAAGGTGCGGGGGTCCCCGTGCCAGCGATCCCATTT
GAGCTGGAGGGCGAGATCGAGGGCGAGCTCGACGAGCCGGTCGTCCCCGGAGAGTTTCATGACCAGCAT
GAAGGGGACGAGCTGCTTGCCGAAGGACCCCATCCAGGTGTAGGTTTCCACATCGTAGGTGAGGAAGAG
CCTTTCGGTGCGAGGATGCGAGCCGATGGGGAAGAACTGGATCTCCTGCCACCAATTGGAGGAATGGCTG
TTGATGTGATGGAAGTAGAAATGCCGACGGCGCGCCGAACACTCGTGCTTGTGTTTATACAAGCGGCCAC
AGTGCTCGCAACGCTGCACGGGATGCACGTGCTGCACGAGCTGTACCTGAGTTCCTTTGACGAGGAATTT
CAGTGGGAAGTGGAGTCGTGGCGCCTGCATCTCGTGCTGTACTACGTCGTGGTGGTCGGCCTGGCCCTCT
TCTGCCTCGATGGTGGTCATGCTGACGAGCCCGCGCGGGAGGCAGGTCCAGACCTCGGCGCGAGCGGGT
CGGAGAGCGAGGACGAGGGCGCGCAGGCCGGAGCTGTCCAGGGTCCTGAGACGCTGCGGAGTCAGGTC
AGTGGGCAGCGGCGGCGCGCGGTTGACTTGCAGGAGTTTTTCCAGGGCGCGCGGGAGGTCCAGATGGTA
CTTGATCTCCACCGCGCCATTGGTGGCGACGTCGATGGCTTGCAGGGTCCCGTGCCCCTGGGGTGTGACC
ACCGTCCCCCGTTTCTTCTTGGGCGGCTGGGGCGACGGGGGCGGTGCCTCTTCCATGGTTAGAAGCGGCG
GCGAGGACGCGCGCCGGGCGGCAGGGGCGGCTCGGGGCCCGGAGGCAGGGGCGGCAGGGGCACGTCG
GCGCCGCGCGCGGGTAGGTTCTGGTACTGCGCCCGGAGAAGACTGGCGTGAGCGACGACGCGACGGTTG
ACGTCCTGGATCTGACGCCTCTGGGTGAAGGCCACGGGACCCGTGAGTTTGAACCTGAAAGAGAGTTCG
ACAGAATCAATCTCGGTATCGTTGACGGCGGCCTGCCGCAGGATCTCTTGCACGTCGCCCGAGTTGTCCT
GGTAGGCGATCTCGGTCATGAACTGCTCGATCTCCTCCTCTTGAAGGTCTCCGCGGCCGGCGCGCTCCAC
GGTGGCCGCGAGGTCGTTGGAGATGCGGCCCATGAGCTGCGAGAAGGCGTTCATGCCCGCCTCGTTCCA
GACGCGGCTGTAGACCACGACGCCCTCGGGATCGCgGGCGCGCATGACCACCTGGGCGAGGTTGAGCTC
CACGTGGCGCGTGAAGACCGCGTAGTTGCAGAGGCGCTGGTAGAGGTAGTTGAGCGTGGTGGCGATGTG
CTCGGTGACGAAGAAATACATGATCCAGCGGCGGAGCGGCATCTCGCTGACGTCGCCCAGCGCCTCCAA
ACGTTCCATGGCCTCGTAAAAGTCCACGGCGAAGTTGAAAAACTGGGAGTTGCGCGCCGAGACGGTCAA
CTCCTCCTCCAGAAGACGGATGAGCTCGGCGATGGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAGGCCCCCGGGAG
TTCCTCCACTTCCTCTTCTTCCTCCTCCACTAACATCTCTTCTACTTCCTCCTCAGGCGGCAGTGGTGGCGG
GGGAGGGGGCCTGCGTCGCCGGCGGCGCACGGGCAGACGGTCGATGAAGCGCTCGATGGTCTCGCCGCG
CCGGCGTCGCATGGTCTCGGTGACGGCGCGCCCGTCCTCGCGGGGCCGCAGCGTGAAGACGCCGCCGCG
CATCTCCAGGTGGCCGGGGGGGTCCCCGTTGGGCAGGGAGAGGGCGCTGACGATGCATCTTATCAATTGC
CCCGTAGGGACTCCGCGCAAGGACCTGAGCGTCTCGAGATCCACGGGATCTGAAAACCGCTGAACGAAG
GCTTCGAGCCAGTCGCAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACGGTTTCTTCTGGCGGGTCATGTTGGTTGGGAG
CGGGGCGGGCGATGCTGCTGGTGATGAAGTTGAAATAGGCGGTTCTGAGACGGCGGATGGTGGCGAGGA
GCACCAGGTCTTTGGGCCCGGCTTGCTGGATGCGCAGACGGTCGGCCATGCCCCAGGCGTGGTCCTGACA
CCTGGCCAGGTCCTTGTAGTAGTCCTGCATGAGCCGCTCCACGGGCACCTCCTCCTCGCCCGCGCGGCCG
TGCATGCGCGTGAGCCCGAAGCCGCGCTGGGGCTGGACGAGCGCCAGGTCGGCGACGACGCGCTCGGC
GAGGATGGCTTGCTGGATCTGGGTGAGGGTGGTCTGGAAGTCATCAAAGTCGACGAAGCGGTGGTAGGC
TCCGGTGTTGATGGTGTAGGAGCAGTTGGCCATGACGGACCAGTTGACGGTCTGGTGGCCCGGACGCAC
GAGCTCGTGGTACTTGAGGCGCGAGTAGGCGCGCGTGTCGAAGATGTAGTCGTTGCAGGTGCGCACCAG
GTACTGGTAGCCGATGAGGAAGTGCGGCGGCGGCTGGCGGTAGAGCGGCCATCGCTCGGTGGCGGGGGC
GCCGGGCGCGAGGTCCTCGAGCATGGTGCGGTGGTAGCCGTAGATGTACCTGGACATCCAGGTGATGCCG
GCGGCGGTGGTGGAGGCGCGCGGGAACTCGCGGACGCGGTTCCAGATGTTGCGCAGCGGCAGGAAGTA
GTTCATGGTGGGCACGGTCTGGCCCGTGAGGCGCGCGCAGTCGTGGATGCTCTATACGGGCAAAAACGA
AAGCGGTCAGCGGCTCGACTCCGTGGCCTGGAGGCTAAGCGAACGGGTTGGGCTGCGCGTGTACCCCGG
TTCGAATCTCGAATCAGGCTGGAGCCGCAGCTAACGTGGTATTGGCACTCCCGTCTCGACCCAAGCCTGC

10 20 30 40 50

ACCAACCCTCCAGGATACGGAGGCGGGTCGTTTTGCAACTTTTTTTTGGAGGCCGGATGAGACTAGTAAG
CGCGGAAAGCGGCCGACCGCGATGGCTCGCTGCCGTAGTCTGGAGAAGAATCGCCAGGGTTGCGTTGCG
GTGTGCCCCGGTTCGAGGCCGGCCGGATTCCGCGGCTAACGAGGGCGTGGCTGCCCCGTCGTTTCCAAG
ACCCCATAGCCAGCCGACTTCTCCAGTTACGGAGCGAGCCCCTCTTTTGTTTTGTTTGTTTTTGCCAGATG
CATCCCGTACTGCGGCAGATGCGCCCCCACCACCCTCCACCGCAACAACAGCCCCCTCCACAGCCGGCGC
TTCTGCCCCCGCCCCAGCAGCAACTTCCAGCCACGACCGCCGCGGCCGCCGTGAGCGGGGCTGGACAGA
GTTATGATCACCAGCTGGCCTTGGAAGAGGGCGAGGGGCTGGCGCGCCTGGGGGCGTCGTCGCCGGAGC
GGCACCCGCGCGTGCAGATGAAAAGGGACGCTCGCGAGGCCTACGTGCCCAAGCAGAACCTGTTCAGAG
ACAGGAGCGGCGAGGAGCCCGAGGAGATGCGCGCGGCCCGGTTCCACGCGGGGCGGGAGCTGCGGCGC
GGCCTGGACCGAAAGAGGGTGCTGAGGGACGAGGATTTCGAGGCGGACGAGCTGACGGGGATCAGCCC
CGCGCGCGCGCACGTGGCCGCGGCCAACCTGGTCACGGCGTACGAGCAGACCGTGAAGGAGGAGAGCA
ACTTCCAAAAATCCTTCAACAACCACGTGCGCACCCTGATCGCGCGCGAGGAGGTGACCCTGGGCCTGAT
GCACCTGTGGGACCTGCTGGAGGCCATCGTGCAGAACCCCACCAGCAAGCCGCTGACGGCGCAGCTGTT
CCTGGTGGTGCAGCATAGTCGGGACAACGAAGCGTTCAGGGAGGCGCTGCTGAATATCACCGAGCCCGA
GGGCCGCTGGCTCCTGGACCTGGTGAACATTCTGCAGAGCATCGTGGTGCAGGAGCGCGGGCTGCCGCT
GTCCGAGAAGCTGGCGGCCATCAACTTCTCGGTGCTGAGTTTGGGCAAGTACTACGCTAGGAAGATCTAC
AAGACCCCGTACGTGCCCATAGACAAGGAGGTGAAGATCGACGGGTTTTACATGCGCATGACCCTGAAAG
TGCTGACCCTGAGCGACGATCTGGGGGTGTACCGCAACGACAGGATGCACCGTGCGGTGAGCGCCAGCA
GGCGGCGCGAGCTGAGCGACCAGGAGCTGATGCATAGTCTGCAGCGGGCCCTGACCGGGGCCGGGACCG
AGGGGGAGAGCTACTTTGACATGGGCGCGGACCTGCACTGGCAGCCCAGCCGCCGGGCCTTGGAGGCGG
CGGCAGGACCCTACGTAGAAGAGGTGGACGATGAGGTGGACGAGGAGGGCGAGTACCTGGAAGACTGA
TGGCGCGACCGTATTTTTGCTAGATGCAACAACAACAGCCACCTCCTGATCCCGCGATGCGGGCGGCGCT
GCAGAGCCAGCCGTCCGGCATTAACTCCTCGGACGATTGGACCCAGGCCATGCAACGCATCATGGCGCTG
ACGACCCGCAACCCCGAAGCCTTTAGACAGCAGCCCCAGGCCAACCGGCTCTCGGCCATCCTGGAGGCC
GTGGTGCCCTCGCGCTCCAACCCCACGCACGAGAAGGTCCTGGCCATCGTGAACGCGCTGGTGGAGAAC
AAGGCCATCCGCGGCGACGAGGCCGGCCTGGTGTACAACGCGCTGCTGGAGCGCGTGGCCCGCTACAAC
AGCACCAACGTGCAGACCAACCTGGACCGCATGGTGACCGACGTGCGCGAGGCCGTGGCCCAGCGCGA
GCGGTTCCACCGCGAGTCCAACCTGGGATCCATGGTGGCGCTGAACGCCTTCCTCAGCACCCAGCCCGCC
AACGTGCCCCGGGGCCAGGAGGACTACACCAACTTCATCAGCGCCCTGCGCCTGATGGTGACCGAGGTG
CCCCAGAGCGAGGTGTACCAGTCCGGGCCGGACTACTTCTTCCAGACCAGTCGCCAGGGCTTGCAGACC
GTGAACCTGAGCCAGGCTTTCAAGAACTTGCAGGGCCTGTGGGGCGTGCAGGCCCCGGTCGGGGACCGC
GCGACGGTGTCGAGCCTGCTGACGCCGAACTCGCGCCTGCTGCTGCTGGTGGCCCCCTTCACGGAC
AGCGGCAGCATCAACCGCAACTCGTACCTGGGCTACCTGATTAACCTGTACCGCGAGGCCATCGGCCAGG
CGCACGTGGACGAGCAGACCTACCAGGAGATCACCCACGTGAGCCGCGCCCTGGGCCAGGACGACCCG
GGCAACCTGGAAGCCACCCTGAACTTTTTGCTGACCAACCGGTCGCAGAAGATCCCGCCCCAGTACGCG
CTCAGCACCGAGGAGGAGCGCATCCTGCGTTACGTGCAGCAGAGCGTGGGCCTGTTCCTGATGCAGGAG
GGGGCCACCCCCAGCGCCGCGCTCGACATGACCGCGCGCAACATGGAGCCCAGCATGTACGCCAGCAAC
CGCCCGTTCATCAATAAACTGATGGACTACTTGCATCGGGCGGCCGCCATGAACTCTGACTATTTCACCAA
CGCCATCCTGAATCCCCACTGGCTCCCGCCGCCGGGGTTCTACACGGGCGAGTACGACATGCCCGACCCC
AATGACGGGTTCCTGTGGGACGATGTGGACAGCAGCGTGTTCTCCCCCCGACCGGGTGCTAACGAGCGC
CCCTTGTGGAAGAAGGAAGGCAGCGACCGACGCCCGTCCTCGGCGCTGTCCGGCCGCGAGGGTGCTGCC
GCGGCGGTGCCCGAGGCCGCCAGTCCTTTCCCGAGCTTGCCCTTCTCGCTGAACAGTATCCGCAGCAGCG
AGCTGGGCAGGATCACGCGCCCGCGCTTGCTGGGCGAAGAGGAGTACTTGAATGACTCGCTGTTGAGAC
CCGAGCGGGAGAAGAACTTCCCCAATAACGGGATAGAAAGCCTGGTGGACAAGATGAGCCGCTGGAAGA
CGTATGCGCAGGAGCACAGGGACGATCCCCGGGCGTCGCAGGGGGCCACGAGCCGGGGCAGCGCCGCC
CGTAAACGCCGGTGGCACGACAGGCAGCGGGGACAGATGTGGGACGATGAGGACTCCGCCGACGACAG
CAGCGTGTTGGACTTGGGTGGGAGTGGTAACCCGTTCGCTCACCTGCGCCCCCGTATCGGGCGCATGATG
TAAGAGAAACCGAAAATAAATGATACTCACCAAGGCCATGGCGACCAGCGTGCGTTCGTTTCTTCTCTGT
TGTTGTTGTATCTAGTATGATGAGGCGTGCGTACCCGGAGGGTCCTCCTCCCTCGTACGAGAGCGTGATGC
AGCAGGCGATGGCGGCGGCGGCGATGCAGCCCCCGCTGGAGGCTCCTTACGTGCCCCCGCGGTACCTGG
CGCCTACGGAGGGGCGGAACAGCATTCGTTACTCGGAGCTGGCACCCTTGTACGATACCACCCGGTTGTA
CCTGGTGGACAACAAGTCGGCGGACATCGCCTCGCTGAACTACCAGAACGACCACAGCAACTTCCTGAC
CACCGTGGTGCAGAACAATGACTTCACCCCCACGGAGGCCAGCACCCAGACCATCAACTTTGACGAGCG
CTCGCGGTGGGGCGGCCAGCTGAAAACCATCATGCACACCAACATGCCCAACGTGAACGAGTTCATGTAC
AGCAACAAGTTCAAGGCGCGGGTGATGGTCTCCCGCAAGACCCCCAATGGGGTGACAGTGACAGAGGAT
TATGATGGTAGTCAGGATGAGCTGAAGTATGAATGGGTGGAATTTGAGCTGCCCGAAGGCAACTTCTCGG
TGACCATGACCATCGACCTGATGAACAACGCCATCATCGACAATTACTTGGCGGTGGGGCGGCAGAACGG
GGTGCTGGAGAGCGACATCGGCGTGAAGTTCGACACTAGGAACTTCAGGCTGGGCTGGGACCCCGTGAC
CGAGCTGGTCATGCCCGGGGTGTACACCAACGAGGCTTTCCATCCCGATATTGTCTTGCTGCCCGGCTGCG
GGGTGGACTTCACCGAGAGCCGCCTCAGCAACCTGCTGGGCATTCGCAAGAGGCAGCCCTTCCAGGAAG
GCTTCCAGATCATGTACGAGGATCTGGAGGGGGGCAACATCCCCGCGCTCCTGGATGTCGACGCCTATGA
GAAAAGCAAGGAGGATGCAGCAGCTGAAGCAACTGCAGCCGTAGCTACCGCCTCTACCGAGGTCAGGGG
CGATAATTTTGCAAGCGCCGCAGCAGTGGCAGCGGCCGAGGCGGCTGAAACCGAAAGTAAGATAGTCAT
TCAGCCGGTGGAGAAGGATAGCAAGAACAGGAGCTACAACGTACTACCGGACAAGATAAACACCGCCTA
CCGCAGCTGGTACCTAGCCTACAACTATGGCGACCCCGAGAAGGGCGTGCGCTCCTGGACGCTGCTCACC
ACCTCGGACGTCACCTGCGGCGTGGAGCAAGTCTACTGGTCGCTGCCCGACATGATGCAAGACCCGGTC
ACCTTCCGCTCCACGCGTCAAGTTAGCAACTACCCGGTGGTGGGCGCCGAGCTCCTGCCCGTCTACTCCA
AGAGCTTCTTCAACGAGCAGGCCGTCTACTCGCAGCAGCTGCGCGCCTTCACCTCGCTTACGCACGTCTT

10 20 30 40 50

CAACCGCTTCCCCGAGAACCAGATCCTCGTCCGCCCGCCCGCGCCCACCATTACCACCGTCAGTGAAAAC
GTTCCTGCTCTCACAGATCACGGGACCCTGCCGCTGCGCAGCAGTATCCGGGGAGTCCAGCGCGTGACCG
TTACTGACGCCAGACGCCGCACCTGCCCCTACGTCTACAAGGCCCTGGGCATAGTCGCGCCGCGCGTCCT
CTCGAGCCGCACCTTCTAAATGTCCATTCTCATCTCGCCCAGTAATAACACCGGTTGGGGCCTGCGCGCGC
CCAGCAAGATGTACGGAGGCGCTCGCCAACGCTCCACGCAACACCCCGTGCGCGTGCGCGGGCACTTCC
GCGCTCCCTGGGGCGCCCTCAAGGGCCGCGTGCGGTCGCGCACCACCGTCGACGACGTGATCGACCAGG
TGGTGGCCGACGCGCGCAACTACACCCCCGCCGCCGCGCCCGTCTCCACCGTGGACGCCGTCATCGACA
GCGTGGTGGCcGACGCGCGCCGGTACGCCCGCGCCAAGAGCCGGCGGCGGCGCATCGCCCGGCGGCACC
GGAGCACCCCCGCCATGCGCGCGGCGCGAGCCTTGCTGCGCAGGGCCAGGCGCACGGGACGCAGGGCC
ATGCTCAGGGCGGCCAGACGCGCGGCTTCAGGCGCCAGCGCCGGCAGGACCCGGAGACGCGCGGCCAC
GGCGGCGGCAGCGGCCATCGCCAGCATGTCCCGCCCGCGGCGAGGGAACGTGTACTGGGTGCGCGACGC
CGCCACCGGTGTGCGCGTGCCCGTGCGCACCCGCCCCCCTCGCACTTGAAGATGTTCACTTCGCGATGTT
GATGTGTCCCAGCGGCGAGGAGGATGTCCAAGCGCAAATTCAAGGAAGAGATGCTCCAGGTCATCGCGC
CTGAGATCTACGGCCCTGCGGTGGTGAAGGAGGAAAGAAAGCCCCGCAAAATCAAGCGGGTCAAAAAG
GACAAAAAGGAAGAAGAAAGTGATGTGGACGGATTGGTGGAGTTTGTGCGCGAGTTCGCCCCCCGGCGG
CGCGTGCAGTGGCGCGGGCGGAAGGTGCAACCGGTGCTGAGACCCGGCACCACCGTGGTCTTCACGCCC
GGCGAGCGCTCCGGCACCGCTTCCAAGCGCTCCTACGACGAGGTGTACGGGGATGATGATATTCTGGAGC
AGGCGGCCGAGCGCCTGGGCGAGTTTGCTTACGGCAAGCGCAGCCGTTCCGCACCGAAGGAAGAGGCG
GTGTCCATCCCGCTGGACCACGGCAACCCCACGCCGAGCCTCAAGCCCGTGACCTTGCAGCAGGTGCTG
CCGACCGCGGCGCCGCGCCGGGGGTTCAAGCGCGAGGGCGAGGATCTGTACCCCACCATGCAGCTGATG
GTGCCCAAGCGCCAGAAGCTGGAAGACGTGCTGGAGACCATGAAGGTGGACCCGGACGTGCAGCCCGA
GGTCAAGGTGCGGCCCATCAAGCAGGTGGCCCCGGGCCTGGGCGTGCAGACCGTGGACATCAAGATTCC
CACGGAGCCCATGGAAACGCAGACCGAGCCCATGATCAAGCCCAGCACCAGCACCATGGAGGTGCAGAC
GGATCCCTGGATGCCATCGGCTCCTAGTCGAAGACCCCGGCGCAAGTACGGCGCGGCCAGCCTGCTGATG
CCCAACTACGCGCTGCATCCTTCCATCATCCCCACGCCGGGCTACCGCGGCACGCGCTTCTACCGCGGTCA
TACCAGCAGCCGCCGCCGCAAGACCACCACTCGCCGCCGCCGTCGCCGCACCGCCGCTGCAACCACCCC
TGCCGCCCTGGTGCGGAGAGTGTACCGCCGCGGCCGCGCACCTCTGACCCTGCCGCGCGCGCGCTACCA
CCCGAGCATCGCCATTTAAACTTTCGCCtGCTTTGCAGATCAATGGCCCTCACATGCCGCCTTCGCGTTCCC
ATTACGGGCTACCGAGGAAGAAAACCGCGCCGTAGAAGGCTGGCGGGGAACGGGATGCGTCGCCACCAC
CACCGGCGGCGGCGCGCCATCAGCAAGCGGTTGGGGGGAGGCTTCCTGCCCGCGCTGATCCCCATCATCG
CCGCGGCGATCGGGGCGATCCCCGGCATTGCTTCCGTGGCGGTGCAGGCCTCTCAGCGCCACTGAGACAC
ACTTGGAAACATCTTGTAATAAACCaATGGACTCTGACGCTCCTGGTCCTGTGATGTGTTTTCGTAGACAG
ATGGAAGACATCAATTTTTCGTCCCTGGCTCCGCGACACGGCACGCGGCCGTTCATGGGCACCTGGAGCG
ACATCGGCACCAGCCAACTGAACGGGGGCGCCTTCAATTGGAGCAGTCTCTGGAGCGGGCTTAAGAATTT
CGGGTCCACGCTTAAAACCTATGGCAGCAAGGCGTGGAACAGCACCACAGGGCAGGCGCTGAGGGATAA
GCTGAAAGAGCAGAACTTCCAGCAGAAGGTGGTCGATGGGCTCGCCTCGGGCATCAACGGGGTGGTGGA
CCTGGCCAACCAGGCCGTGCAGCGGCAGATCAACAGCCGCCTGGACCCGGTGCCGCCCGCCGGCTCCGT
GGAGATGCCGCAGGTGGAGGAGGAGCTGCCTCCCCTGGACAAGCGGGGCGAGAAGCGACCCCGCCCCG
ATGCGGAGGAGACGCTGCTGACGCACACGGACGAGCCGCCCCCGTACGAGGAGGCGGTGAAACTGGGT
CTGCCCACCACGCGGCCCATCGCGCCCCTGGCCACCGGGGTGCTGAAACCCGAAAAGCCCGCGACCCTG
GACTTGCCTCCTCCCCAGCCTTCCCGCCCCTCTACAGTGGCTAAGCCCCTGCCGCCGGTGGCCGTGGCCC
GCGCGCGACCCGGGGGCACCGCCCGCCCTCATGCGAACTGGCAGAGCACTCTGAACAGCATCGTGGGTC
TGGGAGTGCAGAGTGTGAAGCGCCGCCGCTGCTATTAAACCTACCGTAGCGCTTAACTTGCTTGTCTGTGT
GTGTATGTATTATGTCGCCGCCGCCGCTGTCCACCAGAAGGAGGAGTGAAGAGGCGCGTCGCCGAGTTGC
AAGATGGCCACCCCATCGATGCTGCCCCAGTGGGCGTACATGCACATCGCCGGACAGGACGCTTCGGAGT
ACCTGAGTCCGGGTCTGGTGCAGTTTGCCCGCGCCACAGACACCTACTTCAGTCTGGGGAACAAGTTTAG
GAACCCCACGGTGGCGCCCACGCACGATGTGACCACCGACCGCAGCCAGCGGCTGACGCTGCGCTTCGT
GCCCGTGGACCGCGAGGACAACACCTACTCGTACAAAGTGCGCTACACGCTGGCCGTGGGCGACAACCG
CGTGCTGGACATGGCCAGCACCTACTTTGACATCCGCGGCGTGCTGGATCGGGGCCCTAGCTTCAAACCC
TACTCCGGCACCGCCTACAACAGTCTGGCCCCCAAGGGAGCACCCAACACTTGTCAGTGGACATATAAAG
CCGATGGTGAAACTGCCACAGAAAAAACCTATACATATGGAAATGCACCCGTGCAGGGCATTAACATCAC
AAAAGATGGTATTCAACTTGGAACTGACACCGATGATCAGCCAATCTACGCAGATAAAACCTATCAGCCTG
AACCTCAAGTGGGTGATGCTGAATGGCATGACATCACTGGTACTGATGAAAAGTATGGAGGCAGAGCTCT
TAAGCCTGATACCAAAATGAAGCCTTGTTATGGTTCTTTTGCCAAGCCTACTAATAAAGAAGGAGGTCAGG
CAAATGTGAAAACAGGAACAGGCACTACTAAAGAATATGACATAGACATGGCTTTCTTTGACAACAGAAG
TGCGGCTGCTGCTGGCCTAGCTCCAGAAATTGTTTTGTATACTGAAAATGTGGATTTGGAAACTCCAGATA
CCCATATTGTATACAAAGCAGGCACAGATGACAGCAGCTCTTCTATTAATTTGGGTCAGCAAGCCATGCCC
AACAGACCTAACTACATTGGTTTCAGAGACAACTTTATCGGGCTCATGTACTACAACAGCACTGGCAATAT
GGGGGTGCTGGCCGGTCAGGCTTCTCAGCTGAATGCTGTGGTTGACTTGCAAGACAGAAACACCGAGCT
GTCCTACCAGCTCTTGCTTGACTCTCTGGGTGACAGAACCCGGTATTTCAGTATGTGGAATCAGGCGGTGG
ACAGCTATGATCCTGATGTGCGCATTATTGAAAATCATGGTGTGGAGGATGAACTTCCCAACTATTGTTTCC
CTCTGGATGCTGTTGGCAGAACAGATACTTATCAGGGAATTAAGGCTAATGGAACTGATCAAACCACATGG
ACCAAAGATGACAGTGTCAATGATGCTAATGAGATAGGCAAGGGTAATCCATTCGCCATGGAAATCAACAT
CCAAGCCAACCTGTGGAGGAACTTCCTCTACGCCAACGTGGCCCTGTACCTGCCCGACTCTTACAAGTAC
ACGCCGGCCAATGTTACCCTGCCCACCAACACCAACACCTACGATTACATGAACGGCCGGGTGGTGGCGC
CCTCGCTGGTGGACTCCTACATCAACATCGGGGCGCGCTGGTCGCTGGATCCCATGGACAACGTGAACCC
CTTCAACCACCACCGCAATGCGGGGCTGCGCTACCGCTCCATGCTCCTGGGCAACGGGCGCTACGTGCCC
TTCCACATCCAGGTGCCCCAGAAATTTTTCGCCATCAAGAGCCTCCTGCTCCTGCCCGGGTCCTACACCTA

CGAGTGGAACTTCCGCAAGGACGTCAACATGATCCTGCAGAGCTCCCTCGGCAACGACCTGCGCACGGA
CGGGGCCTCCATCTCCTTCACCAGCATCAACCTCTACGCCACCTTCTTCCCCATGGCGCACAACACGGCCT
CCACGCTCGAGGCCATGCTGCGCAACGACACCAACGACCAGTCCTTCAACGACTACCTCTCGGCGGCCA
ACATGCTCTACCCCATCCCGGCCAACGCCACCAACGTGCCCATCTCCATCCCCTCGCGCAACTGGGCCGC
CTTCCGCGGCTGGTCCTTCACGCGTCTCAAGACCAAGGAGACGCCCTCGCTGGGCTCCGGGTTCGACCCC
TACTTCGTCTACTCGGGCTCCATCCCCTACCTCGACGGCACCTTCTACCTCAACCACACCTTCAAGAAGGT
CTCCATCACCTTCGACTCCTCCGTCAGCTGGCCCGGCAACGACCGGCTCCTGACGCCCAACGAGTTCGAA
ATCAAGCGCACCGTCGACGGCGAGGGCTACAACGTGGCCCAGTGCAACATGACCAAGGACTGGTTCCTG
GTCCAGATGCTGGCCCACTACAACATCGGCTACCAGGGCTTCTACGTGCCCGAGGGCTACAAGGACCGCA
TGTACTCCTTCTTCCGCAACTTCCAGCCCATGAGCCGCCAGGTGGTGGACGAGGTCAACTACAAGGACTA
CCAGGCCGTCACCCTGGCCTACCAGCACAACAACTCGGGCTTCGTCGGCTACCTCGCGCCCACCATGCGC
CAGGGCCAGCCCTACCCCGCCAACTACCCCTACCCGCTCATCGGCAAGAGCGCCGTCACCAGCGTCACCC
AGAAAAAGTTCCTCTGCGACAGGGTCATGTGGCGCATCCCCTTCTCCAGCAACTTCATGTCCATGGGCGC
GCTCACCGACCTCGGCCAGAACATGCTCTATGCCAACTCCGCCCACGCGCTAGACATGAATTTCGAAGTC
GACCCCATGGATGAGTCCACCCTTCTCTATGTTGTCTTCGAAGTCTTCGACGTCGTCCGAGTGCACCAGCC
CCACCGCGGCGTCATCGAGGCCGTCTACCTGCGCACCCCCTTCTCGGCCGGTAACGCCACCACCTAAGCT
CTTGCTTCTTGCAAGCCATGGCCGCGGGCTCCGGCGAGCAGGAGCTCAGGGCCATCATCCGCGACCTGGG
CTGCGGGCCCTACTTCCTGGGCACCTTCGATAAGCGCTTCCCGGGATTCATGGCCCCGCACAAGCTGGCCT
GCGCCATCGTCAACACGGCCGGCCGCGAGACCGGGGGCGAGCACTGGCTGGCCTTCGCCTGGAACCCGC
GCTCGAACACCTGCTACCTCTTCGACCCCTTCGGGTTCTCGGACGAGCGCCTCAAGCAGATCTACCAGTT
CGAGTACGAGGGCCTGCTGCGCCGCAGCGCCCTGGCCACCGAGGACCGCTGCGTCACCCTGGAAAAGTC
CACCCAGACCGTGCAGGGTCCGCGCTCGGCCGCCTGCGGGCTCTTCTGCTGCATGTTCCTGCACGCCTTC
GTGCACTGGCCCGACCGCCCCATGGACAAGAACCCCACCATGAACTTGCTGACGGGGGTGCCCAACGGC
ATGCTCCAGTCGCCCCAGGTGGAACCCACCCTGCGCCGCAACCAGGAGGCGCTCTACCGCTTCCTCAACT
CCCACTCCGCCTACTTTCGCTCCCACCGCGCGCGCATCGAGAAGGCCACCGCCTTCGACCGCATGAATCA
AGACATGTAAACCGTGTGTGTATGTTAAATGTCTTTAATAAACAGCACTTTCATGTTACACATGCATCTGAG
ATGATTTATTTAGAAATCGAAAGGGTTCTGCCGGGTCTCGGCATGGCCCGCGGGCAGGGACACGTTGCGG
AACTGGTACTTGGCCAGCCACTTGAACTCGGGGATCAGCAGTTTGGGCAGCGGGGTGTCGGGGAAGGAG
TCGGTCCACAGCTTCCGCGTCAGTTGCAGGGCGCCCAGCAGGTCGGGCGCGGAGATCTTGAAATCGCAG
TTGGGACCCGCGTTCTGCGCGCGGGAGTTGCGGTACACGGGGTTGCAGCACTGGAACACCATCAGGGCC
GGGTGCTTCACGCTCGCCAGCACCGTCGCGTCGGTGATGCTCTCCACGTCGAGGTCCTCGGCGTTGGCCA
TCCCGAAGGGGGTCATCTTGCAGGTCTGCCTTCCCATGGTGGGCACGCACCCGGGCTTGTGGTTGCAATC
GCAGTGCAGGGGGATCAGCATCATCTGGGCCTGGTCGGCGTTCATCCCCGGGTACATGGCCTTCATGAAA
GCCTCCAATTGCCTGAACGCCTGCTGGGCCTTGGCTCCCTCGGTGAAGAAGACCCCGCAGGACTTGCTAG
AGAACTGGTTGGTGGCGCACCCGGCGTCGTGCACGCAGCAGCGCGCGTCGTTGTTGGCCAGCTGCACCA
CGCTGCGCCCCCAGCGGTTCTGGGTGATCTTGGCCCGGTCGGGGTTCTCCTTCAGCGCGCGCTGCCCGTT
CTCGCTCGCCACATCCATCTCGATCATGTGCTCCTTCTGGATCATGGTGGTCCCGTGCAGGCACCGCAGCT
TGCCCTCGGCCTCGGTGCACCCGTGCAGCCACAGCGCGCACCCGGTGCACTCCCAGTTCTTGTGGGCGAT
CTGGGAATGCGCGTGCACGAAGCCCTGCAGGAAGCGGCCCATCATGGTGGTCAGGGTCTTGTTGCTAGTG
AAGGTCAGCGGAATGCCGCGGTGCTCCTCGTTGATGTACAGGTGGCAGATGCGGCGGTACACCTCGCCCT
GCTCGGGCATCAGCTGGAAGTTGGCTTTCAGGTCGGTCTCCACGCGGTAGCGGTCCATCAGCATAGTCAT
GATTTCCATACCCTTCTCCCAGGCCGAGACGATGGGCAGGCTCATAGGGTTCTTCACCATCATCTTAGCGC
TAGCAGCCGCGGCCAGGGGGTCGCTCTCGTCCAGGGTCTCAAAGCTCCGCTTGCCGTCCTTCTCGGTGAT
CCGCACCGGGGGGTAGCTGAAGCCCACGGCCGCCAGCTCCTCCTCGGCCTGTCTTTCGTCCTCGCTGTCC
TGGCTGACGTCCTGCAGGACCACATGCTTGGTCTTGCGGGGTTTCTTCTTGGGCGGCAGCGGCGGCGGAG
ATGTTGGAGATGGCGAGGGGGAGCGCGAGTTCTCGCTCACCACTACTATCTCTTCCTCTTCTTGGTCCGAG
GCCACGCGGCGGTAGGTATGTCTCTTCGGGGGCAGAGGCGGAGGCGACGGGCTCTCGCCGCCGCGACTT
GGCGGATGGCTGGCAGAGCCCCTTCCGCGTTCGGGGGTGCGCTCCCGGCGGCGCTCTGACTGACTTCCTC
CGCGGCCGGCCATTGTGTTCTCCTAGGGAGGAACAACAAGCATGGAGACTCAGCCATCGCCAACCTCGCC
ATCTGCCCCCACCGCCGACGAGAAGCAGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAACCGCCCCGCCGCCCAGCCC
CGCCACCTCCGACGCGGCCGTCCCAGACATGCAAGAGATGGAGGAATCCATCGAGATTGACCTGGGCTAT
GTGACGCCCGCGGAGCACGAGGAGGAGCTGGCAGTGCGCTTTTCACAAGAAGAGATACACCAAGAACA
GCCAGAGCAGGAAGCAGAGAATGAGCAGAGTCAGGCTGGGCTCGAGCATGACGGCGACTACCTCCACCT
GAGCGGGGGGGAGGACGCGCTCATCAAGCATCTGGCCCGGCAGGCCACCATCGTCAAGGATGCGCTGCT
CGACCGCACCGAGGTGCCCCTCAGCGTGGAGGAGCTCAGCCGCGCCTACGAGTTGAACCTCTTCTCGCC
GCGCGTGCCCCCCAAGCGCCAGCCCAATGGCACCTGCGAGCCCAACCCGCGCCTCAACTTCTACCCGGTC
TTCGCGGTGCCCGAGGCCCTGGCCACCTACCACATCTTTTTCAAGAACCAAAAGATCCCCGTCTCCTGCC
GCGCCAACCGCACCCGCGCCGACGCCCTTTTCAACCTGGGTCCCGGCGCCCGCCTACCTGATATCGCCTC
CTTGGAAGAGGTTCCCAAGATCTTCGAGGGTCTGGGCAGCGACGAGACTCGGGCCGCGAACGCTCTGCA
AGGAGAAGGAGGAGAGCATGAGCACCACAGCGCCCTGGTCGAGTTGGAAGGCGACAACGCGCGGCTGG
CGGTGCTCAAACGCACGGTCGAGCTGACCCATTTCGCCTACCCGGCTCTGAACCTGCCCCCCAAAGTCAT
GAGCGCGGTCATGGACCAGGTGCTCATCAAGCGCGCGTCGCCCATCTCCGAGGACGAGGGCATGCAAGA
CTCCGAGGAGGGCAAGCCCGTGGTCAGCGACGAGCAGCTGGCCCGGTGGCTGGGTCCTAATGCTAGTCC
CCAGAGTTTGGAAGAGCGGCGCAAACTCATGATGGCCGTGGTCCTGGTGACCGTGGAGCTGGAGTGCCT
GCGCCGCTTCTTCGCCGACGCGGAGACCCTGCGCAAGGTCGAGGAGAACCTGCACTACCTCTTCAGGCA
CGGGTTCGTGCGCCAGGCCTGCAAGATCTCCAACGTGGAGCTGACCAACCTGGTCTCCTACATGGGCATC
TTGCACGAGAACCGCCTGGGGCAGAACGTGCTGCACACCACCCTGCGCGGGGAGGCCCGGCGCGACTAC
ATCCGCGACTGCGTCTACCTCTACCTCTGCCACACCTGGCAGACGGGCATGGGCGTGTGGCAGCAGTGTC

TGGAGGAGCAGAACCTGAAAGAGCTCTGCAAGCTCCTGCAGAAGAACCTCAAGGGTCTGTGGACCGGG
TTCGACGAGCGCACCACCGCCTCGGACCTGGCCGACCTCATTTTCCCCGAGCGCCTCAGGCTGACGCTGC
GCAACGGCCTGCCCGACTTTATGAGCCAAAGCATGTTGCAAAACTTTCGCTCTTTCATCCTCGAACGCTCC
GGAATCCTGCCCGCCACCTGCTCCGCGCTGCCCTCGGACTTCGTGCCGCTGACCTTCCGCGAGTGCCCCC
CGCCGCTGTGGAGCCACTGCTACCTGCTGCGCCTGGCCAACTACCTGGCCTACCACTCGGACGTGATCGA
GGACGTCAGCGGCGAGGGCCTGCTCGAGTGCCACTGCCGCTGCAACCTCTGCACGCCGCACCGCTCCCT
GGCCTGCAACCCCCAGCTGCTGAGCGAGACCCAGATCATCGGCACCTTCGAGTTGCAAGGGCCCAGCGA
AGGCGAGGGTTCAGCCGCCAAGGGGGGTCTGAAACTCACCCCGGGGCTGTGGACCTCGGCCTACTTGCG
CAAGTTCGTGCCCGAGGACTACCATCCCTTCGAGATCAGGTTCTACGAGGACCAATCCCATCCGCCCAAG
GCCGAGCTGTCGGCCTGCGTCATCACCCAGGGGGCGATCCTGGCCCAATTGCAAGCCATCCAGAAATCCC
GCCAAGAATTCTTGCTGAAAAAGGGCCGCGGGGTCTACCTCGACCCCCAGACCGGTGAGGAGCTCAACC
CCGGCTTCCCCCAGGATGCCCCGAGGAAACAAGAAGCTGAAAGTGGAGCTGCCGCCCGTGGAGGATTTG
GAGGAAGACTGGGAGAACAGCAGTCAGGCAGAGGAGGAGGAGATGGAGGAAGACTGGGACAGCACTC
AGGCAGAGGAGGACAGCCTGCAAGACAGTCTGGAGGAAGACGAGGAGGAGGCAGAGGAGGAGGTGGA
AGAAGCAGCCGCCGCCAGACCGTCGTCCTCGGCGGGGGAGAAAGCAAGCAGCACGGATACCATCTCCGC
TCCGGGTCGGGGTCCCGCTCGACCACACAGTAGATGGGACGAGACCGGACGATTCCCGAACCCCACCAC
CCAGACCGGTAAGAAGGAGCGGCAGGGATACAAGTCCTGGCGGGGGCACAAAAACGCCATCGTCTCCTG
CTTGCAGGCCTGCGGGGGCAACATCTCCTTCACCCGGCGCTACCTGCTCTTCCACCGCGGGGTGAACTTT
CCCCGCAACATCTTGCATTACTACCGTCACCTCCACAGCCCCTACTACTTCCAAGAAGAGGCAGCAGCAG
CAGAAAAAGACCAGCAGAAAACCAGCAGCTAGAAAATCCACAGCGGCGGCAGCAGGTGGACTGAGGAT
CGCGGCGAACGAGCCGGCGCAAACCCGGGAGCTGAGGAACCGGATCTTTCCCACCCTCTATGCCATCTTC
CAGCAGAGTCGGGGGCAGGAGCAGGAACTGAAAGTCAAGAACCGTTCTCTGCGCTCGCTCACCCGCAGT
TGTCTGTATCACAAGAGCGAAGACCAACTTCAGCGCACTCTCGAGGACGCCGAGGCTCTCTTCAACAAGT
ACTGCGCGCTCACTCTTAAAGAGTAGCCCGCGCCCGCCCAGTCGCAGAAAAAGGCGGGAATTACGTCAC
CTGTGCCCTTCGCCCTAGCCGCCTCCACCCATCATCATGAGCAAAGAGATTCCCACGCCTTACATGTGGAG
CTACCAGCCCCAGATGGGCCTGGCCGCCGGTGCCGCCCAGGACTACTCCACCCGCATGAATTGGCTCAGC
GCCGGGCCCGCGATGATCTCACGGGTGAATGACATCCGCGCCCACCGAAACCAGATACTCCTAGAACAGT
CAGCGCTCACCGCCACGCCCCGCAATCACCTCAATCCGCGTAATTGGCCCGCCGCCCTGGTGTACCAGGA
AATTCCCCAGCCCACGACCGTACTACTTCCGCGAGACGCCCAGGCCGAAGTCCAGCTGACTAACTCAGGT
GTCCAGCTGGCGGGCGGCGCCACCCTGTGTCGTCACCGCCCCGCTCAGGGTATAAAGCGGCTGGTGATCC
GGGGCAGAGGCACACAGCTCAACGACGAGGTGGTGAGCTCTTCGCTGGGTCTGCGACCTGACGGAGTCT
TCCAACTCGCCGGATCGGGGAGATCTTCCTTCACGCCTCGTCAGGCCGTCCTGACTTTGGAGAGTTCGTC
CTCGCAGCCCCGCTCGGGTGGCATCGGCACTCTCCAGTTCGTGGAGGAGTTCACTCCCTCGGTCTACTTC
AACCCCTTCTCCGGCTCCCCCGGCCACTACCCGGACGAGTTCATCCCGAACTTCGACGCCATCAGCGAGT
CGGTGGACGGCTACGATTGAAACTAATCACCCCCTTATCCAGTGAAATAAAGATCATATTGATGATGATTTT
ACAGAAATAAAAAATAATCATTTGATTTGAAATAAAGATACAATCATATTGATGATTTGAGTTTAACAAAAA
AATAAAGAATCACTTACTTGAAATCTGATACCAGGTCTCTGTCCATGTTTTCTGCCAACACCACTTCACTCC
CCTCTTCCCAGCTCTGGTACTGCAGGCCCCGGCGGGCTGCAAACTTCCTCCACACGCTGAAGGGGATGTC
AAATTCCTCCTGTCCCTCAATCTTCATTTTATCTTCTATCAGATGTCCAAAAAGCGCGTCCGGGTGGATGAT
GACTTCGACCCCGTCTACCCCTACGATGCAGACAACGCACCGACCGTGCCCTTCATCAACCCCCCCTTCG
TCTCTTCAGATGGATTCCAAGAGAAGCCCCTGGGGGTGTTGTCCCTGCGACTGGCCGACCCCGTCACCAC
CAAGAACGGGGAAATCACCCTCAAGCTGGGAGAGGGGGTGGACCTCGATTCCTCGGGAAAACTCATCTC
CAACACGGCCACCAAGGCCGCCGCCCCTCTCAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCCTTAACATGGATCAC
CCCTTTTACACTAAAGATGGAAAATTATCCTTACAAGTTTCTCCACCATTAAATATACTGAGAACAAGCATT
CTAAACACACTAGCTTTAGGTTTTGGATCAGGTTTAGGACTCCGTGGCTCTGCCTTGGCAGTACAGTTAGT
CTCTCCACTTACATTTGATACTGATGGAAACATAAAGCTTACCTTAGACAGAGGTTTGCATGTTACAACAG
GAGATGCAATTGAAAGCAACATAAGCTGGGCTAAAGGTTTAAAATTTGAAGATGGAGCCATAGCAACCAA
CATTGGAAATGGGTTAGAGTTTGGAAGCAGTAGTACAGAAACAGGTGTTGATGATGCTTACCCAATCCAA
GTTAAACTTGGATCTGGCCTTAGCTTTGACAGTACAGGAGCCATAATGGCTGGTAACAAAGAAGACGATA
AACTCACTTTGTGGACAACACCTGATCCATCACCAAACTGTCAAATACTCGCAGAAAATGATGCAAAACT
AACACTTTGCTTGACTAAATGTGGTAGTCAAATACTGGCCACTGTGTCAGTCTTAGTTGTAGGAAGTGGAA
ACCTAAACCCCATTACTGGCACCGTAAGCAGTGCTCAGGTGTTTCTACGTTTTGATGCAAACGGTGTTCTT
TTAACAGAACATTCTACACTAAAAAAATACTGGGGGTATAGGCAGGGAGATAGCATAGATGGCACTCCATA
TACCAATGCTGTAGGATTCATGCCCAATTTAAAAGCTTATCCAAAGTCACAAAGTTCTACTACTAAAAATAA
TATAGTAGGGCAAGTATACATGAATGGAGATGTTTCAAAACCTATGCTTCTCACTATAACCCTCAATGGTAC
TGATGACAGCAACAGTACATATTCAATGTCATTTTCATACACCTGGACTAATGGAAGCTATGTTGGAGCAA
CATTTGGGGCTAACTCTTATACCTTCTCATACATCGCCCAAGAATGAACACTGTATCCCACCCTGCATGCCA
ACCCTTCCCACCCCACTCTGTGGAACAAACTCTGAAACACAAAATAAAATAAAGTTCAAGTGTTTTATTGA
TTCAACAGTTTTACAGGATTCGAGCAGTTATTTTTCCTCCACCCTCCCAGGACATGGAATACACCACCCTC
TCCCCCCGCACAGCCTTGAACATCTGAATGCCATTGGTGATGGACATGCTTTTGGTCTCCACGTTCCACAC
AGTTTCAGAGCGAGCCAGTCTCGGGTCGGTCAGGGAGATGAAACCCTCCGGGCACTCCCGCATCTGCAC
CTCACAGCTCAACAGCTGAGGATTGTCCTCGGTGGTCGGGATCACGGTTATCTGGAAGAAGCAGAAGAG
CGGCGGTGGGAATCATAGTCCGCGAACGGGATCGGCCGGTGGTGTCGCATCAGGCCCCGCAGCAGTCGC
TGCCGCCGCCGCTCCGTCAAGCTGCTGCTCAGGGGGTCCGGGTCCAGGGACTCCCTCAGCATGATGCCCA
CGGCCCTCAGCATCAGTCGTCTGGGTCGGTCAGGGAGATGAAACCCTCCGGGCACTCCCGCATCTGCAC
GTACGTGCAACACAGAACCACCAGGTTGTTCAACAGTCCATAGTTCAACACGCTCCAGCCGAAACTCATC
GCGGGAAGGATGCTACCCACGTGGCCGTCGTACCAGATCCTCAGGTAAATCAAGTGGTGCCCCCTCCAGA
ACACGCTGCCCACGTACATGATCTCCTTGGGCATGTGGCGGTTCACCACCTCCCGGTACCACATCACCCTC

TGGTTGAACATGCAGCCCCGGATGATCCTGCGGAACCACAGGGCCAGCACCGCCCCGCCCGCCATGCAG
CGAAGAGACCCCGGGTCCCGGCAATGGCAATGGAGGACCCACCGCTCGTACCCGTGGATCATCTGGGAG
CTGAACAAGTCTATGTTGGCACAGCACAGGCATATGCTCATGCATCTCTTCAGCACTCTCAACTCCTCGGG
GGTCAAAACCATATCCCAGGGCACGGGGAACTCTTGCAGGACAGCGAACCCCGCAGAACAGGGCAATCC
TCGCACAGAACTTACATTGTGCATGGACAGGGTATCGCAATCAGGCAGCACCGGGTGATCCTCCACCAGA
GAAGCGCGGGTCTCGGTCTCCTCACAGCGTGGTAAGGGGGCCGGCCGATACGGGTGATGGCGGGACGCG
GCTGATCGTGTTCGCGACCGTGTCATGATGCAGTTGCTTTCGGACATTTTCGTACTTGCTGTAGCAGAACC
TGGTCCGGGCGCTGCACACCGATCGCCGGCGGCGGTCTCGGCGCTTGGAACGCTCGGTGTTGAAATTGTA
AAACAGCCACTCTCTCAGACCGTGCAGCAGATCTAGGGCCTCAGGAGTGATGAAGATCCCATCATGCCTG
ATGGCTCTGATCACATCGACCACCGTGGAATGGGCCAGACCCAGCCAGATGATGCAATTTTGTTGGGTTTC
GGTGACGGCGAGCCTCGGGAACAACGATGAAGTAAATGCAAGCGGTGCGTTCCAGCATGGTTAGTTAGC
TGATCTGTAGAAAAAACAAAAATGAACATTAAACCATGCTAGCCTGGCGAACAGGTGGGTAAATCGTTCT
CTCCAGCACCAGGCAGGCCACGGGGTCTCCGGCGCGACCCTCGTAAAAATTGTCGCTATGATTGAAAACC
ATCACAGAGAGACGTTCCCGGTGGCCGGCGTGAATGATTCGACAAGATGAATACACCCCCGGAACATTGG
CGTCCGCGAGTGAAAAAAAGCGCCCGAGGAAGCAATAAGGCACTACAATGCTCAGTCTCAAGTCCAGCA
AAGCGATGCCATGCGGATGAAGCACAAAATTCTCAGGTGCGTACAAAATGTAATTACTCCCCTCCTGCAC
AGGCAGCAAAGCCCCCGATCCCTCCAGGTACACATACAAAGCCTCAGCGTCCATAGCTTACCGAGCAGCA
GCACACAACAGGCGCAAGAGTCAGAGAAAGGCTGAGCTCTAACCTGTCCACCCGCTCTCTGCTCAATATA
TAGCCCAGATCTACACTGACGTAAAGGCCAAAGTCTAAAAATACCCGCCAAATAATCACACACGCCCAGC
ACACGCCCAGAAACCGGTGACACACTCAAAAAAATACGCGCACTTCCTCAAACGCCCAAAACTGCCGTC
ATTTCCGGGTTCCCACGCTACGTCATCAAAACACGACTTTCAAATTCCGTCGACCGTTAAAAACGTCACCC
GCCCCGCCCCTAACGGTCGCCCGTCTCTCAGCCAATCAGCGCCCCGCATCCCCAAATTCAAACACCTCATT
TGCATATTAACGCGCACAAAAAGTTTGAGGTATATTATTGATGATG

ChAdV68-GFP-E4 欠失 (配列番号 58); 太字のイタリック体=GFP 導入遺伝子

CATCaTCAATAATATACCTCAAACTTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTGAATTTGGGGAGGA
AGGGCGGTGATTGGTCGAGGGATGAGCGACCGTTAGGGGCGGGGCGAGTGACGTTTTGATGACGTGGTT
GCGAGGAGGAGCCAGTTTGCAAGTTCTCGTGGGAAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTTGAACACG
GAAATACTCAATTTTCCCGCGCTCTCTGACAGGAAATGAGGTGTTTCTGGGCGGATGCAAGTGAAAACGG
GCCATTTTCGCGCGAAAACTGAATGAGGAAGTGAAAATCTGAGTAATTTCGCGTTTATGGCAGGGAGGAG
TATTTGCCGAGGGCCGAGTAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTACCGTGTTTTTCACCTAAATT
TCCGCGTACGGTGTCAAAGTCCGGTGTTTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGCCAGGGTATTTAAACCTGCG
CTCTCCAGTCAAGAGGCCACTCTTGAGTGCCAGCGAGAAGAGTTTTCTCCTCCGCGCCGCGAGTCAGATC
TACACTTTGAAAGTAGGGATAACAGGGTAATgacattgattattgactagttGttaaTAGTAATCAATTACGGGGTCATTAG
TTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAAC
GACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACG
TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGC
CCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTT
CCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGgTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATG
GGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTT
TGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTA
GGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAgcTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAACGCCATC
CACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGATCGCGccacc
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAA
ACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTT
CATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGT
GCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTC
CAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCG
ACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAA
GCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGA
ACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCC
CATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGAC
CCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGG
ACGAGCTiTACAAGTAG
tgaGTTTAAACTCCCATTTAAATGTGAGGGTTAATGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTG
GACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTG
TAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGG
GAGATGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATAACTATAACGGTCCTAAG
GTAGCGAGTGAGTAGTGTTCTGGGGCGGGGGAGGACCTGCATGAGGGCCAGAATAACTGAAATCTGTGC
TTTTCTGTGTGTTGCAGCAGCATGAGCGGAAGCGGCTCCTTTGAGGGAGGGGTATTCAGCCCTTATCTGAC
GGGGCGTCTCCCCTCCTGGGCGGGAGTGCGTCAGAATGTGATGGGATCCACGGTGGACGGCCGGCCCGT
GCAGCCCGCGAACTCTTCAACCCTGACCTATGCAACCCTGAGCTCTTCGTCGTTGGACGCAGCTGCCGCC
GCAGCTGCTGCATCTGCCGCCAGCGCCGTGCGCGGAATGGCCATGGGCGCCGGCTACTACGGCACTCTGG
TGGCCAACTCGAGTTCCACCAATAATCCCGCCAGCCTGAACGAGGAGAAGCTGTTGCTGCTGATGGCCCA
GCTCGAGGCCTTGACCCAGCGCCTGGGCGAGCTGACCCAGCAGGTGGCTCAGCTGCAGGAGCAGACGC
GGGCCGCGGTTGCCACGGTGAAATCCAAATAAAAAATGAATCAATAAATAAACGGAGACGGTTGTTGATT
TTAACACAGAGTCTGAATCTTTATTTGATTTTTCGCGCGCGGTAGGCCCTGGACCACCGGTCTCGATCATT
GAGCACCCGGTGGATCTTTTCCAGGACCCGGTAGAGGTGGGCTTGGATGTTGAGGTACATGGGCATGAGC
CCGTCCCGGGGGGTGGAGGTAGCTCCATTGCAGGGCCTCGTGCTCGGGGGGTGGTGTTGTAAATCACCCAGT

CATAGCAGGGGGCGCAGGGCATGGTGTTGCACAATATCTTTGAGGAGGAGACTGATGGCCACGGGCAGCCC
TTTGGTGTAGGTGTTTACAAATCTGTTGAGCTGGGAGGGATGCATGCGGGGGGAGATGAGGTGCATCTTG
GCCTGGATCTTGAGATTGGCGATGTTACCGCCCAGATCCCGCCTGGGGTTCATGTTGTGCAGGACCACCA
GCACGGTGTATCCGGTGCACTTGGGGAATTTATCATGCAACTTGGAAGGGAAGGCGTGAAAGAATTTGGC
GACGCCTTTGTGCCCGCCCAGGTTTTCCATGCACTCATCCATGATGATGGCGATGGGCCCGTGGGCGGCGG
CCTGGGCAAAGACGTTTCGGGGGTCGGACACATCATAGTTGTGGTCCTGGGTGAGGTCATCATAGGCCAT
TTTAATGAATTTGGGGCGGAGGGTGCCGGACTGGGGGACAAAGGTtCCCTCGATCCCGGGGGCGTAGTTC
CCCTCACAGATCTGCATCTCCCAGGCTTTGAGCTCGGAGGGGGGGATCATGTCCACCTGCGGGGCGATAA
AGAACACGGTTTCCGGGGCGGGGGAGATGAGCTGGGCCGAAAGCAAGTTCCGGAGCAGCTGGGACTTG
CCGCAGCCGGTGGGGCCGTAGATGACCCCGATGACCGGCTGCAGGTGGTAGTTGAGGGAGAGACAGCTG
CCGTCCTCCCGGAGGAGGGGGGCCACCTCGTTCATCATCTCGCGCACGTGCATGTTCTCGCGCACCAGTT
CCGCCAGGAGGCGCTCTCCCCCCAGGGATAGGAGCTCCTGGAGCGAGGCGAAGTTTTTCAGCGGCTTGA
GTCCGTCGGCCATGGGCATTTTGGAGAGGGTTTGTTGCAAGAGTTCCAGGCGGTCCCAGAGCTCGGTGAT
GTGCTCTACGGCATCTCGATCCAGCAGACCTCCTCGTTTCGCGGGTTGGGACGGCTGCGGGAGTAGGGCA
CCAGACGATGGGCGTCCAGCGCAGCCAGGGTCCGGTCCTTCCAGGGTCGCAGCGTCCGCGTCAGGGTGG
TCTCCGTCACGGTGAAGGGGTGCGCGCCGGGCTGGGCGCTTGCGAGGGTGCGCTTCAGGCTCATCCGGC
TGGTCGAAAACCGCTCCCGATCGGCGCCCTGCGCGTCGGCCAGGTAGCAATTGACCATGAGTTCGTAGTT
GAGCGCCTCGGCCGCGTGGCCTTTGGCGCGGAGCTTACCTTTGGAAGTCTGCCCGCAGGCGGGACAGAG
GAGGGACTTGAGGGCGTAGAGCTTGGGGGCGAGGAAGACGGACTCGGGGGCGTAGGCGTCCGCGCCGC
AGTGGGCGCAGACGGTCTCGCACTCCACGAGCCAGGTGAGGTCGGGCTGGTCGGGGTCAAAAACCAGTT
TCCCGCCGTTCTTTTTGATGCGTTTCTTACCTTTGGTCTCCATGAGCTCGTGTCCCCGCTGGGTGACAAAG
AGGCTGTCCGTGTCCCCGTAGACCGACTTTATGGGCCGGTCCTCGAGCGGTGTGCCGCGGTCCTCCTCGT
AGAGGAACCCCGCCCACTCCGAGACGAAAGCCCGGGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCCACGTGGGAC
GGGTAGCGGTCGTTGTCCACCAGCGGGTCCACCTTTTCCAGGGTATGCAAACACATGTCCCCCTCGTCCA
CATCCAGGAAGGTGATTGGCTTGTAAGTGTAGGCCACGTGACCGGGGGTCCCGGCCGGGGGGGTATAAA
AGGGTGCGGGTCCCTGCTCGTCCTCACTGTCTTCCGGATCGCTGTCCAGGAGCGCCAGCTGTTGGGGTAG
GTATTCCCTCTCGAAGGCGGGCATGACCTCGGCACTCAGGTTGTCAGTTTCTAGAAACGAGGAGGATTTG
ATATTGACGGTGCCGGCGGAGATGCCTTTCAAGAGCCCCTCGTCCATCTGGTCAGAAAAGACGATCTTTTT
GTTGTCGAGCTTGGTGGCGAAGGAGCCGTAGAGGGCGTTGGAGAGGAGCTTGGCGATGGAGCGCATGGT
CTGGTTTTTTTCCTTGTCGGCGCGCTCCTTGGCGGCGATGTTGAGCTGCACGTACTCGCGCGCCACGCACT
TCCATTCGGGGAAGACGGTGGTCAGCTCGTCGGGCACGATTCTGACCTGCCAGCCCCGATTATGCAGGGT
GATGAGGTCCACACTGGTGGCCACCTCGCCGCGCAGGGGCTCATTAGTCCAGCAGAGGCGTCCGCCCTTG
CGCGAGCAGAAGGGGGGCAGGGGGTCCAGCATGACCTCGTCGGGGGGGTCGGCATCGATGGTGAAGATG
CCGGGCAGGAGGTCGGGGTCAAAGTAGCTGATGGAAGTGGCCAGATCGTCCAGGGCAGCTTGCCATTCG
CGCACGGCCAGCGCGCGCTCGTAGGGACTGAGGGGCGTGCCCCAGGGCATGGGATGGGTAAGCGCGGAG
GCGTACATGCCGCAGATGTCGTAGACGTAGAGGGGCTCCTCGAGGATGCCGATGTAGGTGGGGTAGCAGC
GCCCCCCGCGGATGCTGGCGCGCACGTAGTCATACAGCTCGTGCGAGGGGGCGAGGAGCCCCGGGCCCA
GGTTGGTGCGACTGGGCTTTTCGGCGCGGTAGACGATCTGGCGGAAAATGGCATGCGAGTTGGAGGAGA
TGGTGGGCCTTTGGAAGATGTTGAAGTGGGCGTGGGGCAGTCCGACCGAGTCGCGGATGAAGTGGGCGT
AGGAGTCTTGCAGCTTGGCGACGAGCTCGGCGGTGACTAGGACGTCCAGAGCGCAGTAGTCGAGGGTCT
CCTGGATGATGTCATACTTGAGCTGTCCCTTTTGTTTCCACAGCTCGCGGTTGAGAAGGAACTCTTCGCGG
TCCTTCCAGTACTCTTCGAGGGGGAACCCGTCCTGATCTGCACGGTAAGAGCCTAGCATGTAGAACTGGT
TGACGGCCTTGTAGGCGCAGCAGCCCTTCTCCACGGGGAGGGCGTAGGCCTGGGCGGCCTTGCGCAGGG
AGGTGTGCGTGAGGGCGAAAGTGTCCCTGACCATGACCTTGAGGAACTGGTGCTTGAAGTCGATATCGTC
GCAGCCCCCCTGCTCCCAGAGCTGGAAGTCCGTGCGCTTCTTGTAGGCGGGGTTGGGCAAAGCGAAAGT
AACATCGTTGAAGAGGATCTTGCCCGCGCGGGGCATAAAGTTGCGAGTGATGCGGAAAGGTTGGGGCAC
CTCGGCCCGGTTGTTGATGACCTGGGCGGCGAGCACGATCTCGTCGAAGCCGTTGATGTTGTGGCCCACG
ATGTAGAGTTCCACGAATCGCGGACGGCCCTTGACGTGGGGCAGTTTCTTGAGCTCCTCGTAGGTGAGCT
CGTCGGGGTCGCTGAGCCCGTGCTGCTCGAGCGCCCAGTCGGCGAGATGGGGGTTGGCGCGGAGGAAGG
AAGTCCAGAGATCCACGGCCAGGGCGGTTTGCAGACGGTCCCGGTACTGACGGAACTGCTGCCCGACGG
CCATTTTTTCGGGGGTGACGCAGTAGAAGGTGCGGGGGTCCCCGTGCCAGCGATCCCATTTGAGCTGGAG
GGCGAGATCGAGGGCGAGCTCGACGAGCCGGTCGTCCCCGGAGAGTTTCATGACCAGCATGAAGGGGAC
GAGCTGCTTGCCGAAGGACCCCATCCAGGTGTAGGTTTCCACATCGTAGGTGAGGAAGAGCCTTTCGGTG
CGAGGATGCGAGCCGATGGGGAAGAACTGGATCTCCTGCCACCAATTGGAGGAATGGCTGTTGATGTGAT
GGAAGTAGAAATGCCGACGGCGCGCCGAACACTCGTGCTTGTGTTTATACAAGCGGCCACAGTGCTCGCA
ACGCTGCACGGGATGCACGTGCTGCACGAGCTGTACCTGAGTTCCTTTGACGAGGAATTTCAGTGGGAAG
TGGAGTCGTGGCGCCTGCATCTCGTGCTGTACTACGTCGTGGTGGTCGGCCTGGCCCTCTTCTGCCTCGAT
GGTGGTCATGCTGACGAGCCCGCGCGGGAGGCAGGTCCAGACCTCGGCGCGAGCGGGTCGGAGAGCGA
GGACGAGGGCGCGCAGGCCGGAGCTGTCCAGGGTCCTGAGACGCTGCGGAGTCAGGTCAGTGGGCAGC
GGCGGCGCGCGGTTGACTTGCAGGAGTTTTTCCAGGGCGCGCGGGAGGTCCAGATGGTACTTGATCTCCA
CCGCGCCATTGGTGGCGACGTCGATGGCTTGCAGGGTCCCGTGCCCCTGGGGTGTGACCACCGTCCCCCG
TTTCTTCTTGGGCGGCTGGGGCGACGGGGGCGGTGCCTCTTCCATGGTTAGAAGCGGCGGCGAGGACGC
GCGCCGGGCGGCAGGGGCGGCTCGGGGCCCGGAGGCAGGGGCGGCAGGGGCACGTCGGCGCCGCGCGC
GGGTAGGTTCTGGTACTGCGCCCGGAGAAGACTGGCGTGAGCGACGACGCGACGGTTGACGTCCTGGAT
CTGACGCCTCTGGGTGAAGGCCACGGGACCCGTGAGTTTGAACCTGAAAGAGAGTTCGACAGAATCAAT
CTCGGTATCGTTGACGGCGGCCTGCCGCAGGATCTCTTGCACGTCGCCCGAGTTGTCCTGGTAGGCGATCT
CGGTCATGAACTGCTCGATCTCCTCCTCTTGAAGGTCTCCGCGGCCGGCGCGCTCCACGGTGGCCGCGAG
GTCGTTGGAGATGCGGCCCATGAGCTGCGAGAAGGCGTTCATGCCCGCCTCGTTCCAGACGCGGCTGTAG

10

20

30

40

50

ACCACGACGCCCTCGGGATCGCgGGCGCGCATGACCACCTGGGCGAGGTTGAGCTCCACGTGGCGCGTG
AAGACCGCGTAGTTGCAGAGGCGCTGGTAGAGGTAGTTGAGCGTGGTGGCGATGTGCTCGGTGACGAAG
AAATACATGATCCAGCGGCGGAGCGGCATCTCGCTGACGTCGCCCAGCGCCTCCAAACGTTCCATGGCCT
CGTAAAAGTCCACGGCGAAGTTGAAAAACTGGGAGTTGCGCGCCGAGACGGTCAACTCCTCCTCCAGAA
GACGGATGAGCTCGGCGATGGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAGGCCCCCGGGAGTTCCTCCACTTCCTC
TTCTTCCTCCTCCACTAACATCTCTTCTACTTCCTCCTCAGGCGGCAGTGGTGGCGGGGGAGGGGGCCTGC
GTCGCCGGCGGCGCACGGGCAGACGGTCGATGAAGCGCTCGATGGTCTCGCCGCGCCGGCGTCGCATGG
TCTCGGTGACGGCGCGCCCGTCCTCGCGGGGCCGCAGCGTGAAGACGCCGCCGCGCATCTCCAGGTGGC
CGGGGGGGTCCCCGTTGGGCAGGGAGAGGGCGCTGACGATGCATCTTATCAATTGCCCCGTAGGGACTCC
GCGCAAGGACCTGAGCGTCTCGAGATCCACGGGATCTGAAAACCGCTGAACGAAGGCTTCGAGCCAGTC
GCAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACGGTTTCTTCTGGCGGGTCATGTTGGTTGGGAGCGGGGCGGGCGAT
GCTGCTGGTGATGAAGTTGAAATAGGCGGTTCTGAGACGGCGGATGGTGGCGAGGAGCACCAGGTCTTT
GGGCCCGGCTTGCTGGATGCGCAGACGGTCGGCCATGCCCCAGGCGTGGTCCTGACACCTGGCCAGGTC
CTTGTAGTAGTCCTGCATGAGCCGCTCCACGGGCACCTCCTCCTCGCCCGCGCGGCCGTGCATGCGCGTG
AGCCCGAAGCCGCGCTGGGGCTGGACGAGCGCCAGGTCGGCGACGACGCGCTCGGCGAGGATGGCTTG
CTGGATCTGGGTGAGGGTGGTCTGGAAGTCATCAAAGTCGACGAAGCGGTGGTAGGCTCCGGTGTTGAT
GGTGTAGGAGCAGTTGGCCATGACGGACCAGTTGACGGTCTGGTGGCCCGGACGCACGAGCTCGTGGTA
CTTGAGGCGCGAGTAGGCGCGCGTGTCGAAGATGTAGTCGTTGCAGGTGCGCACCAGGTACTGGTAGCC
GATGAGGAAGTGCGGCGGCGGCTGGCGGTAGAGCGGCCATCGCTCGGTGGCGGGGGCGCCGGGCGCGA
GGTCCTCGAGCATGGTGCGGTGGTAGCCGTAGATGTACCTGGACATCCAGGTGATGCCGGCGGCGGTGGT
GGAGGCGCGCGGGAACTCGCGGACGCGGTTCCAGATGTTGCGCAGCGGCAGGAAGTAGTTCATGGTGGG
CACGGTCTGGCCCGTGAGGCGCGCGCAGTCGTGGATGCTCTATACGGGCAAAAACGAAAGCGGTCAGCG
GCTCGACTCCGTGGCCTGGAGGCTAAGCGAACGGGTTGGGCTGCGCGTGTACCCCGGTTCGAATCTCGAA
TCAGGCTGGAGCCGCAGCTAACGTGGTATTGGCACTCCCGTCTCGACCCAAGCCTGCACCAACCCTCCAG
GATACGGAGGCGGGTCGTTTTGCAACTTTTTTTTGGAGGCCGGATGAGACTAGTAAGCGCGGAAAGCGGC
CGACCGCGATGGCTCGCTGCCGTAGTCTGGAGAAGAATCGCCAGGGTTGCGTTGCGGTGTGCCCCGGTTC
GAGGCCGGCCGGATTCCGCGGCTAACGAGGGCGTGGCTGCCCCGTCGTTTCCAAGACCCCATAGCCAGCC
GACTTCTCCAGTTACGGAGCGAGCCCCTCTTTTGTTTTGTTTGTTTTTGCCAGATGCATCCCGTACTGCGGC
AGATGCGCCCCCACCACCCTCCACCGCAACAACAGCCCCCTCCACAGCCGGCGCTTCTGCCCCCGCCCCA
GCAGCAACTTCCAGCCACGACCGCCGCGGCCGCCGTGAGCGGGGCTGGACAGAGTTATGATCACCAGCT
GGCCTTGGAAGAGGGCGAGGGGCTGGCGCGCCTGGGGGCGTCGTCGCCGGAGCGGCACCCGCGCGTGC
AGATGAAAAGGGACGCTCGCGAGGCCTACGTGCCCAAGCAGAACCTGTTCAGAGACAGGAGCGGCGAG
GAGCCCGAGGAGATGCGCGCGGCCCGGTTCCACGCGGGGCGGGAGCTGCGGCGCGGCCTGGACCGAAA
GAGGGTGCTGAGGGACGAGGATTTCGAGGCGGACGAGCTGACGGGGATCAGCCCCGCGCGCGCGCACG
TGGCCGCGGCCAACCTGGTCACGGCGTACGAGCAGACCGTGAAGGAGGAGAGCAACTTCCAAAAATCCT
TCAACAACCACGTGCGCACCCTGATCGCGCGCGAGGAGGTGACCCTGGGCCTGATGCACCTGTGGGACC
TGCTGGAGGCCATCGTGCAGAACCCCACCAGCAAGCCGCTGACGGCGCAGCTGTTCCTGGTGGTGCAGC
ATAGTCGGGACAACGAAGCGTTCAGGGAGGCGCTGCTGAATATCACCGAGCCCGAGGGCCGCTGGCTCC
TGGACCTGGTGAACATTCTGCAGAGCATCGTGGTGCAGGAGCGCGGGCTGCCGCTGTCCGAGAAGCTGG
CGGCCATCAACTTCTCGGTGCTGAGTTTGGGCAAGTACTACGCTAGGAAGATCTACAAGACCCCGTACGT
GCCCATAGACAAGGAGGTGAAGATCGACGGGTTTTACATGCGCATGACCCTGAAAGTGCTGACCCTGAGC
GACGATCTGGGGGTGTACCGCAACGACAGGATGCACCGTGCGGTGAGCGCCAGCAGGCGGCGCGAGCTG
AGCGACCAGGAGCTGATGCATAGTCTGCAGCGGGCCCTGACCGGGGCCGGGACCGAGGGGGAGAGCTAC
TTTGACATGGGCGCGGACCTGCACTGGCAGCCCAGCCGCCGGGCCTTGGAGGCGGCGGCAGGACCCTAC
GTAGAAGAGGTGGACGATGAGGTGGACGAGGAGGGCGAGTACCTGGAAGACTGATGGCGCGACCGTATT
TTTGCTAGATGCAACAACAACAGCCACCTCCTGATCCCGCGATGCGGGCGGCGCTGCAGAGCCAGCCGTC
CGGCATTAACTCCTCGGACGATTGGACCCAGGCCATGCAACGCATCATGGCGCTGACGACCCGCAACCCC
GAAGCCTTTAGACAGCAGCCCCAGGCCAACCGGCTCTCGGCCATCCTGGAGGCCGTGGTGCCCTCGCGC
TCCAACCCCACGCACGAGAAGGTCCTGGCCATCGTGAACGCGCTGGTGGAGAACAAGGCCATCCGCGGC
GACGAGGCCGGCCTGGTGTACAACGCGCTGCTGGAGCGCGTGGCCCGCTACAACAGCACCAACGTGCAG
ACCAACCTGGACCGCATGGTGACCGACGTGCGCGAGGCCGTGGCCCAGCGCGAGCGGTTCCACCGCGAG
TCCAACCTGGGATCCATGGTGGCGCTGAACGCCTTCCTCAGCACCCAGCCCGCCAACGTGCCCCGGGGCC
AGGAGGACTACACCAACTTCATCAGCGCCCTGCGCCTGATGGTGACCGAGGTGCCCCAGAGCGAGGTGT
ACCAGTCCGGGCCGGACTACTTCTTCCAGACCAGTCGCCAGGGCTTGCAGACCGTGAACCTGAGCCAGG
CTTTCAAGAACTTGCAGGGCCTGTGGGGCGTGCAGGCCCCGGTCGGGGACCGCGCGACGGTGTCGAGCC
TGCTGACGCCGAACTCGCGCCTGCTGCTGCTGGTGGCCCCCTTCACGGACAGCGGCAGCATCAACCG
CAACTCGTACCTGGGCTACCTGATTAACCTGTACCGCGAGGCCATCGGCCAGGCGCACGTGGACGAGCAG
ACCTACCAGGAGATCACCCACGTGAGCCGCGCCCTGGGCCAGGACGACCCGGGCAACCTGGAAGCCACC
CTGAACTTTTTGCTGACCAACCGGTCGCAGAAGATCCCGCCCCAGTACGCGCTCAGCACCGAGGAGGAG
CGCATCCTGCGTTACGTGCAGCAGAGCGTGGGCCTGTTCCTGATGCAGGAGGGGGCCACCCCCAGCGCC
GCGCTCGACATGACCGCGCGCAACATGGAGCCCAGCATGTACGCCAGCAACCGCCCGTTCATCAATAAAC
TGATGGACTACTTGCATCGGGCGGCCGCCATGAACTCTGACTATTTCACCAACGCCATCCTGAATCCCCAC
TGGCTCCCGCCGCCGGGGTTCTACACGGGCGAGTACGACATGCCCGACCCCAATGACGGGTTCCTGTGGG
ACGATGTGGACAGCAGCGTGTTCTCCCCCCGACCGGGTGCTAACGAGCGCCCCTTGTGGAAGAAGGAAG
GCAGCGACCGACGCCCGTCCTCGGCGCTGTCCGGCCGCGAGGGTGCTGCCGCGGCGGTGCCCGAGGCCG
CCAGTCCTTTCCCGAGCTTGCCCTTCTCGCTGAACAGTATCCGCAGCAGCGAGCTGGGCAGGATCACGCG
CCCGCGCTTGCTGGGCGAAGAGGAGTACTTGAATGACTCGCTGTTGAGACCCGAGCGGGAGAAGAACTT
CCCCAATAACGGGATAGAAAGCCTGGTGGACAAGATGAGCCGCTGGAAGACGTATGCGCAGGAGCACAG

GGACGATCCCCGGGCGTCGCAGGGGGCCACGAGCCGGGGCAGCGCCGCCCGTAAACGCCGGTGGCACG
ACAGGCAGCGGGGACAGATGTGGGACGATGAGGACTCCGCCGACGACAGCAGCGTGTTGGACTTGGGT
GGGAGTGGTAACCCGTTCGCTCACCTGCGCCCCCGTATCGGGCGCATGATGTAAGAGAAACCGAAAATAA
ATGATACTCACCAAGGCCATGGCGACCAGCGTGCGTTCGTTTCTTCTCTGTTGTTGTTGTATCTAGTATGAT
GAGGCGTGCGTACCCGGAGGGTCCTCCTCCCTCGTACGAGAGCGTGATGCAGCAGGCGATGGCGGCGGC
GGCGATGCAGCCCCCGCTGGAGGCTCCTTACGTGCCCCCGCGGTACCTGGCGCCTACGGAGGGGCGGAA
CAGCATTCGTTACTCGGAGCTGGCACCCTTGTACGATACCACCCGGTTGTACCTGGTGGACAACAAGTCG
GCGGACATCGCCTCGCTGAACTACCAGAACGACCACAGCAACTTCCTGACCACCGTGGTGCAGAACAAT
GACTTCACCCCCACGGAGGCCAGCACCCAGACCATCAACTTTGACGAGCGCTCGCGGTGGGGCGGCCAG
CTGAAAACCATCATGCACACCAACATGCCCAACGTGAACGAGTTCATGTACAGCAACAAGTTCAAGGCG
CGGGTGATGGTCTCCCGCAAGACCCCCAATGGGGTGACAGTGACAGAGGATTATGATGGTAGTCAGGATG
AGCTGAAGTATGAATGGGTGGAATTTGAGCTGCCCGAAGGCAACTTCTCGGTGACCATGACCATCGACCT
GATGAACAACGCCATCATCGACAATTACTTGGCGGTGGGGCGGCAGAACGGGGTGCTGGAGAGCGACAT
CGGCGTGAAGTTCGACACTAGGAACTTCAGGCTGGGCTGGGACCCCGTGACCGAGCTGGTCATGCCCGG
GGTGTACACCAACGAGGCTTTCCATCCCGATATTGTCTTGCTGCCCGGCTGCGGGGTGGACTTCACCGAG
AGCCGCCTCAGCAACCTGCTGGGCATTCGCAAGAGGCAGCCCTTCCAGGAAGGCTTCCAGATCATGTACG
AGGATCTGGAGGGGGGCAACATCCCCGCGCTCCTGGATGTCGACGCCTATGAGAAAAGCAAGGAGGATG
CAGCAGCTGAAGCAACTGCAGCCGTAGCTACCGCCTCTACCGAGGTCAGGGGCGATAATTTTGCAAGCGC
CGCAGCAGTGGCAGCGGCCGAGGCGGCTGAAACCGAAAGTAAGATAGTCATTCAGCCGGTGGAGAAGGA
TAGCAAGAACAGGAGCTACAACGTACTACCGGACAAGATAAACACCGCCTACCGCAGCTGGTACCTAGCC
TACAACTATGGCGACCCCGAGAAGGGCGTGCGCTCCTGGACGCTGCTCACCACCTCGGACGTCACCTGCG
GCGTGGAGCAAGTCTACTGGTCGCTGCCCGACATGATGCAAGACCCGGTCACCTTCCGCTCCACGCGTCA
AGTTAGCAACTACCCGGTGGTGGGCGCCGAGCTCCTGCCCGTCTACTCCAAGAGCTTCTTCAACGAGCAG
GCCGTCTACTCGCAGCAGCTGCGCGCCTTCACCTCGCTTACGCACGTCTTCAACCGCTTCCCCGAGAACC
AGATCCTCGTCCGCCCGCCCGCGCCCACCATTACCACCGTCAGTGAAAACGTTCCTGCTCTCACAGATCA
CGGGACCCTGCCGCTGCGCAGCAGTATCCGGGGAGTCCAGCGCGTGACCGTTACTGACGCCAGACGCCG
CACCTGCCCCTACGTCTACAAGGCCCTGGGCATAGTCGCGCCGCGCGTCCTCTCGAGCCGCACCTTCTAA
ATGTCCATTCTCATCTCGCCCAGTAATAACACCGGTTGGGGCCTGCGCGCGCCCAGCAAGATGTACGGAG
GCGCTCGCCAACGCTCCACGCAACACCCCGTGCGCGTGCGCGGGCACTTCCGCGCTCCCTGGGGCGCCC
TCAAGGGCCGCGTGCGGTCGCGCACCACCGTCGACGACGTGATCGACCAGGTGGTGGCCGACGCGCGCA
ACTACACCCCCGCCGCCGCGCCCGTCTCCACCGTGGACGCCGTCATCGACAGCGTGGTGGCcGACGCGCG
CCGGTACGCCCGCGCCAAGAGCCGGCGGCGGCATCGCCCGGCGGCACCGGAGCACCCCCGCCATGCG
CGCGGCGCGAGCCTTGCTGCGCAGGGCCAGGCGCACGGGACGCAGGGCCATGCTCAGGGCGGCCAGAC
GCGCGGCTTCAGGCGCCAGCGCCGGCAGGACCCGGAGACGCGCGGCCACGGCGGCGGCAGCGGCCATC
GCCAGCATGTCCCGCCCGCGGCGAGGGAACGTGTACTGGGTGCGCGACGCCGCCACCGGTGTGCGCGTG
CCCGTGCGCACCCGCCCCCCTCGCACTTGAAGATGTTCACTTCGCGATGTTGATGTGTCCCAGCGGCGAG
GAGGATGTCCAAGCGCAAATTCAAGGAAGAGATGCTCCAGGTCATCGCGCCTGAGATCTACGGCCCTGCG
GTGGTGAAGGAGGAAAGAAAGCCCCGCAAAATCAAGCGGGTCAAAAAGGACAAAAAGGAAGAAGAAA
GTGATGTGGACGGATTGGTGGAGTTTGTGCGCGAGTTCGCCCCCCGGCGGCGCGTGCAGTGGCGCGGGC
GGAAGGTGCAACCGGTGCTGAGACCCGGCACCACCGTGGTCTTCACGCCCGGCGAGCGCTCCGGCACCG
CTTCCAAGCGCTCCTACGACGAGGTGTACGGGGATGATGATATTCTGGAGCAGGCGGCCGAGCGCCTGGG
CGAGTTTGCTTACGGCAAGCGCAGCCGTTCCGCACCGAAGGAAGAGGCGGTGTCCATCCCGCTGGACCA
CGGCAACCCCACGCCGAGCCTCAAGCCCGTGACCTTGCAGCAGGTGCTGCCGACCGCGGCGCCGCGCCG
GGGGTTCAAGCGCGAGGGCGAGGATCTGTACCCCACCATGCAGCTGATGGTGCCCAAGCGCCAGAAGCT
GGAAGACGTGCTGGAGACCATGAAGGTGGACCCGGACGTGCAGCCCGAGGTCAAGGTGCGGCCCATCA
AGCAGGTGGCCCCGGGCCTGGGCGTGCAGACCGTGGACATCAAGATTCCCACGGAGCCCATGGAAACGC
AGACCGAGCCCATGATCAAGCCCAGCACCAGCACCATGGAGGTGCAGACGGATCCCTGGATGCCATCGG
CTCCTAGTCGAAGACCCCGGCGCAAGTACGGCGCGGCCAGCCTGCTGATGCCCAACTACGCGCTGCATCC
TTCCATCATCCCCACGCCGGGCTACCGCGGCACGCGCTTCTACCGCGGTCATACCAGCAGCCGCCGCCGC
AAGACCACCACTCGCCGCCGCCGTCGCCGCACCGCCGCTGCAACCACCCCTGCCGCCCTGGTGCGGAGA
GTGTACCGCCGCGGCCGCGCACCTCTGACCCTGCCGCGCGCGCGCTACCACCCGAGCATCGCCATTTAAA
CTTTCGCCtGCTTTGCAGATCAATGGCCCTCACATGCCGCCTTCGCGTTCCCATTACGGGCTACCGAGGAA
GAAAACCGCGCCGTAGAAGGCTGGCGGGGAACGGGATGCGTCGCCACCACCACCGGCGGCGGCGCGCC
ATCAGCAAGCGGTTGGGGGGAGGCTTCCTGCCCGCGCTGATCCCCATCATCGCCGCGGCGATCGGGGCGA
TCCCCGGCATTGCTTCCGTGGCGGTGCAGGCCTCTCAGCGCCACTGAGACACACTTGGAAACATCTTGTA
ATAAACCaATGGACTCTGACGCTCCTGGTCCTGTGATGTGTTTTCGTAGACAGATGGAAGACATCAATTTTT
CGTCCCTGGCTCCGCGACACGGCACGCGGCCGTTCATGGGCACCTGGAGCGACATCGGCACCAGCCAAC
TGAACGGGGGCGCCTTCAATTGGAGCAGTCTCTGGAGCGGGCTTAAGAATTTCGGGTCCACGCTTAAAAC
CTATGGCAGCAAGGCGTGGAACAGCACCACAGGGCAGGCGCTGAGGGATAAGCTGAAAGAGCAGAACT
TCCAGCAGAAGGTGGTCGATGGGCTCGCCTCGGGCATCAACGGGGTGGTGGACCTGGCCAACCAGGCCG
TGCAGCGGCAGATCAACAGCCGCCTGGACCCGGTGCCGCCCGCCGGCTCCGTGGAGATGCCGCAGGTGG
AGGAGGAGCTGCCTCCCCTGGACAAGCGGGGCGAGAAGCGACCCCGCCCCGATGCGGAGGAGACGCTG
CTGACGCACACGGACGAGCCGCCCCCGTACGAGGAGGCGGTGAAACTGGGTCTGCCCACCACGCGGCCC
ATCGCGCCCCTGGCCACCGGGGTGCTGAAACCCGAAAAGCCCGCGACCCTGGACTTGCCTCCTCCCCAG
CCTTCCCGCCCCTCTACAGTGGCTAAGCCCCTGCCGCCGGTGGCCGTGGCCCGCGCGCGACCCGGGGGC
ACCGCCCGCCCTCATGCGAACTGGCAGAGCACTCTGAACAGCATCGTGGGTCTGGGAGTGCAGAGTGTG
AAGCGCCGCCGCTGCTATTAAACCTACCGTAGCGCTTAACTTGCTTGTCTGTGTGTGTATGTATTATGTCGC
CGCCGCCGCTGTCCACCAGAAGGAGGAGTGAAGAGGCGCGTCGCCGAGTTGCAAGATGGCCACCCCATC

10 20 30 40 50

GATGCTGCCCCAGTGGGCGTACATGCACATCGCCGGACAGGACGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTG
GTGCAGTTTGCCCGCGCCACAGACACCTACTTCAGTCTGGGGAACAAGTTTAGGAACCCCACGGTGGCG
CCCACGCACGATGTGACCACCGACCGCAGCCAGCGGCTGACGCTGCGCTTCGTGCCCGTGGACCGCGAG
GACAACACCTACTCGTACAAAGTGCGCTACACGCTGGCCGTGGGCGACAACCGCGTGCTGGACATGGCC
AGCACCTACTTTGACATCCGCGGCGTGCTGGATCGGGGCCCTAGCTTCAAACCCTACTCCGGCACCGCCT
ACAACAGTCTGGCCCCCAAGGGAGCACCCAACACTTGTCAGTGGACATATAAAGCCGATGGTGAAACTG
CCACAGAAAAAAACCTATACATATGGAAATGCACCCGTGCAGGGCATTAACATCACAAAAGATGGTATTCA
ACTTGGAACTGACACCGATGATCAGCCAATCTACGCAGATAAAACCTATCAGCCTGAACCTCAAGTGGGT
GATGCTGAATGGCATGACATCACTGGTACTGATGAAAAGTATGGAGGCAGAGCTCTTAAGCCTGATACCA
AAATGAAGCCTTGTTATGGTTCTTTTGCCAAGCCTACTAATAAAGAAGGAGGTCAGGCAAATGTGAAAAC
AGGAACAGGCACTACTAAAGAATATGACATAGACATGGCTTTCTTTGACAACAGAAGTGCGGCTGCTGCT
GGCCTAGCTCCAGAAATTGTTTTGTATACTGAAAATGTGGATTTGGAAACTCCAGATACCCATATTGTATAC
AAAGCAGGCACAGATGACAGCAGCTCTTCTATTAATTTGGGTCAGCAAGCCATGCCCAACAGACCTAACT
ACATTGGTTTCAGAGACAACTTTATCGGGCTCATGTACTACAACAGCACTGGCAATATGGGGGTGCTGGCC
GGTCAGGCTTCTCAGCTGAATGCTGTGGTTGACTTGCAAGACAGAAACACCGAGCTGTCCTACCAGCTCT
TGCTTGACTCTCTGGGTGACAGAACCCGGTATTTCAGTATGTGGAATCAGGCGGTGGACAGCTATGATCCT
GATGTGCGCATTATTGAAAATCATGGTGTGGAGGATGAACTTCCCAACTATTGTTTCCCTCTGGATGCTGTT
GGCAGAACAGATACTTATCAGGGAATTAAGGCTAATGGAACTGATCAAACCACATGGACCAAAGATGACA
GTGTCAATGATGCTAATGAGATAGGCAAGGGTAATCCATTCGCCATGGAAATCAACATCCAAGCCAACCTG
TGGAGGAACTTCCTCTACGCCAACGTGGCCCTGTACCTGCCCGACTCTTACAAGTACACGCCGGCCAATG
TTACCCTGCCCACCAACACCAACACCTACGATTACATGAACGGCCGGGTGGTGGCGCCCTCGCTGGTGGA
CTCCTACATCAACATCGGGGCGCGCTGGTCGCTGGATCCCATGGACAACGTGAACCCCTTCAACCACCAC
CGCAATGCGGGGCTGCGCTACCGCTCCATGCTCCTGGGCAACGGGCGCTACGTGCCCTTCCACATCCAGG
TGCCCCAGAAATTTTTCGCCATCAAGAGCCTCCTGCTCCTGCCCGGGTCCTACACCTACGAGTGGAACTTC
CGCAAGGACGTCAACATGATCCTGCAGAGCTCCCTCGGCAACGACCTGCGCACGGACGGGGCCTCCATC
TCCTTCACCAGCATCAACCTCTACGCCACCTTCTTCCCCATGGCGCACAACACGGCCTCCACGCTCGAGG
CCATGCTGCGCAACGACACCAACGACCAGTCCTTCAACGACTACCTCTCGGCGGCCAACATGCTCTACCC
CATCCCGGCCAACGCCACCAACGTGCCCATCTCCATCCCCTCGCGCAACTGGGCCGCCTTCCGCGGCTGG
TCCTTCACGCGTCTCAAGACCAAGGAGACGCCCTCGCTGGGCTCCGGGTTCGACCCCTACTTCGTCTACT
CGGGCTCCATCCCCTACCTCGACGGCACCTTCTACCTCAACCACACCTTCAAGAAGGTCTCCATCACCTTC
GACTCCTCCGTCAGCTGGCCCGGCAACGACCGGCTCCTGACGCCCAACGAGTTCGAAATCAAGCGCACC
GTCGACGGCGAGGGCTACAACGTGGCCCAGTGCAACATGACCAAGGACTGGTTCCTGGTCCAGATGCTG
GCCCACTACAACATCGGCTACCAGGGCTTCTACGTGCCCGAGGGCTACAAGGACCGCATGTACTCCTTCTT
CCGCAACTTCCAGCCCATGAGCCGCCAGGTGGTGGACGAGGTCAACTACAAGGACTACCAGGCCGTCAC
CCTGGCCTACCAGCACAACAACTCGGGCTTCGTCGGCTACCTCGCGCCCACCATGCGCCAGGGCCAGCCC
TACCCCGCCAACTACCCCTACCCGCTCATCGGCAAGAGCGCCGTCACCAGCGTCACCCAGAAAAAGTTCC
TCTGCGACAGGGTCATGTGGCGCATCCCCTTCTCCAGCAACTTCATGTCCATGGGCGCGCTCACCGACCTC
GGCCAGAACATGCTCTATGCCAACTCCGCCCACGCGCTAGACATGAATTTCGAAGTCGACCCCATGGATG
AGTCCACCCTTCTCTATGTTGTCTTCGAAGTCTTCGACGTCGTCCGAGTGCACCAGCCCCACCGCGGCGTC
ATCGAGGCCGTCTACCTGCGCACCCCCTTCTCGGCCGGTAACGCCACCACCTAAGCTCTTGCTTCTTGCAA
GCCATGGCCGCGGGCTCCGGCGAGCAGGAGCTCAGGGCCATCATCCGCGACCTGGGCTGCGGGCCCTAC
TTCCTGGGCACCTTCGATAAGCGCTTCCCGGGATTCATGGCCCCGCACAAGCTGGCCTGCGCCATCGTCA
ACACGGCCGGCCGCGAGACCGGGGGCGAGCACTGGCTGGCCTTCGCCTGGAACCCGCGCTCGAACACCT
GCTACCTCTTCGACCCCTTCGGGTTCTCGGACGAGCGCCTCAAGCAGATCTACCAGTTCGAGTACGAGGG
CCTGCTGCGCCGCAGCGCCCTGGCCACCGAGGACCGCTGCGTCACCCTGGAAAAGTCCACCCAGACCGT
GCAGGGTCCGCGCTCGGCCGCCTGCGGGCTCTTCTGCTGCATGTTCCTGCACGCCTTCGTGCACTGGCCC
GACCGCCCCATGGACAAGAACCCCACCATGAACTTGCTGACGGGGGTGCCCAACGGCATGCTCCAGTCG
CCCCAGGTGGAACCCACCCTGCGCCGCAACCAGGAGGCGCTCTACCGCTTCCTCAACTCCCACTCCGCCT
ACTTTCGCTCCCACCGCGCGCGCATCGAGAAGGCCACCGCCTTCGACCGCATGAATCAAGACATGTAAAC
CGTGTGTGTATGTTAAATGTCTTTAATAAACAGCACTTTCATGTTACACATGCATCTGAGATGATTTATTTAG
AAATCGAAAGGGTTCTGCCGGGTCTCGGCATGGCCCGCGGGCAGGGACACGTTGCGGAACTGGTACTTG
GCCAGCCACTTGAACTCGGGGATCAGCAGTTTGGGCAGCGGGGTGTCGGGGAAGGAGTCGGTCCACAGC
TTCCGCGTCAGTTGCAGGGCGCCCAGCAGGTCGGGCGCGGAGATCTTGAAATCGCAGTTGGGACCCGCG
TTCTGCGCGCGGGAGTTGCGGTACACGGGGTTGCAGCACTGGAACACCATCAGGGCCGGGTGCTTCACG
CTCGCCAGCACCGTCGCGTCGGTGATGCTCTCCACGTCGAGGTCCTCGGCGTTGGCCATCCCGAAGGGGG
TCATCTTGCAGGTCTGCCTTCCCATGGTGGGCACGCACCCGGGCTTGTGGTTGCAATCGCAGTGCAGGGG
GATCAGCATCATCTGGGCCTGGTCGGCGTTCATCCCCGGGTACATGGCCTTCATGAAAGCCTCCAATTGCC
TGAACGCCTGCTGGGCCTTGGCTCCCTCGGTGAAGAAGACCCCGCAGGACTTGCTAGAGAACTGGTTGG
TGGCGCACCCGGCGTCGTGCACGCAGCAGCGCGCGTCGTTGTTGGCCAGCTGCACCACGCTGCGCCCCC
AGCGGTTCTGGGTGATCTTGGCCCGGTCGGGGTTCTCCTTCAGCGCGCGCTGCCCGTTCTCGCTCGCCAC
ATCCATCTCGATCATGTGCTCCTTCTGGATCATGGTGGTCCCGTGCAGGCACCGCAGCTTGCCCTCGGCCT
CGGTGCACCCGTGCAGCCACAGCGCGCACCCGGTGCACTCCCAGTTCTTGTGGGCGATCTGGGAATGCGC
GTGCACGAAGCCCTGCAGGAAGCGGCCCATCATGGTGGTCAGGGTCTTGTTGCTAGTGAAGGTCAGCGG
AATGCCGCGGTGCTCCTCGTTGATGTACAGGTGGCAGATGCGGCGGTACACCTCGCCCTGCTCGGGCATC
AGCTGGAAGTTGGCTTTCAGGTCGGTCTCCACGCGGTAGCGGTCCATCAGCATAGTCATGATTTCCATACC
CTTCTCCCAGGCCGAGACGATGGGCAGGCTCATAGGGTTCTTCACCATCATCTTAGCGCTAGCAGCCGCG
GCCAGGGGGTCGCTCTCGTCCAGGGTCTCAAAGCTCCGCTTGCCGTCCTTCTCGGTGATCCGCACCGGGG
GGTAGCTGAAGCCCACGGCCGCCAGCTCCTCCTCGGCCTGTCTTTCGTCCTCGCTGTCCTGGCTGACGTC

CTGCAGGACCACATGCTTGGTCTTGCGGGGTTTCTTCTTGGGCGGCAGCGGCGGCGGAGATGTTGGAGAT
GGCGAGGGGGAGCGCGAGTTCTCGCTCACCACTACTATCTCTTCCTCTTCTTGGTCCGAGGCCACGCGGC
GGTAGGTATGTCTCTTCGGGGGCAGAGGCGGAGGCGACGGGCTCTCGCCGCCGCGACTTGGCGGATGGC
TGGCAGAGCCCCTTCCGCGTTCGGGGGTGCGCTCCCGGCGGCGCTCTGACTGACTTCCTCCGCGGCCGGC
CATTGTGTTCTCCTAGGGAGGAACAACAAGCATGGAGACTCAGCCATCGCCAACCTCGCCATCTGCCCCC
ACCGCCGACGAGAAGCAGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAACCGCCCCGCCGCCCAGCCCCGCCACCTCC
GACGCGGCCGTCCCAGACATGCAAGAGATGGAGGAATCCATCGAGATTGACCTGGGCTATGTGACGCCCG
CGGAGCACGAGGAGGAGCTGGCAGTGCGCTTTTCACAAGAAGAGATACACCAAGAACAGCCAGAGCAG
GAAGCAGAGAATGAGCAGAGTCAGGCTGGGCTCGAGCATGACGGCGACTACCTCCACCTGAGCGGGGG
GGAGGACGCGCTCATCAAGCATCTGGCCCGGCAGGCCACCATCGTCAAGGATGCGCTGCTCGACCGCAC
CGAGGTGCCCCTCAGCGTGGAGGAGCTCAGCCGCGCCTACGAGTTGAACCTCTTCTCGCCGCGCGTGCC
CCCCAAGCGCCAGCCCAATGGCACCTGCGAGCCCAACCCGCGCCTCAACTTCTACCCGGTCTTCGCGGTG
CCCGAGGCCCTGGCCACCTACCACATCTTTTTCAAGAACCAAAAGATCCCCGTCTCCTGCCGCGCCAACC
GCACCCGCGCCGACGCCCTTTTCAACCTGGGTCCCGGCGCCCGCCTACCTGATATCGCCTCCTTGGAAGA
GGTTCCCAAGATCTTCGAGGGTCTGGGCAGCGACGAGACTCGGGCCGCGAACGCTCTGCAAGGAGAAGG
AGGAGAGCATGAGCACCACAGCGCCCTGGTCGAGTTGGAAGGCGACAACGCGCGGCTGGCGGTGCTCA
AACGCACGGTCGAGCTGACCCATTTCGCCTACCCGGCTCTGAACCTGCCCCCCAAAGTCATGAGCGCGGT
CATGGACCAGGTGCTCATCAAGCGCGCGTCGCCCATCTCCGAGGACGAGGGCATGCAAGACTCCGAGGA
GGGCAAGCCCGTGGTCAGCGACGAGCAGCTGGCCCGGTGGCTGGGTCCTAATGCTAGTCCCCAGAGTTT
GGAAGAGCGGCGCAAACTCATGATGGCCGTGGTCCTGGTGACCGTGGAGCTGGAGTGCCTGCGCCGCTT
CTTCGCCGACGCGGAGACCCTGCGCAAGGTCGAGGAGAACCTGCACTACCTCTTCAGGCACGGGTTCGT
GCGCCAGGCCTGCAAGATCTCCAACGTGGAGCTGACCAACCTGGTCTCCTACATGGGCATCTTGCACGAG
AACCGCCTGGGGCAGAACGTGCTGCACACCACCCTGCGCGGGGAGGCCCGGCGCGACTACATCCGCGAC
TGCGTCTACCTCTACCTCTGCCACACCTGGCAGACGGGCATGGGCGTGTGGCAGCAGTGTCTGGAGGAGC
AGAACCTGAAAGAGCTCTGCAAGCTCCTGCAGAAGAACCTCAAGGGTCTGTGGACCGGGTTCGACGAGC
GCACCACCGCCTCGGACCTGGCCGACCTCATTTTCCCCGAGCGCCTCAGGCTGACGCTGCGCAACGGCCT
GCCCGACTTTATGAGCCAAAGCATGTTGCAAAACTTTCGCTCTTTCATCCTCGAACGCTCCGGAATCCTGC
CCGCCACCTGCTCCGCGCTGCCCTCGGACTTCGTGCCGCTGACCTTCCGCGAGTGCCCCCCGCCGCTGTG
GAGCCACTGCTACCTGCTGCGCCTGGCCAACTACCTGGCCTACCACTCGGACGTGATCGAGGACGTCAGC
GGCGAGGGCCTGCTCGAGTGCCACTGCCGCTGCAACCTCTGCACGCCGCACCGCTCCCTGGCCTGCAAC
CCCCAGCTGCTGAGCGAGACCCAGATCATCGGCACCTTCGAGTTGCAAGGGCCCAGCGAAGGCGAGGGT
TCAGCCGCCAAGGGGGGTCTGAAACTCACCCCGGGGCTGTGGACCTCGGCCTACTTGCGCAAGTTCGTG
CCCGAGGACTACCATCCCTTCGAGATCAGGTTCTACGAGGACCAATCCCATCCGCCCAAGGCCGAGCTGT
CGGCCTGCGTCATCACCCAGGGGGCGATCCTGGCCCAATTGCAAGCCATCCAGAAATCCCGCCAAGAATT
CTTGCTGAAAAAGGGCCGCGGGGTCTACCTCGACCCCCAGACCGGTGAGGAGCTCAACCCCGGCTTCCC
CCAGGATGCCCCGAGGAAACAAGAAGCTGAAAGTGGAGCTGCCGCCCGTGGAGGATTTGGAGGAAGAC
TGGGAGAACAGCAGTCAGGCAGAGGAGGAGGAGATGGAGGAAGACTGGGACAGCACTCAGGCAGAGG
AGGACAGCCTGCAAGACAGTCTGGAGGAAGACGAGGAGGAGGCAGAGGAGGAGGTGGAAGAAGCAGC
CGCCGCCAGACCGTCGTCCTCGGCGGGGGAGAAAGCAAGCAGCACGGATACCATCTCCGCTCCGGGTCG
GGGTCCCGCTCGACCACACAGTAGATGGGACGAGACCGGACGATTCCCGAACCCCACCACCCAGACCGG
TAAGAAGGAGCGGCAGGGATACAAGTCCTGGCGGGGGCACAAAAACGCCATCGTCTCCTGCTTGCAGGC
CTGCGGGGGCAACATCTCCTTCACCCGGCGCTACCTGCTCTTCCACCGCGGGGTGAACTTTCCCCGCAAC
ATCTTGCATTACTACCGTCACCTCCACAGCCCCTACTACTTCCAAGAAGAGGCAGCAGCAGCAGAAAAAG
ACCAGCAGAAAACCAGCAGCTAGAAAATCCACAGCGGCGGCAGCAGGTGGACTGAGGATCGCGGCGAA
CGAGCCGGCGCAAACCCGGGAGCTGAGGAACCGGATCTTTCCCACCCTCTATGCCATCTTCCAGCAGAGT
CGGGGGCAGGAGCAGGAACTGAAAGTCAAGAACCGTTCTCTGCGCTCGCTCACCCGCAGTTGTCTGTAT
CACAAGAGCGAAGACCAACTTCAGCGCACTCTCGAGGACGCCGAGGCTCTCTTCAACAAGTACTGCGCG
CTCACTCTTAAAGAGTAGCCCGCGCCCGCCCAGTCGCAGAAAAAGGCGGGAATTACGTCACCTGTGCCCT
TCGCCCTAGCCGCCTCCACCCATCATCATGAGCAAAGAGATTCCCACGCCTTACATGTGGAGCTACCAGCC
CCAGATGGGCCTGGCCGCCGGTGCCGCCCAGGACTACTCCACCCGCATGAATTGGCTCAGCGCCGGGCCC
GCGATGATCTCACGGGTGAATGACATCCGCGCCCACCGAAACCAGATACTCCTAGAACAGTCAGCGCTCA
CCGCCACGCCCCGCAATCACCTCAATCCGCGTAATTGGCCCGCCGCCCTGGTGTACCAGGAAATTCCCCA
GCCCACGACCGTACTACTTCCGCGAGACGCCCAGGCCGAAGTCCAGCTGACTAACTCAGGTGTCCAGCT
GGCGGGCGGCGCCACCCTGTGTCGTCACCGCCCCGCTCAGGGTATAAAGCGGCTGGTGATCCGGGGCAG
AGGCACACAGCTCAACGACGAGGTGGTGAGCTCTTCGCTGGGTCTGCGACCTGACGGAGTCTTCCAACT
CGCCGGATCGGGGAGATCTTCCTTCACGCCTCGTCAGGCCGTCCTGACTTTGGAGAGTTCGTCCTCGCAG
CCCCGCTCGGGTGGCATCGGCACTCTCCAGTTCGTGGAGGAGTTCACTCCCTCGGTCTACTTCAACCCCTT
CTCCGGCTCCCCCGGCCACTACCCGGACGAGTTCATCCCGAACTTCGACGCCATCAGCGAGTCGGTGGAC
GGCTACGATTGAAACTAATCACCCCCTTATCCAGTGAAATAAAGATCATATTGATGATGATTTTACAGAAAT
AAAAAATAATCATTTGATTTGAAATAAAGATACAATCATATTGATGATTTGAGTTTAACAAAAAAATAAAGA
ATCACTTACTTGAAATCTGATACCAGGTCTCTGTCCATGTTTTCTGCCAACACCACTTCACTCCCCTCTTCC
CAGCTCTGGTACTGCAGGCCCCGGCGGGCTGCAAACTTCCTCCACACGCTGAAGGGGATGTCAAATTCCT
CCTGTCCCTCAATCTTCATTTTATCTTCTATCAGATGTCCAAAAAGCGCGTCCGGGTGGATGATGACTTCGA
CCCCGTCTACCCCTACGATGCAGACAACGCACCGACCGTGCCCTTCATCAACCCCCCCTTCGTCTCTTCAG
ATGGATTCCAAGAGAAGCCCCTGGGGGTGTTGTCCCTGCGACTGGCCGACCCCGTCACCACCAAGAACG
GGGAAATCACCCTCAAGCTGGGAGAGGGGGTGGACCTCGATTCCTCGGGAAAACTCATCTCCAACACGG
CCACCAAGGCCGCCGCCCCTCTCAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCCTTAACATGGATCACCCCTTTTAC
ACTAAAGATGGAAAATTATCCTTACAAGTTTCTCCACCATTAAATATACTGAGAACAAGCATTCTAAACAC

ACTAGCTTTAGGTTTTGGATCAGGTTTAGGACTCCGTGGCTCTGCCTTGGCAGTACAGTTAGTCTCTCCAC
TTACATTTGATACTGATGGAAACATAAAGCTTACCTTAGACAGAGGTTTGCATGTTACAACAGGAGATGCA
ATTGAAAGCAACATAAGCTGGGCTAAAGGTTTAAAATTTGAAGATGGAGCCATAGCAACCAACATTGGAA
ATGGGTTAGAGTTTGGAAGCAGTAGTACAGAAACAGGTGTTGATGATGCTTACCCAATCCAAGTTAAACT
TGGATCTGGCCTTAGCTTTGACAGTACAGGAGCCATAATGGCTGGTAACAAAGAAGACGATAAACTCACT
TTGTGGACAACACCTGATCCATCACCAAACTGTCAAATACTCGCAGAAAATGATGCAAAACTAACACTTT
GCTTGACTAAATGTGGTAGTCAAATACTGGCCACTGTGTCAGTCTTAGTTGTAGGAAGTGGAAACCTAAA
CCCCATTACTGGCACCGTAAGCAGTGCTCAGGTGTTTCTACGTTTTGATGCAAACGGTGTTCTTTTAACAG
AACATTCTACACTAAAAAAATACTGGGGGTATAGGCAGGGAGATAGCATAGATGGCACTCCATATACCAAT
GCTGTAGGATTCATGCCCAATTTAAAAGCTTATCCAAAGTCACAAAGTTCTACTACTAAAAATAATATAGTA
GGGCAAGTATACATGAATGGAGATGTTTCAAAACCTATGCTTCTCACTATAACCCTCAATGGTACTGATGAC
AGCAACAGTACATATTCAATGTCATTTTCATACACCTGGACTAATGGAAGCTATGTTGGAGCAACATTTGG
GGCTAACTCTTATACCTTCTCATACATCGCCCAAGAATGAACACTGTATCCCACCCTGCATGCCAACCCTTC
CCACCCCACTCTGTGGAACAAACTCTGAAACACAAAATAAAATAAAGTTCAAGTGTTTTATTGATTCAAC
AGTTTTACAGGATTCGAGCAGTTATTTTTCCTCCACCCTCCCAGGACATGGAATACACCACCCTCTCCCCC
CGCACAGCCTTGAACATCTGAATGCCATTGGTGATGGACATGCTTTTGGTCTCCACGTTCCACACAGTTTC
AGAGCGAGCCAGTCTCGGGTCGGTCAGGGAGATGAAACCCTCCGGGCACTCCCGCATCTGCACCTCACA
GCTCAACAGCTGAGGATTGTCCTCGGTGGTCGGGATCACGGTTATCTGGAAGAAGCAGAAGAGCGGCGG
TGGGAATCATAGTCCGCGAACGGGATCGGCCGGTGGTGTCGCATCAGGCCCCGCAGCAGTCGCTGCCGCC
GCCGCTCCGTCAAGCTGCTGCTCAGGGGGTCCGGGTCCAGGGACTCCCTCAGCATGATGCCCACGGCCCT
CAGCATCAGTCGTCTGGTGCGGCGGGCGCAGCAGCGCATGCGGATCTCGCTCAGGTCGCTGCAGTACGTG
CAACACAGAACCACCAGGTTGTTCAACAGTCCATAGTTCAACACGCTCCAGCCGAAACTCATCGCGGGA
AGGATGCTACCCACGTGGCCGTCGTACCAGATCCTCAGGTAAATCAAGTGGTGCCCCCTCCAGAACACGC
TGCCCACGTACATGATCTCCTTGGGCATGTGGCGGTTCACCACCTCCCGGTACCACATCACCCTCTGGTTG
AACATGCAGCCCCGGATGATCCTGCGGAACCACAGGGCCAGCACCGCCCCGCCCGCCATGCAGCGAAGA
GACCCCGGGTCCCGGCAATGGCAATGGAGGACCCACCGCTCGTACCCGTGGATCATCTGGGAGCTGAAC
AAGTCTATGTTGGCACAGCACAGGCATATGCTCATGCATCTCTTCAGCACTCTCAACTCCTCGGGGGTCAA
AACCATATCCCAGGGCACGGGGAACTCTTGCAGGACAGCGAACCCCGCAGAACAGGGCAATCCTCGCAC
AGAACTTACATTGTGCATGGACAGGGTATCGCAATCAGGCAGCACCGGGTGATCCTCCACCAGAGAAGCG
CGGGTCTCGGTCTCCTCACAGCGTGGTAAGGGGGCCGGCCGATACGGGTGATGGCGGGACGCGGCTGAT
CGTGTTCGCGACCGTGTCATGATGCAGTTGCTTTCGGACATTTTCGTACTTGCTGTAGCAGAACCTGGTCC
GGGCGCTGCACACCGATCGCCGGCGGCGGTCTCGGCGCTTGGAACGCTCGGTGTTGAAATTGTAAAACA
GCCACTCTCTCAGACCGTGCAGCAGATCTAGGGCCTCAGGAGTGATGAAGATCCCATCATGCCTGATGGC
TCTGATCACATCGACCACCGTGGAATGGGCCAGACCCAGCCAGATGATGCAATTTTGTTGGGTTTCGGTG
ACGGCGAGCCTCGGGAACAACGATGAAGTAAATGCAAGCGGTGCGTTCCAGCATGGTTAGTTAGCTGATC
TGTAGAAAAAACAAAAATGAACATTAAACCATGCTAGCCTGGCGAACAGGTGGGTAAATCGTTCTCTCCA
GCACCAGGCAGGCCACGGGGTCTCCGGCGCGACCCTCGTAAAAATTGTCGCTATGATTGAAAACCATCAC
AGAGAGACGTTCCCGGTGGCCGGCGTGAATGATTCGACAAGATGAATACACCCCCGGAACATTGGCGTCC
GCGAGTGAAAAAAAGCGCCCGAGGAAGCAATAAGGCACTACAATGCTCAGTCTCAAGTCCAGCAAAGCG
ATGCCATGCGGATGAAGCACAAAATTCTCAGGTGCGTACAAAATGTAATTACTCCCCTCCTGCACAGGCA
GCAAAGCCCCCGATCCCTCCAGGTACACATACAAAGCCTCAGCGTCCATAGCTTACCGAGCAGCAGCACA
CAACAGGCGCAAGAGTCAGAGAAAGGCTGAGCTCTAACCTGTCCACCCGCTCTCTGCTCAATATATAGCC
CAGATCTACACTGACGTAAAGGCCAAAGTCTAAAAATACCCGCCAAATAATCACACACGCCCAGCACACG
CCCAGAAACCGGTGACACACTCAAAAAAATACGCGCACTTCCTCAAACGCCCAAAACTGCCGTCATTTCC
GGGTTCCCACGCTACGTCATCAAAACACGACTTTCAAATTCCGTCGACCGTTAAAAACGTCACCCGCCCC
GCCCCTAACGGTCGCCCGTCTCTCAGCCAATCAGCGCCCCGCATCCCCAAATTCAAACACCTCATTTGCAT
ATTAACGCGCACAAAAAGTTTGAGGTATATTATTGATGATG

ChAdV68-Empty-E4 欠失 (配列番号 59)

CATCTTCAATAATATACCTCAAACTTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTGAATTTGGGGAGGA
AGGGCGGTGATTGGTCGAGGGATGAGCGACCGTTAGGGGCGGGGCGAGTGACGTTTTGATGACGTGGTT
GCGAGGAGGAGCCAGTTTGCAAGTTCTCGTGGGAAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTTGAACACG
GAAATACTCAATTTTCCCGCGCTCTCTGACAGGAAATGAGGTGTTTCTGGGCGGATGCAAGTGAAAACGG
GCCATTTTCGCGCGAAAACTGAATGAGGAAGTGAAAATCTGAGTAATTTCGCGTTTATGGCAGGGAGGAG
TATTTGCCGAGGGCCGAGTAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTACCGTGTTTTTCACCTAAATT
TCCGCGTACGGTGTCAAAGTCCGGTGTTTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGCCAGGGTATTTAAACCTGCG
CTCTCCAGTCAAGAGGCCACTCTTGAGTGCCAGCGAGAAGAGTTTTCTCCTCCGCGCCGCGAGTCAGATC
TACACTTTGAAAGTAGGGataaGGTAGCGAGTGAGTAGTGTTCTGGGGCGGGGGAGGACCTGCATGAGGGC
CAGAATAACTGAAATCTGTGCTTTTCTGTGTGTTGCAGCAGCATGAGCGGAAGCGGCTCCTTTGAGGGAG
GGGTATTCAGCCCTTATCTGACGGGGCGTCTCCCCTCCTGGGCGGGAGTGCGTCAGAATGTGATGGGATCC
ACGGTGGACGGCCGGCCCGTGCAGCCCGCGAACTCTTCAACCCTGACCTATGCAACCCTGAGCTCTTCGT
CGTTGGACGCAGCTGCCGCCGCAGCTGCTGCATCTGCCGCCAGCGCCGTGCGCGGAATGGCCATGGGCG
CCGGCTACTACGGCACTCTGGTGGCCAACTCGAGTTCCACCAATAATCCCGCCAGCCTGAACGAGGAGAA
GCTGTTGCTGCTGATGGCCCAGCTCGAGGCCTTGACCCAGCGCCTGGGCGAGCTGACCCAGCAGGTGGC
TCAGCTGCAGGAGCAGACGCGGGCCGCGGTTGCCACGGTGAAATCCAAATAAAAAATGAATCAATAAATA
AACGGAGACGGTTGTTGATTTAACACAGAGTCTGAATCTTTATTTGATTTTTCGCGCGCGGTAGGCCCTG
GACCACCGGTCTCGATCATTGAGCACCCGGTGGATCTTTTCCAGGACCCGGTAGAGGTGGGCTTGGATGT
TGAGGTACATGGGCATGAGCCCGTCCCGGGGGTGGAGGTAGCTCCATTGCAGGGCCTCGTGCTCGGGGGT
GGTGTTGTAAATCACCCAGTCATAGCAGGGGCGCAGGGCATGGTGTTGCACAATATCTTTGAGGAGGAGA

CTGATGGCCACGGGCAGCCCTTTGGTGTAGGTGTTTACAAATCTGTTGAGCTGGGAGGGATGCATGCGGG
GGGAGATGAGGTGCATCTTGGCCTGGATCTTGAGATTGGCGATGTTACCGCCCAGATCCCGCCTGGGGTTC
ATGTTGTGCAGGACCACCAGCACGGTGTATCCGGTGCACTTGGGGAATTTATCATGCAACTTGGAAGGGA
AGGCGTGAAAGAATTTGGCGACGCCTTTGTGCCCGCCCAGGTTTTCCATGCACTCATCCATGATGATGGCG
ATGGGCCCGTGGGCGGCGGCCTGGGCAAAGACGTTTCGGGGGTCGGACACATCATAGTTGTGGTCCTGG
GTGAGGTCATCATAGGCCATTTTAATGAATTTGGGGCGGAGGGTGCCGGACTGGGGGACAAAGGTACCCT
CGATCCCGGGGGCGTAGTTCCCCTCACAGATCTGCATCTCCCAGGCTTTGAGCTCGGAGGGGGGGATCAT
GTCCACCTGCGGGGCGATAAAGAACACGGTTTCCGGGGCGGGGGAGATGAGCTGGGCCGAAAGCAAGTT
CCGGAGCAGCTGGGACTTGCCGCAGCCGGTGGGGCCGTAGATGACCCCGATGACCGGCTGCAGGTGGTA
GTTGAGGGAGAGACAGCTGCCGTCCTCCCGGAGGAGGGGGGCCACCTCGTTCATCATCTCGCGCACGTG
CATGTTCTCGCGCACCAGTTCCGCCAGGAGGCGCTCTCCCCCCAGGGATAGGAGCTCCTGGAGCGAGGC
GAAGTTTTTCAGCGGCTTGAGTCCGTCGGCCATGGGCATTTTGGAGAGGGTTTGTTGCAAGAGTTCCAGG
CGGTCCCAGAGCTCGGTGATGTGCTCTACGGCATCTCGATCCAGCAGACCTCCTCGTTTCGCGGGTTGGG
ACGGCTGCGGGAGTAGGGCACCAGACGATGGGCGTCCAGCGCAGCCAGGGTCCGGTCCTTCCAGGGTCG
CAGCGTCCGCGTCAGGGTGGTCTCCGTCACGGTGAAGGGGTGCGCGCCGGGCTGGGCGCTTGCGAGGGT
GCGCTTCAGGCTCATCCGGCTGGTCGAAAACCGCTCCCGATCGGCGCCCTGCGCGTCGGCCAGGTAGCAA
TTGACCATGAGTTCGTAGTTGAGCGCCTCGGCCGCGTGGCCTTTGGCGCGGAGCTTACCTTTGGAAGTCT
GCCCGCAGGCGGGACAGAGGAGGGACTTGAGGGCGTAGAGCTTGGGGGCGAGGAAGACGGACTCGGG
GGCGTAGGCGTCCGCGCCGCAGTGGGCGCAGACGGTCTCGCACTCCACGAGCCAGGTGAGGTCGGGCTG
GTCGGGGTCAAAAACCAGTTTCCCGCCGTTCTTTTTGATGCGTTTCTTACCTTTGGTCTCCATGAGCTCGT
GTCCCCGCTGGGTGACAAAGAGGCTGTCCGTGTCCCCGTAGACCGACTTTATGGGCCGGTCCTCGAGCGG
TGTGCCGCGGTCCTCCTCGTAGAGGAACCCCGCCCACTCCGAGACGAAAGCCCGGGTCCAGGCCAGCAC
GAAGGAGGCCACGTGGGACGGGTAGCGGTCGTTGTCCACCAGCGGGTCCACCTTTTCCAGGGTATGCAA
ACACATGTCCCCCTCGTCCACATCCAGGAAGGTGATTGGCTTGTAAGTGTAGGCCACGTGACCGGGGGTC
CCGGCCGGGGGGGTATAAAAGGGTGCGGGTCCCTGCTCGTCCTCACTGTCTTCCGGATCGCTGTCCAGGA
GCGCCAGCTGTTGGGGTAGGTATTCCCTCTCGAAGGCGGGCATGACCTCGGCACTCAGGTTGTCAGTTTC
TAGAAACGAGGAGGATTTGATATTGACGGTGCCGGCGGAGATGCCTTTCAAGAGCCCCTCGTCCATCTGG
TCAGAAAAGACGATCTTTTTGTTGTCGAGCTTGGTGGCGAAGGAGCCGTAGAGGGCGTTGGAGAGGAGC
TTGGCGATGGAGCGCATGGTCTGGTTTTTTTCCTTGTCGGCGCGCTCCTTGGCGGCGATGTTGAGCTGCAC
GTACTCGCGCGCCACGCACTTCCATTCGGGGAAGACGGTGGTCAGCTCGTCGGGCACGATTCTGACCTGC
CAGCCCCGATTATGCAGGGTGATGAGGTCCACACTGGTGGCCACCTCGCCGCGCAGGGGCTCATTAGTCC
AGCAGAGGCGTCCGCCCTTGCGCGAGCAGAAGGGGGGCAGGGGGTCCAGCATGACCTCGTCGGGGGGGG
TCGGCATCGATGGTGAAGATGCCGGGCAGGAGGTCGGGGTCAAAGTAGCTGATGGAAGTGGCCAGATCG
TCCAGGGCAGCTTGCCATTCGCGCACGGCCAGCGCGCGCTCGTAGGGACTGAGGGGCGTGCCCCAGGGC
ATGGGATGGGTAAGCGCGGAGGCGTACATGCCGCAGATGTCGTAGACGTAGAGGGGCTCCTCGAGGATGC
CGATGTAGGTGGGGTAGCAGCGCCCCCCGCGGATGCTGGCGCGCACGTAGTCATACAGCTCGTGCGAGGG
GGCGAGGAGCCCCGGGCCCAGGTTGGTGCGACTGGGCTTTTCGGCGCGGTAGACGATCTGGCGGAAAAT
GGCATGCGAGTTGGAGGAGATGGTGGGCCTTTGGAAGATGTTGAAGTGGGCGTGGGGCAGTCCGACCGA
GTCGCGGATGAAGTGGGCGTAGGAGTCTTGCAGCTTGGCGACGAGCTCGGCGGTGACTAGGACGTCCAG
AGCGCAGTAGTCGAGGGTCTCCTGGATGATGTCATACTTGAGCTGTCCCTTTTGTTTCCACAGCTCGCGGT
TGAGAAGGAACTCTTCGCGGTCCTTCCAGTACTCTTCGAGGGGGAACCCGTCCTGATCTGCACGGTAAGA
GCCTAGCATGTAGAACTGGTTGACGGCCTTGTAGGCGCAGCAGCCCTTCTCCACGGGGAGGGCGTAGGCC
TGGGCGGCCTTGCGCAGGGAGGTGTGCGTGAGGGCGAAAGTGTCCCTGACCATGACCTTGAGGAACTGG
TGCTTGAAGTCGATATCGTCGCAGCCCCCCTGCTCCCAGAGCTGGAAGTCCGTGCGCTTCTTGTAGGCGG
GGTTGGGCAAAGCGAAAGTAACATCGTTGAAGAGGATCTTGCCCGCGCGGGGCATAAAGTTGCGAGTGA
TGCGGAAAGGTTGGGGCACCTCGGCCCGGTTGTTGATGACCTGGGCGGCGAGCACGATCTCGTCGAAGC
CGTTGATGTTGTGGCCCACGATGTAGAGTTCCACGAATCGCGGACGGCCCTTGACGTGGGGCAGTTTCTT
GAGCTCCTCGTAGGTGAGCTCGTCGGGGTCGCTGAGCCCGTGCTGCTCGAGCGCCCAGTCGGCGAGATG
GGGGTTGGCGCGGAGGAAGGAAGTCCAGAGATCCACGGCCAGGGCGGTTTGCAGACGGTCCCGGTACT
GACGGAACTGCTGCCCGACGGCCATTTTTTCGGGGGTGACGCAGTAGAAGGTGCGGGGGTCCCCGTGCC
AGCGATCCCATTTGAGCTGGAGGGCGAGATCGAGGGCGAGCTCGACGAGCCGGTCGTCCCCGGAGAGTT
TCATGACCAGCATGAAGGGGACGAGCTGCTTGCCGAAGGACCCCATCCAGGTGTAGGTTTCCACATCGTA
GGTGAGGAAGAGCCTTTCGGTGCGAGGATGCGAGCCGATGGGGAAGAACTGGATCTCCTGCCACCAATT
GGAGGAATGGCTGTTGATGTGATGGAAGTAGAAATGCCGACGGCGCGCCGAACACTCGTGCTTGTGTTTA
TACAAGCGGCCACAGTGCTCGCAACGCTGCACGGGATGCACGTGCTGCACGAGCTGTACCTGAGTTCCTT
TGACGAGGAATTTCAGTGGGAAGTGGAGTCGTGGCGCCTGCATCTCGTGCTGTACTACGTCGTGGTGGTC
GGCCTGGCCCTCTTCTGCCTCGATGGTGGTCATGCTGACGAGCCCGCGCGGGAGGCAGGTCCAGACCTCG
GCGCGAGCGGGTCGGAGAGCGAGGACGAGGGCGCGCAGGCCGGAGCTGTCCAGGGTCCTGAGACGCTG
CGGAGTCAGGTCAGTGGGCAGCGGCGGCGCGCGGTTGACTTGCAGGAGTTTTTCCAGGGCGCGCGGGAG
GTCCAGATGGTACTTGATCTCCACCGCGCCATTGGTGGCGACGTCGATGGCTTGCAGGGTCCCGTGCCCCT
GGGGTGTGACCACCGTCCCCCGTTTCTTCTTGGGCGGCTGGGGCGACGGGGGCGGTGCCTCTTCCATGGT
TAGAAGCGGCGGCGAGGACGCGCGCCGGGCGGCAGGGGCGGCTCGGGGCCCGGAGGCAGGGGCGGCA
GGGGCACGTCGGCGCCGCGCGCGGGTAGGTTCTGGTACTGCGCCCGGAGAAGACTGGCGTGAGCGACGA
CGCGACGGTTGACGTCCTGGATCTGACGCCTCTGGGTGAAGGCCACGGGACCCGTGAGTTTGAACCTGA
AAGAGAGTTCGACAGAATCAATCTCGGTATCGTTGACGGCGGCCTGCCGCAGGATCTCTTGCACGTCGCC
CGAGTTGTCCTGGTAGGCGATCTCGGTCATGAACTGCTCGATCTCCTCCTCTTGAAGGTCTCCGCGGCCGG
CGCGCTCCACGGTGGCCGCGAGGTCGTTGGAGATGCGGCCCATGAGCTGCGAGAAGGCGTTCATGCCCG
CCTCGTTCCAGACGCGGCTGTAGACCACGACGCCCTCGGGATCGCgGGCGCGCATGACCACCTGGGCGAG

10

20

30

40

50

GTTGAGCTCCACGTGGCGCGTGAAGACCGCGTAGTTGCAGAGGCGCTGGTAGAGGTAGTTGAGCGTGGT
GGCGATGTGCTCGGTGACGAAGAAATACATGATCCAGCGGCGGAGCGGCATCTCGCTGACGTCGCCCAGC
GCCTCCAAACGTTCCATGGCCTCGTAAAAGTCCACGGCGAAGTTGAAAAACTGGGAGTTGCGCGCCGAG
ACGGTCAACTCCTCCTCCAGAAGACGGATGAGCTCGGCGATGGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAGGCC
CCCGGGAGTTCCTCCACTTCCTCTTCTTCCTCCTCCACTAACATCTCTTCTACTTCCTCCTCAGGCGGCAGT
GGTGGCGGGGGAGGGGGCCTGCGTCGCCGGCGGCGCACGGGCAGACGGTCGATGAAGCGCTCGATGGT
CTCGCCGCGCCGGCGTCGCATGGTCTCGGTGACGGCGCGCCCGTCCTCGCGGGGCCGCAGCGTGAAGAC
GCCGCCGCGCATCTCCAGGTGGCCGGGGGGGTCCCCGTTGGGCAGGGAGAGGGCGCTGACGATGCATCT
TATCAATTGCCCCGTAGGGACTCCGCGCAAGGACCTGAGCGTCTCGAGATCCACGGGATCTGAAAACCGC
TGAACGAAGGCTTCGAGCCAGTCGCAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACGGTTTCTTCTGGCGGGTCATGTT
GGTTGGGAGCGGGGCGGGCGATGCTGCTGGTGATGAAGTTGAAATAGGCGGTTCTGAGACGGCGGATGG
TGGCGAGGAGCACCAGGTCTTTGGGCCCGGCTTGCTGGATGCGCAGACGGTCGGCCATGCCCCAGGCGT
GGTCCTGACACCTGGCCAGGTCCTTGTAGTAGTCCTGCATGAGCCGCTCCACGGGCACCTCCTCCTCGCC
CGCGCGGCCGTGCATGCGCGTGAGCCCGAAGCCGCGCTGGGGCTGGACGAGCGCCAGGTCGGCGACGA
CGCGCTCGGCGAGGATGGCTTGCTGGATCTGGGTGAGGGTGGTCTGGAAGTCATCAAAGTCGACGAAGC
GGTGGTAGGCTCCGGTGTTGATGGTGTAGGAGCAGTTGGCCATGACGGACCAGTTGACGGTCTGGTGGCC
CGGACGCACGAGCTCGTGGTACTTGAGGCGCGAGTAGGCGCGCGTGTCGAAGATGTAGTCGTTGCAGGT
GCGCACCAGGTACTGGTAGCCGATGAGGAAGTGCGGCGGCGGCTGGCGGTAGAGCGGCCATCGCTCGGT
GGCGGGGGCGCCGGGCGCGAGGTCCTCGAGCATGGTGCGGTGGTAGCCGTAGATGTACCTGGACATCCA
GGTGATGCCGGCGGCGGTGGTGGAGGCGCGCGGGAACTCGCGGACGCGGTTCCAGATGTTGCGCAGCGG
CAGGAAGTAGTTCATGGTGGGCACGGTCTGGCCCGTGAGGCGCGCGCAGTCGTGGATGCTCTATACGGGC
AAAAACGAAAGCGGTCAGCGGCTCGACTCCGTGGCCTGGAGGCTAAGCGAACGGGTTGGGCTGCGCGT
GTACCCCGGTTCGAATCTCGAATCAGGCTGGAGCCGCAGCTAACGTGGTATTGGCACTCCCGTCTCGACC
CAAGCCTGCACCAACCCTCCAGGATACGGAGGCGGGTCGTTTTGCAACTTTTTTTTGGAGGCCGGATGAG
ACTAGTAAGCGCGGAAAGCGGCCGACCGCGATGGCTCGCTGCCGTAGTCTGGAGAAGAATCGCCAGGGT
TGCGTTGCGGTGTGCCCCGGTTCGAGGCCGGCCGGATTCCGCGGCTAACGAGGGCGTGGCTGCCCCGTC
GTTTCCAAGACCCCATAGCCAGCCGACTTCTCCAGTTACGGAGCGAGCCCCTCTTTTGTTTTGTTTGTTTT
TGCCAGATGCATCCCGTACTGCGGCAGATGCGCCCCCACCACCCTCCACCGCAACAACAGCCCCCTCCAC
AGCCGGCGCTTCTGCCCCCGCCCCAGCAGCAACTTCCAGCCACGACCGCCGCGGCCGCCGTGAGCGGGG
CTGGACAGAGTTATGATCACCAGCTGGCCTTGGAAGAGGGCGAGGGGCTGGCGCGCCTGGGGGCGTCGT
CGCCGGAGCGGCACCCGCGCGTGCAGATGAAAAGGGACGCTCGCGAGGCCTACGTGCCCAAGCAGAAC
CTGTTCAGAGACAGGAGCGGCGAGGAGCCCGAGGAGATGCGCGCGGCCCGGTTCCACGCGGGGCGGGA
GCTGCGGCGCGGCCTGGACCGAAAGAGGGTGCTGAGGGACGAGGATTTCGAGGCGGACGAGCTGACGG
GGATCAGCCCCGCGCGCGCGCACGTGGCCGCGGCCAACCTGGTCACGGCGTACGAGCAGACCGTGAAGG
AGGAGAGCAACTTCCAAAAATCCTTCAACAACCACGTGCGCACCCTGATCGCGCGCGAGGAGGTGACCC
TGGGCCTGATGCACCTGTGGGACCTGCTGGAGGCCATCGTGCAGAACCCCACCAGCAAGCCGCTGACGG
CGCAGCTGTTCCTGGTGGTGCAGCATAGTCGGGACAACGAAGCGTTCAGGGAGGCGCTGCTGAATATCAC
CGAGCCCGAGGGCCGCTGGCTCCTGGACCTGGTGAACATTCTGCAGAGCATCGTGGTGCAGGAGCGCGG
GCTGCCGCTGTCCGAGAAGCTGGCGGCCATCAACTTCTCGGTGCTGAGTTTGGGCAAGTACTACGCTAGG
AAGATCTACAAGACCCCGTACGTGCCCATAGACAAGGAGGTGAAGATCGACGGGTTTTACATGCGCATGA
CCCTGAAAGTGCTGACCCTGAGCGACGATCTGGGGGTGTACCGCAACGACAGGATGCACCGTGCGGTGA
GCGCCAGCAGGCGGCGCGAGCTGAGCGACCAGGAGCTGATGCATAGTCTGCAGCGGGCCCTGACCGGGG
CCGGGACCGAGGGGGAGAGCTACTTTGACATGGGCGCGGACCTGCACTGGCAGCCCAGCCGCCGGGCCT
TGGAGGCGGCGGCAGGACCCTACGTAGAAGAGGTGGACGATGAGGTGGACGAGGAGGGCGAGTACCTG
GAAGACTGATGGCGCGACCGTATTTTTGCTAGATGCAACAACAACAGCCACCTCCTGATCCCGCGATGCG
GGCGGCGCTGCAGAGCCAGCCGTCCGGCATTAACTCCTCGGACGATTGGACCCAGGCCATGCAACGCATC
ATGGCGCTGACGACCCGCAACCCCGAAGCCTTTAGACAGCAGCCCCAGGCCAACCGGCTCTCGGCCATC
CTGGAGGCCGTGGTGCCCTCGCGCTCCAACCCCACGCACGAGAAGGTCCTGGCCATCGTGAACGCGCTG
GTGGAGAACAAGGCCATCCGCGGCGACGAGGCCGGCCTGGTGTACAACGCGCTGCTGGAGCGCGTGGCC
CGCTACAACAGCACCAACGTGCAGACCAACCTGGACCGCATGGTGACCGACGTGCGCGAGGCCGTGGCC
CAGCGCGAGCGGTTCCACCGCGAGTCCAACCTGGGATCCATGGTGGCGCTGAACGCCTTCCTCAGCACCC
AGCCCGCCAACGTGCCCCGGGGCCAGGAGGACTACACCAACTTCATCAGCGCCCTGCGCCTGATGGTGA
CCGAGGTGCCCCAGAGCGAGGTGTACCAGTCCGGGCCGGACTACTTCTTCCAGACCAGTCGCCAGGGCT
TGCAGACCGTGAACCTGAGCCAGGCTTTCAAGAACTTGCAGGGCCTGTGGGGCGTGCAGGCCCCGGTCG
GGGACCGCGCGACGGTGTCGAGCCTGCTGACGCCGAACTCGCGCCTGCTGCTGCTGCTGGTGGCCCCCT
TCACGGACAGCGGCAGCATCAACCGCAACTCGTACCTGGGCTACCTGATTAACCTGTACCGCGAGGCCAT
CGGCCAGGCGCACGTGGACGAGCAGACCTACCAGGAGATCACCCACGTGAGCCGCGCCCTGGGCCAGG
ACGACCCGGGCAACCTGGAAGCCACCCTGAACTTTTTGCTGACCAACCGGTCGCAGAAGATCCCGCCCC
AGTACGCGCTCAGCACCGAGGAGGAGCGCATCCTGCGTTACGTGCAGCAGAGCGTGGGCCTGTTCCTGAT
GCAGGAGGGGGCCACCCCCAGCGCCGCGCTCGACATGACCGCGCGCAACATGGAGCCCAGCATGTACGC
CAGCAACCGCCCGTTCATCAATAAACTGATGGACTACTTGCATCGGGCGGCCGCCATGAACTCTGACTATT
TCACCAACGCCATCCTGAATCCCCACTGGCTCCCGCCGCCGGGGTTCTACACGGGCGAGTACGACATGCC
CGACCCCAATGACGGGTTCCTGTGGGACGATGTGGACAGCAGCGTGTTCTCCCCCCGACCGGGTGCTAAC
GAGCGCCCCTTGTGGAAGAAGGAAGGCAGCGACCGACGCCCGTCCTCGGCGCTGTCCGGCCGCGAGGG
TGCTGCCGCGGCGGTGCCCGAGGCCGCCAGTCCTTTCCCGAGCTTGCCCTTCTCGCTGAACAGTATCCGC
AGCAGCGAGCTGGGCAGGATCACGCGCCCGCGCTTGCTGGGCGAAGAGGAGTACTTGAATGACTCGCTG
TTGAGACCCGAGCGGGAGAAGAACTTCCCCAATAACGGGATAGAAAGCCTGGTGGACAAGATGAGCCGC
TGGAAGACGTATGCGCAGGAGCACAGGGACGATCCCCGGGCGTCGCAGGGGGCCACGAGCCGGGGCAG

CGCCGCCCGTAAACGCCGGTGGCACGACAGGCAGCGGGGACAGATGTGGGACGATGAGGACTCCGCCG
ACGACAGCAGCGTGTTGGACTTGGGTGGGAGTGGTAACCCGTTCGCTCACCTGCGCCCCCGTATCGGGCG
CATGATGTAAGAGAAACCGAAAATAAATGATACTCACCAAGGCCATGGCGACCAGCGTGCGTTCGTTTCT
TCTCTGTTGTTGTTGTATCTAGTATGATGAGGCGTGCGTACCCGGAGGGTCCTCCTCCCTCGTACGAGAGC
GTGATGCAGCAGGCGATGGCGGCGGCGGCGATGCAGCCCCCGCTGGAGGCTCCTTACGTGCCCCCGCGGT
ACCTGGCGCCTACGGAGGGGCGGAACAGCATTCGTTACTCGGAGCTGGCACCCTTGTACGATACCACCCG
GTTGTACCTGGTGGACAACAAGTCGGCGGACATCGCCTCGCTGAACTACCAGAACGACCACAGCAACTT
CCTGACCACCGTGGTGCAGAACAATGACTTCACCCCCACGGAGGCCAGCACCCAGACCATCAACTTTGA
CGAGCGCTCGCGGTGGGGCGGCCAGCTGAAAACCATCATGCACACCAACATGCCCAACGTGAACGAGTT
CATGTACAGCAACAAGTTCAAGGCGCGGGTGATGGTCTCCCGCAAGACCCCCAATGGGGTGACAGTGAC
AGAGGATTATGATGGTAGTCAGGATGAGCTGAAGTATGAATGGGTGGAATTTGAGCTGCCCGAAGGCAAC
TTCTCGGTGACCATGACCATCGACCTGATGAACAACGCCATCATCGACAATTACTTGGCGGTGGGGCGGC
AGAACGGGGTGCTGGAGAGCGACATCGGCGTGAAGTTCGACACTAGGAACTTCAGGCTGGGCTGGGACC
CCGTGACCGAGCTGGTCATGCCCGGGGTGTACACCAACGAGGCTTTCCATCCCGATATTGTCTTGCTGCCC
GGCTGCGGGGTGGACTTCACCGAGAGCCGCCTCAGCAACCTGCTGGGCATTCGCAAGAGGCAGCCCTTC
CAGGAAGGCTTCCAGATCATGTACGAGGATCTGGAGGGGGGCAACATCCCCGCGCTCCTGGATGTCGACG
CCTATGAGAAAAGCAAGGAGGATGCAGCAGCTGAAGCAACTGCAGCCGTAGCTACCGCCTCTACCGAGG
TCAGGGGCGATAATTTTGCAAGCGCCGCAGCAGTGGCAGCGGCCGAGGCGGCTGAAACCGAAAGTAAGA
TAGTCATTCAGCCGGTGGAGAAGGATAGCAAGAACAGGAGCTACAACGTACTACCGGACAAGATAAACA
CCGCCTACCGCAGCTGGTACCTAGCCTACAACTATGGCGACCCCGAGAAGGGCGTGCGCTCCTGGACGCT
GCTCACCACCTCGGACGTCACCTGCGGCGTGGAGCAAGTCTACTGGTCGCTGCCCGACATGATGCAAGAC
CCGGTCACCTTCCGCTCCACGCGTCAAGTTAGCAACTACCCGGTGGTGGGCGCCGAGCTCCTGCCCGTCT
ACTCCAAGAGCTTCTTCAACGAGCAGGCCGTCTACTCGCAGCAGCTGCGCGCCTTCACCTCGCTTACGCA
CGTCTTCAACCGCTTCCCCGAGAACCAGATCCTCGTCCGCCCGCCCGCGCCCACCATTACCACCGTCAGT
GAAAACGTTCCTGCTCTCACAGATCACGGGACCCTGCCGCTGCGCAGCAGTATCCGGGGAGTCCAGCGC
GTGACCGTTACTGACGCCAGACGCCGCACCTGCCCCTACGTCTACAAGGCCCTGGGCATAGTCGCGCCGC
GCGTCCTCTCGAGCCGCACCTTCTAAATGTCCATTCTCATCTCGCCCAGTAATAACACCGGTTGGGGCCTG
CGCGCGCCCAGCAAGATGTACGGAGGCGCTCGCCAACGCTCCACGCAACACCCCGTGCGCGTGCGCGGG
CACTTCCGCGCTCCCTGGGGCGCCCTCAAGGGCCGCGTGCGGTCGCGCACCACCGTCGACGACGTGATC
GACCAGGTGGTGGCCGACGCGCGCAACTACACCCCCGCCGCCGCGCCCGTCTCCACCGTGGACGCCGTC
ATCGACAGCGTGGTGGCcGACGCGCGCCGGTACGCCCGCGCCAAGAGCCGGCGGCGGCGCATCGCCCGG
CGGCACCGGAGCACCCCCGCCATGCGCGCGGCGCGAGCCTTGCTGCGCAGGGCCAGGCGCACGGGACG
CAGGGCCATGCTCAGGGCGGCCAGACGCGCGGCTTCAGGCGCCAGCGCCGGCAGGACCCGGAGACGCG
CGGCCACGGCGGCGGCAGCGGCCATCGCCAGCATGTCCCGCCCGCGGCGAGGGAACGTGTACTGGGTGC
GCGACGCCGCCACCGGTGTGCGCGTGCCCGTGCGCACCCGCCCCCCTCGCACTTGAAGATGTTCACTTCG
CGATGTTGATGTGTCCCAGCGGCGAGGAGGATGTCCAAGCGCAAATTCAAGGAAGAGATGCTCCAGGTCA
TCGCGCCTGAGATCTACGGCCCTGCGGTGGTGAAGGAGGAAAGAAAGCCCCGCAAAATCAAGCGGGTCA
AAAAGGACAAAAAGGAAGAAGAAAGTGATGTGGACGGATTGGTGGAGTTTGTGCGCGAGTTCGCCCCC
CGGCGGCGCGTGCAGTGGCGCGGGCGGAAGGTGCAACCGGTGCTGAGACCCGGCACCACCGTGGTCTTC
ACGCCCGGCGAGCGCTCCGGCACCGCTTCCAAGCGCTCCTACGACGAGGTGTACGGGGATGATGATATTC
TGGAGCAGGCGGCCGAGCGCCTGGGCGAGTTTGCTTACGGCAAGCGCAGCCGTTCCGCACCGAAGGAA
GAGGCGGTGTCCATCCCGCTGGACCACGGCAACCCCACGCCGAGCCTCAAGCCCGTGACCTTGCAGCAG
GTGCTGCCGACCGCGGCGCCGCGCCGGGGGTTCAAGCGCGAGGGCGAGGATCTGTACCCCACCATGCAG
CTGATGGTGCCCAAGCGCCAGAAGCTGGAAGACGTGCTGGAGACCATGAAGGTGGACCCGGACGTGCA
GCCCGAGGTCAAGGTGCGGCCCATCAAGCAGGTGGCCCCGGGCCTGGGCGTGCAGACCGTGGACATCAA
GATTCCCACGGAGCCCATGGAAACGCAGACCGAGCCCATGATCAAGCCCAGCACCAGCACCATGGAGGT
GCAGACGGATCCCTGGATGCCATCGGCTCCTAGTCGAAGACCCCGGCGCAAGTACGGCGCGGCCAGCCT
GCTGATGCCCAACTACGCGCTGCATCCTTCCATCATCCCCACGCCGGGCTACCGCGGCACGCGCTTCTACC
GCGGTCATACCAGCAGCCGCCGCCGCAAGACCACCACTCGCCGCCGCCGTCGCCGCACCGCCGCTGCAA
CCACCCCTGCCGCCCTGGTGCGGAGAGTGTACCGCCGCGGCCGCGCACCTCTGACCCTGCCGCGCGCGC
GCTACCACCCGAGCATCGCCATTTAAACTTTCGCCtGCTTTGCAGATCAATGGCCCTCACATGCCGCCTTCG
CGTTCCCATTACGGGCTACCGAGGAAGAAAACCGCGCCGTAGAAGGCTGGCGGGGAACGGGATGCGTCG
CCACCACCACCGGCGGCGGCGCGCCATCAGCAAGCGGTTGGGGGGAGGCTTCCTGCCCGCGCTGATCCC
CATCATCGCCGCGGCGATCGGGGCGATCCCCGGCATTGCTTCCGTGGCGGTGCAGGCCTCTCAGCGCCAC
TGAGACACACTTGGAAACATCTTGTAATAAACCaATGGACTCTGACGCTCCTGGTCCTGTGATGTGTTTTC
GTAGACAGATGGAAGACATCAATTTTTCGTCCCTGGCTCCGCGACACGGCACGCGGCCGTTCATGGGCAC
CTGGAGCGACATCGGCACCAGCCAACTGAACGGGGGCGCCTTCAATTGGAGCAGTCTCTGGAGCGGGCT
TAAGAATTTCGGGTCCACGCTTAAAACCTATGGCAGCAAGGCGTGGAACAGCACCACAGGGCAGGCGCT
GAGGGATAAGCTGAAAGAGCAGAACTTCCAGCAGAAGGTGGTCGATGGGCTCGCCTCGGGCATCAACGG
GGTGGTGGACCTGGCCAACCAGGCCGTGCAGCGGCAGATCAACAGCCGCCTGGACCCGGTGCCGCCCGC
CGGCTCCGTGGAGATGCCGCAGGTGGAGGAGGAGCTGCCTCCCCTGGACAAGCGGGGCGAGAAGCGAC
CCCGCCCCGATGCGGAGGAGACGCTGCTGACGCACACGGACGAGCCGCCCCCGTACGAGGAGGCGGTG
AAACTGGGTCTGCCCACCACGCGGCCCATCGCGCCCCTGGCCACCGGGGTGCTGAAACCCGAAAAGCCC
GCGACCCTGGACTTGCCTCCTCCCCAGCCTTCCCGCCCCTCTACAGTGGCTAAGCCCCTGCCGCCGGTGG
CCGTGGCCCGCGCGCGACCCGGGGGCACCGCCCGCCCTCATGCGAACTGGCAGAGCACTCTGAACAGCA
TCGTGGGTCTGGGAGTGCAGAGTGTGAAGCGCCGCCGCTGCTATTAAACCTACCGTAGCGCTTAACTTGC
TTGTCTGTGTGTGTATGTATTATGTCGCCGCCGCCGCTGTCCACCAGAAGGAGGAGTGAAGAGGCGCGTC
GCCGAGTTGCAAGATGGCCACCCCATCGATGCTGCCCCAGTGGGCGTACATGCACATCGCCGGACAGGAC

10 20 30 40 50

GCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTGGTGCAGTTTGCCCGCGCCACAGACACCTACTTCAGTCTGGGGA
ACAAGTTTAGGAACCCCACGGTGGCGCCCACGCACGATGTGACCACCGACCGCAGCCAGCGGCTGACGC
TGCGCTTCGTGCCCGTGGACCGCGAGGACAACACCTACTCGTACAAAGTGCGCTACACGCTGGCCGTGG
GCGACAACCGCGTGCTGGACATGGCCAGCACCTACTTTGACATCCGCGGCGTGCTGGATCGGGGCCCTAG
CTTCAAACCCTACTCCGGCACCGCCTACAACAGTCTGGCCCCCAAGGGAGCACCCAACACTTGTCAGTGG
ACATATAAAGCCGATGGTGAAACTGCCACAGAAAAAACCTATACATATGGAAATGCACCCGTGCAGGGCA
TTAACATCACAAAAGATGGTATTCAACTTGGAACTGACACCGATGATCAGCCAATCTACGCAGATAAAACC
TATCAGCCTGAACCTCAAGTGGGTGATGCTGAATGGCATGACATCACTGGTACTGATGAAAAGTATGGAG
GCAGAGCTCTTAAGCCTGATACCAAAATGAAGCCTTGTTATGGTTCTTTTGCCAAGCCTACTAATAAAGAA
GGAGGTCAGGCAAATGTGAAAACAGGAACAGGCACTACTAAAGAATATGACATAGACATGGCTTTCTTTG
ACAACAGAAGTGCGGCTGCTGCTGGCCTAGCTCCAGAAATTGTTTTGTATACTGAAAATGTGGATTTGGA
AACTCCAGATACCCATATTGTATACAAAGCAGGCACAGATGACAGCAGCTCTTCTATTAATTTGGGTCAGC
AAGCCATGCCCAACAGACCTAACTACATTGGTTTCAGAGACAACTTTATCGGGCTCATGTACTACAACAGC
ACTGGCAATATGGGGGTGCTGGCCGGTCAGGCTTCTCAGCTGAATGCTGTGGTTGACTTGCAAGACAGAA
ACACCGAGCTGTCCTACCAGCTCTTGCTTGACTCTCTGGGTGACAGAACCCGGTATTTCAGTATGTGGAAT
CAGGCGGTGGACAGCTATGATCCTGATGTGCGCATTATTGAAAATCATGGTGTGGAGGATGAACTTCCCAA
CTATTGTTTCCCTCTGGATGCTGTTGGCAGAACAGATACTTATCAGGGAATTAAGGCTAATGGAACTGATC
AAACCACATGGACCAAAGATGACAGTGTCAATGATGCTAATGAGATAGGCAAGGGTAATCCATTCGCCAT
GGAAATCAACATCCAAGCCAACCTGTGGAGGAACTTCCTCTACGCCAACGTGGCCCTGTACCTGCCCGAC
TCTTACAAGTACACGCCGGCCAATGTTACCCTGCCCACCAACACCAACACCTACGATTACATGAACGGCC
GGGTGGTGGCGCCCTCGCTGGTGGACTCCTACATCAACATCGGGGCGCGCTGGTCGCTGGATCCCATGGA
CAACGTGAACCCCTTCAACCACCACCGCAATGCGGGGCTGCGCTACCGCTCCATGCTCCTGGGCAACGGG
CGCTACGTGCCCTTCCACATCCAGGTGCCCCAGAAATTTTTCGCCATCAAGAGCCTCCTGCTCCTGCCCGG
GTCCTACACCTACGAGTGGAACTTCCGCAAGGACGTCAACATGATCCTGCAGAGCTCCCTCGGCAACGAC
CTGCGCACGGACGGGGCCTCCATCTCCTTCACCAGCATCAACCTCTACGCCACCTTCTTCCCCATGGCGCA
CAACACGGCCTCCACGCTCGAGGCCATGCTGCGCAACGACACCAACGACCAGTCCTTCAACGACTACCT
CTCGGCGGCCAACATGCTCTACCCCATCCCGGCCAACGCCACCAACGTGCCCATCTCCATCCCCTCGCGC
AACTGGGCCGCCTTCCGCGGCTGGTCCTTCACGCGTCTCAAGACCAAGGAGACGCCCTCGCTGGGCTCC
GGGTTCGACCCCTACTTCGTCTACTCGGGCTCCATCCCCTACCTCGACGGCACCTTCTACCTCAACCACAC
CTTCAAGAAGGTCTCCATCACCTTCGACTCCTCCGTCAGCTGGCCCGGCAACGACCGGCTCCTGACGCCC
AACGAGTTCGAAATCAAGCGCACCGTCGACGGCGAGGGCTACAACGTGGCCCAGTGCAACATGACCAAG
GACTGGTTCCTGGTCCAGATGCTGGCCCACTACAACATCGGCTACCAGGGCTTCTACGTGCCCGAGGGCT
ACAAGGACCGCATGTACTCCTTCTTCCGCAACTTCCAGCCCATGAGCCGCCAGGTGGTGGACGAGGTCAA
CTACAAGGACTACCAGGCCGTCACCCTGGCCTACCAGCACAACAACTCGGGCTTCGTCGGCTACCTCGCG
CCCACCATGCGCCAGGGCCAGCCCTACCCCGCCAACTACCCCTACCCGCTCATCGGCAAGAGCGCCGTCA
CCAGCGTCACCCAGAAAAAGTTCCTCTGCGACAGGGTCATGTGGCGCATCCCCTTCTCCAGCAACTTCAT
GTCCATGGGCGCGCTCACCGACCTCGGCCAGAACATGCTCTATGCCAACTCCGCCCACGCGCTAGACATG
AATTTCGAAGTCGACCCCATGGATGAGTCCACCCTTCTCTATGTTGTCTTCGAAGTCTTCGACGTCGTCCG
AGTGCACCAGCCCCACCGCGGCGTCATCGAGGCCGTCTACCTGCGCACCCCCTTCTCGGCCGGTAACGCC
ACCACCTAAGCTCTTGCTTCTTGCAAGCCATGGCCGCGGGCTCCGGCGAGCAGGAGCTCAGGGCCATCAT
CCGCGACCTGGGCTGCGGGCCCTACTTCCTGGGCACCTTCGATAAGCGCTTCCCGGGATTCATGGCCCCG
CACAAGCTGGCCTGCGCCATCGTCAACACGGCCGGCCGCGAGACCGGGGGCGAGCACTGGCTGGCCTTC
GCCTGGAACCCGCGCTCGAACACCTGCTACCTCTTCGACCCCTTCGGGTTCTCGGACGAGCGCCTCAAGC
AGATCTACCAGTTCGAGTACGAGGGCCTGCTGCGCCGCAGCGCCCTGGCCACCGAGGACCGCTGCGTCA
CCCTGGAAAAGTCCACCCAGACCGTGCAGGGTCCGCGCTCGGCCGCCTGCGGGCTCTTCTGCTGCATGTT
CCTGCACGCCTTCGTGCACTGGCCCGACCGCCCCATGGACAAGAACCCCACCATGAACTTGCTGACGGG
GGTGCCCAACGGCATGCTCCAGTCGCCCCAGGTGGAACCCACCCTGCGCCGCAACCAGGAGGCGCTCTA
CCGCTTCCTCAACTCCCACTCCGCCTACTTTCGCTCCCACCGCGCGCGCATCGAGAAGGCCACCGCCTTC
GACCGCATGAATCAAGACATGTAAACCGTGTGTGTATGTTAAATGTCTTTAATAAACAGCACTTTCATGTTA
CACATGCATCTGAGATGATTTATTTAGAAATCGAAAGGGTTCTGCCGGGTCTCGGCATGGCCCGCGGGCAG
GGACACGTTGCGGAACTGGTACTTGGCCAGCCACTTGAACTCGGGGATCAGCAGTTTGGGCAGCGGGGT
GTCGGGGAAGGAGTCGGTCCACAGCTTCCGCGTCAGTTGCAGGGCGCCCAGCAGGTCGGGCGCGGAGAT
CTTGAAATCGCAGTTGGGACCCGCGTTCTGCGCGCGGGAGTTGCGGTACACGGGGTTGCAGCACTGGAA
CACCATCAGGGCCGGGTGCTTCACGCTCGCCAGCACCGTCGCGTCGGTGATGCTCTCCACGTCGAGGTCC
TCGGCGTTGGCCATCCCGAAGGGGGTCATCTTGCAGGTCTGCCTTCCCATGGTGGGCACGCACCCGGGCT
TGTGGTTGCAATCGCAGTGCAGGGGGATCAGCATCATCTGGGCCTGGTCGGCGTTCATCCCCGGGTACAT
GGCCTTCATGAAAGCCTCCAATTGCCTGAACGCCTGCTGGGCCTTGGCTCCCTCGGTGAAGAAGACCCCG
CAGGACTTGCTAGAGAACTGGTTGGTGGCGCACCCGGCGTCGTGCACGCAGCAGCGCGCGTCGTTGTTG
GCCAGCTGCACCACGCTGCGCCCCCAGCGGTTCTGGGTGATCTTGGCCCGGTCGGGGTTCTCCTTCAGCG
CGCGCTGCCCGTTCTCGCTCGCCACATCCATCTCGATCATGTGCTCCTTCTGGATCATGGTGGTCCCGTGCA
GGCACCGCAGCTTGCCCTCGGCCTCGGTGCACCCGTGCAGCCACAGCGCGCACCCGGTGCACTCCCAGT
TCTTGTGGGCGATCTGGGAATGCGCGTGCACGAAGCCCTGCAGGAAGCGGCCCATCATGGTGGTCAGGGT
CTTGTTGCTAGTGAAGGTCAGCGGAATGCCGCGGTGCTCCTCGTTGATGTACAGGTGGCAGATGCGGCGG
TACACCTCGCCCTGCTCGGGCATCAGCTGGAAGTTGGCTTTCAGGTCGGTCTCCACGCGGTAGCGGTCCA
TCAGCATAGTCATGATTTCCATACCCTTCTCCCAGGCCGAGACGATGGGCAGGCTCATAGGGTTCTTCACC
ATCATCTTAGCGCTAGCAGCCGCGGCCAGGGGGTCGCTCTCGTCCAGGGTCTCAAAGCTCCGCTTGCCGT
CCTTCTCGGTGATCCGCACCGGGGGGGTAGCTGAAGCCCACGGCCGCCAGCTCCTCCTCGGCCTGTCTTTC
GTCCTCGCTGTCCTGGCTGACGTCCTGCAGGACCACATGCTTGGTCTTGCGGGGTTTCTTCTTGGGCGGC

AGCGGCGGCGGAGATGTTGGAGATGGCGAGGGGGAGCGCGAGTTCTCGCTCACCACTACTATCTCTTCCT
CTTCTTGGTCCGAGGCCACGCGGCGGTAGGTATGTCTCTTCGGGGGCAGAGGCGGAGGCGACGGGCTCT
CGCCGCCGCGACTTGGCGGATGGCTGGCAGAGCCCCTTCCGCGTTCGGGGGTGCGCTCCCGGCGGCGCT
CTGACTGACTTCCTCCGCGGCCGGCCATTGTGTTCTCCTAGGGAGGAACAACAAGCATGGAGACTCAGCC
ATCGCCAACCTCGCCATCTGCCCCCACCGCCGACGAGAAGCAGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAACCGC
CCCGCCGCCCAGCCCCGCCACCTCCGACGCGGCCGTCCCAGACATGCAAGAGATGGAGGAATCCATCGA
GATTGACCTGGGCTATGTGACGCCCGCGGAGCACGAGGAGGAGCTGGCAGTGCGCTTTTCACAAGAAGA
GATACACCAAGAACAGCCAGAGCAGGAAGCAGAGAATGAGCAGAGTCAGGCTGGGCTCGAGCATGACG
GCGACTACCTCCACCTGAGCGGGGGGGAGGACGCGCTCATCAAGCATCTGGCCCGGCAGGCCACCATCG
TCAAGGATGCGCTGCTCGACCGCACCGAGGTGCCCCTCAGCGTGGAGGAGCTCAGCCGCGCCTACGAGT
TGAACCTCTTCTCGCCGCGCGTGCCCCCCAAGCGCCAGCCCAATGGCACCTGCGAGCCCAACCCGCGCCT
CAACTTCTACCCGGTCTTCGCGGTGCCCGAGGCCCTGGCCACCTACCACATCTTTTTCAAGAACCAAAAG
ATCCCCGTCTCCTGCCGCGCCAACCGCACCCGCGCCGACGCCCTTTTCAACCTGGGTCCCGGCGCCCGCC
TACCTGATATCGCCTCCTTGGAAGAGGTTCCCAAGATCTTCGAGGGTCTGGGCAGCGACGAGACTCGGGC
CGCGAACGCTCTGCAAGGAGAAGGAGGAGAGCATGAGCACCACAGCGCCCTGGTCGAGTTGGAAGGCG
ACAACGCGCGGCTGGCGGTGCTCAAACGCACGGTCGAGCTGACCCATTTCGCCTACCCGGCTCTGAACCT
GCCCCCCAAAGTCATGAGCGCGGTCATGGACCAGGTGCTCATCAAGCGCGCGTCGCCCATCTCCGAGGAC
GAGGGCATGCAAGACTCCGAGGAGGGCAAGCCCGTGGTCAGCGACGAGCAGCTGGCCCGGTGGCTGGG
TCCTAATGCTAGTCCCCAGAGTTTGGAAGAGCGGCGCAAACTCATGATGGCCGTGGTCCTGGTGACCGTG
GAGCTGGAGTGCCTGCGCCGCTTCTTCGCCGACGCGGAGACCCTGCGCAAGGTCGAGGAGAACCTGCAC
TACCTCTTCAGGCACGGGTTCGTGCGCCAGGCCTGCAAGATCTCCAACGTGGAGCTGACCAACCTGGTCT
CCTACATGGGCATCTTGCACGAGAACCGCCTGGGGCAGAACGTGCTGCACACCACCCTGCGCGGGGAGG
CCCGGCGCGACTACATCCGCGACTGCGTCTACCTCTACCTCTGCCACACCTGGCAGACGGGCATGGGCGT
GTGGCAGCAGTGTCTGGAGGAGCAGAACCTGAAAGAGCTCTGCAAGCTCCTGCAGAAGAACCTCAAGG
GTCTGTGGACCGGGTTCGACGAGCGCACCACCGCCTCGGACCTGGCCGACCTCATTTTCCCCGAGCGCCT
CAGGCTGACGCTGCGCAACGGCCTGCCCGACTTTATGAGCCAAAGCATGTTGCAAAACTTTCGCTCTTTC
ATCCTCGAACGCTCCGGAATCCTGCCCGCCACCTGCTCCGCGCTGCCCTCGGACTTCGTGCCGCTGACCTT
CCGCGAGTGCCCCCCGCCGCTGTGGAGCCACTGCTACCTGCTGCGCCTGGCCAACTACCTGGCCTACCAC
TCGGACGTGATCGAGGACGTCAGCGGCGAGGGCCTGCTCGAGTGCCACTGCCGCTGCAACCTCTGCACG
CCGCACCGCTCCCTGGCCTGCAACCCCCAGCTGCTGAGCGAGACCCAGATCATCGGCACCTTCGAGTTGC
AAGGGCCCAGCGAAGGCGAGGGTTCAGCCGCCAAGGGGGGTCTGAAACTCACCCCGGGGCTGTGGACC
TCGGCCTACTTGCGCAAGTTCGTGCCCGAGGACTACCATCCCTTCGAGATCAGGTTCTACGAGGACCAAT
CCCATCCGCCCAAGGCCGAGCTGTCGGCCTGCGTCATCACCCAGGGGGCGATCCTGGCCCAATTGCAAGC
CATCCAGAAATCCCGCCAAGAATTCTTGCTGAAAAAGGGCCGCGGGGTCTACCTCGACCCCCAGACCGGT
GAGGAGCTCAACCCCGGCTTCCCCCAGGATGCCCCGAGGAAACAAGAAGCTGAAAGTGGAGCTGCCGC
CCGTGGAGGATTTGGAGGAAGACTGGGAGAACAGCAGTCAGGCAGAGGAGGAGGAGATGGAGGAAGA
CTGGGACAGCACTCAGGCAGAGGAGGACAGCCTGCAAGACAGTCTGGAGGAAGACGAGGAGGAGGCA
GAGGAGGAGGTGGAAGAAGCAGCCGCCGCCAGACCGTCGTCCTCGGCGGGGGAGAAAGCAAGCAGCA
CGGATACCATCTCCGCTCCGGGTCGGGGTCCCGCTCGACCACACAGTAGATGGGACGAGACCGGACGATT
CCCGAACCCCACCACCCAGACCGGTAAGAAGGAGCGGCAGGGATACAAGTCCTGGCGGGGGCACAAAA
ACGCCATCGTCTCCTGCTTGCAGGCCTGCGGGGGCAACATCTCCTTCACCCGGCGCTACCTGCTCTTCCAC
CGCGGGGTGAACTTTCCCCGCAACATCTTGCATTACTACCGTCACCTCCACAGCCCCTACTACTTCCAAGA
AGAGGCAGCAGCAGCAGAAAAAGACCAGCAGAAAACCAGCAGCTAGAAAATCCACAGCGGCGGCAGC
AGGTGGACTGAGGATCGCGGCGAACGAGCCGGCGCAAACCCGGGAGCTGAGGAACCGGATCTTTCCCAC
CCTCTATGCCATCTTCCAGCAGAGTCGGGGGCAGGAGCAGGAACTGAAAGTCAAGAACCGTTCTCTGCG
CTCGCTCACCCGCAGTTGTCTGTATCACAAGAGCGAAGACCAACTTCAGCGCACTCTCGAGGACGCCGA
GGCTCTCTTCAACAAGTACTGCGCGCTCACTCTTAAAGAGTAGCCCGCGCCCGCCCAGTCGCAGAAAAA
GGCGGGAATTACGTCACCTGTGCCCTTCGCCCTAGCCGCCTCCACCCATCATCATGAGCAAAGAGATTCCC
ACGCCTTACATGTGGAGCTACCAGCCCCAGATGGGCCTGGCCGCCGGTGCCGCCCAGGACTACTCCACCC
GCATGAATTGGCTCAGCGCCGGGCCCGCGATGATCTCACGGGTGAATGACATCCGCGCCCACCGAAACCA
GATACTCCTAGAACAGTCAGCGCTCACCGCCACGCCCCGCAATCACCTCAATCCGCGTAATTGGCCCGCC
GCCCTGGTGTACCAGGAAATTCCCCAGCCCACGACCGTACTACTTCCGCGAGACGCCCAGGCCGAAGTCC
AGCTGACTAACTCAGGTGTCCAGCTGGCGGGCGGCGCCACCCTGTGTCGTCACCGCCCCGCTCAGGGTAT
AAAGCGGCTGGTGATCCGGGGCAGAGGCACACAGCTCAACGACGAGGTGGTGAGCTCTTCGCTGGGTCT
GCGACCTGACGGAGTCTTCCAACTCGCCGGATCGGGGAGATCTTCCTTCACGCCTCGTCAGGCCGTCCTG
ACTTTGGAGAGTTCGTCCTCGCAGCCCCGCTCGGGTGGCATCGGCACTCTCCAGTTCGTGGAGGAGTTCA
CTCCCTCGGTCTACTTCAACCCCTTCTCCGGCTCCCCCGGCCACTACCCGGACGAGTTCATCCCGAACTTC
GACGCCATCAGCGAGTCGGTGGACGGCTACGATTGAAACTAATCACCCCCTTATCCAGTGAAATAAAGAT
CATATTGATGATGATTTTACAGAAATAAAAAATAATCATTTGATTTGAAATAAAGATACAATCATATTGATGA
TTTGAGTTTAACAAAAAAATAAAGAATCACTTACTTGAAATCTGATACCAGGTCTCTGTCCATGTTTTCTGC
CAACACCACTTCACTCCCCTCTTCCCAGCTCTGGTACTGCAGGCCCCGGCGGGCTGCAAACTTCCTCCAC
ACGCTGAAGGGGATGTCAAATTCCTCCTGTCCCTCAATCTTCATTTTATCTTCTATCAGATGTCCAAAAAGC
GCGTCCGGGTGGATGATGACTTCGACCCCGTCTACCCCTACGATGCAGACAACGCACCGACCGTGCCCTT
CATCAACCCCCCCTTCGTCTCTTCAGATGGATTCCAAGAGAAGCCCCTGGGGGTGTTGTCCCTGCGACTG
GCCGACCCCGTCACCACCAAGAACGGGGAAATCACCCTCAAGCTGGGAGAGGGGGTGGACCTCGATTCC
TCGGGAAAACTCATCTCCAACACGGCCACCAAGGCCGCCGCCCCTCTCAGTTTTTCCAACAACACCATTT
CCCTTAACATGGATCACCCCTTTTACACTAAAGATGGAAAATTATCCTTACAAGTTTCTCCACCATTAAATAT
ACTGAGAACAAGCATTCTAAACACACTAGCTTTAGGTTTTGGATCAGGTTTAGGACTCCGTGGCTCTGCCT

TGGCAGTACAGTTAGTCTCTCCACTTACATTTGATACTGATGGAAACATAAAGCTTACCTTAGACAGAGGT
TTGCATGTTACAACAGGAGATGCAATTGAAAGCAACATAAGCTGGGCTAAAGGTTTAAAATTTGAAGATG
GAGCCATAGCAACCAACATTGGAAATGGGTTAGAGTTTGGAAGCAGTAGTACAGAAACAGGTGTTGATGA
TGCTTACCCAATCCAAGTTAAACTTGGATCTGGCCTTAGCTTTGACAGTACAGGAGCCATAATGGCTGGTA
ACAAAGAAGACGATAAACTCACTTTGTGGACAACACCTGATCCATCACCAAACTGTCAAATACTCGCAGA
AAATGATGCAAAACTAACACTTTGCTTGACTAAATGTGGTAGTCAAATACTGGCCACTGTGTCAGTCTTAG
TTGTAGGAAGTGGAAACCTAAACCCCATTACTGGCACCGTAAGCAGTGCTCAGGTGTTTCTACGTTTTGAT
GCAAACGGTGTTCTTTTAACAGAACATTCTACACTAAAAAAAATACTGGGGGTATAGGCAGGGAGATAGCAT
AGATGGCACTCCATATACCAATGCTGTAGGATTCATGCCCAATTTAAAAGCTTATCCAAAGTCACAAAGTT
CTACTACTAAAAATAATATAGTAGGGCAAGTATACATGAATGGAGATGTTTCAAAACCTATGCTTCTCACTA
TAACCCTCAATGGTACTGATGACAGCAACAGTACATATTCAATGTCATTTTCATACACCTGGACTAATGGAA
GCTATGTTGGAGCAACATTTGGGGCTAACTCTTATACCTTCTCATACATCGCCCAAGAATGAACACTGTATC
CCACCCTGCATGCCAACCCTTCCCACCCCACTCTGTGGAACAAACTCTGAAACACAAAATAAAATAAAGT
TCAAGTGTTTTATTGATTCAACAGTTTTACAGGATTCGAGCAGTTATTTTTCCTCCACCCTCCCAGGACATG
GAATACACCACCCTCTCCCCCCCGCACAGCCTTGAACATCTGAATGCCATTGGTGATGGACATGCTTTTGGT
CTCCACGTTCCACACAGTTTCAGAGCGAGCCAGTCTCGGGTCGGTCAGGGAGATGAAACCCTCCGGGCA
CTCCCGCATCTGCACCTCACAGCTCAACAGCTGAGGATTGTCCTCGGTGGTCGGGATCACGGTTATCTGG
AAGAAGCAGAAGAGCGGCGGTGGGAATCATAGTCCGCGAACGGGATCGGCCGGTGGTGTCGCATCAGGC
CCCGCAGCAGTCGCTGCCGCCGCCGCTCCGTCAAGCTGCTGCTCAGGGGGTCCGGGTCCAGGGACTCCC
TCAGCATGATGCCCACGGCCCTCAGCATCAGTCGTCTGGTGCGGCGGGCGCAGCAGCGCATGCGGATCTC
GCTCAGGTCGCTGCAGTACGTGCAACACAGAACCACCAGGTTGTTCAACAGTCCATAGTTCAACACGCTC
CAGCCGAAACTCATCGCGGGAAGGATGCTACCCACGTGGCCGTCGTACCAGATCCTCAGGTAAATCAAGT
GGTGCCCCCTCCAGAACACGCTGCCCACGTACATGATCTCCTTGGGCATGTGGCGGTTCACCACCTCCCG
GTACCACATCACCCTCTGGTTGAACATGCAGCCCCGGATGATCCTGCGGAACCACAGGGCCAGCACCGCC
CCGCCCGCCATGCAGCGAAGAGACCCCGGGTCCCGGCAATGGCAATGGAGGACCCACCGCTCGTACCCG
TGGATCATCTGGGAGCTGAACAAGTCTATGTTGGCACAGCACAGGCATATGCTCATGCATCTCTTCAGCAC
TCTCAACTCCTCGGGGGTCAAAACCATATCCCAGGGCACGGGGAACTCTTGCAGGACAGCGAACCCCGC
AGAACAGGGCAATCCTCGCACAGAACTTACATTGTGCATGGACAGGGTATCGCAATCAGGCAGCACCGGG
TGATCCTCCACCAGAGAAGCGCGGGTCTCGGTCTCCTCACAGCGTGGTAAGGGGGCCGGCCGATACGGG
TGATGGCGGGACGCGGCTGATCGTGTTCGCGACCGTGTCATGATGCAGTTGCTTTCGGACATTTTCGTACT
TGCTGTAGCAGAACCTGGTCCGGGCGCTGCACACCGATCGCCGGCGGCGGTCTCGGCGCTTGGAACGCT
CGGTGTTGAAATTGTAAAACAGCCACTCTCTCAGACCGTGCAGCAGATCTAGGGCCTCAGGAGTGATGAA
GATCCCATCATGCCTGATGGCTCTGATCACATCGACCACCGTGGAATGGGCCAGACCCAGCCAGATGATGC
AATTTTGTTGGGTTTCGGTGACGGCGAGCCTCGGGAACAACGATGAAGTAAATGCAAGCGGTGCGTTCCA
GCATGGTTAGTTAGCTGATCTGTAGAAAAAACAAAAATGAACATTAAACCATGCTAGCCTGGCGAACAGG
TGGGTAAATCGTTCTCTCCAGCACCAGGCAGGCCACGGGGTCTCCGGCGCGACCCTCGTAAAAATTGTCG
CTATGATTGAAAACCATCACAGAGAGACGTTCCCGGTGGCCGGCGTGAATGATTCGACAAGATGAATACA
CCCCCGGAACATTGGCGTCCGCGAGTGAAAAAAAGCGCCCGAGGAAGCAATAAGGCACTACAATGCTCA
GTCTCAAGTCCAGCAAAGCGATGCCATGCGGATGAAGCACAAAATTCTCAGGTGCGTACAAAATGTAATT
ACTCCCCTCCTGCACAGGCAGCAAAGCCCCCGATCCCTCCAGGTACACATACAAAGCCTCAGCGTCCATA
GCTTACCGAGCAGCAGCACACAACAGGCGCAAGAGTCAGAGAAAGGCTGAGCTCTAACCTGTCCACCCG
CTCTCTGCTCAATATATAGCCCAGATCTACACTGACGTAAAGGCCAAAGTCTAAAAATACCCGCCAAATAA
TCACACACGCCCAGCACACGCCCAGAAACCGGTGACACACTCAAAAAAATACGCGCACTTCCTCAAACG
CCCAAAACTGCCGTCATTTCCGGGTTCCCACGCTACGTCATCAAAACACGACTTTCAAATTCCGTCGACC
GTTAAAAACGTCACCCGCCCCGCCCCTAACGGTCGCCCGTCTCTCAGCCAATCAGCGCCCCGCATCCCCA
AATTCAAACACCTCATTTGCATATTAACGCGCACAAAAAGTTTGAGGTATATTATTGATGATG

【０５１４】

参考文献

1．Desrichard，A.，Snyder，A.＆Chan，T.A.Cancer Neoantigens and Applications for Immunotherapy.Clin.Cancer Res.Off.J.Am.Assoc.Cancer Res.（２０１５）.doi：１０.１１５８／１０７８－０４３２.CCR－１４－３１７５

2．Schumacher，T.N.＆Schreiber，R.D.Neoantigens in cancer immunotherapy.Science ３４８，６９－７４（２０１５）.

3．Gubin，M.M.，Artyomov，M.N.，Mardis，E.R.＆Schreiber，R.D.Tumor neoantigens：building a framework for personalized cancer immunotherapy.J.Clin.Invest.１２５，３４１３－３４２１（２０１

5)．
4．Rizvi，N．A．et al．Cancer immunology．Mutational landscape determines sensitivity to PD－1 blockade in non－small cell lung cancer．Science 348，124－128（2015）．
5．Snyder，A．et al．Genetic basis for clinical response to CTLA－4 blockade in melanoma．N．Engl．J．Med．371，2189－2199（2014）．
6．Carreno，B．M．et al．Cancer immunotherapy．A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen－specific T cells．Science 348，803－808（2015）．
7．Tran，E．et al．Cancer immunotherapy based on mutation－specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer．Science 344，641－645（2014）．
8．Hacohen，N．& Wu，C．J．－Y．United States Patent Application：20110293637 － COMPOSITIONS AND METHODS OF IDENTIFYING TUMOR SPECIFIC NEOANTIGENS．（A1）．at <http：／／appft1．uspto．gov／netacgi／nph－Parser？Sect1＝PTO1＆Sect2＝HITOFF＆d＝PG01＆p＝1＆u＝／netahtml／PTO／srchnum．html＆r＝1＆f＝G＆l＝50＆s1＝20110293637．PGNR．>
9．Lundegaard，C．，Hoof，I．，Lund，O．& Nielsen，M．State of the art and challenges in sequence based T－cell epitope prediction．Immunome Res．6 Suppl 2，S3（2010）．
10．Yadav，M．et al．Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing．Nature 515，572－576（2014）．
11．Bassani－Sternberg，M．，Pletscher－Frankild，S．，Jensen，L．J．& Mann，M．Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation．Mol．Cell．Proteomics MCP 14，658－673（2015）．
12．Van Allen，E．M．et al．Genomic correlates of response to CTLA－4 blockade in metastatic melanoma．Science 350，207－211（2015）．
13．Yoshida，K．& Ogawa，S．Splicing factor mutations and cancer．Wiley Interdiscip．Rev．RNA 5，445－459（2014）．
14．Cancer Genome Atlas Research Network．Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma．Nature 511，543－550（2014）．
15．Rajasagi，M．et al．Systematic identific

ation of personal tumor-specific neoantigens in chronic lymphocytic leukemia. Blood 124, 453-462 (2014).
16. Downing, S. R. et al. United States Patent Application: 0120208706 - OPTIMIZATION OF MULTIGENE ANALYSIS OF TUMOR SAMPLES. (A1). at <http://appft1.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=20120208706.PGNR.>
17. Target Capture for NextGen Sequencing - IDT. at <http://www.idtdna.com/pages/products/nextgen/target-capture>
18. Shukla, S. A. et al. Comprehensive analysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes. Nat. Biotechnol. 33, 1152-1158 (2015).
19. Cieslik, M. et al. The use of exome capture RNA-seq for highly degraded RNA with application to clinical cancer sequencing. Genome Res. 25, 1372-1381 (2015).
20. Bodini, M. et al. The hidden genomic landscape of acute myeloid leukemia: subclonal structure revealed by undetected mutations. Blood 125, 600-605 (2015).
21. Saunders, C. T. et al. Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs. Bioinforma. Oxf. Engl. 28, 1811-1817 (2012).
22. Cibulskis, K. et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. Nat. Biotechnol. 31, 213-219 (2013).
23. Wilkerson, M. D. et al. Integrated RNA and DNA sequencing improves mutation detection in low purity tumors. Nucleic Acids Res. 42, e107 (2014).
24. Mose, L. E., Wilkerson, M. D., Hayes, D. N., Perou, C. M. & Parker, J. S. ABRA: improved coding indel detection via assembly-based realignment. Bioinforma. Oxf. Engl. 30, 2813-2815 (2014).
25. Ye, K., Schulz, M. H., Long, Q., Apweiler, R. & Ning, Z. Pindel: a pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from paired-end short reads. Bioinforma. Oxf. Engl. 25, 2865-2871 (2009).
26. Lam, H. Y. K. et al. Nucleotide-resolution analysis of structural variants using Bre

akSeq and a breakpoint library. Nat. Biotechnol. 28, 47－55 (2010).
27. Frampton, G. M. et al. Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. Nat. Biotechnol. 31, 1023－1031 (2013).
28. Boegel, S. et al. HLA typing from RNA－Seq sequence reads. Genome Med. 4, 102 (2012).
29. Liu, C. et al. ATHLATES：accurate typing of human leukocyte antigen through exome sequencing. Nucleic Acids Res. 41, e142 (2013).
30. Mayor, N. P. et al. HLA Typing for the Next Generation. PloS One 10, e0127153 (2015).
31. Roy, C. K., Olson, S., Graveley, B. R., Zamore, P. D. & Moore, M. J. Assessing long－distance RNA sequence connectivity via RNA－templated DNA－DNA ligation. eLife 4, (2015).
32. Song, L. & Florea, L. CLASS：constrained transcript assembly of RNA－seq reads. BMC Bioinformatics 14 Suppl 5, S14 (2013).
33. Maretty, L., Sibbesen, J. A. & Krogh, A. Bayesian transcriptome assembly. Genome Biol. 15, 501 (2014).
34. Pertea, M. et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA－seq reads. Nat. Biotechnol. 33, 290－295 (2015).
35. Roberts, A., Pimentel, H., Trapnell, C. & Pachter, L. Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA－Seq. Bioinforma. Oxf. Engl. (2011). doi：10.1093／bioinformatics／btr355
36. Vitting－Seerup, K., Porse, B. T., Sandelin, A. & Waage, J. spliceR：an R package for classification of alternative splicing and prediction of coding potential from RNA－seq data. BMC Bioinformatics 15, 81 (2014).
37. Rivas, M. A. et al. Human genomics. Effect of predicted protein－truncating genetic variants on the human transcriptome. Science 348, 666－669 (2015).
38. Skelly, D. A., Johansson, M., Madeoy, J., Wakefield, J. & Akey, J. M. A powerful and flexible statistical framework for testing hypotheses of allele－specific gene expression from RNA－seq data. Genome Res. 21, 1728－1737 (2011).
39. Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq－－a Python framework to work with high－throug

hput sequencing data. Bioinforma. Oxf. Engl. 31, 166-169 (2015).
40. Furney, S. J. et al. SF3B1 mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma. Cancer Discov. (2013). doi:10.1158/2159-8290. CD-13-0330
41. Zhou, Q. et al. A chemical genetics approach for the functional assessment of novel cancer genes. Cancer Res. (2015). doi:10.1158/0008-5472. CAN-14-2930
42. Maguire, S. L. et al. SF3B1 mutations constitute a novel therapeutic target in breast cancer. J. Pathol. 235, 571-580 (2015).
43. Carithers, L. J. et al. A Novel Approach to High-Quality Postmortem Tissue Procurement: The GTEx Project. Biopreservation Biobanking 13, 311-319 (2015).
44. Xu, G. et al. RNA CoMPASS: a dual approach for pathogen and host transcriptome analysis of RNA-seq datasets. PloS One 9, e89445 (2014).
45. Andreatta, M. & Nielsen, M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. Bioinforma. Oxf. Engl. (2015). doi:10.1093/bioinformatics/btv639
46. Jorgensen, K. W., Rasmussen, M., Buus, S. & Nielsen, M. NetMHCstab - predicting stability of peptide-MHC-I complexes; impacts for cytotoxic T lymphocyte epitope discovery. Immunology 141, 18-26 (2014).
47. Larsen, M. V. et al. An integrative approach to CTL epitope prediction: a combined algorithm integrating MHC class I binding, TAP transport efficiency, and proteasomal cleavage predictions. Eur. J. Immunol. 35, 2295-2303 (2005).
48. Nielsen, M., Lundegaard, C., Lund, O. & Kesmir, C. The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage. Immunogenetics 57, 33-41 (2005).
49. Boisvert, F.-M. et al. A Quantitative Spatial Proteomics Analysis of Proteome Turnover in Human Cells. Mol. Cell. Proteomics 11, M111.011429-M111.011429 (2012).
50. Duan, F. et al. Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunog

enicity. J. Exp. Med. 211, 2231-2248 (2014).
51. Janeway's Immunobiology:9780815345312: Medicine & Health Science Books @ Amazon.com. at <http://www.amazon.com/Janeways-Immunobiology-Kenneth-Murphy/dp/0815345313>
52. Calis, J. J. A. et al. Properties of MHC Class I Presented Peptides That Enhance Immunogenicity. PLoS Comput. Biol. 9, e1003266 (2013).
53. Zhang, J. et al. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. Science 346, 256-259 (2014)
54. Walter, M. J. et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. N. Engl. J. Med. 366, 1090-1098 (2012).
55. Hunt DF, Henderson RA, Shabanowitz J, Sakaguchi K, Michel H, Sevilir N, Cox AL, Appella E, Engelhard VH. Characterization of peptides bound to the class I MHC moleculeHLA-A2.1 by mass spectrometry. Science 1992. 255:1261-1263.
56. Zarling AL, Polefrone JM, Evans AM, Mikesh LM, Shabanowitz J, Lewis ST, Engelhard VH, Hunt DF. Identification of class I MHC-associated phosphopeptides as targets for cancer immunotherapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Oct 3;103(40):14889-94.
57. Bassani-Sternberg M, Pletscher-Frankild S, Jensen LJ, Mann M. Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation. Mol Cell Proteomics. 2015 Mar;14(3):658-73. doi:10.1074/mcp.M114.042812.
58. Abelin JG, Trantham PD, Penny SA, Patterson AM, Ward ST, Hildebrand WH, Cobbold M, Bai DL, Shabanowitz J, Hunt DF. Complementary IMAC enrichment methods forHLA-associated phosphopeptide identification by mass spectrometry. Nat Protoc. 2015 Sep;10(9):1308-18. doi:10.1038/nprot.2015.086. Epub 2015 Aug 6
59. Barnstable CJ, Bodmer WF, Brown G, Galfre G, Milstein C, Williams AF, Ziegler A. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. Cell. 1978 May;14(1):9-20.
60. Goldman JM, Hibbin J, Kearney L, Orchard

K, Th'ng KH. HLA-DR monoclonal antibodies inhibit the proliferation of normal and chronic granulocytic leukaemia myeloid progenitor cells. Br J Haematol. 1982 Nov;52(3):411-20.
61. Eng JK, Jahan TA, Hoopmann MR. Comet: an open-sourceMS/MSsequence databasesearchtool. Proteomics. 2013 Jan;13(1):22-4. doi:10.1002/pmic.201200439. Epub 2012 Dec 4.
62. Eng JK, Hoopmann MR, Jahan TA, Egertson JD, Noble WS, MacCoss MJ. A deeper look intoComet--implementation and features. J Am Soc Mass Spectrom. 2015 Nov;26(11):1865-74. doi:10.1007/s13361-015-1179-x. Epub 2015 Jun 27.
63. Lukas Kall, Jesse Canterbury, Jason Weston, William Stafford Noble and Michael J. MacCoss. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. Nature Methods 4:923 - 925, November 2007
64. Lukas Kall, John D. Storey, Michael J. MacCoss and William Stafford Noble. Assigning confidence measures to peptides identified by tandem mass spectrometry. Journal of Proteome Research, 7(1):29-34, January 2008
65. Lukas Kall, John D. Storey and William Stafford Noble. Nonparametric estimation of posterior error probabilities associated with peptides identified by tandem mass spectrometry. Bioinformatics, 24(16):i42-i48, August 2008
66. Kinney RM, BJ Johnson , VL Brown , DW Trent. Nucleotide Sequence of the 26 S mRNA of the Virulent Trinidad Donkey Strain of Venezuelan Equine Encephalitis Virus and Deduced Sequence of the Encoded Structural Proteins. Virology 152(2), 400-413. 1986 Jul 30.
67. Jill E Slansky, Frederique M Rattis, Lisa F Boyd, Tarek Fahmy, Elizabeth M Jaffee, Jonathan P Schneck, David H Margulies, Drew M Pardoll. Enhanced Antigen-Specific Antitumor Immunity with Altered Peptide Ligands that Stabilize the MHC-Peptide-TCR Complex. Immunity, Volume 13, Issue 4, 1 October 2000, Pages 529-538.
68. A Y Huang, P H Gulden, A S Woods, M C Thomas, C D Tong, W Wang, V H Engelhard, G Pasternack, R Cotter, D Hunt, D M Pardoll, and E M Ja

ffee. The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product. Proc Natl Acad Sci U S A.;93(18):9730-9735, 1996 Sep 3.
69. JOHNSON, BARBARA J. B., RICHARD M. KINNEY, CRYSTLE L. KOST AND DENNIS W. TRENT. Molecular Determinants of Alphavirus Neurovirulence: Nucleotide and Deduced Protein Sequence Changes during Attenuation of Venezuelan Equine Encephalitis Virus. J Gen Virol 67:1951-1960, 1986.
70. Aarnoudse, C. A., Krue, M., Konopitzky, R., Brouwenstijn, N., and Schrier, P. I. (2002). TCR reconstitution in Jurkat reporter cells facilitates the identification of novel tumor antigens by cDNA expression cloning. Int J Cancer 99, 7-13.
71. Alexander, J., Sidney, J., Southwood, S., Ruppert, J., Oseroff, C., Maewal, A., Snoke, K., Serra, H. M., Kubo, R. T., and Sette, A. (1994). Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. Immunity 1, 751-761.
72. Banu, N., Chia, A., Ho, Z. Z., Garcia, A. T., Paravasivam, K., Grotenbreg, G. M., Bertoletti, A., and Gehring, A. J. (2014). Building and optimizing a virus-specific T cell receptor library for targeted immunotherapy in viral infections. Scientific Reports 4, 4166.
73. Cornet, S., Miconnet, I., Menez, J., Lemonnier, F., and Kosmatopoulos, K. (2006). Optimal organization of a polypeptide-based candidate cancer vaccine composed of cryptic tumor peptides with enhanced immunogenicity. Vaccine 24, 2102-2109.
74. Depla, E., van der Aa, A., Livingston, B. D., Crimi, C., Allosery, K., de Brabandere, V., Krakover, J., Murthy, S., Huang, M., Power, S., et al. (2008). Rational design of a multiepitope vaccine encoding T-lymphocyte epitopes for treatment of chronic hepatitis B virus infections. Journal of Virology 82, 435-450.
75. Ishioka, G. Y., Fikes, J., Hermanson, G., Livingston, B., Crimi, C., Qin, M., del Guercio, M. F., Oseroff, C., Dahlberg, C., Alexander, J., et al. (1999). Utilization of MHC class I t

ransgenic mice for development of minigene DNA vaccines encoding multiple HLA-restricted CTL epitopes. J Immunol 162, 3915-3925.
76. Janetzki, S., Price, L., Schroeder, H., Britten, C. M., Welters, M. J. P., and Hoos, A. (2015). Guidelines for the automated evaluation of Elispot assays. Nat Protoc 10, 1098-1115.
77. Lyons, G. E., Moore, T., Brasic, N., Li, M., Roszkowski, J. J., and Nishimura, M. I. (2006). Influence of human CD8 on antigen recognition by T-cell receptor-transduced cells. Cancer Res 66, 11455-11461.
78. Nagai, K., Ochi, T., Fujiwara, H., An, J., Shirakata, T., Mineno, J., Kuzushima, K., Shiku, H., Melenhorst, J. J., Gostick, E., et al. (2012). Aurora kinase A-specific T-cell receptor gene transfer redirects T lymphocytes to display effective antileukemia reactivity. Blood 119, 368-376.
79. Panina-Bordignon, P., Tan, A., Termijtelen, A., Demotz, S., Corradin, G., and Lanzavecchia, A. (1989). Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. Eur J Immunol 19, 2237-2242.
80. Vitiello, A., Marchesini, D., Furze, J., Sherman, L. A., and Chesnut, R. W. (1991). Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex. J Exp Med 173, 1007-1015.
81. Yachi, P. P., Ampudia, J., Zal, T., and Gascoigne, N. R. J. (2006). Altered peptide ligands induce delayed CD8-T cell receptor interaction--a role for CD8 in distinguishing antigen quality. Immunity 25, 203-211.
82. Pushko P, Parker M, Ludwig GV, Davis NL, Johnston RE, Smith JF. Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo. Virology. 1997 Dec 22;239(2):389-401.
83. Strauss, JH and E G Strauss. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. Microbiol Rev. 1994 Sep;58(3):491-562.
84. Rhee C, Ehrengruber MU, Grandgirard D. Alphaviral cytotoxicity and its implication

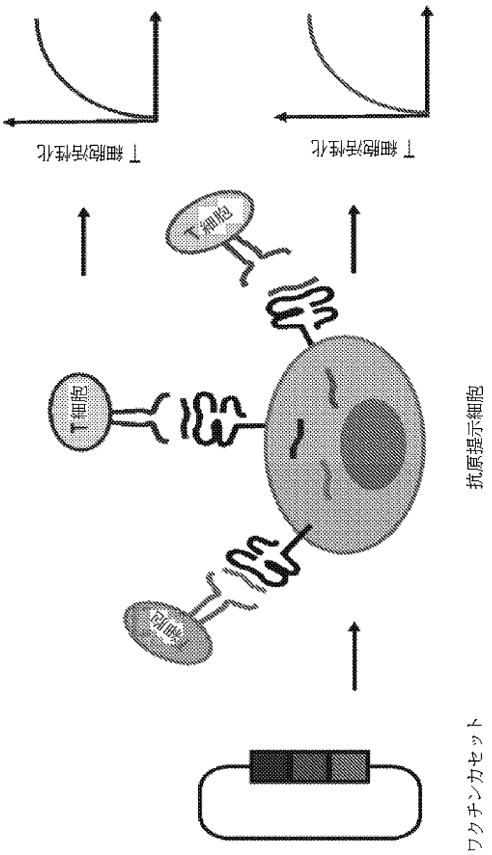
in vector development. Exp Physiol. 2005 Jan;90(1):45-52. Epub 2004 Nov 12.
85. Riley, Michael K. II, and Wilfred Vermerris. Recent Advances in Nanomaterials for Gene Delivery-review. Nanomaterials 2017, 7(5), 94.
86. Frolov I, Hardy R, Rice CM. Cis-acting RNA elements at the 5' end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis. RNA. 2001 Nov;7(11):1638-51.
87. Jose J, Snyder JE, Kuhn RJ. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. Future Microbiol. 2009 Sep;4(7):837-56.
88. Bo Li and C. olin N. Dewey. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a referenfe genome. BMC Bioinformatics, 12:323, August 2011
89. Hillary Pearson, Tariq Daouda, Diana Paola Granados, Chantal Durette, Eric Bonneil, Mathieu Courcelles, Anja Rodenbrock, Jean-Philippe Laverdure, Caroline Cote, Sylvie Mader, Sebastien Lemieux, Pierre Thibault, and Claude Perreault. MHC class I-associated peptides derive from selective regions of the human genome. The Journal of Clinical Investigation, 2016,
90. Juliane Liepe, Fabio Marino, John Sidney, Anita Jeko, Daniel E. Bunting, Alessandro Sette, Peter M. Kloetzel, Michael P. H. Stumpf, Albert J. R. Heck, Michele Mishto. A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides. Science, 21, October 2016.
91. Mommen GP., Marino, F., Meiring HD., Poelen, MC., van Gaans-van den Brink, JA., Mohammed S., Heck AJ., and van Els CA. Sampling From the Proteome to the Human Leukocyte Antigen-DR (HLA-DR) Ligandome Proceeds Via High Specificity. Mol Cell Proteomics 15(4):1412-1423, April 2016.
92. Sebastian Kreiter, Mathias Vormehr, Niels van de Roemer, Mustafa Diken, Martin Lower, Jan Diekmann, Sebastian Boegel, Barbara Schrors, Fulvia Vascotto, John C. Castle, Arbel D. Tadmor, Stephen P. Schoenberger, Christoph Huber, Ozlem Tureci, and Ugur Sahin. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to caner. Nature 520, 692-696, April 2015.

93. Tran E., Turcotte S., Gros A., Robbins P. F., Lu Y. C., Dudley M. E., Wunderlich J. R., Somerville R. P., Hogan K., Hinrichs C. S., Parkhurst M. R., Yang J. C., Rosenberg S. A. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. Science 344 (6184) 641-645, May 2014.
94. Andreatta M., Karosiene E., Rasmussen M., Stryhn A., Buus S., Nielsen M. Accurate pan-specific prediction of peptide-MHC class II binding affinity with improved binding core identification. Immunogenetics 67 (11-12) 641-650, November 2015.
95. Nielsen, M., Lund, O. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. BMC Bioinformatics 10:296, September 2009.
96. Nielsen, M., Lundegaard, C., Lund, O. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. BMC Bioinformatics 8:238, July 2007.
97. Zhang, J., et al. PEAKS DB:de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. Molecular & Cellular Proteomics. 11 (4) :1-8. 1/2/2012.
98. Jensen, Kamilla Kjaergaard, et al. "Improved Methods for Prediting Peptide Binding Affinity to MHC Class II Molecules." Immunology, 2018, doi:10.1111/imm.12889.
99. Carter, S. L., Cibulskis, K., Helman, E., McKenna, A., Shen, H., Zack, T., Laird, P. W., Onofrio, R. C., Winckler, W., Weir, B. A., et al. (2012). Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. Nat. Biotechnol. 30, 413-421
100. McGranahan, N., Rosenthal, R., Hiley, C. T., Rowan, A. J., Watkins, T. B. K., Wilson, G. A., Birkbak, N. J., Veeriah, S., Van Loo, P., Herrero, J., et al. (2017). Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution. Cell 171, 1259-1271. e11.
101. Shukla, S. A., Rooney, M. S., Rajasagi, M., Tiao, G., Dixon, P. M., Lawrence, M. S., Stevens, J., Lane, W. J., Dellagatta, J. L., Steelman, S., et al. (2015). Comprehensive analysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes. Nat. Biotechnol. 33, 1152-11

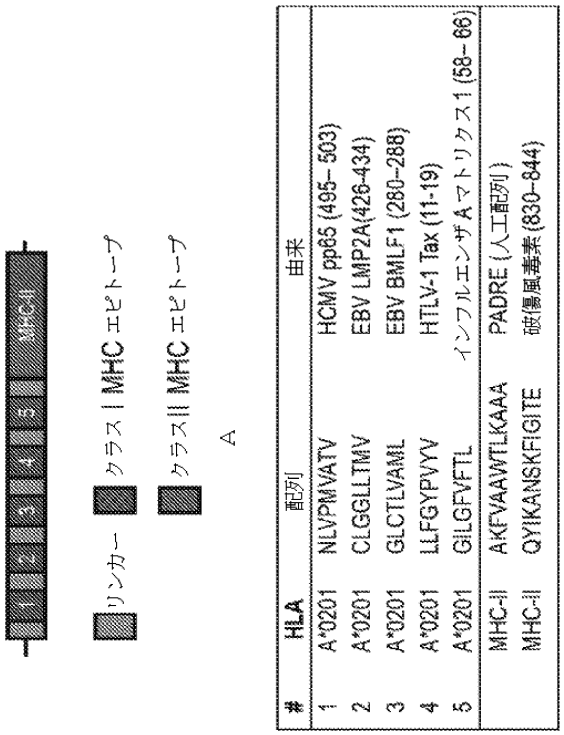
58.
102. Van Loo, P., Nordgard, S. H., Lingjarde, O. C., Russnes, H. G., Rye, I. H., Sun, W., Weigman, V. J., Marynen, P., Zetterberg, A., Naume, B., et al. (2010). Allele-specific copy number analysis of tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 16910-16915.
103. Van Loo, P., Nordgard, S. H., Lingjarde, O. C., Russnes, H. G., Rye, I. H., Sun, W., Weigman, V. J., Marynen, P., Zetterberg, A., Naume, B., et al. (2010). Allele-specific copy number analysis of tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 16910-16915.

【図面】

【図１】



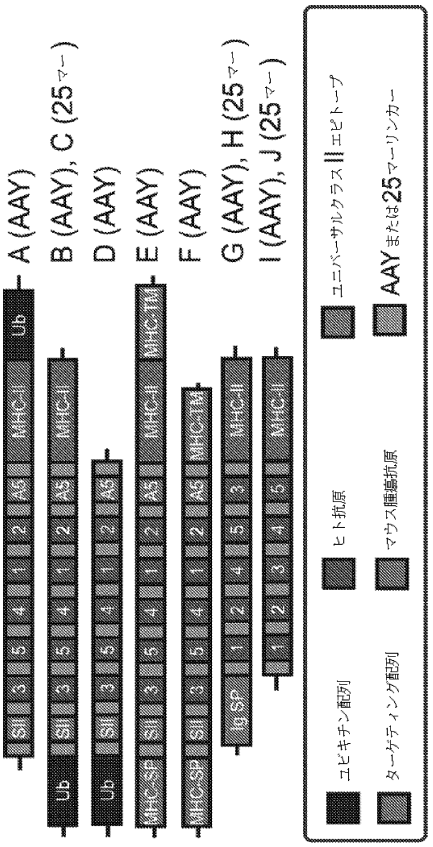
【図２】



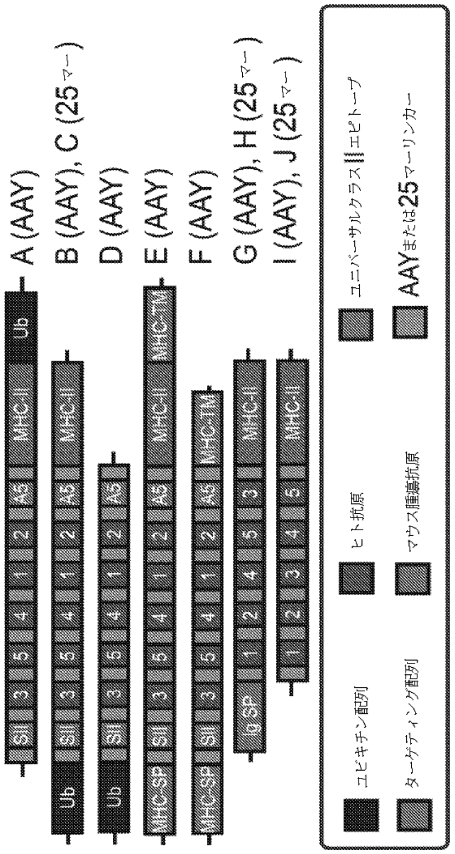
#	HLA	配列	由来
1	A*0201	NLVPMVATV	HCMV pp65 (495–503)
2	A*0201	CLGGLLTMV	EBV LMP2A(426-434)
3	A*0201	GLCTLVAML	EBV BMLF1 (280–288)
4	A*0201	LLFGYPVYV	HTLV-1 Tax (11-19)
5	A*0201	GILGFVFTL	インフルエンザＡマトリクス１(58– 66)
	MHC-II	AKFVAAWTLKAAA	PADRE (人工配列)
	MHC-II	QYIKANSKFIGITE	破傷風毒素(830–844)

B

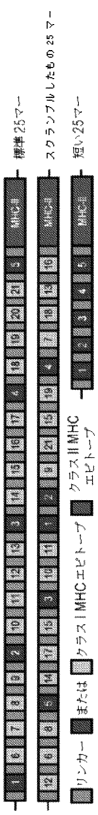
【図３】



【図４】



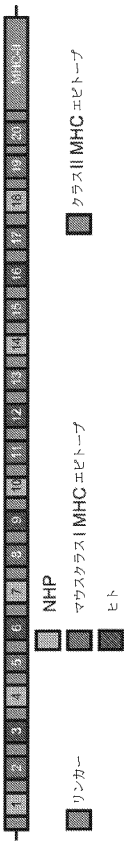
【図５Ａ】



【図５Ｂ】

#	HLA	配列	由来
1	A*02:01	NLVPMVATV	HCMV pp65 495-504
2	A*02:01	CLGGLLTMV	EBV LMP-2 426-434
3	A*02:01	GLCTLVAML	EBV BMLF-1 259-267
4	A*02:01	LLFGYPVYV	HTLV1 Tax 11-19
5	A*02:01	GILGFVFTL	インフルエンザA MP 58-66
6	A*02:01	DLMGYIPAV	HCVコア132-140
7	A*02:01	FLPSDFFPSV	HBVコア抗原18-27
8	A*02:01	FLLTRILTI	HBVエンベロープ183-191
9	A*02:01	WLSLLVPFV	HBV表面抗原172-181
10	A*02:01	FLLSLGIHL	HBVポリメラーゼ 573-581
11	A*02:01	ILKEPVHGV	HIV-1 RT 476-484
12	A*02:01	YMLDLQPETT	HPV 16 E7 11-20
13	A*02:01	CINGVCWTV	HCV NS3 1073-1081
14	A*02:01	YLLPRRGPRL	HCVコア35-44
15	A*02:01	FLYALALLL	EBV LMP-2 356-364
16	A*02:01	AAGIGILTV	MELAN-A/MART-1 (27-35)
17	A*02:01	SLLMWITQV	NY-ESO-1(157-165) C9V
18	A*03:01	KLGGALQAK	CVM-IE1
19	A*03:01	RLRAEAQVK	EBV-EBNA-3a
20	B*44:05	EENLLDFVRF	EBV EBNASC (281-290)
21	B*44:05	EEYLQAFTY	自己ABCD3タンパク質

【図６Ａ】



【図６Ｂ】

マウス **MHC-I** エピトープ

	MHC	配列
2	H-2Kb	SIINFEKL
5	H-2Ld	SPSYAYHQF
8	H-2Db	EGPRNQDWL
11	H-2Kb	DWENVSPEL
13	H-2Kb	SIIVFNLL
15	H-2Db	ASMTNMELM
17	H-2Db	AQLANDVVL
19	H-2Kb	SVYDFFVWL
20	H-2Ld	MNKYAYHML

ユニバーサル **MHC-II** エピトープ

	HLA	配列
1	MHC-II	AKFVAAWTLKAAA
2	MHC-II	QYIKANSKFIGITEL

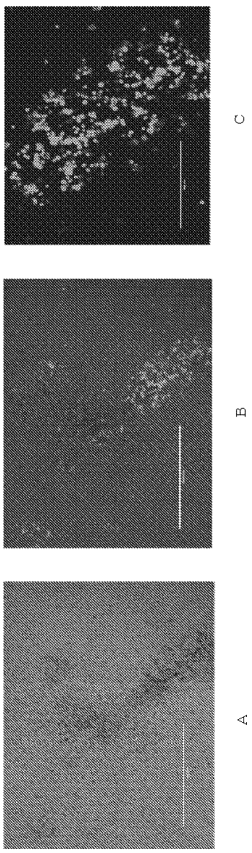
NHP エピトープ

	MHC	配列
1	Mamu*01	CTPYDINQM
4	Mamu*01	TTPESANL
7	Mamu*01	CAPPGYALL
10	Mamu*01	SGPKTNIIV
14	Mamu*01	LSPRTLNAW
18	Mamu*01	TVPWPNASL

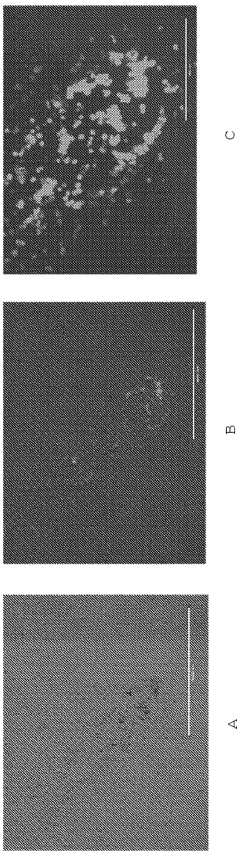
ヒトエピトープ

	HLA	配列
3	A*02:01	GILGFVFTL
6	A*02:01	LLFGYPVYV
9	A*02:01	GLCTLVAML
12	A*02:01	NLVPMVATV
16	A*02:01	CLGGLLTMV

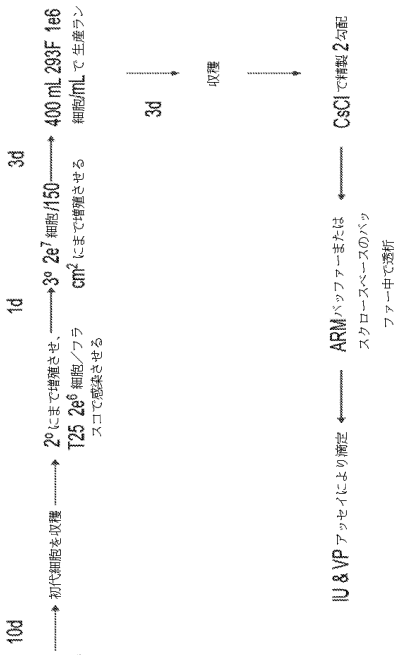
【図７】



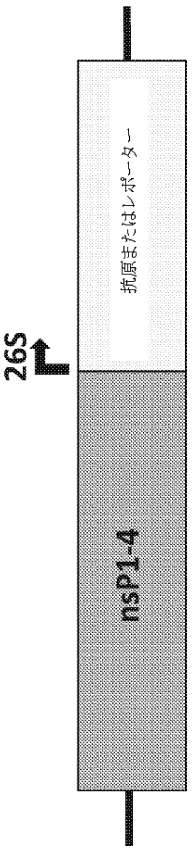
【図８】



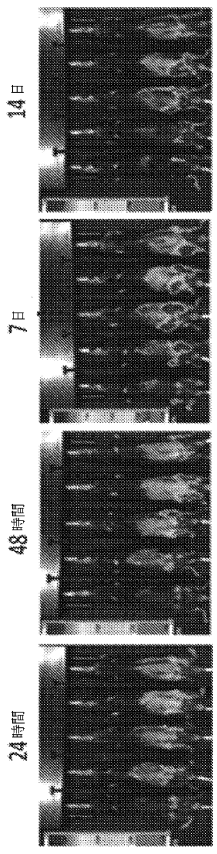
【図９】



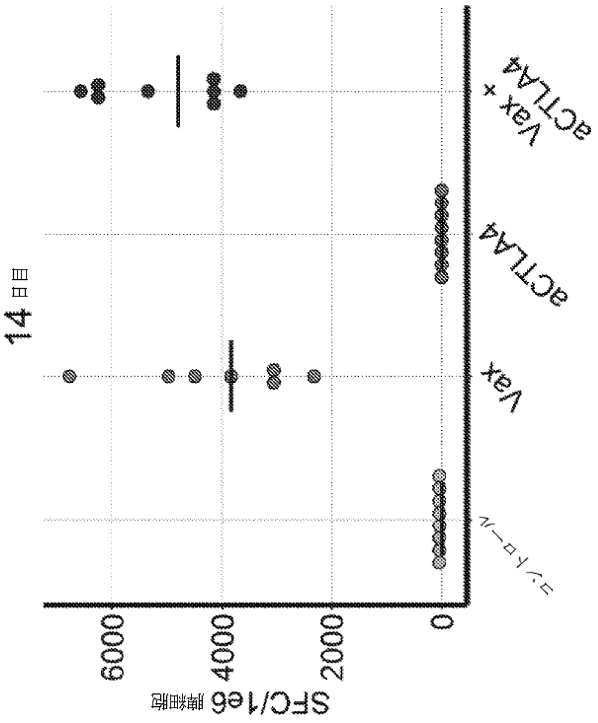
【図１０】



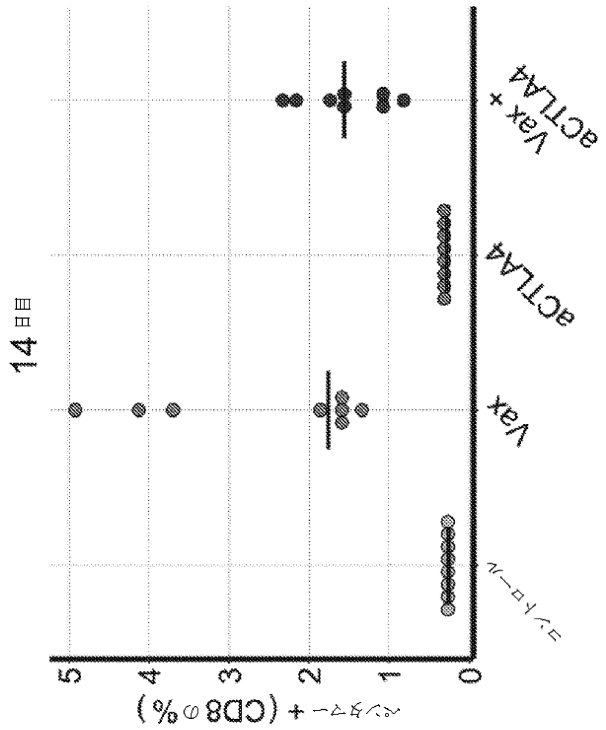
【図１１】



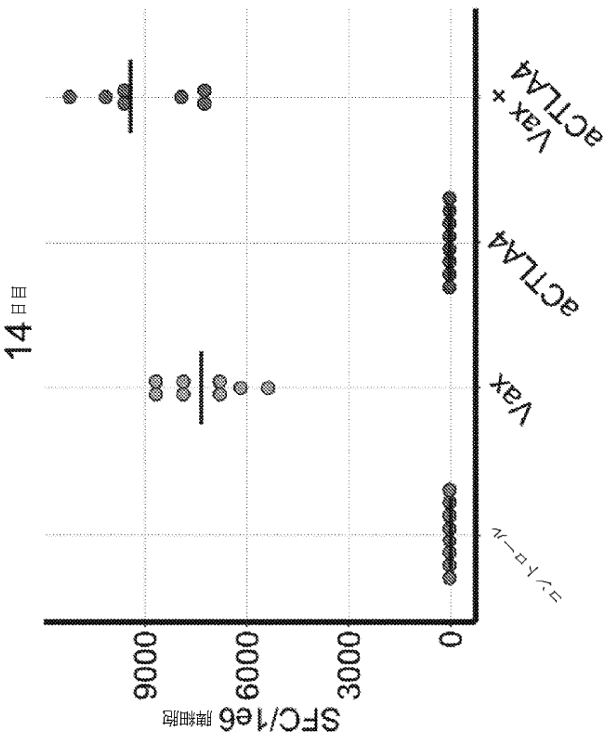
【図１２Ａ】



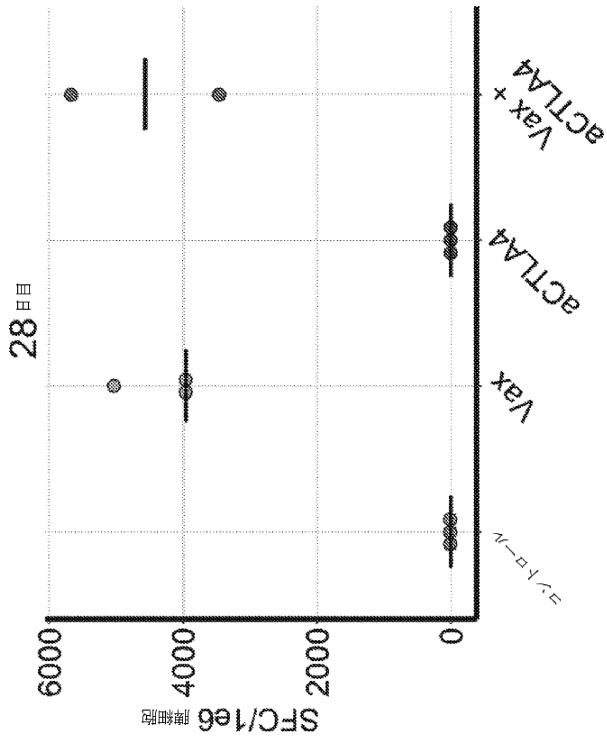
【図１２Ｂ】



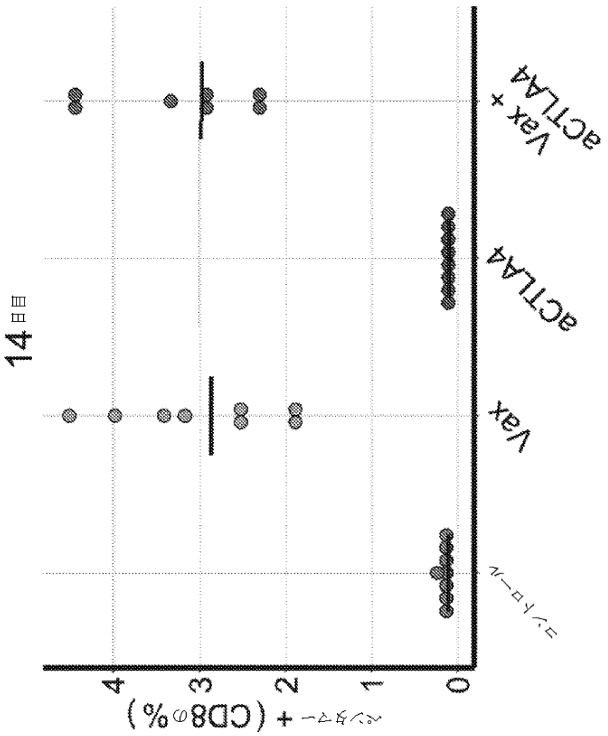
【図１３Ａ】



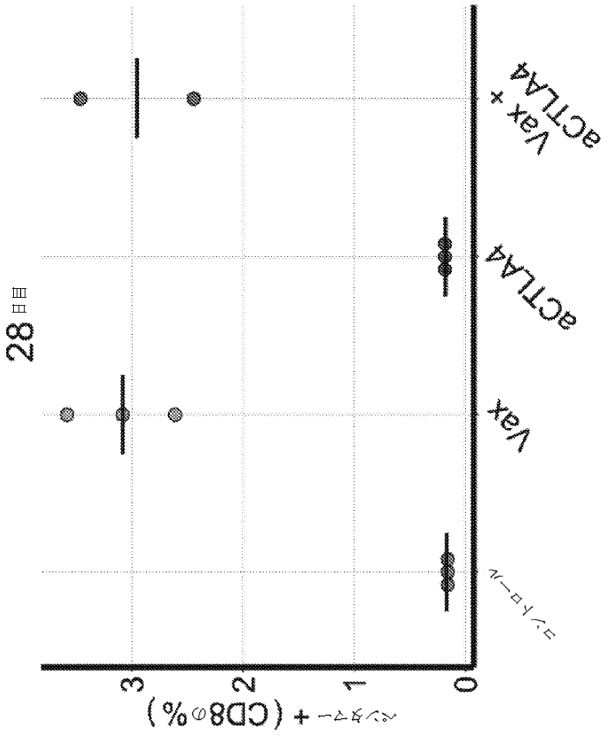
【図１３Ｂ】



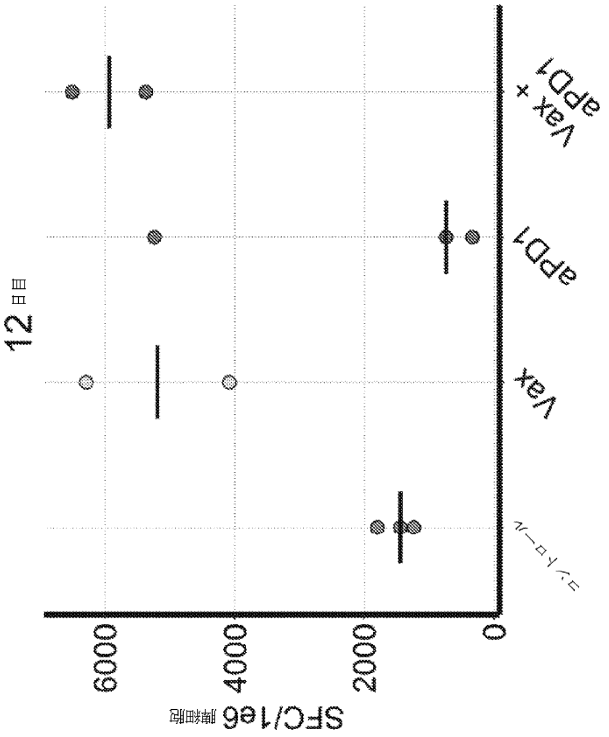
【図１３Ｃ】



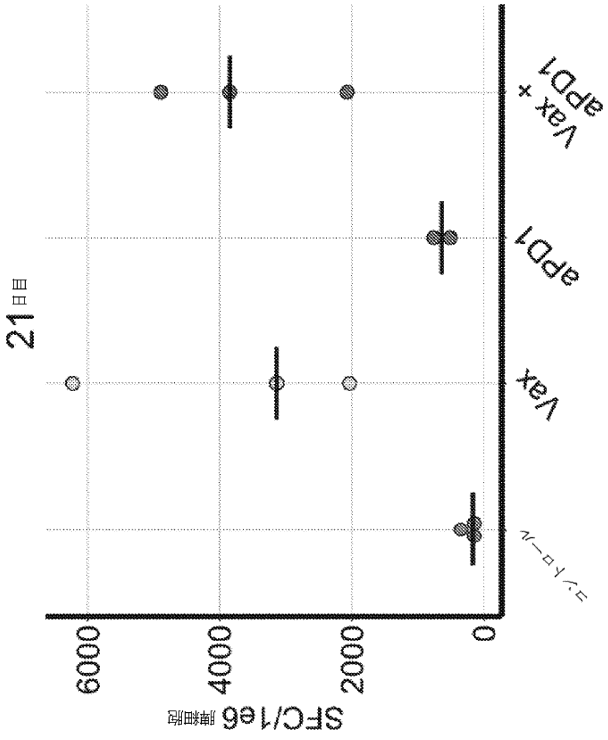
【図１３Ｄ】



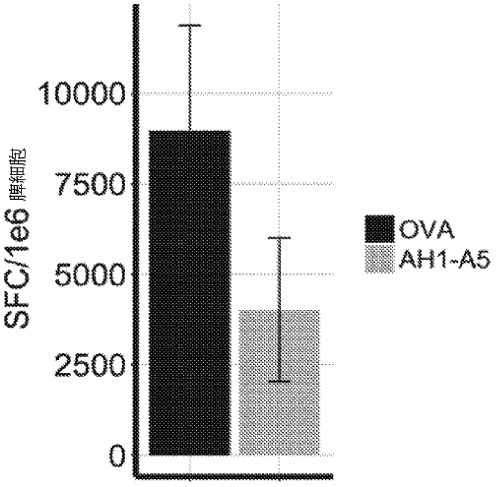
【図１４Ａ】



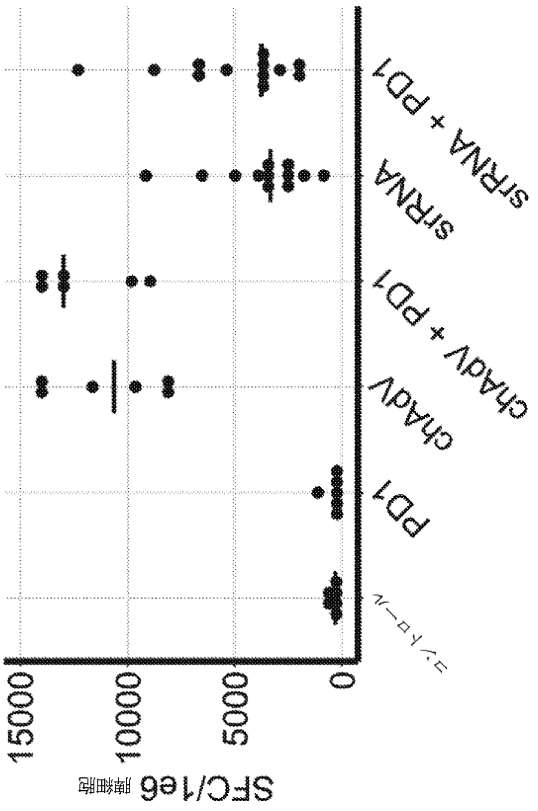
【図１４Ｂ】



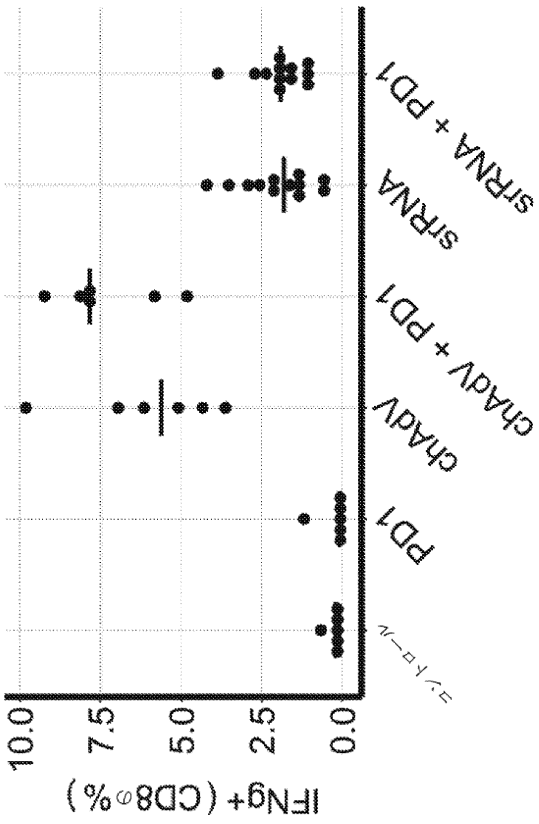
【図１５】



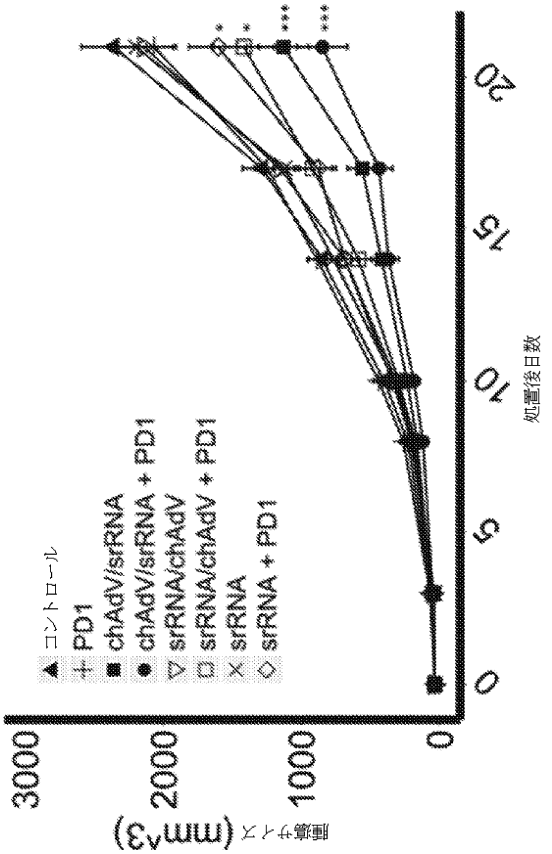
【図１６】



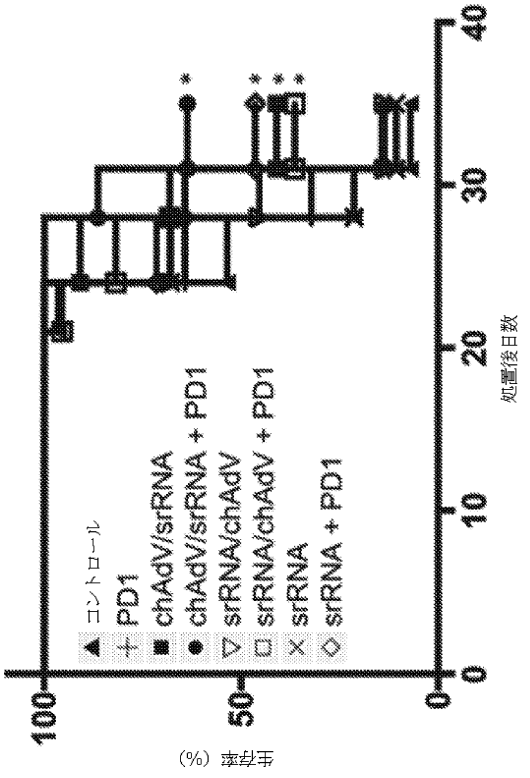
【図１７】



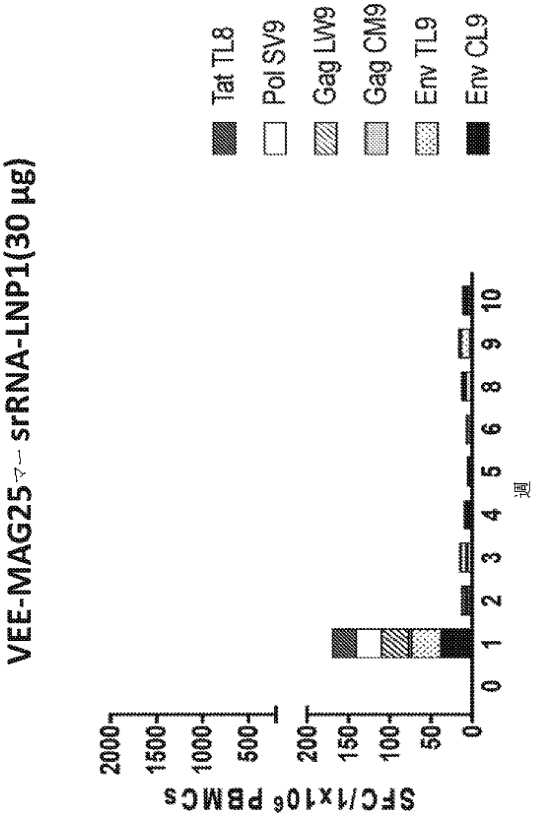
【図１８】



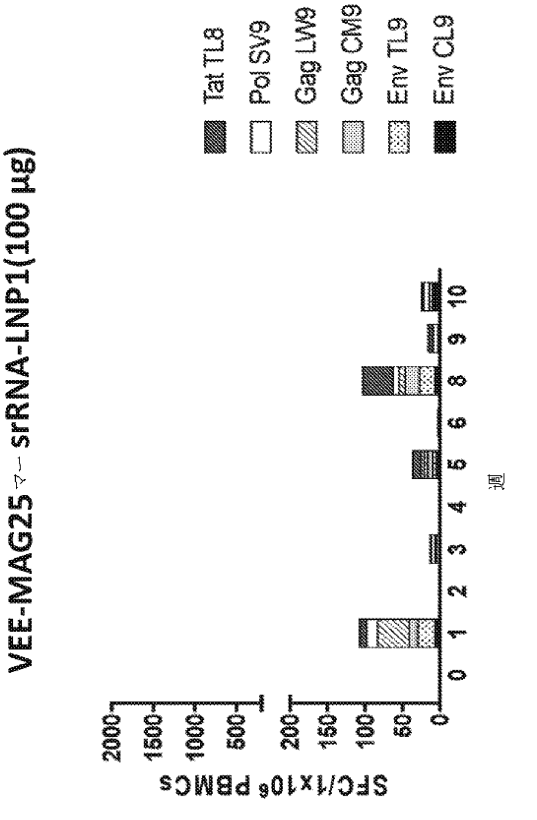
【図１９】



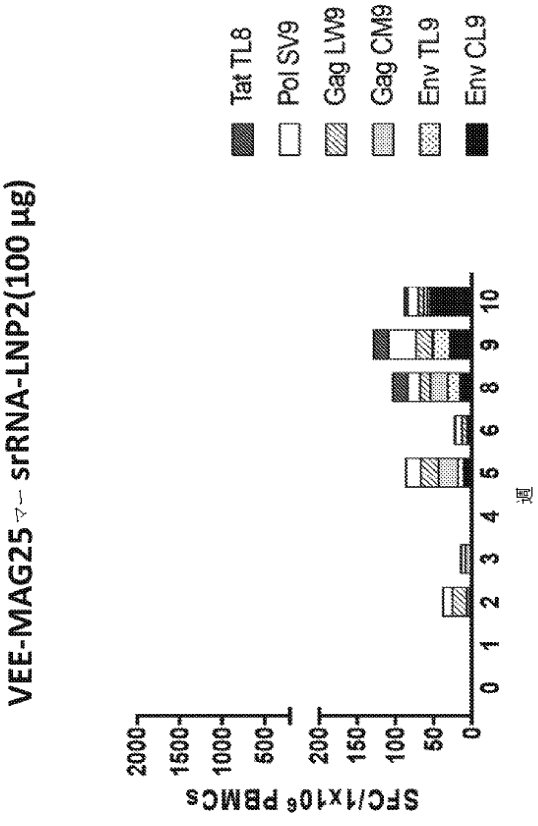
【図２０Ａ】



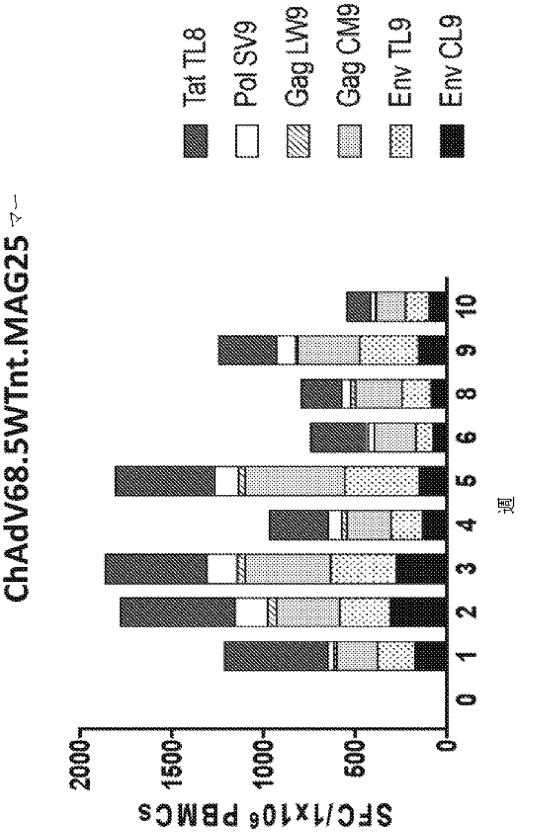
【図２０Ｂ】



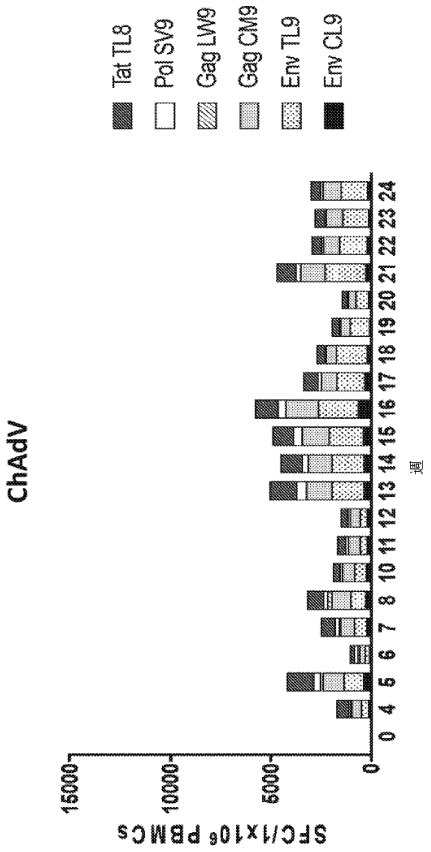
【図２０Ｃ】



【図２０Ｄ】



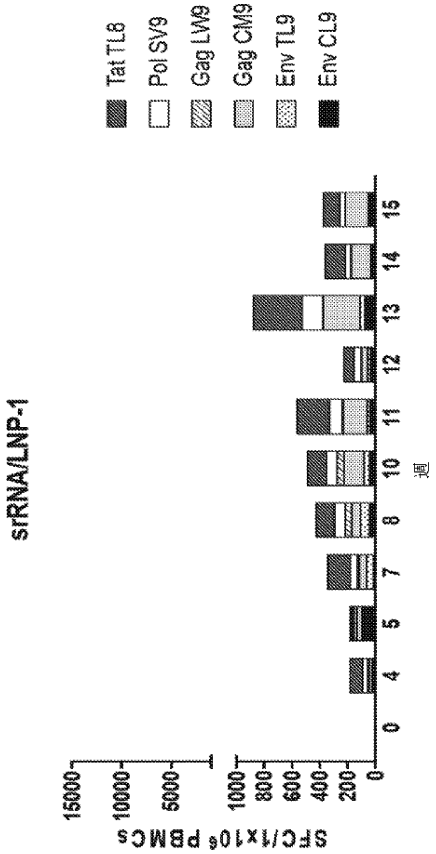
【図２１】



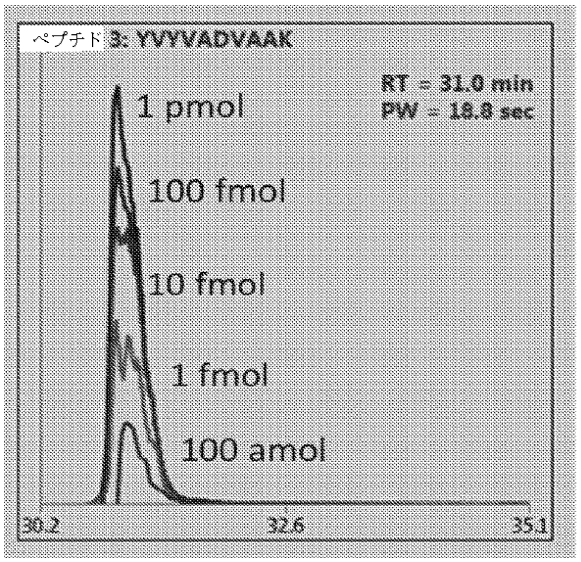
【図２２】



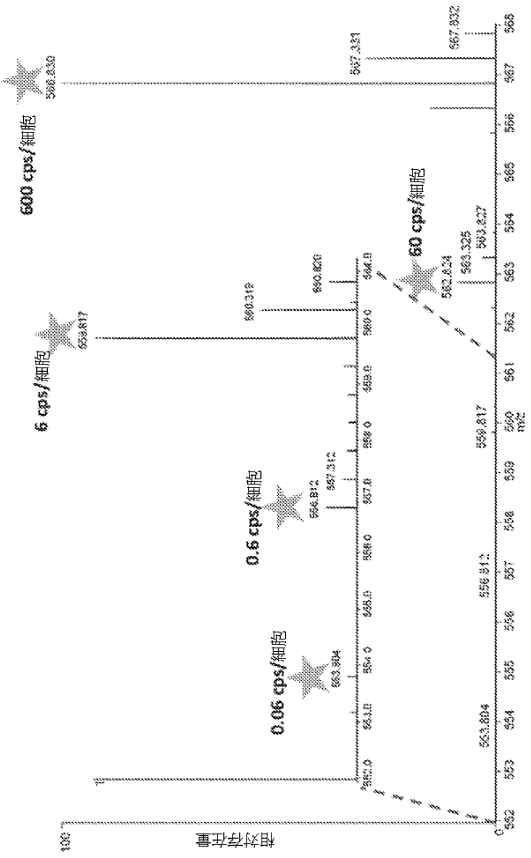
【図２３】



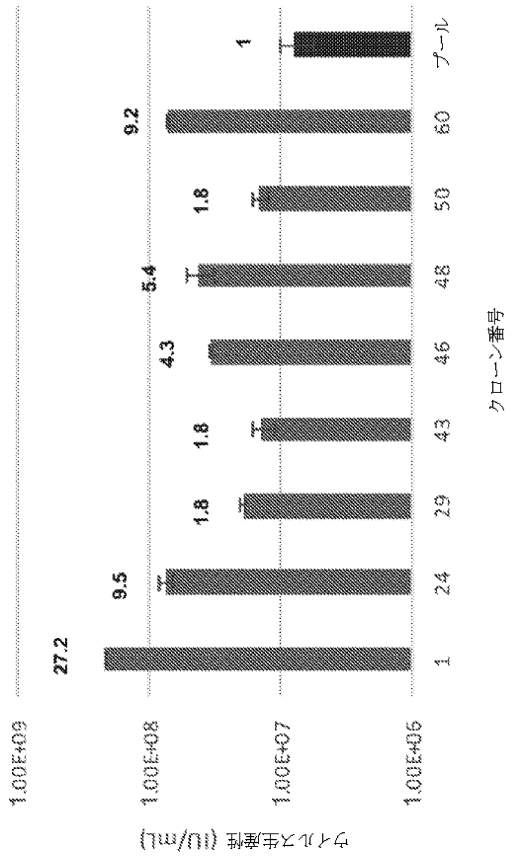
【図２４Ａ】



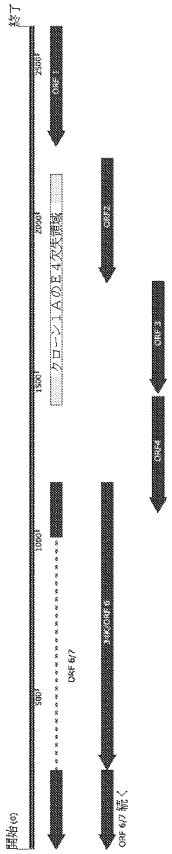
【図２４Ｂ】



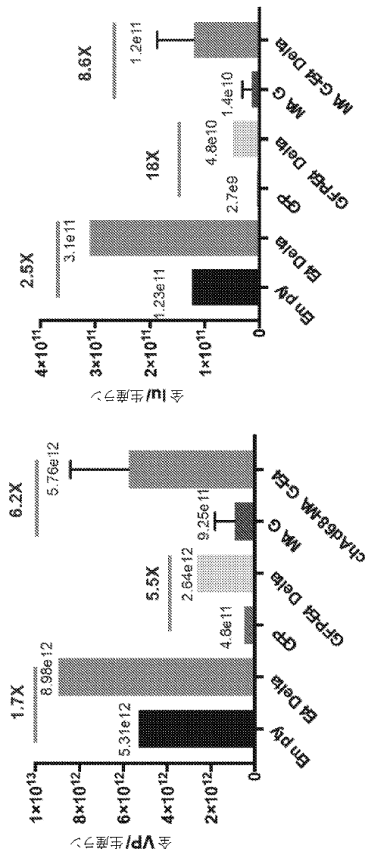
【図２５】



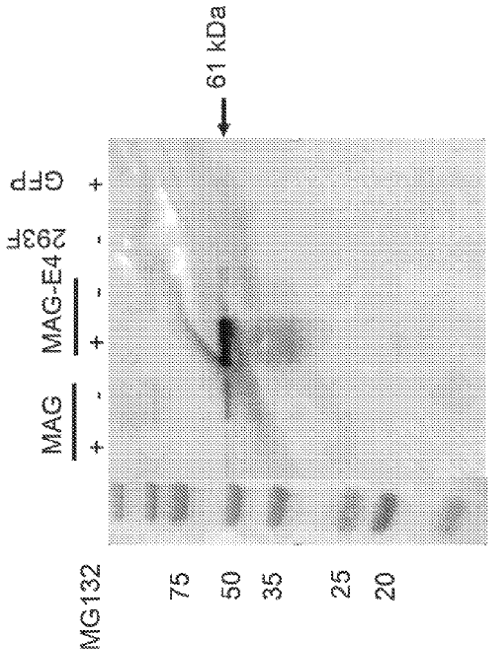
【図２６】



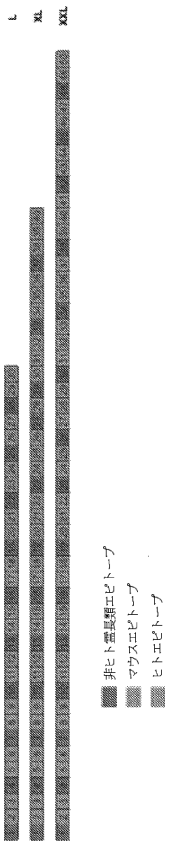
【図２７】



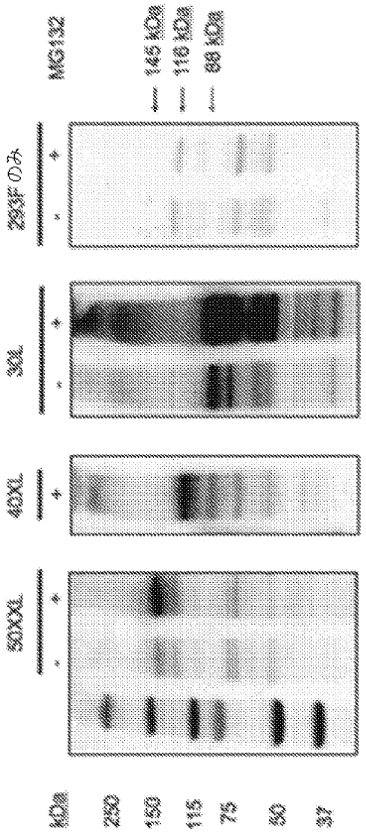
【図２８】



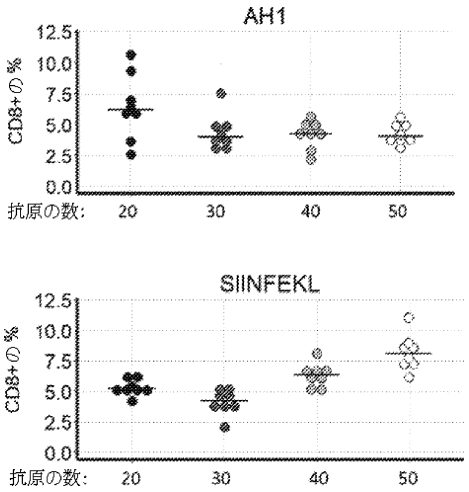
【図２９】



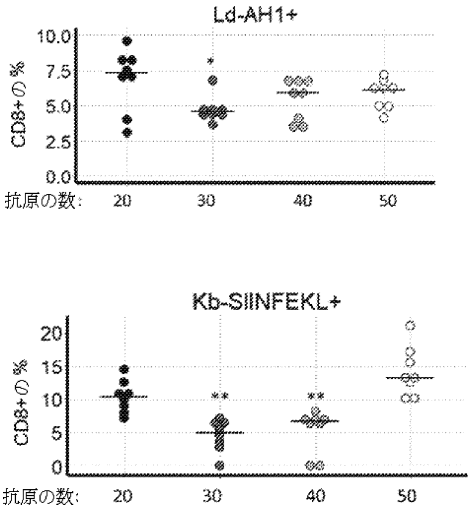
【図３０】



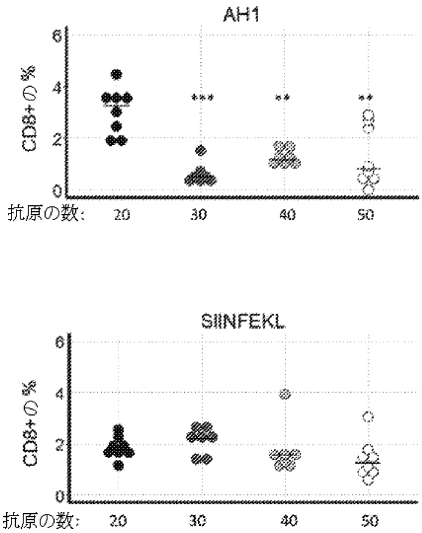
【図３１】



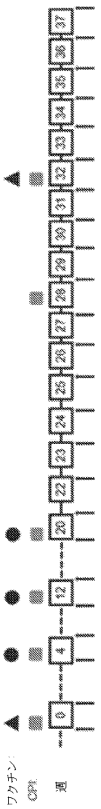
【図３２】



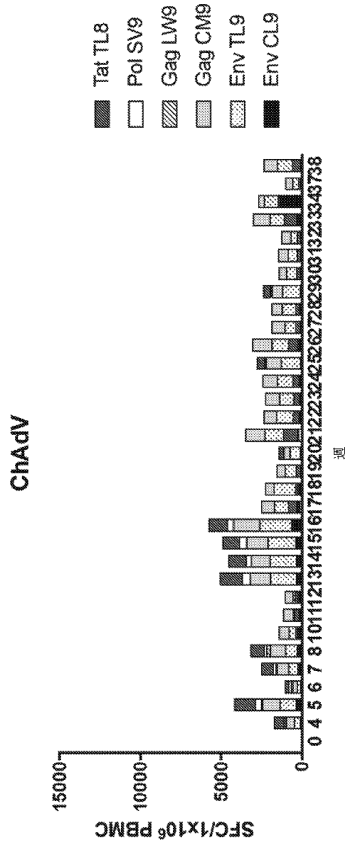
【図３３】



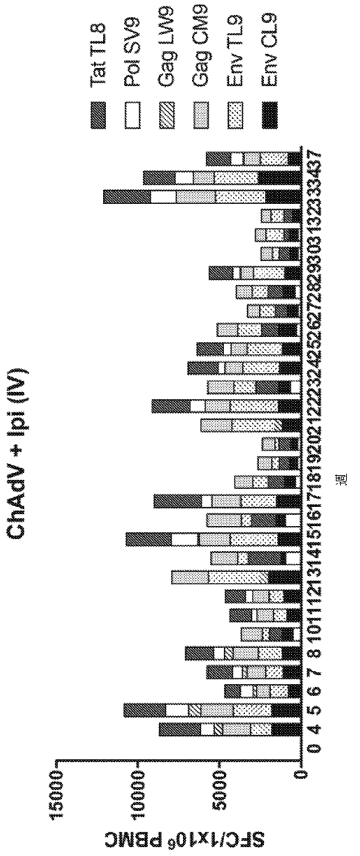
【図３４】



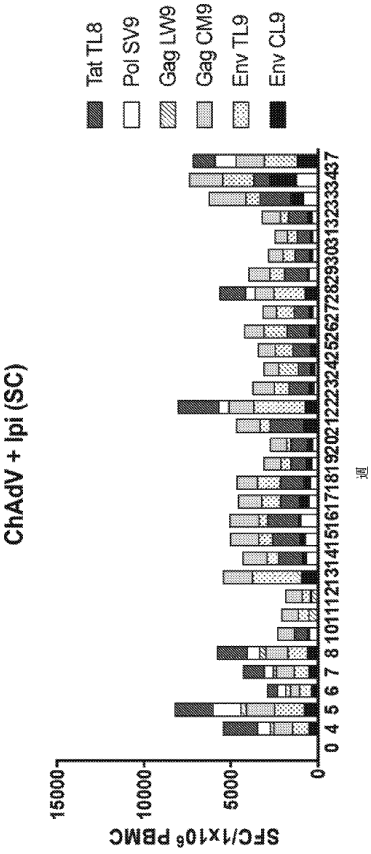
【図３５】



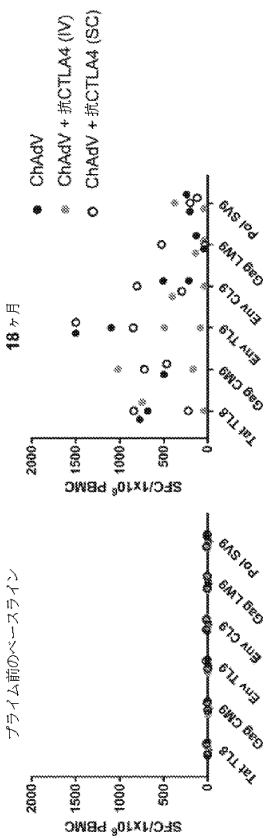
【図３６】



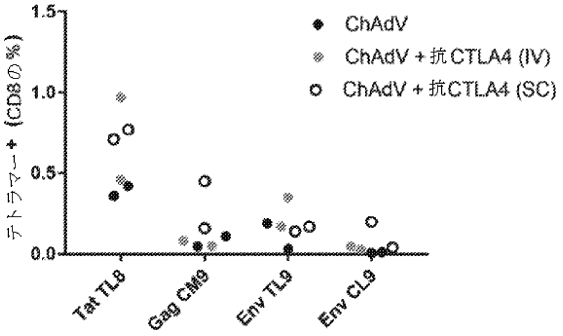
【図３７】



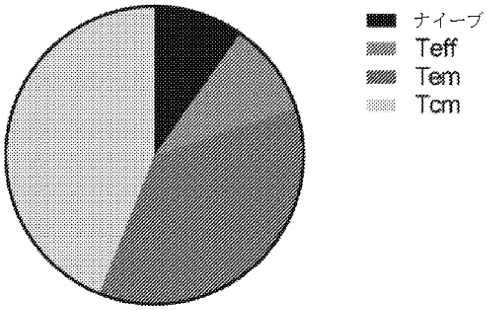
【図３８】



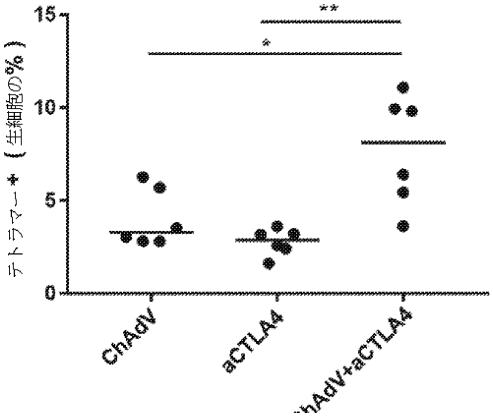
【図３９】



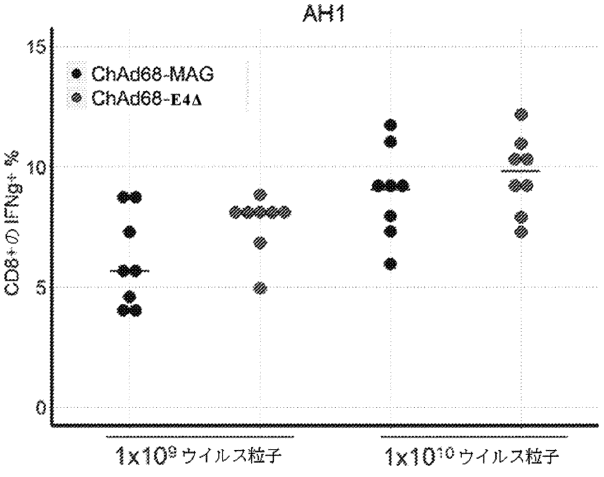
【図４０】



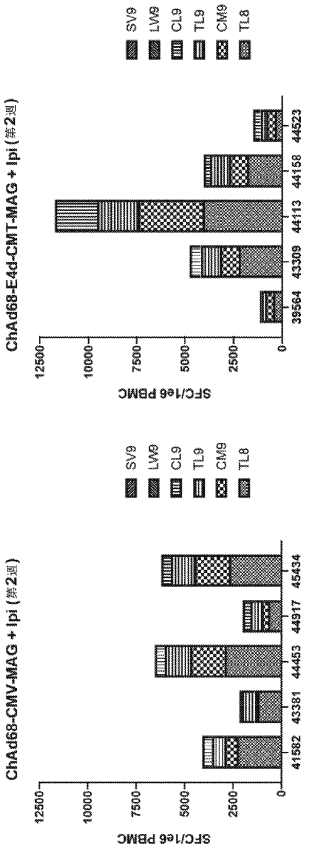
【図４１】



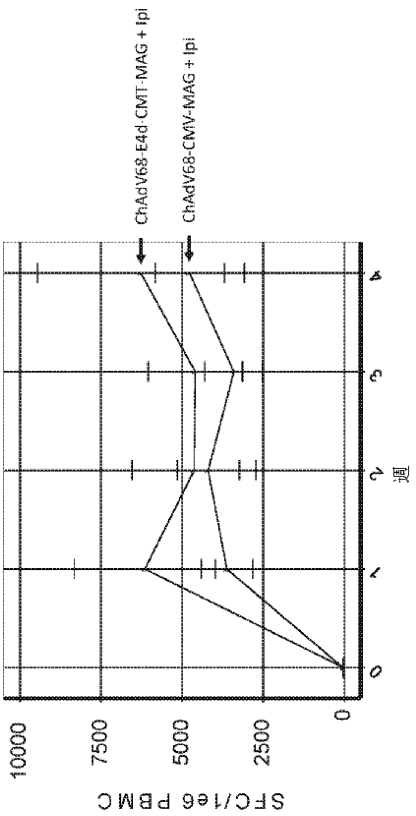
【図４２Ａ】



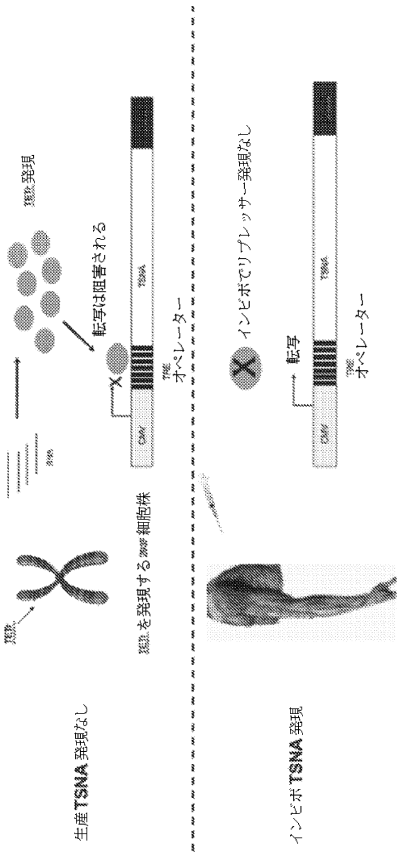
【図４２Ｂ】



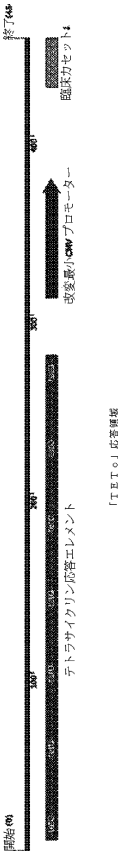
【図４２Ｃ】



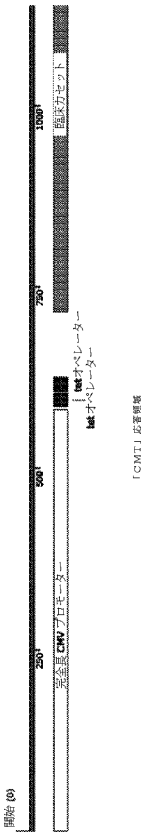
【図４３】



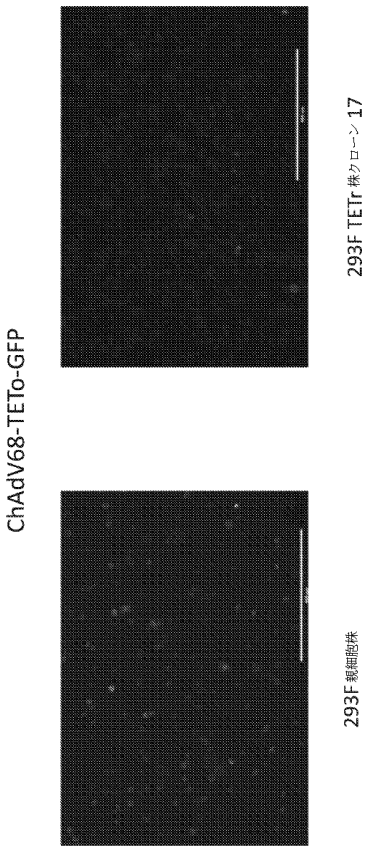
【図４４Ａ】



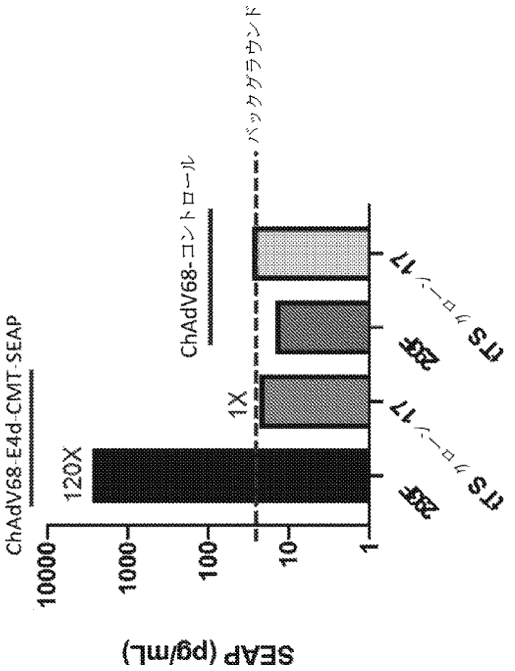
【図４４Ｂ】



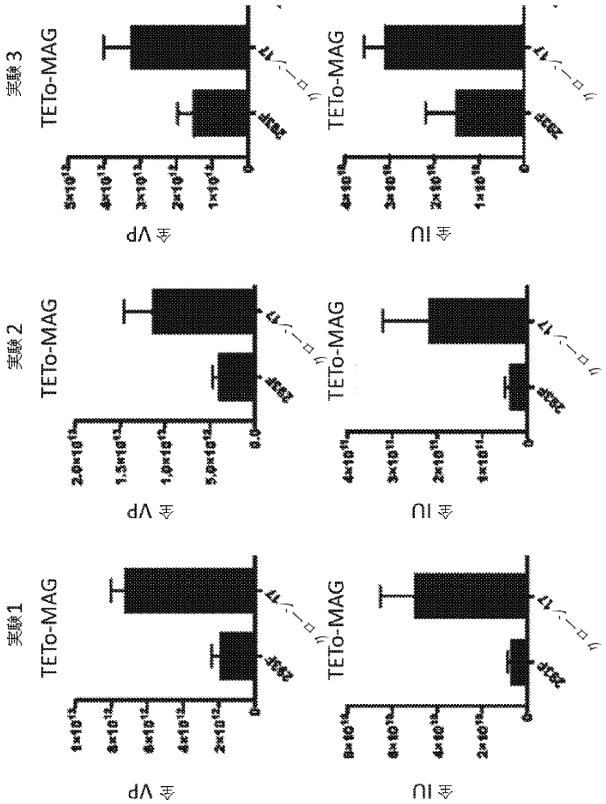
【図４５Ａ】



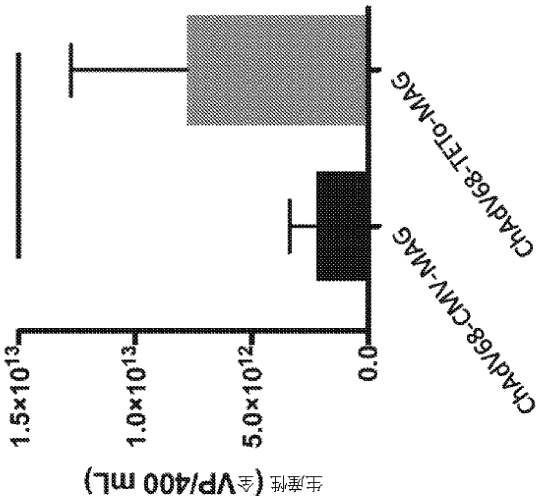
【図４５Ｂ】



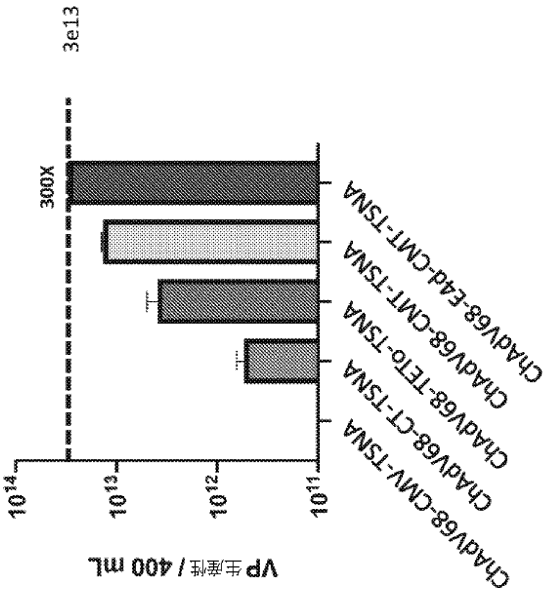
【図４６】



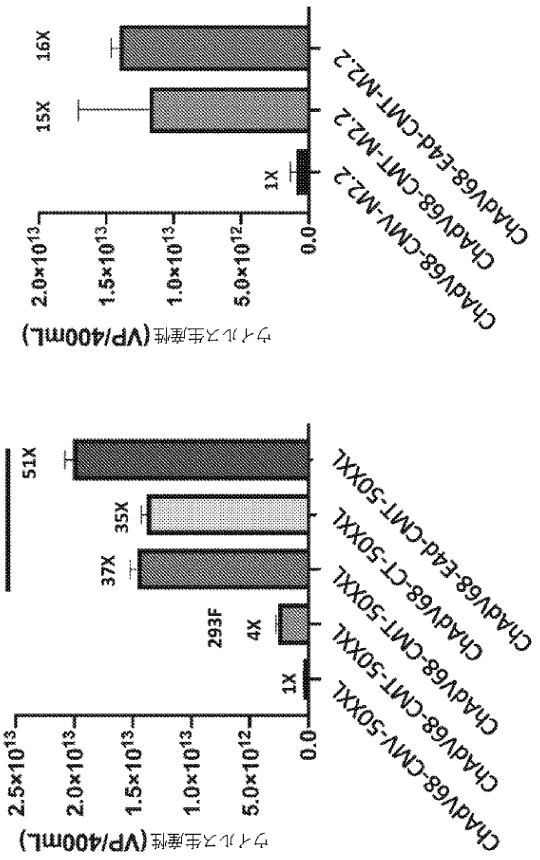
【図４７Ａ】



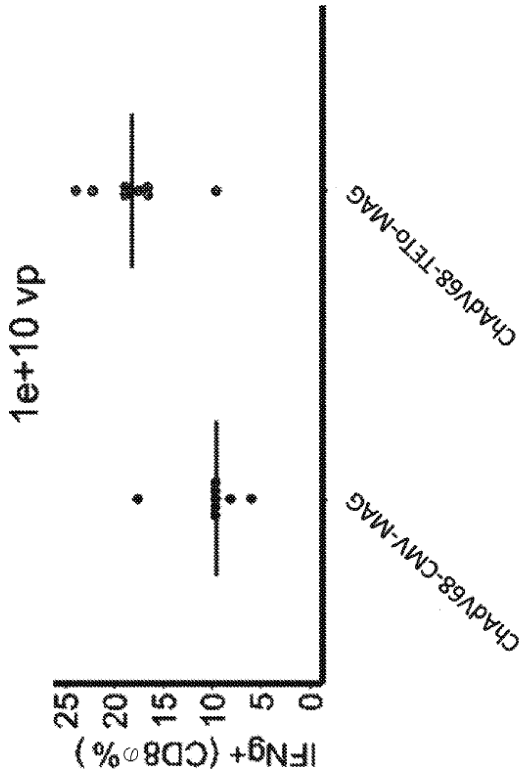
【図４７Ｂ】



【図４７Ｃ】



【図４８】



【配列表】
0007457733000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
A61P 31/04 (2006.01)		A61P	31/04	
A61P 31/10 (2006.01)		A61P	31/10	
A61P 31/12 (2006.01)		A61P	31/12	
A61P 33/00 (2006.01)		A61P	33/00	
A61P 43/00 (2006.01)		A61P	43/00	121

弁理士　佐藤 利光
(74)代理人　100128048
弁理士　新見 浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林 智彦
(74)代理人　100205707
弁理士　小寺 秀紀
(74)代理人　100114340
弁理士　大関 雅人
(74)代理人　100121072
弁理士　川本 和弥
(72)発明者　ヨース カリン
アメリカ合衆国 94608 カリフォルニア州 エメリービル ホートン ストリート 5959 スイート 300 グリットストーン バイオ インコーポレイテッド内
(72)発明者　スカラン シアラン ダニエル
アメリカ合衆国 94608 カリフォルニア州 エメリービル ホートン ストリート 5959 スイート 300 グリットストーン バイオ インコーポレイテッド内
(72)発明者　ギトリン レオニド
アメリカ合衆国 94608 カリフォルニア州 エメリービル ホートン ストリート 5959 スイート 300 グリットストーン バイオ インコーポレイテッド内

審査官　藤澤 雅樹

(56)参考文献
特表2012-516679（JP，A）
特開2000-106875（JP，A）
特開2002-199894（JP，A）
特表2013-537426（JP，A）
特表2015-536147（JP，A）
国際公開第2018/104919（WO，A1）
国際公開第2018/098362（WO，A1）
国際公開第2017/221031（WO，A1）
J. Virol.，1996年，Vol.70, No.12，pp.8934-8943
Journal of General Virology，1997年，Vol.78，pp.2131-2138
FARINA, S.F., et al.，Definition: Simian adenovirus 25, complete genome，Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. AF394196，2001年11月27日，〈http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF394196.1〉，[検索日 2023.6.21]

(58)調査した分野　(Int.Cl.，DB名)
C12N 15/00
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS（STN）
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580（JDreamIII）
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq