República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

* B R 1 2 2 0 2 4 0 0 2 3 8 7 A 2 *

(21) BR 122024002387-3 A2

(22) Data do Depósito: 01/06/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 26/04/2022

(54) Título: VETORES DE ADENOVÍRUS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO ISOLADA, CÉLULA ISOLADA, VETOR, KIT, USOS DE UM VETOR, MÉTODO PARA FABRICAR O VETOR, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM VÍRUS E VETOR VIRAL

(51) Int. Cl.: A61K 35/76; A61K 35/761; A61K 39/235; A61K 48/00; C07K 14/075; (...).

(30) Prioridade Unionista: 30/05/2019 US 62/854,865.

(71) Depositante(es): GRITSTONE BIO, INC..

(72) Inventor(es): KARIN JOOSS; CIARAN DANIEL SCALLAN; LEONID GITLIN.

(86) Pedido PCT: PCT US2020035591 de 01/06/2020

(87) Publicação PCT: WO 2020/243719 de 03/12/2020

(85) Data da Fase Nacional: 05/02/2024

(62) Pedido original do dividido: BR112021024127-2 - 01/06/2020

(57) Resumo: VETORES DE ADENOVÍRUS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO ISOLADA, CÉLULA ISOLADA, VETOR, KIT, USOS DE UM VETOR, MÉTODO PARA FABRICAR O VETOR, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM VÍRUS E VETOR VIRAL. São divulgadas aqui composições que incluem adenovírus modificados. Também são divulgados nucleotídeos, células e métodos associados às composições, incluindo seu uso como vacinas. Também são divulgados aqui vetores virais usando o sistema de promotor TET e métodos para produzir vírus tendo os mesmos.

VETORES DE ADENOVÍRUS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO ISOLADA, CÉLULA ISOLADA, VETOR, KIT, USOS DE UM VETOR, MÉTODO PARA FABRICAR O VETOR, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM VÍRUS E VETOR VIRAL

(DIVIDIDO DO BR 11 2021 024127 2, DEPOSITADO EM 01/06/2020)

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório U.S. No. 62/854.865 depositado em 30 de maio de 2019, que está incorporado por meio deste por referência em sua totalidade para todos os fins.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[002] O presente pedido contém uma Listagem de sequências, que foi submetida eletronicamente no formato ASCII e está incorporada por meio deste a título de referência em sua totalidade. A dita cópia em ASCII, criada em 30 de maio de 2019, é chamada GSO_033PR_Sequence_Listing.txt e tem 422.136 bytes de tamanho.

FUNDAMENTOS

[003] As vacinas terapêuticas baseadas em antígenos específicos de tumor são uma grande promessa como uma próxima geração de imunoterapia personalizada contra o câncer. [1-3] Por exemplo, cânceres com alta carga mutacional, como câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) e melanoma, são alvos particularmente atraentes dessa terapia, dada a probabilidade relativamente maior de geração de neoantígenos. [4,5] Evidências iniciais mostram que a vacinação baseada em neoantígenos pode gerar respostas de células T [6] e que a terapia com células direcionadas a neoantígenos pode causar regressão tumoral em certas circunstâncias em

pacientes selecionados.[7]

[004] Uma questão para o projeto de vacinas de antígenos em cenários de câncer e doenças infecciosas é qual das muitas mutações codificantes presentes gera os "melhores" antígenos terapêuticos, por exemplo, antígenos que podem gerar imunidade.

[005] Além dos desafios dos métodos atuais de predição de antígeno, certos desafios também existem com os sistemas de vetor disponíveis que podem ser usados para a entrega de antígeno em humanos, muitos dos quais são derivados de humanos. Por exemplo, muitos humanos têm imunidade pré-existente a vírus humanos como resultado de exposição natural anterior, e essa imunidade pode ser um grande obstáculo para o uso de vírus humanos recombinantes para entrega de antígeno em estratégias de vacinação, como no tratamento do câncer ou vacinação contra doenças infecciosas. Embora algum progresso tenha sido feito nas estratégias de vacinação que tratam dos problemas acima, melhorias ainda são necessárias, particularmente para aplicações clínicas, como a potência e eficácia da vacina melhorada.

SUMÁRIO

[006] Um vetor de adenovírus compreendendo: uma estrutura adenoviral compreendendo um ou mais genes ou sequências regulatórias de um genoma de adenovírus, e em que a estrutura adenoviral compreende um gene E4 parcialmente deletado com referência ao genoma de adenovírus, em que o gene E4 parcialmente deletado compreende uma região E4orf2 deletada ou parcialmente deletada e uma região E4orf3 deletada ou parcialmente deletada e, opcionalmente, uma região E4orf4 deletada ou parcialmente deletada e,

opcionalmente, em que o vetor de adenovírus compreende ainda um cassete, o cassete compreendendo: (1) pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, opcionalmente em que a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil codifica um polipeptídeo, opcionalmente em que o polipeptídeo compreende um antígeno, opcionalmente em que o antígeno compreende: um epítopo de MHC de classe I, um epítopo de MHC de classe II, um epítopo capaz de estimular uma resposta de célula B, ou uma combinação dos mesmos, e opcionalmente em que a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil compreende ainda uma sequência de ligante 5' e/ou uma sequência de ligante 3', e opcionalmente em que; (2) pelo menos uma sequência promotora operacionalmente ligada a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, (3) opcionalmente, pelo menos uma sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno de MHC de classe II universal; (4) opcionalmente, pelo menos uma sequência de ligante que codifica GPGPG (SEQ ID NO: 56); e (5) opcionalmente, pelo menos uma sequência de poliadenilação.

[007] Também é divulgado aqui um vetor de adenovírus de chimpanzé compreendendo uma sequência ChAdV68 modificada, em que a sequência ChAdV68 modificada compreende: (a) um gene E4 parcialmente deletado da sequência do gene E4 mostrada na SEQ ID NO: 1 e que carece de pelo menos os nucleotídeos 34.916 a 35.642 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1; e (b) um ou mais genes ou sequências regulatórias da sequência ChAdV68 mostrada na SEQ ID NO: 1, opcionalmente em que um ou mais genes ou sequências regulatórias compreendem pelo menos uma das repetições terminais invertidas de

adenovírus de chimpanzé (ITR), genes E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 e L5 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1; e opcionalmente, em que o vetor de adenovírus de chimpanzé compreende ainda um cassete, em que o cassete compreende pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil e em que o cassete compreende pelo menos uma sequência promotora operacionalmente ligada a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil.

[008] Também é divulgado aqui um vetor de adenovírus de chimpanzé compreendendo uma sequência ChAdV68 modificada, em que a sequência ChAdV68 modificada compreende: (a) um gene E4 parcialmente deletado da sequência do gene E4 mostrada na SEQ ID NO: 1 e que carece de pelo menos os nucleotídeos 34.916 a 35.642 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1; (b) nucleotídeos 2 a 34.916 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, em que o gene E4 parcialmente deletado é 3' dos nucleotídeos 2 a 34.916, e opcionalmente os nucleotídeos 2 a 34.916 também não possuem nucleotídeos 577 a 3.403 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção E1 e/ou sem os nucleotídeos 27.125 a 31.825 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção E3; e (c) nucleotídeos 35.643 a 36.518 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, e em que o gene E4 parcialmente deletado é 5' dos nucleotídeos 35.643 a 36.518 e, opcionalmente, em que o vetor de adenovírus de chimpanzé compreende ainda um cassete, em que o cassete compreende pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil e em que o cassete compreende pelo menos uma sequência promotora operacionalmente ligada a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil.

[009] Também é divulgado aqui um vetor de adenovírus de chimpanzé que compreende: a. uma sequência ChAdV68 modificada, em que a sequência ChAdV68 modificada compreende: (i) um gene E4 parcialmente deletado da sequência do gene E4 mostrada na SEQ ID NO: 1 e que carece de pelo menos os nucleotídeos 34.916 a 35.642 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1; (ii) nucleotídeos 2 a 34.916 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, em que o gene E4 parcialmente deletado é 3' dos nucleotídeos 2 a 34.916, e opcionalmente os nucleotídeos 2 a 34.916 adicionalmente não possuem nucleotídeos 577 a 3.403 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção E1 e/ou sem os nucleotídeos 27.125 a 31.825 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção E3; e (iii) e nucleotídeos 35.643 a 36.518 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, e em que o gene E4 parcialmente deletado é 5' dos nucleotídeos 35.643 a 36.518, e; b. uma sequência promotora derivada de CMV; c. uma sequência de nucleotídeos de sinal de poliadenilação de SV40; e d. um cassete, o cassete compreendendo pelo menos uma, pelo menos, uma sequência de ácido nucleico de carga útil que codifica: pelo menos um epítopo de MHC de classe I, opcionalmente em que o pelo menos um epítopo de MHC de classe I compreende pelo menos 2 epítopos de MHC de classe I distintos linearmente ligados entre si e cada um compreendendo opcionalmente: (A) pelo menos uma alteração que torna a sequência de peptídeo codificada distinta da sequência de peptídeo correspondente codificada por uma sequência de ácido nucleico de tipo selvagem, em que o epítopo de MHC I distinto tem 7-15 aminoácidos de comprimento, (B) um ligante N-terminal

compreendendo uma sequência de aminoácidos N-terminal nativa do epítopo de MHC I distinto que tem pelo menos 3 aminoácidos de comprimento, (C) um ligante C-terminal compreendendo uma sequência de ácido C-terminal nativa do epítopo de MHC I distinto que tem pelo menos 3 aminoácidos de comprimento, ou (D) combinações dos mesmos, pelo menos um epítopo de MHC de classe II, opcionalmente em que pelo menos um epítopo de MHC de classe II compreende pelo menos 2 epítopos de MHC de classe II distintos, em pelo menos um epítopo capaz de estimular uma resposta de células B, ou combinações dos mesmos, e em que o cassete é inserido dentro de uma região deletada de ChAdV68 e a sequência promotora derivada de CMV está operacionalmente ligada ao cassete.

[010] Também é divulgado aqui um método para estimular uma resposta imune em um sujeito, o método compreendendo administrar ao sujeito um vetor de adenovírus compreendendo: uma estrutura adenoviral compreendendo um ou mais genes ou sequências regulatórias de um genoma de adenovírus, e em que a estrutura adenoviral compreende um gene E4 parcialmente deletado com referência ao genoma de adenovírus, em que o gene E4 parcialmente deletado compreende uma região E4orf2 deletada ou parcialmente deletada e uma região E4orf3 deletada ou parcialmente deletada e, opcionalmente, uma região E4orf4 deletada ou parcialmente deletada e, em que o vetor de adenovírus compreende ainda um cassete, o cassete compreendendo: (1) pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, opcionalmente em que a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil codifica um polipeptídeo, opcionalmente em que o polipeptídeo compreende um antígeno, opcionalmente em que o antígeno compreende: um

epítopo de MHC de classe I, um epítopo de MHC de classe II, um epítopo capaz de estimular uma resposta de célula B, ou uma combinação dos mesmos, e opcionalmente em que a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil compreende ainda uma sequência de ligante 5' e/ou uma sequência de ligante 3', e opcionalmente em que; (2) pelo menos uma sequência promotora operacionalmente ligada a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, (3) opcionalmente, pelo menos uma sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno de MHC de classe II universal; (4) opcionalmente, pelo menos uma sequência de ligante que codifica GPGPG (SEQ ID NO: 56); e (5) opcionalmente, pelo menos uma sequência de poliadenilação.

[011] Também é divulgado aqui um método para tratar um sujeito com uma doença, opcionalmente em que a doença é câncer ou uma infecção, o método compreendendo administrar ao sujeito um vetor de adenovírus compreendendo: uma estrutura adenoviral compreendendo um ou mais genes ou sequências regulatórias de um genoma de adenovírus, e em que a estrutura adenoviral compreende um gene E4 parcialmente deletado com referência ao genoma de adenovírus, em que o gene E4 parcialmente deletado compreende uma região E4orf2 deletada ou parcialmente deletada e uma região E4orf3 deletada ou parcialmente deletada e, opcionalmente, uma região E4orf4 deletada ou parcialmente deletada e, em que o vetor de adenovírus compreende ainda um cassete, o cassete compreendendo: (1) pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, opcionalmente em que a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil codifica um polipeptídeo, opcionalmente em que o polipeptídeo compreende

um antígeno, opcionalmente em que o antígeno compreende: um epítopo de MHC de classe I, um epítopo de MHC de classe II, um epítopo capaz de estimular uma resposta de célula B, ou uma combinação dos mesmos, e opcionalmente em que a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil compreende ainda uma sequência de ligante 5' e/ou uma sequência de ligante 3', e opcionalmente em que; (2) pelo menos uma sequência promotora operacionalmente ligada a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, (3) opcionalmente, pelo menos uma sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno de MHC de classe II universal; (4) opcionalmente, pelo menos uma sequência de ligante que codifica GPGPG (SEQ ID NO: 56); e (5) opcionalmente, pelo menos uma sequência de poliadenilação.

[012] Também é divulgado aqui um método para estimular uma resposta imune em um sujeito, o método compreendendo administrar ao sujeito um vetor de adenovírus compreendendo uma sequência ChAdV68 modificada, em que a sequência ChAdV68 modificada compreende: (a) um gene E4 parcialmente deletado da sequência do gene E4 mostrada na SEQ ID NO: 1 e que não possui pelo menos os nucleotídeos 34.916 a 35.642 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1; e (b) um ou mais genes ou sequências regulatórias da sequência ChAdV68 mostrada na SEQ ID NO: 1, opcionalmente em que um ou mais genes ou sequências regulatórias compreendem pelo menos uma das repetições terminais invertidas de adenovírus de chimpanzé (ITR), genes E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 e L5 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1; e em que o vetor de adenovírus de chimpanzé compreende ainda um cassete, em que o cassete compreende pelo menos uma sequência de ácido

nucleico de carga útil e em que o cassete compreende pelo menos uma sequência promotora operacionalmente ligada a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil.

[013] Também é divulgado aqui um método para tratar um sujeito com uma doença, opcionalmente em que a doença é câncer ou uma infecção, o método compreendendo administrar ao sujeito um vetor de adenovírus compreendendo uma sequência ChAdV68 modificada, em que a sequência ChAdV68 modificada compreende: (a) um gene E4 parcialmente deletado da sequência do gene E4 mostrada na SEQ ID NO: 1 e que não tem pelo menos os nucleotídeos 34.916 a 35.642 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1; e (b) um ou mais genes ou sequências regulatórias da sequência ChAdV68 mostrada na SEQ ID NO: 1, opcionalmente em que um ou mais genes ou sequências regulatórias compreendem pelo menos uma das repetições terminais invertidas de adenovírus de chimpanzé (ITR), genes E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 e L5 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1; e em que o vetor de adenovírus de chimpanzé compreende ainda um cassete, em que o cassete compreende pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil e em que o cassete compreende pelo menos uma sequência promotora operacionalmente ligada a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil.

[014] Também é divulgado aqui um método de produção de um vírus, em que o método compreende as etapas de: a. fornecer um vetor viral compreendendo um cassete, o cassete compreendendo: (i) pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, opcionalmente em que a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil codifica um polipeptídeo, opcionalmente em que o polipeptídeo compreende

um antígeno, opcionalmente em que o antígeno compreende: um epítopo de MHC de classe I, um epítopo de MHC de classe II, um epítopo capaz de estimular uma resposta de células B ou uma combinação dos mesmos e, opcionalmente, em que pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil compreende ainda uma sequência de ligante 5' e/ou uma sequência de ligante 3', e opcionalmente em que; (ii) pelo menos uma sequência promotora operacionalmente ligada a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, em que pelo menos um promotor é um promotor controlado por proteína repressora de tetraciclina (TET) (TETr), (iii) opcionalmente, pelo menos uma sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno de MHC de classe II; (iv) opcionalmente, pelo menos uma sequência de ligante que codifica GPGPG (SEQ ID NO: 56); e (v) opcionalmente, pelo menos uma sequência de poliadenilação; b. fornecer uma célula projetada para expressar a proteína TETr; e c. colocar o vetor viral em contato com a célula sob condições suficientes para a produção do vírus.

[015] Em alguns aspectos, o vetor viral compreende um vetor de adenovírus de chimpanzé, opcionalmente em que o vetor de adenovírus de chimpanzé é um vetor ChAdV68. Em alguns aspectos, a produção do vírus é aumentada usando o vetor compreendendo o promotor controlado por TETr em relação à produção de um vírus produzido usando um vetor sem o promotor controlado por TETr. Em alguns aspectos, a produção aumentada é aumentada pelo menos 1,5 vez, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 6 vezes, pelo menos 7 vezes, pelo menos 8 vezes, pelo menos 9 vezes ou pelo menos 10 vezes em relação à

produção usando um vetor sem o promotor controlado por TETr. Em alguns aspectos, a produção aumentada é aumentada pelo menos 15 vezes, pelo menos 20 vezes, pelo menos 25 vezes, pelo menos 30 vezes, pelo menos 35 vezes, pelo menos 40 vezes, pelo menos 50 vezes, pelo menos 60 vezes, pelo menos 70 vezes, pelo menos 80 vezes, pelo menos 90 vezes ou pelo menos 100 vezes em relação à produção usando um vetor sem o promotor controlado por TETr. Em alguns aspectos, a produção do vírus é aumentada usando o vetor que compreende o promotor controlado por TETr em relação à produção de um vírus produzido usando uma célula que não é projetada para expressar a proteína TETr. Em alguns aspectos, o aumento da produção é aumentado pelo menos 1,5 vez, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 6 vezes, pelo menos 7 vezes, pelo menos 8 vezes, pelo menos 9 vezes ou pelo menos 10 vezes em relação à produção usando uma célula que não é projetada para expressar a proteína TETr.

[016] Também é provido aqui um vetor viral compreendendo um cassete, o cassete compreendendo: (i) pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, opcionalmente em que a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil codifica um polipeptídeo, opcionalmente em que o polipeptídeo compreende um antígeno, opcionalmente em que o antígeno compreende: um epítopo de MHC de classe I, um epítopo de MHC de classe II, um epítopo capaz de estimular uma resposta de células B ou uma combinação dos mesmos e, opcionalmente, em que pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil compreende ainda uma sequência de ligante 5' e/ou uma sequência de

ligante 3', e opcionalmente em que; (ii) pelo menos uma sequência promotora operacionalmente ligada a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, em que pelo menos um promotor é um promotor controlado por proteína repressora de tetraciclina (TET) (TETr), (iii) opcionalmente, pelo menos uma sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno de MHC de classe II; (iv) opcionalmente, pelo menos uma sequência de ligante que codifica GPGPG (SEQ ID NO: 56); e (v) opcionalmente, pelo menos uma sequência de poliadenilação.

[017] Em alguns aspectos, o promotor controlado por TETr compreende uma ou mais sequências de ácido nucleico do operador TET (TETo), opcionalmente em que uma ou mais sequências de ácido nucleico TETo compreendem a sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO: 60. Em alguns aspectos, as uma ou mais sequências de ácido nucleico TETo compreendem 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 ou mais sequências de ácido nucleico TETo, opcionalmente em que cada das sequências de ácido nucleico TETo compreende a sequência de nucleotídeo mostrada em SEQ ID NO: 60. Em alguns aspectos, as 2 ou mais sequências de ácido nucleico TETo estão ligadas entre si. Em alguns aspectos, as 2 ou mais sequências de ácido nucleico TETo estão diretamente ligadas entre si. Em alguns aspectos, as 2 ou mais sequências de ácido nucleico TETo são ligadas juntas com uma sequência de ligante, em que o ligante compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 ou mais nucleotídeos e, opcionalmente, em que a sequência de ligante compreende a sequência de nucleotídeo de ligante mostrada em SEQ ID NO: 61. Em alguns aspectos, uma ou mais sequências de ácido

nucleico TETo são 5' de uma sequência de ligação de RNA polimerase da sequência promotora. Em alguns aspectos, uma ou mais sequências de ácido nucleico TETo são 3' de uma sequência de ligação de RNA polimerase da sequência promotora. Em alguns aspectos, a pelo menos uma sequência promotora compreende uma sequência promotora de CMV, SV40, EF-1, RSV, PGK, HSA, MCK ou EBV. Em alguns aspectos, a pelo menos uma sequência promotora é uma sequência promotora derivada de CMV, opcionalmente em que a sequência promotora de CMV compreende a sequência de nucleotídeos do promotor de CMV mostrada em SEQ ID NO: 64. Em alguns aspectos, a sequência promotora derivada de CMV é uma sequência promotora de CMV mínima, opcionalmente em que a sequência promotora de CMV mínima compreende a sequência de nucleotídeo de promotor de CMV mínima como mostrado na SEQ ID NO: 61.

[018] Em alguns aspectos, o promotor controlado por TETr operacionalmente ligado a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil compreende uma sequência ordenada descrita na fórmula, de 5'a 3', compreendendo: **$(T\text{-}L_Y)_X\text{-}P\text{-}N$** em que, N compreende um de pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, opcionalmente em que cada N codifica um epítopo de MHC de classe I, um epítopo de MHC de classe II, um epítopo capaz de estimular uma resposta de células B ou uma combinação dos mesmos, opcionalmente com pelo menos uma alteração que torna a sequência de epítopo distinta da sequência de peptídeo correspondente codificada por uma sequência de ácido nucleico de tipo selvagem P uma sequência de ligação de RNA polimerase da sequência promotora operacionalmente ligada a pelo menos uma de pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, T compreende

sequências de ácido nucleico TETo compreendendo a sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO: 60, L compreende uma sequência de ligante, onde Y = 0 ou 1 para cada X, e em que X = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20. Em alguns aspectos, o promotor controlado por TETr operacionalmente ligado a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil compreende uma sequência ordenada descrita na fórmula, de 5' a 3', compreendendo: **P-(T-L_Y)$_X$-N** em que, N compreende um de pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, opcionalmente em que cada N codifica um epítopo de MHC de classe I, um epítopo de MHC de classe II, um epítopo capaz de estimular uma resposta de células B ou uma combinação dos mesmos, opcionalmente com pelo menos uma alteração que faz a sequência de epítopo codificada distinta da sequência de peptídeo correspondente codificada por uma sequência de ácido nucleico de tipo selvagem P uma sequência de ligação de RNA polimerase da sequência promotora operacionalmente ligada a pelo menos uma das pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, T compreende um TETo nucleico sequências de ácido compreendendo a sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO: 60, L compreende uma sequência de ligante, em que Y = 0 ou 1 para cada X, e em que X = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20.

[019] Em alguns aspectos, o promotor controlado por TETr compreende: (1) uma sequência promotora mínima de CMV; (2) 7 sequências de ácido nucleico TETo, em que cada uma das sequências de ácido nucleico TETo compreende a sequência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID NO: 60, e em que cada uma das sequências de ácido nucleico TETo estão ligadas em conjunto

com uma sequência de ligante, as 7 sequências de ácido nucleico TETo são 5' da sequência promotora mínima de CMV e, opcionalmente, em que o promotor controlado por TETr compreende a sequência de nucleotídeos como mostrado na SEQ ID NO: 61. Em alguns aspectos, o promotor controlado por TETr compreende: (1) uma sequência promotora de CMV; (2) 2 sequências de ácido nucleico TETo, em que cada uma das sequências de ácido nucleico TETo compreende a sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO: 60, e em que cada uma das sequências de ácido nucleico TETo estão diretamente ligadas entre si, as 2 sequências de ácido nucleico TETo são 3' da sequência promotora de CMV e, opcionalmente, em que o promotor controlado por TETr compreende a sequência de nucleotídeos como mostrado na SEQ ID NO: 64.

[020] Em alguns aspectos, o vetor viral compreende uma estrutura de vetor, em que a estrutura de vetor compreende um vetor de adenovírus de chimpanzé, opcionalmente em que o vetor de adenovírus de chimpanzé é um vetor ChAdV68.

[021] Em alguns aspectos, o cassete compreende uma sequência ordenada descrita na fórmula, de 5' a 3', compreendendo: $\mathbf{P_a-(L5_b-N_c-L3_d)_x-(G5_e-U_f)_y-G3_g-A_h}$ em que N compreende um de pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, opcionalmente em que cada N codifica um epítopo de MHC de classe I, um epítopo de MHC de classe II, um epítopo capaz de estimular uma resposta de células B ou uma combinação dos mesmos, opcionalmente com pelo menos uma alteração que faz a sequência de epítopo codificada distinta da sequência de peptídeo correspondente codificada por uma sequência de ácido nucleico de tipo selvagem, onde c = 1, P compreende a pelo menos uma sequência promotora

operacionalmente ligada a pelo menos uma das pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, onde a = 1, L5 compreende a sequência de ligante 5', onde b = 0 ou 1, L3 compreende a sequência de ligante 3', onde d = 0 ou 1, G5 compreende uma das pelo menos uma sequência de ácido nucleico que codifica um ligante de aminoácido GPGPG, (SEQ ID NO: 56), onde e = 0 ou 1, G3 compreende uma das pelo menos uma sequência de ácido nucleico que codifica um ligante de aminoácido GPGPG, (SEQ ID NO: 56), onde g = 0 ou 1, U compreende uma de pelo menos uma sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno MHC de classe II universal, onde f = 1, A compreende a pelo menos uma sequência de poliadenilação, onde h = 0 ou 1, X = 2 a 400, onde para cada X o N_c correspondente é uma sequência de ácido nucleico de carga útil, opcionalmente em que para cada X o N_c correspondente é uma sequência de ácido nucleico de carga útil distinta e Y = 0-2, onde para cada Y, o U_f correspondente é uma sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno de MHC de classe II universal, opcionalmente em que para cada Y o U_f correspondente é uma sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno de MHC de classe II universal distinto.

[022] Em alguns aspectos, o cassete compreende ainda pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil adicional não codificada na sequência ordenada. Em alguns aspectos, b = 1, d = 1, e = 1, g = 1, h = 1, X = 10, Y = 2, P é uma sequência promotora derivada de CMV, cada N codifica um epítopo de MHC de classe I, um epítopo de MHC de classe II, um epítopo capaz de estimular uma resposta de células B ou uma combinação dos mesmos, L5 codifica uma sequência de aminoácidos N-terminal nativa do epítopo, e em que a

sequência de ligante 5' codifica um peptídeo que tem pelo menos 3 aminoácidos de comprimento, L3 codifica uma sequência de aminoácidos C-terminal nativa do epítopo, e em que a sequência de ligante 3' codifica um peptídeo que tem pelo menos 3 aminoácidos de comprimento, U é cada um de uma sequência PADRE de classe II e uma sequência de MHC de classe II do toxoide tetânico e o vetor compreende uma sequência ChAdV68 modificada, em que a sequência ChAdV68 modificada compreende: (a) um gene E4 parcialmente deletado da sequência do gene E4 mostrada na SEQ ID NO: 1 e que não tem pelo menos nucleotídeos 34.916 a 35.642 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1; (b) nucleotídeos 2 a 34.916 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, em que o gene E4 parcialmente deletado é 3' dos nucleotídeos 2 a 34.916, e opcionalmente os nucleotídeos 2 a 34.916 também não possuem nucleotídeos 577 a 3.403 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção E1 e/ou sem os nucleotídeos 27.125 a 31.825 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção E3; e (c) nucleotídeos 35.643 a 36.518 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, e em que o gene E4 parcialmente deletado é 5' dos nucleotídeos 35.643 a 36.518.

[023] Em alguns aspectos, o vetor é um vetor de adenovírus de chimpanzé, opcionalmente em que o vetor de adenovírus de chimpanzé é um vetor ChAdV68.

[024] Em alguns aspectos, o gene E4 parcialmente deletado compreende: A. a sequência do gene E4 mostrada na SEQ ID NO: 1 e que não tem pelo menos os nucleotídeos 34.916 a 35.642 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, B. a sequência do gene E4 mostrada na SEQ ID NO: 1 e que não tem pelo menos os nucleotídeos 34.916 a 34.942, os nucleotídeos 34.952 a

35.305 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, os nucleotídeos 35.302 a 35.642 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, e em que o vetor compreende pelo menos os nucleotídeos 2 a 36.518 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, C. a sequência do gene E4 mostrada na SEQ ID NO: 1 e que não tem pelo menos os nucleotídeos 34.980 a 36.516 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, e em que o vetor compreende pelo menos os nucleotídeos 2 a 36.518 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, D. a sequência do gene E4 mostrada na SEQ ID NO: 1 e que não tem pelo menos os nucleotídeos 34.979 a 35.642 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1, e em que o vetor compreende pelo menos os nucleotídeos 2 a 36.518 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1, E. uma deleção de E4 de pelo menos uma deleção parcial de E4Orf2, um E4Orf3 totalmente deletado e pelo menos uma deleção parcial de E4Orf4, F. uma deleção de E4 de pelo menos uma deleção parcial de E4Orf2, pelo menos uma deleção parcial de E4Orf3, e pelo menos uma deleção parcial de E4Orf4, G. uma deleção de E4 de pelo menos uma deleção parcial de E4Orf1, um E4Orf2 totalmente deletado e pelo menos uma deleção parcial de E4Orf3, ou H. uma deleção de E4 de pelo menos uma deleção parcial de E4Orf2 e pelo menos uma deleção parcial de E4Orf3.

[025] Em alguns aspectos, o vetor compreende um ou mais genes ou sequências regulatórias da sequência ChAdV68 mostrada na SEQ ID NO: 1, opcionalmente em que um ou mais genes ou sequências regulatórias são selecionados do grupo que consiste na repetição terminal invertida de adenovírus de chimpanzé (ITR), genes E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 e L5 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1. Em alguns aspectos, a estrutura adenoviral ou sequência ChAdV68

modificada compreende ainda uma deleção funcional em pelo menos um gene selecionado do grupo que consiste em um gene E1A, E1B, E2A, E2B, E3, L1, L2, L3, L4 e L5 de adenovírus com referência ao genoma do adenovírus ou com referência à sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, opcionalmente em que a estrutura adenoviral ou sequência ChAdV68 modificada é totalmente deletada ou funcionalmente deletada em: (1) E1A e E1B; ou (2) E1A, E1B e E3 com referência ao genoma do adenovírus ou com referência à sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, opcionalmente em que o gene E1 é funcionalmente deletado através de uma deleção de E1 de pelo menos os nucleotídeos 577 a 3.403 com referência à sequência mostrada na SEQ ID NO: 1 e opcionalmente em que o gene E3 é funcionalmente deletado através de uma deleção de E3 de pelo menos os nucleotídeos 27.125 a 31.825 com referência à sequência mostrada na SEQ ID NO: 1.

[026] Em alguns aspectos, o cassete está presente e é inserido no vetor na região E1, região E3 e/ou qualquer região AdV deletada que permite a incorporação do cassete.

[027] Em alguns aspectos, o vetor é gerado de uma primeira geração, uma segunda geração ou um vetor adenoviral dependente de auxiliar.

[028] Em alguns aspectos, a sequência ChAdV68 modificada compreende os nucleotídeos 2 a 34.916 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, em que o gene E4 parcialmente deletado é 3' dos nucleotídeos 2 a 34.916. Em alguns aspectos, os nucleotídeos 2 a 34.916 não possuem os nucleotídeos 577 a 3.403 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção de E1. Em alguns aspectos, os nucleotídeos 2 a 34.916 não possuem os nucleotídeos 456-

3.014 com referência à sequência mostrada na SEQ ID NO: 1. Em alguns aspectos, os nucleotídeos 2 a 34.916 não possuem nucleotídeos 27.125-31.825 com referência à sequência mostrada na SEQ ID NO: 1 correspondente a uma deleção de E3. Em alguns aspectos, os nucleotídeos 2 a 34.916 não possuem os nucleotídeos 27.816-31.333 com referência à sequência mostrada na SEQ ID NO: 1. Em alguns aspectos, os nucleotídeos 2 a 34.916 não têm nucleotídeos 577 a 3403 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção de E1 e não têm nucleotídeos 27.125 a 31.825 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção de E3. Em alguns aspectos, os nucleotídeos 2 a 34.916 ainda não possuem nucleotídeos 3.957-10.346, nucleotídeos 21.787-23.370, nucleotídeos 33.486-36.193 ou uma combinação dos mesmos com referência à sequência mostrada na SEQ ID NO: 1.

[029] Em alguns aspectos, pelo menos uma das pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil codifica um antígeno, em que o antígeno compreende: um epítopo de MHC de classe I, um epítopo de MHC de classe II, um epítopo capaz de estimular uma resposta de células B ou uma combinação dos mesmos. Em alguns aspectos, pelo menos uma das pelo menos umas sequências de ácido nucleico de carga útil codifica uma sequência de polipeptídeo capaz de sofrer processamento de antígeno para um epítopo, opcionalmente, em que o epítopo é conhecido ou suspeito de ser apresentado por MHC de classe I em uma superfície de uma célula, opcionalmente em que a superfície da célula é uma superfície de célula de tumor ou uma superfície de célula infectada.

[030] Em alguns aspectos, pelo menos uma das pelo menos umas sequências de ácido nucleico de carga útil codifica uma

sequência de polipeptídeo ou porção da mesma que é apresentada por MHC de classe I e/ou MHC de classe II em uma superfície de uma célula, opcionalmente em que a superfície da célula é uma superfície de célula de tumor ou uma superfície de célula infectada. Em alguns aspectos, a célula tumoral selecionada do grupo que consiste em: câncer de pulmão, melanoma, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de rim, câncer gástrico, câncer de cólon, câncer testicular, câncer de cabeça e pescoço, câncer de pâncreas, cérebro câncer, linfoma de células B, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica, leucemia linfocítica crônica, leucemia linfocítica de células T, câncer de pulmão de células não pequenas e câncer de pulmão de células pequenas, ou a célula infectada selecionada do grupo que consiste em: uma célula infectada por patógeno, uma célula infectada por vírus, uma célula infectada por bactérias, uma célula infectada por fungos e uma célula infectada por parasitas, opcionalmente em que a célula infectada por vírus é selecionada a partir do grupo que consiste em: uma célula infectada por HIV, uma síndrome respiratória aguda grave relacionada à síndrome respiratória célula infectada com coronavírus (SARS), uma célula infectada com síndrome respiratória aguda grave por coronavírus 2 (SARS-CoV-2), uma célula infectada com Ebola, uma célula infectada com o vírus da hepatite B (HBV), um vírus influenza célula infectada e uma célula infectada com o vírus da hepatite C (HCV).

[031] Em alguns aspectos, pelo menos uma das pelo menos umas sequências de ácido nucleico de carga útil codifica uma sequência de polipeptídeo ou porção da mesma compreendendo

um epítopo capaz de estimular uma resposta de célula B, opcionalmente em que a sequência de polipeptídeo ou porção da mesma compreende um proteína de comprimento total, um domínio de proteína, uma subunidade de proteína ou um fragmento antigênico predito ou conhecido ser capaz de ser ligado por um anticorpo.

[032] Em alguns aspectos, pelo menos uma das pelo menos umas sequências de ácido nucleico de carga útil codifica um peptídeo de organismo de doença infecciosa selecionado do grupo que consiste em: um peptídeo derivado de patógeno, um peptídeo derivado de vírus, um peptídeo derivado de bactéria, um peptídeo derivado de fungo e um peptídeo derivado de parasita. Em alguns aspectos, pelo menos uma das pelo menos umas sequências de ácido nucleico de carga útil codifica um epítopo com pelo menos uma alteração que torna a sequência de epítopo codificada distinta da sequência de peptídeo correspondente codificada por uma sequência de ácido nucleico tipo selvagem. Em alguns aspectos, pelo menos uma das pelo menos umas sequências de ácido nucleico de carga útil codifica um epítopo de MHC de classe I ou epítopo de MHC de classe II com pelo menos uma alteração que torna a sequência de peptídeo codificada distinta da sequência de peptídeo correspondente codificada por uma sequência de ácido nucleico tipo selvagem, opcionalmente em que a sequência de polipeptídeo codificada ou porção da mesma tem elevada afinidade de ligação, elevada estabilidade de ligação e/ou uma elevada probabilidade de apresentação em seu alelo MHC correspondente em relação à sequência de ácido nucleico tipo selvagem traduzida, correspondente. Em alguns aspectos, a pelo menos uma alteração compreende uma mutação

pontual, uma mutação de mudança de quadro de leitura, uma mutação não mudança de quadro de leitura, uma mutação de deleção, uma mutação de inserção, uma variante de splice, um rearranjo genômico ou um antígeno emendado gerado por proteassoma.

[033] Em alguns aspectos, pelo menos uma das pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil codifica uma proteína de comprimento total, um domínio de proteína ou uma subunidade de proteína. Em alguns aspectos, pelo menos uma das pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil codifica um anticorpo, uma citocina, um receptor de antígeno quimérico (CAR), um receptor de células T e uma nuclease de sistema de edição de genoma.

[034] Em alguns aspectos, pelo menos uma das pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil compreende uma sequência de ácido nucleico não codificante. Em alguns aspectos, a sequência de ácido nucleico não codificante compreende um polinucleotídeo de interferência de RNA (RNAi) ou polinucleotídeo de sistema de edição de genoma.

[035] Em alguns aspectos, cada uma das pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil está ligada diretamente uma à outra. Em alguns aspectos, pelo menos uma das pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil está ligada a uma sequência de ácido nucleico de carga útil distinta com uma sequência de ácido nucleico que codifica um ligante. Em alguns aspectos, o ligante liga duas sequências de ácido nucleico de carga útil codificando epítopos de MHC de classe I ou liga uma primeira sequência de ácido nucleico de carga útil codificando um epítopo de MHC de classe I a uma segunda sequência de ácido nucleico de carga útil

codificando um epítopo de MHC de classe II ou codificando uma sequência de epítopo capaz de estimular uma resposta de célula B. Em alguns aspectos, o ligante é selecionado do grupo consistindo em: (1) resíduos de glicina consecutivos, pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 resíduos de comprimento; (2) resíduos de alanina consecutivos, pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 resíduos de comprimento; (3) dois resíduos de arginina (RR); (4) alanina, alanina, tirosina (AAY); (5) uma sequência de consenso pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 resíduos de aminoácidos de comprimento que é processada eficientemente por um proteassoma de mamífero; e (6) uma ou mais sequências nativas flanqueando o antígeno derivado da proteína cognata de origem e que é de pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 2-20 resíduos de aminoácidos de comprimento. Em alguns aspectos, o ligante liga duas sequências de ácido nucleico de carga útil codificando epítopos de MHC de classe II ou liga uma primeira sequência de ácido nucleico de carga útil codificando um epítopo de MHC de classe II para uma segunda sequência de ácido nucleico de carga útil codificando um epítopo de MHC de classe I ou codificando uma sequência de epítopo capaz de estimular uma resposta de célula B. Em alguns aspectos, o ligante compreende a sequência GPGPG (SEQ ID NO: 56).

[036] Em alguns aspectos, pelo menos uma das pelo menos umas sequências de ácido nucleico de carga útil é ligada, operavelmente ou diretamente, a uma sequência separada ou contígua que inensifica a expressão, estabilidade, tráfico de célula, processamento e apresentação e/ou imunogenicidade da pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil

e, opcionalmente, a expressão, estabilidade, tráfico de célula, processamento e apresentação e/ou imunogenicidade do polipeptídeo codificado pela pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil. Em alguns aspectos, a sequência separada ou contígua compreende pelo menos um de: uma sequência de ubiquitina, uma sequência de ubiquitina modificada para aumentar direcionamento de proteassoma, opcionalmente em que a sequência de ubiquitina contém uma substituição de Gly para Ala na posição 76, uma sequência de sinal de imunoglobulina, opcionalmente, em que a sequência de sinal de imunoglobulina compreende IgK, uma sequência de histocompatibilidade principal de classe I, proteína de membrana associada a lisossoma (LAMP) -1, proteína de membrana associada a lisossoma de célula dendrítica humana e uma sequência de histocompatibilidade principal de classe II; opcionalmente, em que a sequência de ubiquitina modificada para aumentar direcionamento de proteassoma é A76.

[037] Em alguns aspectos, a expressão de cada uma das pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil é conduzida por pelo menos um promotor.

[038] Em alguns aspectos, a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil compreende pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 sequências de ácido nucleico de carga útil. Em alguns aspectos, a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil compreende pelo menos 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou até 400 sequências de ácido nucleico de carga útil. Em alguns aspectos, a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil compreende pelo menos 2-400 sequências de ácido nucleico de carga útil e em que pelo

menos uma das pelo menos umas sequências de ácido nucleico de carga útil codifica um epítopo de MHC de classe I, um epítopo de MHC de classe II, um epítopo capaz de estimular uma resposta de célula B ou uma combinação dos mesmos. Em alguns aspectos, a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil compreende pelo menos 2-400 sequências de ácido nucleico de carga útil e em que, quando administrada ao sujeito e traduzida, pelo menos uma das pelo menos umas sequências de ácido nucleico de carga útil codifica um antígeno apresentado em células apresentadoras de antígeno, resultando em uma resposta imune direcionando o antígeno. Em alguns aspectos, a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil compreende pelo menos 2-400 sequências de ácido nucleico que codificam antígeno de MHC de classe I e/ou classe II em que, quando administradas ao sujeito e traduzido, em pelo menos um dos antígenos de MHC de classe I ou de classe II são apresentados em células de apresentação de antígenos, resultando em uma resposta imune direcionada a pelo menos um dos antígenos em uma superfície celular e, opcionalmente, em que a expressão de cada uma das pelo menos 2-400 sequências de ácido nucleico que codificam antígeno de MHC de classe I ou de classe II é conduzida por pelo menos um promotor.

[039] Em alguns aspectos, cada epítopo de MHC de classe I tem independentemente entre 8 e 35 aminoácidos de comprimento, opcionalmente 7-15, 9-17, 9-25, 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 ou 35 aminoácidos de comprimento. Em alguns aspectos, a pelo menos uma sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno de MHC de classe

II universal está presente. Em alguns aspectos, pelo menos uma sequência de ácido nucleico codificando antígeno de MHC de classe II universal está presente e compreende pelo menos uma sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno de MHC de classe II universal que compreende pelo menos uma alteração que torna a sequência de peptídeo codificada distinta da sequência de peptídeo correspondente codificada por uma sequência de ácido nucleico tipo selvagem. Em alguns aspectos, a pelo menos uma sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno de MHC de classe II universal tem 12-20, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 20-40 aminoácidos de comprimento. Em alguns aspectos, a pelo menos uma sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno de MHC de classe II universal está presente e em que a pelo menos uma sequência universal compreende pelo menos um dentre toxoide do tétano e PADRE.

[040] Em alguns aspectos, a pelo menos uma sequência promotora é um promotor regulável, opcionalmente em que o promotor regulável é um promotor controlado por proteína repressora de tetraciclina (TET) (TETr), opcionalmente em que o promotor regulável compreende múltiplas sequências de operador TET (TETo) 5' ou 3' de uma sequência de ligação da RNA polimerase do promotor. múltiplas sequências de operador TET (TETo) são 5' ou 3' de um RNA, sendo que pelo menos uma sequência promotora é constitutiva. múltiplas sequências de operador TET (TETo) são 5' ou 3' de um RNA, a pelo menos uma sequência promotora é uma sequência promotora de CMV, SV40, EF-1, RSV, PGK, HSA, MCK ou EBV.

[041] Em alguns aspectos, o cassete compreende ainda pelo menos uma sequência de poliadenilação (poliA)

operavelmente ligada a pelo menos uma das pelo menos umas sequências de ácido nucleico de carga útil, opcionalmente em que a sequência de poliA está localizada 3' da pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil. Em alguns aspectos, a sequência poliA compreende uma sequência poliA de SV40 ou de hormônio de crescimento bovino (BGH).

[042] Em alguns aspectos, o cassete compreende ainda pelo menos um de: uma sequência de íntron, uma sequência de elemento regulador pós-transcricional de vírus da hepatite da marmota (WPRE), uma sequência de entrada de ribossoma interna (IRES), uma sequência de nucleotídeo codificando uma sequência de peptídeo autoclavável 2A, uma sequência de nucleotídeo codificando um sítio de clivagem de Furina, uma sequência de nucleotídeo codificando um sítio de clivagem de TEV ou uma sequência na região não codificante 5' ou 3' conhecida por intensificar a exportação nuclear, estabilidade ou eficiência de tradução de mRNA que é operavelmente ligado a pelo menos uma das pelo menos umas sequências de ácido nucleico de carga útil.

[043] Em alguns aspectos, o cassete compreende um gene repórter, incluindo, mas não se limitando a, proteína fluorescente verde (GFP), uma variante de GFP, fosfatase alcalina secretada, luciferase ou uma variante de luciferase.

[044] Em alguns aspectos, o vetor compreende ainda uma ou mais sequências de ácido nucleico de carga útil que codificam pelo menos um modulador imunológico, opcionalmente em que o pelo menos um modulador imunológico inibe uma molécula de ponto de controle imunológico. Em alguns aspectos, o modulador imunológico é um anticorpo anti-CTLA4

ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um anticorpo anti-PD-1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um anticorpo anti-PD-L1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um anticorpo anti-4-1BB ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, ou um anticorpo anti-OX-40 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em alguns aspectos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é um fragmento Fab, um fragmento Fab', um Fv de cadeia simples (scFv), um anticorpo de domínio único (sdAb) sejam ligados como específico simples ou míultiplas especificidades juntos (por exemplo, domínios de anticorpo de camelídeo) ou anticorpo de cadeia simples de comprimento total (por exemplo, IgG de comprimento total com cadeias pesadas e leves ligadas por um ligante flexível). Em alguns aspectos, as sequências de cadeia pesada e leve do anticorpo são uma sequência contígua separada por qualquer de uma sequência de autoclivagem, tal como 2A, opcionalmente, em que a sequência de autoclivagem tem uma sequência de sítio de clivagem de Furina 5' da sequência de autoclivagem ou uma sequência IRES; ou as sequências de cadeia pesada e leve do anticorpo são ligadas por um ligante flexível, tal como resíduos de glicina consecutivos. Em alguns aspectos, o modulador imunológico é uma citocina. Em alguns aspectos, a citocina é pelo menos uma de IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 ou IL-21 ou suas variantes de cada.

[045] Em alguns aspectos, pelo menos uma das pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil é selecionada executando as etapas de: (a) obter pelo menos um de exoma, transcriptoma ou dados de sequenciamento de nucleotídeo de genoma completo de uma célula tumoral, uma célula infectada,

ou um organismo de doença infecciosa, em que os dados de sequenciamento de nucleotídeos são usados para obter dados que representam sequências de peptídeos de cada um de um conjunto de antígenos; (b) inserir a sequência de peptídeo de cada antígeno em um modelo de apresentação para gerar um conjunto de probabilidades numéricas de que cada um dos antígenos é apresentado por um ou mais dos alelos de MHC em uma superfície celular, opcionalmente, uma superfície de célula tumoral ou uma superfície de célula infectada, o conjunto de probabilidades tendo sido identificado pelo menos com base nos dados de espectrometria de massa recebidos; e (c) selecionar um subconjunto do conjunto de antígenos com base no conjunto de probabilidades para gerar um conjunto de antígenos selecionados que são usados para gerar pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil.

[046] Em alguns aspectos, cada uma das pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil é selecionada executando as etapas de: (a) obter pelo menos um de exoma, transcriptoma ou dados de sequenciamento de nucleotídeo de genoma completo de uma célula tumoral, uma célula infectada ou um organismo de doença infecciosa, em que os dados de sequenciamento de nucleotídeos são usados para obter dados que representam sequências de peptídeos de cada um de um conjunto de antígenos; (b) inserir a sequência de peptídeo de cada antígeno em um modelo de apresentação para gerar um conjunto de probabilidades numéricas de que cada um dos antígenos é apresentado por um ou mais dos alelos de MHC em uma superfície celular, opcionalmente, uma superfície de célula tumoral ou uma superfície da célula infectada, o

conjunto de probabilidades numéricas tendo sido identificado pelo menos com base nos dados de espectrometria de massa recebidos; e (c) selecionar um subconjunto do conjunto de antígenos com base no conjunto de probabilidades numéricas para gerar um conjunto de antígenos selecionados que são usados para gerar cada uma das pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil. Em alguns aspectos, um número do conjunto de antígenos selecionados é 2-20. Em alguns aspectos, o modelo de apresentação representa a dependência entre: (a) presença de um par de um particular um dos alelos de MHC e um determinado aminoácido em uma posição particular de uma sequência de peptídeo; e (b) probabilidade de apresentação em uma superfície celular, opcionalmente em uma superfície de célula tumoral ou em uma superfície celular infectada, pelo particular um dos alelos de MHC do par, de tal sequência de peptídeo compreendendo o aminoácido particular na posição particular. Em alguns aspectos, selecionar o conjunto de antígenos selecionados compreende selecionar antígenos que têm uma probabilidade elevada de serem apresentados na superfície de célula em relação a antígenos não selecionados com base no modelo de apresentação. Em alguns aspectos, selecionar o conjunto de antígenos selecionados compreende selecionar antígenos que têm uma elevada probabilidade de serem capazes de induzir uma resposta imune específica de célula no sujeito em relação a antígenos não selecionados com base no modelo de apresentação. Em alguns aspectos, selecionar o conjunto de antígenos selecionados compreende selecionar antígenos que têm uma elevada probabilidade de serem capazes de serem apresentados a células T naïve por células apresentadoras de

antígenos profissionais (APCs) em relação a antígenos não selecionados com base no modelo de apresentação, opcionalmente em que a APC é uma célula dendrítica (DC). Em alguns aspectos, selecionar o conjunto de antígenos selecionados compreende selecionar antígenos que têm uma probabilidade diminuída de serem submetidos a inibição via tolerância central ou periférica em relação a antígenos não selecionados com base no modelo de apresentação. Em alguns aspectos, selecionar o conjunto de antígenos selecionados compreende selecionar antígenos que têm uma probabilidade diminuída de serem capazes de induzir uma resposta autoimune a tecido normal no sujeito em relação a antígenos não selecionados com base no modelo de apresentação. Em alguns aspectos, os dados de sequenciamento de nucleotídeos de exoma ou transcriptoma são obtidos por meio da realização de sequenciamento em uma célula ou tecido tumoral, uma célula infectada ou um organismo de doença infecciosa. Em alguns aspectos, o sequenciamento é o sequenciamento de próxima geração (NGS) ou qualquer abordagem de sequenciamento massivamente paralelo.

[047] Em alguns aspectos, o cassete compreende sequências de epítopos juncionais formadas por sequências adjacentes no cassete. Em alguns aspectos, pelo menos uma ou cada sequência de epítopo de junção tem uma afinidade superior a 500 nM para MHC. Em alguns aspectos, cada sequência de epítopo juncional é não própria. Em alguns aspectos, o cassete não codifica um epítopo de MHC de classe I ou classe II não terapêutico, em que o epítopo não terapêutico é predito para ser exibido em um alelo de MHC de um sujeito. Em alguns aspectos, a sequência de epítopo de

MHC de classe I ou classe II predita não terapêutica é uma sequência de epítopo juncional formada por sequências adjacentes no cassete. Em alguns aspectos, a predição é baseada nas probabilidades de apresentação geradas pela introdução de sequências dos epítopos não terapêuticos em um modelo de apresentação. Em alguns aspectos, uma ordem de pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil no cassete é determinada por uma série de etapas que compreendem: i. gerar um conjunto de sequências de cassete candidatas correspondendo a diferentes ordens de pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil; ii. determinar, para cada sequência de cassete candidata, uma pontuação de apresentação com base na apresentação de epítopos não terapêuticos na sequência de cassete candidata; e iii. selecionar uma sequência de cassete candidata associada a uma pontuação de apresentação abaixo de um limite predeterminado como a sequência de cassete.

[048] Em alguns aspectos, cada um dos epítopos de MHC de classe I e/ou classe II é predito ou validado para ser capaz de apresentação por pelo menos um alelo HLA presente em pelo menos 5% de uma população humana. Em alguns aspectos, cada um dos epítopos de MHC de classe I e/ou classe II é predito ou validado para ser capaz de apresentação por pelo menos um alelo HLA, em que cada par de antígeno/HLA tem uma prevalência de antígeno/HLA de pelo menos 0,01% em uma população humana. Em alguns aspectos, cada um dos epítopos de MHC de classe I e/ou classe II é predito ou validado para ser capaz de apresentação por pelo menos um alelo HLA, em que cada par de antígeno/HLA tem uma prevalência de antígeno/HLA de pelo menos 0,1% em uma população humana. Em

alguns aspectos, a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil que codifica o polipeptídeo é otimizada por códons em relação a uma sequência de ácido nucleico nativa diretamente extraída de um tecido ou amostra do sujeito.

[049] Também é divulgada aqui uma composição farmacêutica compreendendo qualquer um dos vetores descritos aqui e um carreador farmaceuticamente aceitável. Em alguns aspectos, a composição compreende ainda um adjuvante. Em alguns aspectos, a composição compreende ainda um modulador imunológico. Em alguns aspectos, o modulador imunológico é um anticorpo anti-CTLA4 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um anticorpo anti-PD-1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um anticorpo anti-PD-L1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um anticorpo anti-4-1BB ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, ou um anticorpo anti-OX-40 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[050] Também é divulgado aqui uma sequência de nucleotídeo isolada compreendendo o cassete de qualquer um dos vetores descritos aqui e um gene da sequência de SEQ ID NO: 1, opcionalmente, em que o gene é selecionado do grupo consistindo nos genes ITR, E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 e L5 de adenovírus de chimpanzé da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1, e opcionalmente em que a sequência de nucleotídeo é cDNA.

[051] Também é divulgada aqui uma célula isolada compreendendo qualquer uma das sequências de nucleotídeos isoladas aqui descritas, opcionalmente em que a célula é uma célula CHO, HEK293 ou suas variantes, 911, HeLa, A549, LP-293, PER.C6 ou AE1-2a.

[052] Também é divulgado um vetor que compreende qualquer uma das sequências de nucleotídeos isoladas aqui descritas.

[053] Também é divulgado aqui um kit que compreende qualquer um dos vetores ou composições aqui descritos e instruções de uso.

[054] Também é divulgado aqui um método para estimular uma resposta imune em um sujeito, o método compreendendo administrar ao sujeito qualquer um dos vetores ou composições aqui descritos. Em alguns aspectos, o vetor ou composição é administrado por via intramuscular (IM), intradérmica (ID) ou subcutânea (SC). Em alguns aspectos, o método compreende ainda administrar ao sujeito um modulador imune, opcionalmente, em que o modulador imune é administrado antes, simultaneamente ou após administração do vetor ou da composição farmacêutica. Em alguns aspectos, o modulador imunológico é um anticorpo anti-CTLA4 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um anticorpo anti-PD-1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um anticorpo anti-PD-L1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um anticorpo anti-4-1BB ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, ou um anticorpo anti-OX-40 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em alguns aspectos, o modulador imunológico é administrado por via intravenosa (IV), intramuscular (IM), intradérmica (ID) ou subcutânea (SC). Em alguns aspectos, a administração subcutânea é próxima ao sítio da administração de vetor ou composição ou em estreita proximidade com um ou mais nódulos linfáticos de drenagem de vetor ou composição.

[055] Em alguns aspectos, o método compreende ainda a

administração ao sujeito de uma segunda composição de vacina. Em alguns aspectos, a segunda composição de vacina é administrada antes da administração de qualquer um dos vetores ou composições aqui descritos. Em alguns aspectos, a segunda composição de vacina é administrada subsequentemente à administração de qualquer um dos vetores ou composições aqui descritos. Em alguns aspectos, a segunda composição de vacina é a mesma que qualquer um dos vetores ou composições aqui descritos. Em alguns aspectos, a segunda composição de vacina é diferente de qualquer um dos vetores ou composições aqui descritos. Em alguns aspectos, a segunda composição de vacina compreende um vetor de RNA de autoamplificação (samRNA) que codifica pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil. Em alguns aspectos, a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil codificada pelo vetor samRNA é a mesma que pelo menos uma das pelo menos umas sequências de ácido nucleico de carga útil de qualquer das reivindicações de vetor acima.

[056] Também é divulgado aqui um método de fabricação do vetor de qualquer uma das reivindicações de vetor acima, o método compreendendo: a obter uma sequência de plasmídeo compreendendo o vetor de adenovírus ou vetor de adenovírus de chimpanzé; transfectar a sequência de plasmídeo em uma ou mais células hospedeiras; e isolar o vetor de uma ou mais células hospedeiras. Em alguns aspectos, o isolamento compreende: lisar uma ou mais células hospedeiras para obter um lisado celular compreendendo o vetor; e purificar o vetor do lisado celular e, opcionalmente, também do meio usado para cultivar uma ou mais células hospedeiras. Em alguns aspectos, a sequência de plasmídeo é gerada usando um dos

seguintes; recombinação de DNA ou recombinação bacteriana ou síntese de DNA de genoma completo ou síntese de DNA de genoma completo com amplificação de DNA sintetizado em células bacterianas. Em alguns aspectos, uma ou mais células hospedeiras são pelo menos uma de células CHO, HEK293 ou variantes das mesmas, 911, HeLa, A549, LP-293, PER.C6 e células AE1-2a. Em alguns aspectos, a purificação do vetor do lisado celular envolve um ou mais dentre separação cromatográfica, centrifugação, precipitação de vírus e filtração.

[057] Também é fornecido aqui um método de produção de um vírus, em que o vírus é produzido usando qualquer um dos vetores aqui descritos. Em alguns aspectos, a produção do vírus é aumentada usando o vetor compreendendo o gene E4 parcialmente deletado em relação à produção de um vírus produzido usando um vetor sem o gene E4 parcialmente deletado. Em alguns aspectos, o título da unidade infecciosa do vírus é elevado usando o vetor compreendendo o gene E4 parcialmente deletado em relação ao título da unidade infecciosa de um vírus produzido usando um vetor sem o gene E4 parcialmente deletado. Em alguns aspectos, a produção aumentada é aumentada pelo menos 1,5 vez, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 6 vezes, pelo menos 7 vezes, pelo menos 8 vezes, ou pelo menos 9 vezes em relação à produção usando um vetor sem o gene E4 parcialmente deletado. Em alguns aspectos, a produção aumentada é aumentada pelo menos 10 vezes, pelo menos 18 vezes, pelo menos 20 vezes, pelo menos 25 vezes, ou pelo menos 27 vezes, em relação à produção usando um vetor sem o gene E4 parcialmente deletado.

BREVE DESCRIÇÃO DAS VÁRIAS VISTAS DAS FIGURAS

[058] Essas e outras características, aspectos e vantagens da presente invenção serão melhor compreendidas com relação à descrição a seguir e figuras anexos, onde:

[059] **A Figura (Fig.) 1** ilustra o desenvolvimento de um ensaio de ativação de células T *in vitro* . Esquema do ensaio no qual a entrega de um cassete de vacina às células apresentadoras de antígeno leva à expressão, processamento e apresentação restrita ao MHC de antígenos de peptídeo distintos. As células T repórter projetadas com receptores de células T que correspondem à combinação específica de peptídeo-MHC tornam-se ativadas, resultando na expressão de luciferase.

[060] **A Fig. 2A** ilustra a avaliação de sequências de ligante em cassetes curtos e mostra cinco epítopos restritos de MHC de classe I (epítopos 1 a 5) concatenados na mesma posição um em relação ao outro, seguidos por dois epítopos de MHC de classe II universais (MHC-II). Várias iterações foram geradas usando diferentes ligantes. Em alguns casos, os epítopos de células T estão diretamente ligados uns aos outros. Em outros, os epítopos de células T são flanqueados em um ou ambos os lados por sua sequência natural. Em outras iterações, os epítopos de células T são ligados pelas sequências não naturais AAY, RR e DPP.

[061] **A Fig. 2B** ilustra a avaliação de sequências de ligação em cassetes curtos e mostra informações de sequência sobre os epítopos de células T incorporados nos cassetes curtos. A Fig. 2B revela as SEQ ID NOs : 78-79, 82, 81, 80, 49 e 194, respectivamente, em ordem de aparecimento.

[062] **A Fig. 3** ilustra a avaliação de sequências de

direcionamento celular adicionadas a modelos de cassetes de vacina. Os cassetes de direcionamento estendem os projetos de cassete curto com ubiquitina (Ub), peptídeos de sinal (SP) e/ou domínios transmembrana (TM), caracterizados ao lado dos cinco epítopos de células T humanas marcadoras (epítopos 1 a 5) e também dois epítopos de células T de camundongo SIINFEKL (SII) (SEQ ID NO: 72) e SPSYAYHQF (A5) (SEQ ID NO: 73), e usam o ligante não natural AAY- ou ligantes naturais que flanqueiam os epítopos de células T em ambos os lados (25mer).

[063] **A Fig. 4** ilustra a avaliação *in vivo* de sequências de ligação em cassetes curtos. A) Projeto experimental da avaliação *in vivo* de cassetes de vacina usando camundongos transgênicos HLA-A2.

[064] **A Fig. 5A** ilustra a avaliação *in vivo* do impacto da posição do epítopo em cassetes de 21-meros longos e mostra que o projeto de cassetes longos envolve cinco epítopos de classe I de marcador (epítopos 1 a 5) contidos em sua sequência natural de 25-mer (ligante = sequências flanqueadoras naturais), espaçadas com epítopos de classe I de células T bem conhecidos adicionais (epítopos 6 a 21) contidos em sua sequência natural de 25-mer e dois epítopos universais de classe II (MHC-II0, com apenas a posição relativa da classe I epítopos variados.

[065] **A Fig. 5B** ilustra a avaliação *in vivo* do impacto da posição do epítopo em cassetes de 21-mer longos e mostra a informação da sequência sobre os epítopos de células T usados. A Fig. 5B revela as SEQ ID NOs : 78-79, 82, 81, 80, 195-197, 83 e 198-209, respectivamente, em ordem de aparecimento.

[066] **A Fig. 6A** ilustra o projeto de cassete final para estudos de habilitação de IND pré-clínicos e mostra que o projeto dos cassetes finais compreende 20 epítopos de MHC I contidos em sua sequência natural 25-mer (ligante = sequências flanqueadoras naturais), composta por 6 epítopos de primatas não humanos (NHP), 5 epítopos humanos, 9 epítopos murinos, bem como 2 epítopos universais de MHC de classe II.

[067] **A Fig. 6B** ilustra o projeto de cassete final para estudos de habilitação de IND pré-clínicos e mostra a informação de sequência para os epítopos de células T usados que são apresentados em MHC de classe I de origem primata não humano, camundongo e humana, bem como sequências de 2 MHC universais epítopos PADRE de classe II e toxoide do tétano. A Fig. 6B revela as SEQ ID NOs : 112-117, 80-82, 78-79, 72-73, 142, 210, 146-148, 144-145, 49 e 47, respectivamente, em ordem de colunas.

[068] **A Fig. 7A** ilustra a produção de vírus ChAdV68.4WTnt.GFP após a transfecção. As células HEK293A foram transfectadas com DNA de ChAdV68.4WTnt.GFP usando o protocolo de fosfato de cálcio. A replicação viral foi observada 10 dias após a transfecção e as placas virais de ChAdV68.4WTnt.GFP foram visualizadas usando microscopia de luz (aumento de 40x).

[069] **A Fig. 7B** ilustra a produção de vírus ChAdV68.4WTnt.GFP após a transfecção. As células HEK293A foram transfectadas com DNA de ChAdV68.4WTnt.GFP usando o protocolo de fosfato de cálcio. A replicação viral foi observada 10 dias após a transfecção e as placas virais ChAdV68.4WTnt.GFP foram visualizadas usando microscopia fluorescente com ampliação de 40x.

[070] **A Fig. 7C** ilustra a produção de vírus ChAdV68.4WTnt.GFP após a transfecção. As células HEK293A foram transfectadas com DNA de ChAdV68.4WTnt.GFP usando o protocolo de fosfato de cálcio. A replicação viral foi observada 10 dias após a transfecção e as placas virais de ChAdV68.4WTnt.GFP foram visualizadas usando microscopia fluorescente em amplificação de 100x.

[071] **A Fig. 8A** ilustra a produção de vírus ChAdV68.5WTnt.GFP após a transfecção. As células HEK293A foram transfectadas com DNA de ChAdV68.5WTnt.GFP usando o protocolo de lipofectamina. A replicação viral (placas) foi observada 10 dias após a transfecção. Um lisado foi preparado e usado para reinfectar um frasco T25 de células 293A. As placas virais de ChAdV68.5WTnt.GFP foram visualizadas e fotografadas 3 dias depois usando microscopia de luz (ampliação de 40x).

[072] **A Fig. 8B** ilustra a produção de vírus ChAdV68.5WTnt.GFP após a transfecção. As células HEK293A foram transfectadas com DNA de ChAdV68.5WTnt.GFP usando o protocolo de lipofectamina. A replicação viral (placas) foi observada 10 dias após a transfecção. Um lisado foi preparado e usado para reinfectar um frasco T25 de células 293A. As placas virais de ChAdV68.5WTnt.GFP foram visualizadas e fotografadas 3 dias depois usando microscopia fluorescente com ampliação de 40x.

[073] **A Fig. 8C** ilustra a produção de vírus ChAdV68.5WTnt.GFP após a transfecção. As células HEK293A foram transfectadas com DNA de ChAdV68.5WTnt.GFP usando o protocolo de lipofectamina. A replicação viral (placas) foi observada 10 dias após a transfecção. Um lisado foi preparado

e usado para reinfectar um frasco T25 de células 293A. As placas virais de ChAdV68.5WTnt.GFP foram visualizadas e fotografadas 3 dias depois usando microscopia fluorescente com ampliação de 100x.

[074] **A Fig. 9** ilustra o esquema de produção de partículas virais.

[075] **A Fig. 10** ilustra o vetor de RNA auto-replicante de VEE (srRNA) derivado de alfavírus.

[076] **A Fig. 11** ilustra a expressão do repórter *in vivo* após a inoculação de camundongos C57BL/6J com de srRNAVEE-Luciferase. São mostradas imagens representativas do sinal de luciferase após a imunização de camundongos C57BL/6J com srRNA de VEE-Luciferase (10 ug por camundongo, injeção intramuscular bilateral, MC3 encapsulado) em vários pontos de tempo.

[077] **A Fig. 12A** ilustra as respostas de células T medidas 14 dias após a imunização com srRNA de VEE formulado com MC3 LNP em camundongos com tumor B16-OVA. Camundongos C57BL/6J com tumor B16-OVA com foram injetados com 10 ug de srRNA de VEE-Luciferase (controle), srRNA de VEE-UbAAY (Vax), srRNA de VEE-Luciferase e anti-CTLA-4 (aCTLA-4) ou srRNA de VEE-UbAAY e anti-CTLA-4 (Vax + aCTLA-4). Além disso, todos os camundongos foram tratados com mAb anti-PD1 começando no dia 7. Cada grupo consistia em 8 camundongos. Os camundongos foram sacrificados e os baços e os nódulos linfáticos foram coletados 14 dias após a imunização. As respostas de células T específicas de SIINFEKL (“SIINFEKL” revelada como SEQ ID NO: 72) foram avaliadas por IFN-gama ELISPOT e são relatadas como células formadoras de manchas (SFC) por 106 esplenócitos. As linhas representam medianas.

[078] **A Fig. 12B** ilustra as respostas de células T medidas 14 dias após a imunização com srRNA de VEE formulado com MC3 LNP em camundongos com tumor B16-OVA. Camundongos C57BL/6J com tumor B16-OVA com foram injetados com 10 ug de srRNA de VEE-Luciferase (controle), srRNA de VEE-UbAAY (Vax), srRNA de VEE-Luciferase e anti-CTLA-4 (aCTLA-4) ou srRNA de VEE-UbAAY e anti-CTLA-4 (Vax + aCTLA-4). Além disso, todos os camundongos foram tratados com mAb anti-PD1 começando no dia 7. Cada grupo consistia em 8 camundongos. Os camundongos foram sacrificados e os baços e os nódulos linfáticos foram coletados 14 dias após a imunização. As respostas de células T específicas de SIINFEKL ("SIINFEKL" revelada como SEQ ID NO: 72) foram avaliadas por coloração de MHCI-pentâmero, relatadas como células positivas para pentâmero como uma porcentagem de células positivas para CD8. As linhas representam medianas.

[079] **A Fig. 13A** ilustra respostas de células T específicas de antígeno após iniciação/reforço heterólogo em camundongos com tumor B16-OVA. Camundongos C57BL/6J com tumor B16-OVA com foram injetados com adenovírus expressando GFP (Ad5-GFP) e reforçados com srRNA de VEE-Luciferase formulado com MC3 LNP (Controle) ou Ad5-UbAAY e reforçado com VEE-UbAAY srRNA (Vax). Tanto os grupos Controle quanto Vax também foram tratados com um mAb de controle de IgG. Um terceiro grupo foi tratado com o reforço Ad5-GFP prime/srRNA de VEE-Luciferase em combinação com anti-CTLA-4 (aCTLA-4), enquanto o quarto grupo foi tratado com o reforço Ad5-UbAAY prime/VEE-UbAAY em combinação com anti-CTLA-4 (Vax + aCTLA-4). Além disso, todos os camundongos foram tratados com mAb anti-PD-1 começando no dia 21. As respostas das células T

foram medidas por IFN-gama ELISPOT. Os camundongos foram sacrificados e baços e nódulos linfáticos coletados 14 dias após a imunização com adenovírus.

[080] **A Fig. 13B** ilustra respostas de células T específicas de antígeno após iniciação/reforço heterólogo em camundongos com tumor B16-OVA. Camundongos C57BL/6J com tumor B16-OVA com foram injetados com adenovírus expressando GFP (Ad5-GFP) e reforçados com srRNA de VEE-Luciferase formulado com MC3 LNP (Controle) ou Ad5-UbAAY e reforçado com VEE-UbAAY srRNA (Vax). Tanto os grupos Controle quanto Vax também foram tratados com um mAb de controle de IgG. Um terceiro grupo foi tratado com o reforço Ad5-GFP prime/srRNA de VEE-Luciferase em combinação com anti-CTLA-4 (aCTLA-4), enquanto o quarto grupo foi tratado com o reforço Ad5-UbAAY prime/VEE-UbAAY em combinação com anti-CTLA-4 (Vax + aCTLA-4). Além disso, todos os camundongos foram tratados com mAb anti-PD-1 começando no dia 21. As respostas das células T foram medidas por IFN-gama ELISPOT. Os camundongos foram sacrificados e os baços e nódulos linfáticos coletados 14 dias após a imunização com adenovírus e 14 dias após o reforço com srRNA (dia 28 após a iniciação).

[081] **A Fig. 13C** ilustra respostas de células T específicas de antígeno após iniciação/reforço heterólogo em camundongos com tumor B16-OVA. Camundongos C57BL/6J com tumor B16-OVA com foram injetados com adenovírus expressando GFP (Ad5-GFP) e reforçados com srRNA de VEE-Luciferase formulado com MC3 LNP (Controle) ou Ad5-UbAAY e reforçado com VEE-UbAAY srRNA (Vax). Tanto os grupos Controle quanto Vax também foram tratados com um mAb de controle de IgG. Um terceiro grupo foi tratado com o reforço Ad5-GFP prime/srRNA

de VEE-Luciferase em combinação com anti-CTLA-4 (aCTLA-4), enquanto o quarto grupo foi tratado com o reforço Ad5-UbAAY prime/VEE-UbAAY em combinação com anti-CTLA-4 (Vax + aCTLA-4). Além disso, todos os camundongos foram tratados com mAb anti-PD-1 começando no dia 21. As respostas das células T foram medidas por coloração com pentâmero de MHC de classe I. Os camundongos foram sacrificados e baços e nódulos linfáticos coletados 14 dias após a imunização com adenovírus.

[082] **A Fig. 13D** ilustra respostas de células T específicas de antígeno após iniciação/reforço heterólogo em camundongos com tumor B16-OVA. Camundongos C57BL/6J com tumor B16-OVA com foram injetados com adenovírus expressando GFP (Ad5-GFP) e reforçados com srRNA de VEE-Luciferase formulado com MC3 LNP (Controle) ou Ad5-UbAAY e reforçado com VEE-UbAAY srRNA (Vax). Tanto os grupos Controle quanto Vax também foram tratados com um mAb de controle de IgG. Um terceiro grupo foi tratado com o reforço Ad5-GFP prime/srRNA de VEE-Luciferase em combinação com anti-CTLA-4 (aCTLA-4), enquanto o quarto grupo foi tratado com o reforço Ad5-UbAAY prime/VEE-UbAAY em combinação com anti-CTLA-4 (Vax + aCTLA-4). Além disso, todos os camundongos foram tratados com mAb anti-PD-1 começando no dia 21. As respostas das células T foram medidas por coloração com pentâmero de MHC de classe I. Os camundongos foram sacrificados e os baços e nódulos linfáticos coletados 14 dias após a imunização com adenovírus e 14 dias após o reforço com srRNA (dia 28 após a iniciação).

[083] **A Fig. 14A** ilustra respostas de células T específicas de antígeno após iniciação/reforço heterólogo em camundongos portadores de tumor CT26 (Balb/c). Os

camundongos foram imunizados com Ad5-GFP e reforçados 15 dias após o adenovírus inicial com srRNA de VEE-Luciferase formulado com MC3 LNP (Controle) ou iniciado com Ad5-UbAAY e reforçado com srRNA de VEE-UbAAY (Vax). Tanto os grupos Controle quanto Vax também foram tratados com um mAb de controle de IgG. A um grupo separado foi administrado a iniciação/reforço de Ad5-GFP/srRNA de VEE-Luciferase em combinação com anti-PD-1 (aPD1), enquanto um quarto grupo recebeu a iniciação/reforço de Ad5-UbAAY/srRNA de VEE-UbAAY em combinação com um mAb anti-PD-1 (Vax + aPD1). As respostas das células T ao peptídeo AH1 foram medidas usando IFN-gama ELISPOT. Os camundongos foram sacrificados e baços e nódulos linfáticos coletados 12 dias após a imunização com adenovírus.

[084] **A Fig. 14B** ilustra respostas de células T específicas de antígeno após iniciação/reforço heterólogo em camundongos portadores de tumor CT26 (Balb/c). Os camundongos foram imunizados com Ad5-GFP e reforçados 15 dias após o adenovírus inicial com srRNA de VEE-Luciferase formulado com MC3 LNP (Controle) ou iniciado com Ad5-UbAAY e reforçado com srRNA de VEE-UbAAY (Vax). Tanto os grupos Controle quanto Vax também foram tratados com um mAb de controle de IgG. A um grupo separado foi administrado a iniciação/reforço de Ad5-GFP/srRNA de VEE-Luciferase em combinação com anti-PD-1 (aPD1), enquanto um quarto grupo recebeu a iniciação/reforço de Ad5-UbAAY/srRNA de VEE-UbAAY em combinação com um mAb anti-PD-1 (Vax + aPD1). As respostas das células T ao peptídeo AH1 foram medidas usando IFN-gama ELISPOT. Os camundongos foram sacrificados e os baços e nódulos linfáticos coletados 12 dias após a imunização com

adenovírus e 6 dias após o reforço com srRNA (dia 21 após a iniciação).

[085] **A Fig. 15** ilustra ChAdV68 induzindo respostas de células T a antígenos tumorais de camundongo em camundongos. Os camundongos foram imunizados com ChAdV68.5WTnt.MAG25mer, e as respostas das células T ao epítopo de MHC de classe I SIINFEKL (SEQ ID NO: 72) (OVA) foram medidas em camundongos fêmeas C57BL/6J e o epítopo de MHC de classe I AH1-A5 medido em camundongos Balb/c. Média de células formadoras de manchas (SFCs) por 10^6 esplenócitos medidos nos ensaios ELISpot apresentados. As barras de erro representam desvio padrão.

[086] **A Fig. 16** ilustra as respostas imunes celulares em um modelo de tumor CT26 após uma única imunização com ChAdV6, ChAdV + anti-PD-1, srRNA, srRNA + anti-PD-1 ou anti-PD-1 sozinho. A produção de IFN-gama específica para o antígeno foi medida em esplenócitos para 6 camundongos de cada grupo usando ELISpot. Os resultados são apresentados como células formadoras de manchas (SFC) por 10^6 esplenócitos. Mediana para cada grupo indicada pela linha horizontal. Valores de P determinados usando o teste de comparação múltipla de Dunnett; *** P <0,0001, ** P <0,001, * P <0,05. ChAdV = ChAdV68.5WTnt.MAG25mer; srRNA = VEE-MAG25mer srRNA.

[087] **A Fig. 17** ilustra as respostas de célula T CD8 em um modelo de tumor CT26 após uma única imunização com ChAdV6, ChAdV + anti-PD-1, srRNA, srRNA + anti-PD-1 ou anti-PD-1 sozinho. Produção de IFN-gama específico de antígeno em células T CD8 medida usando ICS e os resultados apresentados como células T CD8 específicas de antígeno como uma porcentagem do total de células T CD8. Mediana para cada

grupo indicada pela linha horizontal. Valores de P determinados usando o teste de comparação múltipla de Dunnett; *** P <0,0001, ** P <0,001, * P <0,05. ChAdV = ChAdV68.5WTnt.MAG25mer; srRNA = VEE-MAG25mer srRNA.

[088] **A Fig. 18** ilustra o crescimento do tumor em um modelo de tumor CT26 após imunização com uma iniciação/reforço heterólogo de ChAdV/srRNA, uma iniciação/reforço heterólogo de srRNA/ChAdV ou uma iniciação/reforço homólogo de srRNA/srRNA. Também ilustrado em uma comparação das imunizações de iniciação/reforço com ou sem administração de anti-PD1 durante a iniciação e reforço. Volumes tumorais medidos duas vezes por semana e volumes médios tumorais apresentados nos primeiros 21 dias do estudo. 22-28 ratos por grupo no início do estudo. Barras de erro representam o erro padrão da média (SEM). Valores de P determinados usando o teste de Dunnett; *** P <0,0001, ** P <0,001, * P <0,05. ChAdV = ChAdV68.5WTnt.MAG25mer; srRNA = VEE-MAG25mer srRNA.

[089] **A Fig. 19** ilustra a sobrevivência em um modelo de tumor CT26 após imunização com uma iniciação/reforço heterólogo de ChAdV/srRNA, uma iniciação/reforço heterólogo de srRNA/ChAdV ou uma iniciação/reforço homólogo de srRNA/srRNA. Também ilustrado em uma comparação das imunizações de iniciação/reforço com ou sem administração de anti-PD1 durante a iniciação e reforço. Valores de P determinados usando o teste de log-rank; *** P <0,0001, ** P <0,001, * P <0,01. ChAdV = ChAdV68.5WTnt.MAG25mer; srRNA = VEE-MAG25mer srRNA.

[090] **A Fig. 20A** ilustra as respostas imunes celulares específicas do antígeno medidas usando ELISpot. A produção

de IFN-gama específica do antígeno para seis epítopos restritos de mamu A01 diferentes foi medida em PBMCs para o VEE-MAG25mer srRNA-LNP1 (30 µg) usando ELISpot 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 ou 10 semanas após a imunização inicial (6 macacos rhesus por grupo). Os resultados são apresentados como células formadoras de manchas médias (SFC) por 10^6 PBMCs para cada epítopo em um formato de gráfico de barras empilhadas. Os valores para cada animal foram normalizados para os níveis de pré-sangramento (semana 0).

[091] **A Fig. 20B** ilustra as respostas imunes celulares específicas para o antígeno medidas usando ELISpot. A produção de IFN-gama específica do antígeno para seis epítopos restritos de mamu A01 diferentes foi medida em PBMCs para o VEE-MAG25mer srRNA-LNP1 (100 µg) usando ELISpot 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 ou 10 semanas após a imunização inicial (6 macacos rhesus por grupo). Os resultados são apresentados como células formadoras de manchas médias (SFC) por 10^6 PBMCs para cada epítopo em um formato de gráfico de barras empilhadas. Os valores para cada animal foram normalizados para os níveis de pré-sangramento (semana 0)

[092] **A Fig. 20C** ilustra as respostas imunes celulares específicas para o antígeno medidas usando ELISpot. A produção de IFN-gama específica do antígeno para seis epítopos restritos de mamu A01 diferentes foi medida em PBMCs para a iniciação/reforço de VEE-MAG25mer srRNA-LNP2 (100 µg) usando ELISpot 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 ou 10 semanas após a imunização inicial (6 macacos rhesus por grupo). Os resultados são apresentados como células formadoras de manchas médias (SFC) por 10^6 PBMCs para cada epítopo em um formato de gráfico de barras empilhadas. Os valores para

cada animal foram normalizados para os níveis de pré-sangramento (semana 0).

[093] **A Fig. 20D** ilustra as respostas imunes celulares específicas para o antígeno medidas usando ELISpot. A produção de IFN-gama específica de antígeno para seis epítopos restritos de mamu A01 diferentes foi medida em PBMCs para o grupo heterólogo iniciação/reforço de srRNA ChAdV68.5WTnt.MAG25mer/VEE-MAG25mer usando ELISpot 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 ou 10 semanas após a imunização inicial (6 macacos rhesus por grupo). Os resultados são apresentados como células formadoras de manchas médias (SFC) por 10^6 PBMCs para cada epítopo em um formato de gráfico de barras empilhadas. Os valores para cada animal foram normalizados para os níveis de pré-sangramento (semana 0).

[094] **A Fig. 21** mostra a resposta imune celular específica do antígeno medida usando ELISpot. A produção de IFN-gama específica de antígeno para seis epítopos restritos de mamu A01 diferentes foi medida em PBMCs após a imunização com o regime de iniciação/reforço heterólogo de srRNA ChAdV68.5WTnt.MAG25mer/VEE-MAG25mer usando ELISpot antes da imunização e 4, 5, 6, 7 , 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24 semanas após a imunização inicial. Os resultados são apresentados como células formadoras de manchas médias (SFC) por 10^6 PBMCs para cada epítopo (6 macacos rhesus por grupo) em um formato de gráfico de barras empilhadas.

[095] **A Fig. 22** mostra a resposta imune celular específica do antígeno medida usando ELISpot. A produção de IFN-gama específica do antígeno para seis epítopos restritos de mamu A01 diferentes foi medida em PBMCs após a imunização

com o regime de iniciação/reforço homólogo VEE-MAG25mer srRNA LNP2 usando ELISpot antes da imunização e 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 semanas após a imunização inicial. Os resultados são apresentados como células formadoras de manchas médias (SFC) por 10^6 PBMCs para cada epítopo (6 macacos rhesus por grupo) em um formato de gráfico de barras empilhadas.

[096] **A Fig. 23** mostra a resposta imune celular específica do antígeno medida usando ELISpot. A produção de IFN-gama específica do antígeno para seis epítopos restritos de mamu A01 diferentes foi medida em PBMCs após a imunização com o regime de iniciação/reforço homólogo VEE-MAG25mer srRNA LNP1 usando ELISpot antes da imunização e 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 semanas após a imunização inicial. Os resultados são apresentados como células formadoras de manchas médias (SFC) por 10^6 PBMCs para cada epítopo (6 macacos rhesus por grupo) em um formato de gráfico de barras empilhadas.

[097] **A FIG. 24A** mostra um exemplo de espectro de peptídeo gerado a partir do padrão de faixa dinâmica da Promega. A Fig. 24A revela SEQ ID NO: 77.

[098] **A FIG. 24B** mostra um exemplo de espectro de peptídeo gerado a partir do padrão de faixa dinâmica da Promega.

[099] **A Fig. 25** mostra a produtividade, conforme avaliada por títulos de IU, das oito placas de crescimento rápido de ChAdV68-MAG selecionadas em comparação com o vírus agrupado não purificado. Os números acima das colunas no gráfico indicam melhorias em relação ao vírus agrupado em uma infecção controlada a um MOI de 0,1.

[100] **A Fig. 26** mostra um esquema do locus E4 e a deleção de 727 bp entre E4orf2-E4orf4 identificado no Clone 1A.

[101] **A Fig. 27** mostra a produtividade do vírus com vírus mais e menos a deleção de E4. Os números acima da barra indicam uma melhoria em relação ao vírus não deletado de E4. A comparação de ChAdV68-MAG com o vírus ChAdV68-MAG-E4 foi realizada em 3 ocasiões distintas. Em cada caso, uma corrida de produção de 400 mL com ambos os vírus foi realizada a um MOI de 1,0. São mostrados títulos de partícula viral (VP) (painel esquerdo) e títulos de unidade infecciosa (IU) (painel direito).

[102] **A Fig. 28** mostra uma análise de Western blot da expressão de MAG usando a expressão de anticorpo de coelho anti-epítopo de classe II em células infectadas com vírus ChAdV68.5WTnt.MAG25mer (“MAG”) e ChAdV68-MAG-E4deletado (“MAG-E4”). As amostras foram tratadas com e sem o inibidor de proteassoma, MG-132, conforme indicado pelos sinais de mais e menos.

[103] **A Fig. 29** ilustra a organização geral dos epítopos modelo de várias espécies para cassetes de antígenos grandes que tinham 30 (L), 40 (XL) ou 50 (XXL) epítopos.

[104] **A Fig. 30** mostra os vetores de ChAd que expressam cassetes longos conforme indicado pelo Western blot acima usando um anticorpo anti-classe II (PADRE) que reconhece uma sequência comum a todos os cassetes. As células HEK293 foram infectadas com vetores ChAdV68 que expressam cassetes grandes (ChAdV68-50XXL, ChAdV68-40XL & ChAdV68-30L) de tamanho variável. As infecções foram estabelecidas em um MOI de 0,2. Vinte e quatro horas após a infecção MG132, um

inibidor de proteassoma foi adicionado a um conjunto de poços infectados (indicado pelo sinal de mais). Outro conjunto de poços tratados com vírus não foram tratados com MG132 (indicado pelo sinal menos). Células HEK293 não infectadas (293F) foram usadas como controle negativo. Quarenta e oito horas após a infecção, precipitados de células foram colhidos e analisados por eletroforese SDS/PAGE e imunotransferência usando um anticorpo de coelho anti-PADRE de Classe II. Um anticorpo anti-coelho HRP e substrato quimioluminescente ECL foram usados para a detecção.

[105] **A Fig. 31** mostra as respostas imunes CD8+ em camundongos imunizados com cassete grande ChAdV68, detectados contra AH1 (parte superior) e SIINFEKL (SEQ ID NO: 72) (parte inferior) por ICS. Os dados são apresentados como células IFNg+ contra o epítopo modelo como % do total de células CD8

[106] **A Fig. 32** mostra as respostas de CD8+ aos tetrâmeros LD-AH1 + (topo) e Kb-SIINFEKL + (parte inferior) ("SIINFEKL" revelada como SEQ ID NO: 72) após vacinação com cassete grande de ChAdV68. Os dados são apresentados como % do total de células CD8 reativas contra o complexo de peptídeo modelo Tetrâmero. * p <0,05, ** p <0,01 por ANOVA com teste de Tukey. Todos os valores de p comparados com o cassete de antígeno MAG 20.

[107] **A Fig. 33** mostra as respostas imunes CD8+ em camundongos tratados com cassete grande de alfavírus, detectados contra AH1 (parte superior) e SIINFEKL (SEQ ID NO: 72) (parte inferior) por ICS. Os dados são apresentados como células IFNg + contra o epítopo modelo como % do total de células CD8. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 por ANOVA

com teste de Tukey. Todos os valores de p comparados com o cassete de antígeno MAG 20.

[108] **A Fig. 34** ilustra a estratégia de vacinação usada para avaliar a imunogenicidade dos vetores contendo o cassete de antígeno em macacos rhesus. Os triângulos indicam a vacinação com ChAdV68 (1e12 vp/animal) nas semanas 0 e 32. Os círculos representam a vacinação de alfavírus nas semanas 0, 4, 12, 20, 28 e 32. Os quadrados representam a administração de um anticorpo anti-CTLA4.

[109] **A Fig. 35** mostra um curso de tempo de respostas anti-epítopo CD8+ em macacos Rhesus dosados com chAd-MAG sozinho (Grupo 4). A média dos esplenócitos SFC/1e6 é mostrada.

[110] **A Fig. 36** mostra um curso de tempo de respostas anti-epítopo CD8+ em Macacos Rhesus dosados com chAd-MAG mais anticorpo anti-CTLA4 (Ipilimumabe) administrado IV (Grupo 5). A média dos esplenócitos SFC/1e6 é mostrada.

[111] **A Fig. 37** mostra um curso de tempo de respostas anti-epítopo CD8+ em Macacos Rhesus dosados com chAd-MAG mais anticorpo anti-CTLA4 (Ipilimumabe) administrado SC (Grupo 6). A média dos esplenócitos SFC/1e6 é mostrada.

[112] **A Fig. 38** mostra as respostas de memória específicas do antígeno geradas pelo protocolo de vacina de ChAdV68/samRNA medido por ELISpot. Os resultados são apresentados como gráficos de pontos individuais, com cada ponto representando um único animal. São mostradas a linha de base pré-imunização (painel esquerdo) e a resposta de memória 18 meses após a primeira imunização (painel direito).

[113] **A Fig. 39** mostra a fenotipagem de células de memória de células T CD8+ específicas de antígeno por

citometria de fluxo usando coloração combinatória com tetrâmero e co-coloração CD45RA/CCR7.

[114] **A Fig. 40** mostra a distribuição dos tipos de células de memória dentro da soma das quatro populações de células T de tetrâmero Mamu-A * 01 + CD8+ no mês de estudo 18. As células de memória foram caracterizadas como segue: CD45RA + CCR7 + = naïve, CD45RA + CCR7- = efetora (Teff), CD45RA-CCR7 + = memória central (Tcm), CD45RA-CCR7- = memória efetora (Tem).

[115] **A Fig. 41** mostra a frequência de células T CD8+ que reconhecem o antígeno tumoral CT26 AH1 em camundongos portadores de tumor CT26. Valores de p determinados usando ANOVA de um fator com teste de comparações múltiplas de Tukey; ** P <0,001, * P <0,05. ChAdV = ChAdV68.5WTnt.MAG25mer; aCTLA4 = anticorpo anti-CTLA4, clone 9D9.

[116] **A Fig. 42A** mostra as respostas imunes CD8+ avaliando a produção de IFN-gama por ICS após estimulação com um AH1 (um epítopo dominante da proteína gp70 do envelope do vírus da leucemia murina) em camundongos Balb/c tratados com vetor ChAdV68-MAG e ChAdV68-E4delta-MAG. Camundongos Balb/c foram imunizados por injeção bilateral de 50 uL de vírus no quadríceps (100 uL no total, 50 uL/perna).

[117] **A Fig. 42B** mostra as respostas de células T avaliando a produção de IFN-gama por ELISpot após estimulação com 6 diferentes epítopos de classe I de macaco rhesus Mamu-A * 01 na semana 2 em macacos Rhesus foram imunizados com ChAdV68-CMV-MAG (painel esquerdo) e ChAdV68 -E4d-CMT-MAG (painel direito), e ambas as condições administraram um anticorpo anti-CTLA4 (Ipilimumabe).

[118] **A Fig. 42C** mostra as respostas de células T avaliando a produção de IFN-gama por ELISpot após estimulação com 6 diferentes epítopos de classe I de macaco rhesus Mamu-A * 01 ao longo do tempo em macacos Rhesus que foram imunizados com ChAdV68-CMV-MAG (painel esquerdo) e ChAdV68-E4d-CMT-MAG (painel direito), e ambas as condições administraram um anticorpo anti-CTLA4 (Ipilimumabe).

[119] **A Fig. 43** ilustra a estratégia geral para um sistema de produção viral controlado por tetraciclina usando o exemplo de vacina que codifica o antígeno.

[120] **A Fig. 44A** apresenta um esquema que mostra o arranjo de uma região de resposta "TETo" em referência ao promotor e ao cassete a serem expressos.

[121] **A Fig. 44B** apresenta um esquema que mostra o arranjo de uma região de resposta "CMT" em referência ao promotor e ao cassete a serem expressos.

[122] **A Fig. 45A** mostra a regulação mediada por TETr de GFP expressa a partir de um vetor ChAdV68 com uma sequência TETo. GFP é significativamente reduzido em células 293F que expressam o TETr (Clone 17, painel direito) em relação à linha de células 293F parental (painel esquerdo). As células foram infectadas em um MOI de 1 com ChAdV68-TETo-GFP e 24h depois o GFP foi avaliado por microscopia fluorescente sob uma objetiva de 10X.

[123] **A Fig. 45B** mostra a regulação mediada por TETr de SEAP expressa a partir de um vetor ChAdV68 com uma sequência CMT. SEAP é significativamente reduzido em células 293F que expressam o TETr (Clone 17, segunda coluna da esquerda) em relação à linha de células 293F parental (coluna da esquerda). O sinal de fundo foi estabelecido usando um

vetor ChAdV68 que expressa um cassete de expressão de controle (duas colunas à direita). As células 293F foram infectadas em um MOI de 0,3 e 24h mais tarde o meio foi colhido para o ensaio SEAP (Phospha-LightTM System (Applied Biosystems) usando um substrato quimioluminescente para a detecção de fosfatase alcalina secretada) que foi seguido de acordo com a descrição do fabricante.

[124] **A Fig. 46** mostra a produção viral para um vetor ChAdV68-Teto-MAG em uma linha repressora 293F TETr (Clone 17) em relação à produção na linha 293F parental. O experimento foi realizado em triplicata (execução 1-3). Em cada experimento, 400 mL de células 293F foram infectados em um MOI de aproximadamente 3 e incubados por 48-72 horas antes da colheita. O vírus foi purificado por duas etapas de ultracentrifugação CsCl descontínuas e dialisado em tampão de armazenamento. As partículas virais foram medidas por absorbância a 260 nm. São mostrados títulos de partículas virais (VP; painéis superiores) e unidades infecciosas (IU; painéis inferiores).

[125] **A Fig. 47A** mostra a produtividade geral de um vírus regulado por Tet ("TETo-MAG") em uma linha 293F TETr (Clone 17) em relação a um vírus não regulado ("MAG") com o mesmo cassete em uma linha celular 293F normal. São mostradas as datas de várias execuções de produção de 400 mL seguidas por centrifugação. A melhoria do número de vezes com o vírus regulado por Tet é indicada pelo número acima do gráfico.

[126] **A Fig. 47B** mostra a produção viral para os vírus ChAdV68-CT-TSNA, ChAdV68-TETo-TSNA, ChAdV68-CMT-TSNA e ChAdV68-E4d-CMT-TSNA em relação ao ChAdV68-CMV-TSNA.

[127] **A Fig. 47C** mostra a produção viral para cassetes

de antígeno modelo 50XXL e M2.2 usando vetores adenovirais com uma região de resposta CMT em uma linha celular que expressa tTS.

[128] **A Fig. 48** mostra as respostas de células T específicas do antígeno após a vacinação com vetores regulados versus não regulados. Produção de IFN-gama específico de antígeno em células T CD8 medida usando ICS e os resultados apresentados como células T CD8 específicas de antígeno como uma porcentagem do total de células T CD8. Mediana para cada grupo indicada pela linha horizontal. Os camundongos Balb/c foram imunizados com $1x10^{10}$ VP de vacinas de ChAdV68 que expressam um modelo de cassete de antígeno sob o controle do promotor CMV normal (ChAdV-MAG) ou um promotor regulado por TETo (TET-ChAdV-MAG). 12 dias após a vacinação, os baços foram colhidos e suspensões de células únicas feitas.

DESCRIÇÃO DETALHADA

I. Definições

[129] Em geral, os termos usados nas reivindicações e no relatório descritivo devem ser interpretados como tendo o significado claro compreendido por versado na técnica. Certos termos são definidos abaixo para fornecer clareza adicional. Em caso de conflito entre o significado claro e as definições fornecidas, as definições fornecidas devem ser usadas.

[130] Conforme usado neste documento, o termo "antígeno" é uma substância que induz uma resposta imune. Um antígeno pode ser um neoantígeno. Um antígeno pode ser um "antígeno compartilhado" que é um antígeno encontrado entre uma população específica, *por exemplo*, uma população

específica de pacientes com câncer ou indivíduos infectados. Um antígeno pode ser associado ou derivado de um organismo infeccioso.

[131] Conforme usado neste documento, o termo "neoantígeno" é um antígeno que possui pelo menos uma alteração que o distingue do antígeno correspondente do tipo selvagem, por exemplo, via mutação em uma célula tumoral ou modificação pós-traducional específica para uma célula tumoral. Um neoantígeno pode incluir uma sequência de polipeptídeo ou uma sequência de ácido nucleico. Uma mutação pode incluir uma substituição de deslocamento de quadro ou sem deslocamento de quadro, missense ou sem sentido, alteração no sítio de junção, rearranjo genômico ou fusão de genes, ou qualquer alteração genômica ou de expressão que dê origem a um neoORF. Uma mutação também pode incluir uma variante de splice. Modificações pós-traducionais específicas para uma célula tumoral podem incluir fosforilação aberrante. Modificações pós-traducionais específicas para uma célula tumoral também podem incluir um antígeno emendado gerado por proteassoma. *Ver* Liepe et al., A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides; Science. 21 de outubro de 2016; 354 (6310): 354-358. O sujeito pode ser identificado para administração através do uso de vários métodos de diagnóstico, por exemplo, métodos de seleção de pacientes descritos mais abaixo.

[132] Tal como aqui utilizado, o termo "antígeno tumoral" é um antígeno presente na célula tumoral ou tecido de um sujeito, mas não na célula ou tecido normal correspondente do sujeito, ou derivado de um polipeptídeo

conhecido ou que tenha alterado a expressão em uma célula tumoral ou tecido canceroso em comparação com uma célula ou tecido normal.

[133] Conforme usado neste documento, o termo "vacina baseada em antígeno" é uma composição de vacina baseada em um ou mais antígenos, por exemplo, uma pluralidade de antígenos. As vacinas podem ser baseadas em nucleotídeos (*por exemplo*, baseadas em vírus, baseadas em RNA ou baseadas em DNA), baseadas em proteínas (*por exemplo*, baseadas em peptídeos) ou uma combinação das mesmas.

[134] Conforme usado neste documento, o termo "antígeno candidato" é uma mutação ou outra aberração que dá origem a uma sequência que pode representar um antígeno.

[135] Conforme usado neste documento, o termo "região codificadora" é a(s) porção(ões) de um gene que codifica a proteína.

[136] Conforme usado neste documento, o termo "mutação codificadora" é uma mutação que ocorre em uma região codificadora.

[137] Conforme usado neste documento, o termo "ORF" significa quadro de leitura aberto.

[138] Conforme usado neste documento, o termo "NEO-ORF" é um ORF específico de um tumor resultante de uma mutação ou outra aberração, como splicing.

[139] Conforme usado neste documento, o termo "mutação missense" é uma mutação que causa uma substituição de um aminoácido para outro.

[140] Conforme usado neste documento, o termo "mutação sem sentido" é uma mutação que causa uma substituição de um aminoácido para um códon de parada ou que causa a remoção de

um códon de início canônico.

[141] Conforme usado neste documento, o termo "mutação de deslocamento de quadro" é uma mutação que causa uma alteração no quadro da proteína.

[142] Conforme usado neste documento, o termo "indel" é uma inserção ou deleção de um ou mais ácidos nucleicos.

[143] Conforme usado neste documento, o termo porcentagem de "identidade", no contexto de duas ou mais sequências de ácidos nucleicos ou de polipeptídeo, refere-se a duas ou mais sequências ou subsequências que possuem uma porcentagem especificada de nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos iguais, quando comparados e alinhados para máxima correspondência, conforme medido usando um dos algoritmos de comparação de sequência descritos abaixo (por exemplo, BLASTP e BLASTN ou outros algoritmos disponíveis para pessoas habilitadas) ou por inspeção visual. Dependendo da aplicação, a porcentagem de "identidade" pode existir em uma região da sequência que está sendo comparada, por exemplo, em um domínio funcional ou, alternativamente, em todo o comprimento das duas sequências a serem comparadas.

[144] Para comparação de sequências, tipicamente uma sequência atua como uma sequência de referência, com a qual as sequências de teste são comparadas. Quando se utiliza um algoritmo de comparação de sequências, as sequências de teste e de referência são introduzidas em um computador, são designadas coordenadas de subsequência, se necessário, e são designados parâmetros de programa de algoritmo de sequência. O algoritmo de comparação de sequências calcula então a porcentagem de identidade de sequência para a(s) sequência(s) de teste em relação à sequência de referência,

com base nos parâmetros de programa designados. Alternativamente, a similaridade ou dissimilaridade de sequência pode ser estabelecida pela presença ou ausência combinada de nucleotídeos específicos ou, para sequências traduzidas, aminoácidos em posições de sequência selecionadas (por exemplo, motivos de sequência).

[145] O alinhamento ideal de sequências para comparação pode ser conduzido, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981); pelo algoritmo de alinhamento por homologia de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), pela busca do método de similaridade de Pearson e Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), por implementações computadorizadas desses algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) ou por inspeção visual (ver geralmente Ausubel et al.).

[146] Um exemplo de um algoritmo que é adequado para determinar a porcentagem de identidade de sequência e similaridade de sequência é o algoritmo BLAST, descrito em Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). O programa para a realização de análises por BLAST está disponível publicamente através do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia.

[147] Conforme usado neste documento, o termo “sem interrupção ou leitura” é uma mutação que causa a remoção do códon natural de parada.

[148] Conforme usado neste documento, o termo “epítopo” é a porção específica de um antígeno tipicamente ligado a um anticorpo ou receptor de célula T.

[149] Conforme usado neste documento, o termo “imunogênico” é a capacidade de obter uma resposta imune, por exemplo, via células T, células B ou ambas.

[150] Conforme usado neste documento, o termo “afinidade de ligação ao HLA” “afinidade de ligação ao MHC” significa afinidade de ligação entre um antígeno específico e um alelo específico de MHC.

[151] Conforme usado neste documento, o termo “isca” é uma sonda de ácido nucleico usada para enriquecer uma sequência específica de DNA ou RNA a partir de uma amostra.

[152] Conforme usado neste documento, o termo “variante” é uma diferença entre os ácidos nucleicos de um sujeito e o genoma humano de referência usado como controle.

[153] Conforme usado neste documento, o termo “chamada de variante” é uma determinação algorítmica da presença de uma variante, tipicamente a partir do sequenciamento.

[154] Conforme usado neste documento, o termo “polimorfismo” é uma variante da linhagem germinativa, ou seja, uma variante encontrada em todas as células portadoras de DNA de um indivíduo.

[155] Conforme usado neste documento, o termo “variante somática” é uma variante que surge em células da linhagem não germinativa de um indivíduo.

[156] Conforme usado neste documento, o termo “alelo” é uma versão de um gene ou uma versão de uma sequência genética ou uma versão de uma proteína.

[157] Conforme usado neste documento, o termo “tipo HLA” é o complemento dos alelos do gene HLA.

[158] Conforme usado neste documento, o termo “decaimento mediado sem sentido” ou “NMD” é uma degradação

de um mRNA por uma célula devido a um códon de parada prematuro.

[159] Conforme usado neste documento, o termo "mutação truncal" é uma mutação originada no início do desenvolvimento de um tumor e presente em uma porção substancial das células do tumor.

[160] Conforme usado neste documento, o termo "mutação subclonal" é uma mutação originada posteriormente no desenvolvimento de um tumor e presente em apenas um subconjunto das células do tumor.

[161] Conforme usado neste documento, o termo "exoma" é um subconjunto do genoma que codifica proteínas. Um exoma pode ser o éxon coletivo de um genoma.

[162] Conforme usado neste documento, o termo "regressão logística" é um modelo de regressão para dados binários a partir de estatísticas, onde o logit da probabilidade de que a variável dependente seja igual a um é modelado como uma função linear das variáveis dependentes.

[163] Conforme usado neste documento, o termo "rede neural" é um modelo de aprendizagem por máquina para classificação ou regressão que consiste em várias camadas de transformações lineares seguidas por não linearidades por elementos normalmente treinadas por descida estocástica de gradiente e propagação inversa.

[164] Conforme usado neste documento, o termo "proteoma" é o conjunto de todas as proteínas expressas e/ou traduzidas por uma célula, grupo de células ou indivíduo.

[165] Conforme usado neste documento, o termo "peptidoma" é o conjunto de todos os peptídeos apresentados por MHC-I ou MHC-II na superfície celular. O peptidoma pode

se referir a uma propriedade de uma célula ou a uma coleção de células (por exemplo, o peptidoma do tumor, significando a união dos peptidomas de todas as células que compõem o tumor).

[166] Conforme usado neste documento, o termo "ELISPOT" significa ensaio de imunoabsorção enzimática - que é um método comum para monitorar respostas imunes em humanos e animais.

[167] Conforme usado neste documento, o termo "dextrâmeros" é um multímero de peptídeo-MHC à base de dextrana usado para coloração de células T específicas ao antígeno na citometria de fluxo.

[168] Conforme usado neste documento, o termo "tolerância ou tolerância imunológica" é um estado de não resposta imune a um ou mais antígenos, por exemplo, autoantígenos.

[169] Conforme usado neste documento, o termo "tolerância central" é uma tolerância afetada no timo, seja pela exclusão de clones de células T autorreativos ou pela promoção de clones de células T autorreativos para diferenciar as células T reguladoras imunossupressoras (Tregs).

[170] Conforme usado neste documento, o termo "tolerância periférica" é uma tolerância afetada na periferia ao sobrerregular ou anergizar células T autorreativas que sobrevivem à tolerância central ou fazer com que essas células T se diferenciem em Tregs.

[171] O termo "amostra" pode incluir uma única célula ou múltiplas células ou fragmentos de células ou uma alíquota de fluido corporal, tirada de um sujeito, por meios que

incluem punção venosa, excreção, ejaculação, massagem, biópsia, aspirado de agulha, amostra de lavagem, raspagem, incisão cirúrgica ou intervenção ou outros meios conhecidos na técnica.

[172] O termo "sujeito" abrange uma célula, tecido ou organismo, humano ou não humano, seja in vivo, ex vivo ou in vitro, masculino ou feminino. O termo sujeito inclui mamíferos, incluindo seres humanos.

[173] O termo "mamífero" abrange humanos e não humanos e inclui, mas não está limitado a, humanos, primatas não humanos, caninos, felinos, murinos, bovinos, equinos e porcinos.

[174] O termo "fator clínico" refere-se a uma medida de uma condição de um sujeito, por exemplo, atividade ou gravidade da doença. O "fator clínico" abrange todos os marcadores do estado de saúde de um sujeito, incluindo marcadores que não são de amostra e/ou outras características de um sujeito, como, sem limitação, idade e sexo. Um fator clínico pode ser uma pontuação, um valor ou um conjunto de valores que podem ser obtidos pela avaliação de uma amostra (ou população de amostras) de um sujeito ou sujeito sob uma determinada condição. Um fator clínico também pode ser predito por marcadores e/ou outros parâmetros, como substitutos da expressão genética. Os fatores clínicos podem incluir tipo de tumor, subtipo de tumor e histórico de tabagismo.

[175] O termo "derivado" refere-se a sequências extraídas diretamente de um tecido ou amostra do sujeito (*por exemplo*, um tumor, célula, célula infectada ou organismo com doença infecciosa), por exemplo, via RT-PCR; ou dados de

sequência obtidos por sequenciamento do tecido ou amostra em questão e, em seguida, sintetizando as sequências de ácido nucleico usando os dados de sequenciamento, por exemplo, por meio de vários métodos sintéticos ou baseados em PCR conhecidos na técnica. "Derivado" pode incluir variantes de sequência de ácido nucleico, como variantes de sequência de ácido nucleico com códon otimizado, que codificam a mesma sequência polide peptídeo como uma sequência de ácido nucleico nativa correspondente, tal como uma sequência de ácido nucleico de organismo com doença infecciosa nativa correspondente. "Derivado" também pode incluir variantes que codificam uma sequência de polipeptídeo modificada, tal como uma sequência de polipeptídeo de organismo de doença infecciosa, tendo uma ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5) mutações em relação a uma sequência de polipeptídeo nativa, tal como sequência de polipeptídeo de organismo com doença infecciosa nativa. Por exemplo, uma sequência de polipeptídeo modificada pode ter uma ou mais mutações missense (*por exemplo*, mutações modificadas) em relação à sequência de polipeptídeo nativa.

[176] O termo "alfavírus" refere-se a membros da família *Togaviridae* e são vírus de RNA de fita simples de sentido positivo. Os alfavírus são normalmente classificados como vírus do Velho Mundo, como Sindbis, Ross River, Mayaro, Chikungunya e Semliki Forest, ou Novo Mundo, como encefalite equina oriental, Aura, Fort Morgan ou encefalite equina venezuelana e sua cepa derivada TC- 83. Os alfavírus são tipicamente vírus de RNA auto-replicantes.

[177] O termo "estrutura de alfavírus" refere-se a sequência(s) mínima(s) de um alfavírus que permite a

autorreplicação do genoma viral. Sequências mínimas podem incluir sequências conservadas para amplificação mediada por proteína não estrutural, um gene de proteína não estrutural 1 (nsP1), um gene nsP2, um gene nsP3, um gene nsP4 e uma sequência poliA, bem como sequências para expressão de RNA viral subgenômico incluindo um elemento promotor 26S.

[178] O termo "sequências para amplificação não estrutural mediada por proteínas" inclui elementos de sequência conservada de alfavírus (CSE) bem conhecidos pelos versados na técnica. Os CSEs incluem, mas não estão limitados a, um alfavírus 5'UTR, um 51-nt CSE, um 24-nt CSE ou outra sequência promotora subgenômica 26S, um 19-nt CSE e um alfavírus 3' UTR.

[179] O termo "RNA polimerase" inclui polimerases que catalisam a produção de polinucleotídeos de RNA a partir de um molde de DNA. RNA polimerases incluem, mas não estão limitados a, polimerases derivadas de bacteriófagos, incluindo T3, T7 e SP6.

[180] O termo "lipídio" inclui moléculas hidrofóbicas e/ou anfifílicas. Os lipídios podem ser catiônicos, aniônicos ou neutros. Os lipídios podem ser sintéticos ou derivados naturalmente e, em alguns casos, biodegradáveis. Os lípidos podem incluir colesterol, fosfolípidos, conjugados de lípidos incluindo, mas não se limitando a, conjugados de polietilenoglicol (PEG) (lípidos PEGuilados), ceras, óleos, glicerídeos, gorduras e vitaminas solúveis em gordura. Os lipídios também podem incluir dilinoleilmetil-4-dimetilaminobutirato (MC3) e moléculas semelhantes a MC3.

[181] O termo "nanopartícula de lipídio" ou "LNP" inclui estruturas semelhantes a vesículas formadas usando

uma membrana contendo lipídios circundando um interior aquoso, também referido como lipossomas. Nanopartículas de lipídios incluem composições à base de lipídios com um núcleo de lipídio sólido estabilizado por um tensoativo. Os lipídios do núcleo podem ser ácidos graxos, acilgliceróis, ceras e misturas desses tensoativos. Lípidos de membrana biológica, como fosfolípidos, esfingomielinas, sais biliares (taurocolato de sódio) e esteróis (colesterol), podem ser utilizados como estabilizantes. Nanopartículas de lipídio podem ser formadas usando proporções definidas de diferentes moléculas de lipídios, incluindo, mas não se limitando a, proporções definidas de um ou mais lipídios catiônicos, aniônicos ou neutros. Nanopartículas de lipídio podem encapsular moléculas dentro de um invólucro de membrana externa e, subsequentemente, podem ser colocadas em contato com células-alvo para entregar as moléculas encapsuladas ao citosol da célula hospedeira. Nanopartículas de lipídio podem ser modificadas ou funcionalizadas com moléculas não lipídicas, inclusive em sua superfície. Nanopartículas lipídicas podem ser de camada única (unilamelar) ou multicamadas (multilamelar). Nanopartículas de lipídio podem ser complexadas com ácido nucleico. Nanopartículas de lipídio unilamelares podem ser complexadas com ácido nucleico, em que o ácido nucleico está no interior aquoso. Nanopartículas de lipídio multilamelares podem ser complexadas com ácido nucleico, em que o ácido nucleico está no interior aquoso, ou para formar ou imprensadas entre

[182] Abreviações: MHC: complexo principal de histocompatibilidade; HLA: antígeno leucocitário humano, ou

o locus do gene MHC humano; NGS: sequenciamento de próxima geração; PPV: valor preditivo positivo; TSNA: neoantígeno específico de tumor; FFPE: fixado em formalina, embebido em parafina; NMD: decaimento mediado por nonsense; NSCLC: câncer de pulmão de células não pequenas; DC: célula dendrítica.

[183] Deve ser notado que, conforme usado neste relatório descritivo e nas reivindicações anexas, as formas singulares “um” “uma” e “o/a” incluem referentes plurais, a menos que o contexto indique claramente de outra forma.

[184] A menos que especificamente estabelecido ou de outra forma evidente a partir do contexto, como aqui utilizado, o termo “cerca de” é entendido como dentro de uma faixa de tolerância normal na técnica, por exemplo dentro de 2 desvios padrão da média. “Cerca de “pode ser compreendido como dentro de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, ou 0,01% do valor declarado. A menos que caso contrário claro a partir do contexto, todos os valores numéricos providos neste documento são modificados pelo termo cerca de.

[185] Quaisquer termos não definidos diretamente neste documento devem ser entendidos como tendo os significados comumente associados a eles, como entendidos na técnica da invenção. Certos termos são discutidos aqui para fornecer orientação adicional ao profissional na descrição das composições, dispositivos, métodos e semelhantes de aspectos da invenção, e como fazê-los ou usá-los. Será compreendido que a mesma coisa pode ser dita em mais de uma maneira. Consequentemente, a linguagem alternativa e sinônimos podem ser utilizados para qualquer um ou mais dos termos discutidos

neste documento. Não se deve dar importância ao fato de um termo ser ou não elaborado ou discutido aqui. São fornecidos alguns sinônimos ou métodos substituíveis, materiais e semelhantes. O considerando de um ou alguns sinônimos ou equivalentes não exclui o uso de outros sinônimos ou equivalentes, a menos que seja declarado explicitamente. O uso de exemplos, incluindo exemplos de termos, é apenas para fins ilustrativos e não limita o escopo e o significado dos aspectos da invenção aqui descritos.

[186] Todas as referências, patentes emitidas e pedidos de patente citados no corpo do relatório descritivo estão incorporados por referência na sua totalidade, para todos os fins.

II. Métodos de identificação de antígenos

[187] Métodos para identificar antígenos (*por exemplo*, antígenos derivados de um tumor ou organismo infeccioso) incluem a identificação de antígenos que provavelmente serão apresentados na superfície de uma célula (*por exemplo*, apresentados por MHC em uma célula tumoral, uma célula infectada ou uma célula imune, incluindo células de apresentação de antígeno profissionais, como células dendríticas), e/ou são provavelmente imunogênicas. Como um exemplo, um tal método pode compreender as etapas de: obter pelo menos um de exoma, transcriptoma ou sequenciamento de nucleotídeo do genoma completo e/ou dados de expressão de um tumor, uma célula infectada ou um organismo de doença infecciosa, em que os dados de sequenciamento de nucleotídeos e/ou dados de expressão são usados para obter dados que representam sequências de peptídeos de cada um de um conjunto de antígenos (*por exemplo*, antígenos derivados do tumor ou

organismo de doença infecciosa); inserir a sequência de peptídeo de cada antígeno em um ou mais modelos de apresentação para gerar um conjunto de probabilidades numéricas de que cada um dos antígenos é apresentado por um ou mais alelos MHC em uma superfície celular, como uma célula tumoral ou uma célula infectada do sujeito, o conjunto de verossimilhanças numéricas tendo sido identificado pelo menos com base nos dados de espectrometria de massa recebidos; e selecionar um subconjunto do conjunto de antígenos com base no conjunto de probabilidades numéricas para gerar um conjunto de antígenos selecionados.

[188] Em um exemplo direcionado a vacinas de tumor, e que pode ser adaptado para vacinas de doença infecciosa, o modelo de apresentação pode compreender um modelo de regressão estatística ou de aprendizagem por máquina (por exemplo, aprendizagem profunda) treinado em um conjunto de dados de referência (também conhecido como conjunto de dados de treinamento) que compreende um conjunto de rótulos correspondentes, em que o conjunto de dados de referência é obtido de cada um de uma pluralidade de sujeitos distintos, onde opcionalmente alguns sujeitos podem ter um tumor, e em que o conjunto de dados de referência compreende pelo menos um dentre: dados representando sequências de ácido nucleico do exoma de tecido tumoral, dados representando sequências de ácido nucleico do exoma de tecido normal, dados representando sequências de ácido nucleico do transcriptoma do tecido tumoral, dados representando sequências de proteoma do tecido tumoral e dados representando sequências de peptidoma do MHC do tecido tumoral e dados representando sequências de peptidoma do MHC do tecido normal. Os dados de

referência podem ainda compreender dados de espectrometria de massa, dados de sequenciamento, dados de sequenciamento de RNA, dados de perfilamento de expressão e dados proteômicos para linhagens celulares de alelo único concebidas para expressar um alelo MHC predeterminado que são subsequentemente expostas a proteínas sintéticas, linhagens celulares humanas normais e de tumor e amostras primárias frescas e congeladas e ensaios de células T (por exemplo, ELISPOT). Em certos aspectos, o conjunto de dados de referência inclui cada forma de dados de referência.

[189] O modelo de apresentação pode compreender um conjunto de características derivados, pelo menos em parte, do conjunto de dados de referência e em que o conjunto de características compreende pelo menos uma das características dependentes do alelo e independentes do alelo. Em certos aspectos, cada característica está incluída.

[190] Métodos para identificar antígenos também incluem gerar uma resultado para construir uma vacina personalizada, identificando um ou mais antígenos que provavelmente serão apresentados em uma superfície de células do sujeito, como uma célula tumoral ou célula infectada. Como um exemplo direcionado a vacinas tumorais, e que pode ser adaptado a vacinas de doenças infecciosas, um método como este pode compreender as etapas de: obter pelo menos um de exoma, transcriptoma ou sequenciamento de nucleotídeo de genoma completo e/ou dados de expressão das células tumorais e células normais do sujeito, em que o sequenciamento de nucleotídeos e/ou dados de expressão são usados para obter dados que representam sequências de

peptídeos de cada um de um conjunto de antígenos identificados pela comparação de sequenciamento de nucleotídeos e/ou dados de expressão das células tumorais e o sequenciamento de nucleotídeos e/ou dados de expressão das células normais (*por exemplo*, no caso de neoantígenos em que a sequência de peptídeo de cada neoantígeno compreende pelo menos uma alteração que o torna distinto da sequência de peptídeo de tipo selvagem correspondente ou em casos de antígenos sem uma mutação onde os peptídeos são derivados de qualquer polipeptídeo conhecido ou que tenha alterado a expressão em uma célula tumoral ou tecido canceroso em comparação com uma célula ou tecido normal), sequência de peptídeo identificada a partir das células normais do sujeito; codificar as sequências de peptídeo de cada um dos antígenos em um vetor numérico correspondente, cada vetor numérico incluindo informações sobre uma pluralidade de aminoácidos que constituem a sequência de peptídeo e um conjunto de posições dos aminoácidos na sequência de peptídeo; inserir os vetores numéricos, usando um processador de computador, em um modelo de apresentação de aprendizado profundo para gerar um conjunto de probabilidades de apresentação para o conjunto de antígenos, cada probabilidade de apresentação no conjunto representando a probabilidade de que um antígeno correspondente seja apresentado por uma ou mais alelos de MHC de classes II na superfície das células tumorais do sujeito, o modelo de apresentação de aprendizagem profunda; selecionar um subconjunto do conjunto de antígenos com base no conjunto de probabilidades de apresentação para gerar um conjunto de antígenos selecionados; e gerar o resultado para a construção

da vacina contra o câncer personalizada com base no conjunto de antígenos selecionados.

[191] Métodos específicos para identificar antígenos, incluindo neoantígenos, são conhecidos pelos versados na técnica, por exemplo, os métodos descritos em mais detalhes nas publicações de pedidos de patentes internacionais WO/2017/106638, WO/2018/195357 e WO/2018/208856, cada um aqui incorporado por referência, em sua totalidade, para todos os fins.

[192] Um método de tratamento de um sujeito com um tumor é divulgado neste documento, compreendendo a execução das etapas de qualquer um dos métodos de identificação de antígeno descritos neste documento e compreendendo ainda a obtenção de uma vacina contra o tumor compreendendo o conjunto de antígenos selecionados e a administração da vacina contra o tumor ao sujeito.

[193] Um método divulgado neste documento também pode incluir identificar uma ou mais células T que são específicas do antígeno para pelo menos um dos antígenos no subconjunto. Em algumas modalidades, a identificação compreende cocultivar uma ou mais células T com um ou mais antígenos no subconjunto sob condições que expandem as uma ou mais células T específicas do antígeno. Em outras modalidades, a identificação compreende contatar uma ou mais células T com um tetrâmero que compreende um ou mais dos antígenos no subconjunto sob condições que permitem a ligação entre a célula T e o tetrâmero. Em ainda outras modalidades, o método aqui divulgado também pode incluir identificar um ou mais receptores de células T (TCR) de uma ou mais células T identificadas. Em certas modalidades, a identificação de um

ou mais receptores de células T compreende sequenciar as sequências de receptores de células T de uma ou mais células T identificadas. O método aqui divulgado pode ainda compreender a engenharia genética de uma pluralidade de células T para expressar pelo menos um dos um ou mais receptores de células T identificados; cultivar a pluralidade de células T sob condições que expandem a pluralidade de células T; e infundir as células T expandidas no sujeito. Em algumas modalidades, a engenharia genética da pluralidade de células T para expressar pelo menos um dos um ou mais receptores de células T identificados compreende clonar as sequências de receptores de células T das uma ou mais células T identificadas em um vetor de expressão; e transfectar cada uma da pluralidade de células T com o vetor de expressão. Em algumas modalidades, o método aqui divulgado compreende ainda cultivar uma ou mais células T identificadas sob condições que expandem as uma ou mais células T identificadas; e infundir as células T expandidas no sujeito.

[194] Também aqui divulgada é uma célula T isolada que é específica do antígeno para pelo menos um antígeno selecionado no subconjunto.

[195] Também é divulgado aqui um método para a fabricação de uma vacina contra o tumor, compreendendo as etapas de: obter pelo menos um de exoma, transcriptoma ou sequenciamento de nucleotídeos de tumor de genoma completo e/ou dados de expressão da célula tumoral do sujeito, em que o sequenciamento de nucleotídeos de tumor e/ou dados de expressão são usados para obter dados que representam sequências de peptídeos de cada um de um conjunto de antígenos (*por exemplo*, no caso de neoantígenos em que a

sequência de peptídeos de cada neoantígeno compreende pelo menos uma alteração que a torna distinta do peptídeo de tipo selvagem correspondente sequência ou em casos de antígenos sem uma mutação em que os peptídeos são derivados de qualquer polipeptídeo conhecido ou que tenham expressão alterada em uma célula tumoral ou tecido canceroso em comparação com uma célula ou tecido normal); inserir a sequência de peptídeo de cada antígeno em um ou mais modelos de apresentação para gerar um conjunto de probabilidades numéricas de que cada um dos antígenos é apresentado por um ou mais alelos MHC na superfície da célula tumoral da célula tumoral do sujeito, o conjunto numérico probabilidades tendo sido identificadas pelo menos com base nos dados de espectrometria de massa recebidos; e selecionar um subconjunto do conjunto de antígenos com base no conjunto de probabilidades numéricas para gerar um conjunto de antígenos selecionados; e produzir ou ter produzido uma vacina contra tumor compreendendo o conjunto de antígenos selecionados.

[196] Também é divulgada neste documento uma vacina contra tumor incluindo um conjunto de antígenos selecionados pela realização do método compreendendo as etapas de: obter de pelo menos um de exoma, transcriptoma ou sequenciamento de nucleotídeos de tumor de genoma completo e/ou dados de expressão da célula tumoral do sujeito, em que os dados de sequenciação e/ou expressão de nucleotídeos tumorais são usados para obter dados que representam sequências de peptídeos de cada um de um conjunto de antígenos, e em que a sequência de peptídeos de cada antígeno (*por exemplo*, no caso de neoantígenos em que a sequência de peptídeos de cada neoantígeno compreende pelo menos uma alteração que o torna

distinto da sequência de peptídeo de tipo selvagem correspondente ou em outros casos de antígenos sem uma mutação em que os peptídeos são derivados de qualquer polipeptídeo conhecido ou foi encontrado para ter expressão alterada em uma célula tumoral ou tecido canceroso em comparação com uma célula ou tecido normal); inserir a sequência de peptídeo de cada antígeno em um ou mais modelos de apresentação para gerar um conjunto de probabilidades numéricas de que cada um dos antígenos é apresentado por um ou mais alelos MHC na superfície da célula tumoral da célula tumoral do sujeito, o conjunto numérico probabilidades tendo sido identificadas pelo menos com base nos dados de espectrometria de massa recebidos; e selecionar um subconjunto do conjunto de antígenos com base no conjunto de probabilidades numéricas para gerar um conjunto de antígenos selecionados; e produzir ou ter produzido uma vacina contra tumor compreendendo o conjunto de antígenos selecionados.

[197] A vacina tumoral pode incluir uma ou mais de uma sequência de ácido nucleico, uma sequência de polipeptídeo, RNA, DNA, uma célula, um plasmídeo ou um vetor.

[198] A vacina tumoral pode incluir um ou mais antígenos apresentados na superfície celular do tumor.

[199] A vacina tumoral pode incluir um ou mais antígenos que são imunogênicos no sujeito.

[200] A vacina tumoral pode não incluir um ou mais antígenos que induzem uma resposta autoimune contra o tecido normal no sujeito.

[201] A vacina tumoral pode incluir um adjuvante.

[202] A vacina tumoral pode incluir um excipiente.

[203] Um método divulgado neste documento também pode

incluir selecionar antígenos que têm uma probabilidade aumentada de serem apresentados na superfície da célula tumoral em relação aos antígenos não selecionados com base no modelo de apresentação.

[204] Um método divulgado neste documento também pode incluir selecionar antígenos que têm uma probabilidade aumentada de serem capazes de induzir uma resposta imune específica de um tumor no sujeito em relação a antígenos não selecionados com base no modelo de apresentação.

[205] Um método divulgado neste documento também pode incluir selecionar antígenos que têm uma probabilidade aumentada de serem capazes de serem apresentados a células T naïve por células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) em relação a antígenos não selecionados com base no modelo de apresentação, opcionalmente em que a APC é uma célula dendrítica (DC).

[206] Um método divulgado neste documento também pode incluir selecionar antígenos que têm uma menor probabilidade de estarem sujeitos a inibição via tolerância central ou periférica em relação a antígenos não selecionados com base no modelo de apresentação.

[207] Um método divulgado neste documento também pode incluir selecionar antígenos que têm uma probabilidade reduzida de serem capazes de induzir uma resposta autoimune ao tecido normal no sujeito em relação a antígenos não selecionados com base no modelo de apresentação.

[208] Os dados de sequenciamento e/ou expressão de nucleotídeo de exoma ou transcriptoma podem ser obtidos através da realização de sequenciamento no tecido do tumor.

[209] O sequenciamento pode ser o sequenciamento de

próxima geração (NGS) ou qualquer abordagem de sequenciamento massivamente paralelo.

[210] O conjunto de probabilidades numéricas pode ser ainda identificado por pelo menos características que interagem com alelos de MHC compreendendo pelo menos um dentre: a afinidade predita com a qual o alelo de MHC e o peptídeo codificado por antígeno se ligam; a estabilidade predita do complexo peptídeo-MHC codificado por antígeno; a sequência e o comprimento do peptídeo codificado por antígeno; a probabilidade de apresentação de peptídeos codificados com antígenos com sequência semelhante em células de outros indivíduos que expressam o alelo de MHC específico, avaliado pela proteômica por espectrometria de massa ou por outros meios; os níveis de expressão do alelo de MHC específico no sujeito em questão (por exemplo, conforme medido por RNA-seq ou espectrometria de massa); a probabilidade geral de apresentação independente da sequência de peptídeo codificada por neoantígeno pelo alelo MHC específico em outros sujeitos distintos que expressam o alelo de MHC específico; a probabilidade de apresentação independente de sequência de peptídeo codificada por neoantígeno geral por alelos de MHC na mesma família de moléculas (por exemplo, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-DP) em outros sujeitos distintos.

[211] O conjunto de probabilidades numéricas é ainda identificado por pelo menos características que não interagem com alelos de MHC compreendendo pelo menos uma das: sequências C e N-terminais que flanqueiam o peptídeo codificado por neoantígeno dentro de sua sequência proteica de origem; a presença de motivos de clivagem de protease no

peptídeo codificado por neoantígeno, opcionalmente ponderado de acordo com a expressão das proteases correspondentes nas células tumorais (como medido por RNA-seq ou espectrometria de massa); a taxa de rotatividade da proteína de origem, medida no tipo de célula apropriado; o comprimento da proteína origem, considerando opcionalmente as variantes de junção específicas (“isoformas”) mais altamente expressas nas células tumorais, medidas por RNA-seq ou espectrometria de massa de proteoma, ou como previsto a partir da anotação de linhagem germinativa ou mutações somáticas de junção detectadas em dados de sequência de DNA ou RNA; o nível de expressão do proteassoma, imunoproteassoma, timoproteassoma ou outras proteases nas células tumorais (que podem ser medidos por RNA-seq, espectrometria de massa de proteoma ou imuno-histoquímica); a expressão do gene de origem do peptídeo codificado por neoantígeno (por exemplo, conforme medido por RNA-seq ou espectrometria de massa); a expressão típica de tecido específico do gene de origem do peptídeo codificado por neoantígeno durante vários estágios do ciclo celular; um catálogo abrangente de características da proteína de origem e/ou de seus domínios, como pode ser encontrado em, por exemplo, uniProt ou PDB http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do; características que descrevem as propriedades do domínio da proteína de origem que contém o peptídeo, por exemplo: estrutura secundária ou terciária (por exemplo, hélice alfa vs folha beta); junção alternativa; a probabilidade de apresentação de peptídeos da proteína de origem do peptídeo codificado por neoantígeno em questão em outros sujeitos distintos; a probabilidade de o peptídeo não ser detectado ou super-representado por

espectrometria de massa devido a vieses técnicos; a expressão de vários módulos/vias de genes, medidos por RNASeq (que não precisam conter a proteína de origem do peptídeo) que são informativos sobre o estado das células tumorais, estroma ou linfócitos infiltrantes de tumor (TILs); o número de cópias do gene de origem do peptídeo codificado por neoantígeno nas células tumorais; a probabilidade do peptídeo se ligar à TAP ou a afinidade de ligação medida ou predita do peptídeo à TAP; o nível de expressão de TAP nas células tumorais (que pode ser medido por RNA-seq, espectrometria de massa de proteoma, imuno-histoquímica); presença ou ausência de mutações tumorais, incluindo, mas não se limitando a: mutações de driver em genes de driver de câncer conhecidos como EGFR, KRAS, ALK, RET, ROS1, TP53, CDKN2A, CDKN2B, NTRK1, NTRK2, NTRK3 e em genes que codificam o proteínas envolvidas nas máquinas de apresentação de antígenos (por exemplo, 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 ou qualquer um dos genes que codificam componentes do proteassoma ou imunoproteassoma). Peptídeos cuja apresentação depende de um componente do mecanismo de apresentação de antígeno que está sujeito a mutação de perda de função no tumor têm probabilidade reduzida de apresentação; presença ou ausência de polimorfismos funcionais da linhagem germinativa, incluindo, entre outros: genes que codificam as proteínas envolvidas no mecanismo de apresentação de antígenos (por exemplo, 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 ou qualquer um dos genes que codificam componentes do proteassoma ou imunoproteassoma); tipo de tumor (por exemplo, NSCLC, melanoma); subtipo de tumor clínico (por exemplo, câncer de pulmão escamoso vs. não escamoso); histórico de tabagismo; a expressão típica do gene de origem do peptídeo no tipo de tumor ou subtipo clínico relevante, opcionalmente estratificada por mutação do driver.

[212] A pelo menos uma alteração pode ser um indel de deslocamento de quadro ou sem deslocamento de quadro, missense ou sem sentido, alteração no sítio de junção, rearranjo genômico ou fusão de genes, ou qualquer alteração genômica ou de expressão que dê origem a um neoORF.

[213] A célula tumoral pode ser selecionada do grupo que consiste em: câncer de pulmão, melanoma, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de rim, câncer gástrico, câncer de cólon, câncer de testículo, câncer de cabeça e pescoço, câncer de pâncreas, câncer de cérebro, linfoma de células B, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica, leucemia linfocítica crônica e leucemia linfocítica de células T, câncer de pulmão de células não pequenas e câncer de pulmão de células pequenas.

[214] Um método divulgado neste documento também pode incluir obter uma vacina tumoral compreendendo o conjunto de neoantígenos selecionados ou um subconjunto dos mesmo, opcionalmente compreendendo ainda administrar a vacina tumoral ao sujeito.

[215] Pelo menos um dos neoantígenos no conjunto de

neoantígenos selecionados, quando na forma de polipeptídeo, pode incluir pelo menos um dentre: uma afinidade de ligação ao MHC com um valor de IC50 inferior a 1000nM, para os polipeptídeos do MHC de classe I com comprimento de 8 a 15, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 aminoácidos, para polipeptídeos do MHC de classe II, com um comprimento de 6-30, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 , 16, 17, 18,19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 aminoácidos, presença de motivos de sequência dentro ou perto do polipeptídeo na sequência da proteína original promovendo a clivagem de proteassoma e a presença de motivos de sequência promovendo o transporte de TAP. Para MHC de classe II, presença de motivos de sequência dentro ou perto do peptídeo promovendo a clivagem por proteases extracelulares ou lisossômicas (por exemplo, catepsinas) ou ligação de HLA catalisada por HLA-DM.

[216] São divulgados aqui métodos para identificar um ou mais neoantígenos que provavelmente serão apresentados na superfície de uma célula tumoral de uma célula tumoral, compreendendo a execução das etapas de: receber dados de espectrometria de massa compreendendo dados associados a uma pluralidade de peptídeos isolados eluídos do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) derivado de uma pluralidade de amostras de tumor frescas ou congeladas; obter um conjunto de dados de treinamento identificando pelo menos um conjunto de sequências de peptídeo de treinamento presentes nas amostras de tumor e apresentadas em um ou mais alelos de MHC associados a cada sequência de peptídeo de treinamento; obter um conjunto de sequências proteicas de treinamento com base nas sequências de peptídeo de

treinamento; e treinar um conjunto de parâmetros numéricos de um modelo de apresentação usando as sequências proteicas de treinamento e as sequências de peptídeo de treinamento, o modelo de apresentação que fornece uma pluralidade de probabilidades numéricas de que as sequências de peptídeo da célula tumoral são apresentadas por um ou mais alelos de MHC na superfície da célula tumoral.

[217] O modelo de apresentação pode representar dependência entre: a presença de um par de um dos alelos de MHC em particular e um aminoácido específico em uma posição específica de uma sequência de peptídeo; e probabilidade de apresentação na superfície da célula tumoral, pelo particular dos alelos de MHC do par, de tal sequência de peptídeo compreendendo o aminoácido particular na posição particular.

[218] Um método divulgado neste documento também pode incluir selecionar um subconjunto de neoantígenos, em que o subconjunto de neoantígenos é selecionado porque cada um tem uma probabilidade aumentada de ser apresentado na superfície celular do tumor em relação a um ou mais neoantígenos tumorais distintos.

[219] Um método divulgado neste documento também pode incluir selecionar um subconjunto de neoantígenos, em que o subconjunto de neoantígenos é selecionado porque cada um tem uma probabilidade aumentada de que é capaz de induzir uma resposta imune específica do tumor no sujeito em relação a um ou mais neoantígenos tumorais distintos.

[220] Um método divulgado neste documento também pode incluir selecionar um subconjunto de neoantígenos, em que o subconjunto de neoantígenos é selecionado porque cada um tem

uma probabilidade aumentada de que seja capaz de ser apresentado a células T naïve por células apresentadoras de antígeno profissional (APCs) relativas a um ou mais neoantígenos tumorais distintos, opcionalmente em que a APC é uma célula dendrítica (DC).

[221] Um método divulgado neste documento também pode incluir selecionar um subconjunto de neoantígenos, em que o subconjunto de neoantígenos é selecionado porque cada um tem uma menor probabilidade de estar sujeito a inibição via tolerância central ou periférica em relação a um ou mais neoantígenos tumorais distintos.

[222] Um método divulgado neste documento também pode incluir selecionar um subconjunto de neoantígenos, em que o subconjunto de neoantígenos é selecionado porque cada um tem uma menor probabilidade de ser capaz de induzir uma resposta autoimune ao tecido normal no sujeito em relação a um ou mais neoantígenos tumorais distintos.

[223] Um método divulgado neste documento também pode incluir selecionar um subconjunto de neoantígenos, em que o subconjunto de neoantígenos é selecionado porque cada um tem uma probabilidade reduzida de que será diferentemente pós-traducionalmente modificado em células tumorais versus APCs, opcionalmente em que o APC é uma célula dendrítica (DC).

[224] A prática dos métodos aqui empregará, a menos que indicado de outra forma, métodos convencionais de química de proteínas, bioquímica, técnicas de DNA recombinante e farmacologia, dentro dos conhecimentos da técnica. Tais técnicas são explicadas por completo na literatura. Ver, por exemplo, 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* (2a Edição, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18a Edição (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry 3ª Ed.* (Plenum Press) Vols A e B(1992).

III. Identificação de mutações específicas de tumores em neoantígenos

[225] Também aqui divulgados são métodos para a identificação de certas mutações (por exemplo, as variantes ou alelos que estão presentes nas células cancerígenas). Em particular, essas mutações podem estar presentes no genoma, transcriptoma, proteoma ou exoma de células cancerígenas de um sujeito com câncer, mas não no tecido normal do sujeito. Métodos específicos para identificar neoantígenos, incluindo neoantígenos compartilhados, que são específicos para tumores, são conhecidos pelos versados na técnica, por exemplo, os métodos descritos em mais detalhes na Patente U.S. No. 10.055.540, Pub. do Pedido U.S. No. US20200010849A1, e publicações de pedido de patente internacional WO/2018/195357 e WO/2018/208856, cada um aqui incorporado por referência, em sua totalidade, para todos os efeitos.

[226] Mutações genéticas em tumores podem ser consideradas úteis para o direcionamento imunológico de tumores se levarem a alterações na sequência de aminoácidos de uma proteína exclusivamente no tumor. Mutações úteis incluem: (1) mutações não sinônimas levando a diferentes aminoácidos na proteína; (2) mutações de leitura em que um códon de parada é modificado ou deletado, levando à tradução

de uma proteína mais longa com uma nova sequência específica de tumor no terminal C; (3) mutações no sítio de junção que levam à inclusão de um íntron no mRNA maduro e, portanto, em uma sequência única de proteína específica do tumor; (4) rearranjos cromossômicos que dão origem a uma proteína quimérica com sequências específicas de tumores na junção de 2 proteínas (isto é, fusão de genes); (5) mutações ou deleções de deslocamento de quadro que levam a um novo quadro de leitura aberto com uma nova sequência de proteína específica de tumor. As mutações também podem incluir uma ou mais de indel sem deslocamento de quadro, missense ou sem sentido, alteração no sítio de junção, rearranjo genômico ou fusão de genes ou qualquer alteração genômica ou de expressão que dê origem a um neoORF.

[227] Os peptídeos com mutações ou polipeptídeos mutados resultantes de, por exemplo, mutações no sítio splice, deslocamento de quadro, leitura ou fusão de genes em células tumorais podem ser identificados sequenciando DNA, RNA ou proteína no tumor versus células normais.

[228] Também mutações podem incluir mutações específicas de tumores previamente identificadas. Mutações tumorais conhecidas podem ser encontradas no banco de dados do Catálogo de Mutações Somáticas em Câncer (COSMIC).

[229] Uma variedade de métodos está disponível para detectar a presença de uma mutação ou alelo específico no DNA ou RNA de um indivíduo. Os avanços nesse campo forneceram genotipagem SNP em larga escala, precisa, fácil e barata. Por exemplo, várias técnicas foram descritas, incluindo hibridização dinâmica de alelos específicos (DASH), eletroforese em gel diagonal de microplacas (MADGE),

pirosequenciamento, ligação específica de oligonucleotídeo, o sistema TaqMan e várias tecnologias de “chip” de DNA, como o Affymetrix Chips SNP. Estes métodos utilizam a amplificação de uma região genética alvo, tipicamente por PCR. Ainda outros métodos, baseados na geração de pequenas moléculas de sinal por clivagem invasiva seguida por espectrometria de massa ou sondas de cadeado imobilizadas e amplificação de círculos rolantes. Vários dos métodos conhecidos na técnica para detectar mutações específicas estão sumarizados abaixo.

[230] Os meios de detecção baseados em PCR podem incluir amplificação multiplex de uma pluralidade de marcadores simultaneamente. Por exemplo, é bem conhecido na técnica selecionar iniciadores de PCR para gerar produtos de PCR que não se sobrepõem em tamanho e podem ser analisados simultaneamente. Alternativamente, é possível amplificar marcadores diferentes com iniciadores marcados diferencialmente e, assim, cada um pode ser detectado diferencialmente. Obviamente, os meios de detecção baseados em hibridação permitem a detecção diferencial de múltiplos produtos de PCR em uma amostra. Outras técnicas são conhecidas na técnica para permitir análises multiplex de uma pluralidade de marcadores.

[231] Vários métodos foram desenvolvidos para facilitar a análise de polimorfismos de nucleotídeo único no DNA genômico ou no RNA celular. Por exemplo, um polimorfismo de base única pode ser detectado usando um nucleotídeo resistente a exonucleases especializado, como divulgado, por exemplo, em Mundy, C. R. (Pat. U.S. No. 4.656.127). De acordo com o método, é permitido que um iniciador complementar à sequência alélica imediatamente 3' ao sítio polimórfico

hibridize com uma molécula alvo obtida de um animal ou humano em particular. Se o sítio polimórfico na molécula alvo contiver um nucleotídeo que é complementar ao derivado de nucleotídeo resistente à exonuclease particular presente, esse derivado será incorporado no final do iniciador hibridizado. Essa incorporação torna o iniciador resistente à exonuclease e, assim, permite sua detecção. Como a identidade do derivado resistente à exonuclease da amostra é conhecida, uma descoberta de que o iniciador se tornou resistente às exonucleases revela que o(s) nucleotídeo(s) presente(s) no sítio polimórfico da molécula alvo é complementar ao do derivado de nuclrotídeo utilizado na reação. Este método tem a vantagem de não exigir a determinação de grandes quantidades de dados de sequência estranhos.

[232] Um método baseado em solução pode ser usado para determinar a identidade de um nucleotídeo de um sítio polimórfico. Cohen, D. et al. (Patente Francesa 2.650.840; Pedido PCT No. WO91/02087). Como no método Mundy da Pat. U.S. No. 4.656.127, é utilizado um iniciador que é complementar às sequências alélicas imediatamente 3' a um sítio polimórfico. O método determina a identidade do nucleotídeo desse sítio usando derivados de didesoxinucleotídeos marcados, que, se complementares ao nucleotídeo do sítio polimórfico, serão incorporados no terminal do iniciador.

[233] Um método alternativo, conhecido como Genetic Bit Analysis ou GBA, é descrito por Goelet, P. et al. (Pedido PCT No. 92/15712). O método de Goelet, P. et al. utiliza misturas de terminadores marcados e um iniciador

complementar à sequência 3' de um sítio polimórfico. O terminador marcado que está incorporado é assim determinado pelo, e complementar ao, nucleotídeo presente no sítio polimórfico da molécula alvo que está sendo avaliada. Em contraste com o método de Cohen et al. (Patente Francesa 2.650.840; Pedido PCT No. WO91/02087) o método de Goelet, P. et al. pode ser um ensaio de fase heterogênea, no qual o iniciador ou a molécula alvo é imobilizado em uma fase sólida.

[234] Foram descritos vários procedimentos de incorporação de nucleotídeos guiados por iniciador para análise de sítios polimórficos no DNA (Komher, JS et al., Nucl. Acids. Res. 17: 7779-7784 (1989); Sokolov, BP, Nucl. Acids Res. 18: 3671 (1990); Syvanen, A.-C., et al., Genomics 8: 684-692 (1990); Kuppuswamy, MN et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88: 1143-1147 (1991); Prezant, TR 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)). Estes métodos diferem do GBA na medida em que utilizam a incorporação de desoxinucleotídeos marcados para discriminar entre bases em um sítio polimórfico. Nesse formato, uma vez que o sinal é proporcional ao número de desoxinucleotídeos incorporados, polimorfismos que ocorrem em execuções do mesmo nucleotídeo podem resultar em sinais que são proporcionais à duração da execução (Syvanen, A.-C., et al., Amer. J. Hum. Genet. 52: 46-59 (1993)).

[235] Várias iniciativas obtêm informações de sequência diretamente de milhões de moléculas individuais de DNA ou RNA em paralelo. As tecnologias de sequenciamento por síntese de moléculas únicas em tempo real dependem da

detecção de nucleotídeos fluorescentes à medida que são incorporados a uma fita nascente de DNA que é complementar ao molde que está sendo sequenciado. Em um método, os oligonucleotídeos com 30 a 50 bases de comprimento são ancorados covalentemente na extremidade 5' das lâminas de vidro. Esses fios ancorados executam duas funções. Primeiro, eles agem como sítios de captura para as fitas de molde alvo se os moldes forem configurados com caudas de captura complementares aos oligonucleotídeos ligados à superfície. Eles também atuam como iniciadores para a extensão do iniciador direcionado ao molde que forma a base da leitura da sequência. Os iniciadores de captura funcionam como um sítio de posição fixa para determinação de sequência usando vários ciclos de síntese, detecção e clivagem química do ligante de corante para remover o corante. Cada ciclo consiste em adicionar a mistura polimerase/nucleotídeo marcado, enxague, imageamento e clivagem do corante. Em um método alternativo, a polimerase é modificada com uma molécula doadora fluorescente e imobilizada em uma lâmina, enquanto cada nucleotídeo é codificado por cores com uma fração fluorescente aceptora ligada a um fosfato gama. O sistema detecta a interação entre uma polimerase marcada com fluorescência e um nucleotídeo modificado por fluorescência quando o nucleotídeo se torna incorporado na cadeia de novo. Também existem outras tecnologias de sequenciamento por síntese.

[236] Qualquer plataforma adequada de sequenciamento por síntese pode ser usada para identificar mutações. Como descrito acima, quatro plataformas principais de sequenciamento por síntese estão atualmente disponíveis: os

sequenciadores de genoma da Roche/454 Life Sciences, o Analisador 1G da Illumina/Solexa, o sistema SOLiD da Applied BioSystems e o sistema Heliscope da Helicos Biosciences. As plataformas de sequenciamento por síntese também foram descritas pela Pacific BioSciences e pela VisiGen Biotechnologies. Em algumas modalidades, uma pluralidade de moléculas de ácido nucleico sendo sequenciadas está ligada a um suporte (por exemplo, suporte sólido). Para imobilizar o ácido nucleico em um suporte, uma sequência de captura/sítio de iniciação universal pode ser adicionado nas extremidades 3'e/ou 5' do molde. Os ácidos nucleicos podem ser ligados ao suporte por hibridação da sequência de captura com uma sequência complementar covalentemente ligada ao suporte. A sequência de captura (também referida como uma sequência de captura universal) é uma sequência de ácido nucleico complementar a uma sequência anexada a um suporte que pode servir duplamente como um iniciador universal.

[237] Como alternativa a uma sequência de captura, um membro de um par de acoplamento (como, por exemplo, anticorpo/antígeno, receptor/ligando ou o par avidina-biotina, conforme descrito em, por exemplo, Pedido de Patente U.S. No. 2006/0252077) pode estar ligado a cada fragmento a ser capturado em uma superfície revestida com um respectivo segundo membro desse par de acoplamento.

[238] Após a captura, a sequência pode ser analisada, por exemplo, por detecção/sequenciamento de molécula única, por exemplo, conforme descrito nos Exemplos e na Pat. U.S. No. 7.283.337, incluindo sequenciação por síntese dependente de molde. No sequenciamento por síntese, a molécula ligada à superfície é exposta a uma pluralidade de nucleotídeos

trifosfatos marcados na presença de polimerase. A sequência do modelo é determinada pela ordem dos nucleotídeos marcados incorporados na extremidade 3' da cadeia de crescimento. Isso pode ser feito em tempo real ou no modo de repetição e etapa. Para análise em tempo real, diferentes marcadores ópticos para cada nucleotídeo podem ser incorporados e múltiplos lasers podem ser utilizados para estimulação de nucleotídeos incorporados.

[239] O sequenciamento também pode incluir outras técnicas e plataformas de sequenciamento massivamente paralelo ou de próxima geração (NGS). Exemplos adicionais de técnicas e plataformas de sequenciamento massivamente paralelo são o Illumina HiSeq ou MiSeq, Thermo PGM ou Proton, o Pac Bio RS II ou Sequel, o Gene Reader da Qiagen e o Oxford Nanopore MinION. Podem ser usadas tecnologias de sequenciamento massivamente paralelo atuais adicionais, bem como as gerações futuras dessas tecnologias.

[240] Qualquer tipo de célula ou tecido pode ser utilizado para obter amostras de ácido nucleico para uso nos métodos aqui descritos. Por exemplo, uma amostra de DNA ou RNA pode ser obtida de um tumor ou fluido corporal, por exemplo, sangue, obtido por técnicas conhecidas (por exemplo, punção venosa) ou saliva. Como alternativa, testes de ácido nucleico podem ser realizados em amostras secas (por exemplo, cabelo ou pele). Além disso, uma amostra pode ser obtida para sequenciamento de um tumor e outra amostra pode ser obtida de tecido normal para sequenciamento em que o tecido normal é do mesmo tipo de tecido que o tumor. Uma amostra pode ser obtida para sequenciamento de um tumor e outra amostra pode ser obtida de tecido normal para

sequenciamento em que o tecido normal é de um tipo de tecido distinto em relação ao tumor.

[241] Os tumores podem incluir um ou mais de câncer de pulmão, melanoma, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de rim, câncer gástrico, câncer de cólon, câncer de testículo, câncer de cabeça e pescoço, câncer de pâncreas, câncer de cérebro, linfoma de células B, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica, leucemia linfocítica crônica e leucemia linfocítica de células T, câncer de pulmão de células não pequenas e câncer de pulmão de células pequenas.

[242] Alternativamente, a espectrometria de massa de proteínas pode ser usada para identificar ou validar a presença de peptídeos mutados ligados às proteínas do MHC nas células tumorais. Os peptídeos podem ser eluídos com ácido a partir de células tumorais ou de moléculas de HLA que são imunoprecipitadas do tumor e, em seguida, identificadas por espectrometria de massa.

IV. Antígenos

[243] Os antígenos podem incluir nucleotídeos ou polipeptídeos. Por exemplo, um antígeno pode ser uma sequência de RNA que codifica para uma sequência polide peptídeo. Os antígenos úteis em vacinas podem, portanto, incluir sequências de ácido nucleico ou sequências polide peptídeo.

[244] São divulgados aqui peptídeos isolados que compreendem mutações específicas de tumores identificadas pelos métodos aqui divulgados, peptídeos que compreendem mutações específicas de tumores conhecidas e polipeptídeos mutantes ou fragmentos dos mesmos identificados pelos

métodos aqui divulgados. Os peptídeos neoantígenos podem ser descritos no contexto de sua sequência codificadora, em que um neoantígeno inclui a sequência de ácido nucleico (por exemplo, DNA ou RNA) que codifica a sequência polide peptídeo relacionada.

[245] Também são divulgados aqui peptídeos derivados de qualquer polipeptídeo conhecido ou que tenha sido encontrado para ter expressão alterada em uma célula tumoral ou tecido canceroso em comparação com uma célula ou tecido normal, por exemplo, qualquer polipeptídeo conhecido ou que tenha sido expresso de forma aberrante em uma célula tumoral ou tecido canceroso em comparação com uma célula ou tecido normal. Polipeptídeos adequados dos quais os peptídeos antigênicos podem ser derivados podem ser encontrados, por exemplo, no banco de dados COSMIC. O COSMIC organiza informações abrangentes sobre mutações somáticas no câncer humano. O peptídeo contém a mutação específica do tumor.

[246] Os vetores adenovirais modificados e outros construtos aqui descritos podem ser usados para entregar antígenos de qualquer organismo, incluindo suas toxinas ou outros subprodutos, para prevenir e/ou tratar infecção ou outras reações adversas associadas ao organismo ou seu subproduto.

[247] Os antígenos que podem ser incorporados a uma vacina (*por exemplo*, codificados em um cassete) incluem imunógenos que são úteis para imunizar um animal humano ou não humano contra vírus, como vírus patogênicos que infectam vertebrados humanos e não humanos. Os antígenos podem ser selecionados a partir de uma variedade de famílias virais. Exemplos de famílias virais desejáveis contra as quais uma

resposta imune seria desejável incluem, a família dos picornavírus, que inclui os gêneros rinovírus, que são responsáveis por cerca de 50% dos casos de resfriado comum; os gêneros enterovírus, que incluem poliovirus, coxsackievirus, echovirus e enterovirus humanos, tal como o vírus da hepatite A; e os gêneros apthovirus, que são responsáveis pelas doenças da febre aftosa, principalmente em animais não humanos. Dentro da família de vírus picornavírus, os antígenos alvo incluem VP1, VP2, VP3, VP4 e VPG. Outra família viral inclui a família dos calcivírus, que abrange o grupo Norwalk de vírus, que é um importante agente causador de gastroenterite epidêmica. Ainda outra família viral desejável para uso no alvejamento de antígenos para induzir respostas imunes em humanos e animais não humanos é a família togavirus, que inclui o gênero alphavirus, que inclui vírus Sindbis, vírus RossRiver e encefalite equina venezuelana, oriental & ocidental, e rubivírus, incluindo o vírus da Rubéola. A família Flaviviridae inclui vírus da dengue, febre amarela, encefalite japonesa, encefalite de St. Louis e encefalite transmitida por carrapatos. Outros antígenos alvo podem ser gerados a partir da família da Hepatite C ou coronavírus, que inclui uma série de vírus não humanos, como vírus da bronquite infecciosa (aves), vírus gastroentérico transmissível porcino (porco), vírus da encefalomielite hemaglutinante suína (porco), vírus da peritonite infecciosa felino (gatos), coronavírus entérico felino (gato), coronavírus canino (cão) e coronavírus respiratório humano, que podem causar o resfriado comum e/ou hepatite não A, B ou C. Na família do coronavírus, os antígenos alvo incluem a

glicoproteína E1 (também chamada de proteína M ou matriz), E2 (também chamada de proteína S ou Spike), E3 (também chamada de HE ou hemaglutina-elterose) (não presente em todos os coronavírus) ou N (nucleocapsídeo). Ainda outros antígenos podem ser alvejados contra a família dos rabdovírus, que inclui o gênero vesiculovírus (por exemplo, vírus da estomatite vesicular) e o lissavírus geral (por exemplo, raiva). Na família dos rabdovírus, os antígenos adequados podem ser derivados da proteína G ou da proteína N. A família filoviridae, que inclui os vírus da febre hemorrágica, tais como o vírus Marburg e o Ebola, pode ser uma fonte adequada de antígenos. A família do paramixovírus inclui vírus parainfluenza tipo 1, vírus parainfluenza tipo 3, vírus parainfluenza bovino tipo 3, rubulavírus (vírus da caxumba), vírus parainfluenza tipo 2, vírus parainfluenza tipo 4, vírus da doença de Newcastle (galinhas), peste bovina, morbilivírus, que inclui sarampo e cinomose canina e pneumovírus, que inclui o vírus sincicial respiratório (por exemplo, a proteína glico- (G) e a proteína de fusão (F), cujas sequências estão disponíveis no GenBank). O vírus da gripe é classificado na família dos ortomixovírus e pode ser uma fonte adequada de antígeno (por exemplo, a proteína HA, a proteína N1). A família do bunyavirus inclui os gêneros bunyavirus (encefalite da Califórnia, La Crosse), phlebovirus (Rift Valley Fever), hantavirus (puremala é um vírus da febre hema-hagina), nairovirus (doença das ovelhas de Nairobi) e vários bungavírus não atribuídos. A família do arenavírus fornece uma fonte de antígenos contra LCM e vírus da febre de Lassa. A família dos reovírus inclui os gêneros reovírus, rotavírus (que causa gastroenterite aguda em

crianças), orbivírus e cultivírus (febre do carrapato Colorado, libombo (humanos), encefalose equina, língua azul). A família do retrovírus inclui a subfamília oncorivirinal que abrange tais doenças humanas e veterinárias como vírus da leucemia felina, HTLVI e HTLVII, lentivirinal (que inclui o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da imunodeficiência símia (SIV), vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da anemia infecciosa equina e espumavirinal). Entre os lentivírus, muitos antígenos adequados foram descritos e podem ser facilmente selecionados. Exemplos de antígenos de HIV e SIV adequados incluem, sem limitação, as proteínas gag, pol, Vif, Vpx, VPR, Env, Tat, Nef e Rev, bem como vários fragmentos das mesmas. Por exemplo, fragmentos adequados da proteína Env podem incluir qualquer uma de suas subunidades, tais como gp120, gp160, gp41, ou seus fragmentos menores, por exemplo, de pelo menos cerca de 8 aminoácidos de comprimento. Da mesma forma, fragmentos da proteína tat podem ser selecionados. [Ver, Pat U.S. No. 5.891.994 e Pat. U.S. No. 6.193.981.] Ver, também, as proteínas HIV e SIV descritas em D.H. Barouch et al, J. Virol., 75 (5): 2462-2467 (março de 2001), e R.R. Amara, et al, *Science*, 292: 69-74 (6 de Abril de 2001). Em outro exemplo, as proteínas ou peptídeos imunogênicos de HIV e/ou SIV podem ser usados para formar proteínas de fusão ou outras moléculas imunogênicas. Ver, por exemplo, as proteínas de fusão HIV-1 Tat e/ou Nef e regimes de imunização descritos em WO 01/54719, publicado em 2 de agosto de 2001, e WO 99/16884, publicado em 8 de abril de 1999. A invenção não está limitada às proteínas ou peptídeos imunogênicos de HIV e/ou SIV aqui descritos. Além disso, uma variedade de

modificações a estas proteínas foram descritas ou poderiam ser prontamente feitas por um versado na técnica. Ver, por exemplo, a proteína gag modificada que é descrita na Pat. U.S. No. 5.972.596. Além disso, quaisquer imunógenos de HIV e/ou SIV desejados podem ser administrados isoladamente ou em combinação. Essas combinações podem incluir a expressão de um único vetor ou de vários vetores. A família papovavírus inclui os poliomavírus subfamiliares (vírus BKU e JCU) e os papilomavírus subfamiliares (associados a cânceres ou progressão maligna do papiloma). A família adenovírus inclui vírus (EX, AD7, ARD, O.B.) que causam doenças respiratórias e/ou enterite. O parvovírus felino da família parvovírus (enterite felina), o vírus da panleucopenia felina, o parvovírus canino e o parvovírus porcino. A família herpesvírus inclui a subfamília alphaherpesvirinae, que abrange os gêneros simplexvirus (HSVI, HSVII), varicelovírus (pseudo-raiva, varicela zóster) e a subfamília betaherpesvirinae, que inclui os gêneros citomegalovírus (CMV humano), família muromegalovírus) e o subfamília gammaherpesvirinae, que inclui os gêneros linfocryptovirus, EBV (linfoma de Burkitts), rinotraqueíte infecciosa, vírus da doença de Marek e rhadinovírus. A família poxvírus inclui a subfamília chordopoxvirinae, que abrange os gêneros ortopoxvírus (Variola (Varíola) e Vaccínia (Cowpox)), parapoxvírus, avipoxvírus, capripoxvírus, leporipoxvírus, suipoxvírus e a subfamília entomopoxvírus. A família hepadnavírus inclui o vírus da hepatite B. Um vírus não classificado que pode ser fonte adequada de antígenos é o vírus da hepatite delta. Ainda outras fontes virais podem incluir vírus da doença infecciosa da bolsa aviária e vírus

da síndrome respiratória e reprodutiva suína. A família alfavírus inclui o vírus da arterite equina e vários vírus da encefalite.

[248] Os antígenos que podem ser incorporados a uma vacina (*por exemplo*, codificados em um cassete) também incluem imunógenos que são úteis para imunizar um animal humano ou não humano contra patógenos, incluindo bactérias, fungos, micro-organismos parasitas ou parasitas multicelulares que infectam humanos e não humanos vertebrados. Exemplos de patógenos bacterianos incluem cocos gram-positivos patogênicos, incluindo pneumococos; estafilococos; e estreptococos. Os cocos gram-negativos patogênicos incluem meningococo; gonococo. Os bacilos gram-negativos entéricos patogênicos incluem enterobacteriaceae; *pseudomonas*, acinetobactérias e *eikenella*; melioidose; *salmonella; shigella; haemophilus* (*Haemophilus influenzae, Haemophilus somnus*); *moraxella; H. ducreyi* (que causa cancroide); *brucella; Franisella tularensis* (que causa tularemia); *yersinia* (*pasteurella*); *streptobacillus moniliformis* e *spirillum*. Os bacilos Gram-positivos incluem *listeria monocytogenes; erysipelothrix rhusiopathiae; Corynebacterium diphtheria* (difteria); cólera; *B. anthracis* (antraz); donovanose (granuloma inguinal); e bartonelose. Doenças causadas por bactérias anaeróbias patogênicas incluem tétano; botulismo; outros clostrídios; tuberculose; lepra; e outras micobactérias. Exemplos de espécies de bactérias específicas são, sem limitação, *Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, Streptococcus faecalis,*

Moraxella catarrhalis, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Bordetella pertussis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* complex, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani*, *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Mycoplasma gallisepticum*. As doenças patogênicas dos espiroquetas incluem a sífilis; treponematoses: bouba, pinta e sífilis endêmica; e leptospirose. Outras infecções causadas por bactérias patogênicas superiores e fungos patogênicos incluem actinomicose; nocardiose; criptococose (*Cryptococcus*), blastomicose (*Blastomyces*), histoplasmose (*Histoplasma*) e coccidioidomicose (*Coccidiodes*); candidíase (*Candida*), aspergilose (*Aspergillis*) e mucormicose; esporotricose; paracoccidiodomicose, petrielidiose, torulopsose, micetoma e cromomicose; e dermatofitose. As infecções por Rickettsia incluem febre do tifo, febre maculosa das Montanhas Rochosas, febre Q e varíola de Rickettsial. Exemplos de infecções por clamídia e micoplasma: *mycoplasma pneumoniae*; linfogranuloma venéreo; psitacose; e infecções perinatais por clamídia. Os eucariotos patogênicos abrangem protozoários e helmintos patogênicos e as infecções produzidas por eles incluem: amebíase; malária; leishmaniose (por exemplo, causada por *Leishmania major*); tripanossomíase; toxoplasmose (por

exemplo, causada por *Toxoplasma gondii*); *Pneumocystis carinii*; Trichans; *Toxoplasma gondii*; babesiose; giardíase (por exemplo, causada por *Giardia*); triquinose (por exemplo, causada por *Trichomonas*); filariose; esquistossomose (por exemplo, causada por *Schistosoma*); nematoides; trematoides ou vermes; e infecções por cestoides (tênia). Outras infecções parasitárias podem ser causadas por *Ascaris*, *Trichuris*, *Cryptosporidium*, e *Pneumocystis carinii*, entre outros.

[249] Também são divulgados aqui peptídeos derivados de qualquer polipeptídeo associado a um organismo de doença infecciosa, uma infecção em um sujeito ou uma célula infectada de um sujeito. Os antígenos podem ser derivados de sequências de ácido nucleico ou sequências polide peptídeo de um organismo com doença infecciosa. As sequências polide peptídeo de um organismo de doença infecciosa incluem, mas não estão limitadas a, um peptídeo derivado de patógeno, um peptídeo derivado de vírus, um peptídeo derivado de bactéria, um peptídeo derivado de fungo e/ou um peptídeo derivado de parasita. Organismos de doenças infecciosas incluem, mas não estão limitados a, coronavírus relacionado à síndrome respiratória aguda grave (SARS), síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2), Ebola, HIV, vírus da hepatite B (HBV), gripe, vírus da hepatite C (HCV) e tuberculose.

[250] Os antígenos podem ser selecionados para serem apresentados na superfície celular de uma célula, como uma célula tumoral, uma célula infectada ou uma célula imune, incluindo células apresentadoras de antígeno profissionais, como células dendríticas. Os antígenos podem ser

selecionados para serem imunogênicos.

[251] Um ou mais polipeptídeos codificados por uma sequência de ácido nucleico de antígeno podem compreender pelo menos um dentre: uma afinidade de ligação ao MHC com um valor de IC50 inferior a 1000nM, para peptídeos de MHC Classe I com um comprimento de 8 a 15, 8, 9, 10, 11 , 12, 13, 14 ou 15 aminoácidos, presença de motivos de sequência dentro ou perto do peptídeo promovendo a clivagem do proteassoma e motivos de presença ou sequência promovendo o transporte de TAP. Para peptídeos de MHC de Classe II, um comprimento 6-30, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 aminoácidos, presença de motivos de sequência dentro ou perto do peptídeo promovendo a clivagem por proteases extracelulares ou lisossômicas (por exemplo, catepsinas) ou ligação a HLA catalisada por HLA-DM.

[252] Um ou mais antígenos podem ser apresentados na superfície de um tumor. Um ou mais antígenos podem ser apresentados na superfície de uma célula infectada.

[253] Um ou mais antígenos podem ser imunogênicos em um sujeito com um tumor, por exemplo, capaz de provocar uma resposta de células T ou uma resposta de células B no sujeito. Um ou mais antígenos podem ser imunogênicos em um sujeito com ou com suspeita de ter uma infecção, por exemplo, capaz de induzir uma resposta de células T ou B no sujeito. Um ou mais antígenos podem ser imunogênicos em um sujeito em risco de infecção, por exemplo, capaz de desencadear uma resposta de células T ou B no sujeito que fornece proteção imunológica (*ou seja*, imunidade) contra a infecção, *por exemplo*, como estimular a produção de células T de memória,

células B de memória ou anticorpos específicos para a infecção.

[254] Um ou mais antígenos podem ser capazes de gerar uma resposta de células B, como a produção de anticorpos que reconhecem um ou mais antígenos. Os anticorpos podem reconhecer sequências polide peptídeo lineares ou reconhecer estruturas secundárias e terciárias. Consequentemente, os antígenos de células B podem incluir sequências polide peptídeo lineares ou polipeptídeos com estruturas secundárias e terciárias, incluindo, mas não se limitando a, proteínas de comprimento total, subunidades de proteínas, domínios de proteínas ou qualquer sequência polide peptídeo conhecida ou predita como tendo estruturas secundárias e terciárias.

[255] Um ou mais antígenos que induzem uma resposta autoimune em um sujeito podem ser excluídos da consideração no contexto da geração da vacina para um sujeito.

[256] O tamanho de pelo menos uma molécula de peptídeo antigênico (*por exemplo*, uma sequência de epítopo) pode compreender, mas não está limitado a, cerca de 5, cerca de 6, cerca de 7, cerca de 8, cerca de 9, cerca de 10, cerca de 11, cerca de 12, cerca de 13, cerca de 14, cerca de 15, cerca de 16, cerca de 17, cerca de 18, cerca de 19, cerca de 20, cerca de 21, cerca de 22, cerca de 23, cerca de 24, cerca de 25, cerca de 26, cerca de 27, cerca de 28, cerca de 29, cerca de 30, cerca de 31, cerca de 32, cerca de 33, cerca de 34, cerca de 35, cerca de 36, cerca de 37, cerca de 38, cerca de 39, cerca de 40, cerca de 41, cerca de 42, cerca de 43, cerca de 44, cerca de 45, cerca de 46, cerca de 47, cerca de 48, cerca de 49, cerca de 50, cerca de 60, cerca de 70, cerca de

80, cerca de 90, cerca de 100, cerca de 110, cerca de 120 ou mais resíduos de moléculas de amino e qualquer faixa derivável dos mesmos. Em modalidades específicas, as moléculas de peptídeo antigênico são iguais ou inferiores a 50 aminoácidos.

[257] Os peptídeos e polipeptídeos antigênicos podem ser: para MHC de Classe I 15 resíduos ou menos em comprimento e geralmente consistem em entre cerca de 8 e cerca de 11 resíduos, particularmente 9 ou 10 resíduos; para MHC de Classe II, 6-30 resíduos, inclusive.

[258] Se desejável, um peptídeo mais longo pode ser concebido de várias maneiras. Em um caso, quando as probabilidades de apresentação de peptídeos em alelos HLA são preditas ou conhecidas, um peptídeo mais longo poderia consistir em: (1) peptídeos apresentados individualmente com extensões de 2-5 aminoácidos em direção aos N- e C-terminais de cada produto do gene correspondente; (2) uma concatenação de alguns ou todos os peptídeos apresentados com sequências estendidas para cada um. Em outro caso, quando o sequenciamento revela uma sequência de neoepítopo longa (> 10 resíduos) presente no tumor (por exemplo, devido a um deslicamento do quadro de leitura, leitura ou inclusão de íntron que leva a uma nova sequência de peptídeo), um peptídeo mais longo consistiria em: (3) toda a extensão de novos aminoácidos específicos de tumor ou doenças infecciosas - contornando assim a necessidade de seleção computacional ou baseada em teste in vitro do peptídeo mais curto apresentado por HLA mais forte. Em ambos os casos, o uso de um peptídeo mais longo permite o processamento endógeno pelas células do paciente e pode levar a uma

apresentação mais efetiva do antígeno e à indução das respostas das células T.

[259] Peptídeos e polipeptídeos neoantigênicos podem ser apresentados em uma proteína HLA. Em alguns aspectos, peptídeos e polipeptídeos antigênicos são apresentados em uma proteína HLA com maior afinidade do que um peptídeo do tipo selvagem. Em alguns aspectos, um peptídeo ou polipeptídeo antigênico pode ter um IC50 de pelo menos menos que 5000 nM, pelo menos menos que 1000 nM, pelo menos menos que 500 nM, pelo menos menos que 250 nM, pelo menos menos que 200 nM, em pelo menos menos que 150 nM, pelo menos menos que 100 nM, pelo menos menos que 50 nM ou inferior.

[260] Em alguns aspectos, peptídeos e polipeptídeos antigênicos não induzem uma resposta autoimune e/ou invocam tolerância imunológica quando administrados a um sujeito.

[261] Também são fornecidas composições compreendendo pelo menos dois ou mais peptídeos antigênicos. Em algumas modalidades, a composição contém pelo menos dois peptídeos distintos. Pelo menos dois peptídeos distintos podem ser derivados do mesmo polipeptídeo. Por polipeptídeos distintos, entende-se que o peptídeo varia em comprimento, sequência de aminoácidos ou ambos. Os peptídeos podem ser derivados de qualquer polipeptídeo conhecido ou que contenha uma mutação específica do tumor ou peptídeos derivados de qualquer polipeptídeo conhecido ou que tenham expressão alterada em uma célula tumoral ou tecido canceroso em comparação com uma célula normal ou tecido, por exemplo, qualquer polipeptídeo conhecido ou que tenha sido expresso de forma aberrante em uma célula tumoral ou tecido canceroso em comparação com uma célula ou tecido normal. Os

polipeptídeos adequados a partir dos quais os peptídeos antigênicos podem ser derivados podem ser encontrados, por exemplo, na base de dados COSMIC ou na base de dados AACR Genomics Evidence Neoplasia Information Exchange (GENIE). O COSMIC organiza informações abrangentes sobre mutações somáticas no câncer humano. O AACR GENIE agrega e vincula dados genômicos de câncer de grau clínico com resultados clínicos de dezenas de milhares de pacientes com câncer. Em alguns aspectos, a mutação específica do tumor é uma mutação de driver para um tipo de câncer específico. Os peptídeos podem ser derivados de qualquer polipeptídeo conhecido ou suspeito de estar associado a um organismo de doença infecciosa, ou peptídeos derivados de qualquer polipeptídeo conhecido ou que tenham sido encontrados para ter expressão alterada em uma célula infectada em comparação com uma célula normal ou tecido (*por exemplo*, um polinucleotídeo ou polipeptídeo de doença infecciosa, incluindo polinucleotídeos ou polipeptídeos de doenças infecciosas com expressão restrita a uma célula hospedeira).

[262] Os peptídeos e polipeptídeos antigênicos com uma atividade ou propriedade desejada podem ser modificados para fornecer certos atributos desejados, por exemplo, características farmacológicas aprimoradas, enquanto aumentam ou pelo menos retêm substancialmente toda a atividade biológica do peptídeo não modificado para ligar a molécula de MHC desejada e ativar a célula T apropriada. Por exemplo, peptídeos e polipeptídeos antigênicos podem estar sujeitos a várias alterações, como substituições, conservadoras ou não conservadoras, onde essas alterações podem proporcionar certas vantagens em seu uso, como melhor

ligação, estabilidade ou apresentação ao MHC. Por substituições conservativas entende-se a substituição de um resíduo de aminoácido por outro que é biológica e/ou quimicamente semelhante, por exemplo, um resíduo hidrofóbico para outro, ou um resíduo polar por outro. As substituições incluem combinações como Gly, Ala; Val, Ile, Leu, Met; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; e Phe, Tyr. O efeito de substituições únicas de aminoácidos também pode ser investigado usando D-aminoácidos. Tais modificações podem ser feitas usando procedimentos de síntese de peptídeos bem conhecidos, como descrito em eg, Merrifield, Science 232: 341-347 (1986), Barany & Merrifield, The Peptides, Gross & Meienhofer, eds. (NY, Academic Press), pp. 1-284 (1979); e Stewart & Young, Solid Phase Peptide Synthesis, (Rockford, Ill., Pierce), 2ª Ed. (1984).

[263] Modificações de peptídeos e polipeptídeos com vários miméticos de aminoácidos ou aminoácidos não naturais podem ser particularmente úteis no aumento da estabilidade do peptídeo e polipeptídeo in vivo. A estabilidade pode ser testada de várias maneiras. Por exemplo, peptidases e vários meios biológicos, como plasma e soro humano, foram utilizados para testar a estabilidade. Ver, por exemplo, Verhoef et al., Eur. J. Drug Metab Pharmacokin. 11: 291-302 (1986). A meia-vida dos peptídeos pode ser determinada convenientemente usando um ensaio de soro humano a 25% (v/v). O protocolo é geralmente o seguinte. O soro humano reunido (Tipo AB, inativado sem aquecimento) é deslipidado por centrifugação antes do uso. O soro é então diluído para 25% com meio de cultura de tecidos RPMI e usado para testar a estabilidade do peptídeo. Em intervalos de tempo

predeterminados, uma pequena quantidade de solução de reação é removida e adicionada ao ácido tricloracético aquoso a 6% ou ao etanol. A amostra de reação turva é resfriada (4 graus C) por 15 minutos e depois centrifugada para sedimentar as proteínas séricas precipitadas. A presença dos peptídeos é então determinada por HPLC de fase reversa utilizando condições de cromatografia específicas para estabilidade.

[264] Os peptídeos e polipeptídeos podem ser modificados para fornecer atributos desejados diferentes da meia-vida sérica melhorada. Por exemplo, a capacidade dos peptídeos de induzir a atividade CTL pode ser aumentada por ligação a uma sequência que contém pelo menos um epítopo que é capaz de induzir uma resposta da célula T auxiliar. Os conjugados peptídeos imunogênicos/auxiliares T podem ser ligados por uma molécula espaçadora. O espaçador é tipicamente composto de moléculas neutras relativamente pequenas, como aminoácidos ou miméticos de aminoácidos, que são substancialmente não carregadas sob condições fisiológicas. Os espaçadores são tipicamente selecionados dentre, por exemplo, Ala, Gly ou outros espaçadores neutros de aminoácidos não polares ou aminoácidos polares neutros. Será entendido que o espaçador opcionalmente presente não precisa ser composto pelos mesmos resíduos e, portanto, pode ser um hetero ou homo-oligômero. Quando presente, o espaçador geralmente será de pelo menos um ou dois resíduos, mais geralmente de três a seis resíduos. Alternativamente, o peptídeo pode ser ligado ao peptídeo auxiliar T sem um espaçador.

[265] Um peptídeo antigênico pode ser ligado ao peptídeo T auxiliar, diretamente ou através de um espaçador,

no terminal amino ou carboxi do peptídeo. O terminal amino do peptídeo antigênico ou do peptídeo T auxiliar pode ser acilado. Os peptídeos auxiliares T exemplificativos incluem toxoide tetânico 830-843, gripe 307-319, circunsporozoito de malária 382-398 e 378-389.

[266] As proteínas ou peptídeos podem ser produzidos por qualquer técnica conhecida pelos versados na técnica, incluindo a expressão de proteínas, polipeptídeos ou peptídeos por meio de técnicas biológicas moleculares padrão, o isolamento de proteínas ou peptídeos de fontes naturais ou a síntese química de proteínas ou peptídeos. As sequências de nucleotídeo e proteínas, polipeptídeos e peptídeos correspondentes a vários genes foram anteriormente divulgadas e podem ser encontradas em bases de dados computadorizadas conhecidas pelos versados na técnica. Um desses bancos de dados é o Genbank e GenPept do National Center for Biotechnology Information, localizado no site do National Institutes of Health. As regiões de codificação para genes conhecidos podem ser amplificadas e/ou expressas usando as técnicas aqui divulgadas ou como seria conhecido pelos versados na técnica. Alternativamente, várias preparações comerciais de proteínas, polipeptídeos e peptídeos são conhecidas dos versados na técnica.

[267] Em um aspecto adicional, um antígeno inclui um ácido nucleico (por exemplo, polinucleotídeo) que codifica um peptídeo antigênico ou porção do mesmo. O polinucleotídeo pode ser, por exemplo, DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA (por exemplo, mRNA), de fita simples e/ou de fita dupla ou nativas ou estabilizadas de polinucleotídeos, como, por exemplo, polinucleotídeos com uma espinha dorsal fosforotioada, ou

combinações dos mesmos e pode ou não conter íntrons. Um aspecto ainda adicional fornece um vetor de expressão capaz de expressar um polipeptídeo ou uma porção do mesmo. Os vetores de expressão para diferentes tipos de células são bem conhecidos na técnica e podem ser selecionados sem experimentação indevida. Geralmente, o DNA é inserido em um vetor de expressão, como um plasmídeo, na orientação adequada e no quadro de leitura correta para expressão. Se necessário, o DNA pode ser ligado às sequências de ácido nucleico de controle regulatório transcricional e translacional reconhecidas pelo hospedeiro desejado, embora tais controles estejam geralmente disponíveis no vetor de expressão. O vetor é então introduzido no hospedeiro através de técnicas padrão. A orientação pode ser encontrada, por exemplo, em Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

V. Composições de administração

[268] Também é divulgada aqui uma composição imunogênica, por exemplo, uma composição de vacina, capaz de aumentar uma resposta imune específica, por exemplo, uma resposta imune específica de tumor ou uma resposta imune específica de organismo de doença infecciosa. As composições de vacina tipicamente compreendem uma ou uma pluralidade de antígenos, por exemplo, selecionados usando um método aqui descrito. As composições de vacina também podem ser referidas como vacinas.

[269] Uma vacina pode conter entre 1 e 30 peptídeos, 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 ou 30 peptídeos diferentes, 6, 7, 8, 9, 10 11, 12, 13 ou 14 peptídeos

diferentes, ou 12, 13 ou 14 peptídeos diferentes.Os peptídeos podem incluir modificações pós-tradução. Uma vacina pode conter entre 1 e 100 ou mais sequências de ácido nucleico, 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 ou mais sequências de ácido nucleico diferentes, 6, 7, 8, 9, 10 11, 12, 13 ou 14 sequências de ácido nucleico diferentes ou 12, 13 ou 14 sequências de ácido nucleico diferentes. Uma vacina pode conter entre 1 e 30 sequências de antígeno, 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 ou mais sequências de antígeno diferentes, 6, 7, 8, 9, 10 11, 12, 13 ou 14 sequências de antígeno diferentes ou 12, 13 ou 14 sequências de antígeno diferentes.

[270] Uma vacina pode conter entre 1 e 30 sequências de ácido nucleico que codificam o antígeno, 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 ou mais sequências de ácido nucleico de codificação de antígeno diferentes, 6, 7, 8, 9, 10 11, 12, 13 ou 14 sequências de ácido nucleico de codificação de antígeno diferentes, ou 12, 13 ou 14 sequências de ácido nucleico de codificação de antígeno diferentes. As sequências de ácido nucleico de codificação de antígeno podem se referir à porção de codificação de antígeno de um "cassete" de antígeno. As características de um cassete são descritas em mais detalhes abaixo.

[271] Uma vacina pode conter entre 1 e 30 sequências de ácido nucleico de codificação de epítopo diferentes, 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 ou mais sequências de ácido nucleico de codificação de epítopo diferentes, 6, 7, 8, 9, 10 11, 12, 13 ou 14 sequências de ácido nucleico de codificação de epítopo diferentes, ou 12, 13 ou 14 sequências de ácido nucleico de codificação de epítopo diferentes. As sequências de ácido nucleico de codificação de epítopo podem referir-se a sequências para sequências de epítopos individuais.

[272] Uma vacina pode conter pelo menos duas repetições de uma sequência de ácido nucleico de codificação de epítopo. Um usado aqui, uma "repetição" refere-se a duas ou mais iterações de uma sequência de ácido nucleico que

codifica um epítopo de ácido nucleico idêntico (incluindo sequência de ligante 5'opcional e/ou sequências de ligante 3' opcionais aqui descritas) dentro de um antígeno que codifica a sequência de ácido nucleico. Em um exemplo, a porção da sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno de um cassete codifica pelo menos duas repetições de uma sequência de ácido nucleico que codifica o epítopo. Em outros exemplos não limitativos, a porção da sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno de uma cassete codifica mais de um epítopo distinto e pelo menos um dos epítopos distintos é codificado por pelo menos duas repetições da sequência de ácido nucleico que codifica o epítopo distinto (*isto é*, pelo menos duas sequências de ácido nucleico codificando epítopos distintas). Em exemplos ilustrativos não limitativos, uma sequência de ácido nucleico de codificação de antígeno codifica epítopos A, B e C codificados por sequências de ácido nucleico de codificação de epítopo A (E_A), sequência que codifica epítopo B (E_B), e sequência que codifica epítopo C (E_C), e sequências de ácido nucleico de codificação de antígeno exemplificativas tendo repetições de pelo menos um dos epítopos distintos são ilustrados por, mas não estão limitados a, as fórmulas abaixo:

- Repetição de um epítopo distinto (repetição do epítopo A):

E_A-E_B-E_C-E_A; ou

E_A-E_A-E_B-E_C

- Repetição de vários epítopos distintos (repetições dos epítopos A, B e C):

E_A-E_B-E_C-E_A-E_B-E_C; ou

E_A-E_A-E_B-E_B-E_C-E_C

- Várias repetições de vários epítopos distintos (repetições dos epítopos A, B e C):

E_A-E_B-E_C-E_A-E_B-E_C-E_A-E_B-E_C; ou

E_A-E_A-E_A-E_B-E_B-E_B-E_C-E_C-E_C

[273] Os exemplos acima não são limitativos e as sequências de ácido nucleico que codificam o antígeno tendo repetições de pelo menos um dos epítopos distintos podem codificar cada um dos epítopos distintos em qualquer ordem ou frequência. Por exemplo, a ordem e a frequência podem ser um arranjo aleatório dos epítopos distintos, *por exemplo*, em um exemplo com os epítopos A, B e C, pela fórmula E_A-E_B-E_C-E_C-E_A-E_B-E_A-E_C-E_A-E_C-E_C-E_B.

[274] Também é fornecido aqui um cassete de codificação de antígeno, o cassete de codificação de antígeno tendo pelo menos uma sequência de ácido nucleico de codificação de antígeno descrita, de 5' a 3', pela fórmula:

$(E_x$-$(E^N{}_n)_y)_z$

onde E representa uma sequência de ácido nucleico compreendendo pelo menos uma das pelo menos uma das sequências de ácido nucleico que codificam um epítopo distinto,

n representa o número de sequências de ácido nucleico que codifica epítopos distintas e é qualquer número inteiro incluindo 0,

E^N representa uma sequência de ácido nucleico que compreende a sequência de ácido nucleico que codifica epítopo distinto para cada n correspondente,

para cada iteração de z: x = 0 ou 1, y = 0 ou 1 para cada n, e pelo menos um de x ou y = 1, e

z = 2 ou superior, em que a sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno compreende pelo menos duas iterações de E, um determinado E^N ou uma combinação dos mesmos.

[275] Cada E ou E^N pode compreender, independentemente, qualquer sequência de ácido nucleico que codifica o epítopo aqui descrita. Por exemplo, cada E ou E^N pode compreender, independentemente, uma sequência de ácido nucleico descrita, de 5 'a 3', pela fórmula ($L5_b$-N_c-$L3_d$), em que N compreende a sequência de ácido nucleico que codifica um epítopo distinto associada a cada E ou E^N, onde c = 1, L5 compreende uma sequência de ligante 5 ', onde b = 0 ou 1, e L3 compreende uma sequência de ligante 3', onde d = 0 ou 1. Os epítopos e ligantes que podem ser usados são descritos mais detalhadamente aqui, *por exemplo*, *ver* a seção “Cassetes VA”.

[276] As repetições de sequências de ácido nucleico que codificam o epítopo (incluindo a sequência de ligante 5' opcional e/ou as sequências de ligante 3' opcionais) podem ser linearmente ligadas entre si (*por exemplo*, E_A-E_A-... conforme ilustrado acima). As repetições de sequências de ácido nucleico que codificam um epítopo podem ser separadas por uma ou mais sequências de nucleotídeos adicionais. Em geral, as repetições de sequências de ácido nucleico que codificam um epítopo podem ser separadas por qualquer tamanho de sequência de ácido nucleico aplicável para as composições aqui descritas. Em um exemplo, as repetições de sequências de ácido nucleico que codificam epítopo podem ser separadas por uma sequência de ácido nucleico de codificação de epítopo distinta (*por exemplo*, E_A-E_B-E_C-E_A…, conforme ilustrado acima). Nos exemplos em que as repetições são separadas por uma única sequência de ácido nucleico que codifica um epítopo

distinto e separada, e cada sequência de ácido nucleico que codifica o epítopo (incluindo a sequência de ligação 5' opcional e/ou as sequências de ligação 3' opcionais) codifica um peptídeo de 25 aminoácidos em comprimento, as repetições podem ser separadas por 75 nucleotídeos, como no ácido nucleico que codifica o antígeno representado por E_A-E_B-E_A…, E_A é separado por 75 nucleotídeos. Em um exemplo ilustrativo, um ácido nucleico que codifica o antígeno tendo a sequência VTNTEMFVTAPDNLGYMYEVQWPGQTQPQIANCSVYDFFVWLHYYSVRDTVTNTEMFVT APDNLGYMYEVQWPGQTQPQIANCSVYDFFVWLHYYSVRDT (SEQ ID NO: 74) que codifica repetições de antígenos 25mer Trp1 (VTNTEMFVTAPDNLGYMYEVQWPGQ (SEQ ID NO: 75)) e Trp2 (TQPQIANCSVYDFFVWLHYYSVRDT (SEQ ID NO: 76)), as repetições de Trp1 são separados pelo 25mer Trp2 e, portanto, as repetições das sequências de ácido nucleico que codificam epítopo Trp1 são separadas da sequência de ácido nucleico que codifica o epítopo Trp2 de 75 nucleotídeos. Nos exemplos em que as repetições são separadas por 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 sequências de ácido nucleico que codificam epítopo distintas separadas e cada sequência de ácido nucleico que codifica epítopo (incluindo a sequência de ligante 5' opcional e/ou as sequências de ligante 3' opcionais) codifica um peptídeo de 25 aminoácidos de comprimento, as repetições podem ser separadas por 150, 225, 300, 375, 450, 525, 600 ou 675 nucleotídeos, respectivamente.

[277] Em uma modalidade, diferentes peptídeos e/ou polipeptídeos ou sequências de ácido nucleico que os codificam são selecionados de modo que os peptídeos e/ou polipeptídeos capazes de se associar a diferentes moléculas de MHC, tais como diferentes moléculas de MHC de classe I

e/ou diferentes moléculas de MHC de classe II. Em alguns aspectos, uma composição de vacina compreende a sequência codificadora para peptídeos e/ou polipeptídeos capazes de se associar às moléculas de MHC de classe I de ocorrência mais frequente e/ou moléculas de MHC de classe II diferentes. Portanto, as composições de vacina podem compreender fragmentos diferentes capazes de se associar com pelo menos 2 moléculas preferidas, pelo menos 3 preferidas ou pelo menos pelo menos 4 moléculas de MHC classe I preferidas e/ou moléculas de MHC de classe II diferentes.

[278] A composição da vacina pode ser capaz de aumentar uma resposta específica das células T citotóxicas e/ou uma resposta específica das células T auxiliares.

[279] Uma composição de vacina pode ainda compreender um adjuvante e/ou um carreador. Exemplos de adjuvantes e carreadores úteis são dados aqui abaixo. Uma composição pode ser associada a um carreador, por exemplo, uma proteína ou uma célula apresentadora de antígeno, como, por exemplo, uma célula dendrítica (DC) capaz de apresentar o peptídeo a uma célula T.

[280] Adjuvantes são qualquer substância cuja mistura em uma composição de vacina aumente ou modifique a resposta imune a um neoantígeno. Os transportadores podem ser estruturas de andaimes, por exemplo, um polipeptídeo ou um polissacarídeo, ao qual um antígeno é capaz de ser associado. Opcionalmente, os adjuvantes são conjugados covalentemente ou não covalentemente.

[281] A capacidade de um adjuvante para aumentar uma resposta imune a um antígeno é tipicamente manifestada por um aumento significativo ou substancial em uma reação mediada

por imunidade ou redução nos sintomas da doença. Por exemplo, um aumento na imunidade humoral é tipicamente manifestado por um aumento significativo no título de anticorpos aumentados para o antígeno, e um aumento na atividade das células T é tipicamente manifestado no aumento da proliferação celular, ou citotoxicidade celular ou secreção de citocinas. Um adjuvante também pode alterar uma resposta imune, por exemplo, alterando uma resposta principalmente humoral ou Th em uma resposta principalmente celular ou Th.

[282] Os adjuvantes adequados incluem, entre outros, 1018 ISS, alúmen, sais de alumínio, Amplivax, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod, ImuFact IMP321, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, JuvImmune, LipoVac, MF59, monofosforil lipídio A, Montanida IMS 1312, Montanida ISA 206, Montanida ISA 50V, Montanida ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, sistema de vetor PepTel, micropartículas PLG, resiquimode, SRL172, virossomas e outras partículas semelhantes a vírus, YF-17D, armadilha VEGF, R848, beta-glucana, Pam3Cys, estímulo QS21 de Aquila (Aquila Biotech, Worcester, Mass., EUA), derivado de saponina, extratos micobacterianos e imitações de parede celular bacteriana sintética e outros adjuvantes proprietários, como o Ribi's Detox. Quil ou Superfos. Adjuvantes como Freund incompleto ou GM-CSF são úteis. Vários adjuvantes imunológicos (por exemplo, MF59) específicos para células dendríticas e sua preparação foram descritos anteriormente (Dupuis M, et al., Cell Immunol. 1998; 186 (1): 18-27; Allison AC; Dev Biol Stand. 1998; 92: 3-11). Também, citocinas podem ser usadas. Várias citocinas foram diretamente ligadas a influenciar a migração de células

dendríticas para tecidos linfoides (por exemplo, TNF-alfa), acelerando a maturação de células dendríticas em células apresentadoras de antígenos eficientes para linfócitos T (por exemplo, GM-CSF, IL-1 e IL -4) (Pat. U.S. No. 5.849.589, especificamente incorporada neste documento por referência em sua totalidade) e agindo como imunoadjuvantes (por exemplo, IL-12) (Gabrilovich DI, et al., J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1996 (6): 414-418).

[283] Também foram relatados oligonucleotídeos imunoestimuladores de CpG para aumentar os efeitos de adjuvantes em um cenário de vacina. Também podem ser utilizadas outras moléculas de ligação a TLR, como a ligação a RNA, TLR 7, TLR 8 e/ou TLR 9.

[284] Outros exemplos de adjuvantes úteis incluem, mas não estão limitados a, CpGs quimicamente modificados (por exemplo, CpR, Idera), Poli(I:C) (por exemplo, polyi:CI2U), DNA ou RNA bacteriano não-CpG, bem como pequenas moléculas imunoativas e anticorpos como ciclofosfamida, sunitinibe, bevacizumabe, celebrex, NCX-4016, sildenafil, tadalafil, vardenafil, sorafinibe, XL-999, CP-547632, pazopanibe, ZD2171, AZD2171, ipilimumabe, tremelimumabe e SC58175 qie pode agir terapeuticamente e/ou como um adjuvante. As quantidades e concentrações de adjuvantes e aditivos podem ser rapidamente determinadas pelo versado na técnica sem experimentação indevida. Adjuvantes adicionais incluem fatores estimuladores de colônias, como o Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos de Granulócitos (GM-CSF, sargramostim).

[285] Uma composição de vacina pode compreender mais de um adjuvante diferente. Além disso, uma composição

terapêutica pode compreender qualquer substância adjuvante incluindo qualquer uma das alternativas acima ou combinações das mesmas. Também é contemplado que uma vacina e um adjuvante podem ser administrados juntos ou separadamente em qualquer sequência apropriada.

[286] Um carreador (ou excipiente) pode estar presente independentemente de um adjuvante. A função de um carreador pode, por exemplo, ser aumentar o peso molecular de mutantes em particular para aumentar a atividade ou imunogenicidade, conferir estabilidade, aumentar a atividade biológica ou aumentar a meia-vida sérica. Além disso, um carreador pode ajudar a apresentar peptídeos às células T. Um carreador pode ser qualquer carreador adequado conhecido pelo versado na técnica, por exemplo, uma proteína ou uma célula apresentadora de antígeno. Uma proteína carreadora pode ser, mas não está limitada a hemocianina de lapa de buraco de fechadura, proteínas séricas como transferrina, albumina sérica bovina, albumina sérica humana, tireoglobulina ou ovalbumina, imunoglobulinas ou hormônios, como insulina ou ácido palmítico. Para imunização de seres humanos, o carreador é geralmente um carreador fisiologicamente aceitável, aceitável para os seres humanos e seguro. No entanto, o toxoide tetânico e/ou o toxoide difteria são carreadores adequados. Alternativamente, o carreador pode ser dextrana, por exemplo, sefarose.

[287] As células T citotóxicas (CTLs) reconhecem um antígeno na forma de um peptídeo ligado a uma molécula de MHC em vez do próprio antígeno estranho intacto. A própria molécula de MHC está localizada na superfície celular de uma célula apresentadora de antígeno. Assim, uma ativação de

CTLs é possível se um complexo trimérico de antígeno de peptídeo, molécula de MHC e APC estiver presente. Correspondentemente, ele pode melhorar a resposta imune se não apenas o peptídeo for usado para a ativação dos CTLs, mas se forem adicionados APCs adicionais com a molécula de MHC respectiva. Portanto, em algumas modalidades, uma composição de vacina contém adicionalmente pelo menos uma célula apresentadora de antígeno.

[288] Os antígenos também podem ser incluídos em plataformas de vacinas baseadas em vetores virais, como vaccinia, fowlpox, alfavírus auto-replicante, marabavírus, adenovírus (*Ver, por exemplo,* Tatsis et al., Adenovírus, *Terapia Molecular* (2004) 10, 616-629), ou lentivírus, incluindo, mas não se limitando a, lentivírus de segunda, terceira ou segunda/terceira geração híbrida e lentivírus recombinante de qualquer geração projetada para direcionar tipos de células ou receptores específicos (*ver, por exemplo*, 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: basic to 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. Acids Res.* (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). Dependendo da capacidade de empacotamento das plataformas de vacina baseadas em vetor viral mencionadas acima, esta abordagem pode fornecer uma ou mais sequências de ácido nucleico que codificam um ou mais

peptídeos de antígenos. As sequências podem ser flanqueadas por sequências não mutadas, podem ser separadas por ligantes ou podem ser precedidas por uma ou mais sequências direcionadas a um compartimento subcelular (Ver, por exemplo, 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-derivados T cell receptor repertórios, *Science.* (2016) 352 (6291): 1337-41, Lu et al., Efficient selection of mutated cancer antigeneconheced by T cells associated with tough tumor regressions, *Clin Cancer Res.* (2014) 20 (13): 3401-10). Após a introdução em um hospedeiro, as células infectadas expressam os neoantígenos e, assim, provocam uma resposta imune do hospedeiro (por exemplo, CTL) contra o(s) peptídeo(s). Os vetores de vaccínia e os métodos úteis nos protocolos de imunização são descritos, por exemplo, na Pat. U.S. No. 4.722.848. Outro vetor é o BCG (Bacille Calmette Guerin). Os vetores de BCG são descritos em Stover et al. (Nature 351: 456-460 (1991)). Uma grande variedade de outros vetores de vacina úteis para administração terapêutica ou imunização de antígenos, por exemplo, vetores de Salmonella typhi e semelhantes será evidente para os versados na técnica a partir da descrição aqui.

[289] Também é divulgada neste documento uma composição de entrega de vetor adenoviral capaz de entregar uma ou mais sequências de ácido nucleico de carga útil. Uma sequência de ácido nucleico de carga útil pode ser qualquer sequência de ácido nucleico desejada para ser entregue a uma célula de interesse. Em geral, a carga útil é uma sequência

de ácido nucleico ligada a um promotor para conduzir a expressão da sequência de ácido nucleico. A sequência de ácido nucleico de carga útil pode codificar um polipeptídeo (*ou seja*, uma sequência de ácido nucleico capaz de ser transcrita e traduzida em uma proteína). Em geral, uma sequência de ácido nucleico de carga útil que codifica um peptídeo pode codificar qualquer proteína desejada para ser expressa em uma célula. Exemplos de proteínas incluem, mas não estão limitados a, um antígeno (*por exemplo*, um epítopo de MHC de classe I, um epítopo de MHC de classe II ou um epítopo capaz de estimular uma resposta de células B), um anticorpo, uma citocina, um receptor de antígeno quimérico (CAR), um receptor de células T ou um componente de sistema de edição de genoma (*por exemplo*, uma nuclease usada em um sistema de edição de genoma). Os sistemas de edição de genoma incluem, mas não estão limitados a, um sistema CRISPR, um sistema de dedo de zinco, um sistema de meganuclease ou um sistema TALEN. A sequência de ácido nucleico de carga útil pode ser não codificante (*ou seja*, uma sequência de ácido nucleico capaz de ser transcrita, mas não é traduzida em uma proteína). Em geral, uma sequência de ácido nucleico de carga útil não codificante pode ser qualquer polinucleotídeo não codificante desejado para ser expresso em uma célula. Exemplos de polinucleotídeos não codificantes incluem, mas não estão limitados a, polinucleotídeos de interferência de RNA (RNAi) (*por exemplo*, oligonucleotídeos antisentido, shRNAs, siRNAs, miRNAs etc.) ou polinucleotídeo do sistema de edição de genoma (*por exemplo*, um RNA guia [gRNA], um RNA de guia único [sgRNA], um CRISPR transativador [tracrRNA] e/ou um RNA de CRISPR [crRNA]). Uma sequência de ácido

nucleico de carga útil pode codificar dois ou mais (*por exemplo*, 2, 3, 4, 5 ou mais) polipeptídeos distintos (*por exemplo*, duas ou mais sequências de epítopos distintas ligadas entre si) ou conter duas ou mais sequências de ácido nucleico não codificantes distintas (*por exemplo*, dois ou mais polinucleotídeos RNAi distintos). Uma sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter uma combinação de sequências de ácido nucleico que codificam e sequências de ácido nucleico que não codificam polipeptídeo.

V.A.1 Cassetes

[290] Os métodos empregados para a seleção de um ou mais antígenos, a clonagem e construção de um "cassete" e sua inserção em um vetor viral estão dentro da habilidade na técnica dados os ensinamentos aqui fornecidos. Uma cassete pode ter uma ou mais sequências de ácido nucleico de carga útil, tal como um cassete contendo várias sequências de ácido nucleico de carga útil, cada um independentemente operacionalmente ligado a promotores separados e/ou ligados entre si usando outros sistemas multicistônicos, como elementos de sequência de salto de ribossomo 2A (*por exemplo*, E2A, Sequências P2A, F2A ou T2A) ou elementos de sequência do Sítio de Entrada do Ribossoma Interno (IRES). Em um cassete contendo mais de uma sequência de ácido nucleico de carga útil, cada sequência de ácido nucleico de carga útil pode conter uma ou mais cargas úteis, *por exemplo*, cada sequência de ácido nucleico de carga útil pode codificar dois ou mais polipeptídeos ou conter duas ou mais sequências de ácido nucleico não codificantes. Um cassete pode ter uma combinação de sequências de ácido nucleico que codificam e sequências de ácido nucleico que não codificam polipeptídeo.

[291] Um cassete pode ser um cassete de antígeno. Por "cassete de antígeno" entende-se a combinação de um antígeno selecionado ou pluralidade de antígenos e os outros elementos reguladores necessários para transcrever o(s) antígeno(s) e expressar o produto transcrito. Os cassetes de antígeno podem incluir um ou mais antígenos. O antígeno selecionado ou pluralidade de antígenos pode se referir a sequências de epítopos distintas, *por exemplo*, uma sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno no cassete pode codificar uma sequência de ácido nucleico que codifica o epítopo (ou pluralidade de sequências de ácido nucleico que codificam o epítopo) de modo que os epítopos são transcritos e expressos.

[292] Uma sequência de ácido nucleico de carga útil ou pluralidade de sequências de ácido nucleico de carga útil pode ser operacionalmente ligada a componentes reguladores de uma maneira que permite a transcrição. Tais componentes incluem elementos reguladores convencionais que podem conduzir a expressão do(s) antígeno(s) em uma célula transfectada com o vetor viral. Assim, o cassete também pode conter um promotor selecionado que está ligado à(s) sequência(s) de ácido nucleico de carga útil e localizado, com outros elementos reguladores opcionais, dentro das sequências virais selecionadas do vetor recombinante.

[293] Promotores úteis podem ser promotores constitutivos ou regulados (*por exemplo*, indutíveis), que permitirão o controle da quantidade de sequência(s) de ácido nucleico de carga útil e, em geral, a quantidade de um peptídeo (*por exemplo*, um antígeno) no caso de sequências de ácido nucleico de carga útil de codificação, a serem expressas. Por exemplo, um promotor desejável é aquele do

promotor/intensificador precoce imediato do citomegalovírus [ver, por exemplo, Boshart et al, Cell, 41: 521-530 (1985)]. Outro promotor desejável inclui o promotor/intensificador LTR do vírus do sarcoma de Rous. Ainda outra sequência promotora/intensificadora é o promotor da beta-actina citoplasmática de galinha [TA Kost et al, Nucl. Acids Res., 11 (23): 8287 (1983)]. Outros promotores adequados ou desejáveis podem ser selecionados por um versado na técnica, tais como uma sequência promotora CMV, SV40, EF-1, RSV, PGK, HSA, MCK ou EBV.

[294] O cassete também pode incluir sequências de ácido nucleico heterólogas às sequências do vetor viral, incluindo sequências que fornecem sinais para poliadenilação eficiente do transcrito (poli (A), poli-A ou pA) e íntrons com doador de splice funcional e locais aceitadores. Uma sequência poli-A comum que é empregada nos vetores exemplificativos desta invenção é a derivada do papovavírus SV-40. A sequência poli-A geralmente pode ser inserida na cassete após as sequências de ácido nucleico de carga útil e antes das sequências do vetor viral. Uma sequência de íntron comum também pode ser derivada de SV-40 e é referida como a sequência de íntron SV-40 T. Um cassete também pode conter tal íntron, localizado entre a sequência promotora/intensificadora e a(s) sequência(s) de ácido nucleico de carga útil. A seleção destes e de outros elementos vetoriais comuns é convencional [ver, por exemplo, Sambrook et al, “Molecular Cloning. A Laboratory Manual.”, 2a edição, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989) e referências aí citadas] e muitas dessas sequências estão disponíveis em fontes comerciais e industriais, bem como no

Genbank.

[295] Um cassete pode ter uma ou mais sequências de ácido nucleico de carga útil. Por exemplo, um determinado cassete pode incluir 1-10, 1-20, 1-30, 10-20, 15-25, 15-20, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais sequências de ácido nucleico de carga útil. As sequências de ácido nucleico de carga útil podem ser ligadas diretamente umas às outras. As sequências de ácido nucleico de carga útil também podem ser ligadas umas às outras com ligantes.

[296] Um cassete pode ter uma ou mais sequências de ácido nucleico que codificam um polipeptídeo de carga útil. Por exemplo, um determinado cassete pode incluir 1-10, 1-20, 1-30, 10-20, 15-25, 15-20, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais sequências de ácido nucleico de carga útil que codificam um polipeptídeo. Um cassete pode ter uma ou mais sequências de ácido nucleico de carga útil, em que cada sequência de ácido nucleico de carga útil codifica um polipeptídeo distinto. Um cassete pode ter uma ou mais sequências de ácido nucleico de carga útil, em que cada sequência de ácido nucleico de carga útil codifica um ou mais polipeptídeos. Um cassete pode ter uma ou mais sequências de ácido nucleico de carga útil, em que uma ou mais sequências de ácido nucleico de carga útil codificam um ou mais polipeptídeos. Ospolipeptídeos codificados por uma sequência de ácido nucleico de carga útil podem estar em qualquer orientação um em relação ao outro, incluindo N para C ou C para N.

[297] Um cassete de antígeno pode ter um ou mais antígenos. Por exemplo, um determinado cassete pode incluir

1-10, 1-20, 1-30, 10-20, 15-25, 15-20, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais antígenos. Os antígenos podem ser ligados diretamente uns aos outros. Os antígenos também podem ser vinculados uns aos outros com ligantes. Os antígenos podem estar em qualquer orientação um em relação ao outro, incluindo N para C ou C para N.

[298] Como afirmado acima, o cassete pode estar localizado no sítio de qualquer deleção selecionada no vetor viral, tal como o sítio de deleção da região do gene E1 ou deleção de região do gene E3, entre outros que podem ser selecionados.

[299] O cassete pode ser descrito usando a seguinte fórmula para descrever a sequência ordenada de cada elemento, de 5' a 3':

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

[300] em que P e P2 compreendem sequências de ácido nucleico promotoras, N compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um epítopo distinto, L5 compreende uma sequência de ligante 5', L3 compreende uma sequência de ligante 3', G5 compreende sequências de ácido nucleico que codificam um ligante de aminoácido, G3 compreende uma das pelo menos uma sequência de ácido nucleico que codifica um ligante de aminoácido, U compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno MHC de classe II, em que para cada X o Nc correspondente é um epítopo que codifica a sequência de ácido nucleico, onde para cada Y o correspondente Uf é uma sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno. A composição e a sequência ordenada podem ser ainda definidas selecionando o número de elementos

presentes, por exemplo, onde a = 0 ou 1, onde b = 0 ou 1, onde c = 1, onde d = 0 ou 1, onde e = 0 ou 1, onde f = 1, onde g = 0 ou 1, onde h = 0 ou 1, X = 1 a 400, Y = 0, 1, 2, 3, 4 ou 5, Z = 1 a 400 e W = 0, 1, 2, 3, 4 ou 5.

[301] Em um exemplo, os elementos presentes incluem onde a = 0, b = 1, d = 1, e = 1, g = 1, h = 0, X = 10, Y = 2, Z = 1 e W = 1, descrevendo onde nenhum promotor adicional está presente (*ou seja*, apenas a sequência de ácido nucleico do promotor fornecida pela estrutura do alfavírus do RNA está presente), 20 epítopos de MHC de classe I estão presentes, um ligante 5' está presente para cada N, um ligante 3' está presente para cada N, 2 epítopos de MHC de classe II estão presentes, um ligante está presente ligando os dois epítopos de MHC de classe II, um ligante está presente ligando a extremidade 5' dos dois epítopos de MHC de classe II ao ligante 3' do epítopo de MHC de classe I final, e um ligante está presente ligando a extremidade 3' dos dois epítopos de MHC de classe II à estrutura do alfavírus de RNA. Exemplos de ligação da extremidade 3' do cassete à estrutura do alfa-vírus do RNA incluem a ligação direta aos elementos UTR 3' fornecidos pela estrutura do alfavírus de RNA, tal como um CSE 3' 19-nt. Exemplos de ligação da extremidade 5' do cassete à estrutura do alfavírus do RNA incluem a ligação direta a uma sequência promotora 26S, um UTR 5' do alfavírus, um CSE 51 nt ou um CSE 24 nt.

[302] Outros exemplos incluem: onde a = 1 descreve onde um promotor diferente da sequência de ácido nucleico promotora fornecida pela estrutura do alfavírus de RNA está presente; onde a = 1 e Z é maior que 1, onde múltiplos promotores diferentes da sequência de ácido nucleico

promotora fornecida pela estrutura do alfavírus de RNA estão presentes, cada um dirigindo a expressão de 1 ou mais sequências de ácido nucleico que codificam epítopo de MHC de classe I distinto; onde h = 1 descrevendo onde um promotor separado está presente para conduzir a expressão das sequências de ácido nucleico que codificam o antígeno de MHC de classe II; e onde g = 0 que descreve a sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno de MHC de classe II, se presente, está diretamente ligada à estrutura do alfavírus de RNA.

[303] Outros exemplos incluem onde cada epítopo de MHC de classe I que está presente pode ter um ligante 5', um ligante 3', nenhum ou ambos. Em exemplos onde mais de um epítopo de MHC de classe I está presente no mesmo cassete, alguns epítopos de MHC de classe I podem ter um ligante 5' e um ligante 3', enquanto outros epítopos de MHC de classe I podem ter um ligante 5', um ligante 3', ou nenhum. Em outros exemplos onde mais de um epítopo de MHC de classe I está presente no mesmo cassete, alguns epítopos de MHC de classe I podem ter um ligante 5' ou um ligante 3', enquanto outros epítopos de MHC de classe I podem ter um ligante 5', um ligante 3' ou nenhum.

[304] Em exemplos onde mais de um epítopo de MHC de classe II está presente no mesmo cassete, alguns epítopos de MHC de classe II podem ter um ligante 5' e um ligante 3', enquanto outros epítopos de MHC de classe II podem ter um ligante 5', um ligante 3', ou nenhum. Em outros exemplos onde mais de um epítopo de MHC de classe II está presente no mesmo cassete, alguns epítopos de MHC de classe II podem ter um ligante 5' ou um ligante 3', enquanto outros epítopos de

MHC de classe II podem ter um ligante 5', um ligante 3' ou nenhum.

[305] As sequências de ácido nucleico promotoras P e/ou P2 podem ser as mesmas que uma sequência de ácido nucleico promotor fornecida pela estrutura do alfavírus de RNA. Por exemplo, a sequência promotora fornecida pela estrutura do alfavírus de RNA, Pn e P2, pode, cada uma, compreender um promotor subgenômico 26S. As sequências de ácido nucleico promotoras P e/ou P2 podem ser diferentes da sequência de ácido nucleico promotora fornecida pela estrutura do alfavírus de RNA, bem como podem ser diferentes umas das outras.

[306] O ligante 5' L5 pode ser uma sequência nativa ou uma sequência não natural. A sequência não natural inclui, mas não está limitada a, AAY, RR e DPP. O ligante 3' L3 também pode ser uma sequência nativa ou uma sequência não natural. Além disso, L5 e L3 podem ser sequências nativas, ambas sequências não naturais ou uma pode ser nativa e a outra não natural. Para cada X, os ligantes de aminoácidos podem ter 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 ou mais aminoácidos de comprimento. Para cada X, os ligantes de aminoácidos também podem ter pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 13, pelo

menos 14, pelo menos 15, pelo menos 16, pelo menos 17, pelo menos 18, pelo menos 19, pelo menos 20, pelo menos 21, pelo menos 22, pelo menos 23, pelo menos 24, pelo menos 25, pelo menos 26, pelo menos 27, pelo menos 28, pelo menos 29 ou pelo menos 30 aminoácidos de comprimento.

[307] O ligante de aminoácido G5, para cada Y, pode ter 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 ou mais aminoácidos de comprimento. Para cada Y, os ligantes de aminoácidos também podem ter pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos 14, pelo menos 15, pelo menos 16, pelo menos 17, pelo menos 18, pelo menos 19, pelo menos 20, pelo menos 21, pelo menos 22, pelo menos 23, pelo menos 24, pelo menos 25, pelo menos 26, pelo menos 27, pelo menos 28, pelo menos 29 ou pelo menos 30 aminoácidos de comprimento.

[308] Os ligantes de aminoácido G3 podem ter 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 ou mais aminoácidos de comprimento. G3

também pode ser pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos pelo menos 14, pelo menos 15, pelo menos 16, pelo menos 17, pelo menos 18, pelo menos 19, pelo menos 20, pelo menos 21, pelo menos 22, pelo menos 23, pelo menos 24, pelo menos 25, pelo menos 26, pelo menos 27, pelo menos 28, pelo menos 29 ou pelo menos 30 aminoácidos de comprimento.

[309] Para cada X, cada N pode codificar um epítopo de MHC de classe I de 7 a 15 aminoácidos de comprimento. Para cada X, cada N também pode codificar um epítopo de MHC de classe I 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 ou 30 aminoácidos de comprimento. Para cada X, cada N também pode codificar um epítopo de MHC de classe I de pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos pelo menos 14, pelo menos 15, pelo menos 16, pelo menos 17, pelo menos 18, pelo menos 19, pelo menos 20, pelo menos 21, pelo menos 22, pelo menos 23, pelo menos 24, pelo menos 25, pelo menos 26, pelo menos 27, pelo menos 28, pelo menos 29 ou pelo menos 30 aminoácidos de comprimento.

[310] O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter 700 nucleotídeos ou menos. O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter 700 nucleotídeos ou menos e codificar 2 sequências de ácido nucleico que codificam epítopo distintas. O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter 700 nucleotídeos ou menos e codificar pelo menos 2 sequências de ácido nucleico que

codificam epítopo distintas. O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter 700 nucleotídeos ou menos e codificar 3 sequências de ácido nucleico que codificam epítopo distintas. O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter 700 nucleotídeos ou menos e codificar pelo menos 3 sequências de ácido nucleico que codificam epítopo distintas. O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter 700 nucleotídeos ou menos e incluir 1-10, 1-5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais antígenos.

[311] O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter entre 375-700 nucleotídeos de comprimento. O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter entre 375-700 nucleotídeos de comprimento e codificar 2 sequências de ácido nucleico que codificam epítopo distintas. O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter entre 375-700 nucleotídeos de comprimento e codificar pelo menos 2 sequências de ácido nucleico que codificam epítopo distintas. O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter entre 375-700 nucleotídeos de comprimento e codificar 3 sequências de ácido nucleico que codificam epítopo distintas. O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter entre 375-700 nucleotídeos de comprimento e codificar pelo menos 3 sequências de ácido nucleico que codificam epítopo distintas. O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter entre 375-700 nucleotídeos de comprimento e incluir 1-10, 1-5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,

9, 10 ou mais antígenos.

[312] O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter 600, 500, 400, 300, 200 ou 100 nucleotídeos de comprimento ou menos. A cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter 600, 500, 400, 300, 200 ou 100 nucleotídeos de comprimento ou menos e codificar 2 sequências de ácido nucleico de codificação de epítopo distintas. O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter 600, 500, 400, 300, 200 ou 100 nucleotídeos de comprimento ou menos e codificar pelo menos 2 sequências de ácido nucleico que codificam epítopo distintas. A cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter 600, 500, 400, 300, 200 ou 100 nucleotídeos de comprimento ou menos e codificar 3 sequências de ácido nucleico que codificam epítopo distintas. O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter 600, 500, 400, 300, 200 ou 100 nucleotídeos de comprimento ou menos e codificar pelo menos 3 sequências de ácido nucleico que codificam epítopo distintas. O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter 600, 500, 400, 300, 200, ou 100 nucleotídeos de comprimento ou menos e incluir 1-10, 1-5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais antígenos.

[313] O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter entre 375-600, entre 375-500 ou entre 375-400 nucleotídeos de comprimento. A cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter entre 375-600, entre 375-500 ou entre 375-400 nucleotídeos de comprimento e codificar 2 sequências de ácido

nucleico que codificam epítopo distintas. O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter entre 375-600, entre 375-500 ou entre 375-400 nucleotídeos de comprimento e codificar pelo menos 2 sequências de ácido nucleico que codificam epítopo distintas. O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter entre 375-600, entre 375-500 ou entre 375-400 nucleotídeos de comprimento e codificar 3 sequências de ácido nucleico que codificam epítopo distintas. O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter entre 375-600, entre 375-500 ou entre 375-400 nucleotídeos de comprimento e codificar pelo menos 3 sequências de ácido nucleico que codificam epítopo distintas. O cassete que codifica a sequência de ácido nucleico de carga útil pode ter entre 375-600, entre 375-500 ou entre 375-400 nucleotídeos de comprimento e incluir 1-10, 1-5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais antígenos.

V.A.2 Sistema de promotor TET

[314] Também é divulgado aqui um vetor viral que compreende uma cassete com pelo menos uma sequência de carga útil operacionalmente ligada a um promotor regulável que é um sistema promotor TET, tal como um sistema TET-On ou sistema TET-Off. Sem desejar ser limitado pela teoria, um sistema de promotor TET pode ser usado para minimizar a transcrição de ácidos nucleicos de carga útil codificados em um cassete, como antígenos codificados em um cassete de vacina, durante a produção viral. Um sistema de promotor TET pode incluir um promotor controlado por proteína repressora de tetraciclina (TET) (TETr). Por conseguinte, também é

divulgado aqui um vetor viral compreendendo um cassete com pelo menos uma sequência de carga útil operacionalmente ligada a um promotor controlado da proteína repressora de tetraciclina (TET) (TETr). As sequências TETr (tTS) podem incluir a sequência de aminoácidos mostrada em uma SEQ ID NO: 63 e/ou codificada pela sequência de nucleotídeos mostrada em SEQ ID NO: 62. Um promotor controlado por TETr pode incluir a sequência do operador TET de 19 pb (TETo) TCCCTATCAGTGATAGAGA (SEQ ID NO: 60). Um promotor controlado por TETr pode incluir 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 ou mais sequências de ácido nucleico de TETo. No promotor controlado por TETr tem 2 ou mais sequências de ácido nucleico TETo, as sequências TETo podem ser ligadas entre si. No promotor controlado por TETr tem 2 ou mais sequências de ácido nucleico TETo, as sequências TETo podem ser diretamente ligadas entre si. No promotor controlado por TETr tem 2 ou mais sequências de ácido nucleico TETo, as sequências TETo podem ser ligadas em conjunto com uma sequência de ligante, tal como uma sequência de ligante tendo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 , 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 ou mais nucleotídeos. Em um exemplo, a sequência de ligação tem a sequência de nucleotídeos de ligação mostrada na SEQ ID NO: 61. Em geral, um promotor controlado por TETr pode usar qualquer sequência promotora desejada, tal como uma sequência promotora SV40, EF-1, RSV, PGK, HSA, MCK ou EBV. Um promotor controlado por TETr pode usar uma sequência promotora de CMV. Um promotor controlado por TETr pode usar uma sequência promotora mínima de CMV. As sequências TETo podem estar a montante (5') de uma região de sequência promotora onde a RNA polimerase se liga. Em um exemplo

ilustrativo, 7 sequências TETo estão a montante (5') de uma sequência promotora. Um promotor controlado por TETr operacionalmente ligado a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil com sequência TETo a montante da região de sequência promotora pode ter uma sequência ordenada descrita na fórmula, de 5' a 3':

$$(T\text{-}L_Y)_X\text{-}P\text{-}N$$

onde N é uma sequência de ácido nucleico de carga útil, P é uma sequência de ligação de RNA polimerase da sequência promotora operacionalmente ligada à sequência de ácido nucleico de carga útil, T é uma sequência de ácido nucleico TETo compreendendo a sequência de nucleotídeo mostrada em SEQ ID NO: 60, L é um sequência de ligante, onde Y = 0 ou 1 para cada X, e em que X = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20. Em um exemplo ilustrativo, X = 7 e Y = 1 para cada X descreve onde 7 sequências TETo estão a montante (5') da sequência promotora e cada sequência TETo é separada por um ligante.

[315] As sequências TETo podem estar a jusante (3') de uma região de sequência promotora onde a RNA polimerase se liga. Em outro exemplo ilustrativo, 2 sequências TETo estão a jusante (3') de uma sequência promotora. Um promotor controlado por TETr operacionalmente ligado a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil com sequência TETo a jusante da região de sequência promotora pode ter uma sequência ordenada descrita na fórmula, de 5' a 3':

$$P\text{-}(T\text{-}L_Y)_X\text{-}N$$

onde N é uma sequência de ácido nucleico de carga útil, P é uma sequência de ligação de RNA polimerase da sequência promotora operacionalmente ligada à sequência de ácido

nucleico de carga útil, T é uma sequência de ácido nucleico TETo compreendendo a sequência de nucleotídeo mostrada em SEQ ID NO: 60, L é um sequência de ligante, onde Y = 0 ou 1 para cada X, e em que X = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20. Em um exemplo ilustrativo, X = 2 e Y = 1 para cada X descreve onde 2 sequências TETo estão a jusante (3') da sequência promotora e cada sequência TETo é separada por um ligante.

[316] A produção viral de vetores com promotores controlados por TETr pode usar qualquer linha de células de produção viral projetada para expressar uma sequência de TETr (tTS), como uma linha de células 293 ou seus derivados (*por exemplo*, uma linha de células 293F) projetada para expressar tTS. A produção viral de vetores com promotores controlados por TETr em células que expressam tTS pode melhorar a produção viral. A produção viral de vetores com promotores controlados por TETr em células que expressam tTS pode melhorar a infecciosidade viral definida como partículas virais (VP) por unidade infecciosa (IU). A produção viral de vetores com promotores controlados por TETr em células que expressam tTS pode melhorar a produção viral e/ou infectividade viral em pelo menos 1,5, pelo menos 2, pelo menos 2,5, pelo menos 3, pelo menos 3,5, pelo menos 4, pelo menos 4,5, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9 ou pelo menos 10 vezes em relação à produção em uma célula que não expressa tTS. A produção viral de vetores com promotores controlados por TETr em células que expressam tTS pode melhorar a produção viral e/ou infectividade viral em pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 25, pelo menos 30, pelo menos 35, pelo menos 40,

pelo menos 45, pelo menos 50, pelo menos 60, pelo menos 70, pelo menos 80, pelo menos 90 ou pelo menos 100 vezes em relação à produção em uma célula que não expressa tTS. A produção viral de vetores com promotores controlados por TETr em células que expressam tTS pode melhorar a produção viral e/ou infectividade viral em pelo menos 1,5, pelo menos 2, pelo menos 2,5, pelo menos 3, pelo menos 3,5, pelo menos 4, pelo menos 4,5, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9 ou pelo menos 10 vezes em relação à produção de um vetor que não tem um promotor controlado por TETr. A produção viral de vetores com promotores controlados por TETr em células que expressam tTS pode melhorar a produção viral e/ou infectividade viral em pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 25, pelo menos 30, pelo menos 35, pelo menos 40, pelo menos 45, pelo menos 50, pelo menos 60, pelo menos 70, pelo menos 80, pelo menos 90 ou pelo menos 100 vezes em relação à produção de um vetor que não tem um promotor controlado por TETr.

V.B. Pontos de controle imunológicos

[317] Os vetores aqui descritos, tais como vetores C68 aqui descritos ou vetores de alfavírus aqui descritos, podem compreender um ácido nucleico que codifica pelo menos um antígeno e o mesmo ou um vetor separado pode compreender um ácido nucleico que codifica pelo menos um modulador imunológico (por exemplo, um anticorpo como um scFv) que se liga a e bloqueia a atividade de uma molécula de ponto de controle imunológico. Os vetores podem compreender um cassete e uma ou mais moléculas de ácido nucleico que codificam um inibidor de ponto de controle.

[318] Moléculas de ponto de controle imunológico

ilustrativas que podem ser direcionadas para bloqueio ou inibição incluem, mas não estão limitadas a, 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 (pertence à família de moléculas CD2 e é expresso em todas as células NK, □□ e células T CD8 + (□□) de memória), CD160 (também conhecido como BY55) e CGEN-15049. Os inibidores de ponto de controle imunológico incluem anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, ou outras proteínas de ligação, que se ligam a e bloqueiam ou inibem a atividade de um ou mais de CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4, CD160 e CGEN-15049. Inibidores do ponto de controle imunológico ilustrativos incluem Tremelimumabe (anticorpo bloqueador de CTLA-4), anti-OX40, anticorpo monoclonal PD-L1 (Anti-B7-H1; MEDI4736), ipilimumabe, MK-3475 (bloqueador de PD-1), Nivolumambe (anti-PD1 anticorpo), CT-011 (anticorpo anti-PD1), anticorpo monoclonal BY55, AMP224 (anticorpo anti-PDL1), BMS-936559 (anticorpo anti-PDL1), MPLDL3280A (anticorpo anti-PDL1), MSB0010718C (anticorpo anti-PDL1) e Yervoy/ipilimumabe (inibidor do ponto de controle anti-CTLA-4). As sequências que codificam anticorpos podem ser projetadas em vetores, como C68, usando uma habilidade comum na técnica. Um método exemplificativo é descrito em Fang et al., Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. *Nat Biotechnol.* Maio de 2005; 23 (5): 584-90. Epub 17 de abril de 2005; aqui incorporado por referência para todos os fins.

V.C. Considerações adicionais para projeto e fabricação de vacinas

V.C.1 Determinação de um conjunto de peptídeos que cobrem todos os subclones tumorais

[319] Peptídeos truncais, ou seja, aqueles apresentados por todos ou a maioria dos subclones tumorais, podem ser priorizados para inclusão na vacina.[53] Opcionalmente, se não houver peptídeos truncais previstos para serem apresentados e imunogênicos com alta probabilidade, ou se o número de peptídeos truncais previsto para ser apresentado e imunogênico com alta probabilidade é pequeno o suficiente para que peptídeos não truncais adicionais possam ser incluídos na vacina, então outros peptídeos podem ser priorizados estimando-se o número e a identidade dos subclones tumorais e escolhendo peptídeos para maximizar o número de subclones tumorais cobertos pela vacina.[54]

V.C.2. Priorização de Antígeno

[320] Após a aplicação de todos os filtros de antígenos acima, mais antígenos candidatos ainda podem estar disponíveis para inclusão de vacina do que a tecnologia de vacina pode suportar. Além disso, a incerteza sobre vários aspectos da análise de antígenos pode permanecer e podem existir trocas entre propriedades diferentes dos antígenos candidatos à vacina. Assim, no lugar de filtros predeterminados em cada etapa do processo de seleção, pode-se considerar um modelo multidimensional integrado que coloca os antígenos candidatos em um espaço com pelo menos os seguintes eixos e otimiza a seleção usando uma abordagem integrativa.

1. Risco de autoimunidade ou tolerância (risco de linhagem germinativa) (é geralmente preferido o menor risco

de autoimunidade)

2. Probabilidade de artefato de sequenciamento (a probabilidade mais baixa de artefato é geralmente preferida)

3. Probabilidade de imunogenicidade (normalmente é preferida uma maior probabilidade de imunogenicidade)

4. Probabilidade de apresentação (normalmente é preferida uma maior probabilidade de apresentação)

5. Expressão genética (normalmente é preferida uma expressão mais alta)

6. A cobertura dos genes de HLA (maior número de moléculas de HLA envolvidas na apresentação de um conjunto de antígenos pode diminuir a probabilidade de um tumor escapar do ataque imune por meio de sobrerregulação ou mutação das moléculas de HLA)

7. Cobertura das classes de HLA (cobrir tanto HLA-I quanto HLA-II pode aumentar a probabilidade de resposta terapêutica e diminuir a probabilidade de escape do tumor)

[321] Além disso, opcionalmente, os antígenos podem ser despriorizados (por exemplo, excluídos) da vacinação, se for predito que sejam apresentados por alelos HLA perdidos ou inativados em todo ou em parte do tumor do paciente ou célula infectada. A perda do alelo de HLA pode ocorrer por mutação somática, perda de heterozigose ou exclusão homozigótica do locus. Os métodos para detecção da mutação somática do alelo de HLA são bem conhecidos na técnica, por exemplo (Shukla et al., 2015). Métodos para detecção de LOH somática e deleção homozigótica (inclusive para locus de HLA) também são bem descritos. (Carter et al., 2012; McGranahan et al., 2017; Van Loo et al., 2010). Os antígenos também podem ser despriorizados se os dados de espectrometria

de massa indicarem que um antígeno predito não é apresentado por um alelo HLA predito.

V.D. Alfavírus

V.D.1. Biologia do alfavírus

[322] Os alfavírus são membros da família *Togaviridae* e são vírus de RNA de fita simples de sentido positivo. Os membros são normalmente classificados como vírus do Velho Mundo, como vírus Sindbis, Ross River, Mayaro, Chikungunya e Semliki Forest, ou Novo Mundo, como encefalite equina oriental, Aura, Fort Morgan ou encefalite equina venezuelana e sua cepa derivada TC- 83 (Strauss Microbrial Review 1994). Um genoma de alfavírus natural tem normalmente cerca de 12 kb de comprimento, os primeiros dois terços do qual contêm genes que codificam proteínas não estruturais (nsPs) que formam complexos de replicação de RNA para auto-replicação do genoma viral, e o último terço do qual contém um cassete de expressão subgenômica que codifica proteínas estruturais para a produção de vírions (Frolov RNA 2001).

[323] Um modelo de ciclo de vida de um alfavírus envolve várias etapas distintas (Strauss Microbrial Review 1994, Jose Future Microbiol 2009). Após a fixação do vírus a uma célula hospedeira, o vírion se funde com as membranas dentro dos compartimentos endocíticos, resultando na eventual liberação de RNA genômico no citosol. O RNA genômico, que está em uma orientação de fita positiva e compreende uma capa de metilguanilato 5' e uma cauda poliA 3', é traduzido para produzir proteínas não estruturais nsP1-4 que formam o complexo de replicação. No início da infecção, a fita positiva é então replicada pelo complexo em um modelo de suporte negativo. No modelo atual, o complexo de

replicação é posteriormente processado conforme a infecção progride, com o complexo processado resultante mudando para a transcrição da fita negativa em ambos os RNA genômico de fita positiva de comprimento total, bem como o RNA de fita positiva subgenômico 26S contendo os genes estruturais. Vários elementos de sequência conservada (CSEs) de alfavírus foram identificados como potencialmente desempenhando um papel nas várias etapas de replicação de RNA, incluindo; um complemento da 5' UTR na replicação de RNAs de fita positiva a partir de um modelo de fita negativa, um CSE de 51 nt na replicação da síntese de fita negativa a partir do modelo genômico, um CSE de 24 nt na região de junção entre os nsPs e o RNA 26S na transcrição do RNA subgenômico da fita negativa e um CSE 3' de 19-nt na síntese da fita negativa a partir do molde da fita positiva.

[324] Após a replicação das várias espécies de RNA, as partículas de vírus são normalmente montadas no ciclo de vida natural do vírus. O RNA 26S é traduzido e as proteínas resultantes processadas posteriormente para produzir as proteínas estruturais, incluindo a proteína do capsídeo, glicoproteínas E1 e E2 e dois pequenos polipeptídeos E3 e 6K (Strauss 1994). Ocorre a encapsidação do RNA viral com proteínas do capsídeo normalmente específicas apenas para o RNA genômico sendo empacotado, seguido pela montagem do vírion e brotamento na superfície da membrana.

V.D.2. Alfavírus como vetor de entrega

[325] Os alfavírus (incluindo sequências de alfavírus, características e outros elementos) podem ser usados para gerar vetores de entrega baseados em alfavírus (também podem ser referidos como vetores de alfavírus, vetores virais de

alfavírus, vetores de vacina de alfavírus, vetores de ARN auto-replicante (srRNA) ou auto-amplificação de vetores de RNA (samRNA)). Os alfavírus foram previamente projetados para uso como sistemas de vetores de expressão (Pushko 1997, Rheme 2004). Os alfavírus oferecem várias vantagens, particularmente em um ambiente de vacina onde a expressão de antígeno heterólogo pode ser desejada. Devido à sua capacidade de auto-replicação no citosol do hospedeiro, os vetores de alfavírus são geralmente capazes de produzir altos números de cópias do cassete de expressão dentro de uma célula, resultando em um alto nível de produção de antígeno heterólogo. Além disso, os vetores são geralmente transitórios, resultando em biossegurança melhorada, bem como redução da indução de tolerância imunológica ao vetor. O público, em geral, também carece de imunidade pré-existente aos vetores alfavírus em comparação com outros vetores virais padrão, como o adenovírus humano. Os vetores baseados em alfavírus também geralmente resultam em respostas citotóxicas às células infectadas. A citotoxicidade, até um certo grau, pode ser importante em um ambiente de vacina para produzir adequadamente uma resposta imune ao antígeno heterólogo expresso. No entanto, o grau de citotoxicidade desejada pode ser um ato de equilíbrio e, portanto, vários alfavírus atenuados foram desenvolvidos, incluindo a cepa TC-83 de VEE. Assim, um exemplo de um vetor de expressão de antígeno aqui descrito pode utilizar uma estrutura de alfavírus que permite um alto nível de expressão de antígeno, induz uma resposta imune robusta ao antígeno, não induz uma resposta imune ao próprio vetor e pode ser usado em uma maneira segura. Além disso, o cassete de expressão de

antígeno pode ser projetado para induzir diferentes níveis de uma resposta imune através da otimização de quais sequências de alfavírus o vetor usa, incluindo, mas não se limitando a, sequências derivadas de VEE ou seu derivado atenuado TC-83.

[326] Várias estratégias de projeto de vetor de expressão foram projetadas usando sequências de alfavírus (Pushko 1997). Em uma estratégia, um projeto de vetor de alfavírus inclui a inserção de uma segunda cópia dos elementos da sequência promotora 26S a jusante dos genes da proteína estrutural, seguida por um gene heterólogo (Frolov 1993). Assim, além das proteínas estruturais e não estruturais naturais, é produzido um RNA subgenômico adicional que expressa a proteína heteróloga. Nesse sistema, todos os elementos para a produção de vírions infecciosos estão presentes e, portanto, podem ocorrer rodadas repetidas de infecção do vetor de expressão em células não infectadas.

[327] Outro projeto de vetor de expressão faz uso de sistemas de vírus auxiliares (Pushko 1997). Nessa estratégia, as proteínas estruturais são substituídas por um gene heterólogo. Assim, após a autorreplicação do RNA viral mediada por genes não estruturais ainda intactos, o RNA subgenômico 26S fornece a expressão da proteína heteróloga. Tradicionalmente, vetores adicionais que expressam as proteínas estruturais são então fornecidos *in trans*, tal como por cotransfecção de uma linha celular, para produzir vírus infeccioso. Um sistema é descrito em detalhes em USPN 8.093.021, que está incorporado neste documento por referência em sua totalidade, para todos os fins. O sistema de vetor auxiliar fornece o benefício de limitar a

possibilidade de formação de partículas infecciosas e, portanto, melhora a biossegurança. Além disso, o sistema de vetor auxiliar reduz o comprimento total do vetor, melhorando potencialmente a replicação e a eficiência da expressão. Assim, um exemplo de um vetor de expressão de antígeno aqui descrito pode utilizar uma estrutura de alfavírus em que as proteínas estruturais são substituídas por um cassete, o vetor resultante tanto reduzindo questões de biossegurança, enquanto ao mesmo tempo promovendo expressão eficiente devido à redução no tamanho do vetor de expressão global.

V.D.3. Produção de alfavírus *in vitro*

[328] Os vetores de entrega de alfavírus são geralmente polinucleotídeos de RNA de sentido positivo. Uma técnica conveniente bem conhecida na técnica para a produção de RNA é a transcrição *in vitro* IVT. Nesta técnica, um molde de DNA do vetor desejado é primeiro produzido por técnicas bem conhecidas pelos versados na técnica, incluindo técnicas de biologia molecular padrão, como clonagem, digestão de restrição, ligação, síntese de genes e reação em cadeia da polimerase (PCR). O molde de DNA contém um promotor de RNA polimerase na extremidade 5' da sequência que se deseja transcrever em RNA. Os promotores incluem, mas não estão limitados a, promotores da polimerase de bacteriófago, como T3, T7 ou SP6. O molde de DNA é então incubado com a enzima RNA polimerase apropriada, agentes tampão e nucleotídeos (NTPs). O polinucleotídeo de RNA resultante pode ser opcionalmente modificado incluindo, mas limitado a, adição de uma estrutura cap 5', como 7-metilguanosina ou uma estrutura relacionada, e opcionalmente modificar a extremidade 3' para incluir uma cauda de poliadenilato

(poliA). O RNA pode então ser purificado usando técnicas bem conhecidas na área, como extração com fenol-clorofórmio.

V.D.4. Entrega via nanopartícula de lipídio

[329] Um aspecto importante a ser considerado no projeto do vetor de vacina é a imunidade contra o próprio vetor (Riley 2017). Isto pode ser na forma de imunidade preexistente ao próprio vetor, tal como com certos sistemas de adenovírus humanos, ou na forma de desenvolver imunidade ao vetor após a administração da vacina. O último é uma consideração importante se forem realizadas várias administrações da mesma vacina, como doses separadas de iniciação e reforço, ou se o mesmo sistema de vetor de vacina for usado para entregar diferentes cassetes.

[330] No caso de vetores de alfavírus, o método de entrega padrão é o sistema de vírus auxiliar discutido anteriormente que fornece proteínas capsídeo, E1 e E2 *in trans* para produzir partículas virais infecciosas. No entanto, é importante notar que as proteínas E1 e E2 são frequentemente os principais alvos dos anticorpos neutralizantes (Strauss 1994). Assim, a eficácia do uso de vetores de alfavírus para entregar antígenos de interesse às células alvo pode ser reduzida se as partículas infecciosas forem direcionadas por anticorpos neutralizantes.

[331] Uma alternativa à entrega de genes mediada por partículas virais é o uso de nanomateriais para entregar vetores de expressão (Riley 2017). Os veículos de nanomateriais, de maneira importante, podem ser feitos de materiais não imunogênicos e geralmente evitam induzir imunidade ao próprio vetor de entrega. Esses materiais podem incluir, mas não estão limitados a, lipídios, nanomateriais

inorgânicos e outros materiais poliméricos. Os lipídios podem ser catiônicos, aniônicos ou neutros. Os materiais podem ser sintéticos ou derivados naturalmente e, em alguns casos, biodegradáveis. Os lípidos podem incluir gorduras, colesterol, fosfolípidos, conjugados de lípidos incluindo, mas não se limitando a, conjugados de polietilenoglicol (PEG) (lípidos PEGuilados), ceras, óleos, glicerídeos e vitaminas solúveis em gordura.

[332] Nanopartículas lipídicas (LNPs) são um sistema de entrega atraente devido à natureza anfifílica dos lipídeos, permitindo a formação de membranas e estruturas semelhantes a vesículas (Riley 2017). Em geral, essas vesículas entregam o vetor de expressão absorvendo na membrana das células alvo e liberando ácido nucleico no citosol. Além disso, as LNPs podem ser posteriormente modificadas ou funcionalizadas para facilitar o direcionamento de tipos de células específicos. Outra consideração no projeto de LNP é o equilíbrio entre a eficiência de direcionamento e citotoxicidade. As composições lipídicas geralmente incluem misturas definidas de lipídeos catiônicos, neutros, aniônicos e anfipáticos. Em alguns casos, lipídios específicos são incluídos para prevenir a agregação de LNP, prevenir a oxidação de lipídios ou fornecer grupos químicos funcionais que facilitam a ligação de porções adicionais. A composição lipídica pode influenciar o tamanho e a estabilidade geral da LNP. Em um exemplo, a composição lipídica compreende dilinoleilmetil-4-dimetilaminobutirato (MC3) ou moléculas do tipo MC3. MC3 e composições de lipídios semelhantes a MC3 podem ser formuladas para incluir um ou mais outros lipídios, como um

PEG ou lipídio conjugado a PEG, um esterol ou lipídios neutros.

[333] Os vetores de ácido nucleico, tais como vetores de expressão, expostos diretamente ao soro podem ter várias consequências indesejáveis, incluindo degradação do ácido nucleico por nucleases de soro ou estimulação fora do alvo do sistema imunológico pelos ácidos nucleicos livres. Portanto, o encapsulamento do vetor alfavírus pode ser usado para evitar a degradação, ao mesmo tempo que evita possíveis efeitos fora do alvo. Em certos exemplos, um vetor de alfavírus é totalmente encapsulado no veículo de entrega, como no interior aquoso de uma LNP. A encapsulação do vetor alfavírus dentro de uma LNP pode ser realizada por técnicas bem conhecidas dos versados na técnica, tais como mistura microfluídica e geração de gotículas realizada em um dispositivo de geração de gotículas microfluídicas. Tais dispositivos incluem, mas não estão limitados a, dispositivos de junção em T padrão ou dispositivos de foco de fluxo. Em um exemplo, a formulação lipídica desejada, como MC3 ou composições semelhantes a MC3, é fornecida ao dispositivo de geração de gotículas em paralelo com o vetor de entrega de alfavírus e outros agentes desejados, de modo que o vetor de entrega e os agentes desejados sejam totalmente encapsulados dentro o interior do MC3 ou LNP com base semelhante ao MC3. Em um exemplo, o dispositivo de geração de gotículas pode controlar a faixa de tamanho e a distribuição de tamanho das LNPs produzidas. Por exemplo, a LNP pode ter um tamanho que varia de 1 a 1000 nanômetros de diâmetro, por exemplo, 1, 10, 50, 100, 500 ou 1.000 nanômetros. Após a geração de gotículas, os veículos de

entrega que encapsulam os vetores de expressão podem ser posteriormente tratados ou modificados para prepará-los para administração.

V.E. Adenovírus de chimpanzé (ChAd)

V.E.1. Entrega viral com adenovírus de chimpanzé

[334] As composições de vacina para entrega de um ou mais antígenos (por exemplo, através de um cassete que codifica um ou mais antígenos ou neoantígenos) podem ser criadas fornecendo sequências de ácido nucleico de adenovírus de origem de chimpanzé, uma variedade de novos vetores e linhas celulares que expressam genes de adenovírus de chimpanzé. Uma sequência de ácido nucleico de um adenovírus C68 de chimpanzé (também referido aqui como ChAdV68) pode ser usada em uma composição de vacina para entrega de antígeno (*Ver* SEQ ID NO: 1).O uso de vetores derivados de adenovírus C68 é descrito em mais detalhes em USPN 6.083.716, que está incorporado neste documento por referência em sua totalidade, para todos os efeitos.

[335] Em um aspecto adicional, é fornecido aqui um adenovírus recombinante compreendendo a sequência de DNA de um adenovírus de chimpanzé, como C68 e um cassete operacionalmente ligado a sequências regulatórias que direcionam sua expressão. O vírus recombinante é capaz de infectar uma célula de mamífero, de preferência um humano, e capaz de expressar a carga útil do cassete na célula. Neste vetor, o gene E1 de chimpanzé nativo e/ou gene E3 e/ou gene E4 podem ser deletados. Um cassete pode ser inserido em qualquer um desses sítios de deleção do gene. O cassete pode incluir um antígeno contra o qual uma resposta imune iniciada é desejada.

[336] Em outro aspecto, é fornecido aqui uma célula de mamífero infectada com um adenovírus de chimpanzé, como C68.

[337] Em ainda um aspecto adicional, é fornecida uma nova linha de células de mamífero que expressa um gene de adenovírus de chimpanzé (por exemplo, de C68) ou fragmento funcional do mesmo.

[338] Em ainda um outro aspecto, é fornecido aqui um método para entregar um cassete em uma célula de mamífero que compreende a etapa de introdução na célula de uma quantidade eficaz de um adenovírus de chimpanzé, tal como C68, que foi projetado para expressar o cassete.

[339] Ainda outro aspecto fornece um método para induzir uma resposta imune em um hospedeiro mamífero para tratar o câncer. O método pode compreender a etapa de administrar o hospedeiro de uma quantidade eficaz de um adenovírus de chimpanzé recombinante, como C68, compreendendo um cassete que codifica um ou mais antígenos do tumor contra o qual a resposta imune é direcionada.

[340] Ainda outro aspecto fornece um método para induzir uma resposta imune em um hospedeiro mamífero para tratar ou prevenir uma doença em um sujeito, como uma doença infecciosa. O método pode compreender a etapa de administrar ao hospedeiro de uma quantidade eficaz de um adenovírus de chimpanzé recombinante, como C68, compreendendo uma cassete de antígeno que codifica um ou mais antígenos, como da doença infecciosa contra a qual a resposta imune é direcionada.

[341] Também é divulgada uma célula de mamífero não símio que expressa um gene de adenovírus de chimpanzé obtido a partir da sequência de SEQ ID NO: 1.O gene pode ser selecionado a partir do grupo que consiste no adenovírus

E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 e L5 de SEQ ID NO: 1.

[342] Também é divulgada uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de DNA de adenovírus de chimpanzé compreendendo um gene obtido a partir da sequência de SEQ ID NO: 1. O gene pode ser selecionado a partir do grupo que consiste nos referidos genes de adenovírus de chimpanzé E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 e L5 de SEQ ID NO: 1. Em alguns aspectos, a molécula de ácido nucleico compreende a SEQ ID NO: 1. Em alguns aspectos, a molécula de ácido nucleico compreende a sequência da SEQ ID NO: 1, sem pelo menos um gene selecionado do grupo que consiste nos genes E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 e L5 da SEQ ID NO: 1.

[343] Também é divulgado um vetor que compreende uma sequência de DNA de adenovírus de chimpanzé obtida a partir de SEQ ID NO: 1 e um cassete operacionalmente ligado a uma ou mais sequências regulatórias que direcionam a expressão do cassete em uma célula hospedeira heteróloga, opcionalmente em que a sequência de DNA de adenovírus de chimpanzé compreende em pelo menos os *cis*-elementos necessários para a replicação e encapsidação do vírion, os *cis*-elementos flanqueando o cassete e as sequências regulatórias. Em alguns aspectos, a sequência de DNA de adenovírus de chimpanzé compreende um gene selecionado do grupo que consiste em E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 e sequências de genes L5 de SEQ ID NO: 1.Em alguns aspectos, o vetor pode não ter o gene E1A e/ou E1B.

[344] Também é divulgada neste documento uma célula hospedeira transfectada com um vetor divulgado neste

documento, como um vetor C68 projetado para expressar um cassete. Também é divulgada neste documento uma célula humana que expressa um gene selecionado introduzido na mesma através da introdução de um vetor divulgado neste documento na célula.

[345] Também é divulgado aqui um vetor de adenovírus compreendendo: um gene E4 parcialmente deletado compreendendo uma região E4orf2 deletada ou parcialmente deletada e uma região E4orf3 deletada ou parcialmente deletada e, opcionalmente, uma região E4orf4 deletada ou parcialmente deletada. O E4 parcialmente deletado pode compreender uma deleção de E4 de pelo menos os nucleotídeos 34.916 a 35.642 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, e em que o vetor compreende pelo menos os nucleotídeos 2 a 36.518 da sequência apresentada na SEQ ID NO: 1. O E4 parcialmente deletado pode compreender uma deleção de E4 de pelo menos uma deleção parcial dos nucleotídeos 34.916 a 34.942 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, pelo menos uma deleção parcial dos nucleotídeos 34.952 a 35.305 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, e pelo menos uma deleção parcial dos nucleotídeos 35.302 a 35.642 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, e em que o vetor compreende pelo menos os nucleotídeos 2 a 36.518 da sequência apresentada na SEQ ID NO: 1. A E4 parcialmente deletada pode compreender uma deleção E4 de pelo menos os nucleotídeos 34.980 a 36.516 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, e em que o vetor compreende pelo menos os nucleotídeos 2 a 36.518 da sequência apresentada na SEQ ID NO: 1. O E4 parcialmente deletado pode compreender uma deleção de E4 de pelo menos os nucleotídeos 34.979 a 35.642 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, e em

que o vetor compreende pelo menos os nucleotídeos 2 a 36.518 da sequência apresentada na SEQ ID NO: 1. O E4 parcialmente deletado pode compreender uma deleção de E4 de pelo menos uma deleção parcial de E4Orf2, um E4Orf3 totalmente deletado e pelo menos uma deleção parcial de E4Orf4. O E4 parcialmente deletado pode compreender uma deleção E4 de pelo menos uma deleção parcial de E4Orf2, pelo menos uma deleção parcial de E4Orf3 e pelo menos uma deleção parcial de E4Orf4. O E4 parcialmente deletado pode compreender uma deleção de E4 de pelo menos uma deleção parcial de E4Orf1, um E4Orf2 totalmente deletado e pelo menos uma deleção parcial de E4Orf3. O E4 parcialmente deletado pode compreender uma deleção de E4 de pelo menos uma deleção parcial de E4Orf2 e pelo menos uma deleção parcial de E4Orf3.O E4 parcialmente deletado pode incluir uma deleção de E4 entre o sítio inicial de E4Orf1 e o sítio inicial de E4Orf5. O E4 parcialmente deletado pode ser uma deleção de E4 adjacente ao sítio de início de E4Orf1. O E4 parcialmente deletado pode ser uma deleção de E4 adjacente ao sítio de início de E4Orf2. O E4 parcialmente deletado pode ser uma deleção de E4 adjacente ao sítio de início de E4Orf3. O E4 parcialmente deletado pode ser uma deleção de E4 adjacente ao sítio de início de E4Orf4. A deleção de E4 pode ser de pelo menos 50, pelo menos 100, pelo menos 200, pelo menos 300, pelo menos 400, pelo menos 500, pelo menos 600, pelo menos 700, pelo menos 800, pelo menos 900, pelo menos 1.000, pelo menos pelo menos 1.100, pelo menos 1.200, pelo menos 1.300, pelo menos 1.400, pelo menos 1.500, pelo menos 1.600, pelo menos 1.700, pelo menos 1.800, pelo menos 1.900 ou pelo menos 2.000 nucleotídeos. A deleção de E4 pode ser de pelo menos 700

nucleotídeos. A deleção de E4 pode ser de pelo menos 1.500 nucleotídeos. A deleção de E4 pode ser de 50 ou menos, 100 ou menos, 200 ou menos, 300 ou menos, 400 ou menos, 500 ou menos, 600 ou menos, 700 ou menos, 800 ou menos, 900 ou menos, 1.000 ou menos, 1.100 ou menos, 1.200 ou menos, 1.300 ou menos, 1.400 ou menos, 1.500 ou menos, 1.600 ou menos, 1.700 ou menos, 1.800 ou menos, 1.900 ou menos, ou 2.000 ou menos nucleotídeos. A deleção de E4 pode ser de 750 nucleotídeos ou menos. A deleção de E4 pode ser de pelo menos 1.550 nucleotídeos ou menos.

[346] O gene E4 parcialmente deletado pode ser a sequência do gene E4 mostrada na SEQ ID NO: 1 que não tem pelo menos os nucleotídeos 34.916 a 35.642 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1. O gene E4 parcialmente deletado pode ser a sequência do gene E4 mostrada na SEQ ID NO: 1 que não tema sequência do gene E4 mostrada na SEQ ID NO: 1 e que não tem pelo menos os nucleotídeos 34.916 a 34.942, os nucleotídeos 34.952 a 35.305 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1, e os nucleotídeos 35.302 a 35.642 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1. O gene E4 parcialmente deletado pode ser a sequência do gene E4 mostrada na SEQ ID NO: 1 e que não tem pelo menos os nucleotídeos 34.980 a 36.516 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1. O gene E4 parcialmente deletado pode ser a sequência do gene E4 mostrada na SEQ ID NO: 1 e que não tem pelo menos os nucleotídeos 34.979 a 35.642 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1. O vetor de adenovírus com o gene E4 parcialmente deletado pode ter um cassete, em que o cassete compreende pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil e em que o cassete compreende pelo menos uma sequência promotora operacionalmente ligada

a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil. O vetor de adenovírus com o gene E4 parcialmente deletado pode ter um ou mais genes ou sequências regulatórias da sequência ChAdV68 mostrada na SEQ ID NO: 1, opcionalmente em que um ou mais genes ou sequências regulatórias compreendem pelo menos uma das repetições de terminal invertido (ITR) de adenovírus de chimpanzé, genes E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 e L5 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1. O vetor de adenovírus com o gene E4 parcialmente excluído pode ter os nucleotídeos 2 a 34.916 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, em que o gene E4 parcialmente deletado é 3' dos nucleotídeos 2 a 34.916 e, opcionalmente, os nucleotídeos 2 a 34.916 adicionalmente não têm nucleotídeos 577 a 3403 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção de E1 e/ou não têm nucleotídeos 27.125 a 31.825 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção de E3. O vetor de adenovírus com o gene E4 parcialmente deletado pode ter nucleotídeos 35.643 a 36.518 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, e em que o gene E4 parcialmente deletado é 5' dos nucleotídeos 35.643 a 36.518. O vetor de adenovírus com o gene E4 parcialmente deletado pode ter nucleotídeos 2 a 34.916 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, em que o gene E4 parcialmente deletado é 3' dos nucleotídeos 2 a 34.916, os nucleotídeos 2 a 34.916 adicionalmente não têm nucleotídeos 577 a 3.403 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção de E1 e não têm os nucleotídeos 27.125 a 31.825 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção E3. O vetor de adenovírus com o gene E4 parcialmente deletado pode ter nucleotídeos 2 a 34.916 da sequência mostrada na SEQ ID

NO: 1, em que o gene E4 parcialmente deletado é 3' dos nucleotídeos 2 a 34.916, os nucleotídeos 2 a 34.916adicionalmente não têm nucleotídeos 577 a 3.403 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção de E1 e não têm os nucleotídeos 27.125 a 31.825 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção de E3, e têm nucleotídeos 35.643 a 36.518 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1, e em que o gene E4 parcialmente deletado é 5' dos nucleotídeos 35.643 a 36.518.

[347] O gene E4 parcialmente deletado pode ser a sequência do gene E4 mostrada na SEQ ID NO: 1 que não tem pelo menos os nucleotídeos 34.916 a 35.642 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, os nucleotídeos 2 a 34.916 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, em que o gene E4 parcialmente deletado é 3' dos nucleotídeos 2 a 34.916, os nucleotídeos 2 a 34.916 adicionalmente não têm os nucleotídeos 577 a 3403 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção de E1 e não têm os nucleotídeos 27.125 a 31.825 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção E3, e têm os nucleotídeos 35.643 a 36.518 da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, e em que o gene E4 parcialmente deletado é 5' dos nucleotídeos 35.643 a 36.518.

[348] O vetor de adenovírus com o gene E4 parcialmente deletado pode ter

[349] Também é divulgado neste documento um método para entregar um cassete a uma célula de mamífero, compreendendo a introdução na referida célula de uma quantidade eficaz de um vetor divulgado neste documento, como um vetor C68 projetado para expressar o cassete.

[350] Também é divulgado neste documento um método para a produção de um compreendendo a introdução de um vetor divulgado neste documento em uma célula de mamífero, cultivando a célula em condições adequadas e produzindo o antígeno.

V.E.2. Linhas celulares de complementação que expressam E1

[351] Para gerar adenovírus de chimpanzé recombinante (Ad) deletados em qualquer um dos genes aqui descritos, a função da região do gene deletada, se essencial para a replicação e infectividade do vírus, pode ser fornecida ao vírus recombinante por um vírus auxiliar ou linha celular, isto é, uma linha de células de complementação ou empacotamento. Por exemplo, para gerar um vetor de adenovírus de chimpanzé deficiente para replicação, pode ser usada uma linha celular que expressa os produtos do gene E1 do adenovírus humano ou de chimpanzé; tal linha celular pode incluir HEK293 ou variantes da mesma. O protocolo para a geração das linhas celulares que expressam os produtos do gene E1 de chimpanzé (Exemplos 3 e 4 de USPN 6.083.716) pode ser seguido para gerar uma linha celular que expressa qualquer gene de adenovírus de chimpanzé selecionado.

[352] Um ensaio de aumento de AAV pode ser usado para identificar uma linha celular que expressa E1 de adenovírus de chimpanzé. Este ensaio é útil para identificar a função E1 em linhas celulares preparadas usando os genes E1 de outros adenovírus não caracterizados, por exemplo, de outras espécies. Esse ensaio é descrito no Exemplo 4B de USPN 6.083.716.

[353] Um gene de adenovírus de chimpanzé selecionado,

por exemplo, E1, pode estar sob o controle transcricional de um promotor para expressão em uma linha celular parental selecionada. Promotores indutíveis ou constitutivos podem ser empregados para este propósito. Entre os promotores indutíveis estão incluídos o promotor da metalotionina de ovelha, indutível pelo zinco, ou o promotor do vírus do tumor mamário de camundongo (MMTV), indutível por um glicocorticoide, particularmente a dexametasona. Outros promotores indutíveis, tais como os identificados no pedido de patente internacional WO95/13392, aqui incorporado por referência, também podem ser usados na produção de linhas de células de empacotamento. Promotores constitutivos no controle da expressão do gene de adenovírus de chimpanzé também podem ser empregados.

[354] Uma célula-mãe pode ser selecionada para a geração de uma nova linha celular que expressa qualquer gene C68 desejado. Sem limitação, tal linha celular parental pode ser HeLa [N° de Acesso ATCC CCL 2], A549 [N° de Acesso ATCC CCL 185], KB [CCL 17], células Detroit [por exemplo, Detroit 510, CCL 72] e WI-38 [CCL 75]. Outras linhas celulares parentais adequadas podem ser obtidas de outras fontes. As linhas celulares parentais podem incluir CHO, HEK293 ou variantes das mesmas, 911, HeLa, A549, LP-293, PER.C6 ou AE1-2a.

[355] Uma linha celular que expressa E1 pode ser útil na geração de vetores eliminados de E1 de adenovírus de chimpanzé recombinante. As linhas celulares construídas usando essencialmente os mesmos procedimentos que expressam um ou mais outros produtos do gene adenoviral de chimpanzé são úteis na geração de vetores de adenovírus de chimpanzé

recombinantes deletados nos genes que codificam esses produtos. Além disso, as linhas celulares que expressam outros produtos do gene Ad E1 humano também são úteis na geração de Ads recombinantes de chimpanzé.

V.E.3. Partículas virais recombinantes como vetores

[356] As composições aqui divulgadas podem compreender vetores virais que entregam pelo menos um antígeno às células. Tais vetores compreendem uma sequência de DNA de adenovírus de chimpanzé, tal como C68 e uma cassete operacionalmente ligada a sequências reguladoras que direcionam a expressão do cassete. O vetor C68 é capaz de expressar o cassete em uma célula de mamífero infectada. O vetor C68 pode ser eliminado funcionalmente em um ou mais genes virais. Um cassete compreende pelo menos um antígeno sob o controle de uma ou mais sequências regulatórias, como um promotor. Vírus auxiliares opcionais e/ou linhas de células de empacotamento podem fornecer ao vetor viral do chimpanzé quaisquer produtos necessários de genes adenovirais deletados.

[357] O termo “deletado funcionalmente” significa que uma quantidade suficiente da região do gene é removida ou de outra forma alterada, por exemplo, por mutação ou modificação, de modo que a região do gene não é mais capaz de produzir um ou mais produtos funcionais da expressão do gene. Mutações ou modificações que podem resultar em deleções funcionais incluem, mas não estão limitadas a, mutações sem sentido, como introdução de códons de parada prematuros e remoção de códons de início canônicos e não canônicos, mutações que alteram o splicing de mRNA ou outro processamento de transcrição, ou suas combinações. Se

desejado, toda a região do gene pode ser removida.

[358] Modificações das sequências de ácido nucleico que formam os vetores aqui divulgados, incluindo deleções de sequência, inserções e outras mutações podem ser geradas usando técnicas de biologia molecular padrão e estão dentro do escopo desta invenção.

V.E.4. Construção do vetor de plasmídeo viral

[359] Os vetores C68 de adenovírus de chimpanzé úteis nesta invenção incluem adenovírus defeituosos, isto é, sequências de adenovírus de chimpanzé deletadas funcionalmente nos genes E1a ou E1b e opcionalmente portando outras mutações, por exemplo, mutações sensíveis à temperatura ou deleções em outros genes. Prevê-se que estas sequências de chimpanzé também são úteis na formação de vetores híbridos de outros adenovírus e/ou sequências de vírus adenoassociadas. Vectores de adenovírus homólogos preparados a partir de adenovírus humanos são descritos na literatura publicada [ver, por exemplo, Kozarsky I e II, citado acima, e referências citadas nele, Pat. U.S. No. 5.240.846].

[360] Na construção de vetores C68 de adenovírus de chimpanzé úteis para distribuição de uma cassete a uma célula humana (ou outro mamífero), uma gama de sequências de ácido nucleico de adenovírus pode ser empregada nos vetores. Um vetor compreendendo sequências mínimas de adenovírus C68 de chimpanzé pode ser usado em conjunto com um vírus auxiliar para produzir uma partícula viral recombinante infecciosa. O vírus auxiliar fornece produtos genéticos essenciais necessários para a infecciosidade viral e a propagação do vetor adenoviral mínimo de chimpanzé. Quando apenas uma ou

mais deleções selecionadas de genes de adenovírus de chimpanzé são feitas em um vetor viral funcional, os produtos de genes deletados podem ser fornecidos no processo de produção de vetor viral propagando o vírus em uma linha de células de empacotamento selecionada que fornece as funções do gene deletado em trans.

V.E.5. Adenovírus mínimo recombinante

[361] Um vírus Ad C68 de chimpanzé mínimo é uma partícula viral que contém apenas os elementos cis do adenovírus necessários para a replicação e encapsidação do vírion. Ou seja, o vetor contém as sequências de repetição terminal invertida (ITR) de ação cis 5' e 3' dos adenovírus (que funcionam como origens de replicação) e os domínios de empacotamento/intensificador 5' nativos (que contêm sequências necessárias para empacotamento linear de genomas Ad e elementos intensificadores para o promotor E1). Ver, por exemplo, as técnicas descritas para a preparação de um vetor de Ad humano "mínimo" no Pedido de Patente Internacional WO96/13597 e aqui incorporado por referência.

V.E.6. Outros adenovírus defeituosos

[362] Os adenovírus recombinantes deficientes em replicação também podem conter mais do que as sequências mínimas de adenovírus de chimpanzé. Estes outros vetores de Ad podem ser caracterizados por deleções de várias porções de regiões gênicas do vírus e partículas virais infecciosas formadas pelo uso opcional de vírus auxiliares e/ou linhas de células de empacotamento.

[363] Como um exemplo, os vetores adequados podem ser formados pela deleção de todo ou de uma porção suficiente do gene precoce E1a adenoviral C68 e do gene E1b inicial

retardado, de modo a eliminar suas funções biológicas normais. Os vírus com deleção de E1 defeituosos na replicação são capazes de se replicar e produzir vírus infeccioso quando cultivados em uma linha de células de complementação transformada por adenovírus de chimpanzé contendo genes E1a e E1b de adenovírus funcionais que fornecem os produtos gênicos correspondentes em trans. Com base nas homologias com sequências de adenovírus conhecidas, prevê-se que, como é verdadeiro para os adenovírus eliminados em E1 recombinantes humanos da técnica, o adenovírus de chimpanzé recombinante resultante é capaz de infectar muitos tipos de células e pode expressar antígeno(s), mas não pode se replicar na maioria das células que não carregam o DNA da região E1 do chimpanzé, a menos que a célula seja infectada em uma multiplicidade muito alta de infecção.

[364] Como outro exemplo, todo ou uma porção do gene precoce E3 retardado do adenovírus C68 pode ser eliminado da sequência do adenovírus de chimpanzé que forma uma parte do vírus recombinante.

[365] Os vetores de adenovírus C68 de chimpanzé também podem ser construídos tendo uma deleção do gene E4. Ainda outro vetor pode conter uma deleção no gene inicial retardado E2a.

[366] As deleções também podem ser feitas em qualquer um dos genes tardios L1 a L5 do genoma do adenovírus C68 do chimpanzé. Da mesma forma, as deleções nos genes intermediários IX e IVa2 podem ser úteis para alguns fins. Outras deleções podem ser feitas em outros genes de adenovírus estruturais ou não estruturais.

[367] As deleções discutidas acima podem ser usadas

individualmente, isto é, uma sequência de adenovírus pode conter deleções de E1 apenas. Alternativamente, as deleções de genes inteiros ou porções dos mesmos eficazes para destruir ou reduzir sua atividade biológica podem ser usadas em qualquer combinação. Por exemplo, em um vetor exemplificativo, a sequência de adenovírus C68 pode ter deleções dos genes E1 e do gene E4, ou dos genes E1, E2a e E3, ou dos genes E1 e E3, ou dos genes E1, E2a e E4, com ou sem deleção de E3, e assim por diante. Conforme discutido acima, tais deleções podem ser usadas em combinação com outras mutações, tais como mutações sensíveis à temperatura, para atingir um resultado desejado.

[368] O cassete compreendendo antígeno(s) ser inserido opcionalmente em qualquer região deletada do vírus C68 Ad de chimpanzé. Alternativamente, o cassete pode ser inserido em uma região de gene existente para interromper a função dessa região, se desejado.

V.E.7. Vírus auxiliares

[369] Dependendo do conteúdo do gene de adenovírus de chimpanzé dos vetores virais empregados para transportar a cassete, um adenovírus auxiliar ou fragmento de vírus não replicante pode ser usado para fornecer sequências de genes de adenovírus de chimpanzé suficientes para produzir uma partícula viral recombinante infecciosa contendo a cassete.

[370] Os vírus auxiliares úteis contêm sequências de genes de adenovírus selecionadas não presentes na construção do vetor de adenovírus e/ou não expressos pela linha de células de empacotamento em que o vetor é transfectado. Um vírus auxiliar pode ser deficiente para replicação e conter uma variedade de genes de adenovírus além das sequências

descritas acima. O vírus auxiliar pode ser usado em combinação com as linhas de células que expressam E1 aqui descritas.

[371] Para C68, o vírus "auxiliar" pode ser um fragmento formado pelo corte da extremidade C terminal do genoma C68 com SspI, que remove cerca de 1300 bp da extremidade esquerda do vírus. Este vírus cortado é então co-transfectado para uma linha celular que expressa E1 com o DNA do plasmídeo, formando assim o vírus recombinante por recombinação homóloga com as sequências C68 no plasmídeo.

[372] Os vírus auxiliares também podem ser formados em conjugados policátions, conforme descrito em Wu et al, J. Biol. Chem., 264: 16985-16987 (1989); KJ Fisher e JM Wilson, Biochem. J., 299: 49 (1 de abril de 1994). O vírus auxiliar pode conter opcionalmente um gene repórter. Vários desses genes repórter são conhecidos na técnica. A presença de um gene repórter no vírus auxiliar que é diferente da cassete no vetor de adenovírus permite que o vetor Ad e o vírus auxiliar sejam monitorados independentemente. Este segundo repórter é usado para permitir a separação entre o vírus recombinante resultante e o vírus auxiliar após a purificação.

V.E.8. Montagem de partícula viral e infecção de uma linha celular

[373] A montagem das sequências de DNA selecionadas do adenovírus, o cassete e outros elementos do vetor em vários plasmídeos intermediários e vetores de transporte, e o uso dos plasmídeos e vetores para produzir uma partícula viral recombinante podem ser alcançados usando técnicas convencionais. Tais técnicas incluem técnicas convencionais

de clonagem de cDNA, técnicas de recombinação in vitro (por exemplo, montagem de Gibson), uso de sequências de oligonucleotídeo sobrepostas dos genomas de adenovírus, reação em cadeia da polimerase e qualquer método adequado que forneça a sequência de ácido nucleico desejada. São utilizadas técnicas de transfecção e cotransfecção padrão, por exemplo, técnicas de precipitação com CaPO4 ou métodos de transfecção mediados por lipossomas, tais como lipofectamina. Outros métodos convencionais empregados incluem recombinação homóloga dos genomas virais, plaqueamento de vírus em sobreposição de ágar, métodos de medição de geração de sinal e semelhantes.

[374] Por exemplo, após a construção e montagem do vetor viral contendo o cassete desejado, o vetor pode ser transfectado in vitro na presença de um vírus auxiliar na linha de células de empacotamento. A recombinação homóloga ocorre entre as sequências auxiliares e do vetor, o que permite que as sequências de adenovírus-antígeno no vetor sejam replicadas e empacotadas em capsídeos de vírion, resultando nas partículas do vetor viral recombinante.

[375] Os adenovírus C68 de chimpanzé recombinante resultantes são úteis na transferência de uma cassete para uma célula selecionada. Em experiências in vivo com o vírus recombinante cultivado nas linhas de células de empacotamento, o adenovírus de chimpanzé recombinante eliminado em E1 demonstra utilidade na transferência de uma cassete para um não chimpanzé, de preferência uma célula humana.

V.E.9. Uso dos vetores de vírus recombinantes

[376] O adenovírus C68 de chimpanzé recombinante

resultante contendo o cassete (produzido pela cooperação do vetor de adenovírus e vírus auxiliar ou vetor adenoviral e linha celular de empacotamento, como descrito acima) fornece, assim, um veículo de transferência de gene eficiente que pode entregar antígeno(s) a um sujeito in vivo ou ex vivo.

[377] Os vetores recombinantes descritos acima são administrados a humanos de acordo com métodos publicados para terapia genética. Um vetor viral de chimpanzé carregando um cassete pode ser administrado a um paciente, de preferência suspenso em uma solução biologicamente compatível ou veículo de entrega farmaceuticamente aceitável. Um veículo adequado inclui solução salina estéril. Outras soluções injetáveis estéreis isotônicas aquosas e não aquosas e suspensões estéreis aquosas e não aquosas conhecidas por serem veículos farmaceuticamente aceitáveis e bem conhecidas pelos versados na técnica podem ser empregadas para este propósito.

[378] Os vetores adenovirais de chimpanzé são administrados em quantidades suficientes para transduzir as células humanas e fornecer níveis suficientes de transferência e expressão de antígeno para fornecer um benefício terapêutico sem efeitos adversos indevidos, ou com efeitos fisiológicos medicamente aceitáveis, que podem ser determinados pelos versados nas técnicas médicas. As vias de administração convencionais e farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitadas a, distribuição direta ao fígado, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intradérmica, oral e outras vias parentais de administração. As vias de administração podem ser combinadas, se desejado.

[379] As dosagens do vetor viral dependerão principalmente de fatores tais como a condição a ser tratada, a idade, o peso e a saúde do paciente e, portanto, podem variar entre os pacientes. A dosagem será ajustada para equilibrar o benefício terapêutico contra quaisquer efeitos colaterais e tais dosagens podem variar dependendo da aplicação terapêutica para a qual o vetor recombinante é empregado. Os níveis de expressão do(s) antígeno(s) podem ser monitorados para determinar a frequência de administração da dosagem.

[380] Adenovírus recombinantes defeituosos de replicação podem ser administrados em uma "quantidade farmaceuticamente eficaz", isto é, uma quantidade de adenovírus recombinante que é eficaz em uma via de administração para transfectar as células desejadas e fornecer níveis suficientes de expressão do gene selecionado para fornecer um benefício vacinal, ou seja, algum nível mensurável de imunidade protetora. Os vetores C68 que compreendem um cassete podem ser coadministrados com adjuvante. O adjuvante pode ser separado do vetor (por exemplo, alúmen) ou codificado dentro do vetor, em particular se o adjuvante for uma proteína. Os adjuvantes são bem conhecidos na técnica.

[381] As vias de administração convencionais e farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitadas a, intranasal, intramuscular, intratraqueal, subcutânea, intradérmica, retal, oral e outras vias parentais de administração. As vias de administração podem ser combinadas, se desejado, ou ajustadas dependendo do imunógeno ou da doença. Por exemplo, na profilaxia da raiva,

as vias subcutânea, intratraqueal e intranasal são as preferidas. A via de administração dependerá principalmente da natureza da doença a ser tratada.

[382] Os níveis de imunidade ao(s) antígeno(s) podem ser monitorados para determinar a necessidade, se houver, de reforços. Após uma avaliação dos títulos de anticorpos no soro, por exemplo, podem ser desejadas imunizações de reforço opcionais

VI. Métodos terapêuticos e de fabricação

[383] Também é fornecido um método para induzir uma resposta imune específica de um tumor em um sujeito, vacinar contra um tumor, tratar e/ou aliviar um sintoma de câncer em um sujeito, administrando ao sujeito um ou mais antígenos, como uma pluralidade de antígenos identificados usando métodos aqui divulgado.

[384] Também é fornecido um método de indução de uma resposta imune específica de organismo de doença infecciosa em um sujeito, vacinação contra um organismo de doença infecciosa, tratamento e/ou alívio de um sintoma de uma infecção associada a um organismo de doença infecciosa em um sujeito por administração ao sujeito um ou mais antígenos, como uma pluralidade de antígenos identificados usando métodos aqui divulgados.

[385] Em alguns aspectos, um sujeito foi diagnosticado com câncer ou corre o risco de desenvolver câncer. Um sujeito pode ser um humano, cão, gato, cavalo ou qualquer animal em que seja desejada uma resposta imune específica do tumor. Um tumor pode ser qualquer tumor sólido, como mama, ovário, próstata, pulmão, rim, gástrico, cólon, testicular, cabeça e pescoço, pâncreas, cérebro, melanoma e outros tumores de

órgãos de tecido e tumores hematológicos, como linfomas e leucemias, incluindo leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica, leucemia linfocítica crônica, leucemia linfocítica de células T e linfomas de células B.

[386] Em alguns aspectos, um sujeito foi diagnosticado com uma infecção ou está em risco de uma infecção (*por exemplo*, idade, risco geográfico/viagem e/ou aumento relacionado ao trabalho ou predisposição para uma infecção, ou em risco para uma infecção sazonal e/ou nova infecção de doença).

[387] Um antígeno pode ser administrado em uma quantidade suficiente para induzir uma resposta CTL. Um antígeno pode ser administrado em uma quantidade suficiente para induzir uma resposta de células T. Um antígeno pode ser administrado em uma quantidade suficiente para induzir uma resposta de célula B.

[388] Um antígeno pode ser administrado sozinho ou em combinação com outros agentes terapêuticos. O agente terapêutico é, por exemplo, um agente quimioterapêutico, radiação ou imunoterapia. Qualquer tratamento terapêutico adequado para um câncer em particular pode ser administrado. Os agentes terapêuticos podem incluir aqueles que têm como alvo um organismo de doença infecciosa, como um agente antiviral ou antibiótico.

[389] Além disso, um sujeito pode ainda ser administrado um agente anti-imunossupressor/imunoestimulatório, como um inibidor de ponto de controle. Por exemplo, o sujeito pode ainda ser administrado um anticorpo anti-CTLA ou anti-PD-1 ou anti-PD-L1. O bloqueio de CTLA-4 ou PD-L1 por anticorpos pode

melhorar a resposta imune a células cancerígenas no paciente. Em particular, o bloqueio do CTLA-4 mostrou-se eficaz ao seguir um protocolo de vacinação.

[390] A quantidade ideal de cada antígeno a ser incluído em uma composição de vacina e o regime de dosagem ideal podem ser determinados. Por exemplo, um antígeno ou sua variante pode ser preparado para injeção intravenosa (i.v.), injeção subcutânea (s.c.), injeção intradérmica (i.d.), injeção intraperitoneal (i.p.), injeção intramuscular (i.m.). Os métodos de injeção incluem s.c., i.d., i.p., i.m., e i.v. Os métodos de injeção de DNA ou RNA incluem i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v. Outros métodos de administração da composição da vacina são conhecidos pelos versados na técnica.

[391] Uma vacina pode ser compilada de modo que a seleção, o número e/ou a quantidade de antígenos presentes na composição sejam/são tecidos, câncer, doença infecciosa e/ou específicos do paciente. Por exemplo, a seleção exata de peptídeos pode ser guiada por padrões de expressão das proteínas parentais em um determinado tecido ou guiada por mutação ou estado de doença de um paciente. A seleção pode ser dependente do tipo específico de câncer, a doença infecciosa específica, o estado da doença, o objetivo da vacinação (*por exemplo*, preventivo ou direcionado a uma doença em curso), regimes de tratamento anteriores, o estado imunológico do paciente, e, claro, o haplótipo HLA do paciente. Além disso, uma vacina pode conter componentes individualizados, de acordo com as necessidades pessoais do paciente em particular. Os exemplos incluem variar a seleção de antígenos de acordo com a expressão do antígeno no

paciente em particular ou ajustes para tratamentos secundários após uma primeira rodada ou esquema de tratamento.

[392] Um paciente pode ser identificado para administração de uma vacina de antígeno por meio do uso de vários métodos de diagnóstico, por exemplo, métodos de seleção de pacientes descritos mais abaixo. A seleção de pacientes pode envolver a identificação de mutações ou padrões de expressão de um ou mais genes. A seleção do paciente pode envolver a identificação da doença infecciosa de uma infecção em andamento. A seleção do paciente pode envolver a identificação do risco de infecção por uma doença infecciosa. Em alguns casos, a seleção do paciente envolve a identificação do haplótipo do paciente. Os vários métodos de seleção de pacientes podem ser realizados em paralelo, *por exemplo*, um diagnóstico de sequenciamento pode identificar as mutações e o haplótipo de um paciente. Os vários métodos de seleção de pacientes podem ser realizados sequencialmente, *por exemplo*, um teste de diagnóstico identifica as mutações e o teste de diagnóstico separado identifica o haplótipo de um paciente, e onde cada teste pode ser o mesmo (*por exemplo*, ambos sequenciamento de alto rendimento) ou diferente (*por exemplo*, um método de diagnóstico de sequenciamento de alto rendimento e o outro de sequenciamento Sanger).

[393] Para que uma composição seja usada como uma vacina contra câncer ou uma doença infecciosa, antígenos com autopeptídeos normais semelhantes que são expressos em grandes quantidades em tecidos normais podem ser evitados ou estar presentes em pequenas quantidades em uma composição

aqui descrita. Por outro lado, se for conhecido que o tumor ou célula infectada de um paciente expressa grandes quantidades de um determinado antígeno, a respectiva composição farmacêutica para o tratamento deste câncer ou infecção pode estar presente em grandes quantidades e/ou mais de um antígeno específico para este antígeno em particular ou via deste antígeno pode ser incluído.

[394] As composições que compreendem um antígeno podem ser administradas a um indivíduo que já sofre de câncer ou de uma infecção. Em aplicações terapêuticas, as composições são administradas a um paciente em uma quantidade suficiente para provocar uma resposta CTL eficaz ao antígeno do tumor ou organismo de doença infecciosa e para curar ou pelo menos interromper parcialmente os sintomas e/ou complicações. Uma quantidade adequada para realizar isto é definida como "dose terapeuticamente eficaz." As quantidades eficazes para esta utilização dependerão, por exemplo, da composição, do modo de administração, do estado e da gravidade da doença a ser tratada, do peso e do estado geral de saúde do paciente, e do julgamento do médico que prescreve. Deve-se ter em mente que as composições geralmente podem ser empregadas em estados graves de doença, ou seja, situações com risco de vida ou potencialmente com risco de vida, especialmente quando o câncer é metastizado. Nesses casos, tendo em vista a minimização de substâncias estranhas e a natureza não tóxica relativa de um antígeno, é possível e pode ser considerado desejável pelo médico assistente administrar excessos substanciais dessas composições.

[395] Para uso terapêutico, a administração pode começar na detecção ou remoção cirúrgica de tumores ou

começar na detecção ou tratamento de uma infecção. Isto pode ser seguido pelo aumento das doses até que pelo menos os sintomas sejam substancialmente diminuídos e por um período posterior.

[396] As composições farmacêuticas (por exemplo, composições de vacina) para tratamento terapêutico destinam-se à administração parenteral, tópica, nasal, oral ou local. As composições farmacêuticas podem ser administradas parenteralmente, por exemplo, por via intravenosa, subcutânea, intradérmica ou intramuscular. As composições podem ser administradas no local da excisão cirúrgica para induzir uma resposta imune local ao tumor. As composições podem ser administradas para atingir tecidos e/ou células infectadas específicas (*por exemplo*, células de apresentação de antígeno) de um sujeito. São divulgadas aqui composições para administração parenteral que compreendem uma solução do antígeno e as composições de vacina são dissolvidas ou suspensas em um veículo aceitável, por exemplo, um carreador aquoso. Pode ser utilizada uma variedade de veículos aquosos, por exemplo, água, água tamponada, solução salina a 0,9%, glicina a 0,3%, ácido hialurônico e semelhantes. Estas composições podem ser esterilizadas por técnicas convencionais de esterilização bem conhecidas ou podem ser filtradas até a esterilização. As soluções aquosas resultantes podem ser empacotadas para uso como são, ou liofilizadas, sendo a preparação liofilizada combinada com uma solução estéril antes da administração. As composições podem conter substâncias auxiliares farmaceuticamente aceitáveis, conforme necessário para se aproximar das condições fisiológicas, tais como ajuste do pH e agentes

tamponantes, agentes de ajuste de tonicidade, agentes umectantes e semelhantes, por exemplo, acetato de sódio, lactato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina, etc.

[397] Os antígenos também podem ser administrados via lipossomas, que os direcionam para um tecido celular específico, como o tecido linfoide. Os lipossomas também são úteis para aumentar a meia-vida. Os lipossomas incluem emulsões, espumas, micelas, monocamadas insolúveis, cristais líquidos, dispersões fosfolipídicas, camadas lamelares e semelhantes. Nestas preparações, o antígeno a ser distribuído é incorporado como parte de um lipossomo, sozinho ou em conjunto com uma molécula que se liga a, por exemplo, um receptor prevalente entre células linfoides, como anticorpos monoclonais que se ligam ao antígeno CD45 ou com outras composições terapêuticas ou imunogênicas. Assim, os lipossomas preenchidos com um antígeno desejado podem ser direcionados para o sítio das células linfoides, onde os lipossomas entregam as composições terapêuticas/imunogênicas selecionadas. Os lipossomas podem ser formados a partir de lipídeos formadores de vesículas, que geralmente incluem fosfolipídeos neutros e carregados negativamente e um esterol, como o colesterol. A seleção de lipídeos é geralmente guiada pela consideração de, por exemplo, tamanho do lipossoma, labilidade ácida e estabilidade dos lipossomos na corrente sanguínea. Uma variedade de métodos estão disponíveis para preparar lipossomas, como descrito em, por exemplo, Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9; 467 (1980), Patentes U.S. Nos. 4.235.871, 4.501.728, 4.501.728,

4.837.028 e 5.019.369.

[398] Para direcionar para as células imunes, um ligante a ser incorporado no lipossoma pode incluir, por exemplo, anticorpos ou seus fragmentos específicos para determinantes da superfície celular das células desejadas do sistema imune. Uma suspensão de lipossomas pode ser administrada por via intravenosa, local, tópica, etc. em uma dose que varia de acordo com, inter alia, o modo de administração, o peptídeo sendo distribuído e o estágio da doença a ser tratada.

[399] Para fins terapêuticos ou de imunização, os ácidos nucleicos que codificam um peptídeo e, opcionalmente, um ou mais dos peptídeos aqui descritos também podem ser administrados ao paciente. Vários métodos são convenientemente utilizados para distribuir os ácidos nucleicos ao paciente. Por exemplo, o ácido nucleico pode ser distribuído diretamente, como "DNA nu". Esta abordagem é descrita, por exemplo, em Wolff et al., Science 247: 1465-1468 (1990), bem como nas Patentes U.S. Nos. 5.580.859 e 5.589.466. Os ácidos nucleicos também podem ser administrados usando distribuição balística, como descrito, por exemplo, na Pat. U.S. No. 5.204.253. Partículas compostas apenas por DNA podem ser administradas. Alternativamente, o DNA pode ser aderido a partículas, como partículas de ouro. As abordagens para a distribuição de sequências de ácidos nucleicos podem incluir vetores virais, vetores de mRNA e vetores de DNA com ou sem eletroporação.

[400] Os ácidos nucleicos também podem ser entregues complexados a compostos catiônicos, como lipídeos catiônicos. Os métodos de entrega de genes mediados por

lipídios são descritos, por exemplo, em 9618372WOAWO 96/18372; 9324640WOAWO 93/24640; Mannino e Gould-Fogerite, BioTechniques 6 (7): 682-691 (1988); Pat. U.S. No. 5.279.833 Rose Pat. U.S. No. 5.279.833; 9106309WOAWO 91/06309; e Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7414 (1987).

[401] Os antígenos também podem ser incluídos em plataformas de vacinas baseadas em vetores virais, como vaccinia, fowlpox, alfavírus auto-replicante, marabavírus, adenovírus (*Ver, por exemplo,* Tatsis et al., Adenovírus, *Terapia Molecular* (2004) 10, 616-629), ou lentivírus, incluindo, mas não se limitando a, lentivírus de segunda, terceira ou segunda/terceira geração híbrida e lentivírus recombinante de qualquer geração projetada para direcionar tipos de células ou receptores específicos (*ver, por exemplo*, 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: basic to 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. Acids Res.* (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). Dependendo da capacidade de empacotamento das plataformas de vacina baseadas em vetor viral mencionadas acima, esta abordagem pode fornecer uma ou mais sequências de ácido nucleico que codificam um ou mais peptídeos de antígenos. As sequências podem ser flanqueadas por sequências não mutadas, podem ser separadas por ligantes

ou podem ser precedidas por uma ou mais sequências direcionadas a um compartimento subcelular (Ver, por exemplo, 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-derivados T cell receptor repertórios, *Science.* (2016) 352 (6291): 1337-41, Lu et al., Efficient selection of mutated cancer antigeneconheced by T cells associated with tough tumor regressions, *Clin Cancer Res.* (2014) 20 (13): 3401-10). Após a introdução em um hospedeiro, as células infectadas expressam os neoantígenos e, assim, provocam uma resposta imune do hospedeiro (por exemplo, CTL) contra o(s) peptídeo(s). Os vetores de vaccínia e os métodos úteis nos protocolos de imunização são descritos, por exemplo, na Pat. U.S. No. 4.722.848. Outro vetor é o BCG (Bacille Calmette Guerin). Os vetores de BCG são descritos em Stover et al. (Nature 351: 456-460 (1991)). Uma grande variedade de outros vetores de vacina úteis para administração terapêutica ou imunização de antígenos, por exemplo, vetores de Salmonella typhi e semelhantes será evidente para os versados na técnica a partir da descrição aqui.

[402] Um meio de administrar ácidos nucleicos utiliza construtos de minigene que codificam um ou vários epítopos. Para criar uma sequência de DNA que codifica os epítopos de CTL selecionados (minigene) para expressão em células humanas, as sequências de aminoácidos dos epítopos são traduzidas inversamente. Uma tabela de uso de códons humanos é usada para orientar a escolha do códon para cada aminoácido. Estas sequências de DNA que codificam epítopos

são diretamente ligadas, criando uma sequência de polipeptídeo contínua. Para otimizar a expressão e/ou a imunogenicidade, elementos adicionais podem ser incorporados ao projeto do minigene. Exemplos de sequência de aminoácidos que podem ser traduzidas reversamente e incluídas na sequência do minigene incluem: linfócitos T auxiliares, epítopos, uma sequência líder (sinal) e um sinal de retenção do retículo endoplasmático. Além disso, a apresentação de epítopos CTL pelo MHC pode ser melhorada incluindo sequências flanqueadoras sintéticas (por exemplo, poli-alanina) ou de ocorrência natural adjacentes aos epítopos de CTL. A sequência de minigene é convertida em DNA através da montagem de oligonucleotídeos que codificam as fitas mais e menos do minigene. Os oligonucleotídeos sobrepostos (30-100 bases de comprimento) são sintetizados, fosforilados, purificados e recozidos sob condições apropriadas usando técnicas bem conhecidas. As extremidades dos oligonucleotídeos são unidas usando T4 DNA ligase. Este minigene sintético, que codifica o polipeptídeo do epítopo CTL, pode então ser clonado no vetor de expressão desejado.

[403] O DNA plasmídico purificado pode ser preparado para injeção usando uma variedade de formulações. O mais simples deles é a reconstituição do DNA liofilizado em solução salina estéril-tampão fosfato (PBS). Uma variedade de métodos foi descrita e novas técnicas podem se tornar disponíveis. Como observado acima, os ácidos nucleicos são convenientemente formulados com lipídios catiônicos. Além disso, glicolipídeos, lipossomas fusogênicos, peptídeos e compostos referidos coletivamente como protetores, interativos e sem condensação (PINC) também podem ser

complexos para DNA plasmidial purificado para influenciar variáveis como estabilidade, dispersão intramuscular ou tráfico para órgãos ou tipos celulares específicos.

[404] Também é divulgado um método de fabricação de uma vacina, compreendendo executar as etapas de um método aqui divulgado; e produzir uma vacina compreendendo uma pluralidade de antígenos ou um subconjunto da pluralidade de antígenos. Também é divulgado um método de fabricação de vetor adenoviral, compreendendo a execução das etapas de um método aqui divulgado; e a produção de um vetor adenoviral compreendendo uma cassete. Por exemplo, é divulgado um método de fabricação de vetor adenoviral usando um sistema de promotor TET, tal como o sistema de promotor controlado por TETr aqui descrito. A produção viral usando o sistema de promotor controlado por TETr pode incluir a. fornecer um vetor viral compreendendo uma cassete, a cassete compreendendo: (i) pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil e (ii) pelo menos uma sequência promotora operacionalmente ligada a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, em que o pelo menos um promotor é um promotor controlado da proteína repressora da tetraciclina (TET) (TETr), b. fornecer uma célula projetada para expressar a proteína TETr; e c. colocar o vetor viral em contato com a célula sob condições suficientes para a produção do vírus.

[405] Os antígenos divulgados neste documento podem ser fabricados usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, um método de produção de um antígeno ou vetor (por exemplo, um vetor incluindo pelo menos uma sequência que codifica um ou mais antígenos) divulgado neste documento pode incluir a cultura de uma célula hospedeira sob condições

adequadas para expressar o antígeno ou vetor em que a célula hospedeira compreende pelo menos um polinucleotídeo que codifica o antígeno ou vetor e purifica o antígeno ou vetor. Os métodos padrão de purificação incluem técnicas cromatográficas, técnicas eletroforéticas, imunológicas, de precipitação, diálise, filtração, concentração e cromatofoco.

[406] As células hospedeiras podem incluir uma célula de Ovário de Hamster Chinês (CHO), célula NS0, levedura ou célula HEK293. As células hospedeiras podem ser transformadas com um ou mais polinucleotídeos compreendendo pelo menos uma sequência de ácido nucleico que codifica um antígeno ou vetor divulgado aqui, opcionalmente em que o polinucleotídeo isolado compreende ainda uma sequência promotora operativamente ligada à pelo menos uma sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno ou vetor. Em certas modalidades, o polinucleotídeo isolado pode ser cDNA.

VII. Uso e administração de antígenos

[407] Um protocolo de vacinação pode ser usado para dosar um sujeito com um ou mais antígenos. Uma vacina primária e uma vacina de reforço podem ser usadas para dosar o sujeito. A vacina de iniciação pode ser baseada em C68 (por exemplo, as sequências mostradas em SEQ ID NO: 1 ou 2) ou srRNA (por exemplo, as sequências mostradas em SEQ ID NO: 3 ou 4) e a vacina de reforço pode ser baseada em C68 (por exemplo, as sequências mostradas em SEQ ID NO: 1 ou 2) ou srRNA (por exemplo, as sequências mostradas em SEQ ID NO: 3 ou 4). Cada vetor inclui tipicamente um cassete que inclui antígenos. Os cassetes podem incluir cerca de 20 antígenos, separados por espaçadores, como a sequência natural que

normalmente envolve cada antígeno ou outras sequências espaçadoras não naturais, como AAY. Os cassetes também podem incluir antígenos MHCII, como o antígeno do toxoide do tétano e o antígeno PADRE, que podem ser considerados antígenos universais de classe II. Os cassetes também podem incluir uma sequência de direcionamento, como uma sequência de direcionamento de ubiquitina. Além disso, cada dose de vacina pode ser administrada ao sujeito em conjunto com (por exemplo, simultaneamente, antes ou depois) um inibidor de ponto de controle (CPI). Os CPI podem incluir aqueles que inibem CTLA4, PD1 e/ou PDL1, como anticorpos ou porções de ligação ao antígeno dos mesmos. Esses anticorpos podem incluir tremelimumabe ou durvalumabe.

[408] Uma vacina primária pode ser injetada (por exemplo, intramuscularmente) em um indivíduo. Podem ser usadas injeções bilaterais por dose. Por exemplo, uma ou mais injeções de ChAdV68 (C68) podem ser usadas (por exemplo, dose total de $1x10^{12}$ partículas virais); uma ou mais injeções de RNA autorreplicante (srRNA) em baixa dose de vacina selecionada na faixa de 0,001 a 1 ug de RNA, em particular 0,1 ou 1 ug podem ser usadas; ou uma ou mais injeções de srRNA em alta dose de vacina selecionada na faixa de 1 a 100 ug de RNA, em particular de 10 ou 100 ug, podem ser usadas.

[409] Um reforço de vacina (vacina de reforço) pode ser injetado (por exemplo, por via intramuscular) após a vacinação primária. Uma vacina de reforço pode ser administrada a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 semanas, por exemplo, a cada 4 semanas e/ou 8 semanas após a de iniciação. Podem ser usadas injeções bilaterais por dose. Por exemplo, uma ou mais injeções de ChAdV68 (C68) podem ser

usadas (por exemplo, dose total de $1x10^{12}$ partículas virais); uma ou mais injeções de RNA autorreplicante (srRNA) em baixa dose de vacina selecionada na faixa de 0,001 a 1 ug de RNA, em particular 0,1 ou 1 ug podem ser usadas; ou uma ou mais injeções de srRNA em alta dose de vacina selecionada na faixa de 1 a 100 ug de RNA, em particular de 10 ou 100 ug, podem ser usadas.

[410] Anti-CTLA-4 (por exemplo, tremelimumabe) também pode ser administrado ao sujeito. Por exemplo, o anti-CTLA4 pode ser administrado por via subcutânea perto do local da injeção da vacina intramuscular (dose inicial de ChAdV68 ou srRNA em baixas doses) para garantir a drenagem para o mesmo nódulo linfático. O tremelimumabe é um inibidor seletivo do mAb de IgG2 humano de CTLA-4. A dose subcutânea alvo de Anti-CTLA-4 (tremelimumabe) é tipicamente 70-75 mg (em particular 75 mg) com uma faixa de dose de, por exemplo, 1-100 mg ou 5-420 mg.

[411] Em certos casos, um anticorpo anti-PD-L1 pode ser usado, como durvalumabe (MEDI 4736). Durvalumabe é um mAb de IgG1 humana seletiva de alta afinidade que bloqueia a ligação de PD-L1 a PD-1 e CD80. O durvalumabe é geralmente administrado na dose de 20 mg/kg iv a cada 4 semanas.

[412] O monitoramento imunológico pode ser realizado antes, durante e/ou após a administração da vacina. Esse monitoramento pode informar segurança e eficácia, entre outros parâmetros.

[413] Para realizar o monitoramento imunológico, PBMCs são comumente usadas. PBMCs podem ser isoladas antes da vacinação primária e após a vacinação primária (por exemplo, 4 semanas e 8 semanas). As PBMCs podem ser colhidas

imediatamente antes da vacinação de reforço e após cada vacinação de reforço (por exemplo, 4 semanas e 8 semanas).

[414] As respostas das células T podem ser avaliadas como parte de um protocolo de monitoramento imunológico. Por exemplo, a capacidade de uma composição de vacina aqui descrita para estimular uma resposta imune pode ser monitorada e/ou avaliada. Conforme usado neste documento, "estimular uma resposta imune" refere-se a qualquer aumento em uma resposta imune, como o início de uma resposta imune (*por exemplo*, uma vacina de iniciação estimulando o início de uma resposta imune em um sujeito naïve) ou aumento de uma resposta imune (*por exemplo*, uma vacina de reforço que estimula o aumento de uma resposta imune em um sujeito com uma resposta imune preexistente a um antígeno, como uma resposta imune preexistente iniciada por uma vacina de iniciação). As respostas das células T podem ser medidas usando um ou mais métodos conhecidos na técnica, tais como ELISpot, coloração intracelular de citocinas, secreção de citocinas e captura da superfície celular, proliferação de células T, coloração de multímero de MHC ou por ensaio de citotoxicidade. As respostas das células T aos epítopos codificados nas vacinas podem ser monitoradas a partir de PBMCs medindo a indução de citocinas, como IFN-gama, usando um ensaio ELISpot. Respostas específicas de células T CD4 ou CD8 a epítopos codificados em vacinas podem ser monitoradas a partir de PBMCs medindo a indução de citocinas capturadas intracelularmente ou extracelularmente, como IFN-gama, usando citometria de fluxo. Respostas de células T CD4 ou CD8 específicas para epítopos codificados nas vacinas podem ser monitoradas a partir de PBMCs medindo populações de

células T que expressam receptores de células T específicos para complexos de epítopo/MHC de classe I usando coloração de multímero de MHC. Respostas específicas de células T CD4 ou CD8 para epítopos codificados nas vacinas podem ser monitoradas a partir de PBMCs medindo a expansão ex vivo de populações de células T após incorporação de 3H-timidina, bromodeoxiuridina e carboxifluoresceína-diacetato-succinimidilester (CFSE). A capacidade de reconhecimento de antígeno e a atividade lítica de células T derivadas de PBMC que são específicas para epítopos codificados em vacinas podem ser avaliadas funcionalmente por ensaio de liberação de cromo ou ensaios de citotoxicidade colorimétricos alternativos.

[415] As respostas de células B podem ser medidas usando um ou mais métodos conhecidos na técnica, como ensaios usados para determinar a diferenciação de células B (*por exemplo*, diferenciação em células de plasma), células B ou proliferação de células de plasma, células B ou ativação de células de plasma (*por exemplo*, regulação positiva de marcadores coestimuladores, como CD80 ou CD86), troca de classe de anticorpos e/ou produção de anticorpos (*por exemplo*, um ELISA).

VIII. Identificação de antígeno

VIII.A. Identificação de antígeno candidato

[416] Métodos de pesquisa para análise NGS de tumor e exoma normal e transcriptomas foram descritos e aplicados no espaço de identificação de antígenos. [6,14,15] Certas otimizações para maior sensibilidade e especificidade para identificação de antígenos no ambiente clínico podem ser consideradas. Essas otimizações podem ser agrupadas em duas

áreas, aquelas relacionadas a processos de laboratório e aquelas relacionadas à análise de dados NGS. Os métodos de pesquisa descritos também podem ser aplicados à identificação de antígenos em outras configurações, como a identificação de antígenos de identificação de um organismo de doença infecciosa, uma infecção em um sujeito ou uma célula infectada de um sujeito. Exemplos de otimizações são conhecidos pelos versados na técnica, por exemplo, os métodos descritos em mais detalhes na Pat. U.S. No. 10.055.540, Pub. do Pedido U.S. No. US20200010849A1, e publicações de pedido de patente internacional WO/2018/195357 e WO/2018/208856, cada um aqui incorporado por referência, em sua totalidade, para todos os efeitos.

VIII.B Isolamento e detecção de peptídeos de HLA

[417] O isolamento das moléculas de peptídeo de HLA foi realizado utilizando métodos clássicos de imunoprecipitação (IP) após lise e solubilização da amostra de tecido (55-58). Um lisado clarificado foi utilizado para IP específico do HLA.

[418] A imunoprecipitação foi realizada utilizando anticorpos acoplados a esferas onde o anticorpo é específico para moléculas de HLA. Para uma imunoprecipitação de HLA pan-Classe I, é utilizado um anticorpo pan-Classe I CR; para HLA-DR Classe II, é utilizado um anticorpo HLA-DR. O anticorpo é covalentemente ligado às esferas de NHS-sefarose durante a incubação durante a noite. Após a fixação covalente, as esferas foram lavadas e divididas em alíquotas para IP. (59, 60) As imunoprecipitações também podem ser realizadas com anticorpos que não estão covalentemente ligados a esferas. Tipicamente, isso é feito usando sefarose

ou esferas magnéticas revestidas com proteína A e/ou proteína G para manter o anticorpo na coluna. Alguns anticorpos que podem ser utilizados para enriquecer seletivamente o complexo MHC/peptídeo estão listados abaixo.

Nome do anticorpo	Especificidade
W6/32	HLA-A, B, C de classe I
L243	Classe II - HLA-DR
Tu36	Classe II - HLA-DR
LN3	Classe II - HLA-DR
Tu39	Classe II - HLA-DR, DP, DQ

[419] O lisado de tecido clarificado é adicionado às esferas de anticorpo para a imunoprecipitação. Após imunoprecipitação, as esferas são removidas do lisado e o lisado é armazenado para experiências adicionais, incluindo IPs adicionais. As esferas IP são lavadas para remover a ligação não específica e o complexo HLA/peptídeo é eluído das esferas usando técnicas padrão. Os componentes da proteína são removidos dos peptídeos usando uma coluna de rotação de peso molecular ou fracionamento C18. Os peptídeos resultantes são levados à secura por evaporação SpeedVac e, em alguns casos, são armazenados a -20 C antes da análise por MS.

[420] Os peptídeos secos são reconstituídos em um tampão de HPLC adequado para cromatografia de fase reversa e carregados em uma coluna de HPLC microcapilar C-18 para eluição gradiente em um espectrômetro de massa Fusion Lumos (Thermo). Os espectros MS1 de massa/carga de peptídeo (m/z) foram coletados no detector Orbitrap em alta resolução, seguidos por varreduras de baixa resolução MS2 coletadas no detector de armadilha de íons após a fragmentação por HCD do íon selecionado. Além disso, os espectros de MS2 podem ser obtidos usando métodos de fragmentação CID ou ETD ou qualquer

combinação das três técnicas para obter maior cobertura de aminoácidos do peptídeo. O espectro MS2 também pode ser medido com precisão de massa de alta resolução no detector Orbitrap.

[421] Os espectros de MS2 de cada análise são pesquisados em um banco de dados de proteínas usando Comet (61, 62) e a identificação do peptídeo é avaliada usando Percolator (63-65). O sequenciamento adicional é realizado usando PEAKS studio (Bioinformatics Solutions Inc.) e outros motores de busca ou métodos de sequenciamento podem ser usados, incluindo correspondência espectral e sequenciamento *de novo* (97).

VIII.B.1 Estudos de limite de detecção de MS em apoio ao sequenciamento abrangente de peptídeos de HLA.

[422] Usando o peptídeo YVYVADVAAK (SEQ ID NO: 77), foi determinado o que os limites de detecção estão usando diferentes quantidades de peptídeo carregado na coluna LC. As quantidades de peptídeo testadas foram 1 pmol, 100fmol, 10 fmol, 1 fmol e 100amol. (**Tabela 1**) Os resultados são mostrados nas **Fig. 24A** e **24B**. Esses resultados indicam que o limite mais baixo de detecção (LoD) está na faixa do atomol (10^{-18}), que a faixa dinâmica abrange cinco ordens de magnitude e que o sinal de ruído parece suficiente para o sequenciamento em faixas baixas de femtomol (10^{-15}).

Tabela 1

Peptídeo m/z	Carregado na coluna	Cópias/Célula em 1e9 células
566,830	1 pmol	600
562,823	100 fmol	60
559,816	10 fmol	6
556,810	1 fmol	0,6
553,802	100 amol	0,06

IX. Modelo de apresentação

[423] Os modelos de apresentação podem ser usados para identificar as probabilidades de apresentação do peptídeo em pacientes. Vários modelos de apresentação são conhecidos pelos versados na técnica, por exemplo, os modelos de apresentação descritos em mais detalhes na Patente U.S. No. 10.055.540, Pub. do Pedido U.S. No. US20200010849A1, e US20110293637 e publicações de pedido de patente internacional WO/2018/195357, WO/2018/208856 e WO2016187508, cada um aqui incorporado por referência, em sua totalidade, para todos os efeitos.

X. Módulo de treinamento

[424] Os módulos de treinamento podem ser usados para construir um ou mais modelos de apresentação com base em conjuntos de dados de treinamento que geram probabilidades de se as sequências de peptídeos serão apresentadas por alelos MHC associados às sequências de peptídeos. Vários módulos de treinamento são conhecidos pelos versados na técnica, por exemplo, os modelos de apresentação descritos em mais detalhes na Patente U.S. No. 10.055.540, Pub. do Pedido U.S. No. US20200010849A1, e publicações de pedido de patente internacional WO/2018/195357 e WO/2018/208856, cada um aqui incorporado por referência, em sua totalidade, para

todos os efeitos. Um módulo de treinamento pode construir um modelo de apresentação para prever as probabilidades de apresentação de peptídeos por alelo. Um módulo de treinamento também pode construir um modelo de apresentação para predizer as probabilidades de apresentação de peptídeos em um cenário de alelos múltiplos, onde dois ou mais alelos de MHC estão presentes.

XI. Módulo de predição

[425] Um módulo de predição pode ser usado para receber dados de sequência e selecionar antígenos candidatos nos dados de sequência usando um modelo de apresentação. Especificamente, os dados de sequência podem ser sequências de DNA, sequências de RNA e/ou sequências de proteínas extraídas de células de tecido tumoral de pacientes, células infectadas de pacientes ou os próprios organismos com doenças infecciosas. Um módulo de predição pode identificar neoantígenos candidatos que são sequências de peptídeo mutadas comparando dados de sequência extraídos de células de tecido normais de um paciente com os dados de sequência extraídos de células de tecido tumoral do paciente para identificar porções que contêm um ou mais mutações. Um módulo de predição pode identificar antígenos candidatos que são peptídeos derivados de patógenos, peptídeos derivados de vírus, peptídeos derivados de bactérias, peptídeos derivados de fungos e peptídeos derivados de parasitas, por exemplo, comparando dados de sequência extraídos de células de tecido normal de um paciente com os dados de sequência extraídos de células infectadas do paciente para identificar porções contendo um ou mais antígenos associados a organismos com doenças infecciosas. Um módulo de predição pode identificar

antígenos candidatos que têm expressão alterada em uma célula tumoral ou tecido canceroso em comparação com uma célula ou tecido normal, comparando dados de sequência extraídos de células de tecido normal de um paciente com os dados de sequência extraídos de células de tecido tumoral do paciente para identificar antígenos candidatos expressos incorretamente. Um módulo de predição pode identificar antígenos candidatos que são expressos em uma célula infectada ou tecido infectado em comparação com uma célula normal ou tecido, comparando dados de sequência extraídos de células de tecido normal de um paciente com os dados de sequência extraídos de células de tecido infectado do paciente para identificar antígenos candidatos expressos (*por exemplo*, identificar polinucleotídeos expressos e/ou polipeptídeos específicos para uma doença infecciosa).

[426] Um módulo de apresentação pode aplicar um ou mais modelos de apresentação a sequências de peptídeos processadas para estimar as probabilidades de apresentação das sequências de peptídeos. Especificamente, o módulo de predição pode selecionar uma ou mais sequências de peptídeos de antígenos candidatos que provavelmente serão apresentadas em moléculas de HLA de tumor ou moléculas de HLA de células infectadas aplicando modelos de apresentação aos antígenos candidatos. Em uma implementação, o módulo de apresentação seleciona sequências de antígenos candidatas que têm probabilidade estimada de apresentação acima de um limiar predeterminado. Em outra implementação, o modelo de apresentação seleciona as sequências de antígenos candidatos a *N* que têm as maiores probabilidades de apresentação estimadas (onde *N* é geralmente o número máximo de epítopos

que podem ser distribuídos em uma vacina). Uma vacina incluindo os antígenos candidatos selecionados para um determinado paciente pode ser injetada no paciente para induzir respostas imunes.

XI.B. Módulo de projeto do cassete

XI.B.1 Visão geral

[427] Um módulo de projeto de cassete pode ser usado para gerar uma sequência de cassete de vacina com base em peptídeos candidatos selecionados para injeção em um paciente. Vários módulos de projeto de cassete são conhecidos pelos versados na técnica, por exemplo, os módulos de projeto de cassete descritos em mais detalhes na Pat. U.S. No. 10.055.540, Pub. do pedido U.S. No. US20200010849A1, e publicações de pedido de patente internacional WO/2018/195357 e WO/2018/208856, cada um aqui incorporado por referência, em sua totalidade, para todos os efeitos.

[428] Um conjunto de epítopos terapêuticos pode ser gerado com base nos peptídeos selecionados determinados por um módulo de predição associado às probabilidades de apresentação acima de um limiar predeterminado, onde as probabilidades de apresentação são determinadas pelos modelos de apresentação. No entanto, é compreendido que em outras modalidades, o conjunto de epítopos terapêuticos pode ser gerado com base em qualquer um ou mais de uma série de métodos (sozinhos ou em combinação), por exemplo, com base na afinidade de ligação ou afinidade de ligação predita para HLA de classe I ou alelos de classe II do paciente, estabilidade de ligação ou estabilidade de ligação predita para HLA de classe I ou alelos de classe II do paciente, amostragem aleatória e semelhantes.

[429] Os epítopos terapêuticos podem corresponder aos próprios peptídeos selecionados. Os epítopos terapêuticos também podem incluir sequências flanqueadoras do C- e/ou N-terminal, além dos peptídeos selecionados. As sequências flanqueadoras de N- e C-terminais podem ser as sequências flanqueadoras de N- e C-terminais nativas do epítopo de vacina terapêutica no contexto de sua proteína de origem. Os epítopos terapêuticos podem representar um epítopo de comprimento fixo Os epítopos terapêuticos podem representar um epítopo de comprimento variável, em que o comprimento do epítopo pode ser variado dependendo, por exemplo, do comprimento da sequência flanqueadora C ou N. Por exemplo, a sequência de flanqueamento do C-terminal e a sequência de flanqueamento do N-terminal podem, cada uma, ter comprimentos variados de 2-5 resíduos, resultando em 16 opções possíveis para o epítopo.

[430] Um módulo de projeto de cassete também pode gerar sequências de cassete levando em consideração a apresentação de epítopos de junção que abrangem a junção entre um par de epítopos terapêuticos no cassete. Os epítopos de junção são novas sequências de epítopos não próprias, mas irrelevantes, que surgem na cassete devido ao processo de concatenação de epítopos terapêuticos e sequências de ligação no cassete. As novas sequências de epítopos de junção são diferentes dos epítopos terapêuticos do próprio cassete.

[431] Um módulo de projeto de cassete pode gerar uma sequência de cassete que reduz a probabilidade de que os epítopos de junção sejam apresentados no paciente. Especificamente, quando o cassete é injetado no paciente, os epítopos de junção têm o potencial de serem apresentados

pelos alelos de HLA de classe I ou HLA de classe II do paciente e estimulam uma resposta de células T CD8 ou CD4, respectivamente. Essas reações são muitas vezes indesejáveis porque as células T reativas aos epítopos de junção não têm nenhum benefício terapêutico e podem diminuir a resposta imune aos epítopos terapêuticos selecionados no cassete por competição antigênica.[76]

[432] Um módulo de projeto de cassete pode iterar através de um ou mais cassetes candidatos e determinar uma sequência de cassete para a qual uma pontuação de apresentação de epítopos de junção associados a essa sequência de cassete está abaixo de um limiar numérico. A pontuação de apresentação do epítopo de junção é uma quantidade associada às probabilidades de apresentação dos epítopos de junção no cassete, e um valor mais alto da pontuação de apresentação do epítopo de junção indica uma maior probabilidade de que os epítopos de junção do cassete sejam apresentados por HLA de classe I ou HLA de classe II ou ambos.

[433] Em uma modalidade, um módulo de projeto de cassete pode determinar uma sequência de cassete associada à pontuação de apresentação de epítopo de junção mais baixa entre as sequências de cassete candidatas.

[434] Um módulo de projeto de cassete pode iterar através de uma ou mais sequências de cassete candidatas, determinar a pontuação de apresentação de epítopo de junção para as cassetes candidatas e identificar uma sequência de cassete ideal associada a uma pontuação de apresentação de epítopo de junção abaixo do limiar.

[435] Um módulo de projeto de cassete pode ainda

verificar uma ou mais sequências de cassete candidatas para identificar se algum dos epítopos de junção nas sequências de cassete candidatas são autoepítopos para um determinado paciente para o qual a vacina está sendo projetada. Para conseguir isso, o módulo de projeto de cassete verifica os epítopos de junção em um banco de dados conhecido, como BLAST. Em uma modalidade, o módulo de projeto de cassete pode ser configurado para projetar cassetes que evitam autoepítopos de junção.

[436] Um módulo de projeto de cassete pode realizar uma abordagem de força bruta e iterar através de todas ou da maioria das possíveis sequências de cassete candidatas para selecionar a sequência com a menor pontuação de apresentação de epítopo de junção. No entanto, o número de tais cassetes candidatos pode ser proibitivamente grande à medida que a capacidade da vacina aumenta. Por exemplo, para uma capacidade de vacina de 20 epítopos, o módulo de projeto de cassete tem que iterar por ~ 10^{18} cassetes candidatos possíveis para determinar o cassete com a menor pontuação de apresentação de epítopo de junção. Esta determinação pode ser computacionalmente pesada (em termos de recursos de processamento computacional necessários) e, às vezes, intratável, para que o módulo de projeto de cassete seja concluído em um período de tempo razoável para gerar a vacina para o paciente. Além disso, a contabilização dos possíveis epítopos de junção para cada cassete candidato pode ser ainda mais onerosa. Assim, um módulo de projeto de cassete pode selecionar uma sequência de cassete com base em maneiras de iterar através de uma série de sequências de cassete candidatas que são significativamente menores do que o número

de sequências de cassete candidatas para a abordagem de força bruta.

[437] Um módulo de projeto de cassete pode gerar um subconjunto de cassetes candidatos gerados aleatoriamente ou pelo menos pseudo-aleatoriamente e seleciona o cassete candidato associado a uma pontuação de apresentação de epítopo de junção abaixo de um limiar predeterminado como a sequência de cassete. Além disso, o módulo de projeto de cassete pode selecionar o cassete candidato do subconjunto com a pontuação de apresentação de epítopo de junção mais baixa como a sequência de cassete. Por exemplo, o módulo de projeto de cassete pode gerar um subconjunto de ~ 1 milhão de cassetes candidatos para um conjunto de 20 epítopos selecionados e selecionar o cassete candidato com a menor pontuação de apresentação de epítopo de junção. Embora gerar um subconjunto de sequências de cassete aleatórias e selecionar uma sequência de cassete com uma pontuação de apresentação de epítopo de junção baixa do subconjunto possa ser subideal em relação à abordagem de força bruta, isto requer significativamente menos recursos computacionais, tornando assim sua implementação tecnicamente viável. Além disso, realizar o método de força bruta em oposição a esta técnica mais eficiente pode apenas resultar em uma melhoria menor ou mesmo insignificante na pontuação de apresentação do epítopo de junção, tornando-o não confiável do ponto de vista de alocação de recursos. Um módulo de projeto de cassete pode determinar uma configuração de cassete melhorada formulando a sequência de epítopo para a cassete como um problema de caixeiro viajante assimétrico (TSP). Dada uma lista de nós e distâncias entre cada par de nós, o

TSP determina uma sequência de nós associada à distância total mais curta para visitar cada nó exatamente uma vez e retornar ao nó original. Por exemplo, dadas as cidades A, B e C com distâncias conhecidas entre si, a solução do TSP gera uma sequência fechada de cidades, para a qual a distância total percorrida para visitar cada cidade exatamente uma vez é a menor entre as rotas possíveis. A versão assimétrica do TSP determina a sequência ideal de nós quando a distância entre um par de nós é assimétrica. Por exemplo, a "distância" para viajar do nó A ao nó B pode ser diferente da "distância" para viajar do nó B ao nó A. Ao resolver um cassete ideal melhorado usando um TSP assimétrico, o módulo de projeto de cassete pode encontrar uma sequência de cassete que resulta em uma pontuação de apresentação reduzida através das junções entre epítopos da cassete. A solução do TSP assimétrico indica uma sequência de epítopos terapêuticos que correspondem à ordem em que os epítopos devem ser concatenados em uma cassete para minimizar a pontuação de apresentação do epítopo de junção através das junções da cassete. Uma sequência de cassete determinada por meio desta abordagem pode resultar em uma sequência com apresentação significativamente menor de epítopos de junção, embora exigindo potencialmente menos recursos computacionais do que a abordagem de amostragem aleatória, especialmente quando o número de sequências de cassete candidato gerado é grande. Exemplos ilustrativos de diferentes abordagens computacionais e comparações para otimizar o projeto de cassete são descritos em mais detalhes na Patente US N° 10.055.540, Ped. de publicação U.S. No. US20200010849A1, e publicações de pedido de patente internacional

WO/2018/195357 e WO/2018/208856, cada um aqui incorporado por referência, em sua totalidade, para todos os efeitos.

XI.B.2 Seleção de sequência de vacina de antígeno compartilhado

[438] Sequências de antígeno compartilhadas para inclusão em uma vacina de antígeno compartilhada e pacientes apropriados para tratamento com tal vacina podem ser escolhidos por um versado na técnica usando a divulgação detalhada aqui fornecida. Em certos casos, uma mutação particular e combinação de alelo HLA podem ser preferidos (por exemplo, com base em dados de sequenciamento disponíveis de um determinado sujeito, indicando que cada um está presente no sujeito) e subsequentemente usados em combinação para identificar uma sequência de neoantígeno compartilhada.

XIII. Exemplo de computador

[439] Um computador pode ser usado para qualquer um dos métodos computacionais descritos neste documento. Um versado na técnica reconhecerá que um computador pode ter arquiteturas diferentes. Exemplos de computadores são conhecidos pelos versados na técnica, por exemplo, os computadores descritos em mais detalhes na Pat. U.S. No. 10.055.540, Pub. do Pedido U.S. No. US20200010849A1, e publicações de pedido de patente internacional WO/2018/195357 e WO/2018/208856, cada um aqui incorporado por referência, em sua totalidade, para todos os efeitos.

XIV. Exemplo de vetor de entrega de antígeno

[440] Estão descritos abaixo exemplos de modalidades específicas para a execução da presente invenção. Os exemplos são apresentados para fins ilustrativos apenas e não são destinados a impor limitações sobre o escopo da presente

invenção, em qualquer hipótese. Esforços têm sido feitos para garantir a precisão no que diz respeito aos números usados (por exemplo, quantidades, temperatura, etc), mas alguns erros e desvios experimentais devem ser, obviamente, considerados.

[441] A prática da presente invenção empregará, a menos que indicado de outra forma, métodos convencionais de química de proteínas, bioquímica, técnicas de DNA recombinante e farmacologia, dentro dos conhecimentos da técnica. Tais técnicas são explicadas por completo na literatura. Ver, por exemplo, 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* (2a Edição, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18a Edição (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry 3ª Ed.* (Plenum Press) Vols A e B(1992).

XIV.A. Projeto de cassete de neoantígeno

[442] Por meio da vacinação, múltiplos neoantígenos específicos de tumor restritos por MHC de classe I (TSNAs) que estimulam a(s) resposta(s) imune (s) celular(es) correspondente(s) podem ser entregues. Em um exemplo, um cassete de vacina foi projetado para codificar múltiplos epítopos como um único produto de gene, onde os epítopos foram incorporados em sua sequência de peptídeo natural circundante ou espaçados por sequências de ligação não naturais. Vários parâmetros de projeto foram identificados

que poderiam potencialmente impactar o processamento e apresentação do antígeno e, portanto, a magnitude e a amplitude das respostas de células T CD8 específicas de TSNA. No presente exemplo, vários modelos de cassetes foram projetados e construídos para avaliar: (1) se respostas robustas de células T poderiam ser geradas para múltiplos epítopos incorporados em um único cassete de expressão; (2) o que torna um ligante ideal colocado entre os TSNAs dentro do cassete de expressão - que leva ao processamento e apresentação ideais de todos os epítopos; (3) se a posição relativa dos epítopos dentro da cassete impactam as respostas das células T; (4) se o número de epítopos dentro de uma cassete influencia a magnitude ou qualidade das respostas das células T a epítopos individuais; (5) se a adição de sequências de direcionamento celular melhora as respostas das células T.

[443] Duas leituras foram desenvolvidas para avaliar a apresentação do antígeno e as respostas das células T específicas para epítopos marcadores dentro dos cassetes modelo: (1) uma tela baseada em células *in vitro* que permitiu a avaliação da apresentação do antígeno medida pela ativação de células T repórter especialmente projetadas (Aarnoudse et al., 2002; Nagai et al., 2012); e (2) um ensaio *in vivo* que usou camundongos transgênicos HLA-A2 (Vitiello et al., 1991) para avaliar a imunogenicidade pós-vacinação de epítopos derivados de cassetes de origem humana por suas respostas de células T específicas de epítopo correspondentes (Cornet et al., 2006; Depla et al., 2008; Ishioka et al., 1999).

XIV.B. Avaliação de projeto de cassete de antígeno

XIV.B.1. Métodos e materiais

Projeto e clonagem de TCR e cassete

[444] Os TCRs selecionados reconhecem os peptídeos NLVPMVATV (SEQ ID NO: 78) (PDB # 5D2N), CLGGLLTMV (SEQ ID NO: 79) (PDB # 3REV), GILGFVFTL (SEQ ID NO: 80) (PDB # 1OGA) LLFGYPVYV (SEQ ID NO: 81) (PDB # 1AO7) quando apresentados por A * 0201. Os vetores de transferência foram construídos que contêm subunidades de TCR ligadas ao peptídeo 2A (beta seguido por alfa), o IRES EMCV e subunidades CD8 ligadas a 2A (beta seguido por alfa e pelo gene de resistência à puromicina). As sequências de quadro de leitura aberta foram otimizadas por códons e sintetizadas por GeneArt.

Geração de linha celular para processamento de epítopos in vitro e estudos de apresentação

[445] Os peptídeos foram adquiridos da ProImmune ou Genscript diluídos para 10 mg/mL com tris (2-carboxietil) fosfina 10 mM (TCEP) em água/DMSO (2:8, v/v). O meio de cultura de células e suplementos, a menos que indicado de outra forma, eram da Gibco. O soro fetal bovino inativado por calor (FBShi) era da Seradigm. O substrato QUANTI-Luc, a zeocina e a puromicina eram da InvivoGen. As células Jurkat-Lucia NFAT (InvivoGen) foram mantidas em RPMI 1640 suplementado com 10% de FBShi, piruvato de sódio e 100 µg/mL de zeocina. Uma vez transduzidas, essas células receberam adicionalmente 0,3 µg/mL de puromicina. As células T2 (ATCC CRL-1992) foram cultivadas em meio Iscove (IMDM) mais 20% de FBShi. As células U-87 MG (ATCC HTB-14) foram mantidas em meio MEM Eagles suplementado com 10% de FBShi.

[446] As células NFAT Jurkat-Lucia contêm uma construção repórter Lucia induzível por NFAT. O gene Lucia, quando ativado pelo envolvimento do receptor de células T

(TCR), causa a secreção de uma luciferase que utiliza coelenterazina para o meio de cultura. Esta luciferase pode ser medida usando o reagente de detecção de luciferase QUANTI-Luc. As células Jurkat-Lucia foram transduzidas com lentivírus para expressar TCRs específicos para o antígeno. O vetor de transferência de lentivírus derivado de HIV foi obtido de GeneCopoeia, e plasmídeos de suporte de lentivírus expressando VSV-G (pCMV-VsvG), Rev (pRSV-Rev) e Gag-pol (pCgpV) foram obtidos de Cell Design Labs.

[447] O lentivírus foi preparado por transfecção de balões T75 confluentes de 50-80% de células HEK293 com Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher), usando 40 µl de lipofectamina e 20 µg da mistura de DNA (4:2:1:1 em peso do plasmídeo de transferência:pCgpV:pRSV-Rev:pCMV-VsvG). 8-10 mL do meio contendo vírus foram concentrados usando o sistema Lenti-X (Clontech), e o vírus ressuspenso em 100-200 µl de meio fresco. Este volume foi usado para sobrepor um volume igual de células Jurkat-Lucia (células 5x10E4-1x10E6 foram usadas em diferentes experimentos). Após a cultura em 0,3 µg/ml de meio contendo puromicina, as células foram classificadas para obter clonalidade. Estes clones de TCR Jurkat-Lucia foram testados quanto à atividade e seletividade usando células T2 carregadas com peptídeo.

Ensaio de apresentação e processamento de epítopos in vitro

[448] As células T2 são rotineiramente usadas para examinar o reconhecimento do antígeno pelos TCRs. As células T2 carecem de um transportador de peptídeo para processamento de antígeno (TAP deficiente) e não podem carregar peptídeos endógenos no retículo endoplasmático para apresentação no

MHC. No entanto, as células T2 podem ser facilmente carregadas com peptídeos exógenos. Os cinco peptídeos marcadores (NLVPMVATV (SEQ ID NO: 78), CLGGLLTMV (SEQ ID NO: 79), GLCTLVAML (SEQ ID NO: 82), LLFGYPVYV (SEQ ID NO: 81), GILGFVFTL (SEQ ID NO: 80)) e dois peptídeos irrelevantes (WLSLLVPFV (SEQ ID NO: 83), FLLTRICT (SEQ ID NO: 84)) foram carregados em células T2. Resumidamente, as células T2 foram contadas e diluídas para 1x106 células/mL com IMDM mais 1% de FBShi. Os peptídeos foram adicionados para resultar em 10 µg de peptídeo/1x106 células. As células foram então incubadas a 37oC por 90 minutos. As células foram lavadas duas vezes com IMDM mais FBShi 20%, diluídas para 5x10E5 células/mL e 100 µL plaqueadas em uma placa de cultura de tecidos Costar de 96 poços. Os clones de TCR Jurkat-Lucia foram contados e diluídos para 5x10E5 células/mL em RPMI 1640 mais FBShi a 10% e 100 µL adicionados às células T2. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C, 5% de CO2. As placas foram então centrifugadas a 400g durante 3 minutos e 20 µL do sobrenadante removidos para uma placa Greiner de fundo plano branco. O substrato QUANTI-Luc foi preparado de acordo com as instruções e 50 µL/poço adicionados. A expressão da luciferase foi lida em um Molecular Devices SpectraMax iE3x.

[449] Para testar a apresentação do epítopo do marcador pelas cassetes adenovirais, células U-87 MG foram usadas como células de apresentação de antígeno substituto (APCs) e foram transduzidas com os vetores adenovirais. As células U-87 MG foram colhidas e semeadas em meio de cultura como células 5x10E5/100 µl em uma placa de cultura de tecidos Costar de 96 poços. As placas foram incubadas por

aproximadamente 2 horas a 37°C. As cassetes adenovirais foram diluídas com MEM mais FBShi a 10% para um MOI de 100, 50, 10, 5, 1 e 0 e adicionadas às células U-87 MG como 5 µl/poço. As placas foram incubadas novamente por aproximadamente 2 horas a 37°C. Os clones de TCR Jurkat-Lucia foram contados e diluídos para 5x10E5 células/mL em RPMI mais FBShi a 10% e adicionados às células U-87 MG como 100 µL/poço. As placas foram então incubadas por aproximadamente 24 horas a 37°C, 5% de CO2. As placas foram centrifugadas a 400g durante 3 minutos e 20 µL do sobrenadante removidos para uma placa Greiner de fundo plano branco. O substrato QUANTI-Luc foi preparado de acordo com as instruções e 50 µL/poço adicionados. A expressão da luciferase foi lida em um Molecular Devices SpectraMax iE3x.

Cepas de camundongos para estudos de imunogenicidade

[450] Os camundongos HLA-A2.1 transgênicos (HLA-A2 Tg) foram obtidos da Taconic Labs, Inc. Estes camundongos carregam um transgene que consiste em uma molécula quimérica de classe I composta pelo líder HLA-A2.1 humano, domínios α1 e α2 e os domínios H2-Kb α3, transmembrana e citoplasmático murinos (Vitiello et al., 1991). Os camundongos usados para estes estudos foram a prole de primeira geração (F1) de fêmeas BALB/cAnNTac de tipo selvagem e machos homozigotos HLA-A2.1 Tg no fundo C57Bl/6.

Imunizações de vetor de adenovírus (Ad5v)

[451] Os camundongos HLA-A2 Tg foram imunizados com $1x10^{10}$ a $1x10^{6}$ partículas virais de vetores adenovirais por meio de injeção intramuscular bilateral no tibial anterior. As respostas imunes foram medidas 12 dias após a imunização.

Isolamento de linfócitos

[452] Os linfócitos foram isolados de baços recentemente colhidos e nódulos linfáticos de camundongos imunizados. Os tecidos foram dissociados em RPMI contendo 10% de soro fetal bovino com penicilina e estreptomicina (RPMI completo) usando o dissociador de tecido GentleMACS de acordo com as instruções do fabricante.

Análise ex vivo do immunospot ligado à enzima (ELISPOT)

[453] A análise ELISPOT foi realizada de acordo com as diretrizes de harmonização ELISPOT (Janetzki et al., 2015) com o kit IFNg ELISpotPLUS de camundongo (MABTECH). $1x10^5$ esplenócitos foram incubados com 10 uM dos peptídeos indicados durante 16 horas em placas revestidas com anticorpo IFNg de 96 poços. Pontos foram desenvolvidos usando fosfatase alcalina. A reação foi cronometrada por 10 minutos e foi extinta colocando a placa sob água da torneira. Os pontos foram contados usando um AID vSpot Reader Spectrum. Para a análise ELISPOT, os poços com saturação> 50% foram registrados como “numerosos demais para contar”. As amostras com desvio de poços replicados> 10% foram excluídas da análise. As contagens de pontos foram então corrigidas para a confluência do poço usando a fórmula: contagem de pontos + 2 x (contagem de pontos x %confluência/[100% - %confluência]). O fundo negativo foi corrigido por subtração das contagens de pontos nos poços de estimulação de peptídeo negativo dos poços estimulados com antígeno. Por fim, os poços rotulados como muito numerosos para serem contados foram configurados com o maior valor corrigido observado, arredondado para a centena mais próxima.

Coloração de citocina intracelular ex vivo (ICS) e análise de citometria de fluxo

[454] Linfócitos isolados de fresco a uma densidade de 2-5x10^6 células/mL foram incubados com 10 uM dos peptídeos indicados durante 2 horas. Após duas horas, a brefeldina A foi adicionada a uma concentração de 5ug/ml e as células foram incubadas com estimulante durante mais 4 horas. Após a estimulação, as células viáveis foram marcadas com o corante de viabilidade fixável eFluor780 de acordo com o protocolo do fabricante e coradas com APC anti-CD8 (clone 53-6.7, BioLegend) na diluição de 1:400. PE anti-IFNg (clone XMG1.2, BioLegend) foi usado a 1:100 para coloração intracelular. As amostras foram coletadas em um citômetro de fluxo Attune NxT (Thermo Scientific). Os dados da citometria de fluxo foram plotados e analisados usando FlowJo. Para avaliar o grau de resposta específica do antígeno, tanto o percentual de IFNg + de células CD8 + quanto o número total de células de IFNg +/ 1x10^6 células vivas foram calculados em resposta a cada estimulante de peptídeo.

XIV.B.2. Avaliação *in vitro* de projetos de cassetes de antígenos

[455] Como um exemplo de avaliação de projeto de cassete de antígeno, um ensaio baseado em células in vitro foi desenvolvido para avaliar se epítopos humanos selecionados dentro de cassetes de vacina modelo estavam sendo expressos, processados e apresentados por células apresentadoras de antígeno (**Fig. 1**). Após o reconhecimento, as células T repórter Jurkat-Lucia que foram projetadas para expressar um dos cinco TCRs específicos para combinações de peptídeo-HLA bem caracterizadas tornam-se ativadas e translocam o fator nuclear de células T ativadas (NFAT) para o núcleo que leva à ativação transcricional de um gene

repórter de luciferase. A estimulação antigênica das linhas de células T CD8 repórter individuais foi quantificada por bioluminescência.

[456] As linhas repórter Jurkat-Lucia individuais foram modificadas por transdução lentiviral com um construto de expressão que inclui uma cadeia beta de TCR e alfa de TCR específica do antígeno separada por uma sequência de salto ribossomal P2A para garantir quantidades equimolares de produto traduzido (Banu et al., 2014). A adição de um segundo elemento CD8 beta-P2A-CD8 alfa ao construto lentiviral proporcionou a expressão do co-receptor CD8, que falta à linha celular repórter parental, uma vez que o CD8 na superfície celular é crucial para a afinidade de ligação às moléculas pMHC alvo e aumenta a sinalização por meio do engajamento de sua cauda citoplasmática (Lyons et al., 2006; Yachi et al., 2006).

[457] Após a transdução lentiviral, os repórteres Jurkat-Lucia foram expandidos sob seleção de puromicina, submetidos a separação de células assistida por fluorescência de célula única (FACS) e as populações monoclonais testadas para a expressão de luciferase. Isto rendeu linhas de células repórter transduzidas de forma estável para antígenos de peptídeo específicos 1, 2, 4 e 5 com respostas de células funcionais. (**Tabela 2**).

Tabela 2: Desenvolvimento de um ensaio de ativação de células T *in vitro* . O reconhecimento de células T específicas do peptídeo, conforme medido pela indução de luciferase, indica o processamento e apresentação eficazes dos antígenos do cassete da vacina.

	Projeto de cassete curto
Epítopo	**AAY**
1	24,5 ± 0,5
2	11,3 ± 0,4
3*	n/a
4	26,1 ± 3,1
5	46,3 ± 1,9

* Célula T repórter para o epítopo 3 ainda não gerada

[458] Em outro exemplo, uma série de cassetes curtos, todos os epítopos marcadores foram incorporados na mesma posição (**Fig. 2A**) e apenas os ligantes que separam os epítopos restritos HLA-A * 0201 (**Fig. 2B**) foram variados. As células T repórter foram individualmente misturadas com células apresentadoras de antígeno U-87 (APCs) que foram infectadas com construtos adenovirais que expressam esses cassetes curtos e a expressão de luciferase foi medida em relação aos controles não infectados. Todos os quatro antígenos nos modelos de cassetes foram reconhecidos por células T repórter correspondentes, demonstrando processamento e apresentação eficientes de vários antígenos. A magnitude das respostas das células T segue tendências muito semelhantes para os ligantes naturais e AAY. Os antígenos liberados do cassete baseado em RR-ligante mostram induções de luciferase mais baixas (**Tabela 3**). O DPP-ligante, projetado para interromper o processamento do antígeno, produziu um cassete de vacina que levou a uma apresentação de epítopo baixa (**Tabela 3**).

Tabela 3: Avaliação das sequências de ligantes em cassetes curtos. A indução de luciferase no ensaio de ativação de células T *in vitro* indicou que, além do cassete baseado em DPP, todos os ligantes facilitaram a liberação eficiente dos antígenos do cassete. Apenas epítopo de célula

T (sem ligante) = 9AA, ligante natural de um lado = 17AA, ligante natural de ambos os lados = 25AA, ligantes não naturais = AAY, RR, DPP

	Projetos de cassetes curtos					
Epí-topo	**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

* Célula T repórter para o epítopo 3 ainda não gerada

[459] Em outro exemplo, uma série adicional de cassetes curtos foi construída que, além de epítopos humanos e de camundongo, continham sequências de direcionamento, como ubiquitina (Ub), MHC e peptídeos de sinal Ig-kappa (SP) e/ou motivos transmembranares (TM) de MHC posicionado no N- ou C-terminal do cassete. (**Fig. 3**). Quando entregues a APCs U-87 pelo vetor adenoviral, as células T repórter novamente demonstraram processamento e apresentação eficientes de múltiplos antígenos derivados de cassetes. No entanto, a magnitude das respostas das células T não foi substancialmente afetada pelos vários recursos de direcionamento (Tabela 4).

Tabela 4: Avaliação das sequências de direcionamento celular adicionadas aos cassetes de vacina modelo. Empregar o ensaio de ativação de células T *in vitro* demonstrou que os quatro epítopos marcadores restritos a HLA-A * 0201 são liberados eficientemente a partir dos cassetes modelo e as sequências de direcionamento não melhoraram substancialmente o reconhecimento e a ativação de células T.

	Projetos de cassetes curtos									
Epítopo	**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

* Célula T repórter para o epítopo 3 ainda não gerada

XIV.B.3. Avaliação *in vivo* de projetos de cassete de antígeno

[460] Como outro exemplo de avaliação de projeto de cassete de antígeno, os cassetes de vacina foram projetados para conter 5 epítopos de MHC de classe I humanos bem caracterizados, conhecidos por estimular células T CD8 de forma restrita a HLA-A * 02:01 (**Fig. 2A**, **3**, **5A**) . Para a avaliação da sua imunogenicidade in vivo, cassetes de vacina contendo esses epítopos marcadores foram incorporados em vetores adenovirais e usados para infectar camundongos transgênicos HLA-A2 (**Fig. 4**). Este modelo de camundongo carrega um transgene que consiste parcialmente em HLA-A * 0201 humano e H2-Kb de camundongo, portanto, codificando uma molécula de MHC de classe I quimérica que consiste no líder HLA-A2.1 humano, domínios α1 e α2 ligados à transmembrana α3 murina e domínio citoplasmático de H2-Kb (Vitiello et al., 1991). A molécula quimérica permite a apresentação de antígeno restrito a HLA-A * 02:01, enquanto mantém a interação de correspondência de espécie do co-receptor CD8 com o domínio α3 no MHC.

[461] Para os cassetes curtos, todos os epítopos marcadores geraram uma resposta de células T, conforme determinado por IFN-gama ELISPOT, que foi aproximadamente 10-50x mais forte do que foi comumente relatado (Cornet et al., 2006; Depla et al., 2008; Ishioka et al., 1999). De todos os ligantes avaliados, o concatâmero de sequências de 25mer, cada um contendo um epítopo mínimo flanqueado por suas sequências de aminoácidos naturais, gerou a maior e mais ampla resposta de células T (**Tabela 5**). A coloração intracelular de citocinas (ICS) e a análise de citometria de

fluxo revelaram que as respostas das células T específicas para o antígeno são derivadas de células T CD8.

Tabela 5: Avaliação in vivo das sequências de ligantes em cassetes curtos. Os dados de ELISPOT indicaram que camundongos transgênicos HLA-A2, 17 dias após a infecção com partículas virais de adenovírus 1e11, geraram uma resposta de células T para todos os epítopos restritos de MHC de classe I na cassete.

	Projetos de cassetes curtos					
Epí-topo	**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

[462] Em outro exemplo, uma série de cassetes de vacina longos foi construída e incorporada em vetores adenovirais que, ao lado dos 5 epítopos marcadores originais, continham 16 HLA-A * 02:01 adicionais, A * 03:01 e B * 44:05 epítopos com reatividade de células T CD8 conhecidas (**Fig. 5A, 5B**). O tamanho desses cassetes longos imitou de perto o projeto final do cassete clínico, e apenas a posição dos epítopos em relação uns aos outros variou. As respostas das células T CD8 foram comparáveis em magnitude e amplitude para cassetes de vacina longos e curtos, demonstrando que (a) a adição de mais epítopos não impactou substancialmente a magnitude da resposta imune ao conjunto original de epítopos, e (b) a posição de um epítopo em um cassete não influenciou

substancialmente a resposta de células T que se seguiu a ele (**Tabela 6**).

Tabela 6: Avaliação in vivo do impacto da posição do epítopo em cassetes longos. Dados de ELISPOT indicaram que camundongos transgênicos HLA-A2, 17 dias após a infecção com partículas virais de adenovírus 5e10, geraram uma resposta de células T comparável em magnitude para cassetes de vacina longos e curtos.

	Projetos de cassetes longos		
Epítopo	**Padrão**	**Misturados**	**Curtos**
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

* Suspeita de erro técnico causou ausência de resposta das células T.

XIV.B.4. Projeto de cassete de antígeno para estudos de imunogenicidade e toxicologia

[463] Em resumo, os resultados das avaliações de cassete modelo (**Fig. 2-5, Tabelas 2-6**) demonstraram que, para cassetes de vacina modelo, a imunogenicidade robusta foi alcançada quando uma abordagem de "cadeia de grânulos" foi empregada que codifica cerca de 20 epítopos no contexto de um vetor baseado em adenovírus. Os epítopos foram montados pela concatenação de sequências 25mer, cada uma incorporando um epítopo mínimo de células T CD8 (por exemplo, 9 resíduos de aminoácidos) que foram flanqueados em ambos os lados por sua sequência de peptídeo natural circundante (por exemplo, 8 resíduos de aminoácidos em cada lado). Tal como aqui utilizado, uma sequência flanqueadora "natural" ou "nativa"

refere-se à sequência flanqueadora N- e/ou C-terminal de um determinado epítopo no contexto de ocorrência natural desse epítopo dentro de sua proteína de origem. Por exemplo, o epítopo NLVPMVATV (SEQ ID NO: 78) de pp65 MHC I de HCMV é flanqueado em sua extremidade 5' pela sequência nativa 5' WQAGILAR (SEQ ID NO: 85) e em sua extremidade 3' pela sequência nativa 3' QGQNLKYQ (SEQ ID NO: 86), gerando assim o peptídeo WQAGILARNLVPMVATVQGQNLKYQ (SEQ ID NO: 87)25mer pp65 encontrado na proteína fonte HCMV. A sequência natural ou nativa também pode se referir a uma sequência de ácido nucleico que codifica um epítopo flanqueado por sequência(s) flanqueadora(s) nativa(s). Cada sequência 25mer está diretamente conectada à seguinte sequência 25mer. Nos casos em que o epítopo mínimo de células T CD8 é maior ou menor que 9 aminoácidos, o comprimento do peptídeo flanqueador pode ser ajustado de modo que o comprimento total ainda seja uma sequência de peptídeo de 25mer. Por exemplo, um epítopo de célula T CD8 de 10 aminoácidos pode ser flanqueado por uma sequência de 8 aminoácidos e 7 aminoácidos. O concatâmero foi seguido por dois epítopos de MHC de classe II universais que foram incluídos para estimular as células T auxiliares CD4 e melhorar a imunogenicidade geral *in vivo* dos antígenos do cassete da vacina. (Alexander et al., 1994; Panina-Bordignon et al., 1989) Os epítopos de classe II foram ligados ao epítopo de classe I final por um ligante de aminoácido GPGPG (SEQ ID NO: 56). Os dois epítopos de classe II também foram ligados um ao outro por um ligante de aminoácido GPGPG (SEQ ID NO: 56), bem como flanqueados no C-terminal por um ligante de aminoácido GPGPG (SEQ ID NO: 56). Nem a posição nem o número de epítopos pareceram impactar

substancialmente o reconhecimento ou a resposta das células T. As sequências de direcionamento também não parecem impactar substancialmente a imunogenicidade de antígenos derivados de cassetes.

[464] Como outro exemplo, com base nos dados in vitro e in vivo obtidos com cassetes modelo (**Fig. 2-5, Tabelas 2-6)**, um projeto de cassete foi gerado que alterna epítopos de células T bem caracterizados conhecidos por serem imunogênicos em não humanos primatas (NHPs), camundongos e humanos. Os 20 epítopos, todos incorporados em suas sequências 25mer naturais, são seguidos pelos dois epítopos MHC de classe II universal que estavam presentes em todos os modelos de cassetes avaliados (**Fig. 6**). Este projeto de cassete foi usado para estudar a imunogenicidade, bem como estudos de farmacologia e toxicologia em várias espécies.

XIV.B.5. Projeto e avaliação de cassete de antígeno para 30, 40 e 50 antígenos

[465] Foram projetadas cassetes de antígeno grandes que tinham 30 (L), 40 (XL) ou 50 (XXL) epítopos, cada um com 25 aminoácidos de comprimento. Os epítopos eram uma mistura de epítopos humanos, NHP e de camundongo para modelar antígenos de doenças, incluindo antígenos tumorais. **A Fig. 29** ilustra a organização geral dos epítopos das várias espécies. Os antígenos modelo usados são descritos nas **Tabelas 32, 33 e 34** para epítopos modelo humano, de primata e de camundongo, respectivamente. Cada uma das **Tabelas 32, 33 e 34** descreveu a posição do epítopo, nome, descrição mínima do epítopo e classe de MHC.

[466] Estes cassetes foram clonados nos vetores de vacina ChAdV68 e alfavírus, conforme descrito para avaliar

a eficácia de cassetes de epítopos múltiplos mais longos. **A Fig. 30** mostra que cada um dos cassetes de antígeno grandes foi expresso a partir de um vetor ChAdV conforme indicado por pelo menos uma banda principal do tamanho esperado por Western blot.

[467] Os camundongos foram imunizados conforme descrito para avaliar a eficácia dos cassetes grandes. As respostas das células T foram analisadas por ICS e coloração de tetrâmero após imunização com um vetor ChAdV68 (**Fig. 31/Tabela 35** e **Fig. 32/Tabela 36,** respectivamente) e por ICS após imunização com um vetor srRNA (**Fig. 33/Tabela 37**) para epítopos AH1 (painéis superiores) e SIINFEKL (SEQ ID NO: 72) (painéis inferiores). As imunizações usando ChAdV68 e vetores de vacina de srRNA expressando epítopos 30 (L), 40 (XL) ou 50 (XXL) induziram respostas imunes CD8+ para modelos de epítopos da doença.

Tabela 32 - Epítopos humanos em cassetes grandes (Tabela 32 revela SEQ ID NOs 80-82, 78-79, 88-100, 87 e 101-111, respectivamente, em ordem de colunas)

Posição de Epítopo de Cada Cassete										
L	XL	XXL		Nome	Epítopo mínimo	25mer	MHC	Restrição	Cepa	Espécies
	3	3	3	5.influenza M	GILGFVFTL	PILSPLTKGILGFVFTLTVPSERGL	Classe I	A*02:01	Humana	Humana
	6	6	6	4.HTLV-1 Tax	LLFGYPVYV	HFPGFGQSLLFGYPVYVFGDCVQGD	Classe I	A*02:01	Humana	Humana
	9	9	9	3.EBV BMLF1	GLCTLVAML	RMQAIQNAGLCTLVAMLEETIFWLQ	Classe I	A*02:01	Humana	Humana
	12	12	12	1. HCMV pp65	NLVPMVATV	WQAGILARNLVPMVATVQGQNLKYQ	Classe I	A*02:01	Humana	Humana
	15	15	15	2.EBV LMP2A	CLGGLLTMV	RTYGPVFMCLGGLLTMVAGAVWLTV	Classe I	A*02:01	Humana	Humana
	18	18	18	CT83	NTDNNLAVY	SSSGLINSNTDNNLAVYDLSRDILN	Classe I	A*02:01	Humana	Humana
		21	21	MAGEA6	EVDPIGHVY	LVFGIELMEVDPIGHVYIFATCLGL	Classe I	B*35:01	Humana	Humana
	21	25	25	CT83	LLASSILCA	MNFYLLLASSILCALIVFWKYRRFQ	Classe I	A*02:01	Humana	Humana
	24	31	28	FOXE1	AIFPGAVPAA	AAAAAAAAIFPGAVPAARPPYPGAV	Classe I	A*24:02	Humana	Humana
	27	35	32	CT83	VYDLSDIL	SNTDNNLAVYDLSRDILNNFPHSIA	Classe I	A*01:01	Humana	Humana
		38	36	MAGE3/6	ASSLPTTMNY	DPPQSPQGASSLPTTMNYPLWSQSY	Classe II	DRB1*0101	Humana	Humana
	30	40	40	Influenza HA	PKYVKQNTLKLAT	ITYGACPKYVKQNTLKLATGMRNVP	Classe II	DRB1*0101	Humana	Humana
			44	CMV pp65	LPLKMLNIPSINVH	SIYVYALPLKMLNIPSINVHHYPSA	Classe II	DRB1*0101	Humana	Humana

Posição de Epítopo de Cada Cassete										
L	XL	XXL		Nome	Epítopo mínimo	25mer	MHC	Restrição	Cepa	Espécies
			47	EBV EBNA3A	PEQWMFQGAPPSQGT	EGPWVPEQWMFQGAPPSQGTDVVQH	Classe II	DRB1*0102	Humana	Humana
			50	CMV pp65	EHPTFTSQYRIQGKL	RGPQYSEHPTFTSQYRIQGKLEYRH	Classe II	DRB1*1101	Humana	Humana

Tabela 33 - Epítopos de NHP em cassetes grandes (Tabela 33 revela SEQ ID NOs 112-141, respectivamente, em ordem de colunas)

Posição de Epítopo de Cada Cassete										
L	XL	XXL		Nome	Epítopo mínimo	25mer	MHC	Restrição	Cepa	Espécies
	1	1	1	Gag CM9	CTPYDINQM	MFQALSEGCTPYDINQMLNVLGDHQ	Classe I	Mamu-A*01	Rhesus	NHP
	4	4	4	Tat TL8	TTPESANL	SCISEADATTPESANLGEEILSQLY	Classe I	Mamu-A*01	Rhesus	NHP
	7	7	7	Env CL9	CAPPGYALL	WDAIRFRYCAPPGYALLRCNDTNYS	Classe I	Mamu-A*01	Rhesus	NHP
	10	10	10	Pol SV9	SGPKTNIIV	AFLMALTDSGPKTNIIVDSQYVMGI	Classe I	Mamu-A*01	Rhesus	NHP
	13	13	13	Gag LW9	LSPRTLNAW	GNVWVHTPLSPRTLNAWVKAVEEKK	Classe I	Mamu-A*01	Rhesus	NHP
			16	Env_TL9	TVPWPNASL	AFRQVCHTTVPWPNASLTPKWNNET	Classe I	Mamu-A*01	Rhesus	NHP
	16	16	19	Ag85B	PNGTHSWEYWGAQLN	VFNFPPNGTHSWEYWGAQLNAMKGD	Classe II	Mamu-DR*W	Rhesus	NHP
	19	19	23	HIV-1 Env	YKYKVVKIEPLGV	NWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTKAK	Classe II	Mamu-DR*W	Rhesus	NHP
			26	Gag TE15	TEEAKQIVORHLVVE	EKVKHTEEAKQIVQRHLVVETGTTE	Classe II	Mamu-DRB*	Rhesus	NHP
		23	30	CFP-10 36-48	AGSLQGQWRGAAG	DQVESTAGSLQGQWRGAAGTAAQAA	Classe II	Mafa-DRB1*	Cyno	NHP
		27	34	CFP-10 71-86	EISTNIRQAGVQYSRA	QELDEISTNIRQAGVQYSRADEEQQ	Classe II	Mafa-DRB1*	Cyno	NHP
	22	29	38	Env 338-346	RPKQAWCWF	FHSQPINERPKQAWCWFGGSWKEAI	Classe I	Mafa-A1*063	Cyno	NHP
	25	33	42	Nef 103-111	RPKVPLRTM	DDIDEEDDDLVGVSVRPKVPLRTMS	Classe I	Mafa-A1*063	Cyno	NHP

Posição de Epítopo de Cada Cassete										
L	XL	XXL		Nome	Epítopo mínimo	25mer	MHC	Restrição	Cepa	Espécies
	28	37	45	Gag 386-394	GPRKPIKCW	PFAAAQQRGPRKPIKCWNCGKEGHS	Classe I	Mafa-A1*063	Cyno	NHP
			48	Nef LT9	LNMADKKET	RRLTARGLLNMADKKETRTPKKAKA	Classe I	Mafa-B*104:	Cyno	NHP

Tabela 34 - Epítopos de camundongo em cassetes grandes (Tabela 34 revela SEQ ID NOs 72, 142-144, 73, 145-161, 75-76 e 162-177, respectivamente, em ordem de colunas)

Posição de Epítopo de Cada Cassete										
L	XL	XXL		Nome	Epítopo mínimo	25mer	MHC	Restrição	Cepa	Espécie
	2	2	2	OVA257	SIINFEKL	VSGLEQLESIIN FEKLTEWTSSNVM	Classe I	H2-Kb	B6	Camundongo
			5	B16-EGP	EGPRNQDWL	ALLAVGALEGPRNQDWLGVPRQLVT	Classe I	H2-Db	B6	Camundongo
			8	B16-TRP1 455-463	TAPDNLGYM	VTNTEMFVTAPDNLGYMYEVQWPGQ	Classe I	H2-Db	B6	Camundongo
			11	Trp2180-188	SVYDFFVWL	TQPQIANCSVYDFFVWLHYYSVRDT	Classe I	H2-Kb	B6	Camundongo
	5	5	14	CT26 AH1-A5	SPSYAYHQF	LWPRVTYHSPSYAYHQFERRAKYKR	Classe I	H2-Ld	Balb/C	Camundongo
		8	17	CT26 AH1-39	MNKYAYHML	LWPRVTYHMKYAYHMLER RAKYKR	Classe I	H2-Ld	Balb/C	Camundongo
		11	20	MC38 Dpagt1	SIIVFNLL	GQSLVISASIIVFNLLELEGDYRDD	Classe I	H2-Kb	B6	Camundongo
		14	22	MC38 Adpgk	ASMTNMELM	GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQV	Classe I	H2-Db	B6	Camundongo
		17	24	MC38 Reps1	AQLANDVVL	RVLELFRAAQLANDVVLQIMELCGA	Classe I	H2-Db	B6	Camundongo
	8	20	27	P815 P1A 35-44	LPYLGWLVF	HRYSLEEILPYLGWLVFAVVTTSFL	Classe I	H2-Ld	DBA/2	Camundongo
	11	22	29	P815 P1E	GYCGLRGTGV	YLSKNPDGYCGLR GTGVSCPMAIKK	Classe I	H2-Kd	DBA/2	Camundongo
	14	24	31	Panc02 Mesothelin	LSIFKHKL	NEIPFTYEQLSIFKHKLDKTYPQGY	Classe I	H2-Kb	B6	Camundongo
	17	26	33	Panc02 Mesothelin	LIWIPALL	SRASLLGPGFVLIWIPALLPALRLS	Classe I	H2-Kb	B6	Camundongo

Posição de Epítopo de Cada Cassete										
L	XL	XXL		Nome	Epítopo mínimo	25mer	MHC	Restrição	Cepa	Espécie
	20	28	35	1D8 FRa 161-169	SSGHNECPV	NWHKGWNWSSGHNECPVGASCHPFT	Classe I	H2-Kb	B6	Camundongo
	23	30	37	1D8 Mesothelin 400	GQKMNAQAI	KTLLKVSKGQKMNAQAIALVACYLR	Classe I	H2-Db	B6	Camundongo
	26	32	39	OVA-II	ISQAVHAAHA EINEAGR	ESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVG	Classe II	I-Ab, I-Ad	B6	Camundongo
	29	34	41	ESAT-6	MTEQQWNFAG IEAAASAIQ	MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSI	Classe II	I-Ab	B6	Camundongo
		36	43	TT p30	FNNFTVSFWL RVPKVSASHL	DMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEQY	Classe II	I-Ad	Balb/C	Camundongo
		39	46	HEL	DGSTDYGILQ INSRW	TNRNTDGSTDYGILQINSRWWCNDG	Classe II	I-Ak	CBA	Camundongo
			49	MOG	MEVGWYRSPF SRVVHLYRN	ITGMEVGWYRSPFSRVVHLYRNGKD Q	Classe II	I-Ab	B6	Camundongo

Tabela 35: Células IFNg + médias em resposta aos peptídeos AH1 e SIINFEKL (SEQ ID NO: 72) em camundongos tratados com cassete grande ChAd. Os dados são apresentados como % do total de células CD8. São mostrados a média e o desvio padrão por grupo e o valor p por ANOVA com o teste de Tukey. Todos os valores de p comparados com o cassete de antígeno MAG 20.

no. do antígenos	Antígeno	Média	Desvio padrão	valor-p	N
20	SIINFEKL	5,308	0,660	n/a	8
30	SIINFEKL	4,119	1,019	0,978	8
40	SIINFEKL	6,324	0,954	0,986	8
50	SIINFEKL	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

Tabela 36: Células tetrâmero + médio para antígenos AH1 e SIINFEKL (SEQ ID NO: 72) em camundongos tratados com cassete grande ChAd. Os dados são apresentados como % do total de células CD8. São mostrados a média e o desvio padrão por grupo e o valor p por ANOVA com o teste de Tukey. Todos os valores de p comparados com o cassete de antígeno MAG 20.

no. do antígenos	Antígeno	Média	Desvio padrão	valor-p	N
20	SIINFEKL	10,314	2,384	n/a	8
30	SIINFEKL	4,551	2,370	0,003	8
40	SIINFEKL	5,186	3,254	0,009	8
50	SIINFEKL	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

Tabela 37: Células IFNg + médias em resposta aos peptídeos AH1 e SIINFEKL (SEQ ID NO: 72) em camundongos tratados com cassete grande SAM. Os dados são apresentados como % do total de células CD8. São mostrados a média e o

desvio padrão por grupo e o valor p por ANOVA com o teste de Tukey. Todos os valores de p comparados com o cassete de antígeno MAG 20.

no. do antígenos	Antígeno	Média	Desvio padrão	valor-p	N
20	SIINFEKL	1,843	0,422	n/a	8
30	SIINFEKL	2,112	0,522	0,879	7
40	SIINFEKL	1,754	0,978	0,995	7
50	SIINFEKL	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

XV. Vetor de entrega de cassete de antígeno ChAd

XV.A. Construção de vetor de entrega de cassete de antígeno ChAd

[468] Em um exemplo, o adenovírus de chimpanzé (ChAd) foi projetado para ser um vetor de entrega para cassetes de antígeno. Em outro exemplo, um vetor ChAdV68 de comprimento total foi sintetizado com base em AC_000011.1 (sequência 2 da Patente U.S. 6083716) com sequências E1 (nt 457 a 3014) e E3 (nt 27.816-31.332) deletadas. Genes repórteres sob o controle do promotor/intensificador de CMV foram inseridos no lugar das sequências E1 deletadas. A transfecção deste clone em células HEK293 não produziu vírus infeccioso. Para confirmar a sequência do vírus C68 de tipo selvagem, o isolado VR-594 foi obtido da ATCC, passado e, em seguida, sequenciado de forma independente (SEQ ID NO: 10). Ao comparar a sequência AC_000011.1 com a sequência ATCC VR-594 (SEQ ID NO: 10) do vírus ChAdV68 de tipo selvagem, foram identificadas 6 diferenças de nucleotídeos. Em um exemplo, um vetor ChAdV68 modificado foi gerado com base em AC_000011.1, com os nucleotídeos ATCC VR-594 correspondentes

substituídos em cinco posições (ChAdV68.5WTnt SEQ ID NO: 1).

[469] Em outro exemplo, um vetor ChAdV68 modificado foi gerado com base em AC_000011.1 com sequências E1 (nt 577 a 3403) e E3 (nt 27.816- 31.332) deletadas e os nucleotídeos ATCC VR-594 correspondentes substituídos em quatro posições. Um repórter GFP (ChAdV68.4WTnt.GFP; SEQ ID NO: 11) ou cassete de neoantígeno modelo (ChAdV68.4WTnt.MAG25mer; SEQ ID NO: 12) sob o controle do promotor/intensificador de CMV foi inserido no lugar das sequências E1 deletadas.

[470] Em outro exemplo, um vetor ChAdV68 modificado foi gerado com base em AC_000011.1 com sequências E1 (nt 577 a 3403) e E3 (nt 27.125-31.825) deletadas e os nucleotídeos ATCC VR-594 correspondentes substituídos em cinco posições. Um repórter GFP (ChAdV68.5WTnt.GFP; SEQ ID NO:13) ou cassete de neoantígeno modelo (ChAdV68.5WTnt.MAG25mer; SEQ ID NO:2) sob o controle do promotor/intensificador de CMV foi inserido no lugar das sequências E1 deletadas.

[471] Os vetores relevantes são descritos abaixo:

-Sequência ChAdVC68 de comprimento total "ChAdV68.5WTnt" (SEQ ID NO: 1); Sequência AC_000011.1 com nucleotídeos ATCC VR-594 correspondentes substituídos em cinco posições.

-ATCC VR-594 C68 (SEQ ID NO: 10); Sequenciada de forma independente; C68 de comprimento total

-ChAdV68.4WTnt.GFP (SEQ ID NO: 11); AC_000011.1 com sequências E1 (nt 577 a 3403) e E3 (nt 27.816- 31.332) deletadas; nucleotídeos ATCC VR-594 correspondentes substituídos nas quatro posições ; Repórter de GFP sob o controle do promotor/intensificador de CMV inserido no lugar de E1 deletado

-ChAdV68.4WTnt.MAG25mer (SEQ ID NO: 12); AC_000011.1 com sequências E1 (nt 577 a 3403) e E3 (nt 27.816- 31.332) deletadas; nucleotídeos ATCC VR-594 correspondentes substituídos nas quatro posições ; modelo de cassete de neoantígeno sob o controle do promotor/intensificador de CMV inserido no lugar de E1 deletado

-ChAdV68.5WTnt.GFP (SEQ ID NO: 13); AC_000011.1 com sequências E1 (nt 577 a 3403) e E3 (nt 27.125-31.825) deletadas; nucleotídeos ATCC VR-594 correspondentes substituídos nas cinco posições; Repórter de GFP sob o controle do promotor/intensificador de CMV inserido no lugar de E1 deletado

XV.B Teste de vetor de entrega de cassete de antígeno ChAd

XV.B.1. Métodos e materiais de avaliação de vetores ChAd

Transfecção de células HEK293A usando lipofectamina

[472] O DNA para os construtos de ChAdV68 (ChAdV68.4WTnt.GFP, ChAdV68.5WTnt.GFP, ChAdV68.4WTnt.MAG25mer e ChAdV68.5WTnt.MAG25mer) foi preparado e transfectado em células HEK293A usando o seguinte protocolo.

[473] 10 ug de DNA de plasmídeo foram digeridos com PacI para liberar o genoma viral. O DNA foi então purificado usando Micro colunas de limpeza de DNA GeneJet (Thermo Fisher) de acordo com as instruções do fabricante para fragmentos de DNA longos e eluído em 20 ul de água pré-aquecida; as colunas foram deixadas a 37 graus durante 0,5-1 horas antes da etapa de eluição.

[474] As células HEK293A foram introduzidas em placas de 6 poços a uma densidade celular de 10^6 células/poço 14-18

horas antes da transfecção. As células foram cobertas com 1 ml de meio fresco (DMEM-10% de hiFBS com pen/estreptococos e glutamato) por poço. 1-2 ug de DNA purificado foi usado por poço em uma transfecção com duas vezes o volume de ul (2-4 ul) de Lipofectamine2000, de acordo com o protocolo do fabricante. 0,5 ml de meio OPTI-MEM contendo a mistura de transfecção foi adicionado a 1 ml de meio de crescimento normal em cada poço e deixado nas células durante a noite.

[475] As culturas de células transfectadas foram incubadas a 37°C durante pelo menos 5-7 dias. Se as placas virais não eram visíveis no dia 7 após a transfecção, as células foram divididas 1:4 ou 1:6 e incubadas a 37°C para monitorar o desenvolvimento da placa. Alternativamente, as células transfectadas foram colhidas e submetidas a 3 ciclos de congelamento e descongelamento e os lisados celulares foram usados para infectar células HEK293A e as células foram incubadas até que as placas de vírus fossem observadas.

Transfecção de vetores ChAdV68 em células HEK293A usando fosfato de cálcio e geração do estoque viral terciário

[476] O DNA para os construtos de ChAdV68 (ChAdV68.4WTnt.GFP, ChAdV68.5WTnt.GFP, ChAdV68.4WTnt.MAG25mer, ChAdV68.5WTnt.MAG25mer) foi preparado e transfectado em células HEK293A usando o seguinte protocolo.

[477] As células HEK293A foram semeadas um dia antes da transfecção a 10^6 células/poço de uma placa de 6 poços em 5% de BS/DMEM/1XP/S, 1XGlutamax. Dois poços são necessários por transfecção. Duas a quatro horas antes da transfecção, o meio foi mudado para meio fresco. O plasmídeo ChAdV68.4WTnt.GFP foi linearizado com PacI. O DNA

linearizado foi então extraído com fenol-clorofórmio e precipitado usando um décimo do volume de acetato de sódio 3M pH 5,3 e dois volumes de etanol 100%. O DNA precipitado foi sedimentado por centrifugação a 12.000xg por 5 min antes da lavagem 1X com etanol a 70%. O sedimento foi seco ao ar e ressuspenso em 50 µL de água estéril. A concentração de DNA foi determinada usando um NanoDrop™ (ThermoFisher) e o volume ajustado para 5 µg de DNA/50 µL.

[478] 169 µL de água esterilizada foram adicionados a um tubo de microcentrífuga. 5 µL de $CaCl_2$ 2M foram então adicionados à água e misturados suavemente por pipetagem. 50 µL de DNA foram adicionados gota a gota à solução aquosa de $CaCl_2$. Vinte e seis µL de $CaCl_2$ 2M foram então adicionados e misturados suavemente por pipetagem duas vezes com um micropipetador. Esta solução final deve consistir em 5 µg de DNA em 250 µL de 0,25M $CaCl_2$. Um segundo tubo foi então preparado contendo 250 µL de 2XHBS (solução tamponada de Hepes). Usando uma pipeta estéril de 2 mL anexada a um Pipet-Aid, o ar foi borbulhado lentamente através da solução 2XHBS. Ao mesmo tempo, a solução de DNA na solução 0,25 M de $CaCl_2$ foi adicionada em gotas. A borbulhagem continuou por aproximadamente 5 segundos após a adição da gota final de DNA. A solução foi então incubada à temperatura ambiente por até 20 minutos antes de ser adicionada às células 293A. 250 µL da solução de DNA/fosfato de cálcio foram adicionados gota a gota a uma monocamada de células 293A que tinham sido semeadas um dia antes a 10^6 células por poço de uma placa de 6 poços. As células foram devolvidas à incubadora e incubadas durante a noite. O meio foi trocado 24h depois. Após 72h, as células foram divididas 1:6 em uma placa de 6 poços. As

monocamadas foram monitoradas diariamente por microscopia de luz para evidências de efeito citopático (CPE). 7-10 dias após a transfecção as placas virais foram observadas e a monocamada colhida pipetando o meio nos poços para levantar as células. As células e meios colhidos foram transferidos para um tubo de centrífuga de 50 mL seguido por três rodadas de congelamento e descongelamento (a -80 ° C e 37 ° C). O lisado subsequente, denominado estoque de vírus primário, foi clarificado por centrifugação em velocidade total em uma centrífuga de bancada (4300Xg) e uma proporção do lisado 10-50%) usada para infectar células 293A em um frasco T25. As células infectadas foram incubadas por 48h antes da colheita das células e do meio no CPE completo. As células foram mais uma vez colhidas, congeladas, descongeladas e clarificadas antes de usar este estoque viral secundário para infectar um frasco T150 semeado a 1,5x 10^7 células por frasco. Uma vez que o CPE completo foi alcançado em 72h, o meio e as células foram colhidos e tratados como estoques virais anteriores para gerar um estoque terciário.

Produção em células 293F

[479] A produção do vírus ChAdV68 foi realizada em células 293F cultivadas em meio 293 FreeStyle™ (ThermoFisher) em uma incubadora a 8% de $C0_2$. No dia da infecção as células foram diluídas para 10^6 células por mL, com viabilidade de 98% e 400 mL foram utilizados por corrida de produção em frascos Shake de 1L (Corning). 4 mL do estoque viral terciário com um MOI alvo de > 3,3 foram usados por infecção. As células foram incubadas durante 48-72h até a viabilidade ser < 70% medida pelo azul de Tripano. As células infectadas foram então colhidas por centrifugação,

centrifugação de bancada de alta velocidade e lavadas em 1XPBS, re-centrifugadas e então ressuspensas em 20 mL de Tris 10 mM pH 7,4. O sedimento celular foi lisado por congelamento e descongelamento 3X e clarificado por centrifugação a 4.300Xg por 5 minutos.

Purificação por centrifugação CsCl

[480] O DNA viral foi purificado por centrifugação em CsCl. Duas execuções de gradiente descontínuo foram realizadas. O primeiro para purificar o vírus dos componentes celulares e o segundo para refinar ainda mais a separação dos componentes celulares e separar as partículas defeituosas das infecciosas.

[481] 10 mL de 1,2 (26,8 g CsCl dissolvido em 92 mL de Tris 10 mM pH 8,0) CsCl foram adicionados aos tubos de polialômero. Em seguida, 8 mL de 1,4 CsCl (53g CsCl dissolvido em 87 mL de Tris 10 mM pH 8,0) foram cuidadosamente adicionados usando uma pipeta distribuída no fundo do tubo. O vírus clarificado foi cuidadosamente colocado em cima da 1,2 camada. Se necessário, mais Tris 10 mM foi adicionado para equilibrar os tubos. Os tubos foram então colocados em um rotor SW-32Ti e centrifugados por 2h 30min a 10^0C. O tubo foi então removido para uma cabine de fluxo laminar e a banda de vírus puxada usando uma agulha de calibre 18 e uma seringa de 10 mL. Foi tomado cuidado para não remover a contaminação do DNA e da proteína da célula hospedeira. A banda foi então diluída pelo menos 2X com Tris 10 mM pH 8,0 e acamada como antes em um gradiente descontínuo como descrito acima. A execução foi realizada conforme descrito antes, exceto que desta vez a execução foi realizada durante a noite. No dia seguinte, a banda foi puxada com

cuidado para evitar puxar qualquer parte da banda de partícula defeituosa. O vírus foi então dialisado usando um cassete Slide-a-LyzerT^{M} (Pierce) contra tampão ARM (Tris 20 mM pH 8,0, NaCl 25 mM, glicerol 2,5%). Isso foi realizado 3X, 1h por troca de tampão. O vírus foi então dividido em alíquotas para armazenamento a -80 °C.

Ensaios virais

[482] A concentração de VP foi realizada usando um ensaio OD 260 com base no coeficiente de extinção de 1,1x 10^{12} partículas virais (VP) é equivalente a um valor de Absorbância de 1 em OD260 nm. Duas diluições (1: 5 e 1:10) de adenovírus foram feitas em um tampão de lise viral (0,1% SDS, 10 mM Tris pH 7,4, EDTA 1 mM). A OD foi medida em duplicata em ambas as diluições e a concentração de VP/mL foi medida multiplicando o valor de OD260 X fator de diluição X 1,1x 10^{12}VP.

[483] Um título de unidade infecciosa (IU) foi calculado por um ensaio de diluição limitante do estoque viral. O vírus foi inicialmente diluído 100X em DMEM/5% NS/1X PS e, em seguida, diluído em diluições de 10 vezes até 1x10^{-7}. 100 µL dessas diluições foram então adicionados a células 293A que foram semeadas pelo menos uma hora antes a 3e5 células/poço de uma placa de 24 poços. Isto foi realizado em duplicata. As placas foram incubadas por 48h em uma incubadora de CO2 (5%) a 37 ^{0}C. As células foram então lavadas com 1XPBS e foram então fixadas com metanol 100% frio (-20 ° C). As placas foram então incubadas a -20 ^{o}C por um mínimo de 20 minutos. Os poços foram lavados com 1XPBS e depois bloqueados em 1XPBS/BSA a 0,1% durante 1 h à temperatura ambiente. Um anticorpo anti-Ad de coelho (Abcam, Cambridge,

MA) foi adicionado a uma diluição de 1: 8.000 em tampão de bloqueio (0,25 ml por poço) e incubado durante 1 h à temperatura ambiente. Os poços foram lavados 4X com 0,5 mL de PBS por poço. Um anticorpo anti-coelho de cabra conjugado com HRP (Bethyl Labs, Montgomery Texas) diluído 1.000X foi adicionado por poço e incubado por 1h antes de uma rodada final de lavagem. 5 lavagens de PBS foram realizadas e as placas foram desenvolvidas usando substrato DAB (tetrahidrocloreto de diaminobenzidina) em solução salina tamponada com Tris (0,67 mg/mL DAB em 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl) com 0,01% de H_2O_2. Os poços foram desenvolvidos por 5 minutos antes da contagem. As células foram contadas sob uma objetiva de 10X usando uma diluição que deu entre 4-40 células coradas por campo de visão. O campo de visão que foi usado foi uma grade de 0,32 mm^2, dos quais são equivalentes a 625 por campo de visão em uma placa de 24 poços. O número de vírus infecciosos/mL pode ser determinado pelo número de células coradas por grade multiplicado pelo número de grades por campo de visão multiplicado por um fator de diluição 10. Da mesma forma, ao trabalhar com células que expressam GFP fluorescentes podem ser usadas em vez de coloração de capsídeo para determinar o número de vírions que expressam GFP por mL.

Imunizações

[484] Camundongos C57BL/6J fêmeas e camundongos Balb/c fêmeas foram injetados com $1x10^8$ partículas virais (VP) de ChAdV68.5WTnt.MAG25mer em 100 uL de volume, injeção intramuscular bilateral (50 uL por perna).

Dissociação de esplenócitos

[485] O baço e os nódulos linfáticos para cada

camundongo foram reunidos em 3 mL de RPMI completo (RPMI, FBS a 10%, penicilina/estreptomicina). A dissociação mecânica foi realizada usando o dissociador gentleMACS (Miltenyi Biotec), seguindo o protocolo do fabricante. As células dissociadas foram filtradas através de um filtro de 40 mícrons e os glóbulos vermelhos foram lisados com tampão de lise ACK (150mM NH_4Cl, 10mM $KHCO_3$, 0,1mM Na_2EDTA). As células foram filtradas novamente através de um filtro de 30 mícrons e então ressuspensas em RPMI completo. As células foram contadas no citômetro de fluxo Attune NxT (Thermo Fisher) usando coloração com iodeto de propídio para excluir células mortas e apoptóticas. As células foram então ajustadas à concentração apropriada de células vivas para análise subsequente.

Análise ex vivo do immunospot ligado à enzima (ELISPOT)

[486] A análise ELISPOT foi realizada de acordo com as diretrizes de harmonização ELISPOT {DOI: 10.1038/nprot.2015.068} com o kit IFNg ELISpotPLUS de camundongo (MABTECH). $5x10^4$ esplenócitos foram incubados com 10 uM dos peptídeos indicados durante 16 horas em placas revestidas com anticorpo IFNg de 96 poços. Pontos foram desenvolvidos usando fosfatase alcalina. A reação foi cronometrada por 10 minutos e foi finalizada colocando a placa sob água da torneira. Os pontos foram contados usando um AID vSpot Reader Spectrum. Para a análise ELISPOT, os poços com saturação> 50% foram registrados como “numerosos demais para contar”. As amostras com desvio de poços replicados> 10% foram excluídas da análise. As contagens de pontos foram então corrigidas para a confluência do poço usando a fórmula: contagem de pontos + 2 x (contagem de

pontos x %confluência/[100% - %confluência]). O fundo negativo foi corrigido por subtração das contagens de pontos nos poços de estimulação de peptídeo negativo dos poços estimulados com antígeno. Por fim, os poços rotulados como muito numerosos para serem contados foram configurados com o maior valor corrigido observado, arredondado para a centena mais próxima.

XV.B.2. Produção de partículas de entrega viral ChAdV68 após transfecção de DNA

[487] Em um exemplo, o DNA de ChAdV68.4WTnt.GFP (**Fig. 7**) e ChAdV68.5WTnt.GFP **(Fig. 8**) foi transfectado em células HEK293A e a replicação do vírus (placas virais) foi observada 7-10 dias após a transfecção. As placas virais ChAdV68 foram visualizadas usando luz (**Fig. 7A** e **8A**) e microscopia fluorescente (**Fig. 7B-C** e **Fig. 8B-C**). GFP denota a produção produtiva de partículas de entrega viral ChAdV68.

XV.B.3. Expansão de partículas de entrega viral ChAdV68

[488] Em um exemplo, os vírus ChAdV68.4WTnt.GFP, ChAdV68.5WTnt.GFP e ChAdV68.5WTnt.MAG25mer foram expandidos em células HEK293F e um estoque de vírus purificado produzido 18 dias após a transfecção (**Fig. 9**). Partículas virais foram quantificadas nos estoques de vírus ChAdV68 purificados e comparados com adenovírus tipo 5 (Ad5) e ChAdVY25 (um ChAdV intimamente relacionado; Dicks, 2012, PloS ONE 7, e40385) estoques virais produzidos usando o mesmo protocolo. Os títulos virais de ChAdV68 foram comparáveis aos de Ad5 e ChAdVY25 (**Tabela 7**).

Tabela 7. Produção de vetor adenoviral em células em suspensão 293F

Construto	**VP/célula média +/- SD**
Vetores Ad5 (vetores múltiplos)	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.MAG25mer	1,39e3 +/- 1,1e3

* SD é relatado apenas onde várias execuções de produção foram realizadas

XV.B.4. Avaliação de imunogenicidade em modelos de tumor

[489] O vetor C68 que expressa antígenos tumorais de camundongo foi avaliado em estudos de imunogenicidade de camundongo para demonstrar que o vetor C68 induz respostas de células T. As respostas de células T ao epítopo de MHC de classe I SIINFEKL (SEQ ID NO: 72) foram medidas em camundongos C57BL/6J fêmeas e o epítopo de MHC de classe I AH1-A5 (Slansky et al., 2000, Immunity13: 529-538) medido em camundongos Balb/c. Como mostrado na **Fig. 15**, as respostas de células T fortes em relação ao controle foram medidas após a imunização de camundongos com ChAdV68.5WTnt.MAG25mer. Respostas imunes celulares médias de 8957 ou 4019 células formadoras de ponto (SFCs) por 10^6 esplenócitos foram observadas em ensaios ELISpot quando camundongos C57BL/6J ou Balb/c foram imunizados com ChAdV68.5WTnt.MAG25mer, respectivamente, 10 dias após a imunização.

[490] Linfócitos infiltrantes de tumor também foram avaliados em modelo de tumor CT26 avaliando ChAdV e coadministração de um anticorpo anti-CTLA4. Os camundongos foram implantados com células tumorais CT26 e 7 dias após a implantação, foram imunizados com vacina ChAdV e tratados com anticorpo anti-CTLA4 (clone 9D9) ou IgG como controle.

Os linfócitos infiltrantes do tumor foram analisados 12 dias após a imunização. Os tumores de cada camundongo foram dissociados usando o dissociador gentleMACS (Miltenyi Biotec) e o kit de dissociação de tumor de camundongo (Miltenyi Biotec). As células dissociadas foram filtradas através de um filtro de 30 mícrons e ressuspensas em RPMI completo. As células foram contadas no citômetro de fluxo Attune NxT (Thermo Fisher) usando coloração com iodeto de propídio para excluir células mortas e apoptóticas. As células foram então ajustadas à concentração apropriada de células vivas para análise subsequente. As células específicas do antígeno foram identificadas por complexos MHC-tetrâmero e co-coradas com anti-CD8 e um marcador de viabilidade. Os tumores foram colhidos 12 dias após a imunização primária.

[491] As células T CD8+ específicas do antígeno dentro do tumor constituíram uma mediana de 3,3%, 2,2% ou 8,1% da população total de células vivas em grupos tratados com ChAdV, anti-CTLA4 e ChAdV + anti-CTLA4, respectivamente (**Fig. 41** e **Tabela 40**). O tratamento com anti-CTLA em combinação com imunização ChAdV ativa resultou em um aumento estatisticamente significativo na frequência de células T CD8+ específicas do antígeno em relação a ChAdV sozinho e anti-CTLA4 sozinho demonstrando anti-CTLA4, quando coadministrado com a vacina ChAdV68, aumentou o número de células T infiltradas dentro de um tumor.

Tabela 40 - Frequências de células T CD8 infiltrantes de tetrâmero + em tumores CT26

Tratamento	% de tetrâmero+ mediana
ChAdV68.5WTnt.MAG25mer (ChAdV)	3,3
Anti-CTLA4	2,2
ChAdV68.5WTnt.MAG25mer (ChAdV) + anti-CTLA4	8,1

XVI. Vetor de entrega de cassete de antígeno de alfavírus

XVI.A. Materiais e métodos de avaliação de vetores de entrega de alfavírus

Transcrição in vitro para gerar RNA

[492] ***Para teste in vitro***: o DNA de plasmídeo foi linearizado por digestão de restrição com PmeI, purificado em coluna seguindo o protocolo do fabricante (GeneJet DNA cleanup kit, Thermo) e usado como molde. A transcrição*in vitro* foi realizada usando o Sistema de produção de RNA em grande escala RiboMAX (Promega) com o análogo cap m^7G (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante. O mRNA foi purificado usando o kit RNeasy (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante.

[493] ***Para estudos in vivo***: o RNA foi gerado e purificado por TriLink Biotechnologies e coberto com Enzymatic Cap1.

Transfecção de RNA

[494] As células HEK293A foram semeadas em células 6e4/poço para 96 poços e células 2e5/poço para 24 poços, ~ 16 horas antes da transfecção. As células foram transfectadas com mRNA usando MessengerMAX lipofectamina (Invitrogen) e seguindo o protocolo do fabricante. Para 96 poços, 0,15 uL de lipofectamina e 10 ng de mRNA foram usados por poço, e para 24 poços, 0,75 uL de lipofectamina e 150 ng de mRNA foram usados por poço. Um GFP expressando mRNA (TriLink Biotechnologies) foi usado como um controle de transfecção.

Ensaio de luciferase

[495] O ensaio de repórter de luciferase foi realizado em placas de 96 poços de paredes brancas com cada condição em triplicata usando o ensaio de luciferase ONE-Glo (Promega) seguindo o protocolo do fabricante. A luminescência foi medida usando o SpectraMax.

qRT-PCR

[496] As células transfectadas foram lavadas e substituídas por meio fresco 2 horas após a transfecção para remover qualquer mRNA não transfectado. As células foram então colhidas em vários pontos de tempo em RLT mais tampão de lise (Qiagen), homogeneizadas usando um QiaShredder (Qiagen) e o RNA foi extraído usando o kit RNeasy (Qiagen), tudo de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA total foi quantificado usando um Nanodrop (Thermo Scientific). O qRT-PCR foi realizado usando o kit Quantitect Probe One-Step RT-PCR (Qiagen) no qTower^3 (Analytik Jena) de acordo com o protocolo do fabricante, usando 20 ng de RNA total por reação. Cada amostra foi executada em triplicata para cada sonda. Actina ou GusB foram usados como genes de referência. Primer/sondas personalizados foram gerados por IDT (**Tabela 8**).

Tabela 8: iniciadores/sondas qPCR

Alvo		
Luci	Iniciador1	GTGGTGTGCAGCGAGAATAG
	Iniciador2	CGCTCGTTGTAGATGTCGTTAG
	Sonda	/56-FAM/TTGCAGTTC/ZEN/TTCATGCCCGTGTTG/3IABkFQ/
GusB	Iniciador1	GTTTTTGATCCAGACCCAGATG
	Iniciador2	GCCCATTATTCAGAGCGAGTA
	Sonda	/56-FAM/TGCAGGGTT/ZEN/TCACCAGGATCCAC/3IABkFQ/
ActB	Iniciador1	CCTTGCACATGCCGGAG
	Iniciador2	ACAGAGCCTCGCCTTTG
	Sonda	/56-FAM/TCATCCATG/ZEN/GTGAGCTGGCGG/3IABkFQ/
MAG-25mer	Iniciador1	CTGAAAGCTCGGTTTGCTAATG
Conjunto1	Iniciador2	CCATGCTGGAAGAGACAATCT
	Sonda	/56-FAM/CGTTTCTGA/ZEN/TGGCGCTGACCGATA/3IABkFQ/
MAG-25mer	Iniciador1	TATGCCTATCCTGTCTCCTCTG
Conjunto2	Iniciador2	GCTAATGCAGCTAAGTCCTCTC
	Sonda	/56-FAM/TGTTTACCC/ZEN/TGACCGTGCCTTCTG/3IABkFQ/

Modelo de tumor B16-OVA

[497] Camundongos C57BL/6J foram injetados no flanco abdominal esquerdo inferior com 10^5 células B16-OVA/animal. Os tumores cresceram durante 3 dias antes da imunização.

Modelo de tumor CT26

[498] Camundongos Balb/c foram injetados no flanco abdominal esquerdo inferior com 10^6 células CT26/animal. Os tumores cresceram naturalmente durante 7 dias antes da imunização.

Imunizações

[499] Para a vacina de srRNA, os camundongos foram injetados com 10 ug de RNA em um volume de 100 uL, injeção intramuscular bilateral (50 uL por perna). Para a vacina Ad5, os camundongos foram injetados com $5x10^{10}$ partículas virais (VP) em um volume de 100 uL, injeção intramuscular bilateral (50 uL por perna). Os animais foram injetados com

anti-CTLA-4 (clone 9D9, BioXcell), anti-PD-1 (clone RMP1-14, BioXcell) ou anti-IgG (clone MPC-11, BioXcell), dose de 250 ug, 2 vezes por semana , via injeção intraperitoneal.

Imagem bioluminescente in vivo

[500] Em cada ponto de tempo, os camundongos foram injetados com 150 mg/kg de substrato de luciferina via injeção intraperitoneal e a bioluminescência foi medida usando o sistema de imagem IVIS In vivo (PerkinElmer) 10-15 minutos após a injeção.

Dissociação de esplenócitos

[501] O baço e os nódulos linfáticos para cada camundongo foram reunidos em 3 mL de RPMI completo (RPMI, FBS a 10%, penicilina/estreptomicina). A dissociação mecânica foi realizada usando o dissociador gentleMACS (Miltenyi Biotec), seguindo o protocolo do fabricante. As células dissociadas foram filtradas através de um filtro de 40 mícrons e os glóbulos vermelhos foram lisados com tampão de lise ACK (150mM NH_4Cl, 10mM $KHCO_3$, 0,1mM Na_2EDTA). As células foram filtradas novamente através de um filtro de 30 mícrons e então ressuspensas em RPMI completo. As células foram contadas no citômetro de fluxo Attune NxT (Thermo Fisher) usando coloração com iodeto de propídio para excluir células mortas e apoptóticas. As células foram então ajustadas à concentração apropriada de células vivas para análise subsequente.

Análise ex vivo do immunospot ligado à enzima (ELISPOT)

[502] A análise ELISPOT foi realizada de acordo com as diretrizes de harmonização ELISPOT {DOI: 10.1038/nprot.2015.068} com o kit IFNg ELISpotPLUS de camundongo (MABTECH). $5x10^4$ esplenócitos foram incubados com

10 uM dos peptídeos indicados durante 16 horas em placas revestidas com anticorpo IFNg de 96 poços. Pontos foram desenvolvidos usando fosfatase alcalina. A reação foi cronometrada por 10 minutos e foi finalizada colocando a placa sob água da torneira. Os pontos foram contados usando um AID vSpot Reader Spectrum. Para a análise ELISPOT, os poços com saturação> 50% foram registrados como "numerosos demais para contar". As amostras com desvio de poços replicados> 10% foram excluídas da análise. As contagens de pontos foram então corrigidas para a confluência do poço usando a fórmula: contagem de pontos + 2 x (contagem de pontos x %confluência/[100% - %confluência]). O fundo negativo foi corrigido por subtração das contagens de pontos nos poços de estimulação de peptídeo negativo dos poços estimulados com antígeno. Por fim, os poços rotulados como muito numerosos para serem contados foram configurados com o maior valor corrigido observado, arredondado para a centena mais próxima.

XVI.B. Vetor de alfavírus

XVI.B.1. Avaliação *in vitro* do vetor alfavírus

[503] Em uma implementação da presente invenção, um esqueleto de RNA de alfavírus para o sistema de expressão de antígeno foi gerado a partir de um vetor de RNA auto-replicante (srRNA) baseado em Encefalite Equina Venezuelana (VEE) (Kinney, 1986, Virology 152: 400-413). Em um exemplo, as sequências que codificam as proteínas estruturais de VEE localizadas a 3' do promotor subgenômico 26S foram deletadas (sequências de VEE 7544 a 11.175 deletadas; numeração baseada em Kinney *et al* 1986; SEQ ID NO: 6) e substituídos por sequências de antígeno (SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO: 4) ou um

repórter de luciferase (por exemplo, VEE-Luciferase, SEQ ID NO: 15) (**Fig. 10**). O RNA foi transcrito a partir do vetor de DNA srRNA *in vitro*, transfectado em células HEK293A e a expressão do repórter de luciferase foi medida. Além disso, um mRNA (não replicante) que codifica a luciferase foi transfectado para comparação. Um aumento de ~ 30.000 vezes no sinal repórter srRNA foi observado para o srRNA VEE-Luciferase ao comparar a medição de 23 horas versus a medição de 2 horas (**Tabela 9**). Em contraste, o repórter de mRNA exibiu um aumento de menos de 10 vezes no sinal durante o mesmo período de tempo (**Tabela 9**).

Tabela 9: A expressão da luciferase do vetor auto-replicante de VEE aumenta ao longo do tempo. Células HEK293A transfectadas com 10 ng de srRNA de VEE-Luciferase ou 10 ng de mRNA de luciferase não replicante (TriLink L-6307) por poço em 96 poços. A luminescência foi medida em vários momentos após a transfecção. A expressão da luciferase é relatada como unidades de luminescência relativa (RLU). Cada ponto de dados é a média +/- SD de 3 poços transfectados.

Construto	Ponto de tempo (h)	RLU médio	Desv. padrão (poços em triplicata)
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

[504] Em outro exemplo, a replicação do srRNA foi confirmada diretamente medindo os níveis de RNA após a transfecção do srRNA que codifica a luciferase (VEE-Luciferase) ou um srRNA que codifica um cassete multiepítopo

(VEE-MAG25mer) usando a reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa (qRT-PCR). Um aumento de ~ 150 vezes no RNA foi observado para o srRNA de VEE-luciferase (**Tabela 10**), enquanto um aumento de 30-50 vezes no RNA foi observado para o VEE-MAG25mer srRNA (**Tabela 11**). Estes dados confirmam que os vetores VEE srRNA replicam quando transfectados em células.

Tabela 10: Medição direta da replicação de RNA em células transfectadas com srRNA de VEE-Luciferase . Células HEK293A transfectadas com srRNA de VEE-Luciferase (150 ng por poço, 24 poços) e níveis de RNA quantificados por qRT-PCR em vários momentos após a transfecção. Cada medição foi normalizada com base no gene de referência da Actina e o número de vezes de alteração em relação ao ponto de tempo de 2 horas é apresentada.

Ponto de tempo (h)	**Luciferase Ct**	**Actina Ct**	**dCt**	**Ref dCt**	**ddCt**	**Número de vezes de alteração relativa**
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

Tabela 11: Medição direta da replicação de RNA em células transfectadas com VEE-MAG25mer srRNA. Células HEK293 transfectadas com VEE-MAG25mer srRNA (150 ng por poço, 24 poços) e níveis de RNA quantificados por qRT-PCR em vários momentos após a transfecção. Cada medição foi normalizada com base no gene de referência GusB e o número de vezes de alteração em relação ao ponto de tempo de 2 horas é apresentada. Linhas diferentes no gráfico representam 2 conjuntos de iniciador/sonda qPCR diferentes, sendo que ambos detectam a região do cassete de epítopo do srRNA.

Iniciador/ sonda	Ponto de tempo (h)	Ct	GusB Ct	dCt	Ref dCt	ddCt	Número de vezes da alteração relativa
Conjunto1	2	18,96	22,41	-3,45	-3,45	0,00	1,00
Conjunto1	4	17,46	22,27	-4,81	-3,45	-1,37	2,58
Conjunto1	6	14,87	22,04	-7,17	-3,45	-3,72	13,21
Conjunto1	8	14,16	22,19	-8,02	-3,45	-4,58	23,86
Conjunto1	24	13,16	22,01	-8,86	-3,45	-5,41	42,52
Conjunto1	36	13,53	22,63	-9,10	-3,45	-5,66	50,45
Conjunto2	2	17,75	22,41	-4,66	-4,66	0,00	1,00
Conjunto2	4	16,66	22,27	-5,61	-4,66	-0,94	1,92
Conjunto2	6	14,22	22,04	-7,82	-4,66	-3,15	8,90
Conjunto2	8	13,18	22,19	-9,01	-4,66	-4,35	20,35
Conjunto2	24	12,22	22,01	-9,80	-4,66	-5,13	35,10
Conjunto2	36	13,08	22,63	-9,55	-4,66	-4,89	29,58

XVI.B.2. Avaliação *in vivo* do vetor de alfavírus

[505] Em outro exemplo, a expressão do repórter VEE-Luciferase foi avaliada *in vivo*. Os camundongos foram injetados com 10 ug de srRNA de VEE-Luciferase encapsulado em nanopartículas de lipídio (MC3) e fotografados em 24 e 48 horas e 7 e 14 dias após a injeção para determinar o sinal bioluminescente. O sinal da luciferase foi detectado 24 horas após a injeção e aumentou ao longo do tempo e pareceu atingir o pico 7 dias após a injeção de srRNA (**Fig. 11**).

XVI.B.3. Avaliação do modelo de tumor de vetor de alfavírus

[506] Em uma implementação, para determinar se o vetor VEE srRNA direciona respostas imunes específicas do antígeno *in vivo*, um vetor VEE srRNA foi gerado (VEE-UbAAY, SEQ ID NO: 14) que expressa 2 epítopos de tumor de camundongo de MHC de classe I diferentes, SIINFEKL (SEQ ID NO: 72) e AH1-A5 (Slansky et al., 2000, Immunity 13: 529-538). O epítopo de SFL (SIINFEKL (SEQ ID NO: 72)) é expresso pela linha celular de melanoma B16-OVA e o epítopo de AH1-A5 (SPSYAYHQF

(SEQ ID NO: 73); Slansky et al., 2000, Immunity) induz células T direcionadas a um epítopo relacionado (AH1/SPSYVYHQF (SEQ ID NO: 193); Huang et al. ., 1996, Proc Natl Acad Sci USA 93: 9730-9735) que é expresso pela linha de células de carcinoma do cólon CT26. Em um exemplo, para estudos *in vivo* , VEE-UbAAY srRNA foi gerado por transcrição *in vitro* usando polimerase T7 (TriLink Biotechnologies) e encapsulado em uma nanopartícula de lipídio (MC3).

[507] Uma forte resposta de célula T específica de antígeno direcionada a SFL, em relação ao controle, foi observada duas semanas após a imunização de camundongos com tumor B16-OVA com MC3 formulado VEE-UbAAY srRNA. Em um exemplo, uma mediana de 3835 células formadoras de manchas (SFC) por 10^6 esplenócitos foi medida após a estimulação com o peptídeo SFL em ensaios ELISpot (**Fig. 12A**, **Tabela 12**) e 1,8% (mediana) das células T CD8 eram específicas do antígeno SFL conforme medido por coloração com pentâmero (**Fig. 12B**, **Tabela 12**). Em outro exemplo, a coadministração de um anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 (mAb) com a vacina VEE srRNA resultou em um aumento moderado nas respostas gerais de células T com uma mediana de 4794,5 SFCs por 10^6 esplenócitos medidos no ensaio ELISpot (**Fig. 12A**, **Tabela 12**).

Tabela 12. Resultados de ensaios de coloração de ELISPOT e MHCI-pentâmero 14 dias após a imunização de srRNA de VEE em camundongos C57BL/6J portadores de tumor B16-OVA.

Grupo	Camundongo	SFC/1e6 Esplenócitos	Pentâmero positivo (% de CD8)	Grupo	Camundongo	SFC/1e6 Esplenócitos	Pentâmero positivo (% de CD8)
Comtrole	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

** Observe que os resultados do camundongo # 6 no grupo Vax foram excluídos da análise devido à alta variabilidade entre os poços em triplicata.*

[508] Em outra implementação, para espelhar uma abordagem clínica, uma iniciação/reforço heterólogo nos modelos de tumor de camundongo B16-OVA e CT26 foi realizado, onde camundongos com tumor foram imunizados primeiro com vetor adenoviral expressando o mesmo cassete de antígeno (Ad5-UbAAY), seguido por uma imunização de reforço com a vacina VEE-UbAAY srRNA 14 dias após a iniciação de Ad5-UbAAY. Em um exemplo, uma resposta imune específica do antígeno foi induzida pela vacina Ad5-UbAAY resultando em 7330 (mediana) SFCs por 10^6 esplenócitos medidos no ensaio ELISpot (**Fig. 13A, Tabela 13**) e 2,9% (mediana) de células T CD8 direcionadas ao antígeno SFL conforme medido por coloração com pentâmero (**Fig. 13C, Tabela 13**). Em outro exemplo, a resposta de células T foi mantida 2 semanas após o reforço de srRNA VEE-UbAAY no modelo B16-OVA com 3960 (mediana) SFCs específicos de SFL por 10^6 esplenócitos medidos no ensaio ELISpot (**Fig. 13B, Tabela 13**) e 3,1% (mediana) de células T CD8 direcionadas ao antígeno SFL conforme medido por coloração com pentâmero (**Fig. 13D, Tabela 13**).

Tabela 13: Monitoramento imunológico de camundongos B16-OVA após iniciação/reforço heterólogo com iniciação de vacina Ad5 e reforço de srRNA.

Dia 14

Grupo	Camundongo	SFC/1e6 Esplenócitos	Pentâmero positivo (% de CD8)	Grupo	Camundongo	SFC/1e6 Esplenócitos	Pentâmero positivo (% de CD8)
Controle	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				

Dia 28

Grupo	Camundongo	SFC/1e6 Esplenócitos	Pentâmero positivo (% de CD8)	Grupo	Camundongo	SFC/1e6 Esplenócitos	Pentâmero positivo (% de CD8)

Controle	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				

[509] Em outra implementação, resultados semelhantes foram observados após um aumento de srRNA Ad5-UbAAY e VEE-UbAAY srRNA no modelo de camundongo CT26. Em um exemplo, uma resposta específica do antígeno AH1 foi observada após a iniciação com Ad5-UbAAY (dia 14) com uma média de 5187 SFCs por 10^6 esplenócitos medidos no ensaio ELISpot (**Fig. 14A, Tabela 14**) e 3799 SFCs por 10^6 esplenócitos medidos no ensaio ELISpot após o reforço de srRNA VEE-UbAAY (dia 28) (**Fig.**14B, **Tabela 14**).

Tabela 14 Monitoramento imunológico após iniciação/reforço heterólogo em modelo de camundongo com tumor CT26.

Dia 12 **Dia 21**

Grupo	**Camundongo**	**SFC/1e6 Esplenócitos**	**Grupo**	**Camundongo**	**SFC/1e6 Esplenócitos**
Controle	1	1799	Controle	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

XVII. Avaliação do modelo de tumor de combinação ChAdV/srRNA

[510] Vários protocolos de dosagem usando ChAdV68 e RNA auto-replicante (srRNA) foram avaliados em modelos de tumor CT26 murino.

XVII.A Métodos e materiais de avaliação de modelo de tumor de combinação de ChAdV/srRNA

Injeção de tumor

[511] Camundongos Balb/c foram injetados com a linha de células tumorais CT26. 7 dias após a injeção de células tumorais, os camundongos foram randomizados para os diferentes braços do estudo (28-40 camundongos por grupo) e o tratamento foi iniciado. Camundongos Balb/c foram injetados no flanco abdominal esquerdo inferior com 10^6 células CT26/animal. Os tumores cresceram naturalmente durante 7 dias antes da imunização. Os braços do estudo são descritos em detalhes na **Tabela 15**.

Tabela 15 - Braços de estudo de avaliação de modelo de tumor de combinação ChAdV/srRNA

Grupo	N	Tratamento	Dose	Volume	Cronograma	Via
1	40	Controle ChAdV68	1e11 vp	2x 50 uL	dia 0	IM
		controle srRNA	10 ug	50 uL	dia 14, 28, 42	IM
		Anti-PD1	250 ug	100 uL	2x/semana (dia inicial 0)	IP
2	40	Controle ChAdV68	1e11 vp	2x 50 uL	dia 0	IM
		controle srRNA	10 ug	50 uL	dia 14, 28, 42	IM
		Anti-IgG	250 ug	100 uL	2x/semana (dia inicial 0)	IP
3	28	Vacina ChAdV68	1e11 vp	2x 50 uL	dia 0	IM
		vacina srRNA	10 ug	50 uL	dia 14, 28, 42	IM
		Anti-PD1	250 ug	100 uL	2x/semana (dia inicial 0)	IP
4	28	Vacina ChAdV68	1e11 vp	2x 50 uL	dia 0	IM
		vacina srRNA	10 ug	50 uL	dia 14, 28, 42	IM
		Anti-IgG	250 ug	100 uL	2x/semana (dia inicial 0)	IP
5	28	vacina srRNA	10 ug	50 uL	dia 0, 28, 42	IM
		Vacina ChAdV68	1e11 vp	2x 50 uL	dia 14	IM
		Anti-PD1	250 ug	100 uL	2x/semana (dia inicial 0)	IP
6	28	vacina srRNA	10 ug	50 uL	dia 0, 28, 42	IM
		Vacina ChAdV68	1e11 vp	2x 50 uL	dia 14	IM
		Anti-IgG	250 ug	100 uL	2x/semana (dia inicial 0)	IP
7	40	vacina srRNA	10 ug	50 uL	dia 0, 14, 28, 42	IM
		Anti-PD1	250 ug	100 uL	2x/semana (dia inicial 0)	IP
8	40	vacina srRNA	10 ug	50 uL	dia 0, 14, 28, 42	IM
		Anti-IgG	250 ug	100 uL	2x/semana (dia inicial 0)	IP

Imunizações

[512] Para a vacina de srRNA, os camundongos foram injetados com 10 ug de VEE-MAG25mer srRNA em um volume de 100 uL, injeção intramuscular bilateral (50 uL por perna). Para a vacina C68, os camundongos foram injetados com $1x10^{11}$ partículas virais (VP) de ChAdV68.5WTnt.MAG25mer em 100 uL de volume, injeção intramuscular bilateral (50 uL por perna). Os animais foram injetados com anti-PD-1 (clone RMP1-14, BioXcell) ou anti-IgG (clone MPC-11, BioXcell), dose de 250 ug, 2 vezes por semana , via injeção intraperitoneal.

Dissociação de esplenócitos

[513] O baço e os nódulos linfáticos para cada camundongo foram reunidos em 3 mL de RPMI completo (RPMI, FBS a 10%, penicilina/estreptomicina). A dissociação mecânica foi realizada usando o dissociador gentleMACS (Miltenyi Biotec), seguindo o protocolo do fabricante. As células dissociadas foram filtradas através de um filtro de 40 mícrons e os glóbulos vermelhos foram lisados com tampão de lise ACK (150mM NH_4Cl, 10mM $KHCO_3$, 0,1mM Na_2EDTA). As células foram filtradas novamente através de um filtro de 30 mícrons e então ressuspensas em RPMI completo. As células foram contadas no citômetro de fluxo Attune NxT (Thermo Fisher) usando coloração com iodeto de propídio para excluir células mortas e apoptóticas. As células foram então ajustadas à concentração apropriada de células vivas para análise subsequente.

Análise ex vivo do immunospot ligado à enzima (ELISPOT)

[514] A análise ELISPOT foi realizada de acordo com as diretrizes de harmonização ELISPOT {DOI: 10.1038/nprot.2015.068} com o kit IFNg ELISpotPLUS de

camundongo (MABTECH). $5x10^4$ esplenócitos foram incubados com 10 uM dos peptídeos indicados durante 16 horas em placas revestidas com anticorpo IFNg de 96 poços. Pontos foram desenvolvidos usando fosfatase alcalina. A reação foi cronometrada por 10 minutos e foi finalizada colocando a placa sob água da torneira. Os pontos foram contados usando um AID vSpot Reader Spectrum. Para a análise ELISPOT, os poços com saturação> 50% foram registrados como "numerosos demais para contar". As amostras com desvio de poços replicados> 10% foram excluídas da análise. As contagens de pontos foram então corrigidas para a confluência do poço usando a fórmula: contagem de pontos + 2 x (contagem de pontos x %confluência/[100% - %confluência]). O fundo negativo foi corrigido por subtração das contagens de pontos nos poços de estimulação de peptídeo negativo dos poços estimulados com antígeno. Por fim, os poços rotulados como muito numerosos para serem contados foram configurados com o maior valor corrigido observado, arredondado para a centena mais próxima.

XVII.B Avaliação de combinação deChAdV/srRNA em um modelo de tumor CT26

[515] A imunogenicidade e a eficácia das vacinas de iniciação/reforço heteróloga de ChAdV68.5WTnt.MAG25mer/VEE-MAG25mer srRNA ou iniciação/reforço homóloga de VEE-MAG25mer srRNA foram avaliadas no modelo de tumor de camundongo CT26. Camundongos Balb/c foram injetados com a linha de células tumorais CT26. 7 dias após a injeção de células tumorais, os camundongos foram randomizados para os diferentes braços do estudo e o tratamento foi iniciado. Os braços do estudo são descritos em detalhes na **Tabela 15** e, de forma mais geral,

na **Tabela 16.**

Tabela 16 - Braços de estudo de dose de iniciação/reforço

Grupo	Iniciação	Reforço
1	Controle	Controle
2	Controle + anti-PD-1	Controle + anti-PD-1
3	ChAdV68.5WTnt.MAG25mer	VEE-MAG25mer srRNA
4	ChAdV68.5WTnt.MAG25mer + anti-PD-1	VEE-MAG25mer srRNA + anti-PD-1
5	VEE-MAG25mer srRNA	ChAdV68.5WTnt.MAG25mer
6	VEE-MAG25mer srRNA + anti-PD-1	ChAdV68.5WTnt.MAG25mer + anti-PD-1
7	VEE-MAG25mer srRNA	VEE-MAG25mer srRNA
8	VEE-MAG25mer srRNA + anti-PD-1	VEE-MAG25mer srRNA + anti-PD-1

[516] Os baços foram colhidos 14 dias após a vacinação de iniciação para monitoramento imunológico. As medições do tumor e do peso corporal foram feitas duas vezes por semana e a sobrevivência foi monitorada. Fortes respostas imunológicas em relação ao controle foram observadas em todos os grupos de vacinas ativas.

[517] Respostas imunes celulares médias de 10.630, 12.976, 3319 ou 3745 células formadoras de pontos (SFCs) por 10^6 esplenócitos foram observadas em ensaios ELISpot em camundongos imunizados com ChAdV68.5WTnt.MAG25mer (ChAdV/grupo 3), ChAdV68.5WTnt.MAG25mer + anti -PD-1 (ChAdV + PD-1/grupo 4), VEE-MAG25mer srRNA (srRNA/mediana para os grupos 5 e 7 combinados) ou VEE-MAG25mer srRNA + anti-PD-1 (srRNA + PD-1/mediana para os grupos 6 e 8 combinados), respectivamente, 14 dias após a primeira imunização (**Fig. 16** e **Tabela 17**). Em contraste, o controle da vacina (grupo 1) ou controle da vacina com anti-PD-1 (grupo 2) exibiu respostas imunes celulares medianas de 296 ou 285 SFC por 10^6 esplenócitos, respectivamente.

Tabela 17 - Respostas imunes celulares em um modelo de tumor CT26

Tratamento	**SFC mediana/10^6 esplenócitos**
Controle	296
PD1	285
ChAdV68.5WTnt.MAG25mer (ChAdV)	10630
ChAdV68.5WTnt.MAG25mer + PD1 (ChAdV + PD-1)	12976
VEE-MAG25mer srRNA (srRNA)	3319
VEE-MAG25mer srRNA + PD-1 (srRNA + PD1)	3745

[518] Consistente com os dados de ELISpot, 5,6, 7,8, 1,8 ou 1,9% das células T CD8 (mediana) exibiram respostas específicas do antígeno em análises de coloração de citocina intracelular (ICS) para camundongos imunizados com ChAdV68.5WTnt.MAG25mer (ChAdV/grupo 3), ChAdV68.5WTnt.MAG25mer + anti-PD-1 (ChAdV + PD-1/grupo 4), VEE-MAG25mer srRNA (srRNA/mediana para os grupos 5 e 7 combinados), ou VEE-MAG25mer srRNA + anti-PD-1 (srRNA + PD-1/mediana para os grupos 6 e 8 combinados), respectivamente, 14 dias após a primeira imunização (**Fig. 17** e **Tabela 18**). Os camundongos imunizados com o controle de vacina ou controle de vacina combinado com anti-PD-1 mostraram respostas de CD8 específicas para o antígeno de 0,2 e 0,1%, respectivamente.

Tabela 18 - Respostas de células T CD8 em um modelo de tumor CT26

Tratamento	**% de CD8 IFN-gama positivo média**
Controle	0,21
PD1	0,1
ChAdV68.5WTnt.MAG25mer (ChAdV)	5,6
ChAdV68.5WTnt.MAG25mer + PD1 (ChAdV + PD-1)	7,8
VEE-MAG25mer srRNA (srRNA)	1,8
VEE-MAG25mer srRNA + PD-1 (srRNA + PD1)	1,9

[519] O crescimento do tumor foi medido no modelo de tumor do cólon CT26 para todos os grupos, e o crescimento do tumor até 21 dias após o início do tratamento (28 dias após a injeção de células tumorais CT-26) é apresentado. Os camundongos foram sacrificados 21 dias após o início do tratamento com base em grandes tamanhos de tumor (> 2500 mm^3); portanto, apenas os primeiros 21 dias são apresentados para evitar viés analítico. Os volumes médios do tumor em 21 dias foram 1129, 848, 2142, 1418, 2198 e 1606 mm^3 para ChAdV68.5WTnt.MAG25mer iniciação/VEE-MAG25mer srRNA reforço (grupo 3), ChAdV68.5WTnt.MAG25mer iniciação/VEE-MAG25mer srRNA reforço + anti-PD-1 (grupo 4), VEE-MAG25mer srRNA iniciação/ChAdV68.5WTnt.MAG25mer reforço (grupo 5), VEE-MAG25mer srRNA iniciação/ChAdV68.5WTnt.MAG25mer reforço + anti-PD-1 (grupo 6), VEE-MAG25mer srRNA iniciação/VEE-MAG25mer srRNA iniciação (grupo 7) e VEE-MAG25mer srRNA iniciação/VEE-MAG25mer srRNA iniciação + anti-PD-1 (grupo 8), respectivamente (**Fig. 18** e **Tabela 19**). Os volumes médios do tumor no controle da vacina ou no controle da vacina combinada com anti-PD-1 foram 2361 ou 2067 mm^3, respectivamente. Com base nesses dados, o tratamento da

vacina com ChAdV68.5WTnt.MAG25mer/VEE-MAG25mer srRNA (grupo 3), ChAdV68.5WTnt.MAG25mer/VEE-MAG25mer srRNA + anti-PD-1 (grupo 4), VEE-MAG25mer srRNA/ChAdV68.5WTnt.MAG25mer + anti-PD-1 (grupo 6) e VEE-MAG25mer srRNA/VEE-MAG25mer srRNA + anti-PD-1 (grupo 8) resultou em uma redução do crescimento do tumor em 21 dias que foi significativamente diferente do controle (grupo 1).

Tabela 19 - Tamanho do tumor no dia 21 medido no modelo CT26

Tratamento	**Tamanho do tumor (mm^3)**	**SEM**
Controle	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

[520] A sobrevivência foi monitorada por 35 dias após o início do tratamento no modelo de tumor CT-26 (42 dias após a injeção de células tumorais CT-26). Sobrevivência melhorada foi observada após vacinação de camundongos com 4 das combinações testadas. Após a vacinação, 64%, 46%, 41% e 36% dos camundongos sobreviveram com iniciação deChAdV68.5WTnt.MAG25mer/reforço de srRNA VEE-MAG25mer em combinação com anti-PD-1 (grupo 4; P <0,0001 em relação ao grupo de controle 1), iniciação de VEE-MAG25mer srRNA/reforço de VEE-MAG25mer srRNA em combinação com anti-PD-1 (grupo 8; P = 0,0006 em relação ao grupo de controle 1), iniciação de ChAdV68.5WTnt.MAG25mer/reforço de VEE-MAG25mer srRNA (grupo 3 ; P = 0,0003 em relação ao grupo de controle 1) e iniciação de VEE-MAG25mer srRNA /reforço de

ChAdV68.5WTnt.MAG25mer em combinação com anti-PD-1 (grupo 6; P = 0,0016 em relação ao grupo de controle 1), respectivamente (**Fig. 19** e **Tabela 20**). A sobrevivência não foi significativamente diferente do grupo de controle 1 (≤14%) para os grupos de tratamento restantes [iniciação de VEE-MAG25mer srRNA/reforço de ChAdV68.5WTnt.MAG25mer (grupo 5), iniciação de VEE-MAG25mer srRNA/reforço de VEE-MAG25mer srRNA (grupo 7) e anti-PD-1 sozinho (grupo 2)].

Tabela 20 - Sobrevivência no modelo CT26

Ponto no tempo	**Controle**	**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

[521] Em conclusão, ChAdV68.5WTnt.MAG25mer e VEE-MAG25mer srRNA provocaram fortes respostas de células T a antígenos tumorais de camundongo codificados pelas vacinas, em relação ao controle. Administração de uma iniciação de ChAdV68.5WTnt.MAG25mer e reforço de VEE-MAG25mer srRNA com ou sem coadministração de anti-PD-1, iniciação de VEE-MAG25mer srRNA e reforço de ChAdV68.5WTnt.MAG25mer em combinação com anti-PD-1 ou administração de VEE-MAG25mer srRNA como uma imunização de reforço homólogo em combinação com anti-PD-1 para camundongos com tumor resultou em sobrevivência melhorada.

XVIII. Estudos de primatas não humanos

[522] Vários protocolos de dosagem usando ChAdV68 e RNA auto-replicante (srRNA) foram avaliados em primatas não

humanos (NHP).

Materiais e métodos

[523] Uma vacina de iniciação foi injetada intramuscularmente (IM) em cada NHP para iniciar o estudo (iniciação de vacina). Uma ou mais vacinas de reforço (reforço da vacina) também foram injetadas por via intramuscular em cada NHP. As injeções bilaterais por dose foram administradas de acordo com os grupos delineados nas tabelas e resumidos abaixo.

Imunizações

[524] Macacos rhesus indianos Mamu-A * 01 foram imunizados bilateralmente com $1x10^{12}$ partículas virais ($5x10^{11}$ partículas virais por injeção) de ChAdV68.5WTnt.MAG25mer, 30 ug de VEE-MAG25MER srRNA, 100 ug de VEE-MAG25mer srRNA ou 300 ug de VEE- MAG25mer srRNA formulado em LNP-1 ou LNP-2. Aumentos de vacinas de 30 ug, 100 ug ou 300 ug VEE-MAG25mer srRNA foram administrados por via intramuscular no tempo indicado após a vacinação inicial.

Monitoramento imunológico

[525] Os PBMCs foram isolados nos momentos indicados após a vacinação inicial usando meio de separação de linfócitos (LSM, MP Biomedicals) e tubos de separação LeucoSep (Greiner Bio-One) e ressuspensos em RPMI contendo 10% de FBS e penicilina/estreptomicina. As células foram contadas no citômetro de fluxo Attune NxT (Thermo Fisher) usando coloração com iodeto de propídio para excluir células mortas e apoptóticas. As células foram então ajustadas à concentração apropriada de células vivas para análise subsequente. Para cada macaco nos estudos, as respostas das células T foram medidas usando ELISpot ou métodos de

citometria de fluxo. As respostas de células T a 6 epítopos de classe I de macaco rhesus diferentes Mamu-A * 01 codificados nas vacinas foram monitoradas a partir de PBMCs medindo a indução de citocinas, como IFN-gama, usando análise de imunospot ligado a enzima ex vivo (ELISpot). A análise ELISpot foi realizada de acordo com as diretrizes de harmonização ELISPOT {DOI: 10.1038/nprot.2015.068} com o kit IFNg ELISpotPLUS de macaco (MABTECH). 200.000 PBMCs foram incubadas com 10 uM dos peptídeos indicados por 16 horas em placas revestidas com anticorpo IFNg de 96 poços. Pontos foram desenvolvidos usando fosfatase alcalina. A reação foi cronometrada por 10 minutos e foi finalizada colocando a placa sob água da torneira. Os pontos foram contados usando um AID vSpot Reader Spectrum. Para a análise ELISPOT, os poços com saturação> 50% foram registrados como "numerosos demais para contar". As amostras com desvio de poços replicados> 10% foram excluídas da análise. As contagens de pontos foram então corrigidas para a confluência do poço usando a fórmula: contagem de pontos + 2 x (contagem de pontos x %confluência/[100% - %confluência]). O fundo negativo foi corrigido por subtração das contagens de pontos nos poços de estimulação de peptídeo negativo dos poços estimulados com antígeno. Por fim, os poços rotulados como muito numerosos para serem contados foram configurados com o maior valor corrigido observado, arredondado para a centena mais próxima.

[526] Respostas específicas de células T CD4 e CD8 a 6 epítopos de classe I de macaco rhesus diferentes Mamu-A * 01 codificados nas vacinas foram monitoradas a partir de PBMCs medindo a indução de citocinas intracelulares, como

IFN-gama, usando citometria de fluxo. Os resultados de ambos os métodos indicam que as citocinas foram induzidas de uma maneira específica para o antígeno aos epítopos.

Imunogenicidade em macacos rhesus

[527] Este estudo foi projetado para (a) avaliar a imunogenicidade e segurança preliminar de VEE-MAG25mer srRNA 30 µg e 100 µg doses como uma iniciação/reforço homólogo ou iniciação/reforço heterólogo em combinação com ChAdV68.5WTnt.MAG25mer; (b) comparar as respostas imunes de VEE-MAG25mer srRNA em nanopartículas de lipídio usando LNP1 versus LNP2; (c) avaliar a cinética das respostas das células T às imunizações de VEE-MAG25mer srRNA e ChAdV68.5WTnt.MAG25mer.

[528] O braço do estudo foi conduzido em macacos rhesus indianos Mamu-A * 01 para demonstrar imunogenicidade. Os antígenos selecionados usados neste estudo são reconhecidos apenas em macacos Rhesus, especificamente os com um haplótipo de MHC de clase I de Mamu-A * 01. Macacos rhesus indianos Mamu-A * 01 foram randomizados para os diferentes braços do estudo (6 macacos por grupo) e administrados uma injeção IM bilateralmente com vetor ChAdV68.5WTnt.MAG25mer ou VEE-MAG25mer srRNA que codifica antígenos de modelo que inclui múltiplos Mamu-A * 01 epítopos restritos. Os braços do estudo foram descritos abaixo.

Tabela 21: Estudo de imunogenicidade não-GLP em macacos Rhesus indianos

Grupo	Iniciação	Reforço 1	Reforço 2
1	VEE-MAG25mer srRNA -LNP1 (30 µg)	VEE-MAG25mer srRNA -LNP1 (30 µg)	VEE-MAG25mer srRNA -LNP1 (30 µg)
2	VEE-MAG25mer srRNA -LNP1 (100 µg)	VEE-MAG25mer srRNA -LNP1 (100 µg)	VEE-MAG25mer srRNA -LNP1 (100 µg)
3	VEE-MAG25mer srRNA -LNP2 (100 µg)	VEE-MAG25mer srRNA -LNP2 (100 µg)	VEE-MAG25mer srRNA -LNP2 (100 µg)
4	ChAdV68.5WTnt.MAG25mer	VEE-MAG25mer srRNA -LNP1 (100 µg)	VEE-MAG25mer srRNA -LNP1 (100 µg)

[529] PBMCs foram coletadas antes da imunização e nas semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 e 10 após a imunização inicial para monitoramento imunológico.

Resultados

[530] As respostas imunes celulares específicas do antígeno em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram medidas em seis epítopos restritos Mamu-A * 01 diferentes antes da imunização e 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 e 10 semanas após a imunização inicial. Os animais receberam uma imunização de reforço com VEE-MAG25mer srRNA nas semanas 4 e 8 com doses de 30 µg ou 100 µg e formulados com LNP1 ou LNP2, conforme descrito na **Tabela 21**. As respostas imunológicas combinadas para todos os seis epítopos foram representadas graficamente para cada ponto de tempo de monitoramento imunológico (**Fig. 20A-D** e **Tabelas 22-25**).

[531] As respostas imunes específicas do antígeno combinadas foram observadas em todas as medições com 170, 14, 15, 11, 7, 8, 14, 17, 12 SFCs por 10^6 PBMCs (seis epítopos combinados) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 ou 10 semanas após uma imunização primária com VEE-MAG25mer srRNA-LNP1 (30 µg), respectivamente (**Fig. 20A**). As respostas imunes específicas

do antígeno combinadas foram observadas em todas as medições com 108, -3, 14, 1, 37, 4, 105, 17, 25 SFCs por 10^6 PBMCs (seis epítopos combinados) 1, 2, 3, 4, 5, 6 , 8, 9 ou 10 semanas após uma imunização primária com VEE-MAG25mer srRNA-LNP1 (100 µg), respectivamente (**Fig. 20B**). As respostas imunes específicas do antígeno combinadas foram observadas em todas as medições com -17, 38, 14, -2, 87, 21, 104, 129, 89 SFCs por 10^6 PBMCs (seis epítopos combinados) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 ou 10 semanas após uma imunização primária com VEE-MAG25mer srRNA-LNP2 (100 µg), respectivamente (**Fig. 20C**). Os valores negativos são o resultado da normalização para valores de pré-sangramento para cada epítopo/animal.

[532] Asrespostas imunes específicas do antígeno combinadas foram observadas em todas as medições com 1218, 1784, 1866, 973, 1813, 747, 797, 1249 e 547 SFCs por 10^6 PBMCs (seis epítopos combinados) 1, 2, 3, 4, 5, 6 , 8, 9 ou 10 semanas após uma imunização primária ChAdV68.5WTnt.MAG25mer, respectivamente (**Fig. 20D**). A resposta imune mostrou o perfil esperado com o pico de respostas imunes medidas ~ 2-3 semanas após a imunização inicial seguida por uma contração na resposta imune após 4 semanas. As respostas imunes celulares específicas do antígeno combinadas de 1813 SFCs por 10^6 PBMCs (seis epítopos combinados) foram medidas 5 semanas após a imunização inicial com ChAdV68.5WTnt.MAG25mer (ou seja, 1 semana após o primeiro reforço com VEE-MAG25mer srRNA). A resposta imune medida 1 semana após o primeiro reforço com VEE-MAG25mer srRNA (semana 5) foi comparável ao pico da resposta imune medida para a imunização primária ChAdV68.5WTnt.MAG25mer (semana 3) (**Fig. 20D**). As respostas imunes celulares específicas do antígeno

combinadas de 1249 SFCs por 10^6 PBMCs (seis epítopos combinados) foram medidas 9 semanas após a imunização inicial com ChAdV68.5WTnt.MAG25mer, respectivamente (ou seja, 1 semana após o segundo reforço com VEE-MAG25mer srRNA). As respostas imunes medidas 1 semana após o segundo reforço com VEE-MAG25mer srRNA (semana 9) foram ~ 2vezes maiores do que as medidas imediatamente antes da imunização de reforço (**Fig. 20D**).

Tabela 22: Células formadoras de manchas médias (SFC) por 10^6 PBMCs para cada epítopo ± SEM para VEE-MAG25mer srRNA-LNP1 (30 µg) (Grupo 1)

Sem.	Antígeno					
	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

Tabela 23: Células formadoras de manchas médias (SFC) por 10^6 PBMCs para cada epítopo ± SEM para VEE-MAG25mer srRNA-LNP1 (100 µg) (Grupo 2)

Sem.	Antígeno					
	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

Tabela 24: Células formadoras de manchas médias (SFC) por 10^6 PBMCs para cada epítopo ± SEM para VEE-MAG25mer srRNA-LNP2 (100 µg) (Grupo 3)

Sem.	Antígeno					
	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

Tabela 25: Células formadoras de manchas médias (SFC)

por 10^6 PBMCs para cada epítopo ± SEM para iniciação com ChAdV68.5WTnt.MAG25mer

Sem.	Antígeno					
	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

Resultados

[533] Macacos rhesus indianos Mamu-A * 01 foram imunizados com ChAdV68.5-WTnt.MAG25mer. As respostas imunes celulares específicas do antígeno em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram medidas em seis epítopos restritos Mamu-A * 01 diferentes antes da imunização e 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24 semanas após a imunização inicial (**Fig. 21** e **Tabela 27**). Os animais receberam imunizações de reforço com VEE-MAG25mer srRNA usando a formulação LNP2 nas semanas 4, 12 e 20. Respostas imunes específicas do antígeno combinadas de 1750, 4225, 1100, 2529, 3218 , 1915, 1708, 1561, 5077, 4543, 4920, 5820, 3395, 2728, 1996, 1465, 4730, 2984, 2828 ou 3043 SFCs por 10^6 PBMCs (seis epítopos combinados) foram medidas 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24 semanas após o imunização inicial com

ChAdV68.5WTnt.MAG25mer (**Fig. 21**). As respostas imunes medidas 1 semana após a segunda imunização de reforço (semana 13) com VEE-MAG25mer srRNA foram ~ 3 vezes maiores do que as medidas imediatamente antes da imunização de reforço (semana 12). As respostas imunes medidas 1 semana após a terceira imunização de reforço (semana 21) com VEE-MAG25mer srRNA foram ~ 3vezes maiores do que as medidas imediatamente antes da imunização de reforço (semana 20), semelhante à resposta observada para o segundo reforço.

[534] Macacos rhesus indianos Mamu-A * 01 também foram imunizados com VEE-MAG25mer srRNA usando duas formulações de LNP diferentes (LNP1 e LNP2). As respostas imunes celulares específicas do antígeno em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram medidas em seis epítopos restritos Mamu-A * 01 diferentes antes da imunização e 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, ou 15 semanas após a imunização inicial (**FIGS. 22 e 23, Tabelas 28 e 29**). Os animais receberam imunizações de reforço com VEE-MAG25mer srRNA usando a respectiva formulação LNP1 ou LNP2 nas semanas 4 e 12. As respostas imunes específicas do antígeno combinadas de 168, 204, 103, 126, 140, 145, 330, 203 e 162 SFCs por 106 PBMCs (seis epítopos combinados) foram medidas 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15 semanas após a imunização com VEE-MAG25mer srRNA-LNP2 (**Fig. 22**). Asrespostas imunes específicas do antígeno combinadas de 189, 185, 349, 437, 492, 570, 233, 886, 369 e 381 SFCs por 10^6 PBMCs (seis epítopos combinados) foram medidas 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15 semanas após a imunização com VEE-MAG25mer srRNA-LNP1 (**Fig. 23**).

Tabela 27: Células formadoras de manchas médias (SFC) por 10^6 PBMCs para cada epítopo ± SEM para vacinação inicial

com ChAdV68.5WTnt.MAG25mer (Grupo 1)

Sem.	Antígeno					
	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

Tabela 28: Células formadoras de manchas médias (SFC) por 10^6 PBMCs para cada epítopo ± SEM para vacinação inicial com VEE-MAG25mer srRNA-LNP2 (300 µg) (Grupo 2)

Sem.	Antígeno					
	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

Tabela 29: Células formadoras de manchas médias (SFC) por 10^6 PBMCs para cada epítopo ± SEM para vacinação inicial com VEE-MAG25mer srRNA-LNP1 (300 µg) (Grupo 3)

Sem.	**Antígeno**					
	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

Estudo de variação de dose de srRNA

[535] Em uma implementação da presente invenção, um estudo de variação de dose de srRNA pode ser conduzido em macacos rhesus indianos Mamu A01 para identificar qual dose de srRNA progredir para estudos de imunogenicidade de NHP. Em um exemplo, macacos rhesus indianos Mamu A01 podem ser administrados com um vetor srRNA que codifica antígenos de modelo que inclui múltiplos epítopos restritos de Mamu A01 por injeção IM. Em outro exemplo, um anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 pode ser administrado SC proximal ao local da injeção de vacina IM para direcionar o linfonodo de drenagem da vacina em um grupo de animais. PBMCs podem ser coletadas a cada 2 semanas após a vacinação inicial para monitoramento imunológico. Os braços do estudo são descritos abaixo (**Tabela 30**).

Tabela 30: Estudo de variação de dose de RNA não GLP em Macacos Rhesus Indianos

Grupo	**Iniciação**	**Reforço 1**	**Reforço 2**
1	srRNA-LNP (dose baixa)	srRNA-LNP (dose baixa)	srRNA-LNP (dose baixa)
2	srRNA-LNP (dose média)	srRNA-LNP (dose média)	srRNA-LNP (dose média)
3	srRNA-LNP (dose elevada)	srRNA-LNP (dose elevada)	srRNA-LNP (dose elevada)
4	srRNA-LNP (dose elevada) + anti-CTLA-4	srRNA-LNP (dose elevada) + anti-CTLA-4	srRNA-LNP (dose elevada) + anti-CTLA-4

* Faixa de dosagem de srRNA a ser determinada com a dose alta ≤300 □g.

Estudo de imunogenicidade em macacos Rhesus indianos

[536] Os estudos de vacinas foram conduzidos em macacos rhesus indianos (NHPs) Mamu A01 para demonstrar a imunogenicidade usando os vetores de antígeno. **A Fig. 34** ilustra a estratégia de vacinação. Três grupos de NHPs foram imunizados com ChAdV68.5-WTnt.MAG25mer e com o anticorpo anti-CTLA-4 inibidor de ponto de controle Ipilimumabe (Grupos 5 e 6) ou sem o inibidor de ponto de controle (Grupo 4). O anticorpo foi administrado intravenosamente (grupo 5) ou subcutaneamente (grupo 6). Os triângulos indicam a vacinação com ChAdV68 (1e12 vp/animal) nas semanas 0 e 32. Os círculos representam a vacinação de alfavírus nas semanas 0, 4, 12, 20, 28 e 32.

[537] O curso do tempo das respostas anti-epítopo CD8 + nos NHPs imunizados é apresentado para imunização ChAdV-MAG sozinha (**Fig. 35** e **Tabela**31A), imunização ChAdV-MAG com o inibidor de ponto de controle entregue IV (**Fig. 36** e **Tabela**31B), e A imunização ChAdV-MAG com o inibidor de ponto de controle entregue SC (**Fig. 37** e **Tabela 31C**). Os resultados demonstram que os vetores ChAdV68 ativaram eficientemente as respostas de CD8 + em primatas, os vetores de alfavírus

aumentaram de forma eficiente a resposta de iniciação da vacina ChAdV68, o inibidor de ponto de controle administrado IV ou SC amplificou as respostas de iniciação e de reforço e os vetores ChAdV readministrados após a vacinação para efetivamente aumentar as respostas imunes.

Tabela 31A: Respostas anti-epítopo CD8+ em macacos Rhesus dosados com ChAdV-MAG (Grupo 4). A média de SFC/1e6 esplenócitos +/- o erro padrão é mostrada

Sem.	**Antígeno**					
	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

Tabela 31B: Respostas anti-epítopo CD8+ em Macacos Rhesus dosados com ChAdV-MAG mais anticorpo anti-CTLA4 (Ipilimumabe) administrado IV (Grupo 5). A média de SFC/1e6 esplenócitos +/- o erro padrão é mostrada

Sem.	**Antígeno**					
	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 ±	896,7 ±	1020,1 ±	1,3 ±	436,6 ±	1222 ±

	216,6	190,7	243,3	3,9	90	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

Tabela 31C: Respostas anti-epítopo CD8+ em Macacos Rhesus dosados com chAd-MAG mais anticorpo anti-CTLA4 (Ipilimumabe) administrado SC (Grupo 6). A média de SFC/1e6

esplenócitos +/- o erro padrão é mostrada

Sem.	Antígeno					
	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

Fenotipagem de memória em macacos Rhesus indianos

[538] Macacos Rhesus foram imunizados com regime de iniciação/reforço heterólogo ChAdV68.5WTnt.MAG25mer/VEE-MAG25mer srRNA com ou sem anti-CTLA4, e reforçados novamente com ChAdV68.5WTnt.MAG25mer. Os grupos foram avaliados 11 meses após a administração final de ChAdV68 (mês do estudo 18). por ELISpot foi realizado conforme descrito. **A Fig. 38** e a **Tabela 38** mostram as respostas celulares a seis epítopos restritos de Mamu-A * 01 diferentes, medidos por ELISpot tanto pré-imunização (painel esquerdo) quanto após 18 meses (painel direito). A detecção de respostas aos epítopos restritos demonstra que as respostas de memória específicas do antígeno foram geradas pelo protocolo de vacina ChAdV68/samRNA.

[539] Para avaliar a memória, as células T CD8 + que reconhecem 4 epítopos de classe I diferentes de macaco rhesus Mamu-A * 01 codificados nas vacinas foram monitoradas usando marcação de tetrâmero Mamu-A * 01 de cor dupla, com cada antígeno sendo representado por uma combinação dupla positiva única, e permitiu a identificação de todas as 4 populações específicas do antígeno em uma única amostra. A fenotipagem de células de memória foi realizada por co-

coloração com os marcadores de superfície celular CD45RA e CCR7. **A Fig. 39** e a **Tabela 39** mostram os resultados da coloração combinatória com tetrâmero e co-coloração CD45RA/CCR7 para células T de memória que reconhecem quatro epítopos restritos Mamu-A * 01 diferentes. Os fenótipos de células T também foram avaliados por citometria de fluxo. **A Fig. 40** mostra a distribuição dos tipos de células de memória dentro da soma das quatro populações de células T de tetrâmero Mamu-A * 01 + CD8+ no mês de estudo 18. As células de memória foram caracterizadas como segue: CD45RA + CCR7 + = naïve, CD45RA + CCR7- = efetora (Teff), CD45RA-CCR7 + = memória central (Tcm), CD45RA-CCR7- = memória efetora (Tem). Coletivamente, os resultados demonstram que as respostas de memória foram detectadas pelo menos um ano após o último reforço, indicando imunidade de longa duração, incluindo populações efetoras, de memória central e efetoras.

Tabela 38 Células formadoras de pontos médias (SFC) por 10^6 PBMCs para cada animal nos pontos de tempo de avaliação pré-iniciação e de memória (18 meses)

Animal	Linha de base pré-iniciação						18 meses					
	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 = não determinado devido à exclusão técnica

Tabela 39 Porcentagem de tetrâmero Mamu-A * 01 positivo de células CD8+ vivas

Animal	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

Estudo de variação de dose de RNA não-GLP (doses mais altas) em macacos rhesus indianos

[540] Este estudo foi projetado para (a) avaliar a imunogenicidade de VEE-MAG25mer srRNA a uma dose de 300 µg como uma iniciação/reforço homóloga ou uma iniciação/reforço heteróloga em combinação com ChAdV68.5WTnt.MAG25mer; (b) comparar as respostas imunes de VEE-MAG25mer srRNA em nanopartículas de lipídio usando LNP1 versus LNP2 na dose de 300 µg; e (c) avaliar a cinética das respostas das células T às imunizações de VEE-MAG25mer srRNA e ChAdV68.5WTnt.MAG25mer.

[541] O braço do estudo foi conduzido em macacos rhesus indianos Mamu-A * 01 para demonstrar imunogenicidade. A imunogenicidade da vacina em espécies de primatas não humanos, como Rhesus, é o melhor preditor da potência da vacina em humanos. Além do mais, os antígenos selecionados usados neste estudo são reconhecidos apenas em macacos Rhesus, especificamente os com um haplótipo de MHC de classe I de Mamu-A * 01. Macacos rhesus indianos Mamu-A * 01 foram randomizados para os diferentes braços do estudo (6 macacos por grupo) e administrados uma injeção IM bilateralmente com ChAdV68.5-WTnt.MAG25mer ou VEE-MAG25mer srRNA que codifica antígenos de modelo que inclui múltiplos antígenos restritos de Mamu-A * 01. Os braços do estudo foram descritos abaixo.

[542] PBMCs foram coletadas antes da imunização e 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24 semanas após a inicial imunização para monitoramento imunológico para o grupo 1 (iniciação/reforço heterólogo). PBMCs foram coletadas antes da imunização e 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 semanas após a imunização inicial para monitoramento imunológico para os grupos 2 e 3 (iniciação/reforço homólogo).

Tabela 26: Estudo de imunogenicidade não-GLP em macacos Rhesus indianos

Grupo	Iniciação	Reforço 1	Reforço 2	Reforço 3
1	ChAdV68.5WTnt.MAG25mer	VEE-MAG25mer srRNA -LNP2 (300 µg)	VEE-MAG25mer srRNA -LNP2 (300 µg)	VEE-MAG25mer srRNA -LNP2 (300 µg)
2	VEE-MAG25mer srRNA -LNP2 (300 µg)	VEE-MAG25mer srRNA -LNP2 (300 µg)	VEE-MAG25mer srRNA -LNP2 (300 µg)	
3	VEE-MAG25mer srRNA -LNP1 (300 µg)	VEE-MAG25mer srRNA -LNP1 (300 µg)	VEE-MAG25mer srRNA -LNP1 (300 µg)	

XIX. Identificação de células T reativas alvo MHC/peptídeo e TCRs

[543] Células T reativas alvo e TCRs são identificados para um ou mais dos pares de antígeno/peptídeos HLA, incluindo quaisquer antígenos aqui descritos, tais como antígenos associados a tumor ou antígenos associados a doenças infecciosas.

[544] As células T podem ser isoladas do sangue, linfonodos ou tumores dos pacientes. As células T podem ser enriquecidas para células T específicas de antígeno, por exemplo, classificando células de ligação ao tetrâmero de antígeno -MHC ou classificando células ativadas estimuladas em uma cocultura *in vitro* de células T e células

apresentadoras de antígeno pulsado por antígeno. Vários reagentes são conhecidos na técnica para identificação de células T específicas de antígeno, incluindo tetrâmeros carregados com antígeno e outros reagentes baseados em MHC.

[545] Os dímeros de TCR alfa-beta (ou gama-delta) relevantes para o antígeno podem ser identificados por sequenciamento de célula única de TCRs de células T específicas para antígeno. Alternativamente, o sequenciamento de TCR em massa de células T específicas de antígeno pode ser realizado e os pares alfa-beta com uma alta probabilidade de correspondência podem ser determinados usando um método de pareamento de TCR conhecido na técnica.

[546] Alternativamente ou além disso, as células T específicas de antígeno podem ser obtidas através da iniciação *in vitro* de células T naïve de doadores saudáveis. As células T obtidas a partir de PBMCs, linfonodos ou sangue do cordão umbilical podem ser repetidamente estimuladas por células apresentadoras de antígeno pulsado por antígeno para iniciar a diferenciação de células T com experiência em antígeno. Os TCRs podem então ser identificados da mesma forma como descrito acima para células T específicas de antígeno dos pacientes.

XX. Deleção de E4 em vetores ChAdV68 demonstra produtividade aprimorada

[547] Os clones de um vetor adenoviral ChAdV68 foram selecionados para melhorar a produtividade do vírus. Os vírus ChAdV68 de crescimento/ajuste rápido que expressam o cassete MAG modelo TSNA foram selecionados durante o isolamento da placa e analisados conforme descrito abaixo.

Materiais e métodos

Isolamento de placa ChAdV68

[548] Diluições em série (de 10^{-2} a 10^{-9}) de vírus ChAdV68-MAG foram feitas e 100 uL plaqueados em células HEK293A (ThermoFisher cat. No. R70507) semeadas em 1e6 células/placa de 60 mM. 24 horas após a infecção, o meio foi removido e as células infectadas foram cobertas com DMEM/agarose 1,25% e as placas foram deixadas crescer por 10-15 dias. Durante este tempo, 72 placas virais foram colhidas. O vírus foi eluído durante a noite em 0,5 mL de meio DMEM/5% de FBS e metade da eluição (0,25 mL) foi usada para reinfectar células 293A semeadas a 1e5 células/poço de uma placa de 24 poços. Os vírus foram amplificados e infectados em células 293A. Os clones de crescimento rápido foram selecionados para a produção de vírus em 400 mL de culturas em suspensão de 293F (ThermoFisher cat. No. A14528). O vírus foi purificado por purificação em gradiente 2X CsCl e formulado em tampão ARM (NaCl 25 mM, Tris 20 mm pH 8,0, glicerol 2,5%) por 3 rodadas de diálise. Os títulos das partículas virais foram determinados por absorbância a 260 nm de medição após 0,1% de lise de SDS a 56 C. Os títulos infecciosos foram determinados usando um ensaio de imunocoloração anticapsídeo.

Sequenciamento da próxima geração

[549] O DNA foi purificado a partir do vírus purificado usando o kit de DNA viral QiAmp (Qiagen) e submetido a NGS usando a plataforma Illumina.

Avaliação MOI da produtividade do clone

[550] Infecções controladas foram estabelecidas usando o vírus purificado em um MOI de 0,1 IU e incubadas por 96 h. As unidades infecciosas foram medidas em lisados celulares.

A produção foi comparada a um vírus selecionado sem placa (grupamento).

Imunizações

[551] Camundongos fêmeas Balb/c foram injetados com $1x10^9$ ou $1x10^{10}$ partículas virais (VP) de ChAdV68.5WTnt.MAG25mer (SEQ ID NO: 2) ou ChAdV68-MAG-E4 deletado (SEQ ID NO: 57; "MAG E4 Delta" e "ChAdV68 -MAG-E4 ") em volume de 100 uL, injeção intramuscular bilateral (50 uL por perna).

[552] Macacos rhesus indianos Mamu-A * 01 foram imunizados como injeções intramusculares bilaterais no músculo quadríceps com $1x10^{12}$ partículas virais ($5x10^{11}$ partículas virais por injeção) de ChAdV68.5WTnt.MAG25mer ("ChAdV68-CMV-MAG"; SEQ ID NO: 2; sem deleção de E4 ou elemento de resposta TET) ou ChAdV68-E4d-CMT-MAG (SEQ ID NO: 71; deleção de E4 e elemento de resposta TET CMT [ver abaixo]). Os macacos também receberam 50 mg de um anticorpo anti-CTLA4 (Ipilimumabe) SC no dia da injeção.

ChAdV68-E4d-CMT-MAG; SEQ ID NO: 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
GCTTGGATGTTGAGGTACATGGGCATGAGCCCGTCCCGGGGGGTGGAGGTAGCTCCATTGCAGGGCCTCGTG
CTCGGGGGTGGTGTTGTAAATCACCCAGTCATAGCAGGGGCGCAGGGCATGGTGTTGCACAATATCTTTGA
GGAGGAGACTGATGGCCACGGGCAGCCCTTTGGTGTAGGTGTTTACAAATCTGTTGAGCTGGGAGGGATGC
ATGCGGGGGGAGATGAGGTGCATCTTGGCCTGGATCTTGAGATTGGCGATGTTACCGCCCAGATCCCGCCT
GGGGTTCATGTTGTGCAGGACCACCAGCACGGTGTATCCGGTGCACTTGGGGAATTTATCATGCAACTTGG
AAGGGAAGGCGTGAAAGAATTTGGCGACGCCTTTGTGCCCGCCCAGGTTTTCCATGCACTCATCCATGATG
ATGGCGATGGGCCCGTGGGCGGCGGCCTGGGCAAAGACGTTTCGGGGGTCGGACACATCATAGTTGTGGTC
CTGGGTGAGGTCATCATAGGCCATTTTAATGAATTTGGGGCGGAGGGTGCCGGACTGGGGGACAAAGGTTC
CCTCGATCCCGGGGGCGTAGTTCCCCTCACAGATCTGCATCTCCCAGGCTTTGAGCTCGGAGGGGGGGATC
ATGTCCACCTGCGGGGCGATAAAGAACACGGTTTCCGGGGCGGGGGAGATGAGCTGGGCCGAAAGCAAGT
TCCGGAGCAGCTGGGACTTGCCGCAGCCGGTGGGGCCGTAGATGACCCCGATGACCGGCTGCAGGTGGTA
GTTGAGGGAGAGACAGCTGCCGTCCTCCCGGAGGAGGGGGGCCACCTCGTTCATCATCTCGCGCACGTGCA
TGTTCTCGCGCACCAGTTCCGCCAGGAGGCGCTCTCCCCCCAGGGATAGGAGCTCCTGGAGCGAGGCGAAG
TTTTTCAGCGGCTTGAGTCCGTCGGCCATGGGCATTTTGGAGAGGGTTTGTTGCAAGAGTTCCAGGCGGTCC
CAGAGCTCGGTGATGTGCTCTACGGCATCTCGATCCAGCAGACCTCCTCGTTTCGCGGGTTGGGACGGCTG
CGGGAGTAGGGCACCAGACGATGGGCGTCCAGCGCAGCCAGGGTCCGGTCCTTCCAGGGTCGCAGCGTCC
GCGTCAGGGTGGTCTCCGTCACGGTGAAGGGGTGCGCGCCGGGCTGGGCGCTTGCGAGGGTGCGCTTCAGG
CTCATCCGGCTGGTCGAAAACCGCTCCCGATCGGCGCCCTGCGCGTCGGCCAGGTAGCAATTGACCATGAG
TTCGTAGTTGAGCGCCTCGGCCGCGTGGCCTTTGGCGCGGAGCTTACCTTTGGAAGTCTGCCCGCAGGCGG
GACAGAGGAGGGACTTGAGGGCGTAGAGCTTGGGGGCGAGGAAGACGGACTCGGGGGCGTAGGCGTCCG
CGCCGCAGTGGGCGCAGACGGTCTCGCACTCCACGAGCCAGGTGAGGTCGGGCTGGTCGGGGTCAAAAAC
CAGTTTCCCGCCGTTCTTTTTGATGCGTTTCTTACCTTTGGTCTCCATGAGCTCGTGTCCCCGCTGGGTGACA
AAGAGGCTGTCCGTGTCCCCGTAGACCGACTTTATGGGCCGGTCCTCGAGCGGTGTGCCGCGGTCCTCCTC
GTAGAGGAACCCCGCCCACTCCGAGACGAAAGCCCGGGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCCACGTGGGAC
GGGTAGCGGTCGTTGTCCACCAGCGGGTCCACCTTTTCCAGGGTATGCAAACACATGTCCCCCTCGTCCACA
TCCAGGAAGGTGATTGGCTTGTAAGTGTAGGCCACGTGACCGGGGGTCCCGGCCGGGGGGGTATAAAAGG
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

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

CGACCAGGTGGTGGCCGACGCGCGCAACTACACCCCCGCCGCCGCGCCCGTCTCCACCGTGGACGCCGTCA
TCGACAGCGTGGTGGCCGACGCGCGCCGGTACGCCCGCGCCAAGAGCCGGCGGCGGCGCATCGCCCGGCG
GCACCGGAGCACCCCCGCCATGCGCGCGGCGCGAGCCTTGCTGCGCAGGGCCAGGCGCACGGGACGCAGG
GCCATGCTCAGGGCGGCCAGACGCGCGGCTTCAGGCGCCAGCGCCGGCAGGACCCGGAGACGCGCGGCCA
CGGCGGCGGCAGCGGCCATCGCCAGCATGTCCCGCCCGCGGCGAGGGAACGTGTACTGGGTGCGCGACGC
CGCCACCGGTGTGCGCGTGCCCGTGCGCACCCGCCCCCCTCGCACTTGAAGATGTTCACTTCGCGATGTTGA
TGTGTCCCAGCGGCGAGGAGGATGTCCAAGCGCAAATTCAAGGAAGAGATGCTCCAGGTCATCGCGCCTG
AGATCTACGGCCCTGCGGTGGTGAAGGAGGAAAGAAAGCCCCGCAAAATCAAGCGGGTCAAAAAGGACA
AAAAGGAAGAAGAAAGTGATGTGGACGGATTGGTGGAGTTTGTGCGCGAGTTCGCCCCCCGGCGGCGCGT
GCAGTGGCGCGGGCGGAAGGTGCAACCGGTGCTGAGACCCGGCACCACCGTGGTCTTCACGCCCGGCGAG
CGCTCCGGCACCGCTTCCAAGCGCTCCTACGACGAGGTGTACGGGGATGATGATATTCTGGAGCAGGCGGC
CGAGCGCCTGGGCGAGTTTGCTTACGGCAAGCGCAGCCGTTCCGCACCGAAGGAAGAGGCGGTGTCCATCC
CGCTGGACCACGGCAACCCCACGCCGAGCCTCAAGCCCGTGACCTTGCAGCAGGTGCTGCCGACCGCGGCG
CCGCGCCGGGGGTTCAAGCGCGAGGGCGAGGATCTGTACCCCACCATGCAGCTGATGGTGCCCAAGCGCC
AGAAGCTGGAAGACGTGCTGGAGACCATGAAGGTGGACCCGGACGTGCAGCCCGAGGTCAAGGTGCGGCC
CATCAAGCAGGTGGCCCCGGGCCTGGGCGTGCAGACCGTGGACATCAAGATTCCCACGGAGCCCATGGAA
ACGCAGACCGAGCCCATGATCAAGCCCAGCACCAGCACCATGGAGGTGCAGACGGATCCCTGGATGCCAT
CGGCTCCTAGTCGAAGACCCCGGCGCAAGTACGGCGCGGCCAGCCTGCTGATGCCCAACTACGCGCTGCAT
CCTTCCATCATCCCCACGCCGGGCTACCGCGCGGCACGCGCTTCTACCGCGGTCATACCAGCAGCCGCCG
CAAGACCACCACTCGCCGCCGCCGTCGCCGCACCGCCGCTGCAACCACCCCTGCCGCCCTGGTGCGGAGAG
TGTACCGCCGCGGCCGCGCACCTCTGACCCTGCCGCGCGCGCGCTACCACCCGAGCATCGCCATTTAAACT
TTCGCCTGCTTTGCAGATCAATGGCCCTCACATGCCGCCTTCGCGTTCCCATTACGGGCTACCGAGGAAGAA
AACCGCGCCGTAGAAGGCTGGCGGGGAACGGGATGCGTCGCCACCACCACCGGCGGCGGCGCGCCATCAG
CAAGCGGTTGGGGGGAGGCTTCCTGCCCGCGCTGATCCCCATCATCGCCGCGGCGATCGGGGCGATCCCCG
GCATTGCTTCCGTGGCGGTGCAGGCCTCTCAGCGCCACTGAGACACACTTGGAAACATCTTGTAATAAACC
AATGGACTCTGACGCTCCTGGTCCTGTGATGTGTTTTCGTAGACAGATGGAAGACATCAATTTTTCGTCCCT
GGCTCCGCGACACGGCACGCGGCCGTTCATGGGCACCTGGAGCGACATCGGCACCAGCCAACTGAACGGG
GGCGCCTTCAATTGGAGCAGTCTCTGGAGCGGGCTTAAGAATTTCGGGTCCACGCTTAAAACCTATGGCAG
CAAGGCGTGGAACAGCACCACAGGGCAGGCGCTGAGGGATAAGCTGAAAGAGCAGAACTTCCAGCAGAA
GGTGGTCGATGGGCTCGCCTCGGGCATCAACGGGGTGGTGGACCTGGCCAACCAGGCCGTGCAGCGGCAG
ATCAACAGCCGCCTGGACCCGGTGCCGCCCGCCGGCTCCGTGGAGATGCCGCAGGTGGAGGAGGAGCTGC
CTCCCCTGGACAAGCGGGGCGAGAAGCGACCCCGCCCCGATGCGGAGGAGACGCTGCTGACGCACACGGA
CGAGCCGCCCCCGTACGAGGAGGCGGTGAAACTGGGTCTGCCCACCACGCGGCCCATCGCGCCCCTGGCCA
CCGGGGTGCTGAAACCCGAAAAGCCCGCGACCCTGGACTTGCCTCCTCCCCAGCCTTCCCGCCCCTCTACA
GTGGCTAAGCCCCTGCCGCCGGTGGCCGTGGCCCGCGCGCGACCCGGGGGCACCGCCCGCCCTCATGCGAA
CTGGCAGAGCACTCTGAACAGCATCGTGGGTCTGGGAGTGCAGAGTGTGAAGCGCCGCCGCTGCTATTAAA
CCTACCGTAGCGCTTAACTTGCTTGTCTGTGTGTGTATGTATTATGTCGCCGCCGCCGCTGTCCACCAGAAG
GAGGAGTGAAGAGGCGCGTCGCCGAGTTGCAAGATGGCCACCCCATCGATGCTGCCCCAGTGGGCGTACA
TGCACATCGCCGGACAGGACGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTGGTGCAGTTTGCCCGCGCCACAGAC
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
AGCTCCGCTTGCCGTCCTTCTCGGTGATCCGCACCGGGGGGTAGCTGAAGCCCACGGCCGCCAGCTCCTCCT
CGGCCTGTCTTTCGTCCTCGCTGTCCTGGCTGACGTCCTGCAGGACCACATGCTTGGTCTTGCGGGGTTTCTT
CTTGGGCGGCAGCGGCGGCGGAGATGTTGGAGATGGCGAGGGGGAGCGCGAGTTCTCGCTCACCACTACT
ATCTCTTCCTCTTCTTGGTCCGAGGCCACGCGGCGGTAGGTATGTCTCTTCGGGGGCAGAGGCGGAGGCGA
CGGGCTCTCGCCGCCGCGACTTGGCGGATGGCTGGCAGAGCCCCTTCCGCGTTCGGGGGTGCGCTCCCGGC
GGCGCTCTGACTGACTTCCTCCGCGGCCGGCCATTGTGTTCTCCTAGGGAGGAACAACAAGCATGGAGACT
CAGCCATCGCCAACCTCGCCATCTGCCCCCACCGCCGACGAGAAGCAGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAA
CCGCCCCGCCGCCCAGCCCCGCCACCTCCGACGCGGCCGTCCCAGACATGCAAGAGATGGAGGAATCCATC
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
CCACCCTCTCCCCCCGCACAGCCTTGAACATCTGAATGCCATTGGTGATGGACATGCTTTTGGTCTCCACGT
TCCACACAGTTTCAGAGCGAGCCAGTCTCGGGTCGGTCAGGGAGATGAAACCCTCCGGGCACTCCCGCATC
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

Camundongo de monitoramento imunológico

[553] Os linfócitos foram isolados de baços recentemente colhidos e nódulos linfáticos de camundongos imunizados. Os tecidos foram dissociados em RPMI contendo 10% de soro fetal bovino com penicilina e estreptomicina (RPMI completo) usando o dissociador de tecido GentleMACS de acordo com as instruções do fabricante. Linfócitos isolados de fresco a uma densidade de 2-5x10^6 células/mL foram incubados com 10 uM dos peptídeos indicados durante 2 horas. Após duas horas, a brefeldina A foi adicionada a uma concentração de 5ug/ml e as células foram incubadas com estimulante durante mais 4 horas. Após a estimulação, as células viáveis foram marcadas com o corante de viabilidade fixável eFluor780 de acordo com o protocolo do fabricante e coradas com APC anti-CD8 (clone 53-6.7, BioLegend) na diluição de 1:400. PE anti-IFNg (clone XMG1.2, BioLegend) foi usado a 1:100 para coloração intracelular. As amostras foram coletadas em um citômetro de fluxo Attune NxT (Thermo Scientific). Os dados da citometria de fluxo foram plotados e analisados usando FlowJo. Para avaliar o grau de resposta específica do antígeno, tanto o percentual de IFNg + de células CD8 + quanto o número total de células de IFNg +/

$1x10^6$ células vivas foram calculados em resposta a cada estimulante de peptídeo.

NHPs de monitoramento imunológico

[554] Os PBMCs foram isolados nos momentos indicados após a vacinação inicial usando meio de separação de linfócitos (LSM, MP Biomedicals) e tubos de separação LeucoSep (Greiner Bio-One) e ressuspensos em RPMI contendo 10% de FBS e penicilina/estreptomicina. As células foram contadas no citômetro de fluxo Attune NxT (Thermo Fisher) usando coloração com iodeto de propídio para excluir células mortas e apoptóticas. As células foram então ajustadas à concentração apropriada de células vivas para análise subsequente. Para cada macaco nos estudos, as respostas das células T foram medidas usando ELISpot ou métodos de citometria de fluxo. As respostas de células T a 6 epítopos de classe I de macaco rhesus diferentes Mamu-A * 01 codificados nas vacinas foram monitoradas a partir de PBMCs medindo a indução de citocinas, como IFN-gama, usando análise de imunospot ligado a enzima ex vivo (ELISpot). A análise ELISpot foi realizada de acordo com as diretrizes de harmonização ELISPOT {DOI: 10.1038/nprot.2015.068} com o kit IFNg ELISpotPLUS de macaco (MABTECH). 200.000 PBMCs foram incubadas com 10 uM dos peptídeos indicados por 16 horas em placas revestidas com anticorpo IFNg de 96 poços. Pontos foram desenvolvidos usando fosfatase alcalina. A reação foi cronometrada por 10 minutos e foi finalizada colocando a placa sob água da torneira. Os pontos foram contados usando um AID vSpot Reader Spectrum. Para a análise ELISPOT, os poços com saturação> 50% foram registrados como “numerosos demais para contar”. As amostras com desvio de poços

replicados> 10% foram excluídas da análise. As contagens de pontos foram então corrigidas para a confluência do poço usando a fórmula: contagem de pontos + 2 x (contagem de pontos x %confluência/[100% - %confluência]). O fundo negativo foi corrigido por subtração das contagens de pontos nos poços de estimulação de peptídeo negativo dos poços estimulados com antígeno. Por fim, os poços rotulados como muito numerosos para serem contados foram configurados com o maior valor corrigido observado, arredondado para a centena mais próxima.

Resultados

[555] Vírus ChAdV68 de crescimento/ajuste rápido que expressam o cassete modelo TSNA MAG (ChAdV68.5WTnt.MAG25mer; SEQ ID NO: 2) foram selecionados durante o isolamento da placa, conforme descrito. Das 75 placas originais, 33 produziram vírus, conforme indicado por alguns sinais de CPE (efeito citopático) e, dessas, 8 cresceram mais rapidamente do que o restante, conforme indicado pelo número significativo de placas ou pelo tamanho das placas após 7 dias de incubação. Os clones de crescimento rápido foram selecionados para a produção de vírus em 400 mL de culturas em suspensão de 293F (ThermoFisher cat. No. A14528). Os títulos de unidades infecciosas (IU) foram determinados para os 8 clones. Como mostrado na **Fig. 25**, todos os clones selecionados demonstraram títulos de IU iguais ou acima da referência de vírus agrupados não purificados. Os clones 1, 24 e 60 demonstraram um aumento de pelo menos 9 vezes nos títulos de IU em relação à referência de vírus agrupados não purificados.

[556] Os clones 1, 24 e 60 (os 3 clones mais

produtivos) foram posteriormente analisados por NGS e indicaram que cada um continha deleções na região E4. Dois dos clones (Clone 1A e clone 24) compartilharam uma mutação idêntica de 727 bp entre E4orf2-E4orf4 (**Fig. 26**), especificamente entre 34.916 a 35.642 pb do vírus ChAdV68 de tipo selvagem (SEQ ID NO : 1). O clone 60 foi deletado na região E4orf1-E4orf3 (34.980-36.516), mas a deleção foi maior (1539 bp). Com base nessas deleções, deleções de Orf 2 e 3 (34,979-35,642) são comuns a ambos os conjuntos de clones, sugerindo que as deleções de Orf 2 e 3 contribuem para a melhoria da produtividade.

[557] Três vetores virais deletados de E4 foram gerados deletando a porção da região E4 deletada nos Clones 1A e 24 e comparados com seus vetores originais não deletados em E4. Os vetores escolhidos foram 1) ChAdV-Vazio ("Vazio") sem cassete ou regiões regulatórias (promotor ou poli-A) 2) ChAdV68.5WTnt.GFP (SEQ ID NO: 13; "GFP"), e 3) ChAdV68.5WTnt.MAG25mer (SEQ ID NO: 2; "MAG"). Eles são todos baseados na sequência AC_000011.1 com E1 (nt577 a 3403) e E3 deletado (nt 27.125-31.825) [SEQ ID NO: 1]. Estes foram comparados com os mesmos vetores, mas deletados na região E4 que identificamos (34,916 a 35,642 de SEQ ID NO:1); ChAdV68-Vazio-E4 deletado(SEQ ID NO: 59; "E4 Delta"), ChAdV68-GFP-E4 deletado (SEQ ID NO: 58; "GFP E4 Delta") e ChAdV68-MAG-E4 deletado (SEQ ID NO: 57; "MAG E4 Delta" e "ChAdV68-MAG-E4"), respectivamente. Estes seis vetores foram feitos e os títulos de partícula viral (VP) e unidade infecciosa (IU) determinados. A produtividade foi avaliada na escala de produção de 400 mL. Como mostrado na **Fig. 27**, em cada comparação a versão deletada de E4 demonstrou títulos de

partículas virais aumentados (painel esquerdo) e títulos de unidades infecciosas (painel direito).

[558] A expressão do cassete MAG foi comparada entre os vetores deletados e não deletados de E4. Como mostrado na **Fig. 28**, a análise Western em lisados de células HEK293F infectados com vírus ChAdV68.5WTnt.MAG25mer ("MAG") e ChAdV68-MAG-E4deletado ("MAG-E4") indicou que o vírus E4 deletado tinha níveis mais elevados de Cassete MAG expressos em comparação com os vírus não deletados em E4.

[559] Os camundongos foram então imunizados comparando o ChAdV68.5WTnt.MAG25mer ("ChAdV68-MAG") e sua contraparte deletada em E4 ChAdV68-MAG-E4deletado ("ChAdV68-E4delta"). As respostas das células T foram analisadas quanto à produção de IFN-gama por ICS após estimulação com um peptídeo AH1. Como mostrado na **Fig. 42A** e **Tabela 41A**, a imunização com o vetor E4-deletado demonstrou pelo menos respostas imunes equivalentes em ambas as doses testadas ($1x10^9$ painel esquerdo, $1x10^{10}$ painel direito), com uma tendência positiva para uma resposta aumentada em vetores E4-deletados.

Tabela 41A - Produção de IFN-gama por E4 deletado ChAdV68 (ICS)

Tratamento	Dose	IFNg+ médio como % de CD8	Desvio padrão	N
ChAdV68-MAG	1,00E+10	1,040875	0,211938	8
ChAdV68-E4delta	1,00E+10	1,084125	0,213109	8
ChAdV68-MAG	1,00E+09	0,61575	0,202046	8
ChAdV68-E4delta	1,00E+09	0,800125	0,189558	8

[560] Macacos Rhesus foram então imunizados com ChAdV68.5WTnt.MAG25mer ("ChAdV68-CMV-MAG"; SEQ ID NO: 2) ou ChAdV68-E4d-CMT-MAG (SEQ ID NO: 71), com cada grupo também administrado um anticorpo anti-CTLA4 (Ipilimumabe). As

respostas das células T foram analisadas quanto à produção de IFN-gama por ELISpot após estimulação com 6 diferentes epítopos de classe I de macaco rhesus Mamu-A * 01. Como mostrado na **Fig. 42B e Fig. 42C, e**quantificado na **Tabela 41B** (ChAdV68-CMV-MAG) e **Tabela 41C** (ChAdV68-E4d-CMT-MAG), a imunização com o vetor E4 deletado demonstrou pelo menos respostas imunes equivalentes, com uma tendência positiva para uma resposta aumentada em vetores E4 deletados.

Tabela 41B: Células formadoras de pontos médias (SFC) por 10^6 PBMCs para cada epítopo ± SEM para ChAdV68-CMV-MAG

	Antígeno					
Sem.	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

Tabela 41C: Células formadoras de pontos médias (SFC) por 10^6 PBMCs para cada epítopo ± SEM para ChAdV68-E4d-CMT-MAG

	Antígeno					
Sem.	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

XXI. Construção de um sistema de expressão de cassete regulado por TETr

[561] Um sistema de expressão viral regulado por TETr foi estabelecido para minimizar a transcrição de ácidos

nucleicos codificados em um cassete, como um cassete de codificação de antígeno em uma vacina, durante a produção viral. **A Fig. 43** ilustra a estratégia geral para um exemplo de um sistema de produção viral controlado por tetraciclina usando o exemplo de vacina que codifica o antígeno, a saber:

- Células 293F que expressam uma proteína repressora de TET (TETr) reprimem a expressão do cassete de vacina ligando-se à sequência do operador TET a montante de um promotor CMV mínimo

- A transcrição da sequência do cassete facilita a produção de adenovírus sem a influência da expressão do cassete

- Uma vez administrado in vivo, nenhum repressor está presente e a transcrição da cassete pode prosseguir sem impedimentos

[562] **A Fig. 44A** apresenta um esquema que mostra o arranjo de um exemplo de uma região de resposta TET, referida como uma região de resposta “TETo”, em referência ao promotor e cassete a serem expressos. A região de resposta TET consiste em sete repetições da sequência do operador TET de 19 pb (TETo) (TCCCTATCAGTGATAGAGA; SEQ ID NO: 60) ligada a espaçadores (aaagtgaaagtcgagtttaccac; SEQ ID NO: 70) entre cada TETo. A região de resposta TET está a montante (5') do promotor CMV mínimo (67 pb; *ver* SEQ ID NO: 61) e o início da localização do cassete. O arranjo da região de resposta TETo e sequências promotoras são mostrados e descritos na SEQ ID NO: 61.

[563] **A Fig. 44B** apresenta um esquema que mostra o arranjo de outro exemplo de uma região de resposta TET, referida como uma região de resposta “CMT”, em referência ao

promotor e cassete a serem expressos. A região de resposta TET inclui duas repetições da sequência do operador TET de 19 pb (TETo) (TCCCTATCAGTGATAGAGA; SEQ ID NO: 60) ligadas entre si com um espaçador de dois nucleotídeos. A região de resposta TET está a jusante (3') de um promotor CMV de comprimento total (605 pb; *ver* SEQ ID NO: 64) e a montante (5') do início da localização do cassete. O arranjo da região de resposta CMT e sequências promotoras são mostrados e descritos na SEQ ID NO: 64.

[564] A região de resposta TETo foi inserida entre os sítios I-SceI e AsisI de ChAdV68.5WTnt.GFP (SEQ ID NO: 13) para gerar ChAdV68-TETo-GFP. Uma sequência TETr (tTS; SEQ ID NO: 62) foi clonada em um vetor pLX de Lentivirus para gerar pLXCMV-tTS-iPuro e usada para transduzir células 293F. As sequências usadas na construção do sistema são apresentadas a seguir. Uma linha 293F TETr clonal foi gerada após a seleção de puromicina. A expressão do transgene GFP foi avaliada para avaliar a regulação da expressão pela linha TETr in vitro. Como mostrado na **Fig. 45A**, após a infecção com o vírus ChAdV68-TETo-GFP, o GFP foi significativamente reduzido em células 293F que expressam o TETr (Clone 17, painel direito) em relação à linha celular 293F parental (painel esquerdo).

[565] Um construto repórter SEAP de fosfatase alcalina embrionária segregada foi gerado usando a região de resposta CMT inserida entre os sítios I-SceI e AsisI de ChAdV68-Vazio-E4deletado (SEQ ID NO: 59) e com SEAP inserido no lugar do E1 deletado ("ChAdV68 -E4d-CMT-SEAP "). As células 293F foram infectadas em um MOI de 0,3 e 24h mais tarde o meio foi colhido para o ensaio SEAP (Phospha-LightTM System (Applied

Biosystems) usando um substrato quimioluminescente para a detecção de fosfatase alcalina secretada) que foi seguido de acordo com a descrição do fabricante. Como mostrado na **Fig. 45B**, após a infecção com o vírus ChAdV68-E4d-CMT-SEAP, a secreção SEAP foi reduzida 120 vezes ao nível de fundo em células 293F que expressam o TETr ("tTS Clone 17"), com fundo definido usando um vetor ChAdV68 expressar um cassete de expressão de controle, em relação à linha celular parental 293F ("293F"). Assim, os cassetes adenovirais expressos a partir de um promotor controlado por TETr demonstram expressão de cassete reduzida quando usados em linhas de células que expressam TETr *in vitro*.

Região de resposta TETo entre os sítios I-SceI e AsisI da estrutura do vetor ChAdV68. (SEQ ID NO: 61) Uma das sete repetições das sequências TETo de 19 pb está em negrito e itálico. O promotor CMV mínimo está em negrito

ccatgttgacattgattattgactagttattaaagtact***tccctatcagtgatagaga***aaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtga
aagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaa
agtcgagctcggtacccgggtcga**ggtaggcgtgtacggtgggaggcctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgcctggag**

Sequência TETr (tTS) sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO: 62)

ATGAGCAGACTGGACAAGAGCAAAGTGATCAACAGCGCCCTGGAACTGCTGAACGAAGTGGGCATCGAGG
GCCTGACAACCAGAAAGCTGGCCCAGAAGCTGGGCGTTGAGCAGCCTACACTGTATTGGCACGTGCGGAA
CAAGCAGACCCTGATGAATATGCTGAGCGAGGCCATCCTGGCCAAGCACCATACAAGATCTGCCCCTCTGC
CAACCGAGAGCTGGCAGCAGTTTCTGCAAGAGAACGCCCTGAGCTTCAGAAAGGCCCTGCTGGTGCATAG
AGATGGCGCCAGACTGCACATCGGCACATCTCCCACACCTCCACAGTTTGAGCAGGCTGAGGCACAGCTGA
GATGTCTGTGTGATGCCGGCTTTAGCGTGGAAGAGGCCCTGTTCATCCTGCAGTCCATCAGCCACTTTACAC
TGGGCGCCGTGCTGGAAGAACAGGCCACCAACCAGATCGAGAACAACCACGTGATCGACGCTGCCCCTCC
ACTGCTGCAAGAGGCCTTCAATATCCAAGCCAGAACCAGCGCCGAGATGGCCTTCCACTTTGGCCTGAAGT
CCCTGATCTTTGGCTTCAGCGCCCAGCTGGACGAGAAGAAGCACACACCTATCGAGGACGGCAACAAGCCC
AAGAAGAAGCGGAAGCTGGCCGTCAGCGTGACCTTTGAAGATGTGGCCGTGCTGTTCACCCGGGACGAGT
GGAAGAAACTGGACCTGAGCCAGCGGAGCCTGTACCGGGAAGTGATGCTGGAAAACTACAGCAACCTGGC
CTCCATGGCCGGCTTTCTGTTCACCAAGCCTAAAGTGATCTCCCTGCTTCAGCAGGGCGAAGATCCTTGGTA
A

Sequência TETr (tTS) sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 63)

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVRNKQTLMNMLSEAILAKHHTR
SAPLPTESWQQFLQENALSFRKALLVHRDGARLHIGTSPTPPQFEQAEAQLRCLCDAGFSVEEALFIL
QSISHFTLGAVLEEQATNQIENNHVIDAAPPLLQEAFNIQARTSAEMAFHFGLKSLIFGFSAQLDEKK
HTPIEDGNKPKKKRKLAVSVTFEDVAVLFTRDEWKKLDLSQRSLYREVMLENYSNLASMAGFLFTK
PKVISLLQQGEDPW

Região de resposta CMT entre os sítios I-SceI e AsisI da estrutura do vetor ChAdV68. (SEQ ID NO: 64) As duas repetições das sequências TETo de 19 pb estão em negrito. O promotor CMV de comprimento total está em itálico.

GACATTGATTATTGACTAGTTGTTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATAT
ATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCC
CATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGG
TGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTA
TTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCT
ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAAT
GGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTT
GTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGG
GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT**CTCCCTATCAGTGATAGAGATCTC**
CCTATCAGTGATAGAGATC

XXII. Produção viral no sistema de expressão de cassete regulado por TETr

[566] A região de resposta TETo foi inserida entre os sítios I-SceI e AsisI de ChAdV68.5WTnt.MAG25mer ("ChAdV68-CMV-MAG"; SEQ ID NO: 2) para gerar um vírus ChAdV68-TETo-MAG (SEQ ID NO: 65) que expressa um cassete de antígeno modelo sob o controle de um promotor regulado por TET. A produção viral foi comparada entre as linhas celulares que expressam TETr (Clone 17) e a linha celular parental que não expressou TETr (293F). Como mostrado na **Fig. 46**, a produção viral foi melhorada conforme avaliado pelos títulos de partícula viral (VP; painéis superiores) e unidades infecciosas (IU; painéis inferiores) em três repetições independentes.

[567] A produção viral de um vírus ChAdV68-TETo-MAG produzido em uma linha celular que expressa TETr (Clone 17) também foi comparada a um vírus sem as sequências TETo ("ChAdV68-CMV-MAG"). Conforme mostrado na **Fig. 47A**, a produção viral foi melhorada em 3,4 vezes para o vírus ChAdV68-TETo-MAG em relação ao ChAdV68-CMV-MAG. Estes resultados indicam redução na expressão *in vitro* dos transgenes de cassete entregues, traduzidos em produtividade

de vírus mais consistente e melhorada.

[568] A produção viral produzida em uma linha celular que expressa TETr (tTS Clone 17) foi ainda comparada para uma série de construtos virais, incluindo construtos com deleções E4 e elementos de resposta TET. Todos os construtos expressaram o mesmo cassete de neoantígeno específico de tumor de controle (TSNA). A estrutura geral com deleções E1/E3 e 5 substituições de nucleotídeos foi a mesma que ChAdV68.5WTnt.MAG25mer (SEQ ID NO: 2), com regiões de resposta TETo e CMT inseridas entre os sítios I-SceI e AsisI, conforme indicado, e o cassete MAG25mer substituído pelo cassete TSNA. A região E4 deletada foi a identificada acima (deleção 34.916 a 35.642 de SEQ ID NO: 1). Os vários construtos examinados são descritos abaixo:

-ChAdV68-CMV-TSNA; E1/E3 deletado, promotor CMV de comprimento total

-ChAdV68-CT-TSNA; E1/E3 deletadi, promotor CMV de comprimento total, códon de cassete TSNA otimizado usando uma otimização de códon alternativo (SEQ ID NO: 66)

-ChAdV68-TETo-TSNA; E1/E3 deletados, 7 repetições de TETo ligadas a espaçadores a montante (5') do promotor CMV mínimo (regiãode resposta “TETo”) (SEQ ID NO: 67)

-ChAdV68-CMT-TSNA; E1/E3 deletados, 2 repetições de TETo diretamente ligadas a jusante (3') do promotor CMV de comprimento total (região de resposta “CMT”) (SEQ ID NO: 68)

-ChAdV68-E4d-CMT-TSNA; E1/E3/E4 deletados, 2 repetições de TETo diretamente ligadas a jusante (3') do promotor CMV de comprimento total (SEQ ID NO: 69)

[569] Como mostrado na **Fig. 47B**, a produção viral para

os vírus ChAdV68-CT-TSNA, ChAdV68-TETo-TSNA, ChAdV68-CMT-TSNA e ChAdV68-E4d-CMT-TSNA foi melhorada em cerca de 6 vezes, 39 vezes, 137 vezes ou 300 vezes em relação a ChAdV68-CMV-TSNA. respectivamente. A razão de partículas virais para unidades infecciosas também foi avaliada para medir a capacidade infecciosa do vírus e é calculada dividindo o título de partícula viral (VP)/mL pelo título de unidade infecciosa (IU)/mL, onde uma razão inferior representa uma infecciosidade mais alta por partícula (uma razão de 1:1 representa uma razão perfeita de cada partícula ser infecciosa). Conforme mostrado na **Tabela 42A**, os vetores controlados por TET ChAdV68-TETo-TSNA, ChAdV68-CMT-TSNA e ChAdV68-E4d-CMT-TSNA demonstraram capacidade infecciosa melhorada em relação ao ChAdV68-CMV-TSNA, com vetores CMT demonstrando as melhores capacidades infecciosas.

[570] A produção viral de outra série de construtos virais, incluindo construtos apresentando deleções E4 e elementos de resposta TET, foi avaliada para construtos apresentando um grande modelo de cassete de antígeno (50XXL; *ver* **Fig. 29** e **Tabelas 32-34**) ou modelo de cassete de antígeno M2.2. A estrutura geral com deleções E1/E3 e 5 substituições de nucleotídeos foi a mesma que ChAdV68.5WTnt.MAG25mer (SEQ ID NO:2), com regiões de resposta TETo e CMT inseridas entre os sítios I-SceI e AsisI, conforme indicado, e o cassete MAG25mer substituído pelo cassete indicado. A região E4 deletada foi a identificada acima (deleção 34.916 a 35.642 de SEQ ID NO: 1). Os vários construtos examinados são descritos abaixo:

-ChAdV68-CMV-50 XXL; E1/E3 deletado, promotor CMV de comprimento total, códon de cassete 50XXL otimizado usando

a ferramenta de otimização de códon Genscript

-ChAdV68-CMT-50XXL; E1/E3 deletado, 2 repetições de TETo diretamente ligadas a jusante (3') do promotor CMV de comprimento total, códon de cassete 50XXL otimizado usando a ferramenta de otimização de códon Genscript

-ChAdV68- CT-50XXL; E1/E3 deletado, promotor CMV de comprimento total, códon de cassete 50XXL otimizado usando uma ferramenta de otimização de códon alternativa

- ChAdV68-E4d-CMT-50XXL; E1/E3/E4 deletado, 2 repetições de TETo diretamente ligadas a jusante (3') do promotor CMV de comprimento total, códon de cassete 50XXL otimizado usando a ferramenta de otimização de códon Genscript

-ChAdV68-CMV-M2.2; E1/E3 deletado, promotor CMV de comprimento total, códon de cassete M2.2 otimizado usando a ferramenta de otimização de códon Genscript

-ChAdV68-CMT-M2.2; E1/E3 deletado, 2 repetições de TETo diretamente ligadas a jusante (3') do promotor CMV de comprimento total, códon de cassete M2.2 otimizado usando a ferramenta de otimização de códon Genscript

-ChAdV68-E4d-CMT-M2.2 ; E1/E3/E4 deletado, 2 repetições de TETo diretamente ligadas a jusante (3') do promotor CMV de comprimento total, códon de cassete M2.2 otimizado usando a ferramenta de otimização de códon Genscript

[571] Como mostrado na **Fig. 47C**, a produção viral para os cassetes de antígeno modelo 50XXL e M2.2 foi melhorada pelo uso de vetores adenovirais com uma região de resposta CMT em uma linha celular que expressa tTS. Por exemplo, a produção viral foi quase 10 vezes maior para ChAdV68-CMT-50XXL na linha celular que expressa tTS (painel esquerdo; coluna do meio) em relação a uma linha celular 293F parental

(painel esquerdo; segunda coluna da esquerda), e 15- vezes maior para ChAdV68-CMT-M2.2 (painel direito; coluna do meio) em relação a um vetor sem a região de resposta CMT em uma linha celular parental 293F (painel direito; coluna esquerda). No caso de construtos 50XXL, melhorias adicionais na produção viral foram alcançadas combinando uma região de resposta CMT com uma deleção E4 (painel esquerdo coluna central vs painel esquerdo coluna direita). As melhorias também foram alcançadas em certas circunstâncias por otimização de códon alternativa (como mostrado para ChAdV68-CT-50XXL). A razões de partículas virais para unidades infecciosas também foi avaliada. Como mostrado na **Tabela 42C**, os vetores controlados por TET em um fundo deletado de E4 demonstraram capacidade infecciosa melhorada em relação aos vetores sem uma deleção de E4 e elemento de resposta TET.

Tabela 42A - Razão de partícula viral para unidade infecciosa Construtos de TSNA

Construto	**Razão VP:IU**
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

Tabela 42B - Razão de partícula viral para unidade infecciosa Construto de 50XXL

Construto	**Razão VP:IU**
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 (SEQ ID NO: 65)

CATCATCAATAATATACCTCAAACTTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTGAATTTGGGGAGGA
AGGGCGGTGATTGGTCGAGGGATGAGCGACCGTTAGGGGCGGGGCGAGTGACGTTTTGATGACGTGGTTG
CGAGGAGGAGCCAGTTTGCAAGTTCTCGTGGGAAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTTGAACACGGAA
ATACTCAATTTTCCCGCGCTCTCTGACAGGAAATGAGGTGTTTCTGGGCGGATGCAAGTGAAAACGGGCCA
TTTTCGCGCGAAAACTGAATGAGGAAGTGAAAATCTGAGTAATTTCGCGTTTATGGCAGGGAGGAGTATTT
GCCGAGGGCCGAGTAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTACCGTGTTTTTCACCTAAATTTCCGC
GTACGGTGTCAAAGTCCGGTGTTTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGCCAGGGTATTTAAACCTGCGCTCTCC
AGTCAAGAGGCCACTCTTGAGTGCCAGCGAGAAGAGTTTTCTCCTCCGCGCCGCGAGTCAGATCTACACTT
TGAAAGTAGGGATAACAGGGTAATCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAAAGTACTTCCCTATCA

GTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTA
CCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTG
AAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTG
ATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGCTCGGT
ACCCGGGTCGAGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC
GCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGATCGCGCCACCATGGCCGGGATGT
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
TTTTCCAGGACCCGGTAGAGGTGGGCTTGGATGTTGAGGTACATGGGCATGAGCCCGTCCCGGGGGGTGGAG
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
AGAAGGCGTTCATGCCCCGCCTCGTTCCAGACGCGGCTGTAGACCACGACGCCCTCGGGATCGCGGGCGCGC
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
TACGTCTACAAGGCCCTGGGCATAGTCGCGCCCGCGCGTCCTCTCGAGCCGCACCTTCTAAATGTCCATTCTC
ATCTCGCCCAGTAATAACACCGGTTGGGGCCTGCGCGCGCCCAGCAAGATGTACGGAGGCGCTCGCCAACG
CTCCACGCAACACCCCGTGCGCGTGCGCGGGCACTTCCGCGCTCCCTGGGGCGCCCTCAAGGCCGCGTGC
GGTCGCGCACCACCGTCGACGACGTGATCGACCAGGTGGTGGCCGACGCGCGCAACTACACCCCCGCCGCC
GCGCCCGTCTCCACCGTGGACGCCGTCATCGACAGCGTGGTGGCCGACGCGCGCCGGTACGCCCGCGCCAA
GAGCCGGCGGCGGCGCATCGCCCGGCGGCACCGGAGCACCCCCGCCATGCGCGCGGCGCGAGCCTTGCTG
CGCAGGGCCAGGCGCACGGGACGCAGGGCCATGCTCAGGGCGGCCAGACGCGCGGCTTCAGGCGCCAGCG
CCGGCAGGACCCGGAGACGCGCGGCCACGGCGGCGGCAGCGGCCATCGCCAGCATGTCCCGCCCGCGGCG
AGGGAACGTGTACTGGGTGCGCGACGCCGCCACCGGTGTGCGCGTGCCCGTGCGCACCCGCCCCCCTCGCA
CTTGAAGATGTTCACTTCGCGATGTTGATGTGTCCCAGCGGCGAGGAGGATGTCCAAGCGCAAATTCAAGG
AAGAGATGCTCCAGGTCATCGCGCCTGAGATCTACGGCCCTGCGGTGGTGAAGGAGGAAAGAAAGCCCCG
CAAAATCAAGCGGGTCAAAAAGGACAAAAAGGAAGAAGAAAGTGATGTGGACGGATTGGTGGAGTTTGTG
CGCGAGTTCGCCCCCCGGCGGCGCGTGCAGTGGCGCGGGCGGAAGGTGCAACCGGTGCTGAGACCCGGCA
CCACCGTGGTCTTCACGCCCGGCGAGCGCTCCGGCACCGCTTCCAAGCGCTCCTACGACGAGGTGTACGGG
GATGATGATATTCTGGAGCAGGCGGCCGAGCGCCTGGGCGAGTTTGCTTACGGCAAGCGCAGCCGTTCCGC
ACCGAAGGAAGAGGCGGTGTCCATCCCGCTGGACCACGGCAACCCCACGCCGAGCCTCAAGCCCGTGACC
TTGCAGCAGGTGCTGCCGACCGCGGCGCCGCGCCGGGGGTTCAAGCGCGAGGGCGAGGATCTGTACCCCA
CCATGCAGCTGATGGTGCCCAAGCGCCAGAAGCTGGAAGACGTGCTGGAGACCATGAAGGTGGACCCGGA
CGTGCAGCCCGAGGTCAAGGTGCGGCCCATCAAGCAGGTGGCCCCGGGCCTGGGCGTGCAGACCGTGGAC
ATCAAGATTCCCACGGAGCCCATGGAAACGCAGACCGAGCCCATGATCAAGCCCAGCACCAGCACCATGG
AGGTGCAGACGGATCCCTGGATGCCATCGGCTCCTAGTCGAAGACCCCGGCGCAAGTACGGCGCGGCCAG
CCTGCTGATGCCCAACTACGCGCTGCATCCTTCCATCATCCCCACGCCGGGCTACCGCGGCACGCGCTTCTA
CCGCGGTCATACCAGCAGCCGCCGCCGCAAGACCACCACTCGCCGCCGCCGTCGCCGCACCGCCGCTGCAA
CCACCCCTGCCGCCCTGGTGCGGAGAGTGTACCGCCGCGGCCGCGCACCTCTGACCCTGCCGCGCGCGCGC
TACCACCCGAGCATCGCCATTTAAACTTTCGCCTGCTTTGCAGATCAATGGCCCTCACATGCCGCCTTCGCG
TTCCCATTACGGGCTACCGAGGAAGAAAACCGCGCCGTAGAAGGCTGGCGGGGAACGGGATGCGTCGCCA
CCACCACCGGCGGCGGCGCGCCATCAGCAAGCGGTTGGGGGGAGGCTTCCTGCCCGCGCTGATCCCCATCA
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
AGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAACCGCCCCGCCGCCCAGCCCCGCCACCTCCGACGCGGCCCGTCCCAGA
CATGCAAGAGATGGAGGAATCCATCGAGATTGACCTGGGCTATGTGACGCCCGCGGAGCACGAGGAGGAG
CTGGCAGTGCGCTTTTCACAAGAAGAGATACACCAAGAACAGCCAGAGCAGGAAGCAGAGAATGAGCAGA
GTCAGGCTGGGCTCGAGCATGACGGCGACTACCTCCACCTGAGCGGGGGGGGAGGACGCGCTCATCAAGCA
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
CCCCTTATCCAGTGAAATAAGATCATATTGATGATGATTTTACAGAAATAAAAAATAATCATTTGATTTGA
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
GGACTCCCTCAGCATGATGCCCACGGCCCTCAGCATCAGTCGTCTGGTGCCGGCGGGCGCAGCAGCGCATGC
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
TTCAAACACCTCATTTGCATATTAACGCGCACAAAAAGTTTGAGGTATATTATTGATGATGG

ChAdV68-CT-TSNA (SEQ ID NO: 66)

CATCATCAATAATATACCTCAAACTTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTGAATTTGGGGAGGA
AGGGCGGTGATTGGTCGAGGGATGAGCGACCGTTAGGGGCGGGGCGAGTGACGTTTTGATGACGTGGTTG
CGAGGAGGAGCCAGTTTGCAAGTTCTCGTGGGAAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTTGAACACGGAA
ATACTCAATTTTCCCGCGCTCTCTGACAGGAAATGAGGTGTTTCTGGGCGGATGCAAGTGAAAACGGGCCA
TTTTCGCGCGAAAACTGAATGAGGAAGTGAAAATCTGAGTAATTTCGCGTTTATGGCAGGGAGGAGTATTT
GCCGAGGGCCGAGTAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTACCGTGTTTTTCACCTAAATTTCCGC
GTACGGTGTCAAAGTCCGGTGTTTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGCCAGGGTATTTAAACCTGCGCTCTCC
AGTCAAGAGGCCACTCTTGAGTGCCAGCGAGAAGAGTTTTCTCCTCCGCGCCGCGAGTCAGATCTACACTT
TGAAAGTAGGGATAACAGGGTAATGACATTGATTATTGACTAGTTGTTAATAGTAATCAATTACGGGGTCA
TTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCC
AACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTG
ACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTC
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGAC
TTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACC
AATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTT
GTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCG
GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAACGCC
ATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACAGCGATCGCGCCACCATGGCTGGCATGACCGAGTACAAGCT
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
CCCGGTGGATCTTTTTCCAGGACCCGGTAGAGGTGGGCTTGGATGTTGAGGTACATGGGCATGAGCCCGTCC
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

GGGGCACCTCGGCCCGGTTGTTGATGACCTGGGCGGCGAGCACGATCTCGTCGAAGCCGTTGATGTTGTGG
CCCACGATGTAGAGTTCCACGAATCGCGGACGGCCCTTGACGTGGGGCAGTTTCTTGAGCTCCTCGTAGGT
GAGCTCGTCGGGGGTCGCTGAGCCCGTGCTGCTCGAGCGCCCAGTCGGCGAGATGGGGGTTGGCGCGGAGG
AAGGAAGTCCAGAGATCCACGGCCAGGGCGGTTTGCAGACGGTCCCGGTACTGACGGAACTGCTGCCCGA
CGGCCATTTTTTCGGGGGGTGACGCAGTAGAAGGTGCGGGGGTCCCCGTGCCAGCGATCCCATTTGAGCTGG
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
CGCGTCAAGTTAGCAACTACCCGGTGGTGGGCGCCGAGCTCCTGCCCGTCTACTCCAAGAGCTTCTTCAAC
GAGCAGGCCGTCTACTCGCAGCAGCTGCGCGCCTTCACCTCGCTTACGCACGTCTTCAACCGCTTCCCCGAG
AACCAGATCCTCGTCCGCCCGCCCGCGCCCACCATTACCACCGTCAGTGAAAACGTTCCTGCTCTCACAGAT
CACGGGACCCTGCCGCTGCGCAGCAGTATCCGGGGAGTCCAGCGCGTGACCGTTACTGACGCCAGACGCCG
CACCTGCCCCTACGTCTACAAGGCCCTGGGCATAGTCGCGCCGCGCGTCCTCTCGAGCCGCACCTTCTAAAT
GTCCATTCTCATCTCGCCCAGTAATAACACCGGTTGGGGCCTGCGCGCGCCCAGCAAGATGTACGGAGGCG
CTCGCCAACGCTCCACGCAACACCCCGTGCGCGTGCGCGGGCACTTCCGCGCTCCCTGGGGCGCCCTCAAG
GGCCGCGTGCGGTCGCGCACCACCGTCGACGACGTGATCGACCAGGTGGTGGCCGACGCGCGCAACTACA
CCCCCGCCGCCGCGCCCGTCTCCACCGTGGACGCCGTCATCGACAGCGTGGTGGCCGACGCGCGCCGGTAC
GCCCGCGCCAAGAGCCGGCGGCGGCGCATCGCCCGGCGGCACCGGAGCACCCCCGCCATGCGCGCGGCGC
GAGCCTTGCTGCGCAGGGCCAGGCGCACGGGACGCAGGGCCATGCTCAGGGCGGCCAGACGCGCGGCTTC
AGGCGCCAGCGCCGGCAGGACCCGGAGACGCGCGGCCACGGCGGCGGCAGCGGCCATCGCCAGCATGTCC
CGCCCGCGGCGAGGGAACGTGTACTGGGTGCGCGACGCCGCCACCGGTGTGCGCGTGCCCGTGCGCACCC
GCCCCCCTCGCACTTGAAGATGTTCACTTCGCGATGTTGATGTGTCCCAGCGGCGAGGAGGATGTCCAAGC
GCAAATTCAAGGAAGAGATGCTCCAGGTCATCGCGCCTGAGATCTACGGCCCTGCGGTGGTGAAGGAGGA
AAGAAAGCCCCCGCAAAATCAAGCGGGTCAAAAAGGACAAAAAGGAAGAAGAAAGTGATGTGGACGGATT
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

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

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
GTGAATGATTCGACAAGATGAATACACCCCCGGAACATTGGCGTCCGCGAGTGAAAAAAGCGCCCGAGG
AAGCAATAAGGCACTACAATGCTCAGTCTCAAGTCCAGCAAAGCGATGCCATGCGGATGAAGCACAAAAT
TCTCAGGTGCGTACAAAATGTAATTACTCCCCTCCTGCACAGGCAGCAAAGCCCCCGATCCCTCCAGGTAC
ACATACAAAGCCTCAGCGTCCATAGCTTACCGAGCAGCAGCACACAACAGGCGCAAGAGTCAGAGAAAGG
CTGAGCTCTAACCTGTCCACCCGCTCTCTGCTCAATATATAGCCCAGATCTACACTGACGTAAAGGCCAAA
GTCTAAAAATACCCGCCAAATAATCACACACGCCCAGCACACGCCCAGAAACCGGTGACACACTCAAAAA
AATACGCGCACTTCCTCAAACGCCCAAAACTGCCGTCATTTCCGGGTTCCCACGCTACGTCATCAAAACAC
GACTTTCAAATTCCGTCGACCGTTAAAAACGTCACCCGCCCCGCCCCTAACGGTCGCCCGTCTCTCAGCCAA
TCAGCGCCCCGCATCCCCAAATTCAAACACCTCATTTGCATATTAACGCGCACAAAAAGTTTGAGGTATATT
ATTGATGATG

ChAdV68-TETo-TSNA (SEQ ID NO: 67)

CCATCTTCAATAATATACCTCAAACTTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTGAATTTGGGGAGG
AAGGGCGGTGATTGGTCGAGGGATGAGCGACCGTTAGGGGCGGGGCGAGTGACGTTTTGATGACGTGGTT
GCGAGGAGGAGCCAGTTTGCAAGTTCTCGTGGGAAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTTGAACACGGA
AATACTCAATTTTCCCGCGCTCTCTGACAGGAAATGAGGTGTTTCTGGGCGGATGCAAGTGAAAACGGGCC
ATTTTCGCGCGAAAACTGAATGAGGAAGTGAAAATCTGAGTAATTTCGCGTTTATGGCAGGGAGGAGTATT
TGCCGAGGGCCGAGTAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTACCGTGTTTTTCACCTAAATTTCCG
CGTACGGTGTCAAAGTCCGGTGTTTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGCCAGGGTATTTAAACCTGCGCTCTC
CAGTCAAGAGGCCACTCTTGAGTGCCAGCGAGAAGAGTTTTCTCCTCCGCGCCGCGAGTCAGATCTACACT
TTGAAAGTAGGGATAACAGGGTAATCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAAAGTACTTCCCTATC
AGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTT
ACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGT
GAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGT
GATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGCTCGG
TACCCGGGTCGAGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAT
CGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACAGCGATCGCGCCACCATGGCTGGCATG
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
GGTCTCGATCATTGAGCACCCGGTGGATCTTTTCCAGGACCCCGGTAGAGGTGGGCTTGGATGTTGAGGTAC
ATGGGCATGAGCCCGTCCCGGGGGTGGAGGTAGCTCCATTGCAGGGCCTCGTGCTCGGGGGTGGTGTTGTA
AATCACCCAGTCATAGCAGGGGCGCAGGGCATGGTGTTGCACAATATCTTTGAGGAGGAGACTGATGGCCA
CGGGCAGCCCTTTGGTGTAGGTGTTTACAAATCTGTTGAGCTGGGAGGGATGCATGCGGGGGGAGATGAGG

TGCATCTTGGCCTGGATCTTGAGATTGGCGATGTTACCGCCCAGATCCCGCCTGGGGTTCATGTTGTGCAGG
ACCACCAGCACGGTGTATCCGGTGCACTTGGGGAATTTATCATGCAACTTGGAAGGGAAGGCGTGAAAGA
ATTTGGCGACGCCTTTGTGCCCCGCCCAGGTTTTCCATGCACTCATCCATGATGATGGCGATGGGCCCGTGGG
CGGCGGCCTGGGCAAAGACGTTTCGGGGGGTCGGACACATCATAGTTGTGGTCCTGGGTGAGGTCATCATAG
GCCATTTTAATGAATTTGGGGCGGAGGGTGCCGGACTGGGGGACAAAGGTACCCTCGATCCCGGGGGCGTA
GTTCCCCTCACAGATCTGCATCTCCCAGGCTTTGAGCTCGGAGGGGGGGATCATGTCCACCTGCGGGGCGA
TAAAGAACACGGTTTCCGGGGCGGGGGAGATGAGCTGGGCCGAAAGCAAGTTCCGGAGCAGCTGGGACTT
GCCGCAGCCGGTGGGGCCGTAGATGACCCCGATGACCGGCTGCAGGTGGTAGTTGAGGGAGAGACAGCTG
CCGTCCTCCCGGAGGAGGGGGGCCACCTCGTTCATCATCTCGCGCACGTGCATGTTCTCGCGCACCAGTTCC
GCCAGGAGGCGCTCTCCCCCCAGGGATAGGAGCTCCTGGAGCGAGGCGAAGTTTTTCAGCGGCTTGAGTCC
GTCGGCCATGGGCATTTTGGAGAGGGTTTGTTGCAAGAGTTCCAGGCGGTCCCAGAGCTCGGTGATGTGCT
CTACGGCATCTCGATCCAGCAGACCTCCTCGTTTCGCGGGTTGGGACGGCTGCGGGAGTAGGGCACCAGAC
GATGGGCGTCCAGCGCAGCCAGGGTCCGGTCCTTCCAGGGTCGCAGCGTCCGCGTCAGGGTGGTCTCCGTC
ACGGTGAAGGGGTGCGCGCCGGGCTGGGCGCTTGCGAGGGTGCGCTTCAGGCTCATCCGGCTGGTCGAAA
ACCGCTCCCGATCGGCGCCCTGCGCGTCGGCCAGGTAGCAATTGACCATGAGTTCGTAGTTGAGCGCCTCG
GCCGCGTGGCCTTTGGCGCGGAGCTTACCTTTGGAAGTCTGCCCGCAGGCGGGACAGAGGAGGGACTTGAG
GGCGTAGAGCTTGGGGGCGAGGAAGACGGACTCGGGGGGCGTAGGCGTCCGCGCCGCAGTGGGCGCAGACG
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
AACTGCTGCCCGACGGCCATTTTTTCGGGGGGTGACGCAGTAGAAGGTGCGGGGGGTCCCCGTGCCAGCGATC
CCATTTGAGCTGGAGGGCGAGATCGAGGGCGAGCTCGACGAGCCGGTCGTCCCCGGAGAGTTTCATGACC
AGCATGAAGGGGACGAGCTGCTTGCCGAAGGACCCCATCCAGGTGTAGGTTTCCACATCGTAGGTGAGGA
AGAGCCTTTCGGTGCGAGGATGCGAGCCGATGGGGAAGAACTGGATCTCCTGCCACCAATTGGAGGAATG
GCTGTTGATGTGATGGAAGTAGAAATGCCGACGGCGCGCCGAACACTCGTGCTTGTGTTTATACAAGCGGC
CACAGTGCTCGCAACGCTGCACGGGATGCACGTGCTGCACGAGCTGTACCTGAGTTCCTTTGACGAGGAAT
TTCAGTGGGAAGTGGAGTCGTGGCGCCTGCATCTCGTGCTGTACTACGTCGTGGTGGTCGGCCTGGCCCTCT
TCTGCCTCGATGGTGGTCATGCTGACGAGCCCGCGCGGGAGGCAGGTCCAGACCTCGGCGCGAGCGGGTCG
GAGAGCGAGGACGAGGGCGCGCAGGCCGGAGCTGTCCAGGGTCCTGAGACGCTGCGGAGTCAGGTCAGTG
GGCAGCGGCGGCGCGCGGTTGACTTGCAGGAGTTTTTCCAGGGCGCGCGGGAGGTCCAGATGGTACTTGAT
CTCCACCGCGCCATTGGTGGCGACGTCGATGGCTTGCAGGGTCCCGTGCCCCTGGGGTGTGACCACCGTCC
CCGTTTCTTCTTGGGCGGCTGGGGCGACGGGGGCGGTGCCTCTTCCATGGTTAGAAGCGGCGGCGAGGAC
GCGCGCCGGGCGGCAGGGGCGGCTCGGGGCCCGGAGGCAGGGGCGGCAGGGGCACGTCGGCGCCGCGCG
CGGGTAGGTTCTGGTACTGCGCCCGGAGAAGACTGGCGTGAGCGACGACGCGACGGTTGACGTCCTGGATC
TGACGCCTCTGGGTGAAGGCCACGGGACCCGTGAGTTTGAACCTGAAAGAGAGTTCGACAGAATCAATCTC
GGTATCGTTGACGGCGGCCTGCCGCAGGATCTCTTGCACGTCGCCCGAGTTGTCCTGGTAGGCGATCTCGGT
CATGAACTGCTCGATCTCCTCCTCTTGAAGGTCTCCGCGGCCGGCGCGCTCCACGGTGGCCGCGAGGTCGTT
GGAGATGCGGCCCATGAGCTGCGAGAAGGCGTTCATGCCCGCCTCGTTCCAGACGCGGCTGTAGACCACGA
CGCCCTCGGGATCGCGGGCGCGCATGACCACCTGGGCGAGGTTGAGCTCCACGTGGCGCGTGAAGACCGC
GTAGTTGCAGAGGCGCTGGTAGAGGTAGTTGAGCGTGGTGGCGATGTGCTCGGTGACGAAGAAATACATG

ATCCAGCGGCGGAGCGGCATCTCGCTGACGTCGCCCAGCGCCTCCAAACGTTCCATGGCCTCGTAAAAGTC
CACGGCGAAGTTGAAAAACTGGGAGTTGCGCGCCGAGACGGTCAACTCCTCCTCCAGAAGACGGATGAGC
TCGGCGATGGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAGGCCCCCGGGAGTTCCTCCACTTCCTCTTCTTCCTCCTCC
ACTAACATCTCTTCTACTTCCTCCTCAGGCGGCAGTGGTGGCGGGGGAGGGGGCCTGCGTCGCCGGCGGCG
CACGGGCAGACGGTCGATGAAGCGCTCGATGGTCTCGCCGCGCCGGCGTCGCATGGTCTCGGTGACGGCGC
GCCCGTCCTCGCGGGGCCGCAGCGTGAAGACGCCGCCGCGCATCTCCAGGTGGCCGGGGGGGTCCCCGTTG
GGCAGGGAGAGGGCGCTGACGATGCATCTTATCAATTGCCCCGTAGGGACTCCGCGCAAGGACCTGAGCG
TCTCGAGATCCACGGGATCTGAAAACCGCTGAACGAAGGCTTCGAGCCAGTCGCAGTCGCAAGGTAGGCT
GAGCACGGTTTCTTCTGGCGGGTCATGTTGGTTGGGAGCGGGGCGGGCGATGCTGCTGGTGATGAAGTTGA
AATAGGCGGTTCTGAGACGGCGGATGGTGGCGAGGAGCACCAGGTCTTTGGGCCCGGCTTGCTGGATGCGC
AGACGGTCGGCCATGCCCCAGGCGTGGTCCTGACACCTGGCCAGGTCCTTGTAGTAGTCCTGCATGAGCCG
CTCCACGGGCACCTCCTCCTCGCCCGCGCGGCCGTGCATGCGCGTGAGCCCGAAGCCGCGCTGGGGCTGGA
CGAGCGCCAGGTCGGCGACGACGCGCTCGGCGAGGATGGCTTGCTGGATCTGGGTGAGGGTGGTCTGGAA
GTCATCAAAGTCGACGAAGCGGTGGTAGGCTCCGGTGTTGATGGTGTAGGAGCAGTTGGCCATGACGGACC
AGTTGACGGTCTGGTGGCCCGGACGCACGAGCTCGTGGTACTTGAGGCGCGAGTAGGCGCGCGTGTCGAAG
ATGTAGTCGTTGCAGGTGCGCACCAGGTACTGGTAGCCGATGAGGAAGTGCGGCGGCGGCTGGCGGTAGA
GCGGCCATCGCTCGGTGGCGGGGGCGCCGGGCGCGAGGTCCTCGAGCATGGTGCGGTGGTAGCCGTAGAT
GTACCTGGACATCCAGGTGATGCCGGCGGCGGTGGTGGAGGCGCGCGGGAACTCGCGGACGCGGTTCCAG
ATGTTGCGCAGCGGCAGGAAGTAGTTCATGGTGGGCACGGTCTGGCCCGTGAGGCGCGCGCAGTCGTGGAT
GCTCTATACGGGCAAAAACGAAAGCGGTCAGCGGCTCGACTCCGTGGCCTGGAGGCTAAGCGAACGGGTT
GGGCTGCGCGTGTACCCCGGTTCGAATCTCGAATCAGGCTGGAGCCGCAGCTAACGTGGTATTGGCACTCC
CGTCTCGACCCAAGCCTGCACCAACCCTCCAGGATACGGAGGCGGGTCGTTTTGCAACTTTTTTTGGAGGC
CGGATGAGACTAGTAAGCGCGGAAAGCGGCCGACCGCGATGGCTCGCTGCCGTAGTCTGGAGAAGAATCG
CCAGGGTTGCGTTGCGGTGTGCCCCGGTTCGAGGCCGGCCGGATTCCGCGGCTAACGAGGGCGTGGCTGCC
CCGTCGTTTCCAAGACCCCATAGCCAGCCGACTTCTCCAGTTACGGAGCGAGCCCCTCTTTTGTTTTGTTTGT
TTTTGCCAGATGCATCCCGTACTGCGGCAGATGCGCCCCCACCACCCTCCACCGCAACAACAGCCCCCTCC
ACAGCCGGCGCTTCTGCCCCCCGCCCCAGCAGCAACTTCCAGCCACGACCGCCGCGGCCGCCGTGAGCGGGG
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
GTGCAGCAGAGCGTGGGCCTGTTCCTGATGCAGGAGGGGGCCACCCCCAGCGCCGCGCTCGACATGACCG
CGCGCAACATGGAGCCCAGCATGTACGCCAGCAACCGCCCCGTTCATCAATAAACTGATGGACTACTTGCAT
CGGGCGGCCGCCATGAACTCTGACTATTTCACCAACGCCATCCTGAATCCCCACTGGCTCCCGCCGCCGGG
GTTCTACACGGGCGAGTACGACATGCCCGACCCCAATGACGGGTTCCTGTGGGACGATGTGGACAGCAGCG
TGTTCTCCCCCCGACCGGGTGCTAACGAGCGCCCCTTGTGGAAGAAGGAAGGCAGCGACCGACGCCCGTCC
TCGGCGCTGTCCGGCCGCGAGGGTGCTGCCGCGGCGGTGCCCGAGGCCGCCAGTCCTTTCCCGAGCTTGCC
CTTCTCGCTGAACAGTATCCGCAGCAGCGAGCTGGGCAGGATCACGCGCCCGCGCTTGCTGGGCGAAGAGG
AGTACTTGAATGACTCGCTGTTGAGACCCGAGCGGGAGAAGAACTTCCCCAATAACGGGATAGAAAGCCT
GGTGGACAAGATGAGCCGCTGGAAGACGTATGCGCAGGAGCACAGGGACGATCCCCGGGCGTCGCAGGGG
GCCACGAGCCGGGGCAGCGCCGCCCGTAAACGCCGGTGGCACGACAGGCAGCGGGGACAGATGTGGGAC
GATGAGGACTCCGCCGACGACAGCAGCGTGTTGGACTTGGGTGGGAGTGGTAACCCGTTCGCTCACCTGCG

CCCCCGTATCGGGCGCATGATGTAAGAGAAACCGAAAATAAATGATACTCACCAAGGCCATGGCGACCAG
CGTGCGTTCGTTTCTTCTCTGTTGTTGTTGTATCTAGTATGATGAGGCGTGCGTACCCGGAGGGTCCTCCTCC
CTCGTACGAGAGCGTGATGCAGCAGGCGATGGCGGCGGCGGCGATGCAGCCCCCGCTGGAGGCTCCTTAC
GTGCCCCCGCGGTACCTGGCGCCTACGGAGGGGCGGAACAGCATTCGTTACTCGGAGCTGGCACCCTTGTA
CGATACCACCCGGTTGTACCTGGTGGACAACAAGTCGGCGGACATCGCCTCGCTGAACTACCAGAACGACC
ACAGCAACTTCCTGACCACCGTGGTGCAGAACAATGACTTCACCCCCACGGAGGCCAGCACCCAGACCATC
AACTTTGACGAGCGCTCGCGGTGGGGCGGCCAGCTGAAAACCATCATGCACACCAACATGCCCAACGTGA
ACGAGTTCATGTACAGCAACAAGTTCAAGGCGCGGGTGATGGTCTCCCGCAAGACCCCCAATGGGGTGAC
AGTGACAGAGGATTATGATGGTAGTCAGGATGAGCTGAAGTATGAATGGGTGGAATTTGAGCTGCCCGAA
GGCAACTTCTCGGTGACCATGACCATCGACCTGATGAACAACGCCATCATCGACAATTACTTGGCGGTGGG
GCGGCAGAACGGGGTGCTGGAGAGCGACATCGGCGTGAAGTTCGACACTAGGAACTTCAGGCTGGGCTGG
GACCCCGTGACCGAGCTGGTCATGCCCGGGGTGTACACCAACGAGGCTTTCCATCCCGATATTGTCTTGCTG
CCCGGCTGCGGGGTGGACTTCACCGAGAGCCCGCCTCAGCAACCTGCTGGGCATTCGCAAGAGGCAGCCCTT
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
TTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTGGTGCAGTTTGCCCCGCGCCACAGACACCTACTTCAGTCTGGGGAACA
AGTTTAGGAACCCCACGGTGGCGCCCACGCACGATGTGACCACCGACCGCAGCCAGCGGCTGACGCTGCG

CTTCGTGCCCGTGGACCGCGAGGACAACACCTACTCGTACAAAGTGCGCTACACGCTGGCCGTGGGCGACA
ACCGCGTGCTGGACATGGCCAGCACCTACTTTGACATCCGCGGCGTGCTGGATCGGGGCCCTAGCTTCAAA
CCCTACTCCGGCACCGCCTACAACAGTCTGGCCCCCAAGGGAGCACCCAACACTTGTCAGTGGACATATAA
AGCCGATGGTGAAACTGCCACAGAAAAAACCTATACATATGGAAATGCACCCGTGCAGGGCATTAACATC
ACAAAAGATGGTATTCAACTTGGAACTGACACCGATGATCAGCCAATCTACGCAGATAAAACCTATCAGCC
TGAACCTCAAGTGGGTGATGCTGAATGGCATGACATCACTGGTACTGATGAAAAGTATGGAGGCAGAGCTC
TTAAGCCTGATACCAAAATGAAGCCTTGTTATGGTTCTTTTGCCAAGCCTACTAATAAAGAAGGAGGTCAG
GCAAATGTGAAAACAGGAACAGGCACTACTAAAGAAATATGACATAGACATGGCTTTCTTTGACAACAGAA
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
GCCACGCGGCCGGTAGGTATGTCTCTTCGGGGGCAGAGGCGGAGGCGACGGGCTCTCGCCGCCGCCGACTTG

GCGGATGGCTGGCAGAGCCCCTTCCGCGTTCGGGGGTGCGCTCCCGGCGGCGCTCTGACTGACTTCCTCCG
CGGCCGGCCATTGTGTTCTCCTAGGGAGGAACAACAAGCATGGAGACTCAGCCATCGCCAACCTCGCCATC
TGCCCCCACCGCCGACGAGAAGCAGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAACCGCCCCCGCCGCCCAGCCCCGCC
ACCTCCGACGCGGCCGTCCCAGACATGCAAGAGATGGAGGAATCCATCGAGATTGACCTGGGCTATGTGAC
GCCCGCGGAGCACGAGGAGGAGCTGGCAGTGCGCTTTTCACAAGAAGAGATACACCAAGAACAGCCAGAG
CAGGAAGCAGAGAATGAGCAGAGTCAGGCTGGGCTCGAGCATGACGGCGACTACCTCCACCTGAGCGGGG
GGGAGGACGCGCTCATCAAGCATCTGGCCCGGCAGGCCACCATCGTCAAGGATGCGCTGCTCGACCGCACC
GAGGTGCCCCCTCAGCGTGGAGGAGCTCAGCCGCGCCTACGAGTTGAACCTCTTCTCGCCGCGCGTGCCCCC
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

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

ChAdV68-CMT-TSNA (SEQ ID NO: 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
ATGACCGGCTGCAGGTGGTAGTTGAGGGAGAGACAGCTGCCGTCCTCCCGGAGGAGGGGGGCCACCTCGT
TCATCATCTCGCGCACGTGCATGTTCTCGCGCACCAGTTCCGCCAGGAGGCGCTCTCCCCCCAGGGATAGG
AGCTCCTGGAGCGAGGCGAAGTTTTTCAGCGGCTTGAGTCCGTCGGCCATGGGCATTTTGGAGAGGGTTTG
TTGCAAGAGTTCCAGGCGGTCCCAGAGCTCGGTGATGTGCTCTACGGCATCTCGATCCAGCAGACCTCCTC
GTTTCGCGGGTTGGGACGGCTGCGGGAGTAGGGCACCAGACGATGGGCGTCCAGCGCAGCCAGGGTCCGG
TCCTTCCAGGGTCGCAGCGTCCGCGTCAGGGTGGTCTCCGTCACGGTGAAGGGGTGCGCGCCGGGCTGGGC
GCTTGCGAGGGTGCGCTTCAGGCTCATCCGGCTGGTCGAAAACCGCTCCCGATCGGCGCCCTGCGCGTCGG
CCAGGTAGCAATTGACCATGAGTTCGTAGTTGAGCGCCTCGGCCGCGTGGCCTTTGGCGCGGAGCTTACCTT
TGGAAGTCTGCCCGCAGGCGGGACAGAGGAGGGACTTGAGGGCGTAGAGCTTGGGGGCGAGGAAGACGG
ACTCGGGGGCGTAGGCGTCCGCGCCGCAGTGGGCGCAGACGGTCTCGCACTCCACGAGCCAGGTGAGGTC
GGGCTGGTCGGGGTCAAAAACCAGTTTCCCGCCGTTCTTTTTGATGCGTTTCTTACCTTTGGTCTCCATGAGC
TCGTGTCCCCGCTGGGTGACAAAGAGGCTGTCCGTGTCCCCGTAGACCGACTTTATGGGCCGGTCCTCGAG
CGGTGTGCCGCGGTCCTCCTCGTAGAGGAACCCCGCCCACTCCGAGACGAAAGCCCGGGTCCAGGCCAGCA

CGAAGGAGGCCACGTGGGACGGGTAGCGGTCGTTGTCCACCAGCGGGTCCACCTTTTCCAGGGTATGCAAA
CACATGTCCCCCTCGTCCACATCCAGGAAGGTGATTGGCTTGTAAGTGTAGGCCACGTGACCGGGGGGTCCC
GGCCCGGGGGGGTATAAAAGGGTGCGGGTCCCTGCTCGTCCTCACTGTCTTCCGGATCGCTGTCCAGGAGCG
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
GCCCGGAGGCAGGGGCGGCAGGGGCACGTCGGCGCCGCCGCGCGGGTAGGTTCTGGTACTGCGCCCGGAGA
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
GATGCGCCCCCCACCACCCTCCACCGCAACAACAGCCCCCTCCACAGCCGGCGCTTCTGCCCCCGCCCCAGC
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
CCAGCAACCGCCCCGTTCATCAATAAACTGATGGACTACTTGCATCGGGCGGCCGCCATGAACTCTGACTAT
TTCACCAACGCCATCCTGAATCCCCACTGGCTCCCGCCGCCGGGGTTCTACACGGGCGAGTACGACATGCC
CGACCCCAATGACGGGTTCCTGTGGGACGATGTGGACAGCAGCCGTGTTCTCCCCCCGACCGGGTGCTAACG
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
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
TACTAAAGAATATGACATAGACATGGCTTTCTTTGACAACAGAAGTGCGGCTGCTGCTGGCCTAGCTCCAG
AAATTGTTTTGTATACTGAAAATGTGGATTTGGAAACTCCAGATACCCATATTGTATACAAAGCAGGCACA
GATGACAGCAGCTCTTCTATTAATTTGGGTCAGCAAGCCATGCCCAACAGACCTAACTACATTGGTTTCAGA
GACAACTTTATCGGGCTCATGTACTACAACAGCACTGGCAATATGGGGGTGCTGGCCGGTCAGGCTTCTCA
GCTGAATGCTGTGGTTGACTTGCAAGACAGAAACACCGAGCTGTCCTACCAGCTCTTGCTTGACTCTCTGGG
TGACAGAACCCGGTATTTCAGTATGTGGAATCAGGCGGTGGACAGCTATGATCCTGATGTGCGCATTATTG
AAAATCATGGTGTGGAGGATGAACTTCCCAACTATTGTTTCCCTCTGGATGCTGTTGGCAGAACAGATACTT
ATCAGGGAATTAAGGCTAATGGAACTGATCAAACCACATGGACCAAAGATGACAGTGTCAATGATGCTAA
TGAGATAGGCAAGGGTAATCCATTCGCCATGGAAATCAACATCCAAGCCAACCTGTGGAGGAACTTCCTCT
ACGCCAACGTGGCCCTGTACCTGCCCGACTCTTACAAGTACACGCCGGCCAATGTTACCCTGCCCACCAAC
ACCAACACCTACGATTACATGAACGGCCGGGTGGTGGCGCCCTCGCTGGTGGACTCCTACATCAACATCGG
GGCGCGCTGGTCGCTGGATCCCATGGACAACGTGAACCCCTTCAACCACCACCGCAATGCGGGGCTGCGCT
ACCGCTCCATGCTCCTGGGCAACGGGCGCTACGTGCCCCTTCCACATCCAGGTGCCCCAGAAATTTTTCGCCA

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
CGACGAGACTCGGGCCGCGAACGCTCTGCAAGGAGAAGGAGGAGCATGAGCACCACAGCGCCCTGGTC
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
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 (SEQ ID NO: 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
CTCCATTGCAGGGCCTCGTGCTCGGGGGTGGTGTTGTAAATCACCCAGTCATAGCAGGGGCGCAGGGCATG
GTGTTGCACAATATCTTTGAGGAGGAGACTGATGGCCACGGGCAGCCCTTTGGTGTAGGTGTTTACAAATC
TGTTGAGCTGGGAGGGATGCATGCGGGGGGAGATGAGGTGCATCTTGGCCTGGATCTTGAGATTGGCGATG
TTACCGCCCAGATCCCGCCTGGGGTTCATGTTGTGCAGGACCACCAGCACGGTGTATCCGGTGCACTTGGG
GAATTTATCATGCAACTTGGAAGGGAAGGCGTGAAAGAATTTGGCGACGCCTTTGTGCCCGCCCAGGTTTT
CCATGCACTCATCCATGATGATGGCGATGGGCCCGTGGGCGGCGGCCTGGGCAAAGACGTTTCGGGGGTCG
GACACATCATAGTTGTGGTCCTGGGTGAGGTCATCATAGGCCATTTTAATGAATTTGGGGCGGAGGGTGCC
GGACTGGGGGACAAAGGTTCCCTCGATCCCGGGGGCGTAGTTCCCCTCACAGATCTGCATCTCCCAGGCTT
TGAGCTCGGAGGGGGGGATCATGTCCACCTGCGGGGCGATAAAGAACACGGTTTCCGGGGCGGGGGAGAT
GAGCTGGGCCGAAAGCAAGTTCCGGAGCAGCTGGGACTTGCCGCAGCCGGTGGGGCCGTAGATGACCCCG
ATGACCGGCTGCAGGTGGTAGTTGAGGGAGAGACAGCTGCCGTCCTCCCGGAGGAGGGGGGCCACCTCGT
TCATCATCTCGCGCACGTGCATGTTCTCGCGCACCAGTTCCGCCAGGAGGCGCTCTCCCCCCCAGGGATAGG
AGCTCCTGGAGCGAGGCGAAGTTTTTCAGCGGCTTGAGTCCGTCGGCCATGGGCATTTTGGAGAGGGTTTG
TTGCAAGAGTTCCAGGCGGTCCCAGAGCTCGGTGATGTGCTCTACGGCATCTCGATCCAGCAGACCTCCTC
GTTTCGCGGGTTGGGACGGCTGCGGGAGTAGGGCACCAGACGATGGGCGTCCAGCGCAGCCAGGGTCCGG
TCCTTCCAGGGTCGCAGCGTCCGCGTCAGGGTGGTCTCCGTCACGGTGAAGGGGTGCGCGCCGGGCTGGGC
GCTTGCGAGGGTGCGCTTCAGGCTCATCCGGCTGGTCGAAAACCGCTCCCGATCGGCGCCCTGCGCGTCGG
CCAGGTAGCAATTGACCATGAGTTCGTAGTTGAGCGCCTCGGCCGCGTGGCCTTTGGCGCGGAGCTTACCTT
TGGAAGTCTGCCCGCAGGCGGGACAGAGGAGGGACTTGAGGGCGTAGAGCTTGGGGGCGAGGAAGACGG
ACTCGGGGGCGTAGGCGTCCGCGCCGCAGTGGGCGCAGACGGTCTCGCACTCCACGAGCCAGGTGAGGTC
GGGCTGGTCGGGGTCAAAAACCAGTTTCCCGCCGTTCTTTTTGATGCGTTTCTTACCTTTGGTCTCCATGAGC
TCGTGTCCCCGCTGGGTGACAAAGAGGCTGTCCGTGTCCCCGTAGACCGACTTTATGGGCCGGTCCTCGAG
CGGTGTGCCGCGGTCCTCCTCGTAGAGGAACCCCGCCCACTCCGAGACGAAAGCCCGGGTCCAGGCCAGCA
CGAAGGAGGCCACGTGGGACGGGTAGCGGTCGTTGTCCACCAGCGGGTCCACCTTTTCCAGGGTATGCAAA
CACATGTCCCCCTCGTCCACATCCAGGAAGGTGATTGGCTTGTAAGTGTAGGCCACGTGACCGGGGGTCCC
GGCCGGGGGGGTATAAAAGGGTGCGGGTCCCTGCTCGTCCTCACTGTCTTCCGGATCGCTGTCCAGGAGCG
CCAGCTGTTGGGGTAGGTATTCCCTCTCGAAGGCGGGCATGACCTCGGCACTCAGGTTGTCAGTTTCTAGAA
ACGAGGAGGATTTGATATTGACGGTGCCGGCGGAGATGCCTTTCAAGAGCCCCTCGTCCATCTGGTCAGAA
AAGACGATCTTTTTGTTGTCGAGCTTGGTGGCGAAGGAGCCGTAGAGGGCGTTGGAGAGGAGCTTGGCGAT
GGAGCGCATGGTCTGGTTTTTTTCCTTGTCGGCGCGCTCCTTGGCGGCGATGTTGAGCTGCACGTACTCGCG
CGCCACGCACTTCCATTCGGGGAAGACGGTGGTCAGCTCGTCGGGCACGATTCTGACCTGCCAGCCCCGAT
TATGCAGGGTGATGAGGTCCACACTGGTGGCCACCTCGCCGCGCAGGGGCTCATTAGTCCAGCAGAGGCGT
CCGCCCTTGCGCGAGCAGAAGGGGGGCAGGGGGTCCAGCATGACCTCGTCGGGGGGGTCGGCATCGATGG
TGAAGATGCCGGGCAGGAGGTCGGGGTCAAAGTAGCTGATGGAAGTGGCCAGATCGTCCAGGGCAGCTTG
CCATTCGCGCACGGCCAGCGCGCGCTCGTAGGGACTGAGGGGCCGTGCCCCAGGGCATGGGATGGGTAAGC
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
GGTTGGGAGCGGGGCGGCGATGCTGCTGGTGATGAAGTTGAAATAGGCGGTTCTGAGACGGCGGATGGT
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
GCCTTCCTCAGCACCCAGCCCGCCAACGTGCCCCCGGGGCCAGGAGGACTACACCAACTTCATCAGCGCCCT
GCGCCTGATGGTGACCGAGGTGCCCCAGAGCGAGGTGTACCAGTCCGGGCCGGACTACTTCTTCCAGACCA
GTCGCCAGGGCTTGCAGACCGTGAACCTGAGCCAGGCTTTCAAGAACTTGCAGGGCCTGTGGGGCGTGCAG
GCCCCGGTCGGGGACCGCGCGACGGTGTCGAGCCTGCTGACGCCGAACTCGCGCCTGCTGCTGCTGCTGGT
GGCCCCCTTCACGGACAGCGGCAGCATCAACCGCAACTCGTACCTGGGCTACCTGATTAACCTGTACCGCG
AGGCCATCGGCCAGGCGCACGTGGACGAGCAGACCTACCAGGAGATCACCCACGTGAGCCGCGCCCTGGG
CCAGGACGACCCGGGCAACCTGGAAGCCACCCTGAACTTTTTGCTGACCAACCGGTCGCAGAAGATCCCGC
CCCAGTACGCGCTCAGCACCGAGGAGGAGCGCATCCTGCGTTACGTGCAGCAGAGCGTGGGCCTGTTCCTG
ATGCAGGAGGGGGCCACCCCCAGCGCCGCGCTCGACATGACCGCGCGCAACATGGAGCCCAGCATGTACG
CCAGCAACCGCCCCGTTCATCAATAAACTGATGGACTACTTGCATCGGGCGGCCGCCATGAACTCTGACTAT
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
CGAGTTCGCCCCCCCGGCGGCGCGTGCAGTGGCGCGGGCGGAAGGTGCAACCGGTGCTGAGACCCGGCACC
ACCGTGGTCTTCACGCCCGGCGAGCGCTCCGGCACCGCTTCCAAGCGCTCCTACGACGAGGTGTACGGGGA
TGATGATATTCTGGAGCAGGCGGCCGAGCGCCTGGGCGAGTTTGCTTACGGCAAGCGCAGCCGTTCCGCAC
CGAAGGAAGAGGCGGTGTCCATCCCGCTGGACCACGGCAACCCCACGCCGAGCCTCAAGCCCGTGACCTT
GCAGCAGGTGCTGCCGACCGCGGCGCCGCGCCGGGGGTTCAAGCGCGAGGGCGAGGATCTGTACCCCACC
ATGCAGCTGATGGTGCCCAAGCGCCAGAAGCTGGAAGACGTGCTGGAGACCATGAAGGTGGACCCGGACG

TGCAGCCCGAGGTCAAGGTGCGGCCCATCAAGCAGGTGGCCCCGGGCCTGGGCGTGCAGACCGTGGACAT
CAAGATTCCCACGGAGCCCATGGAAACGCAGACCGAGCCCATGATCAAGCCCAGCACCAGCACCATGGAG
GTGCAGACGGATCCCTGGATGCCATCGGCTCCTAGTCGAAGACCCCGGCGCAAGTACGGCGCGGCCAGCCT
GCTGATGCCCAACTACGCGCTGCATCCTTCCATCATCCCCACGCCGGGCTACCGCGGCACGCGCTTCTACCG
CGGTCATACCAGCAGCCGCCGCCGCAAGACCACCACTCGCCGCCGCCGTCGCCGCACCGCCGCTGCAACCA
CCCCTGCCGCCCTGGTGCGGAGAGTGTACCGCCGCGGCCGCGCACCTCTGACCCTGCCGCGCGCGCGCTAC
CACCCGAGCATCGCCATTTAAACTTTCGCCTGCTTTGCAGATCAATGGCCCTCACATGCCGCCTTCGCGTTC
CCATTACGGGCTACCGAGGAAGAAAACCGCGCCGTAGAAGGCTGGCGGGGAACGGGATGCGTCGCCACCA
CCACCGGCGGCGGCGCGCCATCAGCAAGCGGTTGGGGGGAGGCTTCCTGCCCGCGCTGATCCCCATCATCG
CCGCGGCGATCGGGGCGATCCCCGGCATTGCTTCCGTGGCGGTGCAGGCCTCTCAGCGCCACTGAGACACA
CTTGGAAACATCTTGTAATAAACCAATGGACTCTGACGCTCCTGGTCCTGTGATGTGTTTTCGTAGACAGAT
GGAAGACATCAATTTTTCGTCCCTGGCTCCGCGACACGGCACGCGGCCGTTCATGGGCACCTGGAGCGACA
TCGGCACCAGCCAACTGAACGGGGGCGCCTTCAATTGGAGCAGTCTCTGGAGCGGGCTTAAGAATTTCGGG
TCCACGCTTAAAACCTATGGCAGCAAGGCGTGGAACAGCACCACAGGGCAGGCGCTGAGGGATAAGCTGA
AAGAGCAGAACTTCCAGCAGAAGGTGGTCGATGGGCTCGCCTCGGGCATCAACGGGGTGGTGGACCTGGC
CAACCAGGCCGTGCAGCGGCAGATCAACAGCCGCCTGGACCCGGTGCCGCCCGCCGGCTCCGTGGAGATG
CCGCAGGTGGAGGAGGAGCTGCCTCCCCTGGACAAGCGGGGCGAGAAGCGACCCCGCCCCGATGCGGAGG
AGACGCTGCTGACGCACACGGACGAGCCGCCCCCGTACGAGGAGGCGGTGAAACTGGGTCTGCCCACCAC
GCGGCCCATCGCGCCCCTGGCCACCGGGGTGCTGAAACCCGAAAAGCCCGCGACCCTGGACTTGCCTCCTC
CCCAGCCTTCCCGCCCCTCTACAGTGGCTAAGCCCCTGCCGCCGGTGGCCGTGGCCCCGCGCGCGACCCGGG
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
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
GGCTCTGAACCTGCCCCCCCAAAGTCATGAGCGCGGTCATGGACCAGGTGCTCATCAAGCGCGCGTCGCCCA
TCTCCGAGGACGAGGGCATGCAAGACTCCGAGGAGGGCAAGCCCGTGGTCAGCGACGAGCAGCTGGCCCG
GTGGCTGGGTCCTAATGCTAGTCCCCAGAGTTTGGAAGAGCGGCGCAAACTCATGATGGCCGTGGTCCTGG
TGACCGTGGAGCTGGAGTGCCTGCGCCGCTTCTTCGCCGACGCGGAGACCCTGCGCAAGGTCGAGGAGAAC
CTGCACTACCTCTTCAGGCACGGGTTCGTGCGCCAGGCCTGCAAGATCTCCAACGTGGAGCTGACCAACCT
GGTCTCCTACATGGGCATCTTGCACGAGAACCGCCTGGGGCAGAACGTGCTGCACACCACCCTGCGCGGGG
AGGCCCGGCGCGACTACATCCGCGACTGCGTCTACCTCTACCTCTGCCACACCTGGCAGACGGGCATGGGC
GTGTGGCAGCAGTGTCTGGAGGAGCAGAACCTGAAAGAGCTCTGCAAGCTCCTGCAGAAGAACCTCAAGG
GTCTGTGGACCGGGTTCGACGAGCGCACCACCGCCTCGGACCTGGCCGACCTCATTTTCCCCGAGCGCCTC
AGGCTGACGCTGCGCAACGGCCTGCCCGACTTTATGAGCCAAAGCATGTTGCAAAACTTTCGCTCTTTCATC
CTCGAACGCTCCGGAATCCTGCCCGCCACCTGCTCCGCGCTGCCCTCGGACTTCGTGCCGCTGACCTTCCGC
GAGTGCCCCCCGCCGCTGTGGAGCCACTGCTACCTGCTGCGCCTGGCCAACTACCTGGCCTACCACTCGGA
CGTGATCGAGGACGTCAGCGGCGAGGGCCTGCTCGAGTGCCACTGCCGCTGCAACCTCTGCACGCCGCACC
GCTCCCTGGCCTGCAACCCCCAGCTGCTGAGCGAGACCCAGATCATCGGCACCTTCGAGTTGCAAGGGCCC
AGCGAAGGCGAGGGTTCAGCCGCCAAGGGGGGTCTGAAACTCACCCCGGGGCTGTGGACCTCGGCCTACT
TGCGCAAGTTCGTGCCCGAGGACTACCATCCCTTCGAGATCAGGTTCTACGAGGACCAATCCCATCCGCCC
AAGGCCGAGCTGTCGGCCTGCGTCATCACCCAGGGGGCGATCCTGGCCCAATTGCAAGCCATCCAGAAATC
CCGCCAAGAATTCTTGCTGAAAAAGGGCCGCGGGGTCTACCTCGACCCCCAGACCGGTGAGGAGCTCAACC
CCGGCTTCCCCCAGGATGCCCCGAGGAAACAAGAAGCTGAAAGTGGAGCTGCCGCCCGTGGAGGATTTGG
AGGAAGACTGGGAGAACAGCAGTCAGGCAGAGGAGGAGGAGATGGAGGAAGACTGGGACAGCACTCAGG
CAGAGGAGGACAGCCTGCAAGACAGTCTGGAGGAAGACGAGGAGGAGGCAGAGGAGGAGGTGGAAGAAG
CAGCCGCCGCCAGACCGTCGTCCTCGGCGGGGGAGAAAGCAAGCAGCACGGATACCATCTCCGCTCCGGG
TCGGGGTCCCGCTCGACCACACAGTAGATGGGACGAGACCGGACGATTCCCGAACCCCACCACCCAGACC
GGTAAGAAGGAGCGGCAGGGATACAAGTCCTGGCGGGGGCACAAAAACGCCATCGTCTCCTGCTTGCAGG
CCTGCGGGGGCAACATCTCCTTCACCCGGCGCTACCTGCTCTTCCACCGCGGGGTGAACTTTCCCCGCAACA
TCTTGCATTACTACCGTCACCTCCACAGCCCCTACTACTTCCAAGAAGAGGCAGCAGCAGAAAAAGAC
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
CCTCCCAGGACATGGAATACACCACCCTCTCCCCCCCGCACAGCCTTGAACATCTGAATGCCATTGGTGATG
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

XXIII. Imunogenicidade no sistema de expressão de cassete regulado por TETr

[572] Os camundongos Balb/c foram imunizados com $1x10^{10}$ VP de vacinas de ChAdV68 que expressam um modelo de cassete de antígeno sob o controle do promotor CMV normal (ChAdV-MAG) ou um promotor regulado por TETo (TET-ChAdV-MAG). 12 dias após a vacinação, os baços foram colhidos e suspensões de células únicas feitas. A produção de IFN-gama específica para antígeno em células T CD8 foi medida usando ICS. Como mostrado na **Fig. 48** e **Tabela 43**, a eficácia *in vivo* foi a mesma ou melhor quando os camundongos que foram imunizados com o cassete de antígeno expresso a partir do promotor regulado por TETo. Assim, o vetor ChAd regulado foi igualmente potente, e potencialmente mais potente, na indução de respostas imunes CD8+ aos alvos da vacina *in vivo*.

[573] Como descrito em mais detalhes acima, macacos Rhesus também foram imunizados com ChAdV68.5WTnt.MAG25mer ("ChAdV68-CMV-MAG"; SEQ ID NO: 2) ou ChAdV68-E4d-CMT-MAG (SEQ ID NO: 71), com cada grupo também administrado um anticorpo anti-CTLA4 (Ipilimumabe). As respostas das células T foram analisadas quanto à produção de IFN-gama por ELISpot após estimulação com 6 diferentes epítopos de classe I de macaco rhesus Mamu-A * 01. Conforme mostrado na **Fig. 42B** e **Fig.42C**, e quantificado na **Tabela 41B** (ChAdV68-CMV-MAG) e **Tabela 41C** (ChAdV68-E4d-CMT-MAG), imunização com um construto apresentando uma região de resposta "CMT" no fundo do vetor deletado de E4 demonstrou pelo menos respostas imunes equivalentes, com uma tendência positiva para uma resposta aumentada em vetores deletados de CMT-E4.

Tabela 43 - % de resposta de CD8+ em camundongos

imunizados com ChAdV68-MAG e ChAdV68-Teto-MAG

ChAdV68-MAG 1e10 VP	**no. do camundongo**	**% de CD8+**	**ChAdV68-TETo-MAG 1e10 VP**	**no. do camundongo**	**% de 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
Mediana		**9,61**	**Mediana**		**18,25**

XXIV. Seleção de populações de pacientes

[574] Um ou mais antígenos são usados para formular uma composição de vacina usando um adenovírus modificado, tal como o adenovírus modificado E4, aqui descrito. A vacina é administrada a um paciente, por exemplo, para tratar o câncer. Em certos casos, o paciente é selecionado, *por exemplo*, usando um diagnóstico complementar ou um ensaio NGS de painel de genes de câncer comumente usado, como FoundationOne, FoundationOne CDx, Guardant 360, Guardant OMNI ou MSK IMPACT. Critérios de seleção de pacientes exemplificativos são descritos abaixo.

Seleção do paciente

[575] A seleção de pacientes para vacinação com neoantígenos compartilhados é realizada considerando a expressão do gene tumoral, o status de mutação somática e o tipo de HLA do paciente. Especificamente, um paciente é considerado elegível para a terapia de vacina se:

(a) o paciente carregar um alelo HLA predito ou conhecido por apresentar um epítopo incluído em uma vacina e o tumor do paciente expressar um gene com a sequência de epítopo, ou

(b) o paciente carregar um alelo HLA predito ou conhecido por apresentar um epítopo incluído em uma vacina, e o tumor do paciente carregar a mutação que dá origem à sequência de epítopo, ou

(c) O mesmo que (b), mas também exigindo que o tumor do paciente expresse o gene com a mutação acima de um certo limiar (por exemplo, 1 TPM ou 10 TPM), ou

(d) O mesmo que (b), mas também exigindo que o tumor do paciente expresse a mutação acima de um certo limiar (por exemplo, pelo menos 1 leitura mutada observada no nível de RNA)

(e) O mesmo que (b), mas também requerendo ambos os critérios adicionais em (c) e (d)

(f) Qualquer uma das opções acima, mas também opcionalmente exigindo que a perda do alelo HLA de apresentação não seja detectada no tumor

[576] A expressão do gene é medida no nível de RNA ou proteína por qualquer um dos métodos estabelecidos, incluindo RNASeq, microarranjo, PCR, Nanostring, ISH, espectrometria de massa ou IHC. Limiares para positividade da expressão gênica são estabelecidos por vários métodos, incluindo: (1) probabilidade predita de apresentação do epítopo pelo alelo HLA em vários níveis de expressão gênica, (2) correlação da expressão gênica e apresentação do epítopo HLA medida por espectrometria de massa, e/ou (3) benefícios clínicos da vacinação obtidos para pacientes que expressam os genes em vários níveis. A seleção de pacientes é ainda estendida para exigir positividade para mais de 1 epítopo, por exemplo, pelo menos 2, 3, 4 ou 5 epítopos incluídos na vacina.

[577] O status mutacional somático é avaliado por qualquer um dos métodos estabelecidos, incluindo sequenciamento de exoma (NGS DNASeq), sequenciamento de exoma direcionado (painel de genes), sequenciamento de transcriptoma (RNASeq), sequenciamento de Sanger, ensaios de genotipagem baseados em PCR (por exemplo, Taqman ou PCR de gota digital), métodos baseados em espectrometria de massa (por exemplo, por Sequenom) ou qualquer outro método conhecido pelos versados na técnica.

[578] Novos neoantígenos compartilhados adicionais são identificados usando qualquer um dos métodos descritos, *por exemplo*, por espectrometria de massa. Estes neoantígenos compartilhados recentemente identificados são incorporados nos cassetes de vacina aqui descritos.

[579] Neoantígenos previamente validados são adicionalmente validados como sendo apresentados por alelos HLA adicionais e informam a seleção de neoantígenos para o cassete de vacina e/ou expande a população potencial tratável.

[580] A inclusão de um novo neoantígeno permite o alargamento do tipo de tumor endereçável (por exemplo, NSCLC com mutação de EGFR) ou a inclusão de pacientes com um novo tipo de tumor.

Certas sequências

[581] Os vetores, cassetes e anticorpos aqui referidos são descritos abaixo e referidos por SEQ ID NO.

Sequência ChAdVC68 de comprimento total "ChAdV68.5WTnt" (SEQ ID NO: 1); Sequência AC_000011.1 com nucleotídeos ATCC VR-594 correspondentes substituídos em cinco posições; W na posição 6 = A ou T

CCATCWTCAATAATATACCTCAAACTTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTGAATTTGGGGAGGA
AGGGCGGTGATTGGTCGAGGGATGAGCGACCGTTAGGGGCGGGGCGAGTGACGTTTTGATGACGTGGTTGCG
AGGAGGAGCCAGTTTGCAAGTTCTCGTGGGAAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTTGAACACGGAAATAC
TCAATTTTCCCGCGCTCTCTGACAGGAAATGAGGTGTTTCTGGGCGGATGCAAGTGAAAACGGGCCATTTTCG
CGCGAAAACTGAATGAGGAAGTGAAAATCTGAGTAATTTCGCGTTTATGGCAGGGAGGAGTATTTGCCGAGG
GCCGAGTAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTACCGTGTTTTTCACCTAAATTTCCGCGTACGGTGT
CAAAGTCCGGTGTTTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGCCAGGGTATTTAAACCTGCGCTCTCCAGTCAAGAGG
CCACTCTTGAGTGCCAGCGAGAAGAGTTTTCTCCTCCGCGCCGCGAGTCAGATCTACACTTTGAAAGATGAGG
CACCTGAGAGACCTGCCCGATGAGAAAATCATCATCGCTTCCGGGAACGAGATTCTGGAACTGGTGGTAAAT
GCCATGATGGGCGACGACCCTCCGGAGCCCCCCACCCCATTTGAGACACCTTCGCTGCACGATTTGTATGATC
TGGAGGTGGATGTGCCCGAGGACGATCCCAATGAGGAGGCGGTAAATGATTTTTTTAGCGATGCCGCGCTGC
TAGCTGCCGAGGAGGCTTCGAGCTCTAGCTCAGACAGCGACTCTTCACTGCATACCCCTAGACCCGGCAGAG
GTGAGAAAAAGATCCCCGAGCTTAAAGGGGAAGAGATGGACTTGCGCTGCTATGAGGAATGCTTGCCCCCGA
GCGATGATGAGGACGAGCAGGCGATCCAGAACGCAGCGAGCCAGGGAGTGCAAGCCGCCAGCGAGAGCTTT
GCGCTGGACTGCCCGCCTCTGCCCGGACACGGCTGTAAGTCTTGTGAATTTCATCGCATGAATACTGGAGATA
AAGCTGTGTTGTGTGCACTTTGCTATATGAGAGCTTACAACCATTGTGTTTACAGTAAGTGTGATTAAGTTGA
ACTTTAGAGGGAGGCAGAGAGCAGGGTGACTGGGCGATGACTGGTTTATTTATGTATATATGTTCTTTATATA
GGTCCCGTCTCTGACGCAGATGATGAGACCCCCACTACAAAGTCCACTTCGTCACCCCCAGAAATTGGCACAT
CTCCACCTGAGAATATTGTTAGACCAGTTCCTGTTAGAGCCACTGGGAGGAGAGCAGCTGTGGAATGTTTGGA
TGACTTGCTACAGGGTGGGGTTGAACCTTTGGACTTGTGTACCCGGAAACGCCCCAGGCACTAAGTGCCACAC
ATGTGTGTTTACTTGAGGTGATGTCAGTATTTATAGGGTGTGGAGTGCAATAAAAAATGTGTTGACTTTAAGT
GCGTGGTTTATGACTCAGGGGTGGGGACTGTGAGTATATAAGCAGGTGCAGACCTGTGTGGTTAGCTCAGAG
CGGCATGGAGATTTGGACGGTCTTGGAAGACTTTCACAAGACTAGACAGCTGCTAGAGAACGCCTCGAACGG
AGTCTCTTACCTGTGGAGATTCTGCTTCGGTGGCGACCTAGCTAGGCTAGTCTACAGGGCCAAACAGGATTAT
AGTGAACAATTTGAGGTTATTTTGAGAGAGTGTTCTGGTCTTTTTGACGCTCTTAACTTGGGCCATCAGTCTCA
CTTTAACCAGAGGATTTCGAGAGCCCTTGATTTTACTACTCCTGGCAGAACCACTGCAGCAGTAGCCTTTTTTG
CTTTTATTCTTGACAAATGGAGTCAAGAAACCCATTTCAGCAGGGATTACCAGCTGGATTTCTTAGCAGTAGC
TTTGTGGAGAACATGGAAGTGCCAGCGCCTGAATGCAATCTCCGGCTACTTGCCGGTACAGCCGCTAGACACT
CTGAGGATCCTGAATCTCCAGGAGAGTCCCAGGGCACGCCAACGTCGCCAGCAGCAGCAGCAGGAGGAGGA
TCAAGAAGAGAACCCGAGAGCCGGCCTGGACCCTCCGGCGGAGGAGGAGGAGTAGCTGACCTGTTTCCTGAA
CTGCGCCGGGTGCTGACTAGGTCTTCGAGTGGTCGGGAGAGGGGGATTAAGCGGGAGAGGCATGATGAGACT
AATCACAGAACTGAACTGACTGTGGGTCTGATGAGTCGCAAGCGCCCAGAAACAGTGTGGTGGCATGAGGTG
CAGTCGACTGGCACAGATGAGGTGTCGGTGATGCATGAGAGGTTTTCTCTAGAACAAGTCAAGACTTGTTGGT
TAGAGCCTGAGGATGATTGGGAGGTAGCCATCAGGAATTATGCCAAGCTGGCTCTGAGGCCAGACAAGAAGT
ACAAGATTACTAAGCTGATAAATATCAGAAATGCCTGCTACATCTCAGGGAATGGGGCTGAAGTGGAGATCT
GTCTCCAGGAAAGGGTGGCTTTCAGATGCTGCATGATGAATATGTACCCGGGAGTGGTGGGCATGGATGGGG
TTACCTTTATGAACATGAGGTTCAGGGGAGATGGGTATAATGGCACGGTCTTTATGGCCAATACCAAGCTGAC
AGTCCATGGCTGCTCCTTCTTTGGGTTTAATAACACCTGCATCGAGGCCTGGGGTCAGGTCGGTGTGAGGGGC
TGCAGTTTTTCAGCCAACTGGATGGGGGTCGTGGGCAGGACCAAGAGTATGCTGTCCGTGAAGAAATGCTTG
TTTGAGAGGTGCCACCTGGGGGTGATGAGCGAGGGCGAAGCCAGAATCCGCCACTGCGCCTCTACCGAGACG
GGCTGCTTTGTGCTGTGCAAGGGCAATGCTAAGATCAAGCATAATATGATCTGTGGAGCCTCGGACGAGCGC
GGCTACCAGATGCTGACCTGCGCCGGCGGGAACAGCCATATGCTGGCCACCGTACATGTGGCTTCCCATGCTC
GCAAGCCCTGGCCCGAGTTCGAGCACAATGTCATGACCAGGTGCAATATGCATCTGGGGTCCCGCCGAGGCA
TGTTCATGCCCTACCAGTGCAACCTGAATTATGTGAAGGTGCTGCTGGAGCCCGATGCCATGTCCAGAGTGAG
CCTGACGGGGGTGTTTGACATGAATGTGGAGGTGTGGAAGATTCTGAGATATGATGAATCCAAGACCAGGTG
CCGAGCCTGCGAGTGCGGAGGGAAGCATGCCAGGTTCCAGCCCGTGTGTGTGGATGTGACGGAGGACCTGCG
ACCCGATCATTTGGTGTTGCCCTGCACCGGGACGGAGTTCGGTTCCAGCGGGGAAGAATCTGACTAGAGTGA
GTAGTGTTCTGGGGCGGGGGAGGACCTGCATGAGGGCCAGAATAACTGAAATCTGTGCTTTTCTGTGTGTTGC
AGCAGCATGAGCGGAAGCGGCTCCTTTGAGGGAGGGGTATTCAGCCCTTATCTGACGGGGCGTCTCCCCTCCT
GGGCGGGAGTGCGTCAGAATGTGATGGGATCCACGGTGGACGGCCGGCCCGTGCAGCCCGCGAACTCTTCAA
CCCTGACCTATGCAACCCTGAGCTCTTCGTCGTTGGACGCAGCTGCCGCCGCAGCTGCTGCATCTGCCGCCAG
CGCCGTGCGCGGAATGGCCATGGGCGCCGGCTACTACGGCACTCTGGTGGCCAACTCGAGTTCCACCAATAA
TCCCGCCAGCCTGAACGAGGAGAAGCTGTTGCTGCTGATGGCCCAGCTCGAGGCCTTGACCCAGCGCCTGGG
CGAGCTGACCCAGCAGGTGGCTCAGCTGCAGGAGCAGACGCGGGCCGCGGTTGCCACGGTGAAATCCAAATA
AAAAATGAATCAATAAATAAACGGAGACGGTTGTTGATTTTAACACAGAGTCTGAATCTTTATTTGATTTTTC
GCGCGCGGTAGGCCCTGGACCACCGGTCTCGATCATTGAGCACCCGGTGGATCTTTTCCAGGACCCGGTAGA

GGTGGGCTTGGATGTTGAGGTACATGGGCATGAGCCCGTCCCGGGGGTGGAGGTAGCTCCATTGCAGGGCCT
CGTGCTCGGGGGTGGTGTTGTAAATCACCCAGTCATAGCAGGGGCGCAGGGCATGGTGTTGCACAATATCTTT
GAGGAGGAGACTGATGGCCACGGGCAGCCCTTTGGTGTAGGTGTTTACAAATCTGTTGAGCTGGGAGGGATG
CATGCGGGGGGAGATGAGGTGCATCTTGGCCTGGATCTTGAGATTGGCGATGTTACCGCCCAGATCCCGCCTG
GGGTTCATGTTGTGCAGGACCACCAGCACGGTGTATCCGGTGCACTTGGGGAATTTATCATGCAACTTGGAAG
GGAAGGCGTGAAAGAATTTGGCGACGCCTTTGTGCCCGCCCAGGTTTTCCATGCACTCATCCATGATGATGGC
GATGGGCCCGTGGGCGGCGGCCTGGGCAAAGACGTTTCGGGGGTCGGACACATCATAGTTGTGGTCCTGGGT
GAGGTCATCATAGGCCATTTTAATGAATTTGGGGCGGAGGGTGCCGGACTGGGGGACAAAGGTACCCTCGAT
CCCGGGGGCGTAGTTCCCCTCACAGATCTGCATCTCCCAGGCTTTGAGCTCGGAGGGGGGGATCATGTCCACC
TGCGGGGCGATAAAGAACACGGTTTCCGGGGCGGGGGAGATGAGCTGGGCCGAAAGCAAGTTCCGGAGCAG
CTGGGACTTGCCGCAGCCGGTGGGGCCGTAGATGACCCCGATGACCGGCTGCAGGTGGTAGTTGAGGGAGAG
ACAGCTGCCGTCCTCCCGGAGGAGGGGGGCCACCTCGTTCATCATCTCGCGCACGTGCATGTTCTCGCGCACC
AGTTCCGCCAGGAGGCGCTCTCCCCCCAGGGATAGGAGCTCCTGGAGCGAGGCGAAGTTTTTCAGCGGCTTG
AGTCCGTCGGCCATGGGCATTTTGGAGAGGGTTTGTTGCAAGAGTTCCAGGCGGTCCCAGAGCTCGGTGATGT
GCTCTACGGCATCTCGATCCAGCAGACCTCCTCGTTTCGCGGGTTGGGACGGCTGCGGGAGTAGGGCACCAG
ACGATGGGCGTCCAGCGCAGCCAGGGTCCGGTCCTTCCAGGGTCGCAGCGTCCGCGTCAGGGTGGTCTCCGT
CACGGTGAAGGGGTGCGCGCCGGGCTGGGCGCTTGCGAGGGTGCGCTTCAGGCTCATCCGGCTGGTCGAAAA
CCGCTCCCGATCGGCGCCCTGCGCGTCGGCCAGGTAGCAATTGACCATGAGTTCGTAGTTGAGCGCCTCGGCC
GCGTGGCCTTTGGCGCGGAGCTTACCTTTGGAAGTCTGCCCGCAGGCGGGACAGAGGAGGGACTTGAGGGCG
TAGAGCTTGGGGGCGAGGAAGACGGACTCGGGGGCGTAGGCGTCCGCGCCGCAGTGGGCGCAGACGGTCTC
GCACTCCACGAGCCAGGTGAGGTCGGGCTGGTCGGGGTCAAAAACCAGTTTCCCGCCGTTCTTTTTGATGCGT
TTCTTACCTTTGGTCTCCATGAGCTCGTGTCCCCGCTGGGTGACAAAGAGGCTGTCCGTGTCCCCGTAGACCG
ACTTTATGGGCCGGTCCTCGAGCGGTGTGCCGCGGTCCTCCTCGTAGAGGAACCCCGCCCACTCCGAGACGAA
AGCCCGGGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCCACGTGGGACGGGTAGCGGTCGTTGTCCACCAGCGGGTCCAC
CTTTTCCAGGGTATGCAAACACATGTCCCCCTCGTCCACATCCAGGAAGGTGATTGGCTTGTAAGTGTAGGCC
ACGTGACCGGGGGTCCCGGCCGGGGGGGTATAAAAGGGTGCGGGTCCCTGCTCGTCCTCACTGTCTTCCGGA
TCGCTGTCCAGGAGCGCCAGCTGTTGGGGTAGGTATTCCCTCTCGAAGGCGGGCATGACCTCGGCACTCAGGT
TGTCAGTTTCTAGAAACGAGGAGGATTTGATATTGACGGTGCCGGCGGAGATGCCTTTCAAGAGCCCCTCGTC
CATCTGGTCAGAAAAGACGATCTTTTTGTTGTCGAGCTTGGTGGCGAAGGAGCCGTAGAGGGCGTTGGAGAG
GAGCTTGGCGATGGAGCGCATGGTCTGGTTTTTTTCCTTGTCGGCGCGCTCCTTGGCGGCGATGTTGAGCTGC
ACGTACTCGCGCGCCACGCACTTCCATTCGGGGAAGACGGTGGTCAGCTCGTCGGGCACGATTCTGACCTGCC
AGCCCCGATTATGCAGGGTGATGAGGTCCACACTGGTGGCCACCTCGCCGCGCAGGGGCTCATTAGTCCAGC
AGAGGCGTCCGCCCTTGCGCGAGCAGAAGGGGGGCAGGGGGTCCAGCATGACCTCGTCGGGGGGGTCGGCA
TCGATGGTGAAGATGCCGGGCAGGAGGTCGGGGTCAAAGTAGCTGATGGAAGTGGCCAGATCGTCCAGGGC
AGCTTGCCATTCGCGCACGGCCAGCGCGCGCTCGTAGGGACTGAGGGGCGTGCCCCAGGGCATGGGATGGGT
AAGCGCGGAGGCGTACATGCCGCAGATGTCGTAGACGTAGAGGGGCTCCTCGAGGATGCCGATGTAGGTGGG
GTAGCAGCGCCCCCCGCGGATGCTGGCGCGCACGTAGTCATACAGCTCGTGCGAGGGGGCGAGGAGCCCCGG
GCCCAGGTTGGTGCGACTGGGCTTTCGGCGCGGTAGACGATCTGGCGGAAAATGGCATGCGAGTTGGAGGA
GATGGTGGGCCTTTGGAAGATGTTGAAGTGGGCGTGGGGCAGTCCGACCGAGTCGCGGATGAAGTGGGCGTA
GGAGTCTTGCAGCTTGGCGACGAGCTCGGCGGTGACTAGGACGTCCAGAGCGCAGTAGTCGAGGGTCTCCTG
GATGATGTCATACTTGAGCTGTCCCTTTTGTTTCCACAGCTCGCGGTTGAGAAGGAACTCTTCGCGGTCCTTCC
AGTACTCTTCGAGGGGGAACCCGTCCTGATCTGCACGGTAAGAGCCTAGCATGTAGAACTGGTTGACGGCCTT
GTAGGCGCAGCAGCCCTTCTCCACGGGGAGGGCGTAGGCCTGGGCGGCCTTGCGCAGGGAGGTGTGCGTGAG
GGCGAAAGTGTCCCTGACCATGACCTTGAGGAACTGGTGCTTGAAGTCGATATCGTCGCAGCCCCCCTGCTCC
CAGAGCTGGAAGTCCGTGCGCTTCTTGTAGGCGGGGTTGGGCAAAGCGAAAGTAACATCGTTGAAGAGGATC
TTGCCCGCGCGGGGCATAAAGTTGCGAGTGATGCGGAAAGGTTGGGGCACCTCGGCCCGGTTGTTGATGACC
TGGGCGGCGAGCACGATCTCGTCGAAGCCGTTGATGTTGTGGCCCACGATGTAGAGTTCCACGAATCGCGGA
CGGCCCTTGACGTGGGGCAGTTTCTTGAGCTCCTCGTAGGTGAGCTCGTCGGGGTCGCTGAGCCCGTGCTGCT
CGAGCGCCCAGTCGGCGAGATGGGGGTTGGCGCGGAGGAAGGAAGTCCAGAGATCCACGGCCAGGGCGGTT
TGCAGACGGTCCCGGTACTGACGGAACTGCTGCCCGACGGCCATTTTTTCGGGGGTGACGCAGTAGAAGGTG
CGGGGGTCCCCGTGCCAGCGATCCCATTTGAGCTGGAGGGCGAGATCGAGGGCGAGCTCGACGAGCCGGTCG
TCCCCGGAGAGTTTCATGACCAGCATGAAGGGGACGAGCTGCTTGCCGAAGGACCCCATCCAGGTGTAGGTT
TCCACATCGTAGGTGAGGAAGAGCCTTTCGGTGCGAGGATGCGAGCCGATGGGGAAGAACTGGATCTCCTGC
CACCAATTGGAGGAATGGCTGTTGATGTGATGGAAGTAGAAATGCCGACGGCGCGCCGAACACTCGTGCTTG
TGTTTATACAAGCGGCCACAGTGCTCGCAACGCTGCACGGGATGCACGTGCTGCACGAGCTGTACCTGAGTTC
CTTTGACGAGGAATTTCAGTGGGAAGTGGAGTCGTGGCGCCTGCATCTCGTGCTGTACTACGTCGTGGTGGTC
GGCCTGGCCCTCTTCTGCCTCGATGGTGGTCATGCTGACGAGCCCGCGCGGGAGGCAGGTCCAGACCTCGGC
GCGAGCGGGTCGGAGAGCGAGGACGAGGGCGCGCAGGCCGGAGCTGTCCAGGGTCCTGAGACGCTGCGGAG
TCAGGTCAGTGGGCAGCGGCGGCGCGCGGTTGACTTGCAGGAGTTTTTCCAGGGCGCGCGGGAGGTCCAGAT
GGTACTTGATCTCCACCGCGCCATTGGTGGCGACGTCGATGGCTTGCAGGGTCCCGTGCCCCTGGGGTGTGAC
CACCGTCCCCCGTTTCTTCTTGGGCGGCTGGGGCGACGGGGGCGGTGCCTCTTCCATGGTTAGAAGCGGCGGC
GAGGACGCGCGCCGGGCGGCAGGGGCGGCTCGGGGCCCGGAGGCAGGGGCGGCAGGGGCACGTCGGCGCCG
CGCGCGGGTAGGTTCTGGTACTGCGCCCGGAGAAGACTGGCGTGAGCGACGACGCGACGGTTGACGTCCTGG
ATCTGACGCCTCTGGGTGAAGGCCACGGGACCCGTGAGTTTGAACCTGAAAGAGAGTTCGACAGAATCAATC
TCGGTATCGTTGACGGCGGCCTGCCGCAGGATCTCTTGCACGTCGCCCGAGTTGTCCTGGTAGGCGATCTCGG
TCATGAACTGCTCGATCTCCTCCTCTTGAAGGTCTCCGCGGCCGGCGCGCTCCACGGTGGCCGCGAGGTCGTT

GGAGATGCGGCCCATGAGCTGCGAGAAGGCGTTCATGCCCGCCTCGTTCCAGACGCGGCTGTAGACCACGAC
GCCCTCGGGATCGCgGGCGCGCATGACCACCTGGGCGAGGTTGAGCTCCACGTGGCGCGTGAAGACCGCGTA
GTTGCAGAGGCGCTGGTAGAGGTAGTTGAGCGTGGTGGCGATGTGCTCGGTGACGAAGAAATACATGATCCA
GCGGCGGAGCGGCATCTCGCTGACGTCGCCCAGCGCCTCCAAACGTTCCATGGCCTCGTAAAAGTCCACGGC
GAAGTTGAAAAACTGGGAGTTGCGCGCCGAGACGGTCAACTCCTCCTCCAGAAGACGGATGAGCTCGGCGAT
GGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAGGCCCCCGGGAGTTCCTCCACTTCCTCTTCTTCCTCCTCCACTAACATCT
CTTCTACTTCCTCCTCAGGCGGCAGTGGTGGCGGGGGAGGGGGCCTGCGTCGCCGGCGGCGCACGGGCAGAC
GGTCGATGAAGCGCTCGATGGTCTCGCCGCGCCGGCGTCGCATGGTCTCGGTGACGGCGCGCCCGTCCTCGCG
GGGCCGCAGCGTGAAGACGCCGCCGCGCATCTCCAGGTGGCCGGGGGGGTCCCCGTTGGGCAGGGAGAGGG
CGCTGACGATGCATCTTATCAATTGCCCCGTAGGGACTCCGCGCAAGGACCTGAGCGTCTCGAGATCCACGG
GATCTGAAAACCGCTGAACGAAGGCTTCGAGCCAGTCGCAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACGGTTTCTTCTG
GCGGGTCATGTTGGTTGGGAGCGGGGCGGGCGATGCTGCTGGTGATGAAGTTGAAATAGGCGGTTCTGAGAC
GGCGGATGGTGGCGAGGAGCACCAGGTCTTTGGGCCCGGCTTGCTGGATGCGCAGACGGTCGGCCATGCCCC
AGGCGTGGTCCTGACACCTGGCCAGGTCCTTGTAGTAGTCCTGCATGAGCCGCTCCACGGGCACCTCCTCCTC
GCCCGCGCGGCCGTGCATGCGCGTGAGCCCGAAGCCGCGCTGGGGCTGGACGAGCGCCAGGTCGGCGACGA
CGCGCTCGGCGAGGATGGCTTGCTGGATCTGGGTGAGGGTGGTCTGGAAGTCATCAAAGTCGACGAAGCGGT
GGTAGGCTCCGGTGTTGATGGTGTAGGAGCAGTTGGCCATGACGGACCAGTTGACGGTCTGGTGGCCCGGAC
GCACGAGCTCGTGGTACTTGAGGCGCGAGTAGGCGCGCGTGTCGAAGATGTAGTCGTTGCAGGTGCGCACCA
GGTACTGGTAGCCGATGAGGAAGTGCGGCGGCGGCTGGCGGTAGAGCGGCCATCGCTCGGTGGCGGGGGCG
CCGGGCGCGAGGTCCTCGAGCATGGTGCGGTGGTAGCCGTAGATGTACCTGGACATCCAGGTGATGCCGGCG
GCGGTGGTGGAGGCGCGCGGGAACTCGCGGACGCGGTTCCAGATGTTGCGCAGCGGCAGGAAGTAGTTCATG
GTGGGCACGGTCTGGCCCGTGAGGCGCGCGCAGTCGTGGATGCTCTATACGGGCAAAAACGAAAGCGGTCAG
CGGCTCGACTCCGTGGCCTGGAGGCTAAGCGAACGGGTTGGGCTGCGCGTGTACCCCGGTTCGAATCTCGAA
TCAGGCTGGAGCCGCAGCTAACGTGGTATTGGCACTCCCGTCTCGACCCAAGCCTGCACCAACCCTCCAGGAT
ACGGAGGCGGGTCGTTTTGCAACTTTTTTTTGGAGGCCGGATGAGACTAGTAAGCGCGGAAAGCGGCCGACC
GCGATGGCTCGCTGCCGTAGTCTGGAGAAGAATCGCCAGGGTTGCGTTGCGGTGTGCCCCGGTTCGAGGCCG
GCCGGATTCCGCGGCTAACGAGGGCGTGGCTGCCCCGTCGTTTCCAAGACCCCATAGCCAGCCGACTTCTCCA
GTTACGGAGCGAGCCCCTCTTTTGTTTTGTTTGTTTTTGCCAGATGCATCCCGTACTGCGGCAGATGCGCCCCC
ACCACCCTCCACCGCAACAACAGCCCCCTCCACAGCCGGCGCTTCTGCCCCCGCCCCAGCAGCAACTTCCAGC
CACGACCGCCGCGGCCGCCGTGAGCGGGGCTGGACAGAGTTATGATCACCAGCTGGCCTTGGAAGAGGGCGA
GGGGCTGGCGCGCCTGGGGGCGTCGTCGCCGGAGCGGCACCCGCGCGTGCAGATGAAAAGGGACGCTCGCG
AGGCCTACGTGCCCAAGCAGAACCTGTTCAGAGACAGGAGCGGCGAGGAGCCCGAGGAGATGCGCGCGGCC
CGGTTCCACGCGGGGCGGGAGCTGCGGCGCGGCCTGGACCGAAAGAGGGTGCTGAGGGACGAGGATTTCGA
GGCGGACGAGCTGACGGGGATCAGCCCCGCGCGCGCGCACGTGGCCGCGGCCAACCTGGTCACGGCGTACG
AGCAGACCGTGAAGGAGGAGAGCAACTTCCAAAAATCCTTCAACAACCACGTGCGCACCCTGATCGCGCGCG
AGGAGGTGACCCTGGGCCTGATGCACCTGTGGGACCTGCTGGAGGCCATCGTGCAGAACCCCACCAGCAAGC
CGCTGACGGCGCAGCTGTTCCTGGTGGTGCAGCATAGTCGGGACAACGAAGCGTTCAGGGAGGCGCTGCTGA
ATATCACCGAGCCCGAGGGCCGCTGGCTCCTGGACCTGGTGAACATTCTGCAGAGCATCGTGGTGCAGGAGC
GCGGGCTGCCGCTGTCCGAGAAGCTGGCGGCCATCAACTTCTCGGTGCTGAGTTTGGGCAAGTACTACGCTAG
GAAGATCTACAAGACCCCGTACGTGCCCATAGACAAGGAGGTGAAGATCGACGGGTTTTACATGCGCATGAC
CCTGAAAGTGCTGACCCTGAGCGACGATCTGGGGGTGTACCGCAACGACAGGATGCACCGTGCGGTGAGCGC
CAGCAGGCGGCGCGAGCTGAGCGACCAGGAGCTGATGCATAGTCTGCAGCGGGCCCTGACCGGGGCCGGGA
CCGAGGGGGAGAGCTACTTTGACATGGGCGCGGACCTGCACTGGCAGCCCAGCCGCCGGGCCTTGGAGGCGG
CGGCAGGACCCTACGTAGAAGAGGTGGACGATGAGGTGGACGAGGAGGGCGAGTACCTGGAAGACTGATGG
CGCGACCGTATTTTTGCTAGATGCAACAACAACAGCCACCTCCTGATCCCGCGATGCGGGCGGCGCTGCAGA
GCCAGCCGTCCGGCATTAACTCCTCGGACGATTGGACCCAGGCCATGCAACGCATCATGGCGCTGACGACCC
GCAACCCCGAAGCCTTTAGACAGCAGCCCCAGGCCAACCGGCTCTCGGCCATCCTGGAGGCCGTGGTGCCCT
CGCGCTCCAACCCCACGCACGAGAAGGTCCTGGCCATCGTGAACGCGCTGGTGGAGAACAAGGCCATCCGCG
GCGACGAGGCCGGCCTGGTGTACAACGCGCTGCTGGAGCGCGTGGCCCGCTACAACAGCACCAACGTGCAGA
CCAACCTGGACCGCATGGTGACCGACGTGCGCGAGGCCGTGGCCCAGCGCGAGCGGTTCCACCGCGAGTCCA
ACCTGGGATCCATGGTGGCGCTGAACGCCTTCCTCAGCACCCAGCCCGCCAACGTGCCCCGGGGCCAGGAGG
ACTACACCAACTTCATCAGCGCCCTGCGCCTGATGGTGACCGAGGTGCCCCAGAGCGAGGTGTACCAGTCCG
GGCCGGACTACTTCTTCCAGACCAGTCGCCAGGGCTTGCAGACCGTGAACCTGAGCCAGGCTTTCAAGAACTT
GCAGGGCCTGTGGGGCGTGCAGGCCCCGGTCGGGGACCGCGCGACGGTGTCGAGCCTGCTGACGCCGAACTC
GCGCCTGCTGCTGCTGCTGGTGGCCCCCTTCACGGACAGCGGCAGCATCAACCGCAACTCGTACCTGGGCTAC
CTGATTAACCTGTACCGCGAGGCCATCGGCCAGGCGCACGTGGACGAGCAGACCTACCAGGAGATCACCCAC
GTGAGCCGCGCCCTGGGCCAGGACGACCCGGGCAACCTGGAAGCCACCCTGAACTTTTTGCTGACCAACCGG
TCGCAGAAGATCCCGCCCCAGTACGCGCTCAGCACCGAGGAGGAGCGCATCCTGCGTTACGTGCAGCAGAGC
GTGGGCCTGTTCCTGATGCAGGAGGGGGCCACCCCCAGCGCCGCGCTCGACATGACCGCGCGCAACATGGAG
CCCAGCATGTACGCCAGCAACCGCCCGTTCATCAATAAACTGATGGACTACTTGCATCGGGCGGCCGCCATG
AACTCTGACTATTTCACCAACGCCATCCTGAATCCCCACTGGCTCCCGCCGCCGGGGTTCTACACGGGCGAGT
ACGACATGCCCGACCCCAATGACGGGTTCCTGTGGGACGATGTGGACAGCAGCGTGTTCTCCCCCCGACCGG
GTGCTAACGAGCGCCCCTTGTGGAAGAAGGAAGGCAGCGACCGACGCCCGTCCTCGGCGCTGTCCGGCCGCG
AGGGTGCTGCCGCGGCGGTGCCCGAGGCCGCCAGTCCTTTCCCGAGCTTGCCCTTCTCGCTGAACAGTATCCG
CAGCAGCGAGCTGGGCAGGATCACGCGCCCGCGCTTGCTGGGCGAAGAGGAGTACTTGAATGACTCGCTGTT
GAGACCCGAGCGGGAGAAGAACTTCCCCAATAACGGGATAGAAAGCCTGGTGGACAAGATGAGCCGCTGGA

AGACGTATGCGCAGGAGCACAGGGACGATCCCCGGGCGTCGCAGGGGGCCACGAGCCGGGGCAGCGCCGCC
CGTAAACGCCGGTGGCACGACAGGCAGCGGGGACAGATGTGGGACGATGAGGACTCCGCCGACGACAGCAG
CGTGTTGGACTTGGGTGGGAGTGGTAACCCGTTCGCTCACCTGCGCCCCCCGTATCGGGCGCATGATGTAAGAC
AAACCGAAAATAAATGATACTCACCAAGGCCATGGCGACCAGCGTGCGTTCGTTTCTTCTCTGTTGTTGTTGT
ATCTAGTATGATGAGGCGTGCGTACCCGGAGGGTCCTCCTCCCTCGTACGAGAGCGTGATGCAGCAGGCGAT
GGCGGCGGCGGCGATGCAGCCCCCGCTGGAGGCTCCTTACGTGCCCCCGCGGTACCTGGCGCCTACGGAGGG
GCGGAACAGCATTCGTTACTCGGAGCTGGCACCCTTGTACGATACCACCCGGTTGTACCTGGTGGACAACAA
GTCGGCGGACATCGCCTCGCTGAACTACCAGAACGACCACAGCAACTTCCTGACCACCGTGGTGCAGAACAA
TGACTTCACCCCCACGGAGGCCAGCACCCAGACCATCAACTTTGACGAGCGCTCGCGGTGGGGCGGCCAGCT
GAAAACCATCATGCACACCAACATGCCCAACGTGAACGAGTTCATGTACAGCAACAAGTTCAAGGCGCGGGT
GATGGTCTCCCGCAAGACCCCCAATGGGGTGACAGTGACAGAGGATTATGATGGTAGTCAGGATGAGCTGAA
GTATGAATGGGTGGAATTTGAGCTGCCCGAAGGCAACTTCTCGGTGACCATGACCATCGACCTGATGAACAA
CGCCATCATCGACAATTACTTGGCGGTGGGGCGGCAGAACGGGGTGCTGGAGAGCGACATCGGCGTGAAGTT
CGACACTAGGAACTTCAGGCTGGGCTGGGACCCCGTGACCGAGCTGGTCATGCCCGGGGTGTACACCAACGA
GGCTTTCCATCCCGATATTGTCTTGCTGCCCGGCTGCGGGGTGGACTTCACCGAGAGCCGCCTCAGCAACCTG
CTGGGCATTCGCAAGAGGCAGCCCTTCCAGGAAGGCTTCCAGATCATGTACGAGGATCTGGAGGGGGGCAAC
ATCCCCGCGCTCCTGGATGTCGACGCCTATGAGAAAAGCAAGGAGGATGCAGCAGCTGAAGCAACTGCAGCC
GTAGCTACCGCCTCTACCGAGGTCAGGGGCGATAATTTTGCAAGCGCCGCAGCAGTGGCAGCGGCCGAGGCG
GCTGAAACCGAAAGTAAGATAGTCATTCAGCCGGTGGAGAAGGATAGCAAGAACAGGAGCTACAACGTACT
ACCGGACAAGATAAACACCGCCTACCGCAGCTGGTACCTAGCCTACAACTATGGCGACCCCGAGAAGGGCGT
GCGCTCCTGGACGCTGCTCACCACCTCGGACGTCACCTGCGGCGTGGAGCAAGTCTACTGGTCGCTGCCCGAC
ATGATGCAAGACCCGGTCACCTTCCGCTCCACGCGTCAAGTTAGCAACTACCCGGTGGTGGGCGCCGAGCTCC
TGCCCGTCTACTCCAAGAGCTTCTTCAACGAGCAGGCCGTCTACTCGCAGCAGCTGCGCGCCTTCACCTCGCT
TACGCACGTCTTCAACCGCTTCCCCGAGAACCAGATCCTCGTCCGCCCGCCCGCGCCCACCATTACCACCGTC
AGTGAAAACGTTCCTGCTCTCACAGATCACGGGACCCTGCCGCTGCGCAGCAGTATCCGGGGAGTCCAGCGC
GTGACCGTTACTGACGCCAGACGCCGCACCTGCCCCTACGTCTACAAGGCCCTGGGCATAGTCGCGCCGCGC
GTCCTCTCGAGCCGCACCTTCTAAATGTCCATTCTCATCTCGCCCAGTAATAACACCGGTTGGGGCCTGCGCG
CGCCCAGCAAGATGTACGGAGGCGCTCGCCAACGCTCCACGCAACACCCCGTGCGCGTGCGCGGGCACTTCC
GCGCTCCCTGGGGCGCCCTCAAGGGCCGCGTGCGGTCGCGCACCACCGTCGACGACGTGATCGACCAGGTGG
TGGCCGACGCGCGCAACTACACCCCCGCCGCCGCGCCCGTCTCCACCGTGGACGCCGTCATCGACAGCGTGG
TGGCcGACGCGCGCCCGGTACGCCCGCGCCAAGAGCCGGCGGCGGCGCATCGCCCGGCGGCACCGGAGCACCC
CCGCCATGCGCGCGGCGCGAGCCTTGCTGCGCAGGGCCAGGCGCACGGGACGCAGGGCCATGCTCAGGGCG
GCCAGACGCGCGGCTTCAGGCGCCAGCGCCGGCAGGACCCGGAGACGCGCGGCCACGGCGGCGGCAGCGGC
CATCGCCAGCATGTCCCGCCCGCGGCGAGGGAACGTGTACTGGGTGCGCGACGCCGCCACCGGTGTGCGCGT
GCCCGTGCGCACCCGCCCCCCTCGCACTTGAAGATGTTCACTTCGCGATGTTGATGTGTCCCAGCGGCGAGGA
GGATGTCCAAGCGCAAATTCAAGGAAGAGATGCTCCAGGTCATCGCGCCTGAGATCTACGGCCCTGCGGTGG
TGAAGGAGGAAAGAAAGCCCCGCAAAATCAAGCGGGTCAAAAAGGACAAAAAGGAAGAAGAAAGTGATGT
GGACGGATTGGTGGAGTTTGTGCGCGAGTTCGCCCCCCGGCGGCGCGTGCAGTGGCGCGGGCGGAAGGTGCA
ACCGGTGCTGAGACCCGGCACCACCGTGGTCTTCACGCCCGGCGAGCGCTCCGGCACCGCTTCCAAGCGCTCC
TACGACGAGGTGTACGGGGATGATGATATTCTGGAGCAGGCGGCCGAGCGCCTGGGCGAGTTTGCTTACGGC
AAGCGCAGCCGTTCCGCACCGAAGGAAGAGGCGGTGTCCATCCCGCTGGACCACGGCAACCCCACGCCGAGC
CTCAAGCCCGTGACCTTGCAGCAGGTGCTGCCGACCGCGGCGCCGCGCCGGGGGTTCAAGCGCGAGGGCGAG
GATCTGTACCCCACCATGCAGCTGATGGTGCCCAAGCGCCAGAAGCTGGAAGACGTGCTGGAGACCATGAAG
GTGGACCCGGACGTGCAGCCCGAGGTCAAGGTGCGGCCCATCAAGCAGGTGGCCCCGGGCCTGGGCGTGCAC
ACCGTGGACATCAAGATTCCCACGGAGCCCATGGAAACGCAGACCGAGCCCATGATCAAGCCCAGCACCAGC
ACCATGGAGGTGCAGACGGATCCCTGGATGCCATCGGCTCCTAGTCGAAGACCCCGGCGCAAGTACGGCGCG
GCCAGCCTGCTGATGCCCAACTACGCGCTGCATCCTTCCATCATCCCCACGCCGGGCTACCGCGGCACGCGCT
TCTACCGCGGTCATACCAGCAGCCGCCGCCGCAAGACCACCACTCGCCGCCGCCGTCGCCGCACCGCCGCTG
CAACCACCCCTGCCGCCCTGGTGCGGAGAGTGTACCGCCGCGGCCGCGCACCTCTGACCCTGCCGCGCGCGC
GCTACCACCCGAGCATCGCCATTTAAACTTTCGCCtGCTTTGCAGATCAATGGCCCTCACATGCCGCCTTCGCG
TTCCCATTACGGGCTACCGAGGAAGAAAACCGCGCCGTAGAAGGCTGGCGGGGAACGGGATGCGTCGCCACC
ACCACCGGCGGCGGCGCGCCATCAGCAAGCGGTTGGGGGGAGGCTTCCTGCCCGCGCTGATCCCCATCATCG
CCGCGGCGATCGGGGCGATCCCCGGCATTGCTTCCGTGGCGGTGCAGGCCTCTCAGCGCCACTGAGACACAC
TTGGAAACATCTTGTAATAAACCaATGGACTCTGACGCTCCTGGTCCTGTGATGTGTTTTCGTAGACAGATGGA
AGACATCAATTTTTCGTCCCTGGCTCCGCGACACGGCACGCGGCCGTTCATGGGCACCTGGAGCGACATCGGC
ACCAGCCAACTGAACGGGGGCGCCTTCAATTGGAGCAGTCTCTGGAGCGGGCTTAAGAATTTCGGGTCCACG
CTTAAAACCTATGGCAGCAAGGCGTGGAACAGCACCACAGGGCAGGCGCTGAGGGATAAGCTGAAAGAGCA
GAACTTCCAGCAGAAGGTGGTCGATGGGCTCGCCTCGGGCATCAACGGGGTGGTGGACCTGGCCAACCAGGC
CGTGCAGCGGCAGATCAACAGCCGCCTGGACCCGGTGCCGCCCGCCGGCTCCGTGGAGATGCCGCAGGTGGA
GGAGGAGCTGCCTCCCCTGGACAAGCGGGGCGAGAAGCGACCCCGCCCCGATGCGGAGGAGACGCTGCTGA
CGCACACGGACGAGCCGCCCCCGTACGAGGAGGCGGTGAAACTGGGTCTGCCCACCACGCGGCCCATCGCGC
CCCTGGCCACCGGGGTGCTGAAACCCGAAAAGCCCCGCGACCCTGGACTTGCCTCCTCCCCAGCCTTCCCGCCC
CTCTACAGTGGCTAAGCCCCTGCCGCCGGTGGCCCGTGCCCCGCGCGCGACCCGGGGGCACCGCCCGCCCTCA
TGCGAACTGGCAGAGCACTCTGAACAGCATCGTGGGTCTGGGAGTGCAGAGTGTGAAGCGCCGCCGCTGCTA
TTAAACCTACCGTAGCGCTTAACTTGCTTGTCTGTGTGTGTATGTATTATGTCGCCGCCGCCGCTGTCCACCAG
AAGGAGGAGTGAAGAGGCGCGTCGCCGAGTTGCAAGATGGCCACCCCATCGATGCTGCCCCAGTGGGCGTAC

ATGCACATCGCCGGACAGGACGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTGGTGCAGTTTGCCCGCGCCACAGAC
ACCTACTTCAGTCTGGGGAACAAGTTTAGGAACCCCACGGTGGCGCCCACGCACGATGTGACCACCGACCGC
AGCCAGCGGCTGACGCTGCGCTTCGTGCCCGTGGACCGCGAGGACAACACCTACTCGTACAAAGTGCGCTAC
ACGCTGGCCGTGGGCGACAACCGCGTGCTGGACATGGCCAGCACCTACTTTGACATCCGCGGCGTGCTGGAT
CGGGGCCCTAGCTTCAAACCCTACTCCGGCACCGCCTACAACAGTCTGGCCCCCAAGGGAGCACCCAACACT
TGTCAGTGGACATATAAAGCCGATGGTGAAACTGCCACAGAAAAAACCTATACATATGGAAATGCACCCGTG
CAGGGCATTAACATCACAAAAGATGGTATTCAACTTGGAACTGACACCGATGATCAGCCAATCTACGCAGAT
AAAACCTATCAGCCTGAACCTCAAGTGGGTGATGCTGAATGGCATGACATCACTGGTACTGATGAAAAGTAT
GGAGGCAGAGCTCTTAAGCCTGATACCAAAATGAAGCCTTGTTATGGTTCTTTTGCCAAGCCTACTAATAAAG
AAGGAGGTCAGGCAAATGTGAAAACAGGAACAGGCACTACTAAAGAATATGACATAGACATGGCTTTCTTTG
ACAACAGAAGTGCGGCTGCTGCTGGCCTAGCTCCAGAAATTGTTTTGTATACTGAAAATGTGGATTTGGAAAC
TCCAGATACCCATATTGTATACAAAGCAGGCACAGATGACAGCAGCTCTTCTATTAATTTGGGTCAGCAAGCC
ATGCCCAACAGACCTAACTACATTGGTTTCAGAGACAACTTTATCGGGCTCATGTACTACAACAGCACTGGCA
ATATGGGGGTGCTGGCCGGTCAGGCTTCTCAGCTGAATGCTGTGGTTGACTTGCAAGACAGAAACACCGAGC
TGTCCTACCAGCTCTTGCTTGACTCTCTGGGTGACAGAACCCGGTATTTCAGTATGTGGAATCAGGCGGTGGA
CAGCTATGATCCTGATGTGCGCATTATTGAAAATCATGGTGTGGAGGATGAACTTCCCAACTATTGTTTCCCT
CTGGATGCTGTTGGCAGAACAGATACTTATCAGGGAATTAAGGCTAATGGAACTGATCAAACCACATGGACC
AAAGATGACAGTGTCAATGATGCTAATGAGATAGGCAAGGGTAATCCATTCGCCATGGAAATCAACATCCAA
GCCAACCTGTGGAGGAACTTCCTCTACGCCAACGTGGCCCTGTACCTGCCCGACTCTTACAAGTACACGCCGG
CCAATGTTACCCTGCCCACCAACACCAACACCTACGATTACATGAACGGCCGGGTGGTGGCGCCCTCGCTGGT
GGACTCCTACATCAACATCGGGGCGCGCTGGTCGCTGGATCCCATGGACAACGTGAACCCCTTCAACCACCA
CCGCAATGCGGGGCTGCGCTACCGCTCCATGCTCCTGGGCAACGGGCGCTACGTGCCCTTCCACATCCAGGTG
CCCCAGAAATTTTTCGCCATCAAGAGCCTCCTGCTCCTGCCCGGGTCCTACACCTACGAGTGGAACTTCCGCA
AGGACGTCAACATGATCCTGCAGAGCTCCCTCGGCAACGACCTGCGCACGGACGGGGCCTCCATCTCCTTCAC
CAGCATCAACCTCTACGCCACCTTCTTCCCCATGGCGCACAACACGGCCTCCACGCTCGAGGCCATGCTGCGC
AACGACACCAACGACCAGTCCTTCAACGACTACCTCTCGGCGGCCAACATGCTCTACCCCATCCCGGCCAACG
CCACCAACGTGCCCATCTCCATCCCCTCGCGCAACTGGGCCGCCTTCCGCGGCTGGTCCTTCACGCGTCTCAA
GACCAAGGAGACGCCCTCGCTGGGCTCCGGGTTCGACCCCTACTTCGTCTACTCGGGCTCCATCCCCTACCTC
GACGGCACCTTCTACCTCAACCACACCTTCAAGAAGGTCTCCATCACCTTCGACTCCTCCGTCAGCTGGCCCG
GCAACGACCGGCTCCTGACGCCCAACGAGTTCGAAATCAAGCGCACCGTCGACGGCGAGGGCTACAACGTGG
CCCAGTGCAACATGACCAAGGACTGGTTCCTGGTCCAGATGCTGGCCCACTACAACATCGGCTACCAGGGCTT
CTACGTGCCCGAGGGCTACAAGGACCGCATGTACTCCTTCTTCCGCAACTTCCAGCCCATGAGCCGCCAGGTG
GTGGACGAGGTCAACTACAAGGACTACCAGGCCGTCACCCTGGCCTACCAGCACAACAACTCGGGCTTCGTC
GGCTACCTCGCGCCCACCATGCGCCAGGGCCAGCCCTACCCCGCCAACTACCCCTACCCGCTCATCGGCAAGA
GCGCCGTCACCAGCGTCACCCAGAAAAAGTTCCTCTGCGACAGGGTCATGTGGCGCATCCCCTTCTCCAGCAA
CTTCATGTCCATGGGCGCGCTCACCGACCTCGGCCAGAACATGCTCTATGCCAACTCCGCCCACGCGCTAGAC
ATGAATTTCGAAGTCGACCCCATGGATGAGTCCACCCTTCTCTATGTTGTCTTCGAAGTCTTCGACGTCGTCCG
AGTGCACCAGCCCCACCGCGGCGTCATCGAGGCCGTCTACCTGCGCACCCCCTTCTCGGCCGGTAACGCCACC
ACCTAAGCTCTTGCTTCTTGCAAGCCATGGCCGCGGGCTCCGGCGAGCAGGAGCTCAGGGCCATCATCCGCG
ACCTGGGCTGCGGGCCCTACTTCCTGGGCACCTTCGATAAGCGCTTCCCGGGATTCATGGCCCCGCACAAGCT
GGCCTGCGCCATCGTCAACACGGCCGGCCGCGAGACCGGGGGCGAGCACTGGCTGGCCTTCGCCTGGAACCC
GCGCTCGAACACCTGCTACCTCTTCGACCCCTTCGGGTTCTCGGACGAGCGCCTCAAGCAGATCTACCAGTTC
GAGTACGAGGGCCTGCTGCGCCGCAGCGCCCTGGCCACCGAGGACCGCTGCGTCACCCTGGAAAAGTCCACC
CAGACCGTGCAGGGTCCGCGCTCGGCCGCCTGCGGGCTCTTCTGCTGCATGTTCCTGCACGCCTTCGTGCACT
GGCCCGACCGCCCCATGGACAAGAACCCCACCATGAACTTGCTGACGGGGGTGCCCAACGGCATGCTCCAGT
CGCCCCAGGTGGAACCCACCCTGCGCCGCAACCAGGAGGCGCTCTACCGCTTCCTCAACTCCCACTCCGCCTA
CTTTCGCTCCCACCGCGCGCGCATCGAGAAGGCCACCGCCTTCGACCGCATGAATCAAGACATGTAAACCGT
GTGTGTATGTTAAATGTCTTTAATAAACAGCACTTTCATGTTACACATGCATCTGAGATGATTTATTTAGAAAT
CGAAAGGGTTCTGCCGGGTCTCGGCATGGCCCGCGGGCAGGGACACGTTGCGGAACTGGTACTTGGCCAGCC
ACTTGAACTCGGGGATCAGCAGTTTGGGCAGCGGGGTGTCGGGGAAGGAGTCGGTCCACAGCTTCCGCGTCA
GTTGCAGGGCGCCCAGCAGGTCGGGCGCGGAGATCTTGAAATCGCAGTTGGGACCCGCGTTCTGCGCGCGGG
AGTTGCGGTACACGGGGTTGCAGCACTGGAACACCATCAGGGCCGGGTGCTTCACGCTCGCCAGCACCGTCG
CGTCGGTGATGCTCTCCACGTCGAGGTCCTCGGCGTTGGCCATCCCGAAGGGGGTCATCTTGCAGGTCTGCCT
TCCCATGGTGGGCACGCACCCGGGCTTGTGGTTGCAATCGCAGTGCAGGGGGATCAGCATCATCTGGGCCTG
GTCGGCGTTCATCCCCGGGTACATGGCCTTCATGAAAGCCTCCAATTGCCTGAACGCCTGCTGGGCCTTGGCT
CCCTCGGTGAAGAAGACCCCGCAGGACTTGCTAGAGAACTGGTTGGTGGCGCACCCGGCGTCGTGCACGCAG
CAGCGCGCGTCGTTGTTGGCCAGCTGCACCACGCTGCGCCCCCAGCGGTTCTGGGTGATCTTGGCCCGGTCGG
GGTTCTCCTTCAGCGCGCGCTGCCCGTTCTCGCTCGCCACATCCATCTCGATCATGTGCTCCTTCTGGATCATG
GTGGTCCCGTGCAGGCACCGCAGCTTGCCCTCGGCCTCGGTGCACCCGTGCAGCCACAGCGCGCACCCGGTG
CACTCCCAGTTCTTGTGGGCGATCTGGGAATGCGCGTGCACGAAGCCCTGCAGGAAGCGGCCCATCATGGTG
GTCAGGGTCTTGTTGCTAGTGAAGGTCAGCGGAATGCCGCGGTGCTCCTCGTTGATGTACAGGTGGCAGATGC
GGCGGTACACCTCGCCCTGCTCGGGCATCAGCTGGAAGTTGGCTTTCAGGTCGGTCTCCACGCGGTAGCGGTC
CATCAGCATAGTCATGATTTCCATACCCTTCTCCCAGGCCGAGACGATGGGCAGGCTCATAGGGTTCTTCACC
ATCATCTTAGCGCTAGCAGCCGCGGCCAGGGGGTCGCTCTCGTCCAGGGTCTCAAAGCTCCGCTTGCCGTCCT
TCTCGGTGATCCGCACCGGGGGGTAGCTGAAGCCCACGGCCGCCAGCTCCTCCTCGGCCTGTCTTTCGTCCTC
GCTGTCCTGGCTGACGTCCTGCAGGACCACATGCTTGGTCTTGCGGGGTTTCTTCTTGGGCGGCAGCGGCGGC

GGAGATGTTGGAGATGGCGAGGGGGAGCGCGAGTTCTCGCTCACCACTACTATCTCTTCCTCTTCTTGGTCCG
AGGCCACGCGGCGGTAGGTATGTCTCTTCGGGGGCAGAGGCGGAGGCGACGGGCTCTCGCCGCCGCGACTTG
GCGGATGGCTGGCAGAGCCCCTTCCGCGTTCGGGGGTGCGCTCCCGGCGGCGCTCTGACTGACTTCCTCCGCG
GCCGGCCATTGTGTTCTCCTAGGGAGGAACAACAAGCATGGAGACTCAGCCATCGCCAACCTCGCCATCTGC
CCCCACCGCCGACGAGAAGCAGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAACCGCCCCGCCGCCCAGCCCCGCCACCTC
CGACGCGGCCGTCCCAGACATGCAAGAGATGGAGGAATCCATCGAGATTGACCTGGGCTATGTGACGCCCGC
GGAGCACGAGGAGGAGCTGGCAGTGCGCTTTTCACAAGAAGAGATACACCAAGAACAGCCAGAGCAGGAAG
CAGAGAATGAGCAGAGTCAGGCTGGGCTCGAGCATGACGGCGACTACCTCCACCTGAGCGGGGGGGAGGAC
GCGCTCATCAAGCATCTGGCCCGGCAGGCCACCATCGTCAAGGATGCGCTGCTCGACCGCACCGAGGTGCCC
CTCAGCGTGGAGGAGCTCAGCCGCGCCTACGAGTTGAACCTCTTCTCGCCGCGCGTGCCCCCCAAGCGCCAGC
CCAATGGCACCTGCGAGCCCAACCCGCGCCTCAACTTCTACCCGGTCTTCGCGGTGCCCGAGGCCCTGGCCAC
CTACCACATCTTTTTCAAGAACCAAAAGATCCCCGTCTCCTGCCGCGCCAACCGCACCCGCGCCGACGCCCTT
TTCAACCTGGGTCCCGGCGCCCGCCTACCTGATATCGCCTCCTTGGAAGAGGTTCCCAAGATCTTCGAGGGTC
TGGGCAGCGACGAGACTCGGGCCGCGAACGCTCTGCAAGGAGAAGGAGGAGAGCATGAGCACCACAGCGCC
CTGGTCGAGTTGGAAGGCGACAACGCGCGGCTGGCGGTGCTCAAACGCACGGTCGAGCTGACCCATTTCGCC
TACCCGGCTCTGAACCTGCCCCCCAAAGTCATGAGCGCGGTCATGGACCAGGTGCTCATCAAGCGCGCGTCG
CCCATCTCCGAGGACGAGGGCATGCAAGACTCCGAGGAGGGCAAGCCCGTGGTCAGCGACGAGCAGCTGGC
CCGGTGGCTGGGTCCTAATGCTAGTCCCCAGAGTTTGGAAGAGCGGCGCAAACTCATGATGGCCGTGGTCCT
GGTGACCGTGGAGCTGGAGTGCCTGCGCCGCTTCTTCGCCGACGCGGAGACCCTGCGCAAGGTCGAGGAGAA
CCTGCACTACCTCTTCAGGCACGGGTTCGTGCGCCAGGCCTGCAAGATCTCCAACGTGGAGCTGACCAACCTG
GTCTCCTACATGGGCATCTTGCACGAGAACCGCCTGGGGCAGAACGTGCTGCACACCACCCTGCGCGGGGAG
GCCCGGCGCGACTACATCCGCGACTGCGTCTACCTCTACCTCTGCCACACCTGGCAGACGGGCATGGGCGTGT
GGCAGCAGTGTCTGGAGGAGCAGAACCTGAAAGAGCTCTGCAAGCTCCTGCAGAAGAACCTCAAGGGTCTGT
GGACCGGGTTCGACGAGCGCACCACCGCCTCGGACCTGGCCGACCTCATTTTCCCCGAGCGCCTCAGGCTGAC
GCTGCGCAACGGCCTGCCCGACTTTATGAGCCAAAGCATGTTGCAAAACTTTCGCTCTTTCATCCTCGAACGC
TCCGGAATCCTGCCCGCCACCTGCTCCGCGCTGCCCTCGGACTTCGTGCCGCTGACCTTCCGCGAGTGCCCCC
CGCCGCTGTGGAGCCACTGCTACCTGCTGCGCCTGGCCAACTACCTGGCCTACCACTCGGACGTGATCGAGGA
CGTCAGCGGCGAGGGCCTGCTCGAGTGCCACTGCCGCTGCAACCTCTGCACGCCGCACCGCTCCCTGGCCTGC
AACCCCCAGCTGCTGAGCGAGACCCAGATCATCGGCACCTTCGAGTTGCAAGGGCCCAGCGAAGGCGAGGGT
TCAGCCGCCAAGGGGGGTCTGAAACTCACCCCGGGGCTGTGGACCTCGGCCTACTTGCGCAAGTTCGTGCCC
GAGGACTACCATCCCTTCGAGATCAGGTTCTACGAGGACCAATCCCATCCGCCCAAGGCCGAGCTGTCGGCCT
GCGTCATCACCCAGGGGGCGATCCTGGCCCAATTGCAAGCCATCCAGAAATCCCGCCAAGAATTCTTGCTGA
AAAAGGGCCGCGGGGTCTACCTCGACCCCCAGACCGGTGAGGAGCTCAACCCCGGCTTCCCCCAGGATGCCC
CGAGGAAACAAGAAGCTGAAAGTGGAGCTGCCGCCCGTGGAGGATTTGGAGGAAGACTGGGAGAACAGCAG
TCAGGCAGAGGAGGAGGAGATGGAGGAAGACTGGGACAGCACTCAGGCAGAGGAGGACAGCCTGCAAGAC
AGTCTGGAGGAAGACGAGGAGGAGGCAGAGGAGGAGGTGGAAGAAGCAGCCGCCGCCAGACCGTCGTCCTC
GGCGGGGGAGAAAGCAAGCAGCACGGATACCATCTCCGCTCCGGGTCGGGGTCCCGCTCGACCACACAGTAG
ATGGGACGAGACCGGACGATTCCCGAACCCCACCACCCAGACCGGTAAGAAGGAGCGGCAGGGATACAAGT
CCTGGCGGGGGCACAAAAACGCCATCGTCTCCTGCTTGCAGGCCTGCGGGGGCAACATCTCCTTCACCCGGC
GCTACCTGCTCTTCCACCGCGGGGTGAACTTTCCCCGCAACATCTTGCATTACTACCGTCACCTCCACAGCCCC
TACTACTTCCAAGAAGAGGCAGCAGCAGCAGAAAAAGACCAGCAGAAAACCAGCAGCTAGAAAATCCACAG
CGGCGGCAGCAGGTGGACTGAGGATCGCGGCGAACGAGCCGGCGCAAACCCGGGAGCTGAGGAACCGGATC
TTTCCCACCCTCTATGCCATCTTCCAGCAGAGTCGGGGGCAGGAGCAGGAACTGAAAGTCAAGAACCGTTCTC
TGCGCTCGCTCACCCGCAGTTGTCTGTATCACAAGAGCGAAGACCAACTTCAGCGCACTCTCGAGGACGCCG
AGGCTCTCTTCAACAAGTACTGCGCGCTCACTCTTAAAGAGTAGCCCGCGCCCGCCCAGTCGCAGAAAAAGG
CGGGAATTACGTCACCTGTGCCCTTCGCCCTAGCCGCCTCCACCCATCATCATGAGCAAAGAGATTCCCACGC
CTTACATGTGGAGCTACCAGCCCCAGATGGGCCTGGCCGCCGGTGCCGCCCAGGACTACTCCACCCGCATGA
ATTGGCTCAGCGCCGGGCCCGCGATGATCTCACGGGTGAATGACATCCGCGCCCACCGAAACCAGATACTCC
TAGAACAGTCAGCGCTCACCGCCACGCCCCGCAATCACCTCAATCCGCGTAATTGGCCCGCCGCCCTGGTGTA
CCAGGAAATTCCCCAGCCCACGACCGTACTACTTCCGCGAGACGCCCAGGCCGAAGTCCAGCTGACTAACTC
AGGTGTCCAGCTGGCGGGCGGCGCCACCCTGTGTCGTCACCGCCCCGCTCAGGGTATAAAGCGGCTGGTGAT
CCGGGGCAGAGGCACACAGCTCAACGACGAGGTGGTGAGCTCTTCGCTGGGTCTGCGACCTGACGGAGTCTT
CCAACTCGCCGGATCGGGGAGATCTTCCTTCACGCCTCGTCAGGCCGTCCTGACTTTGGAGAGTTCGTCCTCG
CAGCCCCGCTCGGGTGGCATCGGCACTCTCCAGTTCGTGGAGGAGTTCACTCCCTCGGTCTACTTCAACCCCT
TCTCCGGCTCCCCCGGCCACTACCCGGACGAGTTCATCCCGAACTTCGACGCCATCAGCGAGTCGGTGGACGG
CTACGATTGAATGTCCCATGGTGGCGCAGCTGACCTAGCTCGGCTTCGACACCTGGACCACTGCCGCCGCTTC
CGCTGCTTCGCTCGGGATCTCGCCGAGTTTGCCTACTTTGAGCTGCCCGAGGAGCACCCTCAGGGCCCGGCCC
ACGGAGTGCGGATCGTCGTCGAAGGGGGCCTCGACTCCCACCTGCTTCGGATCTTCAGCCAGCGTCCGATCCT
GGTCGAGCGCGAGCAAGGACAGACCCTTCTGACTCTGTACTGCATCTGCAACCACCCCGGCCTGCATGAAAG
TCTTTGTTGTCTGCTGTGTACTGAGTATAATAAAAGCTGAGATCAGCGACTACTCCGGACTTCCGTGTGTTCCT
GAATCCATCAACCAGTCTTTGTTCTTCACCGGGAACGAGACCGAGCTCCAGCTCCAGTGTAAGCCCCACAAGA
AGTACCTCACCTGGCTGTTCCAGGGCTCCCCGATCGCCGTTGTCAACCACTGCGACAACGACGGAGTCCTGCT
GAGCGGCCCTGCCAACCTTACTTTTTCCACCCGCAGAAGCAAGCTCCAGCTCTTCCAACCCTTCCTCCCCGGG
ACCTATCAGTGCGTCTCGGGACCCTGCCATCACACCTTCCACCTGATCCCGAATACCACAGCGTCGCTCCCCG
CTACTAACAACCAAACTAACCTCCACCAACGCCACCGTCGCGACCTTTCTGAATCTAATACTACCACCCACAC
CGGAGGTGAGCTCCGAGGTCAACCAACCTCTGGGATTTACTACGGCCCCTGGGAGGTGGTTGGGTTAATAGC

GCTAGGCCTAGTTGCGGGTGGGCTTTTGGTTCTCTGCTACCTATACCTCCCTTGCTGTTCGTACTTAGTGGTGC
TGTGTTGCTGGTTTAAGAAATGGGGAAGATCACCCTAGTGAGCTGCGGTGCGCTGGTGGCGGTGTTGCTTTCG
ATTGTGGGACTGGGCGGTGCGGCTGTAGTGAAGGAGAAGGCCGATCCCTGCTTGCATTTCAATCCCAACAAA
TGCCAGCTGAGTTTTCAGCCCGATGGCAATCGGTGCGCGGTACTGATCAAGTGCGGATGGGAATGCGAGAAC
GTGAGAATCGAGTACAATAACAAGACTCGGAACAATACTCTCGCGTCCGTGTGGCAGCCCGGGGACCCCGAG
TGGTACACCGTCTCTGTCCCCGGTGCTGACGGCTCCCCGCGCACCGTGAATAATACTTTCATTTTTGCGCACAT
GTGCGACACGGTCATGTGGATGAGCAAGCAGTACGATATGTGGCCCCCCACGAAGGAGAACATCGTGGTCTT
CTCCATCGCTTACAGCCTGTGCACGGCGCTAATCACCGCTATCGTGTGCCTGAGCATTCACATGCTCATCGCT
ATTCGCCCCAGAAATAATGCCGAAAAAGAAAAACAGCCATAACGTTTTTTTTCACACCTTTTTCAGACCATGG
CCTCTGTTAAATTTTTGCTTTTATTTGCCAGTCTCATTGCCGTCATTCATGGAATGAGTAATGAGAAAATTACT
ATTTACACTGGCACTAATCACACATTGAAAGGTCCAGAAAAAGCCACAGAAGTTTCATGGTATTGTTATTTTA
ATGAATCAGATGTATCTACTGAACTCTGTGGAAACAATAACAAAAAAAATGAGAGCATTACTCTCATCAAGT
TTCAATGTGGATCTGACTTAACCCTAATTAACATCACTAGAGACTATGTAGGTATGTATTATGGAACTACAGC
AGGCATTTCGGACATGGAATTTTATCAAGTTTCTGTGTCTGAACCCACCACGCCTAGAATGACCACAACCACA
AAAACTACACCTGTTACCACTATGCAGCTCACTACCAATAACATTTTTGCCATGCGTCAAATGGTCAACAATA
GCACTCAACCCACCCCACCCAGTGAGGAAATTCCCAAATCCATGATTGGCATTATTGTTGCTGTAGTGGTGTG
CATGTTGATCATCGCCTTGTGCATGGTGTACTATGCCTTCTGCTACAGAAAGCACAGACTGAACGACAAGCTG
GAACACTTACTAAGTGTTGAATTTTAATTTTTTAGAACCATGAAGATCCTAGGCCTTTTAATTTTTTCTATCAT
TACCTCTGCTCTATGCAATTCTGACAATGAGGACGTTACTGTCGTTGTCGGATCAAATTATACACTGAAAGGT
CCAGCGAAGGGTATGCTTTCGTGGTATTGCTATTTTGGATCTGACACTACAGAAACTGAATTATGCAATCTTA
AGAATGGCAAAATTCAAAATTCTAAAATTAACAATTATATATGCAATGGTACTGATCTGATACTCCTCAATAT
CACGAAATCATATGCTGGCAGTTACACCTGCCCTGGAGATGATGCTGACAGTATGATTTTTTACAAAGTAACT
GTTGTTGATCCCACTACTCCACCTCCACCCACCACAACTACTCACACCACACACACAGATCAAACCGCAGCAG
AGGAGGCAGCAAAGTTAGCCTTGCAGGTCCAAGACAGTTCATTTGTTGGCATTACCCCTACACCTGATCAGCG
GTGTCCGGGGCTGCTAGTCAGCGGCATTGTCGGTGTGCTTTCGGGATTAGCAGTCATAATCATCTGCATGTTC
ATTTTTGCTTGCTGCTATAGAAGGCTTTACCGACAAAAATCAGACCCACTGCTGAACCTCTATGTTTAATTTTT
TCCAGAGTCATGAAGGCAGTTAGCGCTCTAGTTTTTTGTTCTTTGATTGGCATTGTTTTTTGCAATCCTATTCCT
AAAGTTAGCTTTATTAAAGATGTGAATGTTACTGAGGGGGGCAATGTGACACTGGTAGGTGTAGAGGGTGCT
GAAAACACCACCTGGACAAAATACCACCTCAATGGGTGGAAAGATATTTGCAATTGGAGTGTATTAGTTTAT
ACATGTGAGGGAGTTAATCTTACCATTGTCAATGCCACCTCAGCTCAAAATGGTAGAATTCAAGGACAAAGT
GTCAGTGTATCTAATGGGTATTTTACCCAACATACTTTTATCTATGACGTTAAAGTCATACCACTGCCTACGCC
TAGCCCACCTAGCACTACCACACAGACAACCCACACTACACAGACAACCACATACAGTACATTAAATCAGCC
TACCACCACTACAGCAGCAGAGGTTGCCAGCTCGTCTGGGGTCCGAGTGGCATTTTTGATGTGGGCCCCATCT
AGCAGTCCCACTGCTAGTACCAATGAGCAGACTACTGAATTTTTGTCCACTGTCGAGAGCCACACCACAGCTA
CCTCCAGTGCCTTCTCTAGCACCGCCAATCTCTCCTCGCTTTCCTCTACACCAATCAGTCCCGCTACTACTCCT
AGCCCCGCTCCTCTTCCCACTCCCCTGAAGCAAACAGACGGCGGCATGCAATGGCAGATCACCCTGCTCATTG
TGATCGGGTTGGTCATCCTGGCCGTGTTGCTCTACTACATCTTCTGCCGCCGCATTCCCAACGCGCACCGCAA
GCCGGTCTACAAGCCCATCATTGTCGGGCAGCCGGAGCCGCTTCAGGTGGAAGGGGGTCTAAGGAATCTTCT
CTTCTCTTTTACAGTATGGTGATTGAACTATGATTCCTAGACAATTCTTGATCACTATTCTTATCTGCCTCCTCC
AAGTCTGTGCCACCCTCGCTCTGGTGGCCAACGCCAGTCCAGACTGTATTGGGCCCTTCGCCTCCTACGTGCT
CTTTGCCTTCACCACCTGCATCTGCTGCTGTAGCATAGTCTGCCTGCTTATCACCTTCTTCCAGTTCATTGACTG
GATCTTTGTGCGCATCGCCTACCTGCGCCACCACCCCCAGTACCGCGACCAGCGAGTGGCGCGGCTGCTCAGG
CTCCTCTGATAAGCATGCGGGCTCTGCTACTTCTCGCGCTTCTGCTGTTAGTGCTCCCCCGTCCCGTCGACCCC
CGGTCCCCCACCCAGTCCCCCGAGGAGGTCCGCAAATGCAAATTCCAAGAACCCTGGAAATTCCTCAAATGC
TACCGCCAAAAATCAGACATGCATCCCAGCTGGATCATGATCATTGGGATCGTGAACATTCTGGCCTGCACCC
TCATCTCCTTTGTGATTTACCCCTGCTTTGACTTTGGTTGGAACTCGCCAGAGGCGCTCTATCTCCCGCCTGAA
CCTGACACACCACCACAGCAACCTCAGGCACACGCACTACCACCACTACAGCCTAGGCCACAATACATGCCC
ATATTAGACTATGAGGCCGAGCCACAGCGACCCATGCTCCCCGCTATTAGTTACTTCAATCTAACCGGCGGAG
ATGACTGACCCACTGGCCAACAACAACGTCAACGACCTTCTCCTGGACATGGACGGCCGCGCCTCGGAGCAG
CGACTCGCCCAACTTCGCATTCGCCAGCAGCAGGAGAGAGCCGTCAAGGAGCTGCAGGATGCGGTGGCCATC
CACCAGTGCAAGAGAGGCATCTTCTGCCTGGTGAAACAGGCCAAGATCTCCTACGAGGTCACTCCAAACGAC
CATCGCCTCTCCTACGAGCTCCTGCAGCAGCGCCAGAAGTTCACCTGCCTGGTCGGAGTCAACCCCATCGTCA
TCACCCAGCAGTCTGGCGATACCAAGGGGTGCATCCACTGCTCCTGCGACTCCCCCGACTGCGTCCACACTCT
GATCAAGACCCTCTGCGGCCTCCGCGACCTCCTCCCCATGAACTAATCACCCCCTTATCCAGTGAAATAAAGA
TCATATTGATGATGATTTTACAGAAATAAAAAATAATCATTTGATTTGAAATAAAGATACAATCATATTGATG
ATTTGAGTTTAACAAAAAAATAAAGAATCACTTACTTGAAATCTGATACCAGGTCTCTGTCCATGTTTTCTGC
CAACACCACTTCACTCCCCTCTTCCCAGCTCTGGTACTGCAGGCCCCGGCGGGCTGCAAACTTCCTCCACACG
CTGAAGGGGATGTCAAATTCCTCCTGTCCCTCAATCTTCATTTTATCTTCTATCAGATGTCCAAAAAGCGCGTC
CGGGTGGATGATGACTTCGACCCCGTCTACCCCTACGATGCAGACAACGCACCGACCGTGCCCTTCATCAACC
CCCCCTTCGTCTCTTCAGATGGATTCCAAGAGAAGCCCCTGGGGGTGTTGTCCCTGCGACTGGCCGACCCCGT
CACCACCAAGAACGGGGAAATCACCCTCAAGCTGGGAGAGGGGGTGGACCTCGATTCCTCGGGAAAACTCAT
CTCCAACACGGCCACCAAGGCCGCCGCCCCTCTCAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCCTTAACATGGATCAC
CCCTTTTACACTAAAGATGGAAAATTATCCTTACAAGTTTCTCCACCATTAAATATACTGAGAACAAGCATTC
TAAACACACTAGCTTTAGGTTTTGGATCAGGTTTAGGACTCCGTGGCTCTGCCTTGGCAGTACAGTTAGTCTCT
CCACTTACATTTGATACTGATGGAAACATAAAGCTTACCTTAGACAGAGGTTTGCATGTTACAACAGGAGATG
CAATTGAAAGCAACATAAGCTGGGCTAAAGGTTTAAAATTTGAAGATGGAGCCATAGCAACCAACATTGGAA

ATGGGTTAGAGTTTGGAAGCAGTAGTACAGAAACAGGTGTTGATGATGCTTACCCAATCCAAGTTAAACTTG
GATCTGGCCTTAGCTTTGACAGTACAGGAGCCATAATGGCTGGTAACAAAGAAGACGATAAACTCACTTTGT
GGACAACACCTGATCCATCACCAAACTGTCAAATACTCGCAGAAAATGATGCAAAACTAACACTTTGCTTGA
CTAAATGTGGTAGTCAAATACTGGCCACTGTGTCAGTCTTAGTTGTAGGAAGTGGAAACCTAAACCCCATTAC
TGGCACCGTAAGCAGTGCTCAGGTGTTTCTACGTTTTGATGCAAACGGTGTTCTTTTAACAGAACATTCTACA
CTAAAAAAATACTGGGGGTATAGGCAGGGAGATAGCATAGATGGCACTCCATATACCAATGCTGTAGGATTC
ATGCCCAATTTAAAAGCTTATCCAAAGTCACAAAGTTCTACTACTAAAAATAATATAGTAGGGCAAGTATAC
ATGAATGGAGATGTTTCAAAACCTATGCTTCTCACTATAACCCTCAATGGTACTGATGACAGCAACAGTACAT
ATTCAATGTCATTTTCATACACCTGGACTAATGGAAGCTATGTTGGAGCAACATTTGGGGCTAACTCTTATAC
CTTCTCATACATCGCCCAAGAATGAACACTGTATCCCACCCTGCATGCCAACCCTTCCCACCCCACTCTGTGG
AACAAACTCTGAAACACAAAATAAAATAAAGTTCAAGTGTTTTATTGATTCAACAGTTTTACAGGATTCGAGC
AGTTATTTTTCCTCCACCCTCCCAGGACATGGAATACACCACCCTCTCCCCCCGCACAGCCTTGAACATCTGA
ATGCCATTGGTGATGGACATGCTTTTGGTCTCCACGTTCCACACAGTTTCAGAGCGAGCCAGTCTCGGGTCGG
TCAGGGAGATGAAACCCTCCGGGCACTCCCGCATCTGCACCTCACAGCTCAACAGCTGAGGATTGTCCTCGGT
GGTCGGGATCACGGTTATCTGGAAGAAGCAGAAGAGCGGCGGTGGGAATCATAGTCCGCGAACGGGATCGG
CCGGTGGTGTCGCATCAGGCCCCGCAGCAGTCGCTGCCGCCGCCGCTCCGTCAAGCTGCTGCTCAGGGGGTCC
GGGTCCAGGGACTCCCTCAGCATGATGCCCACGGCCCTCAGCATCAGTCGTCTGGTGCGGCGGGCGCAGCAG
CGCATGCGGATCTCGCTCAGGTCGCTGCAGTACGTGCAACACAGAACCACCAGGTTGTTCAACAGTCCATAGT
TCAACACGCTCCAGCCGAAACTCATCGCGGGAAGGATGCTACCCACGTGGCCGTCGTACCAGATCCTCAGGT
AAATCAAGTGGTGCCCCCTCCAGAACACGCTGCCCACGTACATGATCTCCTTGGGCATGTGGCGGTTCACCAC
CTCCCGGTACCACATCACCCTCTGGTTGAACATGCAGCCCCGGATGATCCTGCGGAACCACAGGGCCAGCAC
CGCCCCGCCCGCCATGCAGCGAAGAGACCCCGGGTCCCGGCAATGGCAATGGAGGACCCACCGCTCGTACCC
GTGGATCATCTGGGAGCTGAACAAGTCTATGTTGGCACAGCACAGGCATATGCTCATGCATCTCTTCAGCACT
CTCAACTCCTCGGGGGTCAAAACCATATCCCAGGGCACGGGGAACTCTTGCAGGACAGCGAACCCCGCAGAA
CAGGGCAATCCTCGCACAGAACTTACATTGTGCATGGACAGGGTATCGCAATCAGGCAGCACCGGGTGATCC
TCCACCAGAGAAGCGCGGGTCTCGGTCTCCTCACAGCGTGGTAAGGGGGCCGGCCGATACGGGTGATGGCGG
GACGCGGCTGATCGTGTTCGCGACCGTGTCATGATGCAGTTGCTTTCGGACATTTTCGTACTTGCTGTAGCAG
AACCTGGTCCGGGCGCTGCACACCGATCGCCGGCGGCGGTCTCGGCGCTTGGAACGCTCGGTGTTGAAATTGT
AAAACAGCCACTCTCTCAGACCGTGCAGCAGATCTAGGGCCTCAGGAGTGATGAAGATCCCATCATGCCTGA
TGGCTCTGATCACATCGACCACCGTGGAATGGGCCAGACCCAGCCAGATGATGCAATTTTGTTGGGTTTCGGT
GACGGCGGGGGAGGGAAGAACAGGAAGAACCATGATTAACTTTTAATCCAAACGGTCTCGGAGTACTTCAAA
ATGAAGATCGCGGAGATGGCACCTCTCGCCCCCGCTGTGTTGGTGGAAAATAACAGCCAGGTCAAAGGTGAT
ACGGTTCTCGAGATGTTCCACGGTGGCTTCCAGCAAAGCCTCCACGCGCACATCCAGAAACAAGACAATAGC
GAAAGCGGGAGGGTTCTCTAATTCCTCAATCATCATGTTACACTCCTGCACCATCCCCAGATAATTTTCATTTT
TCCAGCCTTGAATGATTCGAACTAGTTCcTGAGGTAAATCCAAGCCAGCCATGATAAAGAGCTCGCGCAGAGC
GCCCTCCACCGGCATTCTTAAGCACACCCTCATAATTCCAAGATATTCTGCTCCTGGTTCACCTGCAGCAGATT
GACAAGCGGAATATCAAAATCTCTGCCGCGATCCCTGAGCTCCTCCCTCAGCAATAACTGTAAGTACTCTTTC
ATATCCTCTCCGAAATTTTTAGCCATAGGACCACCAGGAATAAGATTAGGGCAAGCCACAGTACAGATAAAC
CGAAGTCCTCCCCAGTGAGCATTGCCAAATGCAAGACTGCTATAAGCATGCTGGCTAGACCCGGTGATATCTT
CCAGATAACTGGACAGAAAATCGCCCAGGCAATTTTTAAGAAAATCAACAAAAGAAAAATCCTCCAGGTGGA
CGTTTAGAGCCTCGGGAACAACGATGAAGTAAATGCAAGCGGTGCGTTCCAGCATGGTTAGTTAGCTGATCT
GTAGAAAAAACAAAAATGAACATTAAACCATGCTAGCCTGGCGAACAGGTGGGTAAATCGTTCTCTCCAGCA
CCAGGCAGGCCACGGGGTCTCCGGCGCGACCCTCGTAAAAATTGTCGCTATGATTGAAAACCATCACAGAGA
GACGTTCCCGGTGGCCGGCGTGAATGATTCGACAAGATGAATACACCCCCGGAACATTGGCGTCCGCGAGTG
AAAAAAAGCGCCCGAGGAAGCAATAAGGCACTACAATGCTCAGTCTCAAGTCCAGCAAAGCGATGCCATGC
GGATGAAGCACAAAATTCTCAGGTGCGTACAAAATGTAATTACTCCCCTCCTGCACAGGCAGCAAAGCCCCC
GATCCCTCCAGGTACACATACAAAGCCTCAGCGTCCATAGCTTACCGAGCAGCAGCACACAACAGGCGCAAG
AGTCAGAGAAAGGCTGAGCTCTAACCTGTCCACCCGCTCTCTGCTCAATATATAGCCCAGATCTACACTGACG
TAAAGGCCAAAGTCTAAAAATACCCGCCAAATAATCACACACGCCCAGCACACGCCCAGAAACCGGTGACAC
ACTCAAAAAAATACGCGCACTTCCTCAAACGCCCAAAACTGCCGTCATTTCCGGGTTCCCACGCTACGTCATC
AAAACACGACTTTCAAATTCCGTCGACCGTTAAAAACGTCACCCGCCCCGCCCCTAACGGTCGCCCGTCTCTC
AGCCAATCAGCGCCCCGCATCCCCAAATTCAAACACCTCATTTGCATATTAACGCGCACAAAAAGTTTGAGGT
ATATTATTGATGATGG

VL de Tremelimumabe (SEQ ID NO:16)
VH de Tremelimumabe (SEQ ID NO:17)
CDR1 de VH de Tremelimumabe 1 (SEQ ID NO: 18)
CDR2 de VH de Tremelimumabe (SEQ ID NO: 19)
CDR3 de VH de Tremelimumabe (SEQ ID NO: 20)
CDR1 de VL de Tremelimumabe (SEQ ID NO: 21)
CDR2 de VL de Tremelimumabe (SEQ ID NO: 22)
CDR3 de VL de Tremelimumabe (SEQ ID NO: 23)

VL de Durvalumabe (MEDI4736) (SEQ ID NO: 24)
VH de MEDI4736 (SEQ ID NO: 25)
CDR1 de VH de MEDI4736 (SEQ ID NO: 26)
CDR2 de VH de MEDI4736 (SEQ ID NO: 27)
CDR3 de VH de MEDI4736 (SEQ ID NO: 28)
CDR1 de VL de MEDI4736 (SEQ ID NO: 29)
CDR2 de VL de MEDI4736 (SEQ ID NO: 30)
CDR3 de VL de MEDI4736 (SEQ ID NO: 31)
Nucleotídeo UbA76-25merPDTT (SEQ ID NO: 32)
Polipeptídeo UbA76-25merPDTT (SEQ ID NO: 33)
Nucleotídeo MAG-25merPDTT (SEQ ID NO: 34)
Polipeptídeo MAG-25merPDTT (SEQ ID NO: 35)
Nucleotídeo Ub7625merPDTT_NoSFL (SEQ ID NO: 36)
Polipeptídeo Ub7625merPDTT_NoSFL (SEQ ID NO: 37)
ChAdV68.5WTnt.MAG25mer (SEQ ID NO: 2); AC_000011.1 com sequências E1 (nt 577 a 3403) e E3 (nt 27.125-31.825) deletadas; nucleotídeos ATCC VR-594 correspondentes substituídos nas cinco posições; modelo de cassete de neoantígeno sob o controle do promotor/intensificador de CMV inserido no lugar de E1 deletado; SV40 polyA 3' do cassete
Vírus da encefalite equina venezuelana [VEE] (SEQ ID NO: 3) GenBank: L01442.2
VEE-MAG25mer (SEQ ID NO: 4); contém nucleotídeo MAG-25merPDTT (bases 30-1755)
Cepa do vírus da encefalite equina venezuelana TC-83 [TC-83] (SEQ ID NO: 5) GenBank: L01443.1
Vetor de entrega VEE (SEQ ID NO: 6); Genoma VEE com nucleotídeos 7544-11175 deletados [proteínas estruturais de alfavírus removidas]

Vetor de entrega TC-83 (SEQ ID NO: 7); Genoma TC-83 com nucleotídeos 7544-11175 deletados [proteínas estruturais de alfavírus removidas]
Vetor de produção de VEE (SEQ ID NO: 8); Genoma VEE com nucleotídeos 7544-11175 deletados, mais T7-promotor 5', mais sítios de restrição 3'
Vetor de produção TC-83 (SEQ ID NO: 9); Genoma TC-83 com nucleotídeos 7544-11175 deletados, mais T7-promotor 5', mais sítios de restrição 3'
VEE-UbAAY (SEQ ID NO: 14); Vetor de entrega de VEE com epítopos de tumor de camundongo de MHC de classe I SIINFEKL e AH1-A5 inseridos
VEE-Luciferase (SEQ ID NO: 15); Vetor de entrega VEE com gene luciferase inserido em 7545
ubiquitina (SEQ ID NO: 38)> UbG76 0-228
Ubiquitina A76 (SEQ ID NO: 39)> UbA76 0-228
HLA-A2 (MHC de classe I) de peptídeo sinal (SEQ ID NO: 40)> MHC SignalPep 0-78
HLA-A2 (MHC de classe I) Domínio de membrana trans (SEQ ID NO: 41)> Domínio HLA A2 TM 0-201
Seq. Líder IgK (SEQ ID NO: 42)> Seq Líder IgK 0-60
DC-Lamp humano (SEQ ID NO: 43)> HumanDCLAMP 0-3178
LAMP1 de camundongo (SEQ ID NO: 44)> MouseLamp1 0-1858
cDNA de Lamo1 Humano 1 (SEQ ID NO: 45)> Lamp1 Humano 1 0-2339
Sequência de ácido nucléico de toxoide tetânico (SEQ ID NO: 46)
Sequência de aminoácidos do toxoide tetânico (SEQ ID NO: 47)
Sequência de nulceotídeo de PADRE (SEQ ID NO: 48)

Sequência de aminoácidos de PADRE (SEQ ID NO: 49)
WPRE (SEQ ID NO: 50)> WPRE 0-593
IRES (SEQ ID NO: 51)> eGFP_IRES_SEAP_Insert 1746-2335
GFP (SEQ ID NO:52)
SEAP (SEQ ID NO:53)
Luciferase de vagalume (SEQ ID NO: 54)
FMDV 2A (SEQ ID NO: 55)
ChAdV68-MAG-E4 deletado (SEQ ID NO: 57)
CATCaTCAATAATATACCTCAAACTTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTGAATTTGGGGAGGAA GGGCGGTGATTGGTCGAGGGATGAGCGACCGTTAGGGGCGGGGCGAGTGACGTTTTGATGACGTGGTTGCGA GGAGGAGCCAGTTTGCAAGTTCTCGTGGGAAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTTGAACACGGAAATACT CAATTTTCCCGCGCTCTCTGACAGGAAATGAGGTGTTTCTGGGCGGATGCAAGTGAAAACGGGCCATTTTCGC GCGAAAACTGAATGAGGAAGTGAAAATCTGAGTAATTTCGCGTTTATGGCAGGGAGGAGTATTTGCCGAGGG CCGAGTAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTACCGTGTTTTTCACCTAAATTTCCGCGTACGGTGTC AAAGTCCGGTGTTTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGCCAGGGTATTTAAACCTGCGCTCTCCAGTCAAGAGGC CACTCTTGAGTGCCAGCGAGAAGAGTTTTCTCCTCCGCGCCGCGAGTCAGATCTACACTTTGAAAGTAGGGAT AACAGGGTAATgacattgattattgactagttGttaaTAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTT

CCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATA
ATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAA
CTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATG
GCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTC
ATCGCTATTACCATGgTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGAT
TTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATG
TCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAgcT
CGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGATCGCG
ccaccATGGCCGGGATGTTCCAGGCACTGTCCGAAGGCTGCACACCCTATGATATTAACCAGATGCTGAATGTC
CTGGGAGACCACCAGGTCTCTGGCCTGGAGCAGCTGGAGAGCATCATCAACTTCGAGAAGCTGACCGAGTGG
ACAAGCTCCAATGTGATGCCTATCCTGTCCCCACTGACCAAGGGCATCCTGGGCTTCGTGTTTACCCTGACAG
TGCCTTCTGAGCGGGGCCTGTCTTGCATCAGCGAGGCAGACGCAACCACACCAGAGTCCGCCAATCTGGGCG
AGGAGATCCTGTCTCAGCTGTACCTGTGGCCCCGGGTGACATATCACTCCCCTTCTTACGCCTATCACCAGTTC
GAGCGGAGAGCCAAGTACAAGAGACACTTCCCAGGCTTTGGCCAGTCTCTGCTGTTCGGCTACCCCGTGTACG
TGTTCGGCGATTGCGTGCAGGGCGACTGGGATGCCATCCGGTTTAGATACTGCGCACCACCTGGATATGCACT
GCTGAGGTGTAACGACACCAATTATTCCGCCCTGCTGGCAGTGGGCGCCCTGGAGGGCCCTCGCAATCAGGA
TTGGCTGGGCGTGCCAAGGCAGCTGGTGACACGCATGCAGGCCATCCAGAACGCAGGCCTGTGCACCCTGGT
GGCAATGCTGGAGGAGACAATCTTCTGGCTGCAGGCCTTTCTGATGGCCCTGACCGACAGCGGCCCCAAGAC
AAACATCATCGTGGATTCCCAGTACGTGATGGGCATCTCCAAGCCTTCTTTCCAGGAGTTTGTGGACTGGGAG
AACGTGAGCCCAGAGCTGAATTCCACCGATCAGCCATTCTGGCAGGCAGGAATCCTGGCAAGGAACCTGGTG
CCTATGGTGGCCACAGTGCAGGGCCAGAATCTGAAGTACCAGGGCCAGAGCCTGGTCATCAGCGCCTCCATC
ATCGTGTTTAACCTGCTGGAGCTGGAGGGCGACTATCGGGACGATGGCAACGTGTGGGTGCACACCCCACTG
AGCCCCAGAACACTGAACGCCTGGGTGAAGGCCGTGGAGGAGAAGAAGGGCATCCCAGTGCACCTGGAGCT
GGCCTCCATGACCAATATGGAGCTGATGTCTAGCATCGTGCACCAGCAGGTGAGGACATACGGACCCGTGTT
CATGTGCCTGGGAGGCCTGCTGACCATGGTGGCAGGAGCCGTGTGGCTGACAGTGCGGGTGCTGGAGCTGTT
CAGAGCCGCCCAGCTGGCCAACGATGTGGTGCTGCAGATCATGGAGCTGTGCGGAGCAGCCTTTCGCCAGGT
GTGCCACACCACAGTGCCATGGCCCAATGCCTCCCTGACCCCCAAGTGGAACAATGAGACAACACAGCCTCA
GATCGCCAACTGTAGCGTGTACGACTTCTTCGTGTGGCTGCACTACTATAGCGTGAGGGATACCCTGTGGCCC
CGCGTGACATACCACATGAATAAGTACGCCTATCACATGCTGGAGAGGCGCGCCAAGTATAAGAGAGGCCCT
GGCCCAGGCGCAAAGTTTGTGGCAGCATGGACCCTGAAGGCCGCCGCCGGCCCCGGCCCCGGCCAGTATATC
AAGGCTAACAGTAAGTTCATTGGAATCACAGAGCTGGGACCCGGACCTGGATAATGAGTTTAAACTCCCATT
TAAATGTGAGGGTTAATGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGA
ATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAA
TAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTTAA
AGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAGTGAGTAGTGTTCTG
GGGCGGGGGAGGACCTGCATGAGGGCCAGAATAACTGAAATCTGTGCTTTTCTGTGTGTTGCAGCAGCATGA
GCGGAAGCGGCTCCTTTGAGGGAGGGGTATTCAGCCCTTATCTGACGGGGCGTCTCCCCTCCTGGGCGGGAGT
GCGTCAGAATGTGATGGGATCCACGGTGGACGGCCGGCCCGTGCAGCCCGCGAACTCTTCAACCCTGACCTA
TGCAACCCTGAGCTCTTCGTCGTTGGACGCAGCTGCCGCCGCAGCTGCTGCATCTGCCGCCAGCGCCGTGCGC
GGAATGGCCATGGGCGCCGGCTACTACGGCACTCTGGTGGCCAACTCGAGTTCCACCAATAATCCCGCCAGC
CTGAACGAGGAGAAGCTGTTGCTGCTGATGGCCCAGCTCGAGGCCTTGACCCAGCGCCTGGGCGAGCTGACC
CAGCAGGTGGCTCAGCTGCAGGAGCAGACGCGGGCCGCGGTTGCCACGGTGAAATCCAAATAAAAAATGAA
TCAATAAATAAACGGAGACGGTTGTTGATTTTAACACAGAGTCTGAATCTTTATTTGATTTTTCGCGCGCGGT
AGGCCCTGGACCACCGGTCTCGATCATTGAGCACCCGGTGGATCTTTTCCAGGACCCGGTAGAGGTGGGCTTG
GATGTTGAGGTACATGGGCATGAGCCCGTCCCGGGGGTGGAGGTAGCTCCATTGCAGGGCCTCGTGCTCGGG
GGTGGTGTTGTAAATCACCCAGTCATAGCAGGGGCGCAGGGCATGGTGTTGCACAATATCTTTGAGGAGGAG
ACTGATGGCCACGGGCAGCCCTTTGGTGTAGGTGTTTACAAATCTGTTGAGCTGGGAGGGATGCATGCGGGG
GGAGATGAGGTGCATCTTGGCCTGGATCTTGAGATTGGCGATGTTACCGCCCAGATCCCGCCTGGGGTTCATG
TTGTGCAGGACCACCAGCACGGTGTATCCGGTGCACTTGGGGAATTTATCATGCAACTTGGAAGGGAAGGCG
TGAAAGAATTTGGCGACGCCTTTGTGCCCCGCCCAGGTTTTCCATGCACTCATCCATGATGATGGCGATGGGCC
CGTGGGCGGCGGCCTGGGCAAAGACGTTTCGGGGGTCGGACACATCATAGTTGTGGTCCTGGGTGAGGTCAT
CATAGGCCATTTTAATGAATTTGGGGCGGAGGGTGCCGGACTGGGGGACAAAGGTHCCCTCGATCCCGGGGGC
GTAGTTCCCCTCACAGATCTGCATCTCCCAGGCTTTGAGCTCGGAGGGGGGGATCATGTCCACCTGCGGGGCG
ATAAAGAACACGGTTTCCGGGGCGGGGGAGATGAGCTGGGCCGAAAGCAAGTTCCGGAGCAGCTGGGACTT
GCCGCAGCCGGTGGGGCCGTAGATGACCCCGATGACCGGCTGCAGGTGGTAGTTGAGGGAGAGACAGCTGCC
GTCCTCCCGGAGGAGGGGGGCCACCTCGTTCATCATCTCGCGCACGTGCATGTTCTCGCGCACCAGTTCCGCC
AGGAGGCGCTCTCCCCCCAGGGATAGGAGCTCCTGGAGCGAGGCGAAGTTTTTCAGCGGCTTGAGTCCGTCG
GCCATGGGCATTTTGGAGAGGGTTTGTTGCAAGAGTTCCAGGCGGTCCCAGAGCTCGGTGATGTGCTCTACGG
CATCTCGATCCAGCAGACCTCCTCGTTTCGCGGGTTGGGACGGCTGCGGGAGTAGGGCACCAGACGATGGGC
GTCCAGCGCAGCCAGGGTCCGGTCCTTCCAGGGTCGCAGCGTCCGCGTCAGGGTGGTCTCCGTCACGGTGAA
GGGGTGCGCGCCGGGCTGGGCGCTTGCGAGGGTGCGCTTCAGGCTCATCCGGCTGGTCGAAAACCGCTCCCG
ATCGGCGCCCTGCGCGTCGGCCAGGTAGCAATTGACCATGAGTTCGTAGTTGAGCGCCTCGGCCGCGTGGCCT
TTGGCGCGGAGCTTACCTTTGGAAGTCTGCCCGCAGGCGGGACAGAGGAGGGACTTGAGGGCGTAGAGCTTG
GGGGCGAGGAAGACGGACTCGGGGGCGTAGGCGTCCGCGCCGCAGTGGGCGCAGACGGTCTCGCACTCCAC
GAGCCAGGTGAGGTCGGGCTGGTCGGGGTCAAAAACCAGTTTCCCGCCGTTCTTTTTGATGCGTTTCTTACCT
TTGGTCTCCATGAGCTCGTGTCCCCGCTGGGTGACAAAGAGGCTGTCCGTGTCCCCGTAGACCGACTTTATGG

GCCGGTCCTCGAGCGGTGTGCCGCGGTCCTCCTCGTAGAGGAACCCCGCCCACTCCGAGACGAAAGCCCGGG
TCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCCACGTGGGACGGGTAGCGGTCGTTGTCCACCAGCGGGTCCACCTTTTCCA
GGGTATGCAAACACATGTCCCCCTCGTCCACATCCAGGAAGGTGATTGGCTTGTAAGTGTAGGCCACGTGACC
GGGGGTCCCGGCCGGGGGGGTATAAAAGGGTGCGGGTCCCTGCTCGTCCTCACTGTCTTCCGGATCGCTGTCC
AGGAGCGCCAGCTGTTGGGGTAGGTATTCCCTCTCGAAGGCGGGCATGACCTCGGCACTCAGGTTGTCAGTTT
CTAGAAACGAGGAGGATTTGATATTGACGGTGCCGGCGGAGATGCCTTTCAAGAGCCCCTCGTCCATCTGGTC
AGAAAAGACGATCTTTTTGTTGTCGAGCTTGGTGGCGAAGGAGCCGTAGAGGGCGTTGGAGAGGAGCTTGGC
GATGGAGCGCATGGTCTGGTTTTTTTCCTTGTCGGCGCGCTCCTTGGCGGCGATGTTGAGCTGCACGTACTCGC
GCGCCACGCACTTCCATTCGGGGAAGACGGTGGTCAGCTCGTCGGGCACGATTCTGACCTGCCAGCCCCGATT
ATGCAGGGTGATGAGGTCCACACTGGTGGCCACCTCGCCGCGCAGGGGCTCATTAGTCCAGCAGAGGCGTCC
GCCCTTGCGCGAGCAGAAGGGGGGCAGGGGGTCCAGCATGACCTCGTCGGGGGGGTCGGCATCGATGGTGA
AGATGCCGGGCAGGAGGTCGGGGTCAAAGTAGCTGATGGAAGTGGCCAGATCGTCCAGGGCAGCTTGCCATT
CGCGCACGGCCAGCGCGCGCTCGTAGGGACTGAGGGGCGTGCCCCAGGGCATGGGATGGGTAAGCGCGGAG
GCGTACATGCCGCAGATGTCGTAGACGTAGAGGGGCTCCTCGAGGATGCCGATGTAGGTGGGGTAGCAGCGC
CCCCCGCGGATGCTGGCGCGCACGTAGTCATACAGCTCGTGCGAGGGGGCGAGGAGCCCCGGGCCCAGGTTG
GTGCGACTGGGCTTTTCGGCGCGGTAGACGATCTGGCGGAAAATGGCATGCGAGTTGGAGGAGATGGTGGGC
CTTTGGAAGATGTTGAAGTGGGCGTGGGGCAGTCCGACCGAGTCGCGGATGAAGTGGGCGTAGGAGTCTTGC
AGCTTGGCGACGAGCTCGGCGGTGACTAGGACGTCCAGAGCGCAGTAGTCGAGGGTCTCCTGGATGATGTCA
TACTTGAGCTGTCCCTTTTGTTTCCACAGCTCGCGGTTGAGAAGGAACTCTTCGCGGTCCTTCCAGTACTCTTC
GAGGGGGAACCCGTCCTGATCTGCACGGTAAGAGCCTAGCATGTAGAACTGGTTGACGGCCTTGTAGGCGCA
GCAGCCCTTCTCCACGGGGAGGGCGTAGGCCTGGGCGGCCTTGCGCAGGGAGGTGTGCGTGAGGGCGAAAGT
GTCCCTGACCATGACCTTGAGGAACTGGTGCTTGAAGTCGATATCGTCGCAGCCCCCCTGCTCCCAGAGCTGG
AAGTCCGTGCGCTTCTTGTAGGCGGGGTTGGGCAAAGCGAAAGTAACATCGTTGAAGAGGATCTTGCCCGCG
CGGGGCATAAAGTTGCGAGTGATGCGGAAAGGTTGGGGCACCTCGGCCCGGTTGTTGATGACCTGGGCGGCG
AGCACGATCTCGTCGAAGCCGTTGATGTTGTGGCCCACGATGTAGAGTTCCACGAATCGCGGACGGCCCTTGA
CGTGGGGCAGTTTCTTGAGCTCCTCGTAGGTGAGCTCGTCGGGGTCGCTGAGCCCGTGCTGCTCGAGCGCCCA
GTCGGCGAGATGGGGGTTGGCGCGGAGGAAGGAAGTCCAGAGATCCACGGCCAGGGCGGTTTGCAGACGGT
CCCGGTACTGACGGAACTGCTGCCCGACGGCCATTTTTTCGGGGGTGACGCAGTAGAAGGTGCGGGGGTCCC
CGTGCCAGCGATCCCATTTGAGCTGGAGGGCGAGATCGAGGGCGAGCTCGACGAGCCGGTCGTCCCCGGAGA
GTTTCATGACCAGCATGAAGGGGACGAGCTGCTTGCCGAAGGACCCCATCCAGGTGTAGGTTTCCACATCGT
AGGTGAGGAAGAGCCTTTCGGTGCGAGGATGCGAGCCGATGGGGAAGAACTGGATCTCCTGCCACCAATTGG
AGGAATGGCTGTTGATGTGATGGAAGTAGAAATGCCGACGGCGCGCCGAACACTCGTGCTTGTGTTTATACA
AGCGGCCACAGTGCTCGCAACGCTGCACGGGATGCACGTGCTGCACGAGCTGTACCTGAGTTCCTTTGACGA
GGAATTTCAGTGGGAAGTGGAGTCGTGGCGCCTGCATCTCGTGCTGTACTACGTCGTGGTGGTCGGCCTGGCC
CTCTTCTGCCTCGATGGTGGTCATGCTGACGAGCCCGCGCGGGAGGCAGGTCCAGACCTCGGCGCGAGCGGG
TCGGAGAGCGAGGACGAGGGCGCGCAGGCCGGAGCTGTCCAGGGTCCTGAGACGCTGCGGAGTCAGGTCAG
TGGGCAGCGGCGGCGCGCGGTTGACTTGCAGGAGTTTTTCCAGGGCGCGCGGGAGGTCCAGATGGTACTTGA
TCTCCACCGCGCCATTGGTGGCGACGTCGATGGCTTGCAGGGTCCCGTGCCCCTGGGGTGTGACCACCGTCCC
CCGTTTCTTCTTGGGCGGCTGGGGCGACGGGGGCGGTGCCTCTTCCATGGTTAGAAGCGGCGGCGAGGACGC
GCGCCGGGCGGCAGGGGCGGCTCGGGGCCCGGAGGCAGGGGCGGCAGGGGCACGTCGGCGCCGCGCGCGGG
TAGGTTCTGGTACTGCGCCCGGAGAAGACTGGCGTGAGCGACGACGCGACGGTTGACGTCCTGGATCTGACG
CCTCTGGGTGAAGGCCACGGGACCCGTGAGTTTGAACCTGAAAGAGAGTTCGACAGAATCAATCTCGGTATC
GTTGACGGCGGCCTGCCGCAGGATCTCTTGCACGTCGCCCGAGTTGTCCTGGTAGGCGATCTCGGTCATGAAC
TGCTCGATCTCCTCCTCTTGAAGGTCTCCGCGGCCGGCGCGCTCCACGGTGGCCGCGAGGTCGTTGGAGATGC
GGCCCATGAGCTGCGAGAAGGCGTTCATGCCCGCCTCGTTCCAGACGCGGCTGTAGACCACGACGCCCTCGG
GATCGCgGGCGCGCATGACCACCTGGGCGAGGTTGAGCTCCACGTGGCGCGTGAAGACCGCGTAGTTGCAGA
GGCGCTGGTAGAGGTAGTTGAGCGTGGTGGCGATGTGCTCGGTGACGAAGAAATACATGATCCAGCGGCGGA
GCGGCATCTCGCTGACGTCGCCCAGCGCCTCCAAACGTTCCATGGCCTCGTAAAAGTCCACGGCGAAGTTGA
AAAACTGGGAGTTGCGCGCCGAGACGGTCAACTCCTCCTCCAGAAGACGGATGAGCTCGGCGATGGTGGCGC
GCACCTCGCGCTCGAAGGCCCCCGGGAGTTCCTCCACTTCCTCTTCTTCCTCCTCCACTAACATCTCTTCTACT
TCCTCCTCAGGCGGCAGTGGTGGCGGGGGAGGGGGCCTGCGTCGCCGGCGGCGCACGGGCAGACGGTCGATG
AAGCGCTCGATGGTCTCGCCGCGCCGGCGTCGCATGGTCTCGGTGACGGCGCGCCCGTCCTCGCGGGGCCGC
AGCGTGAAGACGCCGCCGCGCATCTCCAGGTGGCCGGGGGGGTCCCCGTTGGGCAGGGAGAGGGCGCTGAC
GATGCATCTTATCAATTGCCCCGTAGGGACTCCGCGCAAGGACCTGAGCGTCTCGAGATCCACGGGATCTGA
AAACCGCTGAACGAAGGCTTCGAGCCAGTCGCAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACGGTTTCTTCTGGCGGGTC
ATGTTGGTTGGGAGCGGGGCGGGCGATGCTGCTGGTGATGAAGTTGAAATAGGCGGTTCTGAGACGGCGGAT
GGTGGCGAGGAGCACCAGGTCTTTGGGCCCGGCTTGCTGGATGCGCAGACGGTCGGCCATGCCCCAGGCGTG
GTCCTGACACCTGGCCAGGTCCTTGTAGTAGTCCTGCATGAGCCGCTCCACGGGCACCTCCTCCTCGCCCGCG
CGGCCGTGCATGCGCGTGAGCCCGAAGCCGCGCTGGGGCTGGACGAGCGCCAGGTCGGCGACGACGCGCTCG
GCGAGGATGGCTTGCTGGATCTGGGTGAGGGTGGTCTGGAAGTCATCAAAGTCGACGAAGCGGTGGTAGGCT
CCGGTGTTGATGGTGTAGGAGCAGTTGGCCATGACGGACCAGTTGACGGTCTGGTGGCCCCGGACGCACGAGC
TCGTGGTACTTGAGGCGCGAGTAGGCGCGCGTGTCGAAGATGTAGTCGTTGCAGGTGCGCACCAGGTACTGG
TAGCCGATGAGGAAGTGCGGCGGCGGCTGGCGGTAGAGCGGCCATCGCTCGGTGGCGGGGGCGCCGGGCGC
GAGGTCCTCGAGCATGGTGCGGTGGTAGCCGTAGATGTACCTGGACATCCAGGTGATGCCGGCGGCGGTGGT
GGAGGCGCGCGGGAACTCGCGGACGCGGTTCCAGATGTTGCGCAGCGGCAGGAAGTAGTTCATGGTGGGCAC
GGTCTGGCCCGTGAGGCGCGCGCAGTCGTGGATGCTCTATACGGGCAAAAACGAAAGCGGTCAGCGGCTCGA

CTCCGTGGCCTGGAGGCTAAGCGAACGGGTTGGGCTGCGCGTGTACCCCGGTTCGAATCTCGAATCAGGCTG
GAGCCGCAGCTAACGTGGTATTGGCACTCCCGTCTCGACCCAAGCCTGCACCAACCCTCCAGGATACGGAGG
CGGGTCGTTTTTGCAACTTTTTTTTTGGAGGCCGGATGAGACTAGTAAGCGCGGAAAGCGGCCGACCGCGATGG
CTCGCTGCCGTAGTCTGGAGAAGAATCGCCAGGGTTGCGTTGCGGTGTGCCCCGGTTCGAGGCCGGCCGGATT
CCGCGGCTAACGAGGGCGTGGCTGCCCCGTCGTTTCCAAGACCCCATAGCCAGCCGACTTCTCCAGTTACGGA
GCGAGCCCCTCTTTTGTTTTGTTTGTTTTTGCCAGATGCATCCCGTACTGCGGCAGATGCGCCCCCACCACCCT
CCACCGCAACAACAGCCCCCTCCACAGCCGGCGCTTCTGCCCCCGCCCCAGCAGCAACTTCCAGCCACGACC
GCCGCGGCCGCCGTGAGCGGGGCTGGACAGAGTTATGATCACCAGCTGGCCTTGGAAGAGGGCGAGGGGCT
GGCGCGCCTGGGGGCGTCGTCGCCGGAGCGGCACCCGCGCGTGCAGATGAAAAGGGACGCTCGCGAGGCCT
ACGTGCCCAAGCAGAACCTGTTCAGAGACAGGAGCGGCGAGGAGCCCGAGGAGATGCGCGCGGCCCCGGTTC
CACGCGGGGCGGGAGCTGCGGCGCGGCCTGGACCGAAAGAGGGTGCTGAGGGACGAGGATTTCGAGGCGGA
CGAGCTGACGGGGATCAGCCCCGCGCGCGCGCACGTGGCCGCGGCCAACCTGGTCACGGCGTACGAGCAGAC
CGTGAAGGAGGAGAGCAACTTCCAAAAATCCTTCAACAACCACGTGCGCACCCTGATCGCGCGCGAGGAGGT
GACCCTGGGCCTGATGCACCTGTGGGACCTGCTGGAGGCCATCGTGCAGAACCCCACCAGCAAGCCGCTGAC
GGCGCAGCTGTTCCTGGTGGTGCAGCATAGTCGGGACAACGAAGCGTTCAGGGAGGCGCTGCTGAATATCAC
CGAGCCCGAGGGCCGCTGGCTCCTGGACCTGGTGAACATTCTGCAGAGCATCGTGGTGCAGGAGCGCGGGCT
GCCGCTGTCCGAGAAGCTGGCGGCCATCAACTTCTCGGTGCTGAGTTTGGGCAAGTACTACGCTAGGAAGAT
CTACAAGACCCCGTACGTGCCCATAGACAAGGAGGTGAAGATCGACGGGTTTTACATGCGCATGACCCTGAA
AGTGCTGACCCTGAGCGACGATCTGGGGGTGTACCGCAACGACAGGATGCACCGTGCGGTGAGCGCCAGCAG
GCGGCGCGAGCTGAGCGACCAGGAGCTGATGCATAGTCTGCAGCGGGCCCTGACCGGGGCCGGGACCGAGG
GGGAGAGCTACTTTGACATGGGCGCGGACCTGCACTGGCAGCCCAGCCGCCGGGCCTTGGAGGCGGCGGCAG
GACCCTACGTAGAAGAGGTGGACGATGAGGTGGACGAGGAGGGCGAGTACCTGGAAGACTGATGGCGCGAC
CGTATTTTTGCTAGATGCAACAACAACAGCCACCTCCTGATCCCGCGATGCGGGCGGCGCTGCAGAGCCAGC
CGTCCGGCATTAACTCCTCGGACGATTGGACCCAGGCCATGCAACGCATCATGGCGCTGACGACCCGCAACC
CCGAAGCCTTTAGACAGCAGCCCCAGGCCAACCGGCTCTCGGCCATCCTGGAGGCCGTGGTGCCCTCGCGCTC
CAACCCCACGCACGAGAAGGTCCTGGCCATCGTGAACGCGCTGGTGGAGAACAAGGCCATCCGCGGCGACG
AGGCCGGCCTGGTGTACAACGCGCTGCTGGAGCGCGTGGCCCGCTACAACAGCACCAACGTGCAGACCAACC
TGGACCGCATGGTGACCGACGTGCGCGAGGCCGTGGCCCAGCGCGAGCGGTTCCACCGCGAGTCCAACCTGG
GATCCATGGTGGCGCTGAACGCCTTCCTCAGCACCCAGCCCGCCAACGTGCCCCGGGGCCAGGAGGACTACA
CCAACTTCATCAGCGCCCTGCGCCTGATGGTGACCGAGGTGCCCCAGAGCGAGGTGTACCAGTCCGGGCCGG
ACTACTTCTTCCAGACCAGTCGCCAGGGCTTGCAGACCGTGAACCTGAGCCAGGCTTTCAAGAACTTGCAGGG
CCTGTGGGGCGTGCAGGCCCCGGTCGGGGACCGCGCGACGGTGTCGAGCCTGCTGACGCCGAACTCGCGCCT
GCTGCTGCTGCTGGTGGCCCCCTTCACGGACAGCGGCAGCATCAACCGCAACTCGTACCTGGGCTACCTGATT
AACCTGTACCGCGAGGCCATCGGCCAGGCGCACGTGGACGAGCAGACCTACCAGGAGATCACCCACGTGAGC
CGCGCCCTGGGCCAGGACGACCCGGGCAACCTGGAAGCCACCCTGAACTTTTTGCTGACCAACCGGTCGCAG
AAGATCCCGCCCCAGTACGCGCTCAGCACCGAGGAGGAGCGCATCCTGCGTTACGTGCAGCAGAGCGTGGGC
CTGTTCCTGATGCAGGAGGGGGCCACCCCCAGCGCCGCGCTCGACATGACCGCGCGCAACATGGAGCCCAGC
ATGTACGCCAGCAACCGCCCCGTTCATCAATAAACTGATGGACTACTTGCATCGGGCGGCCGCCATGAACTCTG
ACTATTTCACCAACGCCATCCTGAATCCCCACTGGCTCCCGCCGCCGGGGTTCTACACGGGCGAGTACGACAT
GCCCGACCCCAATGACGGGTTCCTGTGGGACGATGTGGACAGCAGCGTGTTCTCCCCCCGACCGGGTGCTAA
CGAGCGCCCCTTGTGGAAGAAGGAAGGCAGCGACCGACGCCCGTCCTCGGCGCTGTCCGGCCGCGAGGGTGC
TGCCGCCGGCGGTGCCCGAGGCCGCCAGTCCTTTCCCGAGCTTGCCCTTCTCGCTGAACAGTATCCGCAGCAGC
GAGCTGGGCAGGATCACGCGCCCGCGCTTGCTGGGCGAAGAGGAGTACTTGAATGACTCGCTGTTGAGACCC
GAGCGGGAGAAGAACTTCCCCAATAACGGGATAGAAAGCCTGGTGGACAAGATGAGCCGCTGGAAGACGTA
TGCGCAGGAGCACAGGGACGATCCCCGGGCGTCGCAGGGGGCCACGAGCCGGGGCAGCGCCGCCCGTAAAC
GCCGGTGGCACGACAGGCAGCGGGGACAGATGTGGGACGATGAGGACTCCGCCGACGACAGCAGCGTGTTG
GACTTGGGTGGGAGTGGTAACCCGTTCGCTCACCTGCGCCCCCGTATCGGGCGCATGATGTAAGAGAAACCG
AAAATAAATGATACTCACCAAGGCCATGGCGACCAGCGTGCGTTCGTTTCTTCTCTGTTGTTGTTGTATCTAGT
ATGATGAGGCGTGCGTACCCGGAGGGTCCTCCTCCCTCGTACGAGAGCGTGATGCAGCAGGCGATGGCGGCG
GCGGCGATGCAGCCCCCGCTGGAGGCTCCTTACGTGCCCCCGCGGTACCTGGCGCCTACGGAGGGGCGGAAC
AGCATTCGTTACTCGGAGCTGGCACCCTTGTACGATACCACCCGGTTGTACCTGGTGGACAACAAGTCGGCGG
ACATCGCCTCGCTGAACTACCAGAACGACCACAGCAACTTCCTGACCACCGTGGTGCAGAACAATGACTTCA
CCCCCACGGAGGCCAGCACCCAGACCATCAACTTTGACGAGCGCTCGCGGTGGGGCGGCCAGCTGAAAACCA
TCATGCACACCAACATGCCCAACGTGAACGAGTTCATGTACAGCAACAAGTTCAAGGCGCGGGTGATGGTCT
CCCGCAAGACCCCCAATGGGGTGACAGTGACAGAGGATTATGATGGTAGTCAGGATGAGCTGAAGTATGAAT
GGGTGGAATTTGAGCTGCCCGAAGGCAACTTCTCGGTGACCATGACCATCGACCTGATGAACAACGCCATCA
TCGACAATTACTTGGCGGTGGGGCGGCAGAACGGGGTGCTGGAGAGCGACATCGGCGTGAAGTTCGACACTA
GGAACTTCAGGCTGGGCTGGGACCCCGTGACCGAGCTGGTCATGCCCGGGGTGTACACCAACGAGGCTTTCC
ATCCCGATATTGTCTTGCTGCCCGGCTGCGGGGTGGACTTCACCGAGAGCCGCCTCAGCAACCTGCTGGGCAT
TCGCAAGAGGCAGCCCTTCCAGGAAGGCTTCCAGATCATGTACGAGGATCTGGAGGGGGGCAACATCCCCGC
GCTCCTGGATGTCGACGCCTATGAGAAAAGCAAGGAGGATGCAGCAGCTGAAGCAACTGCAGCCGTAGCTAC
CGCCTCTACCGAGGTCAGGGGCGATAATTTTGCAAGCGCCGCAGCAGTGGCAGCGGCCGAGGCGGCTGAAAC
CGAAAGTAAGATAGTCATTCAGCCGGTGGAGAAGGATAGCAAGAACAGGAGCTACAACGTACTACCGGACA
AGATAAACACCGCCTACCGCAGCTGGTACCTAGCCTACAACTATGGCGACCCCGAGAAGGGCGTGCGCTCCT
GGACGCTGCTCACCACCTCGGACGTCACCTGCGGCGTGGAGCAAGTCTACTGGTCGCTGCCCGACATGATGC
AAGACCCGGTCACCTTCCGCTCCACGCGTCAAGTTAGCAACTACCCGGTGGTGGGCGCCGAGCTCCTGCCCGT

CTACTCCAAGAGCTTCTTCAACGAGCAGGCCGTCTACTCGCAGCAGCTGCGCGCCTTCACCTCGCTTACGCAC
GTCTTCAACCGCTTCCCCGAGAACCAGATCCTCGTCCGCCCGCCCGCGCCCACCATTACCACCGTCAGTGAAA
ACGTTCCTGCTCTCACAGATCACGGGACCCTGCCGCTGCGCAGCAGTATCCGGGGAGTCCAGCGCGTGACCGT
TACTGACGCCAGACGCCGCACCTGCCCCTACGTCTACAAGGCCCTGGGCATAGTCGCGCCGCGCGTCCTCTCG
AGCCGCACCTTCTAAATGTCCATTCTCATCTCGCCCAGTAATAACACCGGTTGGGGCCTGCGCGCGCCCAGCA
AGATGTACGGAGGCGCTCGCCAACGCTCCACGCAACACCCCGTGCGCGTGCGCGGGCACTTCCGCGCTCCCT
GGGGCGCCCTCAAGGGCCGCGTGCGGTCGCGCACCACCGTCGACGACGTGATCGACCAGGTGGTGGCCGACG
CGCGCAACTACACCCCCGCCGCCGCGCCCGTCTCCACCGTGGACGCCGTCATCGACAGCGTGGTGGCcGACGC
GCGCCGGTACGCCCGCGCCAAGAGCCGGCGGCGGCGCATCGCCCGGCGGCACCGGAGCACCCCCGCCATGCG
CGCGGCGCGAGCCTTGCTGCGCAGGGCCAGGCGCACGGGACGCAGGGCCATGCTCAGGGCGGCCAGACGCG
CGGCTTCAGGCGCCAGCGCCGGCAGGACCCGGAGACGCGCGGCCACGGCGGCGGCAGCGGCCATCGCCAGC
ATGTCCCGCCCGCGGCGAGGGAACGTGTACTGGGTGCGCGACGCCGCCACCGGTGTGCGCGTGCCCGTGCGC
ACCCGCCCCCCTCGCACTTGAAGATGTTCACTTCGCGATGTTGATGTGTCCCAGCGGCGAGGAGGATGTCCAA
GCGCAAATTCAAGGAAGAGATGCTCCAGGTCATCGCGCCTGAGATCTACGGCCCTGCGGTGGTGAAGGAGGA
AAGAAAGCCCCGCAAAATCAAGCGGGTCAAAAAGGACAAAAAGGAAGAAGAAAGTGATGTGGACGGATTG
GTGGAGTTTGTGCGCGAGTTCGCCCCCCGGCGGCGCGTGCAGTGGCGCGGGCGGAAGGTGCAACCGGTGCTG
AGACCCGGCACCACCGTGGTCTTCACGCCCGGCGAGCGCTCCGGCACCGCTTCCAAGCGCTCCTACGACGAG
GTGTACGGGGATGATGATATTCTGGAGCAGGCGGCCGAGCGCCTGGGCGAGTTTGCTTACGGCAAGCGCAGC
CGTTCCGCACCGAAGGAAGAGGCGGTGTCCATCCCGCTGGACCACGGCAACCCCACGCCGAGCCTCAAGCCC
GTGACCTTGCAGCAGGTGCTGCCGACCGCGGCGCCGCGCCGGGGGTTCAAGCGCGAGGGCGAGGATCTGTAC
CCCACCATGCAGCTGATGGTGCCCAAGCGCCAGAAGCTGGAAGACGTGCTGGAGACCATGAAGGTGGACCCG
GACGTGCAGCCCGAGGTCAAGGTGCGGCCCATCAAGCAGGTGGCCCCGGGCCTGGGCGTGCAGACCGTGGAC
ATCAAGATTCCCACGGAGCCCATGGAAACGCAGACCGAGCCCATGATCAAGCCCAGCACCAGCACCATGGAG
GTGCAGACGGATCCCTGGATGCCATCGGCTCCTAGTCGAAGACCCCGGCGCAAGTACGGCGCGGCCAGCCTG
CTGATGCCCAACTACGCGCTGCATCCTTCCATCATCCCCACGCCGGGCTACCGCGGCACGCGCTTCTACCGCG
GTCATACCAGCAGCCGCCGCCGCAAGACCACCACTCGCCGCCGCCGTCGCCGCACCGCCGCTGCAACCACCC
CTGCCGCCCTGGTGCGGAGAGTGTACCGCCGCGGCCGCGCACCTCTGACCCTGCCGCGCGCGCGCTACCACCC
GAGCATCGCCATTTAAACTTTCGCCtGCTTTGCAGATCAATGGCCCTCACATGCCGCCTTCGCGTTCCCATTAC
GGGCTACCGAGGAAGAAAACCGCGCCGTAGAAGGCTGGCGGGGAACGGGATGCGTCGCCACCACCACCGGC
GGCGGCGCGCCATCAGCAAGCGGTTGGGGGGAGGCTTCCTGCCCGCGCTGATCCCCATCATCGCCGCGGCGA
TCGGGGCGATCCCCGGCATTGCTTCCGTGGCGGTGCAGGCCTCTCAGCGCCACTGAGACACACTTGGAAACAT
CTTGTAATAAACCaATGGACTCTGACGCTCCTGGTCCTGTGATGTGTTTTCGTAGACAGATGGAAGACATCAA
TTTTTCGTCCCTGGCTCCGCGACACGGCACGCGGCCGTTCATGGGCACCTGGAGCGACATCGGCACCAGCCAA
CTGAACGGGGGCGCCTTCAATTGGAGCAGTCTCTGGAGCGGGCTTAAGAATTTCGGGTCCACGCTTAAAACCT
ATGGCAGCAAGGCGTGGAACAGCACCACAGGGCAGGCGCTGAGGGATAAGCTGAAAGAGCAGAACTTCCAG
CAGAAGGTGGTCGATGGGCTCGCCTCGGGCATCAACGGGGTGGTGGACCTGGCCAACCAGGCCGTGCAGCGG
CAGATCAACAGCCGCCTGGACCCGGTGCCGCCCGCCGGCTCCGTGGAGATGCCGCAGGTGGAGGAGGAGCTG
CCTCCCCTGGACAAGCGGGGCGAGAAGCGACCCCGCCCCGATGCGGAGGAGACGCTGCTGACGCACACGGA
CGAGCCGCCCCCGTACGAGGAGGCGGTGAAACTGGGTCTGCCCACCACGCGGCCCATCGCGCCCCTGGCCAC
CGGGGTGCTGAAACCCGAAAAGCCCGCGACCCTGGACTTGCCTCCTCCCCAGCCTTCCCGCCCCTCTACAGTG
GCTAAGCCCCTGCCGCCGGTGGCCGTGGCCCGCGCGCGACCCGGGGGCACCGCCCGCCCTCATGCGAACTGG
CAGAGCACTCTGAACAGCATCGTGGGTCTGGGAGTGCAGAGTGTGAAGCGCCGCCGCTGCTATTAAACCTAC
CGTAGCGCTTAACTTGCTTGTCTGTGTGTGTATGTATTATGTCGCCGCCGCCGCTGTCCACCAGAAGGAGGAG
TGAAGAGGCGCGTCGCCGAGTTGCAAGATGGCCACCCCATCGATGCTGCCCCAGTGGGCGTACATGCACATC
GCCGGACAGGACGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTGGTGCAGTTTGCCCGCGCCACAGACACCTACTTCA
GTCTGGGGAACAAGTTTAGGAACCCCACGGTGGCGCCCACGCACGATGTGACCACCGACCGCAGCCAGCGGC
TGACGCTGCGCTTCGTGCCCGTGGACCGCGAGGACAACACCTACTCGTACAAAGTGCGCTACACGCTGGCCG
TGGGCGACAACCGCGTGCTGGACATGGCCAGCACCTACTTTGACATCCGCGGCGTGCTGGATCGGGGCCCTA
GCTTCAAACCCTACTCCGGCACCGCCTACAACAGTCTGGCCCCCAAGGGAGCACCCAACACTTGTCAGTGGA
CATATAAAGCCGATGGTGAAACTGCCACAGAAAAAACCTATACATATGGAAATGCACCCGTGCAGGGCATTA
ACATCACAAAAGATGGTATTCAACTTGGAACTGACACCGATGATCAGCCAATCTACGCAGATAAAACCTATC
AGCCTGAACCTCAAGTGGGTGATGCTGAATGGCATGACATCACTGGTACTGATGAAAAGTATGGAGGCAGAG
CTCTTAAGCCTGATACCAAAATGAAGCCTTGTTATGGTTCTTTTGCCAAGCCTACTAATAAAGAAGGAGGTCA
GGCAAATGTGAAAACAGGAACAGGCACTACTAAAGAATATGACATAGACATGGCTTTCTTTGACAACAGAAG
TGCGGCTGCTGCTGGCCTAGCTCCAGAAATTGTTTTGTATACTGAAAATGTGGATTTGGAAACTCCAGATACC
CATATTGTATACAAAGCAGGCACAGATGACAGCAGCTCTTCTATTAATTTGGGTCAGCAAGCCATGCCCAACA
GACCTAACTACATTGGTTTCAGAGACAACTTTATCGGGCTCATGTACTACAACAGCACTGGCAATATGGGGGT
GCTGGCCGGTCAGGCTTCTCAGCTGAATGCTGTGGTTGACTTGCAAGACAGAAACACCGAGCTGTCCTACCAG
CTCTTGCTTGACTCTCTGGGTGACAGAACCCGGTATTTCAGTATGTGGAATCAGGCGGTGGACAGCTATGATC
CTGATGTGCGCATTATTGAAAATCATGGTGTGGAGGATGAACTTCCCAACTATTGTTTCCCTCTGGATGCTGTT
GGCAGAACAGATACTTATCAGGGAATTAAGGCTAATGGAACTGATCAAACCACATGGACCAAAGATGACAGT
GTCAATGATGCTAATGAGATAGGCAAGGGTAATCCATTCGCCATGGAAATCAACATCCAAGCCAACCTGTGG
AGGAACTTCCTCTACGCCAACGTGGCCCTGTACCTGCCCGACTCTTACAAGTACACGCCGGCCAATGTTACCC
TGCCCACCAACACCAACACCTACGATTACATGAACGGCCGGGTGGTGGCGCCCTCGCTGGTGGACTCCTACAT
CAACATCGGGGCGCGCTGGTCGCTGGATCCCATGGACAACGTGAACCCCTTCAACCACCACCGCAATGCGGG
GCTGCGCTACCGCTCCATGCTCCTGGGCAACGGGCGCTACGTGCCCTTCCACATCCAGGTGCCCCAGAAATTT

TTCGCCATCAAGAGCCTCCTGCTCCTGCCCCGGGTCCTACACCTACGAGTGGAACTTCCGCAAGGACGTCAACA
TGATCCTGCAGAGCTCCCTCGGCAACGACCTGCGCACGGACGGGGCCTCCATCTCCTTCACCAGCATCAACCT
CTACGCCACCTTCTTCCCCATGGCGCACAACACGGCCTCCACGCTCGAGGCCATGCTGCGCAACGACACCAAC
GACCAGTCCTTCAACGACTACCTCTCGGCGGCCAACATGCTCTACCCCATCCCGGCCAACGCCACCAACGTGC
CCATCTCCATCCCCTCGCGCAACTGGGCCGCCTTCCGCGGCTGGTCCTTCACGCGTCTCAAGACCAAGGAGAC
GCCCTCGCTGGGCTCCGGGTTCGACCCCTACTTCGTCTACTCGGGCTCCATCCCCTACCTCGACGGCACCTTCT
ACCTCAACCACACCTTCAAGAAGGTCTCCATCACCTTCGACTCCTCCGTCAGCTGGCCCGGCAACGACCGGCT
CCTGACGCCCAACGAGTTCGAAATCAAGCGCACCGTCGACGGCGAGGGCTACAACGTGGCCCAGTGCAACAT
GACCAAGGACTGGTTCCTGGTCCAGATGCTGGCCCACTACAACATCGGCTACCAGGGCTTCTACGTGCCCGAG
GGCTACAAGGACCGCATGTACTCCTTCTTCCGCAACTTCCAGCCCATGAGCCGCCAGGTGGTGGACGAGGTCA
ACTACAAGGACTACCAGGCCGTCACCCTGGCCTACCAGCACAACAACTCGGGCTTCGTCGGCTACCTCGCGCC
CACCATGCGCCAGGGCCAGCCCTACCCCGCCAACTACCCCTACCCGCTCATCGGCAAGAGCGCCGTCACCAG
CGTCACCCAGAAAAAGTTCCTCTGCGACAGGGTCATGTGGCGCATCCCCTTCTCCAGCAACTTCATGTCCATG
GGCGCGCTCACCGACCTCGGCCAGAACATGCTCTATGCCAACTCCGCCCACGCGCTAGACATGAATTTCGAA
GTCGACCCCATGGATGAGTCCACCCTTCTCTATGTTGTCTTCGAAGTCTTCGACGTCGTCCGAGTGCACCAGCC
CCACCGCGGCGTCATCGAGGCCGTCTACCTGCGCACCCCCTTCTCGGCCGGTAACGCCACCACCTAAGCTCTT
GCTTCTTGCAAGCCATGGCCGCGGGCTCCGGCGAGCAGGAGCTCAGGGCCATCATCCGCGACCTGGGCTGCG
GGCCCTACTTCCTGGGCACCTTCGATAAGCGCTTCCCGGGATTCATGGCCCCGCACAAGCTGGCCTGCGCCAT
CGTCAACACGGCCGGCCGCGAGACCGGGGGCGAGCACTGGCTGGCCTTCGCCTGGAACCCGCGCTCGAACAC
CTGCTACCTCTTCGACCCCTTCGGGTTCTCGGACGAGCGCCTCAAGCAGATCTACCAGTTCGAGTACGAGGGC
CTGCTGCGCCGCAGCGCCCTGGCCACCGAGGACCGCTGCGTCACCCTGGAAAAGTCCACCCAGACCGTGCAG
GGTCCGCGCTCGGCCGCCTGCGGGCTCTTCTGCTGCATGTTCCTGCACGCCTTCGTGCACTGGCCCGACCGCC
CCATGGACAAGAACCCCACCATGAACTTGCTGACGGGGGTGCCCAACGGCATGCTCCAGTCGCCCCAGGTGG
AACCCACCCTGCGCCGCAACCAGGAGGCGCTCTACCGCTTCCTCAACTCCCACTCCGCCTACTTTCGCTCCCA
CCGCGCGCGCATCGAGAAGGCCACCGCCTTCGACCGCATGAATCAAGACATGTAAACCGTGTGTGTATGTTA
AATGTCTTTAATAAACAGCACTTTCATGTTACACATGCATCTGAGATGATTTATTTAGAAATCGAAAGGGTTC
TGCCGGGTCTCGGCATGGCCCGCGGGCAGGGACACGTTGCGGAACTGGTACTTGGCCAGCCACTTGAACTCG
GGGATCAGCAGTTTGGGCAGCGGGGTGTCGGGGAAGGAGTCGGTCCACAGCTTCCGCGTCAGTTGCAGGGCG
CCCAGCAGGTCGGGCGCGGAGATCTTGAAATCGCAGTTGGGACCCGCGTTCTGCGCGCGGGAGTTGCGGTAC
ACGGGGTTGCAGCACTGGAACACCATCAGGGCCGGGTGCTTCACGCTCGCCAGCACCGTCGCGTCGGTGATG
CTCTCCACGTCGAGGTCCTCGGCGTTGGCCATCCCGAAGGGGGTCATCTTGCAGGTCTGCCTTCCCATGGTGG
GCACGCACCCGGGCTTGTGGTTGCAATCGCAGTGCAGGGGGATCAGCATCATCTGGGCCTGGTCGGCGTTCAT
CCCCGGGTACATGGCCTTCATGAAAGCCTCCAATTGCCTGAACGCCTGCTGGGCCTTGGCTCCCTCGGTGAAG
AAGACCCCGCAGGACTTGCTAGAGAACTGGTTGGTGGCGCACCCGGCGTCGTGCACGCAGCAGCGCGCGTCG
TTGTTGGCCAGCTGCACCACGCTGCGCCCCCAGCGGTTCTGGGTGATCTTGGCCCGGTCGGGGTTCTCCTTCA
GCGCGCGCTGCCCGTTCTCGCTCGCCACATCCATCTCGATCATGTGCTCCTTCTGGATCATGGTGGTCCCGTGC
AGGCACCGCAGCTTGCCCTCGGCCTCGGTGCACCCGTGCAGCCACAGCGCGCACCCGGTGCACTCCCAGTTCT
TGTGGGCGATCTGGGAATGCGCGTGCACGAAGCCCTGCAGGAAGCGGCCCATCATGGTGGTCAGGGTCTTGT
TGCTAGTGAAGGTCAGCGGAATGCCGCGGTGCTCCTCGTTGATGTACAGGTGGCAGATGCGGCGGTACACCT
CGCCCTGCTCGGGCATCAGCTGGAAGTTGGCTTTCAGGTCGGTCTCCACGCGGTAGCGGTCCATCAGCATAGT
CATGATTTCCATACCCTTCTCCCAGGCCGAGACGATGGGCAGGCTCATAGGGTTCTTCACCATCATCTTAGCG
CTAGCAGCCGCGGCCAGGGGGTCGCTCTCGTCCAGGGTCTCAAAGCTCCGCTTGCCGTCCTTCTCGGTGATCC
GCACCGGGGGGTAGCTGAAGCCCACGGCCGCCAGCTCCTCCTCGGCCTGTCTTTCGTCCTCGCTGTCCTGGCT
GACGTCCTGCAGGACCACATGCTTGGTCTTGCGGGGTTTCTTCTTGGGCGGCAGCGGCGGCGGAGATGTTGGA
GATGGCGAGGGGGAGCGCGAGTTCTCGCTCACCACTACTATCTCTTCCTCTTCTTGGTCCGAGGCCACGCGGC
GGTAGGTATGTCTCTTCGGGGGCAGAGGCGGAGGCGACGGGCTCTCGCCGCCGCGACTTGGCGGATGGCTGG
CAGAGCCCCTTCCGCGTTCGGGGGTGCGCTCCCGGCGGCGCTCTGACTGACTTCCTCCGCGGCCGGCCATTGT
GTTCTCCTAGGGAGGAACAACAAGCATGGAGACTCAGCCATCGCCAACCTCGCCATCTGCCCCCACCGCCGA
CGAGAAGCAGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAACCGCCCCGCCGCCCAGCCCCGCCACCTCCGACGCGGCCGT
CCCAGACATGCAAGAGATGGAGGAATCCATCGAGATTGACCTGGGCTATGTGACGCCCGCGGAGCACGAGG
AGGAGCTGGCAGTGCGCTTTTCACAAGAAGAGATACACCAAGAACAGCCAGAGCAGGAAGCAGAGAATGAG
CAGAGTCAGGCTGGGCTCGAGCATGACGGCGACTACCTCCACCTGAGCGGGGGGGAGGACGCGCTCATCAAG
CATCTGGCCCGGCAGGCCACCATCGTCAAGGATGCGCTGCTCGACCGCACCGAGGTGCCCCTCAGCGTGGAG
GAGCTCAGCCGCGCCTACGAGTTGAACCTCTTCTCGCCGCGCGTGCCCCCCAAGCGCCAGCCCAATGGCACCT
GCGAGCCCAACCCGCGCCTCAACTTCTACCCGGTCTTCGCGGTGCCCGAGGCCCTGGCCACCTACCACATCTT
TTTCAAGAACCAAAAGATCCCCGTCTCCTGCCGCGCCAACCGCACCCGCGCCGACGCCCTTTTCAACCTGGGT
CCCGGCGCCCGCCTACCTGATATCGCCTCCTTGGAAGAGGTTCCCAAGATCTTCGAGGGTCTGGGCAGCGACG
AGACTCGGGCCGCGAACGCTCTGCAAGGAGAAGGAGGAGAGCATGAGCACCACAGCGCCCTGGTCGAGTTG
GAAGGCGACAACGCGCGGCTGGCGGTGCTCAAACGCACGGTCGAGCTGACCCATTTCGCCTACCCGGCTCTG
AACCTGCCCCCCAAAGTCATGAGCGCGGTCATGGACCAGGTGCTCATCAAGCGCGCGTCGCCCATCTCCGAG
GACGAGGGCATGCAAGACTCCGAGGAGGGCAAGCCCGTGGTCAGCGACGAGCAGCTGGCCCGGTGGCTGGG
TCCTAATGCTAGTCCCCAGAGTTTGGAAGAGCGGCGCAAACTCATGATGGCCGTGGTCCTGGTGACCGTGGA
GCTGGAGTGCCTGCGCCGCTTCTTCGCCGACGCGGAGACCCTGCGCAAGGTCGAGGAGAACCTGCACTACCT
CTTCAGGCACGGGTTCGTGCGCCAGGCCTGCAAGATCTCCAACGTGGAGCTGACCAACCTGGTCTCCTACATG
GGCATCTTGCACGAGAACCGCCTGGGGCAGAACGTGCTGCACACCACCCTGCGCGGGGAGGCCCGGCGCGAC
TACATCCGCGACTGCGTCTACCTCTACCTCTGCCACACCTGGCAGACGGGCATGGGCGTGTGGCAGCAGTGTC

TGGAGGAGCAGAACCTGAAAGAGCTCTGCAAGCTCCTGCAGAAGAACCTCAAGGGTCTGTGGACCGGGTTCG
ACGAGCGCACCACCGCCTCGGACCTGGCCGACCTCATTTTCCCCGAGCGCCTCAGGCTGACGCTGCGCAACG
GCCTGCCCGACTTTATGAGCCAAAGCATGTTGCAAAACTTTCGCTCTTTCATCCTCGAACGCTCCGGAATCCT
GCCCGCCACCTGCTCCGCGCTGCCCTCGGACTTCGTGCCGCTGACCTTCCGCGAGTGCCCCCCGCCGCTGTGG
AGCCACTGCTACCTGCTGCGCCTGGCCAACTACCTGGCCTACCACTCGGACGTGATCGAGGACGTCAGCGGC
GAGGGCCTGCTCGAGTGCCACTGCCGCTGCAACCTCTGCACGCCGCACCGCTCCCTGGCCTGCAACCCCCAGC
TGCTGAGCGAGACCCAGATCATCGGCACCTTCGAGTTGCAAGGGCCCAGCGAAGGCGAGGGTTCAGCCGCCA
AGGGGGGTCTGAAACTCACCCCGGGGCTGTGGACCTCGGCCTACTTGCGCAAGTTCGTGCCCGAGGACTACC
ATCCCTTCGAGATCAGGTTCTACGAGGACCAATCCCATCCGCCCAAGGCCGAGCTGTCGGCCTGCGTCATCAC
CCAGGGGGCGATCCTGGCCCAATTGCAAGCCATCCAGAAATCCCGCCAAGAATTCTTGCTGAAAAAGGGCCG
CGGGGTCTACCTCGACCCCCAGACCGGTGAGGAGCTCAACCCCGGCTTCCCCCAGGATGCCCCGAGGAAACA
AGAAGCTGAAAGTGGAGCTGCCGCCCGTGGAGGATTTGGAGGAAGACTGGGAGAACAGCAGTCAGGCAGAG
GAGGAGGAGATGGAGGAAGACTGGGACAGCACTCAGGCAGAGGAGGACAGCCTGCAAGACAGTCTGGAGG
AAGACGAGGAGGAGGCAGAGGAGGAGGTGGAAGAAGCAGCCGCCGCCAGACCGTCGTCCTCGGCGGGGGA
GAAAGCAAGCAGCACGGATACCATCTCCGCTCCGGGTCGGGGTCCCGCTCGACCACACAGTAGATGGGACGA
GACCGGACGATTCCCGAACCCCACCACCCAGACCGGTAAGAAGGAGCGGCAGGGATACAAGTCCTGGCGGG
GGCACAAAAACGCCATCGTCTCCTGCTTGCAGGCCTGCGGGGGCAACATCTCCTTCACCCGGCGCTACCTGCT
CTTCCACCGCGGGGTGAACTTTCCCCGCAACATCTTGCATTACTACCGTCACCTCCACAGCCCCTACTACTTCC
AAGAAGAGGCAGCAGCAGCAGAAAAAGACCAGCAGAAAACCAGCAGCTAGAAAATCCACAGCGGCGGCAG
CAGGTGGACTGAGGATCGCGGCGAACGAGCCGGCGCAAACCCGGGAGCTGAGGAACCGGATCTTTCCCACCC
TCTATGCCATCTTCCAGCAGAGTCGGGGGCAGGAGCAGGAACTGAAAGTCAAGAACCGTTCTCTGCGCTCGC
TCACCCGCAGTTGTCTGTATCACAAGAGCGAAGACCAACTTCAGCGCACTCTCGAGGACGCCGAGGCTCTCTT
CAACAAGTACTGCGCGCTCACTCTTAAAGAGTAGCCCGCGCCCGCCCAGTCGCAGAAAAAGGCGGGAATTAC
GTCACCTGTGCCCTTCGCCCTAGCCGCCTCCACCCATCATCATGAGCAAAGAGATTCCCACGCCTTACATGTG
GAGCTACCAGCCCCAGATGGGCCTGGCCGCCGGTGCCGCCCAGGACTACTCCACCCGCATGAATTGGCTCAG
CGCCGGGCCCGCGATGATCTCACGGGTGAATGACATCCGCGCCCACCGAAACCAGATACTCCTAGAACAGTC
AGCGCTCACCGCCACGCCCCGCAATCACCTCAATCCGCGTAATTGGCCCGCCGCCCTGGTGTACCAGGAAATT
CCCCAGCCCACGACCGTACTACTTCCGCGAGACGCCCAGGCCGAAGTCCAGCTGACTAACTCAGGTGTCCAG
CTGGCGGGCGGCGCCACCCTGTGTCGTCACCGCCCCGCTCAGGGTATAAAGCGGCTGGTGATCCGGGGCAGA
GGCACACAGCTCAACGACGAGGTGGTGAGCTCTTCGCTGGGTCTGCGACCTGACGGAGTCTTCCAACTCGCC
GGATCGGGGAGATCTTCCTTCACGCCTCGTCAGGCCGTCCTGACTTTGGAGAGTTCGTCCTCGCAGCCCCGCT
CGGGTGGCATCGGCACTCTCCAGTTCGTGGAGGAGTTCACTCCCTCGGTCTACTTCAACCCCTTCTCCGGCTCC
CCCGGCCACTACCCGGACGAGTTCATCCCGAACTTCGACGCCATCAGCGAGTCGGTGGACGGCTACGATTGA
AACTAATCACCCCCTTATCCAGTGAAATAAAGATCATATTGATGATGATTTTACAGAAATAAAAAATAATCAT
TTGATTTGAAATAAAGATACAATCATATTGATGATTTGAGTTTAACAAAAAAATAAAGAATCACTTACTTGAA
ATCTGATACCAGGTCTCTGTCCATGTTTTCTGCCAACACCACTTCACTCCCCTCTTCCCAGCTCTGGTACTGCA
GGCCCCGGCGGGCTGCAAACTTCCTCCACACGCTGAAGGGGATGTCAAATTCCTCCTGTCCCTCAATCTTCAT
TTTATCTTCTATCAGATGTCCAAAAAGCGCGTCCGGGTGGATGATGACTTCGACCCCGTCTACCCCTACGATG
CAGACAACGCACCGACCGTGCCCTTCATCAACCCCCCCTTCGTCTCTTCAGATGGATTCCAAGAGAAGCCCCT
GGGGGTGTTGTCCCTGCGACTGGCCGACCCCGTCACCACCAAGAACGGGGAAATCACCCTCAAGCTGGGAGA
GGGGGTGGACCTCGATTCCTCGGGAAAACTCATCTCCAACACGGCCACCAAGGCCGCCGCCCCTCTCAGTTTT
TCCAACAACACCATTTCCCTTAACATGGATCACCCCTTTTACACTAAAGATGGAAAATTATCCTTACAAGTTTC
TCCACCATTAAATATACTGAGAACAAGCATTCTAAACACACTAGCTTTAGGTTTTGGATCAGGTTTAGGACTC
CGTGGCTCTGCCTTGGCAGTACAGTTAGTCTCTCCACTTACATTTGATACTGATGGAAACATAAAGCTTACCTT
AGACAGAGGTTTGCATGTTACAACAGGAGATGCAATTGAAAGCAACATAAGCTGGGCTAAAGGTTTAAAATT
TGAAGATGGAGCCATAGCAACCAACATTGGAAATGGGTTAGAGTTTGGAAGCAGTAGTACAGAAACAGGTGT
TGATGATGCTTACCCAATCCAAGTTAAACTTGGATCTGGCCTTAGCTTTGACAGTACAGGAGCCATAATGGCT
GGTAACAAAGAAGACGATAAACTCACTTTGTGGACAACACCTGATCCATCACCAAACTGTCAAATACTCGCA
GAAAATGATGCAAAACTAACACTTTGCTTGACTAAATGTGGTAGTCAAATACTGGCCACTGTGTCAGTCTTAG
TTGTAGGAAGTGGAAACCTAAACCCCATTACTGGCACCGTAAGCAGTGCTCAGGTGTTTCTACGTTTTGATGC
AAACGGTGTTCTTTTAACAGAACATTCTACACTAAAAAAATACTGGGGGTATAGGCAGGGAGATAGCATAGA
TGGCACTCCATATACCAATGCTGTAGGATTCATGCCCAATTTAAAAGCTTATCCAAAGTCACAAAGTTCTACT
ACTAAAAATAATATAGTAGGGCAAGTATACATGAATGGAGATGTTTCAAAACCTATGCTTCTCACTATAACCC
TCAATGGTACTGATGACAGCAACAGTACATATTCAATGTCATTTTCATACACCTGGACTAATGGAAGCTATGT
TGGAGCAACATTTGGGGCTAACTCTTATACCTTCTCATACATCGCCCAAGAATGAACACTGTATCCCACCCTG
CATGCCAACCCTTCCCACCCCACTCTGTGGAACAAACTCTGAAACACAAAATAAAATAAAGTTCAAGTGTTTT
ATTGATTCAACAGTTTTACAGGATTCGAGCAGTTATTTTTCCTCCACCCTCCCAGGACATGGAATACACCACC
CTCTCCCCCCGCACAGCCTTGAACATCTGAATGCCATTGGTGATGGACATGCTTTTGGTCTCCACGTTCCACAC
AGTTTCAGAGCGAGCCAGTCTCGGGTCGGTCAGGGAGATGAAACCCTCCGGGCACTCCCGCATCTGCACCTC
ACAGCTCAACAGCTGAGGATTGTCCTCGGTGGTCGGGATCACGGTTATCTGGAAGAAGCAGAAGAGCGGCGG
TGGGAATCATAGTCCGCGAACGGGATCGGCCGGTGGTGTCGCATCAGGCCCCGCAGCAGTCGCTGCCGCCGC
CGCTCCGTCAAGCTGCTGCTCAGGGGGTCCGGGTCCAGGGACTCCCTCAGCATGATGCCCACGGCCCTCAGCA
TCAGTCGTCTGGTGCCGGCGGGCGCAGCAGCGCATGCGGATCTCGCTCAGGTCGCTGCAGTACGTGCAACACA
GAACCACCAGGTTGTTCAACAGTCCATAGTTCAACACGCTCCAGCCGAAACTCATCGCGGGAAGGATGCTAC
CCACGTGGCCGTCGTACCAGATCCTCAGGTAAATCAAGTGGTGCCCCCTCCAGAACACGCTGCCCACGTACAT
GATCTCCTTGGGCATGTGGCGGTTCACCACCTCCCGGTACCACATCACCCTCTGGTTGAACATGCAGCCCCGG

ATGATCCTGCGGAACCACAGGGCCAGCACCGCCCCGCCCGCCATGCAGCGAAGAGACCCCGGGTCCCGGCAA
TGGCAATGGAGGACCCACCGCTCGTACCCGTGGATCATCTGGGAGCTGAACAAGTCTATGTTGGCACAGCAC
AGGCATATGCTCATGCATCTCTTCAGCACTCTCAACTCCTCGGGGGTCAAAACCATATCCCAGGGCACGGGGA
ACTCTTGCAGGACAGCGAACCCCGCAGAACAGGGCAATCCTCGCACAGAACTTACATTGTGCATGGACAGGG
TATCGCAATCAGGCAGCACCGGGTGATCCTCCACCAGAGAAGCGCGGGTCTCGGTCTCCTCACAGCGTGGTA
AGGGGGCCGGCCGATACGGGTGATGGCGGGACGCGGCTGATCGTGTTCGCGACCGTGTCATGATGCAGTTGC
TTTCGGACATTTTCGTACTTGCTGTAGCAGAACCTGGTCCGGGCGCTGCACACCGATCGCCGGCGGCGGTCTC
GGCGCTTGGAACGCTCGGTGTTGAAATTGTAAAACAGCCACTCTCTCAGACCGTGCAGCAGATCTAGGGCCTC
AGGAGTGATGAAGATCCCATCATGCCTGATGGCTCTGATCACATCGACCACCGTGGAATGGGCCAGACCCAG
CCAGATGATGCAATTTTGTTGGGTTTCGGTGACGGCGAGCCTCGGGAACAACGATGAAGTAAATGCAAGCGG
TGCGTTCCAGCATGGTTAGTTAGCTGATCTGTAGAAAAAACAAAAATGAACATTAAACCATGCTAGCCTGGC
GAACAGGTGGGTAAATCGTTCTCTCCAGCACCAGGCAGGCCACGGGGTCTCCGGCGCGACCCTCGTAAAAAT
TGTCGCTATGATTGAAAACCATCACAGAGAGACGTTCCCGGTGGCCGGCGTGAATGATTCGACAAGATGAAT
ACACCCCCGGAACATTGGCGTCCGCGAGTGAAAAAAAGCGCCCGAGGAAGCAATAAGGCACTACAATGCTC
AGTCTCAAGTCCAGCAAAGCGATGCCATGCGGATGAAGCACAAAATTCTCAGGTGCGTACAAAATGTAATTA
CTCCCCTCCTGCACAGGCAGCAAAGCCCCCGATCCCTCCAGGTACACATACAAAGCCTCAGCGTCCATAGCTT
ACCGAGCAGCAGCACACAACAGGCGCAAGAGTCAGAGAAAGGCTGAGCTCTAACCTGTCCACCCGCTCTCTG
CTCAATATATAGCCCAGATCTACACTGACGTAAAGGCCAAAGTCTAAAAATACCCGCCAAATAATCACACAC
GCCCAGCACACGCCCAGAAACCGGTGACACACTCAAAAAAATACGCGCACTTCCTCAAACGCCCAAAACTGC
CGTCATTTCCGGGTTCCCACGCTACGTCATCAAAACACGACTTTCAAATTCCGTCGACCGTTAAAAACGTCAC
CCGCCCCGCCCCTAACGGTCGCCCGTCTCTCAGCCAATCAGCGCCCCGCATCCCCAAATTCAAACACCTCATT
TGCATATTAACGCGCACAAAAAGTTTGAGGTATATTATTGATGATG

ChAdV68-GFP-E4 deletado (SEQ ID NO: 58); Negrito itálico = transgene GFP

CATCaTCAATAATATACCTCAAACTTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTGAATTTGGGGAGGAA
GGGCGGTGATTGGTCGAGGGATGAGCGACCGTTAGGGGCGGGGCGAGTGACGTTTTGATGACGTGGTTGCGA
GGAGGAGCCAGTTTGCAAGTTCTCGTGGGAAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTTGAACACGGAAATACT
CAATTTTCCCGCGCTCTCTGACAGGAAATGAGGTGTTTCTGGGCGGATGCAAGTGAAAACGGGCCATTTTCGC
GCGAAAACTGAATGAGGAAGTGAAAATCTGAGTAATTTCGCGTTTATGGCAGGGAGGAGTATTTGCCGAGGG
CCGAGTAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTACCGTGTTTTTCACCTAAATTTCCGCGTACGGTGTC
AAAGTCCGGTGTTTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGCCAGGGTATTTAAACCTGCGCTCTCCAGTCAAGAGGC
CACTCTTGAGTGCCAGCGAGAAGAGTTTTCTCCTCCGCGCCGCGAGTCAGATCTACACTTTGAAAGTAGGGAT
AACAGGGTAATgacattgattattgactagttGttaaTAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTT
CCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATA
ATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAA
CTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATG
GCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTC
ATCGCTATTACCATGgTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGAT
TTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATG
TCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAgcT
CGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGATCGCG
ccacc
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACG
GCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTG
CACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCC
GCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACC
ATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACC
GCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAA
CAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACA
TCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCT
GCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCC
TGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAG
tgaGTTTAAACTCCCATTTAAATGTGAGGGTTAATGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGG
ACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTA
ACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGA
TGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATAACTATAACGGTCCTAAGGTAGC
GAGTGAGTAGTGTTCTGGGGCGGGGGAGGACCTGCATGAGGGCCAGAATAACTGAAATCTGTGCTTTTCTGT
GTGTTGCAGCAGCATGAGCGGAAGCGGCTCCTTTGAGGGAGGGGTATTCAGCCCTTATCTGACGGGGCGTCT
CCCCTCCTGGGCGGGAGTGCGTCAGAATGTGATGGGATCCACGGTGGACGGCCGGCCCGTGCAGCCCGCGAA
CTCTTCAACCCTGACCTATGCAACCCTGAGCTCTTCGTCGTTGGACGCAGCTGCCGCCGCAGCTGCTGCATCT
GCCGCCAGCGCCGTGCGCGGAATGGCCATGGGCGCCGGCTACTACGGCACTCTGGTGGCCAACTCGAGTTCC
ACCAATAATCCCGCCAGCCTGAACGAGGAGAAGCTGTTGCTGCTGATGGCCCAGCTCGAGGCCTTGACCCAG
CGCCTGGGCGAGCTGACCCAGCAGGTGGCTCAGCTGCAGGAGCAGACGCGGGCCGCGGTTGCCACGGTGAA
ATCCAAATAAAAAATGAATCAATAAATAAACGGAGACGGTTGTTGATTTTAACACAGAGTCTGAATCTTTATT
TGATTTTTCGCGCGCGGTAGGCCCTGGACCACCGGTCTCGATCATTGAGCACCCGGTGGATCTTTTCCAGGAC
CCGGTAGAGGTGGGCTTGGATGTTGAGGTACATGGGCATGAGCCCGTCCCGGGGGGTGGAGGTAGCTCCATTG

CAGGGCCTCGTGCTCGGGGGTGGTGTTGTAAATCACCCAGTCATAGCAGGGGCGCAGGGCATGGTGTTGCAC
AATATCTTTGAGGAGGAGACTGATGGCCACGGGCAGCCCTTTGGTGTAGGTGTTTACAAATCTGTTGAGCTGG
GAGGGATGCATGCGGGGGGAGATGAGGTGCATCTTGGCCTGGATCTTGAGATTGGCGATGTTACCGCCCAGA
TCCCGCCTGGGGTTCATGTTGTGCAGGACCACCAGCACGGTGTATCCGGTGCACTTGGGGAATTTATCATGCA
ACTTGGAAGGGAAGGCGTGAAAGAATTTGGCGACGCCTTTGTGCCCGCCCAGGTTTTCCATGCACTCATCCAT
GATGATGGCGATGGGCCCGTGGGCGGCGGCCTGGGCAAAGACGTTTCGGGGGTCGGACACATCATAGTTGTG
GTCCTGGGTGAGGTCATCATAGGCCATTTTAATGAATTTGGGGCGGAGGGTGCCGGACTGGGGGACAAAGGTt
CCCTCGATCCCGGGGGCGTAGTTCCCCTCACAGATCTGCATCTCCCAGGCTTTGAGCTCGGAGGGGGGGATCA
TGTCCACCTGCGGGGCGATAAAGAACACGGTTTCCGGGGCGGGGGAGATGAGCTGGGCCGAAAGCAAGTTCC
GGAGCAGCTGGGACTTGCCGCAGCCGGTGGGGCCGTAGATGACCCCGATGACCGGCTGCAGGTGGTAGTTGA
GGGAGAGACAGCTGCCGTCCTCCCGGAGGAGGGGGGCCACCTCGTTCATCATCTCGCGCACGTGCATGTTCTC
GCGCACCAGTTCCGCCAGGAGGCGCTCTCCCCCCCAGGGATAGGAGCTCCTGGAGCGAGGCGAAGTTTTTCAG
CGGCTTGAGTCCGTCGGCCATGGGCATTTTGGAGAGGGTTTGTTGCAAGAGTTCCAGGCGGTCCCAGAGCTCG
GTGATGTGCTCTACGGCATCTCGATCCAGCAGACCTCCTCGTTTCGCGGGTTGGGACGGCTGCGGGAGTAGGG
CACCAGACGATGGGCGTCCAGCGCAGCCAGGGTCCGGTCCTTCCAGGGTCGCAGCGTCCGCGTCAGGGTGGT
CTCCGTCACGGTGAAGGGGTGCGCGCCGGGCTGGGCGCTTGCGAGGGTGCGCTTCAGGCTCATCCGGCTGGT
CGAAAACCGCTCCCGATCGGCGCCCTGCGCGTCGGCCAGGTAGCAATTGACCATGAGTTCGTAGTTGAGCGC
CTCGGCCGCGTGGCCTTTGGCGCGGAGCTTACCTTTGGAAGTCTGCCCGCAGGCGGGACAGAGGAGGGACTT
GAGGGCGTAGAGCTTGGGGGCGAGGAAGACGGACTCGGGGGCGTAGGCGTCCGCGCCGCAGTGGGCGCAGA
CGGTCTCGCACTCCACGAGCCAGGTGAGGTCGGGCTGGTCGGGGTCAAAAACCAGTTTCCCGCCGTTCTTTTT
GATGCGTTTCTTACCTTTGGTCTCCATGAGCTCGTGTCCCCGCTGGGTGACAAAGAGGCTGTCCGTGTCCCCGT
AGACCGACTTTATGGGCCGGTCCTCGAGCGGTGTGCCGCGGTCCTCCTCGTAGAGGAACCCCGCCCACTCCGA
GACGAAAGCCCGGGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCCACGTGGGACGGGTAGCGGTCGTTGTCCACCAGCG
GGTCCACCTTTTCCAGGGTATGCAAACACATGTCCCCCTCGTCCACATCCAGGAAGGTGATTGGCTTGTAAGT
GTAGGCCACGTGACCGGGGGTCCCGGCCGGGGGGGGTATAAAAGGGTGCGGGTCCCTGCTCGTCCTCACTGTC
TTCCGGATCGCTGTCCAGGAGCGCCAGCTGTTGGGGTAGGTATTCCCTCTCGAAGGCGGGCATGACCTCGGCA
CTCAGGTTGTCAGTTTCTAGAAACGAGGAGGATTTGATATTGACGGTGCCGGCGGAGATGCCTTTCAAGAGCC
CCTCGTCCATCTGGTCAGAAAAGACGATCTTTTTGTTGTCGAGCTTGGTGGCGAAGGAGCCGTAGAGGGCGTT
GGAGAGGAGCTTGGCGATGGAGCGCATGGTCTGGTTTTTTTTCCTTGTCGGCGCGCTCCTTGGCGGCGATGTTG
AGCTGCACGTACTCGCGCGCCACGCACTTCCATTCGGGGAAGACGGTGGTCAGCTCGTCGGGCACGATTCTG
ACCTGCCAGCCCCGATTATGCAGGGTGATGAGGTCCACACTGGTGGCCACCTCGCCGCGCAGGGGCTCATTA
GTCCAGCAGAGGCGTCCGCCCTTGCGCGAGCAGAAGGGGGGCAGGGGGTCCAGCATGACCTCGTCGGGGGG
GTCGGCATCGATGGTGAAGATGCCGGGCAGGAGGTCGGGGTCAAAGTAGCTGATGGAAGTGGCCAGATCGTC
CAGGGCAGCTTGCCATTCGCGCACGGCCAGCGCGCGCTCGTAGGGACTGAGGGGCGTGCCCCAGGGCATGGG
ATGGGTAAGCGCGGAGGCGTACATGCCGCAGATGTCGTAGACGTAGAGGGGCTCCTCGAGGATGCCGATGTA
GGTGGGGTAGCAGCGCCCCCCGCGGATGCTGGCGCGCACGTAGTCATACAGCTCGTGCGAGGGGGCGAGGA
GCCCCGGGCCCAGGTTGGTGCGACTGGGCTTTTCGGCGCGGTAGACGATCTGGCGGAAAATGGCATGCGAGT
TGGAGGAGATGGTGGGCCTTTGGAAGATGTTGAAGTGGGCGTGGGGCAGTCCGACCGAGTCGCGGATGAAGT
GGGCGTAGGAGTCTTGCAGCTTGGCGACGAGCTCGGCGGTGACTAGGACGTCCAGAGCGCAGTAGTCGAGGG
TCTCCTGGATGATGTCATACTTGAGCTGTCCCTTTTGTTTCCACAGCTCGCGGTTGAGAAGGAACTCTTCGCGG
TCCTTCCAGTACTCTTCGAGGGGGAACCCGTCCTGATCTGCACGGTAAGAGCCTAGCATGTAGAACTGGTTGA
CGGCCTTGTAGGCGCAGCAGCCCTTCTCCACGGGGAGGGCGTAGGCCTGGGCGGCCTTGCGCAGGGAGGTGT
GCGTGAGGGCGAAAGTGTCCCTGACCATGACCTTGAGGAACTGGTGCTTGAAGTCGATATCGTCGCAGCCCC
CCTGCTCCCAGAGCTGGAAGTCCGTGCGCTTCTTGTAGGCGGGGTTGGGCAAAGCGAAAGTAACATCGTTGA
AGAGGATCTTGCCCGCGCGGGGCATAAAGTTGCGAGTGATGCGGAAAGGTTGGGGCACCTCGGCCCGGTTGT
TGATGACCTGGGCGGCGAGCACGATCTCGTCGAAGCCGTTGATGTTGTGGCCCACGATGTAGAGTTCCACGA
ATCGCGGACGGCCCTTGACGTGGGGCAGTTTCTTGAGCTCCTCGTAGGTGAGCTCGTCGGGGTCGCTGAGCCC
GTGCTGCTCGAGCGCCCAGTCGGCGAGATGGGGGTTGGCGCGGAGGAAGGAAGTCCAGAGATCCACGGCCA
GGGCGGTTTGCAGACGGTCCCGGTACTGACGGAACTGCTGCCCGACGGCCATTTTTTCGGGGGTGACGCAGT
AGAAGGTGCGGGGGTCCCCGTGCCAGCGATCCCATTTGAGCTGGAGGGCGAGATCGAGGGCGAGCTCGACG
AGCCGGTCGTCCCCGGAGAGTTTCATGACCAGCATGAAGGGGACGAGCTGCTTGCCGAAGGACCCCATCCAG
GTGTAGGTTTCCACATCGTAGGTGAGGAAGAGCCTTTCGGTGCGAGGATGCGAGCCGATGGGGAAGAACTGG
ATCTCCTGCCACCAATTGGAGGAATGGCTGTTGATGTGATGGAAGTAGAAATGCCGACGGCGCGCCGAACAC
TCGTGCTTGTGTTTATACAAGCGGCCACAGTGCTCGCAACGCTGCACGGGATGCACGTGCTGCACGAGCTGTA
CCTGAGTTCCTTTGACGAGGAATTTCAGTGGGAAGTGGAGTCGTGGCGCCTGCATCTCGTGCTGTACTACGTC
GTGGTGGTCGGCCTGGCCCTCTTCTGCCTCGATGGTGGTCATGCTGACGAGCCCGCGCGGGAGGCAGGTCCAG
ACCTCGGCGCGAGCGGGTCGGAGAGCGAGGACGAGGGCGCGCAGGCCGGAGCTGTCCAGGGTCCTGAGACG
CTGCGGAGTCAGGTCAGTGGGCAGCGGCGGCGCGCGGTTGACTTGCAGGAGTTTTTCCAGGGCGCGCGGGAG
GTCCAGATGGTACTTGATCTCCACCGCGCCATTGGTGGCGACGTCGATGGCTTGCAGGGTCCCGTGCCCCTGG
GGTGTGACCACCGTCCCCCGTTTCTTCTTGGGCGGCTGGGGCGACGGGGGCGGTGCCTCTTCCATGGTTAGAA
GCGGCGGCGAGGACGCGCGCCGGGCGGCAGGGGCGGCTCGGGGCCCGGAGGCAGGGGCGGCAGGGGCACG
TCGGCGCCGCGCGCGGGTAGGTTCTGGTACTGCGCCCGGAGAAGACTGGCGTGAGCGACGACGCGACGGTTG
ACGTCCTGGATCTGACGCCTCTGGGTGAAGGCCACGGGACCCGTGAGTTTGAACCTGAAAGAGAGTTCGACA
GAATCAATCTCGGTATCGTTGACGGCGGCCTGCCGCAGGATCTCTTGCACGTCGCCCGAGTTGTCCTGGTAGG
CGATCTCGGTCATGAACTGCTCGATCTCCTCCTCTTGAAGGTCTCCGCGGCCGGCGCGCTCCACGGTGGCCGC
GAGGTCGTTGGAGATGCGGCCCATGAGCTGCGAGAAGGCGTTCATGCCCGCCTCGTTCCAGACGCGGCTGTA

GACCACGACGCCCTCGGGATCGCgGGCGCGCATGACCACCTGGGCGAGGTTGAGCTCCACGTGGCGCGTGAA
GACCGCGTAGTTGCAGAGGCGCTGGTAGAGGTAGTTGAGCGTGGTGGCGATGTGCTCGGTGACGAAGAAATA
CATGATCCAGCGGCGGAGCGGCATCTCGCTGACGTCGCCCAGCGCCTCCAAACGTTCCATGGCCTCGTAAAA
GTCCACGGCGAAGTTGAAAAACTGGGAGTTGCGCGCCGAGACGGTCAACTCCTCCTCCAGAAGACGGATGAG
CTCGGCGATGGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAGGCCCCCGGGAGTTCCTCCACTTCCTCTTCTTCCTCCTCCA
CTAACATCTCTTCTACTTCCTCCTCAGGCGGCAGTGGTGGCGGGGGAGGGGGCCTGCGTCGCCGGCGGCGCAC
GGGCAGACGGTCGATGAAGCGCTCGATGGTCTCGCCGCGCCGGCGTCGCATGGTCTCGGTGACGGCGCGCCC
GTCCTCGCGGGGCCGCAGCGTGAAGACGCCGCCGCGCATCTCCAGGTGGCCGGGGGGGTCCCCGTTGGGCAG
GGAGAGGGCGCTGACGATGCATCTTATCAATTGCCCCGTAGGGACTCCGCGCAAGGACCTGAGCGTCTCGAG
ATCCACGGGATCTGAAAACCGCTGAACGAAGGCTTCGAGCCAGTCGCAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACGGT
TTCTTCTGGCGGGTCATGTTGGTTGGGAGCGGGGCGGGCGATGCTGCTGGTGATGAAGTTGAAATAGGCGGTT
CTGAGACGGCGGATGGTGGCGAGGAGCACCAGGTCTTTGGGCCCGGCTTGCTGGATGCGCAGACGGTCGGCC
ATGCCCCAGGCGTGGTCCTGACACCTGGCCAGGTCCTTGTAGTAGTCCTGCATGAGCCGCTCCACGGGCACCT
CCTCCTCGCCCGCGCGGCCGTGCATGCGCGTGAGCCCGAAGCCGCGCTGGGGCTGGACGAGCGCCAGGTCGG
CGACGACGCGCTCGGCGAGGATGGCTTGCTGGATCTGGGTGAGGGTGGTCTGGAAGTCATCAAAGTCGACGA
AGCGGTGGTAGGCTCCGGTGTTGATGGTGTAGGAGCAGTTGGCCATGACGGACCAGTTGACGGTCTGGTGGC
CCGGACGCACGAGCTCGTGGTACTTGAGGCGCGAGTAGGCGCGCGTGTCGAAGATGTAGTCGTTGCAGGTGC
GCACCAGGTACTGGTAGCCGATGAGGAAGTGCGGCGGCGGCTGGCGGTAGAGCGGCCATCGCTCGGTGGCG
GGGGCGCCGGGCGCGAGGTCCTCGAGCATGGTGCGGTGGTAGCCGTAGATGTACCTGGACATCCAGGTGATG
CCGGCGGCGGTGGTGGAGGCGCGCGGGAACTCGCGGACGCGGTTCCAGATGTTGCGCAGCGGCAGGAAGTA
GTTCATGGTGGGCACGGTCTGGCCCGTGAGGCGCGCGCAGTCGTGGATGCTCTATACGGGCAAAAACGAAAG
CGGTCAGCGGCTCGACTCCGTGGCCTGGAGGCTAAGCGAACGGGTTGGGCTGCGCGTGTACCCCGGTTCGAA
TCTCGAATCAGGCTGGAGCCGCAGCTAACGTGGTATTGGCACTCCCGTCTCGACCCAAGCCTGCACCAACCCT
CCAGGATACGGAGGCGGGTCGTTTTGCAACTTTTTTTTGGAGGCCGGATGAGACTAGTAAGCGCGGAAAGCG
GCCGACCGCGATGGCTCGCTGCCGTAGTCTGGAGAAGAATCGCCAGGGTTGCGTTGCGGTGTGCCCCGGTTC
GAGGCCGGCCGGATTCCGCGGCTAACGAGGGCGTGGCTGCCCCGTCGTTTCCAAGACCCCATAGCCAGCCGA
CTTCTCCAGTTACGGAGCGAGCCCCTCTTTTGTTTTGTTTGTTTTTGCCAGATGCATCCCGTACTGCGGCAGAT
GCGCCCCCACCACCCTCCACCGCAACAACAGCCCCCTCCACAGCCGGCGCTTCTGCCCCCGCCCCAGCAGCAA
CTTCCAGCCACGACCGCCGCGGCCGCCGTGAGCGGGGCTGGACAGAGTTATGATCACCAGCTGGCCTTGGAA
GAGGGCGAGGGGCTGGCGCGCCTGGGGGCGTCGTCGCCGGAGCGGCACCCGCGCGTGCAGATGAAAAGGGA
CGCTCGCGAGGCCTACGTGCCCAAGCAGAACCTGTTCAGAGACAGGAGCGGCGAGGAGCCCGAGGAGATGC
GCGCGGCCCGGTTCCACGCGGGGCGGGAGCTGCGGCGCGGCCTGGACCGAAAGAGGGTGCTGAGGGACGAG
GATTTCGAGGCGGACGAGCTGACGGGGATCAGCCCCGCGCGCGCGCACGTGGCCGCGGCCAACCTGGTCACG
GCGTACGAGCAGACCGTGAAGGAGGAGAGCAACTTCCAAAAATCCTTCAACAACCACGTGCGCACCCTGATC
GCGCGCGAGGAGGTGACCCTGGGCCTGATGCACCTGTGGGACCTGCTGGAGGCCATCGTGCAGAACCCCACC
AGCAAGCCGCTGACGGCGCAGCTGTTCCTGGTGGTGCAGCATAGTCGGGACAACGAAGCGTTCAGGGAGGCG
CTGCTGAATATCACCGAGCCCGAGGGCCGCTGGCTCCTGGACCTGGTGAACATTCTGCAGAGCATCGTGGTGC
AGGAGCGCGGGCTGCCGCTGTCCGAGAAGCTGGCGGCCATCAACTTCTCGGTGCTGAGTTTGGGCAAGTACT
ACGCTAGGAAGATCTACAAGACCCCGTACGTGCCCATAGACAAGGAGGTGAAGATCGACGGGTTTTACATGC
GCATGACCCTGAAAGTGCTGACCCTGAGCGACGATCTGGGGGTGTACCGCAACGACAGGATGCACCGTGCGG
TGAGCGCCAGCAGGCGGCGCGAGCTGAGCGACCAGGAGCTGATGCATAGTCTGCAGCGGGCCCTGACCGGG
GCCGGGACCGAGGGGGAGAGCTACTTTGACATGGGCGCGGACCTGCACTGGCAGCCCAGCCGCCGGGCCTTG
GAGGCGGCGGCAGGACCCTACGTAGAAGAGGTGGACGATGAGGTGGACGAGGAGGGCGAGTACCTGGAAGA
CTGATGGCGCGACCGTATTTTTGCTAGATGCAACAACAACAGCCACCTCCTGATCCCGCGATGCGGGCGGCGC
TGCAGAGCCAGCCGTCCGGCATTAACTCCTCGGACGATTGGACCCAGGCCATGCAACGCATCATGGCGCTGA
CGACCCGCAACCCCGAAGCCTTTAGACAGCAGCCCCAGGCCAACCGGCTCTCGGCCATCCTGGAGGCCGTGG
TGCCCTCGCGCTCCAACCCCACGCACGAGAAGGTCCTGGCCATCGTGAACGCGCTGGTGGAGAACAAGGCCA
TCCGCGGCGACGAGGCCGGCCTGGTGTACAACGCGCTGCTGGAGCGCGTGGCCCGCTACAACAGCACCAACG
TGCAGACCAACCTGGACCGCATGGTGACCGACGTGCGCGAGGCCGTGGCCCAGCGCGAGCGGTTCCACCGCG
AGTCCAACCTGGGATCCATGGTGGCGCTGAACGCCTTCCTCAGCACCCAGCCCGCCAACGTGCCCCGGGGCC
AGGAGGACTACACCAACTTCATCAGCGCCCTGCGCCTGATGGTGACCGAGGTGCCCCAGAGCGAGGTGTACC
AGTCCGGGCCGGACTACTTCTTCCAGACCAGTCGCCAGGGCTTGCAGACCGTGAACCTGAGCCAGGCTTTCAA
GAACTTGCAGGGCCTGTGGGGCGTGCAGGCCCCGGTCGGGGACCGCGCGACGGTGTCGAGCCTGCTGACGCC
GAACTCGCGCCTGCTGCTGCTGCTGGTGGCCCCCTTCACGGACAGCGGCAGCATCAACCGCAACTCGTACCTG
GGCTACCTGATTAACCTGTACCGCGAGGCCATCGGCCAGGCGCACGTGGACGAGCAGACCTACCAGGAGATC
ACCCACGTGAGCCGCGCCCTGGGCCAGGACGACCCGGGCAACCTGGAAGCCACCCTGAACTTTTTGCTGACC
AACCGGTCGCAGAAGATCCCGCCCCAGTACGCGCTCAGCACCGAGGAGGAGCGCATCCTGCGTTACGTGCAG
CAGAGCGTGGGCCTGTTCCTGATGCAGGAGGGGGCCACCCCCAGCGCCGCGCTCGACATGACCGCGCGCAAC
ATGGAGCCCAGCATGTACGCCAGCAACCGCCCGTTCATCAATAAACTGATGGACTACTTGCATCGGGCGGCC
GCCATGAACTCTGACTATTTCACCAACGCCATCCTGAATCCCCACTGGCTCCCGCCGCCGGGGTTCTACACGG
GCGAGTACGACATGCCCGACCCCAATGACGGGTTCCTGTGGGACGATGTGGACAGCAGCGTGTTCTCCCCCC
GACCGGGTGCTAACGAGCGCCCCTTGTGGAAGAAGGAAGGCAGCGACCGACGCCCGTCCTCGGCGCTGTCCG
GCCGCGAGGGTGCTGCCGCGGCGGTGCCCGAGGCCGCCAGTCCTTTCCCGAGCTTGCCCTTCTCGCTGAACAG
TATCCGCAGCAGCGAGCTGGGCAGGATCACGCGCCCGCGCTTGCTGGGCGAAGAGGAGTACTTGAATGACTC
GCTGTTGAGACCCGAGCGGGAGAAGAACTTCCCCAATAACGGGATAGAAAGCCTGGTGGACAAGATGAGCC
GCTGGAAGACGTATGCGCAGGAGCACAGGGACGATCCCCGGGCGTCGCAGGGGGCCACGAGCCGGGGCAGC

GCCGCCCGTAAACGCCGGTGGCACGACAGGCAGCGGGGACAGATGTGGGACGATGAGGACTCCGCCGACGA
CAGCAGCGTGTTGGACTTGGGTGGGAGTGGTAACCCGTTCGCTCACCTGCGCCCCCGTATCGGGCGCATGATG
TAAGAGAAACCGAAAATAAATGATACTCACCAAGGCCATGGCGACCAGCGTGCGTTCGTTTCTTCTCTGTTGT
TGTTGTATCTAGTATGATGAGGCGTGCGTACCCGGAGGGTCCTCCTCCCTCGTACGAGAGCGTGATGCAGCAG
GCGATGGCGGCGGCGGCGATGCAGCCCCCGCTGGAGGCTCCTTACGTGCCCCCGCGGTACCTGGCGCCTACG
GAGGGGCGGAACAGCATTCGTTACTCGGAGCTGGCACCCTTGTACGATACCACCCGGTTGTACCTGGTGGAC
AACAAGTCGGCGGACATCGCCTCGCTGAACTACCAGAACGACCACAGCAACTTCCTGACCACCGTGGTGCAG
AACAATGACTTCACCCCCACGGAGGCCAGCACCCAGACCATCAACTTTGACGAGCGCTCGCGGTGGGGCGGC
CAGCTGAAAACCATCATGCACACCAACATGCCCAACGTGAACGAGTTCATGTACAGCAACAAGTTCAAGGCG
CGGGTGATGGTCTCCCGCAAGACCCCCAATGGGGTGACAGTGACAGAGGATTATGATGGTAGTCAGGATGAG
CTGAAGTATGAATGGGTGGAATTTGAGCTGCCCGAAGGCAACTTCTCGGTGACCATGACCATCGACCTGATG
AACAACGCCATCATCGACAATTACTTGGCGGTGGGGCGGCAGAACGGGGTGCTGGAGAGCGACATCGGCGTG
AAGTTCGACACTAGGAACTTCAGGCTGGGCTGGGACCCCGTGACCGAGCTGGTCATGCCCGGGGTGTACACC
AACGAGGCTTTCCATCCCGATATTGTCTTGCTGCCCGGCTGCGGGGTGGACTTCACCGAGAGCCGCCTCAGCA
ACCTGCTGGGCATTCGCAAGAGGCAGCCCTTCCAGGAAGGCTTCCAGATCATGTACGAGGATCTGGAGGGGG
GCAACATCCCCGCGCTCCTGGATGTCGACGCCTATGAGAAAAGCAAGGAGGATGCAGCAGCTGAAGCAACTG
CAGCCGTAGCTACCGCCTCTACCGAGGTCAGGGGCGATAATTTTGCAAGCGCCGCAGCAGTGGCAGCGGCCG
AGGCGGCTGAAACCGAAAGTAAGATAGTCATTCAGCCGGTGGAGAAGGATAGCAAGAACAGGAGCTACAAC
GTACTACCGGACAAGATAAACACCGCCTACCGCAGCTGGTACCTAGCCTACAACTATGGCGACCCCGAGAAG
GGCGTGCGCTCCTGGACGCTGCTCACCACCTCGGACGTCACCTGCGGCGTGGAGCAAGTCTACTGGTCGCTGC
CCGACATGATGCAAGACCCGGTCACCTTCCGCTCCACGCGTCAAGTTAGCAACTACCCGGTGGTGGGCGCCG
AGCTCCTGCCCGTCTACTCCAAGAGCTTCTTCAACGAGCAGGCCGTCTACTCGCAGCAGCTGCGCGCCTTCAC
CTCGCTTACGCACGTCTTCAACCGCTTCCCCGAGAACCAGATCCTCGTCCGCCCGCCCGCGCCCACCATTACC
ACCGTCAGTGAAAACGTTCCTGCTCTCACAGATCACGGGACCCTGCCGCTGCGCAGCAGTATCCGGGGAGTC
CAGCGCGTGACCGTTACTGACGCCAGACGCCGCACCTGCCCCTACGTCTACAAGGCCCTGGGCATAGTCGCG
CCGCGCGTCCTCTCGAGCCGCACCTTCTAAATGTCCATTCTCATCTCGCCCAGTAATAACACCGGTTGGGGCC
TGCGCGCGCCCAGCAAGATGTACGGAGGCGCTCGCCAACGCTCCACGCAACACCCCGTGCGCGTGCGCGGGC
ACTTCCGCGCTCCCTGGGGCGCCCTCAAGGGCCGCGTGCGGTCGCGCACCACCGTCGACGACGTGATCGACC
AGGTGGTGGCCGACGCGCGCAACTACACCCCCGCCGCCGCGCCCGTCTCCACCGTGGACGCCGTCATCGACA
GCGTGGTGGCcGACGCGCGCCGGTACGCCCGCGCCAAGAGCCGGCGGCGCATCGCCCGGCGGCACCGGA
GCACCCCCGCCATGCGCGCGGCGCGAGCCTTGCTGCGCAGGGCCAGGCGCACGGGACGCAGGGCCATGCTCA
GGGCGGCCAGACGCGCGGCTTCAGGCGCCAGCGCCGGCAGGACCCGGAGACGCGCGGCCACGGCGGCGGCA
GCGGCCATCGCCAGCATGTCCCGCCCGCGGCGAGGGAACGTGTACTGGGTGCGCGACGCCGCCACCGGTGTG
CGCGTGCCCGTGCGCACCCGCCCCCCTCGCACTTGAAGATGTTCACTTCGCGATGTTGATGTGTCCCAGCGGC
GAGGAGGATGTCCAAGCGCAAATTCAAGGAAGAGATGCTCCAGGTCATCGCGCCTGAGATCTACGGCCCTGC
GGTGGTGAAGGAGGAAAGAAAGCCCCGCAAAATCAAGCGGGTCAAAAAGGACAAAAAGGAAGAAGAAAGT
GATGTGGACGGATTGGTGGAGTTTGTGCGCGAGTTCGCCCCCCGGCGGCGCGTGCAGTGGCGCGGGCGGAAG
GTGCAACCGGTGCTGAGACCCGGCACCACCGTGGTCTTCACGCCCGGCGAGCGCTCCGGCACCGCTTCCAAG
CGCTCCTACGACGAGGTGTACGGGGATGATGATATTCTGGAGCAGGCGGCCGAGCGCCTGGGCGAGTTTGCT
TACGGCAAGCGCAGCCGTTCCGCACCGAAGGAAGAGGCGGTGTCCATCCCGCTGGACCACGGCAACCCCACG
CCGAGCCTCAAGCCCGTGACCTTGCAGCAGGTGCTGCCGACCGCGGCGCCGCGCCGGGGGTTCAAGCGCGAG
GGCGAGGATCTGTACCCCACCATGCAGCTGATGGTGCCCAAGCGCCAGAAGCTGGAAGACGTGCTGGAGACC
ATGAAGGTGGACCCGGACGTGCAGCCCGAGGTCAAGGTGCGGCCCATCAAGCAGGTGGCCCCGGGCCTGGG
CGTGCAGACCGTGGACATCAAGATTCCCACGGAGCCCATGGAAACGCAGACCGAGCCCATGATCAAGCCCAG
CACCAGCACCATGGAGGTGCAGACGGATCCCTGGATGCCATCGGCTCCTAGTCGAAGACCCCGGCGCAAGTA
CGGCGCGGCCAGCCTGCTGATGCCCAACTACGCGCTGCATCCTTCCATCATCCCCACGCCGGGCTACCGCGGC
ACGCGCTTCTACCGCGGTCATACCAGCAGCCGCCGCCGCAAGACCACCACTCGCCGCCGCCGTCGCCGCACC
GCCGCTGCAACCACCCCTGCCGCCCTGGTGCGGAGAGTGTACCGCCGCGGCCGCGCACCTCTGACCCTGCCGC
GCGCGCGCTACCACCCGAGCATCGCCATTTAAACTTTCGCCtGCTTTGCAGATCAATGGCCCTCACATGCCGCC
TTCGCGTTCCCATTACGGGCTACCGAGGAAGAAAACCGCGCCGTAGAAGGCTGGCGGGGAACGGGATGCGTC
GCCACCACCACCGGCGGCGGCGCGCCATCAGCAAGCGGTTGGGGGGAGGCTTCCTGCCCGCGCTGATCCCCA
TCATCGCCGCGGCGATCGGGGCGATCCCCGGCATTGCTTCCGTGGCGGTGCAGGCCTCTCAGCGCCACTGAGA
CACACTTGGAAACATCTTGTAATAAACCaATGGACTCTGACGCTCCTGGTCCTGTGATGTGTTTTCGTAGACAG
ATGGAAGACATCAATTTTTCGTCCCTGGCTCCGCGACACGGCACGCGGCCGTTCATGGGCACCTGGAGCGAC
ATCGGCACCAGCCAACTGAACGGGGGCGCCTTCAATTGGAGCAGTCTCTGGAGCGGGCTTAAGAATTTCGGG
TCCACGCTTAAAACCTATGGCAGCAAGGCGTGGAACAGCACCACAGGGCAGGCGCTGAGGGATAAGCTGAA
AGAGCAGAACTTCCAGCAGAAGGTGGTCGATGGGCTCGCCTCGGGCATCAACGGGGTGGTGGACCTGGCCAA
CCAGGCCGTGCAGCGGCAGATCAACAGCCGCCTGGACCCGGTGCCGCCCGCCGGCTCCGTGGAGATGCCGCA
GGTGGAGGAGGAGCTGCCTCCCCTGGACAAGCGGGGCGAGAAGCGACCCCGCCCCGATGCGGAGGAGACGC
TGCTGACGCACACGGACGAGCCGCCCCCGTACGAGGAGGCGGTGAAACTGGGTCTGCCCACCACGCGGCCCA
TCGCGCCCCTGGCCACCGGGGTGCTGAAACCCGAAAAGCCCGCGACCCTGGACTTGCCTCCTCCCCAGCCTTC
CCGCCCCTCTACAGTGGCTAAGCCCCTGCCGCCGGTGGCCGTGGCCCGCGCGCGACCCGGGGGCACCGCCCG
CCCTCATGCGAACTGGCAGAGCACTCTGAACAGCATCGTGGGTCTGGGAGTGCAGAGTGTGAAGCGCCGCCG
CTGCTATTAAACCTACCGTAGCGCTTAACTTGCTTGTCTGTGTGTGTATGTATTATGTCGCCGCCGCCGCTGTC
CACCAGAAGGAGGAGTGAAGAGGCGCGTCGCCGAGTTGCAAGATGGCCACCCCATCGATGCTGCCCCAGTGG
GCGTACATGCACATCGCCGGACAGGACGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTGGTGCAGTTTGCCCGCGCC

ACAGACACCTACTTCAGTCTGGGGAACAAGTTTAGGAACCCCACGGTGGCGCCCACGCACGATGTGACCACC
GACCGCAGCCAGCGGCTGACGCTGCGCTTCGTGCCCGTGGACCGCGAGGACAACACCTACTCGTACAAAGTG
CGCTACACGCTGGCCGTGGGCGACAACCGCGTGCTGGACATGGCCAGCACCTACTTTGACATCCGCGGCGTG
CTGGATCGGGGCCCTAGCTTCAAACCCTACTCCGGCACCGCCTACAACAGTCTGGCCCCCAAGGGAGCACCC
AACACTTGTCAGTGGACATATAAAGCCGATGGTGAAACTGCCACAGAAAAAACCTATACATATGGAAATGCA
CCCGTGCAGGGCATTAACATCACAAAAGATGGTATTCAACTTGGAACTGACACCGATGATCAGCCAATCTAC
GCAGATAAAACCTATCAGCCTGAACCTCAAGTGGGTGATGCTGAATGGCATGACATCACTGGTACTGATGAA
AAGTATGGAGGCAGAGCTCTTAAGCCTGATACCAAAATGAAGCCTTGTTATGGTTCTTTTGCCAAGCCTACTA
ATAAAGAAGGAGGTCAGGCAAATGTGAAAACAGGAACAGGCACTACTAAAGAATATGACATAGACATGGCT
TTCTTTGACAACAGAAGTGCGGCTGCTGCTGGCCTAGCTCCAGAAATTGTTTTGTATACTGAAAATGTGGATT
TGGAAACTCCAGATACCCATATTGTATACAAAGCAGGCACAGATGACAGCAGCTCTTCTATTAATTTGGGTCA
GCAAGCCATGCCCAACAGACCTAACTACATTGGTTTCAGAGACAACTTTATCGGGCTCATGTACTACAACAGC
ACTGGCAATATGGGGGTGCTGGCCGGTCAGGCTTCTCAGCTGAATGCTGTGGTTGACTTGCAAGACAGAAAC
ACCGAGCTGTCCTACCAGCTCTTGCTTGACTCTCTGGGTGACAGAACCCGGTATTTCAGTATGTGGAATCAGG
CGGTGGACAGCTATGATCCTGATGTGCGCATTATTGAAAATCATGGTGTGGAGGATGAACTTCCCAACTATTG
TTTCCCTCTGGATGCTGTTGGCAGAACAGATACTTATCAGGGAATTAAGGCTAATGGAACTGATCAAACCACA
TGGACCAAAGATGACAGTGTCAATGATGCTAATGAGATAGGCAAGGGTAATCCATTCGCCATGGAAATCAAC
ATCCAAGCCAACCTGTGGAGGAACTTCCTCTACGCCAACGTGGCCCTGTACCTGCCCGACTCTTACAAGTACA
CGCCGGCCAATGTTACCCTGCCCACCAACACCAACACCTACGATTACATGAACGGCCGGGTGGTGGCGCCCT
CGCTGGTGGACTCCTACATCAACATCGGGGCGCGCTGGTCGCTGGATCCCATGGACAACGTGAACCCCTTCAA
CCACCACCGCAATGCGGGGCTGCGCTACCGCTCCATGCTCCTGGGCAACGGGCGCTACGTGCCCTTCCACATC
CAGGTGCCCCAGAAATTTTTCGCCATCAAGAGCCTCCTGCTCCTGCCCGGGTCCTACACCTACGAGTGGAACT
TCCGCAAGGACGTCAACATGATCCTGCAGAGCTCCCTCGGCAACGACCTGCGCACGGACGGGGCCTCCATCT
CCTTCACCAGCATCAACCTCTACGCCACCTTCTTCCCCATGGCGCACAACACGGCCTCCACGCTCGAGGCCAT
GCTGCGCAACGACACCAACGACCAGTCCTTCAACGACTACCTCTCGGCGGCCAACATGCTCTACCCCATCCCG
GCCAACGCCACCAACGTGCCCATCTCCATCCCCTCGCGCAACTGGGCCGCCTTCCGCGGCTGGTCCTTCACGC
GTCTCAAGACCAAGGAGACGCCCTCGCTGGGCTCCGGGTTCGACCCCTACTTCGTCTACTCGGGCTCCATCCC
CTACCTCGACGGCACCTTCTACCTCAACCACACCTTCAAGAAGGTCTCCATCACCTTCGACTCCTCCGTCAGCT
GGCCCGGCAACGACCGGCTCCTGACGCCCAACGAGTTCGAAATCAAGCGCACCGTCGACGGCGAGGGCTACA
ACGTGGCCCAGTGCAACATGACCAAGGACTGGTTCCTGGTCCAGATGCTGGCCCACTACAACATCGGCTACC
AGGGCTTCTACGTGCCCGAGGGCTACAAGGACCGCATGTACTCCTTCTTCCGCAACTTCCAGCCCATGAGCCG
CCAGGTGGTGGACGAGGTCAACTACAAGGACTACCAGGCCGTCACCCTGGCCTACCAGCACAACAACTCGGG
CTTCGTCGGCTACCTCGCGCCCACCATGCGCCAGGGCCAGCCCTACCCCGCCAACTACCCCTACCCGCTCATC
GGCAAGAGCGCCGTCACCAGCGTCACCCAGAAAAAGTTCCTCTGCGACAGGGTCATGTGGCGCATCCCCTTC
TCCAGCAACTTCATGTCCATGGGCGCGCTCACCGACCTCGGCCAGAACATGCTCTATGCCAACTCCGCCCACG
CGCTAGACATGAATTTCGAAGTCGACCCCATGGATGAGTCCACCCTTCTCTATGTTGTCTTCGAAGTCTTCGAC
GTCGTCCGAGTGCACCAGCCCCACCGCGGCGTCATCGAGGCCGTCTACCTGCGCACCCCCTTCTCGGCCGGTA
ACGCCACCACCTAAGCTCTTGCTTCTTGCAAGCCATGGCCGCGGGCTCCGGCGAGCAGGAGCTCAGGGCCAT
CATCCGCGACCTGGGCTGCGGGCCCTACTTCCTGGGCACCTTCGATAAGCGCTTCCCGGGATTCATGGCCCCG
CACAAGCTGGCCTGCGCCATCGTCAACACGGCCGGCCGCGAGACCGGGGGCGAGCACTGGCTGGCCTTCGCC
TGGAACCCGCGCTCGAACACCTGCTACCTCTTCGACCCCTTCGGGTTCTCGGACGAGCGCCTCAAGCAGATCT
ACCAGTTCGAGTACGAGGGCCTGCTGCGCCGCAGCGCCCTGGCCACCGAGGACCGCTGCGTCACCCTGGAAA
AGTCCACCCAGACCGTGCAGGGTCCGCGCTCGGCCGCCTGCGGGCTCTTCTGCTGCATGTTCCTGCACGCCTT
CGTGCACTGGCCCGACCGCCCCATGGACAAGAACCCCACCATGAACTTGCTGACGGGGGTGCCCAACGGCAT
GCTCCAGTCGCCCCAGGTGGAACCCACCCTGCGCCGCAACCAGGAGGCGCTCTACCGCTTCCTCAACTCCCAC
TCCGCCTACTTTCGCTCCCACCGCGCGCGCATCGAGAAGGCCACCGCCTTCGACCGCATGAATCAAGACATGT
AAACCGTGTGTGTATGTTAAATGTCTTTAATAAACAGCACTTTCATGTTACACATGCATCTGAGATGATTTATT
TAGAAATCGAAAGGGTTCTGCCGGGTCTCGGCATGGCCCGCGGGCAGGGACACGTTGCGGAACTGGTACTTG
GCCAGCCACTTGAACTCGGGGATCAGCAGTTTGGGCAGCGGGGTGTCGGGGAAGGAGTCGGTCCACAGCTTC
CGCGTCAGTTGCAGGGCGCCCAGCAGGTCGGGCGCGGAGATCTTGAAATCGCAGTTGGGACCCGCGTTCTGC
GCGCGGGAGTTGCGGTACACGGGGTTGCAGCACTGGAACACCATCAGGGCCGGGTGCTTCACGCTCGCCAGC
ACCGTCGCGTCGGTGATGCTCTCCACGTCGAGGTCCTCGGCGTTGGCCATCCCGAAGGGGGTCATCTTGCAGG
TCTGCCTTCCCATGGTGGGCACGCACCCGGGCTTGTGGTTGCAATCGCAGTGCAGGGGGATCAGCATCATCTG
GGCCTGGTCGGCGTTCATCCCCGGGTACATGGCCTTCATGAAAGCCTCCAATTGCCTGAACGCCTGCTGGGCC
TTGGCTCCCTCGGTGAAGAAGACCCCGCAGGACTTGCTAGAGAACTGGTTGGTGGCGCACCCGGCGTCGTGC
ACGCAGCAGCGCGCGTCGTTGTTGGCCAGCTGCACCACGCTGCGCCCCCAGCGGTTCTGGGTGATCTTGGCCC
GGTCGGGGTTCTCCTTCAGCGCGCGCTGCCCGTTCTCGCTCGCCACATCCATCTCGATCATGTGCTCCTTCTGG
ATCATGGTGGTCCCGTGCAGGCACCGCAGCTTGCCCTCGGCCTCGGTGCACCCGTGCAGCCACAGCGCGCACC
CGGTGCACTCCCAGTTCTTGTGGGCGATCTGGGAATGCGCGTGCACGAAGCCCTGCAGGAAGCGGCCCATCA
TGGTGGTCAGGGTCTTGTTGCTAGTGAAGGTCAGCGGAATGCCGCGGTGCTCCTCGTTGATGTACAGGTGGCA
GATGCGGCGGTACACCTCGCCCTGCTCGGGCATCAGCTGGAAGTTGGCTTTCAGGTCGGTCTCCACGCGGTAG
CGGTCCATCAGCATAGTCATGATTTCCATACCCTTCTCCCAGGCCGAGACGATGGGCAGGCTCATAGGGTTCT
TCACCATCATCTTAGCGCTAGCAGCCGCGGCCAGGGGGTCGCTCTCGTCCAGGGTCTCAAAGCTCCGCTTGCC
GTCCTTCTCGGTGATCCGCACCGGGGGGTAGCTGAAGCCCACGGCCGCCAGCTCCTCCTCGGCCTGTCTTTCG
TCCTCGCTGTCCTGGCTGACGTCCTGCAGGACCACATGCTTGGTCTTGCGGGGTTTCTTCTTGGGCGGCAGCG
GCGGCGGAGATGTTGGAGATGGCGAGGGGGAGCGCGAGTTCTCGCTCACCACTACTATCTCTTCCTCTTCTTG

GTCCGAGGCCACGCGGCGGTAGGTATGTCTCTTCGGGGGCAGAGGCGGAGGCGACGGGCTCTCGCCGCCGCG
ACTTGGCGGATGGCTGGCAGAGCCCCTTCCGCGTTCGGGGGTGCGCTCCCGGCGGCGCTCTGACTGACTTCCT
CCGCGGCCGGCCATTGTGTTCTCCTAGGGAGGAACAACAAGCATGGAGACTCAGCCATCGCCAACCTCGCCA
TCTGCCCCCACCGCCGACGAGAAGCAGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAACCGCCCCGCCGCCCAGCCCCGCC
ACCTCCGACGCGGCCGTCCCAGACATGCAAGAGATGGAGGAATCCATCGAGATTGACCTGGGCTATGTGACG
CCCGCGGAGCACGAGGAGGAGCTGGCAGTGCGCTTTTCACAAGAAGAGATACACCAAGAACAGCCAGAGCA
GGAAGCAGAGAATGAGCAGAGTCAGGCTGGGCTCGAGCATGACGGCGACTACCTCCACCTGAGCGGGGGGG
AGGACGCGCTCATCAAGCATCTGGCCCGGCAGGCCACCATCGTCAAGGATGCGCTGCTCGACCGCACCGAGG
TGCCCCTCAGCGTGGAGGAGCTCAGCCGCGCCTACGAGTTGAACCTCTTCTCGCCGCGCGTGCCCCCCAAGCG
CCAGCCCAATGGCACCTGCGAGCCCAACCCGCGCCTCAACTTCTACCCGGTCTTCGCGGTGCCCGAGGCCCTG
GCCACCTACCACATCTTTTTCAAGAACCAAAAGATCCCCGTCTCCTGCCGCGCCAACCGCACCCGCGCCGACG
CCCTTTTCAACCTGGGTCCCGGCGCCCGCCTACCTGATATCGCCTCCTTGGAAGAGGTTCCCAAGATCTTCGA
GGGTCTGGGCAGCGACGAGACTCGGGCCGCGAACGCTCTGCAAGGAGAAGGAGGAGAGCATGAGCACCACA
GCGCCCTGGTCGAGTTGGAAGGCGACAACGCGCGGCTGGCGGTGCTCAAACGCACGGTCGAGCTGACCCATT
TCGCCTACCCGGCTCTGAACCTGCCCCCCAAAGTCATGAGCGCGGTCATGGACCAGGTGCTCATCAAGCGCGC
GTCGCCCATCTCCGAGGACGAGGGCATGCAAGACTCCGAGGAGGGCAAGCCCGTGGTCAGCGACGAGCAGC
TGGCCCGGTGGCTGGGTCCTAATGCTAGTCCCCAGAGTTTGGAAGAGCGGCGCAAACTCATGATGGCCGTGG
TCCTGGTGACCGTGGAGCTGGAGTGCCTGCGCCGCTTCTTCGCCGACGCGGAGACCCTGCGCAAGGTCGAGG
AGAACCTGCACTACCTCTTCAGGCACGGGTTCGTGCGCCAGGCCTGCAAGATCTCCAACGTGGAGCTGACCA
ACCTGGTCTCCTACATGGGCATCTTGCACGAGAACCGCCTGGGGCAGAACGTGCTGCACACCACCCTGCGCG
GGGAGGCCCGGCGCGACTACATCCGCGACTGCGTCTACCTCTACCTCTGCCACACCTGGCAGACGGGCATGG
GCGTGTGGCAGCAGTGTCTGGAGGAGCAGAACCTGAAAGAGCTCTGCAAGCTCCTGCAGAAGAACCTCAAGG
GTCTGTGGACCGGGTTCGACGAGCGCACCACCGCCTCGGACCTGGCCGACCTCATTTTCCCCGAGCGCCTCAG
GCTGACGCTGCGCAACGGCCTGCCCGACTTTATGAGCCAAAGCATGTTGCAAAACTTTCGCTCTTTCATCCTC
GAACGCTCCGGAATCCTGCCCGCCACCTGCTCCGCGCTGCCCTCGGACTTCGTGCCGCTGACCTTCCGCGAGT
GCCCCCCGCCGCTGTGGAGCCACTGCTACCTGCTGCGCCTGGCCAACTACCTGGCCTACCACTCGGACGTGAT
CGAGGACGTCAGCGGCGAGGGCCTGCTCGAGTGCCACTGCCGCTGCAACCTCTGCACGCCGCACCGCTCCCT
GGCCTGCAACCCCCAGCTGCTGAGCGAGACCCAGATCATCGGCACCTTCGAGTTGCAAGGGCCCAGCGAAGG
CGAGGGTTCAGCCGCCAAGGGGGGTCTGAAACTCACCCCGGGGCTGTGGACCTCGGCCTACTTGCGCAAGTT
CGTGCCCGAGGACTACCATCCCTTCGAGATCAGGTTCTACGAGGACCAATCCCATCCGCCCAAGGCCGAGCT
GTCGGCCTGCGTCATCACCCAGGGGGCGATCCTGGCCCAATTGCAAGCCATCCAGAAATCCCGCCAAGAATT
CTTGCTGAAAAAGGGCCGCGGGGTCTACCTCGACCCCCAGACCGGTGAGGAGCTCAACCCCGGCTTCCCCCA
GGATGCCCCGAGGAAACAAGAAGCTGAAAGTGGAGCTGCCGCCCGTGGAGGATTTGGAGGAAGACTGGGAG
AACAGCAGTCAGGCAGAGGAGGAGGAGATGGAGGAAGACTGGGACAGCACTCAGGCAGAGGAGGACAGCC
TGCAAGACAGTCTGGAGGAAGACGAGGAGGAGGCAGAGGAGGAGGTGGAAGAAGCAGCCGCCGCCAGACC
GTCGTCCTCGGCGGGGGAGAAAGCAAGCAGCACGGATACCATCTCCGCTCCGGGTCGGGGTCCCGCTCGACC
ACACAGTAGATGGGACGAGACCGGACGATTCCCGAACCCCACCACCCAGACCGGTAAGAAGGAGCGGCAGG
GATACAAGTCCTGGCGGGGGCACAAAAACGCCATCGTCTCCTGCTTGCAGGCCTGCGGGGGCAACATCTCCT
TCACCCGGCGCTACCTGCTCTTCCACCGCGGGGTGAACTTTCCCCGCAACATCTTGCATTACTACCGTCACCTC
CACAGCCCCTACTACTTCCAAGAAGAGGCAGCAGCAGCAGAAAAAGACCAGCAGAAAACCAGCAGCTAGAA
AATCCACAGCGGCGGCAGCAGGTGGACTGAGGATCGCGGCGAACGAGCCGGCGCAAACCCGGGAGCTGAGG
AACCGGATCTTTCCCACCCTCTATGCCATCTTCCAGCAGAGTCGGGGGCAGGAGCAGGAACTGAAAGTCAAG
AACCGTTCTCTGCGCTCGCTCACCCGCAGTTGTCTGTATCACAAGAGCGAAGACCAACTTCAGCGCACTCTCG
AGGACGCCGAGGCTCTCTTCAACAAGTACTGCGCGCTCACTCTTAAAGAGTAGCCCGCGCCCGCCCAGTCGC
AGAAAAAGGCGGGAATTACGTCACCTGTGCCCTTCGCCCTAGCCGCCTCCACCCATCATCATGAGCAAAGAG
ATTCCCACGCCTTACATGTGGAGCTACCAGCCCCAGATGGGCCTGGCCGCCGGTGCCGCCCAGGACTACTCCA
CCCGCATGAATTGGCTCAGCGCCGGGCCCGCGATGATCTCACGGGTGAATGACATCCGCGCCCACCGAAACC
AGATACTCCTAGAACAGTCAGCGCTCACCGCCACGCCCCGCAATCACCTCAATCCGCGTAATTGGCCCGCCGC
CCTGGTGTACCAGGAAATTCCCCAGCCCACGACCGTACTACTTCCGCGAGACGCCCAGGCCGAAGTCCAGCT
GACTAACTCAGGTGTCCAGCTGGCGGGCGGCGCCACCCTGTGTCGTCACCGCCCCGCTCAGGGTATAAAGCG
GCTGGTGATCCGGGGCAGAGGCACACAGCTCAACGACGAGGTGGTGAGCTCTTCGCTGGGTCTGCGACCTGA
CGGAGTCTTCCAACTCGCCGGATCGGGGAGATCTTCCTTCACGCCTCGTCAGGCCGTCCTGACTTTGGAGAGT
TCGTCCTCGCAGCCCCGCTCGGGTGGCATCGGCACTCTCCAGTTCGTGGAGGAGTTCACTCCCTCGGTCTACTT
CAACCCCTTCTCCGGCTCCCCCGGCCACTACCCGGACGAGTTCATCCCGAACTTCGACGCCATCAGCGAGTCG
GTGGACGGCTACGATTGAAACTAATCACCCCCTTATCCAGTGAAATAAAGATCATATTGATGATGATTTTACA
GAAATAAAAAATAATCATTTGATTTGAAATAAAGATACAATCATATTGATGATTTGAGTTTAACAAAAAAAT
AAAGAATCACTTACTTGAAATCTGATACCAGGTCTCTGTCCATGTTTTCTGCCAACACCACTTCACTCCCCTCT
TCCCAGCTCTGGTACTGCAGGCCCCGGCGGGCTGCAAACTTCCTCCACACGCTGAAGGGGATGTCAAATTCCT
CCTGTCCCTCAATCTTCATTTTATCTTCTATCAGATGTCCAAAAAGCGCGTCCGGGTGGATGATGACTTCGACC
CCGTCTACCCCTACGATGCAGACAACGCACCGACCGTGCCCTTCATCAACCCCCCCTTCGTCTCTTCAGATGG
ATTCCAAGAGAAGCCCCTGGGGGTGTTGTCCCTGCGACTGGCCGACCCCGTCACCACCAAGAACGGGGAAAT
CACCCTCAAGCTGGGAGAGGGGGTGGACCTCGATTCCTCGGGAAAACTCATCTCCAACACGGCCACCAAGGC
CGCCGCCCCTCTCAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCCTTAACATGGATCACCCCTTTTACACTAAAGATGGAA
AATTATCCTTACAAGTTTCTCCACCATTAAATATACTGAGAACAAGCATTCTAAACACACTAGCTTTAGGTTTT
GGATCAGGTTTAGGACTCCGTGGCTCTGCCTTGGCAGTACAGTTAGTCTCTCCACTTACATTTGATACTGATGG
AAACATAAAGCTTACCTTAGACAGAGGTTTGCATGTTACAACAGGAGATGCAATTGAAAGCAACATAAGCTG

GGCTAAAGGTTTAAAATTTGAAGATGGAGCCATAGCAACCAACATTGGAAATGGGTTAGAGTTTGGAAGCAG
TAGTACAGAAACAGGTGTTGATGATGCTTACCCAATCCAAGTTAAACTTGGATCTGGCCTTAGCTTTGACAGT
ACAGGAGCCATAATGGCTGGTAACAAAGAAGACGATAAACTCACTTTGTGGACAACACCTGATCCATCACCA
AACTGTCAAATACTCGCAGAAAATGATGCAAAACTAACACTTTGCTTGACTAAATGTGGTAGTCAAATACTG
GCCACTGTGTCAGTCTTAGTTGTAGGAAGTGGAAACCTAAACCCCATTACTGGCACCGTAAGCAGTGCTCAGG
TGTTTCTACGTTTTGATGCAAACGGTGTTCTTTTAACAGAACATTCTACACTAAAAAAATACTGGGGGTATAG
GCAGGGAGATAGCATAGATGGCACTCCATATACCAATGCTGTAGGATTCATGCCCAATTTAAAAGCTTATCCA
AAGTCACAAAGTTCTACTACTAAAAATAATATAGTAGGGCAAGTATACATGAATGGAGATGTTTCAAAACCT
ATGCTTCTCACTATAACCCTCAATGGTACTGATGACAGCAACAGTACATATTCAATGTCATTTTCATACACCTG
GACTAATGGAAGCTATGTTGGAGCAACATTTGGGGCTAACTCTTATACCTTCTCATACATCGCCCAAGAATGA
ACACTGTATCCCACCCTGCATGCCAACCCTTCCCACCCCACTCTGTGGAACAAACTCTGAAACACAAAATAAA
ATAAAGTTCAAGTGTTTTATTGATTCAACAGTTTTACAGGATTCGAGCAGTTATTTTTCCTCCACCCTCCCAGG
ACATGGAATACACCACCCTCTCCCCCCGCACAGCCTTGAACATCTGAATGCCATTGGTGATGGACATGCTTTT
GGTCTCCACGTTCCACACAGTTTCAGAGCGAGCCAGTCTCGGGTCGGTCAGGGAGATGAAACCCTCCGGGCA
CTCCCGCATCTGCACCTCACAGCTCAACAGCTGAGGATTGTCCTCGGTGGTCGGGATCACGGTTATCTGGAAG
AAGCAGAAGAGCGGCGGTGGGAATCATAGTCCGCGAACGGGATCGGCCGGTGGTGTCGCATCAGGCCCCGC
AGCAGTCGCTGCCGCCGCCGCTCCGTCAAGCTGCTGCTCAGGGGGTCCGGGTCCAGGGACTCCCTCAGCATG
ATGCCCACGGCCCTCAGCATCAGTCGTCTGGTGCGGCGGGCGCAGCAGCGCATGCGGATCTCGCTCAGGTCG
CTGCAGTACGTGCAACACAGAACCACCAGGTTGTTCAACAGTCCATAGTTCAACACGCTCCAGCCGAAACTC
ATCGCGGGAAGGATGCTACCCACGTGGCCGTCGTACCAGATCCTCAGGTAAATCAAGTGGTGCCCCCTCCAG
AACACGCTGCCCACGTACATGATCTCCTTGGGCATGTGGCGGTTCACCACCTCCCGGTACCACATCACCCTCT
GGTTGAACATGCAGCCCCGGATGATCCTGCGGAACCACAGGGCCAGCACCGCCCCGCCCGCCATGCAGCGAA
GAGACCCCGGGTCCCGGCAATGGCAATGGAGGACCCACCGCTCGTACCCGTGGATCATCTGGGAGCTGAACA
AGTCTATGTTGGCACAGCACAGGCATATGCTCATGCATCTCTTCAGCACTCTCAACTCCTCGGGGGTCAAAAC
CATATCCCAGGGCACGGGGAACTCTTGCAGGACAGCGAACCCCGCAGAACAGGGCAATCCTCGCACAGAACT
TACATTGTGCATGGACAGGGTATCGCAATCAGGCAGCACCGGGTGATCCTCCACCAGAGAAGCGCGGGTCTC
GGTCTCCTCACAGCGTGGTAAGGGGGCCGGCCGATACGGGTGATGGCGGGACGCGGCTGATCGTGTTCGCGA
CCGTGTCATGATGCAGTTGCTTTCGGACATTTTCGTACTTGCTGTAGCAGAACCTGGTCCGGGCGCTGCACAC
CGATCGCCGGCGGCGGTCTCGGCGCTTGGAACGCTCGGTGTTGAAATTGTAAAACAGCCACTCTCTCAGACCG
TGCAGCAGATCTAGGGCCTCAGGAGTGATGAAGATCCCATCATGCCTGATGGCTCTGATCACATCGACCACC
GTGGAATGGGCCAGACCCAGCCAGATGATGCAATTTTGTTGGGTTTCGGTGACGGCGAGCCTCGGGAACAAC
GATGAAGTAAATGCAAGCGGTGCGTTCCAGCATGGTTAGTTAGCTGATCTGTAGAAAAAACAAAAATGAACA
TTAAACCATGCTAGCCTGGCGAACAGGTGGGTAAATCGTTCTCTCCAGCACCAGGCAGGCCACGGGGTCTCC
GGCGCGACCCTCGTAAAAATTGTCGCTATGATTGAAAACCATCACAGAGAGACGTTCCCGGTGGCCGGCGTG
AATGATTCGACAAGATGAATACACCCCCGGAACATTGGCGTCCGCGAGTGAAAAAAAGCGCCCGAGGAAGC
AATAAGGCACTACAATGCTCAGTCTCAAGTCCAGCAAAGCGATGCCATGCGGATGAAGCACAAAATTCTCAG
GTGCGTACAAAATGTAATTACTCCCCTCCTGCACAGGCAGCAAAGCCCCCGATCCCTCCAGGTACACATACAA
AGCCTCAGCGTCCATAGCTTACCGAGCAGCAGCACACAACAGGCGCAAGAGTCAGAGAAAGGCTGAGCTCTA
ACCTGTCCACCCGCTCTCTGCTCAATATATAGCCCAGATCTACACTGACGTAAAGGCCAAAGTCTAAAAATAC
CCGCCAAATAATCACACACGCCCAGCACACGCCCAGAAACCGGTGACACACTCAAAAAAATACGCGCACTTC
CTCAAACGCCCAAAACTGCCGTCATTTCCGGGTTCCCACGCTACGTCATCAAAACACGACTTTCAAATTCCGT
CGACCGTTAAAAACGTCACCCGCCCCGCCCCTAACGGTCGCCCGTCTCTCAGCCAATCAGCGCCCCGCATCCC
CAAATTCAAACACCTCATTTGCATATTAACGCGCACAAAAAGTTTGAGGTATATTATTGATGATG

ChAdV68-Vazio-E4deletado (SEQ ID NO: 59)

CATCTTCAATAATATACCTCAAACTTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTGAATTTGGGGAGGAA
GGGCGGTGATTGGTCGAGGGATGAGCGACCGTTAGGGGCGGGGCGAGTGACGTTTTGATGACGTGGTTGCGA
GGAGGAGCCAGTTTGCAAGTTCTCGTGGGAAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTTGAACACGGAAATACT
CAATTTTCCCGCGCTCTCTGACAGGAAATGAGGTGTTTCTGGGCGGATGCAAGTGAAAACGGGCCATTTTCGC
GCGAAAACTGAATGAGGAAGTGAAAATCTGAGTAATTTCGCGTTTATGGCAGGGAGGAGTATTTGCCGAGGG
CCGAGTAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTACCGTGTTTTTCACCTAAATTTCCGCGTACGGTGTC
AAAGTCCGGTGTTTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGCCAGGGTATTTAAACCTGCGCTCTCCAGTCAAGAGGC
CACTCTTGAGTGCCAGCGAGAAGAGTTTTCTCCTCCGCGCCGCGAGTCAGATCTACACTTTGAAAGTAGGGata
aGGTAGCGAGTGAGTAGTGTTCTGGGGCGGGGGAGGACCTGCATGAGGGCCAGAATAACTGAAATCTGTGCT
TTTCTGTGTGTTGCAGCAGCATGAGCGGAAGCGGCTCCTTTGAGGGAGGGGTATTCAGCCCTTATCTGACGGG
GCGTCTCCCCTCCTGGGCGGGAGTGCGTCAGAATGTGATGGGATCCACGGTGGACGGCCGGCCCGTGCAGCC
CGCGAACTCTTCAACCCTGACCTATGCAACCCTGAGCTCTTCGTCGTTGGACGCAGCTGCCGCCGCAGCTGCT
GCATCTGCCGCCAGCGCCGTGCGCGGAATGGCCATGGGCGCCGGCTACTACGGCACTCTGGTGGCCAACTCG
AGTTCCACCAATAATCCCGCCAGCCTGAACGAGGAGAAGCTGTTGCTGCTGATGGCCCAGCTCGAGGCCTTG
ACCCAGCGCCTGGGCGAGCTGACCCAGCAGGTGGCTCAGCTGCAGGAGCAGACGCGGGCCGCGGTTGCCACG
GTGAAATCCAAATAAAAAATGAATCAATAAATAAACGGAGACGGTTGTTGATTTTAACACAGAGTCTGAATC
TTTATTTGATTTTTCGCGCGCGGTAGGCCCTGGACCACCGGTCTCGATCATTGAGCACCCGGTGGATCTTTTCC
AGGACCCGGTAGAGGTGGGCTTGGATGTTGAGGTACATGGGCATGAGCCCGTCCCGGGGGTGGAGGTAGCTC
CATTGCAGGGCCTCGTGCTCGGGGGTGGTGTTGTAAATCACCCAGTCATAGCAGGGGCGCAGGGCATGGTGT
TGCACAATATCTTTGAGGAGGAGACTGATGGCCACGGGCAGCCCTTTGGTGTAGGTGTTTACAAATCTGTTGA
GCTGGGAGGGATGCATGCGGGGGGAGATGAGGTGCATCTTGGCCTGGATCTTGAGATTGGCGATGTTACCGC

CCAGATCCCGCCTGGGGTTCATGTTGTGCAGGACCACCAGCACGGTGTATCCGGTGCACTTGGGGAATTTATC
ATGCAACTTGGAAGGGAAGGCGTGAAAGAATTTGGCGACGCCTTTGTGCCCCGCCCAGGTTTTCCATGCACTCA
TCCATGATGATGGCGATGGGCCCGTGGGCGGCGGCCTGGGCAAAGACGTTTCGGGGGTCGGACACATCATAG
TTGTGGTCCTGGGTGAGGTCATCATAGGCCATTTTAATGAATTTGGGGCGGAGGGTGCCGGACTGGGGGACA
AAGGTACCCTCGATCCCGGGGGCGTAGTTCCCCTCACAGATCTGCATCTCCCAGGCTTTGAGCTCGGAGGGGG
GGATCATGTCCACCTGCGGGGCGATAAAGAACACGGTTTCCGGGGCGGGGGAGATGAGCTGGGCCGAAAGC
AAGTTCCGGAGCAGCTGGGACTTGCCGCAGCCGGTGGGGCCGTAGATGACCCCGATGACCGGCTGCAGGTGG
TAGTTGAGGGAGAGACAGCTGCCGTCCTCCCGGAGGAGGGGGGCCACCTCGTTCATCATCTCGCGCACGTGC
ATGTTCTCGCGCACCAGTTCCGCCAGGAGGCGCTCTCCCCCCAGGGATAGGAGCTCCTGGAGCGAGGCGAAG
TTTTTCAGCGGCTTGAGTCCGTCGGCCATGGGCATTTTGGAGAGGGTTTGTTGCAAGAGTTCCAGGCGGTCCC
AGAGCTCGGTGATGTGCTCTACGGCATCTCGATCCAGCAGACCTCCTCGTTTCGCGGGTTGGGACGGCTGCGG
GAGTAGGGCACCAGACGATGGGCGTCCAGCGCAGCCAGGGTCCGGTCCTTCCAGGGTCGCAGCGTCCGCGTC
AGGGTGGTCTCCGTCACGGTGAAGGGGTGCGCGCCGGGCTGGGCGCTTGCGAGGGTGCGCTTCAGGCTCATC
CGGCTGGTCGAAAACCGCTCCCGATCGGCGCCCTGCGCGTCGGCCAGGTAGCAATTGACCATGAGTTCGTAG
TTGAGCGCCTCGGCCGCGTGGCCTTTGGCGCGGAGCTTACCTTTGGAAGTCTGCCCGCAGGCGGGACAGAGG
AGGGACTTGAGGGCGTAGAGCTTGGGGGCGAGGAAGACGGACTCGGGGGCGTAGGCGTCCGCGCCGCAGTG
GGCGCAGACGGTCTCGCACTCCACGAGCCAGGTGAGGTCGGGCTGGTCGGGGTCAAAAACCAGTTTCCCGCC
GTTCTTTTTGATGCGTTTCTTACCTTTGGTCTCCATGAGCTCGTGTCCCCGCTGGGTGACAAAGAGGCTGTCCG
TGTCCCCGTAGACCGACTTTATGGGCCGGTCCTCGAGCGGTGTGCCGCGGTCCTCCTCGTAGAGGAACCCCGC
CCACTCCGAGACGAAAGCCCGGGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCCACGTGGGACGGGTAGCGGTCGTTGT
CCACCAGCGGGTCCACCTTTTCCAGGGTATGCAAACACATGTCCCCCTCGTCCACATCCAGGAAGGTGATTGG
CTTGTAAGTGTAGGCCACGTGACCGGGGGTCCCGGCCGGGGGGGTATAAAAGGGTGCGGGTCCCTGCTCGTC
CTCACTGTCTTCCGGATCGCTGTCCAGGAGCGCCAGCTGTTGGGGTAGGTATTCCCTCTCGAAGGCGGGCATG
ACCTCGGCACTCAGGTTGTCAGTTTCTAGAAACGAGGAGGATTTGATATTGACGGTGCCGGCGGAGATGCCTT
TCAAGAGCCCCTCGTCCATCTGGTCAGAAAAGACGATCTTTTTGTTGTCGAGCTTGGTGGCGAAGGAGCCGTA
GAGGGCGTTGGAGAGGAGCTTGGCGATGGAGCGCATGGTCTGGTTTTTTTCCTTGTCGGCGCGCTCCTTGGCG
GCGATGTTGAGCTGCACGTACTCGCGCGCCACGCACTTCCATTCGGGGAAGACGGTGGTCAGCTCGTCGGGC
ACGATTCTGACCTGCCAGCCCCGATTATGCAGGGTGATGAGGTCCACACTGGTGGCCACCTCGCCGCGCAGG
GGCTCATTAGTCCAGCAGAGGCGTCCGCCCTTGCGCGAGCAGAAGGGGGGCAGGGGGTCCAGCATGACCTCG
TCGGGGGGGTCGGCATCGATGGTGAAGATGCCGGGCAGGAGGTCGGGGTCAAAGTAGCTGATGGAAGTGGC
CAGATCGTCCAGGGCAGCTTGCCATTCGCGCACGGCCAGCGCGCGCTCGTAGGGACTGAGGGGCGTGCCCCA
GGGCATGGGATGGGTAAGCGCGGAGGCGTACATGCCGCAGATGTCGTAGACGTAGAGGGGCTCCTCGAGGA
TGCCGATGTAGGTGGGGTAGCAGCGCCCCCCGCGGATGCTGGCGCGCACGTAGTCATACAGCTCGTGCGAGG
GGGCGAGGAGCCCCGGGCCCAGGTTGGTGCGACTGGGCTTTTCGGCGCGGTAGACGATCTGGCGGAAAATGG
CATGCGAGTTGGAGGAGATGGTGGGCCTTTGGAAGATGTTGAAGTGGGCGTGGGGCAGTCCGACCGAGTCGC
GGATGAAGTGGGCGTAGGAGTCTTGCAGCTTGGCGACGAGCTCGGCGGTGACTAGGACGTCCAGAGCGCAGT
AGTCGAGGGTCTCCTGGATGATGTCATACTTGAGCTGTCCCTTTTGTTTCCACAGCTCGCGGTTGAGAAGGAA
CTCTTCGCGGTCCTTCCAGTACTCTTCGAGGGGGAACCCGTCCTGATCTGCACGGTAAGAGCCTAGCATGTAG
AACTGGTTGACGGCCTTGTAGGCGCAGCAGCCCTTCTCCACGGGGAGGGCGTAGGCCTGGGCGGCCTTGCGC
AGGGAGGTGTGCGTGAGGGCGAAAGTGTCCCTGACCATGACCTTGAGGAACTGGTGCTTGAAGTCGATATCG
TCGCAGCCCCCCTGCTCCCAGAGCTGGAAGTCCGTGCGCTTCTTGTAGGCGGGGTTGGGCAAAGCGAAAGTA
ACATCGTTGAAGAGGATCTTGCCCGCGCGGGGCATAAAGTTGCGAGTGATGCGGAAAGGTTGGGGCACCTCG
GCCCGGTTGTTGATGACCTGGGCGGCGAGCACGATCTCGTCGAAGCCGTTGATGTTGTGGCCCACGATGTAGA
GTTCCACGAATCGCGGACGGCCCTTGACGTGGGGCAGTTTCTTGAGCTCCTCGTAGGTGAGCTCGTCGGGGTC
GCTGAGCCCGTGCTGCTCGAGCGCCCAGTCGGCGAGATGGGGGTTGGCGCGGAGGAAGGAAGTCCAGAGAT
CCACGGCCAGGGCGGTTTGCAGACGGTCCCGGTACTGACGGAACTGCTGCCCGACGGCCATTTTTTCGGGGGT
GACGCAGTAGAAGGTGCGGGGGTCCCCGTGCCAGCGATCCCATTTGAGCTGGAGGGCGAGATCGAGGGCGA
GCTCGACGAGCCGGTCGTCCCCGGAGAGTTTCATGACCAGCATGAAGGGGACGAGCTGCTTGCCGAAGGACC
CCATCCAGGTGTAGGTTTCCACATCGTAGGTGAGGAAGAGCCTTTCGGTGCGAGGATGCGAGCCGATGGGGA
AGAACTGGATCTCCTGCCACCAATTGGAGGAATGGCTGTTGATGTGATGGAAGTAGAAATGCCGACGGCGCG
CCGAACACTCGTGCTTGTGTTTATACAAGCGGCCACAGTGCTCGCAACGCTGCACGGGATGCACGTGCTGCAC
GAGCTGTACCTGAGTTCCTTTGACGAGGAATTTCAGTGGGAAGTGGAGTCGTGGCGCCTGCATCTCGTGCTGT
ACTACGTCGTGGTGGTCGGCCTGGCCCTCTTCTGCCTCGATGGTGGTCATGCTGACGAGCCCCGCGCGGGAGGC
AGGTCCAGACCTCGGCGCGAGCGGGTCGGAGAGCGAGGACGAGGGCGCGCAGGCCGGAGCTGTCCAGGGTC
CTGAGACGCTGCGGAGTCAGGTCAGTGGGCAGCGGCGGCGCGCGGTTGACTTGCAGGAGTTTTTCCAGGGCG
CGCGGGAGGTCCAGATGGTACTTGATCTCCACCGCGCCATTGGTGGCGACGTCGATGGCTTGCAGGGTCCCGT
GCCCCTGGGGTGTGACCACCGTCCCCCGTTTCTTCTTGGGCGGCTGGGGCGACGGGGGCGGTGCCTCTTCCAT
GGTTAGAAGCGGCGGCGAGGACGCGCGCCGGGCGGCAGGGGCGGCTCGGGGCCCGGAGGCAGGGGCGGCA
GGGGCACGTCGGCGCCGCGCGCGGGTAGGTTCTGGTACTGCGCCCGGAGAAGACTGGCGTGAGCGACGACGC
GACGGTTGACGTCCTGGATCTGACGCCTCTGGGTGAAGGCCACGGGACCCGTGAGTTTGAACCTGAAAGAGA
GTTCGACAGAATCAATCTCGGTATCGTTGACGGCGGCCTGCCGCAGGATCTCTTGCACGTCGCCCGAGTTGTC
CTGGTAGGCGATCTCGGTCATGAACTGCTCGATCTCCTCCTCTTGAAGGTCTCCGCGGCCGGCGCGCTCCACG
GTGGCCGCGAGGTCGTTGGAGATGCGGCCCATGAGCTGCGAGAAGGCGTTCATGCCCGCCTCGTTCCAGACG
CGGCTGTAGACCACGACGCCCTCGGGATCGCgGGCGCGCATGACCACCTGGGCGAGGTTGAGCTCCACGTGG
CGCGTGAAGACCGCGTAGTTGCAGAGGCGCTGGTAGAGGTAGTTGAGCGTGGTGGCGATGTGCTCGGTGACG
AAGAAATACATGATCCAGCGGCGGAGCGGCATCTCGCTGACGTCGCCCAGCGCCTCCAAACGTTCCATGGCC

TCGTAAAAGTCCACGGCGAAGTTGAAAAACTGGGAGTTGCGCGCCGAGACGGTCAACTCCTCCTCCAGAAGA
CGGATGAGCTCGGCGATGGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAGGCCCCCGGGAGTTCCTCCACTTCCTCTTCTT
CCTCCTCCACTAACATCTCTTCTACTTCCTCCTCAGGCGGCAGTGGTGGCGGGGGAGGGGGCCTGCGTCGCCG
GCGGCGCACGGGCAGACGGTCGATGAAGCGCTCGATGGTCTCGCCGCGCCGGCGTCGCATGGTCTCGGTGAC
GGCGCGCCCGTCCTCGCGGGGCCGCAGCGTGAAGACGCCGCCGCGCATCTCCAGGTGGCCGGGGGGGTCCCC
GTTGGGCAGGGAGAGGGCGCTGACGATGCATCTTATCAATTGCCCCGTAGGGACTCCGCGCAAGGACCTGAG
CGTCTCGAGATCCACGGGATCTGAAAACCGCTGAACGAAGGCTTCGAGCCAGTCGCAGTCGCAAGGTAGGCT
GAGCACGGTTTCTTCTGGCGGGTCATGTTGGTTGGGAGCGGGGCGGGCGATGCTGCTGGTGATGAAGTTGAA
ATAGGCGGTTCTGAGACGGCGGATGGTGGCGAGGAGCACCAGGTCTTTGGGCCCGGCTTGCTGGATGCGCAG
ACGGTCGGCCATGCCCCAGGCGTGGTCCTGACACCTGGCCAGGTCCTTGTAGTAGTCCTGCATGAGCCGCTCC
ACGGGCACCTCCTCCTCGCCCGCGCGGCCGTGCATGCGCGTGAGCCCGAAGCCGCGCTGGGGCTGGACGAGC
GCCAGGTCGGCGACGACGCGCTCGGCGAGGATGGCTTGCTGGATCTGGGTGAGGGTGGTCTGGAAGTCATCA
AAGTCGACGAAGCGGTGGTAGGCTCCGGTGTTGATGGTGTAGGAGCAGTTGGCCATGACGGACCAGTTGACG
GTCTGGTGGCCCGGACGCACGAGCTCGTGGTACTTGAGGCGCGAGTAGGCGCGCGTGTCGAAGATGTAGTCG
TTGCAGGTGCGCACCAGGTACTGGTAGCCGATGAGGAAGTGCGGCGGCGGCTGGCGGTAGAGCGGCCATCGC
TCGGTGGCGGGGGCGCCGGGCGCGAGGTCCTCGAGCATGGTGCGGTGGTAGCCGTAGATGTACCTGGACATC
CAGGTGATGCCGGCGGCGGTGGTGGAGGCGCGCGGGAACTCGCGGACGCGGTTCCAGATGTTGCGCAGCGGC
AGGAAGTAGTTCATGGTGGGCACGGTCTGGCCCGTGAGGCGCGCGCAGTCGTGGATGCTCTATACGGGCAAA
AACGAAAGCGGTCAGCGGCTCGACTCCGTGGCCTGGAGGCTAAGCGAACGGGTTGGGCTGCGCGTGTACCCC
GGTTCGAATCTCGAATCAGGCTGGAGCCGCAGCTAACGTGGTATTGGCACTCCCGTCTCGACCCAAGCCTGCA
CCAACCCTCCAGGATACGGAGGCGGGTCGTTTTGCAACTTTTTTTTGGAGGCCGGATGAGACTAGTAAGCGCG
GAAAGCGGCCGACCGCGATGGCTCGCTGCCGTAGTCTGGAGAAGAATCGCCAGGGTTGCGTTGCGGTGTGCC
CCGGTTCGAGGCCGGCCGGATTCCGCGGCTAACGAGGGCGTGGCTGCCCCGTCGTTTCCAAGACCCCATAGC
CAGCCGACTTCTCCAGTTACGGAGCGAGCCCCTCTTTTGTTTTGTTTGTTTTTGCCAGATGCATCCCGTACTGC
GGCAGATGCGCCCCCACCACCCTCCACCGCAACAACAGCCCCCTCCACAGCCGGCGCTTCTGCCCCCGCCCCA
GCAGCAACTTCCAGCCACGACCGCCGCGGCCGCCGTGAGCGGGGCTGGACAGAGTTATGATCACCAGCTGGC
CTTGGAAGAGGGCGAGGGGCTGGCGCGCCTGGGGGCGTCGTCGCCGGAGCGGCACCCGCGCGTGCAGATGA
AAAGGGACGCTCGCGAGGCCTACGTGCCCAAGCAGAACCTGTTCAGAGACAGGAGCGGCGAGGAGCCCGAG
GAGATGCGCGCGGCCCGGTTCCACGCGGGGCGGGAGCTGCGGCGCGGCCTGGACCGAAAGAGGGTGCTGAG
GGACGAGGATTTCGAGGCGGACGAGCTGACGGGGATCAGCCCCGCGCGCGCGCACGTGGCCGCGGCCAACC
TGGTCACGGCGTACGAGCAGACCGTGAAGGAGGAGAGCAACTTCCAAAAATCCTTCAACAACCACGTGCGCA
CCCTGATCGCGCGCGAGGAGGTGACCCTGGGCCTGATGCACCTGTGGGACCTGCTGGAGGCCATCGTGCAGA
ACCCCACCAGCAAGCCGCTGACGGCGCAGCTGTTCCTGGTGGTGCAGCATAGTCGGGACAACGAAGCGTTCA
GGGAGGCGCTGCTGAATATCACCGAGCCCGAGGGCCGCTGGCTCCTGGACCTGGTGAACATTCTGCAGAGCA
TCGTGGTGCAGGAGCGCGGGCTGCCGCTGTCCGAGAAGCTGGCGGCCATCAACTTCTCGGTGCTGAGTTTGG
GCAAGTACTACGCTAGGAAGATCTACAAGACCCCGTACGTGCCCATAGACAAGGAGGTGAAGATCGACGGGT
TTTACATGCGCATGACCCTGAAAGTGCTGACCCTGAGCGACGATCTGGGGGTGTACCGCAACGACAGGATGC
ACCGTGCGGTGAGCGCCAGCAGGCGGCGCGAGCTGAGCGACCAGGAGCTGATGCATAGTCTGCAGCGGGCC
CTGACCGGGGCCGGGACCGAGGGGGAGAGCTACTTTGACATGGGCGCGGACCTGCACTGGCAGCCCAGCCGC
CGGGCCTTGGAGGCGGCGGCAGGACCCTACGTAGAAGAGGTGGACGATGAGGTGGACGAGGAGGGCGAGTA
CCTGGAAGACTGATGGCGCGACCGTATTTTTGCTAGATGCAACAACAACAGCCACCTCCTGATCCCGCGATGC
GGGCGGCGCTGCAGAGCCAGCCGTCCGGCATTAACTCCTCGGACGATTGGACCCAGGCCATGCAACGCATCA
TGGCGCTGACGACCCGCAACCCCGAAGCCTTTAGACAGCAGCCCCAGGCCAACCGGCTCTCGGCCATCCTGG
AGGCCGTGGTGCCCTCGCGCTCCAACCCCACGCACGAGAAGGTCCTGGCCATCGTGAACGCGCTGGTGGAGA
ACAAGGCCATCCGCGGCGACGAGGCCGGCCTGGTGTACAACGCGCTGCTGGAGCGCGTGGCCCGCTACAACA
GCACCAACGTGCAGACCAACCTGGACCGCATGGTGACCGACGTGCGCGAGGCCGTGGCCCAGCGCGAGCGGT
TCCACCGCGAGTCCAACCTGGGATCCATGGTGGCGCTGAACGCCTTCCTCAGCACCCAGCCCGCCAACGTGCC
CCGGGGCCAGGAGGACTACACCAACTTCATCAGCGCCCTGCGCCTGATGGTGACCGAGGTGCCCCAGAGCGA
GGTGTACCAGTCCGGGCCGGACTACTTCTTCCAGACCAGTCGCCAGGGCTTGCAGACCGTGAACCTGAGCCA
GGCTTTCAAGAACTTGCAGGGCCTGTGGGGCGTGCAGGCCCCGGTCGGGGACCGCGCGACGGTGTCGAGCCT
GCTGACGCCGAACTCGCGCCTGCTGCTGCTGCTGGTGGCCCCCTTCACGGACAGCGGCAGCATCAACCGCAA
CTCGTACCTGGGCTACCTGATTAACCTGTACCGCGAGGCCATCGGCCAGGCGCACGTGGACGAGCAGACCTA
CCAGGAGATCACCCACGTGAGCCGCGCCCTGGGCCAGGACGACCCGGGCAACCTGGAAGCCACCCTGAACTT
TTTGCTGACCAACCGGTCGCAGAAGATCCCGCCCCAGTACGCGCTCAGCACCGAGGAGGAGCGCATCCTGCG
TTACGTGCAGCAGAGCGTGGGCCTGTTCCTGATGCAGGAGGGGGCCACCCCCAGCGCCGCTCGACATGAC
CGCGCGCAACATGGAGCCCAGCATGTACGCCAGCAACCGCCCGTTCATCAATAAACTGATGGACTACTTGCA
TCGGGCGGCCGCCATGAACTCTGACTATTTCACCAACGCCATCCTGAATCCCCACTGGCTCCCGCCGCCGGGG
TTCTACACGGGCGAGTACGACATGCCCGACCCCAATGACGGGTTCCTGTGGGACGATGTGGACAGCAGCGTG
TTCTCCCCCCGACCGGGTGCTAACGAGCGCCCCTTGTGGAAGAAGGAAGGCAGCGACCGACGCCCGTCCTCG
GCGCTGTCCGGCCGCGAGGGTGCTGCCGCGGCGGTGCCCGAGGCCGCCAGTCCTTTCCCGAGCTTGCCCTTCT
CGCTGAACAGTATCCGCAGCAGCGAGCTGGGCAGGATCACGCGCCCGCGCTTGCTGGGCGAAGAGGAGTACT
TGAATGACTCGCTGTTGAGACCCGAGCGGGAGAAGAACTTCCCCAATAACGGGATAGAAAGCCTGGTGGACA
AGATGAGCCGCTGGAAGACGTATGCGCAGGAGCACAGGGACGATCCCCGGGCGTCGCAGGGGGCCACGAGC
CGGGGCAGCGCCGCCCGTAAACGCCGGTGGCACGACAGGCAGCGGGGACAGATGTGGGACGATGAGGACTC
CGCCGACGACAGCAGCGTGTTGGACTTGGGTGGGAGTGGTAACCCGTTCGCTCACCTGCGCCCCCCGTATCGG
GCGCATGATGTAAGAGAAACCGAAAATAAATGATACTCACCAAGGCCATGGCGACCAGCGTGCGTTCGTTTC

TTCTCTGTTGTTGTTGTATCTAGTATGATGAGGCGTGCGTACCCGGAGGGTCCTCCTCCCTCGTACGAGAGCGT
GATGCAGCAGGCGATGGCGGCGGCGGCGATGCAGCCCCCGCTGGAGGCTCCTTACGTGCCCCCGCGGTACCT
GGCGCCTACGGAGGGGCGGAACAGCATTCGTTACTCGGAGCTGGCACCCTTGTACGATACCACCCGGTTGTA
CCTGGTGGACAACAAGTCGGCGGACATCGCCTCGCTGAACTACCAGAACGACCACAGCAACTTCCTGACCAC
CGTGGTGCAGAACAATGACTTCACCCCCACGGAGGCCAGCACCCAGACCATCAACTTTGACGAGCGCTCGCG
GTGGGGCGGCCAGCTGAAAACCATCATGCACACCAACATGCCCAACGTGAACGAGTTCATGTACAGCAACAA
GTTCAAGGCGCGGGTGATGGTCTCCCGCAAGACCCCCAATGGGGTGACAGTGACAGAGGATTATGATGGTAG
TCAGGATGAGCTGAAGTATGAATGGGTGGAATTTGAGCTGCCCGAAGGCAACTTCTCGGTGACCATGACCAT
CGACCTGATGAACAACGCCATCATCGACAATTACTTGGCGGTGGGGCGGCAGAACGGGGTGCTGGAGAGCGA
CATCGGCGTGAAGTTCGACACTAGGAACTTCAGGCTGGGCTGGGACCCCGTGACCGAGCTGGTCATGCCCGG
GGTGTACACCAACGAGGCTTTCCATCCCGATATTGTCTTGCTGCCCGGCTGCGGGGTGGACTTCACCGAGAGC
CGCCTCAGCAACCTGCTGGGCATTCGCAAGAGGCAGCCCTTCCAGGAAGGCTTCCAGATCATGTACGAGGAT
CTGGAGGGGGGCAACATCCCCGCGCTCCTGGATGTCGACGCCTATGAGAAAAGCAAGGAGGATGCAGCAGCT
GAAGCAACTGCAGCCGTAGCTACCGCCTCTACCGAGGTCAGGGGCGATAATTTTGCAAGCGCCGCAGCAGTG
GCAGCGGCCGAGGCGGCTGAAACCGAAAGTAAGATAGTCATTCAGCCGGTGGAGAAGGATAGCAAGAACAG
GAGCTACAACGTACTACCGGACAAGATAAACACCGCCTACCGCAGCTGGTACCTAGCCTACAACTATGGCGA
CCCCGAGAAGGGCGTGCGCTCCTGGACGCTGCTCACCACCTCGGACGTCACCTGCGGCGTGGAGCAAGTCTA
CTGGTCGCTGCCCGACATGATGCAAGACCCGGTCACCTTCCGCTCCACGCGTCAAGTTAGCAACTACCCGGTG
GTGGGCGCCGAGCTCCTGCCCGTCTACTCCAAGAGCTTCTTCAACGAGCAGGCCGTCTACTCGCAGCAGCTGC
GCGCCTTCACCTCGCTTACGCACGTCTTCAACCGCTTCCCCGAGAACCAGATCCTCGTCCGCCCGCCCGCGCC
CACCATTACCACCGTCAGTGAAAACGTTCCTGCTCTCACAGATCACGGGACCCTGCCGCTGCGCAGCAGTATC
CGGGGAGTCCAGCGCGTGACCGTTACTGACGCCAGACGCCGCACCTGCCCCTACGTCTACAAGGCCCTGGGC
ATAGTCGCGCCGCGCGTCCTCTCGAGCCGCACCTTCTAAATGTCCATTCTCATCTCGCCCAGTAATAACACCG
GTTGGGGCCTGCGCGCGCCCAGCAAGATGTACGGAGGCGCTCGCCAACGCTCCACGCAACACCCCGTGCGCG
TGCGCGGGCACTTCCGCGCTCCCTGGGGCGCCCTCAAGGGCCGCGTGCGGTCGCGCACCACCGTCGACGACG
TGATCGACCAGGTGGTGGCCGACGCGCGCAACTACACCCCCGCCGCCGCGCCCGTCTCCACCGTGGACGCCG
TCATCGACAGCGTGGTGGCcGACGCGCGCCGGTACGCCCGCGCCAAGAGCCGGCGGCGGCGCATCGCCCGGC
GGCACCGGAGCACCCCCGCCATGCGCGCGGCGCGAGCCTTGCTGCGCAGGGCCAGGCGCACGGGACGCAGG
GCCATGCTCAGGGCGGCCAGACGCGCGGCTTCAGGCGCCAGCGCCGGCAGGACCCGGAGACGCGCGGCCAC
GGCGGCGGCAGCGGCCATCGCCAGCATGTCCCGCCCGCGGCGAGGGAACGTGTACTGGGTGCGCGACGCCGC
CACCGGTGTGCGCGTGCCCGTGCGCACCCGCCCCCCTCGCACTTGAAGATGTTCACTTCGCGATGTTGATGTG
TCCCAGCGGCGAGGAGGATGTCCAAGCGCAAATTCAAGGAAGAGATGCTCCAGGTCATCGCGCCTGAGATCT
ACGGCCCTGCGGTGGTGAAGGAGGAAAGAAAGCCCCGCAAAATCAAGCGGGTCAAAAAGGACAAAAAGGA
AGAAGAAAGTGATGTGGACGGATTGGTGGAGTTTGTGCGCGAGTTCGCCCCCCGGCGGCGCGTGCAGTGGCG
CGGGCGGAAGGTGCAACCGGTGCTGAGACCCGGCACCACCGTGGTCTTCACGCCCGGCGAGCGCTCCGGCAC
CGCTTCCAAGCGCTCCTACGACGAGGTGTACGGGGATGATGATATTCTGGAGCAGGCGGCCGAGCGCCTGGG
CGAGTTTGCTTACGGCAAGCGCAGCCGTTCCGCACCGAAGGAAGAGGCGGTGTCCATCCCGCTGGACCACGG
CAACCCCACGCCGAGCCTCAAGCCCGTGACCTTGCAGCAGGTGCTGCCGACCGCGGCGCCGCGCCGGGGTT
CAAGCGCGAGGGCGAGGATCTGTACCCCACCATGCAGCTGATGGTGCCCAAGCGCCAGAAGCTGGAAGACGT
GCTGGAGACCATGAAGGTGGACCCGGACGTGCAGCCCGAGGTCAAGGTGCGGCCCATCAAGCAGGTGGCCC
CGGGCCTGGGCGTGCAGACCGTGGACATCAAGATTCCCACGGAGCCCATGGAAACGCAGACCGAGCCCATGA
TCAAGCCCAGCACCAGCACCATGGAGGTGCAGACGGATCCCTGGATGCCATCGGCTCCTAGTCGAAGACCCC
GGCGCAAGTACGGCGCGGCCAGCCTGCTGATGCCCAACTACGCGCTGCATCCTTCCATCATCCCCACGCCGGG
CTACCGCGGCACGCGCTTCTACCGCGGTCATACCAGCAGCCGCCGCCGCAAGACCACCACTCGCCGCCGCCG
TCGCCGCACCGCCGCTGCAACCACCCCTGCCGCCCTGGTGCGGAGAGTGTACCGCCGCGGCCGCGCACCTCTG
ACCCTGCCGCGCGCGCGCTACCACCCGAGCATCGCCATTTAAACTTTCGCCtGCTTTGCAGATCAATGGCCCTC
ACATGCCGCCTTCGCGTTCCCATTACGGGCTACCGAGGAAGAAAACCGCGCCGTAGAAGGCTGGCGGGGAAC
GGGATGCGTCGCCACCACCACCGGCGGCGGCGCGCCATCAGCAAGCGGTTGGGGGGAGGCTTCCTGCCCGCG
CTGATCCCCATCATCGCCGCGGCGATCGGGGCGATCCCCGGCATTGCTTCCGTGGCGGTGCAGGCCTCTCAGC
GCCACTGAGACACACTTGGAAACATCTTGTAATAAACCaATGGACTCTGACGCTCCTGGTCCTGTGATGTGTTT
TCGTAGACAGATGGAAGACATCAATTTTTCGTCCCTGGCTCCGCGACACGGCACGCGGCCGTTCATGGGCACC
TGGAGCGACATCGGCACCAGCCAACTGAACGGGGGCGCCTTCAATTGGAGCAGTCTCTGGAGCGGGCTTAAG
AATTTCGGGTCCACGCTTAAAACCTATGGCAGCAAGGCGTGGAACAGCACCACAGGGCAGGCGCTGAGGGAT
AAGCTGAAAGAGCAGAACTTCCAGCAGAAGGTGGTCGATGGGCTCGCCTCGGGCATCAACGGGGTGGTGGA
CCTGGCCAACCAGGCCGTGCAGCGGCAGATCAACAGCCGCCTGGACCCGGTGCCGCCCGCCGGCTCCGTGGA
GATGCCGCAGGTGGAGGAGGAGCTGCCTCCCCTGGACAAGCGGGGCGAGAAGCGACCCCGCCCCGATGCGG
AGGAGACGCTGCTGACGCACACGGACGAGCCGCCCCCGTACGAGGAGGCGGTGAAACTGGGTCTGCCCACC
ACGCGGCCCATCGCGCCCCTGGCCACCGGGGTGCTGAAACCCGAAAAGCCCGCGACCCTGGACTTGCCTCCT
CCCCAGCCTTCCCGCCCCTCTACAGTGGCTAAGCCCCTGCCGCCGGTGGCCGTGGCCCGCGCGCGACCCGGGG
GCACCGCCCGCCCTCATGCGAACTGGCAGAGCACTCTGAACAGCATCGTGGGTCTGGGAGTGCAGAGTGTGA
AGCGCCGCCGCTGCTATTAAACCTACCGTAGCGCTTAACTTGCTTGTCTGTGTGTGTATGTATTATGTCGCCGC
CGCCGCTGTCCACCAGAAGGAGGAGTGAAGAGGCGCGTCGCCGAGTTGCAAGATGGCCACCCCATCGATGCT
GCCCCAGTGGGCGTACATGCACATCGCCGGACAGGACGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTGGTGCAGTT
TGCCCGCGCCACAGACACCTACTTCAGTCTGGGGAACAAGTTTAGGAACCCCACGGTGGCGCCCACGCACGA
TGTGACCACCGACCGCAGCCAGCGGCTGACGCTGCGCTTCGTGCCCGTGGACCGCGAGGACAACACCTACTC
GTACAAAGTGCGCTACACGCTGGCCGTGGGCGACAACCGCGTGCTGGACATGGCCAGCACCTACTTTGACAT

CCGCGGCGTGCTGGATCGGGGCCCTAGCTTCAAACCCTACTCCGGCACCGCCTACAACAGTCTGGCCCCCAAG
GGAGCACCCAACACTTGTCAGTGGACATATAAAGCCGATGGTGAAACTGCCACAGAAAAAACCTATACATAT
GGAAATGCACCCGTGCAGGGCATTAACATCACAAAAGATGGTATTCAACTTGGAACTGACACCGATGATCAG
CCAATCTACGCAGATAAAACCTATCAGCCTGAACCTCAAGTGGGTGATGCTGAATGGCATGACATCACTGGT
ACTGATGAAAAGTATGGAGGCAGAGCTCTTAAGCCTGATACCAAAATGAAGCCTTGTTATGGTTCTTTTGCCA
AGCCTACTAATAAAGAAGGAGGTCAGGCAAATGTGAAAACAGGAACAGGCACTACTAAAGAATATGACATA
GACATGGCTTTCTTTGACAACAGAAGTGCGGCTGCTGCTGGCCTAGCTCCAGAAATTGTTTTGTATACTGAAA
ATGTGGATTTGGAAACTCCAGATACCCATATTGTATACAAAGCAGGCACAGATGACAGCAGCTCTTCTATTAA
TTTGGGTCAGCAAGCCATGCCCAACAGACCTAACTACATTGGTTTCAGAGACAACTTTATCGGGCTCATGTAC
TACAACAGCACTGGCAATATGGGGGTGCTGGCCGGTCAGGCTTCTCAGCTGAATGCTGTGGTTGACTTGCAAG
ACAGAAACACCGAGCTGTCCTACCAGCTCTTGCTTGACTCTCTGGGTGACAGAACCCGGTATTTCAGTATGTG
GAATCAGGCGGTGGACAGCTATGATCCTGATGTGCGCATTATTGAAAATCATGGTGTGGAGGATGAACTTCC
CAACTATTGTTTCCCTCTGGATGCTGTTGGCAGAACAGATACTTATCAGGGAATTAAGGCTAATGGAACTGAT
CAAACCACATGGACCAAAGATGACAGTGTCAATGATGCTAATGAGATAGGCAAGGGTAATCCATTCGCCATG
GAAATCAACATCCAAGCCAACCTGTGGAGGAACTTCCTCTACGCCAACGTGGCCCTGTACCTGCCCGACTCTT
ACAAGTACACGCCGGCCAATGTTACCCTGCCCACCAACACCAACACCTACGATTACATGAACGGCCGGGTGG
TGGCGCCCTCGCTGGTGGACTCCTACATCAACATCGGGGCGCGCTGGTCGCTGGATCCCATGGACAACGTGA
ACCCCTTCAACCACCACCGCAATGCGGGGCTGCGCTACCGCTCCATGCTCCTGGGCAACGGGCGCTACGTGCC
CTTCCACATCCAGGTGCCCCAGAAATTTTTCGCCATCAAGAGCCTCCTGCTCCTGCCCGGGTCCTACACCTAC
GAGTGGAACTTCCGCAAGGACGTCAACATGATCCTGCAGAGCTCCCTCGGCAACGACCTGCGCACGGACGGG
GCCTCCATCTCCTTCACCAGCATCAACCTCTACGCCACCTTCTTCCCCATGGCGCACAACACGGCCTCCACGCT
CGAGGCCATGCTGCGCAACGACACCAACGACCAGTCCTTCAACGACTACCTCTCGGCGGCCAACATGCTCTA
CCCCATCCCGGCCAACGCCACCAACGTGCCCATCTCCATCCCCTCGCGCAACTGGGCCGCCTTCCGCGGCTGG
TCCTTCACGCGTCTCAAGACCAAGGAGACGCCCTCGCTGGGCTCCGGGTTCGACCCCTACTTCGTCTACTCGG
GCTCCATCCCCTACCTCGACGGCACCTTCTACCTCAACCACACCTTCAAGAAGGTCTCCATCACCTTCGACTCC
TCCGTCAGCTGGCCCGGCAACGACCGGCTCCTGACGCCCAACGAGTTCGAAATCAAGCGCACCGTCGACGGC
GAGGGCTACAACGTGGCCCAGTGCAACATGACCAAGGACTGGTTCCTGGTCCAGATGCTGGCCCACTACAAC
ATCGGCTACCAGGGCTTCTACGTGCCCGAGGGCTACAAGGACCGCATGTACTCCTTCTTCCGCAACTTCCAGC
CCATGAGCCGCCAGGTGGTGGACGAGGTCAACTACAAGGACTACCAGGCCGTCACCCTGGCCTACCAGCACA
ACAACTCGGGCTTCGTCGGCTACCTCGCGCCCACCATGCGCCAGGGCCAGCCCTACCCCGCCAACTACCCCTA
CCCGCTCATCGGCAAGAGCGCCGTCACCAGCGTCACCCAGAAAAAGTTCCTCTGCGACAGGGTCATGTGGCG
CATCCCCTTCTCCAGCAACTTCATGTCCATGGGCGCGCTCACCGACCTCGGCCAGAACATGCTCTATGCCAAC
TCCGCCCACGCGCTAGACATGAATTTCGAAGTCGACCCCATGGATGAGTCCACCCTTCTCTATGTTGTCTTCG
AAGTCTTCGACGTCGTCCGAGTGCACCAGCCCCACCGCGGCGTCATCGAGGCCGTCTACCTGCGCACCCCCTT
CTCGGCCGGTAACGCCACCACCTAAGCTCTTGCTTCTTGCAAGCCATGGCCGCGGGCTCCGGCGAGCAGGAG
CTCAGGGCCATCATCCGCGACCTGGGCTGCGGGCCCTACTTCCTGGGCACCTTCGATAAGCGCTTCCCGGGAT
TCATGGCCCCGCACAAGCTGGCCTGCGCCATCGTCAACACGGCCGGCCGCGAGACCGGGGGCGAGCACTGGC
TGGCCTTCGCCTGGAACCCGCGCTCGAACACCTGCTACCTCTTCGACCCCTTCGGGTTCTCGGACGAGCGCCT
CAAGCAGATCTACCAGTTCGAGTACGAGGGCCTGCTGCGCCGCAGCGCCCTGGCCACCGAGGACCGCTGCGT
CACCCTGGAAAAGTCCACCCAGACCGTGCAGGGTCCGCGCTCGGCCGCCTGCGGGCTCTTCTGCTGCATGTTC
CTGCACGCCTTCGTGCACTGGCCCGACCGCCCCATGGACAAGAACCCCACCATGAACTTGCTGACGGGGGTG
CCCAACGGCATGCTCCAGTCGCCCCAGGTGGAACCCACCCTGCGCCGCAACCAGGAGGCGCTCTACCGCTTC
CTCAACTCCCACTCCGCCTACTTTCGCTCCCACCGCGCGCGCATCGAGAAGGCCACCGCCTTCGACCGCATGA
ATCAAGACATGTAAACCGTGTGTGTATGTTAAATGTCTTTAATAAACAGCACTTTCATGTTACACATGCATCT
GAGATGATTTATTTAGAAATCGAAAGGGTTCTGCCGGGTCTCGGCATGGCCCGCGGGCAGGGACACGTTGCG
GAACTGGTACTTGGCCAGCCACTTGAACTCGGGGATCAGCAGTTTGGGCAGCGGGGTGTCGGGGAAGGAGTC
GGTCCACAGCTTCCGCGTCAGTTGCAGGGCGCCCAGCAGGTCGGGCGCGGAGATCTTGAAATCGCAGTTGGG
ACCCGCGTTCTGCGCGCGGGAGTTGCGGTACACGGGGTTGCAGCACTGGAACACCATCAGGGCCGGGTGCTT
CACGCTCGCCAGCACCGTCGCGTCGGTGATGCTCTCCACGTCGAGGTCCTCGGCGTTGGCCATCCCGAAGGGG
GTCATCTTGCAGGTCTGCCTTCCCATGGTGGGCACGCACCCGGGCTTGTGGTTGCAATCGCAGTGCAGGGGGA
TCAGCATCATCTGGGCCTGGTCGGCGTTCATCCCCGGGTACATGGCCTTCATGAAAGCCTCCAATTGCCTGAA
CGCCTGCTGGGCCTTGGCTCCCTCGGTGAAGAAGACCCCGCAGGACTTGCTAGAGAACTGGTTGGTGGCGCA
CCCGGCGTCGTGCACGCAGCAGCGCGCGTCGTTGTTGGCCAGCTGCACCACGCTGCGCCCCCAGCGGTTCTGG
GTGATCTTGGCCCGGTCGGGGTTCTCCTTCAGCGCGCGCTGCCCGTTCTCGCTCGCCACATCCATCTCGATCAT
GTGCTCCTTCTGGATCATGGTGGTCCCGTGCAGGCACCGCAGCTTGCCCTCGGCCTCGGTGCACCCGTGCAGC
CACAGCGCGCACCCGGTGCACTCCCAGTTCTTGTGGGCGATCTGGGAATGCGCGTGCACGAAGCCCTGCAGG
AAGCGGCCCATCATGGTGGTCAGGGTCTTGTTGCTAGTGAAGGTCAGCGGAATGCCGCGGTGCTCCTCGTTGA
TGTACAGGTGGCAGATGCGGCGGTACACCTCGCCCTGCTCGGGCATCAGCTGGAAGTTGGCTTTCAGGTCGGT
CTCCACGCGGTAGCGGTCCATCAGCATAGTCATGATTTCCATACCCTTCTCCCAGGCCGAGACGATGGGCAGG
CTCATAGGGTTCTTCACCATCATCTTAGCGCTAGCAGCCGCGGCCAGGGGGTCGCTCTCGTCCAGGGTCTCAA
AGCTCCGCTTGCCGTCCTTCTCGGTGATCCGCACCGGGGGGGTAGCTGAAGCCCACGGCCGCCAGCTCCTCCTC
GGCCTGTCTTTCGTCCTCGCTGTCCTGGCTGACGTCCTGCAGGACCACATGCTTGGTCTTGCGGGGTTTCTTCT
TGGGCGGCAGCGGCGGCGGAGATGTTGGAGATGGCGAGGGGGAGCGCGAGTTCTCGCTCACCACTACTATCT
CTTCCTCTTCTTGGTCCGAGGCCACGCGGCGGTAGGTATGTCTCTTCGGGGGCAGAGGCGGAGGCGACGGGCT
CTCGCCGCCGCGACTTGGCGGATGGCTGGCAGAGCCCCTTCCGCGTTCGGGGGTGCGCTCCCGGCGGCGCTCT
GACTGACTTCCTCCGCGGCCGGCCATTGTGTTCTCCTAGGGAGGAACAACAAGCATGGAGACTCAGCCATCG

CCAACCTCGCCATCTGCCCCCACCGCCGACGAGAAGCAGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAACCGCCCCGCCG
CCCAGCCCCGCCACCTCCGACGCGGCCGTCCCAGACATGCAAGAGATGGAGGAATCCATCGAGATTGACCTG
GGCTATGTGACGCCCGCGGAGCACGAGGAGGAGCTGGCAGTGCGCTTTTCACAAGAAGAGATACACCAAGA
ACAGCCAGAGCAGGAAGCAGAGAATGAGCAGAGTCAGGCTGGGCTCGAGCATGACGGCGACTACCTCCACC
TGAGCGGGGGGGAGGACGCGCTCATCAAGCATCTGGCCCGGCAGGCCACCATCGTCAAGGATGCGCTGCTCG
ACCGCACCGAGGTGCCCCTCAGCGTGGAGGAGCTCAGCCGCGCCTACGAGTTGAACCTCTTCTCGCCGCGCGT
GCCCCCCAAGCGCCAGCCCAATGGCACCTGCGAGCCCAACCCGCGCCTCAACTTCTACCCGGTCTTCGCGGTG
CCCGAGGCCCTGGCCACCTACCACATCTTTTTCAAGAACCAAAAGATCCCCGTCTCCTGCCGCGCCAACCGCA
CCCGCGCCGACGCCCTTTTCAACCTGGGTCCCGGCGCCCGCCTACCTGATATCGCCTCCTTGGAAGAGGTTCC
CAAGATCTTCGAGGGTCTGGGCAGCGACGAGACTCGGGCCGCGAACGCTCTGCAAGGAGAAGGAGGAGAGC
ATGAGCACCACAGCGCCCTGGTCGAGTTGGAAGGCGACAACGCGCGGCTGGCGGTGCTCAAACGCACGGTCG
AGCTGACCCATTTCGCCTACCCGGCTCTGAACCTGCCCCCCAAAGTCATGAGCGCGGTCATGGACCAGGTGCT
CATCAAGCGCGCGTCGCCCATCTCCGAGGACGAGGGCATGCAAGACTCCGAGGAGGGCAAGCCCGTGGTCAG
CGACGAGCAGCTGGCCCGGTGGCTGGGTCCTAATGCTAGTCCCCAGAGTTTGGAAGAGCGGCGCAAACTCAT
GATGGCCGTGGTCCTGGTGACCGTGGAGCTGGAGTGCCTGCGCCGCTTCTTCGCCGACGCGGAGACCCTGCGC
AAGGTCGAGGAGAACCTGCACTACCTCTTCAGGCACGGGTTCGTGCGCCAGGCCTGCAAGATCTCCAACGTG
GAGCTGACCAACCTGGTCTCCTACATGGGCATCTTGCACGAGAACCGCCTGGGGCAGAACGTGCTGCACACC
ACCCTGCGCGGGGAGGCCCGGCGCGACTACATCCGCGACTGCGTCTACCTCTACCTCTGCCACACCTGGCAGA
CGGGCATGGGCGTGTGGCAGCAGTGTCTGGAGGAGCAGAACCTGAAAGAGCTCTGCAAGCTCCTGCAGAAG
AACCTCAAGGGTCTGTGGACCGGGTTCGACGAGCGCACCACCGCCTCGGACCTGGCCGACCTCATTTTCCCCG
AGCGCCTCAGGCTGACGCTGCGCAACGGCCTGCCCGACTTTATGAGCCAAAGCATGTTGCAAAACTTTCGCTC
TTTCATCCTCGAACGCTCCGGAATCCTGCCCGCCACCTGCTCCGCGCTGCCCTCGGACTTCGTGCCGCTGACCT
TCCGCGAGTGCCCCCCGCCGCTGTGGAGCCACTGCTACCTGCTGCGCCTGGCCAACTACCTGGCCTACCACTC
GGACGTGATCGAGGACGTCAGCGGCGAGGGCCTGCTCGAGTGCCACTGCCGCTGCAACCTCTGCACGCCGCA
CCGCTCCCTGGCCTGCAACCCCCAGCTGCTGAGCGAGACCCAGATCATCGGCACCTTCGAGTTGCAAGGGCCC
AGCGAAGGCGAGGGTTCAGCCGCCAAGGGGGGTCTGAAACTCACCCCGGGGCTGTGGACCTCGGCCTACTTG
CGCAAGTTCGTGCCCGAGGACTACCATCCCTTCGAGATCAGGTTCTACGAGGACCAATCCCATCCGCCCAAGG
CCGAGCTGTCGGCCTGCGTCATCACCCAGGGGGGCGATCCTGGCCCAATTGCAAGCCATCCAGAAATCCCGCC
AAGAATTCTTGCTGAAAAAGGGCCGCGGGGTCTACCTCGACCCCCAGACCGGTGAGGAGCTCAACCCCGGCT
TCCCCCAGGATGCCCCGAGGAAACAAGAAGCTGAAAGTGGAGCTGCCGCCCGTGGAGGATTTGGAGGAAGA
CTGGGAGAACAGCAGTCAGGCAGAGGAGGAGGAGATGGAGGAAGACTGGGACAGCACTCAGGCAGAGGAG
GACAGCCTGCAAGACAGTCTGGAGGAAGACGAGGAGGAGGCAGAGGAGGAGGTGGAAGAAGCAGCCGCCG
CCAGACCGTCGTCCTCGGCGGGGGAGAAAGCAAGCAGCACGGATACCATCTCCGCTCCGGGTCGGGGTCCCG
CTCGACCACACAGTAGATGGGACGAGACCGGACGATTCCCGAACCCCACCACCCAGACCGGTAAGAAGGAG
CGGCAGGGATACAAGTCCTGGCGGGGGCACAAAAACGCCATCGTCTCCTGCTTGCAGGCCTGCGGGGGCAAC
ATCTCCTTCACCCGGCGCTACCTGCTCTTCCACCGCGGGGTGAACTTTCCCCGCAACATCTTGCATTACTACCG
TCACCTCCACAGCCCCTACTACTTCCAAGAAGAGGCAGCAGCAGCAGAAAAAGACCAGCAGAAAACCAGCA
GCTAGAAAATCCACAGCGGCGGCAGCAGGTGGACTGAGGATCGCGGCGAACGAGCCGGCGCAAACCCGGGA
GCTGAGGAACCGGATCTTTCCCACCCTCTATGCCATCTTCCAGCAGAGTCGGGGGCAGGAGCAGGAACTGAA
AGTCAAGAACCGTTCTCTGCGCTCGCTCACCCGCAGTTGTCTGTATCACAAGAGCGAAGACCAACTTCAGCGC
ACTCTCGAGGACGCCGAGGCTCTCTTCAACAAGTACTGCGCGCTCACTCTTAAAGAGTAGCCCGCGCCCGCCC
AGTCGCAGAAAAAGGCGGGAATTACGTCACCTGTGCCCTTCGCCCTAGCCGCCTCCACCCATCATCATGAGCA
AAGAGATTCCCACGCCTTACATGTGGAGCTACCAGCCCCAGATGGGCCTGGCCGCCGGTGCCGCCCAGGACT
ACTCCACCCGCATGAATTGGCTCAGCGCCGGGCCCGCGATGATCTCACGGGTGAATGACATCCGCGCCCACC
GAAACCAGATACTCCTAGAACAGTCAGCGCTCACCGCCACGCCCCGCAATCACCTCAATCCGCGTAATTGGC
CCGCCGCCCTGGTGTACCAGGAAATTCCCCAGCCCACGACCGTACTACTTCCGCGAGACGCCCAGGCCGAAG
TCCAGCTGACTAACTCAGGTGTCCAGCTGGCGGGCGGCGCCACCCTGTGTCGTCACCGCCCCGCTCAGGGTAT
AAAGCGGCTGGTGATCCGGGGCAGAGGCACACAGCTCAACGACGAGGTGGTGAGCTCTTCGCTGGGTCTGCG
ACCTGACGGAGTCTTCCAACTCGCCGGATCGGGGAGATCTTCCTTCACGCCTCGTCAGGCCGTCCTGACTTTG
GAGAGTTCGTCCTCGCAGCCCCGCTCGGGTGGCATCGGCACTCTCCAGTTCGTGGAGGAGTTCACTCCCTCGG
TCTACTTCAACCCCTTCTCCGGCTCCCCCGGCCACTACCCGGACGAGTTCATCCCGAACTTCGACGCCATCAG
CGAGTCGGTGGACGGCTACGATTGAAACTAATCACCCCCTTATCCAGTGAAATAAAGATCATATTGATGATG
ATTTTACAGAAATAAAAAATAATCATTTGATTTGAAATAAAGATACAATCATATTGATGATTTGAGTTTAACA
AAAAAATAAAGAATCACTTACTTGAAATCTGATACCAGGTCTCTGTCCATGTTTTCTGCCAACACCACTTCAC
TCCCCTCTTCCCAGCTCTGGTACTGCAGGCCCCGGCGGGCTGCAAACTTCCTCCACACGCTGAAGGGGATGTC
AAATTCCTCCTGTCCCTCAATCTTCATTTTATCTTCTATCAGATGTCCAAAAAGCGCGTCCGGGTGGATGATGA
CTTCGACCCCGTCTACCCCTACGATGCAGACAACGCACCGACCGTGCCCTTCATCAACCCCCCCTTCGTCTCTT
CAGATGGATTCCAAGAGAAGCCCCTGGGGGTGTTGTCCCTGCGACTGGCCGACCCCGTCACCACCAAGAACG
GGGAAATCACCCTCAAGCTGGGAGAGGGGGTGGACCTCGATTCCTCGGGAAAACTCATCTCCAACACGGCCA
CCAAGGCCGCCGCCCCTCTCAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCCTTAACATGGATCACCCCTTTTACACTAAA
GATGGAAAATTATCCTTACAAGTTTCTCCACCATTAAATATACTGAGAACAAGCATTCTAAACACACTAGCTT
TAGGTTTTGGATCAGGTTTAGGACTCCGTGGCTCTGCCTTGGCAGTACAGTTAGTCTCTCCACTTACATTTGAT
ACTGATGGAAACATAAAGCTTACCTTAGACAGAGGTTTGCATGTTACAACAGGAGATGCAATTGAAAGCAAC
ATAAGCTGGGCTAAAGGTTTAAAATTTGAAGATGGAGCCATAGCAACCAACATTGGAAATGGGTTAGAGTTT
GGAAGCAGTAGTACAGAAACAGGTGTTGATGATGCTTACCCAATCCAAGTTAAACTTGGATCTGGCCTTAGCT
TTGACAGTACAGGAGCCATAATGGCTGGTAACAAAGAAGACGATAAACTCACTTTGTGGACAACACCTGATC

CATCACCAAACTGTCAAATACTCGCAGAAAATGATGCAAAACTAACACTTTGCTTGACTAAATGTGGTAGTCA
AATACTGGCCACTGTGTCAGTCTTAGTTGTAGGAAGTGGAAACCTAAACCCCATTACTGGCACCGTAAGCAGT
GCTCAGGTGTTTCTACGTTTTGATGCAAACGGTGTTCTTTTAACAGAACATTCTACACTAAAAAAATACTGGG
GGTATAGGCAGGGAGATAGCATAGATGGCACTCCATATACCAATGCTGTAGGATTCATGCCCAATTTAAAAG
CTTATCCAAAGTCACAAAGTTCTACTACTAAAAATAATATAGTAGGGCAAGTATACATGAATGGAGATGTTTC
AAAACCTATGCTTCTCACTATAACCCTCAATGGTACTGATGACAGCAACAGTACATATTCAATGTCATTTTCA
TACACCTGGACTAATGGAAGCTATGTTGGAGCAACATTTGGGGCTAACTCTTATACCTTCTCATACATCGCCC
AAGAATGAACACTGTATCCCACCCTGCATGCCAACCCTTCCCACCCCACTCTGTGGAACAAACTCTGAAACAC
AAAATAAAATAAAGTTCAAGTGTTTTATTGATTCAACAGTTTTACAGGATTCGAGCAGTTATTTTTCCTCCACC
CTCCCAGGACATGGAATACACCACCCTCTCCCCCCGCACAGCCTTGAACATCTGAATGCCATTGGTGATGGAC
ATGCTTTTGGTCTCCACGTTCCACACAGTTTCAGAGCGAGCCAGTCTCGGGTCGGTCAGGGAGATGAAACCCT
CCGGGCACTCCCGCATCTGCACCTCACAGCTCAACAGCTGAGGATTGTCCTCGGTGGTCGGGATCACGGTTAT
CTGGAAGAAGCAGAAGAGCGGCGGTGGGAATCATAGTCCGCGAACGGGATCGGCCGGTGGTGTCGCATCAG
GCCCCGCAGCAGTCGCTGCCGCCGCCGCTCCGTCAAGCTGCTGCTCAGGGGGTCCGGGTCCAGGGACTCCCTC
AGCATGATGCCCACGGCCCTCAGCATCAGTCGTCTGGTGCGGCGGGCGCAGCAGCGCATGCGGATCTCGCTC
AGGTCGCTGCAGTACGTGCAACACAGAACCACCAGGTTGTTCAACAGTCCATAGTTCAACACGCTCCAGCCG
AAACTCATCGCGGGAAGGATGCTACCCACGTGGCCGTCGTACCAGATCCTCAGGTAAATCAAGTGGTGCCCC
CTCCAGAACACGCTGCCCACGTACATGATCTCCTTGGGCATGTGGCGGTTCACCACCTCCCGGTACCACATCA
CCCTCTGGTTGAACATGCAGCCCCGGATGATCCTGCGGAACCACAGGGCCAGCACCGCCCCGCCCGCCATGC
AGCGAAGAGACCCCGGGTCCCGGCAATGGCAATGGAGGACCCACCGCTCGTACCCGTGGATCATCTGGGAGC
TGAACAAGTCTATGTTGGCACAGCACAGGCATATGCTCATGCATCTCTTCAGCACTCTCAACTCCTCGGGGGT
CAAAACCATATCCCAGGGCACGGGGAACTCTTGCAGGACAGCGAACCCCGCAGAACAGGGCAATCCTCGCAC
AGAACTTACATTGTGCATGGACAGGGTATCGCAATCAGGCAGCACCGGGTGATCCTCCACCAGAGAAGCGCG
GGTCTCGGTCTCCTCACAGCGTGGTAAGGGGGCCGGCCGATACGGGTGATGGCGGGACGCGGCTGATCGTGT
TCGCGACCGTGTCATGATGCAGTTGCTTTCGGACATTTTCGTACTTGCTGTAGCAGAACCTGGTCCGGGCGCT
GCACACCGATCGCCGGCGGCGGTCTCGGCGCTTGGAACGCTCGGTGTTGAAATTGTAAAACAGCCACTCTCTC
AGACCGTGCAGCAGATCTAGGGCCTCAGGAGTGATGAAGATCCCATCATGCCTGATGGCTCTGATCACATCG
ACCACCGTGGAATGGGCCAGACCCAGCCAGATGATGCAATTTTGTTGGGTTTCGGTGACGGCGAGCCTCGGG
AACAACGATGAAGTAAATGCAAGCGGTGCGTTCCAGCATGGTTAGTTAGCTGATCTGTAGAAAAAACAAAAA
TGAACATTAAACCATGCTAGCCTGGCGAACAGGTGGGTAAATCGTTCTCTCCAGCACCAGGCAGGCCACGGG
GTCTCCGGCGCGACCCTCGTAAAAATTGTCGCTATGATTGAAAACCATCACAGAGAGACGTTCCCGGTGGCC
GGCGTGAATGATTCGACAAGATGAATACACCCCCGGAACATTGGCGTCCGCGAGTGAAAAAAAGCGCCCGA
GGAAGCAATAAGGCACTACAATGCTCAGTCTCAAGTCCAGCAAAGCGATGCCATGCGGATGAAGCACAAAAT
TCTCAGGTGCGTACAAAATGTAATTACTCCCCTCCTGCACAGGCAGCAAAGCCCCCGATCCCTCCAGGTACAC
ATACAAAGCCTCAGCGTCCATAGCTTACCGAGCAGCAGCACACAACAGGCGCAAGAGTCAGAGAAAGGCTG
AGCTCTAACCTGTCCACCCGCTCTCTGCTCAATATATAGCCCAGATCTACACTGACGTAAAGGCCAAAGTCTA
AAAATACCCGCCAAATAATCACACACGCCCAGCACACGCCCAGAAACCGGTGACACACTCAAAAAAATACG
CGCACTTCCTCAAACGCCCAAAACTGCCGTCATTTCCGGGTTCCCACGCTACGTCATCAAAACACGACTTTCA
AATTCCGTCGACCGTTAAAAACGTCACCCGCCCCGCCCCTAACGGTCGCCCGTCTCTCAGCCAATCAGCGCCC
CGCATCCCCAAATTCAAACACCTCATTTGCATATTAACGCGCACAAAAAGTTTGAGGTATATTATTGATGATG

Referências

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 (2015).
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 identification 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 BreakSeq 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-throughput 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. Jørgensen, 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. & Keşmir, 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 immunogenicity. *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 molecule HLA-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 for HLA-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-source MS/MS sequence database search tool. 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 into Comet--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 Käll, 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 Käll, 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 Käll, 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, Frédérique 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 Jaffee. 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., Krüse, 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 transgenic 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. Rhême 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—A 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 Côté, Sylvie Mader, Sébastien 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 Löwer, Jan Diekmann, Sebastian Boegel, Barbara Schrörs, Fulvia Vascotto, John C. Castle, Arbel D. Tadmor, Stephen P. Schoenberger, Christoph Huber, Özlem Türeci, 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, 1152–1158.

102. Van Loo, P., Nordgard, S.H., Lingjærde, 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., Lingjærde, 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.

REIVINDICAÇÕES

1. Vetor de adenovírus, caracterizado pelo fato de que compreende:

uma espinha dorsal adenoviral compreendendo um ou mais genes ou sequências regulatórias de um genoma de adenovírus, e

em que a espinha dorsal adenoviral compreende um gene E4 parcialmente deletado com referência ao genoma de adenovírus, em que o gene E4 parcialmente deletado compreende uma região E4orf2 deletada ou parcialmente deletada e uma região E4orf3 deletada ou parcialmente deletada e, opcionalmente, uma região E4orf4 deletada ou parcialmente deletada, e

opcionalmente, em que o vetor de adenovírus compreende ainda um cassete, o cassete compreendendo:

(1) pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, opcionalmente em que a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil codifica um polipeptídeo, opcionalmente em que o polipeptídeo compreende um antígeno, opcionalmente em que o antígeno compreende:

- um epítopo MHC classe I,

- um epítopo MHC de classe II,

- um epítopo capaz de estimular uma resposta de célula B, ou

- uma combinação dos mesmos, e

opcionalmente, em que a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil compreende ainda uma sequência de ligante 5' e/ou uma sequência de ligante 3' e, opcionalmente, em que;

(2) pelo menos uma sequência de promotor operavelmente

ligada a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil,

(3) opcionalmente, pelo menos uma sequência de ácido nucleico codificando antígeno MHC de classe II universal;

(4) opcionalmente, pelo menos uma sequência de ligante codificando GPGPG (SEQ ID NO: 56); e

(5) opcionalmente, pelo menos uma sequência de poliadenilação.

2. Vetor de adenovírus de chimpanzé, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de ChAdV68 modificada, em que a sequência de ChAdV68 modificada compreende:

(a) um gene E4 parcialmente deletado da sequência de gene E4 mostrada em SEQ ID NO: 1 e que carece de pelo menos nucleotídeos 34.916 a 35.642 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1; e

(b) um ou mais genes ou sequências regulatórias da sequência de ChAdV68 mostrada em SEQ ID NO: 1, opcionalmente em que os um ou mais genes ou sequências regulatórias compreendem pelo menos uma das repetições terminais invertidas de adenovírus de chimpanzé (ITR), genes E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 e L5 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1; e

opcionalmente, em que o vetor de adenovírus de chimpanzé compreende ainda um cassete, em que o cassete compreende pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil e em que o cassete compreende pelo menos uma sequência promotora operavelmente ligada à pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil.

3. Vetor de adenovírus de chimpanzé, caracterizado

pelo fato de que compreende uma sequência de ChAdV68 modificada, em que a sequência de ChAdV68 modificada compreende:

(a) um gene E4 parcialmente deletado da sequência de gene E4 mostrada em SEQ ID NO: 1 e que carece de pelo menos nucleotídeos 34.916 a 35.642 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1;

(b) nucleotídeos 2 a 34.916 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1, em que o gene E4 parcialmente deletado está 3’ dos nucleotídeos 2 a 34.916, e opcionalmente os nucleotídeos 2 a 34.916 adicionalmente carecem de nucleotídeos 577 a 3403 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção E1 e/ou carecem de nucleotídeos 27.125 a 31.825 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção E3; e

(c) nucleotídeos 35,643 a 36.518 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1, e em que o gene E4 parcialmente deletado está 5’ dos nucleotídeos 35,643 a 36.518, e

opcionalmente, em que o vetor de adenovírus de chimpanzé compreende ainda um cassete, em que o cassete compreende pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil e em que o cassete compreende pelo menos uma sequência promotora operavelmente ligada à pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil.

4. Vetor de adenovírus de chimpanzé, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. uma sequência de ChAdV68 modificada, em que a sequência de ChAdV68 modificada compreende:

(i) um gene E4 parcialmente deletado da sequência de gene E4 mostrada em SEQ ID NO: 1 e que carece pelo menos dos

nucleotídeos 34.916 a 35.642 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1;

(ii) nucleotídeos 2 a 34.916 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1, em que o gene E4 parcialmente deletado está 3’ dos nucleotídeos 2 a 34.916, e opcionalmente os nucleotídeos 2 a 34.916 adicionalmente carecem de nucleotídeos 577 a 3403 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção E1 e/ou carecem de nucleotídeos 27.125 a 31.825 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1 correspondendo a uma deleção E3; e

(iii) e nucleotídeos 35,643 a 36.518 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1, e em que o gene E4 parcialmente deletado está 5’ dos nucleotídeos 35,643 a 36.518, e;

b. uma sequência de promotor derivada de CMV;

c. uma sequência de nucleotídeo de sinal de poliadenilação de SV40; e

d. um cassete, o cassete compreendendo pelo menos uma, pelo menos, uma sequência de ácido nucleico de carga útil codificando:

- pelo menos um epítopo MHC classe I, opcionalmente em que o pelo menos um epítopo MHC classe I compreende pelo menos 2 epítopos MHC classe I distintos ligados linearmente entre si e cada um opcionalmente compreendendo:

(A) pelo menos uma alteração que torna a sequência de peptídeo codificada distinta da sequência de peptídeo correspondente codificada por uma sequência de ácido nucleico tipo selvagem, em que o epítopo MHC I distinto é de 7-15 aminoácidos de comprimento,

(B) um ligante N-terminal compreendendo uma sequência de aminoácido N-terminal nativa do epítopo MHC I distinto que

é de pelo menos 3 aminoácidos de comprimento,

(C) um ligante C-terminal compreendendo uma sequência de ácido C-terminal nativa do epítopo MHC I distinto que é de pelo menos 3 aminoácidos de comprimento, ou

(D) combinações dos mesmos,

- pelo menos um epítopo MHC classe II, opcionalmente em que o pelo menos um epítopo MHC classe II compreende pelo menos 2 epítopos MHC classe II distintos,

- pelo menos um epítopo capaz de estimular uma resposta de célula B, ou

- combinações dos mesmos; e

em que o cassete é inserido dentro de uma região deletada de ChAdV68 e a sequência de promotor derivada de CMV está operavelmente ligada ao cassete.

5. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, e um transportador farmaceuticamente aceitável.

6. Sequência de nucleotídeo isolada, caracterizada pelo fato de que compreende o cassete, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 de vetor, e um gene da sequência de SEQ ID NO: 1, opcionalmente, em que o gene é selecionado do grupo consistindo nos genes ITR, E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 e L5 de adenovírus de chimpanzé da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1, e opcionalmente em que a sequência de nucleotídeo é cDNA.

7. Célula isolada, caracterizada pelo fato de que compreende a sequência de nucleotídeo conforme definida na reivindicação 6, opcionalmente, em que a célula é uma célula CHO, HEK293 ou variantes das mesmas, 911, HeLa, A549, LP-

293, PER.C6 ou AE1-2a.

8. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende a sequência de nucleotídeo conforme definida na reivindicação 6.

9. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende o vetor conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e 8 e instruções para uso.

10. Uso de um vetor conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e 8, ou da composição farmacêutica conforme definida na reivindicação 5, caracterizado pelo fato de ser no preparo de um medicamento para estimular uma resposta imune em um sujeito.

11. Método para fabricar o vetor conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e 8, o método caracterizado pelo fato de que compreende:

obter uma sequência de plasmídeo compreendendo o vetor de adenovírus ou vetor de adenovírus de chimpanzé;

transfectar a sequência de plasmídeo para uma ou mais células hospedeiras; e

isolar o vetor das uma ou mais células hospedeiras.

12. Uso de um vetor de adenovírus caracterizado pelo fato de ser no preparo de um medicamento para estimular uma resposta imune em um sujeito, o dito vetor compreendendo:

uma espinha dorsal adenoviral compreendendo um ou mais genes ou sequências regulatórias de um genoma de adenovírus, e

em que a espinha dorsal adenoviral compreende um gene E4 parcialmente deletado com referência ao genoma de adenovírus, em que o gene E4 parcialmente deletado compreende uma região E4orf2 deletada ou parcialmente deletada e uma

região E4orf3 deletada ou parcialmente deletada e, opcionalmente, uma região E4orf4 deletada ou parcialmente deletada, e

em que o vetor de adenovírus compreende ainda um cassete, o cassete compreendendo:

(1) pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, opcionalmente em que a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil codifica um polipeptídeo, opcionalmente em que o polipeptídeo compreende um antígeno, opcionalmente em que o antígeno compreende:

- um epítopo MHC classe I,

- um epítopo MHC de classe II,

- um epítopo capaz de estimular uma resposta de célula B, ou

- uma combinação dos mesmos, e

opcionalmente, em que a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil compreende ainda uma sequência de ligante 5' e/ou uma sequência de ligante 3' e, opcionalmente, em que;

(2) pelo menos uma sequência de promotor operavelmente ligada a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil,

(3) opcionalmente, pelo menos uma sequência de ácido nucleico codificando antígeno MHC de classe II universal;

(4) opcionalmente, pelo menos uma sequência de ligante codificando GPGPG (SEQ ID NO: 56); e

(5) opcionalmente, pelo menos uma sequência de poliadenilação.

13. Uso de vetor de adenovírus caracterizado pelo fato de ser no preparo de um medicamento para tratar um sujeito

com uma doença, opcionalmente, em que a doença é câncer ou uma infecção, o dito vetor compreendendo:

uma espinha dorsal adenoviral compreendendo um ou mais genes ou sequências regulatórias de um genoma de adenovírus, e

em que a espinha dorsal adenoviral compreende um gene E4 parcialmente deletado com referência ao genoma de adenovírus, em que o gene E4 parcialmente deletado compreende uma região E4orf2 deletada ou parcialmente deletada e uma região E4orf3 deletada ou parcialmente deletada e, opcionalmente, uma região E4orf4 deletada ou parcialmente deletada, e

em que o vetor de adenovírus compreende ainda um cassete, o cassete compreendendo:

(1) pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, opcionalmente em que a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil codifica um polipeptídeo, opcionalmente em que o polipeptídeo compreende um antígeno, opcionalmente em que o antígeno compreende:

- um epítopo MHC classe I,

- um epítopo MHC de classe II,

- um epítopo capaz de estimular uma resposta de célula B, ou

- uma combinação dos mesmos, e

opcionalmente, em que a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil compreende ainda uma sequência de ligante 5' e/ou uma sequência de ligante 3' e, opcionalmente, em que;

(2) pelo menos uma sequência de promotor operavelmente ligada a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga

útil,

(3) opcionalmente, pelo menos uma sequência de ácido nucleico codificando antígeno MHC de classe II universal;

(4) opcionalmente, pelo menos uma sequência de ligante codificando GPGPG (SEQ ID NO: 56); e

(5) opcionalmente, pelo menos uma sequência de poliadenilação.

14. Uso de um vetor de adenovírus, caracterizado pelo fato de ser no preparo de um medicamento para estimular uma resposta imune em um sujeito, em que o vetor de adenovírus compreende uma sequência de ChAdV68 modificada, em que a sequência de ChAdV68 modificada compreende:

(a) um gene E4 parcialmente deletado da sequência de gene E4 mostrada em SEQ ID NO: 1 e que carece de pelo menos nucleotídeos 34.916 a 35.642 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1; e

(b) um ou mais genes ou sequências regulatórias da sequência de ChAdV68 mostrada em SEQ ID NO: 1, opcionalmente em que os um ou mais genes ou sequências regulatórias compreendem pelo menos uma das repetições terminais invertidas de adenovírus de chimpanzé (ITR), genes E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 e L5 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1; e

em que o vetor de adenovírus de chimpanzé compreende ainda um cassete, em que o cassete compreende pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil e em que o cassete compreende pelo menos uma sequência promotora operavelmente ligada à pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil.

15. Uso de um vetor de adenovírus, caracterizado pelo

fato de ser no preparo de um medicamento para tratar um sujeito com uma doença, opcionalmente, em que a doença é câncer ou uma infecção, em que o vetor de adenovírus compreende uma sequência de ChAdV68 modificada, em que a sequência de ChAdV68 modificada compreende:

(a) um gene E4 parcialmente deletado da sequência de gene E4 mostrada em SEQ ID NO: 1 e que carece de pelo menos nucleotídeos 34.916 a 35.642 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1; e

(b) um ou mais genes ou sequências regulatórias da sequência de ChAdV68 mostrada em SEQ ID NO: 1, opcionalmente em que os um ou mais genes ou sequências regulatórias compreendem pelo menos uma das repetições terminais invertidas de adenovírus de chimpanzé (ITR), genes E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 e L5 da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1; e

em que o vetor de adenovírus de chimpanzé compreende ainda um cassete, em que o cassete compreende pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil e em que o cassete compreende pelo menos uma sequência promotora operavelmente ligada à pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil.

16. Método para produzir um vírus, caracterizado pelo fato de que o vírus é produzido usando o vetor conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e 8.

17. Método para produzir um vírus, caracterizado pelo fato de que o método compreende as etapas de:

a. fornecer um vetor viral compreendendo um cassete, o cassete compreendendo:

(i) pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga

útil, opcionalmente em que a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil codifica um polipeptídeo, opcionalmente em que o polipeptídeo compreende um antígeno, opcionalmente em que o antígeno compreende:

- um epítopo MHC classe I,

- um epítopo MHC de classe II,

- um epítopo capaz de estimular uma resposta de célula B, ou

- uma combinação dos mesmos, e

opcionalmente, em que a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil compreende ainda uma sequência de ligante 5' e/ou uma sequência de ligante 3' e, opcionalmente, em que;

(ii) pelo menos uma sequência de promotor operavelmente ligada a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, em que o pelo menos um promotor é um promotor controlado por proteína repressora de tetraciclina (TET) (TETr),

(iii) opcionalmente, pelo menos uma sequência de ácido nucleico codificando antígeno MHC de classe II;

(iv) opcionalmente, pelo menos uma sequência de ligante codificando GPGPG (SEQ ID NO: 56); e

(v) opcionalmente, pelo menos uma sequência de poliadenilação;

b. fornecer uma célula engenheirada para expressar a proteína TETr; e

c. contatar o vetor viral com a célula sob condições suficientes para produção do vírus.

18. Vetor viral, caracterizado pelo fato de que compreende um cassete, o cassete compreendendo:

(i) pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, opcionalmente em que a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil codifica um polipeptídeo, opcionalmente em que o polipeptídeo compreende um antígeno, opcionalmente em que o antígeno compreende:

- um epítopo MHC classe I,

- um epítopo MHC de classe II,

- um epítopo capaz de estimular uma resposta de célula B, ou

- uma combinação dos mesmos, e

opcionalmente, em que a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil compreende ainda uma sequência de ligante 5' e/ou uma sequência de ligante 3' e, opcionalmente, em que;

(ii) pelo menos uma sequência de promotor operavelmente ligada a pelo menos uma sequência de ácido nucleico de carga útil, em que o pelo menos um promotor é um promotor controlado por proteína repressora de tetraciclina (TET) (TETr),

(iii) opcionalmente, pelo menos uma sequência de ácido nucleico codificando antígeno MHC de classe II;

(iv) opcionalmente, pelo menos uma sequência de ligante codificando GPGPG (SEQ ID NO: 56); e

(v) opcionalmente, pelo menos uma sequência de poliadenilação.

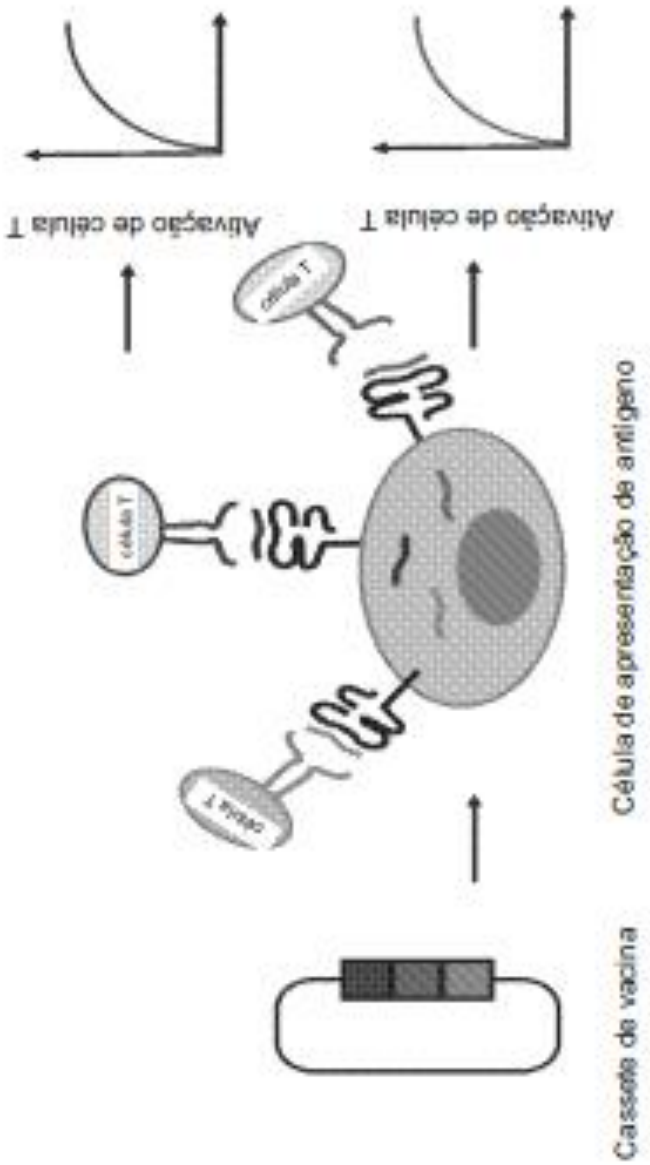

Ativação de célula T
Ativação de célula T
célula T
célula T
célula T
Célula de apresentação de antígeno
Cassete da vacina

FIG 1

Petição 870240010180, de 05/02/2024, pág. 406/471

FIG 2A

FIG 2B

#	HLA	Sequência	Origem
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	Influenza A Matrix 1 (58– 66)
	MHC-II	AKFVAAWTLKAAA	PADRE (seq. artificial)
	MHC-II	QYIKANSKFIGITE	toxoide do tétano (830–844)

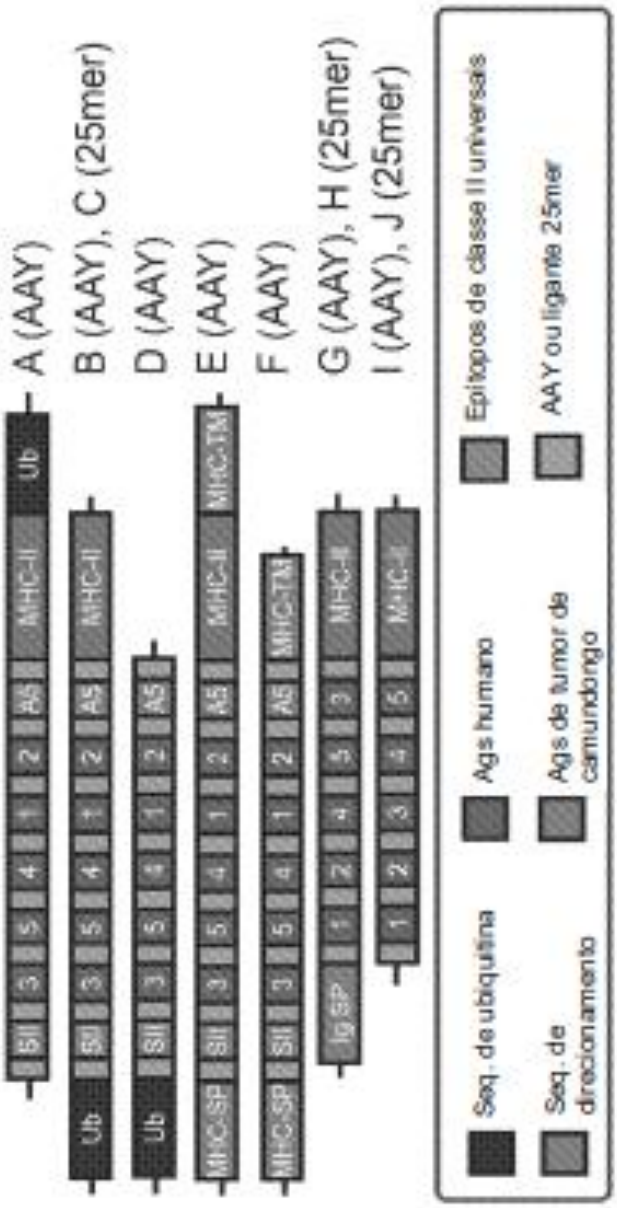

A (AAY)
B (AAY), C (25mer)
D (AAY)
E (AAY)
F (AAY)
G (AAY), H (25mer)
I (AAY), J (25mer)
Ub
SII
3
5
4
1
2
AS
MHC-II
MHC-SP
MHC-TM
Ig SP
Seq. de ubiquitina
Seq. de direcionamento
Ags humano
Ags de tumor de camundongo
Epítopos de classe II universais
AAY ou ligante 25mer

FIG 3

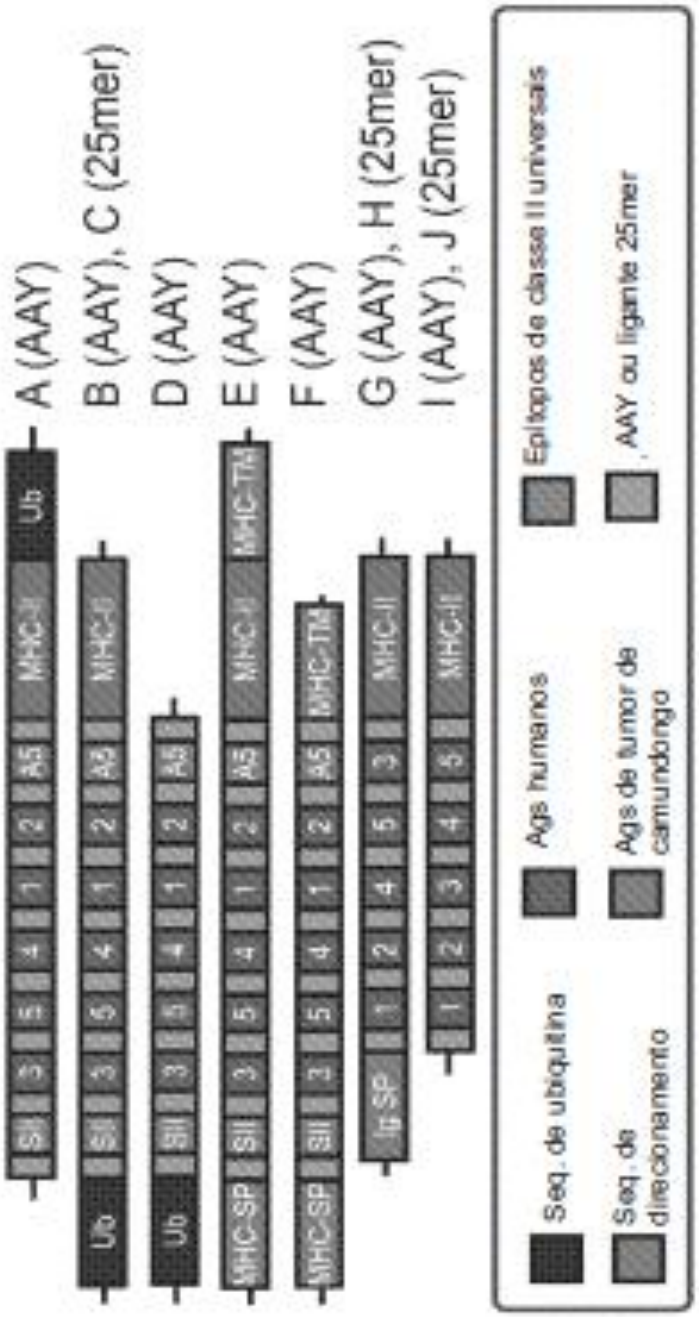

A (AAY)
B (AAY), C (25mer)
D (AAY)
E (AAY)
F (AAY)
G (AAY), H (25mer)
I (AAY), J (25mer)
Ub
SII
3
5
4
1
2
A5
MHC-II
MHC-SP
MHC-TM
Ig SP
Seq. de ubiquitina
Ags humanos
Epítopos de classe II universais
Seq. de direcionamento
Ags de tumor de camundongo
AAY ou ligante 25mer

FIG 4

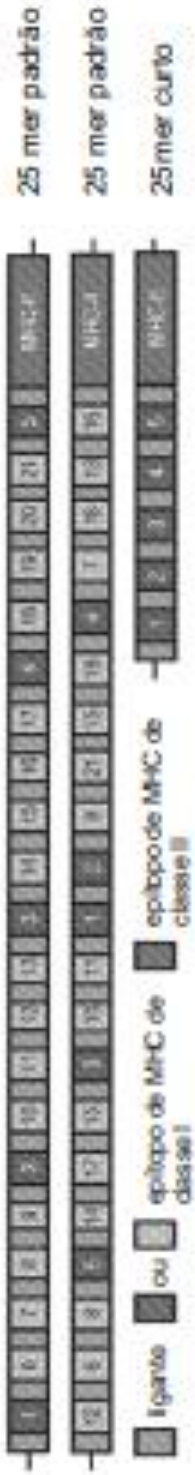

25 mer padrão
25 mer padrão
25mer curto
ligante
ou
epítopo de MHC de classe I
epítopo de MHC de classe II

FIG 5A

#	HLA	Sequência	Origem
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	Influenza A MP 58-66
6	A*02:01	DLMGYIPAV	HCV core 132-140
7	A*02:01	FLPSDFFPSV	HBV
8	A*02:01	FLLTRILTI	HBV
9	A*02:01	WLSLLVPFV	antígeno d
10	A*02:01	FLLSLGIHL	polimerase de HBV 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	Núcleo de HCV 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	autoproteína ABCD3

HCV núcleo 132-140
HBV antígeno de núcleo 18-27

FIG 5B

Ligante
NHP
Epítopo de MHC de classe I murino
Humano
Epítopos de MHC de classe II

FIG 6A

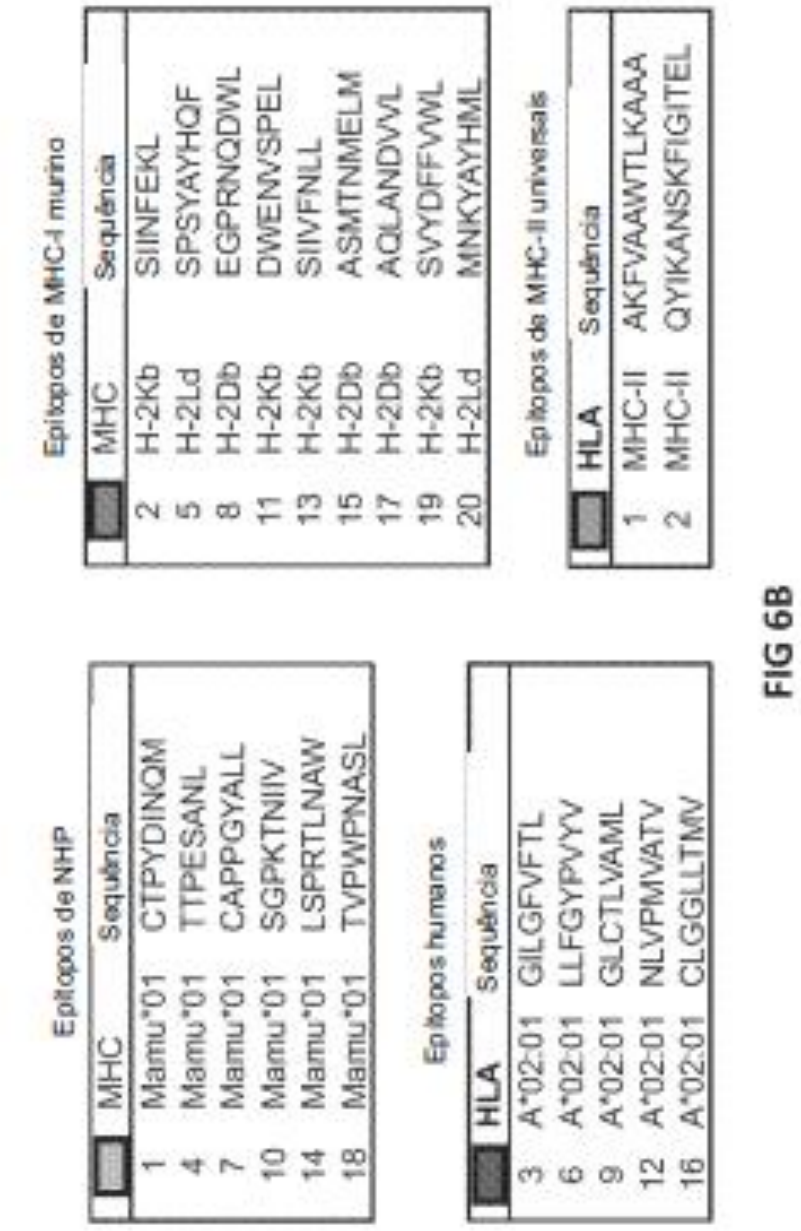

Epítopos de MHC-I murino
MHC Sequência
2 H-2Kb SIINFEKL
5 H-2Ld SPSYAYHQF
8 H-2Db EGPRNQDWL
11 H-2Kb DWENVSPEL
13 H-2Kb SIIVFNLL
15 H-2Db ASMTNMELM
17 H-2Db AQLANDVVL
19 H-2Kb SVYDFFVWL
20 H-2Ld MNKYAYHML
Epítopos de MHC-II universais
HLA Sequência
1 MHC-II AKFVAAWTLKAAA
2 MHC-II QYIKANSKFIGITEL
Epítopos de NHP
MHC Sequência
1 Mamu*01 CTPYDINQM
4 Mamu*01 TTPESANL
7 Mamu*01 CAPPGYALL
10 Mamu*01 SGPKTNIIV
14 Mamu*01 LSPRTLNAW
18 Mamu*01 TVPWPNASL
Epítopos humanos
HLA Sequência
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

FIG 6B

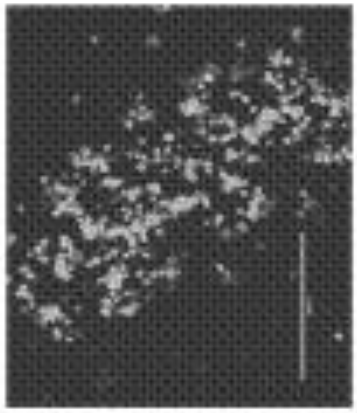


FIG 7C

FIG 7B

FIG 7A

FIG 8C

FIG 8B

FIG 8A

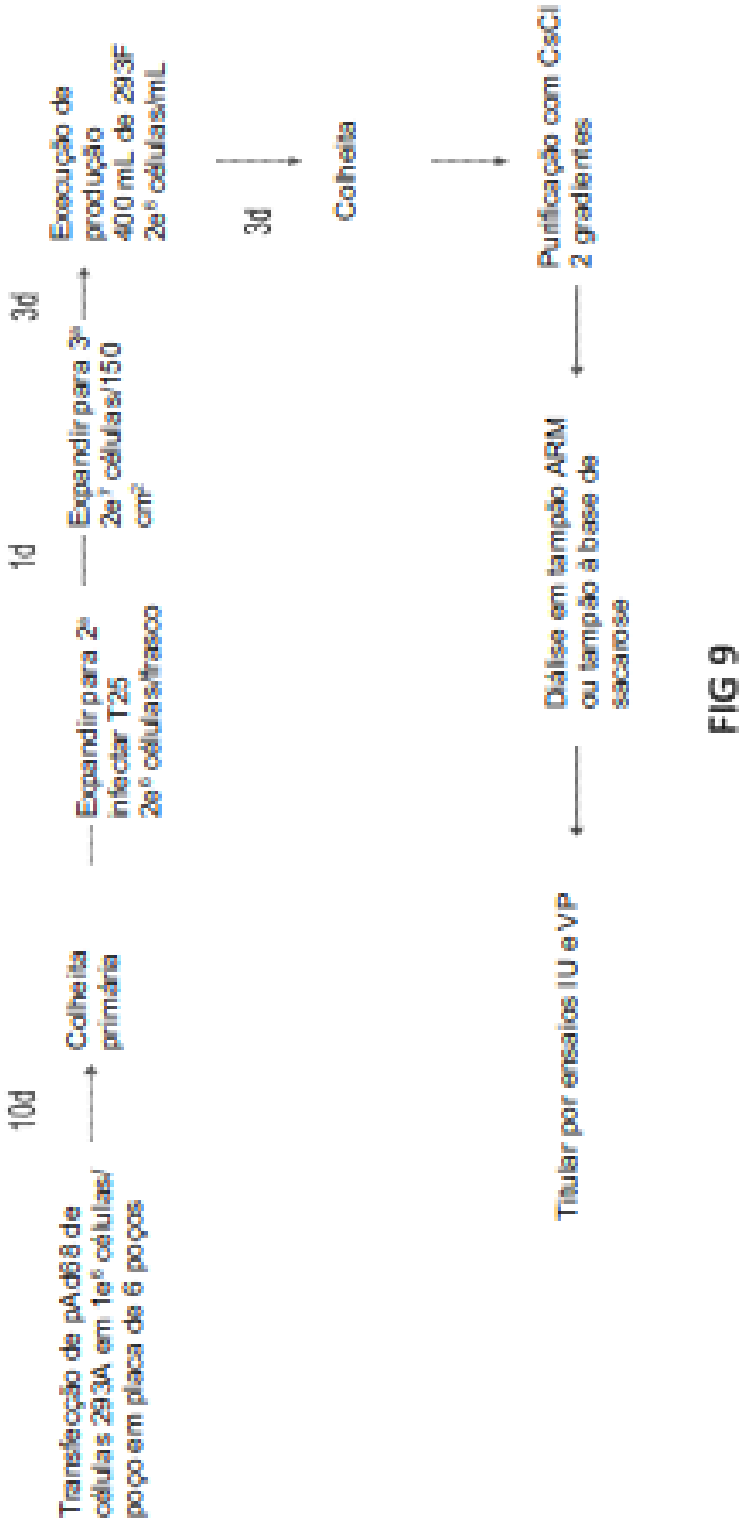

Transfecção de pAd68 de células 293A em 1e⁶ células/poço em placa de 6 poços
10d
Colheita primária
Expandir para 2ª infectar T25 2e⁶ células/frasco
1d
Expandir para 3ª 2e⁷ células/150 cm²
3d
Execução de produção 400 mL de 293F 2e⁶ células/mL
3d
Colheita
Purificação com CsCl 2 gradientes
Diálise em tampão ARM ou tampão à base de sacarose
Titular por ensaios IU e VP

FIG 9

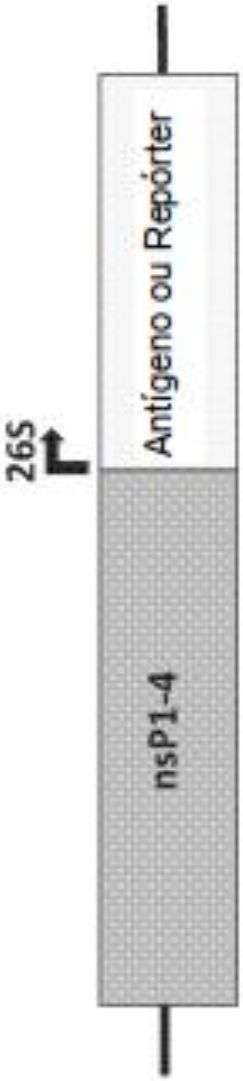


FIG 10

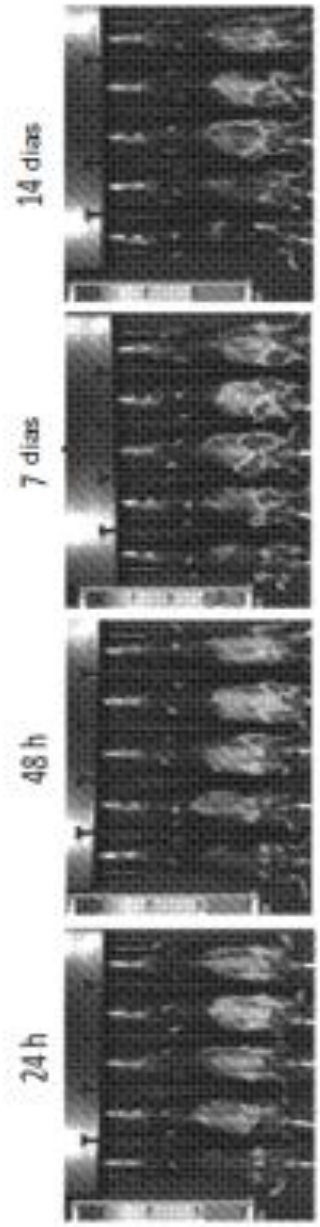


FIG 11

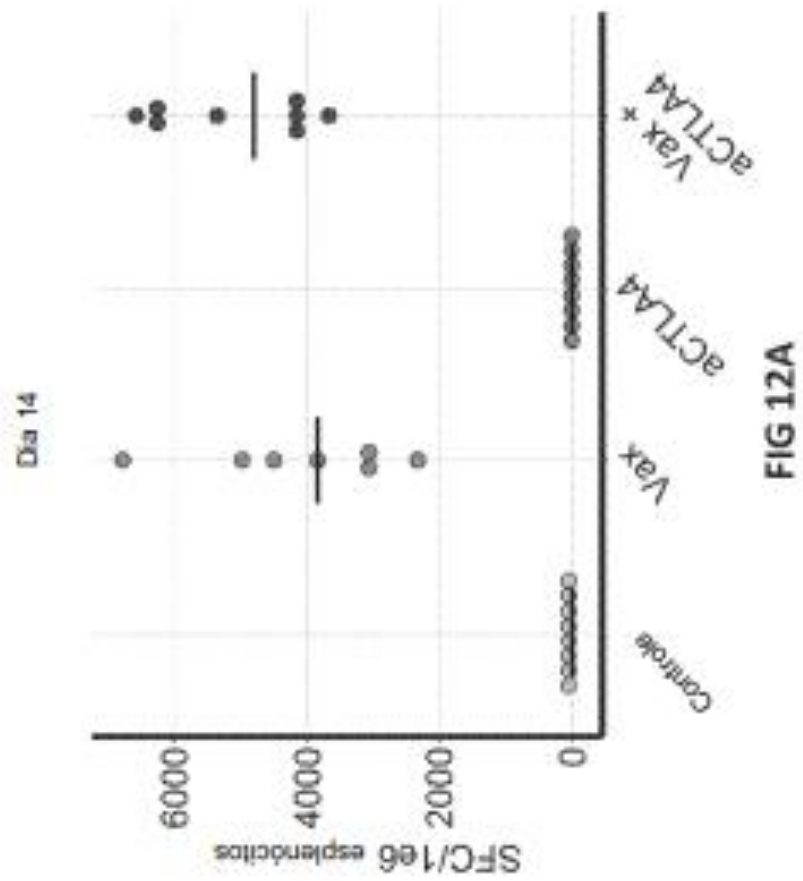

SFC/1e6 esplenócitos
6000
4000
2000
0
Controle
Vax
aCTLA4
Vax + aCTLA4
Dia 14

FIG 12A

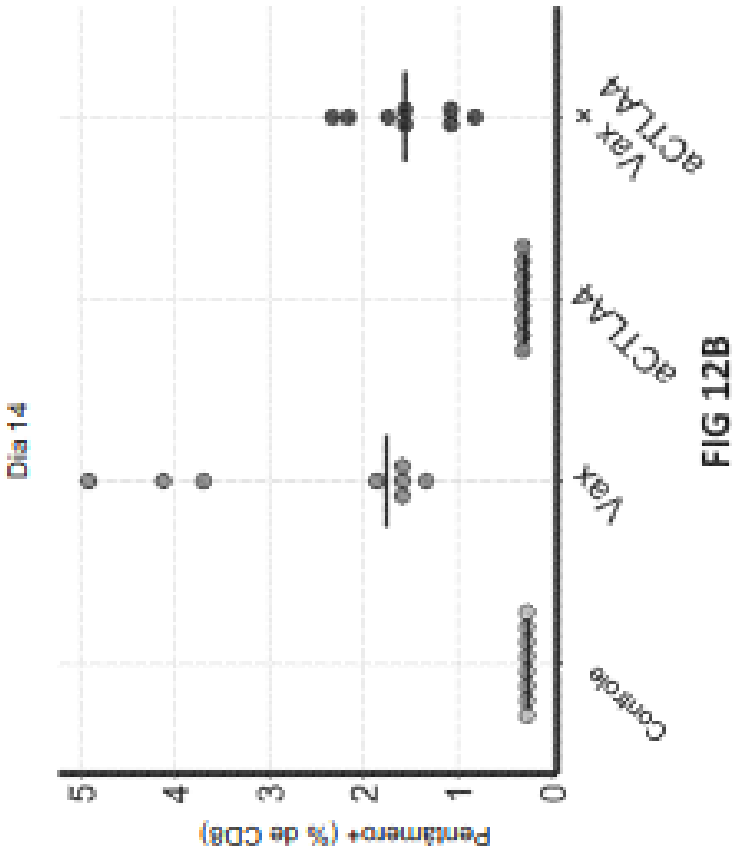

Dia 14
Pentâmero+ (% de CD8)
0
1
2
3
4
5
Controle
Vax
aCTLA4
Vax + aCTLA4

FIG 12B

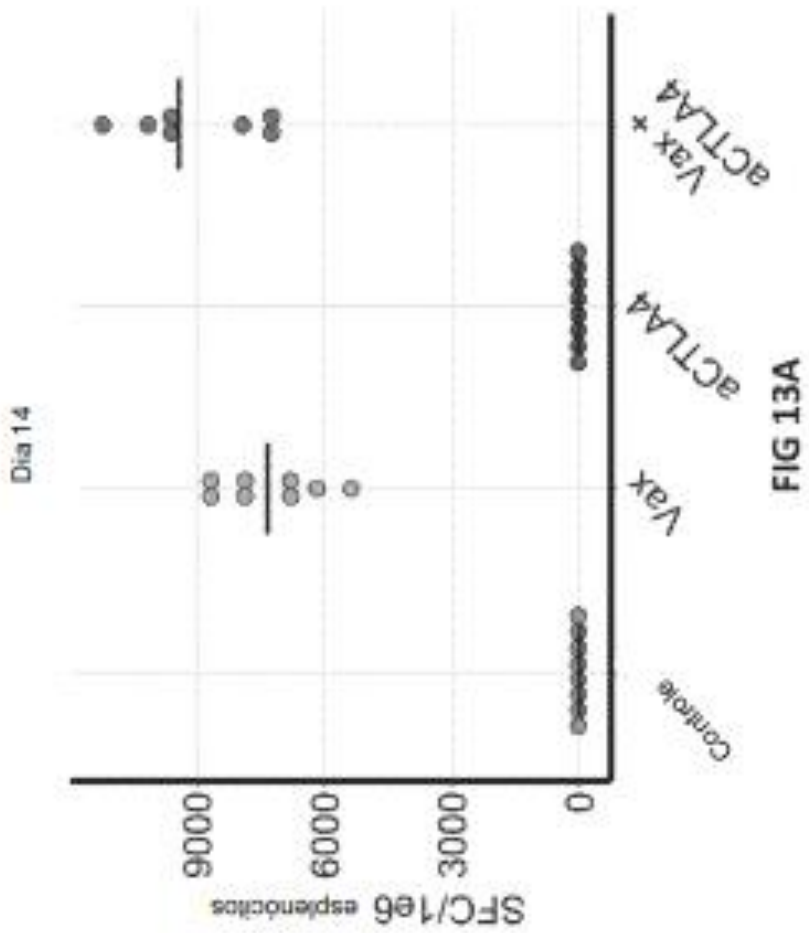

Dia 14
SFC/1e6 esplenócitos
9000
6000
3000
0
Controle
Vax
aCTLA4
Vax + aCTLA4

FIG 13A

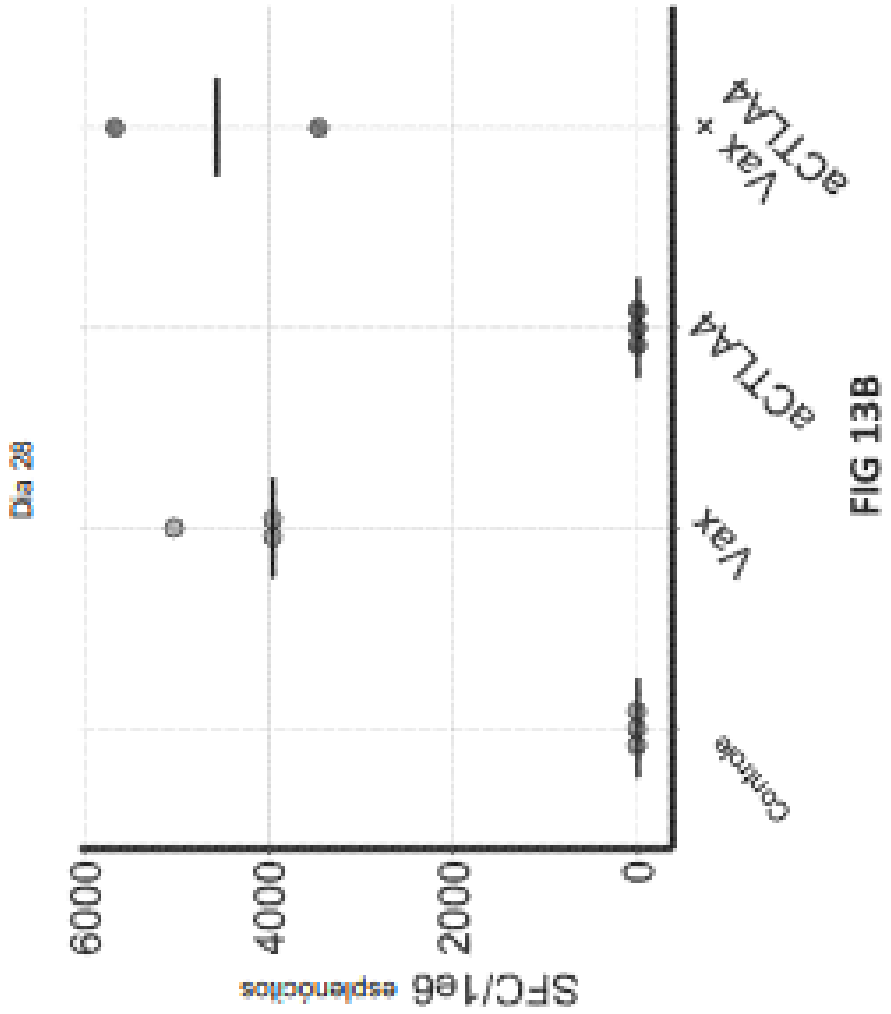

SFC/1e6 esplenócitos
6000
4000
2000
0
Dia 28
Controle
Vax
aCTLA4
Vax + aCTLA4

FIG 13B

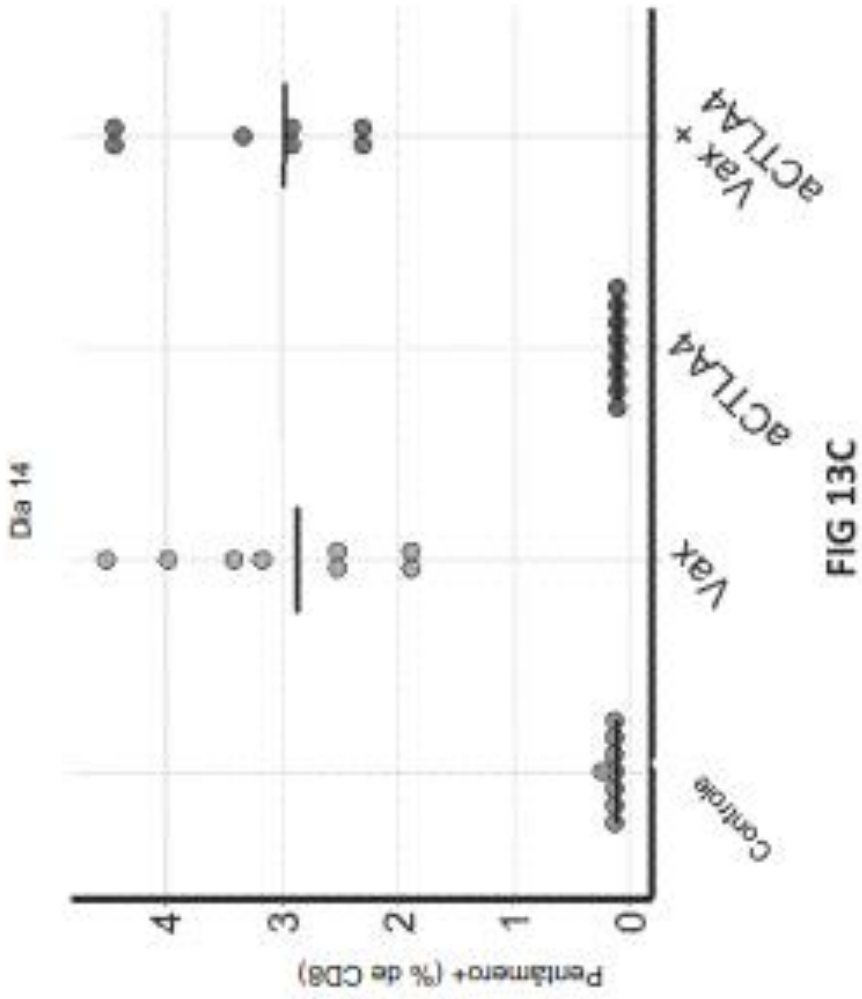


FIG 13C

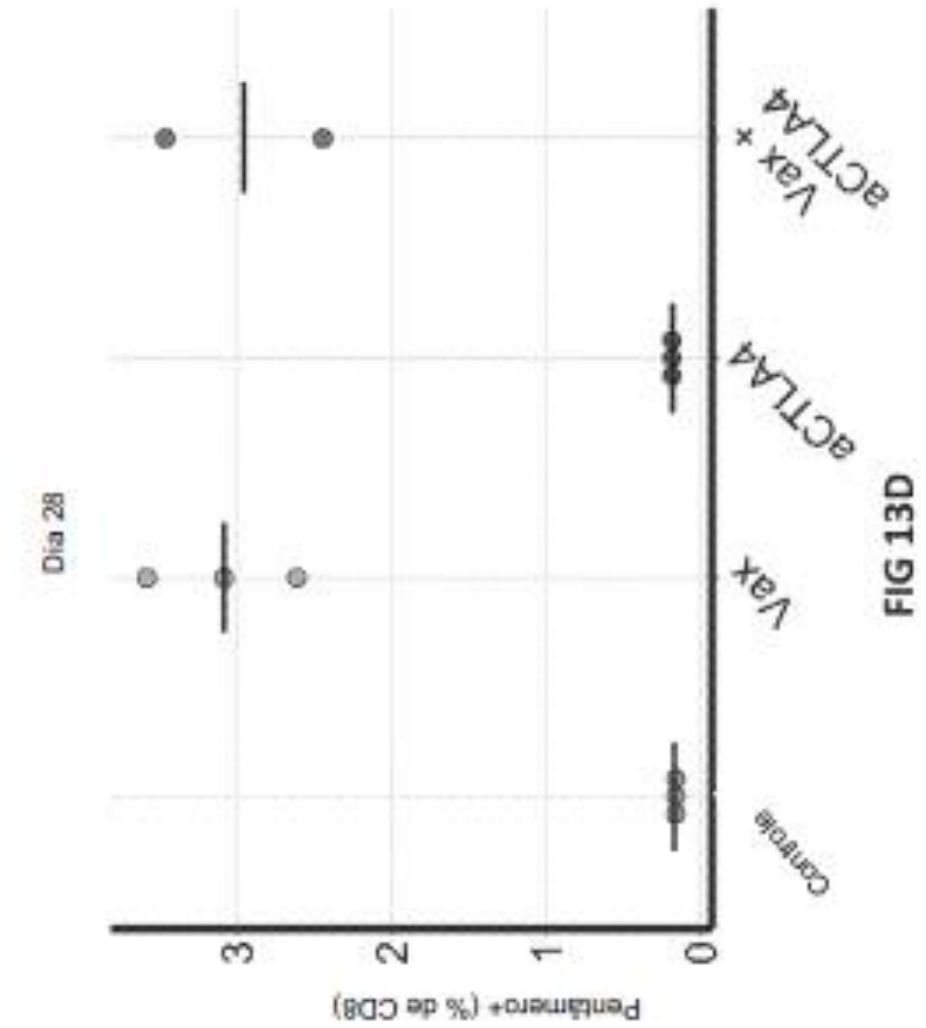


FIG 13D

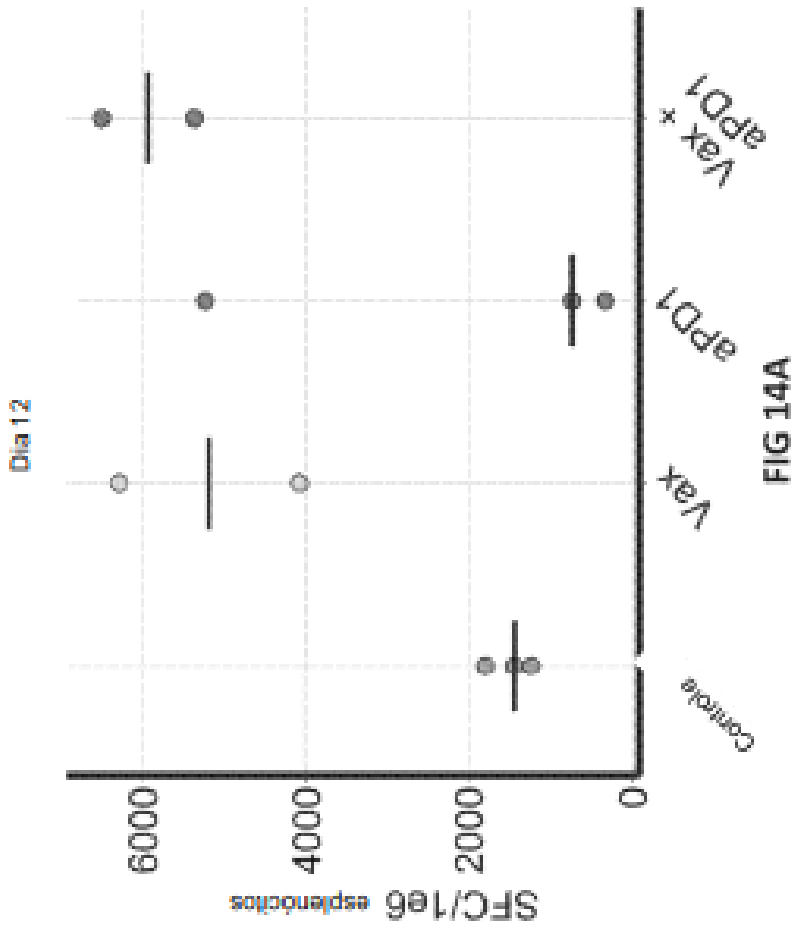

Dia 12
SFC/1e6 esplenócitos
6000
4000
2000
0
Controle
Vax
aPD1
Vax + aPD1

FIG 14A

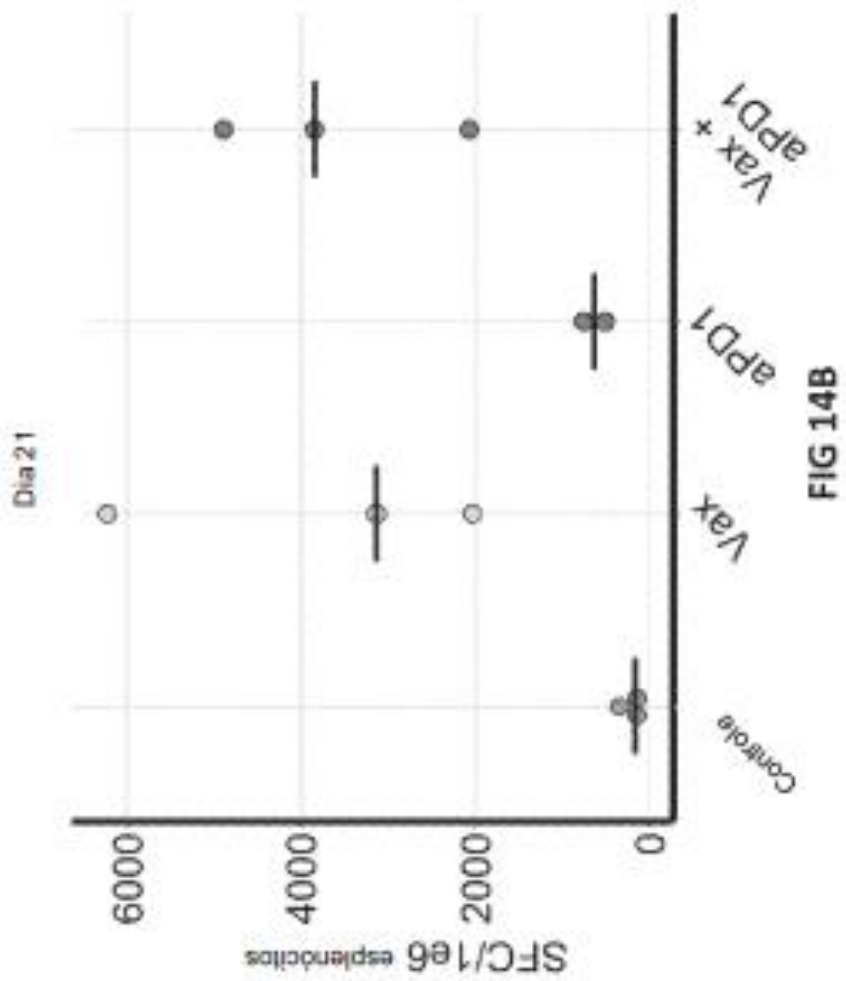

SFC/1e6 esplenócitos
6000
4000
2000
0
Controle
Vax
aPD1
Vax + aPD1
Dia 21

FIG 14B

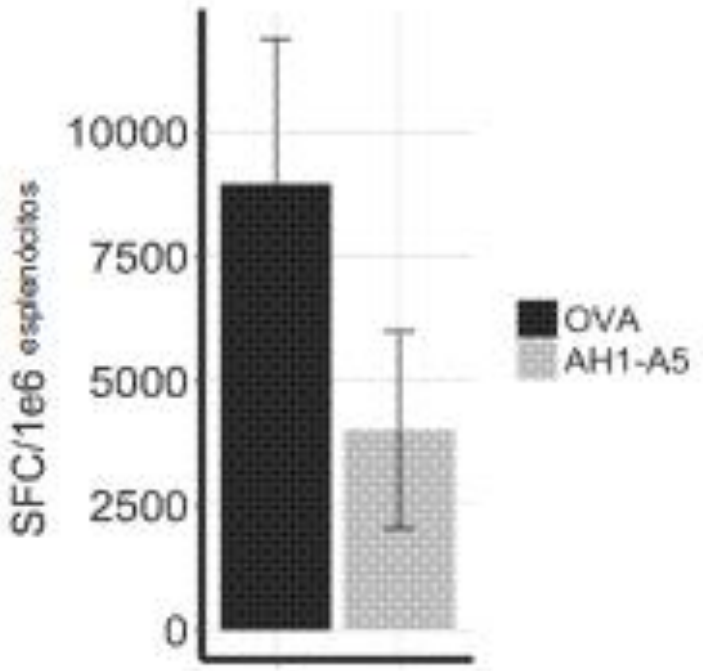


FIG 15

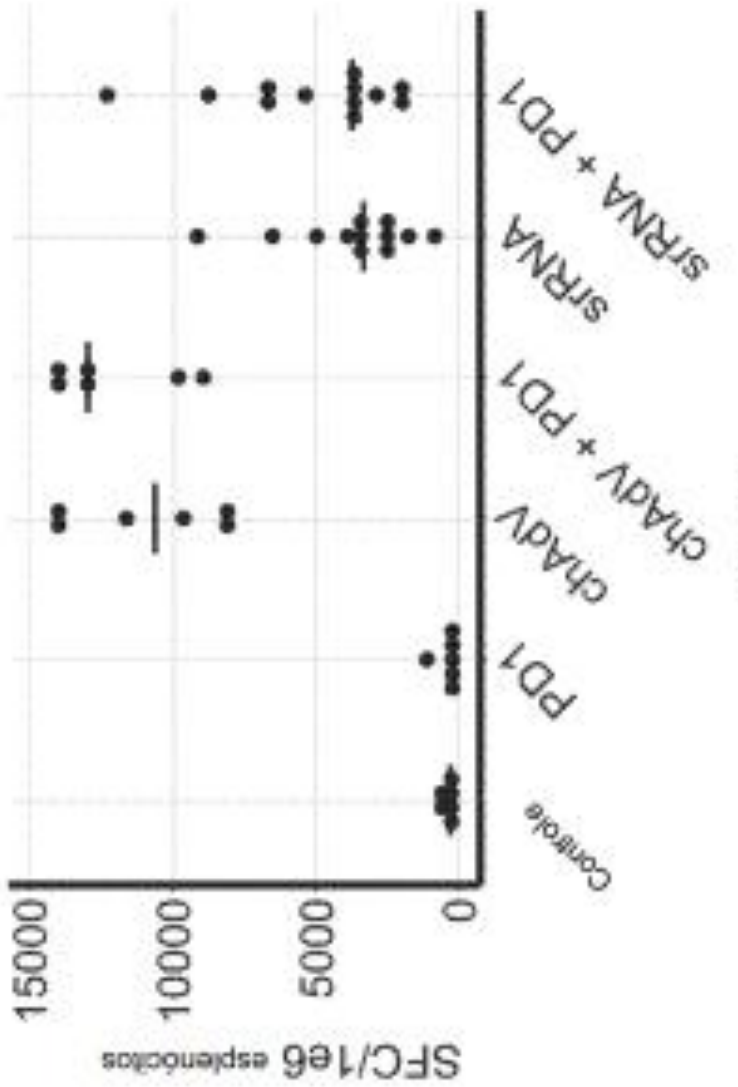

SFC/1e6 esplenócitos
15000
10000
5000
0
Controle
PD1
chAdV
chAdV + PD1
siRNA
siRNA + PD1

FIG 16

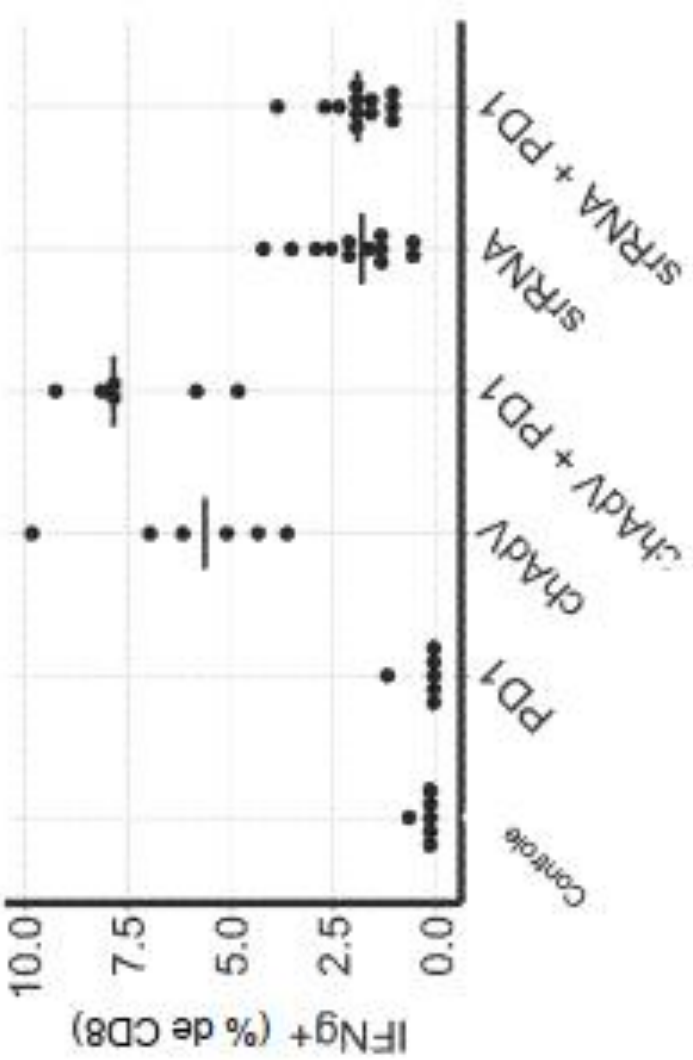

IFNg+ (% de CD8)
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
Controle
PD1
shAdv
shAdv + PD1
siRNA
siRNA + PD1

FIG 17

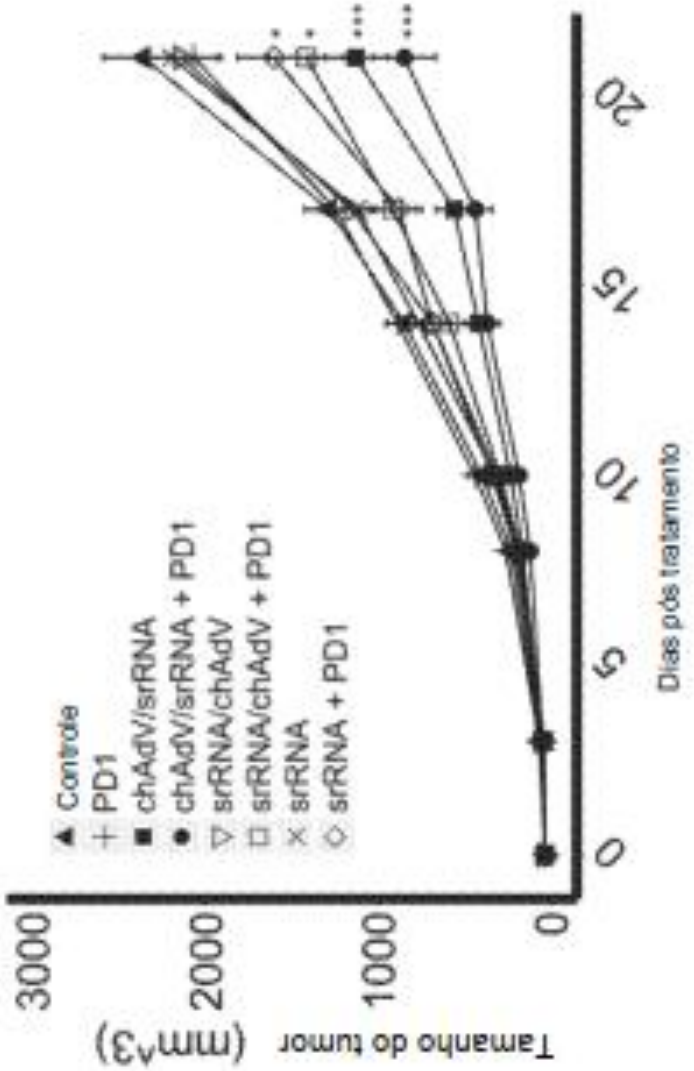

Tamanho do tumor (mm^3)
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
Dias pós tratamento
Controle
PD1
chAdV/srRNA
chAdV/srRNA + PD1
srRNA/chAdV
srRNA/chAdV + PD1
srRNA
srRNA + PD1

FIG 18

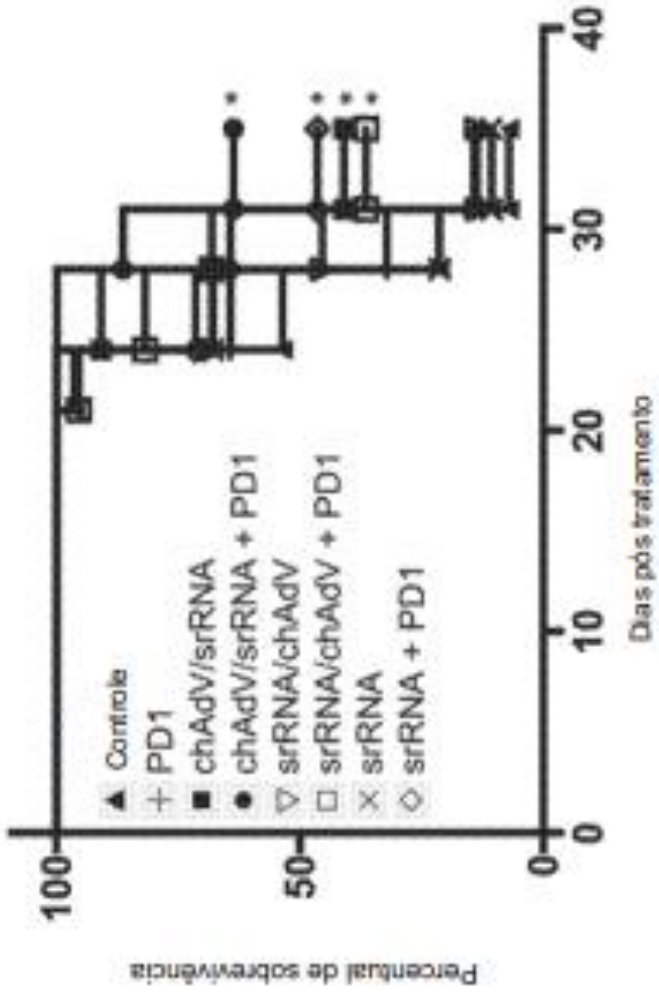

Percentual de sobrevivência
100
50
0
0
10
20
30
40
Dias pós tratamento
Controle
PD1
chAdV/srRNA
chAdV/srRNA + PD1
srRNA/chAdV
srRNA/chAdV + PD1
srRNA
srRNA + PD1

FIG 19

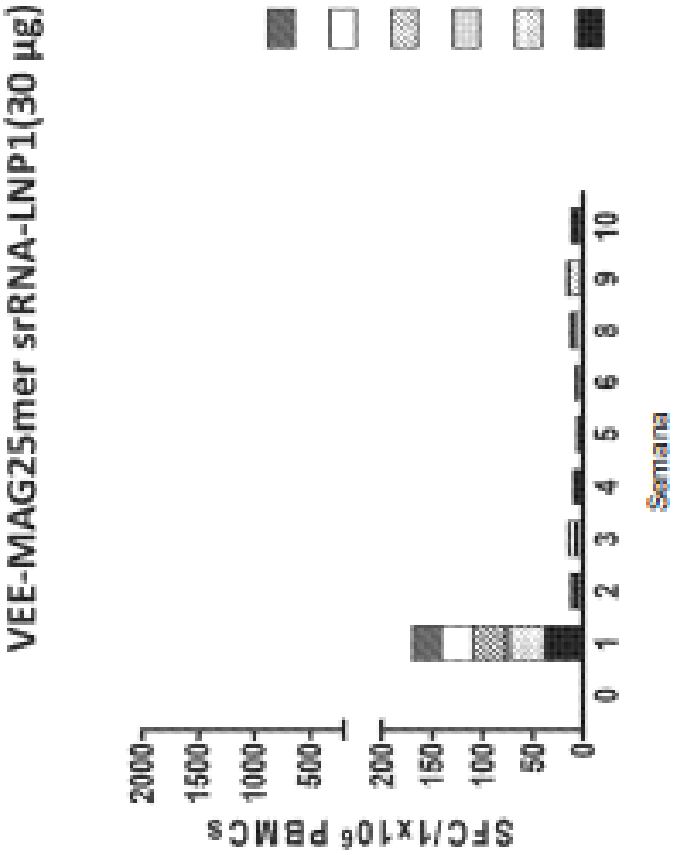

VEE-MAG25mer srRNA-LNP1(30 µg)
Tat TL8
Pol SV9
Gag LW9
Gag CM9
Env TL9
Env CL9
SFC/1x10⁶ PBMCs
2000
1500
1000
500
200
150
100
50
0
0 1 2 3 4 5 6 8 9 10
Semana

FIG 20A

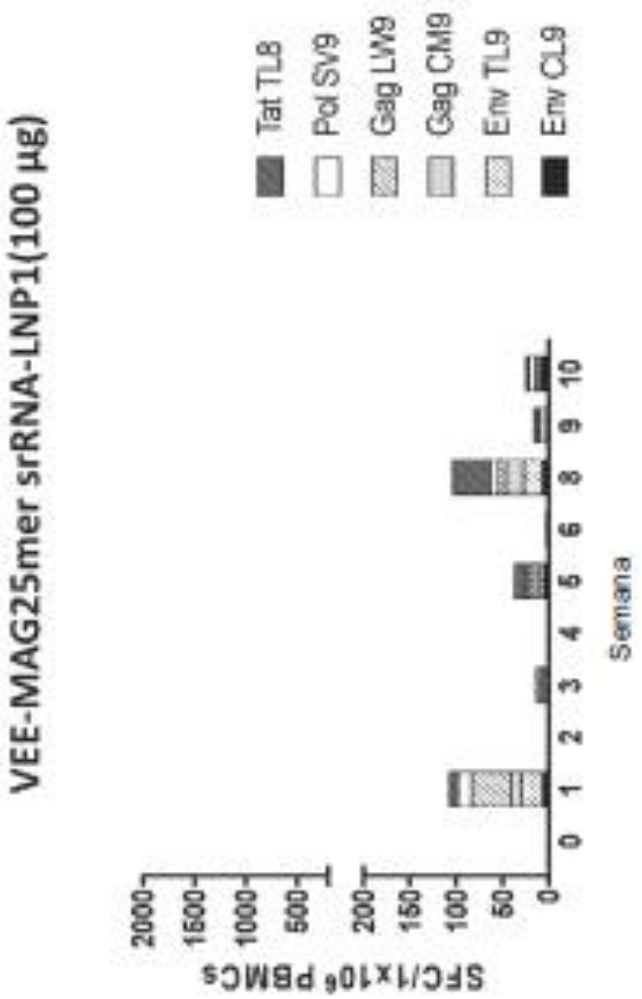

VEE-MAG25mer srRNA-LNP1(100 µg)
Tat TL8
Pol SV9
Gag LW9
Gag CM9
Env TL9
Env CL9
SFC/1x10⁶ PBMCs
2000
1500
1000
500
200
150
100
50
0
0 1 2 3 4 5 6 8 9 10
Semana

FIG 20B

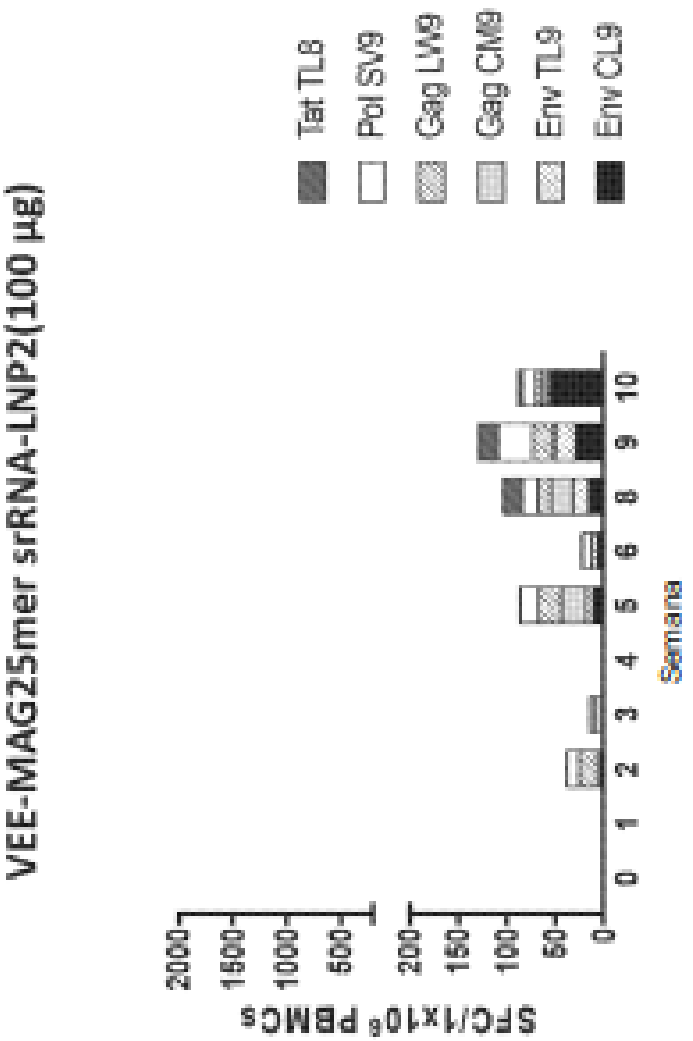

VEE-MAG25mer srRNA-LNP2(100 µg)
Tat TL8
Pol SV9
Gag LV9
Gag CM9
Env TL9
Env CL9
SFC/1x10⁶ PBMCs
2000
1500
1000
500
200
150
100
50
0
0 1 2 3 4 5 6 8 9 10
Semana

FIG 20C

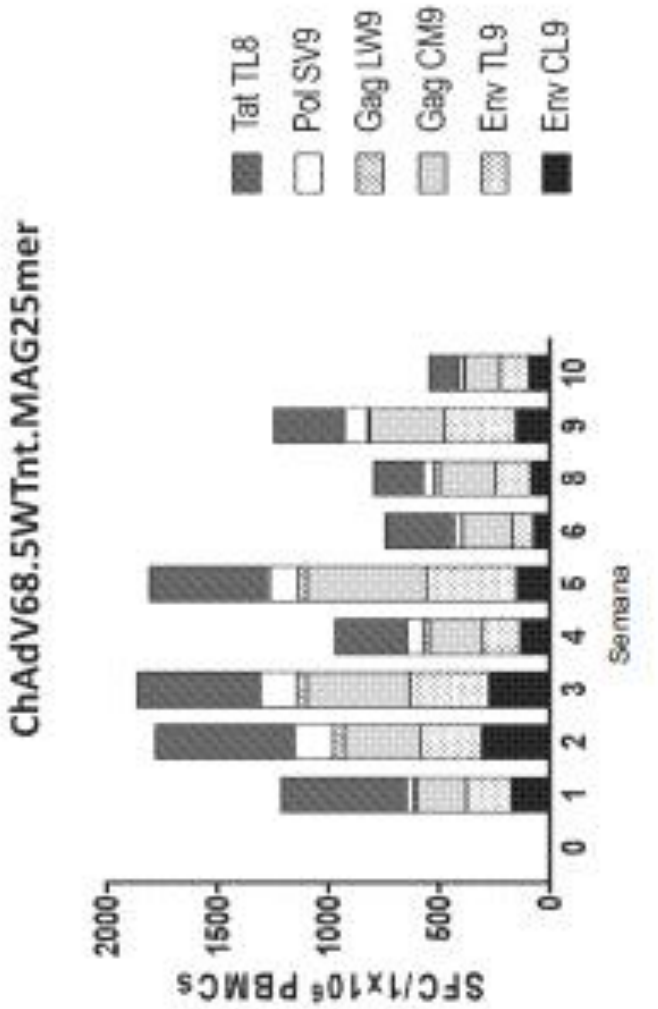

ChAdV68.5WTnt.MAG25mer
Tat TL8
Pol SV9
Gag LW9
Gag CM9
Env TL9
Env CL9
SFC/1x10⁶ PBMCs
2000
1500
1000
500
0
0 1 2 3 4 5 6 8 9 10
Semana

FIG 20D

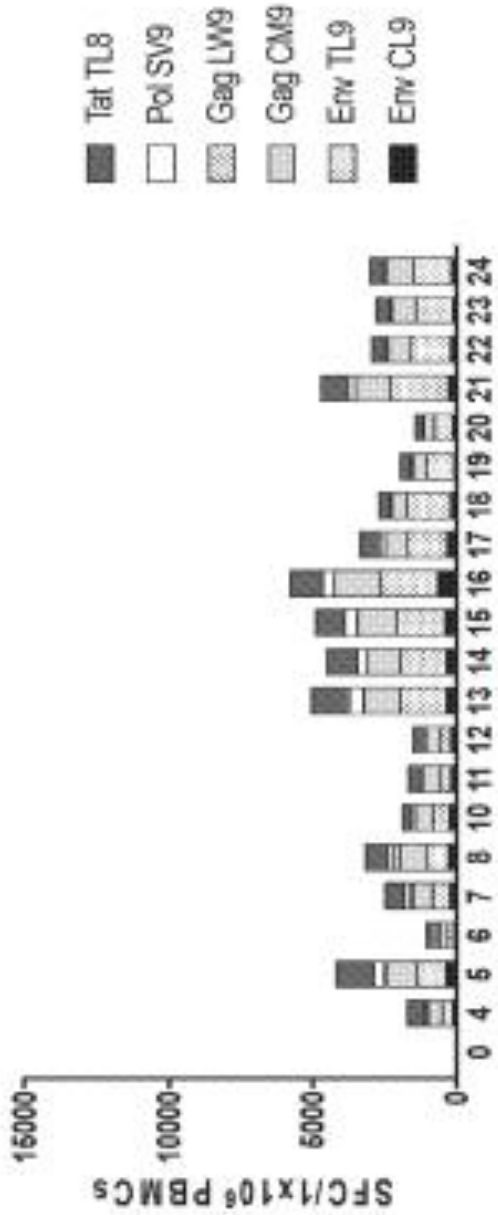

ChAdV
Tat TL8
Pol SV9
Gag LW9
Gag CM9
Env TL9
Env CL9
SFC/1x10⁶ PBMCs
15000
10000
5000
0
0 4 5 6 7 8 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
Semana

FIG 21

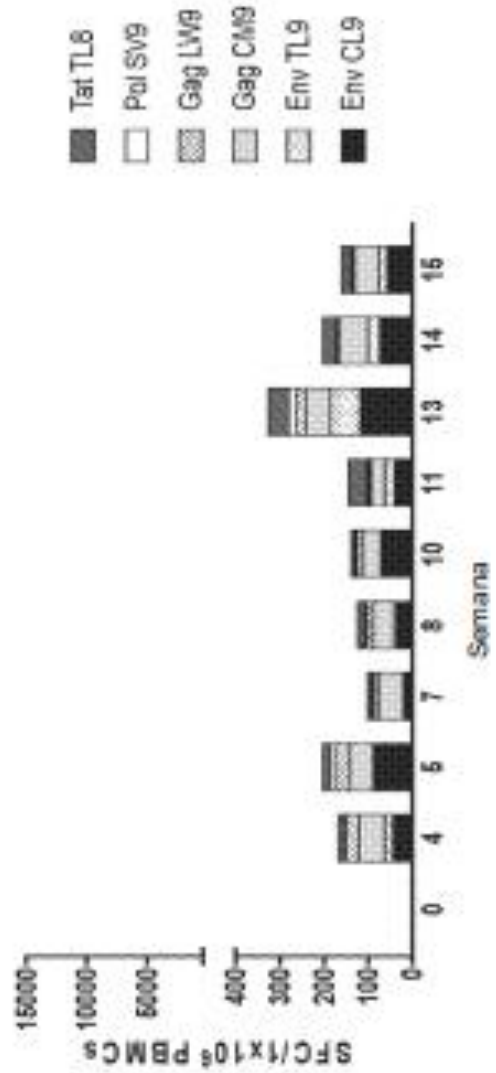

srRNA /LNP-2
Tat TL8
Pol SV9
Gag LW9
Gag CM9
Env TL9
Env CL9
SFC/1x10⁵ PBMCs
15000
10000
5000
400
300
200
100
0
0
4
5
7
8
10
11
13
14
15
Semana

FIG 22

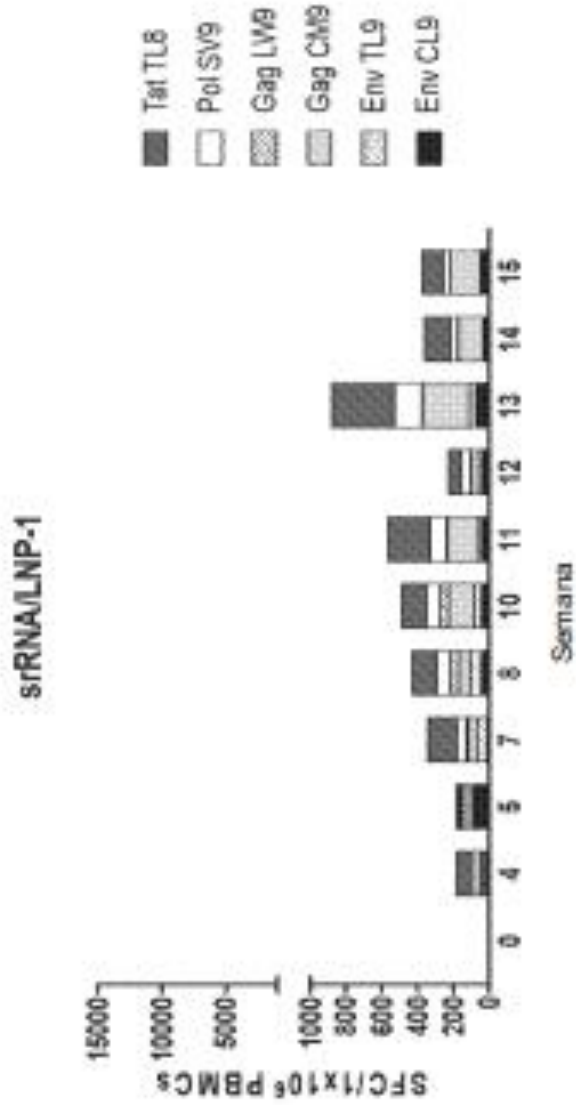

srRNA/LNP-1
Tat TL8
Pol SV9
Gag LV9
Gag CM9
Env TL9
Env CL9
SFC/1x10⁶ PBMCs
15000
10000
5000
1000
800
600
400
200
0
0
4
5
7
8
10
11
12
13
14
15
Semana

FIG 23

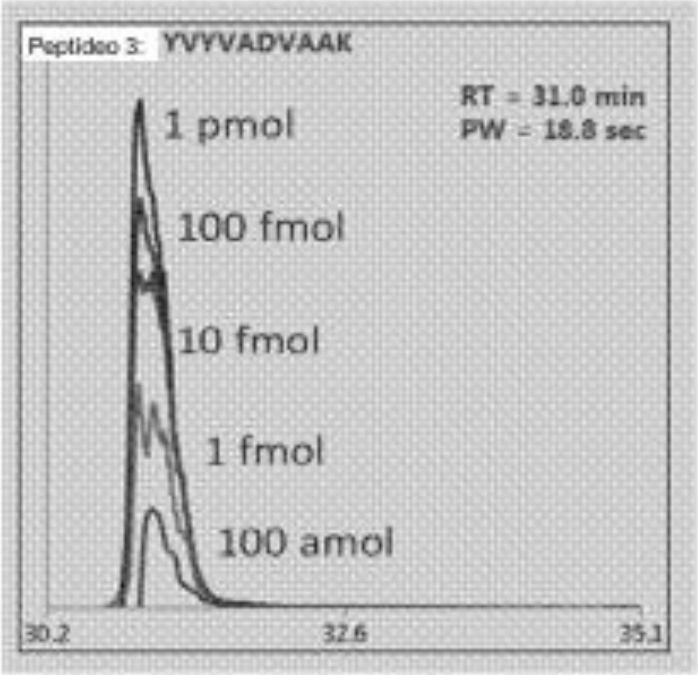

Peptideo 3: YVYVADVAAK
RT = 31.0 min
PW = 18.8 sec
1 pmol
100 fmol
10 fmol
1 fmol
100 amol
30.2
32.6
35.1

FIG 24A

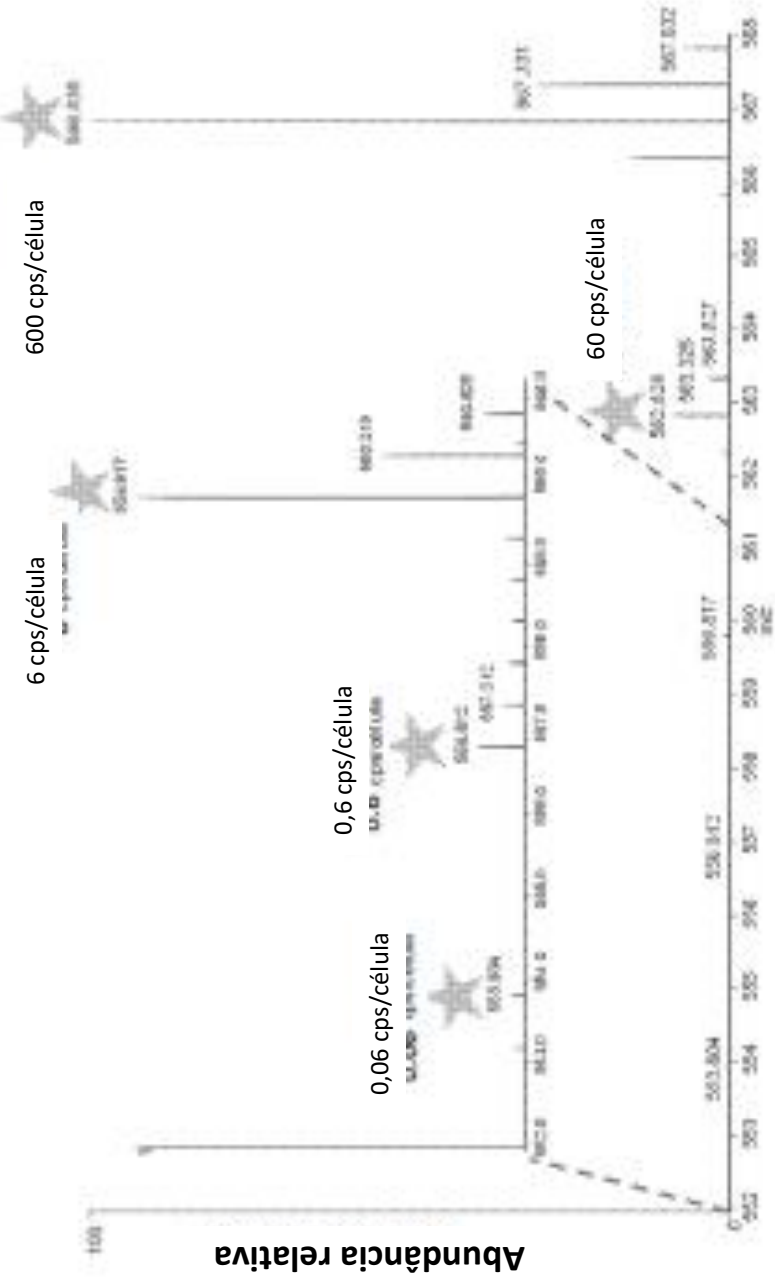

600 cps/célula
6 cps/célula
0,6 cps/célula
0,06 cps/célula
60 cps/célula
Abundância relativa

FIG 24B

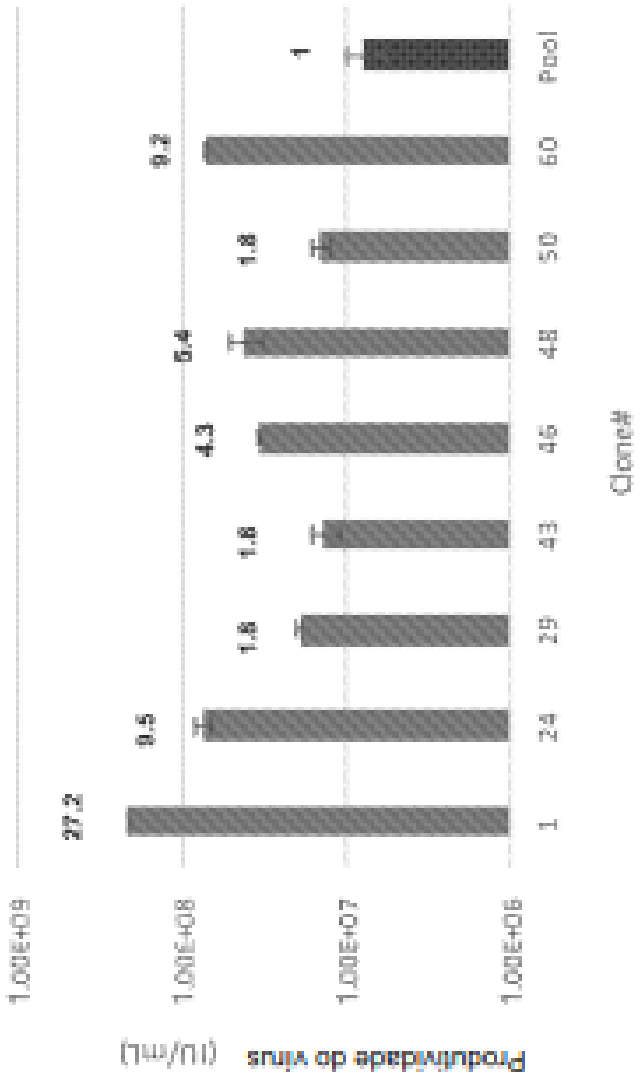

Produtividade do vírus (IU/mL)
1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
1,00E+06
27.2
0.5
1.8
1.8
4.3
6.4
1.8
9.2
1
1
24
25
43
45
48
50
60
Pool
Clone#

FIG 25

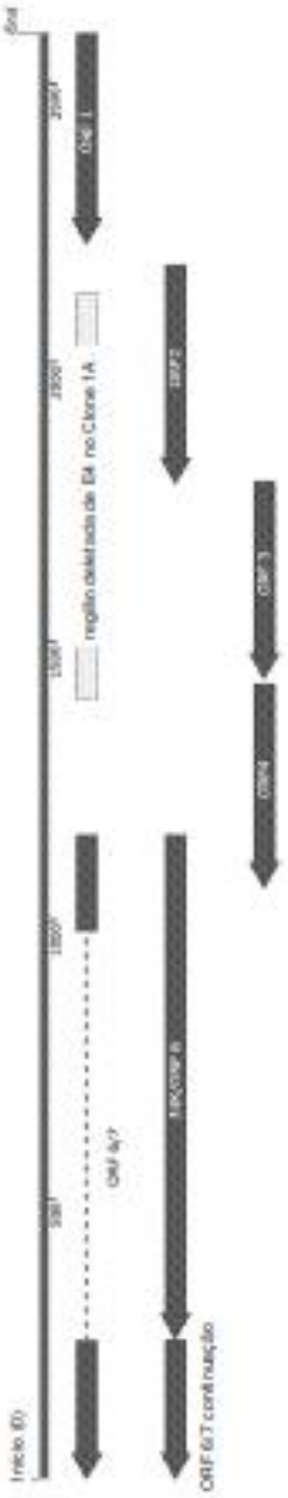

Início (0)
ORF 6/7
ORF 6/7 continuação
região deletada de E4 no Clone 1A
ORF 1
ORF 2
ORF 3
ORF 4

FIG 26

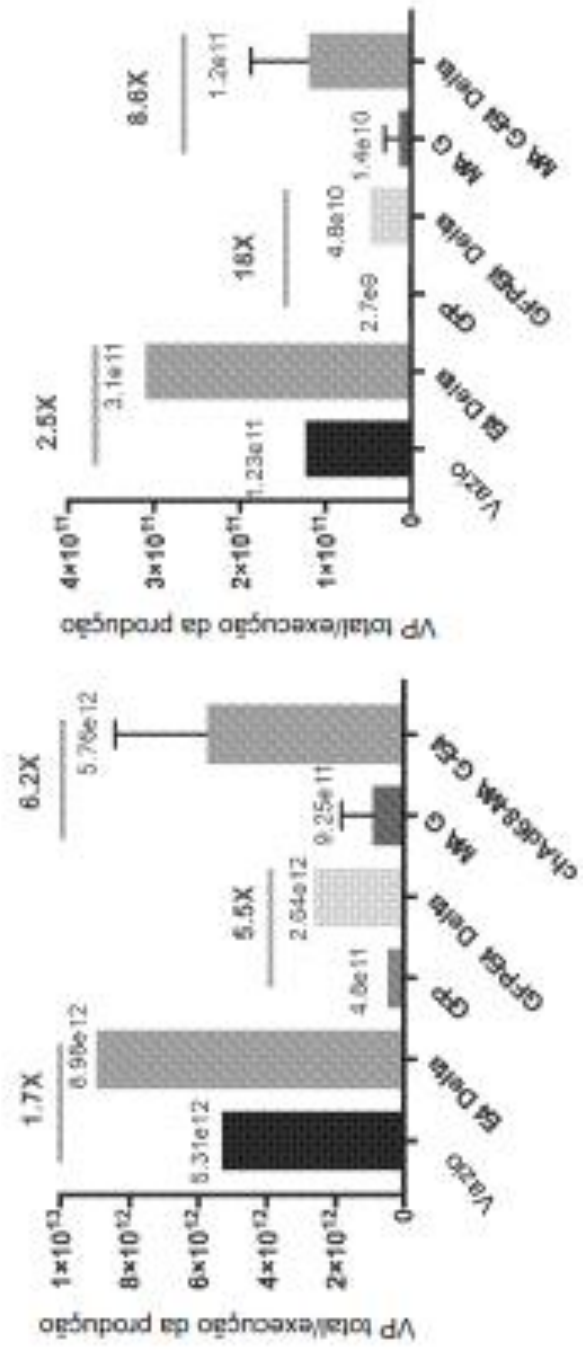

VP total/execução da produção
1×10^13
8×10^12
6×10^12
4×10^12
2×10^12
0
1.7X
6.2X
5.5X
Vazio
E4 Delta
GP
GFP-E4 Delta
MA G
chAd68-MA G-E4
8.31e12
6.98e12
4.8e11
2.64e12
9.25e11
5.76e12
VP total/execução da produção
4×10^11
3×10^11
2×10^11
1×10^11
0
2.5X
18X
8.6X
Vazio
E4 Delta
GP
GFP-E4 Delta
MA G
MA G-E4 Delta
1.23e11
3.1e11
2.7e9
4.8e10
1.4e10
1.2e11

FIG 27

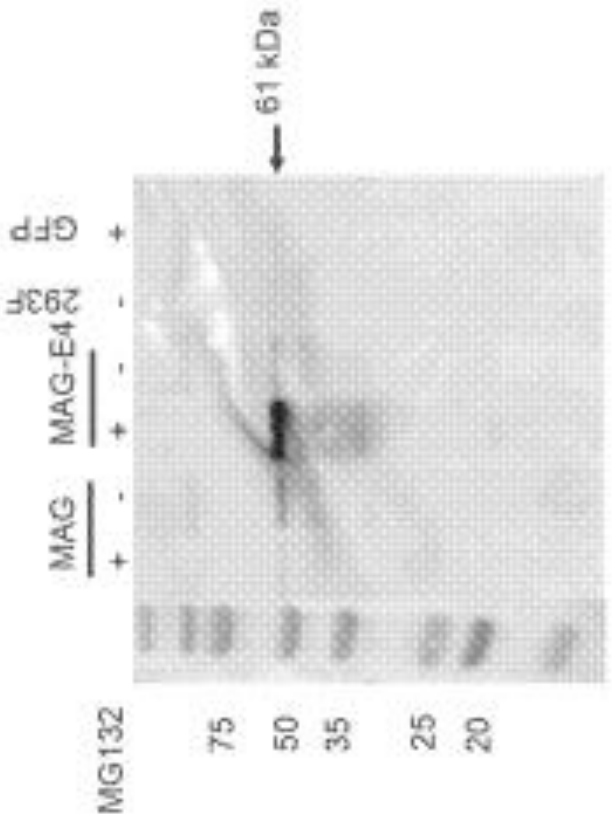


FIG 28

L
XL
XXL
Epítopo de primata não humano
Epítopo de camundongo
Epítopo de humano

FIG 29

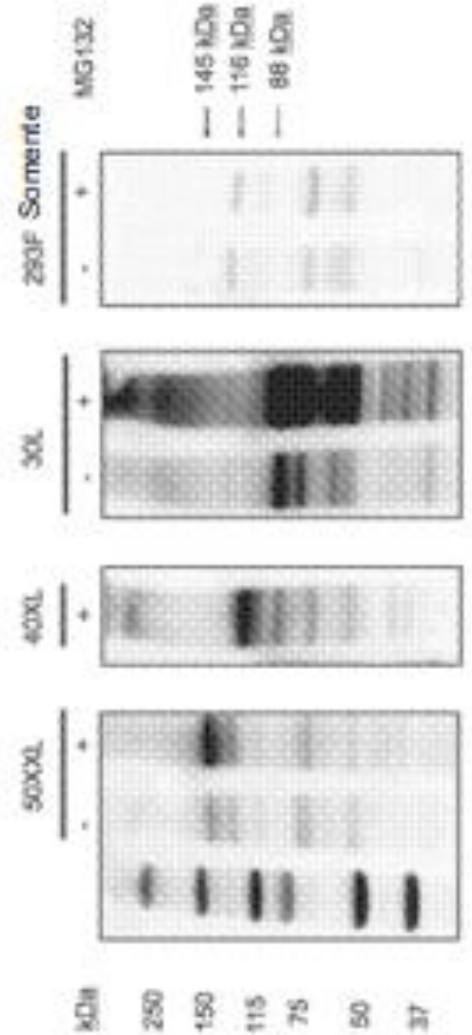

kDa
250
150
115
75
50
37
500XL
40XL
30L
293F Somente
MG132
145 kDa
116 kDa
88 kDa

FIG 30

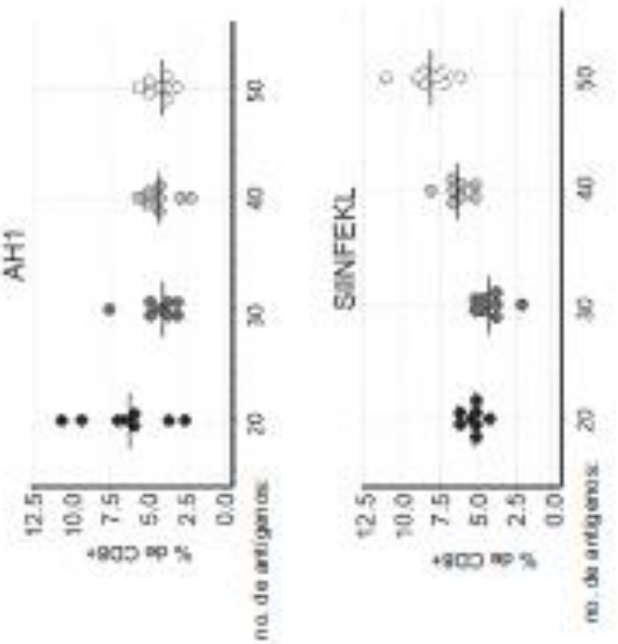

AH1
SIINFEKL
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
% de CD8+
0
10
20
30
40
50
no. de antígenos

FIG 31

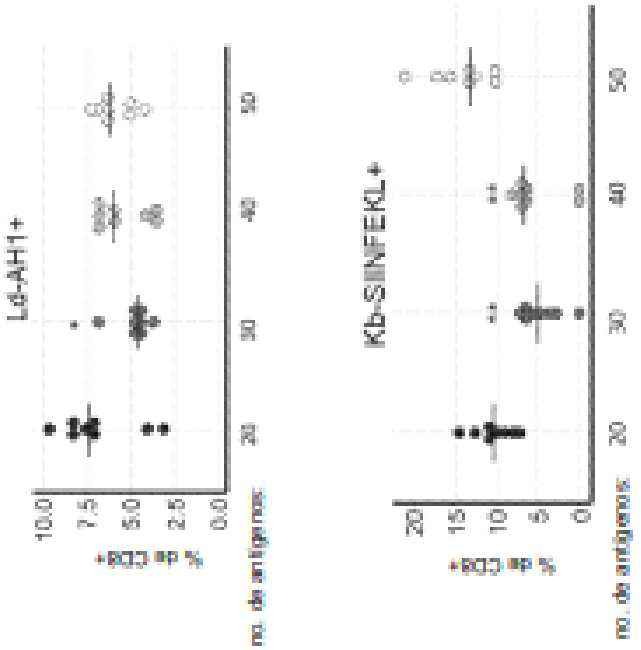
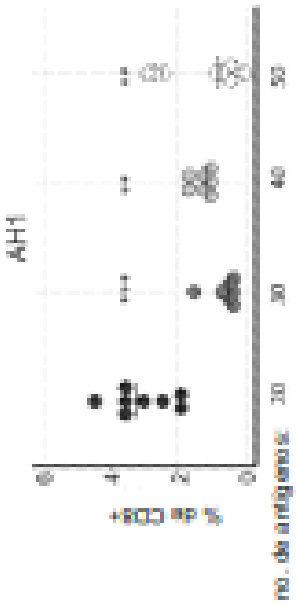

L6-AH1+
% de CD8+
no. de antígenos
Kb-SIINFEKL+
% de CD8+
no. de antígenos

FIG 32



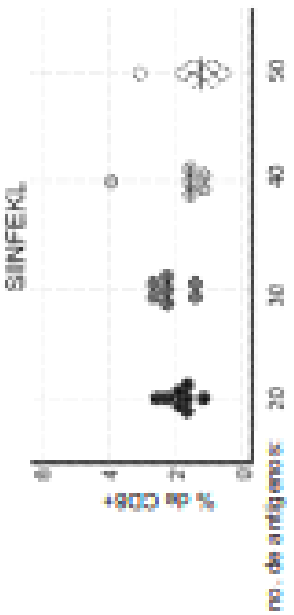


FIG 33

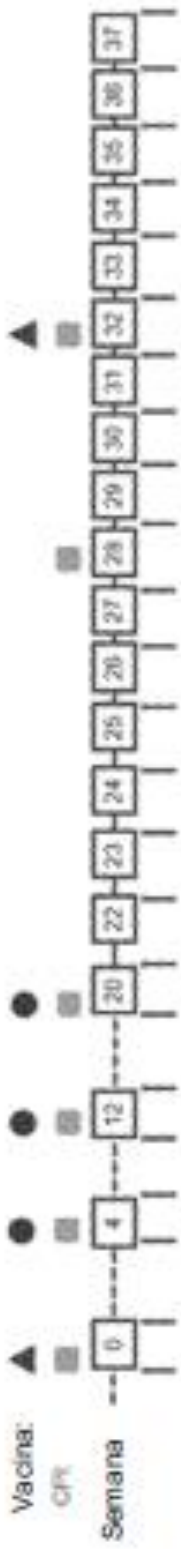

Vacina:
CPI
Semana
0
4
12
20
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

FIG 34

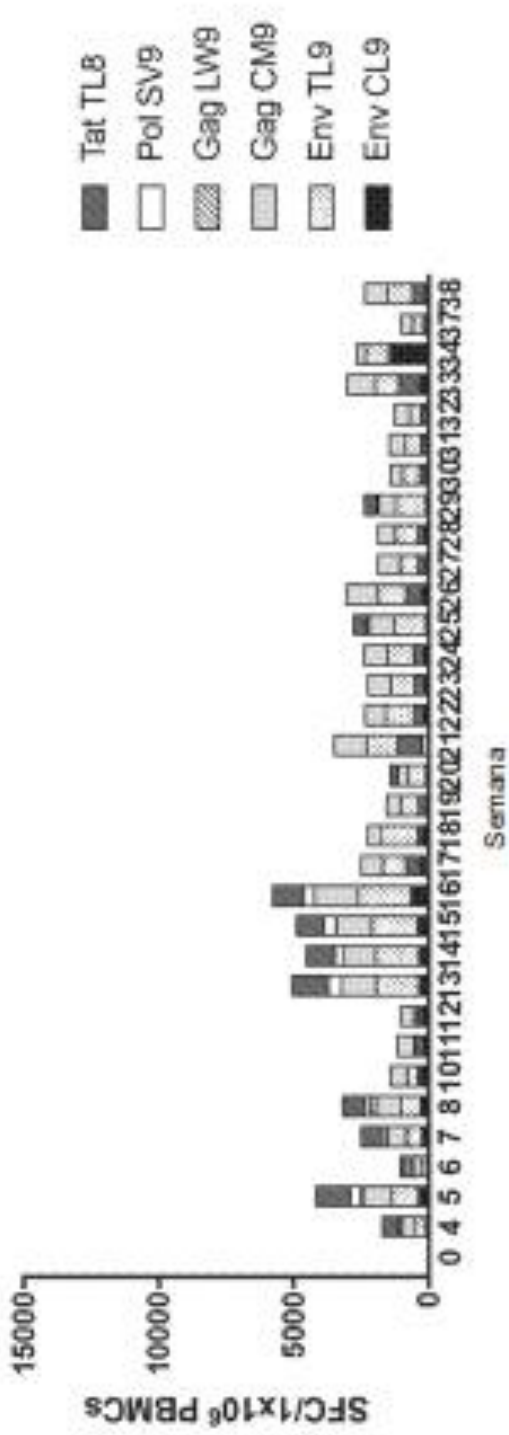

ChAdV
Tat TL8
Pol SV9
Gag LW9
Gag CM9
Env TL9
Env CL9
SFC/1x10⁶ PBMCs
15000
10000
5000
0
0 4 5 6 7 8 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 37 38
Semana

FIG 35

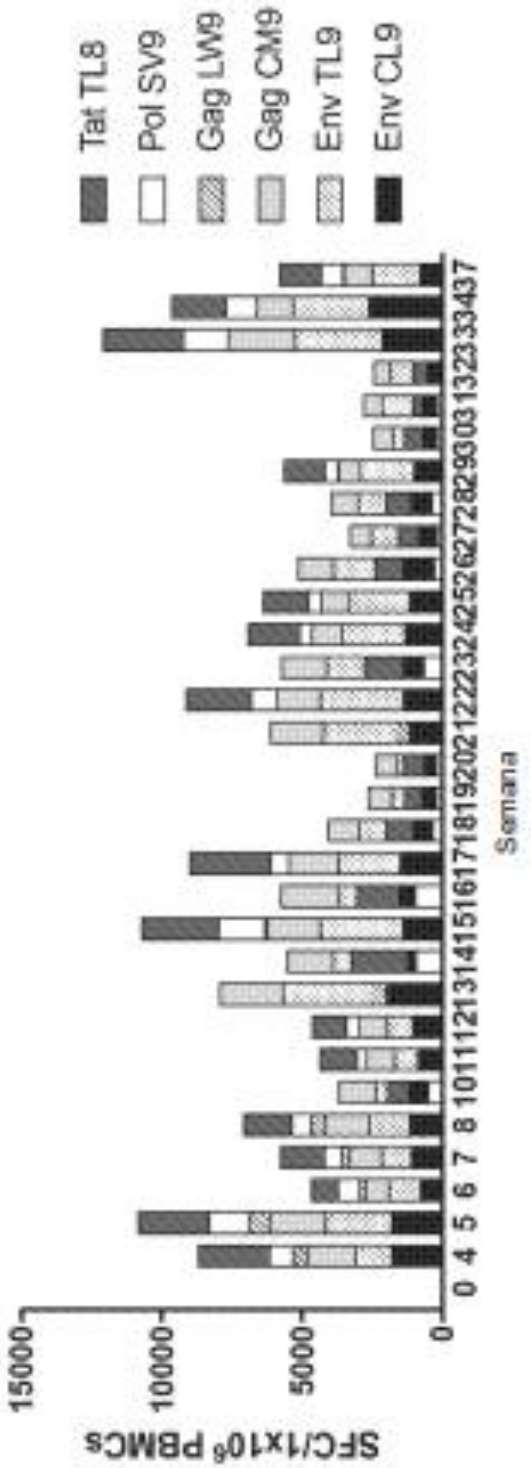

ChAdV + Ipi (IV)
Tat TL8
Pol SV9
Gag LW9
Gag CM9
Env TL9
Env CL9
SFC/1x10⁶ PBMCs
15000
10000
5000
0
0 4 5 6 7 8 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 37
Semana

FIG 36

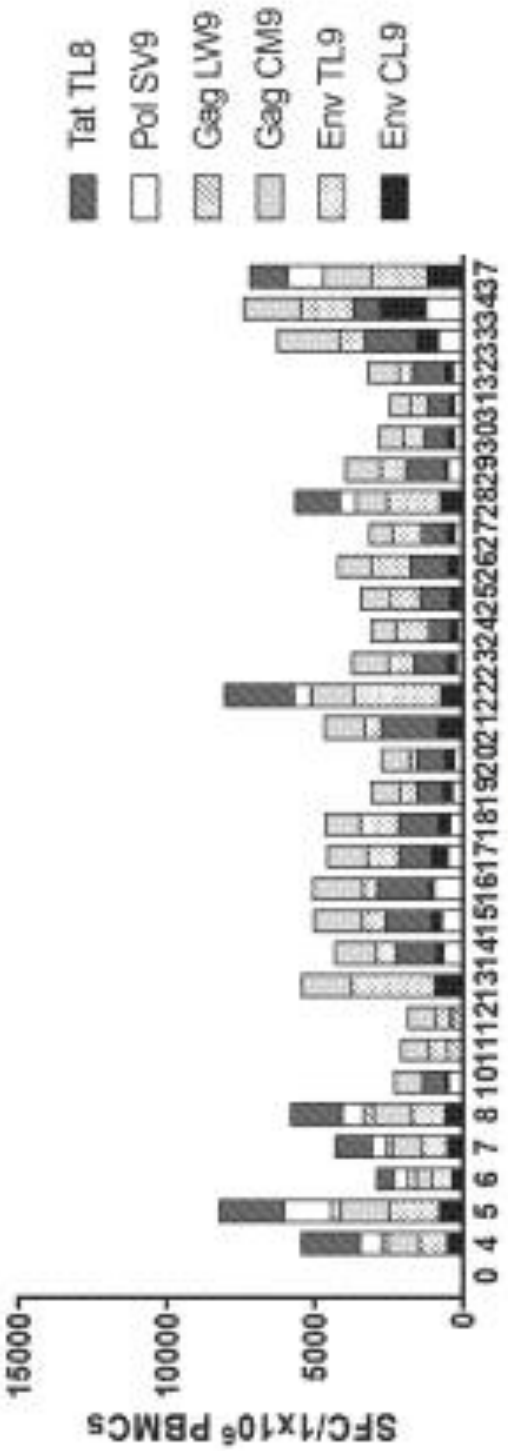

ChAdV + Ipi (SC)
Tat TL8
Pol SV9
Gag LW9
Gag CM9
Env TL9
Env CL9
SFC/1x10⁶ PBMCs
15000
10000
5000
0
0 4 5 6 7 8 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 37
Semana

FIG 37

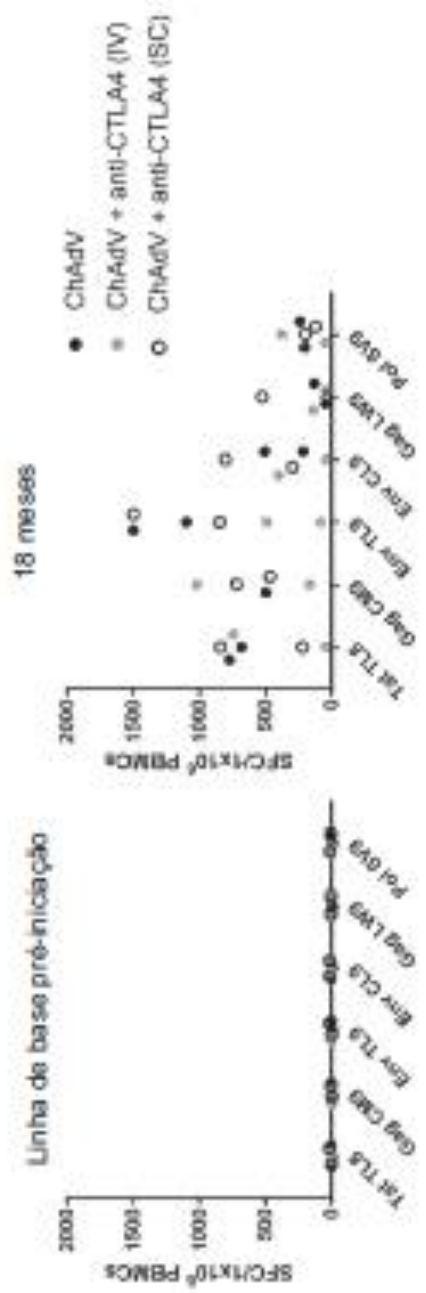

ChAdV
ChAdV + anti-CTLA4 (IV)
ChAdV + anti-CTLA4 (SC)
18 meses
Linha de base pré-inicação
SFC/1x10⁶ PBMCs
2000
1500
1000
500
0
Tak TLs
Gag CMB
Env TLs
Env CLs
Gag LWs
Pol 6Vs

FIG 38

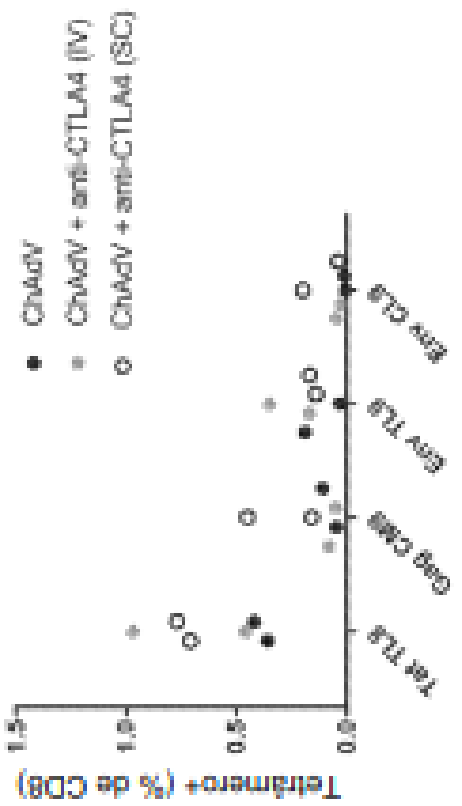

ChAdV
ChAdV + anti-CTLA4 (IV)
ChAdV + anti-CTLA4 (SC)
Tetrâmero+ (% de CD8)
1.5
1.0
0.5
0.0
Tet TL8
Gag CM8
Env TL8
Env CL8

FIG 39

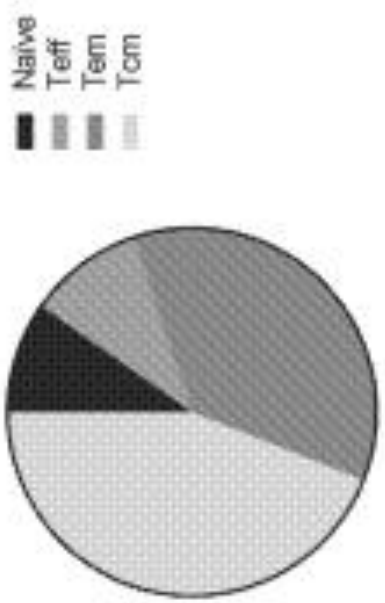


FIG 40

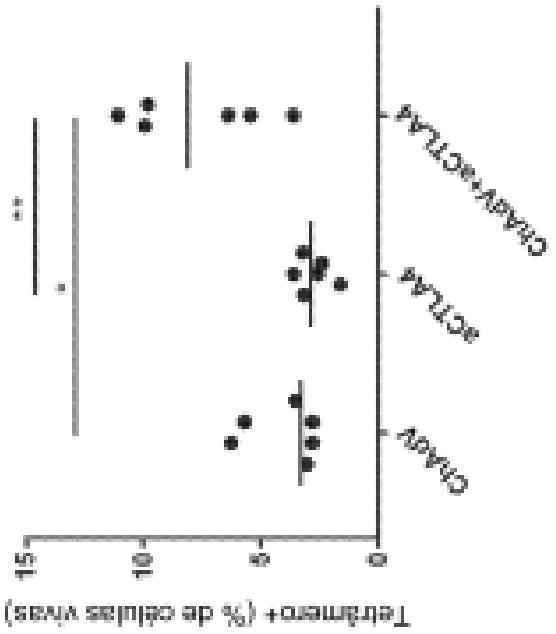

Tetrâmero+ (% de células vivas)
15
10
5
0
*
**
ChAdV
αCTLA4
ChAdV+αCTLA4

FIG 41

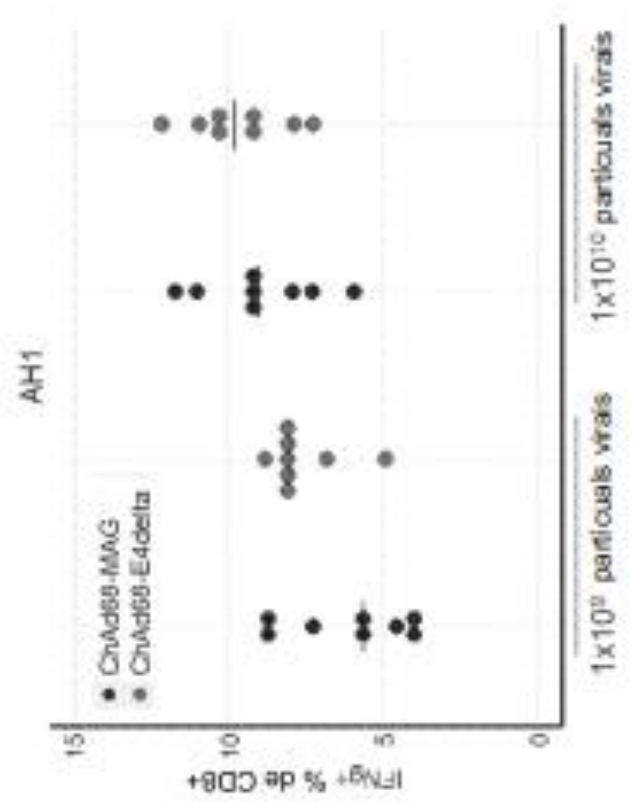

AH1
ChAd68-MAG
ChAd68-E4delta
IFNg+ % de CD8+
15
10
5
0
1x10¹⁰ partículas virais
1x10¹⁰ partículas virais

FIG 42A

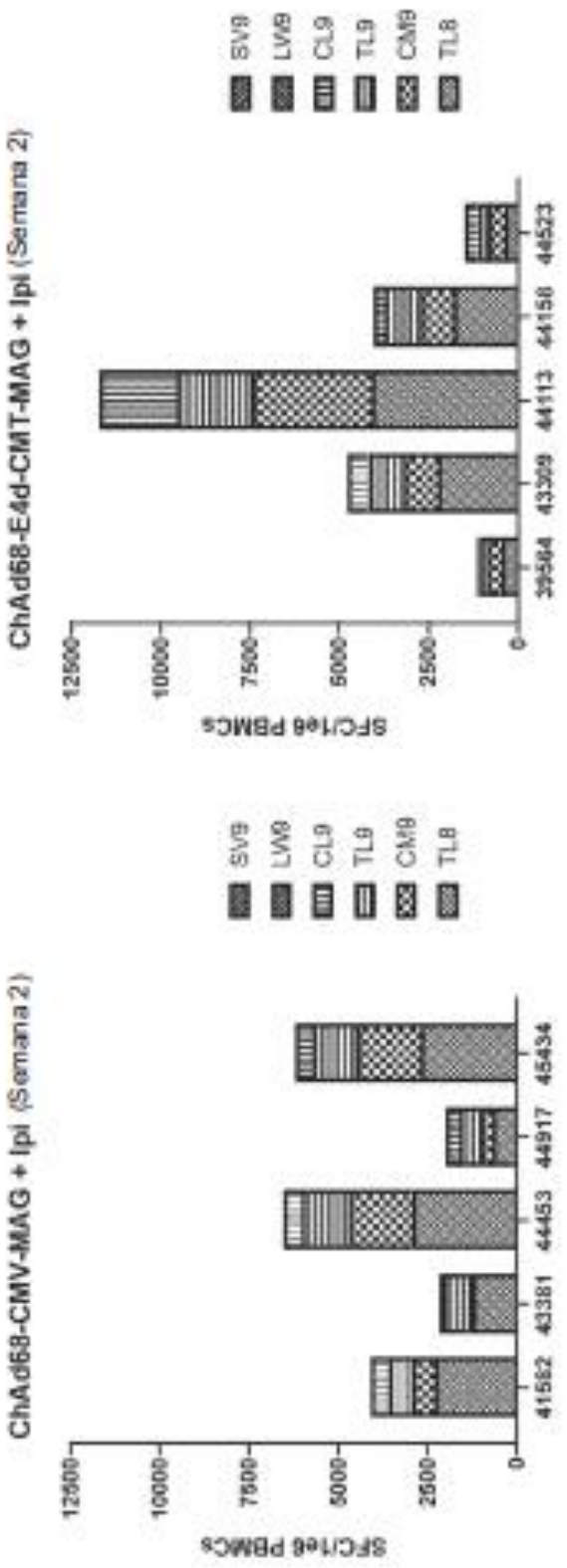

ChAd68-CMV-MAG + Ipi (Semana 2)
SFC/1e6 PBMCs
12500
10000
7500
5000
2500
0
41562
43381
44453
44917
45434
SV9
LV9
CL9
TL9
CM9
TL8
ChAd68-E4d-CMT-MAG + Ipi (Semana 2)
SFC/1e6 PBMCs
12500
10000
7500
5000
2500
0
39584
43309
44113
44158
44523
SV9
LV9
CL9
TL9
CM9
TL8

FIG 42B

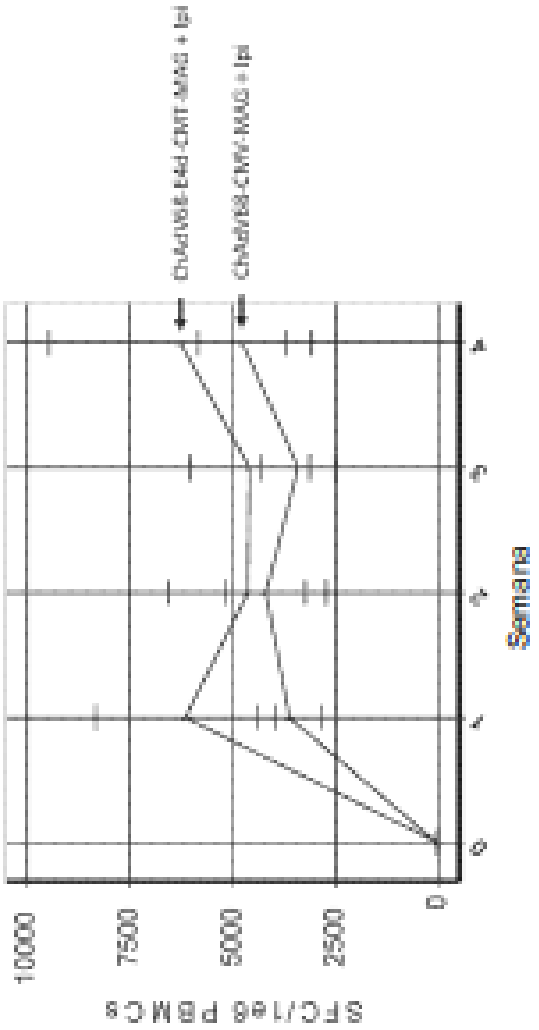

SFC/166 PBMCs
10000
7500
5000
2500
0
0
1
4
5
Semana
ChAdV68-E4d-CMT-MAG + IpI
ChAdV68-CMV-MAG + IpI

FIG 42C

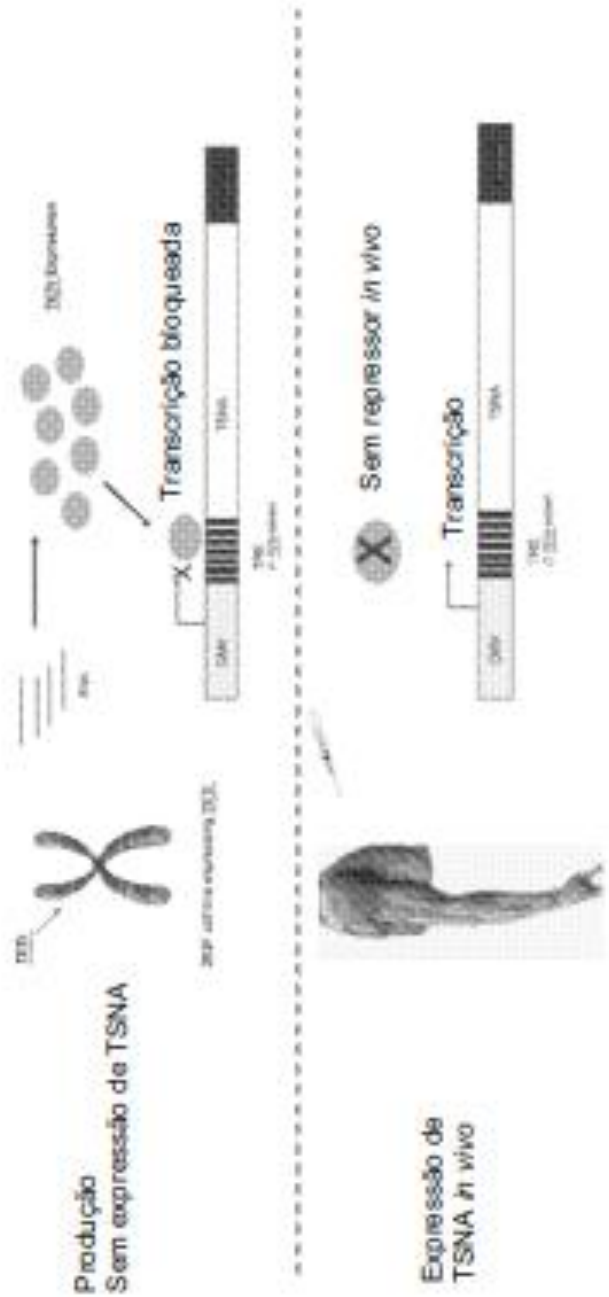

Produção
Sem expressão de TSNA
Transcrição bloqueada
Expressão de
TSNA in vivo
Sem repressor in vivo
Transcrição

FIG 43

Início (0)
Elemento de resposta de tetraciclina
Promotor reverso de CMV modificado
Cassete direcional
Região de resposta a "TETo"

FIG 44A

Início (0)
250
500
750
1000
promotor do CMV de comprimento total
operador do lac
operador do lac
Região de resposta a "CTM"

FIG 44B

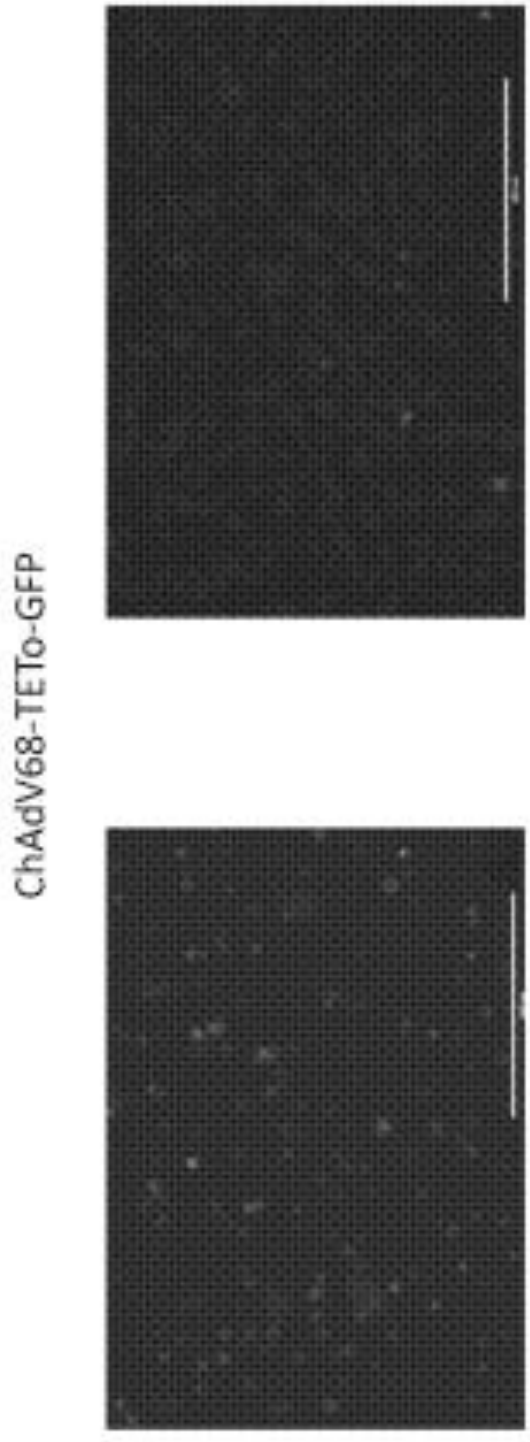

ChAdV68-TETo-GFP
Linha parental 293F
Clone 17 da linha TETr de 293F

FIG 45A

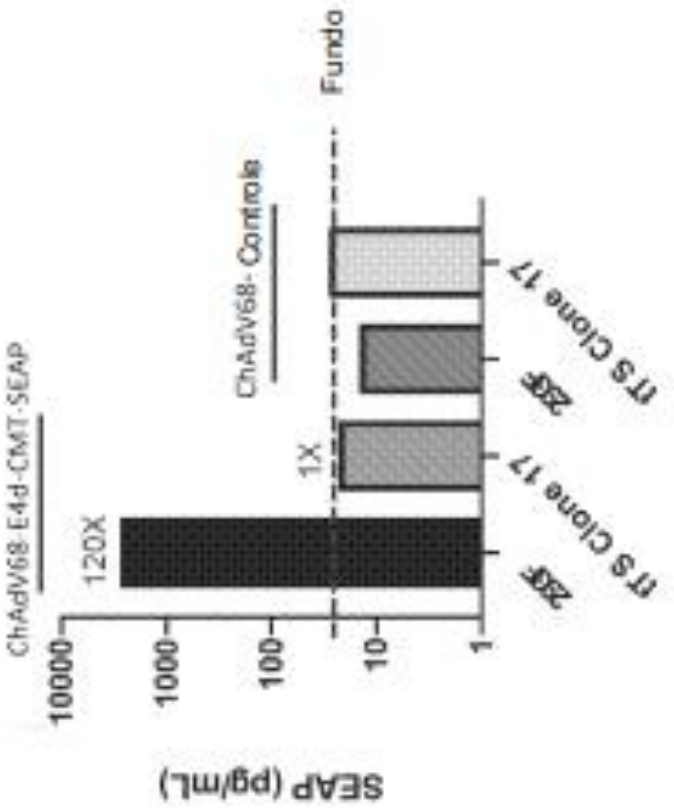

SEAP (pg/mL)
10000
1000
100
10
1
ChAdV68-E4d-CMT-SEAP
120X
1X
ChAdV68-Controle
Fundo
ITS Clone 17
ITS Clone 17

FIG 45B

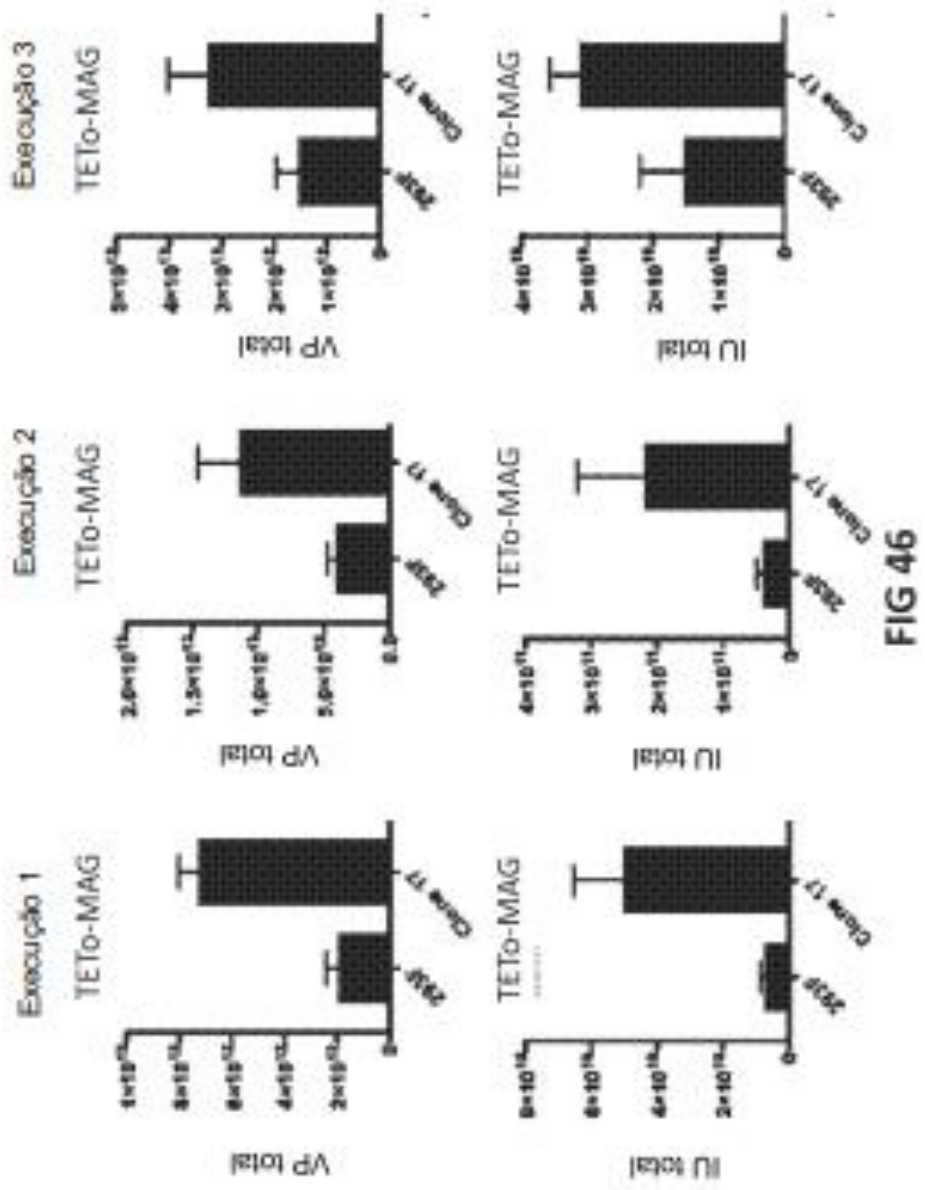

Execução 1
TETo-MAG
VP total
IU total
Execução 2
TETo-MAG
VP total
IU total
Execução 3
TETo-MAG
VP total
IU total

FIG 46

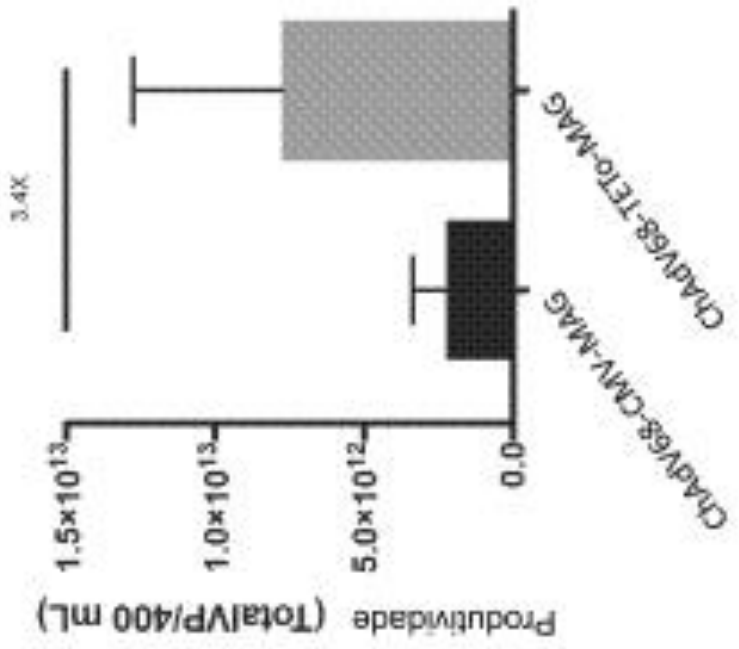

Produtividade (TotalVP/400 mL)
1.5×10^13
1.0×10^13
5.0×10^12
0.0
3.4X
ChAdV68-CMV-MAG
ChAdV68-TETo-MAG

FIG 47A

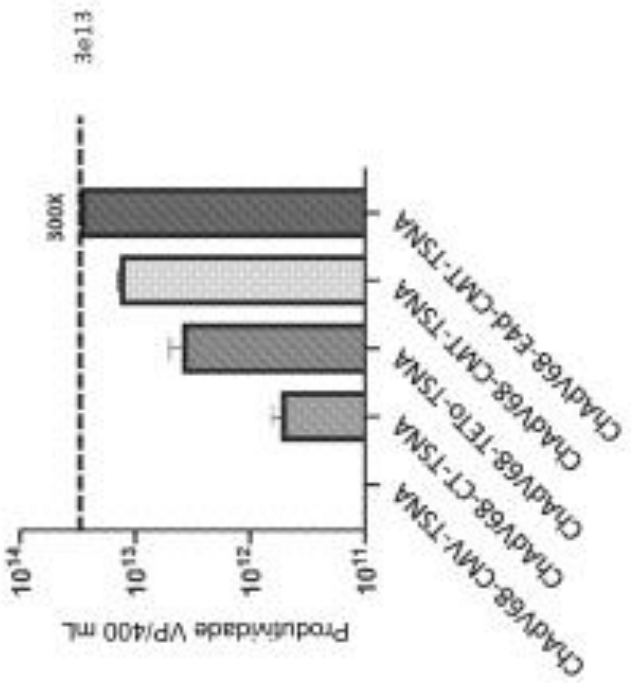

3e13
300X
10^{14}
10^{13}
10^{12}
10^{11}
Produtividade VP/400 mL
ChAdV68-CMV-TSNA
ChAdV68-CT-TSNA
ChAdV68-TET0-TSNA
ChAdV68-CMT-TSNA
ChAdV68-E4d-CMT-TSNA

FIG 47B

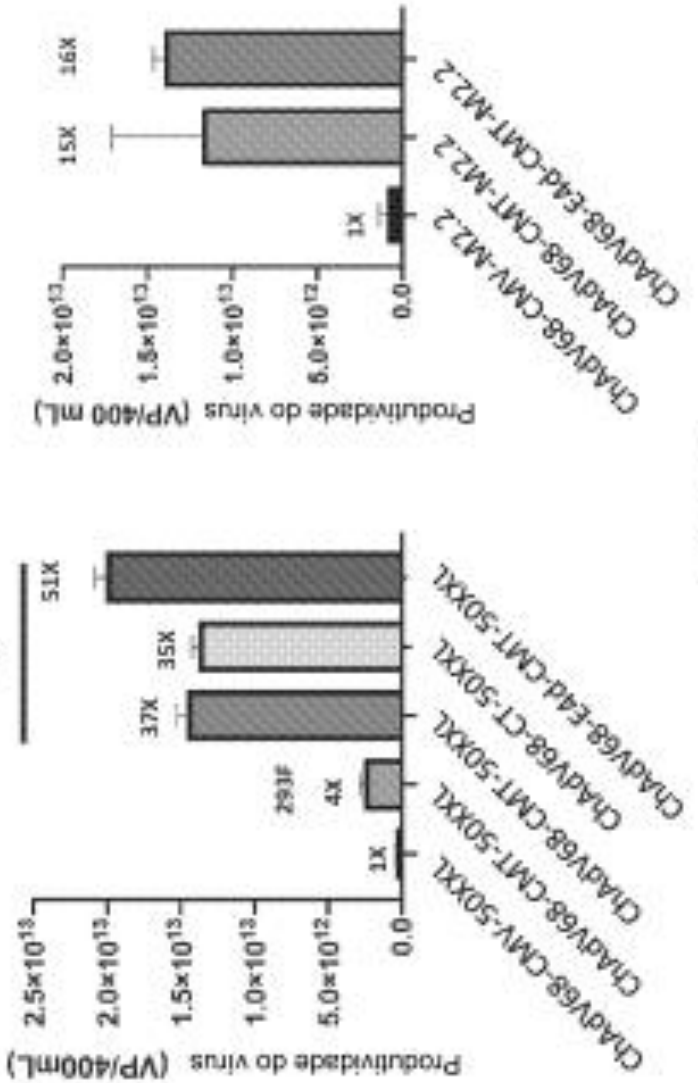

Produtividade do vírus (VP/400mL)
2.5×10^13
2.0×10^13
1.5×10^13
1.0×10^13
5.0×10^12
0.0
1X
4X
293F
37X
35X
51X
tTs
ChAdV68-CMV-50XL
ChAdV68-CMT-50XL
ChAdV68-CT-50XL
ChAdV68-CMT-50XL
ChAdV68-E4d-CMT-50XL
Produtividade do vírus (VP/400 mL)
2.0×10^13
1.5×10^13
1.0×10^13
5.0×10^12
0.0
1X
15X
16X
ChAdV68-CMV-M2.2
ChAdV68-CMT-M2.2
ChAdV68-E4d-CMT-M2.2

FIG 47C

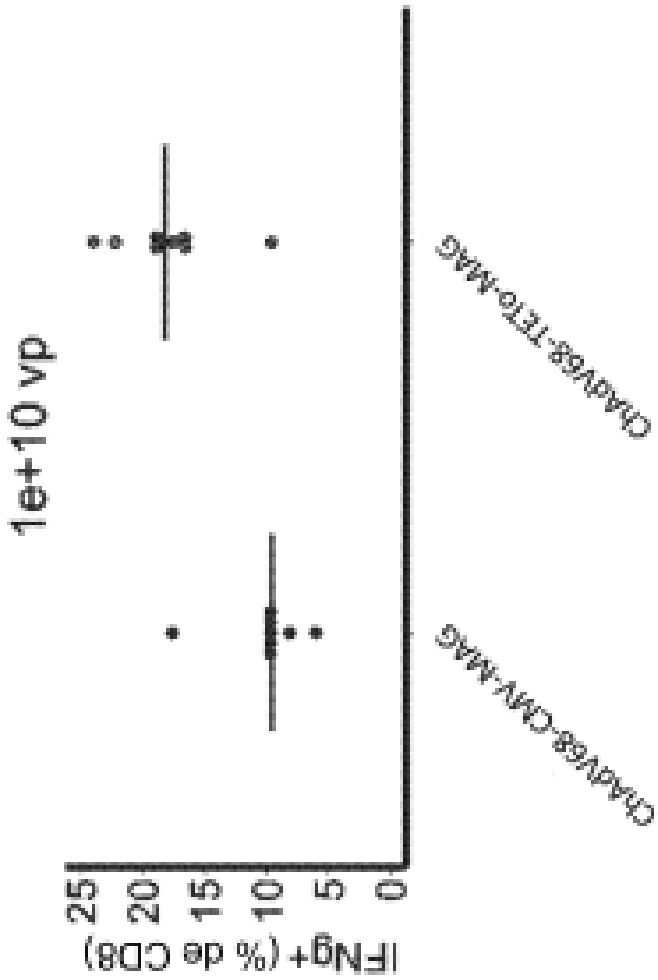

1e+10 vp
IFNg+ (% de CD8)
25
20
15
10
5
0
ChAdV68-CMV-MAG
ChAdV68-TETo-MAG

FIG 48

RESUMO

VETORES DE ADENOVÍRUS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO ISOLADA, CÉLULA ISOLADA, VETOR, KIT, USOS DE UM VETOR, MÉTODO PARA FABRICAR O VETOR, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM VÍRUS E VETOR VIRAL

São divulgadas aqui composições que incluem adenovírus modificados. Também são divulgados nucleotídeos, células e métodos associados às composições, incluindo seu uso como vacinas. Também são divulgados aqui vetores virais usando o sistema de promotor TET e métodos para produzir vírus tendo os mesmos.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1

Campo 2

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 2024_3884 - List Seq.txt
- Data de Geração do Código: 05/02/2024
- Hora de Geração do Código: 18:09:18
- Código de Controle:
  - Campo 1: AF0421C535622869
  - Campo 2: 2BB49C27A6B7A2D8