



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0048124

(51)^{2021.01} A61K 39/00; A61P 35/00; C12N 15/863; (13) B
C12N 15/62; C12N 15/861; A61K
39/395; C07K 16/28

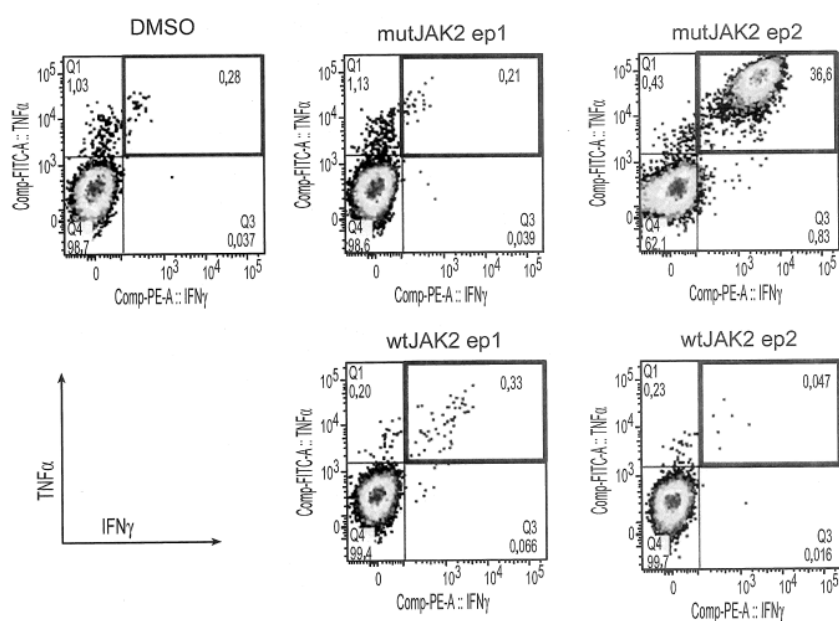
(21) 1-2022-03529 (22) 13/11/2020
(86) PCT/IB2020/060713 13/11/2020 (87) WO 2021/099906 27/05/2021
(30) 62/936,846 18/11/2019 US; 62/936,841 18/11/2019 US
(45) 25/07/2025 448 (43) 25/10/2022 415A
(73) JANSSEN BIOTECH, INC. (US)
800/850 Ridgeview Drive, Horsham, Pennsylvania 19044, United States of America
(72) ATTAR, Ricardo (US); DEHART, Jason (US); KHAN, Selina (DK); KRISHNA,
Vinod (US); LUM, Jenifer (US); MAINE, Christian (GB); SANDERS, Barbara
(NL); SEPULVEDA, Manuel Alejandro (CL); WILKINSON, Patrick (US); ZAHN,
Roland (DE).
(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) POLYNUCLEOTIT, VECTƠ BAO GỒM POLYNUCLEOTIT, VÀ DƯỢC PHẨM
BAO GỒM CHÚNG

(21) 1-2022-03529

(57) Sáng chế đề cập đến polypeptit và polynucleotit dựa trên trình tự CALR và JAK2 đột biến, vectơ, và dược phẩm. Polypeptit có ích trong các phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch và phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F hoặc CALR, hoặc cả hai đột biến exon 9 JAK2V617F và CALR, trong đó phương pháp này bao gồm nhiều nhiều đợt sử dụng của chế phẩm bất kỳ bao gồm polynucleotit, polypeptit hoặc vectơ được đề xuất trong bản mô tả này.

HÌNH 1



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vaccin, polypeptit và polynucleotit dựa trên trình tự calreticulin đột biến (CALR) và Janus Kinaza 2 (JAK2), vector, tế bào chủ, virut và phương pháp tạo ra và việc sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh ung thư tăng sinh tủy (MPN) cổ điển, còn được gọi là BCR-ABL-MPN, là bệnh thường gặp nhất trong số các rối loạn tăng sinh tủy. MPN đặc trưng bởi sản xuất quá mức các tế bào máu được biệt hóa giai đoạn cuối có đầy đủ chức năng. MPN cổ điển đã được phân loại thành ba dạng: bệnh đa hồng cầu (PV), bệnh tăng tiểu cầu tiền phát (ET) và bệnh xơ hóa tủy xương nguyên phát (PMF), có các biến chứng liên quan đến bệnh thường gặp, như là chứng huyết khối ở tĩnh mạch và động mạch, xuất huyết và chuyển thành bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (AML). Tất cả các dạng MPN đều phát sinh từ một tế bào gốc tạo máu (HSC) bị đột biến soma duy nhất, nhân rộng bằng dòng vô tính và làm tăng hầu như tất cả các tế bào dòng tủy, tế bào B và NK. Sự nhân rộng bằng dòng vô tính của MPN HSC đi kèm với sự tăng sản đơn hoặc đa dòng.

PV không chỉ đặc trưng bởi sự dư thừa hồng cầu quá mức và sự bao hàm dòng hồng cầu chiếm ưu thế mà còn có liên quan đến sự tăng sản khác nhau của các dòng tế bào nhân không lồ/bạch cầu hạt. ET đặc trưng bởi sự gia tăng số lượng tiểu cầu với tăng sản tế bào nhân không lồ, trong khi PMF là rối loạn không đồng nhất hơn, được xác định bởi sự có mặt của chứng xơ hóa tủy xương (cụ thể là thừa sợi collagen) và tăng sản tế bào nhân không lồ. Sự tăng sinh dòng tủy trong PMF ban đầu chiếm ưu thế trong tủy xương và sau đó mở rộng đến các vị trí ngoài tủy xương, như là lá lách. Chẩn đoán khi bệnh khởi phát thường gặp nhiều thách thức, nhưng bản sửa đổi năm 2016 của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) về tiêu chuẩn chẩn đoán MPN đang giúp cho việc xác định cả biểu hiện phân tử, lâm sàng và triệu chứng của MPN. Tuy nhiên, ở nhiều bệnh nhân, quán sát thấy được sự tiến triển của ET và PV thành chứng xơ hóa tủy xương thứ phát (MF). Hơn nữa, ranh giới giữa ba rối loạn này không thể được thiết lập rõ ràng, cụ thể là giữa ET và PMF. Do đó, các dạng chuyển tiếp có thể xuất hiện để mô tả các trạng thái

bệnh như PMF tiền xơ hóa (hoặc PMF sớm) mà thể hiện kiểu hình ET khi chẩn đoán với phương pháp mô học tủy xương thông thường, nhưng với xác suất tiến triển thành MF cao và tiên lượng xấu hơn so với ET thực sự.

Hơn 50% bệnh nhân MPN mang đột biến JAK2V617F. Ngoài ra, đột biến trên exon 9 của gen calreticulin (CALR) được tìm thấy ở khoảng 60% bệnh nhân mắc bệnh tăng tiểu cầu tiền phát (ET) kiểu đại JAK2 hoặc bệnh xơ hóa tủy xương nguyên phát (PMF).

Vào năm 2005, đột biến soma G thành T ở nucleotit 1849, trong Exon 14 của JAK2 đã được phát hiện. Đột biến này dẫn đến sự thay thế valin thành phenylalanin ở mã bộ ba 617 (V617F) trong miền giả kinaza (pseudokinaza) của JAK2. Đột biến này có thể được tìm thấy trong khoảng 70% bệnh ung thư tăng sinh tủy (MPN): 95% bệnh đa hồng cầu (PV) và từ 50% đến 60% ET và PMF. JAK2V617F thường trải qua quá trình chuyển đổi từ dị hợp tử sang đồng hợp tử do xảy ra sự tái tổ hợp trong quá trình phân bào dẫn đến việc mất bản sao vô tính của dị hợp tử dọc theo vùng có kích thước thay đổi trên nhánh ngắn của nhiễm sắc thể 9 (9pLOH). JAK2V617F phát sinh trong dạng nguyên bản tạo máu đa năng, có trong tất cả các dòng tủy và cũng có thể được phát hiện trong các tế bào lympho, chủ yếu là tế bào B và tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK), hiếm hơn và muộn hơn là trong bệnh ở tế bào T. JAK2V617F chủ yếu được giới hạn ở các bệnh MPN cổ điển, ngoại trừ bệnh thiếu máu dai dẳng với nguyên bào hồng cầu sắt vòng và chứng tăng tiểu cầu (RARS T). Tuy nhiên, JAK2V617F đã được phát hiện ở mức rất thấp (dưới 1%) trong dân số bình thường, kể cả ở trẻ sơ sinh. Đây là một trong những đột biến thường xuyên nhất được phát hiện trong quá trình tạo máu dòng vô tính liên quan đến quá trình lão hóa (tạo máu dòng vô tính có tiềm năng không xác định). Sự có mặt của đột biến JAK2V71F dẫn đến sự hoạt động chủ yếu của bộ phận cảm biến tín hiệu và chất hoạt hóa của quá trình truyền tín hiệu phiên mã (STAT), dẫn đến việc gia tăng sự tăng sinh tế bào, hoạt hóa và giải phóng autocrin/paracrin. Đột biến JAK2V617F cũng đã được xác định ở những bệnh nhân có chỉ định về tim mạch.

Vào năm 2013, đột biến dịch khung ở Exon 9 của gen CALR được xác định ở bệnh nhân mắc bệnh tăng tiểu cầu tiền phát (ET) và bệnh xơ hóa tủy xương nguyên phát (PMF) mà âm tính với đột biến V617F trong gen JAK2 (JAK2V617F) và đột biến ở gen thụ thể thrombopoietin (MPL). Hơn 50 đột biến dịch khung đã được xác định, với > 85% dẫn đến phần đuôi ở đầu C của đột biến amino axit 44 giống nhau. Sự đột biến của

phần đuôi ở đầu C loại bỏ mô-tip KDEL (SEQ ID NO: 55) dẫn đến mất khả năng lưu giữ và chuyển vị trí của lưới nội chất (ER) tới màng ở bề mặt tế bào. Ngoài ra, phiên bản đột biến của CALR có phần đuôi ở đầu C mang điện tích dương làm gián đoạn liên kết Ca^{2+} và làm hạn chế chức năng tiêu chuẩn. Hai đột biến CALR thường gặp nhất tương ứng với mất đoạn 52 bp (p.L367fs*46), còn được gọi là Loại 1 và chèn đoạn 5 bp (p.K385fs * 47), còn được gọi là Loại 2. Có sự khác biệt lớn về tần suất giữa các đột biến Loại 1 và Loại 2 trong ET và PMF: ở ET, các đột biến Loại 1 và Loại 2 được phân bố chẵn chẻ (55% so với 35%), trong khi ở PMF, Loại 1 chủ yếu chiếm ưu thế (75% so với 15%). Nhìn chung, những kết quả này chỉ ra rằng CALR đột biến là sự thúc đẩy gây ung thư và CALRmut gây ra sự biến đổi thông qua con đường tín hiệu MPL-JAK2-STAT.

Bệnh nhân MPN có gánh nặng triệu chứng cao, các biến chứng đe dọa tính mạng và nguy cơ tiến triển thành bệnh bạch cầu cấp tính đồng thời có các lựa chọn điều trị hạn chế. Phương pháp điều trị cho bệnh nhân MPN tốt nhất được chia thành các loại quan sát, liệu pháp y tế và cấy ghép tế bào gốc dị sinh (allo-SCT). Bản thân các liệu pháp y tế thuộc các loại tác nhân làm giảm khối u, chất ức chế JAK đơn tác nhân và tác nhân điều hòa miễn dịch interferon (IFN)- α . Tiêu chuẩn chăm sóc hiện tại, và chỉ những liệu pháp được chấp thuận, đặc biệt cho bệnh nhân MPN, là chất ức chế JAK1/2 phân tử nhỏ JAKAFI® (ruxolitinib). JAKAFI® (ruxolitinib) là loại thuốc đầu tiên được cơ quan thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) phê duyệt để điều trị bệnh PMF nguy cơ trung bình đến cao và bệnh xơ hóa tủy xương sau bệnh đa hồng cầu (PPV-MF) và bệnh xơ hóa tủy xương sau bệnh tăng tiểu cầu tiền phát (PET-MF) nhưng cũng đã được chấp thuận cho cả nhóm bệnh nhân PV và bệnh nhân mắc bệnh phần cấy ghép chống lại ký chủ (GVHD) gần đây hơn. Hiệu quả được xác minh trong các nghiên cứu COMFORT-I và COMFORT-II và đã cho thấy kích thước lá lách giảm đáng kể là tiêu chí chính. Tuy nhiên, việc ngừng thuốc do mất đáp ứng, do tiến triển của bệnh và do các tác dụng phụ xuất hiện liên quan đến điều trị ở khoảng 50% bệnh nhân sau 3 năm và 75% sau 5 năm. Liệu pháp JAKAFI® (ruxolitinib) cũng có liên quan đến việc tăng nguy cơ gây ra u lympho dòng tế bào B ở bệnh nhân MF. Thật vậy, trong một nghiên cứu trên 107 bệnh nhân MF đã ngừng điều trị bằng JAKAFI® (ruxolitinib), toàn bộ thời gian sống thêm trung bình chỉ là 14 tháng. Mặc dù có một số ít bệnh nhân có thể nhận được lợi ích về

khả năng sống sót khi sử dụng JAKAFI® (ruxolitinib), phần lớn bệnh nhân MPN vẫn tiếp tục tiến triển bệnh của họ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất polypeptit bao gồm ít nhất hai hoặc nhiều trình tự quyết định kháng nguyên trong số các trình tự sau: quyết định kháng nguyên Janus kinaza 2 (JAK2) có SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV), quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5. (VLNYGVCFC), quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 4 (KLSHKH LVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG), quyết định kháng nguyên calreticulin (CALR) có SEQ ID NO: 1 (MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTTRRKMRKMSPARPRTSCREACL QGWTE) và quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRRMMRTK).

Sáng chế cũng đề xuất polypeptit bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit có SEQ ID NO: 6. Theo một số phương án, polypeptit bao gồm 2, 3, 4, 5, hoặc nhiều hơn 5 đoạn lặp có SEQ ID NO: 6 được phân tách bằng trình tự cầu nối như là AAY, RR hoặc DPP, HHAA (SEQ ID NO: 56), HHA, HHL, RKSYL (SEQ ID NO: 57), RKS Y (SEQ ID NO: 58), SSL hoặc REKR (SEQ ID NO: 59).

Sáng chế cũng đề xuất polypeptit có SEQ ID NO: 28 (FCGDENILVAA YFCGDENILV) bao gồm hai polypeptit có SEQ ID NO: 6 được liên kết bằng trình tự cầu nối phi tự nhiên AAY.

Sáng chế cũng đề xuất polynucleotit mã hóa cho polypeptit được đề xuất trong bản mô tả này và vector bao gồm polynucleotit mã hóa cho polypeptit được đề xuất trong bản mô tả này.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch và các phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F hoặc CALR, hoặc cả hai đột biến exon 9 JAK2V617F và CALR, bao gồm việc sử dụng polynucleotit, polypeptit hoặc vector bất kỳ được bộc lộ trong tài bản mô tả này cho đối tượng có nhu cầu về chúng.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch và phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình

trạng lâm sàng đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F hoặc CALR, hoặc cả hai đột biến exon 9 JAK2V617F và CALR, trong đó phương pháp này bao gồm nhiều nhiều đợt sử dụng của chế phẩm bất kỳ bao gồm polynucleotit, polypeptit hoặc vectơ được đề xuất trong bản mô tả này.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng kháng thể kháng CTLA-4, kháng thể kháng PD-1 hoặc kháng thể kháng PD-L1 kết hợp với chế phẩm bất kỳ bao gồm polynucleotit, polypeptit hoặc vectơ được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch và các phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F hoặc CALR, hoặc cả hai đột biến exon 9 JAK2V617F và CALR, trong đó phương pháp này bao gồm việc sử dụng hai hoặc nhiều đợt sử dụng cho đối tượng cần đến vectơ chứa polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV), quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5(VLNYGVCFC), quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1 (MKDKQDEEQRTTRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRKMSPARPRTSCRE ACLQGWTE) và quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRRMMRTK); trong đó, vectơ là Ad26, GAd20, MVA hoặc ARN tự sao chép.

Theo một số phương án, phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch và các phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F hoặc CALR, hoặc cả hai đột biến exon 9 JAK2V617F và CALR, bao gồm việc sử dụng hai hoặc nhiều đợt sử dụng cho đối tượng cần đến vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit bao gồm hai hoặc nhiều phần lặp lại có SEQ ID NO: 6; trong đó, vectơ là Ad26, GAd20, MVA hoặc ARN tự sao chép.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh tăng sinh tủy ở đối tượng, trong đó phương pháp này bao gồm việc sử dụng hai hoặc nhiều đợt sử dụng cho đối tượng cần đến vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV), quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5(VLNYGVCFC), quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1 (MKDKQDEEQRTTRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRKMSPARPRTSCREAC

LQGWTE) và quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRMMRTK); trong đó, vector là Ad26, GAd20, MVA hoặc ARN tự sao chép.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

HÌNH 1 minh họa đáp ứng của tế bào T của mẫu hiến tặng JAK2 V617F + HLA A02: 01+ MPN đối với các quyết định kháng nguyên mutJAK2 lớp I 1 và 2.

HÌNH 2 thể hiện phương pháp nhuộm cytokin nội bào bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy đối với đáp ứng IFN- γ /TNF- α từ cả tế bào T CD4+ và CD8+. Tế bào tua bình thường của người hiến đã được lây nhiễm vector adenovirus 26 chứa vector trống hoặc polynucleotit mã hóa cho LS_CALR.JAK2 2X9mer có SEQ ID NO: 10. Tế bào T CD4/CD8 tự thân được thêm vào tế bào tua 24 giờ sau khi lây nhiễm. Tế bào tua và tế bào T được đồng nuôi cấy trong 11 ngày và được kích thích lại bằng nhóm các peptit mutCALR đặc hiệu.

HÌNH 3 minh họa phương pháp nhuộm cytokin nội bào bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy đối với đáp ứng IFN- γ /TNF- α từ tế bào T CD8+. Tế bào tua bình thường của mẫu hiến tặng đã được lây nhiễm vector adenovirus 5 chứa vector trống hoặc polynucleotit mã hóa cho LS_CALR/JAK2 2X9mer có SEQ ID NO: 10. Tế bào T CD8 tự thân được thêm vào tế bào tua 24 giờ sau khi lây nhiễm. Tế bào tua và tế bào T được đồng nuôi cấy trong 11 ngày và được kích thích lại bằng các peptit 9mer đặc hiệu với một trong hai quyết định kháng nguyên muJAK2 1 (SEQ ID NO: 5) hoặc quyết định kháng nguyên muJAK2 2 (SEQ ID NO: 6).

HÌNH 4 minh họa phương pháp nhuộm cytokin nội bào bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy đối với đáp ứng IFN- γ /TNF- α từ tế bào T CD8+. Tế bào tua bình thường của mẫu hiến tặng được lây nhiễm vector adenovirus 5 chứa vector trống hoặc polynucleotit mã hóa cho LS_CALR.JAK2-30mer (SEQ ID NO: 11). Tế bào T CD8 tự thân được thêm vào tế bào tua 24 giờ sau khi lây nhiễm. Tế bào tua và tế bào T được đồng nuôi cấy trong 11 ngày và được kích thích lại bằng các peptit 9mer đặc hiệu với một trong hai quyết định kháng nguyên mutJAK2 1 (SEQ ID NO: 5) hoặc quyết định kháng nguyên 2 (SEQ ID NO: 6).

HÌNH 5 minh họa đáp ứng IFN- γ ELISpot trong tế bào đơn nhân lách từ chuột C57BL/6 hoặc Balb/c được tạo miễn dịch IM bằng Ad26HEME001 (LS_CALR_JAK2-

30mer, SEQ ID NO: 11) (n=8/nhóm) hoặc Ad26.Empty (n=4) với liều 10^{10} VP, vào 2 tuần sau khi tạo miễn dịch. Tế bào đơn nhân lách được kích thích qua đêm với một nhóm 15-mer peptit kéo dài trình tự HEME001. Số lượng IFN- γ SFU trên 10^6 tế bào đơn nhân lách được xác định bởi ELISpot. Đáp ứng trung bình cho mỗi nhóm được biểu thị bằng đường nằm ngang. Các đường nét đứt biểu thị trạng thái của của xét nghiệm được xác định là 95% phân vị của SFU được quan sát thấy trong các tế bào đơn nhân lách không được kích thích (43 SFU/ 10^6 tế bào). Phân tích thống kê được thực hiện bằng thử nghiệm Wilcoxon Rank Sum, các giá trị dưới 43 SFU/ 10^6 tế bào được thiết lập đến ngưỡng này. VP, hạt virus; LOD, giới hạn phát hiện.

HÌNH 6 minh họa đáp ứng IFN- γ ELISpot trong tế bào đơn nhân lách từ chuột C57BL/6 hoặc Balb/c được tạo miễn dịch IM bằng Ad26HEME002 (LS_CALR_JAK2-2x9mer, SEQ ID NO: 10) (n=8/nhóm) hoặc Ad26.Empty (n=4) với liều 10^{10} VP, vào 2 tuần sau khi tạo miễn dịch. Tế bào đơn nhân lách được kích thích qua đêm với một nhóm 15-mer peptit kéo dài trình tự HEME002. Số lượng IFN- γ SFU trên 10^6 tế bào đơn nhân lách được xác định bởi ELISpot. Đáp ứng trung bình cho mỗi nhóm được biểu thị bằng đường nằm ngang. Các đường nét đứt biểu thị trạng thái của của xét nghiệm được xác định là 95% phân vị của SFU được quan sát thấy trong các tế bào đơn nhân lách không được kích thích (43 SFU/ 10^6 tế bào). Phân tích thống kê được thực hiện bằng thử nghiệm Wilcoxon Rank Sum, các giá trị dưới 43 SFU/ 10^6 tế bào được thiết lập đến ngưỡng này. VP, hạt virus; LOD, giới hạn phát hiện.

HÌNH 7 minh họa đáp ứng IFN- γ ELISpot trong tế bào đơn nhân lách từ chuột C57BL/6 được tạo miễn dịch IM bằng Ad26HEME002 (LS_CALR_JAK2-2x9mer, SEQ ID NO: 10), MVA-HCalJ-9.9 (TCE_CALR_JAK2-2x9mer, SEQ ID NO: 26), hoặc Ad26.Empty (n = 10/nhóm, ngoại trừ Nhóm 1 [MVA-HCalJ-9.9] có 5 con chuột và Nhóm 10 [Ad26.Empty] có 3 con chuột). Ở tuần thứ 4, các tế bào đơn nhân lách được kích thích qua đêm với một nhóm peptit nối dài trình tự Ad26HEME002. Số lượng IFN- γ SFU trên 10^6 tế bào đơn nhân lách được xác định bởi ELISpot. Đáp ứng trung bình nhân cho mỗi nhóm được biểu thị bằng đường nằm ngang. Các đường nét đứt trong đồ thị biểu thị trạng thái của của xét nghiệm được xác định là 95% phân vị của SFU được quan sát thấy trong các tế bào đơn nhân lách không được kích thích. Để thử nghiệm sự khác biệt, so sánh giữa sự tạo miễn dịch chỉ bằng đoạn mồi Ad26HEME002 với đoạn mồi Ad26HEME002 và tăng cường với MVA-HCalJ-9.9, ANOVA đã được thực hiện

trên dữ liệu ELISpot được chuyển đổi \log_{10} . Các giá trị dưới 52 SFU/10⁶ tế bào được thiết lập là ngưỡng giới hạn. Các cột nằm ngang tương ứng với giá trị trung bình của mỗi nhóm. Gr: nhóm.

HÌNH 8 minh họa đáp ứng IFN- γ ELISpot trong tế bào đơn nhân lách từ chuột C57BL/6 được tạo miễn dịch IM bằng Ad26HEMEO02 (LS_CALR_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 10), MVA-HCalJ-9.9 (TCE_CALR_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 26), hoặc Ad26.Empty (n = 10/nhóm, ngoại trừ Nhóm 1 [MVA-HCalJ-9.9] có 5 con chuột và Nhóm 4 [Ad26.Empty] có 3 con chuột). Ở tuần thứ 4, các tế bào đơn nhân lách được kích thích qua đêm với một nhóm peptit nối dài trình tự CALRmut. Số lượng IFN- γ SFU trên 10⁶ tế bào đơn nhân lách được xác định bởi ELISpot. Đáp ứng trung bình nhân cho mỗi nhóm được biểu thị bằng đường nằm ngang. Các đường nét đứt trong đồ thị biểu thị trạng thái của của xét nghiệm được xác định là 95% phân vị của SFU được quan sát thấy trong các tế bào đơn nhân lách không được kích thích. Để thử nghiệm sự khác biệt, so sánh giữa sự tạo miễn dịch chỉ bằng đoạn mồi Ad26HEMEO02 với đoạn mồi Ad26HEMEO02 và tăng cường với MVA-HCalJ-9.9, ANOVA đã được thực hiện trên dữ liệu ELISpot được chuyển đổi \log_{10} . Các giá trị dưới 52 SFU/10⁶ tế bào được thiết lập là ngưỡng giới hạn. Các cột nằm ngang tương ứng với giá trị trung bình của mỗi nhóm. Gr: nhóm.

HÌNH 9 minh họa đáp ứng IFN- γ ELISpot trong tế bào đơn nhân lách của chuột Balb/c đã được tạo miễn dịch IM bằng Ad26HEMEO02 (LS_CALR_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 10), MVA-HCalJ-9.9 (TCE_CALR_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 26), hoặc Ad26.Empty (n = 8/nhóm). Ở tuần thứ 4, các tế bào đơn nhân lách được phân lập và được kích thích qua đêm với một nhóm peptit nối dài trình tự HEMEO02. Số lượng IFN- γ SFU trên 10⁶ tế bào đơn nhân lách được xác định bởi ELISpot. Đáp ứng trung bình cho mỗi nhóm được biểu thị bằng đường nằm ngang. Mỗi điểm dữ liệu riêng biệt được trừ đi giá trị nền bằng cách sử dụng các tế bào đơn nhân lách không được kích thích qua đêm với peptit để đánh giá SFU ban đầu/10⁶ tế bào đơn nhân lách. Để thử nghiệm sự khác biệt, so sánh giữa sự tạo miễn dịch chỉ bằng đoạn mồi Ad26HEMEO02 với đoạn mồi Ad26HEMEO02 và tăng cường với MVA-HCalJ-9.9, là thử nghiệm t độc lập với hiệu chỉnh Welches (SD không bằng nhau) đã được chạy để đánh giá ý nghĩa thống kê. SFU: đơn vị tạo điểm; Ad trống: Ad26.Empty; Chỉ MVA: MVA-HCalJ-9.9

(TCE_CALR_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 26); Ad: Ad26HEME002 (LS_CALR_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 10).

HÌNH 10 minh họa động học cảm ứng tế bào T đặc hiệu với HEME002 ở người sản xuất IFN- γ ở loài linh trưởng không phải người được tạo miễn dịch bằng Ad26HEME002, LS_CALR_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 10 (Ad) và/hoặc MVA-HCalJ-9.9 TCE_CALR_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 26 (MVA) một mình hoặc kết hợp với YERVOY® (ipilimumab) (Ipi) theo thời gian được đo bằng ELISpot. Các đáp ứng của tế bào T đặc hiệu với HEME002 ở người trên 10^6 PBMC được đo theo thời gian. Độ dương tính của xét nghiệm được xác định là SFU/ 10^6 tế bào của đáp ứng được trừ đi giá trị nền >50 SFU/ 10^6 tế bào và SFU/ 10^6 tế bào của đáp ứng được trừ đi giá trị nền $>2 \times$ đáp ứng trung bình. Giá trị không đạt tiêu chuẩn dương tính của xét nghiệm được điều chỉnh thành 50 SFU/ 10^6 tế bào. Dữ liệu được chuyển đổi \log_{10} được thể hiện. Đường nét đứt phía dưới được thiết lập ở 50 SFU/ 10^6 tế bào và tương ứng với LOD, trong khi đường nét đứt phía trên được thiết lập ở 2.000 SFU/ 10^6 tế bào và tương ứng với ULOQ. Các điểm mũi tên chỉ thời gian tạo miễn dịch cho mỗi nhóm. Các cột mũi tên là độ lệch chuẩn. LOD: giới hạn phát hiện dưới; ULOQ: giới hạn định lượng trên; Gr: Nhóm. Các nhóm từ phía trên cùng của biểu đồ: Dòng trên cùng: Gr4; dòng thứ hai từ dòng trên cùng: Gr3, dòng thứ ba từ dòng trên cùng: Gr2, dòng thứ tư từ dòng trên cùng: Gr1.

HÌNH 11 minh họa sự cảm ứng của tế bào T đặc hiệu với HEME002 sản xuất IFN- γ ở linh trưởng không phải người được tạo miễn dịch bằng Ad26HEME002, LS_CALR_JAK2-2x9mer, SEQ ID NO: 10 (Ad) và/hoặc MVA-HCalJ-9.9 TCE_CALR_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 26 (MVA) một mình hoặc kết hợp với YERVOY® (ipilimumab) (Ipi) mỗi nhóm ở tuần -2 của nghiên cứu. Sản xuất IFN- γ được đánh giá bằng ELISpot. Các giá trị được thể hiện đã trừ đi giá trị nền và giá trị dưới 50 SFU/ 10^6 tế bào được thiết lập thành giá trị đó (được biểu thị bằng các ký hiệu màu đen mở). Các động vật có đáp ứng ở mức nền cao >150 SFU/ 10^6 tế bào được biểu thị bằng biểu tượng màu xám. Cột biểu thị trung bình của nhóm. Phân tích thống kê được thực hiện trên tập dữ liệu hoàn chỉnh bằng cách sử dụng mô hình Tobit với các thử nghiệm tỷ lệ Khả năng xảy ra và áp dụng sự hiệu chỉnh Bonferroni, các đáp ứng có ý nghĩa có $p < 0,05$. Đường nét đứt phía dưới được thiết lập ở 50 SFU/ 10^6 tế bào và tương

ứng với LOD, trong khi đường nét đứt phía trên được thiết lập ở 2.000 SFU/10⁶ tế bào và tương ứng với ULOQ. Dữ liệu được chuyển đổi log₁₀ được thể hiện.

HÌNH 12 minh họa sự cảm ứng của tế bào T đặc hiệu với HEME002 sản xuất IFN- γ ở linh trưởng không phải người được tạo miễn dịch bằng Ad26HEME002, LS_CALR_JAK2-2x9mer, SEQ ID NO: 10 (Ad) và/hoặc MVA-HCalJ-9.9 TCE_CALR_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 26 (MVA) một mình hoặc kết hợp với YERVOY® (ipilimumab) (Ipi) mỗi nhóm ở tuần 2 của nghiên cứu. Sản xuất IFN- γ được đánh giá bằng ELISpot. Các giá trị được thể hiện đã trừ đi giá trị nền và giá trị dưới 50 SFU/10⁶ tế bào được thiết lập thành giá trị đó (được biểu thị bằng các ký hiệu màu đen mở). Các động vật có đáp ứng ở mức nền cao >150 SFU/10⁶ tế bào được biểu thị bằng biểu tượng màu xám. Cột biểu thị trung bình của nhóm. Phân tích thống kê được thực hiện trên tập dữ liệu hoàn chỉnh bằng cách sử dụng mô hình Tobit với các thử nghiệm tỷ lệ Khả năng xảy ra và áp dụng sự hiệu chỉnh Bonferroni, các đáp ứng có ý nghĩa có $p < 0,05$. Đường nét đứt phía dưới được thiết lập ở 50 SFU/10⁶ tế bào và tương ứng với LOD, trong khi đường nét đứt phía trên được thiết lập ở 2.000 SFU/10⁶ tế bào và tương ứng với ULOQ. Dữ liệu được chuyển đổi log₁₀ được thể hiện.

HÌNH 13 minh họa sự cảm ứng của tế bào T đặc hiệu với HEME002 sản xuất IFN- γ ở linh trưởng không phải người được tạo miễn dịch bằng Ad26HEME002, LS_CALR_JAK2-2x9mer, SEQ ID NO: 10 (Ad) và/hoặc MVA-HCalJ-9.9 TCE_CALR_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 26 (MVA) một mình hoặc kết hợp với YERVOY® (ipilimumab) (Ipi) mỗi nhóm ở tuần 6 của nghiên cứu. Sản xuất IFN- γ được đánh giá bằng ELISpot. Các giá trị được thể hiện đã trừ đi giá trị nền và giá trị dưới 50 SFU/10⁶ tế bào được thiết lập thành giá trị đó (được biểu thị bằng các ký hiệu màu đen mở). Các động vật có đáp ứng ở mức nền cao >150 SFU/10⁶ tế bào được biểu thị bằng biểu tượng màu xám. Cột biểu thị trung bình của nhóm. Phân tích thống kê được thực hiện trên tập dữ liệu hoàn chỉnh bằng cách sử dụng mô hình Tobit với các thử nghiệm tỷ lệ Khả năng xảy ra và áp dụng sự hiệu chỉnh Bonferroni, các đáp ứng có ý nghĩa có $p < 0,05$. Đường nét đứt phía dưới được thiết lập ở 50 SFU/10⁶ tế bào và tương ứng với LOD, trong khi đường nét đứt phía trên được thiết lập ở 2.000 SFU/10⁶ tế bào và tương ứng với ULOQ. Dữ liệu được chuyển đổi log₁₀ được thể hiện.

HÌNH 14 minh họa sự cảm ứng của tế bào T đặc hiệu với HEME002 sản xuất IFN- γ ở linh trưởng không phải người được tạo miễn dịch bằng Ad26HEME002,

LS_CALR_JAK2-2x9mer, SEQ ID NO: 10 (Ad) và/hoặc MVA-HCalJ-9.9 TCE_CALR_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 26 (MVA) một mình hoặc kết hợp với YERVOY® (ipilimumab) (Ipi) mỗi nhóm ở tuần 10 của nghiên cứu. Sản xuất IFN- γ được đánh giá bằng ELISpot. Các giá trị được thể hiện đã trừ đi giá trị nền và giá trị dưới 50 SFU/10⁶ tế bào được thiết lập thành giá trị đó (được biểu thị bằng các ký hiệu màu đen mở). Các động vật có đáp ứng ở mức nền cao >150 SFU/10⁶ tế bào được biểu thị bằng biểu tượng màu xám. Cột biểu thị trung bình của nhóm. Phân tích thống kê được thực hiện trên tập dữ liệu hoàn chỉnh bằng cách sử dụng mô hình Tobit với các thử nghiệm tỷ lệ Khả năng xảy ra và áp dụng sự hiệu chỉnh Bonferroni, các đáp ứng có ý nghĩa có $p < 0,05$. Đường nét đứt phía dưới được thiết lập ở 50 SFU/10⁶ tế bào và tương ứng với LOD, trong khi đường nét đứt phía trên được thiết lập ở 2.000 SFU/10⁶ tế bào và tương ứng với ULOQ. Dữ liệu được chuyển đổi log₁₀ được thể hiện.

HÌNH 15 minh họa sự cảm ứng của tế bào T đặc hiệu với HEME002 sản xuất IFN- γ ở linh trưởng không phải người được tạo miễn dịch bằng Ad26HEME002, LS_CALR_JAK2-2x9mer, SEQ ID NO: 10 (Ad) và/hoặc MVA-HCalJ-9.9 TCE_CALR_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 26 (MVA) một mình hoặc kết hợp với YERVOY® (ipilimumab) (Ipi) mỗi nhóm ở tuần 16 của nghiên cứu. Sản xuất IFN- γ được đánh giá bằng ELISpot. Các giá trị được thể hiện đã trừ đi giá trị nền và giá trị dưới 50 SFU/10⁶ tế bào được thiết lập thành giá trị đó (được biểu thị bằng các ký hiệu màu đen mở). Các động vật có đáp ứng ở mức nền cao >150 SFU/10⁶ tế bào được biểu thị bằng biểu tượng màu xám. Cột biểu thị trung bình của nhóm. Phân tích thống kê được thực hiện trên tập dữ liệu hoàn chỉnh bằng cách sử dụng mô hình Tobit với các thử nghiệm tỷ lệ Khả năng xảy ra và áp dụng sự hiệu chỉnh Bonferroni, các đáp ứng có ý nghĩa có $p < 0,05$. Đường nét đứt phía dưới được thiết lập ở 50 SFU/10⁶ tế bào và tương ứng với LOD, trong khi đường nét đứt phía trên được thiết lập ở 2.000 SFU/10⁶ tế bào và tương ứng với ULOQ. Dữ liệu được chuyển đổi log₁₀ được thể hiện.

HÌNH 16 minh họa rằng kháng thể kháng CTLA4 Ipilimumab được sử dụng SC tương đương với IV ở các đáp ứng của tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên môi trong NHP. Ipilimumab được định liều là 3 mg/kg IV hoặc SC tại thời điểm tạo miễn dịch bằng vectơ. Các tế bào sản xuất IFN γ từ 250 K khi đuôi dài PBMC được kích thích qua đêm với các peptit đặc hiệu với mutCALR và được phân tích bằng Elipot. Phản ứng peptit mutCALR được tính toán dựa trên đáp ứng đặc hiệu với mutCALR - giá trị nền.

Cột biểu thị trung bình của nhóm. Phân tích thống kê được thực hiện trên tập dữ liệu hoàn chỉnh bằng cách sử dụng mô hình Tobit với các thử nghiệm tỷ lệ Khả năng xảy ra và áp dụng sự hiệu chỉnh Bonferroni, các đáp ứng có ý nghĩa có $p < 0,05$.

HÌNH 17 minh họa rằng việc gồm có kháng thể kháng PD-1 (Nivolumab 10 mg/kg IV) bắt đầu từ tuần 4 với Ad/Ad/MVA + 1 liều (Nhóm 6) hoặc 2 liều (nhóm 5) ipilimumab (SC) để cải thiện mức độ đáp ứng của tế bào T đặc hiệu với mutCALR so với động vật chỉ được dùng liều Ad/Ad/MVA + ipilimumab (SC). Ad26: Ad26HEME002, LS_CALR_JAK2-2x9mer, SEQ ID NO: 10; Ipi; ipilimumab; aPD1: Nivolumab.

HÌNH 18A thể hiện sơ đồ biểu diễn hệ gen alphavirus của virus Semliki Forest, là ARN cảm ứng dương, mạch đơn mà mã hóa các polyprotein không có cấu trúc (nsP1–nsP4; replicaza) ở đầu 5' và các gen cấu trúc (capsid và glycoprotein) ở đầu 3'.

HÌNH 18B minh họa sơ đồ biểu diễn phân tử ARN tự sao chép (đơn vị sao chép) ví dụ có nguồn gốc từ các đơn vị sao chép của alphavirus, trong đó các gen cấu trúc của virus được thay thế bằng gen quan tâm dưới sự kiểm soát phiên mã của vùng khởi động của hệ gen con (SGP). Các yếu tố trình tự bảo thủ (CSE) ở đầu 5' và 3' đóng vai trò là vùng khởi động cho quá trình phiên mã ARN sợi âm và sợi dương. Sau khi đơn vị sao chép được đưa vào tế bào, tiền chất polyprotein không có cấu trúc (nsP1234) được dịch mã từ đơn vị sao chép được phiên mã *in vitro*. nsP1234 ở giai đoạn đầu được tự động phân giải theo phương pháp phân giải protein thành các mảnh nsP123 và nsP4, các mảnh này phiên mã ra bản sao chép sợi âm của đơn vị sao chép. Sau đó, nsP123 được phân giải hoàn toàn thành các protein đơn, chúng sẽ lắp ráp với replicaza sợi (+) để phiên mã các bản sao gen mới có sợi dương, cũng như các bản sao hệ gen con có sợi (+) mà mã hóa cho gen quan tâm. ARN của hệ gen con cũng như ARN hệ gen mới được tạo mũ và poly-adenyl hóa. Vùng khởi động bất hoạt là *mũi tên nét đứt*; Vùng khởi động hoạt động là *mũi tên nét liền*;

HÌNH 19 là giản đồ minh họa về ARN tự khuếch đại ví dụ có nguồn gốc từ alphavirus có chứa gen không có cấu trúc, có mũ ở đầu 5' (NSP1-4), vùng khởi động của hệ gen con 26S (mũi tên màu xám), gen quan tâm (GOI), và đuôi được polyadenyl hóa ở đầu 3'. Hình minh họa cũng thể hiện thành phần bỏ qua ribosom 2A (P2A) và 193 nucleotit đầu tiên được nhân đôi của nsP1 ở phía hạ lưu của 5'-UTR và ở phía thượng lưu của DLP ngoại trừ mã bộ ba khởi đầu.

HÌNH 20 là giản đồ minh họa hạt nano lipid (LNP) ví dụ bao bọc ARN tự khuếch đại, với tỷ lệ phần trăm mol của các thành phần lipid như được biểu thị (Geall và cộng sự, PNAS, 2012, 109:14604–14609).

HÌNH 21A minh họa ARN tự sao chép LS.CALR-JAK2-2x9mer làm môi cho đáp ứng của tế bào T CD4 kháng CALR. Dữ liệu thể hiện sự sản xuất IFN bởi tế bào đơn nhân lách được kích thích bằng thư viện peptit CALR chồng gối (cột chưa đầy) hoặc DMSO (cột màu xám) như được đo bằng ELISpot.

HÌNH 21B minh họa ARN tự sao chép LS.CALR-JAK2-2x9mer làm môi cho đáp ứng của tế bào T CD4 kháng CALR. Dữ liệu thể hiện việc sản xuất IFN, TNF α và IL-2 của tế bào đơn nhân lách được kích thích bằng các peptit CALR chồng gối được đo bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. Các ký hiệu tương ứng với từng con chuột (n=5), các cột thể hiện giá trị trung bình với SD. **p<0,01, thử nghiệm Mann-Whitney.

HÌNH 22A minh họa ARN tự sao chép được bào chế dưới dạng hạt nano lipid là LS.CALR-JAK2-2x9mer làm môi cho đáp ứng của tế bào T CD4 kháng CALR. Chuột Balb/c được tạo miễn dịch bằng liều lượng được chỉ định của ARN tự sao chép được bào chế dưới dạng LNP là LS.CALR-JAK2-2x9mer, cũng như phiên bản không được bào chế ở 20 μ g, và 14 ngày sau các lá lách được phân tích. Hình vẽ minh họa việc sản xuất IFN bởi tế bào đơn nhân lách được kích thích bằng thư viện peptit CALR chồng gối (đã trừ giá trị nền DMSO) như được đo bằng ELISpot.

HÌNH 22B minh họa ARN tự sao chép được bào chế dưới dạng hạt nano lipid là LS.CALR-JAK2-2x9mer làm môi cho đáp ứng của tế bào T CD4 kháng CALR. Dữ liệu thể hiện việc sản xuất IFN, TNF α và IL-2 của tế bào đơn nhân lách được kích thích bằng các peptit CALR chồng gối được đo bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. Các ký hiệu tương ứng với từng con chuột (n=5), các cột thể hiện giá trị trung bình với SD. *p<0,05, **p<0,01, thử nghiệm Mann-Whitney.

HÌNH 23A minh họa các phác đồ vaccin tăng cường đáp ứng của tế bào T CD4 kháng CALR. Những con chuột Balb/c được môi sau đó được tăng cường bằng sự kết hợp khác nhau của Ad26, phân tử ARN tự sao chép (đơn vị sao chép) hoặc MVA như được biểu thị trong hình vẽ này sau đó các lá lách được phân tích. Hình vẽ minh họa việc sản xuất IFN bởi tế bào đơn nhân lách được kích thích bằng thư viện peptit CALR chồng gối (đã trừ giá trị nền DMSO) như được đo bằng ELISpot.

HÌNH 23B minh họa các phác đồ vaccin tăng cường đáp ứng của tế bào T CD4 kháng CALR. Dữ liệu thể hiện việc sản xuất IFN, TNF α và IL-2 của tế bào đơn nhân lách được kích thích bằng các peptit CALR chồng gối được đo bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. Các ký hiệu tương ứng với từng con chuột, các cột thể hiện giá trị trung bình với SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, thử nghiệm Mann-Whitney.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Tất cả các tài liệu ẩn phâm, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các bằng sáng chế và đơn xin cấp bằng sáng chế, được đề cập sau đây được kết hợp đầy đủ vào trong bản mô tả này bằng viện dẫn.

Cần phải hiểu rằng các thuật ngữ sử dụng trong trong bản mô tả này chỉ nhằm mô tả các phương án cụ thể và không làm giới hạn sáng chế. Trừ khi được chỉ ra khác đi, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có cùng nghĩa thông thường theo hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ mà sáng chế đề cập đến.

Có thể sử dụng các phương pháp và vật liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và vật liệu được mô tả trong bản mô tả này trong việc thực hiện các thí nghiệm của sáng chế, và các phương pháp và vật liệu mô tả trong bản mô tả này chỉ là ví dụ. Trong mô tả và yêu cầu bảo hộ sáng chế, các thuật ngữ sau đây sẽ được sử dụng.

Trong bản mô tả này và các yêu cầu bảo hộ kèm theo, dạng số ít “một” đề cập đến cả các số nhiều trừ khi được chỉ ra một cách cụ thể rõ ràng. Do đó, ví dụ, đề cập đến “một tế bào” có thể hiểu là bao gồm cả sự kết hợp của hai hoặc nhiều tế bào, v.v.

“Khoảng” có nghĩa là nằm trong khoảng sai số có thể chấp nhận đối với giá trị cụ thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, một phần dựa trên phương pháp đo hoặc xác định giá trị, tức là, các giới hạn của hệ thống đo lường. Trừ khi được chỉ ra cụ thể khác đi trong các ví dụ hoặc trong bản mô tả theo ngữ cảnh thí nghiệm, kết quả hoặc phương án cụ thể, “khoảng” có nghĩa là nằm trong một độ lệch chuẩn trên mỗi thử nghiệm trong lĩnh vực kỹ thuật này, hoặc khoảng lên đến 5%, tùy giá trị nào lớn hơn.

“Chất bổ trợ” và “chất kích thích miễn dịch” được dùng thay thế cho nhau trong bản mô tả này và được xác định là một hoặc nhiều chất gây ra sự kích thích của hệ miễn dịch. Trong ngữ cảnh này, chất bổ trợ được sử dụng để tăng cường đáp ứng miễn dịch đối với vacxin theo sáng chế.

“Khung thay thế” đề cập đến khung protein chuỗi đơn chứa lõi có cấu trúc liên kết với các vùng biến đổi có khả năng dung nạp cấu hình cao. Các vùng biến đổi có thể dung nạp biến thể được đưa vào mà không ảnh hưởng đến sự toàn vẹn của khung thay thế, và do đó các vùng biến đổi có thể được thiết kế và lựa chọn để liên kết với kháng nguyên đặc hiệu.

“Tế bào trình diện kháng nguyên” (APC) đề cập đến tế bào bất kỳ có kháng nguyên kết hợp với phân tử phức hợp tương hợp mô chính trên bề mặt của nó, hoặc phân tử MHC loại I hoặc MHC loại II hoặc cả hai.

“Kháng thể” đề cập đến phân tử globulin miễn dịch bao gồm các kháng thể đơn dòng gồm các kháng thể đơn dòng chuột, người, nhân hóa và dạng khảm, các mảnh liên kết kháng nguyên, các kháng thể đặc hiệu kép (bispecific) hoặc kháng thể đa hiệu, các kháng thể dạng dime, dạng tetrame hoặc đa phân, kháng thể chuỗi đơn, kháng thể miễn và cấu hình cải biến khác bất kỳ của phân tử globulin miễn dịch bao gồm vị trí liên kết kháng nguyên có tính đặc hiệu yêu cầu.

“Mảnh liên kết kháng nguyên” đề cập đến phần phân tử globulin miễn dịch giữ lại các đặc tính liên kết kháng nguyên của kháng thể gốc đầy đủ chiều dài. Mảnh liên kết kháng nguyên ví dụ là vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (HCDR) 1, 2 và/hoặc 3, các vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (LCDR) 1, 2 và/hoặc 3, VH, VL, VH và VL, các mảnh Fab, F(ab')₂, F_d và F_v cũng như kháng thể miễn (dAb) chứa một miền VH hoặc một miền VL. Miền VH và VL có thể được liên kết với nhau qua cầu nối tổng hợp để tạo nhiều loại cấu hình kháng thể chuỗi đơn khác nhau, trong đó các miền VH/VL ghép cặp trong phân tử hoặc giữa các phân tử trong trường hợp khi miền VH và VL được biểu hiện bằng các chuỗi riêng biệt để tạo vị trí liên kết kháng nguyên đơn trị, ví dụ như F_v chuỗi đơn (scFv) hoặc diabody (kháng thể đặc hiệu kép tái tổ hợp); được mô tả, ví dụ, trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1998/44001, Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1988/01649, Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1994/13804, hoặc Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1992/01047.

Các thuật ngữ chuyên tiếp “bao gồm”, “về cơ bản bao gồm” và “bao gồm chỉ” nhằm mục đích bao hàm ý nghĩa chung được chấp nhận trong ngôn ngữ sáng chế; có nghĩa là, (i) “gồm có” đồng nghĩa với “bao gồm”, “chứa” hoặc “khác biệt trong đó”, có nghĩa bao hàm hoặc mở rộng và không loại trừ các thành phần hoặc các bước phương pháp bổ sung không được nêu; (ii) “bao gồm chỉ” loại trừ bất kỳ thành phần, bước hoặc thành phần nào không được xác định trong yêu cầu bảo hộ; và (iii) “về cơ bản bao gồm” giới hạn phạm vi của yêu cầu bảo hộ ở các chất hoặc bước được xác định và “các thành phần không ảnh hưởng đáng kể đến (các) đặc tính mới và cơ bản” của sáng chế được bảo hộ. Các phương án được mô tả theo cụm từ “gồm có” (hoặc tương đương của nó), cũng đề xuất như là các phương án được mô tả độc lập theo nghĩa “bao gồm” và “về cơ bản bao gồm”.

“CALR” đề cập đến calreticulin ở người. Protein CALR ở người bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện trong, ví dụ, UniProt có mã truy cập P27797.

“Vòng lặp hạ lưu” hoặc “mô-tip DLP” đề cập đến trình tự polynucleotit bao gồm ít nhất một vòng lặp gốc ARN, khi được đặt ở phía hạ lưu của mã bộ ba bắt đầu của khung đọc mở (ORF) cung cấp khả năng dịch mã ORF tăng lên so với cấu trúc tương tự khác mà không có mô-tip DLP.

“Tăng cường” hoặc “gây ra” khi đề cập đến đáp ứng miễn dịch đề cập đến việc tăng quy mô và/hoặc hiệu quả của đáp ứng miễn dịch hoặc kéo dài thời gian của đáp ứng miễn dịch. Các thuật ngữ này được sử dụng thay thế cho nhau bằng “gia tăng”.

“Trình tự quyết định kháng nguyên” như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến một phần của polypeptit hoặc trình tự axit amin, ví dụ một phần của cấu trúc bậc một, bậc hai, bậc ba hoặc bậc bốn của polypeptit hoặc trình tự axit amin, được nhận biết bởi hệ thống miễn dịch, ví dụ kháng thể, tế bào B (ví dụ, tế bào lympho B) và/hoặc tế bào T.

“Vector biểu hiện” đề cập đến vector có thể được sử dụng trong hệ sinh học hoặc hệ sinh học tái tạo để định hướng quá trình dịch mã polypeptit được mã hóa bởi trình tự polynucleotit có mặt trong vector biểu hiện.

“Thành phần hỗ trợ” đề cập đến thành phần polynucleotit hoặc polypeptit bất kỳ có thể được liên kết với polynucleotit hoặc polypeptit, và bao gồm vùng khởi động, vùng tăng cường, tín hiệu polyadenyl hóa, các mã bộ ba kết thúc, nhãn protein, chẳng hạn như nhãn histidin và các loại tương tự.

“Khác loại” đề cập đến hai hoặc nhiều polynucleotit hoặc hai hay nhiều polypeptit không có cùng mối quan hệ với nhau trong tự nhiên.

“Mảnh sinh miễn dịch” đề cập đến polypeptit được tế bào lympho T gây độc, tế bào lympho T trợ giúp hoặc tế bào B nhận biết khi mảnh này kết hợp với phân tử MHC loại I hoặc MHC loại II.

“Trong khung” đề cập đến khung đọc mã bộ ba trong polynucleotit thứ nhất giống với khung đọc mã bộ ba trong polynucleotit thứ hai được nối với nhau để tạo thành polynucleotit. Polynucleotit trong khung mã hóa polypeptit được mã hóa bởi cả polynucleotit thứ nhất và polynucleotit thứ hai.

“Sinh miễn dịch” đề cập đến polypeptit bao gồm một hoặc nhiều mảnh sinh miễn dịch.

“Đáp ứng miễn dịch” đề cập đến đáp ứng bất kỳ với polypeptit hoặc polynucleotit hoặc mảnh sinh miễn dịch của hệ miễn dịch ở đối tượng có xương sống. Ví dụ về đáp ứng miễn dịch bao gồm miễn dịch tại chỗ, miễn dịch tế bào toàn thân cũng như miễn dịch dịch thể, chẳng hạn như đáp ứng tế bào lympho T gây độc tế bào (CTL), bao gồm cảm ứng đặc hiệu kháng nguyên của CD8+ CTL, đáp ứng của tế bào T trợ giúp bao gồm đáp ứng tăng sinh tế bào T và giải phóng cytokin, và đáp ứng tế bào B bao gồm cả đáp ứng kháng thể.

“Kết hợp với” nghĩa là cho đối tượng sử dụng hai hoặc nhiều tác nhân điều trị trong một hỗn hợp, sử dụng đồng thời theo từng chất hoặc lần lượt theo từng chất theo thứ tự bất kỳ.

“Được phân lập” đề cập đến quần thể phân tử đồng nhất (chẳng hạn như polynucleotit hoặc polypeptit tổng hợp), về cơ bản đã được tách ra và/hoặc được tinh chế khỏi các thành phần khác của hệ thống mà phân tử được tạo ra, ví dụ như tế bào tái tổ hợp cũng như protein đã trải qua ít nhất một bước tinh chế hoặc phân lập. “Được phân lập” đề cập đến phân tử về cơ bản không chứa vật liệu tế bào và/hoặc hóa chất và bao gồm các phân tử được phân lập có độ tinh sạch, ví dụ, trên 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%.

“JAK2” đề cập đến Janus kinaza 2 ở người. Protein JAK2 ở người bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện trong, ví dụ, là UniPort có mã truy cập O060674.

“CALR đột biến” đề cập đến CALR chứa một hoặc nhiều đột biến exon 9.

“JAK2 đột biến” đề cập đến JAK2 chứa đột biến V617F.

“Không có trong tự nhiên” đề cập đến phân tử không tồn tại trong tự nhiên.

Trình tự “được liên kết hoạt động” đề cập đến cả trình tự kiểm soát quá trình biểu hiện liên kết với trình tự axit nucleic mà chúng điều hòa và trình tự điều hòa hoạt động ở dạng trans, hoặc ở khoảng cách để kiểm soát trình tự axit nucleic đã điều hòa.

"Nhiễm sắc thể Philadelphia" hoặc "Ph" đề cập đến sự chuyển đoạn nhiễm sắc thể được biết đến nhiều giữa nhiễm sắc thể 9 và 22, dẫn đến dung hợp gen BCR-ABL tạo khối u với hoạt tính kinaza tyrosin hoạt động một cách cơ định. Sự chuyển đoạn khiến cho một phần của gen BCR từ nhiễm sắc thể 22q11 trở nên dung hợp với một phần của gen ABL từ nhiễm sắc thể 9q34, và được đặt tên là t(9;22)(q34;q11) theo Hệ thống quốc tế đối với Danh pháp Di truyền học tế bào ở người (International System for Human Cytogenetic Nomenclature, ISCN). Tùy vào vị trí chính xác của dung hợp, khối lượng phân tử của protein dung hợp tạo thành có thể nằm trong khoảng từ 185 đến 210 kDa. “Nhiễm sắc thể Philadelphia” chỉ tất cả protein dung hợp BCR-ABL được tạo thành do sự chuyển đoạn (9;22)(q34;q11).

“Polynucleotit” đề cập đến phân tử bao gồm chuỗi nucleotit liên kết cộng hóa trị bởi bộ khung đường-phosphat hoặc liên kết hóa học cộng hóa trị tương đương khác. Ví dụ về polynucleotit bao gồm ARN và ADN.

“Polypeptit” hoặc “protein” đề cập đến phân tử bao gồm ít nhất hai đơn phân axit amin liên kết với nhau bằng liên kết peptit để tạo thành polypeptit.

“Phòng ngừa”, “việc phòng ngừa”, “sự phòng ngừa” bệnh hoặc rối loạn nghĩa là phòng ngừa tình trạng rối loạn xảy ra ở đối tượng.

“Tiêm nhắc lại” hoặc “chế độ tiêm nhắc lại” đề cập đến phương pháp điều trị đối tượng liên quan đến việc môi đáp ứng của tế bào T bằng vacxin thứ nhất, sau đó tăng cường đáp ứng miễn dịch bằng vacxin thứ hai. Vacxin thứ nhất và vacxin thứ hai thường khác nhau. Sự tạo miễn dịch tiêm nhắc lại này tạo đáp ứng miễn dịch có phạm vi lớn hơn mức có thể đạt được bằng cách môi và tăng cường với cùng một loại vacxin. Bước môi khởi động tế bào ghi nhớ và bước tăng cường mở rộng phản hồi ghi nhớ. Sự tăng cường có thể xảy ra một lần hoặc nhiều lần.

“Tái tổ hợp” đề cập đến polynucleotit, polypeptit, vectơ, virut và các phân tử khác được điều chế, biểu hiện, tạo thành hoặc phân lập bằng phương tiện tổ hợp.

“Khó chữa” đề cập đến bệnh không đáp ứng với điều trị. Bệnh khó chữa có thể kháng lại phương pháp điều trị trước hoặc khi bắt đầu điều trị, hoặc bệnh khó chữa có thể kháng thuốc trong quá trình điều trị.

“Tái phát” đề cập đến sự quay trở lại của bệnh hoặc các dấu hiệu và triệu chứng của bệnh sau một thời gian cải thiện khi đã được điều trị trước bằng một liệu pháp.

“Đơn vị sao chép” đề cập đến axit nucleic virus có khả năng định hướng việc tạo các bản sao của chính nó và bao gồm ARN cũng như ADN. Ví dụ, phiên bản ADN sợi kép của hệ gen virus PRRS (arterivirus) có thể được sử dụng để tạo phiên mã ARN sợi đơn tạo thành đơn vị sao chép virus PRRS. Nhìn chung, đơn vị sao chép của virus chứa hệ gen hoàn chỉnh của virus này.

“Đơn vị sao chép ARN” (hoặc “ARN tự sao chép”, hoặc “phân tử ARN tự sao chép” hoặc “srARN”) đề cập đến phân tử ARN chứa tất cả thông tin di truyền cần thiết để định hướng sự khuếch đại hoặc tự sao chép của chính nó trong tế bào cho phép. Để định hướng quá trình sao chép của chính nó, phân tử ARN: 1) mã hóa polymeraza, replicaza hoặc protein khác có thể tương tác với protein có nguồn gốc virus hoặc tế bào chủ, axit nucleic hoặc ribonucleoprotein để xúc tác quá trình khuếch đại ARN; và 2) chứa trình tự ARN hoạt hóa dạng cis cần thiết để sao chép và phiên mã ARN do đơn vị sao chép mã hóa. Phân tử ARN tự sao chép thường có nguồn gốc từ hệ gen của virus ARN sợi dương và có thể được sử dụng làm cơ sở đưa trình tự ngoại lai vào tế bào chủ bằng cách thay thế trình tự virus mã hóa gen cấu trúc hoặc không có cấu trúc hoặc chèn trình tự ngoại lai 5' hoặc 3' của trình tự mã hóa gen cấu trúc hoặc không có cấu trúc. Trình tự ngoại lai có thể được đưa vào vùng hệ gen con của virus alpha. Phân tử ARN tự sao chép có thể được đóng gói thành các hạt virus tái tổ hợp, chẳng hạn như hạt virus alpha tái tổ hợp hoặc được dẫn truyền đến vật chủ bằng hạt nano lipid (LNP). ARN tự sao chép có thể có kích thước ít nhất 1 kb, hoặc ít nhất 2 kb, hoặc ít nhất 3 kb, hoặc ít nhất 4 kb, hoặc ít nhất 5 kb, hoặc ít nhất 6 kb, hoặc ít nhất 7 kb, hoặc ít nhất 8 kb, hoặc ít nhất 10 kb, hoặc ít nhất 12 kb, hoặc ít nhất 15 kb, hoặc ít nhất 17 kb, hoặc ít nhất 19 kb, hoặc ít nhất 20 kb, hoặc có thể có kích thước 100 bp-8 kb, hoặc 500 bp-8 kb, hoặc 500 bp-7 kb, hoặc 1-7 kb, hoặc 1-8 kb, hoặc 2-15 kb, hoặc 2-20 kb, hoặc 5-15 kb, hoặc 5-20 kb, hoặc 7-15 kb, hoặc 7-18 kb, hoặc 7-20 kb. ARN tự sao chép được mô tả, ví dụ như trong các công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2017/180770, WO2018/075235, và WO2019143949A2.

“Liên kết đặc hiệu”, “liên kết một cách đặc hiệu” hoặc “liên kết” đề cập đến phân tử protein liên kết với kháng nguyên hoặc quyết định kháng nguyên bên trong kháng nguyên bằng ái lực lớn hơn ái lực cho các kháng nguyên khác. Thông thường, phân tử protein liên kết với kháng nguyên hoặc quyết định kháng nguyên bên trong kháng nguyên bằng hằng số cân bằng phân ly (KD) với khoảng 1×10^{-7} M hoặc nhỏ hơn, ví dụ khoảng 5×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 1×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 1×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 1×10^{-10} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 1×10^{-11} M hoặc nhỏ hơn, hay khoảng 1×10^{-12} M hoặc nhỏ hơn, thông thường với KD nhỏ hơn ít nhất 100 lần so với KD của nó khi liên kết với kháng nguyên không đặc hiệu (ví dụ, BSA, casein). Trong ngữ cảnh của các phân tử được mô tả trong bản mô tả này, "liên kết đặc hiệu" là liên kết của phân tử protein với polypeptit đột biến CALR/JAK2, polypeptit đột biến CALR hoặc chỉ có polypeptit đột biến JAK2 hoặc phức hợp với HLA mà không có liên kết có thể phát hiện được với CALR kiểu dại hoặc chỉ với JAK2 hoặc phức hợp với HLA.

“ARN hệ gen con” đề cập đến phân tử ARN có chiều dài hoặc kích thước nhỏ hơn ARN hệ gen mà nó được tạo ra từ đó. ARN hệ gen con của virus có thể được phiên mã từ vùng khởi động bên trong, trình tự của nó nằm trong ARN hệ gen hoặc phần bổ sung của nó. Quá trình phiên mã của ARN hệ gen con có thể được điều tiết bằng (các) polymeraza được mã hóa của virus liên kết với các protein được mã hóa của tế bào chủ, (các) ribonucleoprotein hoặc sự kết hợp của chúng. Nhiều virus ARN tạo ra mARN hệ gen con (sgARN) để biểu hiện 3 gen ở đầu gân của chúng. ARN hệ gen con của virus có thể được phiên mã từ vùng khởi động bên trong, trình tự của nó nằm trong ARN hệ gen hoặc phần bổ sung của nó. Quá trình phiên mã của ARN hệ gen con có thể được điều tiết bằng (các) polymeraza được mã hóa của virus liên kết với các protein được mã hóa của tế bào chủ, (các) ribonucleoprotein hoặc sự kết hợp của chúng.

“Đơn vị sao chép hệ gen con” đề cập đến axit nucleic của virus chứa ít thành phần hơn so với phần bổ sung đầy đủ của gen và các đặc điểm khác của hệ gen virus, nhưng vẫn có khả năng định hướng việc tạo bản sao của chính nó. Ví dụ, đơn vị sao chép hệ gen con của virus PRRS có thể chứa hầu hết gen đối với protein không có cấu trúc của virus, nhưng lại thiếu hầu hết gen mã hóa đối với protein có cấu trúc. Đơn vị sao chép hệ gen con có khả năng định hướng sự biểu hiện của tất cả gen virus cần thiết cho việc sao chép của hệ gen con virus (sự sao chép của đơn vị sao chép hệ gen con) mà không cần tạo hạt virus.

“Đối tượng” bao gồm động vật bất kỳ là người hoặc không phải là người. “Động vật không phải là người” bao gồm tất cả động vật có xương sống, *ví dụ*, động vật có vú và động vật không có vú, như động vật linh trưởng không phải con người, cừu, chó, mèo, ngựa, bò, gà, lưỡng cư, bò sát, v.v. Thuật ngữ “đối tượng” và “bệnh nhân” có thể được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này.

“Điều trị” hoặc “phương pháp điều trị” bệnh hoặc chứng rối loạn như ung thư đề cập đến việc hoàn thành một hoặc nhiều yếu tố sau: giảm mức độ nghiêm trọng và/hoặc thời gian của chứng rối loạn, ức chế tình trạng xấu đi của các triệu chứng đặc trưng của chứng rối loạn đang được điều trị đó, hạn chế hoặc ngăn ngừa sự tái phát của chứng rối loạn ở những đối tượng đã từng mắc chứng rối loạn, hoặc hạn chế/ngăn chặn triệu chứng tái phát ở những đối tượng đã từng có triệu chứng rối loạn đó.

“Lượng có hiệu quả điều trị” đề cập đến lượng có hiệu quả, với các liều lượng và trong các khoảng thời gian cần thiết, để đạt được hiệu quả điều trị mong muốn. Lượng có hiệu quả điều trị có thể khác nhau phụ thuộc vào các yếu tố như tình trạng bệnh, giới tính, độ tuổi và cân nặng của bệnh nhân, và khả năng của thuốc điều trị hoặc các thuốc điều trị kết hợp để mang lại đáp ứng mong muốn ở bệnh nhân. Các ví dụ về chỉ báo của thuốc điều trị hoặc các thuốc điều trị kết hợp hữu hiệu bao gồm, ví dụ, sức khoẻ của đối tượng được cải thiện.

“Vaccin” đề cập đến chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều polypeptit sinh miễn dịch, polynucleotit mã hóa polypeptit hoặc mảnh sinh miễn dịch, vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit sinh miễn dịch, hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng được sử dụng có mục đích là để gây miễn dịch đạt được ở người nhận (ví dụ là đối tượng).

“Vectơ” đề cập đến polynucleotit có khả năng sao chép bên trong hệ sinh học hoặc có thể được di chuyển giữa các hệ này. Các polynucleotit vectơ thông thường chứa các phần tử, như các gốc sao chép, tín hiệu polyadenyl hóa hoặc chỉ thị chọn lọc, có chức năng hỗ trợ sao chép hoặc duy trì các polynucleotit này trong hệ sinh học. Các ví dụ về các hệ sinh học có thể bao gồm tế bào, virus, động vật, thực vật, và hệ sinh học tái tạo sử dụng các thành phần sinh học có khả năng sao chép vectơ. Polynucleotit chứa vectơ có thể là các phân tử ADN hoặc ARN hoặc phân tử lai của chúng.

“Vectơ virus” đề cập đến cấu trúc vectơ bao gồm ít nhất một thành phần polynucleotit có nguồn gốc virus và có thể được chứa trong hạt vectơ virus.

“Biến thể”, “đột biến” hoặc “bị thay đổi” đề cập đến polypeptit hoặc polynucleotit khác với polypeptit tham chiếu hoặc polynucleotit tham chiếu bởi một hoặc nhiều biến đổi, ví dụ như một hay nhiều sự thay thế, chèn hoặc làm mất đoạn.

Polypeptit

Sáng chế đề cập đến polypeptit bao gồm trình tự quyết định kháng nguyên của CALR đột biến và JAK2 đột biến có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng. Theo một số phương án, polypeptit có thể bao gồm ít nhất hai hoặc nhiều trình tự quyết định kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm:

- quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1 (MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTE) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 1;
- quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRMMRTK) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 2;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 4 (KLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 4;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFC) hoặc ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 5;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 6; và sự kết hợp của chúng.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất polypeptit bao gồm trình tự quyết định kháng nguyên của quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 1; quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 2; và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 4 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 4. Trình tự quyết định kháng nguyên có SEQ ID NO: 1, 2, và 4 có thể xuất hiện theo thứ tự bất kỳ và có thể được phân tách bằng cầu nối. Trình tự cầu nối ví

dụ bao gồm AAY, RR, DPP, HHAA (SEQ ID NO: 56), HHA, HHL, RKSYL (SEQ ID NO: 57), RKSY (SEQ ID NO: 58), SSL, hoặc REKR (SEQ ID NO: 59).

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất polypeptit bao gồm trình tự quyết định kháng nguyên của quyết định kháng nguyên Janus kinaza 2 (JAK2) có SEQ ID NO: 6 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 6, quyết định kháng nguyên calreticulin (CALR) có SEQ ID NO: 1 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 1, và quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 2. Trình tự quyết định kháng nguyên có SEQ ID NO: 6, 1, và 2 có thể xuất hiện theo thứ tự bất kỳ và có thể được phân tách bằng cầu nối. Trình tự cầu nối ví dụ bao gồm AAY, RR, DPP, HHAA (SEQ ID NO: 56), HHA, HHL, RKSYL (SEQ ID NO: 57), RKSY (SEQ ID NO: 58), SSL, hoặc REKR (SEQ ID NO: 59).

Theo một số phương án, sáng chế cũng đề xuất polypeptit bao gồm trình tự quyết định kháng nguyên của quyết định kháng nguyên Janus kinaza 2 (JAK2) có SEQ ID NO: 6 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 6, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên calreticulin (CALR) có SEQ ID NO: 1 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 1, và quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 2. Trình tự quyết định kháng nguyên có SEQ ID NO: 6, 5, 1 và 2 có thể xuất hiện theo thứ tự bất kỳ và có thể được phân tách bằng cầu nối, như là AAY, RR, DPP, HHAA (SEQ ID NO: 56), HHA, HHL, RKSYL (SEQ ID NO: 57), RKSY (SEQ ID NO: 58), SSL, hoặc REKR (SEQ ID NO: 59).

Sáng chế cũng đề xuất polypeptit bao gồm trình tự axit amin của một hoặc nhiều trình tự sau: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 31 hoặc mảnh sinh miễn dịch của nó.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất polypeptit có chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 3 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 3.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất polypeptit có chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 31 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 31.

Theo một số phương án, polypeptit chứa bao gồm tự axit amin có SEQ ID NO: 6 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 6. Sáng chế cũng đề xuất polypeptit bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit có SEQ ID NO: 6. Theo một số phương án, polypeptit bao gồm 2, 3, 4, 5, hoặc nhiều hơn 5 phần lặp lại có SEQ ID NO: 6. Theo một số phương án, đoạn lặp có SEQ ID NO: 6 có thể được phân tách bằng cầu nối. Trình tự cầu nối ví dụ bao gồm AAY, RR, DPP, HHAA (SEQ ID NO: 56), HHA, HHL, RKSYL (SEQ ID NO: 57), RKSYS (SEQ ID NO: 58), SSL, hoặc REKR (SEQ ID NO: 59).

Theo một số phương án, cầu nối được đề xuất trong bản mô tả này có thể bao gồm vị trí phân cắt proteaza sao cho polypeptit có thể được phân cắt in vivo trong đối tượng thành các đoạn peptit chứa trình tự quyết định kháng nguyên, dẫn đến việc đáp ứng miễn dịch được cải thiện.

Theo một số phương án, polypeptit theo sáng chế có thể bao gồm thêm trình tự dẫn hướng hoặc trình tự tăng cường tế bào T (TCE) ở đầu N. Trình tự dẫn hướng có thể làm tăng sự biểu hiện và/hoặc tăng đáp ứng miễn dịch. Trình tự dẫn hướng ví dụ bao gồm chuỗi α của thụ thể TCR của tế bào lympho T² (HAVT20) (MACPGFLWALVISTCLEFSMA; SEQ ID NO: 8), trình tự tín hiệu ubiquitin (Ubiq) (MQIFVKTLTGKTITLEVEP SDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGV; SEQ ID NO: 54), hoặc trình tự tăng cường tế bào T (TCE), như là mảnh peptit có chiều dài 28aa từ chuỗi không biến đổi của cá trạng nguyên (MGQKEQIHTLQKNSERMSKQLTRSSQAV; SEQ ID NO: 29). Người ta tin rằng trình tự dẫn hướng có thể giúp tăng đáp ứng miễn dịch đối với các quyết định kháng nguyên được đề xuất trong bản mô tả này.

Polynucleotit

Sáng chế cũng đề xuất các polynucleotit mã hóa polypeptit bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, polynucleotit mã hóa polypeptit bao gồm ít nhất hai hoặc nhiều trình tự quyết định kháng nguyên được lựa chọn từ nhóm bao gồm:

- quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1 (MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTE) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 1;
- quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRRMMRTK) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 2;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 4 (KLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 4;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFC) hoặc ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 5;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 6; và sự kết hợp của chúng.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa polypeptit bao gồm trình tự quyết định kháng nguyên của quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 1; quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 2; và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 4 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 4. Trình tự quyết định kháng nguyên có SEQ ID NO: 1, 2, và 4 có thể xuất hiện theo thứ tự bất kỳ và có thể được phân tách bằng cầu nối.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa polypeptit bao gồm trình tự quyết định kháng nguyên của quyết định kháng nguyên Janus kinaza 2 (JAK2) có SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 6, quyết định kháng nguyên calreticulin (CALR) có SEQ ID NO: 1 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 1, và quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 2. Trình tự quyết định kháng nguyên có SEQ ID NO: 6, 1, và 2 có thể xuất hiện theo thứ tự bất kỳ và có thể được phân tách bằng cầu nối.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa polypeptit bao gồm trình tự quyết định kháng nguyên của quyết định kháng nguyên Janus kinaza 2 (JAK2) có SEQ ID NO: 6 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 6, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên calreticulin (CALR) có SEQ ID NO: 1 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 1, và quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 2. Trình tự quyết định kháng nguyên có SEQ ID NO: 6, 5, 1, và 2 có thể xuất hiện theo thứ tự bất kỳ và có thể được phân tách bằng cầu nối.

Theo một số phương án, polynucleotide được phân lập mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 3 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 3.

Theo một số phương án, polynucleotide được phân lập mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 4.

Theo một số phương án, polynucleotide được phân lập mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 7.

Theo một số phương án, polynucleotide được phân lập mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 12.

Theo một số phương án, polynucleotide được phân lập mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 13.

Theo một số phương án, polynucleotide được phân lập mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 6 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự,

hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 6.

Sáng chế cũng đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit bao gồm một hoặc nhiều đoạn lặp có SEQ ID NO: 6. Theo một số phương án, polynucleotit mã hóa polypeptit bao gồm 2, 3, 4, 5 hoặc nhiều hơn 5 đoạn lặp có SEQ ID NO: 6. Theo một số phương án, đoạn lặp có SEQ ID NO: 6 có thể được phân tách bằng cầu nối.

Theo một số phương án, polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm:

trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 16 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 16;

trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 17 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 17;

trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 18 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 18;

trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 19 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 19;

trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 20 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 20;

trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 21 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 21;

trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 22 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 22;

trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 26 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 26; và

trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 27 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 27.

Theo một số phương án, polynucleotit này bao gồm ADN.

Theo một số phương án, polynucleotit này bao gồm ARN.

Theo một số phương án, ARN là mRNA, hoặc ARN tự sao chép.

Theo một số phương án, polynucleotit bao gồm vùng khởi động, vùng tăng cường, vị trí polyadenyl hóa, trình tự Kozak, mã bộ ba kết thúc, hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng.

Phương pháp tạo ra polynucleotit theo sáng chế đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm tổng hợp hóa học, tổng hợp enzym (ví dụ, phiên mã *in vitro*), phân cắt tiền chất dài hơn bằng enzym hay bằng hóa chất, tổng hợp hóa học các mảnh polynucleotit nhỏ hơn, sau đó gắn các mảnh này hoặc dùng những phương pháp PCR đã biết. Trình tự polynucleotit được tổng hợp có thể được thiết kế bằng các mã bộ ba thích hợp dành cho trình tự axit amin mong muốn. Nhìn chung, các mã bộ ba ưu tiên có thể được chọn cho vật chủ dự định mà trình tự sẽ được sử dụng để biểu hiện.

Vector

Sáng chế cũng đề xuất vector bao gồm polynucleotit bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này. Sáng chế cũng đề xuất vector bao gồm polynucleotit mã hóa cho polypeptit bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, vector bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit bao gồm ít nhất hai hoặc nhiều trình tự quyết định kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm:

- quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1 (MKDKQDEEQRRMMRTKMRMRRMRR TRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTE) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 1;
- quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRRMMRTK) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 2;

- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 4 (KLSHKHLVLNYGVCFVCGDENILVQEFVKFG) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 4;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFV) hoặc ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 5;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 6; và sự kết hợp của chúng.

Vectơ có thể là vectơ dùng để biểu hiện polynucleotit theo sáng chế ở vật chủ bất kỳ, như là vi khuẩn, nấm men hoặc động vật có vú. Các vectơ biểu hiện phù hợp thông thường được nhân bản trong sinh vật chủ dưới dạng thể bổ sung hoặc dưới dạng một phần tích hợp của ADN nhiễm sắc thể của vật chủ. Nhìn chung, vectơ biểu hiện chứa các chỉ thị chọn lọc như kháng ampicilin, kháng hygromycin, kháng tetracyclin, kháng kanamycin hoặc kháng neomycin để cho phép phát hiện các tế bào được biến đổi hoặc chuyển nạp bằng các trình tự ADN mong muốn. Ví dụ về vectơ là plasmid, cosmid, thực khuẩn, vectơ virus hoặc nhiễm sắc thể nhân tạo.

Các vectơ phù hợp có thể được sử dụng là - Vi khuẩn: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagen, La Jolla, Calif., USA); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, và pRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Thụy Điển). Nhân thực: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG và pSVL (Pharmacia).

Sáng chế đề xuất vectơ biểu hiện bao gồm polynucleotit theo sáng chế. Sáng chế cũng đề xuất vectơ biểu hiện chứa polynucleotit mã hóa cho polypeptit theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất vectơ virus bao gồm polynucleotit bất kỳ sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất vectơ virus chứa polynucleotit mã hóa polynucleotit bất kỳ theo sáng chế.

Vectơ virus có nguồn gốc từ các hệ gen virus tự nhiên, thường được biến đổi để không có khả năng sao chép, ví dụ là không sao chép. Virus không sao chép cần cung cấp protein ở dạng trans để thực hiện quá trình sao chép. Thông thường, những protein đó được biểu hiện ổn định hoặc tạm thời trong dòng tế bào sản xuất virus, do đó cho phép sao chép virus. Do đó, các vectơ virus thường có khả năng lây nhiễm và không sao chép. Vectơ virus có thể là vectơ adenovirus, vectơ virus liên kết với adeno (AAV) (ví

dụ, AAV loại 5 và loại 2), vector adenovirut ở loài Vượn lớn (Gad), vector alphavirus (ví dụ, virut viêm não ngựa Venezuela (VEE), virut Sindbis (SIN), virut Semliki forest (SFV) và VEE-SIN tổng hợp), vector virut herpes (ví dụ, vector có nguồn gốc từ virut cytomegalo như virut cytomegalo rhesus (RhCMV)), vector virut arena (ví dụ, vector virut viêm màng não đám rối màng mạch lympho bào (LCMV)), vector virut sởi, vector virut đậu mùa (ví dụ, virut bệnh đậu mùa, virut vaccin tái tổ hợp đã biến đổi (MVA), NYVAC (có nguồn gốc từ chủng Copenhagen của bệnh đậu mùa) và vector avipox: vector đậu hoàng yến (canarypox - ALVAC) và vector bệnh đậu gà (fowlpox - FPV)), vector virut viêm miệng phỏng nước, vector retrovirut, vector lentivirut, hạt giống virut và bào tử vi khuẩn.

Theo một số phương án, vector virut có nguồn gốc từ adenovirut, poxvirut, alphavirus, virut liên kết với adeno, retrovirut hoặc phân tử ARN tự sao chép.

Vector adenovirut

Theo một số phương án, vector virut có nguồn gốc từ adenovirut.

Vector adenovirut có thể có nguồn gốc từ adenovirut ở người (Ad) nhưng cũng có thể từ adenovirut lây nhiễm sang các loài khác, chẳng hạn như adenovirut ở bò (ví dụ, adenovirut bò 3, BAdV3), adenovirut ở chó (ví dụ, CAdV2), adenovirut ở lợn (ví dụ, PAdV3 hoặc 5), hoặc các loài vượn lớn, chẳng hạn như Tinh tinh (*Pan*), Khỉ đột (*Gorilla*), Đười ươi (*Pongo*), Tinh tinh lùn (*Pan paniscus*) và tinh tinh thông thường (*Pan troglodytes*). Thông thường, adenovirut ở vượn lớn trong tự nhiên được phân lập từ các mẫu phân của loài vượn lớn tương ứng.

Vector adenovirut ở người có thể có nguồn gốc từ nhiều kiểu huyết thanh adenovirut khác nhau, ví dụ từ các kiểu huyết thanh adenovirut ở người hAd5, hAd7, hAd11, hAd26, hAd34, hAd35, hAd48, hAd49 hoặc hAd50 (các kiểu huyết thanh này còn được gọi là Ad5, Ad7, Ad11, Ad26, Ad34, Ad35, Ad48, Ad49 hoặc Ad50).

Vector adenovirut ở loài vượn lớn (Gad) có thể có nguồn gốc từ nhiều kiểu huyết thanh adenovirut khác nhau, ví dụ từ kiểu huyết thanh adenovirut ở loài vượn lớn là GAd20, Gad19, GAd21, GAd25, GAd26, GAd27, GAd28, GAd29, GAd30, GAd31, ChAd3, ChAd4, ChAd5, ChAd6, ChAd7, ChAd8, ChAd9, ChAd10, ChAd11, ChAd16, ChAd17, ChAd19, ChAd20, ChAd22, ChAd24, ChAd26, ChAd30, ChAd31, ChAd37,

ChAd38, ChAd44, ChAd55, ChAd63, ChAd73, ChAd82, ChAd83, ChAd146, ChAd147, PanAd1, PanAd2 hoặc PanAd3.

Các vectơ adenovirut đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này; Trình tự của đa số adenovirut ở người và không phải người đã được biết đến, và có thể thu được các trình tự khác bằng quy trình thông thường. Ví dụ về trình tự hệ gen của Ad26 được tìm thấy trong Ngân hàng gen có mã truy cập EF153474 và trong SEQ ID NO: 1 của Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2007/104792. Ví dụ về trình tự hệ gen của Ad35 được thấy trong HÌNH 6 của Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2000/70071. Vectơ dựa trên Ad26 được mô tả, ví dụ, trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2007/104792. Vectơ dựa trên Ad35 được mô tả, ví dụ, trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 7,270,811 và Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2000/70071. Vectơ dựa trên ChAd3, ChAd4, ChAd5, ChAd6, ChAd7, ChAd8, ChAd9, ChAd10, ChAd11, ChAd16, ChAd17, ChAd19, ChAd20, ChAd22, ChAd24, ChAd26, ChAd30, ChAd31, ChAd37, ChAd38, ChAd44, ChAd63 và ChAd82 được mô tả trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2005/071093. Vectơ dựa trên PanAd1, PanAd2, PanAd3, ChAd55, ChAd73, ChAd83, ChAd146 và ChAd147 được mô tả trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2010/086189.

Vectơ adenovirut được thiết kế để bao gồm ít nhất một sự mất đoạn chức năng hoặc loại bỏ hoàn toàn sản phẩm của gen cần thiết cho sự sao chép virut, như là một hoặc nhiều vùng adenovirut E1, E2 và E4, do đó khiến adenovirut không có khả năng sao chép. Sự mất đoạn vùng E1 có thể bao gồm sự mất đoạn E1A, E1B 55K hoặc E1B 21K, hay sự kết hợp bất kỳ của chúng. Adenovirut thiếu sự sao chép được nhân lên bằng cách cung cấp protein được mã hóa bởi (các) vùng có sự mất đoạn ở dạng trans bằng tế bào sản xuất bằng cách sử dụng plasmid trợ giúp hoặc thiết kế tế bào sản xuất để biểu hiện protein cần thiết. Vectơ adenovirut cũng có thể có sự mất đoạn trong vùng E3, vùng này không cần thiết cho sự sao chép, và do đó sự mất đoạn này không cần phải bổ sung. Vectơ adenovirut theo sáng chế có thể bao gồm sự mất đoạn chức năng hoặc loại bỏ hoàn toàn vùng E1 và ít nhất là một phần vùng E3. Vectơ adenovirut theo sáng chế có thể còn bao gồm sự mất đoạn chức năng hoặc loại bỏ hoàn toàn vùng E4 và/hoặc vùng E2. Các tế bào sản xuất phù hợp có thể được sử dụng là tế bào võng mạc của người được làm bất tử bằng E1, ví dụ như tế bào 911 hoặc PER.C6 (xem, ví dụ Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,994,128), tế bào màng ối biến đổi E1 (xem, ví dụ là EP 1230354), tế bào A549

biến đổi E 1 (xem ví dụ Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1998/39411, Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,891,690). Ví dụ về các vectơ có thể được sử dụng là Ad26 bao gồm vùng mã hóa E1 chức năng đủ để sao chép virut, sự mất đoạn trong vùng mã hóa E3 và sự mất đoạn trong vùng mã hóa E4, với điều kiện là khung đọc mở E4 6/7 không có sự mất đoạn (xem ví dụ Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 9,750,801).

Theo một số phương án, vectơ adenovirut là vectơ adenovirut ở người (Ad). Theo một số phương án, vectơ Ad có nguồn gốc từ Ad5. Theo một số phương án, vectơ Ad có nguồn gốc từ Ad11. Theo một số phương án, vectơ Ad có nguồn gốc từ Ad7. Theo một số phương án, vectơ Ad có nguồn gốc từ Ad26. Theo một số phương án, vectơ Ad có nguồn gốc từ Ad34. Theo một số phương án, vectơ Ad có nguồn gốc từ Ad35. Theo một số phương án, vectơ Ad có nguồn gốc từ Ad48. Theo một số phương án, vectơ Ad có nguồn gốc từ Ad49. Theo một số phương án, vectơ Ad có nguồn gốc từ Ad50.

Theo một số phương án, vectơ adenovirut là vectơ adenovirut ở vượn lớn (GAd). Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ GAd20. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ GAd19. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ GAd21. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ GAd25. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ GAd26. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ GAd27. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ GAd28. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ GAd29. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ GAd30. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ GAd31. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd3. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd4. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd5. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd6. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd7. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd8. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd9. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd9. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd10. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd11. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd16. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd17. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd19. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd20. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd22. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd24. Theo một số phương án, vectơ GAd

có nguồn gốc từ ChAd26. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd30. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd31. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd32. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd31. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd33. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd37. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd38. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd44. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd55. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd63. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd68. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd73. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd82. Theo một số phương án, vectơ GAd có nguồn gốc từ ChAd83. GAd19-21 và GAd25-31 được mô tả trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2019/008111 và mô tả các chủng có tính sinh miễn dịch cao và không có tính miễn dịch sẵn trong quần thể người nói chung. Trình tự polynucleotit của hệ gen GAd20 được bộc lộ trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2019/008111.

Polynucleotit theo sáng chế có thể được chèn vào vị trí hoặc vùng (vùng chèn) trong vectơ mà không ảnh hưởng đến khả năng sống của virus trong virus tái tổ hợp tạo thành. Polynucleotit theo sáng chế có thể được chèn vào vùng E1 bị mất đoạn song song (được phiên mã từ 5' đến 3') hoặc đối song song (được phiên mã theo hướng từ 3' đến 5' theo hướng khung vectơ). Ngoài ra, các yếu tố điều hòa phiên mã thích hợp có khả năng định hướng biểu hiện của polypeptit hoặc polypeptit theo sáng chế trong tế bào chủ của động vật có vú mà vectơ được điều chế để sử dụng có thể được liên kết thực tế với polypeptit hoặc polypeptit theo sáng chế.

Các hạt adenovirus tái tổ hợp có thể được điều chế và nhân lên theo kỹ thuật thông thường bất kỳ trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1996/17070) sử dụng dòng tế bào bổ sung hoặc virus trợ giúp, cung cấp theo dạng trans cho gen virus bị thiếu mà cần thiết để sao chép virus. Các dòng tế bào 293, PER.C6, E1 A549 và 911 thường được sử dụng để bổ sung cho việc làm mất đoạn E1. Các dòng tế bào khác đã được thiết kế để bổ sung các vectơ khiếm khuyết (Yeh và cộng sự, 1996, *J. Virol.* 70: 559-565; Kroughak and Graham, 1995, *Human Gene Ther.* 6: 1575-1586; Wang và cộng sự, 1995, *Gene Ther.* 2: 775-783; Lusky và cộng sự, 1998, *J. Virol.* 72: 2022-203; EP 919627 và Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1997/04119). Hạt adenovirus có thể được thu hồi từ lớp bề mặt dung dịch nuôi cấy, và cũng từ tế bào sau

khi ly giải và được tinh chế thêm tùy ý theo các kỹ thuật tiêu chuẩn (ví dụ, sắc ký, siêu ly tâm như được mô tả trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1996/27677, Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1998/00524, Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1998/26048 và Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2000/50573). Việc xây dựng và các phương pháp để nhân bản vectơ adenovirut cũng được mô tả trong, ví dụ, các Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,559,099, 5,837,511, 5,846,782, 5,851,806, 5,994,106, 5,994,128, 5,965,541, 5,981,225, 6,040,174, 6,020,191 và 6,113,913.

Sáng chế đề cập đến vectơ virut bao gồm polynucleotit bất kỳ theo sáng chế, trong đó vectơ có nguồn gốc từ hAd26 (còn được gọi là Ad26).

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit có SEQ ID NO: 16 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 16.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit có SEQ ID NO: 17 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 17.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit có SEQ ID NO: 18 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 18.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit có SEQ ID NO: 19 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 19.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit có SEQ ID NO: 20 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 20.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit có SEQ ID NO: 21 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 21.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit có SEQ ID NO: 22 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 22.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit có SEQ ID NO: 23 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 23.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit có SEQ ID NO: 24 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 24.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit có SEQ ID NO: 25 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 25.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit có SEQ ID NO: 26 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 26.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit có SEQ ID NO: 27 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 27.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 1.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 2 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 2.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 3 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 3.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 4.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 5 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 5.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 6 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 6.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 7.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 9 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 9.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 10 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 10.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 11 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 11.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 12.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 13.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 14.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 15.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 31 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 31.

Sáng chế đề cập đến vectơ virus bao gồm polynucleotit bất kỳ theo sáng chế, trong đó vectơ có nguồn gốc từ GAd20.

Theo một số phương án, vectơ GAd20 bao gồm polynucleotit có SEQ ID NO: 16 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 16.

Theo một số phương án, vector GAd20 bao gồm polynucleotit có SEQ ID NO: 27 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 27.

Theo một số phương án, vector GAd20 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 1.

Theo một số phương án, vector GAd20 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 2 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 2.

Theo một số phương án, vector GAd20 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 3 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 3.

Theo một số phương án, vector GAd20 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 4.

Theo một số phương án, vector GAd20 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 5 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 5.

Theo một số phương án, vector GAd20 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 6 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 6.

Theo một số phương án, vector GAd20 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 7.

Theo một số phương án, vectơ GAd20 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 9 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 9.

Theo một số phương án, vectơ GAd20 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 10 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 10.

Theo một số phương án, vectơ GAd20 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 11 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 11.

Theo một số phương án, vectơ GAd20 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 12.

Theo một số phương án, vectơ GAd20 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 13.

Theo một số phương án, vectơ GAd20 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 14.

Theo một số phương án, vectơ GAd20 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 15.

Theo một số phương án, vectơ GAd20 bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 31 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 31.

Vectơ virut đậu mùa (poxvirut)

Vectơ virut đậu mùa (*Poxviridae*) có thể có nguồn gốc từ virut bệnh đậu mùa (*variola*), virut vaccinia, virut bệnh đậu mùa ở bò (*cowpox*) hoặc virut bệnh đậu mùa ở khỉ (*monkeypox*). Các loại virut vaccinia ví dụ là virut vaccinia Copenhagen (W), virut vaccinia giảm độc lực New York (NYVAC), ALVAC, TROVAC hoặc Vaccinia ankara biến đổi (MVA).

MVA có nguồn từ chủng vaccinia ở da Ankara (virut Chorioallantois vaccinia Ankara (CVA)) được lưu trữ ở Viện tiêm chủng (Ankara, Thổ Nhĩ Kỳ) trong nhiều năm và được sử dụng làm cơ sở để tiêm chủng cho người. Tuy nhiên, do các biến chứng sau tiêm chủng thường nghiêm trọng liên quan đến virut vaccinia (VACV) nên vacxin bệnh đậu mùa có ít độc lực hơn, an toàn hơn đã được tạo ra.

MVA đã được tạo ra từ 516 quy trình thiết kế liên tiếp trên nguyên bào sợi phôi gà của virut CVA (Meyer và cộng sự, *J. Gen. Virol.*, 72: 1031-1038 (1991) và Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 10,035,832). Do hậu quả của những quy trình lâu dài này, virut MVA tạo thành đã bị mất khoảng 31 kilo bazơ trong trình tự hệ gen của nó và do đó, được mô tả là tế bào chủ rất hạn chế đối với tế bào gia cầm (Meyer, H. và cộng sự, Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence, (Đối chiếu sự mất đoạn trong hệ gen của virut vaccinia giảm độc lực cao MVA và ảnh hưởng của chúng đối với độc lực), *J. Gen. Virol.* 72, 1031-1038, 1991; Meisinger-Henschel và cộng sự, Genomic sequence of chorioallantois vaccinia virus Ankara, the ancestor of modified vaccinia virus Ankara (Trình tự hệ gen của virut chorioallantois vaccinia Ankara, hình thức nguyên thủy của virut vaccinia biến đổi Ankara), *J. Gen. Virol.* 88, 3249-3259, 2007.) Comparison of the MVA genome to its parent, CVA, revealed 6 major deletions of genomic DNA (deletion I, II, III, IV, V, and VI), totaling 31,000 basepairs (So sánh hệ gen MVA với hệ gen gốc của nó là CVA cho thấy 6 sự mất đoạn chính trong ADN hệ gen (sự mất đoạn I, II, III, IV, V và VI), tổng cộng là 31.000 cặp bazơ). (Meyer và cộng sự, *J. Gen. Virol.* 72: 1031-8 (1991)). Điều này đã được thể hiện trên nhiều mô hình động vật rằng MVA thu được là không có độc lực đáng kể (Mayr, A. & Danner, K. Vaccination against pox diseases under immunosuppressive conditions (Tiêm phòng bệnh đậu mùa trong điều kiện ức chế miễn dịch), *Dev. Biol. Stand.* 41: 225-34, 1978). Do nhiều quy trình được sử dụng để làm giảm độc lực MVA, có một số chủng hoặc phân phân lập khác nhau, tùy thuộc vào số

quy trình trong tế bào CEF, chẳng hạn như MVA 476 MG/14/78, MVA-571, MVA-572, MVA-574, MVA-575 và MVA-BN. MVA 476 MG/14/78 được mô tả, ví dụ trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2019/115816A1. Chủng MVA-572 đã được gửi lưu trữ tại Bộ sưu tập châu Âu về nuôi cấy tế bào động vật ("ECACC"), Cơ quan Bảo vệ Sức khỏe, Ngành vi sinh học, Porton Down, Salisbury SP4 0JG, Vương quốc Anh ("Anh") theo số ký gửi ECACC 94012707 vào ngày 27 tháng 1 năm 1994. Chủng MVA-575 được gửi lưu trữ tại ECACC theo số ký gửi ECACC 00120707 vào ngày 7 tháng 12 năm 2000; Chủng MVA-Bavarian Nordic ("MVA-BN") được gửi lưu trữ tại ECACC theo số ký gửi V00080038 vào ngày 30 tháng 8 năm 2000. Trình tự hệ gen của MVA-BN và MVA-572 có sẵn tại GenBank (Mã truy cập lần lượt là DQ983238 và DQ983237). Trình tự hệ gen của các chủng MVA khác có thể thu được bằng các phương pháp giải trình tự tiêu chuẩn.

Vectơ và virus theo sáng chế có thể có nguồn gốc từ chủng MVA bất kỳ hoặc các dẫn xuất khác của chủng MVA. Chủng MVA ví dụ khác là VR-1508, được gửi lưu trữ tại Bộ sưu tập giống chuẩn của Mỹ (ATCC), Manassas, Va. 20108, USA.

Dẫn xuất của MVA chỉ virus biểu hiện các đặc trưng về cơ bản giống với MVA gốc nhưng có sự khác biệt biểu hiện ở một hoặc nhiều phần trong hệ gen của chúng.

Theo một số phương án, vectơ MVA có nguồn gốc từ MVA 476 MG/14/78. Theo một số phương án, vectơ MVA có nguồn gốc từ MVA-571. Theo một số phương án, vectơ MVA có nguồn gốc từ MVA-572. Theo một số phương án, vectơ MVA có nguồn gốc từ MVA-574. Theo một số phương án, vectơ MVA có nguồn gốc từ MVA-575. Theo một số phương án, vectơ MVA có nguồn gốc từ MVA-BN.

Polynucleotit theo sáng chế có thể được chèn vào vị trí hoặc vùng (vùng chèn) trong vectơ MVA mà không làm ảnh hưởng đến khả năng sống của virus trong virus tái tổ hợp tạo thành. Có thể dễ dàng xác định các vùng này bằng cách kiểm tra các đoạn ADN virus đối với vùng cho phép hình thành tái tổ hợp mà không làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến khả năng sống của virus tái tổ hợp. Gen thymidin kinaza (TK) là vùng chèn có thể được sử dụng và hiện diện trong nhiều loại virus, chẳng hạn như trong tất cả hệ gen virus đậu mùa đã được kiểm tra. Ngoài ra, MVA chứa 6 vị trí mất đoạn tự nhiên, mỗi vị trí có thể được sử dụng làm vị trí chèn (ví dụ, sự mất đoạn I, II, III, IV, V, và VI; xem, ví dụ, Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,185,146 và Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 6.440,442). Một hoặc nhiều vùng liên quan (IGR) của MVA cũng có thể được sử dụng

làm vị trí chèn, chẳng hạn như các IGR IGR07/08, IGR 44/45, IGR 64/65, IGR 88/89, IGR 136/137 và IGR 148/149 (xem, ví dụ, Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 2018/0064803). Các vị trí chèn bổ sung phù hợp được mô tả trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2005/048957.

Hạt virut bệnh đậu mùa (poxvirut) tái tổ hợp như rMVA được điều chế như mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này (Piccini và cộng sự, 1987, Phương pháp trong enzym học 153: 545-563; Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,769,330; Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,772,848; Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,603,112; Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,100,587 và Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,179,993). Theo phương pháp ví dụ, trình tự ADN được thêm vào virut có thể được đặt vào cấu trúc plasmid của *E. coli* mà ADN tương đồng với phần ADN của MVA đã được chèn vào. Trình tự ADN sẽ chèn vào có thể được liên kết riêng với vùng khởi động. Liên kết vùng khởi động-gen có thể được đặt trong cấu trúc plasmid để liên kết vùng khởi động-gen nằm ở cả hai bên đầu theo ADN tương đồng với trình tự ADN nằm ở 2 bên vùng ADN MVA chứa lô-cut không thiết yếu. Cấu trúc plasmid tạo thành có thể được khuếch đại bằng cách nhân bản bên trong vi khuẩn *E. coli* và được phân lập. Plasmid phân lập chứa trình tự gen ADN được chèn có thể được chuyển nạp vào môi trường nuôi cấy tế bào, ví dụ, của nguyên bào sợi phôi gà (CEF), đồng thời môi trường nuôi cấy được chuyển nạp bằng MVA. Sự tái tổ hợp giữa ADN MVA tương đồng lẫn lượt trong plasmid và hệ gen virut có thể tạo ra MVA do sự hiện diện của trình tự ADN ngoại lai biến đổi. Các hạt rMVA có thể được thu hồi từ lớp bề mặt dung dịch nuôi cấy hoặc từ tế bào nuôi cấy sau bước ly giải (ví dụ, ly giải hóa học, đông lạnh/rã đông, sốc thẩm thấu, siêu âm và tương tự). Các vòng tinh chế màng liên tiếp có thể được dùng để loại bỏ virut kiểu đại tạp nhiễm. Sau đó, các hạt virut có thể được tinh chế bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, phương pháp sắc ký hoặc siêu ly tâm trên gradien xesi clorua hoặc sucrozơ).

Sáng chế đề cập đến vector virut bao gồm polynucleotit bất kỳ theo sáng chế, trong đó vector có nguồn gốc từ MVA.

Theo một số phương án, vector MVA bao gồm polynucleotit có SEQ ID NO: 16 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 16.

Theo một số phương án, vectơ MVA bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 11 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 11.

Theo một số phương án, vectơ MVA bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 12.

Theo một số phương án, vectơ MVA bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 13.

Theo một số phương án, vectơ MVA bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 14.

Theo một số phương án, vectơ MVA bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 15.

Theo một số phương án, vectơ MVA bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 31 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 31.

Phân tử ARN tự sao chép

ARN tự sao chép có thể có nguồn gốc từ alphavirus. Alphavirus có thể thuộc nhóm VEEV/EEEV, hoặc nhóm SF, hoặc nhóm SIN. Các ví dụ không giới hạn về các nhóm alphavirus SF bao gồm virus Semliki Forest, virus O'Nyong-Nyong, virus Ross River, virus Middelburg, virus Chikungunya, virus Barmah Forest, virus Getah, virus Mayaro, virus Sagiyama, virus Bebaru và virus Una. Các ví dụ không giới hạn về các nhóm nhóm alphavirus SIN bao gồm virus Sindbis, virus Girdwood S.A., virus Arbovirus Nam Phi số 86, virus Ockelbo, virus Aura, virus Babanki, virus Whataroa và virus Kyzylgach. Các ví dụ không giới hạn về alphavirus thuộc nhóm VEEV/EEEV bao gồm virus viêm não ngựa phương Đông (EEEV), virus viêm não ngựa Venezuela (VEEV), virus Everglades (EVEV), virus Mucambo (MUCV), virus Pixuna (PIXV), virus Middleburg (MIDV), virus Chikungunya (CHIKV), virus O'Nyong-Nyong (ONNV),

virut Ross River (RRV), virut Barmah Forest (BF), virut Getah (GET), virut Sagiyama (SAGV), virut Bebaru (BEBV), virut Mayaro (MAYV) và virut Una (UNAV).

Các phân tử ARN tự sao chép có thể có nguồn gốc từ hệ gen alphavirus, nghĩa là chúng có một số đặc điểm cấu trúc của hệ gen alphavirus hoặc tương tự với chúng. Các phân tử ARN tự sao chép có thể có nguồn gốc từ hệ gen alphavirus đã được biến đổi.

Các phân tử ARN tự sao chép có thể có nguồn gốc từ virut viêm não ngựa phương Đông (EEEV), virut viêm não ngựa Venezuela (VEEV), virut Everglades (EVEV), virut Mucambo (MUCV), virut Semliki Forest (SFV), virut Pixuna (PIXV), virut Middleburg (MIDV), virut Chikungunya (CHIKV), virut O'Nyong-Nyong (ONNV), virut Ross River (RRV), virut Barmah Forest (BF), virut Getah (GET), virut Sagiyama (SAGV), virut Bebaru (BEBV), virut Mayaro (MAYV), virut Una (UNAV), virut Sindbis (SINV), virut Aura (AURAV), virut Whataroa (WHAV), virut Babanki (BABV), virut Kyzylgach (KYZV), virut viêm não ngựa phương Tây (WEEV), virut Highland J (HJV), virut Fort Morgan (FMV), virut Ndumu (NDUV) và virut Buggy Creek. Cả hai chủng virut alphavirus có độc và không độc đều phù hợp. Theo một số phương án, đơn vị sao chép ARN của alphavirus là của virut Sindbis (SIN), virut Semliki Forest (SFV), virut Ross River (RRV), virut viêm não ngựa Venezuela (VEEV) hoặc virut viêm não ngựa phương Đông (EEEV).

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép có nguồn gốc từ alphavirus là virut viêm não ngựa ở Venezuela (VEEV).

Các phân tử ARN tự sao chép có thể chứa trình tự ARN từ (hoặc trình tự axit amin được mã hóa bởi) hệ gen alphavirus ở Tân Thế giới hoặc ở Cựu Thế giới kiểu đại. Bất kỳ phân tử ARN nào trong số các phân tử ARN tự sao chép được đề xuất trong bản mô tả này có thể chứa trình tự ARN “có nguồn từ” hoặc “dựa trên” trình tự hệ gen alphavirus kiểu đại, nghĩa là chúng có ít nhất 60% hoặc ít nhất 65% hoặc ít nhất 68% hoặc ít nhất 70% hoặc ít nhất 80% hoặc ít nhất 85% hoặc ít nhất 90% hoặc ít nhất 95% hoặc ít nhất 97% hoặc ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% hoặc 100% hoặc 80-99% hoặc 90-100% hoặc 95-99% hoặc 95-100% hoặc 97-99% hoặc 98-99% độ tương đồng trình tự với trình tự ARN (có thể là trình tự ARN tương ứng) từ hệ gen RNA alphavirus kiểu đại, có thể là hệ gen alphavirus ở Tân Thế giới hoặc ở Cựu Thế giới kiểu đại.

Các phân tử ARN tự sao chép chứa tất cả thông tin di truyền cần thiết để định hướng sự khuếch đại hoặc tự sao chép của chính nó trong tế bào cho phép. Để định

hướng quá trình sao chép của chính nó, các phân tử ARN tự sao chép mã hóa polymeraza, replicaza hoặc protein khác có thể tương tác với protein có nguồn gốc virus hoặc tế bào chủ, axit nucleic hoặc ribonucleoprotein để xúc tác quá trình khuếch đại ARN; và chứa trình tự ARN hoạt hóa dạng cis cần thiết để sao chép và phiên mã ARN do đơn vị sao chép mã hóa. Do đó, quá trình sao chép ARN dẫn đến tạo thành nhiều ARN con. Các ARN con này, cũng như các bản sao hệ gen con cộng tuyến, có thể được dịch mã để cung cấp sự biểu hiện tại chỗ của gen quan tâm, hoặc có thể được phiên mã để cung cấp thêm các bản sao với ý nghĩa tương tự như ARN được phân phối được dịch mã để cung cấp sự biểu hiện tại chỗ của gen quan tâm. Kết quả tổng thể của trình tự phiên mã này là sự khuếch đại rất lớn về số lượng đơn vị sao chép ARN được đưa vào và do đó gen được mã hóa quan tâm trở thành sản phẩm polypeptit chính của tế bào.

Có hai khung đọc mở (ORF) trong hệ gen của alphavirus, gen không có cấu trúc (ns) và gen có cấu trúc. ns ORF mã hóa các protein (nsP1-nsP4) cần thiết cho quá trình phiên mã và sao chép ARN của virus và được tạo thành dưới dạng polyprotein và là bộ máy sao chép của virus. ORF có cấu trúc mã hóa ba protein cấu trúc: protein nucleocapsid lõi C, và protein vỏ P62 và E1 liên kết như một heterodime. Các glycoprotein bề mặt được neo ở màng của virus chịu trách nhiệm nhận dạng thụ thể và xâm nhập vào các tế bào đích thông qua sự dung hợp màng. Bốn gen protein ns được mã hóa bởi các gen ở đầu 5' 2/3 của hệ gen, trong khi 3 protein cấu trúc được dịch mã từ cột mARN hệ gen con cộng tuyến với đầu 3' 1/3 của hệ gen. Mô tả ví dụ về hệ gen alphavirus được thể hiện trong HÌNH 18A.

Các phân tử ARN tự sao chép có thể được sử dụng làm cơ sở đưa các trình tự ngoại lai vào tế bào chủ bằng cách thay thế trình tự mã hóa gen cấu trúc của virus hoặc chèn trình tự ngoại lai 5' hoặc 3' của trình tự mã hóa gen cấu trúc. Chúng có thể được thiết kế để thay thế các gen cấu trúc của virus ở phía hạ lưu của replicaza, vốn nằm dưới sự kiểm soát của trình tự khởi động hệ gen con, bởi các gen quan tâm (GOI), ví dụ như polynucleotit mã hóa cho polypeptit theo sáng chế. Sau khi chuyển nạp, replicaza được dịch mã ngay lập tức, tương tác với đầu 5' và 3' của ARN hệ gen, và tổng hợp các bản sao ARN hệ gen bổ sung. Chúng hoạt động như các khuôn mẫu để tổng hợp các bản sao gen mới có chuỗi dương, có mũ và được poly-adenyl hóa, và các bản sao hệ gen con (HÌNH 18B). Sự khuếch đại cuối cùng dẫn đến số lượng bản sao ARN rất lớn lên đến 2×10^5 bản sao trên mỗi tế bào. Kết quả là sự biểu hiện đồng nhất và/hoặc tăng cường

của GOI (ví dụ, polynucleotit mã hóa cho polypeptit theo sáng chế) có thể ảnh hưởng đến hiệu quả của vaccin hoặc tác động điều trị của một phương pháp điều trị. Do đó, vaccin dựa trên các phân tử ARN tự sao chép có thể được định liều ở mức rất thấp do số lượng bản sao ARN được tạo ra rất lớn so với vectơ virus thông thường. Một trong những giá trị quan trọng của chế phẩm và phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này là hiệu quả vaccin có thể được tăng lên ở những đối tượng đang trong tình trạng kích hoạt miễn dịch mạn tính hoặc cấp tính.

Các phân tử ARN tự sao chép theo sáng chế bao gồm ARN mã hóa cho polypeptit quyết định kháng nguyên CALR/JAK2 hoặc JAK2 2 theo sáng chế có thể được sử dụng làm chất điều trị bằng cách phân phối chúng cho đối tượng mắc bệnh tăng sinh tủy ác tính sử dụng các kỹ thuật khác nhau, bao gồm cả vectơ virus như được mô tả trong bản mô tả này hoặc các kỹ thuật phân phối khác như được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế đề xuất phân tử ARN tự sao chép chứa tất cả thông tin di truyền cần thiết để định hướng quá trình khuếch đại hoặc tự sao chép của chính nó trong tế bào cho phép.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử ARN tự sao chép có thể được sử dụng làm cơ sở để đưa các trình tự ngoại lai vào tế bào chủ (ví dụ, polypeptit quyết định kháng nguyên CALR/JAK2 hoặc JAK2 2 theo sáng chế) bằng cách thay thế trình tự virus mã hóa gen cấu trúc.

Sáng chế cũng đề xuất vectơ virus chứa polynucleotit bất kỳ theo sáng chế, trong đó vectơ là phân tử ARN tự sao chép.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN có nguồn gốc từ polynucleotit có SEQ ID NO: 16 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 16.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN có nguồn gốc từ polynucleotit có SEQ ID NO: 17 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 17.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN có nguồn gốc từ polynucleotit có SEQ ID NO: 18 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình

tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 18.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN có nguồn gốc từ polynucleotit có SEQ ID NO: 19 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 19.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN có nguồn gốc từ polynucleotit có SEQ ID NO: 20 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 20.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN có nguồn gốc từ polynucleotit có SEQ ID NO: 21 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 21.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN có nguồn gốc từ polynucleotit có SEQ ID NO: 22 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 22.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN có nguồn gốc từ polynucleotit có SEQ ID NO: 23 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 23.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN có nguồn gốc từ polynucleotit có SEQ ID NO: 24 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 24.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN có nguồn gốc từ polynucleotit có SEQ ID NO: 25 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 25.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN có nguồn gốc từ polynucleotit có SEQ ID NO: 26 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình

tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 26.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN có nguồn gốc từ polynucleotit có SEQ ID NO: 27 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 27.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 1.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 2 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 2.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 3 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 3.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 4.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 5 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 5.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 6 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 6.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít

nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 7.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 9 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 9.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 10 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 10.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 11 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 11.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 12.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 13.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 14.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 15.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 31 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, hoặc

ít nhất 95% độ tương đồng trình tự, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 31.

Phân tử ARN tự sao chép bất kỳ ở trên còn có thể bao gồm một hoặc nhiều thành phần sau:

- một hoặc nhiều gen không có cấu trúc nsP1, nsP2, nsP3 và nsP4;
- ít nhất một trong số mô-tip DLP, 5'UTR, 3'UTR và Poly A; và
- vùng khởi động.

Theo một số phương án, ví dụ, phân tử ARN tự sao chép có thể bao gồm một hoặc nhiều thành phần dưới đây:

- một hoặc nhiều gen không có cấu trúc nsP1, nsP2, nsP3 và nsP4;
- ít nhất một trong số mô-tip DLP, 5'UTR, 3'UTR và Poly A; và
- vùng khởi động; và
- RNA mã hóa cho axit amin có SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, hoặc 31, và được liên kết hoạt động với vùng khởi động hệ gen con.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự ARN mã hóa protein hoặc peptit; vùng chưa dịch mã 5' và 3' của alphavirus; Trình tự ARN mã hóa trình tự axit amin có nguồn gốc từ protein không có cấu trúc VEEV của alphavirus Tân Thế giới nsP1, nsP2, nsP3 và nsP4; vùng khởi động hệ gen con được liên kết hoạt động và điều hòa quá trình dịch mã trình tự ARN mã hóa protein; mũ 5' và đuôi 3' poly-A; ARN sợi đơn, chiều dương; DLP từ virus Sindbis ở phía thượng lưu của protein không có cấu trúc 1 (nsP1); thành phần bỏ qua ribosom 2A; và đoạn lặp nucleotit nsp ở phía hạ lưu của 5'-UTR và ngược chiều với DLP.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép có thể có kích thước ít nhất là 1 kb hoặc ít nhất là 2 kb hoặc ít nhất là 3 kb hoặc ít nhất là 4 kb hoặc ít nhất là 5 kb hoặc ít nhất là 6 kb hoặc ít nhất là 7 kb hoặc ít nhất là 8 kb hoặc ít nhất là 10 kb hoặc ít nhất là 12 kb hoặc ít nhất là 15 kb hoặc ít nhất là 17 kb hoặc ít nhất là 19 kb hoặc ít nhất là 20 kb, hoặc có thể có kích thước ít nhất là 100 bp-8 kb hoặc 500 bp-8 kb hoặc 500 bp-7 kb hoặc 1-7 kb hoặc 1-8 kb hoặc 2-15 kb hoặc 2-20 kb hoặc 5-15 kb hoặc 5-20 kb hoặc 7-15 kb hoặc 7-18 kb hoặc 7-20 kb.

Các phân tử ARN tự sao chép bất kỳ được đề xuất ở trên đều có thể bao gồm thêm trình tự mã hóa cho peptit autoproteaza (ví dụ, peptit tự phân cắt tự xúc tác), trong

đó trình tự mã hóa cho autoproteaza được tùy ý liên kết hoạt động ở phía thượng lưu của trình tự axit nucleic thứ hai.

Nói chung, vị trí phân cắt phân giải protein bất kỳ đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này đều có thể được kết hợp vào các phân tử axit nucleic theo sáng chế và có thể là, ví dụ, trình tự phân cắt phân giải protein được phân cắt sau sản xuất bằng proteaza. Ngoài ra, các vị trí phân cắt phân giải protein thích hợp cũng bao gồm các trình tự phân cắt phân giải protein có thể được phân cắt sau khi bổ sung một proteaza bên ngoài. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “autoproteaza” đề cập đến peptit “tự phân cắt” có hoạt tính tự phân giải protein và có khả năng tự phân cắt khỏi gốc polypeptit lớn hơn. Được xác định lần đầu tiên trong virus gây bệnh lở mồm long móng (FMDV), một thành viên của nhóm picornavirut, một số autoproteaza sau đó đã được xác định như, ví dụ, peptit “giống 2A” từ virus viêm mũi ngựa A (E2A), Ictesovirut lợn 1 (P2A) và virus *Thosea asigna* (T2A), và các hoạt tính của chúng trong quá trình phân cắt phân giải protein đã được thể hiện trong các hệ thống sinh vật nhân thực *ex vitro* và *in vivo* khác nhau. Do đó, khái niệm về autoproteaza có sẵn đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này này do nhiều hệ thống autoproteaza tự nhiên đã được xác định. Các hệ thống autoproteaza được nghiên cứu chuyên sâu là, ví dụ, proteaza virus, protein phát triển (ví dụ, HetR, protein Hedgehog), miền autoproteaza của RumA, UmuD, v.v.). Các ví dụ không giới hạn về peptit autoproteaza thích hợp cho các chế phẩm và phương pháp theo sáng chế bao gồm trình tự peptit từ teschovirut-1 ở lợn 2A (P2A), virus gây bệnh lở mồm long móng (FMDV) 2A (F2A), virus viêm mũi ngựa A (ERAV) 2A (E2A), virus *Thosea asigna* 2A (T2A), virus đa diện tế bào chất 2A (BmCPV2A), virus Flacherie 2A (BmIFV2A) hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một số phương án, trình tự mã hóa cho peptit autoproteaza được liên kết hoạt động ở phía hạ lưu của mô-tip DLP và ở phía thượng lưu của polynucleotit thứ nhất và thứ hai.

Theo một số phương án, peptit autoproteaza bao gồm, hoặc chỉ bao gồm, trình tự peptit được chọn từ nhóm bao gồm teschovirut-1 2A ở lợn (P2A), virus gây bệnh lở mồm long móng (FMDV) 2A (F2A), virus viêm mũi ngựa A (ERAV) 2A (E2A), một loại virus *Thosea asigna* 2A (T2A), virus đa diện tế bào chất 2A (BmCPV2A), virus

Flacherie 2A (BmIFV2A) và sự kết hợp của chúng. Theo một số phương án, peptit autoproteaza bao gồm trình tự peptit của teschovirut-1 2A ở lợn (P2A).

Theo một số phương án, peptit autoproteaza được chọn từ nhóm bao gồm teschovirut-1 ở lợn 2A (P2A), virus gây bệnh lở mồm long móng (FMDV) 2A (F2A), virus viêm mũi ngựa A (ERAV) 2A (E2A), virus *Thosea asigna* 2A (T2A), virus đa diện tế bào chất 2A (BmCPV2A), virus Flacherie 2A (BmIFV2A), và sự kết hợp của chúng.

Theo một số phương án, peptit autoproteaza là teschovirut-1 ở lợn 2A (P2A).

Việc kết hợp peptit P2A vào trong các đơn vị sao chép ARN của virus đã biến đổi theo sáng chế cho phép giải phóng protein được mã hóa bởi GOI (ví dụ, polypeptit quyết định kháng nguyên JAK2 2 theo sáng chế) từ sự dung hợp capsid-GOI.

Theo một số phương án được đề xuất trong bản mô tả này, trình tự peptit của teschovirut-1 ở lợn 2A (P2A) được thiết kế trong khung ngay sau trình tự DLP và trong khung ở phía thượng lưu của tất cả GOI.

Bất kỳ phân tử ARN nào trong số các phân tử ARN tự sao chép được đề xuất ở trên đều có thể bao gồm thêm mô-tip vòng lặp hạ lưu (DLP) của trình tự mã hóa.

Một số virus có trình tự có khả năng tạo thành một hoặc nhiều cấu trúc vòng lặp gốc mà điều chỉnh, ví dụ như sự gia tăng, biểu hiện gen capsid. Vùng tăng cường capsid của virus như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến thành phần điều hòa bao gồm các trình tự có khả năng tạo thành cấu trúc mạch vòng lặp gốc như vậy. Theo một số ví dụ, cấu trúc vòng lặp gốc được tạo thành bởi các trình tự trong trình tự mã hóa của protein capsid và được đặt tên là trình tự vòng lặp hạ lưu (DLP). Như được mô tả trong bản mô tả này, các cấu trúc vòng lặp gốc này hoặc các biến thể của chúng có thể được sử dụng để điều chỉnh, ví dụ, như tăng mức độ biểu hiện của các gen quan tâm. Ví dụ, các cấu trúc vòng lặp gốc này hoặc các biến thể của chúng có thể được sử dụng trong vectơ tái tổ hợp (ví dụ, trong hệ gen virus dị hợp) để tăng cường phiên mã và/hoặc dịch mã trình tự mã hóa được liên kết hoạt động theo ở phía hạ lưu của chúng.

Sự sao chép của alphavirus trong tế bào chủ được biết là tạo ra protein kinaza phụ thuộc ARN sợi kép (PKR). PKR phosphoryl hóa yếu tố khởi đầu dịch mã của sinh vật nhân thực 2α (eIF2 α). Quá trình phosphoryl hóa của eIF2 α ngăn chặn quá trình bắt đầu dịch mã của mARN và làm như vậy sẽ ngăn không cho virus hoàn thành chu kỳ sao chép sản sinh. Sự xâm nhiễm của các tế bào bằng virus Sindbis gây ra PKR dẫn đến quá trình phosphoryl hóa eIF2 α , tuy nhiên mARN hệ gen con của virus được dịch mã một cách

hiệu quả trong khi sự dịch mã của tất cả các mARN tế bào khác bị hạn chế. Quá trình dịch mã hiệu quả của mARN hệ gen con của virus trong virus Sindbis có thể thực hiện được nhờ sự có mặt của vòng lặp dạng kẹp tóc ARN ổn định (hoặc mô-tip DLP) nằm ở phía hạ lưu của mã bộ ba khởi đầu AUG kiểu đại cho protein capsid của virus (ví dụ, vùng tăng cường capsid). Người ta đã báo cáo rằng cấu trúc DLP có thể ngăn chặn ribosom trên AUG kiểu đại và điều này hỗ trợ quá trình dịch mã mARN hệ gen con mà không cần đến eIF2 α chức năng. Do đó, mARN hệ gen con của virus Sindbis (SINV) cũng như của các alphavirus khác được dịch mã một cách hiệu quả ngay cả trong các tế bào có PKR hoạt động mạnh dẫn đến sự phosphoryl hóa hoàn toàn eIF2 α .

Cấu trúc DLP lần đầu tiên xác định trong mARN 26S của virus Sindbis (SINV) và cũng được phát hiện trong virus Semliki Forest (SFV). Các cấu trúc DLP tương tự đã được báo cáo là có mặt ở ít nhất 14 thành viên khác của chi alphavirus bao gồm thành viên Tân Thế giới (ví dụ, MAYV, UNAV, EEEV (NA), EEEV (SA), AURAV) và thành viên Cựu Thế giới (SV, SFV, BEBV, RRV, SAG, GETV, MIDV, CHIKV, và ONNV). Các cấu trúc dự đoán của các mARN 26S của alphavirus này được xây dựng dựa trên dữ liệu SHAPE (acyl hóa 2'-hydroxyl chọn lọc và kéo dài đoạn môi) (Toribio et al., *Nucleic Acids Res.* 19 tháng 5; 44 (9): 4368-80, 2016), nội dung của tài liệu này được kết hợp vào trong bản mô tả này bằng viện dẫn). Cấu trúc vòng lặp gốc ổn định được phát hiện trong tất cả các trường hợp ngoại trừ CHIKV và ONNV, trong khi MAYV và EEEV thể hiện các DLP có độ ổn định thấp hơn (Toribio và cộng sự, 2016 supra). Các hoạt tính DLP cao nhất đã được báo cáo cho những alphavirus có chứa cấu trúc DLP ổn định nhất.

Ví dụ, các thành viên của chi alphavirus có thể kháng lại sự hoạt hóa của protein kinaza hoạt hóa ARN (PKR) kháng virus bằng vòng lặp hạ lưu (DLP) có trong bản sao 26S của virus, cho phép bắt đầu dịch mã độc lập với eIF2 của các mARN này. Vòng lặp hạ lưu (DLP), nằm theo ở phía hạ lưu từ AUG trong mARN SINV 26S và trong các thành viên khác của chi alphavirus.

Theo một số phương án, phân tử axit nucleic theo sáng chế có thể bao gồm trình tự mã hóa cho gen quan tâm (GOI) được liên kết hoạt động với (các) mô-tip DLP và/hoặc trình tự mã hóa cho mô-tip DLP.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép theo sáng chế bao gồm vòng lặp hạ lưu (DLP).

Theo một số phương án, vòng lặp hạ lưu (DLP) bao gồm ít nhất một vòng lặp gốc ARN.

Trong một số trường hợp, hoạt tính DLP phụ thuộc vào khoảng cách giữa mô-tip DLP và mã bộ ba khởi đầu AUG (AUGi). Khoảng cách AUG-DLP trong mARN 26S của Alphavirus được điều chỉnh theo cấu trúc liên kết của vùng ES6S của rARN 18S ribosom theo cách cho phép vị trí AUGi ở vị trí P của tiểu đơn vị 40S bị chặn bởi DLP, cho phép kết hợp Met-tARN mà không có sự tham gia của eIF2. Trong trường hợp của virus Sindbis, mô-tip DLP được tìm thấy trong ~150 nt đầu tiên của ARN hệ gen con Sindbis. Phần kẹp tóc nằm ở phía hạ lưu của mã bộ ba khởi đầu AUG của Sindbis capsid (AUG ở vị trí thứ 50 của ARN hệ gen con Sindbis) và kết quả là ngăn chặn ribosom sao cho AUG của gen capsid chính xác được sử dụng để bắt đầu quá trình dịch mã. Các nghiên cứu trước đây về so sánh trình tự và phân tích ARN cấu trúc thể hiện sự bảo toàn tiến hóa của DLP trong SINV và dự đoán sự tồn tại của các cấu trúc DLP tương đương ở nhiều thành viên của chi Alphavirus (xem, ví dụ, Ventoso, J. Virol). 9484-9494, Vol. 86, tháng 12 năm 2012).

Không bị ràng buộc bởi bất kỳ lý thuyết cụ thể nào, người ta tin rằng việc đặt mô-tip DLP ở phía thượng lưu của trình tự mã hóa cho GOI bất kỳ thường dẫn đến kết quả dung hợp protein có các axit amin capsid ở đầu N được mã hóa trong vùng kẹp tóc với protein mã hóa GOI bởi vì sự bắt đầu xảy ra trên AUG của capsid không phải AUG của GOI.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm vòng lặp hạ lưu được đặt ở phía hạ lưu của protein không có cấu trúc 1 (nsP1).

Theo một số phương án, vòng lặp hạ lưu được đặt ở phía thượng lưu của protein không có cấu trúc 1 (nsP1) và được nối với nsP1 bởi thành phần bỏ qua ribosom của teschovirus-1 2A ở lộn (P2A).

ARN tự sao chép chứa DLP theo sáng chế có thể hữu ích trong việc tạo ra khả năng kháng lại hệ thống miễn dịch bẩm sinh ở đối tượng. Các đơn vị sao chép ARN chưa biến đổi nhạy cảm với trạng thái hệ thống miễn dịch bẩm sinh ban đầu của các tế bào mà chúng được đưa vào. Nếu các tế bào/đối tượng đang ở trong trạng thái hệ thống miễn dịch bẩm sinh hoạt động mạnh, hiệu quả của đơn vị sao chép ARN (ví dụ, sao chép và biểu hiện GOI) có thể bị tác động tiêu cực. Bằng cách thiết kế DLP để kiểm soát sự khởi đầu của quá trình dịch mã protein, cụ thể là các protein không có cấu trúc, tác động

của trạng thái kích hoạt sẵn có trước đó của hệ thống miễn dịch bẩm sinh để ảnh hưởng đến sự sao chép hiệu quả của đơn vị sao chép ARN sẽ được loại bỏ hoặc giảm bớt. Kết quả là biểu hiện GOI đồng đều và/hoặc tăng hơn có thể ảnh hưởng đến hiệu quả của vacxin hoặc tác động điều trị của một phương pháp điều trị.

Mô-tip DLP của ARN tự sao chép theo sáng chế có thể tạo ra quá trình dịch mã mARN hiệu quả trong môi trường tế bào trong đó quá trình dịch mã mARN của tế bào bị ức chế. Khi DLP được liên kết với quá trình dịch mã của các gen protein không có cấu trúc của vector đơn vị sao chép, các protein transcriptaza và replicaza có khả năng bắt đầu sao chép chức năng trong môi trường tế bào được kích hoạt PKR. Khi một DLP được liên kết với quá trình dịch mã của mARN hệ gen con, biểu hiện GOI mạnh mẽ có thể xảy ra ngay cả khi mARN tế bào bị hạn chế do kích hoạt miễn dịch bẩm sinh. Theo đó, ARN tự sao chép được thiết kế có chứa cấu trúc DLP để giúp thúc đẩy quá trình dịch mã của cả gen protein không có cấu trúc và mARN hệ gen con cung cấp phương thức mạnh mẽ để vượt qua quá trình kích hoạt miễn dịch bẩm sinh.

Các ví dụ về vector ARN tự sao chép bao gồm mô-tip DLP được mô tả trong Công bố đơn đăng ký sáng chế Hoa Kỳ số US2018/0171340 và Công bố đơn sáng chế quốc tế WO2018106615, toàn bộ nội dung của chúng được kết hợp vào bản mô tả này bằng viện dẫn.

Phân tử ARN tự sao chép bất kỳ được đề xuất ở trên có thể còn bao gồm các gen không có cấu trúc nsP1, nsP2, nsP3 và/hoặc nsP4. Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép không mã hóa protein cấu trúc chức năng của virut.

Hệ gen alphavirus mã hóa các protein không có cấu trúc nsP1, nsP2, nsP3 và nsP4, được tạo ra như tiền chất polyprotein đơn lẻ, đôi khi được ký hiệu là P1234 (hoặc nsP1-4 hoặc nsP1234), và được phân cắt thành các protein trưởng thành thông qua quá trình phân giải protein (HÌNH 18B). nsP1 có thể có kích thước khoảng 60 kDa và có thể có hoạt tính metyltransferaza và tham gia vào phản ứng gắn mũ của virut. nsP2 có kích thước khoảng 90 kDa và có thể có hoạt tính helicaza và proteaza trong khi nsP3 có kích thước khoảng 60 kDa và chứa ba miền: miền macro, miền trung tâm (hoặc miền duy nhất của alphavirus) và miền siêu biến (HVD). nsP4 có kích thước khoảng 70 kDa và chứa miền xúc tác ARN polymeraza (RdRp) phụ thuộc ARN lõi. Sau khi lây nhiễm, ARN hệ gen của alphavirus được dịch mã để tạo ra một polyprotein P1234, được phân cắt thành các protein riêng lẻ.

Hệ gen của alphavirus cũng mã hóa ba protein cấu trúc: protein nucleocapsid lõi C, và protein vỏ P62, và E1 liên kết như một heterodime. Các protein cấu trúc nằm dưới sự kiểm soát của vùng khởi động hệ gen con và có thể được thay thế bằng gen quan tâm (GIO).

Theo một số phương án của sáng chế, ARN tự sao chép có thể thiếu (hoặc không chứa) (các) trình tự của ít nhất một trong số các (hoặc tất cả) protein cấu trúc của virus (ví dụ, protein nucleocapsid C và protein vỏ P62, 6K và E1). Theo các phương án này, các trình tự mã hóa một hoặc nhiều gen cấu trúc có thể được thay thế bằng một hoặc nhiều trình tự, ví dụ, như là trình tự mã hóa cho ít nhất một protein hoặc peptit (hoặc gen quan tâm khác (GOI)), ví dụ như polypeptit CALR/JAK2 hoặc polypeptit quyết định kháng nguyên 2 JAK2 theo sáng chế.

Theo một số phương án, ARN tự sao chép thiếu trình tự mã hóa protein cấu trúc của alphavirus; hoặc không mã hóa các protein cấu trúc của alphavirus (hoặc, tùy chọn, bất kỳ khác). Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép được còn không có một phần hoặc toàn bộ vùng mã hóa cho một hoặc nhiều protein cấu trúc của virus. Ví dụ, hệ thống biểu hiện của alphavirus có thể không có một phần hoặc toàn bộ trình tự mã hóa cho một hoặc nhiều protein capsid C của virus, glycoprotein E1, glycoprotein E2, protein E3 và protein 6K.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép không chứa trình tự mã hóa cho ít nhất một trong số các protein cấu trúc của virus. Trong những trường hợp này, trình tự mã hóa gen cấu trúc có thể được thay thế bằng một hoặc nhiều trình tự, như là trình tự mã hóa cho GOI, ví dụ, polynucleotit quyết định kháng nguyên 2 CALR/JAK2 hoặc JAK2 theo mô tả trên HÌNH 18.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử ARN tự sao chép bao gồm các gen không có cấu trúc nsP1, nsP2, nsP3 và nsP4, và trong đó phân tử ARN tự sao chép không mã hóa protein cấu trúc chức năng của virus.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự mã hóa cho ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba hoặc ít nhất bốn protein không có cấu trúc của virus (ví dụ, nsP1, nsP2, nsP3, nsP4). Các protein nsP1, nsP2, nsP3 và nsP4 được mã hóa bởi đơn vị sao chép là các protein chức năng hoặc có hoạt tính sinh học.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự mã hóa cho một phần của ít nhất một protein không có cấu trúc của virus. Ví dụ, các phân tử ARN

tự sao chép có thể bao gồm khoảng 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% hoặc khoảng nằm giữa hai giá trị bất kỳ trong số các giá trị này, của trình tự mã hóa cho ít nhất một protein không có cấu trúc của virus. Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép có thể bao gồm trình tự mã hóa cho một phần đáng kể của ít nhất một protein không có cấu trúc của virus. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “một phần đáng kể” của trình tự axit nucleic mã hóa protein không có cấu trúc của virus bao gồm đầy đủ trình tự axit nucleic mã hóa cho protein không có cấu trúc của virus để có đủ khả năng nhận dạng giả định của protein đó, bằng cách đánh giá trình tự thủ công bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc bằng cách so sánh và nhận dạng trình tự tự động bằng máy tính sử dụng các thuật toán như BLAST (ví dụ, xem trong “Basic Local Alignment Search Tool (Công cụ tìm kiếm căn chỉnh cục bộ cơ bản)”; Altschul S F và cộng sự, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1993).

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép có thể bao gồm toàn bộ trình tự mã hóa cho ít nhất một protein không có cấu trúc. Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép về cơ bản bao gồm tất cả trình tự mã hóa cho các protein không có cấu trúc của virus tự nhiên. Theo một số phương án, một hoặc nhiều protein virus không có cấu trúc có nguồn gốc từ cùng một loại virus.

Theo một số phương án, DLP vòng lặp hạ lưu của phân tử ARN tự sao chép được đặt ở phía thượng lưu của protein không có cấu trúc 1 (nsP1) có nguồn gốc từ virus Sindbis.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm trình tự nsP1, nsP2, nsP3 và nsP4 có nguồn gốc từ virus viêm não ngựa Venezuela (VEEV) và mô-típ DLP có nguồn gốc từ virus Sindbis (SIN).

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép cũng có trình tự phụ ARN mã hóa trình tự axit amin có nguồn gốc từ miền macro alphavirus nsP3 và trình tự phụ ARN mã hóa trình tự axit amin có nguồn gốc từ miền trung tâm alphavirus nsP3. Các phân tử ARN tự sao chép cũng có thể có trình tự phụ ARN mã hóa trình tự axit amin có nguồn gốc hoàn toàn từ miền siêu biến đổi alphavirus ở Cựu Thế giới nsP3; hoặc có thể có trình tự axit amin có một phần có nguồn gốc từ miền siêu biến đổi alphavirus ở Tân Thế giới nsP3 và một phần có nguồn gốc từ miền siêu biến đổi alphavirus ở Cựu Thế giới nsP3, tức là miền siêu biến (HVD) có thể là một trình tự lai hoặc trình tự ở Tân Thế giới/Cựu Thế giới.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép có thể có trình tự ARN mã hóa trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự protein của virus alphavirus ở Tân Thế giới nsP1, nsP2, nsP3 và nsP4. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều protein không có cấu trúc có nguồn gốc từ các virus khác nhau.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép có thể có trình tự ARN mã hóa miền macro nsP3 có nguồn gốc từ alphavirus kiểu đại nsP3 và miền trung tâm nsP3 có nguồn gốc từ alphavirus kiểu đại nsP3. Theo các phương án khác nhau, cả (các) miền trung tâm và macro đều có thể có nguồn gốc từ một loại alphavirus kiểu đại nsP3 ở Tân Thế giới hoặc cả hai có thể có nguồn gốc từ một loại protein của alphavirus kiểu đại nsP3 ở Cựu Thế giới. Theo các phương án khác, miền macro có thể có nguồn gốc từ miền macro của alphavirus kiểu đại ở Tân Thế giới và miền trung tâm có thể có nguồn gốc từ miền trung tâm alphavirus kiểu đại ở Cựu Thế giới hoặc ngược lại. Các miền khác nhau có thể thuộc bất kỳ trình tự nào được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép chứa các protein không có cấu trúc VEEV nsP1, nsP2, nsP3 và nsP4.

Bằng chứng thực nghiệm tích lũy được đã chứng minh rằng sự sao chép/khuếch đại của VEEV và các hệ gen alphavirus khác và các ARN can thiệp (DI) bị lỗi của chúng được xác định bởi ba yếu tố ở vùng khởi động: (i) thành phần trình tự đầu 3' được bảo toàn (3' CSE) và đuôi poly(A) dưới đây; (ii) 5' UTR, có chức năng như một thành phần vùng khởi động chính cho quá trình tổng hợp ARN sợi âm và sợi dương; và (iii) thành phần trình tự được bảo toàn 51-nt (51-nt CSE), nằm trong trình tự mã hóa nsP1 và có chức năng như vùng tăng cường sao chép của hệ gen alphavirus (Kim và cộng sự, PNAS, 2014, 111: 10708–10713, và các tài liệu tham khảo theo bản mô tả này).

Phân tử ARN tự sao chép bất kỳ được đề xuất ở trên đều có thể bao gồm thêm vùng 5' không được dịch mã (5'UTR) không được biến đổi.

Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng trong quá trình nhiễm virus VEEV và Sindbis, chỉ một phần nhỏ các protein không có cấu trúc của virus (nsPs) được đồng nội hóa với các chất trung gian sao chép dsARN. Do đó, có vẻ như một phần lớn nsPs không tham gia vào quá trình sao chép ARN (Gorchakov R và cộng sự. (2008). A new role for ns polyprotein cleavage in Sindbis virus replication (Vai trò mới đối với sự phân cắt polyprotein ns trong quá trình sao chép của virus Sindbis). J Virol 82(13):6218–6231). Điều này đã tạo cơ hội để khai thác các protein ns chưa được sử dụng để khuếch

đại các ARN hệ gen con mã hóa các protein quan tâm, thường được phiên mã từ vùng khởi động của hệ gen con và không được khuếch đại thêm

Theo một số phương án, đoạn nsP1 của phân tử ARN tự sao chép theo sáng chế được sao chép ở phía hạ lưu của 5'-UTR và ở phía thượng lưu của DLP.

Theo một số phương án, 193 nucleotit đầu tiên của nsP1 được nhân đôi ở phía hạ lưu của 5' UTR và ở phía thượng lưu của DLP.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm vùng 5' chưa được dịch mã (5'-UTR) đã được biến đổi. Ví dụ, 5'-UTR được biến đổi có thể bao gồm một hoặc nhiều sự thay thế nucleotit ở vị trí 1, 2, 4 hoặc sự kết hợp của chúng. Tốt hơn là, 5'-UTR được biến đổi bao gồm sự thay thế nucleotit ở vị trí 2, tốt hơn là, 5'-UTR đã biến đổi có sự thay thế U->G ở vị trí 2. Ví dụ về các phân tử ARN tự sao chép như vậy được mô tả trong Công bố đơn đăng ký sáng chế Hoa Kỳ số US2018/0104359 và Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2018075235, toàn bộ nội dung của chúng được đưa vào bản mô tả này bằng viện dẫn.

Theo một số phương án, UTR có thể là trình tự UTR của alphavirus kiểu đại ở Tân Thế giới hoặc ở Cựu Thế giới hoặc trình tự có nguồn từ bất kỳ trình tự nào trong số chúng. UTR 5' có thể có độ dài thích hợp bất kỳ, như là khoảng 60 nt hoặc 50-70 nt hoặc 40-80 nt. Theo một số phương án, 5' UTR cũng có thể có cấu trúc bậc một hoặc bậc hai được bảo toàn (ví dụ, một hoặc nhiều (các) vòng lặp gốc) và có thể tham gia vào quá trình sao chép của alphavirus hoặc của ARN đơn vị sao chép. 3' UTR có thể lên đến vài trăm nucleotit, ví dụ có thể là 50-900 nt hoặc 100-900 nt hoặc 50-800 nt hoặc 100-700 nt hoặc 200 -700 nt. 3' UTR cũng có thể có cấu trúc bậc hai, ví dụ như vòng lặp gốc và có thể được theo sau bởi một miền polyadenylat hoặc đuôi poly-A.

Các vùng chưa được dịch 5' và 3' có thể được liên kết hoạt động với trình tự bất kỳ được mã hóa bởi đơn vị sao chép. Các UTR có thể được liên kết hoạt động với vùng khởi động và/hoặc trình tự mã hóa protein hoặc peptit bằng cách cung cấp trình tự và khoảng cách cần thiết để nhận biết và phiên mã các trình tự được mã hóa khác.

GOI, ví dụ polynucleotit quyết định kháng nguyên CALR/JAK2 hoặc JAK2 2 theo sáng chế có thể được biểu thị dưới sự kiểm soát của vùng khởi động hệ gen con. Theo một số phương án, thay vì trình tự khởi động hệ gen con bản địa, ARN hệ gen con có thể được đặt dưới sự kiểm soát của vị trí xâm nhập ribosom bên trong (IRES) có nguồn gốc từ virus viêm não cơ tim (EMCV), virus tiêu chảy do virus ở bò (BVDV),

virut bại liệt, virut gây bệnh lở mồm long móng (FMD), enterovirut 71, hoặc virut viêm gan C. Vùng khởi động hệ gen con nằm trong khoảng từ 24 nucleotit (virut Sindbis) đến hơn 100 nucleotit (virut mạch vàng hoại tử củ cải) và thường được tìm thấy ở phía thượng lưu của quá trình phiên mã.

Các phân tử ARN tự sao chép có thể có đuôi 3' poly-A. Nó cũng có thể bao gồm trình tự nhận dạng poly-A polymeraza (ví dụ, AAUAAA) gần đầu 3' của nó.

Trong những trường hợp mà phân tử ARN tự sao chép được đóng gói thành hạt alphavirut tái tổ hợp, nó có thể chứa một hoặc nhiều trình tự, được gọi là tín hiệu đóng gói, dùng để bắt đầu tương tác với các protein cấu trúc của alphavirut dẫn đến hình thành hạt. Theo một số phương án, các thành phần alphavirut bao gồm ARN có nguồn gốc từ một hoặc nhiều alphavirut; và protein cấu trúc, trong đó ít nhất một trong số các protein cấu trúc nói trên có nguồn gốc từ hai hoặc nhiều alphavirut.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép bao gồm vectơ có nguồn gốc từ VEEV, trong đó các protein cấu trúc của virut (ví dụ, protein nucleocapsid C, và protein vỏ P62, 6K và E1) được loại bỏ và thay thế bằng trình tự mã hóa của CARL.JAK2 hoặc polypeptit quyết định kháng nguyên 2 JAK2 theo sáng chế.

Các vectơ virut và virut tái tổ hợp khác

Vectơ virut bao gồm polynucleotit theo sáng chế có thể có nguồn gốc từ virut liên kết với adeno ở người, như là AAV-2 (virut liên kết với adeno loại 2). Đặc tính thu hút của vectơ AAV là chúng không biểu hiện bất kỳ gen virut nào. Trình tự ADN virut duy nhất có trong vectơ AAV là các đoạn lặp đầu đảo ngược 145 bp (ITR). Do đó, như khi tạo miễn dịch bằng ADN trần, gen duy nhất được biểu hiện là gen của kháng nguyên, hoặc thể khảm kháng nguyên. Ngoài ra, vectơ AAV được biết là để chuyển nạp cả tế bào phân chia và không phân chia, chẳng hạn như tế bào tua có nguồn gốc từ bạch cầu đơn nhân trong máu ngoại vi ở người, có biểu hiện gen biến đổi dai dẳng và có khả năng cung cấp qua miệng và trong mũi để tạo miễn dịch niêm mạc. Hơn nữa, lượng ADN cần thiết dường như ít hơn nhiều theo một số bậc của độ lớn, với đáp ứng tối đa ở liều lượng từ 10^{10} đến 10^n hạt hoặc bản sao ADN trái ngược với liều lượng ADN trần là 50 μ g hoặc khoảng 10^{15} bản sao. Vectơ AAV được đóng gói bằng cách đồng chuyển nạp dòng tế bào thích hợp (ví dụ, tế bào 293 ở người) với ADN chứa trong cấu trúc mã hóa protein dạng khảm AAV ITR và plasmid trợ giúp AAV ACG2 chứa vùng mã hóa AAV (gen

AAV rep và cap) mà không có ITR. Sau đó, các tế bào được lây nhiễm bằng adenovirus Ad5. Vectơ có thể được tinh chế khỏi dịch thủy phân tế bào bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, siêu ly tâm gradien mật độ xesi clorua) và được chứng nhận đảm bảo không có AAV hoặc adenovirus có khả năng sao chép phát hiện được (ví dụ, bằng kiểm nghiệm sinh học tác dụng trên tế bào).

Vectơ virus bao gồm polynucleotit theo sáng chế cũng bao gồm vectơ virus. Retrovirus là loại virus tích hợp, có thể sao chép bằng enzym phiên mã ngược do virus mã hóa để sao chép hệ gen ARN của virus thành ADN sợi kép được tích hợp vào ADN nhiễm sắc thể của tế bào bị nhiễm (ví dụ, tế bào đích). Những vectơ này bao gồm vectơ có nguồn gốc từ virus bệnh bạch cầu ở chuột, cụ thể là Moloney (Gilboa và cộng sự, 1988, *Adv. Exp. Med. Biol.* 241: 29) hoặc chủng Friend's FB29 (Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1995/01447). Nhìn chung, vectơ retrovirus bị đứt đoạn tất cả hoặc một phần trong gag, pol và env của gen vi rút và giữ lại các 5' và 3' LTR và trình tự tạo bọc. Các thành phần này có thể được biến đổi để tăng mức độ biểu hiện hoặc độ ổn định của vectơ retrovirus. Những biến đổi này bao gồm sự thay thế trình tự tạo bọc của retrovirus bằng một nhân tố chuyên vị ngược, chẳng hạn như VL30 (xem, ví dụ, Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,747,323).

Polynucleotit mã hóa polynucleotit theo sáng chế có thể được chèn ở phía hạ lưu của trình tự tạo bọc, chẳng hạn như theo hướng ngược lại so với hệ gen của retrovirus. Hạt retrovirus được điều chế khi có sự hiện diện của virus trợ giúp hoặc trong dòng tế bào bổ sung (đóng gói) thích hợp, chứa gen retrovirus mà vectơ retrovirus bị khiếm khuyết (ví dụ, gag/pol và env) được tích hợp vào hệ gen của nó. Các dòng tế bào này được mô tả trong tài liệu kỹ thuật trước đây (Miller and Rosman, 1989, *BioTechniques* 7: 980; Danos và Mulligan, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6460; Markowitz và cộng sự, 1988, *Virology* 167: 400). Sản phẩm của gen env chịu trách nhiệm liên kết hạt virus với thụ thể virus có trên bề mặt tế bào đích, và do đó xác định phạm vi vật chủ của hạt retrovirus. Do đó, dòng tế bào đóng gói như tế bào PA317 (ATCC CRL 9078) hoặc 293EI6 (W097/35996) chứa protein màng bọc lưỡng tính có thể được sử dụng để cho phép lây nhiễm tế bào đích của người và các loài khác. Hạt retrovirus được thu hồi từ lớp bề mặt dung dịch nuôi cấy và có thể được tùy ý tinh chế thêm theo các kỹ thuật tiêu chuẩn (ví dụ, sắc ký, siêu ly tâm).

Yếu tố điều hòa

Polynucleotit mã hóa polynucleotit theo sáng chế có thể được liên kết hoạt động với một hoặc nhiều yếu tố điều hòa trong vectơ. Yếu tố điều hòa có thể bao gồm vùng khởi động, vùng tăng cường, tín hiệu polyadenyl hóa, chất kìm hãm và tương tự. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “được liên kết hoạt động” được sử dụng trong ngữ cảnh thích hợp rộng rãi nhất của nó và đề cập đến sự liên kết của các thành phần polynucleotit trong mối quan hệ chức năng. Polynucleotit được “liên kết hoạt động” khi nó được đặt vào trong mối quan hệ chức năng với một polynucleotit khác. Ví dụ, vùng khởi động được liên kết hoạt động với trình tự mã hóa nếu nó ảnh hưởng đến quá trình phiên mã của trình tự mã hóa.

Một số trình tự vùng khởi động và vùng tăng cường thường được dùng trong vectơ biểu hiện và vectơ virus là, ví dụ như xytomegalovirus ở người (hCMV), vùng gen khởi động sớm/muộn của vaccinia P7.5, CAG, SV4, CMV chuột (mCMV), EF-1 và vùng khởi động hPGK. Do hiệu lực cao và kích thước vừa phải khoảng 0,8 kB, vùng khởi động hCMV là một trong các vùng khởi động được sử dụng phổ biến nhất trong số các vùng khởi động này. Vùng khởi động hPGK có đặc trưng là kích thước nhỏ (khoảng 0,4 kB), nhưng vùng này kém hiệu lực hơn so với vùng khởi động hCMV. Mặt khác, vùng khởi động CAG bao gồm yếu tố tăng cường sớm của xytomegalovirus, vùng khởi động, exon và intron đầu tiên của gen beta-actin ở gà và thụ thể cắt nối của gen beta-globin ở thỏ, có thể định hướng sự biểu hiện gen có hiệu lực cao có thể so sánh với vùng khởi động hCMV, nhưng vùng này ít phù hợp hơn trong các vectơ virus do kích thước lớn, nơi các giới hạn về không gian có thể là mối quan tâm đáng kể, ví dụ, đối với vectơ adenovirus (AdV), vectơ virus liên kết adeno (AAV) hoặc vectơ lentivirus (LV).

Vùng khởi động bổ sung có thể được sử dụng là vùng khởi động sớm chính ngay tức thì của Aotine Herpesvirus 1 (vùng khởi động AoHV-1) được mô tả trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2018/146205. Vùng khởi động có thể được nối với trình tự vùng vận hành của chất kìm hãm mà protein kìm hãm có thể liên kết để kìm hãm sự biểu hiện của vùng khởi động khi có protein kìm hãm. Theo một số phương án nhất định, trình tự vùng vận hành của chất kìm hãm là trình tự TetO hoặc trình tự CuO (xem ví dụ, US9790256).

Trong một số trường hợp nhất định, có thể mong muốn biểu hiện ít nhất hai polypeptit riêng biệt từ cùng một vectơ. Trong trường hợp này, mỗi polynucleotit có thể

được liên kết hoạt động với trình tự vùng khởi động và/hoặc vùng tăng cường giống nhau hoặc khác nhau, hoặc hệ thống biểu hiện xistron kép phổ biến, ví dụ bằng cách sử dụng vị trí tiếp nhận ribosom bên trong (IRES) từ virus viêm não cơ tim có thể được sử dụng. Ngoài ra, có thể sử dụng vùng khởi động tổng hợp hai chiều, chẳng hạn như vùng khởi động hCMV-rhCMV và các vùng khởi động khác được mô tả trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2017/220499. Tín hiệu polyadenyl hóa có thể có nguồn từ SV40 hoặc hormon tăng trưởng ở bò (BGH).

Vector ARN tự sao chép bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit theo sáng chế có thể bao gồm thêm yếu tố điều hoà bất kỳ để thiết lập (các) chức năng thông thường của vector, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở việc sao chép và biểu hiện polypeptit theo sáng chế được mã hóa bởi trình tự polynucleotit của vector. Các yếu tố điều hoà bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vùng khởi động, vùng tăng cường, tín hiệu polyadenyl hóa, mã bộ ba dừng dịch mã, yếu tố liên kết ribosom, yếu tố kết thúc phiên mã, chỉ thị chọn lọc, gốc sao chép, v.v. Vector có thể bao gồm một hoặc nhiều cassette biểu hiện. "Cassette biểu hiện (expression cassette)" là một phần của vector định hướng bộ máy trong tế bào tạo ra ARN và protein. Cassette biểu hiện thường bao gồm ba thành phần: trình tự vùng khởi động, khung đọc mở và vùng 3' chưa dịch mã (UTR) có tùy chọn bao gồm tín hiệu polyadenyl hóa. Khung đọc mở (ORF) là khung đọc chứa trình tự mã hóa của protein quan tâm (ví dụ, polypeptit theo sáng chế) từ mã bộ ba bắt đầu đến mã bộ ba kết thúc. Các yếu tố điều hoà của cassette biểu hiện có thể được liên kết hoạt động với trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit quan tâm. Thành phần thích hợp bất kỳ để sử dụng trong cassette biểu hiện như được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong sự kết hợp bất kỳ và theo thứ tự bất kỳ để điều chế vector theo sáng chế.

Vector có thể bao gồm trình tự vùng khởi động, tốt hơn là nằm trong cassette biểu hiện, để kiểm soát sự biểu hiện của polypeptit theo sáng chế. Thuật ngữ "vùng khởi động" được sử dụng theo nghĩa thông thường và đề cập đến trình tự nucleotit bắt đầu quá trình phiên mã của trình tự nucleotit được liên kết hoạt động. Vùng khởi động nằm trên cùng một sợi gann trình tự nucleotit mà nó phiên mã. Vùng khởi động có thể là vùng cơ định, cảm ứng hoặc ức chế. Vùng khởi động có thể xuất hiện tự nhiên hoặc tổng hợp. Vùng khởi động có thể có nguồn gốc từ các nguồn bao gồm virus, vi khuẩn, nấm, thực vật, côn trùng và động vật. Vùng khởi động có thể là vùng khởi động tương đồng (tức là, có nguồn gốc từ cùng một nguồn di truyền với vector) hoặc vùng khởi động dị hợp

(tức là, có nguồn gốc từ vectơ hoặc nguồn gen khác). Tốt hơn là, vùng khởi động nằm ở phía thượng lưu của polynucleotit mã hóa polypeptit theo sáng chế trong cassette biểu hiện. Ví dụ, trong ARN tự sao chép, vùng khởi động có thể là vùng khởi động hệ gen con cho alphavirus.

Trong ARN tự sao chép, vectơ có thể bao gồm thêm các trình tự polynucleotit bổ sung để ổn định bản sao phiên mã được biểu hiện, tăng cường tạo bản sao phiên mã ARN ở nhân và/hoặc cải thiện liên kết phiên mã-dịch mã. Ví dụ về các trình tự như vậy bao gồm các tín hiệu polyadenyl hóa và vùng tăng cường. Tín hiệu polyadenyl hóa thường nằm ở phía hạ lưu của trình tự mã hóa cho protein quan tâm (ví dụ, polypeptit theo sáng chế) trong cassette biểu hiện của vectơ. Trình tự vùng tăng cường là trình tự ADN điều hòa, khi bị ràng buộc bởi các yếu tố phiên mã, sẽ tăng cường quá trình phiên mã của gen liên kết. Tốt hơn là, trình tự vùng tăng cường nằm ở phía thượng lưu của trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit theo sáng chế, nhưng ở phía hạ lưu của trình tự vùng khởi động trong cassette biểu hiện của vectơ.

Trình tự vùng tăng cường bất kỳ đã được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này theo quan điểm của sáng chế này đều có thể được dùng.

Thành phần hoặc trình tự bất kỳ của vectơ ARN tự sao chép theo sáng chế đều có thể được liên kết hoạt động hoặc liên kết chức năng với thành phần hoặc trình tự bất kỳ khác. Các thành phần hoặc trình tự của phân tử ARN tự sao chép có thể được liên kết hoạt động để biểu hiện ít nhất một protein hoặc peptit (hoặc liệu pháp sinh học) trong tế bào chủ hoặc sinh vật được điều trị và/hoặc cho khả năng tự sao chép của đơn vị sao chép.

Vùng khởi động hoặc UTR được liên kết hoạt động với trình tự mã hóa có khả năng thực hiện phiên mã và biểu hiện của trình tự mã hóa khi có mặt các enzym thích hợp. Vùng khởi động không cần phải tiếp giáp với trình tự mã hóa, miễn là nó có chức năng định hướng biểu hiện của nó. Do đó, liên kết có thể hoạt động giữa trình tự ARN mã hóa protein hoặc peptit và trình tự điều hòa (ví dụ, vùng khởi động hoặc UTR) là liên kết chức năng cho phép biểu hiện polynucleotit quan tâm. Được liên kết hoạt động cũng có thể đề cập đến các trình tự như trình tự mã hóa RdRp (ví dụ, nsP4), nsP1-4, UTRs, vùng khởi động và các trình tự khác mã hóa trong đơn vị sao chép ARN, được liên kết để chúng cho phép phiên mã và dịch mã phân tử điều trị sinh học và/hoặc sao chép của đơn vị sao chép. Các UTR có thể được liên kết hoạt động bằng cách cung cấp

các trình tự và khoảng cách cần thiết để nhận biết và dịch mã bởi ribosom có các trình tự được mã hóa khác.

Một phân tử có chức năng hoặc hoạt tính sinh học nếu nó thực hiện ít nhất 50% hoạt tính giống như phân tử tương ứng (hoặc kiểu đại) tự nhiên của nó, nhưng phân tử chức năng cũng có thể thực hiện ít nhất 60% hoặc ít nhất 70% hoặc ít nhất 90% hoặc ít nhất 95% hoặc 100% hoạt tính giống như phân tử tương ứng tự nhiên (hoặc kiểu đại) của nó. Các phân tử ARN tự sao chép cũng có thể mã hóa trình tự axit amin có nguồn gốc từ hoặc dựa trên trình tự axit amin của alphavirus kiểu đại, nghĩa là chúng có ít nhất 60% hoặc ít nhất 65% hoặc ít nhất 68% hoặc ít nhất 70% hoặc ít nhất 80% hoặc ít nhất 70% hoặc ít nhất 80% hoặc ít nhất 90% hoặc ít nhất 95% hoặc ít nhất 97% hoặc ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% hoặc 100% hoặc 80-99% hoặc 90- 100% hoặc 95-99% hoặc 95-100% hoặc 97-99% hoặc 98-99% độ tương đồng trình tự với trình tự axit amin (có thể là trình tự tương ứng) được mã hóa bởi hệ gen ARN alphavirus kiểu đại, có thể là hệ gen alphavirus ở Tân Thế giới hoặc Cựu Thế giới. Các trình tự có nguồn từ các trình tự khác có thể dài hơn lên đến 5% hoặc lên đến 10% hoặc lên đến 20% hoặc dài hơn hoặc ngắn hơn tới 30% so với trình tự ban đầu. Theo phương án bất kỳ, độ tương đồng trình tự có thể là ít nhất 95% hoặc ít nhất 97% hoặc ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% hoặc 100% đối với trình tự nucleotit bất kỳ mã hóa (hoặc trình tự axit amin có) vị trí liên kết G3BP hoặc FXR trên đó. Các trình tự này cũng có thể dài hơn lên đến 5% hoặc lên đến 10% hoặc lên đến 20% hoặc dài hơn hoặc ngắn hơn tới 30% so với trình tự ban đầu.

Tế bào chủ

Sáng chế cũng đề xuất tế bào chủ chứa vector bất kỳ ở trên theo sáng chế. Theo một số phương án, tế bào chủ là tế bào nhân thực hoặc tế bào nhân sơ. Theo một số phương án, tế bào chủ là PER.C6, PER.C6 TetO, nguyên bào sợi phôi gà (CEF), CHO, HEK293, HT-1080, HKB-11, CAP, HuH-7, hoặc dòng tế bào Age1.

Chế phẩm

Sáng chế cũng đề xuất các chế phẩm bao gồm polynucleotit bất kỳ, polypeptit bất kỳ và vector bất kỳ trong số các vector được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, chế phẩm có thể bao gồm vector có chứa nucleotit bất kỳ được đề xuất

trong bản mô tả này, trong đó vectơ được chọn từ Ad26, GAd20, MVA hoặc phân tử ARN tự sao chép.

Chế phẩm bất kỳ được mô tả ở trên có thể bao gồm hoặc có thể được bào chế thành được phẩm bao gồm chế phẩm hoặc tá dược dụng của nó. “Dược dụng” đề cập đến tá dược mà ở liều lượng và nồng độ được sử dụng sẽ không gây ra tác dụng không mong muốn hoặc có hại cho đối tượng sử dụng và bao gồm chất mang, dung dịch đệm, chất ổn định hoặc các chất khác mà đã được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Bản chất chính xác của chất mang hoặc chất khác có thể phụ thuộc vào đường dùng, ví dụ như trong cơ, dưới da, đường miệng, trong tĩnh mạch, trên da, trong niêm mạc (ví dụ, ruột), trong mũi hoặc trong màng bụng. Có thể bao gồm chất mang dạng lỏng như nước, dầu hỏa, dầu động vật hoặc thực vật, dầu khoáng hoặc dầu tổng hợp. Có thể bao gồm dung dịch nước muối sinh lý, dextrozơ hoặc dung dịch sacarit khác hoặc glycol như etylen glycol, propylen glycol hoặc polyetylen glycol. Chế phẩm ví dụ là Tiêu chuẩn quốc tế về Adenovirut (Hoganson và cộng sự, 2002): 20 mM Tris pH 8, 25 mM NaCl, 2,5% glyxerol; hoặc 20 mM Tris, 2 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, sucrozơ 10% khối lượng/thể tích, polysorbat-80 0,02% khối lượng/thể tích; hoặc dung dịch đệm xitrat 10-25 mM pH 5,9-6,2, 4-6% (khối lượng/khối lượng) hydroxypropyl-beta-xyclodextrin (HBCD), 70-100 mM NaCl, 0,018-0,035% (khối lượng/khối lượng) polysorbat-80 và tùy ý là etanol 0,3-0,45% (khối lượng/khối lượng). Nhiều dung dịch đệm khác có thể được sử dụng, và ví dụ về chế phẩm thích hợp để bảo quản và cho dùng các dược phẩm được tinh chế đã được biết đến.

Chế phẩm có thể bao gồm một hoặc nhiều chất bổ trợ. Ví dụ về các chất bổ trợ như vậy bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở chất bổ trợ vô cơ (ví dụ, muối kim loại vô cơ như nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxit), chất bổ trợ hữu cơ (ví dụ, saponin hoặc squalen), chất bổ trợ gốc dầu (ví dụ, chất bổ trợ hoàn chỉnh của Freund và chất bổ trợ không hoàn chỉnh của Freund), liposom, hoặc vi cầu phân hủy sinh học), virosom, chất bổ trợ vi khuẩn (ví dụ, như monophosphoryl lipid A, hoặc muramyl peptit), chất bổ trợ tổng hợp (ví dụ, copolyme khối không ion, chất tương tự muramyl peptit hoặc lipid tổng hợp A), hoặc chất bổ trợ polynucleotit tổng hợp (ví dụ, polyarginin hoặc polylysin). Các ví dụ không giới hạn về các chất bổ trợ khác bao gồm QS-21, Detox-PC, MPL- SE, MoGM-CSF, TiterMax-G, CRL- 1005, GERBU, TERamit, PSC97B, Adjume, PG-026,

GSK-I, GcMAF, B-alethin, MPC-026, Adjuvax, CpG ODN, Betafectin, Alum, và MF59.

Các bổ trợ khác có thể được sử dụng bao gồm lectin, yếu tố tăng trưởng, cytokin và lymphokin như interferon alpha, interferon gamma, yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu huyết cầu (PDGF), yếu tố kích thích tạo dòng-bạch cầu hạt (gCSF), yếu tố kích thích tạo dòng đại thực bào bạch cầu hạt (gMCSF), yếu tố hoại tử khối u (TNF), yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 hoặc chất chủ vận TLR, và chất bổ trợ dạng hạt (ví dụ, phức hợp kích thích miễn dịch (ISCOMS)).

Hạt nano

Theo một số phương án, chế phẩm có thể bao gồm các hạt nano. Polynucleotit bất kỳ theo sáng chế có thể được gắn hoặc tiếp xúc với các hạt nano để phân phối đến đối tượng. Việc phân phối polynucleotit hoặc polypeptit bất kỳ theo sáng chế bằng cách sử dụng các hạt nano có thể loại bỏ yêu cầu phải chứa virus hoặc tá dược trong chế phẩm vaccin. Polynucleotit theo sáng chế có thể là ADN hoặc ARN. Hạt nano có thể chứa tín hiệu báo nguy miễn dịch giúp tạo đáp ứng miễn dịch hiệu quả đối với peptit. Hạt nano có thể gây ra hoạt hóa và trưởng thành của tế bào tua (DC), cần thiết cho đáp ứng miễn dịch mạnh mẽ. Hạt nano có thể chứa thành phần không tự thân giúp cải thiện sự hấp thu hạt nano, và do đó peptit theo tế bào như tế bào trình diện kháng nguyên.

Hạt nano thường có đường kính nằm trong khoảng từ 1 nm đến 100 nm, ví dụ như nằm trong khoảng từ 20 nm đến 40 nm. Hạt nano có đường kính trung bình nằm trong khoảng từ 20 đến 40 nm có thể hỗ trợ hấp thụ hạt nano vào dịch bào (xem, ví dụ, công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2019/135086). Hạt nano ví dụ là hạt nano polyme, hạt nano vô cơ, liposom, hạt nano lipid (LNP), phức hợp kích thích miễn dịch (ISCOM), hạt giống virus (VLP) hoặc protein tự hợp thể. Hạt nano có thể là hạt nano canxi phosphat, hạt nano silic hoặc hạt nano vàng. Hạt nano polyme có thể bao gồm một hoặc nhiều polyme tổng hợp, chẳng hạn như poly(D,L-lactit-co-glycolit) (PLG), poly(axit D,L-lactic-co-glycolic) (PLGA), poly(axit g-glutamic) (g-PGA) poly(etylen glycol) (PEG), hoặc polystyren hoặc một hoặc nhiều polyme tự nhiên chẳng hạn như polysacarit, ví dụ, pullulan, alginat, inulin, và chitosan. Việc sử dụng hạt nano polyme có thể hữu ích do đặc tính của polyme có thể có trong hạt nano. Ví dụ, polyme tự nhiên và tổng hợp được đề cập ở trên có thể có tính tương thích sinh học và khả năng phân hủy sinh học tốt, tính

chất không độc hại và/hoặc có khả năng tạo thành hình dạng và kích thước mong muốn. Hạt nano polyme cũng có thể tạo thành hạt nano hydrogel, mạng lưới polyme ba chiều ưa nước với đặc tính thuận lợi bao gồm kích thước lưới linh hoạt, diện tích bề mặt lớn dành cho liên hợp đa trị, hàm lượng nước và khả năng tải đối với kháng nguyên cao. Các polyme như poly(axit L-lactic) (PLA), PLGA, PEG và polysaccharit thích hợp để tạo thành hạt nano hydrogel. Hạt nano vô cơ thường có cấu trúc cứng và bao gồm vỏ mà trong đó, kháng nguyên được bao bọc hoặc lõi mà kháng nguyên có thể được gắn cộng hóa trị vào đó. Lõi có thể bao gồm một hoặc nhiều nguyên tử như nguyên tử vàng (Au), bạc (Ag), đồng (Cu), Au/Ag, Au/Cu, Au/Ag/Cu, Au/Pt, Au/Pd hoặc Au/Ag/Cu/Pd hoặc canxi phosphat (CaP).

Theo một số phương án, các hạt nano có thể là liposom. Liposom thường được tạo thành từ phospholipid có thể phân hủy sinh học, không độc và bao gồm vỏ lớp phospholipid kép tự hợp thể có lõi chứa nước. Liposom có thể là túi 1 lớp bao gồm một lớp phospholipid kép, hoặc túi đa lớp bao gồm một số vỏ phospholipid đồng tâm được ngăn cách bởi các lớp nước. Do đó, liposom có thể được điều chỉnh để hợp nhất phân tử ưa nước vào lõi chứa nước hoặc phân tử kỵ nước trong lớp phospholipid kép. Các liposom có thể bao bọc các polynucleotit hoặc polypeptit hoặc các mảnh của chúng theo sáng chế trong lõi để phân phối. Liposom và chế phẩm liposom có thể được điều chế theo các phương pháp tiêu chuẩn và đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, xem, ví dụ, Remington's; Akimaru, 1995, *Cytokines Mol. Ther.* 1: 197-210; Alving, 1995, *Immunol. Rev.* 145: 5-31; Szoka, 1980, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 467; bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,235,871; bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,501,728; và bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,837,028. Liposom có thể bao gồm phân tử hướng đích để hướng đích đến các phức hợp liposom vào loại tế bào cụ thể. Phân tử hướng đích có thể bao gồm đôi tác liên kết (ví dụ, phối tử hoặc thụ thể) cho phân tử sinh học (ví dụ, thụ thể hoặc phối tử) trên bề mặt của mạch máu hoặc tế bào được tìm thấy trong mô đích. Điện tích liposom là yếu tố quyết định quan trọng trong quá trình thanh thải liposom khỏi máu, với các liposom mang điện tích âm được hệ lưới nội mô hấp thụ nhanh hơn (Juliano, 1975, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63: 651) và do đó có thời gian bán thải trong dòng máu ngắn hơn. Các dẫn xuất phosphatidyletanolamin kết hợp giúp tăng cường thời gian tuần hoàn bằng cách ngăn chặn sự kết tụ liposom. Ví dụ, sự hợp nhất N-(omega-carboxy)axylamidophosphatidyletanolamin vào túi một lớp của L-alpha-

distearoylphosphatidylcholin làm tăng đáng kể thời gian tuần hoàn liposom *in vivo* (xem, ví dụ, Ahl, 1997, Biochim. Biophys. Acta 1329: 370-382). Thông thường, liposom được điều chế với khoảng từ 5 đến 15 phần trăm mol của phospholipid tích điện âm, chẳng hạn như phosphatidylglyxerol, phosphatidylserin hoặc phosphatidyl-inositol. Phospholipid tích điện âm bổ sung, chẳng hạn như phosphatidylglyxerol, cũng có tác dụng ngăn chặn sự kết tụ liposom tự phát, do đó giúp giảm thiểu nguy cơ hình thành kết tụ liposom kích thước nhỏ. Chất làm cứng màng như là sphingomyelin hoặc phospholipid trung tính bão hòa, có nồng độ ít nhất khoảng 50 phần trăm mol và từ 5 đến 15 phần trăm mol của monosialylgangliosit cũng có thể có đặc tính liposom mong muốn, chẳng hạn như độ cứng (xem, ví dụ, Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,837,028). Ngoài ra, huyền phù liposom có thể bao gồm chất bảo vệ lipid giúp bảo vệ lipid kháng lại gốc tự do và tổn hại từ quá trình peroxy hóa lipid trong quá trình bảo quản. Chất dập tắt gốc tự do ưa béo, chẳng hạn như alpha-tocopherol và chất tạo chelat đặc hiệu sắt hòa tan trong nước như ferrioxianin, được ưu tiên hơn.

Các phân tử ARN tự sao chép và/hoặc chế phẩm chứa cùng loại cũng có thể được bào chế dưới dạng hạt nano bằng cách sử dụng sự kết hợp của các polyme, lipid và/hoặc các chất phân hủy sinh học khác, như là, nhưng không chỉ giới hạn ở, canxi phosphat, polyme. Các thành phần có thể được kết hợp theo cấu trúc lõi-vỏ, kết hợp và/hoặc từng lớp, để cho phép tinh chỉnh hạt nano sao cho việc phân phối các phân tử và/hoặc các chế phẩm theo sáng chế có thể được tăng lên.

Theo một số phương án, các hạt nano có thể bao gồm các túi đa lớp có kích thước không đồng nhất. Ví dụ, lipid tạo túi có thể được hòa tan trong dung môi hữu cơ hoặc hệ dung môi phù hợp và được sấy khô trong chân không hoặc khí trơ để tạo thành màng lipid mỏng. Nếu muốn, màng này có thể được hòa tan lại trong dung môi thích hợp, chẳng hạn như butanol bậc ba, và sau đó được đông khô để tạo thành hỗn hợp lipid đồng nhất hơn ở dạng giống bột dễ hydrat hóa hơn. Màng này được bao phủ bằng dung dịch chứa nước của polypeptit hoặc polynucleotit và cho phép hydrat hóa, thường khuấy trộn trong khoảng thời gian từ 15 đến 60 phút. Sự phân bố kích thước của túi đa lớp tạo thành có thể được chuyển thành kích thước nhỏ hơn bằng cách hydrat hóa lipid trong điều kiện khuấy trộn mạnh hơn hoặc bằng cách bổ sung chất tẩy rửa hòa tan, chẳng hạn như deoxycholat. Môi trường hydrat hóa có thể bao gồm axit nucleic có nồng độ mong muốn với thể tích bên trong của liposom trong huyền phù liposom cuối cùng. Lipid phù hợp

có thể được sử dụng để tạo thành túi nhiều lớp bao gồm DOTMA (Feigner và cộng sự, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7417), DOGS hoặc Transfectain™ (Behr và cộng sự, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6982- 6986), DNERIE hoặc DORIE (Feigner và cộng sự., Methods 5: 67-75), DC-CHOL (Gao và Huang, 1991, BBRC 179: 280-285), DOTAP™ (McLachlan và cộng sự, 1995, Gene Therapy 2: 674-622), Lipofectamine™. và các hợp chất glycerolipid (xem, ví dụ, EP901463 and W098/37916).

Theo một số phương án, hạt nano có thể là phức hợp kích thích miễn dịch (ISCOM). ISCOM là hạt dạng lồng thường được tạo thành từ vi hạt chứa saponin dạng keo. ISCOM có thể bao gồm cholesterol, phospholipid (như phosphatidyletanolamin hoặc phosphatidylcholin) và saponin (chẳng hạn như Quil A từ cây *Quillaia saponaria*).

Theo một số phương án, hạt nano có thể là hạt giống virus (VLP). VLP là hạt nano tự hợp thể thiếu axit nucleic lây nhiễm, được hình thành bằng cách tự hợp thể protein vỏ bọc tương thích sinh học. VLP thường có đường kính nằm trong khoảng từ 20 đến 150 nm, chẳng hạn như khoảng từ 20 đến 40 nm, khoảng từ 30 đến 140 nm, khoảng từ 40 đến 130 nm, khoảng từ 50 đến 120 nm, khoảng từ 60 đến 110 nm, khoảng từ 70 đến 100 nm, hoặc khoảng từ 80 đến 90 nm. VLP thuận lợi khai thác sức mạnh của cấu trúc virus cải tiến, được tối ưu hóa một cách tự nhiên để tương tác với hệ miễn dịch. Kích thước hạt nano được tối ưu hóa tự nhiên và trật tự cấu trúc lặp lại có nghĩa là VLP tạo ra đáp ứng miễn dịch mạnh, ngay cả khi không có chất bổ trợ.

Các phân tử khác thích hợp để tạo phức với polynucleotit theo sáng chế bao gồm các phân tử cation, chẳng hạn như polyamidoamin (Haensler và Szoka, 1993, Bioconjugate Chem. 4: 372-379), polylysin dạng nhánh (Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1995/24221), polyetylen irinin hoặc polypropylen h-nin (Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1996/02655), polylysin (Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,595,897), chitosan (Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,744,166), ADN-gelatin coarcervat (xem, ví dụ, Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 6,207,195; Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 6,025,337; Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,972,707) hoặc DEAE dextran (Lopata và cộng sự, 1984, Nghiên cứu axit nucleic 12: 5707-5717).

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép có thể được đóng gói hoặc bao bọc trong các phân tử cation, như là polyamidoamin (Haensler và Szoka, 1993, Bioconjugate Chem. 4: 372-379), polylysin dạng nhánh (Công bố đơn sáng chế quốc tế

số WO1995/24221), polyetylen irinin hoặc polypropylen h-nin (Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1996/02655), polylysin (Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,595,897), chitosan (Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,744,166), ADN-gelatin coarcervat (xem, ví dụ, Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 6,207,195; Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 6,025,337; Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,972,707) hoặc DEAE dextran (Lopata và cộng sự, 1984, Nghiên cứu axit nucleic 12: 5707-5717), dendrime (xem, ví dụ, công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1996/19240), hoặc polyetylenimin (PEI) (xem, ví dụ, Sun và cộng sự, 2014, Mol Med Rep. 10(5):2657–2662).

Các phân tử ARN tự sao chép và/hoặc chế phẩm được đề xuất chứa các phân tử ARN tự sao chép mã hóa polypeptit bất kỳ theo sáng chế có thể được bao bọc bằng cách sử dụng một hoặc nhiều liposom, lipoplex và/hoặc các hạt nano lipid. Liposom là các túi được điều chế nhân tạo, có thể chủ yếu được cấu tạo bởi lớp kép lipid và có thể được sử dụng như là phương tiện phân phối để sử dụng polynucleotit và các phân tử ARN tự sao chép. Các liposom có thể có các kích thước khác nhau, như là, nhưng không chỉ giới hạn ở, túi đa lớp (MLV) có đường kính hàng trăm nanomet và có thể chứa nhiều lớp kép đồng tâm ngăn cách nhau bởi các ngăn chứa nước hẹp, túi đơn bào nhỏ (SUV) có thể có đường kính nhỏ hơn 50 nm, và túi đơn bào lớn (LUV) có thể có đường kính nằm trong khoảng từ 50 đến 500 nm. Thiết kế liposom có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, opsonin hoặc phối tử để cải thiện sự gắn kết của liposom vào mô không lành hoặc để kích hoạt các sự kiện như, nhưng không chỉ giới ở, nhập bào. Liposom có thể có độ pH thấp hoặc cao để cải thiện việc phân phối polynucleotit và các phân tử ARN tự sao chép được đề xuất trong bản mô tả này.

Sự hình thành liposom có thể phụ thuộc vào các đặc tính hóa lý như, nhưng không chỉ giới hạn ở, công thức được chất được bao bọc và các thành phần của liposom, bản chất của môi trường trong đó các túi lipid được phân tán, nồng độ hiệu quả của hợp chất được bao bọc và độc tính tiềm năng của nó, quy trình bổ sung bất kỳ liên quan trong quá trình áp dụng và/hoặc phân phối các túi, kích thước tối ưu hóa, độ đa phân tán và thời gian lưu giữ của các túi đối với ứng dụng dự kiến, và khả năng tái sản xuất theo lô và khả năng sản xuất quy mô lớn sản phẩm liposom an toàn và hiệu quả.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép được bao bọc, liên kết với hoặc hấp phụ trên liposom, lipoplex, hạt nano lipid, hoặc sự kết hợp của chúng, tốt hơn là phân tử ARN tự sao chép được bao bọc trong hạt nano lipid.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép mã hóa polypeptit bất kỳ theo sáng chế có thể được bao bọc hoàn toàn trong phần lipid của hạt, do đó bảo vệ ARN khỏi sự phân hủy bằng nucleaza. “Được bao bọc hoàn toàn” có nghĩa là ARN không bị phân huỷ đáng kể sau khi tiếp xúc với huyết thanh hoặc xét nghiệm nucleaza sẽ làm phân huỷ đáng kể ARN tự do. Khi được bao bọc hoàn toàn, tốt nhất là ít hơn 25% axit nucleic trong hạt bị phân huỷ trong quá trình điều trị mà thông thường quá trình này làm phân huỷ 100% axit nucleic tự do, tốt hơn là ít hơn 10% và tốt nhất là dưới 5% axit nucleic trong hạt bị phân huỷ. “Được bao bọc hoàn toàn” cũng có nghĩa là các hạt axit nucleic-lipid không bị phân giải nhanh chóng thành các thành phần cấu thành chúng khi sử dụng *in vivo*.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép và/hoặc chế phẩm theo sáng chế chứa thành phần như trên có thể được bào chế thành túi lipid có thể có liên kết chéo giữa các lớp kép lipid đã được chức hóa. Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép và/hoặc chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế thành phức hợp lipid-polycation. Sự hình thành phức hợp lipid-polycation có thể được thực hiện bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Như là một ví dụ không giới hạn, polycation có thể bao gồm peptit cation hoặc polypeptit như, nhưng không chỉ giới hạn ở polylysin, polyornithin và/hoặc polyarginin và các peptit cation. Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép và/hoặc chế phẩm được đề xuất trong bản mô tả này có thể được bào chế thành phức hợp lipid-polycation, phức hợp này có thể bao gồm thêm lipid trung tính, như là, nhưng không chỉ giới hạn ở, cholesterol hoặc dioleoyl phosphatidyletanolamin (DOPE). Công thức hạt nano lipid có thể bị ảnh hưởng bởi, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc lựa chọn thành phần lipid cation, mức độ bão hòa lipid cation, bản chất của PEG hóa, tỷ lệ của tất cả các thành phần và các thông số lý sinh như kích thước.

Theo một số phương án, phân tử ARN tự sao chép được đề xuất trong bản mô tả này được bao bọc trong hạt nano lipid (LNP) như được minh họa trong HÌNH 20 Các hạt nano lipid thường bao gồm bốn loại lipid khác nhau - lipid có thể ion hóa, lipid trợ giúp trung tính, cholesterol và lipid polyetylen glycol (PEG) có thể khuếch tán. LNP tương tự liposom nhưng có chức năng và thành phần khác nhau một chút. LNP được thiết kế hướng tới việc bao bọc polynucleotit, chẳng hạn như ADN, mARN, siARN và sARN. Một hoặc nhiều lớp lipid kép bao quanh các liposom thông thường chứa lõi nước.

LNP có thể có cấu trúc giống vi hạt, bao bọc phân tử thuốc trong lõi không chứa nước. LNP thường chứa lipid cation, lipid không cation và lipid ngăn chặn sự kết tụ của hạt (ví dụ, liên hợp PEG-lipid). LNP hữu ích để sử dụng toàn thân, vì chúng cho thấy thời gian tuần hoàn được kéo dài sau khi tiêm (tức là) trong tĩnh mạch và tích tụ ở các vị trí xa (ví dụ, vị trí tách biệt khỏi vị trí cho dùng thuốc về mặt vật lý). LNP có thể có đường kính trung bình nằm trong khoảng từ 50 nm đến 150 nm, chẳng hạn như khoảng từ 60 nm đến 130 nm, hoặc khoảng từ 70 nm đến 110 nm, hoặc khoảng từ 70 nm đến 90 nm và về cơ bản là không độc. Việc điều chế LNP đã nạp polynucleotit được bộc lộ trong, ví dụ như Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,976,567; 5,981,501; 6,534,484; 6,586,410; 6,815,432; và công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 96/40964. Polynucleotit chứa LNP được mô tả, ví dụ như trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2019/191780.

Theo một số phương án, các hạt nano lipid bao gồm lipid cation (ví dụ, một hoặc nhiều lipid hoặc muối cation của chúng được mô tả trong bản mô tả này), phospholipid và lipid liên hợp có tác dụng ức chế sự kết tụ của các hạt (ví dụ, một hoặc nhiều liên hợp PEG-lipid). Các hạt lipid cũng có thể bao gồm cholesterol. Các thành phần lipid có thể bao bọc ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, hoặc nhiều phân tử ARN tự sao chép mã hóa cho một hoặc nhiều polypeptit.

Theo một số phương án, chế phẩm LNP bao gồm chế phẩm polycation có thể được sử dụng để phân phối các phân tử ARN tự sao chép được mô tả trong bản mô tả này in vivo và/hoặc ex vitro. Sáng chế còn đề xuất thêm công thức LNP chứa lipid cation.

Thuật ngữ “lipid cation” và “lipid amin” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này bao gồm các lipid và muối của chúng có một, hai, ba, hoặc nhiều axit béo hoặc chuỗi alkyl béo và nhóm ở đầu amin có thể chuẩn độ pH (ví dụ, alkylamino hoặc nhóm ở đầu dialkylamino). Lipid cation thường được proton hóa (tức là, tích điện dương) ở độ pH thấp hơn pKa của lipid cation và về cơ bản là trung tính ở độ pH trên pKa. Lipid cation cũng có thể được gọi là lipid cation có thể chuẩn độ. Theo một số phương án, lipid cation bao gồm: nhóm ở đầu (ví dụ, có thể chuẩn độ pH) của amin bậc ba có thể proton hóa; Chuỗi C₁₈ alkyl, trong đó mỗi chuỗi alkyl độc lập có từ 0 đến 3 (ví dụ, 0, 1, 2, hoặc 3) liên kết đôi; và liên kết ete, este hoặc xeton giữa nhóm ở đầu và chuỗi alkyl. Các chất béo cation như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, DSDMA, DODMA, DLinDMA, DLenDMA, γ -DLenDMA, DLin-K-DMA, DLin-K-C2-DMA

(còn được gọi là DLin-C2K-DMA, XTC2 và C2K), DLin-K-C3-DM A, DLin-K-C4-DMA, DLen-C2K-DMA, γ -DLen-C2K-DMA, DLin-M-C2-DMA (còn được gọi là MC2), DLin-M -C3-DMA (còn được gọi là MC3) và (DLin-MP-DMA) (còn được gọi là 1-B1 1).

Sáng chế cũng đề xuất phân tử ARN tự sao chép được bao bọc, trong đó lipid cation bao gồm amin bậc ba có thể proton hóa. Theo một số phương án, lipid cation là di((Z)-non-2-en-1-yl) 8,8'-((((2-(dimethylamino)ethyl)thio)carbonyl)azanediyl) dioctanoat.

Theo một số phương án, hợp chất lipid cation tương đối không gây độc tế bào. Các hợp chất lipid cation có thể tương thích sinh học và có thể phân hủy sinh học. Lipid cation có thể có pKa nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến 7,5, tốt hơn là khoảng từ 6,0 đến 7,0.

Các hợp chất lipid cation được mô tả trong bản mô tả này đặc biệt thích hợp để phân phối thuốc vì một số lý do: chúng chứa các nhóm amin để tương tác với ADN, ARN, polynucleotit khác và các tác nhân tích điện âm khác, để làm đệm pH, để gây ra thẩm thấu nội tiết, để bảo vệ phân tử ARN tự sao chép được phân phối, chúng có thể được tổng hợp từ các nguyên liệu ban đầu có bán trên thị trường; và/hoặc chúng đáp ứng với pH và có thể được thiết kế với pKa mong muốn.

Các công thức hạt nano lipid có thể được cải thiện bằng cách thay thế lipid cation bằng lipid cation có thể phân hủy sinh học được gọi là hạt nano lipid được loại bỏ nhanh (reLNP). Lipid cation có thể ion hóa, như là, nhưng không chỉ giới hạn ở, DLinDMA, DLin-KC2-DMA và DLin-MC3-DMA, đã được chứng minh là tích tụ trong huyết tương và mô theo thời gian và có thể là nguồn độc tính tiềm ẩn. Sự chuyển hóa nhanh chóng của lipid được loại bỏ nhanh có thể cải thiện khả năng dung nạp và chỉ số điều trị của các hạt nano lipid theo thứ tự độ lớn từ liều 1 mg/kg đến liều 10 mg/kg ở chuột. Việc đưa vào liên kết este bị phân huỷ bằng enzym có thể cải thiện đặc tính phân huỷ và chuyển hóa của thành phần cation, trong khi vẫn duy trì hoạt tính của công thức reLNP. Liên kết este có thể nằm bên trong chuỗi lipid hoặc nó có thể nằm ở đầu tận cùng của chuỗi lipid. Liên kết nội este có thể thay thế bất kỳ carbon nào trong chuỗi lipid. Các thành phần lipid có thể bao gồm chất liên hợp lipid. Lipid liên hợp rất hữu ích ở chỗ nó ngăn chặn sự kết tụ của các hạt. Lipid liên hợp thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất liên hợp PEG-lipid, chất liên hợp cation-polyme-lipid và hỗn hợp của chúng.

monometyl- dimetyl- dielaidoyl- stearoyl-oleoyl- phosphatidyletanolamin (SOPE), lysophosphatidylcholin, dilinoleoylphosphatidylcholin, và hỗn hợp của chúng. Các phospholipid diaxylphosphatidylcholin và diaxylphosphatidyletanolamin khác cũng có thể được sử dụng. Các nhóm axyl trong các lipid này tốt hơn là các nhóm axyl có nguồn gốc từ các axit béo có chuỗi cacbon C10-C24, ví dụ, lauroyl, myristoyl, palmitoyl, stearoyl, hoặc oleoyl.

Các ví dụ bổ sung về lipid không cation bao gồm sterol như cholesterol và các dẫn xuất của chúng. Các ví dụ không giới hạn về các dẫn xuất cholesterol bao gồm các chất tương tự phân cực như 5a-cholestanol, 5a-coprostanol, cholesteryl- (2'-hydroxy)-ethyl ete, cholesteryl-(4'-hydroxy)-butyl ete, và 6-ketocholestanol; các chất tương tự không phân cực như 5a-cholestan, cholestenon, 5a-cholestanon, 5a-cholestanon, và cholesteryl decanoat; và hỗn hợp của chúng. Theo các phương án được ưu tiên, dẫn xuất cholesterol là chất tương tự phân cực như cholesteryl-(4'-hydroxy)-butyl ete. Theo một số phương án, polynucleotit là DSPC. Theo một số phương án, lipid không cation có trong các hạt lipid bao gồm hoặc chỉ bao gồm hỗn hợp của một hoặc nhiều photpholipid và cholesterol hoặc dẫn xuất của chúng. Theo một số phương án, trong đó các hạt lipid chứa hỗn hợp của phospholipid và cholesterol hoặc dẫn xuất của cholesterol, hỗn hợp này có thể chứa tới 40% mol, 45% mol, 50% mol, 55% mol, hoặc 60% mol trong tổng số lipid có mặt trong hạt.

Theo một số phương án, LNP có thể bao gồm 30-70% hợp chất lipid cation, 0-60% cholesterol, 0-30% phospholipid và 1-10% polyetylen glycol (PEG).

Theo một số phương án, lipid cation, lipid ion lưỡng tính, cholesterol và lipid liên hợp được kết hợp theo tỷ lệ mol tương ứng là 50:7:40:3 trong hạt nano lipid

Theo một số phương án, công thức LNP được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm thêm phân tử tăng cường tính thấm.

Theo một số phương án, công thức hạt nano có thể là hạt nano carbohydrat bao gồm chất mang carbohydrat và phân tử ARN tự sao chép. Như là ví dụ không giới hạn, chất mang carbohydrat có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phytoglycogen được biến tính bằng anhydrit hoặc nguyên liệu loại glycogen, phytoglycogen octenyl succinat, phytoglycogen beta-dextrin và phytoglycogen beta-dextrin được biến tính bằng anhydrit.

Bộ kit

Sáng chế cũng đề xuất bộ kit bao gồm một hoặc nhiều chế phẩm, một hoặc nhiều polynucleotit, một hoặc nhiều polypeptit hoặc một hoặc nhiều vectơ theo sáng chế. Sáng chế cũng đề xuất bộ kit bao gồm một hoặc nhiều virus tái tổ hợp theo sáng chế. Bộ kit có thể được dùng để hỗ trợ việc thực hiện các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, bộ kit còn bao gồm thêm chất phản ứng để hỗ trợ đưa vacxin theo sáng chế vào tế bào, chẳng hạn như chế phẩm dựa trên lipid hoặc vật liệu đóng gói virus.

Theo một số phương án, bộ kit bao gồm một hoặc nhiều vectơ Ad26 chứa polynucleotit bất kỳ theo sáng chế. Theo một số phương án, bộ kit bao gồm một hoặc nhiều vectơ MVA chứa polynucleotit bất kỳ theo sáng chế. Theo một số phương án, bộ kit bao gồm một hoặc nhiều vectơ GAd20 chứa polynucleotit bất kỳ theo sáng chế. Theo một số phương án, bộ kit bao gồm một hoặc nhiều phân tử ARN tự sao chép chứa polynucleotit bất kỳ theo sáng chế.

Theo một số phương án, bộ kit bao gồm vectơ Ad26 theo sáng chế và vectơ MVA theo sáng chế. Theo một số phương án, bộ kit bao gồm vectơ GAd20 theo sáng chế và vectơ MVA theo sáng chế. Theo một số phương án, bộ kit bao gồm vectơ Ad26 theo sáng chế và vectơ Gad20 theo sáng chế. Theo một số phương án, bộ kit bao gồm phân tử ARN tự sao chép theo sáng chế và vectơ Gad20 theo sáng chế. Theo một số phương án, bộ kit bao gồm phân tử ARN tự sao chép theo sáng chế và vectơ MVA theo sáng chế. Theo một số phương án, bộ kit bao gồm phân tử ARN tự sao chép theo sáng chế và vectơ Ad26 theo sáng chế. Theo một số phương án, bộ kit bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit theo sáng chế. Theo một số phương án, bộ kit bao gồm một hoặc nhiều polypeptit theo sáng chế. Theo một số phương án, bộ kit bao gồm một hoặc nhiều tế bào theo sáng chế.

Các phân tử khác

Phức hợp peptit-HLA

Sáng chế cũng đề xuất phức hợp protein bao gồm kháng nguyên bạch cầu ở người (HLA) và polypeptit có chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 SEQ ID NO:

9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 31 hoặc mảnh của nó.

Theo một số phương án, mảnh này là mảnh gây miễn dịch của polypeptit bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài nằm trong khoảng từ 6 đến 25 axit amin. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài khoảng 6 axit amin. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài khoảng 7 axit amin. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài khoảng 8 axit amin. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài khoảng 9 axit amin. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài khoảng 10 axit amin. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài khoảng 11 axit amin. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài khoảng 12 axit amin. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài khoảng 13 axit amin. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài khoảng 14 axit amin. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài khoảng 15 axit amin. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài khoảng 16 axit amin. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài khoảng 17 axit amin. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài khoảng 18 axit amin. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài khoảng 19 axit amin. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài khoảng 20 axit amin. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài khoảng 21 axit amin. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài khoảng 22 axit amin. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài khoảng 23 axit amin. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài khoảng 24 axit amin. Theo một số phương án, mảnh này có chiều dài khoảng 25 axit amin.

Theo một số phương án, HLA là HLA loại I hoặc HLA loại II.

Theo một số phương án, HLA là HLA-A*02:01, HLA-A*03:01, HLA-B*07:02 và HLA-C*07:02 hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án, phức hợp protein được liên hợp với chất phát hiện hoặc chất gây độc tế bào.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử protein được phân lập liên kết đặc hiệu với polypeptit theo sáng chế hoặc phức hợp của HLA và polypeptit.

Phân tử protein

Theo một số phương án, phân tử protein là kháng thể, khung thay thế, thụ thể kháng nguyên dạng khảm (CAR) hoặc thụ thể tế bào T (TCR).

Theo một số phương án, phân tử protein là kháng thể.

Theo một số phương án, phân tử protein là khung thay thế.

Theo một số phương án, phân tử protein là thụ thể kháng nguyên dạng khảm (CAR).

Theo một số phương án, phân tử protein là thụ thể tế bào T (TCR).

Liên kết của phân tử protein với polypeptit hoặc phức hợp peptit-HLA theo sáng chế có thể được xác định bằng thực nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ. Các phương pháp này có thể sử dụng các thiết bị đo ProteOn XPR36, Biacore 3000 hay KinExA, ELISA hoặc các xét nghiệm cạnh tranh liên kết đã được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Liên kết đo được có thể thay đổi nếu được đo trong các điều kiện khác nhau (ví dụ, nồng độ mol, độ pH). Do đó, các số đo ái lực và các thông số liên kết khác (ví dụ K_D , K_{on} , K_{off}) thường được đo trong các điều kiện tiêu chuẩn và dung dịch đệm tiêu chuẩn, như dung dịch đệm được mô tả trong bản mô tả này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu được rằng sai số nội tại đối với các số đo ái lực, ví dụ, sử dụng Biacore 3000 hoặc ProteOn (được đo theo độ lệch tiêu chuẩn, SD), thông thường có thể nằm trong khoảng từ 5-33% đối với các số đo nằm trong giới hạn phát hiện thông thường. “Không đáng kể” đề cập đến liên kết nhỏ hơn 100 lần khi so sánh với liên kết đã được đo của phân tử protein với polypeptit hoặc phức hợp HLA/peptit theo sáng chế.

Kháng thể

Các kháng thể liên kết polypeptit hoặc phức hợp HLA/peptit có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết. Ví dụ, có thể sử dụng phương pháp tế bào lai của Kohler và Milstein, *Nature* 256:495, 1975 để tạo các kháng thể đơn dòng. Theo phương pháp tế bào lai, chuột nhắt hoặc động vật chủ khác như chuột hamster, chuột cống hoặc khỉ, được tạo miễn dịch bằng một hoặc nhiều polypeptit hoặc mảnh của nó, sau đó là dung hợp tế bào lá lách từ động vật được tạo miễn dịch bằng tế bào u tủy, sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn để tạo thành tế bào lai (Gooding, Kháng thể đơn dòng: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Các dòng tế bào phát sinh từ các tế bào lai bất tử đơn được sàng lọc để tạo kháng thể có các đặc tính mong muốn, chẳng hạn như tính đặc hiệu của liên kết và ái lực.

Các động vật chủ khác nhau có thể được sử dụng để tạo kháng thể. Ví dụ, có thể sử dụng chuột nhắt Balb/c, chuột cống hoặc gà để tạo kháng thể chứa cặp VH/VL, và llama và alpaca có thể được dùng để tạo kháng thể chỉ có chuỗi nặng (VHH) bằng quy

trình tạo miễn dịch tiêu chuẩn. Kháng thể tạo trong động vật không phải người có thể được nhân hóa bằng nhiều công nghệ khác nhau để tạo nhiều trình tự giống người hơn.

Các kỹ thuật nhân hóa ví dụ bao gồm việc chọn khung chất nhận ở người đã được biết đến và bao gồm kỹ thuật ghép CDR (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,225,539), kỹ thuật ghép SDR (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 6,818,749), tái tạo bề mặt (Padlan, *Mol Immunol* 28:489-499), tái tạo bề mặt bằng đơn phân xác định tính đặc hiệu (công bố đơn đăng ký sáng chế Hoa Kỳ số 2010/0261620), mô phỏng khung của người (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 8,748,356) hoặc siêu nhân hóa (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 7,709, 226). Theo các phương pháp này, CDR của kháng thể mẹ được chuyển vào khung ở người có thể được chọn dựa trên tính tương đồng tổng thể của chúng đối với khung mẹ, dựa trên tính đồng dạng theo chiều dài CDR, hoặc tính đồng nhất cấu trúc hợp chuẩn hoặc sự kết hợp của chúng.

Các kháng thể nhân hóa có thể được tối ưu hóa hơn nữa để cải thiện tính chọn lọc hoặc ái lực đối với kháng nguyên mong muốn bằng cách hợp nhất các gốc hỗ trợ khung thay đổi để bảo toàn ái lực liên kết (đột biến ngược) bằng các kỹ thuật như các kỹ thuật được mô tả trong các công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1090/007861 và WO1992/22653, hoặc bằng cách đưa biến đổi vào CDR bất kỳ đềm, ví dụ, cải thiện ái lực của kháng thể.

Có thể sử dụng động vật biến đổi gen, như chuột nhắt hoặc chuột cống mang lô-cut globulin miễn dịch (lg) người trong hệ gen của chúng để tạo các kháng thể người kháng lại protein đích, và đã được mô tả trong, ví dụ, bằng sáng chế Hoa Kỳ số 6,150,584, công bố đơn sáng chế quốc tế số WO99/45962, các công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2002/066630, WO2002/43478, WO2002/043478 và WO1990/04036. Lô-cut globulin miễn dịch nội sinh trong động vật này có thể bị phá vỡ hoặc bị loại bỏ, và ít nhất một phần hoặc toàn bộ lô-cut globulin miễn dịch của người có thể được đưa vào bộ gen động vật sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng hoặc không tương đồng, sử dụng nhiễm sắc thể chuyển đoạn, hoặc sử dụng gen nhỏ. Các công ty như Regeneron (http://_www_regeneron_com), Harbour Antibodies (http://_www_harbourantibodies_com), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) (http://_www_omtinc_net), KyMab (http://_www_kymab_com), Trianni (http://_www.trianni_com) và Ablexis (http://_www_ablexis_com) có thể cam kết cung

cấp kháng thể người được định hướng kháng lại kháng nguyên chọn lọc sử dụng công nghệ như mô tả ở phần trên.

Có thể chọn kháng thể người từ thư viện biểu hiện trên thực khuẩn, trong đó thực khuẩn được thiết kế để biểu hiện globulin miễn dịch người hoặc các phần của chúng như Fab, kháng thể chuỗi đơn (scFv), hoặc các vùng biến đổi kháng thể tạo bất cặp hoặc không bất cặp. Các kháng thể theo sáng chế có thể được phân lập, ví dụ từ thư viện hiển thị thực khuẩn biểu hiện các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể dưới dạng polypeptit có protein phủ pIX của thực khuẩn. Các thư viện có thể được sàng lọc về sự liên kết thực khuẩn với kháng nguyên mong muốn và các dòng tế bào dương tính thu được có thể được xác định, các Fab phân lập từ dung dịch thủy phân dòng tế bào, và được biểu hiện là IgG có chiều dài đầy đủ. Phương pháp biểu hiện trên thực khuẩn này để phân lập kháng thể người được mô tả, ví dụ trong các bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,223,409, 5,403,484, 5,571,698, 5,427,908, 5,580,717, 5,969,108, 6,172,197, 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 và 6,593,081.

Việc điều chế kháng nguyên sinh miễn dịch và tạo kháng thể đơn dòng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật thích hợp bất kỳ, chẳng hạn như sản xuất protein tái tổ hợp hoặc bằng cách tổng hợp hóa học các peptit. Có thể cho động vật sử dụng kháng nguyên gây miễn dịch dưới dạng protein tinh chế, hoặc hỗn hợp protein bao gồm toàn bộ tế bào hoặc phần chiết mô hoặc tế bào, hoặc kháng nguyên có thể được tạo *de novo* (mới) trong cơ thể động vật từ các axit nucleic mã hóa kháng nguyên nói trên hoặc một phần của nó.

Khung thay thế

Khung thay thế (còn được gọi là chất bắt chước kháng thể) liên kết với polypeptit hoặc phức hợp HLA/peptit có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các khung thay thế đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả trong bản mô tả này. Khung thay thế có thể là monobody, được thiết kế để hợp nhất miền fibronectin loại III (Fn3) của fibronectin hoặc tenascin làm khung protein (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 6,673,901; bằng sáng chế Hoa Kỳ số 6,348,584) hoặc các miền FN3 tổng hợp như tencon như được mô tả trong bằng sáng chế Hoa Kỳ số 2010/0216708 và bằng sáng chế Hoa Kỳ số 2010/0255056. Các khung thay thế bổ sung bao gồm Adnectin™, iMab, Anticalin®, EETI-II/AGRP, miền Kunitz, aptame peptit thioredoxin, Affibody®, DARPin, Affilin,

Tetranectin, Fynome và Avime. Khung thay thế là các khung polypeptit chuỗi đơn chứa lõi có cấu trúc cao được liên kết với các miền thay đổi có khả năng dung nạp cấu hình cao, cho phép chèn, mất đoạn hoặc các thay thế khác trong miền thay đổi. Các thư viện đưa tính đa dạng vào một hoặc nhiều miền thay đổi, và trong một số trường hợp đối với lõi có cấu trúc, có thể được tạo ra bằng các quy trình đã biết và thư viện tạo thành có thể được sàng lọc để liên kết với neoantigen theo sáng chế, và chất kết dính đã xác định có thể được đặc trưng thêm cho tính đặc hiệu của chúng bằng các phương pháp đã biết. Khung thay thế có thể có nguồn gốc từ protein A, cụ thể là miền Z của nó (affibody), ImmE7 (protein miễn dịch), BPTI/APPI (miền Kunitz), protein liên kết Ras AF-6 (miền PDZ), charybdotoxin (độc tố bọ cạp), CTLA-4, Min-23 (knottin), lipocalin (anticalin), neokarzinostatin, miền fibronectin, miền lặp lại liên ứng ankyrin hoặc thioredoxin (Skerra, A., "Alternative Non-Antibody Scaffolds for Molecular Recognition (Khung không phải kháng thể thay thế để nhận dạng phân tử)" *Curr. Opin. Biotechnol.* 18:295-304 (2005); Hosse và cộng sự, "A New Generation of Protein Display Scaffolds for Molecular Recognition," *Protein Sci.* 15:14-27 (2006); Nicaise và cộng sự, "Affinity Transfer by CDR Grafting on a Nonimmunoglobulin Scaffold," *Protein Sci.* 13:1882-1891 (2004); Nygren và Uhlen, "Scaffolds for Engineering Novel Binding Sites in Proteins," *Curr. Opin. Struc. Biol.* 7:463-469 (1997).

Thụ thể kháng nguyên dạng khảm (CAR)

CAR có thể được tạo ra để liên kết với polypeptit hoặc phức hợp HLA/peptit. Các thụ thể kháng nguyên dạng khảm (CAR) là các thụ thể được biến đổi gen. Những thụ thể được thiết kế này có thể dễ dàng được chèn vào và biểu hiện bởi tế bào miễn dịch, bao gồm tế bào T theo các kỹ thuật đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Với CAR, một thụ thể có thể được lập trình để vừa nhận dạng kháng nguyên đặc hiệu, vừa hoạt hóa tế bào miễn dịch khi liên kết với kháng nguyên đó để tấn công và tiêu diệt tế bào mang kháng nguyên đó. Khi những kháng nguyên này tồn tại trên tế bào khối u, tế bào miễn dịch biểu hiện CAR có thể hướng đích đến và tiêu diệt tế bào khối u.

CAR thường bao gồm miền ngoại bào liên kết với kháng nguyên, cầu nối tùy chọn, miền xuyên màng và miền dịch bào bao gồm miền kích thích và/hoặc miền phát tín hiệu.

Vùng ngoại bào của CAR có thể chứa polypeptit bất kỳ liên kết với kháng nguyên mong muốn. Miền ngoại bào có thể bao gồm scFv, một phần của kháng thể hoặc khung thay thế. CAR cũng có thể được thiết kế để liên kết hai hoặc nhiều kháng nguyên mong muốn có thể được bố trí nối đuôi nhau và được tách riêng bằng trình tự cầu nối. Ví dụ, một hoặc nhiều kháng thể miền, scFv, kháng thể llama VHH hoặc các mảnh kháng thể chỉ có VH khác mà có thể được sắp xếp nối đuôi nhau thông qua cầu nối để cung cấp tính đặc hiệu kép hoặc tính đa hiệu đối với CAR.

Miền xuyên màng của CAR có thể có nguồn gốc từ miền xuyên màng của CD8, chuỗi alpha, beta hoặc zeta của thụ thể tế bào T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1 BB (CD137), 4-1 BBL, GITR, CD40, BAFR, HVEM (LIGHT), SLAMF7, NKp80 (KLRFI), CD160, CD119, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alpha, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD118, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (xúc giác), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D và/hoặc NKG2C.

Miền đồng kích thích nội bào của CAR có thể có nguồn gốc từ miền nội bào của một hoặc nhiều phân tử đồng kích thích. Phân tử đồng kích thích là phân tử bề mặt tế bào đã được biết đến khác với thụ thể kháng nguyên hoặc thụ thể Fc cung cấp tín hiệu thứ hai cần thiết để hoạt hóa và thực hiện chức năng hiệu quả của tế bào lympho T khi liên kết với kháng nguyên. Các miền đồng kích thích ví dụ có thể được sử dụng trong CAR là các miền nội bào của 4-1BB, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM và ZAP70.

Miền phát tín hiệu nội bào của CAR có thể có nguồn gốc từ các miền phát tín hiệu, ví dụ, CD3zeta, CD3epsilon, CD22, CD79a, CD66d hoặc CD39. “Miền phát tín hiệu nội bào” đề cập đến một phần của polypeptit CAR tham gia truyền thông tin liên kết CAR

hiệu quả với kháng nguyên đích vào bên trong tế bào đáp ứng kích thích miễn dịch để thực hiện chức năng của tế bào đáp ứng kích thích, ví dụ, hoạt hóa, sản xuất cytokin, tăng sinh và hoạt tính gây độc tế bào, bao gồm việc phóng thích yếu tố gây độc tế bào đến tế bào đích liên kết với CAR hoặc các đáp ứng tế bào khác được tạo ra sau khi kháng nguyên liên kết với vùng CAR ngoại bào.

Cầu nối tùy chọn của CAR được đặt giữa miền ngoại bào và miền xuyên màng có thể là polypeptit có chiều dài nằm trong khoảng 2 đến 100 axit amin. Cầu nối có thể bao gồm hoặc gồm có các gốc linh động như glycin và serin để các miền protein liền kề có thể tự do di chuyển so với nhau. Các cầu nối dài hơn có thể được sử dụng nếu muốn để đảm bảo rằng hai miền liền kề không gây cản trở cho nhau về mặt không gian. Các cầu nối có thể phân tách hoặc không thể phân tách. Ví dụ về cầu nối có thể phân tách bao gồm cầu nối 2A (ví dụ, T2A), cầu nối giống 2A hoặc tương đương về chức năng của nó và sự kết hợp của chúng. Cầu nối cũng có thể có nguồn từ vùng bản lề hoặc một phần của vùng bản lề này trong globulin miễn dịch bất kỳ.

CAR ví dụ có thể được sử dụng, ví dụ như CAR chứa miền ngoại bào liên kết với HLA trong phức hợp với mảnh của polypeptit CARL/JAK2 theo sáng chế, miền xuyên màng CD8 và miền phát tín hiệu CD3 ζ . CAR ví dụ khác chứa miền xuyên màng CD8 hoặc CD28, 41BB hoặc miền đồng kích thích OX40 và miền phát tín hiệu CD3 ζ .

CAR được tạo ra bằng các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn. Miền ngoại bào liên kết với kháng nguyên mong muốn có thể có nguồn gốc từ kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng được tạo ra bằng công nghệ được mô tả trong bản mô tả này.

Thu thể bào T (TCR)

TCR có thể được tạo thành để liên kết với phức hợp HLA/peptit theo sáng chế. Các TCR có thể được xác định dựa trên liên kết của tế bào T với phức hợp HLA/peptit, sau đó là giải trình tự của TCR. TCR đã xác định có thể được xác định từ

$\alpha\beta$ tế bào T. TCR đã xác định có thể còn được thiết kế để cải thiện ái lực, độ ổn định, khả năng hòa tan hoặc đặc điểm tương tự khác. Ví dụ, TCR có thể được ổn định cystein, được biểu hiện bằng các TCR hòa tan, như các TCR chuỗi đơn, như sự hợp nhất với các nhãn (tag) quyết định kháng nguyên đầu N hoặc đầu C, được thiết kế để cải thiện

độ ổn định với các đột biến trong lõi kỵ nước, như là vị trí 11, 13, 19, 21, 53, 76, 89, 91 hoặc 94 của chuỗi α được hoán đổi với miền biến đổi chuỗi α và β và/hoặc miền cố định được hoán đổi như được mô tả trong US7329731, US7569664, US9133264, US9624292, US2016/0130319 và US9884075.

Phương pháp sử dụng chế phẩm bất kỳ theo sáng chế

Sáng chế cũng đề xuất các phương pháp điều trị đối tượng bằng các chế phẩm được đề xuất trong bản mô tả này. Các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm việc sử dụng polynucleotit, polypeptit, vector và chế phẩm bất kỳ theo sáng chế. Các polynucleotit, polypeptit, vector, chế phẩm và chế độ sử dụng theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị, phòng ngừa hoặc giảm nguy cơ mắc tình trạng lâm sàng.

Theo một số phương án, tình trạng lâm sàng là bệnh ung thư, bệnh tăng sinh tủy hoặc bệnh tim mạch.

Theo một số phương án, tình trạng lâm sàng là bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm ung thư phổi, ung thư hệ bạch huyết, bệnh bạch cầu bạch huyết cấp tính, bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính, bệnh u lympho Burkitt, bệnh u lympho Hodgkin, bệnh u tủy tế bào plasma, ung thư đường mật, ung thư bàng quang, ung thư gan, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư da, ung thư tuyến giáp, ung thư dạ dày, ung thư ruột già, ung thư ruột kết, ung thư đường tiết niệu, ung thư hệ thần kinh trung ương, u nguyên bào thần kinh, ung thư thận, ung thư vú, ung thư cổ tử cung, ung thư tinh hoàn và ung thư mô mềm.

Theo một số phương án, tình trạng lâm sàng là bệnh tăng sinh tủy được chọn từ nhóm bao gồm bệnh xơ hóa tủy nguyên phát (MPN), bệnh đa hồng cầu (PV), bệnh tăng tiểu cầu cơ bản (ET), bệnh xơ tủy nguyên phát (PFM), bệnh xơ hóa tủy thứ phát, bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (AML), bệnh AML thứ phát, bệnh bạch cầu tủy mạn tính (CML), tạo huyết vô tính có tiềm năng không xác định (CHIP) và bệnh bạch cầu nguyên bào tủy mạn tính (CMML).

Theo một số phương án, bệnh tim mạch được chọn từ nhóm bao gồm hội chứng mạch vành cấp tính, bệnh mạch máu não thiếu máu cục bộ, bệnh tim thiếu máu cục bộ, huyết khối, huyết khối tĩnh mạch, huyết khối tĩnh mạch sâu, tắc mạch phổi, huyết khối

trong ổ bụng dị thường, bệnh động mạch ngoại vi, tăng huyết áp, suy tim, rung tâm nhĩ, bệnh tim mạch vành, xơ vữa động mạch hoặc rối loạn tạo máu vô tính.

Theo một số phương án, đối tượng là nhiễm sắc thể Philadelphia âm tính. Theo một số phương án, đối tượng là bệnh nhân điều trị lần đầu. Theo một số phương án, đối tượng đã trở nên hoặc bị nghi ngờ trở nên kháng hoặc khó điều trị bằng một hoặc nhiều liệu pháp chống ung thư. Theo một số phương án, đối tượng không đủ điều kiện để cấy ghép tế bào gốc. Theo một số phương án, đối tượng đã được điều trị bằng cấy ghép tế bào gốc.

Theo một số phương án, phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng được đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR ở đối tượng bao gồm việc sử dụng cho đối tượng cần điều trị các chế phẩm được đề xuất trong bản mô tả này, và trong đó việc sử dụng bao gồm một hoặc nhiều đợt sử dụng chế phẩm. Theo một số phương án, tình trạng lâm sàng là bệnh ung thư, bệnh tăng sinh tủy hoặc bệnh tim mạch.

Theo một số phương án, phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng mang đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR bao gồm việc sử dụng cho đối tượng cần điều trị chế phẩm bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, và trong đó việc sử dụng bao gồm một hoặc nhiều đợt sử dụng chế phẩm.

Theo một số phương án, phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh tăng sinh tủy ở đối tượng bao gồm việc sử dụng cho đối tượng cần điều trị chế phẩm bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, và trong đó việc sử dụng bao gồm một hoặc nhiều đợt sử dụng chế phẩm. Theo một số phương án, bệnh tăng sinh tủy được chọn từ nhóm bao gồm bệnh xơ hóa tủy nguyên phát (MPN), bệnh đa hồng cầu (PV), bệnh tăng tiểu cầu tiền phát (ET), bệnh xơ tủy nguyên phát (PFM), bệnh xơ hóa tủy thứ phát, bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (AML), bệnh AML thứ phát, bệnh bạch cầu tủy mạn tính (CML), tạo huyết vô tính có tiềm năng không xác định (CHIP) và bệnh bạch cầu nguyên bào tủy mạn tính (CMML).

Theo một số phương án, phương pháp điều trị bệnh ung thư ở đối tượng bao gồm việc sử dụng cho đối tượng cần điều trị chế phẩm bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, và trong đó việc sử dụng bao gồm một hoặc nhiều đợt sử dụng chế phẩm. Theo một số phương án, bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm ung thư phổi, ung thư hệ bạch huyết, bệnh bạch cầu bạch huyết cấp tính, bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, bệnh bạch

cầu dòng tủy mạn tính, bệnh u lympho Burkitt, bệnh u lympho Hodgkin, bệnh u tủy tế bào plasma, ung thư đường mật, ung thư bàng quang, ung thư gan, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư da, ung thư tuyến giáp, ung thư dạ dày, ung thư ruột già, ung thư ruột kết, ung thư đường tiết niệu, ung thư hệ thần kinh trung ương, u nguyên bào thần kinh, ung thư thận, ung thư vú, ung thư cổ tử cung, ung thư tinh hoàn và ung thư mô mềm.

Theo một số phương án, phương pháp điều trị bệnh tim mạch ở đối tượng bao gồm việc sử dụng cho đối tượng cần điều trị chế phẩm bao gồm chế phẩm bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, và trong đó việc sử dụng gồm một hoặc nhiều đợt sử dụng chế phẩm. Theo một số phương án, bệnh tim mạch được chọn từ nhóm bao gồm hội chứng mạch vành cấp tính, bệnh mạch máu não thiếu máu cục bộ, bệnh tim thiếu máu cục bộ, huyết khối, huyết khối tĩnh mạch, huyết khối tĩnh mạch sâu, tắc mạch phổi, huyết khối trong ổ bụng dị thường, bệnh động mạch ngoại vi, tăng huyết áp, suy tim, rung tâm nhĩ, bệnh tim mạch vành, xơ vữa động mạch và rối loạn tạo máu vô tính.

Theo một số phương án, các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm việc sử dụng cho đối tượng cần điều trị chế phẩm chứa polypeptit bao gồm ít nhất hai hoặc nhiều trình tự quyết định kháng nguyên hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit bao gồm ít nhất hai hoặc nhiều trình tự quyết định kháng nguyên hoặc vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa cho polypeptit bao gồm ít nhất hai hoặc nhiều trình tự quyết định kháng nguyên, trong đó trình tự quyết định kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm:

- quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1 (MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRR TRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTE) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 1;
- quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRMMRTK) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 2;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 4 (KLSHKHLVLNYGVCFDGENILVQEFVKFG) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 4;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFD) hoặc ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 5;

- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 6; và sự kết hợp của chúng.

Theo phương pháp bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, chế phẩm được sử dụng cho đối tượng có thể bao gồm vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ adenovirut, vectơ alphavirut, vectơ poxvirut, vectơ virut liên kết với adeno, vectơ retrovirut, phân tử ARN tự sao chép và sự kết hợp của chúng. Theo một số phương án, vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20, phân tử ARN tự sao chép và sự kết hợp của chúng.

Theo một số phương án, các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm một hoặc nhiều đợt sử dụng chế phẩm được đề xuất theo sáng chế. Ví dụ, phương pháp này bao gồm đợt sử dụng thứ nhất, sau đó là đợt sử dụng thứ hai, với một khoảng thời gian giữa hai đợt sử dụng này.

Theo một số phương án, đợt sử dụng thứ nhất và đợt sử dụng thứ hai có thể bao gồm các chế phẩm giống nhau hoặc khác nhau. Ví dụ, đợt sử dụng thứ nhất có thể bao gồm chế phẩm có chứa vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ GAd20, vectơ MVA hoặc phân tử ARN tự sao chép mã hóa các trình tự quyết định kháng nguyên được đại diện bởi DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 1, DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 2, DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 4, DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 5, và DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 6. Theo một số phương án, đợt sử dụng thứ hai có thể bao gồm chế phẩm có chứa vectơ được chọn từ nhóm bao gồm từ vectơ Ad26, vectơ GAd20, vectơ MVA hoặc phân tử ARN tự sao chép mã hóa các trình tự quyết định kháng nguyên được đại diện bởi DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 1, DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 2, DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 4, DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 5, và DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 6.

Theo một số phương án, đợt sử dụng thứ nhất và đợt sử dụng thứ hai là được sử dụng một lần trong cuộc đời đối tượng. Theo một số phương án, đợt sử dụng thứ nhất và đợt sử dụng thứ hai được sử dụng hai hoặc nhiều lần trong cuộc đời đối tượng.

Theo một số phương án, khoảng thời gian giữa đợt sử dụng thứ nhất và đợt sử dụng thứ hai là khoảng từ 1 tuần đến 2 tuần, khoảng từ 1 tuần đến 4 tuần, khoảng từ 1 tuần đến 6 tuần, khoảng từ 1 tuần đến 8 tuần, khoảng từ 1 tuần đến 12 tuần, khoảng từ 1 tuần đến 20 tuần, khoảng từ 1 tuần đến 24 tuần, hoặc khoảng từ 1 tuần đến 52 tuần.

Theo một số phương án, khoảng thời gian giữa đợt sử dụng thứ nhất và đợt sử dụng thứ hai là khoảng 2 tuần, khoảng 3 tuần, khoảng 4 tuần, khoảng 5 tuần, khoảng 6 tuần, khoảng 7 tuần, khoảng 8 tuần, khoảng 9 tuần, khoảng 10 tuần, khoảng 11 tuần, khoảng 12 tuần, khoảng 13 tuần, khoảng 14 tuần, khoảng 15 tuần, khoảng 16 tuần, khoảng 17 tuần, khoảng 18 tuần, khoảng 19 tuần, khoảng 20 tuần, khoảng 21 tuần, khoảng 22 tuần, khoảng 23 tuần, khoảng 24 tuần, khoảng 25 tuần, khoảng 26 tuần, khoảng 27 tuần, khoảng 28 tuần, khoảng 29 tuần, khoảng 30 tuần, khoảng 31 tuần, khoảng 32 tuần, khoảng 33 tuần, khoảng 34 tuần, khoảng 35 tuần, khoảng 36 tuần, khoảng 37 tuần, khoảng 38 tuần, khoảng 39 tuần, khoảng 40 tuần, khoảng 41 tuần, khoảng 42 tuần, khoảng 43 tuần, khoảng 44 tuần, khoảng 45 tuần, khoảng 46 tuần, khoảng 47 tuần, khoảng 48 tuần, khoảng 49 tuần, khoảng 50 tuần, khoảng 51 tuần, hoặc khoảng 52 tuần.

Theo một số phương án, khoảng thời gian giữa đợt sử dụng thứ nhất và đợt sử dụng thứ hai là khoảng 2 tuần.

Theo một số phương án, khoảng thời gian giữa đợt sử dụng thứ nhất và đợt sử dụng thứ hai là khoảng 4 tuần.

Theo một số phương án, đợt sử dụng thứ nhất và đợt sử dụng thứ hai tạo thành chu kỳ và phác đồ điều trị có thể bao gồm hai hoặc nhiều chu kỳ, mỗi chu kỳ cách nhau khoảng 1 tháng, khoảng 2 tháng, khoảng 3 tháng, khoảng 4 tháng, khoảng 5 tháng, khoảng 6 tháng, khoảng 7 tháng, khoảng 8 tháng, khoảng 9 tháng, khoảng 10 tháng, khoảng 11 tháng, hoặc khoảng 12 tháng.

Các ví dụ sau đây được cung cấp để mô tả thêm một số phương án được đề xuất trong bản mô tả này. Các ví dụ để minh họa, không giới hạn, các phương án được đề xuất. Theo một số phương án, đợt sử dụng thứ nhất và đợt sử dụng thứ hai có thể bao gồm sự kết hợp bất kỳ của vectơ được đề xuất trong Bảng 1 hoặc sự kết hợp bất kỳ của các quyết định kháng nguyên được đề xuất trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 1. Thành phần vectơ trong đợt sử dụng thứ nhất và thứ hai

Đợt sử dụng thứ nhất	Đợt sử dụng thứ hai
Ad26	MVA
Ad26	GAd20
Ad26	Phân tử ARN tự sao chép
Ad26	Ad26

MVA	Ad26
MVA	GAd20
MVA	Phân tử ARN tự sao chép
MVA	MVA
GAd20	Ad26
GAd20	MVA
GAd20	Phân tử ARN tự sao chép
GAd20	GAd20
Phân tử ARN tự sao chép	Ad26
Phân tử ARN tự sao chép	MVA
Phân tử ARN tự sao chép	GAd20
Phân tử ARN tự sao chép	Phân tử ARN tự sao chép

Bảng 2. Các quyết định kháng nguyên có trong thành phần vectơ của đợt sử dụng thứ nhất và thứ hai.

Nhóm vacxin	Đợt sử dụng thứ nhất	SEQ ID NO:	Đợt sử dụng thứ hai	SEQ ID NO:
1	Quyết định kháng nguyên CALR 1 và 2 + quyết định kháng nguyên JAK2 2	1, 2, 6	Quyết định kháng nguyên CALR1 1 và 2 + quyết định kháng nguyên JAK2 2	1, 2, 6
2	Quyết định kháng nguyên CALR 1 và 2 + quyết định kháng nguyên JAK2 2	1, 2, 6	Quyết định kháng nguyên CALR1 1 và 2 + quyết định kháng nguyên JAK2 2 + quyết định kháng nguyên JAK2 1	1, 2, 6, 5
3	CALR-JAK2-2x9mer	12	CALR-JAK2-2x9mer	12
4	CALR-JAK2-30mer	13	CALR-JAK2-30mer	13
5	LS_CALR-JAK2-2x9mer	10	LS_CALR-JAK2-2x9mer	10
6	LS_CALR-JAK2-2x9mer	10	TCE_CALR-JAK2-2x9mer	31
7	LS_CALR-JAK2-30mer	11	LS_CALR-JAK2-30mer	11
8	TCE_CALR-JAK2-2x9mer	31	TCE_CALR-JAK2-2x9mer	31
9	Quyết định kháng nguyên JAK2 2	6	Quyết định kháng nguyên JAK2 2	6
10	CALR-JAK2-2x9mer	12	Quyết định kháng nguyên JAK2 2	6

11	CALR-JAK2-30mer	13	Quyết định kháng nguyên JAK2 2	6
9	Quyết định kháng nguyên JAK2 2.AAY. Quyết định kháng nguyên JAK2 2	28	Quyết định kháng nguyên JAK2 2.AAY. Quyết định kháng nguyên JAK2 2	28
10	CALR-JAK2-2x9mer	12	Quyết định kháng nguyên JAK2 2.AAY. Quyết định kháng nguyên JAK2 2	28
11	CALR-JAK2-30mer	13	Quyết định kháng nguyên JAK2 2.AAY. Quyết định kháng nguyên JAK2 2	28

Theo một số phương án, phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch hoặc phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng được đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR ở đối tượng bao gồm chu kỳ xử lý, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép; và

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép.

Theo một số phương án, phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch hoặc phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng được đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR ở đối tượng bao gồm chu kỳ xử lý, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID

NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép; và

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép.

Theo một số phương án, phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch hoặc phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng được đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR ở đối tượng bao gồm chu kỳ xử lý, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ Ad26; và

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ Ad26.

Theo một số phương án, phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch hoặc phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng được đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR ở đối tượng bao gồm chu kỳ xử lý, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ GAd20; và

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định

kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là vector GAd20.

Theo một số phương án, phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch hoặc phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng được đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR ở đối tượng bao gồm chu kỳ xử lý, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là vector MVA; và

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là vector MVA.

Theo một số phương án, phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch hoặc phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng được đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR ở đối tượng bao gồm chu kỳ xử lý, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là vector GAd20; và

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là phân tử ARN tự sao chép.

Theo một số phương án, phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch hoặc phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của

tình trạng lâm sàng được đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR ở đối tượng bao gồm chu kỳ xử lý, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa hoặc nhiều đoạn lặp nối tiếp của quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép;

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa hoặc nhiều đoạn lặp nối tiếp của quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép.

Đợt sử dụng thứ ba

Theo một số phương án, phương pháp bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này có thể bao gồm thêm đợt sử dụng thứ ba. Ví dụ, phương pháp này có thể bao gồm đợt sử dụng thứ nhất, đợt sử dụng thứ hai, sau đó là đợt sử dụng thứ ba, với khoảng thời gian giữa mỗi đợt sử dụng.

Theo một số phương án, đợt sử dụng thứ nhất, đợt sử dụng thứ hai và đợt sử dụng thứ ba có thể bao gồm các chế phẩm giống nhau hoặc khác nhau. Ví dụ, đợt sử dụng thứ nhất có thể bao gồm chế phẩm có chứa vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ GAd20, vectơ MVA hoặc phân tử ARN tự sao chép mã hóa các trình tự quyết định kháng nguyên được đại diện bởi DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 1, DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 2, DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 4, DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 5, và DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 6. Theo một số phương án, đợt sử dụng thứ hai có thể bao gồm chế phẩm có chứa vectơ được chọn từ nhóm bao gồm từ vectơ Ad26, vectơ GAd20, vectơ MVA hoặc phân tử ARN tự sao chép mã hóa các trình tự quyết định kháng nguyên được đại diện bởi DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 1, DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 2, DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 4, DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 5, và DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 6. Theo một số phương án, đợt sử dụng thứ ba có thể bao gồm chế phẩm có chứa vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ GAd20, vectơ MVA hoặc phân tử ARN tự sao chép mã hóa các trình tự quyết định kháng nguyên được đại diện bởi DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 1, DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ

SỐ: 2, DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 4, DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 5, và DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 6.

Theo một số phương án, đợt sử dụng thứ nhất, đợt sử dụng thứ hai và đợt sử dụng thứ ba được sử dụng một lần trong cuộc đời của đối tượng. Theo một số phương án, đợt sử dụng thứ nhất, thứ hai và thứ ba được sử dụng hai hoặc nhiều lần trong cuộc đời của đối tượng.

Theo một số phương án, khoảng thời gian giữa đợt sử dụng thứ hai và đợt sử dụng thứ ba là khoảng từ 1 tuần đến 2 tuần, khoảng từ 1 tuần đến 4 tuần, khoảng từ 1 tuần đến 6 tuần, khoảng từ 1 tuần đến 8 tuần, khoảng từ 1 tuần đến 12 tuần, khoảng từ 1 tuần đến 20 tuần, khoảng từ 1 tuần đến 24 tuần, hoặc khoảng từ 1 tuần đến 52 tuần.

Theo một số phương án, khoảng thời gian giữa đợt sử dụng thứ hai và đợt sử dụng thứ ba là khoảng 2 tuần, khoảng 3 tuần, khoảng 4 tuần, khoảng 5 tuần, khoảng 6 tuần, khoảng 7 tuần, khoảng 8 tuần, khoảng 9 tuần, khoảng 10 tuần, khoảng 11 tuần, khoảng 12 tuần, khoảng 13 tuần, khoảng 14 tuần, khoảng 15 tuần, khoảng 16 tuần, khoảng 17 tuần, khoảng 18 tuần, khoảng 19 tuần, khoảng 20 tuần, khoảng 21 tuần, khoảng 22 tuần, khoảng 23 tuần, khoảng 24 tuần, khoảng 25 tuần, khoảng 26 tuần, khoảng 27 tuần, khoảng 28 tuần, khoảng 29 tuần, khoảng 30 tuần, khoảng 31 tuần, khoảng 32 tuần, khoảng 33 tuần, khoảng 34 tuần, khoảng 35 tuần, khoảng 36 tuần, khoảng 37 tuần, khoảng 38 tuần, khoảng 39 tuần, khoảng 40 tuần, khoảng 41 tuần, khoảng 42 tuần, khoảng 43 tuần, khoảng 44 tuần, khoảng 45 tuần, khoảng 46 tuần, khoảng 47 tuần, khoảng 48 tuần, khoảng 49 tuần, khoảng 50 tuần, khoảng 51 tuần, hoặc khoảng 52 tuần.

Theo một số phương án, khoảng thời gian giữa đợt sử dụng thứ hai và đợt sử dụng thứ ba là khoảng 6 tuần.

Theo một số phương án, khoảng thời gian giữa đợt sử dụng thứ hai và đợt sử dụng thứ ba là khoảng 8 tuần.

Theo một số phương án, đợt sử dụng thứ nhất, đợt sử dụng thứ hai và đợt sử dụng thứ ba cùng nhau tạo thành chu kỳ và phác đồ điều trị có thể bao gồm hai hoặc nhiều chu kỳ, mỗi chu kỳ cách nhau khoảng 1 tháng, khoảng 2 tháng, khoảng 3 tháng, khoảng 4 vài tháng, khoảng 5 tháng, khoảng 6 tháng, khoảng 7 tháng, khoảng 8 tháng, khoảng 9 tháng, khoảng 10 tháng, khoảng 11 tháng, hoặc khoảng 12 tháng.

Các ví dụ sau đây được cung cấp để mô tả thêm một số phương án được đề xuất trong bản mô tả này. Các đợt sử dụng thứ nhất, thứ hai và thứ ba được sử dụng trong các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này có thể bao gồm sự kết hợp bất kỳ của các quyết định kháng nguyên và chế phẩm được đề xuất trong Bảng 3 và Bảng 4 dưới đây.

Bảng 3. Các quyết định kháng nguyên có mặt trong thành phần vectơ của đợt sử dụng thứ nhất, thứ hai và thứ ba

Nhóm vaccin	Đợt sử dụng thứ nhất	SEQ ID NO:	Đợt sử dụng thứ hai	Các SEQ ID NO:	Đợt sử dụng thứ ba	SEQ ID NO:
1	Quyết định kháng nguyên CALR1 1 và 2 + quyết định kháng nguyên JAK2 2	1, 2, 6	Quyết định kháng nguyên CALR1 1 và 2 + quyết định kháng nguyên JAK2 2	1, 2, 6	Quyết định kháng nguyên CALR1 1 và 2 + quyết định kháng nguyên JAK2 2	1, 2, 6
2	Quyết định kháng nguyên CALR1 1 và 2 + quyết định kháng nguyên JAK2 2	1, 2, 6	Quyết định kháng nguyên CALR1 1 và 2 + quyết định kháng nguyên JAK2 2 + quyết định kháng nguyên JAK2 1	1, 2, 6, 5	Quyết định kháng nguyên CALR1 1 và 2 + quyết định kháng nguyên JAK2 2 + quyết định kháng nguyên JAK2 1	1, 2, 6, 5
3	CALR-JAK2-2x9mer	12	CALR-JAK2-2x9mer	12	CALR-JAK2-2x9mer	12
4	CALR-JAK2-30mer	13	CALR-JAK2-30mer	13	CALR-JAK2-30mer	13
5	LS_CALR-JAK2-2x9mer	10	LS_CALR-JAK2-2x9mer	10	LS_CALR-JAK2-2x9mer	10
6	LS_CALR-JAK2-2x9mer	10	TCE_CALR-JAK2-2x9mer	31	TCE_CALR-JAK2-2x9mer	31
7	LS_CALR-JAK2-30mer	11	LS_CALR-JAK2-30mer	11	LS_CALR-JAK2-30mer	11
8	TCE_CALR-JAK2-2x9mer	31	TCE_CALR-JAK2-2x9mer	31	TCE_CALR-JAK2-2x9mer	31
9	Quyết định kháng nguyên JAK2 2	6	Quyết định kháng nguyên JAK2 2	6	Quyết định kháng nguyên JAK2 2	6

Bảng 4. Thành phần vectơ trong đợt sử dụng thứ nhất, thứ hai và thứ ba

Đợt sử dụng thứ nhất	Đợt sử dụng thứ hai	Đợt sử dụng thứ ba
Ad26	Ad26	Ad26
Ad26	Ad26	MVA
Ad26	Ad26	GAd20
Ad26	Ad26	Phân tử ARN tự sao chép
Ad26	MVA	Ad26
Ad26	MVA	MVA
Ad26	MVA	GAd20
Ad26	MVA	Phân tử ARN tự sao chép
Ad26	GAd20	Ad26
Ad26	GAd20	MVA
Ad26	GAd20	GAd20
Ad26	GAd20	Phân tử ARN tự sao chép
Ad26	Phân tử ARN tự sao chép	Ad26
Ad26	Phân tử ARN tự sao chép	MVA
Ad26	Phân tử ARN tự sao chép	GAd20
Ad26	Phân tử ARN tự sao chép	Phân tử ARN tự sao chép
MVA	Ad26	Ad26
MVA	Ad26	MVA
MVA	Ad26	GAd20
MVA	Ad26	Phân tử ARN tự sao chép
MVA	MVA	Ad26
MVA	MVA	MVA
MVA	MVA	GAd20
MVA	MVA	Phân tử ARN tự sao chép
MVA	GAd20	Ad26
MVA	GAd20	MVA
MVA	GAd20	GAd20
MVA	GAd20	Phân tử ARN tự sao chép
MVA	Phân tử ARN tự sao chép	Ad26
MVA	Phân tử ARN tự sao chép	MVA
MVA	Phân tử ARN tự sao chép	GAd20

MVA	Phân tử ARN tự sao chép	Phân tử ARN tự sao chép
GAd20	Ad26	Ad26
GAd20	Ad26	MVA
GAd20	Ad26	GAd20
GAd20	Ad26	Phân tử ARN tự sao chép
GAd20	MVA	Ad26
GAd20	MVA	MVA
GAd20	MVA	GAd20
GAd20	MVA	Phân tử ARN tự sao chép
GAd20	GAd20	Ad26
GAd20	GAd20	MVA
GAd20	GAd20	GAd20
GAd20	GAd20	Phân tử ARN tự sao chép
GAd20	Phân tử ARN tự sao chép	Ad26
GAd20	Phân tử ARN tự sao chép	MVA
GAd20	Phân tử ARN tự sao chép	GAd20
GAd20	Phân tử ARN tự sao chép	Phân tử ARN tự sao chép
Phân tử ARN tự sao chép	Ad26	Ad26
Phân tử ARN tự sao chép	Ad26	MVA
Phân tử ARN tự sao chép	Ad26	GAd20
Phân tử ARN tự sao chép	Ad26	Phân tử ARN tự sao chép
Phân tử ARN tự sao chép	MVA	Ad26
Phân tử ARN tự sao chép	MVA	MVA
Phân tử ARN tự sao chép	MVA	GAd20
Phân tử ARN tự sao chép	MVA	Phân tử ARN tự sao chép
Phân tử ARN tự sao chép	GAd20	Ad26
Phân tử ARN tự sao chép	GAd20	MVA
Phân tử ARN tự sao chép	GAd20	GAd20
Phân tử ARN tự sao chép	GAd20	Phân tử ARN tự sao chép
Phân tử ARN tự sao chép	Phân tử ARN tự sao chép	Ad26
Phân tử ARN tự sao chép	Phân tử ARN tự sao chép	MVA
Phân tử ARN tự sao chép	Phân tử ARN tự sao chép	GAd20
Phân tử ARN tự sao chép	Phân tử ARN tự sao chép	Phân tử ARN tự sao chép

Theo một số phương án, phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch hoặc phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng được đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR ở đối tượng bao gồm chu kỳ xử lý, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép; và

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép; và

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép;

Theo một số phương án, phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch hoặc phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng được đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR ở đối tượng bao gồm chu kỳ xử lý, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là Ad26;

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định

kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là Ad26; và

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là MVA.

Theo một số phương án, phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch hoặc phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng được đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR ở đối tượng bao gồm chu kỳ xử lý, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là Ad26;

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là MVA; và

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là MVA.

Theo một số phương án, phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch hoặc phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng được đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR ở đối tượng bao gồm chu kỳ xử lý, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là GAd;

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định

kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là GAd; và

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là MVA.

Theo một số phương án, phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch hoặc phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng được đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR ở đối tượng bao gồm chu kỳ xử lý, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là GAd20;

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là ARN tự sao chép; và

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là MVA.

Theo một số phương án, phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch hoặc phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng được đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR ở đối tượng bao gồm chu kỳ xử lý, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa hoặc nhiều đoạn lặp nối tiếp của quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép;

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa hoặc nhiều đoạn lặp nối tiếp của quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép; và

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa hoặc nhiều đoạn lặp nối tiếp của quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép.

Đợt sử dụng thứ tư

Theo một số phương án, phương pháp bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này có thể bao gồm thêm đợt sử dụng thứ tư. Ví dụ, phương pháp này có thể bao gồm đợt sử dụng thứ nhất, đợt sử dụng thứ hai, đợt sử dụng thứ ba, và đợt sử dụng thứ tư, với khoảng thời gian giữa mỗi đợt sử dụng. Theo một số phương án, đợt sử dụng thứ nhất, đợt sử dụng thứ hai, đợt sử dụng thứ ba, và đợt sử dụng thứ tư có thể bao gồm các chế phẩm giống nhau hoặc khác nhau.

Ví dụ, đợt sử dụng thứ tư có thể bao gồm chế phẩm có chứa vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ GAd20, vectơ MVA hoặc phân tử ARN tự sao chép mã hóa các trình tự quyết định kháng nguyên được đại diện bởi DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 1, DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 2, DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 4, DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 5, và DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ: 6.

Theo một số phương án, đợt sử dụng thứ nhất, đợt sử dụng thứ hai, đợt sử dụng thứ ba, và đợt sử dụng thứ tư được sử dụng một lần trong cuộc đời của đối tượng. Theo một số phương án, đợt sử dụng thứ nhất, thứ hai, thứ ba và thứ tư được sử dụng hai hoặc nhiều lần trong cuộc đời của đối tượng.

Theo một số phương án, khoảng thời gian giữa đợt sử dụng thứ ba và đợt sử dụng thứ tư là khoảng từ 1 tuần đến 2 tuần, khoảng từ 1 tuần đến 4 tuần, khoảng từ 1 tuần đến 6 tuần, khoảng từ 1 tuần đến 8 tuần, khoảng từ 1 tuần đến 12 tuần, khoảng từ 1 tuần đến 20 tuần, khoảng từ 1 tuần đến 24 tuần, hoặc khoảng từ 1 tuần đến 52 tuần.

Theo một số phương án, khoảng thời gian giữa đợt sử dụng thứ ba và đợt sử dụng thứ tư là khoảng 2 tuần, khoảng 3 tuần, khoảng 4 tuần, khoảng 5 tuần, khoảng 6 tuần,

khoảng 7 tuần, khoảng 8 tuần, khoảng 9 tuần, khoảng 10 tuần, khoảng 11 tuần, khoảng 12 tuần, khoảng 13 tuần, khoảng 14 tuần, khoảng 15 tuần, khoảng 16 tuần, khoảng 17 tuần, khoảng 18 tuần, khoảng 19 tuần, khoảng 20 tuần, khoảng 21 tuần, khoảng 22 tuần, khoảng 23 tuần, khoảng 24 tuần, khoảng 25 tuần, khoảng 26 tuần, khoảng 27 tuần, khoảng 28 tuần, khoảng 29 tuần, khoảng 30 tuần, khoảng 31 tuần, khoảng 32 tuần, khoảng 33 tuần, khoảng 34 tuần, khoảng 35 tuần, khoảng 36 tuần, khoảng 37 tuần, khoảng 38 tuần, khoảng 39 tuần, khoảng 40 tuần, khoảng 41 tuần, khoảng 42 tuần, khoảng 43 tuần, khoảng 44 tuần, khoảng 45 tuần, khoảng 46 tuần, khoảng 47 tuần, khoảng 48 tuần, khoảng 49 tuần, khoảng 50 tuần, khoảng 51 tuần, hoặc khoảng 52 tuần.

Theo một số phương án, khoảng thời gian giữa đợt sử dụng thứ ba và đợt sử dụng thứ tư là khoảng 4 tuần.

Theo một số phương án, khoảng thời gian giữa đợt sử dụng thứ ba và đợt sử dụng thứ tư là khoảng 8 tuần.

Theo một số phương án, đợt sử dụng thứ nhất, đợt sử dụng thứ hai, đợt sử dụng thứ ba và đợt sử dụng thứ tư cùng tạo thành chu kỳ và phác đồ điều trị có thể bao gồm hai hoặc nhiều chu kỳ, mỗi chu kỳ cách nhau khoảng 1 tháng, khoảng 2 tháng, khoảng 3 tháng, khoảng 4 tháng, khoảng 5 tháng, khoảng 6 tháng, khoảng 7 tháng, khoảng 8 tháng, khoảng 9 tháng, khoảng 10 tháng, khoảng 11 tháng, hoặc khoảng 12 tháng.

Theo một số phương án, phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch hoặc phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng được đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR ở đối tượng bao gồm chu kỳ xử lý, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép; và

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID

NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép;

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép; và

đợt sử dụng thứ tư bao gồm chế phẩm thứ tư có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép.

[00479] Theo một số phương án, phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch hoặc phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng được đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR ở đối tượng bao gồm chu kỳ xử lý, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ GAd20; và

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ GAd20;

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID

NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ MVA; và

đợt sử dụng thứ tư bao gồm chế phẩm thứ tư có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là phân tử ARN tự sao chép.

Theo một số phương án, phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch hoặc phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng được đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR ở đối tượng bao gồm chu kỳ xử lý, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ GAd20; và

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ GAd20;

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là phân tử ARN tự sao chép; và

đợt sử dụng thứ tư bao gồm chế phẩm thứ tư có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là phân tử ARN tự sao chép.

Đợt sử dụng duy trì

Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm việc sử dụng chế phẩm cho đối tượng ở những khoảng thời gian đều đặn trong các chu kỳ điều trị và có thể tiếp tục ngay cả sau khi các chu kỳ điều trị đã kết thúc. Ví dụ, chế phẩm có thể được sử dụng cho đối tượng hàng tháng trong phác đồ điều trị và có thể tiếp tục trong 6 tháng tiếp theo. Theo một số phương án, chế phẩm có thể được sử dụng giữa hai chu kỳ xử lý. Theo một số phương án, chế phẩm có thể là chế phẩm bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, như là chế phẩm bao gồm vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ GAd20, vectơ MVA hoặc phân tử ARN tự sao chép mã hóa trình tự quyết định kháng nguyên.

Liều lượng và đường dùng

Theo một số phương án, chế phẩm bao gồm vectơ adenovirut được sử dụng với liều lượng nằm trong khoảng từ 1×10^4 IFU (Infectious Unit (IFU): Đơn vị lây nhiễm) đến 1×10^{12} IFU mỗi liều, khoảng từ 1×10^4 IFU đến 1×10^{11} IFU mỗi liều, khoảng từ 1×10^4 IFU đến 1×10^{10} IFU mỗi liều, khoảng từ 1×10^4 IFU đến 1×10^9 IFU mỗi liều, khoảng từ 1×10^4 IFU đến 1×10^8 IFU mỗi liều, hoặc khoảng từ 1×10^4 IFU đến 1×10^6 IFU mỗi liều.

Theo một số phương án, chế phẩm bao gồm vectơ adenovirut được sử dụng với liều lượng nằm trong khoảng từ 1×10^6 VP (Viral particle (VP): Hạt virut) đến 1×10^{14} VP mỗi liều, khoảng từ 1×10^6 VP đến 1×10^{12} VP mỗi liều, khoảng từ 1×10^6 VP đến 1×10^{10} VP mỗi liều, khoảng từ 1×10^6 VP đến 1×10^8 VP mỗi liều, hoặc khoảng từ 1×10^6 VP đến 1×10^7 VP mỗi liều.

Theo một số phương án, chế phẩm bao gồm vectơ Ad26 được sử dụng khoảng 1×10^{10} IFU mỗi liều. Theo một số phương án, chế phẩm bao gồm vectơ Ad26 được sử dụng khoảng 1×10^{11} IFU mỗi liều. Theo một số phương án, chế phẩm bao gồm vectơ Ad26 được sử dụng khoảng 1×10^{10} VP mỗi liều. Theo một số phương án, chế phẩm bao gồm vectơ Ad26 được sử dụng khoảng 1×10^{11} VP mỗi liều.

Theo một số phương án, chế phẩm bao gồm vectơ GAd20 được sử dụng khoảng 1×10^8 IFU mỗi liều. Theo một số phương án, chế phẩm bao gồm vectơ GAd20 được sử dụng khoảng 1×10^{10} IFU mỗi liều. Theo một số phương án, chế phẩm bao gồm vectơ GAd20 được sử dụng khoảng 1×10^{10} VP mỗi liều. Theo một số phương án, chế phẩm bao gồm vectơ GAd20 được sử dụng khoảng 1×10^{11} VP mỗi liều.

Theo một số phương án, chế phẩm bao gồm vectơ poxvirus được sử dụng với liều lượng nằm trong khoảng từ 1×10^4 IFU (Infectious Unit (IFU): Đơn vị lây nhiễm) đến 1×10^{12} IFU mỗi liều, khoảng từ 1×10^4 IFU đến 1×10^{11} IFU mỗi liều, khoảng từ 1×10^4 IFU đến 1×10^{10} IFU mỗi liều, khoảng từ 1×10^4 IFU đến 1×10^9 IFU mỗi liều, khoảng từ 1×10^4 IFU đến 1×10^8 IFU mỗi liều, hoặc khoảng từ 1×10^4 IFU đến 1×10^6 IFU mỗi liều.

Theo một số phương án, chế phẩm bao gồm vectơ MVA được sử dụng khoảng 1×10^8 IFU mỗi liều. Theo một số phương án, chế phẩm bao gồm vectơ MVA được sử dụng khoảng 1×10^{10} IFU mỗi liều.

Theo một số phương án, chế phẩm bao gồm phân tử ARN tự sao chép được sử dụng với liều lượng nằm trong khoảng từ 1 microgam đến 100 microgam, khoảng từ 1 microgam đến 90 microgam, khoảng từ 1 microgam đến 80 microgam, khoảng từ 1 microgam đến 70 microgam, khoảng từ 1 microgam đến 60 microgam, khoảng từ 1 microgam đến 50 microgam, khoảng từ 1 microgam đến 40 microgam, khoảng từ 1 microgam đến 30 microgam, khoảng từ 1 microgam đến 20 microgam, khoảng từ 1 microgam đến 10 microgam, hoặc khoảng từ 1 microgam đến 5 microgam phân tử ARN tự sao chép.

Theo một số phương án, chế phẩm được đề xuất trong bản mô tả này có thể được sử dụng cho đối tượng bằng nhiều đường dùng khác nhau như tiêm dưới da, dùng tại chỗ, bằng đường uống và tiêm bắp. Việc sử dụng các chế phẩm có thể được thực hiện theo đường uống hoặc đường tiêm. Các phân phối ngoài đường tiêu hóa bao gồm sử dụng tại chỗ, trong động mạch (trực tiếp đến mô), tiêm bắp, dưới da, nội tủy, trong não, trong não thất, trong tĩnh mạch, trong phúc mạc hoặc trong mũi. Sáng chế cũng có mục tiêu cung cấp các chế phẩm dùng tại chỗ, uống, toàn thân và tiêm phù hợp để sử dụng trong các phương pháp dự phòng và điều trị.

Theo một số phương án, có thể tiêm bắp chế phẩm vaccin bằng cách sử dụng kim tiêm. Giải pháp thay thế là sử dụng dụng cụ tiêm không kim để phân phối chế phẩm (ví dụ, như sử dụng Biojector (TM)) hoặc bột đông khô chứa vắc xin. Đối với tiêm trong tĩnh mạch, trên da hoặc dưới da, hoặc tiêm tại vị trí bệnh, chế phẩm có thể ở dạng dung dịch nước chấp nhận trong sử dụng đường tiêm, không chứa pyrogen và có độ pH, tính đẳng trương và độ ổn định phù hợp. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể điều chế tốt dung dịch phù hợp bằng cách sử dụng, ví dụ, các chất dẫn đẳng trương như chất tiêm natri clorua, chất tiêm Ringer, chất tiêm Ringer được lactat

hóa. Chất bảo quản, chất ổn định, chất đệm, chất chống oxy hóa và/hoặc bao gồm các chất phụ gia khác theo yêu cầu. Chế phẩm giải phóng chậm cũng có thể được sử dụng.

Thông thường, việc sử dụng sẽ có mục đích dự phòng để tạo ra đáp ứng miễn dịch chống lại CALR đột biến và/hoặc JAK2 đột biến trước khi phát triển các triệu chứng lâm sàng. Chế phẩm theo sáng chế được sử dụng cho đối tượng, tạo đáp ứng miễn dịch ở đối tượng. Lượng chế phẩm có thể tạo đáp ứng miễn dịch có thể phát hiện được xác định là "liều lượng có hiệu quả miễn dịch". Chế phẩm theo sáng chế có thể tạo đáp ứng miễn dịch thể dịch cũng như đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào. Theo phương án điển hình, đáp ứng miễn dịch là đáp ứng miễn dịch bảo vệ.

Lượng sử dụng thực tế, tỷ lệ và khoảng thời gian sử dụng sẽ phụ thuộc vào bản chất và mức độ nghiêm trọng của bệnh đang được điều trị. Việc kê đơn điều trị, ví dụ như quyết định về liều lượng, v.v., là trách nhiệm của bác sĩ đa khoa và các bác sĩ y khoa khác, và thường tính đến chứng rối loạn được điều trị, tình trạng của từng bệnh nhân, vị trí dẫn truyền thuốc, phương pháp cho dùng và những yếu tố khác mà các bác sĩ (chuyên gia) đã biết đến.

Theo một phác đồ ví dụ, chế phẩm bao gồm vectơ adenovirut được sử dụng (ví dụ, trong cơ) với thể tích nằm trong khoảng từ 100 μ L đến 10 ml chứa nồng độ nằm trong khoảng từ 10^4 đến 10^{12} hạt virut/ml. Chế phẩm vectơ adenovirut có thể được sử dụng với thể tích nằm trong khoảng từ 0,25 đến 1,0 ml, như là ở thể tích 0,5 ml.

Theo một phác đồ ví dụ, chế phẩm bao gồm vectơ MVA được sử dụng (ví dụ, trong cơ) với thể tích nằm trong khoảng từ 100 μ l đến 10 ml dung dịch nước muối chứa liều lượng nằm trong khoảng từ 1×10^7 TCID₅₀ đến 1×10^9 TCID₅₀ (Liều lây nhiễm nuôi cấy mô 50%) hoặc Inf.U. (Đơn vị lây nhiễm). Chế phẩm vectơ MVA thể được sử dụng với thể tích nằm trong khoảng từ 0,25 đến 1,0 ml.

Tác nhân điều trị thứ hai

Theo một số phương án, các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này còn bao gồm việc sử dụng tác nhân trị thứ hai. Theo một số phương án, tác nhân điều trị thứ hai là chất kích thích miễn dịch, chất hóa trị liệu, chất kháng sinh, chất ức chế điểm kiểm soát hoặc liệu pháp tế bào.

Theo một số phương án, tác nhân điều trị thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể CTLA-4, phối tử CTLA4, chất ức chế trục PD-1, chất ức chế trục PD-L1, chất

chủ vận TLR, chất chủ vận CD40, chất chủ vận OX40, hydroxyure, ruxolitinib, fedratinib, chất chủ vận 41BB, chất chủ vận CD28, chất đối kháng STING, chất đối kháng RIG-1, liệu pháp TCR-T, liệu pháp CAR-T, phối tử FLT3, nhôm sulfat, chất ức chế BTK, chất ức chế JAK, kháng thể CD38, chất ức chế CDK, kháng thể CD33, kháng thể CD37, kháng thể CD25, chất ức chế GM-CSF, IL-2, IL-15, IL-7, phân tử chuyển hướng CD3, pomalimib, IFN γ , IFN α , TNF α , kháng thể VEGF, kháng thể CD70, kháng thể CD27, kháng thể BCMA hoặc kháng thể GPRC5D hoặc sự kết hợp của chúng.

Theo một số phương án, liệu pháp điều trị thứ hai là chất ức chế điểm kiểm tra được chọn từ nhóm bao gồm pilimumab, cetrelimab, pembrolizumab, nivolumab, sintilimab, cemiplimab, toripalimab, camrelizumab, tislelizumab, dostralinab, spartalizumab, prolgolimab, balstilimab, budigalimab, sasanlimab, avelumab, atezolizumab, durvalumab, envafolimab, hoặc iodapolimab, hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng.

Trong một số phương pháp, tác nhân điều trị thứ hai là chất ức chế proteasom.

Theo một số phương án, tác nhân điều trị thứ hai có thể được sử dụng kết hợp với chế phẩm thứ nhất của đợt sử dụng thứ nhất hoặc chế phẩm thứ hai của đợt sử dụng thứ hai hoặc chế phẩm thứ ba của đợt sử dụng thứ ba, hoặc chế phẩm thứ tư của đợt sử dụng thứ tư.

Theo một số phương án, kháng thể kháng CTLA-4 được kết hợp với đợt sử dụng bất kỳ trong số đợt sử dụng thứ nhất, thứ hai, hoặc thứ ba, hoặc thứ tư của chế phẩm theo sáng chế.

Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-L1 hoặc kháng PD-L1 được kết hợp với đợt sử dụng bất kỳ trong số đợt sử dụng thứ nhất, thứ hai, hoặc thứ ba, hoặc thứ tư của chế phẩm theo sáng chế.

Theo một số phương án, chất ức chế điểm kiểm tra được sử dụng với liều lượng nằm trong khoảng 0,5 đến 5 mg/kg, khoảng từ 5 đến 10 mg/kg, khoảng từ 10 đến 15 mg/kg, khoảng từ 15 đến 20 mg/kg, khoảng từ 20 đến 25 mg/kg, khoảng từ 20 đến 50 mg/kg, khoảng từ 25 đến 50 mg/kg, khoảng từ 50 đến 75 mg/kg, khoảng từ 50 đến 100 mg/kg, khoảng từ 75 đến 100 mg/kg, khoảng từ 100 đến 125 mg/kg, khoảng từ 125 đến 150 mg/kg, khoảng từ 150 đến 175 mg/kg, khoảng từ 175 đến 200 mg/kg, khoảng từ 200 đến 225 mg/kg, khoảng từ 225 đến 250 mg/kg, hoặc khoảng từ 250 đến 300 mg/kg.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Xác định quyết định kháng nguyên JAK2 V617F 2 và đánh giá tính sinh miễn dịch in-silico của các quyết định kháng nguyên JAK2 V617F

Trình tự 17mer của protein JAK2 có đột biến V617F là gốc trung tâm và tất cả 9-mer của axit amin liền kề có trong trình tự 17mer này, đã được tạo ra. Dự đoán in-silico về ái lực liên kết của các 9-mer này với các alen HLA-A và HLA-B chung được dự đoán bằng cách sử dụng netMHCpan4.0. Các dự đoán liên kết được phân loại thành ba loại bao gồm liên kết yếu (ái lực dự đoán > 500 nM); liên kết vừa phải (ái lực dự đoán từ 50nM đến 500 nM), và liên kết mạnh (ái lực dự đoán < 50nM) với các alen HLA-A thường xuất hiện. Quyết định kháng nguyên 9-mer JAK2 1 có SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFC) và quyết định kháng nguyên 9-mer JAK2 2 có SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV) đã được chọn từ phân tích này để tiếp tục theo dõi thử nghiệm. Peptit có SEQ ID NO: 6 trước đây chưa được mô tả là một mảnh JAK2 gây miễn dịch. Ái lực liên kết dự đoán của quyết định kháng nguyên JAK2 2 được trình bày trong Bảng 5 thấp hơn ái lực liên kết của quyết định kháng nguyên JAK2 1.

Bảng 5. Ái lực của quyết định kháng nguyên JAK2 2. Các loại liên kết là chất không liên kết = xếp hạng > 2,0; chất liên kết vừa phải = xếp hạng từ 0,5 đến 2,0; chất liên kết mạnh = xếp hạng < 0,5.

Alen	Ái lực liên kết nM	Xếp hạng liên kết
HLA-A01:01	22680	11
HLA-A02:01	2878	7
HLA-A03:01	42208	84
HLA-A24:02	41245	52
HLA-B07:02	40322	66
HLA-B08:01	35548	69
HLA-B15:01	38417	76
HLA-B27:05	40573	84
HLA-B40:01	39076	44

Ví dụ 2: JAK2 đột biến so với tính sinh miễn dịch quyết định kháng nguyên JAK2 kiểu đại trong các mẫu bệnh nhân

PBMC được phân lập từ bệnh nhân tăng tiểu cầu tiền phát (ET) hoặc bệnh xơ hóa tủy nguyên phát (PMF) có đột biến JAK617F được xác nhận. Các peptit JAK2 kiểu đại và mutJAK2 được liên kết với lớp I riêng lẻ được sử dụng ngoại sinh ở nồng độ 5 µg/ml cho 250.000 PBMC vào ngày 0. Các tế bào được nuôi cấy trong 10 ngày với sự có mặt của 10 IU/ml IL-2 của người và 10 ng/ml IL-15 của người, và sau đó được đánh giá về tần suất độ biến hoặc tế bào T đặc hiệu kháng nguyên JAK2 kiểu đại bằng peptit-thu hồi xung và phân tích tế bào theo dòng chảy nhuộm nội bào cho tế bào T CD8 + sản xuất IFN γ và TNF α . Đáp ứng đặc hiệu với kháng nguyên được coi là dương tính nếu tần suất của tế bào T IFN γ /TNF α + CD8 + lớn hơn gấp ba lần so với tế bào được điều trị bằng DMSO chỉ vào Ngày 0 và lớn hơn 0,1%. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 6.

Bảng 6

Bệnh	Số mẫu hiến tặng	Kháng nguyên virut đối chứng Đáp ứng CEF	Quyết định kháng nguyên JAK2 đột biến 2	Quyết định kháng nguyên JAK2 đột biến 1	Quyết định kháng nguyên JAK2 kiểu đại 2	Quyết định kháng nguyên JAK2 kiểu đại 1
PMF	120174174	Có	Có (30%)	Không	Không	Không
PMF	120250311	Có	Không	Không	Không	Không
PMF	120800910	Không	Không	Không	Không	Không
PMF	120800936	Có	Có (0,63%)	Có (0,62%)	Không	Không
PMF	120817869	Có	Không	Không	Không	Không
ET	120708928	Có	Không	Không	Không	Không
ET	120815833	Có	Có (30,6%)	Không	Không	Có (1,3%)
ET	120824685	Có	Không	Không	Không	Không

CÓ thể hiện tần số tế bào T IFN γ /TNF α + CD8 + tăng gấp 3 lần so với các tế bào chỉ được kích thích bằng DMSO cho mỗi mẫu hiến tặng. Dấu ngoặc đơn cho biết tần số thực tế của tế bào T IFN γ /TNF α + CD8 +.

HÌNH 1 thể hiện khả năng sinh miễn dịch của quyết định kháng nguyên JAK2 1 và quyết định kháng nguyên JAK2 2 trong các mẫu bệnh nhân so với các trình tự kiểu đại của các vùng quyết định kháng nguyên giống nhau. Các trình tự peptit kiểu đại tương ứng cho các quyết định kháng nguyên mutJAK2 I và II cũng được đánh giá và thể hiện có các đáp ứng tương tự như đối chứng DMSO.

Ví dụ 3: Thiết kế và tạo ra các polynucleotit và polypeptit CALR.JAK2 để biểu hiện Ad26 và MVA

Để chọn chế phẩm vaccin dẫn đến biểu hiện kháng nguyên và kích hoạt tế bào T tốt, một loạt các polynucleotit và polypeptit CALR.JAK2 đã được thiết kế và thử nghiệm.

Các đột biến CALR loại 1 và loại 2 được đưa vào polynucleotit. Dựa trên dự đoán quyết định kháng nguyên tế bào T *in silico* và nghiên cứu liên kết HLA, peptit 54-mer (SEQ ID NO: 1) của đột biến CALR loại 1 và peptit 14-mer bị cắt ngắn (SEQ ID NO: 2) của protein loại 2 đột biến CALR đã được đưa vào polynucleotit. Phần CARL của polynucleotit mã hóa trình tự axit amin được hiển thị trong SEQ ID NO: 3. Để đảm bảo quá trình xử lý nội bào hiệu quả của tất cả các protein, các peptit riêng lẻ được kết nối với nhau bằng các trình liên kết AAY (ala-ala-tyr) để thúc đẩy sự phân cắt protein.

Cũng dựa trên dự đoán quyết định kháng nguyên tế bào T *in silico* và nghiên cứu liên kết HLA, hai peptit JAK2 riêng biệt, peptit 30-mer (SEQ ID NO: 4) hoặc hai peptit 9-mer (SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6) được đưa vào, mỗi gen đều chứa đột biến V617F. Peptit có SEQ ID NO: 6 chưa được mô tả sớm hơn là một đoạn JAK2 gây miễn dịch.

Để đảm bảo quá trình xử lý nội bào hiệu quả của tất cả các protein, các peptit riêng lẻ cũng được kết nối với nhau bằng các trình liên kết AAY (ala-ala-tyr) để thúc đẩy sự phân cắt protein. SEQ ID NO: 7 đại diện cho trình tự axit amin của hai đoạn 9-mer JAK2 được phân tách bởi liên kết AAY.

Hai cấu trúc khác nhau được thiết kế trong đó các phần CALR giống hệt nhau, nhưng phần JAK2 hoặc là peptit 30-mer hoặc hai peptit 9-mer. Hai gen chuyển khác nhau này được thiết kế không có trình tự dẫn hướng (LS), HAVT20 LS (MACPGFLWALVISTCLEFSMA; SEQ ID NO: 8), hoặc tín hiệu ubiquitin (Ubiq) (MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGR TLDYNIQKESTLHLVLRRLRGV; SEQ ID NO: 54) tại đầu N. Các cấu trúc được liệt kê trong bảng 3. HAVT20 LS sẽ hướng gen chuyển vào ER, trong khi trình tự ubiquitin hướng đích đến proteasom. Điều này có thể dẫn đến các mức độ biểu hiện TG khác nhau giữa các cấu trúc. Ngoài ra, cấu trúc chỉ mã hóa trình tự từ hai protein CALR đột biến đã được tạo ra, được sử dụng như là đối chứng cho sự biểu hiện của protein CALR.

Trình tự protein và polynucleotit của các gen chuyên được thể hiện trong Bảng 7. Các trình tự polynucleotit được minh họa đã được tối ưu hóa cho sự biểu hiện của adenovirut.

Bảng 7. Cấu trúc biểu hiện adenovirut

Tên cấu trúc	Trình tự CALR đột biến	Trình tự đột biến JAK2
LS_CALR	Đột biến CALR Loại 1, đột biến CALR cắt ngắn Loại 2	không
LS_CALR_JAK2-2x9mer	Đột biến CALR Loại 1, đột biến CALR cắt ngắn Loại 2	2x9-mer
LS_CALR_JAK2-30mer	Đột biến CALR Loại 1, đột biến CALR cắt ngắn Loại 2	30-mer
CALR_JAK2-2x9mer	Đột biến CALR Loại 1, đột biến CALR cắt ngắn Loại 2	2x9-mer
CALR_JAK2-30mer	Đột biến CALR Loại 1, đột biến CALR cắt ngắn Loại 2	30-mer
Ubiq_CALR_JAK2-2x9mer	Đột biến CALR Loại 1, đột biến CALR cắt ngắn Loại 2	2x9-mer
Ubiq_CALR_JAK2-30mer	Đột biến CALR Loại 1, đột biến CALR cắt ngắn Loại 2	30-mer

LS: trình tự dẫn hướng; Ubiq: ubiquitin

Bảng 8. CALR.JAK2 polypeptit SEQ ID và polynucleotit có SEQ ID NO:

tên cấu trúc	Protein có SEQ ID NO:	Polynucleotit có SEQ ID NO:
LS_CALR	9	16
LS_CALR_JAK2-2x9mer	10	17
LS_CALR_JAK2-30mer	11	18
CALR_JAK2-2x9mer	12	19
CALR_JAK2-30mer	13	20
Ubiq_CALR_JAK2-2x9mer	14	21
Ubiq_CALR_JAK2-30mer	15	22

Các cấu trúc CALR.JAK2 được đưa vào plasmid con thoi pUC57 bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn để biểu hiện adenovirut. Cassette biểu hiện bao gồm trình vùng khởi động chứa xytomegalovirut (TetO) chứa vùng vận hành tetraoxyclin (CMV), để cho phép sử dụng kết hợp với dòng tế bào TetR PER.C6, trình tự Kozak, polynucleotit CALR.JAK2 và tín hiệu polyadenyl hóa virut simian 40 (SV40) được bao bọc bởi các trình tự đặc hiệu Ad26 bên ngoài cassette biểu hiện. Các trình tự đặc hiệu

Ad26 bên sườn này tương đồng với trình tự plasmid bộ khung Ad26 để đảm bảo tạo ra plasmid bằng cách tái tổ hợp tương đồng. Trình tự được tối ưu hóa gen người để tăng cường biểu hiện gen chuyển.

Để kiểm tra sự biểu hiện của CALR.JAK2 bằng các cấu trúc khác nhau này, các tế bào HEK293 đã được truyền nạp với các plasmid ADN tương ứng và sự biểu hiện trong dịch phân giải của tế bào đã được kiểm tra bằng phương pháp Western blot 72 giờ sau khi chuyển gen. Ngoài ra, hoạt động của proteasom bị ức chế bằng cách thêm chất ức chế proteasom MG132 4 giờ trước khi thu thập mẫu để kiểm tra ảnh hưởng đến sự biểu hiện của gen chuyển. Tất cả các cấu trúc đều biểu hiện các quyết định kháng nguyên CALR.JAK2 và mức độ biểu hiện cao nhất đã được quan sát cho các cấu trúc với HAVT20 LS. Ức chế proteasom tăng cường biểu hiện gen chuyển tăng cường một cách khiêm tốn bởi các cấu trúc có tín hiệu ubiquitin, nhưng sự khác biệt này không thể được định lượng bằng phương pháp Western blot. Dựa trên dữ liệu biểu hiện CALR.JAK2, hai cấu trúc có trình tự dẫn hướng HATV20 (LS) đã được chọn để tạo ra adenovirut, tức là Ad26.LS_CALR_JAK2-30mer (Ad26HEME001) và Ad26.LS_CALR_JAK2-2x9mer (Ad26HEME002). Ngoài ra, Ad26-LS-CALR (AD26HEME003) được tạo thành để sử dụng như là đối chứng khả thi. Trình tự polynucleotit của Ad26HEME001 có chứa vùng khởi động xytomegalovirut (TetO) chứa vùng vận hành tetraacyclin (CMV), trình tự Kozak, CALR. JAK2 và tín hiệu polyadenyl hóa của virut simian 40 (SV40) được thể hiện trong SEQ ID NO: 23. Trình tự polynucleotit của Ad26HEME002 chứa vùng khởi động xytomegalovirut (TetO) chứa vùng vận hành tetraacyclin (CMV), trình tự Kozak, CALR.JAK2 và tín hiệu polyadenyl hóa của virut simian 40 (SV40) được thể hiện trong SEQ ID NO: 24.

Để chọn dòng tế bào cho việc tạo ra Ad26HEME001 và Ad26HEME002, khả năng giải cứu virut được đo bằng cách chuyển nạp ADN hệ gen của virut trong PER.C6® so với các tế bào TetR PER.C6. Hiệu ứng tế bào (CPE) và sự hình thành mảng (cùng thể hiện khả năng giải cứu) được so sánh giữa cấu trúc Ad26HEME001 và Ad26HEME002 (Bảng 9). Tóm lại, cả hai cấu trúc đều thể hiện CPE đầy đủ trong vòng 8 ngày trên PER.C6 TetR, nhưng không thể hiện trên các tế bào PER.C6®. Ad26HEME001 và Ad26HEME002 lần lượt thể hiện khoảng 13 mảng và khoảng 11 mảng trên tế bào PER.C6® và > 100 mảng trên tế bào TetR PER.C6 để dễ dàng đồng chuyển nạp ở Ngày thứ 8. Điều này thể hiện khả năng giải cứu đã bị ức chế trên các tế

bào PER.C6®. Các vectơ adenovirut khó giải cứu có đặc điểm năng suất hạn chế và có nguy cơ cao về sự mất đoạn và đột biến trong cassette biểu hiện gen chuyển. Dựa trên những kết quả này, PER.C6 TetR được chọn làm dòng tế bào tạo ra virut Ad26HEME001 và Ad26HEME002. Ad26HEME003 cũng được tạo thành trên các tế bào TetR PER.C6.

Bảng 9.

	CPE đầy đủ PER.C6®/PER.C6 TetR	# mảng PER.C6®/PER.C6 TetR
Ad26HEME001	Không có CPE/<8 ngày	13/>100
Ad26HEME002	Không có CPE/<8 ngày	11/>100

Ví dụ 4: Tạo thành Ad26HEME001 và Ad26HEME002

Các lô nghiên cứu được tạo ra từ các tế bào được truyền gen đơn pAd26HEME001 (pAd26.LS_CALR_JAK2-30mer), pAd26HEME002 (pAd26.LS_CALR_JAK2-2x9mer) và plasmid pAd26HEME003 (pAd26.LS_CALR).

ADN plasmid pUC57, được sử dụng để đưa cassette biểu hiện TG Ad26 vùng sớm 1 (E1) vào trong bộ khung pAd26 để tạo ra plasmid pAd26HEME001, pAd26HEME002 và pAd26HEME003. Vùng E1 trong bộ khung pAd26 đã được loại bỏ để hiển thị vectơ không có năng lực sao chép trong các tế bào không bổ sung, như là tế bào người. Ngoài ra, một phần của vùng Ad26 vùng sớm 3 (E3) đã được loại bỏ ($\Delta E3$) để tạo đủ không gian trong hệ gen virut để chèn các kháng nguyên ngoại lai và khung đọc mở Ad26 vùng sớm 4 (E4) (orf) 6 được trao đổi bởi trình tự tương đồng của adenovirut Loại 5 (Ad5) để cho phép tạo ra các vectơ Ad26 không có khả năng sao chép trong các dòng tế bào bổ sung Ad5-E1 như tế bào HEK293, PER.C6® và HER96. Bộ khung pAd26 đã được tạo mạch thẳng bằng cách sử dụng một điểm hạn chế duy nhất (AsiSI) trong vùng mà cassette TG sau đó đã được đưa vào. Cả hai đầu của plasmid được tạo mạch thẳng này chứa các trình tự chồng gối lên nhau tương đồng với các trình tự đặc hiệu Ad26 có ở mặt ngoài của cassette biểu hiện gen chuyển E1. Điều này cho phép tạo plasmid bằng cách nhân bản cassette gen chuyển vào bộ pAd26 bằng cách sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng. Các trình tự plasmid hoàn chỉnh đã được xác minh.

Đề tạo các vector Ad26HEME001, Ad26HEME002 và Ad26HEME003, các plasmid đã được chuyển nạp vào các tế bào TetR PER.C6. Virut được khuếch đại trên các tế bào TetR PER.C6, được tinh sạch và kiểm tra tính toàn vẹn và nhận dạng của hệ gen adenovirut cũng như biểu hiện chính xác của TG.

Tạo lô và mô tả đặc điểm

Một Ad26HEME001, hai Ad26HEME002 và một Ad26HEME003 lô nghiên cứu đã được tạo ra và được xác định đặc điểm để đánh giá tính lây nhiễm, biểu hiện gen chuyển, độ ổn định di truyền của lô và năng suất tương đối trong tế bào TetR PER.C6 (sPER.C6) huyền phù. Tất cả các lô nghiên cứu được tạo ra trên các tế bào TetR PER.C6 kết dính. Chất lượng lô được xác định bởi sự biểu hiện của kháng nguyên được mã hóa trong điều kiện không sao chép, số lượng hạt virut (VP) và đơn vị lây nhiễm (IU).

Tất cả các lô nghiên cứu được tạo thành đều thể hiện sự biểu hiện của kháng nguyên mã hóa như được xác định bởi phương pháp Western blot và tất cả các lô đều có tỷ lệ VP/IU thấp. Lô nghiên cứu của Ad26HEME001 thể hiện tỷ lệ VP/IU là 29. Hai lô nghiên cứu của Ad26HEME002 thể hiện tỷ lệ VP/IU là 5 và Ad26HEME003 thể hiện tỷ lệ VP/IU là 8. Cả tính ổn định di truyền và năng suất đều quan trọng đối với tính khả thi trong việc mở rộng quy mô sản xuất vector adenovirut cho vật liệu thử nghiệm lâm sàng (CTM) hoặc quy mô thương mại. Nguy cơ mất ổn định di truyền được xác định bởi những thay đổi trong hệ gen vector và sự phát triển tự nhiên của quần thể với các đặc tính không mong muốn trong quá trình nhân giống trong dòng tế bào sản xuất có thể được đánh giá bằng cách nhân giống quần thể virut ở quy mô nhỏ. Đối với tất cả các lô nghiên cứu, tính ổn định di truyền được đánh giá trên vật liệu thuộc lô cuối cùng, bằng phản ứng chuỗi polymeraza nhận dạng (ID PCR) đối với vùng gen chuyển, vùng gen E3 và vùng gen E4. Ngoài ra, sản phẩm phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) của vùng gen chuyển đã được xác định trình tự. Tất cả các lô nghiên cứu đều ổn định về mặt di truyền.

Năng suất (như được xác định bằng hiệu giá VP/mL) được đánh giá trong các thí nghiệm quy mô nhỏ bằng cách so sánh vector ứng viên vacxin với các đối chứng chuẩn tương ứng, trong đó hiệu suất trong bình phản ứng sinh học được tăng cường quy trình (PIN) được biết đến. Tóm lại, tế bào TetR sPER.C6 được chuyển nạp với 70, 300 và 900 VP/tế bào của vật liệu lô nghiên cứu tinh khiết và hai đối chứng tiêu chuẩn Ad26. Ad26HEME001, Ad26HEME002 và Ad26HEME003 thể hiện năng suất tương đương với đối chứng tiêu chuẩn ở 70, 300 và 900 VP/tế bào, thể hiện rằng cả ba vector đều là

những nhà sản xuất tốt (đôi chứng thể hiện kết quả mong đợi) với $\sim 10^{11}$ VP/ml được sản xuất sau 2-3 ngày trong môi trường nuôi cấy.

Trình tự polynucleotit của vector Ad26HEME002 bao gồm các thành phần khác nhau được thể hiện trong SEQ ID NO: 24 và trình tự axit amin được mã hóa bởi chúng được thể hiện trong SEQ ID NO: 10.

Ví dụ 5: Tạo cấu trúc MVA.CALR.JAK2 và GAd20.CALR.JAK2

Trình tự axit amin cho gen chuyển CALR.JAK2 được chuyển đổi thành trình tự nucleotit dựa trên việc sử dụng mã bộ ba của con người. Các mô-típ kết thúc cho vector MVA (TTTTTnT) đã được loại bỏ. Vị trí giới hạn BamH1 và trình tự KOZAK sau đó được thêm vào ở phía thượng lưu của trình tự nucleotit. Hai mã bộ ba KẾT THÚC theo sau là vị trí giới hạn AscI đã được thêm vào phía hạ lưu của trình tự nucleotit. Polynucleotit tế bào T tăng cường (TCE) mã hóa đoạn peptit nhỏ có chiều dài 28aa từ chuỗi bất biến cá trạng nguyên (SEQ ID NO: 29) được đặt ở đầu N của gen chuyển. Dữ liệu tiền lâm sàng thể hiện trình tự này để tăng đáp ứng miễn dịch của vector virus. Quá trình tổng hợp gen chuyển được thực hiện bằng các phương pháp đã biết.

Gen chuyển MVA được nhân bản dưới sự kiểm soát của vùng khởi động sớm/muộn virus bệnh đậu mùa P7.5 (SEQ ID NO: 32) được chèn bằng cách tái tổ hợp tương đồng vào vị trí mất đoạn III của MVA (vùng FlankIII-1 và -2) và các hạt virus tái tổ hợp được tạo ra bằng các phương pháp đã biết.

Gen chuyển GAd20 được tạo dòng phụ vào trong plasmid con thoi giữa vùng khởi động CMV với hai đoạn lặp TetO và polyA BGH thông qua vị trí giới hạn EcoRI-NotI. Cassette biểu hiện tạo thành được chuyển vào hệ gen GAd20 bằng tái tổ hợp tương đồng ở các chủng *E. coli* phù hợp, được biến nạp bằng mảnh ADN CMV-gen chuyển-BGH và bằng cấu trúc mang hệ gen GAd20. Sự tái tổ hợp bao gồm CMV và BGH là các nhánh tương đồng, đã có trong cấu trúc GAd20 thay cho sự mất đoạn E1 (vị trí chèn của gen chuyển). Sau đó, vector GAd20 tái tổ hợp được giải cứu bằng cách chuyển nạp bổ sung E1, tế bào M9 biểu hiện TetR và được khuếch đại bằng cách tái nhiễm tế bào M9 mới tiếp theo.

Vector MVA và GAd20 biểu hiện polypeptit TCE_CALR_JAK2-2x9mer (SEQ ID NO: 31) (HCalJ-9.9) được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết.

Ví dụ 6: Các vectơ Ad26.CALR.JAK2 biểu hiện, xử lý và trình diện kháng nguyên cho các tế bào T tự thân

Mục đích của nghiên cứu này là để kiểm tra khả năng của các tế bào trình diện kháng nguyên (APC) của con người để xử lý và trình diện các kháng nguyên đột biến của vacxin và gắn với các đáp ứng của tế bào T.

Các lọ phản ứng đông lạnh chứa các tế bào CD1c⁺ DC tự thân và các tế bào T CD4⁺/CD8⁺ tự thân được phân lập thông qua chọn lọc âm tính hạt từ tính. Các CD1c⁺ DC đã bị lây nhiễm ở mức độ lây nhiễm bội số (MOI) là 50.000 VP qua đêm với Ad26HEME002 hoặc Ad5HEME002 (vectơ Ad5 được thiết kế để biểu hiện gen chuyển LS_CALR_JAK2-2x9mer). Ở 18 đến 24 giờ sau khi lây nhiễm, các tế bào T tự thân của mẫu hiến tặng giống hệt nhau được trộn với CD1c⁺ DC theo tỷ lệ 10:1. IL-15 của người ở 10 ng/mL được thêm vào môi trường nuôi cấy vào Ngày 0 và một nửa môi trường thay đổi bằng 2×IL-15 và IL-2 (10 IU/mL) được thực hiện cứ sau 2 đến 3 ngày cho đến Ngày 11. Vào ngày 11, các peptit tương ứng với protein CALRmut, JAK2V617F, hoặc Adeno Hexon (đối chứng dương) được thêm vào môi trường nuôi cấy tế bào DC/T qua đêm cùng với chất ức chế vận chuyển protein. Các môi trường nuôi cấy thu được được nhuộm bằng chỉ thị tế bào T (CD4, CD8, CD3) và chỉ thị của tế bào T đã hoạt hóa (IFN- γ , TNF- α) và được phân tích bằng phương pháp đo tế bào theo dòng chảy. Nhuộm IFN- γ và TNF- α tăng lên sau khi kích thích peptit qua đêm vào ngày 11 thể hiện sự phát triển của tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên CALRmutant và/hoặc JAK2V617F do biểu hiện gen hướng đến Ad26/Ad5-HEME002. Các tế bào T CD8 dương tính kép IFN- γ và TNF- α tăng gấp 3 lần so với vectơ không có Ad26/Ad5 được coi là đáp ứng tích cực. Tiêu chí loại trừ là (i) đáp ứng Adeno Hexon dưới 0,5% tế bào T dương tính kép IFN- γ và TNF- α , hoặc (ii) <1% tế bào T dương tính kép IFN- γ và TNF- α của kháng nguyên virus (cấu trúc adeno CEF); trong trường hợp đó, thử nghiệm được coi là không tối ưu và đáp ứng âm có thể là lỗi kỹ thuật do mẫu hiến tặng hoặc thiết lập thử nghiệm.

Tổng cộng có 24 tế bào hiến tặng khỏe mạnh duy nhất đã được sàng lọc. HÌNH 2 thể hiện kết quả đại diện của việc sàng lọc trên mẫu hiến tặng đối với các đáp ứng của tế bào T đặc hiệu đột biến CALR. Trong thử nghiệm này, các tế bào được đánh giá trên tế bào sống/CD3⁺/CD8⁺ và nhuộm IFN- γ và TNF- α được đánh giá. Cả hai đáp ứng CD8 (lớp I) và CD4 (lớp II) đều được quan sát thấy sau khi nhiễm bệnh. Các thử nghiệm được thực hiện trên 3 phân tích độc lập và tần suất đáp ứng là tương tự nhau trong các

thử nghiệm, khoảng 35% bất kể sử dụng Ad26 hay Ad5 của chim bạc bụng. HÌNH 3 minh họa cả hai quyết định kháng nguyên JAK2 được đưa vào vacxin (SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFC); quyết định kháng nguyên 1 trong HÌNH 3 và SEQ ID NO: 6; quyết định kháng nguyên FCGDENILV 2 trong HÌNH 3) có tính sinh miễn dịch. HÌNH 4 thể hiện kết quả đại diện của việc sàng lọc một mẫu hiến tặng đối với các đáp ứng của tế bào T đặc hiệu đột biến JAK2. Dữ liệu chứng minh rằng cả hai quyết định kháng nguyên bị biến đổi của đột biến JAK2 đều được xử lý từ trình tự gen chuyên vacxin thể hiện rằng các quyết định kháng nguyên này có thể được trình diện bởi các tế bào ung thư. Các loại HLA của tất cả những mẫu hiến tặng được thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 10.

Bảng 10.

Mẫu hiến tặng	HLA A1	HLA B1	HLA C1	HLA A2	HLA B2	HLA C2
2480	03:01	15:03	02:10	23:01	44:02	05:01
013B	01:01	07:02	07:01	03:01	08:01	07:02
4384	24:02	35:01	04:01	30:01	42:01	07:01
118	02:01	14:02	01:01	68:02:00	27:05	08:02
676	01:01	08:01	03:04	32:01:00	15:01	07:01
274	03:01					
3942	02:02	08:01	03:04	03:01		07:02
240	03:01	15:03	02:10	23:01	44:02:00	05:01
644	03:01	07:02	06:02	66:01:00	13:02	07:02
359	1:01 SA	07:02	07:01	03:01	08:01	07:01
538	02:01	27:05	01:02	03:01	38:01:00	12:03

Ví dụ 7: Các vector Ad26.CALR.JAK2 biểu hiện các đáp ứng tế bào gây ra ở chuột

Mục đích của nghiên cứu này là để kiểm tra xem các đáp ứng của tế bào T gây ra bởi Ad26HEME001 hoặc A26HEME002 có chứa Ad26 có cao hơn so với đáp ứng của vector không chứa Ad26 bằng cách sử dụng thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym IFN- γ (ELISpot) hay không và để chọn ra chủng chuột tối ưu để nghiên cứu thêm về tính sinh miễn dịch.

Các chủng chuột C57BL/6 và Balb/c đã được thử nghiệm cho nghiên cứu tính sinh miễn dịch này khi phân tích dự đoán về quyết định kháng nguyên cho thấy rằng các quyết định kháng nguyên tế bào T CD8 tiềm năng có mặt trong các chủng chuột này. Chuột được tiêm một liều 10^{10} VP/chuột của Ad26HEME001 hoặc Ad26HEME002,

hoặc Ad26 không mã hóa gen chuyển (Ad26.Empty). Các nhóm peptit chồng gồi lên nhau 15-mer trái dài trên vùng chèn Ad26HEMEO01 hoặc Ad26HEMEO02 đượ sử dụng để đánh giá đáp ứng miễn dịch tế bào ở 14 ngày sau khi tạo miễn dịch chính (IFN- γ ELISpot). Các nhóm thí nghiệm đượ trình bày trong Bảng 11.

Bảng 11.

Nhóm	Số lượng chuột	Mô tả các nhóm	Chủng chuột
1a	4	Liều Ad26.Empty 10^{10} VP	C57BL/6
1b	4	Liều Ad26.Empty 10^{10} VP	Balb/c
2	8	Liều Ad26HEMEO01 10^{10} VP	C57BL/6
3	8	Liều Ad26HEMEO02 10^{10} VP	C57BL/6
4	8	Liều Ad26HEMEO01 10^{10} VP	Balb/c
5	8	Liều Ad26HEMEO02 10^{10} VP	Balb/c

Đáp ứng của tế bào T đặc hiệu vùng chèn đượ tạo ra sau 14 ngày kể từ ngày đầu tiên, ở chuột C57BL/6 và Balb/c đượ đo bằng IFN- γ ELISpot, và có đáp ứng miễn dịch cao hơn đáng kể ở những con chuột đượ tạo miễn dịch bằng Ad26HEMEO01 (HÌNH 5) hoặc Ad26HEMEO02 (HÌNH 6) sao với những con chuột đượ tạo miễn dịch bằng liều Ad26.Empty gây ra. Không có đáp ứng miễn dịch tế bào nào đượ phát hiện chống lại peptit LS (dữ liệu không đượ minh họa). Không có sự khác biệt đáng kể giữa đáp ứng miễn dịch do hai vectơ gây ra khi xem xét dòng chuột. Tương tự, không có sự khác biệt đáng kể giữa đáp ứng miễn dịch đối với nhóm peptit HEMEO01 do Balb/c và C57BL/6 gây ra khi xem xét các ứng viên vaccin. Có sự khác biệt đáng kể giữa đáp ứng miễn dịch đối với nhóm peptit HEMEO02 do Balb/c và C57BL/6 gây ra khi xem xét các ứng viên vaccin.

Ví dụ 8: Các vectơ Ad26.CALR.JAK2 và MVA.CALR.JAK2 tạo ra đáp ứng tế bào ở chuột

Mục đích của những nghiên cứu này là để xác định xem liệu vectơ vaccinia Ankara bị biến đổi (MVA) mã hóa HCalJ-9.9 (tức là, MVA-HCalJ-9.9, MVAHEMEO02) có thể tăng cường đáp ứng miễn dịch môi bằng Ad26HEMEO02 ở chuột Balb/c hay không. Chủng chuột Balb/c đượ chọn dựa trên dữ liệu đượ mô tả trong Ví dụ 7, trong đó chủng chuột Balb/c ít biến đổi hơn so với chủng chuột C57BL/6.

Trong nghiên cứu đầu tiên, Ad26HEMEO02 đượ dùng liều 10^{10} VP và MVA-HCalJ-9.9 đượ dùng liều 10^7 IU. Ở tuần 0, chuột đượ tạo miễn dịch bằng cách tiêm

IM với Ad26HEME002; một nửa số chuột không được tiêm chủng tăng cường (Nhóm 2) và một nửa số chuột được tiêm tăng cường ở Tuần thứ 3 bằng MVA-HCalJ-9.9 (Nhóm 3). Một nhóm chuột khác đã được tạo miễn dịch (mồi) bằng MVA-HCalJ-9.9 ở Tuần 3 (Nhóm 1). Những con chuột đối chứng đã được mồi ở Tuần 0 bằng liều Ad26.Empty (Nhóm 4). Ở tuần thứ 4, tất cả các con chuột đều bị giết và tế bào đơn nhân lách được kích thích bằng các nhóm peptit 15-mer chồng gối lên nhau mở rộng vùng chèn Ad26HEME002, hoặc nhóm peptit bao phủ trình tự CALR trong vùng chèn hoặc nhóm 9-mer có hai chuỗi JAK29-mer. Cảm ứng của các tế bào sản xuất IFN- γ được đo bằng IFN- γ ELISpot. Bảng 12 thể hiện các nhóm thí nghiệm khác nhau.

Bảng 12.

Nhóm	Số lượng chuột	Mô tả các nhóm
1 (#5)	5	Liều MVA-HCalJ-9.9 10^7 IU
2 (#7)	10	Liều Ad26HEME002 10^{10} VP
3 (#8)	10	Liều Ad26HEME002 10^{10} Vp/liều MVA-HCalJ-9.9 10^7 IU
4 (#9)	3	Liều Ad26.Empty 10^{10} VP

Tất cả các con chuột được tạo miễn dịch chỉ bằng Ad26HEME002 hoặc kết hợp với MVA-HCalJ-9.9 thúc đẩy các tế bào sản xuất IFN- γ phát triển khi được kích thích bằng nhóm peptit bao gồm các peptit 15mer chồng gối lên nhau bởi 11 axit amin và bao gồm toàn bộ HEME002 (LS_CALR.JAK2. 2x9mer) (HÌNH 7) hoặc nhóm peptit mutCALR bao gồm các peptit 15mer chồng gối lên nhau bởi 11 axit amin và chỉ gồm phần mutCALR của HEME002 (HÌNH 8). Ngược lại, không có cảm ứng của các tế bào sản xuất cytokin được phát hiện khi kích thích với hai peptit 9-mer JAK2 (dữ liệu không được minh họa). Điều quan trọng là, sự gia tăng bằng MVA-HCalJ-9.9 sau tạo miễn dịch mồi bằng Ad26HEME002 (Nhóm 3) gây ra đáp ứng miễn dịch cao hơn đáng kể so với các con chuột chỉ được mồi ở Tuần 0 bằng Ad26HEME002 (Nhóm 2) (Nhóm peptit HEME002: $p = 0,038$; Nhóm peptit CALRmut: $p = 0,00025$; ANOVA). Kết luận, dữ liệu ELISpot thể hiện MVA có thể tăng cường đáp ứng miễn dịch tế bào đặc hiệu vùng chèn được gây ra bởi việc tạo miễn dịch mồi bằng Ad26HEME002.

Trong nghiên cứu thứ hai, Ad26HEME002 được định liều là 10^9 VP hoặc 10^{10} VP và MVA-HCalJ-9.9 được định liều là 10^7 IU. Ở tuần 0, chuột được tạo miễn dịch bằng cách tiêm IM với Ad26HEME002, sau đó được tiêm tăng cường vào tuần 3 bằng

MVA-HCalJ-9.9. Ở tuần thứ 4, tất cả các con chuột đều bị giết và tế bào đơn nhân lách được kích thích bằng các nhóm peptit 15-mer chồng gối lên nhau mở rộng vùng chèn Ad26HEME002, hoặc nhóm peptit bao phủ trình tự CALR trong vùng chèn hoặc nhóm 9-mer có hai chuỗi JAK29-mer. Cảm ứng của các tế bào sản xuất IFN- γ được đo bằng IFN- γ ELISpot. Mỗi Ad26HEME002 ở mức liều 1×10^{10} VP, theo sau là tiêm tăng cường MVA-HCalJ-9.9 ở mức liều 1×10^7 đơn vị hình thành mảng (pfu), dẫn đến sự gia tăng có ý nghĩa thống kê trong FN- γ khi so sánh với vector Ad26.Empty ở mức liều 1×10^{10} VP (tăng gấp 3,2 lần, $p = 0,0042$). Ngược lại, không có thay đổi đáng kể nào về IFN- γ được quan sát thấy ở mức liều thấp hơn của mỗi Ad26HEME002 ở 1×10^9 VP, sau đó là liều tăng cường MVA-HCalJ-9.9 ở 1×10^7 pfu ($p = 0,090$). Tế bào đơn nhân lách sản sinh IFN- γ tăng đã được quan sát với liều 1×10^{10} VP của Ad26HEME002 so với liều 1×10^9 VP. Hình 9 minh họa các kết quả của thí nghiệm.

Ví dụ 9: Khả năng sinh miễn dịch của Ad26HEME002 và MVA-HCalJ 9.9 ở linh trưởng không phải người (NHP)

Mục đích chính của nghiên cứu này là xác định xem liệu việc tiêm chủng bằng Ad26HEME002 và MVA-HCalJ-9.9 có gây ra các đáp ứng của tế bào T đặc hiệu với CALR và/hoặc JAK2 cao hơn về mức độ và thời gian so với tiêm chủng chỉ bằng Ad26HEME002 duy nhất trong NHP hay không. Mục đích thứ hai là đánh giá xem liệu kháng thể đơn dòng kháng CTLA-4, tức là YERVOY® (ipilimumab) ([Ipi]) kết hợp với Ad26HEME002 và MVA-HCalJ-9.9 có khả năng tăng cường đáp ứng miễn dịch hay không. Ngoài ra, mục tiêu khám phá là đánh giá xem liệu kháng thể kháng CTLA-4 kết hợp với liều lượng hai phác đồ tương đồng của Ad26HEME002 có thể tăng cường đáp ứng của tế bào T đặc hiệu vùng chèn so với dùng liều một phác đồ Ad26HEME002 hay không.

Khỉ đuôi dài (Cynomolgus) được tạo miễn dịch IM bằng Ad26HEME002 và/hoặc MVA-HCalJ-9.9 một mình hoặc kết hợp với Ipi (10 mg/kg tiêm tĩnh mạch [IV]) theo lịch trình được trình bày trong Bảng 13. Tóm lại, NHP được tạo miễn dịch bằng chỉ bằng Ad26HEME002 (5×10^{10} VP, IM) (Nhóm 1 và Nhóm 2) hoặc kết hợp với Ipi 10 mg/kg IV (Nhóm 3 và Nhóm 4). Các con khỉ nhận liều tăng cường ở Tuần 4 và 8 chỉ bằng MVA-HCalJ-9.9 (108 IU, IM, Nhóm 2) hoặc MVA-HCalJ-9.9 kết hợp với Ipi 10 mg/kg IV (Nhóm 3) hoặc khỉ được nhận liều tăng cường với Ad26HEME002 kết hợp

với Ipi ở Tuần 4 sau đó là liều ở Tuần 14 với MVA-HCaJ-9.9 kết hợp với Ipi 10 mg/kg IV (Nhóm 4), hoặc khi không nhận được bất kỳ liều tăng cường nào (Nhóm 1). Các con khi được lấy máu ở các thời điểm khác nhau và PBMC và huyết thanh được phân lập để làm các xét nghiệm miễn dịch học. Việc gây đáp ứng miễn dịch cho CALRmut hoặc JAK2 đã được đánh giá trong PBMC tại các thời điểm khác nhau trong quá trình nghiên cứu bởi IFN- γ ELISpot bằng cách sử dụng các nhóm peptit trải dài hoặc trình vùng chèn CALRmut hoặc JAK2 2 \times 9-mer, trình tự dẫn hướng hoặc toàn bộ vùng chèn (HEME002; CALR_JAK2-2x9mer).

Bảng 13.

Nhóm	Số lượng khí	Tạo miễn dịch				Ipi mg/kg IV
		(Tuần 0)	(Tuần 4)	(Tuần 8)	(Tuần 14)	
1	5	Ad26HEME002 (5x10 ¹⁰ VP)	NA	NA	NA	NA
2	7	Ad26HEME002 (5x10 ¹⁰ VP)	MVA-HCaJ-9.9 (10 ⁸ IU)	MVA-HCaJ-9.9 (10 ⁸ IU)	NA	NA
3	7a	Ad26HEME002 (5x10 ¹⁰ VP)	MVA-HCaJ-9.9 (10 ⁸ IU)	MVA-HCaJ-9.9 (10 ⁸ IU)	NA	10
4	5	Ad26HEME002 (5x10 ¹⁰ VP)	Ad26HEME002 (5x10 ¹⁰ VP)	NA	MVA-HCaJ-9.9 (10 ⁸ IU)	10

Ipi, ipilimumab; nr, số lượng; VP, hạt virut; IU, đơn vị lây nhiễm; IV, trong tĩnh mạch; PBMC, tế bào đơn nhân máu ngoại vi.

Các đáp ứng mức nền không đặc hiệu cao đã được quan sát thấy ở một số con khi vào các thời điểm khác nhau trong nghiên cứu, điều này có thể che giấu việc giải thích các đáp ứng đặc biệt thấp. Tất cả các con khi đã được đưa vào trong tập hợp dữ liệu.

Không có đáp ứng miễn dịch có thể phát hiện được đối với JAK2 hoặc nhóm peptit có trình tự dẫn hướng tại bất kỳ thời điểm nào được đo (dữ liệu không được minh họa). Mức độ và tốc độ đáp ứng được đo cho các nhóm peptit CALR và CALR_JAK2-2x9mer (HEME002) rất giống nhau và do đó chỉ có tập hợp dữ liệu CALR_JAK2-2x9mer (HEME002) được minh họa. HÌNH 10 minh họa động học cảm ứng của tế bào T đặc hiệu HEME002 ở người tạo ra IFN- γ trên bốn nhóm. Chỉ tạo miễn dịch bằng Ad26HEME002 không tạo ra các tế bào tạo ra IFN- γ có thể phát hiện được đối với nhóm peptit HEME002 ở bất kỳ khi nào (HÌNH 10). Ngược lại, các tế bào tạo ra IFN-

HEME002 đặc hiệu với HEME002 thấp nhưng có thể phát hiện được đã được phát hiện ở 5 trong số 12 con khỉ được tạo miễn dịch bằng Ad26HEME002 kết hợp với Ipi (Nhóm 3 và Nhóm 4 kết hợp) ở tuần 2 (Hình 12) và tuần 4 (dữ liệu không được minh họa) và đáp ứng miễn dịch này cao hơn đáng kể so với phản ứng được phát hiện ở khỉ chỉ nhận liều Ad26HEME002 ($p < 0,001$).

Đáp ứng miễn dịch đối với CALR_JAK2-2x9mer (HEME002) được quan sát thấy từ tuần thứ 6 trở đi ở khỉ được tiêm Ad26HEME002 và MVA-HCalJ-9.9. Chỉ có sự thay đổi nhỏ về tỷ lệ đáp ứng (3-4 trong số 7 con khỉ) cho dù khỉ đã nhận một liều (Hình 13) hay hai liều (HÌNH 14) MVA-HCalJ-9.9. Trong số các con khỉ đáp ứng, mức độ trung bình của đáp ứng miễn dịch HEME002 nằm trong khoảng từ 129 đến 453 SFU/10⁶ tế bào (HÌNH 13-15). HÌNH 11 minh họa đáp ứng miễn dịch trước 2 tuần của nghiên cứu (tức là 2 tuần trước liều đầu tiên). HÌNH 12 minh họa đáp ứng miễn dịch sau 2 tuần. HÌNH 13 minh họa đáp ứng miễn dịch ở tuần thứ 6. HÌNH 14 thể hiện đáp ứng miễn dịch ở tuần thứ 10. HÌNH 15 thể hiện đáp ứng miễn dịch ở tuần thứ 16. Khỉ được tiêm MVA-HCalJ-9.9 kết hợp với Ipi ở tuần 4 và ở tuần 8 (Nhóm 3) đã tăng mức độ đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với HEME002 so với sau khi tiêm chủng Ad26HEME002 (đáp ứng bình quân trung bình của những khỉ đáp ứng: 93 SFU/10⁶ tế bào ở Tuần 2, 1,945 SFU/10⁶ tế bào ở Tuần 6 và 983 SFU/10⁶ tế bào ở Tuần 10), trong khi tỷ lệ đáp ứng tổng thể không tăng so với trước và sau khi dùng liều MVA.

Có sự gia tăng về lượng của các tế bào tạo ra IFN- γ sau hai liều Ad26HEME002 kết hợp với Ipi so với một liều duy nhất với Ad26HEME002 kết hợp với Ipi (Nhóm 4): đáp ứng HEME002 bình quân trung bình của khỉ đáp ứng là 93 SFU/10⁶ tế bào ở Tuần 2 (sau liều lượng đầu tiên) và 580 SFU/10⁶ tế bào ở Tuần 6 (sau liều lượng thứ hai). Ở Tuần 14, Nhóm 4 nhận được liều MVA-HCalJ-9.9 kết hợp với Ipi, dẫn đến sự gia tăng 4,6 lần đáp ứng bình quân trung bình của khỉ đáp ứng (400 SFU/10⁶ tế bào ở Tuần 12 và 1,827 SFU/10⁶ tế bào ở Tuần 16; Hồi quy Tobit về điểm thay đổi $p < 0,001$), trong khi tỷ lệ phản hồi không thay đổi. Trong số các khỉ phản ứng, chỉ có đáp ứng miễn dịch co lại nhỏ được quan sát, với đáp ứng trung bình là 1,698 SFU/10⁶ tế bào đối với HEME002 ở Tuần 20 (6 tuần sau khi dùng liều MVA-HCalJ-9.9 + Ipi) (Nhóm 4).

Phân tích diện tích dưới đường cong (AUC; Hồi quy Tobit với hiệu chỉnh Bonferroni) đối với đáp ứng miễn dịch HEME002 đã được thực hiện trong các khoảng thời gian sau: (i) Tuần 2 đến Tuần 20, (ii) Tuần 2 đến Tuần 12, và (iii) Tuần 16 đến

Tuần 20. Do sự khác biệt lớn và số lượng giá trị được kiểm duyệt lớn, nên không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh AUC cho Nhóm 1 và Nhóm 2, hoặc AUC cho Nhóm 2 và Nhóm 3 (HÌNH 10). Ngược lại, có sự khác biệt đáng kể trong AUC đối với đáp ứng HEME002 khi so sánh Nhóm 3 và Nhóm 4 cho khoảng thời gian từ Tuần 16 đến Tuần 20 ($p = 0,029$). Khí #3002 (mẫu số 14) đã bị chết vào Ngày 43. Khí #4003 (mẫu số 22) Tuần 16 thể hiện số lượng giết quá nhiều không thể đếm được và mẫu này được đặt ở $2.000 \text{ SFU}/10^6$ tế bào và cũng được sử dụng để phân tích thống kê.

Các nghiên cứu phi lâm sàng chứng minh rằng các vectơ Ad26 và MVA được tạo ra biểu hiện protein dung hợp CALRmut và JAK2 2x9-mer có thể làm tăng kích hoạt tế bào T *in vitro* và tạo ra đáp ứng miễn dịch tế bào ở chuột và NHP.

Ví dụ 10: Nghiên cứu cấu trúc MutCALR/MutJAK2, liều lượng và lên lịch trình

Mục đích chính của nghiên cứu là so sánh việc tiêm dưới da (SC) so với tiêm tĩnh mạch (IV) của kháng thể kháng CTLA4 kết hợp với vacxin Ad/Ad/MVA. Mục đích cũng là để đánh giá đa liều kháng thể kháng CTLA4 so với liều duy nhất kết hợp với vacxin Ad/Ad/MVA. Mục đích thứ hai là đánh giá xem sự kết hợp của kháng thể đơn dòng kháng CTLA-4, tức là YERVOY® (ipilimumab) ([Ipi]) với kháng thể kháng PD-1 (Nivolumab) có thể tăng cường hơn nữa đáp ứng của tế bào T đặc hiệu hay không.

Kháng thể kháng CLTA4 được tiêm dưới da cùng lúc với việc tiêm vacxin Ad26 được bản địa hóa cho mũi tiêm Ad26. Ngoài ra, kháng thể kháng CTLA4 được truyền qua đường tĩnh mạch ngay sau khi tiêm Ad26. Sử dụng tiêm dưới da đối với kháng thể kháng CTLA4 được so sánh với tiêm tĩnh mạch với liều 3 mg/kg mỗi động vật. Ở tuần thứ 2, 16 động vật phân tích được nhận thuốc kháng CTLA4 IV (3 mg/kg) và 31 động vật đã nhận được thuốc kháng CTLA4 (3 mg/kg) thông qua tiêm dưới da. Số lượng động vật đáp ứng tương tự 7/16 (44%) và 13/31 (42%) được quan sát thấy trong nhóm nhận thuốc kháng CTLA4 tiêm tĩnh mạch và tiêm dưới da tương ứng. Ngoài ra, mức độ trung bình của đáp ứng không khác biệt đáng kể khi được xác định bằng phân tích Tobit LRT, với hiệu chỉnh Bonferroni, $p < 0,05$ (HÌNH 16. Bảng 14).

BẢNG 14.

Nhóm	Mũi/Tăng cường	Tăng cường'	Tác nhân IO			
	Ngày 0 và Ngày 28	Ngày 84	Ngày 0	Ngày 28	Ngày 84	Ngày 29 bắt đầu 28 ngày một lần

1	Ad26 / Ad26	MVA	aCTLA4 3mpk iv	aCTLA4 3mpk iv	aCTLA4 3mpk iv	-
2	Ad26 / Ad26	MVA	aCTLA4 3mpk iv			-
3	Ad26 / Ad26	MVA	aCTLA4 3mpk sc	aCTLA4 3mpk sc	aCTLA4 3mpk sc	-
4	Ad26 / Ad26	MVA	aCTLA4 3mpk sc			-
5	Ad26 / Ad26	MVA	aCTLA4 3mpk sc	aCTLA4 3mpk sc	aCTLA4 3mpk sc	IV của aPD1 10mpk
6	Ad26 / Ad26	MVA	aCTLA4 3mpk sc			IV của aPD1 10mpk

IV, tiêm tĩnh mạch; sc, tiêm dưới da.

Việc đưa vào kháng thể kháng α PD-1 (Nivolumab 10 mg/kg IV) bắt đầu từ tuần thứ 4 đến Ad/Ad/MVA + ipilimumab giúp cải thiện mức độ đáp ứng của tế bào T đặc hiệu với mutCALR (HÌNH 17). Đáp ứng peptit mutCALR được tính toán dựa trên đáp ứng cụ thể của mutCALR - mức nền. Phân tích ELISpot sơ bộ ở Tuần 6 cũng chỉ ra rằng nhiều liều với kháng thể kháng α CTLA4 và phác đồ đợt sử dụng Ad/Ad/MVA tốt hơn so với một liều duy nhất (HÌNH 17).

Ví dụ 11: Tạo cấu trúc CALR_JAK2-2x9 của ARN tự sao chép

Polynucleotit LS_CALR.JAK2-2x9mer được nhân bản thành ARN tự sao chép.

Dòng TC-83 của trình tự hệ gen virus viêm não ngựa Venezuela (VEEV) được dùng làm trình tự cơ sở được sử dụng để tạo ra đơn vị sao chép theo sáng chế. Trình tự này đã được sửa đổi bằng cách đặt vòng lặp hạ lưu (DLP) từ virus Sindbis ở phía thượng lưu của protein không có cấu trúc 1 (nsP1) với cả hai được nối bởi thành phần bỏ qua ribosom 2A từ teschovirus-1 của lợn. 193 nucleotit đầu tiên của nsP1 đã được nhân đôi ở phía hạ lưu của 5' UTR và ở phía thượng lưu của DLP ngoại trừ mã bộ ba bắt đầu, đã bị đột biến thành TAG. Điều này đảm bảo rằng tất cả các cấu trúc quy định và thứ cấp cần thiết cho quá trình sao chép đều được duy trì nhưng ngăn cản dịch mã của trình tự nsp1 từng phần này. Các gen cấu trúc đã được loại bỏ và các vị trí giới hạn EcoR V và Asc I được đặt ở hạ lưu của vùng khởi động hệ gen con như là vị trí nhân bản nhiều lần (MCS) để tạo điều kiện cho việc chèn gen quan tâm bất kỳ (HÌNH 19). LS_CALR_JAK2-2x9mer đã được chèn vào vị trí nhân đôi. Gen chuyển được tổng hợp dưới dạng mảnh dsADN bởi IDT với 40 bp tương đồng với MCS ở các đầu 5' và 3'

của chúng và được nhân dòng vào vectơ ARN tự sao chép có nguồn gốc từ VEEV được tiêu hóa bằng EcoRV và AscI bằng cách sử dụng hỗn hợp tổng thể lắp ráp ADN NEB HiFi (cat # E2621S).

Trình tự polynucleotit của plasmid ARN tự sao chép đầy đủ được thể hiện trong SEQ ID NO: 33. Trình tự polynucleotit của vùng kết thúc T7 được thể hiện trong SEQ ID NO: 34. Trình tự polynucleotit của vùng khởi động AmpR được thể hiện trong SEQ ID NO: 35. Trình tự polynucleotit của vùng khởi động 26S nhỏ được thể hiện trong SEQ ID NO: 36. Trình tự polynucleotit của vùng khởi động T7 được thể hiện trong SEQ ID NO: 37. Trình tự polynucleotit của vị trí Poly A được thể hiện trong SEQ ID NO: 38. Trình tự polynucleotit của trình tự sao chép 5' alpha từ nsP1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 39. Trình tự polynucleotit của DLP SEQ được thể hiện trong SEQ ID NO: 40. Trình tự polynucleotit của P2A được thể hiện trong SEQ ID NO: 41. Trình tự polynucleotit của Bom được thể hiện trong SEQ ID NO: 42. Trình tự polynucleotit của DLP nsp ORF được thể hiện trong DÃY NHẬN DẠNG SEQ ID TRÌNH TỰ SỐ: 43. Trình tự polynucleotit của nsP2 được thể hiện trong SEQ ID NO: 44. Trình tự polynucleotit của nsP4 được thể hiện trong SEQ ID NO: 45. Trình tự polynucleotit của nsP3 được thể hiện trong SEQ ID NO: 46. Trình tự polynucleotit của nsP1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 47. Trình tự polynucleotit của KanR được thể hiện trong SEQ ID NO: 48. Trình tự polynucleotit của Rop được thể hiện trong SEQ ID NO: 49. Trình tự polynucleotit của 5' UTR được thể hiện trong SEQ ID NO: 50. Trình tự polynucleotit của 3' UTR được thể hiện trong SEQ ID NO: 51.

Ví dụ 12: Nền tảng ARN sao chép srARN.CALR/JAK2 gây ra đáp ứng tế bào ở chuột

Mục đích của những nghiên cứu này là để xác định xem phân tử ARN tự sao chép mã hóa CALR_JAK2-2x9mer có thể tạo ra các đáp ứng miễn dịch ở chuột Balb/c hay không. Chúng chuột Balb/c được chọn dựa trên dữ liệu được mô tả trong Ví dụ 7, trong đó chúng chuột Balb/c ít biến đổi hơn so với chúng chuột C57BL/6.

Trong nghiên cứu đầu tiên, ARN tự sao chép mã hóa LS_CALR_JAK2-2x9mer (srARN.CALR/JAK2)) đã được định liều là 3, 10 và 30 μ g. Ở tuần 0, chuột Balb/c đã được tạo miễn dịch bằng cách tiêm IM với srARN.CALR/JAK2 ở liều lượng chỉ định (3, 10 và 30 μ g) và nhóm đối chứng được tiêm nước muối. Ở tuần thứ 2, tất cả các con

chuột đều bị giết chết và tế bào đơn nhân lách được kích thích bằng peptit gồi lên nhau 15-mer (SEQ ID NO: 3) các nhóm bao gồm trình tự CALR trong vùng chèn, hoặc các 9-mer bao gồm hai trình tự JAK2 9-mer (SEQ ID NO: 7). Cảm ứng của các tế bào sản xuất IFN- γ được đo bằng IFN- γ ELISpot. Đáp ứng của tế bào T đa chức năng CD8 và CD4 được xác định bằng cách đo sự tạo ra IFN- γ , TNF α và IL-2 bằng phương pháp đo tế bào theo dòng chảy. Bảng 15 thể hiện các nhóm thí nghiệm khác nhau.

Bảng 15.

Nhóm	Số lượng chuột	Mô tả các nhóm
1	5	Dung dịch nước muối
2	5	srRNA.CALR/JAK2 3 μ g
3	5	srRNA.CALR/JAK2 10 μ g
4	5	srRNA.CALR/JAK2 30 μ g

Tất cả các con chuột được tạo miễn dịch bằng tế bào tạo ra IFN γ phát triển srARN.CALR/JAK2 khi được kích thích bằng các peptit bao gồm trình tự CALRmut (HÌNH 21A), ngược lại, không có cảm ứng tế bào tạo thành cytokin nào được phát hiện khi kích thích bằng hai peptit 9-mer JAK2 (SEQ ID NO: 5 và 6) (dữ liệu không được minh họa). Phân tích tế bào theo dòng chảy nội bào thể hiện đáp ứng kháng CALR được điều khiển bởi CD4 và đa chức năng ở tất cả các liều được thử nghiệm (HÌNH 21B).

Các phân tử ARN tự sao chép trong nghiên cứu đầu tiên đã được tiêm trần vào chuột. Đối với nghiên cứu thứ hai, chúng tôi bào chế phân tử ARN tự sao chép thành hạt nano lipid (LNP) và thực hiện nghiên cứu tương tự được nêu trong Bảng 16. Tương tự nghiên cứu đầu tiên, tất cả các con chuột được tạo miễn dịch bằng tế bào tạo ra IFN γ phát triển srARN.CALR/JAK2 khi được kích thích bằng các peptit bao gồm trình tự CALRmut (HÌNH 22A), ngược lại, không có cảm ứng tế bào tạo thành cytokin nào được phát hiện khi kích thích bằng hai peptit 9-mer JAK2 (SEQ ID NO: 5 và 6) (dữ liệu không được minh họa). Phân tích tế bào theo dòng chảy nội bào thể hiện đáp ứng kháng CALR được điều khiển bởi CD4 và đa chức năng ở tất cả các liều được thử nghiệm ở cả phiên bản không được bào chế công thức và được bào chế thành LNP (HÌNH 22B).

Bảng 16.

Nhóm	Số lượng chuột	Mô tả các nhóm
1	5	Dung dịch nước muối
2	5	srRNA.CALR/JAK2 0,2 μ g được bào chế thành LNP

3	5	srRNA.CALR/JAK2 2 µg được bào chế thành LNP
4	5	srRNA.CALR/JAK2 20 µg được bào chế thành LNP
5	5	srRNA.CALR/JAK2 20 µg không được bào chế

Trong nghiên cứu thứ ba, chúng tôi đã thử nghiệm srARN.CALR/JAK2 kết hợp với hai nền tảng vaccin khác, Ad26 và MVA để xác định xem liệu các phác đồ tăng cường/môi dị hợp có làm tăng chức năng tế bào T kháng CALR hay không. Tất cả các nền tảng được mã hóa cấu trúc CALR_JAK2-2x9mer. Vào tuần 0, chuột Balb/c được tiêm nước muối sinh lý Ad26HEME002 (1010 PFU) hoặc srARN/CALR.JAK2 (20 µg). Vào tuần thứ 4, các con chuột được tiêm Ad26HEME002, MVA-HCalJ-9.9 (107 PFU) hoặc srARN.CALR/JAK2 và các lá lách được phân tích sau tiêm tăng cường một tuần sau (xem thiết kế thí nghiệm bên dưới, Bảng 17). Một nhóm đối chứng đã được thêm vào để kết nối với dữ liệu lịch sử bằng cách sử dụng Ad26/MVA với khoảng thời gian môi/tăng cường 3 tuần và phân tích lách cách sau 2 tuần sau khi tiêm tăng cường. Các lá lách được phân tích bởi ELISpot và ICS như được mô tả ở trên bằng cách sử dụng các peptit CALR chồng gối lên nhau

Bảng 17.

Nhóm	Số lượng chuột	Mô tả các nhóm
1	5	Dung dịch nước muối
2	8	Chỉ môi srARN
3	8	Chỉ môi Ad26
4	8	srARN/srARN
5	8	Ad26/Ad26
6	8	srARN/Ad26
7	8	Ad26/srARN
8	8	srARN/MVA
9	8	Ad26/MVA
10	6	Ad26/MVA khoảng thời gian 3 tuần

Việc bổ sung liều tăng cường Ad26 hoặc MVA vào môi ARN tự sao chép dẫn đến mức tăng có ý nghĩa thống kê theo IFN γ ELISpot ($p < 0,001$, tăng 5,1 và 6,5 lần tương ứng). Việc bổ sung ARN tự sao chép làm tác nhân tăng cường sau môi Ad26 dẫn đến tăng 1,7 lần so với môi Ad26 đơn lẻ (không có ý nghĩa thống kê) (HÌNH 23A). Nhuộm cytokin nội bào thể hiện rằng sau môi ARN tự sao chép, việc bổ sung Ad26 và/hoặc MVA như là liều tăng cường dẫn đến sự gia tăng có ý nghĩa thống kê trong các

tế bào T đa chức năng $IFN\gamma + TNF\alpha + IL-2 + CD4$ ($p < 0,001$, 4,9 và 3,6 lần tăng tương ứng). Tăng cường với ARN tự sao chép sau mỗi Ad26 dẫn đến tăng gấp 2 lần số tế bào T dương tính với cytokin gấp ba lần đa chức năng so với chỉ mình mỗi Ad26 (không có ý nghĩa thống kê) (HÌNH 23B).

Ví dụ 13. Khả năng sinh miễn dịch của srARN.CALR/JAK2 và MVA-HCalJ-9.9 ở linh trưởng không phải người (NHP)

Mục đích chính của nghiên cứu này là để xác định xem liệu việc tiêm chủng srARN.CALR/JAK2 và MVA-HCalJ-9.9 có gây ra các đáp ứng của tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên cao hơn về mức độ và thời gian so với tiêm chủng srARN.CALR/JAK2 đơn lẻ trong NHP hay không. Mục đích thứ hai là đánh giá xem liệu kháng thể đơn dòng kháng CTLA-4, tức là YERVOY® (ipilimumab) ([Ipi]) kết hợp với srARN.CALR/JAK2 và MVA-HCalJ-9.9 có thể tăng cường đáp ứng miễn dịch do vaccin gây ra hay không. Ngoài ra, mục tiêu khám phá là đánh giá xem liệu kháng thể đơn dòng kháng PD-1 OPDIVO® (nivolumab) kết hợp với phác đồ vaccin và kháng thể kháng CTLA-4 có thể so sánh hoặc làm tăng đáp ứng của tế bào T đặc hiệu vùng chèn so với khi được tiêm liều không kháng PD-1. Khi đuôi dài được tạo miễn dịch IM bằng srARN.CALR/JAK2, và/hoặc MVA-HCalJ-9.9 đơn lẻ hoặc kết hợp với Ipi (3 mg/kg tiêm dưới da [SC]) hoặc kết hợp với Nivolumab (10 mg/kg tiêm tĩnh mạch [IV] theo đề lịch trình được thể hiện trong Bảng 18. Tóm lại, NHP sẽ được tạo miễn dịch bằng srARN.CALR/JAK2 và MVA-HCalJ-9.9 kết hợp với Ipi 3 mg/kg SC (Nhóm 2) hoặc kết hợp với Ipi 3 mg/kg SC và Nivolumab IV 10 mg/kg IV (Nhóm 4). Lấy máu khi ở nhiều thời điểm khác nhau và PBMC và huyết thanh được phân lập để làm các xét nghiệm miễn dịch học. Việc cảm ứng các đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với kháng nguyên CALR được đánh giá trong PBMC tại các thời điểm khác nhau trong quá trình nghiên cứu bởi $IFN\gamma$ ELISpot bằng cách sử dụng nhóm peptit bao gồm các peptit chồng gối lên nhau 15mer tương ứng với toàn bộ trình tự chèn CALR.

Vaccin srARN.CALR/JAK2 được kỳ vọng sẽ tạo ra đáp ứng của tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên có thể gia tăng hơn nữa khi được sử dụng theo phác đồ kết hợp với MVA-HCalJ-9.9. Sử dụng kháng thể đơn dòng ngăn chặn điểm kiểm tra miễn dịch, kháng thể kháng CTLA-4 và/hoặc kháng thể kháng PD-1 kết hợp với

srARN.CALR/JAK2 và MVA-HCalJ-9.9 sẽ dẫn đến cường độ, chất lượng và nhiều đáp ứng của tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên mong muốn cao hơn.

Bảng 18.

Nhóm	Ngày 0/28	Ngày 70	Kháng thể kháng CTLA-4 mAb	Kháng thể kháng PD-1 mAb
1	srARN/srARN	MVA	-	-
2	srARN/srARN	MVA	0, 28, 70	-
3	srARN/srARN	MVA	0, 28, 70	29, 57, 84, 113

Ví dụ 14. Tính sinh miễn dịch của GAd.CALR.JAK2 và sự trình diện liên tục của srARN.CALR/JAK2 ở động vật linh trưởng không phải người (NHP)

Mục đích chính của nghiên cứu này là xác nhận rằng tiêm chủng GAd20.CALR.JAK2 gây ra các đáp ứng của tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên kết hợp với kháng thể kháng CTL-4 và MVA hoặc srARN. Nghiên cứu cũng được thiết kế để xác định xem liệu việc tiêm chủng srARN.CALR/JAK2 có làm tăng tế bào T khi kết hợp với GAd20 hoặc GAD20/MVA hay không và liệu srARN có thể được sử dụng thay thế cho MVA hay không. Mục tiêu của nghiên cứu này cũng là để đánh giá xem liệu GAD20/MVA/srARN kết hợp với kháng thể kháng CTLA4 có thể gây ra đáp ứng của tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên lớn hơn GAD20/MVA/srARN đơn lẻ hay không. Việc bổ sung vectơ srARN.CALR/JAK2 vào vacxin GAd20/MVA dưới dạng kết hợp bộ ba được mong đợi là sẽ thúc đẩy các đáp ứng của tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên lớn hơn và bền hơn ở bệnh nhân ung thư.

Mục đích thứ hai của nghiên cứu này là đánh giá khả năng phác đồ đa liều srARN.CALR.JAK2 để loại bỏ nhu cầu kháng thể kháng CTL-4, hoàn toàn hoặc sau khi dùng MVA. Ngoài ra, nghiên cứu được xây dựng để xác định xem srARN có thể được sử dụng nhiều lần (hàng tháng) để liên tục tăng hoặc duy trì các đáp ứng của tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên hay không. Mức độ cao nhất và bền nhất của các tế bào T hướng đích kháng mutCALR/mutJAK2 được tạo ra sẽ đòi hỏi quá trình trình diện liên tục của kháng nguyên đột biến bởi vectơ không nhạy cảm với trung hòa qua trung gian Ab, dẫn đến thanh thải dòng ác tính và mang lại lợi ích lâm sàng cho bệnh nhân MPN. Một ưu điểm tiềm năng của vacxin dựa trên ARN tự sao chép là thiếu khả năng miễn dịch đặc hiệu với vectơ được phát triển. Sự vắng mặt của đáp ứng miễn dịch đặc hiệu

với vectơ có thể cho phép sử dụng lặp lại ARN tự sao chép mà không làm giảm sự trình diện kháng nguyên do vacxin dựa trên ARN tự sao chép không có khả năng tạo ra các kháng thể trung hòa đặc hiệu với vectơ. Các phác đồ đa liều được thử nghiệm để đánh giá xem srARN.CALR/JAK2 có thể duy trì đáp ứng của tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên hay không bằng cách sử dụng theo lịch tiêm bắp hàng tháng.

Đối với nghiên cứu này, khi đuôi dài được tạo miễn dịch theo lịch trình được trình bày trong Bảng 19. Lấy máu khi ở nhiều thời điểm khác nhau và PBMC và huyết thanh được phân lập để làm các xét nghiệm miễn dịch học. Việc cảm ứng các đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với kháng nguyên CALR được đánh giá trong PBMC tại các thời điểm khác nhau trong quá trình nghiên cứu bởi IFN γ ELISpot bằng cách sử dụng nhóm peptit bao gồm các peptit chồng gối lên nhau 15mer tương ứng với toàn bộ trình tự chèn CALR.

Sử dụng srARN.CALR/JAK2 sau khi tạo miễn dịch bằng GAd20/MVA sẽ cho phép tiếp tục tăng cường tạo ra phản ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên độc lập hoặc kết hợp với sử dụng CPI. Các phác đồ dựa trên ARN tự sao chép đa liều srARN.CALR/JAK2 được kỳ vọng sẽ tạo ra đáp ứng của tế bào T có mức độ cao hơn với thời gian dài hơn.

Bảng 19.

Nhóm	Mô tả các nhóm
1	GAd20/MVA/srARN
2	GAd20/MVA/srRNA/srARN
3	GAd20/srARN/srARN/srARN
4	GAD20/GAD20/MVA + kháng thể kháng CTLA4 3 mg/kg IV
5	GAD20/GAD20/MVA/srARN/srARN/srARN + kháng thể kháng CTLA4 3 mg/kg IV
6	GAD20/GAD20/srARN/srARN/srARN/srARN + kháng thể kháng CTLA4 3 mg/kg IV
4	GAD20/GAD20/srARN/srARN/srARN/srARN

CÁC PHƯƠNG ÁN

Danh sách các phương án sau đây nhằm bổ sung, chứ không phải thay thế hoặc loại bỏ các mô tả trước.

Phương án 1. Polypeptit bao gồm ít nhất hai hoặc nhiều trình tự quyết định kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm:

MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCR
EACLQGWTE (SEQ ID NO: 1) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ
ID NO: 1;

EAAEDNCRRMMRTK (SEQ ID NO: 2) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng
trình tự với SEQ ID NO: 2;

KLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG (SEQ ID NO: 4) hoặc có ít
nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 4;

VLNYGVCFC (SEQ ID NO: 5) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với
SEQ ID NO: 5;

FCGDENILV (SEQ ID NO: 6) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với
SEQ ID NO: 6; và sự kết hợp của chúng.

Phương án 2. Polypeptit theo phương án 1, trong đó polypeptit này bao gồm trình
tự quyết định kháng nguyên:

MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCR
EACLQGWTE (SEQ ID NO: 1) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ
ID NO: 1;

EAAEDNCRRMMRTK (SEQ ID NO: 2) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng
trình tự với SEQ ID NO: 2;

VLNYGVCFC (SEQ ID NO: 5) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với
SEQ ID NO: 5; và

FCGDENILV (SEQ ID NO: 6) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với
SEQ ID NO: 6.

Phương án 3. Polypeptit theo phương án 1, trong đó polypeptit này bao gồm trình
tự quyết định kháng nguyên:

MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCR
EACLQGWTE (SEQ ID NO: 1) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ
ID NO: 1;

EAAEDNCRRMMRTK (SEQ ID NO: 2) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng
trình tự với SEQ ID NO: 2; và

KLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG (SEQ ID NO: 4) hoặc có ít
nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 4.

Phương án 4. Polypeptit theo phương án 1, trong đó polypeptit này bao gồm trình tự quyết định kháng nguyên:

MKDKQDEEQRTTRMMRTKMRMRMRTRRKMRKMSPARPRTSCR
EACLQGWTE (SEQ ID NO: 1) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 1; và

EAAEDNCRMMRTK (SEQ ID NO: 2) hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 2.

Phương án 5. Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 4, còn bao gồm trình tự dẫn hướng ở đầu N được chọn từ nhóm bao gồm:

MACPGFLWALVISTCLEFSMA (SEQ ID NO: 8);

MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLE
DGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGV (SEQ ID NO: 54); và

MGQKEQIHTLQKNSERMSKQLTRSSQAV (SEQ ID NO: 29).

Phương án 6. Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 5, trong đó trình tự quyết định kháng nguyên được nối với nhau bằng trình tự cầu nối.

Phương án 7. Polypeptit theo phương án 6, trong đó trình tự cầu nối được chọn từ nhóm bao gồm AAY, RR, DPP, HHAA (SEQ ID NO: 56), HHA, HHL, RKSYL (SEQ ID NO: 57), RKSYS (SEQ ID NO: 58), SSL, hoặc REKR (SEQ ID NO: 59).

Phương án 8. Polypeptit theo phương án 6, trong đó trình tự cầu nối bao gồm vị trí phân cắt proteaza.

Phương án 9. Polypeptit theo phương án 1, trong đó polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm:

trình tự axit amin có SEQ ID NO: 3 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 3;

trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 7;

trình tự axit amin có SEQ ID NO: 9 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 9;

trình tự axit amin có SEQ ID NO: 10 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 10;

trình tự axit amin có SEQ ID NO: 11 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 11;

trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 12;

trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 13;

trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 14;

trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 15; và

trình tự axit amin có SEQ ID NO: 31 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 31.

Phương án 10. Polynucleotit mã hóa polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 9.

Phương án 11. Polynucleotit theo phương án 10, trong đó polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm:

trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 16 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 16;

trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 17 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 17;

trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 18 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 18;

trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 19 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 19;

trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 20 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 20;

trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 21 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 21;

trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 22 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 22;

trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 26 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 26; và

trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 27 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 27.

Phương án 12. Vectơ bao gồm polynucleotit theo phương án bất kỳ trong số các phương án 10 hoặc 11.

Phương án 13. Vectơ theo phương án 12, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ adenovirut, vectơ alphavirut, vectơ poxvirut, vectơ virut liên kết với adeno, vectơ retrovirut, phân tử ARN tự sao chép và sự kết hợp của chúng.

Phương án 14. Vectơ theo phương án 13, trong đó vectơ adenovirut được chọn từ nhóm bao gồm hAd5, hAd7, hAd11, hAd26, hAd34, hAd35, hAd48, hAd49, hAd50, GAd20, Gad19, GAd21, GAd25, GAd26, GAd27, GAd28, GAd29, GAd30, GAd31, ChAd3, ChAd4, ChAd5, ChAd6, ChAd7, ChAd8, ChAd9, ChAd10, ChAd11, ChAd16, ChAdI7, ChAd19, ChAd20, ChAd22, ChAd24, ChAd26, ChAd30, ChAd31, ChAd37, ChAd38, ChAd44, ChAd55, ChAd63, ChAd73, ChAd82, ChAd83, ChAd146, ChAd147, PanAd1, PanAd2, và PanAd3.

Phương án 15. Vectơ theo phương án 13, trong đó vectơ poxvirut được chọn từ nhóm bao gồm vectơ virut đậu mùa nặng, vectơ virut vaccinia, vectơ virut đậu mùa ở gia súc, vectơ virut đậu mùa khí, vectơ virut Copenhagen vaccinia (W), vectơ virut vaccinia giảm độc lực New York (NYVAC) và vectơ Vaccinia Ankara biến đổi (MVA).

Phương án 16. Vectơ theo phương án 12, trong đó vectơ là vectơ adenovirut bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit bất kỳ theo các phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 9.

Phương án 17. Vectơ theo phương án 12, trong đó vectơ là phân tử ARN tự sao chép bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit bất kỳ theo các phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 9.

Phương án 18. Vectơ của phương án 12, trong đó vectơ là Ad26 bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit có SEQ ID NO: 10 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 10.

Phương án 19. Vectơ theo phương án 12, trong đó vectơ là vectơ MVA bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit có SEQ ID NO: 31 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 31.

Phương án 20. Vectơ của phương án 12, trong đó vectơ là GAd20 bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit có SEQ ID NO: 31 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 31.

Phương án 21. Vectơ theo phương án 12, trong đó vectơ là phân tử ARN tự sao chép bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit có SEQ ID NO: 12 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 12.

Phương án 22. Dược phẩm bao gồm polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 9.

Phương án 23. Dược phẩm bao gồm polynucleotit bất kỳ theo phương án bất kỳ trong số các phương án 10 và 11.

Phương án 24. Dược phẩm bao gồm vectơ theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 12 đến 21.

Phương án 25. Dược phẩm theo phương án 24, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20, phân tử ARN tự sao chép và sự kết hợp của chúng.

Phương án 26. Phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng được đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR ở đối tượng bao gồm việc sử dụng cho đối tượng cần điều trị dược phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 22 đến 25.

Phương án 27. Phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng mang đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR bao gồm việc sử dụng cho đối tượng cần điều trị dược phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 22 đến 25.

Phương án 28. Phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh tăng sinh tủy ở đối tượng bao gồm việc sử dụng cho đối tượng cần điều trị dược phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 22 đến 25.

Phương án 29. Phương pháp điều trị bệnh ung thư ở đối tượng bao gồm việc sử dụng cho đối tượng cần điều trị dược phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 22 đến 25.

Phương án 30. Phương pháp điều trị bệnh tim mạch ở đối tượng bao gồm việc sử dụng cho đối tượng cần điều trị dược phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 22 đến 25.

Phương án 31. Phương pháp điều trị, phòng ngừa, làm giảm nguy cơ khởi phát hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lâm sàng được đặc trưng bởi sự biểu hiện của đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR ở đối tượng bao gồm việc sử dụng cho

đối tượng cần điều trị được phẩm bao gồm vectơ có chứa polynucleotit mã hóa ít nhất hai hoặc nhiều trình tự quyết định kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm:

- quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 1;
- quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 2;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 4 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 4;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 5;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 6; và sự kết hợp của chúng, và trong đó, việc sử dụng bao gồm một hoặc nhiều đợt sử dụng chế phẩm.

Phương án 32. Phương pháp tạo ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng mang đột biến exon 9 JAK2V617F và/hoặc CALR bao gồm việc sử dụng cho đối tượng cần điều trị được phẩm bao gồm vectơ có chứa polynucleotit mã hóa ít nhất hai hoặc nhiều trình tự quyết định kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm:

- quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 1;
- quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 2;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 4 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 4;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 5;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 6; và sự kết hợp của chúng, và trong đó, việc sử dụng bao gồm một hoặc nhiều đợt sử dụng chế phẩm.

Phương án 33. Phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh tăng sinh tủy ở đối tượng bao gồm việc sử dụng cho đối tượng cần điều trị được phẩm bao gồm vectơ

có chứa polynucleotit mã hóa ít nhất hai hoặc nhiều trình tự quyết định kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm:

- quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 1;
- quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 2;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 4 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 4;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 5;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 6; và sự kết hợp của chúng, và trong đó, việc sử dụng bao gồm một hoặc nhiều đợt sử dụng chế phẩm.

Phương án 34. Phương pháp theo phương án 33, trong đó bệnh tăng sinh tủy được chọn từ nhóm bao gồm bệnh xơ hóa tủy nguyên phát (MPN), bệnh đa hồng cầu (PV), bệnh tăng tiểu cầu tiền phát (ET), bệnh xơ tủy nguyên phát (PFM), bệnh xơ hóa tủy thứ phát, bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (AML), bệnh AML thứ phát, bệnh bạch cầu tủy mạn tính (CML), tạo huyết vô tính có tiềm năng không xác định (CHIP) và bệnh bạch cầu nguyên bào tủy mạn tính (CMML).

Phương án 35. Phương pháp điều trị bệnh ung thư ở đối tượng bao gồm việc sử dụng cho đối tượng cần điều trị được phẩm bao gồm vectơ có chứa polynucleotit mã hóa ít nhất hai hoặc nhiều trình tự quyết định kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm:

- quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 1;
- quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 2;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 4 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 4;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 5;

- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 6; và sự kết hợp của chúng, và trong đó, việc sử dụng bao gồm một hoặc nhiều đợt sử dụng chế phẩm.

Phương án 36. Phương pháp theo phương án 35, trong đó bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm ung thư phổi, ung thư hệ bạch huyết, bệnh bạch cầu bạch huyết cấp tính, bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính, bệnh u lympho Burkitt, bệnh u lympho Hodgkin, bệnh u tủy tế bào plasma, ung thư đường mật, ung thư bàng quang, ung thư gan, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư da, ung thư tuyến giáp, ung thư dạ dày, ung thư ruột già, ung thư ruột kết, ung thư đường tiết niệu, ung thư hệ thần kinh trung ương, u nguyên bào thần kinh, ung thư thận, ung thư vú, ung thư cổ tử cung, ung thư tinh hoàn và ung thư mô mềm.

Phương án 37. Phương pháp điều trị bệnh tim mạch ở đối tượng bao gồm việc sử dụng cho đối tượng cần điều trị dược phẩm bao gồm vectơ có chứa polynucleotit mã hóa ít nhất hai hoặc nhiều trình tự quyết định kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm:

- quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 1;
- quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 2;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 4 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 4;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 5;
- quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6 hoặc có ít nhất 90% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 6; và sự kết hợp của chúng, và trong đó, việc sử dụng bao gồm một hoặc nhiều đợt sử dụng chế phẩm.

Phương án 38. Phương pháp theo phương án 37, trong đó bệnh tim mạch được chọn từ nhóm bao gồm hội chứng mạch vành cấp tính, bệnh mạch máu não thiếu máu cục bộ, bệnh tim thiếu máu cục bộ, huyết khối, huyết khối tĩnh mạch, huyết khối tĩnh mạch sâu, tắc mạch phổi, huyết khối trong ổ bụng dị thường, bệnh động mạch ngoại

vi, tăng huyết áp, suy tim, rung tâm nhĩ, bệnh tim mạch vành, xơ vữa động mạch và rối loạn tạo máu vô tính.

Phương án 39. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 38, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ adenovirut, vectơ alphavirut, vectơ poxvirut, vectơ virut liên kết với adeno, vectơ retrovirut, phân tử ARN tự sao chép và sự kết hợp của chúng.

Phương án 40. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 39, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20, phân tử ARN tự sao chép và sự kết hợp của chúng.

Phương án 41. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 39, trong đó vectơ là vectơ Ad26 bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit có chứa trình tự quyết định kháng nguyên của quyết định kháng nguyên calreticulin (CALR) có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6.

Phương án 42. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 39, trong đó vectơ là vectơ GAd20 bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit có chứa trình tự quyết định kháng nguyên của quyết định kháng nguyên calreticulin (CALR) có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6.

Phương án 43. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 39, trong đó vectơ là vectơ MVA bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit có chứa trình tự quyết định kháng nguyên của quyết định kháng nguyên calreticulin (CALR) có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6.

Phương án 44. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 39, trong đó vectơ là phân tử ARN tự sao chép bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit có chứa trình tự quyết định kháng nguyên của quyết định kháng nguyên calreticulin (CALR) có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID

NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên Janus kinaza 2 (JAK2) có SEQ ID NO: 6.

Phương án 45. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 44, bao gồm một hoặc nhiều chu kỳ điều trị, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép; và

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép.

Phương án 46. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 44, bao gồm một hoặc nhiều chu kỳ điều trị, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép; và

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép; và

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID

NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép.

Phương án 47. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 44, bao gồm một hoặc nhiều chu kỳ điều trị, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ GAd20;

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là phân tử ARN tự sao chép; và

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ MVA.

Phương án 48. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 44, bao gồm một hoặc nhiều chu kỳ điều trị, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ GAd20;

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ GAd20; và

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ MVA.

Phương án 49. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 44, bao gồm một hoặc nhiều chu kỳ điều trị, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ GAd20;

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ GAd20;

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ MVA; và

đợt sử dụng thứ tư bao gồm chế phẩm thứ tư có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là phân tử ARN tự sao chép.

Phương án 50. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 44, bao gồm một hoặc nhiều chu kỳ điều trị, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID

NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là vector GAd20;

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là vector MVA;

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là phân tử ARN tự sao chép; và

đợt sử dụng thứ tư bao gồm chế phẩm thứ tư có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là phân tử ARN tự sao chép.

Phương án 51. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 44, bao gồm một hoặc nhiều chu kỳ điều trị, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là vector GAd20;

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là phân tử ARN tự sao chép;

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là phân tử ARN tự sao chép; và

đợt sử dụng thứ tư bao gồm chế phẩm thứ tư có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là phân tử ARN tự sao chép.

Phương án 52. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 44, bao gồm một hoặc nhiều chu kỳ điều trị, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ GAd20; và

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ GAd20;

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là phân tử ARN tự sao chép;

đợt sử dụng thứ tư bao gồm chế phẩm thứ tư có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là phân tử ARN tự sao chép;

đợt sử dụng thứ năm bao gồm chế phẩm thứ năm có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là phân tử ARN tự sao chép; và

đợt sử dụng thứ sáu bao gồm chế phẩm thứ sáu có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định

kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là phân tử ARN tự sao chép.

Phương án 53. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 52, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc sử dụng tác nhân điều trị thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể CTLA-4, kháng thể PD-1, kháng thể PD-L1, chất chủ vận TLR, chất chủ vận CD40, chất chủ vận OX40, hydroxyure, ruxolitinib, fedratinib, chất chủ vận 41BB, chất chủ vận CD28, phối tử FLT3, nhôm sulfat, chất ức chế BTK, chất ức chế JAK, kháng thể CD38, chất ức chế CDK, kháng thể CD33, kháng thể CD37, kháng thể CD25, chất ức chế GM-CSF, IL-2, IL-15, IL-7, IFN γ , IFN α , TNF α , kháng thể VEGF, kháng thể CD70, kháng thể CD27, kháng thể BCMA, kháng thể GPRC5D và sự kết hợp của chúng.

Phương án 54. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 44, bao gồm một hoặc nhiều chu kỳ điều trị, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là vector GAd20;

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là vector GAd20; và

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là vector MVA; và

trong đó, chu kỳ điều trị còn bao gồm việc sử dụng chất ức chế điểm kiểm tra được chọn từ kháng thể kháng CTLA-4, kháng thể PD-1 và kháng thể PD-L1, kết hợp với chế phẩm thứ nhất, thứ hai và/hoặc thứ ba.

Phương án 55. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 44, bao gồm một hoặc nhiều chu kỳ điều trị, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là vector GAd20;

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là vector GAd20;

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là vector MVA;

đợt sử dụng thứ tư bao gồm chế phẩm thứ tư có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là phân tử ARN tự sao chép;

đợt sử dụng thứ năm bao gồm chế phẩm thứ năm có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là phân tử ARN tự sao chép; và

đợt sử dụng thứ sáu bao gồm chế phẩm thứ sáu có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là phân tử ARN tự sao chép; và

trong đó chu kỳ điều trị còn bao gồm việc sử dụng chất ức chế điểm kiểm tra được chọn từ kháng thể kháng CTLA-4, kháng thể PD-1 và kháng thể PD-L1, kết hợp với chế phẩm thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm và/hoặc thứ sáu.

Phương án 56. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 44, bao gồm một hoặc nhiều chu kỳ điều trị, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là vector GAd20; và

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là vector GAd20;

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là một phép tự sao chép;

đợt sử dụng thứ tư bao gồm chế phẩm thứ tư có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là phân tử ARN tự sao chép;

đợt sử dụng thứ năm bao gồm chế phẩm thứ năm có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là phân tử ARN tự sao chép; và

đợt sử dụng thứ sáu bao gồm chế phẩm thứ sáu có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID

NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là phân tử ARN tự sao chép; và

trong đó chu kỳ điều trị còn bao gồm việc sử dụng chất ức chế điểm kiểm tra được chọn từ kháng thể kháng CTLA-4, kháng thể PD-1 và kháng thể PD-L1, kết hợp với chế phẩm thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm và/hoặc thứ sáu.

Phương án 57. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 44, bao gồm một hoặc nhiều chu kỳ điều trị, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là vector GAd20;

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là vector GAd20;

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là vector MVA;

đợt sử dụng thứ tư bao gồm chế phẩm thứ tư có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là phân tử ARN tự sao chép;

đợt sử dụng thứ năm bao gồm chế phẩm thứ năm có chứa vector bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vector là phân tử ARN tự sao chép; và

đợt sử dụng thứ sáu bao gồm chế phẩm thứ sáu có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là phân tử ARN tự sao chép; và

trong đó chu kỳ điều trị còn bao gồm việc sử dụng chất ức chế điểm kiểm tra được chọn từ kháng thể kháng CTLA-4, kháng thể PD-1 và kháng thể PD-L1, kết hợp với chế phẩm thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm và/hoặc thứ sáu.

Phương án 58. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 44, bao gồm một hoặc nhiều chu kỳ điều trị, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ GAd20; và

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ GAd20;

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là vectơ tự sao chép;

đợt sử dụng thứ tư bao gồm chế phẩm thứ tư có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là phân tử ARN tự sao chép;

đợt sử dụng thứ năm bao gồm chế phẩm thứ năm có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID

NO: 5, và quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là phân tử ARN tự sao chép; và

đợt sử dụng thứ sáu bao gồm chế phẩm thứ sáu có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 1, quyết định kháng nguyên CALR có SEQ ID NO: 2, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 5, quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ là phân tử ARN tự sao chép; và

trong đó chu kỳ điều trị còn bao gồm việc sử dụng chất ức chế điểm kiểm tra được chọn từ kháng thể kháng CTLA-4, kháng thể PD-1 và kháng thể PD-L1, kết hợp với chế phẩm thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm và/hoặc thứ sáu.

Phương án 58. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 44, bao gồm một hoặc nhiều chu kỳ điều trị, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa hoặc nhiều đoạn lặp nối tiếp của quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép;

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa hoặc nhiều đoạn lặp nối tiếp của quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép.

Phương án 59. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 44, bao gồm một hoặc nhiều chu kỳ điều trị, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm:

đợt sử dụng thứ nhất bao gồm chế phẩm thứ nhất có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa hoặc nhiều đoạn lặp nối tiếp của quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép;

đợt sử dụng thứ hai bao gồm chế phẩm thứ hai có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa hoặc nhiều đoạn lặp nối tiếp của quyết định kháng nguyên JAK2 có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép;

đợt sử dụng thứ ba bao gồm chế phẩm thứ ba có chứa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa hoặc nhiều đoạn lặp nối tiếp của quyết định kháng nguyên JAK2

có SEQ ID NO: 6, trong đó vectơ được chọn từ nhóm bao gồm vectơ Ad26, vectơ MVA, vectơ GAd20 hoặc phân tử ARN tự sao chép; và

trong đó, chu kỳ điều trị còn bao gồm việc sử dụng chất ức chế điểm kiểm tra được chọn từ kháng thể kháng CTLA-4, kháng thể PD-1 và kháng thể PD-L1, kết hợp với chế phẩm thứ nhất, thứ hai và/hoặc thứ ba.

DANH SÁCH TRÌNH TỰ

DÃY NHẬN DẠNG TRÌNH TỰ SỐ:	Quyết định kháng nguyên ID	Trình tự
1	Quyết định kháng nguyên CALR I	MKDKQDEEQRTTRMMRTKMRMRRMRRTTRRKMR RKMSPARPRTSCREACLQGWTE
2	Quyết định kháng nguyên CALR II	EAAEDNCRRMMRTK
3	Quyết định kháng nguyên I-AAY-CALR quyết định kháng nguyên CALR II	MKDKQDEEQRTTRMMRTKMRMRRMRRTTRRKMR RKMSPARPRTSCREACLQGWTEAAAYEEAEDNCRR MMRTK
4	Quyết định kháng nguyên JAK2 30mer	KLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG
5	Quyết định kháng nguyên JAK2 1	VLNYGVCFC
6	Quyết định kháng nguyên JAK2 2	FCGDENILV
7	2X9mer JAK2	VLNYGVCFCAAAYFCGDENILV
8	trình tự dẫn hướng HAVt20 (LS)	MACPGFLWALVISTCLEFSMA
9	LS_CALR (HEME003)	MACPGFLWALVISTCLEFSMAMKDKQDEEQRTTR MMRTKMRMRRMRRTTRRKMRMRRMRRMRRMRR RKMSPARPRTSCREACLQGWTEAAAYEEAEDNCRRMMRTK
10	LS_CALR_JAK2 -2x9mer (HEME002)	MACPGFLWALVISTCLEFSMAMKDKQDEEQRTTR MMRTKMRMRRMRRTTRRKMRMRRMRRMRRMRR RKMSPARPRTSCREACLQGWTEAAAYEEAEDNCRRMMRTKAAAYVLNYG VCFCAAAYFCGDENILV

11	LS_CALR_JAK2-30mer (HEME001)	MACPGFLWALVISTCLEFSMAMKDKQDEEQRTRR MMRTKMRMRRMRRTRRRKMRRKMSPARPRTSCRE ACLQGWTEAAYEEAEDNCRMMRTKAAAYKLSHK HLVLNYGVCF CGDENILVQEFVKFG
12	CALR_JAK2-2x9mer	MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRRKMR RKMSPARPRTSCREACLQGWTEAAYEEAEDNCR MMRTKAAAYVLNYGVCFCAAYFCGDENILV
13	CALR_JAK2-30mer	MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRRKMR RKMSPARPRTSCREACLQGWTEAAYEEAEDNCR MMRTKAAAYKLSHKHLVLNYGVCF CGDENILVQEF VKFG
14	Ubiq_CALR_JAK2-2x9mer	MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIP PDQQLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRL RGVRKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRR KMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAAYEEAEDN CRRMMRTKAAAYVLNYGVCFCAAYFCGDENILV
15	Ubiq_CALR_JAK2-30mer	MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIP PDQQLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRL RGVRKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRR KMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAAYEEAEDN CRRMMRTKAAAYKLSHKHLVLNYGVCF CGDENILV QEFVKFG
16	LS_CALR	ATGGCATGCCAGGCTTCCTGTGGGCCCTGGTCA TCAGCACCTGTCTGGAGTTTTCCATGGCCATGAA GGACAAGCAGGATGAGGAGCAGCGGACCCGGA GAATGATGAGGACAAAGATGCGCATGAGGCGCA TGCGGAGAACAAGGCGCAAGATGCGGAGAAAG ATGTCTCCAGCAAGGCCTAGAACCAGCTGCAGG GAGGCATGTCTGCAGGGATGGACAGAGGCAGCA TACGAGGAGGCAGAGGACA ACTGCAGGCGCATG ATGAGGACCAAG
17	LS_CALR_JAK2-2x9mer	ATGGCATGCCAGGCTTCCTGTGGGCCCTGGTCA TCAGCACCTGTCTGGAGTTTTCCATGGCCATGAA GGACAAGCAGGATGAGGAGCAGCGGACCCGGA GAATGATGAGGACAAAGATGCGCATGAGGCGCA TGCGGAGAACAAGGCGCAAGATGCGGAGAAAG ATGTCTCCAGCAAGGCCTAGAACCAGCTGCAGG GAGGCATGTCTGCAGGGATGGACAGAGGCAGCA TACGAGGAGGCAGAGGACA ACTGCAGGCGCATG ATGAGGACCAAGGCCGCTACGTGCTGAATTAT GGCGTGTGCTTCTGTGCCGCTATTTTTGTGGCG ATGAGAACATCCTGGTG

18	LS_CALR_JAK2 -30mer	ATGGCATGCCAGGCTTCCTGTGGGCCCTGGTCA TCAGCACCTGTCTGGAGTTTTCCATGGCCATGAA GGACAAGCAGGATGAGGAGCAGCGGACCCGGA GAATGATGAGGACAAAGATGCGCATGAGGCGCA TGCGGAGAACAAGGCGCAAGATGCGGAGAAAG ATGTCTCCAGCAAGGCCTAGAACCAGCTGCAGG GAGGCATGTCTGCAGGGATGGACAGAGGCAGCA TACGAGGAGGCAGAGGACAACTGCAGGCGCATG ATGAGGACCAAGGCCGCCTACAAGCTGAGCCAC AAGCACCTGGTGCTGAACTATGGCGTGTGCTTCT GTGGCGATGAGAATATCCTGGTGCAGGAGTTCG TGAAGTTTGGC
19	CALR_JAK2- 2x9mer cho Ad26	ATGAAGGACAAGCAGGATGAGGAGCAGCGGAC CCGGAGAATGATGAGGACAAAGATGCGCATGAG GCGCATGCGGAGAACAAGGCGCAAGATGCGGAG AAAGATGTCTCCAGCAAGGCCTAGAACCAGCTG CAGGGAGGCATGTCTGCAGGGATGGACAGAGGC AGCATAACGAGGAGGCAGAGGACAACTGCAGGCG CATGATGAGGACCAAGGCCGCCTACGTGCTGAA TTATGGCGTGTGCTTCTGTGCCGCCTATTTTTGTG GCGATGAGAACATCCTGGTG
20	CALR_JAK2- 30mer	ATGAAGGACAAGCAGGATGAGGAGCAGCGGAC CCGGAGAATGATGAGGACAAAGATGCGCATGAG GCGCATGCGGAGAACAAGGCGCAAGATGCGGAG AAAGATGTCTCCAGCAAGGCCTAGAACCAGCTG CAGGGAGGCATGTCTGCAGGGATGGACAGAGGC AGCATAACGAGGAGGCAGAGGACAACTGCAGGCG CATGATGAGGACCAAGGCCGCCTACAAGCTGAG CCACAAGCACCTGGTGCTGAACTATGGCGTGTGC TTCTGTGGCGATGAGAATATCCTGGTGCAGGAGT TCGTGAAGTTTGGC

21	Ubiq_CALR_JA K2-2x9mer	ATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGACAGGCAAG ACCATCACACTGGAGGTGGAGCCCTCCGACACC ATCGAGAACGTGAAGGCCAAGATCCAGGACAAG GAGGGCATCCCCCCTGATCAGCAGCGGCTGATCT TTGCCGGCAAGCAGCTGGAGGACGGCAGAACCC TGTCTGATTACAATATCCAGAAGGAGAGCACAC TGCACCTGGTGCTGCGGCTGAGAGGCGTGAGGA AGGACAAGCAGGATGAGGAGCAGCGCACCCGG AGAATGATGCGGACAAAGATGAGAATGAGGCGC ATGCGGAGAACCAGGCGCAAGATGCGGAGAAA GATGAGCCCAGCAAGGCCACGCACCTCCTGCAG GGAGGCATGTCTGCAGGGATGGACAGAGGCAGC CTATGAGGAGGCCGAGGACAACCTGCAGGCGCAT GATGCGGACAAAGGCCGCCTACGTGCTGAATTA TGGCGTGTGCTTCTGTGCCGCCTATTTTTGTGGC GATGAGAACATCCTGGTG
22	Ubiq_CALR_JA K2-30mer	ATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGACAGGCAAG ACCATCACACTGGAGGTGGAGCCCTCCGACACC ATCGAGAACGTGAAGGCCAAGATCCAGGACAAG GAGGGCATCCCCCCTGATCAGCAGCGGCTGATCT TTGCCGGCAAGCAGCTGGAGGACGGCAGAACCC TGTCTGATTACAATATCCAGAAGGAGAGCACAC TGCACCTGGTGCTGCGGCTGAGAGGCGTGAGGA AGGACAAGCAGGATGAGGAGCAGCGCACCCGG AGAATGATGCGGACAAAGATGAGAATGAGGCGC ATGCGGAGAACCAGGCGCAAGATGCGGAGAAA GATGAGCCCAGCAAGGCCACGCACCTCCTGCAG GGAGGCATGTCTGCAGGGATGGACAGAGGCAGC CTATGAGGAGGCCGAGGACAACCTGCAGGCGCAT GATGCGGACAAAGGCCGCCTACAAGCTGTCTCA CAAGCACCTGGTGCTGAACTATGGCGTGTGCTTC TGTGGCGATGAGAATATCCTGGTGACAGGAGTTC GTGAAGTTTGGCTGATAA

23	trình tự polynucleotit của gen chuyên Ad26HEME001 bao gồm vùng khởi động xytomegalovirut chứa vùng vận hành tetraoxycilin (TetO), trình tự Kozak và gen chuyên và tính hiệu polyadenyl của virut simian 40 (SV40)	TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGT TATATAGCATAAAATCAATATTGGCTATTGGCCAT TGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACAT TTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGT TGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAAT CAATTACGGGGTTCATTAGTTCATAGCCCATATAT GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGC CCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCAT TGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC GCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTG GAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTAC ATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTAT TGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCA TTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCT ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTA TTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAA TGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTT CCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTT TGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAA ATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATG GGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATA AGCAGAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGATCTCC CTATCAGTGATAGAGATCGTTCGACGAGCTCGTTT AGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCC ACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGAC CGATCCAGCCTCCGCGGGCCGGAACGGTGCATT GGATCTAGAGCCACCATGGCATGCCCAGGCTTCC TGTGGGCCCTGGTCATCAGCACCTGTCTGGAGTT TTCCATGGCCATGAAGGACAAGCAGGATGAGGA GCAGCGGACCCGGAGAATGATGAGGACAAAGAT GCGCATGAGGCGCATGCGGAGAACAAGGCGCAA GATGCGGAGAAAGATGTCTCCAGCAAGGCCTAG AACCAGCTGCAGGGAGGCATGTCTGCAGGGATG GACAGAGGCAGCATAACGAGGAGGCAGAGGACA ACTGCAGGCGCATGATGAGGACCAAGGCCGCT ACAAGCTGAGCCACAAGCACCTGGTGCTGAACT ATGGCGTGTGCTTCTGTGGCGATGAGAATATCCT GGTGCAGGAGTTCGTGAAGTTTGGCTGATAAGG TACCATCCGAACCTTGTTTATTGCAGCTTATAATG GTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCA CAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTG TGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCAT GTCT
----	---	--

24	trình tự polynucleotit của gen chuyển Ad26HEME002 bao gồm vùng khởi động xytomegalovirut chứa vùng vận hành tetraxyclin (TetO), trình tự Kozak và gen chuyển và tính hiệu polyadenyl của virut simian 40 (SV40)	TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGT TATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCAT TGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACAT TTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGT TGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAAT CAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT GGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGC CCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCAT TGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC GCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTG GAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTAC ATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTAT TGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCA TTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCT ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTA TTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAA TGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTT CCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTT TGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCAAA ATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATG GGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATA AGCAGAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGATCTCC CTATCAGTGATAGAGATCGTCGACGAGCTCGTTT AGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCC ACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGAC CGATCCAGCCTCCGCGGGCCGGGAACGGTGCATT GGATCTAGAGCCACCATGGCATGCCCAGGCTTCC TGTGGGCCCTGGTCATCAGCACCTGTCTGGAGTT TTCCATGGCCATGAAGGACAAGCAGGATGAGGA GCAGCGGACCCGGAGAATGATGAGGACAAAGAT GCGCATGAGGCGCATGCGGAGAACAAGGCGCAA GATGCGGAGAAAGATGTCTCCAGCAAGGCCTAG AACCAGCTGCAGGGAGGCATGTCTGCAGGGATG GACAGAGGCAGCATAACGAGGAGGCAGAGGACA ACTGCAGGCGCATGATGAGGACCAAGGCCGCCT ACGTGCTGAATTATGGCGTGTGCTTCTGTGCCGC CTATTTTTGTGGCGATGAGAACATCCTGGTGTGA TAAGGTACCATCCGAACCTGTTTATTGCAGCTTA TAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAA TTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTA GTTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTA TCATGTCT
----	---	---

25	ADN chèn hoàn toàn HCalJ-9.9 (TCE_CALR_JA K2-2x9mer) cho quá trình biểu hiện trong MVA và Gad20	GATCACTAATTCCAAACCCACCCGCTTTTTATAG TAAGTTTTTTCACCCATAAATAATAAATACAATAA TTAATTTCTCGTAAAAGTAGAAAATATATTCTAA TTTATTGCACGGTAAGGAAGTAGAATCATAAAG AACAGTGACGGATCCC GCGACTTCGCCGCCATG GGCCAGAAGGAACAGATTCATACGCTTCAGAAA AATTCTGAACGAATGTCAAAGCAATTGACACGA AGTTCTCAGGCAGTAATGAAGGACAAACAAGAC GAAGAACAACGAAGTACTAGGCGGATGATGAGGACT AAGATGAGGATGCGGAGGATGAGACGGACGCG ACGCAAGATGCGCCGGAAAATGTCTCCCGCCCG GCCAAGGACGTCTTGTCTGGGAAGCCTGTTTGCAG GGCTGGACCGAAGCAGCTTACGAAGAAGCAGAA GACAATTGTCGGCGAATGATGAGAACGAAGGCT GCTTACGTGCTTAACTATGGAGTGTGCTTCTGCG CTGCCTATTTCTGCGGAGATGAGAACATTCTGGT GTAGTAAAGGCGCGCC
26	Gen chuyển HCalJ-9.9 (TCE_CALR_JA K2-2x9mer) chỉ có trình tự dẫn hướng cho quá trình biểu hiện trong MVA và Gad20	ATGGGCCAGAAGGAACAGATTCATACGCTTCAG AAAAATTCTGAACGAATGTCAAAGCAATTGACA CGAAGTTCTCAGGCAGTAATGAAGGACAAACAA GACGAAGAACAACGAAGTACTAGGCGGATGATGAGG ACTAAGATGAGGATGCGGAGGATGAGACGGACG CGACGCAAGATGCGCCGGAAAATGTCTCCCGCC CGGCCAAGGACGTCTTGTCTGGGAAGCCTGTTTGC AGGGCTGGACCGAAGCAGCTTACGAAGAAGCAG AAGACAATTGTCGGCGAATGATGAGAACGAAGG CTGCTTACGTGCTTAACTATGGAGTGTGCTTCTG CGCTGCCTATTTCTGCGGAGATGAGAACATTCTG GTG
27	Gen chuyển CALR_JAK2-2x9mer chỉ không có ADN trình tự dẫn hướng cho quá trình biểu hiện trong MVA và Gad20	ATGAAGGACAAACAAGACGAAGAACAACGAAC TAGGCGGATGATGAGGACTAAGATGAGGATGCG GAGGATGAGACGGACGCGACGCAAGATGCGCCG GAAAATGTCTCCCGCCCGGCCAAGGACGTCTTGT CGGGAAGCCTGTTTGCAGGGCTGGACCGAAGCA GCTTACGAAGAAGCAGAAGACAATTGTCGGCGA ATGATGAGAACGAAGGCTGCTTACGTGCTTAACT ATGGAGTGTGCTTCTGCGCTGCCTATTTCTGCGG AGATGAGAACATTCTGGT
28	Quyết định kháng nguyên JAK2 Quyết định kháng nguyên 2-AAJ- JAK2 2	FCGDENILVAA YFCGDENILV
29	TCE	MGQKEQIHTLQKNSERMSKQLTRSSQAV

30	TCE polynucleotit	ATGGGCCAGAAGGAACAGATTCATACGCTTCAG AAAAATTCTGAACGAATGTCAAAGCAATTGACA CGAAGTTCTCAGGCAGTA
31	TCE_CALR_JA K2-2x9mer	MGQKEQIHTLQKNSERMSKQLTRSSQAVMKDKQD EEQRTRRMMRTKMRMRRMRTRRRKMRRKMSPA RPRTSCREACLQGWTEAAYEEAEDNCRRMMRTK AAYVLNYGVCFCAAYFCGDENILV
32	Vùng khởi động P7.5	GATCACTAATTCCAAACCCACCCGCTTTTTATAG TAAGTTTTTCACCCATAAATAATAAATACAATAA TTAATTTCTCGTAAAAGTAGAAAATATATTCTAA TTTATTGCACGGTAAGGAAGTAGAATCATAAAG AACAGTGACGGATC

33	Trình tự polynucleotit của plasmid ARN tự sao chép hoàn toàn	TAATACGACTCACTATAGATAGGCGGCATGA GAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAATAGG AGAAAGTTCACGTTGACATCGAGGAAGACAGCC CATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCA GTTTGAGGTAGAAGCCAAGCAGGTCCTGATAA TGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTTCGCATCTG GCTTCAAACTGATCGAAACGGAGGTGGACCCA TCCGACACGATCCTTGACATTGGAATAGTCAGCA TAGTACATTTTCATCTGACTAATACTACAACACCA CCACCATGAATAGAGGATTCTTTAACATGCTCGG CCGCCGCCCTTCCCGGCCCCACTGCCATGTGG AGGCCGCGGAGAAGGAGGCAGGCGGCCCGGG AAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCA GGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTGA GAAAGTTCACGTTGACATCGAGGAAGACAGCCC ATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAG TTTGAGGTAGAAGCCAAGCAGGTCCTGATAAT GACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTTCGCATCTGG CTTCAAACTGATCGAAACGGAGGTGGACCCAT CCGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCCCGC CCGCAGAATGTATTCTAAGCACAAAGTATCATTGT ATCTGTCCGATGAGATGTGCGGAAGATCCGGAC AGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAAA AACTGTAAGGAAATAACTGATAAGGAATTGGAC AAGAAAATGAAGGAGCTCGCCGCCGTCATGAGC GACCCTGACCTGGAACTGAGACTATGTGCCTCC ACGACGACGAGTCGTGTGCTACGAAGGGCAAG TCGCTGTTTACCAGGATGTATACGCGGTTGACGG ACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGG AGTTAGAGTCGCCTACTGGATAGGCTTTGACACC ACCCCTTTTATGTTTAAGA ACTTGGCTGGAGCAT ATCCATCATACTCTACCAACTGGGCCGACGAAAC CGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATGCAGC TCTGACGTTATGGAGCGGTCACGTAGAGGGATG TCCATTCTTAGAAAGAAGTATTTGAAACCATCCA ACAATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCATCTA CCACGAGAAGAGGGACTTACTGAGGAGCTGGCA CCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGCAAGCAA AATTACACATGTCGGTGTGAGACTATAGTTAGTT GCGACGGGTACGTCGTTAAAAGAATAGCTATCA GTCCAGGCCTGTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGC TGCTACGATGCACCGGAGGGATTCTTGTGCTGC AAAGTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTC TCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAGCTACAT TGTGTGACCAAATGACTGGCATACTGGCAACAG ATGTCAGTGCGGACGACGCGCAAAA ACTGCTGG TTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTCCG
----	--	---

	CACCCAGAGAAACACCAATACCATGAAAAATTA CCTTTTGCCCGTAGTGGCCAGGCATTTGCTAGG TGGCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGAT GAAAGGCCACTAGGACTACGAGATAGACAGTTA GTCATGGGGTGTGTTGGGCTTTTAGAAGGCACA AGATAACATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCA AACCATCATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCA TTCGTGCTGCCAGGATAGGCAGTAACACATTGG AGATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAATGT TAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACCTCTCATT CCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCGCAG CCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAAGCCGAGG AGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCTGA TGTTGAGGAGCCCCTCTGGAAGCCGATGTGCA CTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGT GGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAGGTTACCAG CTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGC TGTGCTTTCTCCGCAGGCTGTACTCAAGAGTGAA AAATTATCTTGCATCCACCCTCTCGCTGAACAAG TCATAGTGATAACACACTCTGGCCGAAAAGGGC GTTATGCCGTGGAACCATAACCATGGTAAAGTAGT GGTGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGA CTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATTGTG TACAACGAACGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTG CACCATATTGCCACACATGGAGGAGCGCTGAAC ACTGATGAAGAATATTACAAAAGTCAAGCCC AGCGAGCACGACGGCGAATACCTGTACGACATC GACAGGAAACAGTGCGTCAAGAAAGAACTAGTC ACTGGGCTAGGGCTCACAGGCGAGCTGGTGGAT CCTCCCTTCCATGAATTCGCCTACGAGAGTCTGA GAACACGACCAGCCGCTCCTTACCAAGTACCAA CCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCA AGTCTGGCATCATTAAAAGCGCAGTCACCAAAA AAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAAGAAAAGT GTGCAGAAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGA AAGGGCTGGACGTCAATGCCAGAAGTGTGGACT CAGTGCTCTTGAATGGATGCAAACACCCCGTAG AGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCTTGTCA TGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCATAGCCATTATA AGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCGGGGATCCC AAACAGTGCGGTTTTTTTAAACATGATGTGCCTGA AAGTGCATTTTAAACCACGAGATTTGCACACAAGT CTTCCACAAAAGCATCTCTCGCCGTTGCACTAAA TCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTTGTTTTACGA CAAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGA CTAAGATTGTGATTGACACTACCGGCAGTACCAA ACCTAAGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTTC AGAGGGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTAC
--	--

AAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCTCT
CAAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTT
GGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCAC
CCACCTCTGAACATGTGAACGTCCTACTGACCCG
CACGGAGGACCGCATCGTGTGGAAAACACTAGC
CGGCGACCCATGGATAAAAACACTGACTGCCAA
GTACCCTGGGAATTTCACTGCCACGATAGAGGA
GTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCA
CATCTTGGAGAGACCGGACCCTACCGACGTCTTC
CAGAATAAGGCAAACGTGTGTTGGGCCAAGGCT
TTAGTGCCGGTGTGAAGACCGCTGGCATAGAC
ATGACCACTGAACAATGGAACACTGTGGATTATT
TTGAAACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAG
TATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTTGGACT
CGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACT
GTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGGGATA
ACTCCCCGTCGCCTAACATGTACGGGCTGAATAA
AGAAGTGGTCCGTCAGCTCTCTCGCAGGTACCCA
CAACTGCCTCGGGCAGTTGCCACTGGAAGAGTCT
ATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAATTATG
ATCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTAAACAGAA
GACTGCCTCATGCTTTAGTCCTCCACCATAATGA
ACACCCACAGAGTGACTTTTCTTCATTCGTCAGC
AAATTGAAGGGCAGAACTGTCCTGGTGGTCGGG
GAAAAGTTGTCCGTCCAGGCAAAATGGTTGAC
TGGTTGTCAGACCGGCCTGAGGCTACCTTCAGAG
CTCGGCTGGATTTAGGCATCCCAGGTGATGTGCC
CAAATATGACATAATATTTGTTAATGTGAGGACC
CCATATAAATACCATCACTATCAGCAGTGTGAAG
ACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAA
AGCTTGTCTGCATCTGAATCCCGGCGGAACCTGT
GTCAGCATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCC
AGCGAAAGCATCATTGGTGCTATAGCGCGGCAG
TTCAAGTTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCT
CACTTGAAGAGACGGAAGTTCTGTTTGTATTAT
TGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATCC
TTACAAGCTTTCATCAACCTTGACCAACATTTAT
ACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGATGTGCA
CCCTCATATCATGTGGTGCAGAGGGGATATTGCCA
CGGCCACCGAAGGAGTGATTATAAATGCTGCTA
ACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTGTGCG
GAGCGCTGTATAAGAAATTCGCGAAAGCTTCG
ATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGAC
TGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTCATGC
CGTAGGACCAAACCTTCAACAAAGTTTCGGAGGT
TGAAGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGA
GTCCATCGCTAAGATTGTCAACGATAACAATTAC
AAGTCAGTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGGCA

TCTTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATC
ATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACACCACT
GATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGACAAG
AAATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCT
AGGAGAGAAGCAGTGGAGGAGATATGCATATCC
GACGACTCTTCAGTGACAGAACCTGATGCAGAG
CTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTTCTTTGGCTG
GAAGGAAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAA
ACTTTCTCATATTTGGAAGGGACCAAGTTTCACC
AGGCGGCCAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCA
TGTGGCCCGTTGCAACGGAGGCCAATGAGCAGG
TATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGCATGAGCA
GTATTAGGTCGAAATGCCCCGTCGAAGAGTCGG
AAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTTGCTT
GTGCATCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACA
GCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAATTAC
TGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGA
ATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATGCTCCCAGC
CTATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCTGCGTATAT
TCATCCAAGGAAGTATCTCGTGGAACACCACC
GGTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAA
CCAATCCACAGAGGGGACACCTGAACAACCACC
ACTTATAACCGAGGATGAGACCAGGACTAGAAC
GCCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGAAGA
GGATAGCATAAGTTTGCTGTCAGATGGCCCGACC
CACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCAC
GGGCCGCCCTCTGTATCTAGCTCATCCTGGTCCA
TTCCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTT
ATCCATACTTGACACCCTGGAGGGAGCTAGCGT
GACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGACTAACTC
TTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTCTGGCGCGA
CCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACC
CTCCACATCCCGCTCCGCGCACAAGAACACCGTC
ACTTGCACCCAGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAG
CCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAATAGGGTG
ATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCG
TCACGCACTCCTAGCAGGTCGGTCTCGAGAACCA
GCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGG
TGATTACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTTTCGTAG
CACAACAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGCAT
ACATCTTTTCTCCGACACCGGTCAAGGGCATT
ACAACAAAAATCAGTAAGGCAAACGGTGCTATC
CGAAGTGGTGTTGGAGAGGACCGAATTGGAGAT
TTCGTATGCCCCGCGCCTCGACCAAGAAAAAGA
AGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAATCC
CACACCTGCTAACAGAAGCAGATACCAGTCCAG
GAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTAG
ACGTATTCTGCAAGGCCTAGGGCATTATTTGAAG

		<p>GCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAACCCCTG CATCCTGTTCCCTTTGTATTTCATCTAGTGTGAACCG TGCCTTTTCAAGCCCCAAGGTCGCAGTGGAAAGCC TGTAACGCCATGTTGAAAGAGAAGCTTTCCGACTG TGGCTTCTTACTGTATTATTCCAGAGTACGATGC CTATTTGGACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGC TTAGACACTGCCAGTTTTTGGCCCTGCAAAGCTGC GCAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATTTGGAACC CACAATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCA GAACACGCTCCAGAACGTCCTGGCAGCTGCCAC AAAAAGAAATTGCAATGTCACGCAAATGAGAGA ATTGCCCGTATTGGATTTCGGCGGCCTTTAATGTG GAATGCTTCAAGAAATATGCGTGTAATAATGAA TATTGGGAAACGTTTTAAAGAAAACCCCATCAGG CTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCA AATTAAGGACCAAAGCTGCTGCTCTTTTTGC GAAGACACATAATTTGAATATGTTGCAGGACAT ACCAATGGACAGGTTTGTAATGGACTTAAAGAG AGACGTGAAAGTGACTCCAGGAACAAAACATAC TGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGTGATCCAGGC TGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGA ATCCACCGAGAGCTGGTTAGGAGATTAATGCG GTCCTGCTTCCGAACATTCATACACTGTTTGATA TGTCGGCTGAAGACTTTGACGCTATTATAGCCGA GCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAAACT GACATCGCGTCGTTTGATAAAAGTGAGGACGAC GCCATGGCTCTGACCGCGTTAATGATTCTGGAAG ACTTAGGTGTGGACGCAGAGCTGTTGACGCTGAT TGAGGCGGCTTTCGGCGAAATTCATCAATACAT TTGCCCACTAAAATAAATTTAAATTCGGAGCCA TGATGAAATCTGGAATGTTCCCTCACACTGTTTGT GAACACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAG AGTGTTGAGAGAACGGCTAACCGGATCACCATG TGCAGCATTATTGGAGATGACAATATCGTGAA AGGAGTCAAATCGGACAAATTAATGGCAGACAG GTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAGATT ATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTTAT TTCTGTGGAGGGTTTATTTTGTGTGACTCCGTGA CCGGCACAGCGTGCCGTGTGGCAGACCCCTAA AAAGGCTGTTAAGCTTGGCAAACCTCTGGCAGC AGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGC ATTGCATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGT GGGTATTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGA ATCAAGGTATGAAACCGTAGGAACTTCCATCAT AGTTATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTT AAATCATTAGCTACCTGAGAGGGGGCCCCTATA ACTCTCTACGGCTAACCTGAATGGACTACGACAT AGTCTAGTCCGCCAAGATATCGGCGCGCCGTTTA</p>
--	--	---

		AACGGCCGGCCTTAATTAAGTAACGATACAGCA GCAATTGGCAAGCTGCTTACATAGAAGCTCGCGG CGATTGGCATGCCGCTTTAAAATTTTTATTTTATT TTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTAA TATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAACCCCTCTCTAAACGGAGGGG TTTTTTTCAGCGTAACTGGACTGGCCACAGTTAG GCGGCCGCGCATGTTTCATCATCAGTAACCCGTAT CGTGAGCATCCTCTCTCGTTTCATCGGTATCATT ACCTCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGGAG GCATCAGTGACCAAACAGGAAAAAACCGCCCTT AACATGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTA ACGCTTCTGGAGAACTCAACGAGCTGGACGCG GATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTCAC GACCACGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCG CGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACA CATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTG TAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAG GGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGGTGTCGGGGC GCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGA GTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCA GATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGA AATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCG CATCAGGCGCTCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGC TGCGCTCGGTCTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATC AGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCAC AGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTG AGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTA AAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCT CCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACG CTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACT ATAAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCC CTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTA CCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAG CGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTAT CTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGG GCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCG CTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCC AACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCA GCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGG TATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGT GGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTAT TTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTT CGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAA ACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGT TGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGA TCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGT CTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTAAAG
--	--	---

		GGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTT CACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAAATGAAGTTTT AAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGT CTGACAGTTATTAGAAAAATTCATCCAGCAGAC GATAAAACGCAATACGCTGGCTATCCGGTGCCG CAATGCCATACAGCACCAGAAAACGATCCGCC ATTCGCCGCCAGTTCTTCCGCAATATCACGGGT GGCCAGCGCAATATCCTGATAACGATCCGCCAC GCCAGACGGCCGCAATCAATAAAGCCGCTAAA ACGGCCATTTTCCACCATAATGTTTCGGCAGGCAC GCATCACCATGGGTACCACCAGATCTTCGCCAT CCGGCATGCTCGCTTTCAGACGCGCAAACAGCTC TGCCGGTGCCAGGCCCTGATGTTCTTCATCCAGA TCATCCTGATCCACCAGGCCCGCTTCCATACGGG TACGCGCACGTTCAATACGATGTTTCGCCTGATG ATCAAACGGACAGGTCGCCGGGTCCAGGGTATG CAGACGACGCATGGCATCCGCCATAATGCTCACT TTTTCTGCCGGCGCCAGATGGCTAGACAGCAGAT CCTGACCCGGCACTTCGCCCAGCAGCAGCCAATC ACGGCCCGCTTCGGTCACCACATCCAGCACCGCC GCACACGGAACACCGGTGGTGGCCAGCCAGCTC AGACGCGCCGCTTCATCCTGCAGCTCGTTCAGCG CACCGCTCAGATCGGTTTTCAAAACAGCACCGG ACGACCCTGCGCGCTCAGACGAAACACCGCCGC ATCAGAGCAGCCAATGGTCTGCTGCGCCCAATC ATAGCCAAACAGACGTTCCACCCACGCTGCCGG GCTACCCGCATGCAGGCCATCCTGTTCAATCATA CTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCA GGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAA TGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCG CGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCT AAGAAACCATTATTATCATGACATTAAGCATCCG CCTTTCGTTTTATTGACCATGTTGGTATG
34	Vùng kết thúc T7	AACCCCTCTCTAAACGGAGGGGTTTTTTTT
35	Vùng khởi động AmpR	CGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATAC ATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACC CTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAA GAGT
36	Vùng khởi động 26S	CTCTCTACGGCTAACCTGAATGGA
37	Vùng khởi động T7	TAATACGACTCACTATAG
38	Vị trí Poly A	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAA

39	Trình tự sao chép 5' alpha từ nsP1	TAGGAGAAAGTTCACGTTGACATCGAGGAAGAC AGCCCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCC CGCAGTTTGAGGTAGAAGCCAAGCAGGTCACTG ATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTCGCA TCTGGCTTCAAACACTGATCGAAACGGAGGTGGA CCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGA
40	DLP	ATAGTCAGCATAGTACATTTTCATCTGACTAATAC TACAACACCACCACCATGAATAGAGGATTCTTTA ACATGCTCGGCCGCCGCCCTTCCCGGCCCCAC TGCCATGTGGAGGCCGCGGAGAAGGAGGCAGGC GGCCCCG
41	P2A	GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAG CAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT
42	Bon	CGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGG AGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGC AGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTG AAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACC GCATCAGG

43	DLP nsp ORF	<p> ATGAATAGAGGATTCTTTAACATGCTCGGCCGCC GCCCCTTCCCGGCCCCACTGCCATGTGGAGGCC GCGGAGAAGGAGGCAGGCCGCCCGGGAAGCG GAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTG GAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTGAGAAAG TTCACGTTGACATCGAGGAAGACAGCCCATTCT CAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAG GTAGAAGCCAAGCAGGTCACTGATAATGACCAT GCTAATGCCAGAGCGTTTTTCGCATCTGGCTTCAA AACTGATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACA CGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCCCGCCCGCAG AATGTATTCTAAGCACAAGTATCATTGTATCTGT CCGATGAGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATTG TATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAAAACTGT AAGGAAATAACTGATAAGGAATTGGACAAGAAA ATGAAGGAGCTCGCCGCCGTCATGAGCGACCCT GACCTGGAAACTGAGACTATGTGCCTCCACGAC GACGAGTCGTGTCGCTACGAAGGGCAAGTCGCT GTTTACCAGGATGTATACGCGGTTGACGGACCG ACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGGAGTT AGAGTCGCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCC CTTTTATGTTTAAGAACTTGGCTGGAGCATATCC ATCATACTCTACCAACTGGGCCGACGAAACCGT GTTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATGCAGCTCT GACGTTATGGAGCGGTCACGTAGAGGGATGTCC ATTCTTAGAAAGAAGTATTTGAAACCATCCAACA ATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCATCTACCAC GAGAAGAGGGACTTACTGAGGAGCTGGCACCTG CCGTCTGTATTTCACTTACGTGGCAAGCAAATT ACACATGTCGGTGTGAGACTATAGTTAGTTGCGA CGGGTACGTCGTTAAAAGAATAGCTATCAGTCC AGGCCTGTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCT ACGATGCACCGCGAGGGATTCTTGTGCTGCAA GTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCT TTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAGCTACATTGT GTGACCAAATGACTGGCATACTGGCAACAGATG TCAGTGC GGACGACGCGCAAAA ACTGCTGGTTG GGCTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTTCGCA CCCAGAGAAACACCAATACCATGAAAAATTACC TTTTGCCCGTAGTGGCCCAGGCATTTGCTAGGTG GGCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGATG AAAGGCCACTAGGACTACGAGATAGACAGTTAG TCATGGGGTGTGTTGGGCTTTTAGAAGGCACAA GATAACATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCAA ACCATCATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCAT TCGTGCTGCCAGGATAGGCAGTAACACATTGG AGATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAATGT </p>
----	-------------	---

	<p>TAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACCTCTCATTA CCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCGCAG CCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAAGCCGAGG AGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCTGA TGTTGAGGAGCCCACTCTGGAAGCCGATGTCGA CTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGT GGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAGGTTACCA CTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGC TGTGCTTTCTCCGCAGGCTGTAICTAAGAGTGAA AAATTATCTTGCATCCACCCTCTCGCTGAACAAG TCATAGTGATAACACACTCTGGCCGAAAAGGGC GTTATGCCGTGGAACCATAACCATGGTAAAGTAGT GGTGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGA CTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATTGTG TACAACGAACGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTG CACCATATTGCCACACATGGAGGAGCGCTGAAC ACTGATGAAGAATATTACAAAACGTCAAGCCC AGCGAGCACGACGGCGAATACCTGTACGACATC GACAGGAAACAGTGCGTCAAGAAAGAACTAGTC ACTGGGCTAGGGCTCACAGGCGAGCTGGTGGAT CCTCCCTTCCATGAATTCGCCTACGAGAGTCTGA GAACACGACCAGCCGCTCCTTACCAAGTACCAA CCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCA AGTCTGGCATCATTAAAAGCGCAGTCACCAAAA AAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAAGAAAAC GTGCAGAAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGA AAGGGCTGGACGTCAATGCCAGAAGTGTGGACT CAGTGCTCTTGAATGGATGCAAACACCCCGTAG AGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCTTGTC TGCAGGTAICTCTCAGAGCGCTCATAGCCATTATA AGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCGGGGATCCC AAACAGTGCGGTTTTTTTAAACATGATGTGCCTGA AAGTGCATTTTAAACCACGAGATTTGCACACAAGT CTTCCACAAAAGCATCTCTCGCCGTTGCACTAAA TCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTTGTTTTACGA CAAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGA CTAAGATTGTGATTGACACTACCGGCAGTACCAA ACCTAAGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTTC AGAGGGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTAC AAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCTCT CAAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTT GGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCAC CCACCTCTGAACATGTGAACGTCCTACTGACCCG CACGGAGGACCGCATCGTGTGGAAAACACTAGC CGGCGACCCATGGATAAAAACACTGACTGCCAA GTACCCTGGGAATTTCACTGCCACGATAGAGGA GTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCA CATCTTGGAGAGACCGGACCCTACCGACGTCTTC</p>
--	--

	CAGAATAAGGCAAACGTGTGTTGGGCCAAGGCT TTAGTGCCGGTGTCTGAAGACCGCTGGCATAGAC ATGACCACTGAACAATGGAACACTGTGGATTATT TTGAAACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAG TATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTTGGACT CGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACT GTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGGGATA ACTCCCCGTCGCCTAACATGTACGGGCTGAATAA AGAAGTGGTCCGTCAGCTCTCTCGCAGGTACCCA CAACTGCCTCGGGCAGTTGCCACTGGAAGAGTCT ATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAATTATG ATCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTAAACAGAA GACTGCCTCATGCTTTAGTCCTCCACCATAATGA ACACCCACAGAGTGACTTTTCTTCATTCGTCAGC AAATTGAAGGGCAGAACTGTCCTGGTGGTCGGG GAAAAGTTGTCCGTCCCAGGCAAATGGTTGAC TGGTTGTCAGACCGGCCTGAGGCTACCTTCAGAG CTCGGCTGGATTTAGGCATCCCAGGTGATGTGCC CAAATATGACATAATATTTGTTAATGTGAGGACC CCATATAAATACCATCACTATCAGCAGTGTGAAG ACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAA AGCTTGTCTGCATCTGAATCCCGGCGGAACCTGT GTCAGCATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCC AGCGAAAGCATCATTGGTGCTATAGCGCGGCAG TTCAAGTTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCT CACTTGAAGAGACGGAAGTTCTGTTTGTATTCAT TGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATCC TTACAAGCTTTCATCAACCTTGACCAACATTTAT ACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGATGTGCA CCCTCATATCATGTGGTGCGAGGGGATATTGCCA CGGCCACCGAAGGAGTGATTATAAATGCTGCTA ACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTGTGCG GAGCGCTGTATAAGAAATTCCCGGAAAGCTTCG ATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGAC TGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTCATGC CGTAGGACCAAACCTTCAACAAAGTTTCGGAGGT TGAAGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGA GTCCATCGCTAAGATTGTCAACGATAACAATTAC AAGTCAGTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGGCA TCTTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATC ATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACACCACT GATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGACAAG AAATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCT AGGAGAGAAGCAGTGGAGGAGATATGCATATCC GACGACTCTTCAGTGACAGAACCTGATGCAGAG CTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTTCTTTGGCTG GAAGGAAGGGCTACAGCACAAAGCGATGGCAA ACTTTCTCATATTTGGAAGGGACCAAGTTTACC
--	---

		AGGCGGCCAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCA TGTGGCCCGTTGCAACGGAGGCCAATGAGCAGG TATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGCATGAGCA GTATTAGGTCGAAATGCCCCGTCGAAGAGTCGG AAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTTGCTT GTGCATCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACA GCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAATTAC TGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGA ATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATGCTCCCAGC CTATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCTGCGTATAT TCATCCAAGGAAGTATCTCGTGAAACACCACC GGTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAA CCAATCCACAGAGGGGACACCTGAACAACCACC ACTTATAACCGAGGATGAGACCAGGACTAGAAC GCCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGAAGA GGATAGCATAAGTTTGCTGTCAGATGGCCCGACC CACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCAC GGGCCGCCCTCTGTATCTAGCTCATCTGGTCCA TTCCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTT ATCCATACTTGACACCCTGGAGGGAGCTAGCGT GACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGACTAACTC TACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTCTGGCGCGA CCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACC CTCCACATCCCGCTCCGCGCACAAGAACACCGTC ACTTGCACCCAGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAG CCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAATAGGGTG ATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCG TCACGCACTCCTAGCAGGTCGGTCTCGAGAACCA GCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGG TGATTACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTTCGTAG CACAACAACAATGA
--	--	---

44	nsP2	<p> GGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAG GTTACCAGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGC TCTTACGCTGTGCTTTCTCCGCAGGCTGTACTCA AGAGTGAAAAATTATCTTGCATCCACCCTCTCGC TGAACAAGTCATAGTGATAACACACTCTGGCCG AAAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATAACCATGG TAAAGTAGTGGTGCCAGAGGGACATGCAATACC CGTCCAGGACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCC ACCATTGTGTACAACGAACGTGAGTTCGTAAAC AGGTACCTGCACCATATTGCCACACATGGAGGA GCGCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAAC GTCAAGCCCAGCGAGCACGACGGCGAATACCTG TACGACATCGACAGGAAACAGTGCGTCAAGAAA GAACTAGTCACTGGGCTAGGGCTCACAGGCGAG CTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTCGCCTACG AGAGTCTGAGAACACGACCAGCCGCTCCTTACC AAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAG GATCAGGCAAGTCTGGCATCATTAAAAGCGCAG TCACCAAAAAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGA AAGAAAACGTGTCAGAAATTATAAGGGACGTCA AGAAAATGAAAGGGCTGGACGTCAATGCCAGAA CTGTGGACTCAGTGCTCTTGAATGGATGCAAACA CCCCGTAGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTT GCTTGTCATGCAGGTA CTCTCAGAGCGCTCATAG CCATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCG GGGATCCCAAACAGTGCGGTTTTTTTAAACATGAT GTGCCTGAAAGTGCATTTTAAACCACGAGATTTGC ACACAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCTCGCCGTT GCACTAAATCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTT GTTTTACGACAAAAAAATGAGAACGACGAATCC GAAAGAGACTAAGATTGTGATTGACACTACCGG CAGTACCAAACCTAAGCAGGACGATCTCATTCTC ACTTGTTTCAGAGGGTGGGTGAAGCAGTTGCAA ATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCA GCTGCCTCTCAAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGT ATGCCGTTCCGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCT GTACGCACCCACCTCTGAACATGTGAACGTCCTA CTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTGTGGAAA ACACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAAACACTG ACTGCCAAGTACCCTGGGAATTTCACTGCCACGA TAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCA TGAGGCACATCTTGGAGAGACCGGACCCTACCG ACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGTTGGG CCAAGGCTTTAGTGCCGGTGCTGAAGACCGCTG GCATAGACATGACCACTGAACAATGGAACACTG TGGATTATTTTGAACGGACAAAGCTCACTCAGC AGAGATAGTATTGAACCAACTATGCGTGAGGTT </p>
----	------	---

		CTTTGGACTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTG CACCCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCA CTGGGATAACTCCCCGTCGCCTAACATGTACGGG CTGAATAAAGAAGTGGTCCGTCAGCTCTCTCGCA GGTACCCACAAGTGCCTCGGGCAGTTGCCACTGG AAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTGCG CAATTATGATCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTA AACAGAAGACTGCCTCATGCTTTAGTCCTCCACC ATAATGAACACCCACAGAGTACTTTTCTTCATT CGTCAGCAAATTGAAGGGCAGAACTGTCCTGGT GGTCGGGGAAAAGTTGTCCGTCCCAGGCAAAT GGTTGACTGGTTGTCAGACCGGCCTGAGGCTACC TTCAGAGCTCGGCTGGATTTAGGCATCCCAGGTG ATGTGCCCAAATATGACATAATTTGTTAATGT GAGGACCCCATATAAATACCATCACTATCAGCA GTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTG ACCAAGAAAGCTTGTCTGCATCTGAATCCCGGCG GAACCTGTGTCAGCATAGGTTATGGTTACGCTGA CAGGGCCAGCGAAAGCATCATTGGTGCTATAGC GCGGCAGTTCAAGTTTTCCCGGGTATGCAAACCG AAATCCTCACTTGAAGAGACGGAAGTTCTGTTTG TATTCATTGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCA CAATCCTTACAAGCTTTCATCAACCTTGACCAAC ATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGAT GT
--	--	--

45	nsP4	<p>TACATCTTTTCTCCGACACCGGTCAAGGGCATT TACAACAAAAATCAGTAAGGCAAACGGTGCTAT CCGAAGTGGTGTGGAGAGGACCGAATTGGAGA TTTCGTATGCCCCGCGCCTCGACCAAGAAAAAG AAGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAATC CCACACCTGCTAACAGAAGCAGATACCAGTCCA GGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTA GACGTATTCTGCAAGGCCTAGGGCATTATTTGAA GGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGTACCGAACCCCT GCATCCTGTTCTTTGTATTTCATCTAGTGTGAACC GTGCCTTTTCAAGCCCCAAGGTTCGCAGTGGAAAGC CTGTAACGCCATGTTGAAAGAGAACTTTCCGACT GTGGCTTCTTACTGTATTATTCCAGAGTACGATG CCTATTTGGACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTG CTTAGACACTGCCAGTTTTTGCCTGCAAAGCTG CGCAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATTTGGAAC CCACAATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCA GAACACGCTCCAGAACGTCCTGGCAGCTGCCAC AAAAAGAAATTGCAATGTCACGCAAATGAGAGA ATTGCCCGTATTGGATTCGGCGGCCTTTAATGTG GAATGCTTCAAGAAATATGCGTGAATAATGAA TATTGGGAAACGTTTTAAAGAAAACCCCATCAGG CTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCA AATTAAGGACCAAAGCTGCTGCTCTTTTTGC GAAGACACATAATTTGAATATGTTGCAGGACAT ACCAATGGACAGGTTTGTAAATGGACTTAAAGAG AGACGTGAAAGTGACTCCAGGAACAAAACATAC TGAAGAACGGCCAAGGTACAGGTGATCCAGGC TGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGA ATCCACCGAGAGCTGGTTAGGAGATTAATGCG GTCCTGCTTCCGAACATTCATACACTGTTTGATA TGTCGGCTGAAGACTTTGACGCTATTATAGCCGA GCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAAACT GACATCGCGTCGTTTGATAAAAAGTGAGGACGAC GCCATGGCTCTGACCGCGTTAATGATTCTGGAAG ACTTAGGTGTGGACGCAGAGCTGTTGACGCTGAT TGAGGCGGCTTTCGGCGAAATTCATCAATACAT TTGCCACTAAAATAAATTTAAATTCGGAGCCA TGATGAAATCTGGAATGTTCTCACACTGTTTGT GAACACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAG AGTGTGAGAGAACGGCTAACCGGATCACCATG TGCAGCATTATTGGAGATGACAATATCGTGAA AGGAGTCAAATCGGACAAATTAATGGCAGACAG GTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAGATT ATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTTAT TTCTGTGGAGGGTTTTATTTGTGTGACTCCGTGA CCGGCACAGCGTGCCGTGTGGCAGACCCCCTAA</p>
----	------	---

		AAAGGCTGTTTAAGCTTGGCAAACCTCTGGCAGC AGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGC ATTGCATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGT GGGTATTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGA ATCAAGGTATGAAACCGTAGGAACTTCCATCAT AGTTATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTT AAATCATTGAGCTACCTGAGAGGGGCCCCTATA ACTCTCTACGGC
--	--	---

46	nsP3	GCACCCTCATATCATGTGGTGCGAGGGGATATTG CCACGGCCACCGAAGGAGTGATTATAAATGCTG CTAACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTGT GCGGAGCGCTGTATAAGAAATTCCCGGAAAGCT TCGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGC GACTGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTC ATGCCGTAGGACCAAACCTTCAACAAAGTTTCGG AGGTTGAAGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTT ATGAGTCCATCGCTAAGATTGTCAACGATAACA ATTACAAGTCAGTAGCGATTCCACTGTTGTCCAC CGGCATCTTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAACC CAATCATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACA CCACTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGG ACAAGAAATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAG TGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAGGAGATATGCA TATCCGACGACTCTTCAGTGACAGAACCTGATGC AGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTTCTTT GGCTGGAAGGAAGGGCTACAGCACAAGCGATGG CAAACCTTTCTCATATTTGGAAGGGACCAAGTTT CACCAGGCGGCCAAGGATATAGCAGAAATTAAT GCCATGTGGCCCGTTGCAACGGAGGCCAATGAG CAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGCATG AGCAGTATTAGGTCGAAATGCCCCGTCGAAGAG TCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTT GCTTGTGCATCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGT ACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAAT TACTGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTAT AGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATGCTCC CAGCCTATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCTGCGT ATATTCATCCAAGGAAGTATCTCGTGGAACACC ACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGA GAACCAATCCACAGAGGGGACACCTGAACAACC ACCACTTATAACCGAGGATGAGACCAGGACTAG AACGCCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGA AGAGGATAGCATAAGTTTGCTGTCAGATGGCCC GACCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACAT TCACGGGCCGCCCTCTGTATCTAGCTCATCCTGG TCCATTCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACA GTTTATCCATACTTGACACCCTGGAGGGAGCTAG CGTGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGACTAA CTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTCTGGCG CGACCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGG AACCCTCCACATCCCGCTCCGCGCACAAGAACA CCGTCACCTTGACCCAGCAGGGCCTGCTCGAGA ACCAGCCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAATA GGGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTA CCCCGTCACGCACTCCTAGCAGGTCCGGTCTCGAG
----	------	--

		AACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAA TAGGGTGATTACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTT CGTAGCACAACAACAATGACGGTTTGATGCGGG TGCA
--	--	---

47	nsP1	<p>GAGAAAGTTCACGTTGACATCGAGGAAGACAGC CCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGC AGTTTGAGGTAGAAGCCAAGCAGGTCACTGATA ATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTTCGCATCT GGCTTCAAACACTGATCGAAACGGAGGTGGACCC ATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCCC GCCCCGAGAATGTATTCTAAGCACAAGTATCATT GTATCTGTCCGATGAGATGTGCGGAAGATCCGG ACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGA AAAACCTGTAAGGAAATAACTGATAAGGAATTGG ACAAGAAAATGAAGGAGCTCGCCGCCGTCATGA GCGACCCTGACCTGGAAACTGAGACTATGTGCCT CCACGACGACGAGTCGTGTCGCTACGAAGGGCA AGTCGCTGTTTACCAGGATGTATACGCGGTTGAC GGACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAG GGAGTTAGAGTCGCCTACTGGATAGGCTTTGACA CCACCCCTTTTATGTTTAAAGAACTTGGCTGGAGC ATATCCATCATACTCTACCAACTGGGCCGACGAA ACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATGCA GCTCTGACGTTATGGAGCGGTCACGTAGAGGGA TGTCATTCTTAGAAAGAAGTATTTGAAACCATC CAACAATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCATC TACCACGAGAAGAGGGACTTACTGAGGAGCTGG CACCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGCAAGC AAAATTACACATGTCGGTGTGAGACTATAGTTAG TTGCGACGGGTACGTCGTTAAAAGAATAGCTATC AGTCCAGGCCTGTATGGGAAGCCTTCAGGCTATG CTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTCTTGTGCTG CAAAGTGACAGACACATTGAACGGGGGAGAGGGT CTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAGCTACA TTGTGTGACCAAATGACTGGCATACTGGCAACA GATGTCAGTGCGGACGACGCGCAAAAACCTGCTG GTTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTC GCACCCAGAGAAACACCAATACCATGAAAAATT ACCTTTTGCCCGTAGTGGCCAGGCATTTGCTAG GTGGGCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAG ATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGATAGACAGT TAGTCATGGGGTGTTGTTGGGCTTTTAGAAGGCA CAAGATAACATCTATTTATAAGCGCCCCGGATACC CAAACCATCATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACT CATTTCGTGCTGCCAGGATAGGCAGTAACACATT GGAGATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAAT GTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACCTCTCAT TACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCGC AGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAAGCCGA GGAGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCT</p>
----	------	--

		GATGTTGAGGAGCCCCTCTGGAAGCCGATGTC GACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCC
48	KanR	ATGATTGAACAGGATGGCCTGCATGCGGGTAGC CCGGCAGCGTGGGTGGAACGTCTGTTTGGCTATG ATTGGGCGCAGCAGACCATTGGCTGCTCTGATGC GGCGGTGTTTCGTCTGAGCGCGCAGGGTCGTCCG GTGCTGTTTGTGAAAACCGATCTGAGCGGTGCGC TGAACGAGCTGCAGGATGAAGCGGCGCGTCTGA GCTGGCTGGCCACCACCGGTGTTCCGTGTGCGGC GGTGCTGGATGTGGTGACCGAAGCGGGCCGTGA TTGGCTGCTGCTGGGCGAAGTGCCGGGTCAGGA TCTGCTGTCTAGCCATCTGGCGCCGGCAGAAAAA GTGAGCATTATGGCGGATGCCATGCGTCTGTCTGC ATACCCTGGACCCGGCGACCTGTCCGTTTGATCA TCAGGCGAAACATCGTATTGAACGTGCGCGTAC CCGTATGGAAGCGGGCCTGGTGGATCAGGATGA TCTGGATGAAGAACATCAGGGCCTGGCACCGGC AGAGCTGTTTGCGCGTCTGAAAGCGAGCATGCC GGATGGCGAAGATCTGGTGGTGACCCATGGTGA TGC GTGCCTGCCGAACATTATGGTGGAAAATGG CCGTTTTAGCGGCTTTATTGATTGCGGCCGTCTG GGCGTGGCGGATCGTTATCAGGATATTGCGCTGG CCACCCGTGATATTGCGGAAGA ACTGGGCGGGCG AATGGGCGGATCGTTTTCTGGTGTGTATGGCAT TGCGGCACCGGATAGCCAGCGTATTGCGTTTTAT CGTCTGCTGGATGAATTTTTCTAATAA
49	Rop	GTGACCAAACAGGAAAAAACCGCCCTAACATG GCCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTC TGGAGAACTCAACGAGCTGGACGCGGATGAAC AGGCAGACATCTGTGAATCGCTTCACGACCACG CTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCGCGCGTTT CGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGA
50	5' UTR	ATAGGCGGCGCATGAGAGAAGCCAGACCAATT ACCTACCCAAA
51	3' UTR	ATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTACATAGA ACTCGCGGCGATTGGCATGCCGCTTTAAAATTTT TATTTTATTTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTT GTTTTTAATATTTT

52	Vùng khởi động CVM có các vị trí TetO	CCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGT ACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCC ATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAG TAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT ATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAA TGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGC CCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAG TAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCA GTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTG GCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTT CCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCG CTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACAT CAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGG ATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGG AGTTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTC CAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCA AATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTA TATAAGCAGAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGAT CTCCCTATCAGTGATAGAGATCGTCGACGAGCTC GTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCC ATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCG GGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTG CATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGA
53	BGH polyA	CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGC CCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTG CCTACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGA AATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCT ATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAG GGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCT GGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCC
54	Trình tự dẫn hướng Ubiquitin	MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIP PDQQLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLR RGV

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polynucleotit mã hóa polypeptit bao gồm các trình tự quyết định kháng nguyên:

MKDKQDEEQRTTRMMRTKMRMRMRTRRKMRKMSPARPRTSCR
EACLQGWTE (SEQ ID NO: 1);
EEAEDNCRMMRTK (SEQ ID NO: 2);
VLNYGVCFC (SEQ ID NO: 5); và
FCGDENILV (SEQ ID NO: 6).

2. Polynucleotit theo điểm 1, trong đó polynucleotit bao gồm:

trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 17;
trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 19;
trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 26; hoặc
trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 27.

3. Polynucleotit theo điểm 1, còn mã hóa trình tự dẫn hướng đầu N được chọn từ:

MACPGFLWALVISTCLEFSMA (SEQ ID NO: 8);
MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLE
DGRTLSDYNIQKESTLHLVLRIRGV (SEQ ID NO: 54); và
MGQKEQIHTLQKNSERMSKQLTRSSQAV (SEQ ID NO: 29).

4. Polynucleotit theo điểm 1, còn bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit mã hóa một hoặc nhiều trình tự cầu nối, trong đó các trình tự quyết định kháng nguyên được nối với nhau bằng một hoặc nhiều trình tự cầu nối.

5. Polynucleotit theo điểm 4, trong đó một hoặc nhiều trình tự cầu nối được mã hóa bởi polynucleotit được chọn từ AAY, RR, DPP, HHAA, HHA, HHL, RKSYL, RKSYS, SSL, và REKR.

6. Polynucleotit theo điểm 4, trong đó một hoặc nhiều trình tự cầu nối được mã hóa bởi một hoặc nhiều polynucleotit bao gồm vị trí phân cắt proteaza.

7. Polynucleotit theo điểm 1, trong đó polynucleotit mã hóa polypeptit bao gồm:
 - trình tự axit amin có SEQ ID NO: 10;
 - trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12; hoặc
 - trình tự axit amin có SEQ ID NO: 31.

8. Polynucleotit theo điểm 7, trong đó polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12.

9. Polynucleotit theo điểm 8, trong đó polynucleotit bao gồm SEQ ID NO: 27.

10. Polynucleotit theo điểm 1, bao gồm:
 - các nucleotit 1-162 của SEQ ID NO: 27;
 - các nucleotit 172-213 của SEQ ID NO: 27;
 - các nucleotit 223-249 của SEQ ID NO: 27; và
 - các nucleotit 259-285 của SEQ ID NO: 27.

11. Vectơ bao gồm polynucleotit theo điểm 1.

12. Vectơ theo điểm 11, trong đó vectơ được chọn từ vectơ adenovirut, vectơ alphavirut, vectơ poxvirut, vectơ virut liên kết với adeno, vectơ retrovirut, phân tử ARN tự sao chép, và sự kết hợp của chúng.

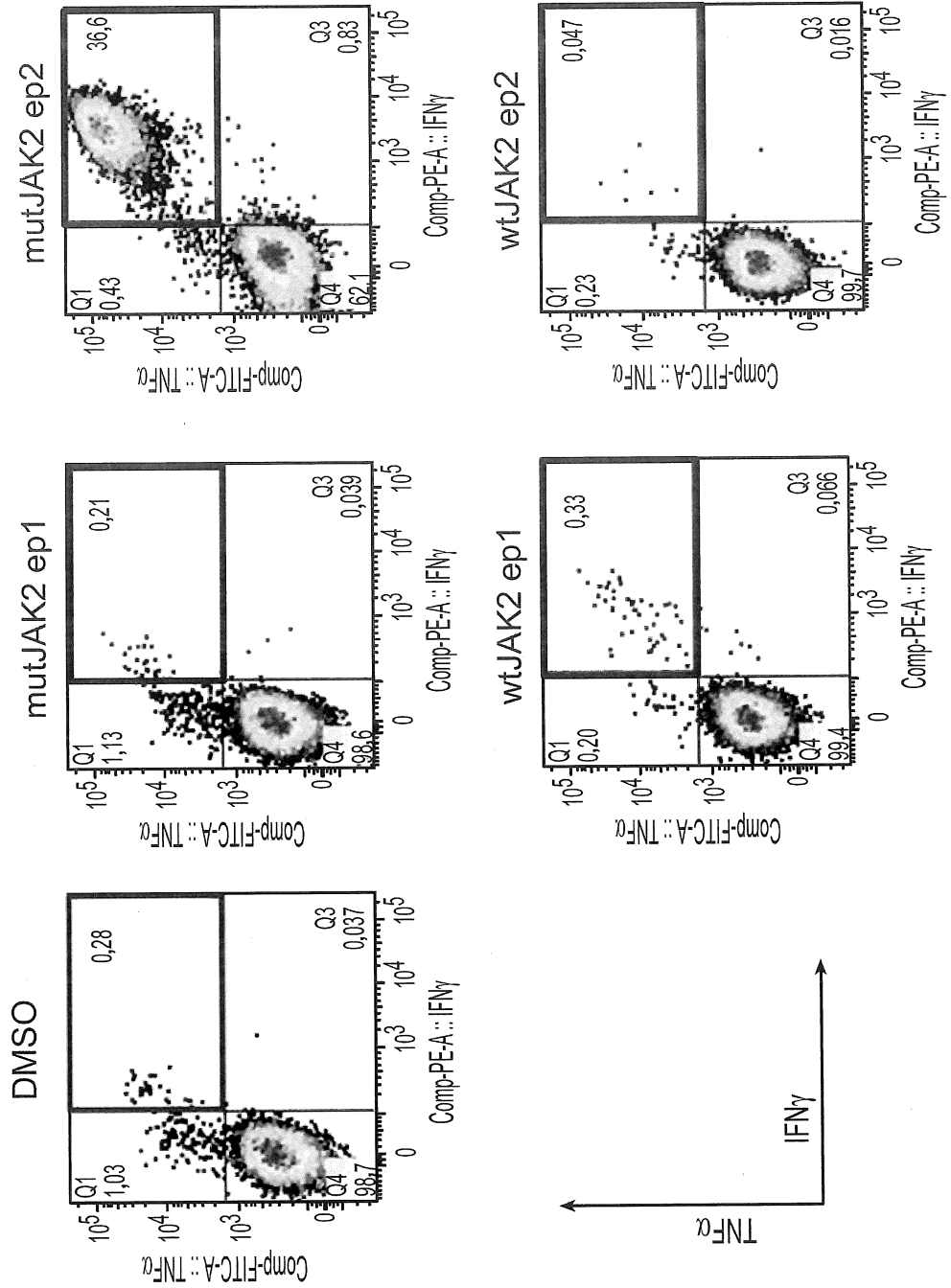
13. Vectơ theo điểm 12, trong đó vectơ adenovirut được chọn từ hAd5, hAd7, hAd11, hAd26, hAd34, hAd35, hAd48, hAd49, hAd50, GAd20, GAd19, GAd21, GAd25, GAd26, GAd27, GAd28, GAd29, GAd30, GAd31, ChAd3, ChAd4, ChAd5, ChAd6, ChAd7, ChAd8, ChAd9, ChAd10, ChAd11, ChAd16, ChAd17, ChAd19, ChAd20, ChAd22, ChAd24, ChAd26, ChAd30, ChAd31, ChAd37, ChAd38, ChAd44, ChAd55, ChAd63, ChAd73, ChAd82, ChAd83, ChAd146, ChAd147, PanAd1, PanAd2, và PanAd3.

14. Vectơ theo điểm 12, trong đó vectơ poxvirut được chọn từ vectơ virut bệnh đậu mùa, vectơ virut vaccinia, vectơ virut bệnh đậu mùa ở bò (cowpox), monkeypox virus

vector virus bệnh đậu mùa ở khỉ (monkeypox), vector virus vaccinia Copenhagen, vector virus giảm độc lực New York (New York Attenuated Vaccinia Virus, NYVAC), và vector Vaccinia Ankara biến đổi (Modified Vaccinia Ankara, MVA).

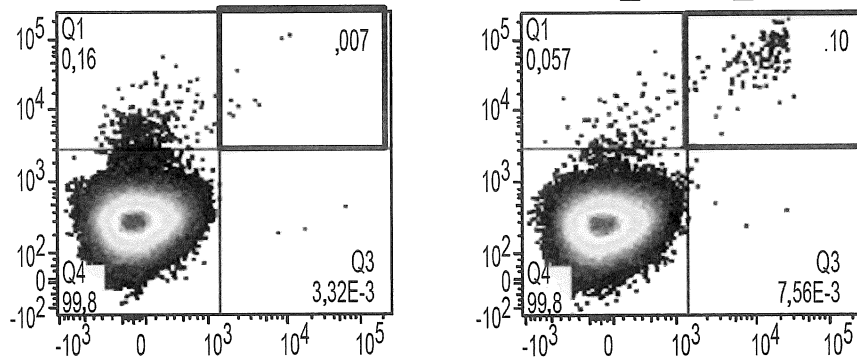
15. Vector theo điểm 12, trong đó vector là vector adenovirus.
16. Vector theo điểm 12, trong đó vector là phân tử ARN tự sao chép.
17. Vector theo điểm 11, trong đó vector là vector Ad26 và trong đó polynucleotit mã hóa polypeptit có SEQ ID NO: 10.
18. Vector theo điểm 11, trong đó vector là vector MVA và trong đó polynucleotit mã hóa polypeptit có SEQ ID NO: 31.
19. Vector theo điểm 11, trong đó vector là vector GAd20 và trong đó polynucleotit mã hóa polypeptit có SEQ ID NO: 31.
20. Vector theo điểm 11, trong đó vector là phân tử ARN tự sao chép và trong đó polynucleotit mã hóa polypeptit có SEQ ID NO: 12.
21. Vector bao gồm polynucleotit theo điểm 8.
22. Vector theo điểm 21, trong đó polynucleotit bao gồm SEQ ID NO: 27.
23. Vector theo điểm 22, trong đó vector là vector Ad26 hoặc vector MVA.
24. Dược phẩm bao gồm polynucleotit theo điểm 1.
25. Dược phẩm bao gồm vector theo điểm 11.
26. Dược phẩm theo điểm 25, trong đó vector được chọn từ vector Ad26, vector MVA, vector GAd20, phân tử ARN tự sao chép, hoặc sự kết hợp của chúng.

HÌNH 1



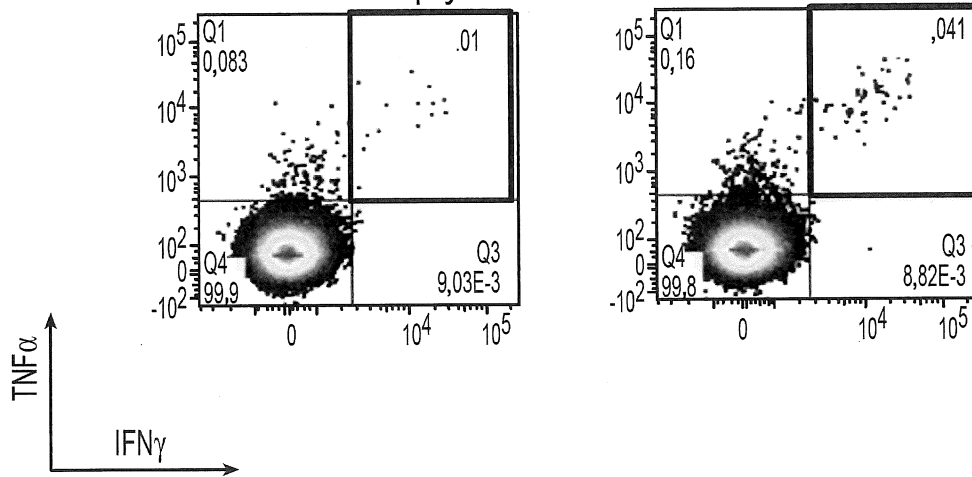
HÌNH 2

CD4+ Ad26 Empty Ad26.LS_CALR_JAK2-2X9mer

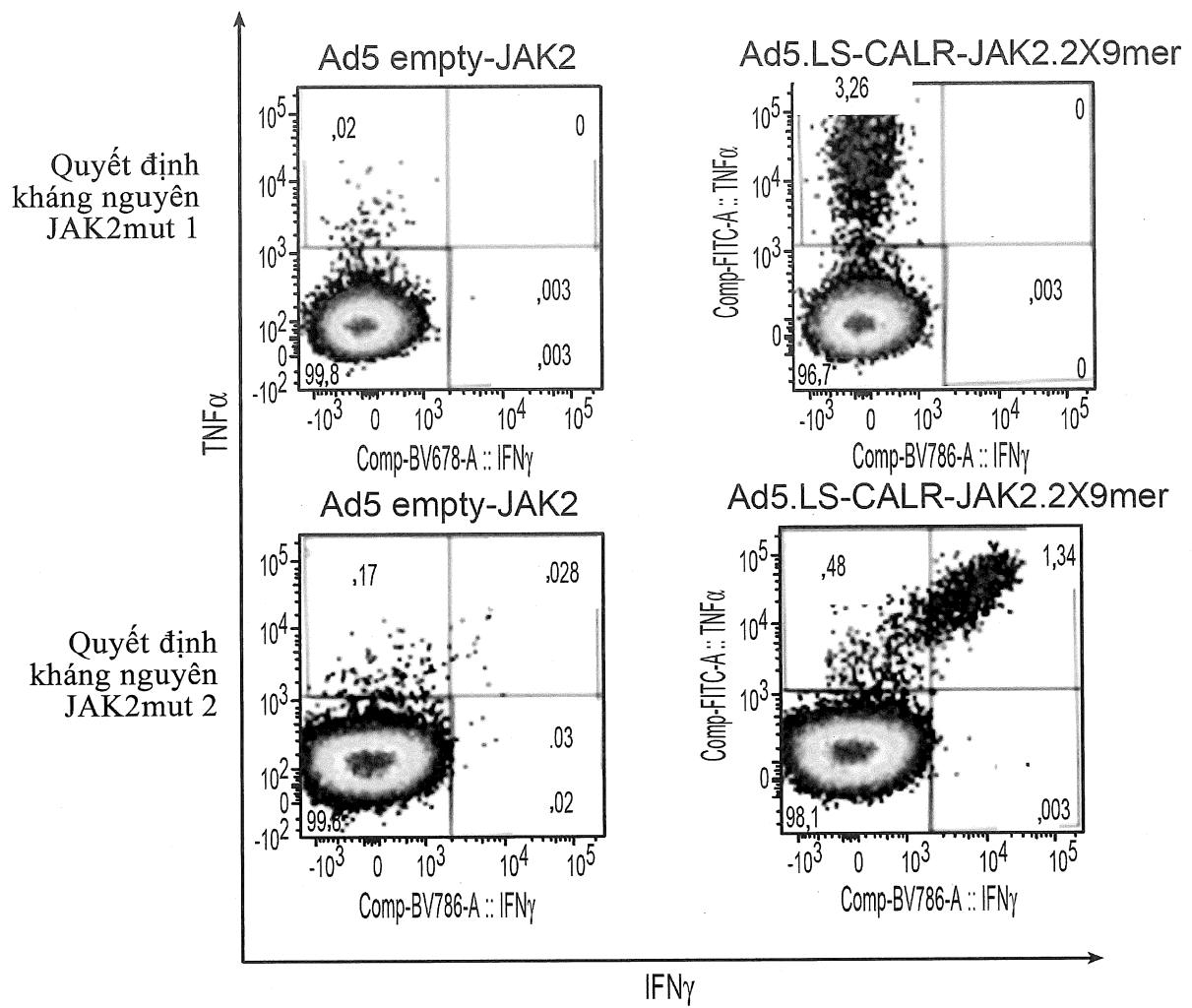


CD8+

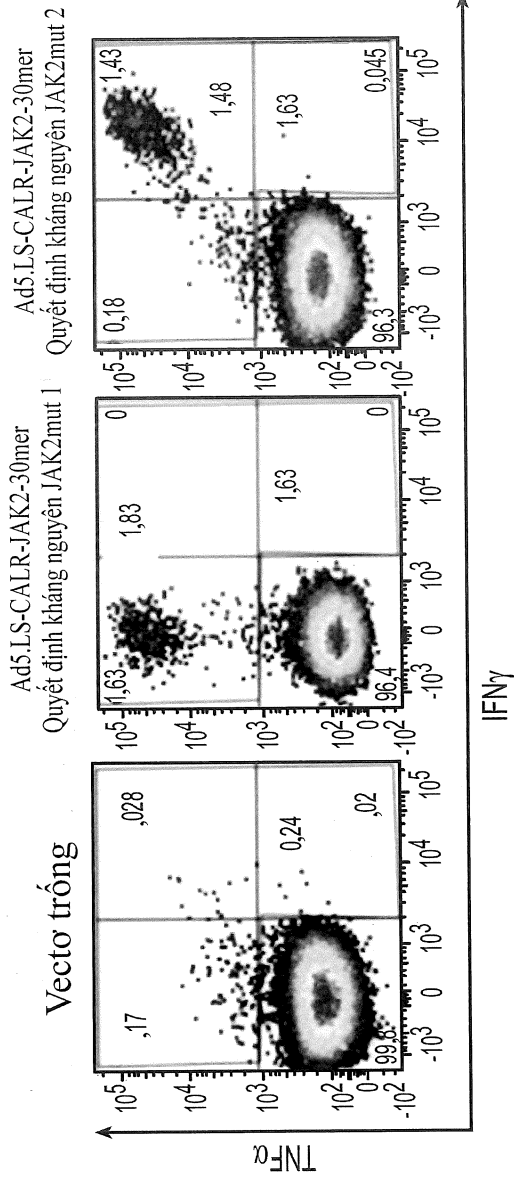
Ad26 Empty Ad26.LS_CALR_JAK2-2X9mer



HÌNH 3

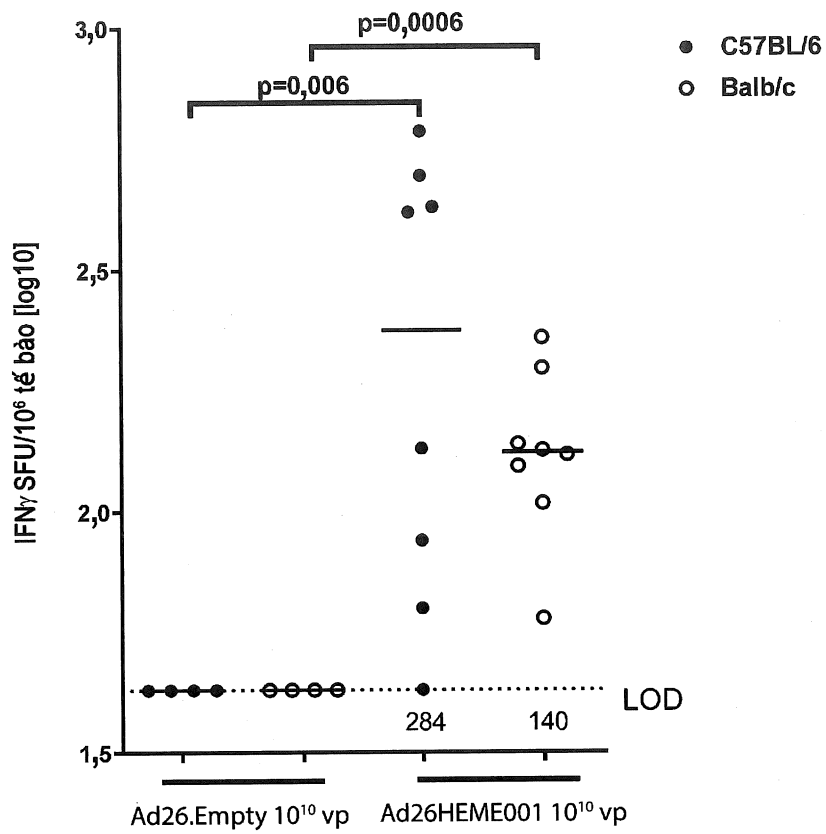


HÌNH 4



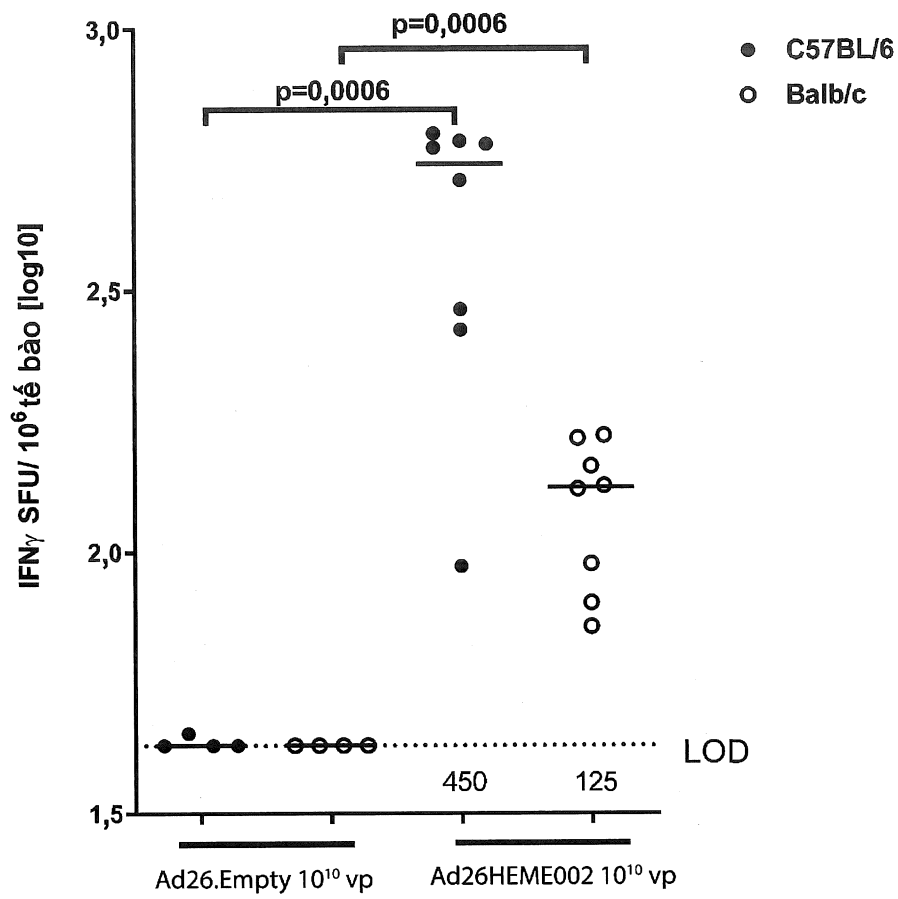
HÌNH 5

Nhóm peptit HEME001

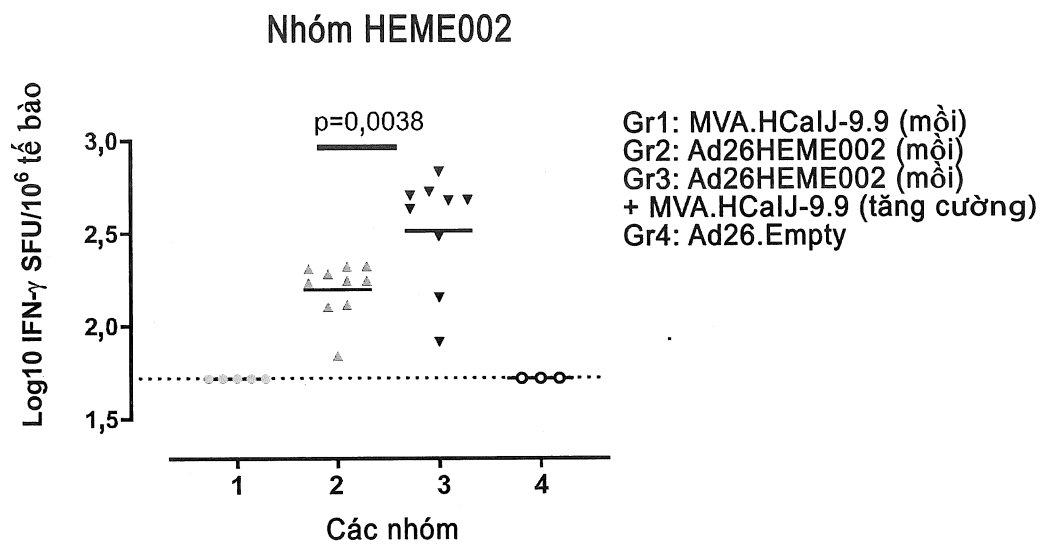


HÌNH 6

Nhóm peptit HEME002

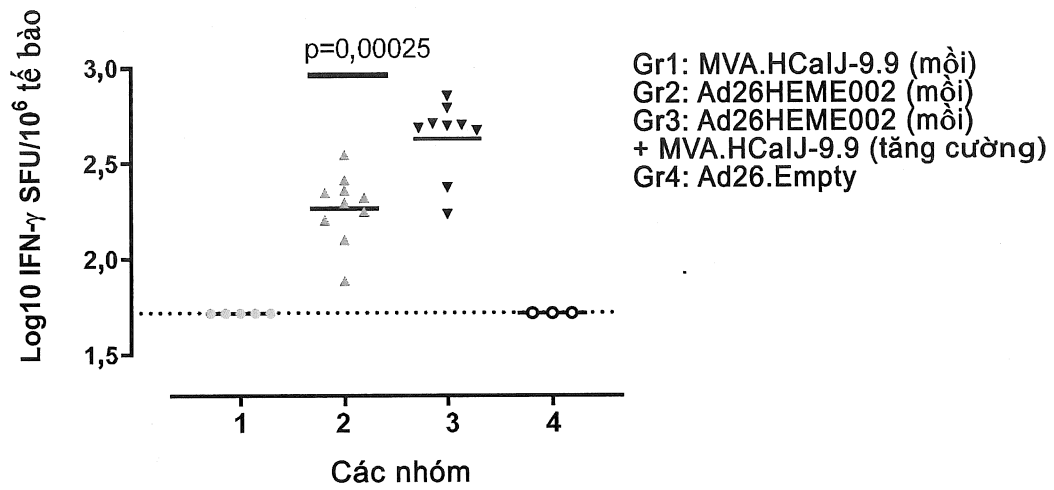


HÌNH 7

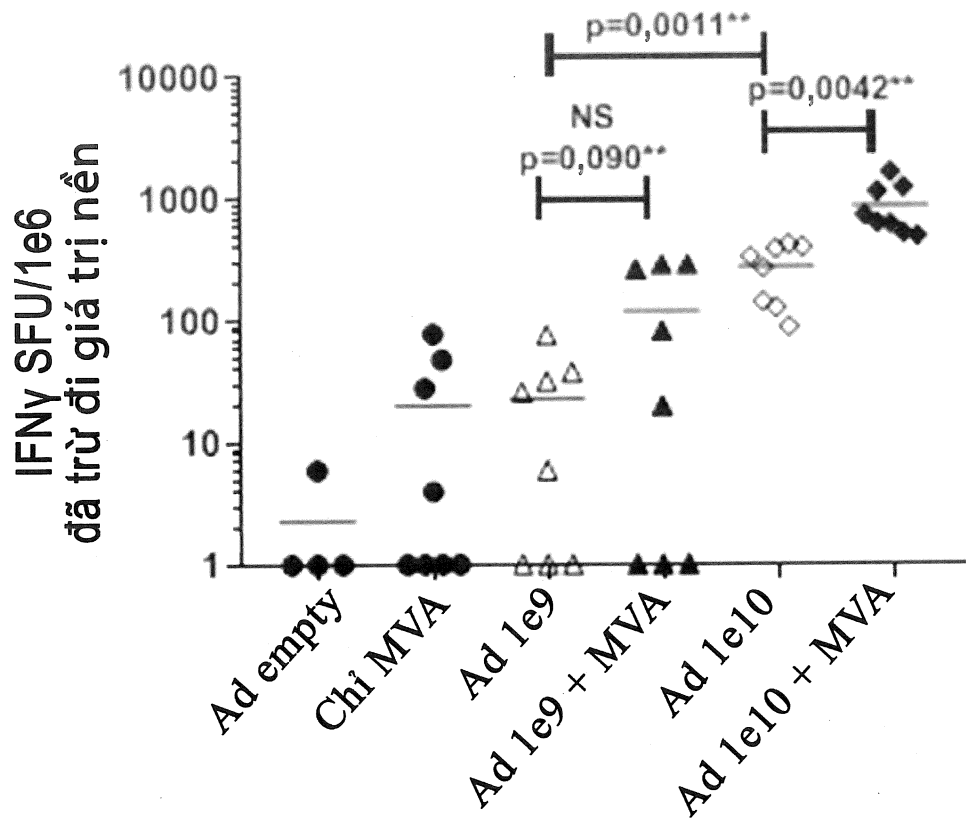


HÌNH 8

Nhóm CaIR

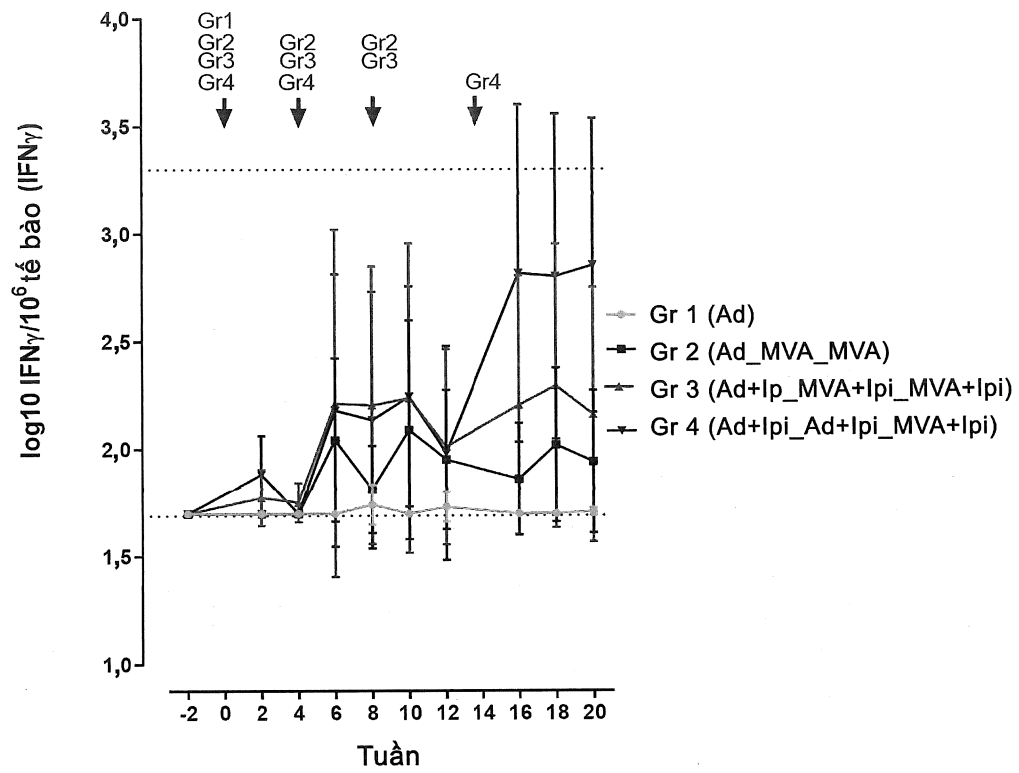


HÌNH 9

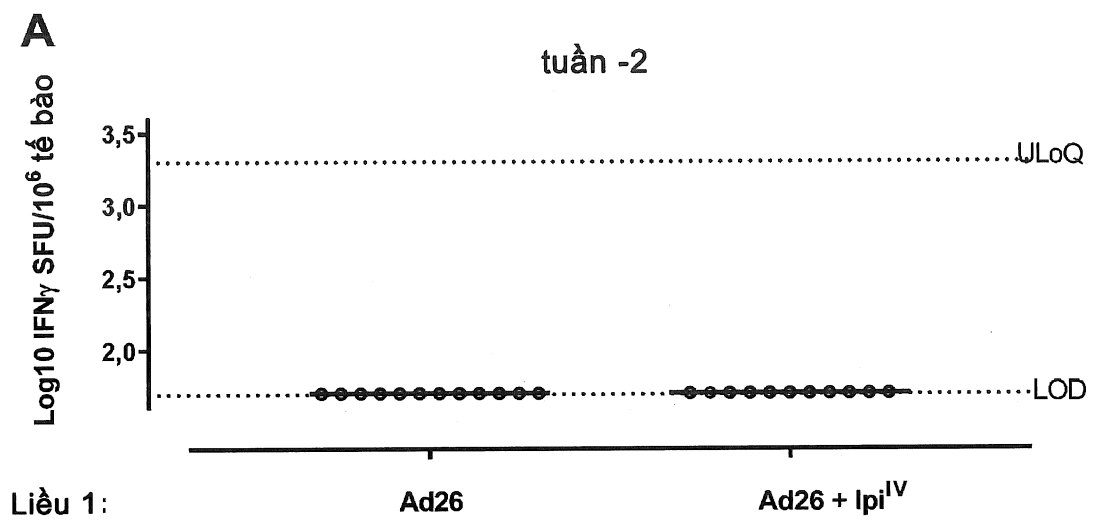


HÌNH 10

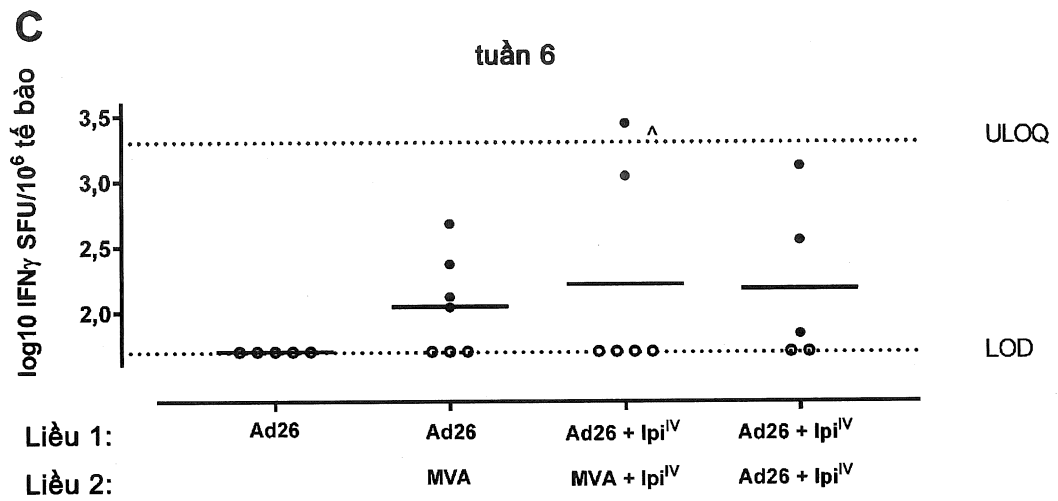
Nhóm peptit HEME002



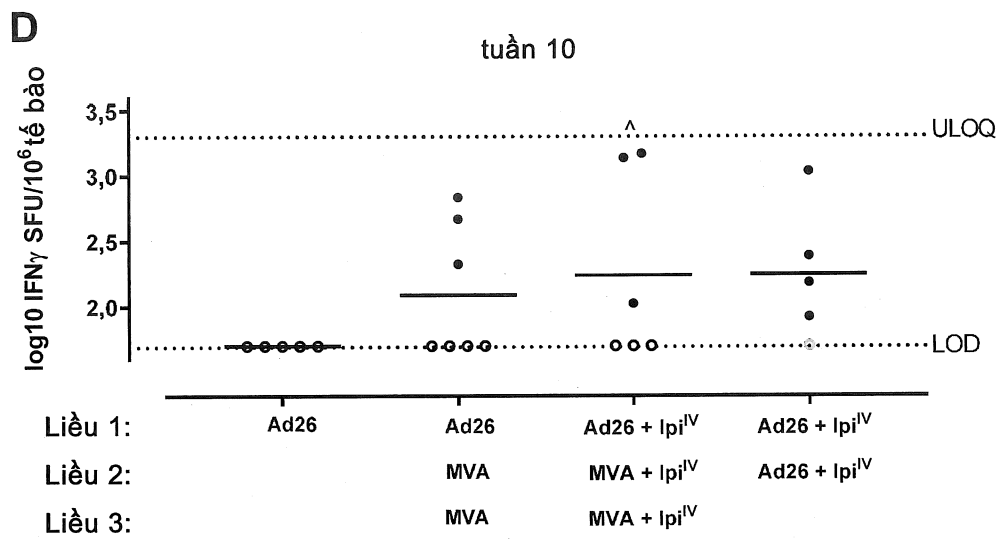
HÌNH 11



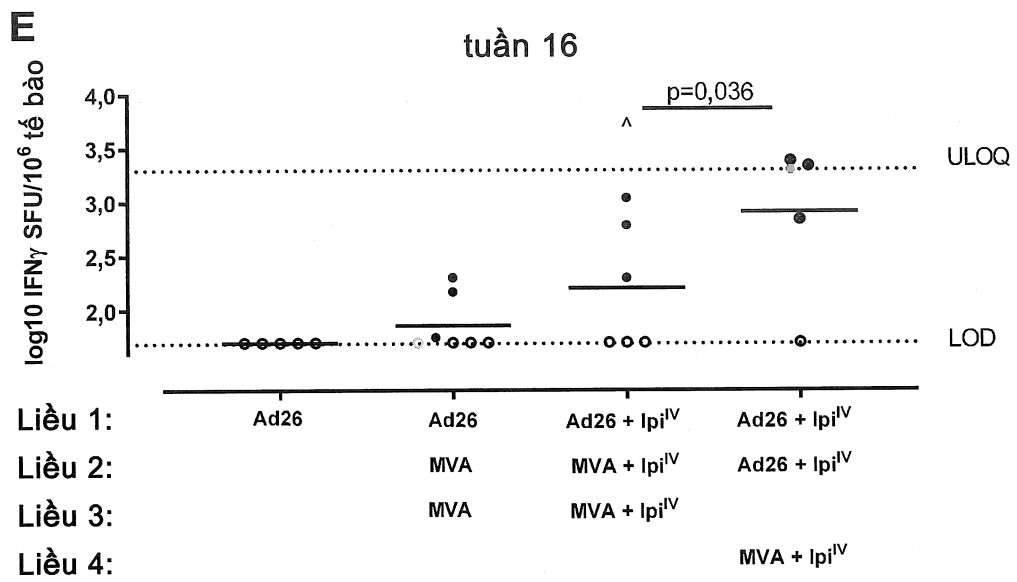
HÌNH 13



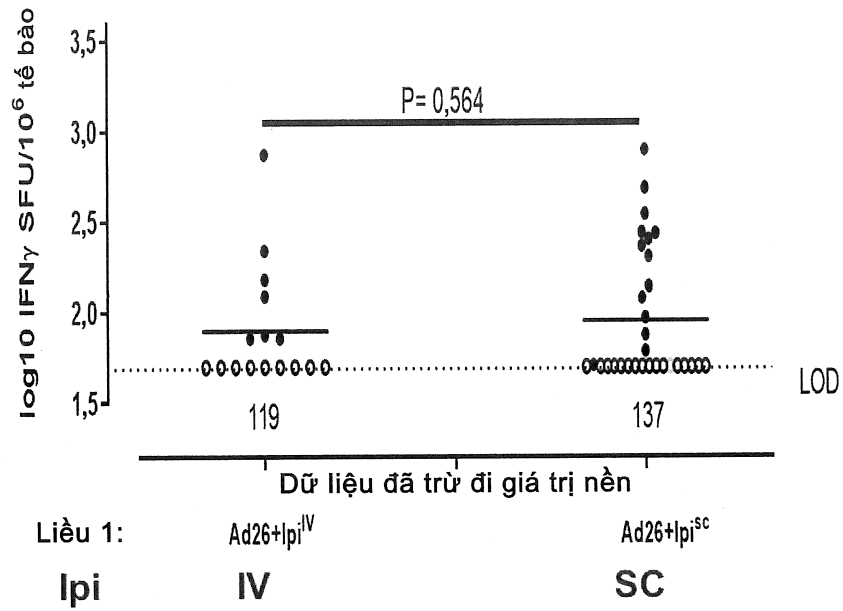
HÌNH 14



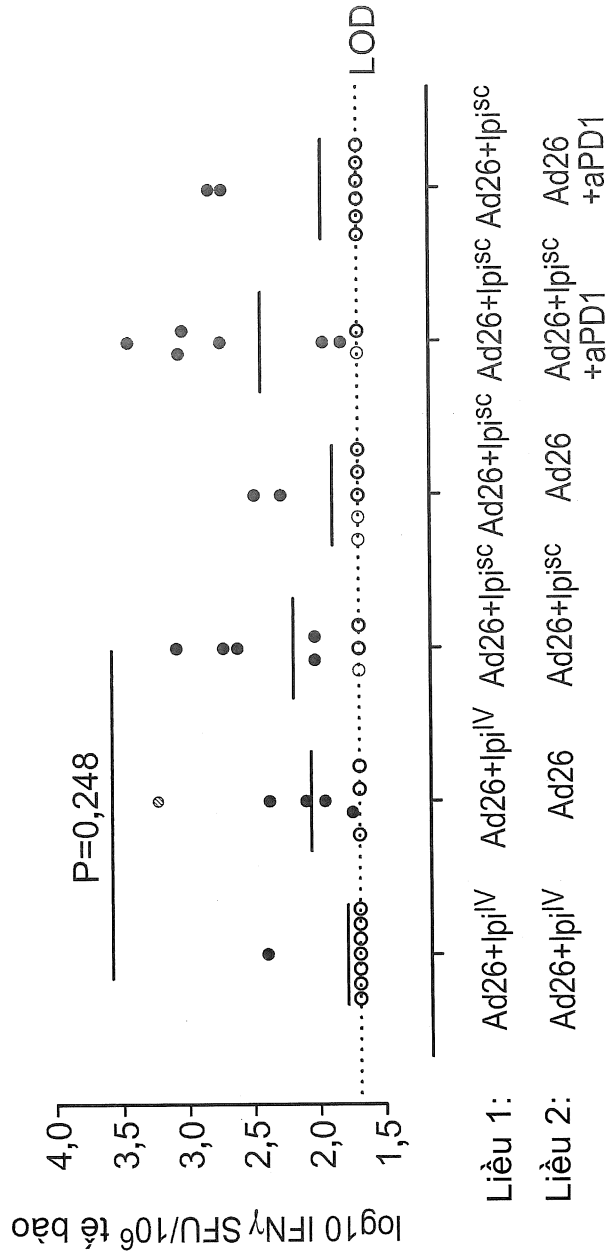
HÌNH 15



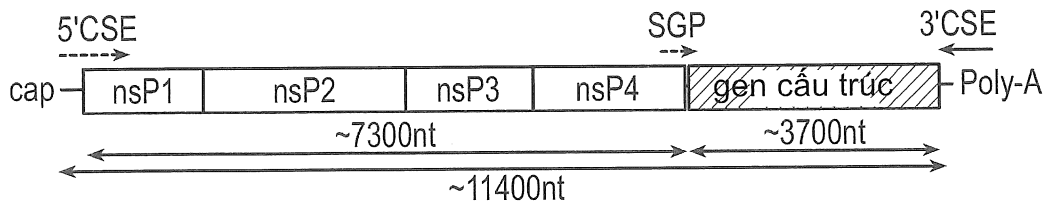
HÌNH 16



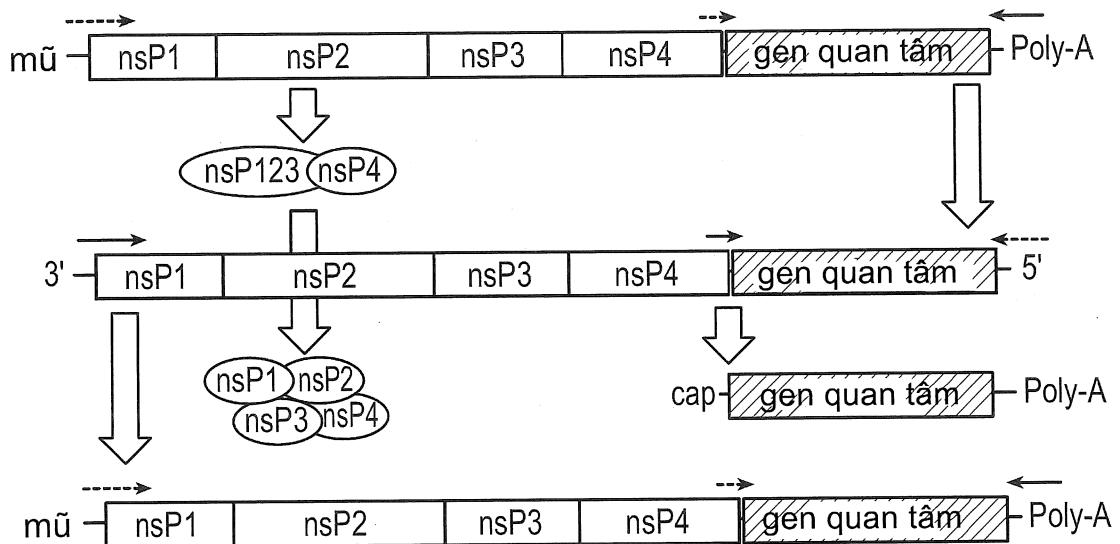
HÌNH 17



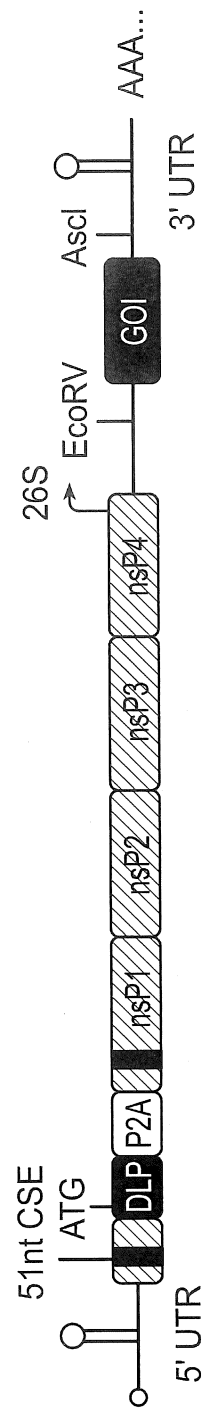
HÌNH 18A



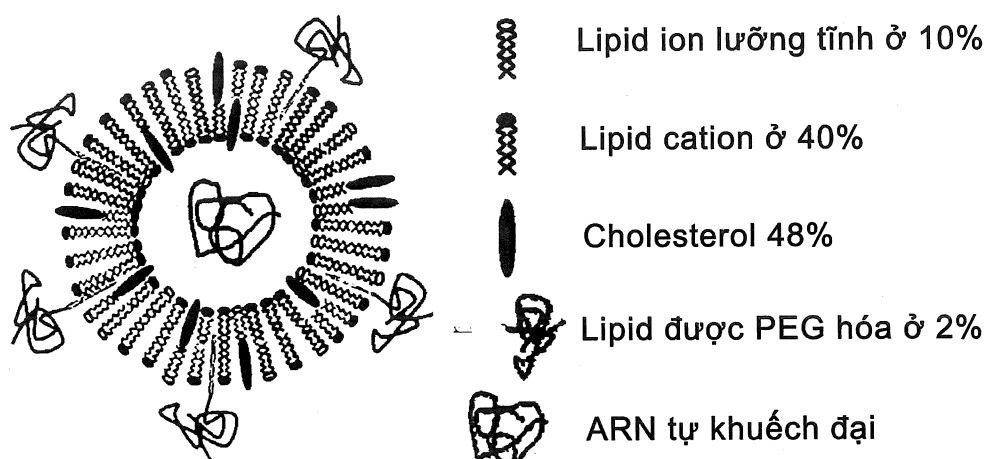
HÌNH 18B



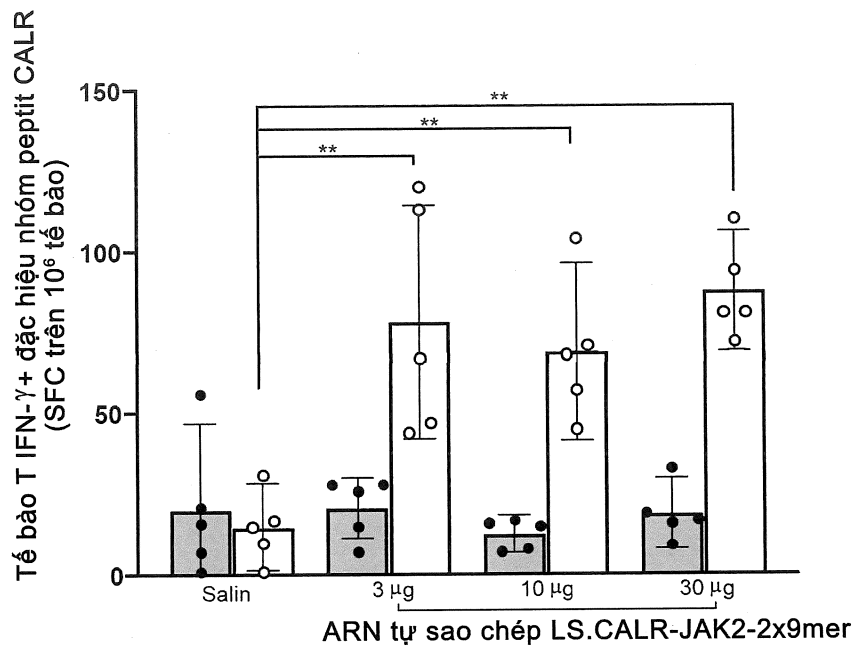
HÌNH 19



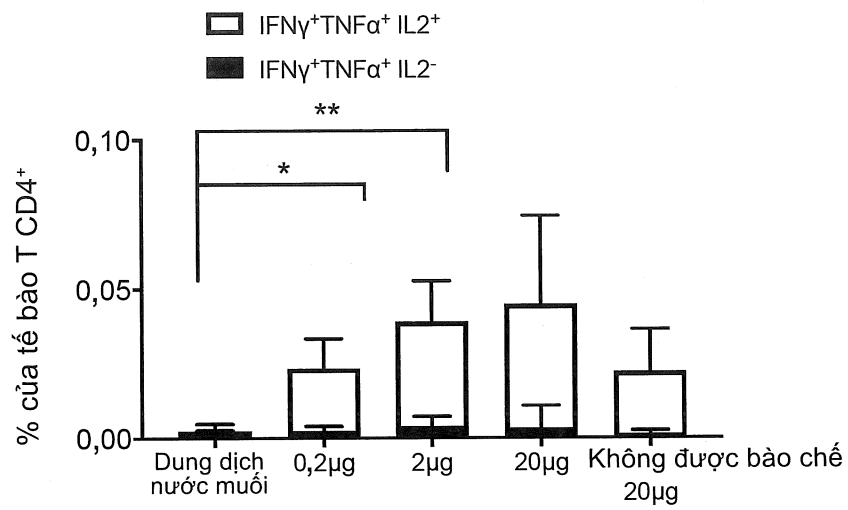
HÌNH 20



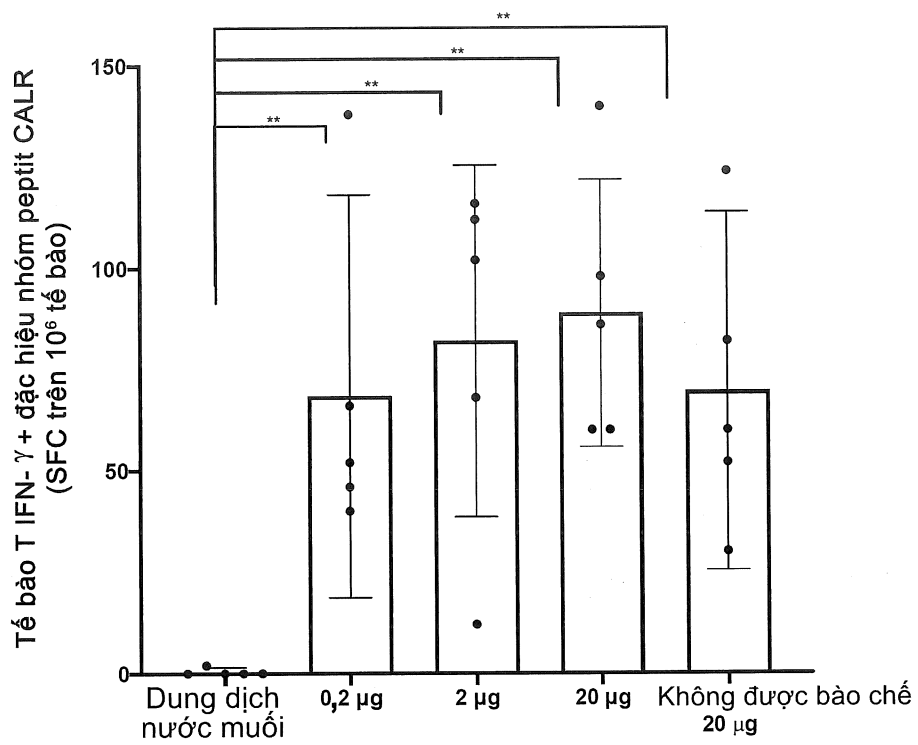
HÌNH 21A



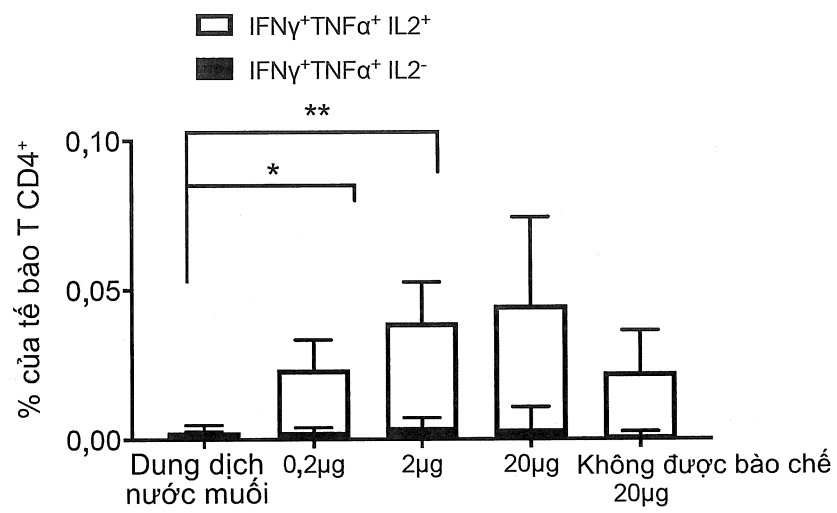
HÌNH 21B



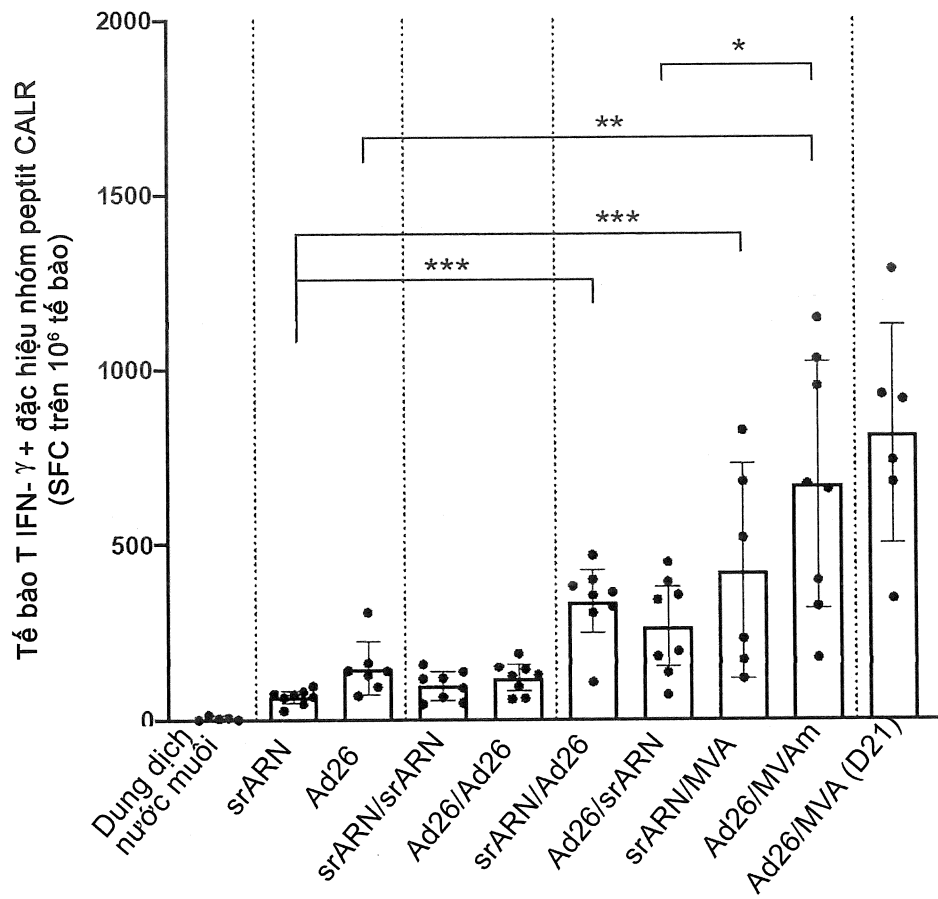
HÌNH 22A



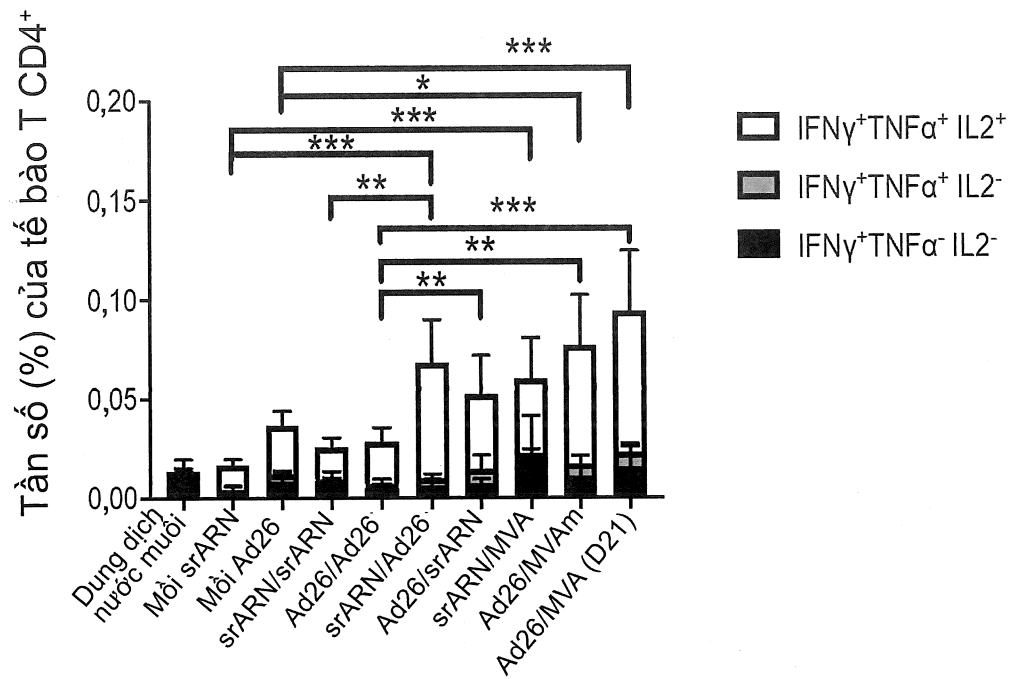
HÌNH 22B



HÌNH 23A



HÌNH 23B



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> JANSSEN BIOTECH, INC.

<120> POLYNUCLEOTIT, VECTO BAO GỒM POLYNUCLEOTIT, VÀ DƯỢC PHẨM BAO GỒM CHÚNG

<130> JBI6177WOPCT1

<140>

<141>

<150> 62/936,841

<151> 2019-11-18

<150> 62/936,846

<151> 2019-11-18

<160> 54

<170> Phiên bản sáng chế 3.5

<210> 1

<211> 54

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 1

Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg
1 5 10 15

Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg
20 25 30

Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys
35 40 45

Leu Gln Gly Trp Thr Glu
50

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 2

Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met Arg Thr Lys
1 5 10

<210> 3

<211> 71

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 3
 Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg
 1 5 10 15

Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg
 20 25 30

Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys
 35 40 45

Leu Gln Gly Trp Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys
 50 55 60

Arg Arg Met Met Arg Thr Lys
 65 70

<210> 4
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 4
 Lys Leu Ser His Lys His Leu Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys
 1 5 10 15

Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val Gln Glu Phe Val Lys Phe Gly
 20 25 30

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 5
 Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 6

Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val
1 5

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 7

Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys Ala Ala Tyr Phe Cys Gly Asp
1 5 10 15

Glu Asn Ile Leu Val
20

<210> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 8

Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu
1 5 10 15

Glu Phe Ser Met Ala
20

<210> 9

<211> 92

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 9

Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu
1 5 10 15

Glu Phe Ser Met Ala Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr
20 25 30

Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr

35

40

45

Arg Arg Lys Met Arg Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser
 50 55 60

Cys Arg Glu Ala Cys Leu Gln Gly Trp Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met Arg Thr Lys
 85 90

<210> 10

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 10

Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu
 1 5 10 15

Glu Phe Ser Met Ala Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr
 20 25 30

Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr
 35 40 45

Arg Arg Lys Met Arg Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser
 50 55 60

Cys Arg Glu Ala Cys Leu Gln Gly Trp Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Val
 85 90 95

Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys Ala Ala Tyr Phe Cys Gly Asp Glu
 100 105 110

Asn Ile Leu Val
 115

<210> 11

<211> 125

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 11

Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu
 1 5 10 15

Glu Phe Ser Met Ala Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr
 20 25 30

Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr
 35 40 45

Arg Arg Lys Met Arg Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser
 50 55 60

Cys Arg Glu Ala Cys Leu Gln Gly Trp Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Lys
 85 90 95

Leu Ser His Lys His Leu Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys Gly
 100 105 110

Asp Glu Asn Ile Leu Val Gln Glu Phe Val Lys Phe Gly
 115 120 125

<210> 12

<211> 95

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 12

Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg
 1 5 10 15

Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg
 20 25 30

Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys
 35 40 45

Leu Gln Gly Trp Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys
 50 55 60

Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Val Leu Asn Tyr Gly Val
65 70 75 80

Cys Phe Cys Ala Ala Tyr Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val
85 90 95

<210> 13

<211> 104

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 13

Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg
1 5 10 15

Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg
20 25 30

Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys
35 40 45

Leu Gln Gly Trp Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys
50 55 60

Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Lys Leu Ser His Lys His
65 70 75 80

Leu Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu
85 90 95

Val Gln Glu Phe Val Lys Phe Gly
100

<210> 14

<211> 171

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 14

Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys
 35 40 45

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu
 50 55 60

Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Val Arg Lys Asp Lys
 65 70 75 80

Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Met Arg
 85 90 95

Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg Arg Lys Met Ser
 100 105 110

Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys Leu Gln Gly Trp
 115 120 125

Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met
 130 135 140

Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys Ala
 145 150 155 160

Ala Tyr Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val
 165 170

<210> 15

<211> 180

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 15

Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
 1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
 20 25 30

Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys
 35 40 45

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu
 50 55 60

Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Val Arg Lys Asp Lys
65 70 75 80

Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Met Arg
85 90 95

Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg Arg Lys Met Ser
100 105 110

Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys Leu Gln Gly Trp
115 120 125

Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met
130 135 140

Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Lys Leu Ser His Lys His Leu Val Leu Asn
145 150 155 160

Tyr Gly Val Cys Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val Gln Glu Phe
165 170 175

Val Lys Phe Gly
180

<210> 16

<211> 276

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 16

atggcatgcc caggcttctt gtggggccctg gtcacacagca cctgtctgga gttttccatg 60

gccatgaagg acaagcagga tgaggagcag cggacccgga gaatgatgag gacaaagatg 120

cgcatgaggg ccatgcggag aacaaggcgc aagatgcgga gaaagatgtc tccagcaagg 180

cctagaacca gctgcaggga ggcattgtctg cagggatgga cagaggcagc atacgaggag 240

gcagaggaca actgcaggcg catgatgagg accaag 276

<210> 17

<211> 348

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 17
 atggcatgcc caggcttcct gtgggccctg gtcacacagca cctgtctgga gttttccatg 60
 gccatgaagg acaagcagga tgaggagcag cggacccgga gaatgatgag gacaaagatg 120
 cgcatgaggc gcatgcggag aacaaggcgc aagatgcgga gaaagatgtc tccagcaagg 180
 cctagaacca gctgcaggga ggcatgtctg cagggatgga cagaggcagc atacgaggag 240
 gcagaggaca actgcaggcg catgatgagg accaaggccg cctacgtgct gaattatggc 300
 gtgtgcttct gtgccgccta tttttgtggc gatgagaaca tcctggtg 348

<210> 18
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 18
 atggcatgcc caggcttcct gtgggccctg gtcacacagca cctgtctgga gttttccatg 60
 gccatgaagg acaagcagga tgaggagcag cggacccgga gaatgatgag gacaaagatg 120
 cgcatgaggc gcatgcggag aacaaggcgc aagatgcgga gaaagatgtc tccagcaagg 180
 cctagaacca gctgcaggga ggcatgtctg cagggatgga cagaggcagc atacgaggag 240
 gcagaggaca actgcaggcg catgatgagg accaaggccg cctacaagct gagccacaag 300
 cacctggtgc tgaactatgg cgtgtgcttc tgtggcgatg agaatatcct ggtgcaggag 360
 ttcgtgaagt ttggc 375

<210> 19
 <211> 285
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 19
 atgaaggaca agcaggatga ggagcagcgg acccggagaa tgatgaggac aaagatgcgc 60
 atgaggcgca tgcggagaac aaggcgcaag atgcggagaa agatgtctcc agcaaggcct 120
 agaaccagct gcagggaggc atgtctgcag ggatggacag aggcagcata cgaggaggca 180
 gaggacaact gcaggcgcac gatgaggacc aaggccgcct acgtgctgaa ttatggcgtg 240
 tgcttctgtg ccgcctatct ttgtggcgat gagaacatcc tgggtg 285

<210> 20
 <211> 312
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 20

atgaaggaca agcaggatga ggagcagcgg acccgagaa tgatgaggac aaagatgcgc	60
atgaggcgca tgcggagaac aaggcgcaag atgcggagaa agatgtctcc agcaaggcct	120
agaaccagct gcagggaggc atgtctgcag ggatggacag aggcagcata cgaggaggca	180
gaggacaact gcaggcgcac gatgaggacc aaggccgctt acaagctgag ccacaagcac	240
ctggtgctga actatggcgt gtgcttctgt ggcgatgaga atatcctggt gcaggagtgc	300
gtgaagtttg gc	312

<210> 21

<211> 513

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 21

atgcagatct tcgtgaagac cctgacaggc aagaccatca cactggaggt ggagccctcc	60
gacaccatcg agaacgtgaa ggccaagatc caggacaagg agggcatccc ccctgatcag	120
cagcggctga tctttgccgg caagcagctg gaggacggca gaaccctgtc tgattacaat	180
atccagaagg agagcacact gcacctggtg ctgcggctga gaggcgtgag gaaggacaag	240
caggatgagg agcagcgcac ccggagaatg atgcggacaa agatgagaat gaggcgcatg	300
cggagaacca ggcgcaagat gcggagaaag atgagcccag caaggccacg cacctcctgc	360
agggaggcat gtctgcaggg atggacagag gcagcctatg aggaggccga ggacaactgc	420
aggcgcctga tgcggacaaa ggccgcctac gtgctgaatt atggcgtgtg cttctgtgcc	480
gcctatTTTT gtggcgatga gaacatcctg gtg	513

<210> 22

<211> 546

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 22

atgcagatct tcgtgaagac cctgacaggc aagaccatca cactggaggt ggagccctcc	60
gacaccatcg agaacgtgaa ggccaagatc caggacaagg agggcatccc ccctgatcag	120
cagcggctga tctttgccgg caagcagctg gaggacggca gaaccctgtc tgattacaat	180

atccagaagg agagcacact gcacctggtg ctgcggtga gaggcgtgag gaaggacaag 240
 caggatgagg agcagcgcac ccggagaatg atgcggacaa agatgagaat gaggcgcatg 300
 cggagaacca ggcgcaagat gcggagaaaag atgagcccag caaggccacg cacctcctgc 360
 agggaggcat gtctgcaggg atggacagag gcagcctatg aggaggccga ggacaactgc 420
 aggcgcatga tgcggacaaa ggccgcctac aagctgtctc acaagcacct ggtgctgaac 480
 tatggcgtgt gcttctgtgg cgatgagaat atcctggtgc aggagtctgt gaagtttggc 540
 tgataa 546

<210> 23

<211> 1417

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 23

tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
 ttggccattg catacgttgt atccatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
 aacattaccg ccattgtgac attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
 gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
 gcctggctga ccgccaacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
 agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360
 ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtacg cccctattg acgtcaatga 420
 cggtaaattg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttatgggact ttctacttg 480
 gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacat 540
 caatgggctg gtagtagcgt ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
 caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc 660
 cgccccattg acgcaaattg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc 720
 tctccctatc agttagatag atctccctat cagttagataga gatcgtcgac gagctcgttt 780
 agtgaaccgt cagatcgctt ggagacgcca tccacgctgt ttgacctcc atagaagaca 840
 ccgggaccga tccagcctcc gcggccggga acggtgcatt ggatctagag ccaccatggc 900
 atgcccaggc ttctgtggtg ccctggtcat cagcacctgt ctggagtttt ccatggccat 960
 gaaggacaag caggatgagg agcagcggac ccggagaatg atgaggacaa agatgcgcat 1020
 gaggcgcatg cggagaacaa ggcgcaagat gcggagaaaag atgtctccag caaggcctag 1080

aaccagctgc agggaggcat gtctgcaggg atggacagag gcagcatacg aggaggcaga 1140
 ggacaactgc aggcgcatga tgaggaccaa ggccgcctac aagctgagcc acaagcacct 1200
 ggtgctgaac tatggcgtgt gcttctgtgg cgatgagaat atcctgggtgc aggagtctgt 1260
 gaagtttggc tgataaggta ccatccgaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa 1320
 taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt 1380
 ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtct 1417

<210> 24

<211> 1390

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 24

tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
 ttggccattg catacgttgt atccatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
 aacattaccg ccatggtgac attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
 gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
 gcctggctga ccgccaacg acccccggcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
 agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360
 ccacttgga gtacatcaag tgtatcatat gccaagtacg ccccctattg acgtcaatga 420
 cggtaaattg cccgcctggc attatgcccc gtacatgacc ttatgggact ttctacttg 480
 gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt ggcagtacat 540
 caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
 caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc 660
 cgccccattg acgcaaattg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata taagcagagc 720
 tctccctatc agtgateagag atctccctat cagtgateaga gatcgtcgac gagctcgttt 780
 agtgaaccgt cagatcgctt ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca 840
 ccgggaccga tccagcctcc gcggccggga acggtgcatt ggatctagag ccaccatggc 900
 atgcccaggc ttctgttggg ccctggtcat cagcacctgt ctggagtttt ccatggccat 960
 gaaggacaag caggatgagg agcagcggac ccggagaatg atgaggacaa agatgcgcat 1020
 gaggcgcatg cggagaacaa ggcgcaagat gcggagaaag atgtctccag caaggcctag 1080
 aaccagctgc agggaggcat gtctgcaggg atggacagag gcagcatacg aggaggcaga 1140
 ggacaactgc aggcgcatga tgaggaccaa ggccgcctac gtgctgaatt atggcgtgtg 1200

cttctgtgcc gcctatTTTT gtggcgatga gaacatcctg gtgtgataag gtaccatccg 1260
 aacttgTTTA ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca 1320
 aataaagcat ttttttcaact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct 1380
 tatcatgtct 1390

<210> 25
 <211> 549
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 25
 gatcactaat tccaaacca cccgctTTTT atagtaagtt tttcacccat aaataataaa 60
 tacaataatt aatttctcgt aaaagtagaa aatatattct aatttattgc acggtaagga 120
 agtagaatca taaagaacag tgacggatcc cgcgacttcg ccgcatggg ccagaaggaa 180
 cagattcata cgcttcagaa aaattctgaa cgaatgtcaa agcaattgac acgaagttct 240
 caggcagtaa tgaaggacaa acaagacgaa gaacaacgaa ctaggcggat gatgaggact 300
 aagatgagga tgcggaggat gagacggacg cgacgcaaga tgcgccggaa aatgtctccc 360
 gcccgccaa ggacgtcttg tcggaagcc tgtttgcagg gctggaccga agcagcttac 420
 gaagaagcag aagacaattg tcggcgaatg atgagaacga aggctgctta cgtgcttaac 480
 tatggagtgt gcttctgcgc tgcctatttc tgcggagatg agaacattct ggtgtagtaa 540
 aggcgcgcc 549

<210> 26
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 26
 atgggccaga agaacagat tcatacgctt cagaaaaatt ctgaacgaat gtcaaagcaa 60
 ttgacacgaa gttctcaggc agtaatgaag gacaaacaag acgaagaaca acgaactag 120
 cggatgatga ggactaagat gaggatgcgg aggatgagac ggacgcgacg caagatgcgc 180
 cggaaaatgt ctcccgcccg gccaaaggac tcttgtcggg aagcctgttt gcagggctgg 240
 accgaagcag cttacgaaga agcagaagac aattgtcggc gaatgatgag aacgaaggct 300
 gcttacgtgc ttaactatgg agtgtgcttc tgcgctgcct atttctgcgg agatgagaac 360

attctggtg

369

<210> 27

<211> 284

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 27

atgaaggaca aacaagacga agaacaacga actaggcgga tgatgaggac taagatgagg 60

atgcgaggga tgagacggac gcgacgcaag atgcgccgga aaatgtctcc cgcccggcca 120

aggacgtctt gtcgggaagc ctgtttgcag ggctggaccg aagcagctta cgaagaagca 180

gaagacaatt gtcggcgaat gatgagaacg aaggctgctt acgtgcttaa ctatggagtg 240

tgcttctgcg ctgcctattt ctgcgagat gagaacattc tggt 284

<210> 28

<211> 21

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 28

Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val Ala Ala Tyr Phe Cys Gly Asp
1 5 10 15Glu Asn Ile Leu Val
20

<210> 29

<211> 28

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 29

Met Gly Gln Lys Glu Gln Ile His Thr Leu Gln Lys Asn Ser Glu Arg
1 5 10 15Met Ser Lys Gln Leu Thr Arg Ser Ser Gln Ala Val
20 25

<210> 30

<211> 84

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 30

atgggccaga aggaacagat tcatacgctt cagaaaaatt ctgaacgaat gtcaaagcaa 60

ttgacacgaa gttctcaggc agta 84

<210> 31

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 31

Met Gly Gln Lys Glu Gln Ile His Thr Leu Gln Lys Asn Ser Glu Arg
1 5 10 15Met Ser Lys Gln Leu Thr Arg Ser Ser Gln Ala Val Met Lys Asp Lys
20 25 30Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Met Arg
35 40 45Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg Arg Lys Met Ser
50 55 60Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys Leu Gln Gly Trp
65 70 75 80Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met
85 90 95Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys Ala
100 105 110Ala Tyr Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val
115 120

<210> 32

<211> 149

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 32

gatcactaat tccaaaccca cccgcttttt atagtaagtt tttcacccat aaataataaa 60

tacaataatt aatttctcgt aaaagtagaa aatatattct aatttattgc acggtaagga 120
 agtagaatca taaagaacag tgacggatc 149

<210> 33
 <211> 10712
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 33
 taatacgact cactatagat aggcggcgca tgagagaagc ccagaccaat tacctacca 60
 aataggagaa agttcacgtt gacatcgagg aagacagccc attcctcaga gctttgcagc 120
 ggagcttccc gcagtttgag gtagaagcca agcaggtcac tgataatgac catgctaatg 180
 ccagagcgtt ttcgcatctg gttcaaaac tgatcgaac ggaggtggac ccatccgaca 240
 cgatccttga cattggaata gtcagcatag tacatttcat ctgactaata ctacaacacc 300
 accacatga atagaggatt ctttaacatg ctcgccgcc gcccttccc ggccccact 360
 gccatgtgga ggccgcggag aaggaggcag gcggccccg gaagcggagc tactaacttc 420
 agcctgctga agcaggctgg agacgtggag gagaaccctg gacctgagaa agttcacgtt 480
 gacatcgagg aagacagccc attcctcaga gctttgcagc ggagcttccc gcagtttgag 540
 gtagaagcca agcaggtcac tgataatgac catgctaatg ccagagcgtt ttcgcatctg 600
 gttcaaaac tgatcgaac ggaggtggac ccatccgaca cgatccttga cattggaagt 660
 gcgccccgcc gcagaatgta ttctaagcac aagtatcatt gtatctgtcc gatgagatgt 720
 gcggaagatc cggacagatt gtataagtat gcaactaagc tgaagaaaa ctgtaaggaa 780
 ataactgata aggaattgga caagaaaatg aaggagctcg ccgccgtcat gagcgaccct 840
 gacctgaaa ctgagactat gtgcctccac gacgacgagt cgtgtcgcta cgaagggcaa 900
 gtcgctgttt accaggatgt atacgcggtt gacggaccga caagtctcta tcaccaagcc 960
 aataagggag ttagagtcgc ctactggata ggctttgaca ccacccttt tatgtttaag 1020
 aacttggctg gagcatatcc atcactctt accaactggg ccgacgaaac cgtgttaacg 1080
 gctcgtaaca taggcctatg cagctctgac gttatggagc ggtcacgtag agggatgtcc 1140
 attcttagaa agaagtattt gaaaccatcc aacaatgttc tattctctgt tggctcgacc 1200
 atctaccacg agaagagga cttactgagg agctggcacc tgccgtctgt atttcaacta 1260
 cgtggcaagc aaaattacac atgtcgggtg gagactatag ttagttgca cgggtacgtc 1320
 gttaaaagaa tagctatcag tccaggcctg tatgggaagc cttcaggcta tgctgctacg 1380

atgcaccgcg agggattctt gtgctgcaaa gtgacagaca cattgaacgg ggagagggtc 1440
tcttttcccc tgtgacgta tgtgccagct acattgtgtg accaaatgac tggcatactg 1500
gcaacagatg tcagtgcgga cgacgcgcaa aaactgctgg ttgggctcaa ccagcgtata 1560
gtcgtcaacg gtcgcacca gagaaacacc aataccatga aaaattacct tttgcccgtata 1620
gtggcccagg catttgctag gtgggcaaag gaatataagg aagatcaaga agatgaaagg 1680
ccactaggac tacgagatag acagttagtc atgggggtgtt gttgggcttt tagaaggcac 1740
aagataacat ctatttataa gcgcccggat acccaaacca tcatcaaagt gaacagcgat 1800
ttccactcat tcgtgctgcc caggataggc agtaacacat tggagatcgg gctgagaaca 1860
agaatcagga aatgttaga ggagcacaag gagccgtcac ctctcattac cgccgaggac 1920
gtacaagaag ctaagtgcgc agccgatgag gctaaggagg tgcgtgaagc cgaggagtgtg 1980
cgcgagctc taccaccttt ggagctgat gttgaggagc ccactctgga agccgatgtc 2040
gacttgatgt tacaagaggc tggggccggc tcagtggaga cacctcgtgg cttgataaag 2100
gttaccagct acgatggcga ggacaagatc ggctcttacg ctgtgctttc tccgcaggct 2160
gtactcaaga gtgaaaaatt atcttgcatc caccctctcg ctgaacaagt catagtgata 2220
acacactctg gccgaaaagg gcgttatgcc gtggaacat accatggtaa agtagtggtg 2280
ccagagggac atgcaatacc cgtccaggac tttcaagctc tgagtgaaag tgccaccatt 2340
gtgtacaacg aacgtgagtt cgtaaacagg tacctgcacc atattgccac acatggagga 2400
gcgctgaaca ctgatgaaga atattacaaa actgtcaagc ccagcgagca cgacggcgaa 2460
tacctgtacg acatcgacag gaaacagtgc gtcaagaaag aactagtcac tgggctaggg 2520
ctcacaggcg agctggtgga tcctcccttc catgaattcg cctacgagag tctgagaaca 2580
cgaccagccg ctcttacc agtaccaacc ataggggtgt atggcgtgcc aggatcaggc 2640
aagtctggca tcattaaaag cgagtcacc aaaaagatc tagtggtgag cgccaagaaa 2700
gaaaactgtg cagaaattat aagggacgtc aagaaaatga aagggctgga cgtcaatgcc 2760
agaactgtgg actcagtgtc cttgaatgga tgcaaacacc ccgtagagac cctgtatatt 2820
gacgaagctt ttgcttgtca tgcaggtact ctgagagcgc tcatagccat tataagacct 2880
aaaaaggcag tgctctgcgg ggatcccaaa cagtgcgggt tttttaacat gatgtgcctg 2940
aaagtgcatt ttaaccacga gatttgcaca caagtcttcc acaaaagcat ctctcgccgt 3000
tgactaaat ctgtgacttc ggtcgtctca acctgtttt acgacaaaaa aatgagaacg 3060
acgaatccga aagagactaa gattgtgatt gacactaccg gcagtaccaa acctaagcag 3120
gacgatctca ttctcacttg tttcagaggg tgggtgaagc agttgcaaat agattacaaa 3180
ggcaacgaaa taatgacggc agctgcctct caagggtga cccgtaaagg tgtgtatgcc 3240

gttcggtaca aggtgaatga aaatcctctg tacgcaccca cctctgaaca tgtgaacgtc 3300
ctactgaccc gcacggagga ccgcatcgtg tggaaaacac tagccggcga cccatggata 3360
aaaacactga ctgccaagta ccctgggaat ttcactgcca cgatagagga gtggcaagca 3420
gagcatgatg ccatcatgag gcacatcttg gagagaccgg accctaccga cgtcttccag 3480
aataaggcaa acgtgtgttg ggccaaggct ttagtgccgg tgctgaagac cgctggcata 3540
gacatgacca ctgaacaatg gaacactgtg gattatcttg aaacggacaa agctcactca 3600
gcagagatag tattgaacca actatgcgtg aggttctttg gactcgatct ggactccggt 3660
ctatcttctg caccactgt tccgttatcc attaggaata atcactggga taactccccg 3720
tcgcctaaca tgtacgggct gaataaagaa gtggtccgtc agctctctcg caggtaccca 3780
caactgcctc gggcagttgc cactggaaga gtctatgaca tgaacactgg taaactgcgc 3840
aattatgatc cgcgcataaa cctagtacct gtaaacagaa gactgcctca tgctttagtc 3900
ctccaccata atgaacaccc acagagtgac ttttcttcat tcgtcagcaa attgaagggc 3960
agaactgtcc tgggtggtcgg ggaaaagttg tccgtcccag gcaaaatggt tgactggttg 4020
tcagaccggc ctgaggctac cttcagagct cggctggatt taggcatccc aggtgatgtg 4080
cccaaataatg acataatatt tgtaaatgtg aggaccccat ataaatacca tcactatcag 4140
cagtgtgaag accatgcat taagcttagc atggtgacca agaaagcttg tctgcatctg 4200
aatcccggcg gaacctgtgt cagcataggt tatggttacg ctgacagggc cagcgaaagc 4260
atcattggtg ctatagcgcg gcagttcaag ttttcccggg tatgcaaacc gaaatcctca 4320
cttgaagaga cggaagttct gtttgtattc attgggtacg atcgcaaggc ccgtacgcac 4380
aatccttaca agctttcatc aaccttgacc aacatttata caggttccag actccacgaa 4440
gccgatgtg caccctcata tcatgtggtg cgaggggata ttgccacggc caccgaagga 4500
gtgattataa atgctgctaa cagcaaagga caacctggcg gaggggtgtg cggagcgctg 4560
tataagaaat tcccggaaag cttcgattta cagccgatcg aagtaggaaa agcgcgactg 4620
gtcaaagggtg cagctaaaca tatcattcat gccgtaggac caaacttcaa caaagtttcg 4680
gaggttgaag gtgacaaaca gttggcagag gcttatgagt ccatcgctaa gattgtcaac 4740
gataacaatt acaagtcagt agcgattcca ctgtttgcca ccggcatctt ttccgggaac 4800
aaagatcgac taaccaatc attgaacat ttgctgacag cttagacac cactgatgca 4860
gatgtagcca tatactgcag ggacaagaaa tgggaaatga ctctcaagga agcagtggtc 4920
aggagagaag cagtggagga gatatgcata tccgacgact cttcagtgac agaacctgat 4980
gcagagctgg tgaggggtgca tccgaagagt tctttggctg gaaggaaggg ctacagcaca 5040

agcgatggca aaactttctc atatttgga gggaccaagt ttcaccaggc ggccaaggat 5100
atagcagaaa ttaatgccat gtggcccggt gcaacggagg ccaatgagca ggtatgcatg 5160
tatatcctcg gagaaagcat gagcagtatt aggtcgaaat gccccgtcga agagtcggaa 5220
gcctccacac cacctagcac gctgccttgc ttgtgcatcc atgccatgac tccagaaaga 5280
gtacagcgcc taaaagcctc acgtccagaa caaattactg tgtgctcatc ctttccattg 5340
ccgaagtata gaatcactgg tgtgcagaag atccaatgct cccagcctat attgtttctca 5400
ccgaaagtgc ctgcgatat tcatccaagg aagtatctcg tggaaacacc accggtagac 5460
gagactccgg agccatcggc agagaaccaa tccacagagg ggacacctga acaaccacca 5520
cttataaccg aggatgagac caggactaga acgcctgagc cgatcatcat cgaagaggaa 5580
gaagaggata gcataagttt gctgtcagat ggcccgacc accaggtgct gcaagtcgag 5640
gcagacattc acgggcccgc ctctgtatct agctcatcct ggtccattcc tcatgcatcc 5700
gactttgatg tggacagttt atccatactt gacaccctgg agggagctag cgtgaccagc 5760
ggggcaacgt cagccgagac taactcttac ttcgcaaaga gtatggagtt tctggcgcga 5820
ccggtgcctg cgctcgaac agtattcagg aaccctccac atcccgtcc gcgcacaaga 5880
acaccgtcac ttgcaccag cagggcctgc tcgagaacca gcctagtttc caccgccca 5940
ggcgtgaata gggatgatcac tagagaggag ctcgaggcgc ttaccccgtc acgcactcct 6000
agcaggtcgg tctcgagaac cagcctggtc tccaaccgc caggcgtaaa taggggtgatt 6060
acaagagagg agtttgaggc gttcgtagca caacaacaat gacggtttga tgcgggtgca 6120
tacatctttt cctccgacac cgggtcaaggg catttacaac aaaaatcagt aaggcaaacg 6180
gtgctatccg aagtgggtgt ggagaggacc gaattggaga tttcgtatgc cccgcgcctc 6240
gaccaagaaa aagaagaatt actacgcaag aaattacagt taaatcccac acctgctaac 6300
agaagcagat accagtccag gaaggtggag aacatgaaag ccataacagc tagacgtatt 6360
ctgcaaggcc tagggcatta tttgaaggca gaaggaaaag tggagtgcta ccgaaccctg 6420
catcctgttc ctttgtattc atctagtgtg aaccgtgcct tttcaagccc caaggtcgca 6480
gtggaagcct gtaacgccat gttgaaagag aactttccga ctgtggcttc ttactgtatt 6540
attccagagt acgatgccta tttggacatg gttgacggag cttcatgctg cttagacact 6600
gccagttttt gcctgcaaa gctgcgcagc tttccaaaga aacactccta tttggaacc 6660
acaatacgat cggcagtgcc ttcagcgatc cagaacacgc tccagaacgt cctggcagct 6720
gccacaaaaa gaaattgcaa tgtcacgcaa atgagagaaat tgcccgtatt ggattcggcg 6780
gcctttaatg tggaatgctt caagaaatat gcgtgtaata atgaatattg ggaaacgttt 6840
aaagaaaacc ccatcaggct tactgaagaa aacgtggtaa attacattac caaattaata 6900

ggacccaaaag ctgctgctct ttttgccaag acacataatt tgaatatggt gcaggacata 6960
ccaatggaca ggtttgtaat ggacttaaag agagacgtga aagtgactcc aggaacaaaa 7020
catactgaag aacggcccaa ggtacaggtg atccaggctg ccgatccgct agcaacagcg 7080
tatctgtgcg gaatccaccg agagctgggt aggagattaa atgcggctct gcttccgaac 7140
attcatacac tgtttgatat gtcggctgaa gactttgacg ctattatagc cgagcacttc 7200
cagcctgggg attgtgttct ggaaactgac atcgcgtcgt ttgataaaaag tgaggacgac 7260
gccatggctc tgaccgcggt aatgattctg gaagacttag gtgtggacgc agagctggtg 7320
acgctgattg aggcggcttt cggcgaatt tcatcaatac atttgccac taaaactaaa 7380
tttaaattcg gagccatgat gaaatctgga atgttcctca cactgtttgt gaacacagtc 7440
attaacattg taatcgcaag cagagtgttg agagaacggc taaccggatc accatgtgca 7500
gcattcattg gagatgacaa tatcgtgaaa ggagtcaaat cggacaaaatt aatggcagac 7560
aggtgcgcca cctggttgaa tatggaagtc aagattatag atgctgtggt gggcgagaaa 7620
gcgcttatt tctgtggagg gtttattttg tgtgactccg tgaccggcac agcgtgccgt 7680
gtggcagacc ccctaaaaag gctgtttaag cttggcaaac ctctggcagc agacgatgaa 7740
catgatgatg acaggagaag ggcattgcat gaagagtcaa cacgctggaa ccgagtgggt 7800
attctttcag agctgtgcaa ggcagtagaa tcaaggtagg aaaccgtagg aacttccatc 7860
atagttatgg ccatgactac tctagctagc agtgtaaat cattcagcta cctgagaggg 7920
gccctataa ctctctacgg ctaacctgaa tggactacga catagtctag tccgccaaga 7980
tatcggcgcg ccgtttaaac ggccggcctt aattaagtaa cgatacagca gcaattggca 8040
agctgcttac atagaactcg cggcgattgg catgccgctt taaaatttt attttatttt 8100
tcttttctt tccgaatcgg attttgttt taatatttca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 8160
aaaaaaaaa aaaaaaac cctctctaaa cggaggggtt tttttcagcg taactggact 8220
ggccacagtt aggcggccgc gcatgttcat catcagtaac ccgtatcgtg agcatcctct 8280
ctcgtttcat cggtatcatt acctccatga acagaaatcc cccttacacg gaggcacag 8340
tgaccaaaaca gaaaaaac gcccttaaca tggcccgtt tatcagaagc cagacattaa 8400
cgcttctgga gaaactcaac gagctggacg cggatgaaca ggcagacatc tgtgaatcgc 8460
ttcacgacca cgctgatgag ctttaccgca gctgcctcgc gcgtttcggg gatgacgggt 8520
aaaacctctg acacatgcag ctcccggaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg 8580
ggagcagaca agcccgtcag ggcgcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggcgcagcca 8640
tgaccagtc acgtagcgt agcggagtgt atactggctt aactatgcgg catcagagca 8700

gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg tgaataaccg cacagatgcg taaggagaaa 8760
ataccgcatac aggcgctcgc ttctcgcctc actgactcgc tgcgctcggc cgttcggctg 8820
cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggc tatccacaga atcaggggat 8880
aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc 8940
gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcacia aaatcgacgc 9000
tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga 9060
agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt 9120
ctcccttcgg gaagcgtggc gcttttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggcg 9180
taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc 9240
gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg 9300
gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtc tacagagttc 9360
ttgaagtggc ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg 9420
ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt gtagctctt gatccggcaa acaaaccacc 9480
gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct 9540
caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt 9600
taagggatth tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa 9660
aaatgaagtt taaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttattag 9720
aaaaattcat ccagcagacg ataaaacgca atacgctggc tatccgggtc cgcaatgcc 9780
tacagcacca gaaaacgatc cgcccattcg ccgcccagtt cttccgcaat atcacgggtg 9840
gccagcgcga tatcctgata acgatccgcc acgcccagac ggccgcaatc aataaagccg 9900
ctaaaacggc cattttccac cataatgttc ggcaggcacg catcaccatg ggtcaccacc 9960
agatcttcgc catccggcat gctcgtttc agacgcgcaa acagctctgc cggtgccagg 10020
ccctgatggt cttcatccag atcatcctga tccaccaggc ccgcttccat acgggtacgc 10080
gcacgttcaa tacgatgttt cgctgatga tcaaaccggc aggtcgccgg gtccagggt 10140
tgcagacgac gcatggcatc cgccataatg ctcaactttt ctgccggcgc cagatggcta 10200
gacagcagat cctgaccggc cacttcgccc agcagcagcc aatcacggcc cgcttcggtc 10260
accacatcca gcaccgccc acacggaaca ccggtgggtg ccagccagct cagacgcgcc 10320
gcttcatcct gcagctcgtt cagcgcaccg ctcatatcgg ttttcacaaa cagcaccgga 10380
cgaccctgcg cgctcagacg aaacaccgcc gcatcagacg agccaatggt ctgctgcgcc 10440
caatcatagc caaacagacg ttccaccac gctgccgggc taccgcatg caggccatcc 10500
tgttcaatca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc 10560

atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca 10620
 tttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaagcatc 10680
 cgcctttcgt tttatttgac catgttgga tg 10712

<210> 34
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 34
 aaccctctc taaacggagg ggttttttt 29

<210> 35
 <211> 105
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 35
 cgcggaaccc ctatttgatt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga 60
 caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagt 105

<210> 36
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 36
 ctctctacgg ctaacctgaa tgga 24

<210> 37
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 37
 taatacgact cactatag 18

<210> 38
 <211> 39
 <212> RNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 38

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

39

<210> 39

<211> 195

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 39

taggagaaag ttcacgttga catcgaggaa gacagcccat tcctcagagc tttgcagcgg 60

agcttcccgc agtttgaggt agaagccaag caggtcactg ataatgacca tgctaattgcc 120

agagcgtttt cgcactctggc ttcaaaactg atcgaaacgg aggtggacct atccgacacg 180

atccttgaca ttgga 195

<210> 40

<211> 142

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 40

atagtcagca tagtacattt catctgacta atactacaac accaccacca tgaatagagg 60

attctttaac atgctcggcc gccgcccctt cccggccccc actgccatgt ggaggccgcg 120

gagaaggagg caggcggccc cg 142

<210> 41

<211> 66

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 41

ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct 60

ggacct 66

<210> 42

<211> 141

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 42

cgcagccatg acccagtcac gtagcgatag cggagtgtat actggcttaa ctatgcgga 60
 tcagagcaga ttgtactgag agtgcacat atgcggtgtg aaataccgca cagatgcgta 120
 aggagaaaat accgcatcag g 141

<210> 43

<211> 5796

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 43

atgaatagag gattctttaa catgctcggc cgccgccct tcccggccc cactgccatg 60
 tggaggccgc ggagaaggag gcaggcggcc ccgggaagcg gagctactaa cttcagcctg 120
 ctgaagcagg ctggagacgt ggaggagaac cctggacctg agaaagttca cgttgacatc 180
 gaggaagaca gccattcct cagagctttg cagcggagct tcccgcagtt tgaggtagaa 240
 gccaaagcagg tcaactgataa tgaccatgct aatgccagag cgttttcgca tctggcttca 300
 aaactgatcg aaacggaggt ggacccatcc gacacgatcc ttgacattgg aagtgcgccc 360
 gccgcagaa tgtattctaa gcacaagtat cattgtatct gtccgatgag atgtgcggaa 420
 gatccggaca gattgtataa gtatgcaact aagctgaaga aaaactgtaa ggaaataact 480
 gataaggaat tggacaagaa aatgaaggag ctcgccgccc tcatgagcga cctgacctg 540
 gaaactgaga ctatgtgcct ccacgacgac gagtcgtgtc gctacgaagg gcaagtcgct 600
 gtttaccagg atgtatacgc gggtgacgga ccgacaagtc tctatcacca agccaataag 660
 ggagttagag tcgcctactg gataggcttt gacaccacc cttttatggt taagaacttg 720
 gctggagcat atccatcata ctctaccaac tgggcccagc aaaccgtgtt aacggctcgt 780
 aacataggcc tatgcagctc tgacgttatg gagcggtcac gtagagggat gtccattctt 840
 agaaagaagt atttgaaacc atccaacaat gttctattct ctggtggctc gaccatctac 900
 cacgagaaga gggacttact gaggagctgg cacctgccgt ctgtatttca cttacgtggc 960
 aagcaaaatt acacatgtcg gtgtgagact atagttagtt gcgacgggta cgtcgtaaa 1020
 agaatagcta tcagtccagg cctgtatggg aagccttcag gctatgctgc tacgatgcac 1080
 cgcgagggat tcttgtgctg caaagtgaca gacacattga acggggagag ggtctctttt 1140
 cccgtgtgca cgtatgtgcc agctacattg tgtgaccaa tgactggcat actggcaaca 1200

gatgtcagtg	cggacgacgc	gcaaaaactg	ctggttgggc	tcaaccagcg	tatagtcgtc	1260
aacggtcgca	cccagagaaa	caccaatacc	atgaaaaatt	accttttgcc	cgtagtggcc	1320
caggcatttg	ctaggtgggc	aaaggaatat	aaggaagatc	aagaagatga	aaggccacta	1380
ggactacgag	atagacagtt	agtcatgggg	tgttggtggg	cttttagaag	gcacaagata	1440
acatctatth	ataagcgccc	ggatacccaa	accatcatca	aagtgaacag	cgatttccac	1500
tcattcgtgc	tgcccaggat	aggcagtaac	acattggaga	tcgggctgag	aacaagaatc	1560
aggaaaatgt	tagaggagca	caaggagccg	tcacctctca	ttaccgccga	ggacgtacaa	1620
gaagctaagt	gcgacagccg	tgaggctaag	gaggtgcgtg	aagccgagga	gttgcgcgca	1680
gctctaccac	ctttggcagc	tgatggtgag	gagcccactc	tggaagccga	tgctgacttg	1740
atgttacaag	aggctggggc	cggctcagtg	gagacacctc	gtggcttgat	aaaggttacc	1800
agctacgatg	gcgaggacaa	gatcggctct	tacgctgtgc	tttctccgca	ggctgtactc	1860
aagagtgaaa	aattatcttg	catccaccct	ctcgctgaac	aagtcatagt	gataacacac	1920
tctggccgaa	aagggcgta	tgccgtggaa	ccataccatg	gtaaagtagt	ggtgccagag	1980
ggacatgcaa	taccctcca	ggactttcaa	gctctgagtg	aaagtgccac	cattgtgtac	2040
aacgaacgtg	agttcgtaaa	caggtacctg	cacatattg	ccacacatgg	aggagcgctg	2100
aacactgatg	aagaatatta	caaaactgtc	aagcccagcg	agcacgacgg	cgaatacctg	2160
tacgacatcg	acaggaaaca	gtgctcaag	aaagaactag	tactgggct	agggtcaca	2220
ggcgagctgg	tgatcctcc	cttccatgaa	ttcgcctacg	agagtctgag	aacacgacca	2280
gccgctcctt	accaagtacc	aaccataggg	gtgtatggcg	tgccaggatc	aggcaagtct	2340
ggcatcatta	aaagcgcagt	caccaaaaa	gatctagtgg	tgagcgccaa	gaaagaaaac	2400
tgtgcagaaa	ttataagga	cgtcaagaaa	atgaaagggc	tgacgtcaa	tgccagaact	2460
gtggactcag	tgctcttgaa	tgatgcaaaa	caccccgtag	agaccctgta	tattgacgaa	2520
gcttttgctt	gtcatgcagg	tactctcaga	gcgctcatag	ccattataag	acctaaaaag	2580
gcagtgtctt	gcggggatcc	caaacagtgc	ggttttttta	acatgatgtg	cctgaaagtg	2640
cattttaacc	acgagatttg	cacacaagtc	ttccacaaaa	gcattctctg	ccgttgact	2700
aaatctgtga	cttcggctgt	ctcaaccttg	ttttacgaca	aaaaaatgag	aacgacgaat	2760
ccgaaagaga	ctaagattgt	gattgacact	accggcagta	ccaaacctaa	gcaggacgat	2820
ctcattctca	cttgtttcag	agggtgggtg	aagcagttgc	aaatagatta	caaaggcaac	2880
gaaataatga	cggcagctgc	ctctcaaggg	ctgaccogta	aaggtgtgta	tgccgttcgg	2940
tacaaggtga	atgaaaatcc	tctgtacgca	cccacctctg	aacatgtgaa	cgctctactg	3000
accgcacgg	aggaccgcat	cgtgtggaaa	acactagccg	gcgacccatg	gataaaaaca	3060

ctgactgcca agtaccctgg gaatttcact gccacgatag aggagtggca agcagagcat	3120
gatgccatca tgaggcacat cttggagaga ccggacccta ccgacgtctt ccagaataag	3180
gcaaacgtgt gttgggcca ggcttttagtg ccggtgctga agaccgctgg catagacatg	3240
accactgaac aatggaacac tgtggattat tttgaaacgg acaaagctca ctcagcagag	3300
atagtattga accaactatg cgtgaggttc tttggactcg atctggactc cggctctat	3360
tctgcacca ctgttccgtt atccattagg aataatcact gggataactc cccgtcgcct	3420
aacatgtacg ggctgaataa agaagtggtc cgtcagctct ctcgcaggta cccacaactg	3480
cctcgggcag ttgccactgg aagagtctat gacatgaaca ctggtacact gcgcaattat	3540
gatccgcgca taaacctagt acctgtaaac agaagactgc ctcagtcttt agtcctccac	3600
cataatgaac acccacagag tgacttttct tcattcgtca gcaaattgaa gggcagaact	3660
gtcctggtgg tcggggaaaa gttgtccgtc ccaggcaaaa tggttgactg gttgtcagac	3720
cggcctgagg ctacctcag agctcggctg gatttaggca tcccagggtga tgtgcccaaa	3780
tatgacataa tatttgtaa tgtgaggacc ccatataaat accatcacta tcagcagtgt	3840
gaagaccatg ccattaagct tagcatggtg accaagaaag cttgtctgca tctgaatccc	3900
ggcggaacct gtgtcagcat aggttatggt tacgctgaca gggccagcga aagcatcatt	3960
ggtgctatag cgcggcagtt caagttttcc cgggtatgca aaccgaaatc ctcacttgaa	4020
gagacggaag ttctgtttgt attcattggg tacgatcgca aggcccgtac gcacaatcct	4080
tacaagcttt catcaacctt gaccaacatt tatacagggt ccagactcca cgaagccgga	4140
tgtgcaccct catatcatgt ggtgcgaggg gatattgcca cggccaccga aggagtgatt	4200
ataaatgctg ctaacagcaa aggacaacct ggcggagggg tgtgcgagc gctgtataag	4260
aaattcccgg aaagcttcga tttacagccg atcgaagtag gaaaagcgcg actggtcaaa	4320
ggtgcagcta aacatatcat tcatgccgta ggaccaaact tcaacaaagt ttcggaggtt	4380
gaaggtgaca aacagttggc agaggcttat gagtccatcg ctaagattgt caacgataac	4440
aattacaagt cagtagcgat tccactgttg tccaccggca tcttttccgg gaacaaagat	4500
cgactaacc aatcattgaa ccatttgctg acagcttttag acaccactga tgcagatgta	4560
gccatatact gcagggacaa gaaatgggaa atgactctca aggaagcagt ggctaggaga	4620
gaagcagtgg aggagatatg catatccgac gactcttcag tgacagaacc tgatgcagag	4680
ctggtgaggg tgcattccgaa gagttctttg gctggaagga agggctacag cacaagcgat	4740
ggcaaaactt tctcatat	4800
gaaattaatg ccatgtggcc cgttgcaacg gaggccaatg agcaggtatg catgtatc	4860

ctcggagaaa gcatgagcag tattaggtcg aaatgccccg tcgaagagtc ggaagcctcc 4920
 acaccaccta gcacgctgcc ttgcttgtgc atccatgcca tgactccaga aagagtacag 4980
 cgcctaaaag cctcacgtcc agaacaaatt actgtgtgct catcctttcc attgccgaag 5040
 tatagaatca ctgggtgtgca gaagatccaa tgctcccagc ctatatgtt ctcaccgaaa 5100
 gtgcctgcgt atattcatcc aaggaagtat ctcgtggaaa caccaccggt agacgagact 5160
 ccggagccat cggcagagaa ccaatccaca gaggggacac ctgaacaacc accacttata 5220
 accgaggatg agaccaggac tagaacgcct gagccgatca tcatcgaaga ggaagaagag 5280
 gatagcataa gtttgctgtc agatggcccc acccaccagg tgctgcaagt cgaggcagac 5340
 attcacgggc cgccctctgt atctagctca tcctggtcca ttctcatgc atccgacttt 5400
 gatgtggaca gtttatccat acttgacacc ctggaggag ctagcgtgac cagcggggca 5460
 acgtcagccg agactaactc ttacttcgca aagagtatgg agtttctggc gcgaccggtg 5520
 cctgcgcctc gaacagtatt caggaaccct ccacatcccg ctccgcgcac aagaacaccg 5580
 tcacttgcac ccagcagggc ctgctcgaga accagcctag tttccacccc gccaggcgtg 5640
 aataggtgga tcactagaga ggagctcgag gcgcttacc cgtcacgcac tcctagcagg 5700
 tcggtctcga gaaccagcct ggtctccaac ccgccaggcg taaatagggt gattacaaga 5760
 gaggagtttg aggcgttcgt agcacaacaa caatga 5796

<210> 44

<211> 2382

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 44

ggctcagtgg agacacctcg tggcttgata aaggttacca gctacgatgg cgaggacaag 60
 atcggctctt acgctgtgct ttctccgag gctgtactca agagtgaaaa attatcttgc 120
 atccaccctc tcgctgaaca agtcatagtg ataacacact ctggccgaaa agggcggtat 180
 gccgtggaac cataccatgg taaagtagtg gtgccagagg gacatgcaat acccgctcag 240
 gactttcaag ctctgagtga aagtgccacc attgtgtaca acgaacgtga gttcgtaaac 300
 aggtacctgc accatattgc cacacatgga ggagcgtga aactgatga agaataattac 360
 aaaactgtca agcccagcga gcacgacggc gaatacctgt acgacatcga caggaaacag 420
 tgcgtaaga aagaactagt cactgggcta gggctcacag gcgagctggt ggatcctccc 480
 ttccatgaat tcgctacga gagtctgaga acacgaccag ccgctcctta ccaagtacca 540
 accatagggg tgtatggcgt gccaggatca ggcaagtctg gcatcattaa aagcgcagtc 600

accaaaaaag atctagtggg gagcgccaag aaagaaaact gtgcagaaat tataagggac	660
gtcaagaaaa tgaaagggct ggacgtcaat gccagaactg tggactcagt gctcttgaat	720
ggatgcaaac accccgtaga gaccctgtat attgacgaag cttttgcttg tcatgcaggt	780
actctcagag cgctcatagc cattataaga cctaaaaagg cagtgtctctg cggggatccc	840
aaacagtgcg gtttttttaa catgatgtgc ctgaaagtgc attttaacca cgagatttgc	900
acacaagtct tccacaaaag catctctcgc cgttgacta aatctgtgac ttcggtcgtc	960
tcaaccttgt tttagcacia aaaaatgaga acgacgaatc cgaaagagac taagattgtg	1020
attgacacta ccggcagtac caaacctaag caggacgatc tcattctcac ttgtttcaga	1080
gggtgggtga agcagttgca aatagattac aaaggcaacg aaataatgac ggcagctgcc	1140
tctcaagggc tgacccgtaa aggtgtgtat gccgttcggg acaaggtgaa tgaaaatcct	1200
ctgtacgcac ccacctctga acatgtgaac gtcctactga cccgcacgga ggaccgcatc	1260
gtgtggaaaa cactagccgg cgaccatgg ataaaaacac tgactgcca a gtaccctggg	1320
aatttactg ccacgataga ggagtggcaa gcagagcatg atgccatcat gaggcacatc	1380
ttggagagac cggaccctac cgacgtcttc cagaataagg caaacgtgtg ttggggccaag	1440
gctttagtgc cgggtgtgaa gaccgctggc atagacatga cactgaaca atggaacact	1500
gtggattatt ttgaaacgga caaagctcac tcagcagaga tagtattgaa ccaactatgc	1560
gtgaggttct ttggactcga tctggactcc ggtctatfff ctgcaccac tgttccgtta	1620
tccattagga ataactactg ggataactcc ccgtcgccta acatgtacgg gctgaataaa	1680
gaagtgttcc gtcagctctc tcgcaggtac ccacaactgc ctcgggcagt tgccactgga	1740
agagtctatg acatgaacac tggtagactg cgcaattatg atccgcgcat aaacctagta	1800
cctgtaaaca gaagactgcc tcatgcttta gtcctccacc ataataaaca cccacagagt	1860
gacttttctt cattcgtcag caaattgaag ggcagaactg tcctggtggg cggggaaaag	1920
ttgtccgtcc caggcaaaat ggttgactgg ttgtcagacc ggctgaggc taccttcaga	1980
gctcggctgg atttaggcat ccaggtgat gtgcccnaat atgacataat atttgtaat	2040
gtgaggacc catataaata ccatcactat cagcagtgtg aagaccatgc cattaagctt	2100
agcatgttga ccaagaaagc ttgtctgcat ctgaatcccg gcggaacctg tgtcagcata	2160
ggttatggtt acgctgacag ggccagcgaa agcatcattg gtgctatagc gcggcagttc	2220
aagttttccc gggatgcaa accgaaatcc tcacttgaag agacggaagt tctgtttgta	2280
ttcattgggt acgatcga gggccgtacg cacaatcctt acaagctttc atcaaccttg	2340
accaacattt atacaggttc cagactccac gaagccggat gt	2382

<210> 45
 <211> 1821
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 45
 tacatctttt cctccgacac cgggtcaaggg catttacaac aaaaatcagt aaggcaaacg 60
 gtgctatccg aagtgggtgtt ggagaggacc gaattggaga ttctgtatgc cccgcgctc 120
 gaccaagaaa aagaagaatt actacgcaag aaattacagt taaatcccac acctgctaac 180
 agaagcagat accagtccag gaaggtggag aacatgaaag ccataacagc tagacgtatt 240
 ctgcaaggcc tagggcatta tttgaaggca gaaggaaaag tggagtgcta ccgaaccctg 300
 catcctgttc ctttgtattc atctagtgtg aaccgtgcct tttcaagccc caaggtcgca 360
 gtggaagcct gtaacgcat gttgaaagag aactttccga ctgtggcttc ttactgtatt 420
 attccagagt acgatgccta tttggacatg gttgacggag cttcatgctg cttagacact 480
 gccagttttt gccctgcaaa gctgcgagc tttccaaaga aacactccta tttggaacc 540
 acaatacgat cggcagtgcc ttcagcgatc cagaacagc tccagaacgt cctggcagct 600
 gccacaaaaa gaaattgcaa tgtcacgcaa atgagagaat tgcccgtatt ggattcggcg 660
 gcctttaatg tggaatgctt caagaaatat gcgtgtaata atgaatattg ggaaacgttt 720
 aaagaaaacc ccatcaggct tactgaagaa aacgtggtaa attacattac caaattaaaa 780
 ggacaaaag ctgctgctct ttttgogaag acacataatt tgaatatgtt gcaggacata 840
 ccaatggaca ggtttgtaat ggacttaaag agagacgtga aagtgactcc aggaacaaaa 900
 cactactgaag aacggcccaa ggtacagggtg atccaggctg ccgatccgct agcaacagcg 960
 tatctgtgcg gaatccaccg agagctgggt aggagattaa atgcggtcct gcttccgaac 1020
 attcatacac tgtttgatat gtcggctgaa gactttgacg ctattatagc cgagcacttc 1080
 cagcctgggg attgtgttct ggaaactgac atcgcgtcgt ttgataaaaag tgaggacgac 1140
 gccatggctc tgaccgcgtt aatgattctg gaagacttag gtgtggacgc agagctggtg 1200
 acgctgattg aggcggcttt cggcgaaatt tcatcaatac atttgcccac taaaactaaa 1260
 tttaaattcg gagccatgat gaaatctgga atgttcctca cactgtttgt gaacacagtc 1320
 attaacattg taatcgcaag cagagtgttg agagaacggc taaccggatc accatgtgca 1380
 gcattcattg gagatgacaa tctcgtgaaa ggagtcaaat cggacaaatt aatggcagac 1440
 aggtgcgcca cctggttgaa tatggaagtc aagattatag atgctgtggt gggcgagaaa 1500
 gcgccttatt tctgtggagg gtttattttg tgtgactccg tgaccggcac agcgtgccgt 1560

gtggcagacc ccctaaaaag gctgtttaag cttggcaaac ctctggcagc agacgatgaa 1620
 catgatgatg acaggagaag ggcattgcat gaagagtcaa cacgctggaa ccgagtgggt 1680
 attctttcag agctgtgcaa ggcagtagaa tcaaggtatg aaaccgtagg aacttccatc 1740
 atagttatgg ccatgactac tctagctagc agtgttaaat cattcagcta cctgagaggg 1800
 gccctataa ctctctacgg c 1821

<210> 46

<211> 1671

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 46

gcaccctcat atcatgtggt gcgaggggat attgccacgg ccaccgaagg agtgattata 60
 aatgctgcta acagcaaagg acaacctggc ggaggggtgt gcggagcgct gtataagaaa 120
 ttcccgaaa gcttcgattt acagccgatc gaagtaggaa aagcgcgact ggtcaaaggt 180
 gcagctaaac atatcattca tgccgtagga ccaaacttca acaaagtttc ggaggttgaa 240
 ggtgacaaac agttggcaga ggcttatgag tccatcgcta agattgtcaa cgataacaat 300
 tacaagtcag tagcgattcc actgttgtcc accggcatct tttccgggaa caaagatcga 360
 ctaaccaat cattgaacca tttgctgaca gctttagaca ccaactgatgc agatgtagcc 420
 atatactgca gggacaagaa atgggaaatg actctcaagg aagcagtggc taggagagaa 480
 gcagtggagg agatatgcat atccgacgac tcttcagtga cagaacctga tgcagagctg 540
 gtgaggggtgc atccgaagag ttctttggct ggaaggaagg gctacagcac aagcgatggc 600
 aaaactttct catatttga agggaccaag tttcaccagg cggccaagga tatagcagaa 660
 attaatgcca tgtggcccgt tgcaacggag gccaatgagc aggtatgcat gtatatcctc 720
 ggagaaagca tgagcagtat taggtcgaag tgccccgtcg aagagtcgga agcctccaca 780
 ccacctagca cgctgccttg cttgtgcatc catgccatga ctccagaaag agtacagcgc 840
 ctaaaagcct cacgtccaga acaaattact gtgtgctcat cctttccatt gccgaagtat 900
 agaatcactg gtgtgcagaa gatccaatgc tcccagccta tattgttctc accgaaagtg 960
 cctgcgtata ttcatccaag gaagtatctc gtggaaacac caccggtaga cgagactccg 1020
 gagccatcgg cagagaacca atccacagag gggacacctg aacaaccacc acttataacc 1080
 gaggatgaga ccaggactag aacgcctgag ccgatcatca tcgaagagga agaagaggat 1140
 agcataagtt tgctgtcaga tggcccgacc caccaggtgc tgcaagtcga ggcagacatt 1200

cacgggcccgc cctctgtatc tagctcatcc tgggccattc ctcatgcatc cgactttgat 1260
 gtggacagtt tatccatact tgacaccctg gagggagcta gcgtgaccag cggggcaacg 1320
 tcagccgaga ctaactctta cttcgcaaag agtatggagt ttctggcgcg accggtgcct 1380
 gcgcctcgaa cagtattcag gaaccctcca catcccgtc cgcgcacaaag aacaccgtca 1440
 cttgcaccca gcagggcctg ctcgagaacc agcctagttt ccaccccgcc aggcgtgaat 1500
 agggatgatca ctagagagga gctcgaggcg cttaccccgt cacgcactcc tagcaggctcg 1560
 gtctcgagaa ccagcctggt ctccaacccg ccaggcgtaa atagggatgat tacaagagag 1620
 gagtttgagg cgttcgtagc acaacaacaa tgacggtttg atgcgggtgc a 1671

<210> 47

<211> 1602

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 47

gagaaagtcc acgttgacat cgaggaagac agccattcc tcagagcttt gcagcggagc 60
 ttcccgcagt ttgaggtaga agccaagcag gtcactgata atgacatgc taatgccaga 120
 gcgttttcgc atctggcttc aaaactgac gaaacggagg tggacccatc cgacacgatc 180
 cttgacattg gaagtgcgcc cgcccgcaga atgtattcta agcacaagta tcattgtatc 240
 tgtccgatga gatgtgcgga agatccggac agattgtata agtatgcaac taagctgaag 300
 aaaaactgta aggaaataac tgataaggaa ttggacaaga aaatgaagga gctcgcgcc 360
 gtcattgagc accctgacct ggaaactgag actatgtgcc tccacgacga cgagtcgtgt 420
 cgctacgaag ggcaagtcgc tgtttaccag gatgtatacg cggttgacgg accgacaagt 480
 ctctatcacc aagccaataa gggagttaga gtcgcctact ggataggctt tgacaccacc 540
 ctttttatgt ttaagaactt ggctggagca tatccatcat actctaccaa ctgggccgac 600
 gaaaccgtgt taacggctcg taacataggc ctatgcagct ctgacgttat ggagcgggtca 660
 cgtagagggga tgtccattct tagaaagaag tatttgaaac catccaacaa tgttctattc 720
 tctgtttggc cgaccatcta ccacgagaag agggacttac tgaggagctg gcacctgccg 780
 tctgtatttc acttacgtgg caagcaaaat tacacatgtc ggtgtgagac tatagttagt 840
 tgcgacgggt acgtcgtaa aagaatagct atcagtcag gcctgtatgg gaagccttca 900
 ggctatgctg ctacgatgca ccgcgagggg ttcttgtgct gcaaagtgac agacacattg 960
 aacggggaga gggctctctt tcccgtgtgc acgtatgtgc cagctacatt gtgtgaccaa 1020
 atgactggca tactggcaac agatgtcagt gcggacgacg cgcaaaaact gctggttggg 1080

ctcaaccagc gtatagtcgt caacggtcgc acccagagaa acaccaatac catgaaaaat 1140
 taccttttgc ccgtagtggc ccaggcattt gctaggtggg caaaggaata taaggaagat 1200
 caagaagatg aaaggccact aggactacga gatagacagt tagtcatggg gtgttggttg 1260
 gcttttagaa ggcacaagat aacatctatt tataagcgcc cggataccca aaccatcatc 1320
 aaagtgaaca gcgatttcca ctcatcgtg ctgcccagga taggcagtaa cacattggag 1380
 atcgggctga gaacaagaat caggaaaatg ttagaggagc acaaggagcc gtcacctctc 1440
 attaccgccg aggacgtaca agaagctaag tgccgagccg atgaggctaa ggaggtgcgt 1500
 gaagccgagg agttgcccgc agctctacca cctttggcag ctgatgttga ggagcccact 1560
 ctggaagccg atgtcgactt gatgttacia gaggtgggg cc 1602

<210> 48

<211> 798

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 48

atgattgaac aggatggcct gcatgcccgg agcccggcag cgtgggtgga acgtctgttt 60
 ggctatgatt gggcgcagca gaccattggc tgctctgatg cggcgggtgtt tcgtctgagc 120
 gcgcagggtc gtccgggtgct gtttgtgaaa accgatctga gcgggtgcgct gaacgagctg 180
 caggatgaag cggcgcgtct gagctggctg gccaccaccg gtgttccgtg tgcggcgggtg 240
 ctggatgtgg tgaccgaagc gggccgtgat tggctgctgc tgggcgaagt gccgggtcag 300
 gatctgctgt ctagccatct ggcgcccggca gaaaaagtga gcattatggc ggatgccatg 360
 cgtcgtctgc ataccctgga cccggcgacc tgtccgtttg atcatcaggc gaaacatcgt 420
 attgaacgtg cgcgtaccgc tatggaagcg ggcctgggtg atcaggatga tctggatgaa 480
 gaacatcagg gcctggcacc ggcagagctg tttgcccgtc tgaaagcgag catgccggat 540
 ggcaagatc tgggtggtgac ccatggtgat gcgtgcctgc cgaacattat ggtggaaaat 600
 ggccgtttta gcggctttat tgattgcggc cgtctggggc tggcggatcg ttatcaggat 660
 attgctgtgg ccaccctgga tattgcggaa gaactggggc gcgaatgggc ggatcgtttt 720
 ctggtgctgt atggcattgc ggcaccggat agccagcgtg ttgctttta tcgtctgctg 780
 gatgaatttt tctaataa 798

<210> 49

<211> 192

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 49

gtgaccaaac aggaaaaaac cgcccttaac atggcccgct ttatcagaag ccagacatta 60

acgcttctgg agaaactcaa cgagctggac gcggatgaac aggcagacat ctgtgaatcg 120

cttcacgacc acgctgatga gctttaccgc agctgcctcg cgcgtttcgg tgatgacggt 180

gaaaacctct ga 192

<210> 50

<211> 44

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 50

ataggcggcg catgagagaa gccagacca attacctacc caaa 44

<210> 51

<211> 117

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 51

atacagcagc aattggcaag ctgcttacat agaactcgcg gcgattggca tgccgcttta 60

aaatttttat tttatttttc ttttcttttc cgaatcggat tttgttttta atatttc 117

<210> 52

<211> 845

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 52

ccattgcata cgttgtatcc atatcataat atgtacattt atattggctc atgtccaaca 60

ttaccgccat gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca 120

ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct 180

ggctgaccgc ccaacgacc cgcgccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta 240

acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgccac 300

ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca agtacgccc ctattgacgt caatgacggt 360

aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag 420
 tacatctacg tattagtcac cgctattacc atggtgatgc ggttttggca gtacatcaat 480
 gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat 540
 gggagtttgt tttggcacca aatcaacgg gactttccaa aatgctgtaa caactccgcc 600
 ccattgacgc aaatgggagg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag cagagctctc 660
 cctatcagtg atagagatct ccctatcagt gatagagatc gtcgacgagc tcgttttagtg 720
 aaccgtcaga tcgcctggag acgccatcca cgctgttttg acctccatag aagacaccgg 780
 gaccgatcca gcctccgagg ccgggaacgg tgcatggaa cgcggattcc ccgtgccaaag 840
 agtga 845

<210> 53
 <211> 227
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 53
 ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg ttgcccctc ccccgctgct tccttgacct 60
 tggaaggtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc 120
 tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg ggggtggggca ggacagcaag ggggaggatt 180
 ggaagacaaa tagcaggcat gctgggggatg cgggtgggctc tatggcc 227

<210> 54
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 54

Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys
35 40 45

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu

50

55

60

Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Val Arg
65 70 75

<210> 55
<211> 4
<212> PRT
<213> Không rõ

<220>
<223> Mô tả của không rõ: Peptit mô-típ "KDEL"

<400> 55
Lys Asp Glu Leu
1

<210> 56
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 56
His His Ala Ala
1

<210> 57
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 57
Arg Lys Ser Tyr Leu
1 5

<210> 58
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 58
Arg Lys Ser Tyr
1

<210> 59
<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 59

Arg Glu Lys Arg

1