(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) **1-0049075**

(51)[2020.01] **A61K 35/76**; C12N 15/861; C07K 14/075; C12N 15/86; A61K 35/761; A61K 48/00

(13) **B**

(21) 1-2021-03702
(22) 21/11/2019
(86) PCT/US2019/062547 21/11/2019
(87) WO2020/106924 28/05/2020
(30) 62/770,631 21/11/2018 US
(45) 25/07/2025 448
(43) 25/11/2021 404A
(73) MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH (US)
200 First Street S.W., Rochester, MN 55905, United States of America
(72) BARRY, Michael A. (US).
(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) ADENOVIRUT TÁI TỔ HỢP VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA ADENOVIRUT TÁI TỔ HỢP NÀY

(21) 1-2021-03702

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp và vật liệu để phân phối axit nucleic, tiêm chủng vacxin. Cụ thể hơn, phương pháp và vật liuệ để phân phối axit nucleic, tiêm chủng vacxin sử dụng một hoặc nhiều adenovirut (Ad) tái tổ hợp làm chất tiêu diệt khối u được đề cập.

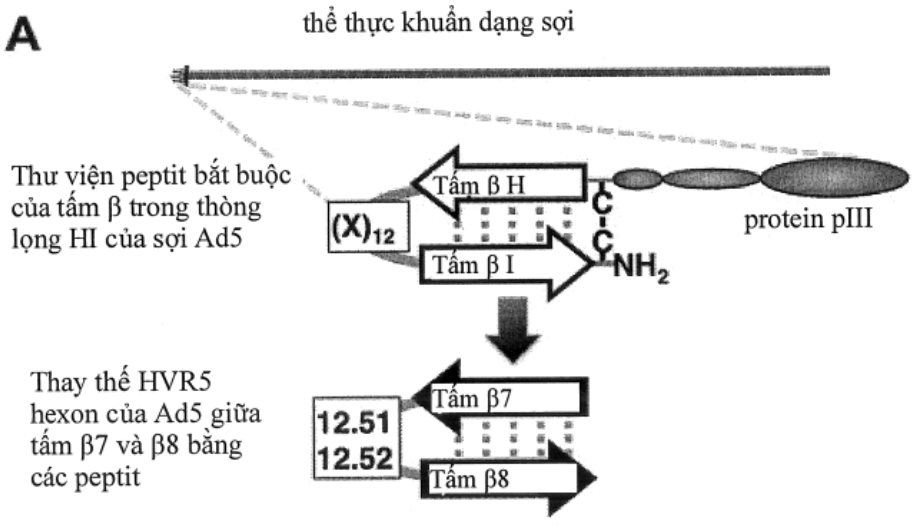


FIG. 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp và vật liệu để phân phối axit nucleic, tiêm chủng vacxin và/hoặc điều trị ung thư. Ví dụ, sáng chế bao gồm adenovirut (Ad) và phương pháp sử dụng adenovirut để điều trị tình trạng y khoa như là ung thư. Theo một khía cạnh của sáng chế, adenovirut được đề xuất ở đây được sử dụng làm chất tiêu diệt khối u.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Mặc dù cố gắng rất nhiều, nhưng ung thư vẫn là một vấn đề sức khỏe cộng đồng lớn ở Mỹ với hơn 1,6 triệu ca mắc mới chỉ trong năm 2017 (National Cancer Institute, "Cancer Stat Facts: Cancer of Any Site," seer.cancer.gov/statfacts/html/all.html). Các liệu pháp truyền thống, chẳng hạn như hóa trị, xạ trị và phẫu thuật, thường thất bại, đặc biệt là khi ung thư đã tiến triển. Một trong những lý do đó là các tế bào ung thư có thể loại bỏ hoặc thay đổi các thành phần được hướng đến bởi các liệu pháp này và tránh bị tiêu diệt một cách hiệu quả.

Liệu pháp virut để tiêu khối u có thể mang lại một cách tiếp cận khác để điều trị ung thư bằng cách sử dụng các virut sao chép được tuyển chọn để tiêu diệt khối u, kích hoạt đáp ứng miễn dịch thích ứng và đảm bảo khả năng miễn dịch suốt đời chống lại khối u (Russell et al., 2017 Molecular Therapy 25: 1107- 1116).

Sáng chế đề xuất phương pháp và vật liệu để phân phối axit nucleic, tiêm chủng vacxin và/hoặc điều trị ung thư. Ví dụ, sáng chế đề xuất phương pháp và vật liệu để điều trị ung thư bằng cách sử dụng một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp (ví dụ, một hoặc nhiều Ad657 và biến thể của chúng) làm chất tiêu diệt khối u. Theo một phương án, Ad tái tổ hợp có thể bắt nguồn từ Ad thứ nhất (ví dụ, có thể bao gồm hệ gen của Ad thứ nhất, chẳng hạn như Ad6, còn được gọi là mạch chính của Ad tái tổ hợp) và có thể bao gồm HVR hexon từ Ad thứ hai, chẳng hạn như Ad57. Trong trường hợp Ad tái tổ hợp bao gồm hệ gen của Ad6 và HVR hexon của Ad57, thì Ad tái tổ hợp có thể là Ad khảm được gọi là Ad657. (Xem Nguyen, et al. Oncolytic Virotherapy 7:43-51, 2018).

Theo một khía cạnh, sáng chế này đề xuất phương pháp tiêm chủng vacxin

chống lại bệnh lây nhiễm sử dụng một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp (ví dụ, một hoặc nhiều Ad657 và biến thể của chúng). Theo một khía cạnh, sáng chế này đề xuất phương pháp điều trị ung thư bằng cách sử dụng một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp (ví dụ, một hoặc nhiều Ad657 và biến thể của chúng) làm chất tiêu diệt khối u. Trong một số trường hợp, một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp (ví dụ, một hoặc nhiều Ad657) có thể được sử dụng để làm giảm số lượng tế bào ung thư (ví dụ, bằng cách lây nhiễm và tiêu diệt tế bào ung thư) ở động vật có vú. Trong một số trường hợp, một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp (ví dụ, một hoặc nhiều Ad657 và biến thể của chúng) có thể được sử dụng để kích thích đáp ứng miễn dịch chống ung thư ở động vật có vú. Trong một số trường hợp, một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp (ví dụ, một hoặc nhiều Ad657 và biến thể của chúng) có thể được sử dụng để kích thích đáp ứng miễn dịch chống lại bệnh lây nhiễm ở động vật có vú.

Như được chứng minh ở đây, khi Ad657 được phân phối bằng cách tiêm tĩnh mạch cho chuột có khối u ung thư tuyến tiền liệt DU145 của người ở dưới da, đầu tiên Ad657 sẽ lây nhiễm sang gan và sau đó đến các khối u ở xa. Cả Ad6 và Ad657 làm trung gian làm chậm đáng kể sự sinh trưởng của khối u và kéo dài thời gian sống sót với Ad6 làm trung gian cho hiệu quả cao hơn.

Sáng chế đề xuất phương pháp và vật liệu để phân phối axit nucleic, tiêm chủng vacxin và/hoặc điều trị ung thư. Ví dụ, sáng chế đề xuất phương pháp và vật liệu để điều trị ung thư bằng cách sử dụng một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp (ví dụ, một hoặc nhiều Ad657 và biến thể của chúng) làm chất tiêu diệt khối u. Theo một phương án, Ad tái tổ hợp có thể bắt nguồn từ Ad thứ nhất (ví dụ, có thể bao gồm hệ gen của Ad thứ nhất, chẳng hạn như Ad6, còn được gọi là khung chính của Ad tái tổ hợp) và có thể bao gồm HVR hexon từ Ad thứ hai, chẳng hạn như Ad57. Trong trường hợp Ad tái tổ hợp bao gồm hệ gen của Ad6 và các HVR hexon của Ad57, thì Ad tái tổ hợp có thể là Ad khảm được gọi là Ad657. Theo một khía cạnh, sáng chế này đề xuất phương pháp tiêm chủng vacxin chống lại bệnh lây nhiễm sử dụng một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp (ví dụ, một hoặc nhiều Ad657 và biến thể của chúng). Theo một khía cạnh nào đó, sáng chế này đề xuất phương pháp điều trị ung thư bằng cách sử dụng một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp (ví dụ, một hoặc nhiều Ad657 và biến thể của chúng) làm chất tiêu diệt khối u. Trong một số trường hợp, một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp (ví dụ, một hoặc nhiều Ad657) có thể được sử dụng để làm giảm số lượng tế bào ung thư (ví dụ, bằng cách

lây nhiễm và tiêu diệt tế bào ung thư) ở động vật có vú. Trong một số trường hợp, một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp (ví dụ, một hoặc nhiều Ad657 và biến thể của chúng) có thể được sử dụng để kích thích đáp ứng miễn dịch chống ung thư ở động vật có vú. Trong một số trường hợp, một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp (ví dụ, một hoặc nhiều Ad657 và biến thể của chúng) có thể được sử dụng để kích thích đáp ứng miễn dịch chống lại các bệnh lây nhiễm ở động vật có vú.

Như được chứng minh ở đây, khi Ad657 được phân phối bằng cách tiêm tĩnh mạch cho chuột có khối u ung thư tuyến tiền liệt DU145 của người ở dưới da, đầu tiên Ad657 sẽ lây nhiễm sang gan và sau đó đến các khối u ở xa. Cả Ad6 và Ad657 làm trung gian để làm chậm đáng kể sự sinh trưởng của khối u và kéo dài thời gian sống sót với Ad6 làm trung gian cho hiệu quả cao hơn.

Hơn nữa, sự cô lập ở gan là một vấn đề đáng kể đối với hầu hết bất kỳ virut tiêu khối u nào nếu nó được sử dụng như một liệu pháp toàn thân qua đường tĩnh mạch. Nếu virut lây nhiễm vào tế bào gan và tiêu diệt chúng, điều này sẽ dẫn đến tổn thương gan ở liều thấp và giết chết ở liều cao hơn. Đáng chú ý, việc dùng Ad theo sáng chế, tức là, vectơ Ad657 khảm và biến thể của chúng, gián tiếp tổn thương gan thấp hơn bất ngờ so với Ad5 hoặc Ad6. Do đó, tổ hợp duy nhất của nền tảng Ad6 với HVR từ 1-7 của Ad657 làm trung gian làm thay đổi trong phân phối sinh học và liệu pháp không được quan sát thấy trong các virut tự nhiên.

Tương tự, như được chứng minh ở đây, việc tạo miễn dịch cho khỉ rezut với vacxin chứa adenovirut một chu kỳ (SC-Ad657) sao chép chỉ biểu hiện phân nhánh B HIV-1 gp160 theo đường trong mũi (IN) và trong cơ (IM) được so sánh với việc tiêm chủng vacxin theo đường niêm mạc và đường toàn thân. Vacxin SC-Ad tự chúng tạo ra hàm lượng kháng thể tuần hoàn đáng kể chống lại Env chỉ tạo miễn dịch một lần duy nhất. Động vật được tạo miễn dịch chỉ bằng đường IM có hàm lượng tế bào T trợ giúp tạo nang T ngoại vi (pTfh) trong máu cao, nhưng Tfh thấp trong các hạch bạch huyết và có hoạt tính kháng thể gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC) thấp hơn. Động vật được tạo miễn dịch bằng đường IN có Tfh cao trong các hạch bạch huyết, nhưng pTfh thấp trong máu và có kháng thể ADCC cao hơn. Khi động vật đã tạo miễn dịch được thử thách theo đường trực tràng với $SHIV_{SF162P3}$, tất cả chúng đều bị lây nhiễm, nhưng những động vật có lớp màng nhầy có tải lượng virut thấp hơn rõ rệt trong đường tiêu hóa của chúng. Tương tự, Ad657 mang gen cho kháng nguyên

viêm gan C có thể tạo ra đáp ứng của tế bào lympho T gây độc tế bào (CTL) chống lại virut viêm gan và virut cự bào. Ad657 có thể phân phối và biểu hiện các gen trị liệu bao gồm các xytokin giống 4-1BBL, yếu tố kích thích đại thực bào bạch cầu hạt (GMCSF) và IL-21. Các kết quả thu được ở đây chứng minh rằng Ad tái tổ hợp có thể được sử dụng làm chất dẫn phân phối tại chỗ hoặc toàn thân đối với axit nucleic, vacxin và/hoặc liệu pháp virut tiêu diệt khối u để điều trị ung thư.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Nói chung, một khía cạnh của sáng chế này đề xuất Ad tái tổ hợp bao gồm (a) hệ gen Ad từ chủng Ad thứ nhất và (b) axit nucleic mã hóa cho polypeptit hexon từ chủng Ad thứ hai, trong đó một hoặc nhiều vùng siêu biến (HVR) của polypeptit hexon khác với các HVR được mã hóa bởi hệ gen Ad. Chủng Ad thứ nhất có thể là chủng Ad thứ nhất của người và chủng Ad thứ hai có thể là chủng Ad thứ hai của người, khác với chủng Ad thứ nhất của người. Chủng Ad thứ nhất và chủng Ad thứ hai có thể khác nhau về đặc tính huyết thanh. Chủng Ad thứ nhất có thể là chủng Ad6 của người và chủng Ad thứ hai có thể là chủng Ad57 của người. Ad tái tổ hợp cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều polypeptit hướng đích, polypeptit kháng nguyên, enzym, đột biến thế axit amin, PEGyl hóa, phối tử, thẻ và tương tự.

Ad tái tổ hợp có thể được sử dụng làm vectơ để tiêm chủng trên cơ sở gen, cho dùng/phân phối liệu pháp gen, hoặc cho liệu pháp virut tiêu diệt khối u.

Theo phương án khác, Ad tái tổ hợp bao gồm (a) hệ gen Ad từ chủng Ad thứ nhất và (b) axit nucleic mã hóa cho ít nhất một polypeptit hexon từ một hoặc nhiều chủng Ad, trong đó vùng siêu biến (HVR) của polypeptit hexon từ một hoặc nhiều chủng Ad khác với HVR được mã hóa bởi hệ gen Ad thứ nhất.

Theo phương án khác, Ad tái tổ hợp có thể là Ad có khả năng sao chép hoặc Ad sao chép có điều kiện (ví dụ, CRAd).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất Ad tái tổ hợp và/hoặc khảm bao gồm (a) axit nucleic mã hóa cho polypeptit hexon thứ nhất và (b) polypeptit hexon thứ hai, trong đó trình tự axit amin của polypeptit hexon thứ nhất khác với trình tự axit amin của polypeptit hexon thứ hai. Trình tự axit amin của vùng siêu biến (HVR) trong polypeptit hexon thứ nhất có thể khác với trình tự axit amin của vùng siêu biến trong polypeptit hexon thứ hai. Axit nucleic có thể từ chủng Ad thứ nhất và polypeptit hexon

thứ hai có thể từ chủng Ad thứ hai. Chủng Ad thứ nhất có thể là chủng Ad thứ nhất của người và chủng Ad thứ hai có thể là chủng Ad thứ hai của người khác với chủng Ad thứ nhất của người. Chủng Ad thứ nhất và chủng Ad thứ hai có thể khác nhau về đặc tính huyết thanh. Chủng Ad có thể là chủng Ad6 của người và chủng Ad thứ hai có thể là chủng Ad57 của người. Ad tái tổ hợp cũng có thể bao gồm polypeptit hướng đích. Polypeptit hướng đích có thể chứa trình tự axit amin TARGEHKEEELI (SEQ ID NO: 1).

Theo phương án khác, Ad tái tổ hợp bao gồm (a) axit nucleic mã hóa cho polypeptit hexon thứ nhất và (b) polypeptit hexon thứ hai từ một hoặc nhiều chủng Ad, trong đó trình tự axit amin của polypeptit hexon thứ nhất khác với trình tự axit amin của polypeptit hexon thứ hai từ một hoặc nhiều chủng Ad.

Theo phương án khác, Ad tái tổ hợp có thể là Ad có khả năng sao chép hoặc Ad sao chép có điều kiện (ví dụ, CRAd).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vật liệu và phương pháp điều trị cho động vật có vú mắc ung thư. Các phương pháp này bao gồm, hoặc gần như chỉ bao gồm, bước cho động vật có vú mắc ung thư dùng, Ad tái tổ hợp bao gồm (a) hệ gen Ad từ chủng Ad thứ nhất và (b) ít nhất một polypeptit hexon từ một hoặc nhiều chủng Ad, trong đó một hoặc nhiều vùng siêu biến (HVR) trong polypeptit hexon này khác với HVR được mã hóa bởi hệ gen Ad và/hoặc Ad bao gồm (a) axit nucleic mã hóa cho polypeptit hexon thứ nhất và (b) polypeptit hexon thứ hai, trong đó trình tự axit amin của polypeptit hexon thứ nhất khác với trình tự axit amin của polypeptit hexon thứ hai. Động vật có vú là con người. Bệnh ung thư có thể là ung thư tuyến tiền liệt, ung thư buồng trứng, ung thư phổi, bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư tuyến tụy, ung thư thận, u hắc tố, ung thư não, ung thư đại tràng, u lympho, u tủy, bệnh bạch cầu dòng tế bào lympho hoặc bệnh bạch cầu dòng tế bào tủy xương. Việc dùng có thể bao gồm dùng toàn thân hoặc tại chỗ (ví dụ trong tĩnh mạch, trong khối u, trong cơ, trong nội tạng, trong hạch bạch huyết).

Ở đây, nó được chứng minh rằng Ad657 và biến thể của chúng có thể phân phối gen trị liệu đến tế bào để biểu hiện các polypeptit trị liệu. Do đó, Ad tái tổ hợp, bao gồm Ad khảm, có thể được sử dụng làm chất dẫn phân phối tại chỗ hoặc toàn thân đối với axit nucleic, vacxin và/hoặc liệu pháp virut tiêu diệt khối u để điều trị ung thư.

Chi tiết về một hoặc nhiều phương án trong sáng chế được nêu trong các ví dụ và hình vẽ kèm theo, cũng như trong phần mô tả bên dưới. Các dấu hiệu, mục đích và uu điểm của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng thông qua phần mô tả và hình vẽ, và từ bộ yêu cầu bảo hộ. Adenovirut (Ad) tái tổ hợp bao gồm (a) hệ gen Ad mã hóa cho polypeptit hexon từ chủng Ad thứ nhất và (b) axit nucleic mã hóa cho ít nhất một polypeptit hexon từ một hoặc nhiều chủng Ad khác, trong đó có ít nhất một vùng siêu biến (HVR) của polypeptit hexon khác với HVR được mã hóa bởi hệ gen Ad của chủng Ad thứ nhất.

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất Ad tái tổ hợp, trong đó chủng Ad thứ nhất và một hoặc nhiều chủng Ad khác khác nhau về đặc tính huyết thanh.

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất Ad tái tổ hợp, trong đó chủng Ad thứ nhất là chủng Ad6 của người và trong đó chủng Ad thứ hai là chủng Ad57 của người.

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất Ad tái tổ hợp, còn chứa thêm axit nucleic mã hóa cho polypeptit hướng đích, kháng nguyên, enzym, thụ thể, phối tử hoặc thẻ.

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất Ad tái tổ hợp, trong đó polypeptit hướng đích chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 1-41 và SEQ ID NO:46-47.

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất Ad tái tổ hợp, trong đó Ad tái tổ hợp đã nêu là Ad có khả năng sao chép.

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất Ad tái tổ hợp, trong đó Ad có khả năng sao chép là Ad một chu kỳ hoặc Ad sao chép có điều kiện (CRAd).

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất adenovirut (Ad) tái tổ hợp bao gồm (a) polypeptit capsit Ad từ chủng Ad thứ nhất và (b) ít nhất một polypeptit hexon từ một hoặc nhiều chủng Ad khác nhau, trong đó vùng siêu biến (HVR) trong polypeptit hexon hoặc polypeptit capsit khác với HVR hoặc polypeptit của chủng Ad thứ nhất.

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất adenovirut (Ad) tái tổ hợp bao gồm (a) axit nucleic mã hóa cho polypeptit hexon thứ nhất và (b) axit nucleic mã hóa cho polypeptit hexon thứ hai, trong đó trình tự axit amin của polypeptit hexon thứ nhất khác với trình tự axit amin của polypeptit hexon thứ hai.

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất Ad tái tổ hợp, trong đó axit nucleic mã hóa cho ít nhất một polypeptit hexon khác với trình tự axit amin của vùng siêu biến trong polypeptit hexon thứ hai.

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất Ad tái tổ hợp, trong đó axit nucleic đã nêu là từ chủng Ad thứ nhất, và trong đó polypeptit hexon thứ hai là từ chủng Ad thứ hai

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất Ad tái tổ hợp, trong đó chủng Ad thứ nhất là chủng Ad thứ nhất của người, và trong đó chủng Ad thứ hai là chủng Ad thứ hai của người khác với chủng Ad thứ nhất của người.

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất Ad tái tổ hợp, trong đó chủng Ad thứ nhất và chủng Ad thứ hai khác nhau về đặc tính huyết thanh.

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất Ad tái tổ hợp, trong đó chủng Ad thứ nhất là chủng Ad6 của người và trong đó chủng Ad thứ hai là chủng Ad57 của người.

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất Ad tái tổ hợp, còn chứa thêm polypeptit hướng đích.

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất Ad tái tổ hợp, trong đó polypeptit hướng đích đã nêu chứa trình tự axit amin TARGEHKEEELI (SEQ ID NO:1).

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất Ad tái tổ hợp, trong đó Ad tái tổ hợp đã nêu là Ad có khả năng sao chép.

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất Ad tái tổ hợp, trong đó Ad có khả năng sao chép đã nêu là Ad một chu kỳ hoặc Ad sao chép có điều kiện (CRAd).

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho động vật có vú mắc ung thư, trong đó phương pháp bao gồm bước cho động vật có vú đã nêu dùng adenovirut (Ad) tái tổ hợp như đã mô tả trong bản mô tả này.

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất phương pháp, trong đó bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm ung thư tuyến tiền liệt, ung thư buồng trứng, ung thư phổi, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư tụy, ung thư thận, u hắc tố, ung thư não, ung thư đại tràng, u lympho, u tủy, bệnh bạch cầu dòng tế bào lympho hoặc bệnh bạch cầu dòng tế bào tủy xương.

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất phương pháp, trong đó bước dùng bao gồm dùng toàn thân.

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất phương pháp, trong đó dùng toàn thân bao gồm dùng trong cơ, trong mũi, và trong tĩnh mạch.

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất phương pháp, trong đó bước dùng bao gồm dùng tại chỗ.

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất phương pháp, trong đó dùng tại chỗ đã nêu bao gồm tiêm trong khối u.

Trừ khi được chỉ ra là khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong bản mô tả này có cùng một nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế theo đuổi. Mặc dù phương pháp và vật liệu tương tự hoặc tương đương với phương pháp và vật liệu được mô tả ở đây có thể sử dụng để thực hành sáng chế, phương pháp và vật liệu thích hợp được mô tả bên dưới. Tất cả các công bố, đơn sáng chế, bằng sáng chế và các tài liệu tham khảo khác được đề cập ở đây được kết hợp bằng cách viện dẫn toàn bộ. Trong trường hợp có xung đột, bản mô tả sáng chế, bao gồm các định nghĩa, sẽ có hiệu lực. Ngoài ra, các nguyên liệu, phương pháp và ví dụ chỉ mang tính minh họa và không có mục đích giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Chi tiết của một hoặc nhiều phương án trong sáng chế được nêu trong hình vẽ kèm theo và phần mô tả bên dưới. Các dấu hiệu, mục đích và ưu điểm của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng thông qua phần mô tả và hình vẽ, và từ bộ yêu cầu bảo hộ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 trình bày sự dịch mã của peptit đặc hiệu phạm vi từ thể thực khuẩn thành adenovirut. A) Sơ đồ về thư viện trình diện thể thực khuẩn chứa các tấm β trong sợi HI của Ad5 mà bắt buộc về mặt cấu trúc là thư viện peptit 12-đơn vị ngẫu nhiên. Hình dưới đây mô tả vị trí tương tự về cấu trúc giữa các tấm β7 và β8 trong hexon HVR5 của Ad5. B) Sắp thẳng hàng axit amin nguyên bản của 12.51 và 12.52 trong thư viện HI và vị trí của chúng khi được chèn vào trong HVR5 của hexon. C) Đại diện của virut biểu hiện GFP-Luc Ad5 được cải biến với peptit.

Fig. 2 trình bày việc tải nạp *in vitro* A) Biểu hiện GFP bằng kính hiển vi huỳnh

quang của tế bào C2C12 lây nhiễm với 10^4 vp/tế bào của vectơ được chỉ định 2 ngày sau lây nhiễm. B) Hoạt tính luciferaza từ tế bào C2C12 sau 2 ngày lây nhiễm với MOI khác nhau của Ad được chỉ định.

Fig. 3 trình bày sự tải nạp *in vivo* ở chuột. A) Tạo ảnh luciferaza của chuột 1 ngày sau khi tiêm theo đường tĩnh mạch (IV) hoặc trong cơ (IM). Chuột được tiêm IM tiếp nhận 10^9 vp vào trong mỗi cơ bốn đầu. Chuột được tiêm IV tiếp nhận 10^{10} vp bằng tĩnh mạch đuôi. B) Định lượng hoạt tính luciferaza bằng cách chụp ảnh vào những ngày được chỉ định sau khi tiêm. * $p < 0,05$ bằng ANOVA một yếu tố. *** $p < 0,001$ bằng ANOVA một yếu tố.

Fig. 4 trình bày sự tải nạp *in vivo* ở chuột đồng. A) Hoạt tính luciferaza trong cơ của chuột đồng 1 ngày sau khi tiêm với 10^{10} vp theo đường IM. ** $p < 0,01$ kiểm định t-test.

Fig. 5 trình bày đáp ứng miễn dịch trên cơ sở gen 16 tuần sau khi tạo miễn dịch bằng đường IM một lần duy nhất. Chuột từ Fig. 3 được lấy máu sau 16 tuần sau khi tiêm IM và huyết thanh của chúng được phân tích trong dịch pha loãng hàng loạt bằng ELISA để phát hiện kháng thể chống lại protein GFP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ bằng ANOVA một yếu tố. **** $p < 0,0001$ bằng ANOVA một yếu tố. Tất cả chuột được tiêm Ad đều tạo ra lượng đáng kể kháng thể kháng GFP so với nhóm PBS tại độ pha loãng huyết thanh là 1:10,000 đến 1:1000. So sánh giữa Ad5-GL-HVR-12.51 và 12.52 với Ad5-GL được thể hiện bằng dấu hoa thị màu đen. So sánh giữa Ad5-GL-HVR-12.51 và Ad5-GL-HVR-12.52 được thể hiện bằng dấu hoa thị màu xám. Đường nét đứt và đường chấm chấm màu xám tại OD 0,06 cho thấy khoảng tin cậy 95% tách biệt các kháng thể mà khác với nhóm PBS.

Fig. 6 trình bày cây phát sinh chủng loại của toàn bộ trình tự hệ gen của các kiểu huyết thanh adenovirut của người.

Fig. 7 trình bày sự sắp thẳng hàng của Ad5, 6 và 57 cho thấy sự cải biến trong hexon và vùng E3. (A) Sắp thẳng hàng ADN Pustell của hệ gen của Ad6 và Ad57. Các ô để chỉ hexon và vùng E3 thay đổi nhiều nhất giữa hai virut. (B) Sắp thẳng hàng axit amin ClustalW của vùng siêu biến trong protein hexon từ Ad5, Ad6, và Ad57. Sắp thẳng hàng được thực hiện trên phần mềm MacVectơr.

Fig. 8 trình bày hình vẽ về cấu trúc của Ad657 bằng cách thay thế HVR Ad6

bằng HVR Ad57. Các từ viết tắt: HVR, vùng siêu biến.

Fig. 9 thể hiện hoạt tính tiêu diệt khối u *in vitro*. Tế bào LNCaP và DU145 được xử lý bằng virut được chỉ định với lượng vp/tế bào được chỉ định trong 5 ngày. Tế bào được nhuộm với tím tinh thể và khả năng sống sót của thế bào được đo lại bằng OD595. Khả năng sống của tế bào (%) được tính toán bằng cách chia OD của mẫu cho OD trung bình của tế bào đối chứng không được xử lý trên cùng đĩa 96 giếng và nhân số này với 100. (A) tiêu diệt tế bào LNCap. (B) tiêu diệt tế bào DU145. Chữ việt tắt: vp, hạt virut.

Fig. 10 trình bày tác động của Ad tiêu diệt khối u đến thương tổn gan. Chuột C57BL/6 (n=6 con mỗi nhóm) được tiêm với 1011 vp mỗi virut theo tĩnh mạch đuôi. (A) Khả năng sống sót Kaplan–Meier. (B) Máu được lấy để đo ALT 3 ngày sau khi tiêm (****p<0,001 bằng ANOVA). Chữ viết tắt: ALT, alanin aminotransferaza; vp, hạt virut.

Fig. 11 trình bày hoạt tính chống ung thư của Ad6 và Ad657 trong khối u DU145 ghép ngoại lai trong chuột trụi lông sau. Chuột trụi lông (n=9 mỗi nhóm) mang các khối u DU145 đã tạo ra được tiêm i.v với liều đơn 3×10^{10} vp của virut được chỉ định hoặc với PBS. (A) Tác động của việc chỉ tiêm i.v. lên sinh trưởng khối u. Kích thước khối u được đo bằng thước cặp và thể tích khối u được tính toán là chiều rộng^2×chiều dài×1/2. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng trung bình ± SE. *p<0,05, ****p=0,0001 bằng ANOVA hoặc bằng kiểm định T-test như được mô tả trong sáng chế. Dấu hoa thị màu đen với mũi tên màu đen chỉ lên trên cho biết sự khác biệt thống kê giữa nhóm Ad6 và nhóm PBS vào ngày được chọn. Dấu hoa thị màu xám và mũi tên màu xám chỉ lên trên cho biết sự khác biệt giữa nhóm Ad657 và nhóm PBS vào ngày được chỉ định. Dấu hoa thị màu trắng được đổ bóng cùng với mũi tên màu xám chỉ xuống cho biết sự khác biệt thống kê giữa nhóm Ad6 và Ad657 vào ngày được chỉ định. (B) Tác động của chỉ tiêm i.v. lên khả năng sống sót. Động vật được giết chết êm ái khi thể tích khối u đạt 2000 µL hoặc khi đáp ứng các tiêu chuẩn để giết chết khác (ví dụ, vết loét) và vẽ đồ thị đường cong sống sót Kaplan–Meier (*p<0,05, **p<0,01 bằng phân tích log-rank). Chữ viết tắt: i.v., tĩnh mạch.

Fig. 12 trình bày chụp ảnh luciferaza ở chuột trụi lông. Bốn ngày sau khi chỉ tiêm i.v. 3×10^{10} vp của Ad6 và Ad657-GFP-Luc bị mất một phần 12.5K, 6.7K, 19K,

11.6K (ADP), 10.4K (RIDα), 14.5K (RIDβ), và 14.7K và mất một phần E4 34K. Chữ viết tắt: i.v., tĩnh mạch; vp, hạt virut.

Fig. 13 trình bày chụp ảnh luciferaza ở chuột trụi lông. Lưu ý: mười bốn ngày sau khi chỉ tiêm i.v. 3×10^{10} vp của Ad657-GFP-Luc. Chữ viết tắt: i.v., tĩnh mạch; vp, hạt virut.

Fig. 14 trình bày hàm lượng liên kết với Env HIV trong huyết tương. Tạo miễn dịch với các protein SC-Ad và gp140 khác nhau được hiển thị trên biểu đồ bằng các mũi tên lớn. Trung điểm hàm lượng liên kết với gp140 F8 bằng ELISA được trình bày cho mỗi động vật trước và sau mỗi lần tạo miễn dịch. Đường nét đứt thể hiện giới hạn phát hiện tối thiểu đối với kháng thể trong thử nghiệm này. Các ký hiệu nằm rải rác theo hướng x tại mỗi thời điểm cho phép quan sát các phép đo riêng lẻ. SC-Ad6-Ebov là vacxin Ad đối chứng âm. Nhóm động vật này được tăng cường với gp140. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p< 0,001$, **** $p < 0,0001$ bằng ANOVA một yếu tố so với nhóm SC-Ad6-Ebov.

Fig. 15 trình bày hàm lượng trung hòa HIV trong huyết tương. Trung hòa virut được chỉ định được thực hiện sử dụng thử nghiệm trung hòa TZM-bl. Tất cả các giá trị được tính toán so với các giếng chỉ có virut. Mỗi dấu chấm đại diện cho giá trị trung bình đối với mỗi động vật.

Fig. 16 trình bày hoạt tính ADCC ở huyết tương. Mẫu huyết tương được đem đi thử nghiệm với tế bào hiệu ứng CD16-KHYG-1 để tiêu diệt CEM.NKR.CCR5.CD4+-Luc, tế bào đích lây nhiễm với $SHIV_{SF162P3}$. Mỗi dấu chấm đại diện cho giá trị trung bình đối với mỗi động vật. * $p < 0,05$, *** $p< 0,001$, **** $p < 0,0001$ bằng ANOVA một yếu tố so với nhóm SC-Ad6-Ebov.

Fig. 17 trình bày hoạt tính ADCC ở niêm mạc. Mẫu nước bọt và rửa âm đạo được đem đi thử nghiệm với tế bào hiệu ứng CD16-KHYG-1 để tiêu diệt CEM.NKR.CCR5.CD4+-Luc, tế bào đích lây nhiễm với SHIVSF162P3. Mỗi dấu chấm đại diện cho giá trị trung bình đối với mỗi động vật. * $p < 0,05$ bằng ANOVA một yếu tố so với nhóm SC-Ad6-Ebov.

Fig. 18 trình bày tế bào tiết IFN-γ từ PBMC và hạch bạch huyết. PBMC và tế bào hạch bạch huyết được phân tích bằng ELISPOT bằng cách nhuộm IFN-γ. Kháng Env dùng để chỉ tế bào được kích thích bằng peptit Env HIV bảo toàn, và SC-Ad.

Tổng số lượng của tế bào hình thành đốm (SFC) trong mỗi giếng được kích thích được đếm và điều chỉnh để kiểm soát môi trường làm nền. Mỗi dấu chấm đại diện cho giá trị trung bình đối với mỗi động vật. * $p < 0,05$ bằng ANOVA một yếu tố.

Fig. 19 trình bày việc hoạt hóa và vận chuyển tế bào T ở cơ. Tế bào T được thu hoạch từ sinh thiết trực tràng thu thập sau lần tăng cường protein thứ hai và được phân tích bằng kỹ thuật phân tích tế bào theo dòng chảy đối với CD4, CD8, α4β7 integrin, CD69, và FoxP3. Mỗi dấu chấm đại diện cho giá trị trung bình đối với mỗi động vật.

Fig. 20 trình bày đáp ứng tế bào Tfh trong máu và hạch bạch huyết. PBMC và tế bào hạch bạch huyết được thu thập tại tuần 40 được kích thích bằng protein Env HIV-1 và sau đó kiểm tra sự đồng biểu hiện của CD3+, CD4+, CXCR5+, và IL-21. Mỗi dấu chấm đại diện cho giá trị trung bình đối với mỗi động vật. * $p < 0,05$ bằng ANOVA một yếu tố.

Fig. 21 trình bày sự bảo vệ chống lại thử thách $SHIV_{SF162P3}$ trực tràng lặp đi lặp lại. Các nhóm chỉ định được thử thách trực tràng với 4.3 TCID50 (trên PBMC khỉ rezut) của $SHIV_{SF162P3}$ hàng tuần. Mẫu huyết tương được phân tích bản sao ARN virut SHIV. Động vật có bản sao ARN trên 10 được xem là bị lây nhiễm và số lần thử thách cần thiết để lây nhiễm mà động vật được sử dụng làm sự kiện đối với phân tích khả năng sống sót Kaplan-Meier.

Fig. 22 trình bày việc thu được $SHIV_{SF162P3}$ và tải lượng virut. A) Động vật từ Fig. 8 được chia nhóm theo đường mồi SC-Ad ban đầu (IM hoặc IN) thu được 8 nhóm và phân tích Kaplan-Meier được thực hiện. B) Hàm lượng ARN của virut SHIVSF162P3 trong huyết tương trong quá trình nghiên cứu thử thách.

Fig. 23 trình bày tải lượng virut SHIV trong mô. ARN từ PBMC và mô sau khi chết được thu thập và thực hiện qPCR để phát hiện ARN virut SHIV được phân tích.

Fig. 24 trình bày vacxin adenovirut một chu kỳ được sử dụng trong Ví dụ 7. A) Sơ đồ cấu trúc của SC-Ad kiểu huyết thanh 6 và 657 mang gen vỏ HIV nhánh B là F8 và G4. A) Sự sắp thẳng hàng của hexon trong Ad nhánh C bao gồm hexon Ad6 và 57 trình diện trên vacxin.

Fig. 25 trình bày hàm lượng liên kết với env HIV trong nước bọt và âm đạo. Mức độ OD450 bằng ELISA được trình bày đối với các mẫu chỉ định tại độ pha loãng

chỉ định khi thử nghiệm chống lại F8. Hàm lượng kháng thể thấp trong các mẫu niêm mạc này ngăn ngừa đạt đến độ bão hòa trong thử nghiệm. Vì lý do này, giá trị EC50 không thể tính toán chính xác với hầu hết động vật. Khỉ rezut Rh13-091 trong nhóm IN-IM-IM chỉ là động vật trong đó EC50 có thể được tính toán (EC50 = 4580). Kết quả tương tự quan sát thấy trong ELISA sử dụng SF162 gp140.

Fig. 26 trình bày Ad657 biểu hiện gen kháng nguyên từ virut viêm gan C và virut cự bào (CMV) gB tạo ra hoạt tính tế bào lympho T gây độctế bào (CTL) *in vitro* Được trình bày là việc tiêu diệt tế bào đích nạp peptit virut viêm gan C ở chuột được tạo miễn dịch với Ad657-HCV thay vì CMV gB.

Fig. 27 trình bày biểu hiện của GMCSF của người từ Ad657 gây ra tăng sinh nguyên hồng cầu người TF-1 phụ thuộc vào GMCSF.

Fig. 28 là biểu đồ thể hiện việc chỉ tiêm IV Ad6 so với khối u phổi A549.

Fig. 29 là biểu đồ thể hiện việc chỉ tiêm IV hoặc IT Ad6 so với khối u tụy Panc1.

Fig. 30 là biểu đồ thể hiện việc chỉ tiêm IV Ad6 so với ung thư thận trong chuột có khả năng miễn dịch đầy đủ.

Fig. 31 là biểu đồ thể hiện hoạt tính luciferaza trong khối u hắc tố B16 và tế bào ung thư/khối u phổi A549 bằng Ad trình diện peptit liên kết tế bào 12.51 trong HVR5 của hexon.

Fig. 32 là biểu đồ thể hiện hoạt tính luciferaza trong ung thư biểu mô tế bào gan và ung thư thận bằng Ad trình diện peptit liên kết tế bào 12.51 trong HVR5 của hexon.

Fig. 33 là hình vẽ việc kết hợp giữa việc thêm các HVR riêng rẽ từ các kiểu huyết thanh Ad khác nhau với việc thêm peptit hướng đích/khử hướng đích tế bào hoặc axit amin mới chẳng hạn như xystein vào trong hexon để cải biến hóa học hướng đích và che chắn. Được mô tả là cấu trúc HVR khảm mà kết hợp các HVR khác nhau từ các kiểu huyết thanh Ad khác nhau để biến đổi tương tác tự nhiên với tế bào và yếu tố máu cải thiện dược lý kết hợp với việc chèn thêm peptit liên kết tế bào và khử hướng đích tế bào trong HVR khác nhau để thay đổi sự xâm nhập tế bào và sự trốn tránh tế bào. Nếu một HVR được thay thế từ 100 Ad, điều này sẽ tạo ra 100 thể khảm hexon khác nhau. Nếu toàn bộ 7 HVR, mỗi cái nhận một HVR Ad khác nhau, thư viện

tái tổ hợp này sẽ bằng 7^{100} biến thể. Nếu 1 peptit được đưa vào trong 7 HVR, điều này sẽ bằng với 7 X 7^{100} biến thể. Nếu 10 peptit khác nhau được đưa vào trong 7 HVR, điều này sẽ bằng với 10 X 7 X 7^{100} biến thể, v.v..

Fig. 34 trình bày biểu đồ plasmit đối với hexon tổ hợp đại diện và các tổ hợp peptit. Được trình bày là hexon có HVR1 từ Ad6 và HVR 2-7 từ Ad57 cũng như việc chèn thêm peptit hướng đích tế bào vào trong các HVR riêng rẽ.

Fig. 35 trình bày cấu trúc HVR thể khảm mà kết hợp các HVR khác nhau từ các kiểu huyết thanh Ad khác nhau để biến đổi tương tác tự nhiên với tế bào và yếu tố máu cải thiện dược lý kết hợp với việc chèn thêm peptit liên kết tế bào và khử hướng đích tế bào trong HVR khác nhau để thay đổi sự xâm nhập vào tế bào và sự trốn tránh tế bào. Trong ví dụ này, chỉ axit amin xystein được chèn vào trong HVR1 và HVR5 của Ad657 để biến đổi dược lý và cho phép liên hợp hướng đích của các polyme như là polyetylen glycol hoặc các gốc khác như là chất tạo ảnh như huỳnh quang.

Fig. 36 trình bày sự liên hợp của polyetylen glycol (PEG) với Ad657-HVR1-C. A) SDS-PAGE của protein Ad có và không có PEGyl hóa. Các mũi tên cho thấy kích thước tăng lên do gắn kết hóa học của PEG vào hexon. B) Tác động của việc PEGyl hóa hướng đích bằng maleimit-PEG và NHS-PEG không hướng đích lên lây nhiễm virut.

Fig. 37 trình bày sự liên hợp của polyetylen glycol (PEG) với Ad657-HVR5-C. A) SDS-PAGE của protein Ad có và không có PEGyl hóa. B) Chụp ảnh cận hồng ngoại SDS-PAGE của các protein Ad có và không có PEGyl hóa và có và không có chụp ảnh huỳnh quang cận hồng ngoại gắn thẻ IR800. C) Việc tải nạp *in vivo* sau khi tiêm trong bụng Ad657-HVR5-C maleimit-được PEGyl hóa bằng chụp ảnh luciferaza.

Fig. 38 trình bày chụp ảnh luciferaza ở chuột trụi lông. A) 1, 4, 7, 14, 28, và 42 ngày sau khi chỉ tiêm I.V. điều trị Ad6 với khối u tuyến tiền liệt DU145 xa. B) 3, 7, và 19 ngày sau khi chỉ tiêm I.V. Ad5-GFPLUC sao chép vào trong chuột mang khối u tuyến tiền liệt LNCaP.

Fig. 39 trình bày sơ đồ của Ad sao chép có điều kiện (CRAd) đặc hiệu ung thư dl1101+dl1107 có cải biến ở gen E1A.

Fig. 40 là biểu đồ thể hiện rằng cả Ad6 và Ad657 đều được sử dụng làm CRAd

đối với trị liệu ung thư hướng đích.

Fig. 41 là sơ đồ trình bày các đợt trị liệu Ad. A) Sơ đồ về chuyển đổi kiểu huyết thanh với Ad. B) Sơ đồ đợt trị liệu minh họa trong đó Ad6 và Ad657 có thể sử dụng cho nhiều đợt điều trị bằng chuyển đổi kiểu huyết thanh kết hợp với liên hợp polyme cộng hóa trị.

Fig. 42 chứng minh chuyển đổi kiểu huyết thanh và hoạt tính luciferaza trên đích trong khối u tuyến tiền liệt DU145 sau khi chỉ tiêm IV Ad6 và Ad6-F35 bị mất gen E3A (12.5K, 6.7K, 19K, 11.6K), nhưng giữ lại gen E3B (10.4K, 14.5K, và 14.7K) và giữ lại E4 34K. Chuột mà khối u của nó cưỡng lại được việc tiêm IV trước đó với Ad657 và CRAd657 cả hai đều có gen E3 nguyên bản được tiêm với vectơ chỉ định bằng cách tiêm IV.

Fig. 43 là sơ đồ của Ad có khả năng sao chép (RC-Ad), trong đó biểu hiện E1 được kiểm soát bằng vùng gen khởi đầu E1 bẩm sinh; biến thể CRAd –Probasin-E1A (Ad-PB), trong đó việc biểu hiện E1 được kiểm soát bởi vùng gen khởi đầu probasin đặc hiệu tuyến tiền liệt; CRAd-dl1101, trong đó đã cắt bỏ liên kết con đường p300, nhạy với con đường IFN trong tế bào bình thường; CRAd-dl1107, trong đó đã cắt bỏ liên kết con đường pRB cho phép virut để tiêu diệt tế bào ung thư bằng cách gián đoạn con đường RB, nhưng bị kìm hãm trong tế bào bình thường RB+; CRAd-dl1101/07, trong đó đã cắt bỏ liên kết con đường p300, nhạy với con đường IFN cho phép virut tiêu diệt tế bào ung thư bằng cách làm gián đoạn con đường RB, nhưng bị kìm hãm trong tế bào bình thường RB+.

Fig. 44 (A và B) trình bày hiệu quả của việc lây nhiễm với Ad5, Ad6, Ad657 có khả năng sao chép trên tế bào không ung thư và việc cải biến Ad6 và Ad657 thành Ad sao chép có điều kiện (CRAd).

Fig. 45 chứng minh việc tiêu tiệt tế bào ung thư bằng Ad5, Ad6 và Ad657 có khả năng sao chép, và CRAd được chỉ định.

Fig. 46 chứng minh việc cải biến Ad66 và Ad657 thành Ad sao chép có điều kiện (CRAd).

Fig. 47 chứng minh việc cải biến Ad66 và Ad657 thành Ad sao chép có điều kiện (CRAd).

Fig. 48 chứng minh hiệu quả *in vivo* của Ad6 có khả năng sao chép hoặc CRAd

được chỉ định đối vợi sinh trưởng của khối u DU145 ở chuột.

Fig. 49 chứng minh hiệu quả *in vivo* của Ad657 có khả năng sao chép và Ad657-dl1101/07 sao chép có điều kiện cả hai đều có vùng E3 nguyên bản *in vivo* sau khi chỉ tiêm tĩnh mạch ở chuột mang khối u tuyến tiền liệt người.

Fig. 50 chứng minh rằng việc PEGyl hóa khử hướng đích adenovirut đến gan *in vitro*.

Fig. 51 chứng minh việc cải biến Ad657 có sợi ngắn hơn từ AdC68 tinh tinh và việc thêm gen E4 34.K lung lay mã bộ ba làm thay đổi hiệu quả *in vitro*.

Fig. 52 chứng minh virut 6/56/6 tiêu diệt tế bào ung thư tuyến tiền liệt người có và không có cải biến CRAd.

Fig. 53 chứng minh việc sản xuất đáp ứng kháng thể chống lại thụ thể folat alpha kháng nguyên ung thư người sau khi chỉ tạo miễn dịch trong cơ ở chuột BALB/c bằng CRAd657-dl1101/07-FOLR có vùng E3 nguyên bản.

Fig. 54 mô tả vị trí trên HVR của Ad cái mà có thể được cải biến, ví dụ, bằng PEGyl hóa hoặc "BAPryl hóa" có peptit nhận biotin (BAP).

Fig. 55 là sơ đồ về biến thể của Ad có đột biến trong protein E1 để chuyển hóa virut thành Ad sao chép có điều kiện (CRAd).

Fig. 56 trình bày trình tự axit amin của phần đầu N trong polypeptit E1A kiểu dại và đầu N của E1A trong biến thể CRAs dl1101, dl1107 và dl1101/1107.

Fig. 57 trình bày dưới dạng giản đồ các gen trốn tránh miễn dịch E3 khác nhau trong Ad loài C ví dụ như Ad6 và Ad loài D ví dụ như Ad26. Cả hai Ad đều biểu hiện biến thể kích thước và trình tự của gen E3 12.5K, 6.7K, 19K, 10.4K (RIDα), 14.5K (RIDβ), và 14.7K, cũng như mô tả chức năng của các protein mã hóa cho E3 này.

Fig. 58 chứng minh tác động của việc PEGyl hóa và mất E3 đến hoạt tính virut tiêu diệt khối u kháng khối u bằng virut Ad6-Luc trong chuột đồng có đủ sức đề kháng. Cả Ad6-Luc và Ad6-Luc-20K PEG đều có toàn bộ gen E3 và E4 34K nguyên bản. Ad6-deltaE3-Luc mất một phần gen E3 12.5K và E4 34K và mất toàn bộ gen E3 6.7K, 19K, 11.6K (ADP), 10.4K (RIDα), 14.5K (RIDβ), và 14.7K. Hiệu quả tiêu diệt khối u mất đi trong mô hình động vật có đủ sức đề kháng khi các gen trốn tránh miễn dịch này không có mặt trong adenovirut tiêu diệt khối u.

Fig. 59 là bản đồ plasmit của Ad657 mất một phần gen E3 12.5K và E4 34K và mất toàn bộ gen E3 6.7K, 19K, 11.6K (ADP), 10.4K (RIDα), 14.5K (RIDβ), và 14.7K.

Fig. 16 mô tả cấu trúc CEAd657 có hoặc không có cải biến dl1101/1107 CRAd và mất hoặc không mất gen trốn tránh miễn dịch E3 được chọn.

Fig. 61 mô tả CRAd657 có vị trí chèn E3. CRAd657 này có hoặc không có cải biến dl1101/1107 CRAd được mô tả trong bản mô tả này và có hoặc không có cải biến trốn tránh miễn dịch E3.

Fig. 62 mô tả sợi CRAd657 +/- Ad35 hoặc sợi C68 tinh tinh +/- peptit K7. Các cái này có hoặc không có cải biến dl1101/1107 CRAd được mô tả trước đó và có hoặc không có cải biến trốn tránh miễn dịch E3. Trong một số trường hợp, gen E4 34K lung lay mã bộ ba được đưa vào sau E4 và trước khi sợi để bù cho việc mất một phần E4 34K khi xóa mất gen E3B.

Fig. 63 mô tả sợi CRAd657 +/- Ad35 hoặc sợi C68 tinh tinh +/- peptit K7. Các cái này có hoặc không có cải biến dl1101/1107 CRAd được mô tả trước đó và có hoặc không có cải biến trốn tránh miễn dịch E3.

Fig. 64 mô tả sợi CRAd657 +/- Ad35 hoặc sợi C68 tinh tinh +/- peptit K7 biểu hiện thụ thể Folat alpha.

Fig. 65 mô tả sợi CRAd657 +/- Ad35 hoặc sợi C68 tinh tinh +/- peptit K7 biểu hiện yếu tố kích thích tạo cụm đại thực bào hạt (GMCSF).

Fig. 66 mô tả sợi CRAd657 +/- Ad35 hoặc sợi C68 tinh tinh +/- peptit K7 biểu hiện 4-1BBL hoặc GMCSF hoặc IL21 hoặc CD40L và các tổ hợp trong một virut.

Fig. 67 mô tả sợi Ad6/57 có Ad6 HVR1 và Ad57 HVR2-7 +/- Ad35 hoặc sợi C68 tinh tinh +/- peptit K7.

Fig. 68 mô tả sợi Ad6/57/6 có Ad6 HVR1, Ad57 HVR2-6, Ad6 HVR7 +/- Ad35 hoặc sợi C68 tinh tinh +/- peptit K7.

Fig. 69 mô tả sợi Ad6/57/6 có Ad6 HVR1, Ad57 HVR2-6, Ad6 HVR7 +/- Ad35 hoặc sợi C68 tinh tinh +/- peptit K7 biểu hiện GFPLuciferaza.

Fig. 70 trình bày chụp ảnh luciferaza sau khi chuyển đổi kiểu huyết thanh. Chuột mang khối u tuyến tiền liệt LNCaP trên sườn của nó được điều trị bằng cách

chỉ tiêm IV Ad657 hoặc CRAD657. Chuột mang khối u tồn dư 5 tháng sau khi chỉ tiêm IV được điều trị bằng cách chuyển đổi kiểu huyết thanh của biến thể Ad6/57/6 được chỉ định biểu hiện GFPLuciferaza có hoặc không có sợi biến thể và gen E4 34K được tối ưu hóa mã bộ ba. Biến thể Ad6/57/6 được chỉ định bao gồm virut Ad6/57/6 có các cải biến sợi khác nhau bao gồm thêm 7 lysin vào sợi (K7), sợi C68 tinh tinh được ghép vào sợi Ad6 sau miền linh hoạt KKTK của nó và với sợi Ad35. Chuột được chụp ảnh hoạt tính luciferaza vào 7 ngày sau.

Fig. 71 trình bày tế bào ung thư phổi người A549 được điều trị với hạt virut (vp) trên tế bào được chỉ định của Ad6/57/6 có hoặc không có sợi biến thể và gen E4 K34 được tối ưu hóa mã bộ ba. 7 ngày sau, tế bào được nhuộm vơi tím tinh thể và các giếng được phân tích trên đầu đọc đĩa. OD cao cho thấy có tế bào sống sót. OD thấp cho thấy tế bào chết hoặc mất kết dính.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp và vật liệu để phân phối axit nucleic, tiêm chủng vacxin và/hoặc điều trị ung thư. Ví dụ, sáng chế đề xuất phương pháp và vật liệu để phân phối axit nucleic của protein/polypeptit, tiêm chủng vacxin, và/hoặc điều trị ung thư sử dụng một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp (ví dụ, Ad657 và biến thể của nó) làm chất tiêu diệt khối u.

Adenovirut khối hai mươi mặt được tạo thành từ 720 bản sao của protein hexon của nó. Virut không sử dụng protein này để liên kết với thụ thể, nhưng mạng lưới nano của các protein lặp lại tạo ra ma trận để tương tác (ví dụ, tương tác tự nhiên và tương tác không tự nhiên) với protein, tế bào và thuốc. Kháng thể có thể trung hòa Ad có thể hướng đích đến vùng siêu biến (HVR) trong polypeptit hexon trên Ad.

Trong một số trường hợp, sáng chế này đề xuất Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư. Ví dụ, Ad tái tổ hợp có thể bắt nguồn từ Ad thứ nhất và có thể chứa HVR hexon từ một hoặc nhiều Ad khác nhau. HVR có thể bắt nguồn từ bất kỳ Ad loài C nào, ví dụ, Ad1, Ad2, Ad5, Ad6 và Ad57. Theo một phương án, Ad tái tổ hợp có thể bắt nguồn từ Ad thứ nhất và có thể chứa một hoặc nhiều HVR hexon từ ít nhất một Ad khác, trong đó ít nhất một HVR hexon khác với (các) HVR trong Ad thứ nhất. Chủng Ad thứ nhất có thể là chủng Ad6 của người, và chủng Ad thứ hai có thể là chủng Ad57 của người. Bản đồ plasmit xáo trộn của hexon (Fig. 34) cho thấy việc kết

hợp giữa việc chèn thêm các HVR riêng rẽ từ các kiểu huyết thanh Ad khác nhau với việc chèn thêm peptit hướng đích/khử hướng đích tế bào hoặc axit amin mới như là xystein vào trong hexon để cải biến hóa học hướng đích hoặc che chắn. Theo một phương án, Ad tái tổ hợp chứa đột biến thế axit amin, ví dụ, thay thế xystein thành các polypeptit, và các cải biến bao gồm PEGyl hóa và BAPyl hóa. Khả năng hướng đích polyme và các cải biến hóa học khác thành xystein được chèn vào trong hexon Ad657 được chứng minh ở đây.

Ad657 làm chất tiêu diệt khối u chống lại ung thư tuyến tiền liệt người đã được chứng minh. HVR trong Ad6 được thay thế bằng những cái từ Ad57 để tạo ra virut tiêu diệt khối u loài C khảm được gọi là Ad657. Ad657 và Ad6 được thử nghiệm như một liệu pháp tiêu diệt khối u toàn thân bằng chỉ tiêm tĩnh mạch trong chuột trụi lông mang khối u ung thư của người. Ad657 có thể được sử dụng làm liệu pháp virut tiêu diệt khối u toàn thân hoặc tại chỗ dùng cho ung thư. Các dữ liệu này cũng chứng minh hiệu quả bất ngờ của việc chuyển đổi kiểu huyết thanh với các Ad loài C tiêu diệt khối u.

Trong một số trường hợp, sáng chế này đề xuất phương pháp để sử dụng một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp được đề xuất ở đây để điều trị cho động vật có vú mắc, hoặc có nguy cơ mắc, ung thư, bệnh lây nhiễm, và/hoặc bệnh về gen. Ví dụ, có thể dùng một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp cho động vật có vú mắc hoặc có nguy cơ mắc, ung thư để làm giảm số lượng tế bào ung thư (ví dụ, bằng cách lây nhiễm và tiêu diệt tế bào ung thư) ở động vật có vú (ví dụ, con người). Ví dụ, có thể dùng một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp cho động vật có vú mắc hoặc có nguy cơ mắc, ung thư để kích thích đáp ứng miễn dịch chống lại ung thư ở động vật có vú (ví dụ, con người).

Trong một vài trường hợp, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad 657 tái tổ hợp và các biến thể của nó) không bị phá hủy bởi hệ miễn dịch của động vật có vú. Ví dụ, Ad tái tổ hợp không bị phá hủy bởi tế bào trình diện kháng nguyên (APC), đại thực bào, và/hoặc tế bào miễn dịch khác trong động vật có vú mà Ad tái tổ hợp được dùng.

Trong một vài trường hợp, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad 657 tái tổ hợp và các biến thể của nó) có thể được dùng cho nhiều đợt điều trị (ví dụ, hai hoặc nhiều) đợt

điều trị. Ví dụ, Ad tái tổ hợp thứ nhất được mô tả trong bản mô tả này có thể tránh được các kháng thể mà có thể trung hòa Ad tái tổ hợp thứ hai được mô tả trong bản mô tả này, và ngược lại. Trong trường hợp mà động vật có vú mắc ung thư được điều trị với một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này, trong đợt điều trị thứ nhất động vật có vú có thể dùng Ad tái tổ hợp thứ nhất và sau đó trong đợt điều trị thứ hai có thể dùng Ad tái tổ hợp thứ hai.

Trong một số trường hợp, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad 657 tái tổ hợp và các biến thể của nó) có thể là Ad có khả năng sao chép (RC-Ad). Ví dụ, RC-Ad có thể là RC-Ad mà chứa axit nucleic mã hóa cho polypeptit E1 (ví dụ, E1+ RC-Ad). Ví dụ, RC-Ad có thể là Ad một chu kỳ (SC-Ad) mà mất một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa cho một hoặc nhiều polypeptit liên quan đến việc sản xuất thế hệ virut lây nhiễm (ví dụ, pIIIa và E3). Ví dụ, RC-Ad có thể là Ad sao chép có điều kiện (CRAd). Ví dụ về Ad một chu kỳ và làm thế nào để tạo ra và sử dụng chúng được nêu ở tài liệu khác (công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2009/111738).

Trong một vài trường hợp, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad 657 tái tổ hợp và các biến thể của nó) có thể là Ad khiếm khuyết sao chép (RD-Ad). Ví dụ, RD-Ad có thể là RD-Ad mà mất axit nucleic mã hóa cho polypeptit E1 (ví dụ, RD-Ad bị mất E1).

Điều này đã được chứng minh trong các ví dụ trong bản mô tả này rằng CRAd 657 và biến thể của nó là Ad sao chép có điều kiện (CRAd) trong tế bào ung thư và rằng việc lây nhiễm tế bào với CRAd657 và biến thể của nó làm giảm khả năng sống sót của tế bào và thể tích khối u. Do đó, CRAd 657 và các biến thể của nó có thể sử dụng làm liệu pháp virut tiêu diệt khối u toàn thân hoặc tại chỗ ở đối tượng mắc ung thư.

Hơn nữa, nó được chứng minh rằng CRAd có thể sử dụng để biểu hiện kháng nguyên và sử dụng làm vacxin để tiêm chủng vacxin chống lại virut, ví dụ, chống lại virut gây suy giảm miễn dịch người (HIV), virut gây u nhú ở người (HPV) và Virut viêm gan C (HCV).

Trong một vài trường hợp, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad 657 tái tổ hợp và

các biến thể của nó) có thể liên kết với thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, để tạo điều kiện cho virut xâm nhập vào tế bào). Ví dụ, Ad tái tổ hợp được mô tả ở đây có thể liên kết với thụ thể coxsackie-adenovirut (CAR) và/hoặc thụ thể Fc (ví dụ, FcμR và FcγR), thụ thể bổ thể (ví dụ, CR3 và/hoặc C2qR).

Theo một khía cạnh của sáng chế, CRAd có thể chứa axit nucleic mã hóa cho polypeptit khác loại với Ad, ví dụ, kháng nguyên, thụ thể bề mặt tế bào, polypeptit hướng đích tế bào và tương tự. Ví dụ, CRAd-657-dl1101/1107-FolR là Ad tái tổ hợp chứa E3 nguyên bản và biểu hiện thụ thể folat alpha của người. Nó đã được chứng minh ở đây rằng CRAd có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể chống lại kháng nguyên ung thư đã biết, ví dụ, thụ thể folat alpha.

Trong một vài trường hợp, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là các Ad 657 tái tổ hợp và biến thể của chúng) có thể tránh liên kết (ví dụ, không liên kết) với thụ thể lao công (ví dụ, để tạo điều kiện thuận lợi cho virut xâm nhập vào tế bào). Ví dụ, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này tránh liên kết với thụ thể SREC và/hoặc thụ thể SR-A.

Trong một vài trường hợp, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad 657 tái tổ hợp) có thể tránh được hiện tượng thực bào.

Trong một số trường hợp, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad 657 tái tổ hợp) không gây bệnh (ví dụ, cho động vật có vú đang được điều trị như được mô tả trong bản mô tả này).

Trong một số trường hợp, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad 657 tái tổ hợp) có thể lây nhiễm các tế bào đang phân chia (ví dụ, có thể chỉ lây nhiễm các tế bào đang phân chia).

Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này có thể là bất kỳ Ad tái tổ hợp thích hợp nào (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư) được tạo ra bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp và phương pháp đã biết với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Ad tái tổ hợp có thể là bất kỳ Ad nào được tạo ra bằng vật liệu tái tổ hợp (ví dụ, axit nucleic và/hoặc polypeptit) từ bất kỳ sinh vật nào khác ngoài Ad mà từ đó Ad tái tổ hợp được tạo ra. Ví dụ, Ad tái tổ hợp có thể bao gồm

một hoặc nhiều vật liệu mà không xuất hiện một cách tự nhiên trong Ad đó (ví dụ, không xuất hiện một cách tự nhiên trong Ad đó trước khi tái tổ hợp). Trong một số trường hợp, Ad tái tổ hợp được đề xuất ở đây có thể là Ad khảm (ví dụ, có thể bao gồm thành phần virut từ hai hoặc nhiều (ví dụ, hai, ba, bốn, năm hoặc nhiều) hệ gen Ad khác nhau).

Các phương án này cũng được áp dụng trong phạm vi của Ad cái mà kết hợp các HVR khác nhau từ các Ad khác nhau (tức là HVR xáo trộn). Ví dụ, HVR1 của Ad6 với HVR từ 2-7 của Ad57 hoặc HVR1 và 7 của Ad6 với HVR 2-6 của Ad57, hoặc HVR 1 và 7 từ Ad6 và HVR 2-6 từ Ad657.

Axit nucleic và/hoặc polypeptit mà không xuất hiện một cách tự nhiên trong Ad có thể từ bất kỳ nguồn thích hợp nào. Trong một số trường hợp, axit nucleic và/hoặc polypeptit mà không xuất hiện một cách tự nhiên trong Ad đó có thể từ sinh vật không phải virut. Trong một số trường hợp, axit nucleic và/hoặc polypeptit mà không xuất hiện một cách tự nhiên trong Ad đó có thể từ virut khác ngoài Ad. Trong một số trường hợp, axit nucleic và/hoặc polypeptit mà không xuất hiện một cách tự nhiên trong Ad đó có thể từ Ad thu được từ nhiều loài khác nhau. Trong một số trường hợp, axit nucleic và/hoặc polypeptit mà không xuất hiện một cách tự nhiên trong Ad đó có thể từ một chủng khác của Ad (ví dụ, chủng khác biệt về kiểu huyết thanh). Trong một số trường hợp, axit nucleic và/hoặc polypeptit mà không xuất hiện một cách tự nhiên trong Ad đó có thể là axit nucleic tổng hợp và/hoặc polypeptit tổng hợp.

Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad657 tái tổ hợp) có thể bắt nguồn từ (ví dụ, có thể bao gồm mạch chính hệ gen từ) bất kỳ Ad thích hợp nào. Trong một số trường hợp, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này có thể bắt nguồn từ Ad có trị số huyết thanh thấp. Ví dụ, 50% hoặc thấp hơn (ví dụ, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, hoặc thấp hơn) động vật có vú (ví dụ, con người) có thể phơi nhiễm với Ad mà từ đó Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này bắt nguồn. Liên quan đến trị số huyết thanh, adenovirut loài C, Ad6, Ad657 có mức độ phổ biến thấp hơn so với virut Ad5 nguyên mẫu. Trong một số trường hợp, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này có thể bắt nguồn từ Ad có tác dụng phụ giảm đi hoặc bị loại bỏ (ví dụ, hiện tượng thực bào hoặc tổn thương gan). Ad tái tổ hợp có thể bắt nguồn từ Ad được phân lập từ bất kỳ loại động vật thích hợp nào. Ví dụ, Ad có thể được phân lập từ

người, linh trưởng không phải con người (ví dụ, khỉ như là loại khỉ mũi dài như khỉ rezut), cá, ếch và rắn. Trong một số trường hợp, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này có thể bắt nguồn từ Ad người (HAd hoặc HAdv). Ad tái tổ hợp có thể bắt nguồn từ bất kỳ loài Ad nào (ví dụ, A, B, C, D, E, F, hoặc G). Trong một số trường hợp, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này có thể bắt nguồn từ Ad loài C (ví dụ, Ad loài C của người (HAd-C)). Ad tái tổ hợp có thể bắt nguồn từ bất kỳ kiểu huyết thanh Ad nào thích hợp (ví dụ, 2, 5, 6, hoặc 57). Trong một số trường hợp, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này có thể bắt nguồn từ kiểu huyết thanh Ad 6 (Ad6; ví dụ, Ad6 của người).

Trong một số trường hợp, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad657 tái tổ hợp và các biến thể của nó) có thể bao gồm hệ gen Ad chứa một hoặc nhiều cải biến ở một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa cho polypeptit (hoặc mảnh của nó) và/hoặc một hoặc nhiều thành phần virut của hệ gen Ad. Một hoặc nhiều cải biến có thể là bất kỳ cải biến nào thích hợp. Trong một số trường hợp, cải biến có thể có hiệu quả ức chế khả năng của polypeptit được cải biến để liên kết với polypeptit khác như là p300 và/hoặc pRB. Trong một số trường hợp, cải biến có thể có hiệu quả trong việc trung hòa một hoặc nhiều con đường interferon. Ví dụ về cải biến có thể tạo ra cho axit nucleic mã hóa cho polypeptit hoặc cho thành phần virut bao gồm, không bị giới hạn ở thay thế, mất, thêm và đột biến.

Ad, ví dụ, Ad657 và biến thể của nó, có thể được cải biến và giữ lại toàn bộ gen E1A, hoặc được cải biến để mất đi vùng được chọn và chức năng của protein được mã hóa của chúng.

Fig. 57 trình bày dưới dạng giản đồ các gen trốn tránh miễn dịch E3 khác nhau trong Ad loài C ví dụ như Ad6 và Ad loài D ví dụ như Ad26, cũng như mô tả chức năng của các protein E3 được mã hóa này. Cả hai Ad đều biểu hiện biến thể kích thước và trình tự của các gen E3 12.5K, 6.7K, 19K, 10.4K (RIDα), 14.5K (RIDβ), và 14.7K. 19K làm giảm trình diện của MHC I và protein MIC trên bề mặt tế bào để bảo vệ tế bào bị nhiễm khỏi tế bào T và tế bào NK. Protein RID bảo vệ tế bào bị nhiễm khỏi phối tử gây chết (FAS, TRAIL, TNFR, và EGFR). 14.7K ức chế hoạt hóa bên trong của quá trình chết tế bào theo chương trình trong tế bào bị nhiễm. Ad loài C cũng biểu hiện 11.6 K được biết đến như là protein gây chết adenovirut (ADP). Biểu hiện quá

mức ADP làm chết tế bào nhanh hơn, nhưng về tổng thể chết tế bào là như nhau. Virut loài D cũng biểu hiện hai biến thể mới gọi là 49K và 31K. Dạng được tiết ra của 49K liên kết với CD46 trên tế bào T và tế bào NK dẫn đến giảm điều hòa của các tế bào này và tiêu diệt tế bào thiếu hụt MHC lớp I bởi tế bào NK kém hiệu quả hơn. Plasmit Ad657 được cải biến để giữ lại tất cả các gen trốn tránh miễn dịch E3 bẩm sinh (12.5K, 6.7K, 19K, 11.6K (ADP), 10.4K (RIDα), 14.5K (RIDβ), và 14.7K) và E4 34K hoặc để mất đi vùng được chọn. Ad657 và biến thể của nó cũng được cải biến bằng cách thêm 49K và 31K để tạo ra các chức năng bổ sung này cho nền tảng virut loài C này.

Ad, ví dụ, Ad657 và biến thể của nó, có thể được cải biến để giữ lại toàn bộ gen trốn tránh miễn dịch E3, hoặc để mất đi vùng được chọn và chức năng của protein được mã hóa của chúng. Đối với đột biến E3: 19K giảm điều hòa protein MHCI và MIC trên tế bào bị nhiễm; biểu hiện quá mức ADP gây chết tế bào nhanh hơn, nhưng không làm tăng số lượng tế bào bị giết; protein 10k và 14k (RIDα và RIDβ) kết hợp để ngăn chặn tiêu diệt tế bào bởi các protein gây chết tế bào theo chương trình bên ngoài như FAS, TRAIL, TNF, TNFR và EGFR; protein 14.7k ức chế tín hiệu chết tế bào theo chương trình ở bên trong.

Việc giữ lại các protein E3 này cũng cho phép tiêu diệt khối u tồn tại lâu hơn và việc cắt chúng đi có thể làm tăng kích thích miễn dịch.

Dữ liệu thử nghiệm hiệu quả tiêu diệt khối u đưa ra giả thuyết rằng E3 nguyên bản làm trung gian cho hiệu quả tốt hơn.

Cấu trúc DE3 có phần 12.5 bị cắt đi và bao gồm 14.7k, cấu trúc DE3A có phần E3 là 12.5k bị cắt đi và bao gồm 19k, và cấu trúc DE3ADP có phần E3 là 12.5k bị cắt đi và bao gồm ADP.

Bất ngờ là, việc cắt tất cả các gen E3 khiến cho virut tiêu diệt khối u ít hiệu quả hơn trong việc ngăn chặn sinh trưởng khối u.

Trong một phương án, sáng chế bao gồm adenovirut một chu kỳ, ví dụ, SC-Ad657 và biến thể của nó. Virut SC-Ad tái tổ hợp có axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit được đánh giá để sử dụng làm vacxin. Vacxin SC-Ad657 tự chúng tạo ra hàm lượng kháng thể tuần hoàn đáng kể chống lại protein vỏ HIV chỉ sau một lần tạo miễn dịch duy nhất.

Tương tự, Ad657 mang gen kháng nguyên viêm gan B và C có thể tạo ra đáp ứng của tế bào lympho T gây độc tế bào (CTL) chống lại virut viêm gan và virut cự bào.

Ad657 được biến đổi bằng cách chèn thêm peptit tổng hợp từ virut gây u nhú ở người vào trong HVR5. Theo một phương án, trình tự axit amin của biến thể hexon Ad657-HVR5-HPV biến thể được nêu trong SEQ ID NO:57. Việc cải biến cho phép trình diện kháng nguyên này cho mục đích vacxin cũng như hướng đích lại bằng cách liên kết với protein mà tương tác với peptit HPV.

Theo phương án tiếp theo, biểu hiện của yếu tố kích thích tạo cụm đại thực bào hạt (GMCSF) người bằng Ad657 được chứng minh trong bản mô tả này.

Do đó, từ những ví dụ ở đây, chứng tỏ rằng Ad tái tổ hợp, ví dụ, Ad657 và biến thể của nó, có thể sử dụng để biểu hiện protein khác loại, ví dụ, kháng nguyên polypeptit và polypeptit hướng đích tế bào.

Trong một vài trường hợp, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad 657 tái tổ hợp) có thể bao gồm hệ gen Ad chứa một hoặc nhiều đột biến thế. Ví dụ, một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa cho polypeptit (hoặc mảnh của nó) và/hoặc một hoặc nhiều thành phần virut được mã hóa bởi hệ gen Ad có thể bị thay thế. Thay thế có thể là bất kỳ thay thế thích hợp nào. Trong một số trường hợp, một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa cho polypeptit capsit của hệ gen trong Ad thứ nhất có thể bị thay thế bằng một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa cho polypeptit capsit của Ad thứ hai để tạo ra Ad khảm. Ví dụ, khi Ad tái tổ hợp chứa hệ gen từ Ad thứ nhất trong đó axit nucleic mã hóa cho polypeptit capsit trong hệ gen bị thay thế bằng axit nucleic mã hóa cho polypeptit capsit từ Ad thứ hai (ví dụ, Ad khác với khung chính Ad), axit nucleic mã hóa cho polypeptit capsit từ Ad thứ hai có thể biểu hiện một hoặc nhiều polypeptit capsit, và (các) polypeptit capsit được biểu hiện có thể kết hợp vào trong capsit của Ad tái tổ hợp. Ví dụ về polypeptit capsit bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polypeptit hexon, polypeptit sợi, polypeptit bazơ penton, polypeptit IIIa, polypeptit IX, và polypeptit pVI.

Protein sợi Ad là phức hợp của ba tiểu phần nhìn bên ngoài giống nhau làm trung gian cho bước gắn kết tế bào ban đầu. Protein sợi Ad6 bẩm sinh chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:60 và liên kết với CAR.

Theo một khía cạnh trong sáng chế, Ad khảm và Ad tái tổ hợp biến đổi sợi có

protein sợi mà không giống với Ad mẹ và "khung chính" được tạo ra.

Ad khảm, thể khảm sợi AdF35, có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:61 và ngắn hơn so với protein sợi Ad5 và Ad6 và hướng đích lại virut đến CD46.

Ad tái tổ hợp được biến đổi sợi, bao gồm sợi K7 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:62, hướng đích virut đến heparin sulfat proteoglycan và điện tích âm trên tế bào.

Ad khảm, tái tổ hợp, sợi 6/FC68 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:63, là Ad khảm có protein sợi từ adenovirut tinh tinh C68. Protein sợi này ngắn hơn so với protein sợi Ad5 hoặc Ad6 và liên kết với CAR.

Ad khảm, tái tổ hợp, sợi 6/FC68-K7 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:64, là Ad khảm có protein sợi từ adenovirut tinh tinh C68. Protein sợi này ngắn hơn so với protein sợi Ad5 hoặc Ad6. Sợi 6/FC68-K7 liên kết với CAR và được hướng đích lại tới heparin sulfat và điện tích âm.

Ad khảm, tái tổ hợp, sợi 6/FC68-HI-K7 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:65, là Ad khảm có protein sợi từ adenovirut tinh tinh C68. Protein sợi này ngắn hơn so với protein sợi Ad5 hoặc Ad6. Sợi 6/FC68-HI-K7 liên kết với CAR và được hướng đích lại tới heparin sulfat và điện tích âm.

Trong một số trường hợp, Ad tái tổ hợp có thể bao gồm hệ gen từ Ad thứ nhất trong đó axit nucleic mã hóa cho polypeptit hexon (ví dụ, HVR của axit nucleic mã hóa cho polypeptit hexon) trong hệ gen được thay thế bằng axit nucleic mã hóa cho polypeptit hexon (ví dụ, HVR của axit nucleic mã hóa cho polypeptit hexon) từ Ad thứ hai. Trong một số trường hợp, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm hệ gen từ Ad thứ nhất mà có một hoặc nhiều HVR được thay thế bằng một hoặc nhiều HVR từ Ad thứ hai. Ví dụ, Ad tái tổ hợp có thể là thể khảm, cụ thể là Ad657 (ví dụ, có thể bao gồm hệ gen Ad6 trong đó HVR hexon bị thay thế bằng HVR hexon của Ad57). Trong trường hợp trong đó Ad tái tổ hợp bao gồm hệ gen từ Ad thứ nhất trong đó axit nucleic mã hóa cho polypeptit hexon trong hệ gen được thay thế bằng axit nucleic mã hóa cho polypeptit hexon từ Ad thứ hai, Ad tái tổ hợp có thể chứa khỏng từ 1 đến 720 polypeptit hexon từ Ad thứ hai. Ví dụ, khi Ad tái tổ hợp là Ad657, Ad657 có thể bao gồm hệ gen Ad6 và 720 polypeptit hexon chứa HVR hexon của Ad57.

Trong một vài trường hợp, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad 657 tái tổ hợp) có thể bao gồm hệ gen Ad mất một hoặc nhiều axit nucleic. Mất axit nucleic có thể là bất kỳ mất axit nucleic thích hợp nào. Mất axit nucleic có thể là mất hoàn toàn (ví dụ, mất axit nucleic mã hóa cho polypeptit) hoặc mất một phần (mất một hoặc nhiều nucleotit trong axit nucleic mã hóa cho polypeptit). Mất axit nucleic có thể làm giảm hoặc loại bỏ quá trình phiên mã và dịch mã của polypeptit được mã hóa bởi axit nucleic bị mất. Bất kỳ axit nucleic nào thích hợp cũng đều có thể bị mất. Trong một số trường hợp, axit nucleic mã hóa cho polypeptit liên quan đến việc sản xuất thế hệ con cháu lây nhiễm có thể bị mất đi. Ví dụ về axit nucleic có thể bị mất và/hoặc bị biến đổi trong Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này có thể mã hóa cho E1 (ví dụ, E1A và E1B), E2, E3, E4, pIIIA, sợi, E1B, và bao gồm chất tăng cường và vùng gen khởi đầu của virut. Ví dụ, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad 657 tái tổ hợp) có thể bao gồm hệ gen Ad mất một hoặc nhiều nucleotit trong axit nucleic mã hóa cho polypeptit E1. Trong một số trường hợp, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm một hoặc nhiều thay thế trong axit nucleic mô tả ở đây polypeptit E1.

Theo phương án cụ thể, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này được cải biến để chứa vùng gen khởi đầu probasin chứa, ví dụ, axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:48; Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này được cải biến để mất dl1101 trong axit nucleic mã hóa cho polypeptit E1; Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này được cải biến để mất dl1107 trong axit nucleic mã hóa cho polypeptit E1; Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này được cải biến để mất dl1101 và mất dl1107. Xem ví dụ ở đây và Fig. 56 đối với trình tự axit amin đầu N của polypeptit E1A, ví dụ, Ad E1A kiểu dại, và các biến thể CRAd-657-dl1101, CRAd-657-dl1107 và CRAd-657-dl1101/1107.

Theo một phương án, biến thể CRAd-657-dl1101/1107-FolR chứa E3 nguyên bản và biểu hiện thụ thể folat alpha người được tìm thấy trên tế bào ung thư.

Nhìn chung, Ad có thể được cải biến để chứa các cải biến CRAd được mô tả trong bản mô tả này.

Trong một vài trường hợp, Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ,

Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad 657 tái tổ hợp) có thể bao gồm hệ gen Ad chứa một hoặc nhiều sự chèn thêm axit nucleic. Ví dụ, chèn thêm axit nucleic có thể bao gồm axit nucleic mã hóa cho polypeptit. Axit nucleic có thể được thêm vào trong bất kỳ vị trí nào thích hợp trong hệ gen của Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này. Trong một số trường hợp, axit nucleic mã hóa cho polypeptit có thể được thêm vào trong HVR (ví dụ, thòng lọng HVR5) trong hệ gen của Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, khi axit nucleic mã hóa cho polypeptit được thêm vào trong HVR của hệ gen trong Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này, axit nucleic mã hóa cho polypeptit có thể biểu hiện một hoặc nhiều polypeptit, và polypeptit được biểu hiện có thể kết hợp vào trong capsit của Ad tái tổ hợp. Trong trường hợp trong đó axit nucleic mã hóa cho polypeptit được thêm vào trong HVR của hệ gen trong Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này, Ad tái tổ hợp có thể có từ khoảng 1 đến 720 polypeptit được mã hóa bởi axit nucleic được thêm vào trên bề mặt của nó. Thêm axit nucleic có thể là bất kỳ axit nucleic mã hóa cho bất kỳ polypeptit nào thích hợp. Trong một số trường hợp, thêm axit nucleic có thể mã hóa cho polypeptit kháng nguyên.

Trong một số trường hợp, thêm axit nucleic có thể mã hóa cho polypeptit hướng đích. Ví dụ về polypeptit hướng đích mà có thể có trong Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở peptit 12.51 (TARGEHKEEELI; SEQ ID NO:1), peptit 12.52 (LRQTGAASAVWG; SEQ ID NO:2), 12.53 (ARRADTQWRGLE; SEQ ID NO:3), VSV (GTWLNPGFPPQSCGYATVT; SEQ ID NO:4), RGD (CDCRGDCFC; SEQ ID NO:5), peptit liên kết với alpha4 integrin (NMSLDVNRKA; SEQ ID NO:6), Met 3-4 (ISLSSHRATWVV; SEQ ID NO:7), L10.1F (WTMGLDQLRDSSWAHGGFSA; SEQ ID NO:8), L10.1RGDF (WTMGLDQLRGDSSWAHGGFS; SEQ ID NO:9), L10.2F (RSVSGTEWVPMNEQHRGAIW; SEQ ID NO:10), L10.5F (TELRTHTSKELTIRTAASSD; SEQ ID NO:11), S5.1 (DRAIGWQDKLYKLPLGSIHN; SEQ ID NO:12), DU9C.1 (MGSWEKAALWNRVSASSGGA; SEQ ID NO:13), DU9C.2 (MAMGGKPERPADDNVQVRG; SEQ ID NO:14), DU9A.7 (MASRGDAGEGSTQSNTNVPS; SEQ ID NO:15), XS.1 (GPEDTSRAPENQQKTFHRRW; SEQ ID NO:16), REDVmyc

(MGREDVGEQKLISEEDLGGS; SEQ ID NO:17), RGD-4C (ACDCRGDCFCG; SEQ ID NO:18), REDV-4C (ACDCREDVCFCG; SEQ ID NO:19), SKBR5C1 (GQIPITEPELCCVPWTEAFY; SEQ ID NO:20), 231R10.1 (PQPPNSTAHPNPHKAPPNTT; SEQ ID NO:21), HepaCD8 (VRWFPGGEWGVTHPESLPPP; SEQ ID NO:22), K20 (KKKKKKKKKKKKKKKKKKKK; SEQ ID NO:23), BAP (GLNDIFEAQKIEWH; SEQ ID NO:24), CALM BP (CAAARWKKAFIAVSAANRFKKIS; SEQ ID NO:25), EBV (EDPGFFNVEIPEFP; SEQ ID NO:26), #1-5 (GGHGRVLWPDGWFSLVGISP; SEQ ID NO:27), ##4*-5 (MARTVTANVPGMGEGMVVVPC; SEQ ID NO:28), 1-1 (GVSKRGLQCHDFISCSGVPW; SEQ ID NO:29), 1-2 (NQSIPKVAGDSKVFCWWCAL; SEQ ID NO:30), 1-3 (QSTPPTKHLTIPRHLRNTLI; SEQ ID NO:31), 1-4 (DMSFQLVTPFLKALPTGWRG; SEQ ID NO:32), 1-5 (GGHGRVLWPDGWFSLVGISP; SEQ ID NO:33), 1-5con (FSLVGISP; SEQ ID NO:34), 1-6 (QIMMGPSLGYYMPSESIFAY; SEQ ID NO:35), 2-11 (ISWDIWRWWYTSEDRDAGSA; SEQ ID NO:36), 2-14 (VWGMTTSDHQRKTERLDSPE; SEQ ID NO:37), 2-20 (MTSAQTSEKLKAETDRHTAE; SEQ ID NO:38), 2-9 (MGSRSAVGDFESAEGSRRP; SEQ ID NO:39), 3b-6 (MGRTVQSGDGTPAQTQPSVN; SEQ ID NO:40), 4*-5 (MARTVTANVPGMGEGMVVVP; SEQ ID NO:41), peptit CLL, PD-1, polypeptit GLA (ví dụ, yếu tố X), gen kháng nguyên, protein dung hợp, glycoprotein dung hợp gen, kháng thể đơn chuỗi, và protein capsit từ các virut khác. Polypeptit hướng đích có thể hướng đích bất kỳ loại tế bào thích hợp nào. Ví dụ về các loại tế bào mà được hướng đích bởi polypeptiti hướng đích nằm trong Ad tái tổ hợp được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào cơ (ví dụ, tế bào cơ xương), khối u, tế bào ung thư, tế bào thận, tế bào gan, tế bào niêm mạc, carbohydrat và màng tế bào.

Ví dụ này chứng minh rằng peptit lựa chọn trong bối cảnh cấu trúc tương hợp trên thư viện thể thực khuẩn có thể được dịch mã thành protein hexon của Ad. Ví dụ, đối với peptit 12.51, vị trí thêm vào này làm tăng tải nạp cơ trong khi làm giảm lây nhiễm chệch đích trong gan. Do đó, Ad tái tổ hợp này hướng đích đến mô cơ có thể sử dụng làm vectơ cho tiêm chủng vacxin cơ trên cơ sở gen hoặc cho ứng dụng/phân phối

liệu pháp gen đến cơ.

Trong một vài trường hợp, việc thêm axit nucleic có thể khử hướng đích virut (ví dụ, bằng cách phá vỡ tương tác protein xuất hiện trên HVR nhất định). Trong một số trường hợp, việc thêm axit nucleic có thể mã hóa cho nhãn có thể phát hiện. Ví dụ về nhãn có thể phát hiện bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở chất huỳnh quang (ví dụ protein phát huỳnh quang xanh lá (GFP), mCherry, và mBFP), và enzym (ví dụ, luciferaza, DNAza, proteaza, chất vận chuyển, và polymeraza).

Cũng được đề xuất ở đây là vectơ biểu hiện chứa Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad657 tái tổ hợp và biến thể của nó). Vectơ biểu hiện có thể mang Ad tái tổ hợp được mô tả ở đây vào trong tế bào khác (ví dụ, tế bào ung thư), trong đó nó có thể sao chép và/hoặc biểu hiện. Vectơ biểu hiện, thường được gọi là cấu trúc biểu hiện, thường là plasmit hoặc vectơ có vùng gen khởi động/vùng tăng cường điều khiển biểu hiện của axit nucleic cụ thể. Khi được đưa vào trong tế bào, vectơ biểu hiện có thể sử dụng cách thức tổng hợp protein tế bào để tạo ra virut trong tế bào. Trong một vài trường hợp, vectơ biểu hiện chứa Ad tái tổ hợp được mô tả ở đây có thể là vectơ virut. Ví dụ, vectơ biểu hiện chứa Ad tái tổ hợp được mô tả ở đây có thể là vectơ retrovirut. Trong một số trường hợp, vectơ biểu hiện chứa Ad tái tổ hợp được mô tả ở đây cũng có thể được thiết kế để cho phép chèn thêm một hoặc nhiều gen chuyển (ví dụ, vị trí đa tách dòng). Ví dụ, vectơ biểu hiện chứa Ad tái tổ hợp được mô tả ở đây cũng có thể bao gồm axit nucleic mã hóa cho nhãn có thể phát hiện. Ví dụ về nhãn có thể phát hiện bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở chất huỳnh quang (ví dụ, protein huỳnh quang xanh là (GFP), mCherry, và mBFP), và enzym (ví dụ, luciferaza, recombinaza, nucleaza, và các yếu tố phiên mã).

Sáng chế này cũng đề xuất phương pháp và vật liệu để sử dụng một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp được mô tả ở đây (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad657 tái tổ hợp). Trong một số trường hợp, Ad tái tổ hợp được đề xuất ở đây có thể sử dụng để điều trị cho động vật có vú mắc, hoặc có nguy cơ mắc ung thư. Ví dụ, phương pháp để điều trị cho động vật có vú mắc, hoặc có nguy cơ mắc, ung thư có thể bao gồm dùng một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp được mô tả ở đây cho động vật có vú. Trong một số trường hợp, phương pháp để điều trị cho động vật có vú mắc, hoặc có nguy cơ mắc, ung thư có thể bao gồm dùng một hoặc nhiều vectơ biểu hiện

mã hóa cho Ad tái tổ hợp được mô tả ở đây hoặc axit nucleic mã hóa cho Ad tái tổ hợp được mô tả ở đây cho động vật có vú. Trong một số trường hợp, một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp được mô tả ở đây có thể được dùng cho động vật có vú để làm giảm số lượng tế bào ung thư trong động vật có vú (ví dụ, cản trở và/hoặc trì hoãn sinh trưởng khối u) và/hoặc để tăng khả năng sống sót của động vật có vú.

Việc hướng đích đến khối u ung thư bằng adenovirut tiêu diệt khối u chuyển đổi kiểu huyết thanh đã được chứng minh. Chuột mang khối u ung thư tuyến tiền liệt DU145 hoặc LNCaP trên sườn của chúng được điều trị bằng một liều tiêm tĩnh mạch (IV) với Ad6547. Chuột này được điều trị lần thứ hai với Ad6 khác hoặc biến thể virut tiêu diệt khối u Ad6/57/6 có cải biến sợi và biểu hiện GFPLuciferaza và hoạt tính luciferaza được đo lại bằng cách chụp ảnh. Ad6 có hexon Ad6 và sợi hướng đích đến CAR. Ad6-F35 có hexon Ad6 và sợi Ad35 hướng đích đến CD46. Ad6/57/6 có HVR1 và 7 từ Ad6 và HVR 2-6 từ Ad57. Virut Ad6/57/6 có sợi Ad6, sợi AdC68, hoặc sợi Ad35. Các dữ liệu trình bày trong Fig. 9 cho thấy khả năng bất ngờ trong việc tiêu diệt khối u chuyển đổi kiểu huyết thanh với virut hướng đích khối u với lây nhiễm chệch đích thấp hơn trong gan.

Ví dụ khác về chuyển đổi kiểu huyết thanh, chuột mang khối u tuyến tiền liệt LNCaP trên sườn của nó được điều trị bằng cách chỉ tiêm tĩnh mạch (IV) Ad657 hoặc CRAD657. Chuột này được điều trị lần hai vào 5 tháng sau với virut tiêu diệt khối u Ad6/57/6 khác biểu hiện GFPLuciferaza và biến thể sợi K7 (với 7 lysin được thêm vào), F35 (với sợi Ad35), hoặc KKTK-C68 (sợi C68 tinh tinh được dung hợp phía sau miền linh động KKTK của Ad6. Virut KKTK-C68 cũng có gen E4 34K được tối ưu hóa mã bộ ba được thêm vào để tăng cường khả năng sản xuất virut. Hoạt tính luciferaza được đo lại bằng cách chụp ảnh. Tất cả Ad6/57/6 có hexon với HVR1 và 7 từ Ad6 và HVR 2-6 từ Ad57. Ad6/57/6 và KKTK-C68 có sợi hướng đích đến CAR. Ad6/57/6-F35 có sợi Ad35 hướng đích đến CD46. K7 tăng cường liên kết với điện tích âm trên tế bào chứa liên kết heparin sulfat proteoglycan. Fig. 70 chứng minh khả năng trong việc tiêu diệt khối u chuyển đổi kiểu huyết thanh với virut hướng đích khối u với lây nhiễm chệch đích thấp hơn trong gan.

Động vật có vú thích hợp mắc, hoặc có nguy cơ mắc ung thư, bệnh lây nhiễm, và/hoặc bệnh gen được điều trị như được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, con người, linh trưởng không phải con người (ví dụ, khỉ) ngựa, bò, lợn, chó, mèo, chuột nhắt,

chuột đồng, và gia súc mắc ung thư, bệnh lây nhiễm, và/hoặc bệnh gen có thể được điều trị ung thư như được mô tả trong bản mô tả này. Trong một số trường hợp, con người mắc ung thư được điều trị. Trong một số trường hợp, động vật có vú (ví dụ, con người) được điều trị như được mô tả trong bản mô tả này không phải là vật chủ tự nhiên của Ad được sử dụng để tạo ra Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như Ad657 tái tổ hợp). Ví dụ, người được điều trị với Ad657 tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này có thể thiếu bất kỳ miễn dịch đáp ứng có từ trước với Ad6.

Động vật có vú mắc loại ung thư bất kỳ cũng có thể điều trị như được mô tả trong bản mô tả này. Trong một số trường hợp, ung thư có thể bao gồm một hoặc nhiều khối u rắn. Trong một vài trường hợp, ung thư có thể là ung thư máu. Ví dụ về ung thư có thể điều trị như được mô tả trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư buồng trứng, ung thư phổi, bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư tuyến tụy, ung thư thận, u hắc tố, ung thư não, ung thư đại tràng, u lympho, u tủy, bệnh bạch cầu (ví dụ, bệnh bạch cầu dòng tế bào lympho hoặc bệnh bạch cầu dòng tế bào tủy xương).

Trong một số trường hợp, phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm phát hiện ra động vật có vú mắc ung thư. Ví dụ về phương pháp phát hiện ra động vật có vú mắc ung thư bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kiểm tra vật lý, xét nghiệm (ví dụ, máu và/hoặc nước tiểu), sinh thiết, hình ảnh (ví dụ, tia X, PET/CT, MRI, và/hoặc siêu âm), quét y học hạt nhân (*ví dụ*, quét xương), nội soi, và/hoặc kiểm tra gen. Khi được phát hiện là mắc ung thư, bệnh lây nhiễm, và/hoặc bệnh gen, động vật có vú có thể được dùng hoặc chỉ định để tự dùng một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad657 tái tổ hợp) hoặc axit nucleic (ví dụ, vectơ biểu hiện) mã hóa cho một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad657 tái tổ hợp).

Một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad 657 tái tổ hợp) có thể được dùng theo đường dùng thích hợp. Trong một số trường hợp, dùng có thể là dùng tại chỗ. Trong một số trường hợp, dùng có thể là dùng toàn thân. Ví dụ về đường dùng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung trong tiêm tĩnh mạch, trong cơ, dưới da,

theo đường miệng, trong mũi, hít, qua da, ngoài đường tiêu hóa, trong khối u, sau niệu quản, dưới bao, âm đạo, và trực tràng. Trong trường hợp nếu điều trị nhiều đợt, điều trị đợt thứ nhất có thể bao gồm dùng một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này cho động vật có vú (ví dụ, con người) bằng đường dùng thứ nhất (ví dụ, trong tĩnh mạch), và đợt điều trị thứ hai có thể bao gồm dùng một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này cho động vật có vú (ví dụ, con người) bằng đường dùng thứ hai (ví dụ, trong cơ).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "dược phẩm" dùng để chỉ tổ hợp của một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp và/hoặc khảm theo sáng chế cùng với chất mang, chất trơ hoặc chất hoạt hóa, bào chế chế phẩm đặc biệt phù hợp với liệu pháp sử dụng. Một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad657) có thể được bào chế vào trong chế phẩm (ví dụ, dược phẩm) để dùng cho động vật có vú (ví dụ, động vật có vú mắc, hoặc có nguy cơ mắc ung thư). Ví dụ, một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp có thể được bào chế vào trong chế phẩm dược dụng để dùng cho động vật có vú mắc, hoặc có nguy cơ mắc ung thư. Trong một số trường hợp, một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp có thể được bào chế cùng với một hoặc nhiều chất mang (chất phụ gia) và/hoặc chất pha loãng dược dụng. Dược phẩm có thể được bào chế để dùng dưới dạng rắn hoặc lỏng bao gồm, không chỉ giới hạn ở, dung dịch vô trùng, huyền phù, chế phẩm giải phóng chậm, viên nén, viên nang, viên tròn, bột, viên nhện, và hạt. Chất mang dược dụng, chất độn hoặc tá dược lỏng được sử dụng trong dược phẩm được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước muối (ví dụ, muối đệm photphat, chất trao đổi ion, alumin, nhôm stearat, lexithin, protein huyết thanh, như là albumin huyết thanh người, các chất đệm như là photphat, glyxin, axit sorbic, kali sorbat, hỗn hợp glyxerit cục bộ của axit béo thực vật bão hòa, nước, muối hoặc chất điện phân, như là protamin sulfat, dinatri hydro phosphat, kali hydro phosphat, natri clorua, muối kẽm, chất keo silica, magie trisilicat, polyvinylpyrolidon, cơ chất trên cơ sở xenlulozo, natri cacboxymetylxenlulozo, polyacrylat, sáp, polyme khối của polyetylen-polyoxypropylen, polyetylen glycol và mỡ lợn. Chất mang dược dụng thích hợp được mô tả trong "Remington's Pharmaceutical Sciences" bởi E.W. Martin, tái bản lần thứ 18. Việc lựa chọn và sử dụng tá dược thích hợp được chỉ dẫn trong Gennaro, ed., Remington: The Science và Practice of Pharmacy, 20th Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003).

Chế phẩm (ví dụ, dược phẩm) chứa một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống khối u như là Ad657 tái tổ hợp) có thể dùng cho động vật có vú (ví dụ, động vật có vú mắc, hoặc có nguy cơ mắc ung thư) làm vacxin. Vacxin có thể để trị liệu hoặc phòng ngừa.

Trong một số trường hợp, phương pháp được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể bao gồm cho động vật có vú (ví dụ, động vật có vú mắc ung thư) dùng một hoặc nhiều chất bổ sung được sử dụng để điều trị ung thư. Một hoặc nhiều chất bổ sung được sử dụng để điều trị ung thư có thể bao gồm bất kỳ điều trị ung thư nào thích hợp. Trong một số trường hợp, điều trị ung thư bao gồm phẫu thuật. Trong một số trường hợp, điều trị ung thư bao gồm xạ trị. Trong một số trường hợp, điều trị ung thư bao gồm dùng liệu pháp dược như là hóa trị, liệu pháp hocmon, liệu pháp hướng đích và/hoặc liệu pháp gây độc tế bào. Ví dụ, động vật có vú mắc ung thư có thể được dùng một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, Ad tái tổ hợp có hoạt tính tiêu diệt khối u chống ung thư như là Ad657 và biến thể của nó) và dùng một hoặc nhiều chất bổ sung được sử dụng để điều trị ung thư. Trong trường hợp trong đó động vật có vú mắc ung thư được điều trị bằng một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này và được điều trị với một hoặc nhiều chất bổ sung được sử dụng để điều trị ung thư, bệnh lây nhiễm, và/hoặc bệnh gen, chất bổ sung được sử dụng để điều trị ung thư, bệnh lây nhiễm, và/hoặc bệnh gen có thể được dùng cùng lúc hoặc độc lập với nhau. Ví dụ, một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này và một hoặc nhiều chất bổ sung được sử dụng để điều trị ung thư, bệnh lây nhiễm và/hoặc bệnh gen có thể được bào chế cùng nhau để tạo thành một chế phẩm duy nhất. Trong một số trường hợp, một hoặc nhiều Ad tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này được dùng trước và một hoặc nhiều chất bổ sung được sử dụng để điều trị ung thư, bệnh lây nhiễm và/hoặc bệnh gen được dùng sau, và ngược lại.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Adenovirut

Trong 50 năm, chỉ có bốn loài Ad người loài C được biến đến bao gồm Ad1, Ad2, Ad5, và Ad6 (xem, ví dụ, Weaver et al., 2011 *Virology*. 412:19-27). Trong năm 2001, adenovirut loài C thứ năm được phát hiện là chủng phân lập #16700, và thử nghiệm trung hòa virut với kháng huyết thanh chống lại Ad1, 2, 5, và 6 chứng minh

mức độ trung hòa cao (hàm lượng nghịch đảo là 500–16.000) khi mỗi kháng huyết thanh được sử dụng chống lại virut cùng họ của nó (Lukashev et al., 2008 *J Gen Virol.* 89:380-388). Ngược lại, kháng thể kháng Ad1, 2, và 5 có độ phản ứng chéo yếu chống lại #16700 (hàm lượng nghịch đảo là 32–64). Huyết thanh kháng Ad6 đã chứng minh độ phản ứng chéo cao hơn chống lại #16700, nhưng việc trung hòa đòi hỏi nồng độ huyết thanh cao hơn 10 lần để trung hòa #16700 khi so sánh với tự một mình Ad6. So sánh trình tự sau đó xác nhận #16700 là adenovirut loài C mới và đặt tên lại cho nó là Ad57 (xem, ví dụ, Walsh et al., 2011 *J. Clin Microbiol. 49:3482-3490).*

15 Ad người được đánh giá hoạt tính tiêu diệt khối u chống lại khối u ác tính vú, buồng trứng, gan, tụy, thận, và tế bào B. Trong thử nghiệm chống lại khối u tuyến tiền liệt người DU145, Ad6 loài C hiệu quả hơn sau khi tiêm tĩnh mạch (i.v.) hoặc tiêm trong khối u so với virut Ad5 loài C hoặc virut Ad11 và Ad35 loài B. Ad6 cũng hiệu quả hơn so với Ad5 và Ad11 trong chuột đồng Syria có đủ sức đề kháng.

Cấu trúc của adenovirut tái tổ hợp

Adenovirut tái tổ hợp được tạo cấu trúc bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp sử dụng phương pháp đã biết với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Ad tái tổ hợp bắt nguồn từ Ad thứ nhất (ví dụ, có thể bao gồm hệ gen của Ad thứ nhất, chẳng hạn như Ad6) và có thể bao gồm HVR hexon từ Ad thứ hai, chẳng hạn như Ad57. Trong trường hợp Ad tái tổ hợp bao gồm hệ gen của Ad6 và các HVR hexon của Ad57, thì Ad tái tổ hợp có thể là Ad khảm được gọi là Ad657.

Để thu được Ad657, trình tự HVR Ad57 được tổng hợp và chèn vào trong hexon Ad6 trong plasmit với băng FRT-Zeocin®-FRT nằm giữa pVI và hexon. Cái này được tái tổ hợp vào trong các plasmit khác nhau để tạo ra Ad657 và biến thể của nó. Trình tự axit amin của hexon Ad657 được nêu trong SEQ ID NO: 49. Xem Fig. 34 và 59-65 để biết bản đồ plasmit của biến thể Ad657.

Liên quan đến biến thể của Ad657, trình tự HVR Ad57 được tổng hợp với HVR1 được cải biến có xystein, axit amin linh hoạt, và vị trí cắt giới hạn để cho phép chèn thêm các peptit khác. Cái này được chèn vào trong hexon Ad6 trong plasmit với băng FRT-Zeocin®-FRT nằm giữa pVI và hexon. Cái này được tái tổ hợp vào trong nhiều plasmit pAd6 khác nhau để tạo ra biến thể Ad657 có xystein trong HVR1, biến thể được gọi là Ad657-HVR1-XXA chứa hexon có trình tự axit amin nêu trong SEQ

ID NO:50.

Liên quan đến biến thể của Ad657, trình tự HVR Ad57 được tổng hợp với HVR5 được cải biến có xystein, axit amin linh hoạt, và vị trí cắt giới hạn để cho phép chèn thêm các peptit khác. Cái này được chèn vào trong hexon Ad6 trong plasmit với băng FRT-Zeocin®-FRT nằm giữa pVI và hexon. Cái này được tái tổ hợp vào trong nhiều plasmit pAd6 khác nhau để tạo ra biến thể Ad657 có xystein trong HVR5, biến thể được gọi là Ad657-HVR5-XXA chứa hexon có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:51.

Liên quan đến biến thể của Ad657, trình tự HVR Ad57 được tổng hợp với HVR1 được cải biến có xystein, axit amin linh hoạt, và vị trí cắt giới hạn để cho phép chèn thêm các peptit khác. Cái này được chèn vào trong hexon Ad6 trong plasmit với băng FRT-Zeocin®-FRT nằm giữa pVI và hexon. Cái này được tái tổ hợp vào trong nhiều plasmit pAd6 khác nhau để tạo ra biến thể Ad657 không có xystein trong HVR1, nhưng vị trí cắt giới hạn cho phép chèn peptit vào trong HVR1, biến thể được gọi là Ad657-HVR1-XA chứa hexon có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:52.

Liên quan đến biến thể của Ad657, trình tự HVR Ad57 được tổng hợp với HVR5 được cải biến có xystein, axit amin linh hoạt, và vị trí cắt giới hạn để cho phép chèn thêm các peptit khác. Cái này được chèn vào trong hexon Ad6 trong plasmit với băng FRT-Zeocin®-FRT nằm giữa pVI và hexon. Cái này được tái tổ hợp vào trong nhiều plasmit pAd6 khác nhau để tạo ra biến thể Ad657 không có xystein trong HVR5, nhưng vị trí cắt giới hạn cho phép chèn peptit vào trong HVR5, biến thể được gọi là Ad657-HVR5-XA chứa hexon có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:53.

Liên quan đến biến thể của Ad657, trình tự HVR1-XA trong Ad657 được cải biến bằng cách thêm peptit nhận biotin vào trong HVR1. Cái này được tái tổ hợp vào trong nhiều plasmit pAd6 khác nhau để tạo ra biến thể Ad657 có BAP trong HVR1, biến thể được gọi là Ad657-HVR1-PSTCD chứa hexon có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:54.

Việc chèn peptit nhận biotin khử hướng đích biến thể virut từ gan, cho phép virut được tái hướng đích với avidin hoặc streptavidin và phối tử được biotin hóa, và cho phép virut được tinh sạch trên cột avidin hoặc streptavidin đơn phân.

Liên quan đến biến thể của Ad657, trình tự HVR1-XA trong Ad657 được cải

biến bằng cách chèn thêm peptit nhận biotin vào trong HVR1. Cái này được tái tổ hợp vào trong nhiều plasmit pAd6 khác nhau để tạo ra biến thể Ad657 có BAP trong HVR1, biến thể được gọi là Ad657-HVR5-PSTCD chứa hexon có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:55.

Liên quan đến biến thể của Ad657, trình tự HVR5-XA trong Ad657 được cải biến bằng cách chèn thêm thòng lòng V1/V2 tổng hợp từ vỏ HIV vào trong HVR5, biến thể được gọi là Ad657-HVR5-V1/V2 chứa hexon có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:56.

Việc chèn thêm thòng lọng V1/V2 tổng hợp từ vỏ HIV cho phép trình diện kháng nguyên này để đảm nhiệm làm vacxin cũng như hướng đích lại bằng cách liên kết với protein tương tác với vỏ HIV.

Liên quan đến biến thể của Ad657, trình tự HVR5-XA trong Ad657 được cải biến bằng cách chèn thêm peptit tổng hợp từ virut gây u nhú ở người vào trong HVR5, biến thể được gọi là Ad657-HVR5-HPV chứa hexon có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:57.

Việc chèn thêm peptit tổng hợp từ virut gây u nhú người cho phép trình diện peptit HIV làm kháng nguyên này cho mục đích vacxin cũng như hướng đích lại bằng cách liên kết với protein mà tương tác với peptit HPV.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, Ad khảm được tạo ra có HVR1 của Ad6 và HVR 2-7 của Ad57, thể khảm, được gọi là thể khảm Ad6/57 HVR chứa hexon có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:58.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, Ad khảm được tạo ra có HVR1 của Ad6 và 7 và HVR 2-6 của Ad57, thể khảm, được gọi là thể khảm Ad6/57/6 HVR chứa hexon có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:59.

Ví dụ 2 Adenovirut tái tổ hợp hướng đích lại và khử hướng đích để phân phối gen

Adenovirut là vectơ mạnh để phân phối gen và tạo miễn dịch trên cơ sở gen. Adenovirut nguyên mẫu được dùng cho phần lớn các ứng dụng này là adenovirut loài C người có kiểu huyết thanh 5 (HAdV-C5 hoặc Ad5). *In vitro*, Ad5 liên kết và đi vào tế bào thông qua tương tác kết hợp của sợi của nó và protein bazơ penton với thụ thể bề mặt tế bào. Sợi tam phân liên kết với thụ thể coxsackie-adenovirut (CAR), và tế bào

mà thiếu CAR có khả năng chống lây nhiễm tương đối trừ khi chúng cũng biểu hiện α_v integrin được liên kết bằng môtip RGD trên bazơ penton.

In vivo, tương tác này vẫn được sử dụng, nhưng độ quan trọng của chúng thay đổi theo đường tiêm. Nếu được tiêm trực tiếp vào trong khối u hoặc mô rắn, CAR và integrin tương tác cao hơn hẳn. Nếu tiêm tiêm tĩnh mạch (IV), các tương tác này trở thành thứ cấp do tác động của Ad5 liên kết với các yếu tố đông máu phụ thuộc vào vitamin K. Yếu tố máu X (FX) liên kết với ái lực dưới nanomol với hexon trong Ad5 và, sau đó, làm cho Ad5 tải nạp hiệu quả tế bào gan sau khi tiêm IV. Nếu vắng mặt FX, tải nạp ở gan giảm đi đáng kể.

Vectơ adenovirut chỉ hơi độc nhất về khả năng mang trình tự cADN rất lớn lên đến 36 cặp kilobase (kbp) so với các vectơ khác như vectơ của virut kết hợp adeno (AAV) với chỉ với trình tự ADN 4,5 kb. Khả năng tải này biện minh cho việc thăm dò vectơ Ad đối với liệu pháp gen cơ khi phân phối gen chuyển rất lớn như là cADN dystrophin 14 kbp. Tiêm tĩnh mạch chuột mới sinh có thể làm trung gian cho phân phối gen cơ, nhưng khả năng bị mất đi ở chuột trưởng thành. Chuyển nạp giảm đi theo tuổi do một phần là do kích thước rất lớn của virion Ad (tức là 100 nm) cũng như mất thụ thể CAR trên tế bào cơ bị lão hóa. Đường trong cơ (IM) là con đường phổ biến nhất đối với vacxin trên cơ sở gen khi sử dụng Ad5 và các loại huyết thanh khác mặc dù thực tế là CAR vắng mặt trên tế bào cơ xương.

Do đó, tải nạp Ad5 và các kiểu huyết thanh Ad khác của cơ có thể đủ đối với liệu pháp gen hoặc tiêm chủng vacxin trên cơ sở gen. Tuy nhiên, việc vắng mặt thụ thể chính của virut trong cơ làm giảm hiệu quả của virut và đòi hỏi nhiều vectơ được phân phối để đạt được hiệu quả mong muốn.

Cấu trúc của hexon được cải biến peptit trong adenovirut.

Peptit 12 axit amin (12 đơn phân) trên tế bào cơ chuột C2C12 được lựa chọn từ thư viện peptit ngẫu nhiên trình diện giữa tấm β H và I từ vùng bấm của Ad5 (Fig. 1). Peptit 12.51 (TARGEHKEEELI; SEQ ID NO:1) và 12.52 (LRQTGAASAVWG; SEQ ID NO:2) được lựa chọn chống lại nguyên bào cơ hoàn toàn chống lại tế bào không phải đích để thu được peptit có thể sẽ đặc hiệu để liên kết tế bào cơ. Trong hầu hết các trường hợp, peptit nhỏ có ái lực tương đối thấp. Do đó, suy luận rằng việc trình diện các peptit chọn lọc cơ trên 720 bản sao của hexon Ad5 có thể làm cho việc phân phối

gen cơ tốt hơn. Vị trí chèn thêm này cũng có ích trong việc bất hoạt FX liên kết với hexon để "khử hướng đích" vectơ khỏi gan nếu vectơ rò rỉ vào trong máu sau khi tiêm IM.

Việc chèn các peptit chọn lọc cơ nằm giữa hai tấm β khác mà cũng chế ngự thòng lọng siêu biến trên virut, khả năng của Ad đã cải biến trong việc điều biến tính hướng kích thích được đánh giá. Peptit 12.51 và 12.52 được đưa vào trong vùng siêu biến (HVR) trong thòng 5 được chế ngự bởi tấm β7 và β8 trong hexon Ad5. Khả năng *in vivo* của các virut này trong việc tải nạp mô sau khi tiêm tĩnh mạch và tiêm trong cơ ở chuột nhà và trong chuột đồng được đánh giá.

Adenovirut

Ad5-GL bị mất E1 (RD-Ad5-GL) biểu hiện protein dung hợp protein phát huỳnh quang màu xanh-luciferaza (GFP-Luciferaza, GL) như được mô tả trong tài liệu nào đó (xem, ví dụ, Crosby et al., 2002 *J. Virol.*, 76:6893-6899; Khare et al., 2011 *Mol. Ther.*, 19:1254-1262; và Khare et al., 2012 *J. Virol.*, 86:2293-2301). Các peptit chọn lọc cơ 12.51 và 12.52 được chèn vào vị trí trong HVR5 trên hexon Ad5 nằm giữa các tấm β7 và β8 của nó mà có cấu trúc tương tự với tấm β H và I từ vùng bấm của Ad5 (Fig. 1A) theo phương pháp đã biết với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Peptit với đoạn đầu có tính linh hoạt thay thế toàn bộ thòng lọng HVR5 trong Ad5 (Fig. 1B). Các trình tự hexon được cải biến này được đưa vào trong Ad5 khiếm khuyết sao chép biểu hiện protein dung hợp protein phát huỳnh quang màu xanh-luciferaza (RD-Ad5-GL) bằng cách tái tổ hợp màu đỏ trong vi khuẩn (xem, ví dụ, Campos et al., 2004 *Hum. Gene Ther.*, 15:1125-1130). Ad cải biến peptit được tạo cấu trúc bằng cách chèn thêm oligonucleotit đã ủ mã hóa cho peptit 12.51 và 12.52 (Fig. 1B) vào trong trình diện plasmit pHVR5 (Fig.1A dưới) để thu được Ad tái tổ hợp, Ad5-HVR5-12.51 và Ad5-HVR5-12.52.

Các plasmit thu được đã được phân hủy và được sử dụng để tái tổ hợp màu đỏ vào trong pAd5-GL. Các vectơ này được cứu trong 293 tế bào, được tinh sạch trên hai gradient CsCl liên tiếp và được khử muối trên cột sắc ký Econopac 10-DG (Bio-Rad) thành 50 mM Tris pH 8 với 0,5 M sucroza và được bảo quản ở -80°C.

Thử nghiệm virut *In vitro*

Nguyên bào cơ của chuột C2C12 được mua từ American Type Tissue Culture (Manassas, VA). 293 tế bào được lấy từ Microbix, Toronto, Ontario, Canada. Tế bào được nuôi trong DMEM với 10% FBS Invitrogen.

Tế bào cơ C2C12 được đặt trong đĩa 6 giếng (Corning) một ngày trước khi cho lây nhiễm. Virut được sử dụng để lây nhiễm tế bào trong DMEM với 5% FBS. Các tế bào được ủ trong 2 ngày trước khi quan sát dưới ánh sáng huỳnh quang xanh.

Các thí nghiệm trên động vật được thực hiện với sự chấp thuận của Ủy ban Chăm sóc và Sử dụng Động vật của Viện Mayo theo quy định của Đạo luật Phúc lợi Động vật, Chính sách Phúc lợi Động vật PHS và các nguyên tắc của Hướng dẫn NIH về Chăm sóc và Sử dụng Động vật Phòng thí nghiệm. Chuột cái CD-1 (Charles River) được gây mê và tiêm trong cơ (IM) hoặc trong tĩnh mạch (IV) với 10^{10} vp của các loại virut chỉ định vào những thời điểm chỉ định. Động vật được gây mê và tiêm 3 mg d-luciferin (Sản phẩm chụp ảnh phân tử) và được chụp ảnh trên hệ thống chụp ảnh Xenogen. Vào thời điểm sau đó, động vật được gây mê và lấy máu trong thiết bị tách huyết thanh để làm ELISA.

ELISA được thực hiện như sau. Các đĩa Immulon 4 HBX (Thermo) được ủ với 100 ng mỗi giếng protein GFP trong nước muối đệm phosphat 1X (PBS) ở 4°C qua đêm, rửa sạch và phong bế bằng sữa 5% trong nước muối đệm TRIS với 0,1% Tween 20 (TBST) ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Các độ pha loãng 1: 100.000 đến 1: 1.1000 của mỗi mẫu huyết thanh được chuẩn bị trong đệm phong bế. Các giếng được rửa sạch và 100 µL mỗi giếng được thêm vào các đĩa phủ GFP làm ba lần và ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng. Các giếng được rửa sạch và dịch pha loãng 1/10.000 của kháng thể thứ cấp kháng HRP chuột ở dê (Pierce Chemical) được thêm vào mỗi giếng. Các đĩa được ủ thêm trong 2 giờ nữa ở nhiệt độ phòng, rửa sạch và 50 µL 1 Step Ultra TMB ELISA (Thermo Fisher Scientific Inc.) được thêm vào để phát hiện HRP, sau đó là 50 µL H_2SO_4 2 M. Độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm được xác định bằng máy Beckman Coulter DTX 880.

Các phân tích thống kê được thực hiện bằng Prism (Graphpad). Ý nghĩa thống kê được tính toán bởi ANOVA một yếu tố sau đó là HSD của Tukey

Tải nạp *in vitro* vào tế bào cơ C2C12 của chuột

RD-Ad5-GL, RD-Ad5-GL-HVR5-12.51, và RD-Ad5-HVR5-12.52 được sử

dụng để lây nhiễm tế bào nguyên bào cơ C2C12 của chuột tại các chỉ số bội nhiễm (MOI) khác nhau về mặt hạt virut (vp)/tế bào. Khi quan sát thấy huỳnh quang màu xanh từ protein dung hợp GFP bằng kính hiển vi huỳnh quang, cả hai vectơ cải biến peptit đều làm trung gian tải nạp tốt hơn đáng kể so với RD-Ad5-GL (Fig 2A). Khi hoạt tính luciferaza được đo, quan sát thấy có sự gia tăng đáng kể trong các tế bào bị nhiễm RD-Ad5-GL-12.51 và 12.52 (Fig. 2B). Khi một trong số các peptit, 12.51, được thêm trở lại vùng bấm của Ad5, peptit này đã tăng khả năng tải nạp *in vitro* lên 14 lần trên nguyên bào cơ C2C12.

Tải nạp *in vivo* sau khi tiêm trong cơ ở chuột

10^9 vp của Ad5-GL, Ad5-GL-HVR5-12.51, và Ad5-GL-HVR5-12.52 được tiêm theo đường IM vào cả hai cơ bốn đầu ở chuột và chụp ảnh luciferaza được thực hiện ở các thời điểm khác nhau (Fig. 3A ở trên). Ad5-GL-HVR5-12.51 tạo ra hoạt tính luciferaza cao gấp 2 đến 3 lần so với Ad5-GL tại mọi thời điểm ($p < 0,05$ ở ngày 1 bằng ANOVA một yếu tố) (Fig. 3B bên trái). Hoạt tính của Ad5-GL-HVR5-12.52 trong cơ thấp hơn cả Ad5-GL và HVR5-12.51 trái ngược với hoạt tính *in vitro* mạnh hơn của nó.

Tải nạp *in vivo* sau khi tiêm tĩnh mạch ở chuột

3×10^{10} vp của Ad5-GL, Ad5-GL-HVR5-12.51 và Ad5-GL-HVR5-12.52 được tiêm theo đường IV ở chuột và tiến hành chụp ảnh luciferaza (Fig. 3A bên dưới). Trái ngược với kết quả ở cơ, chỉ có Ad5-GL không cải biến làm trung gian tải nạp mạnh qua gan. Tải nạp ở gan bằng Ad5-GL cao hơn 60 lần so với Ad5-GL-HVR5-12.51 và Ad5-GL-HVR5-12.52 ($p < 0,001$ ở ngày thứ nhất bằng ANOVA một yếu tố) (Fig. 3B bên phải) chứng tỏ rằng Ad tái tổ hợp hướng đích mô cơ trong khi giảm lây nhiễm chệch đích trong gan.

Tải nạp *in vivo* sau khi tiêm trong cơ ở chuột đồng

Để kiểm tra xem vectơ được cải biến 12.51 có hoạt động ở các loài khác ngoài chuột hay không, 10^{10} vp của Ad5-GL và Ad5-GL-HVR5-12.51 đã được tiêm theo đường IM vào cả hai cơ bốn đầu của chuột đồng Syria lớn hơn và tiến hành chụp ảnh luciferaza vào 24 giờ sau (Fig. 4). Trong trường hợp này, Ad5-GL-HVR5-12.51 làm trung gian cho hoạt tính luciferaza cao gấp 7 lần so với Ad5-GL ($p < 0,01$ ở ngày 1 bằng ANOVA một yếu tố).

Tạo miễn dịch trên cơ sở gen sau khi tiêm trong cơ ở chuột

16 tuần sau khi tiêm IM, thu lấy huyết thanh của những con chuột được điều trị như đã mô tả ở trên và như trình bày trong Fig. 3 và được phân tích dịch pha loãng liên tiếp bằng ELISA để tìm kháng thể chống lại GFP mã hóa gen chuyển (Fig 5). Tất cả những con chuột được tiêm Ad đều tạo ra kháng thể kháng GFP đáng kể so với nhóm PBS ở độ pha loãng huyết thanh từ 1: 10.000 đến 1: 1000 ($p < 0,0001$ bằng ANOVA một yếu tố). Tuy nhiên, Ad5-GL-HVR-12.51 tạo ra kháng thể nhiều hơn so với hoặc Ad5 hoặc Ad5-HVR5-12.52. Ở độ pha loãng 1: 1000 đến 1: 10.000 của huyết thanh, Ad5-GL-HVR-12.51 nhiều hơn đáng kể so với Ad5-GL ($p < 0,01$ đến 0,0001 theo ANOVA một yếu tố). Ở độ pha loãng 1: 1000 của huyết thanh, 12.51 nhiều hơn đáng kể so với 12,52 ($p < 0,05$). Ad5-GL-12.52 nhiều hơn đáng kể so với Ad5-GL ở độ pha loãng 1: 1000 và 1: 10.000 của huyết thanh ($p < 0,05$ đến 0,001).

Ví dụ này chứng minh rằng các peptit được chọn trong bối cảnh cấu trúc tương thích trên các thư viện thể thực khuẩn có thể được dịch mã thành protein hexon Ad. Ví dụ, đối với peptit 12.51, vị trí chèn này làm tăng tải nạp cơ trong khi giảm lây nhiễm chệch đích ở gan. Do đó, Ad tái tổ hợp hướng đích mô cơ có thể sử dụng làm vectơ để tiêm chủng vacxin trên cơ sở gen hoặc để áp dụng/phân phối liệu pháp gen cho cơ.

Khía cạnh tiếp theo của sáng chế xuất Ad tái tổ hợp và/hoặc Ad khảm chứa các peptit hướng đích tế bào khác được chèn thêm vào trong HVR của Ad657 và vào trong thòng lọng HI của Ad6 và C68 được mô tả trong Bảng 1.

Bảng 1

Các peptit hướng đích tế bào khác được chèn vào trong HVR Ad657 và vào trong thòng lòng HI của Ad6 và C68

peptit liên kết tế bào VSV	GTWLNPGFPPQSCGYATVT (SEQ ID NO:4)
peptit liên kết integrin RGD-4C	CDCRGDCFC (SEQ ID NO:5)
peptit thể thực khuẩn được chọn 12.51	TARGEHKEEELI (SEQ ID NO:1)
peptit thể thực khuẩn được chọn 12.52	LRQTGAASAVWG (SEQ ID NO:2)
peptit thể thực khuẩn được chọn 12.53	ARRADTQWRGLE (SEQ ID NO:3)
peptit liên kết alpha4	NMSLDVNRKA (SEQ ID NO:6)
peptit liên kết phổi L10.1	WTMGLDQLRDSSWAHGGFSA (SEQ ID NO:9)
peptit liên kết phổi L10.2	RSVSGTEWVPMNEQHRGAIW (SEQ ID NO:10)
peptit liên kết phổi L10.5	TELRTHTSKELTIRTAASSD(SEQ ID NO:11)
peptit liên kết cơ S5.1	DRAIGWQDKLYKLPLGSIHN (SEQ ID NO:12)
peptit liên kết tế bào ung thư tuyến tiền liệt DU9C.1	MGSWEKAALWNRVSASSGGA (SEQ ID NO:13)
peptit liên kết tế bào ung thư tuyến tiền liệt DU9C.2	MAMGGKPERPADSDNVQVRG (SEQ ID NO:14)
peptit liên kết tế bào ung thư tuyến tiền liệt DU9A.7	MASRGDAGEGSTQSNTNVPS (SEQ ID NO:15)
peptit liên kết tế bào tua XS.1	GPEDTSRAPENQQKTFHRRW (SEQ ID NO:17)
peptit liên kết tế bào màng trong REDV	REDVY (SEQ ID NO:46)
peptit liên kết tế bào ung thư vú SKBR5C1	GQIPITEPELCCVPWTEAFY (SEQ ID NO:2(
peptit liên kết tế bào ung thư vú 231R10.1	PQPPNSTAHPNPHKAPPNTT (SEQ ID NO::
peptit liên kết tế bào ung thư tế bào gen HepaCD8	VRWFPGGEWGVTHPESLPPP (SEQ ID NO:2
peptit liên kết tế bào ung thư vú HI Met 231 3-4	ISLSSHRATWVV (SEQ ID NO: 47)

peptit được chọn cho ung thư tế bào B:

1-1	GVSKRGLQCHDFISCSGVPW (SEQ ID NO:29)
1-2	NQSIPKVAGDSKVFCWWCAL (SEQ ID NO:30)
1-3	QSTPPTKHLTIPRHLRNTLI (SEQ ID NO:31)
1-4	DMSFQLVTPFLKALPTGWRG (SEQ ID NO:32)
1-5	GGHGRVLWPDGWFSLVGISP (SEQ ID NO:33)
1-6	QIMMGPSLGYYMPSESIFAY(SEQ ID NO:35)
2-11	ISWDIWRWWYTSEDRDAGSA (SEQ ID NO:36)
2-14	VWGMTTSDHQRKTERLDSPE (SEQ ID NO:37)
2-20	MTSAQTSEKLKAETDRHTAE (SEQ ID NO:38)
2-9	MGSRSAVGDFESAEGSRRP (SEQ ID NO:39)
3b-6	MGRTVQSGDGTPAQTQPSVN(SEQ ID NO:40)
4*-5	MARTVTANVPGMGEGMVVVP (SEQ ID NO:41)

peptit nhận biotin BAP nhỏ	GLNDIFEAQKIEWH (SEQ ID NO:24)
peptit liên kết calmodulin	CAAARWKKAFIAVSAANRFKKIS (SEQ ID NO:25)

ADN mã hóa cho peptit được chỉ định và ADN bổ sung của nó được tổng hợp bằng các đầu dính liền để nối vào trong plasmit Ad, ví dụ, plasmit hexon XA hoặc plasmit xáo trộn sợi pAd6-NdePfl. Các oligonucleotit này được nối vào trong HVR hoặc thòng lọng HI của Ad. Các plasmit này được sử dụng để tái tổ hợp vào trong plasmit khung chính Ad khác nhau.

Một vài peptit phụ trách hướng đích thụ thể mới trên tế bào. Những cái khác như BAP nhỏ có thể sử dụng để hướng đích adivin và để tinh sạch nếu virut được sinh trưởng trong tế bào biểu hiện biotin ligaza BirA vi khuẩn. Peptit calmodulin cho phép virut liên kết với calmodulin hoặc protein dung hợp calmodulin để hướng đích lại hoặc để tinh sạch virut.

Do đó, Ad tái tổ hợp hướng đích thụ thể tế bào/mô cụ thể có thể sử dụng làm vectơ để tiêm chủng trên cơ sở gen hoặc ứng dụng liệu pháp gen trong tế bào và/hoặc mô hướng đích.

Ví dụ 3 Chèn thêm các HVR riêng rẽ từ các kiểu huyết thanh Ad khác nhau với chèn thêm peptit hướng đích/khử hướng đích tế bào hoặc axit amin mới.

Bản đồ plasmit xáo trộn hexon (Fig. 34) cho thấy rằng việc kết hợp giữa việc chèn thêm các HVR riêng rẽ từ các kiểu huyết thanh Ad khác nhau với việc chèn thêm peptit hướng đích/khử hướng đích tế bào hoặc axit amin mới như là xystein vào trong hexon để cải biến hóa học hướng đích và che chắn.

Theo các phương án nhất định, các peptit liên kết tế bào 12.51, VSV, RGD (xem bảng 1) được chèn vào trong HVR 1 hoặc HVR 5, phương án này đóng vai trò là ví dụ về chèn thêm các peptit này và peptit khác trong bất kỳ HVR nào của Ad (Fig. 34). Ví dụ khác cho thấy việc chèn thêm peptit nhận biotin (BAP) được chèn vào trong HVR này cho phép vectơ hướng đích lại với avidin và streptavidin và phối tử được biotin hóa hoặc với protein dung hợp avidin hoặc streptavidin. Việc chèn thêm BAP cho phép virut được tinh sạch trên cột avidin hoặc streptavidin đơn phân để sản xuất vectơ. Tương tự, Ad57-HVR1-XXA và XA là ví dụ về việc chèn xystein vào trong vị trí này cho phép cải biến hóa học hướng đích với maleinit hoặc chất phản ứng xystein khác (Fig. 34).

Các phương án này cũng được áp dụng trong ngữ cảnh của Ad cái mà kết hợp các HVR khác nhau từ các Ad khác nhau (tức là HVR xáo trộn). Ví dụ, HVR1 của Ad6 với HVR từ 2-7 của Ad57 hoặc HVR1 và 7 của Ad6 với HVR 2-6 của Ad57. Theo phương án khác, virut 6/56/6 có HVR 1 và 7 từ Ad6 và HVR 2-6 từ Ad657.

Ví dụ 4 Liên hợp hóa học đích của Ad657-HVR5C được biến đổi hexon được biến đổi xystein

Fig. 35 mô tả các biến thể Ad cho thấy việc kết hợp giữa việc chèn thêm các

HVR riêng rẽ từ các kiểu huyết thanh Ad khác nhau với việc chèn thêm axit amin mới như là xystein vào trong hexon để cải biến hóa học hướng đích và che chắn.

So sánh tác động của việc liên hợp hóa học không hướng đích với liên hợp hóa học hướng đích lên việc che chắn và chức năng của Ad657-HVR1C được cải biến hexon được cải biến xystein (Fig. 36). Ví dụ này chứng minh khả năng hướng đích polyme và cải biến hóa học khác đến xystein được chèn vào trong hexon Ad. PEG không hướng đích bất hoạt lây nhiễm virut trong khi PEGyl hóa hướng đích xystein giữ lại chức năng virut.

Theo một khía cạnh của sáng chế, việc sử dụng polyme hoặc protein/peptit được chèn vào để khử hướng đích, hướng đích lại, và che chắn khỏi kháng thể, protein, tế bào được dự tính. Fig. 54 mô tả vị trí của HVR của Ad cái mà có được cải biến, ví dụ, bằng PEGyl hóa hoặc "BAPryl hóa".

Theo một phương án, các kiểu huyết thanh Ad và/hoặc biến thể khác nhau chứa lớp bảo vệ polyme để cho phép sử dụng nhiều liều biến thể Ad6 và Ad657. Chu trình trị liệu minh họa trong đó Ad6 và Ad657 có thể sử dụng cho nhiều đợt điều trị bằng chuyển đổi kiểu huyết thanh kết hợp với liên hợp polyme cộng hóa trị được trình bày (Fig. 41B).

Ad657-HVR1C biểu hiện GFPLuciferaza được tạo ra từ tế bào và được tinh sạch trên grandien CsCl. Virut được cải biến cộng hóa trị với Polyetylen glycol (PEG) 5 kDa. Virut được xử lý với hoặc NHS-PEG mà phản ứng ngẫu nhiên với amin/lysin trên protein virut hoặc với maleimit PEG mà phản ứng đặc hiệu với xystein được chèn vào trong HVR1 sử dụng plasmit con thoi XXA. Virut được cải biến hoặc không được cải biến này sau đó được tinh sạch bằng quay CsCl cuối cùng và sau đó bằng khử muối. Virut chỉ định được phân tách trên gen SDS-PAGE, nhuộm với SyproRuby, và được nhìn thấy bằng cách chụp ảnh (Fig. 36A). Điều này cho thấy rằng việc NHS-PEGyl hóa cải biến ngẫu nhiên nhiều protein virut như được chứng minh bởi sự gia tăng khối lượng biểu kiến của protein (được chỉ ra bằng các mũi tên). Ngược lại, phản ứng maleimit PEG hướng đích với xystein trong HVR1 chỉ cải biến hexon và không hư hại các protein capsome virut khác. Tác động của PEGyl hóa đến chức năng virut được đánh giá.

Virut chỉ định được ủ với tế bào A549 và khả năng của chúng để lây nhiễm tế

bào được đo lại bằng thử nghiệm luciferaza. Điều này cho thấy rằng việc NHS-PEGyl hóa ngẫu nhiên làm giảm hoạt tính virut nhiều hơn 90% trong khi maleimit-PEG thì không (Fig. 36B).

Chuột đồng Syri có đủ khả năng miễn dịch được cấy khối u ung thư thận HaK dưới da. Khi khối u đạt thể tích 200 µl, chúng được tiêm một lần duy nhất theo đường tĩnh mạch với virut Ad6 chỉ định được tạo cấu trúc có hoặc không có E3 (DE3) và có hoặc không có NHS-PEGyl ngẫu nhiên. Kích thước khối u được đo theo thời gian. Dữ liệu cho thấy rằng việc mất toàn bộ gen E3 trong virut tiêu diệt khối u Ad6-deltaE3-Luc khiến cho virut kém hiệu quả hơn trong việc giảm thể tích khối u so với virut tiêu diệt khối u mẹ, Ad6-Luc. Dữ liệu cũng cho thấy rằng Ad6 có thể được PEGyl hóa và giữ lại hiệu quả (xem, Ad6-Luc vs. Ad6-Luc-20 kDa PEG) (Fig. 58).

Liên hợp hóa học hướng đích của Ad được cải biến hexon được cải biến xystein, ví dụ, Ad657-HVR5C. Ad657-HVR5C biểu hiện GFPLuciferaza được tạo ra từ tế bào và được tinh sạch trên grandien CsCl. Virut được cải biến cộng hóa trị với maleimit-huỳnh quang cận hồng ngoại IR800, maleimit-biotin, hoặc 5 kDa maleimit-PEG mà phản ứng đặc hiệu với xystein cái được chèn vào trong HVR5 sử dụng plasmit con thoi XXA của nó. Ad chỉ định và Ad được cải biến được phân tách trên gel SDS-PAGE, nhuộm với SyproRuby, và được nhìn thấy bằng cách chụp ảnh (Fig. 37A). SDS-PAGE của protein virut sau khi chụp ảnh cận hồng ngoại chứng minh rằng HCV-C có thể được gắn thẻ với chất tạo ảnh (Fig. 37B). Tác động của việc PEGyl hóa lên chức năng virut *in vivo* được chứng minh bằng cách tiêm virut Ad được PEGyl hóa trong màng bụng. Khả năng lây nhiễm tế bào trong chuột mang khối u được chứng minh bằng hoạt tính luciferaza có thể phát hiện bằng cách chụp ảnh. Fig. 37C chứng minh khả năng hướng đích polyme và cải biến hóa học khác đến xystein được chèn vào trong vùng hexon của Ad657. Hơn nữa, nó được chứng minh rằng việc PEGyl hóa không hướng đích adenovirut đến gan *in vivo* (Fig. 50).

Ví dụ 5 Biểu hiện của yếu tố kích thích tạo cụm đại thực bào hạt (GMCFS) người bằng Ad657.

Ad657 mang cADN đối với GMCFS người được sử dụng để lây nhiễm tế bào A549 và thay đổi hàm lượng của dịch nổi được thêm vào tế bào TF-1 phụ thuộc vào sinh trưởng GMCSF. Số lượng tế bào tăng lên chứng tỏ biểu hiện của xytokin chức

năng của người (Fig. 27). Dữ liệu chứng minh rằng Ad tái tổ hợp có thể sử dụng để biểu hiện protein khác loại.

Ví dụ 6 Adenovirut tiêu diệt khối u Ad657 dùng cho liệu pháp virut toàn thân chống lại tế bào ung thư

Việc sắp thẳng hàng toàn bộ hệ gen Ad được chọn tạo thành cây phát sinh chủng loại mà nhóm Ad57 với các virut loài C khác tương đồng nhiều nhất với Ad6 được trình bày trong Fig. 6.

Ad57 xuất hiện gần giống với Ad6 với sự phân kỳ trình tự trong vùng siêu biến (HVR) hexon và gen trốn tránh miễn dịch E3 (Fig. 7). Protein capsit virut phơi nhiễm khác chứa sợi, bazơ penton, IIIa, và IX gần như giống nhau giữa Ad6 và Ad57. Dữ liệu trung hòa phù hợp với thực tế là hầu hết kháng thể trung hòa adenovirut đều hướng đích HVR trên Ad. Độ phản ứng chéo thấp giữa kháng huyết thanh Ad6 và Ad57 được cho là do kháng thể có thể hướng đích protein sợi thông thường của chúng (Lukashev et al., 2008 *J Gen Virol*. 89:380-388).

Trong ví dụ này, việc sử dụng Ad657 làm chất tiêu diệt khối u chống lại ung thư tuyến tiền liệt người đã được chứng minh. HVR trong Ad6 được thay thế bằng các HVR từ Ad57 để tạo ra virut tiêu diệt khối u khảm loài C được gọi là Ad657. Ad657 và Ad6 được thử nghiệm như một liệu pháp tiêu diệt khối u toàn thân bằng chỉ tiêm tĩnh mạch trong chuột trụi lông mang khối u ung thư tuyến tiền liệt người. Tính hướng gan và khối u của virut này được đánh giá trong mô hình chuột mắc ung thư tuyến tiền liệt như sau.

Tế bào ung thư biểu mô tuyến tiền liệt người DU145 được mua từ American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) và được xác minh là không có mầm bệnh cụ thể bằng thử nghiệm IMPACT bằng RADIL. 293 tế bào thu được từ Microbix, Toronto, Ontario, Canada. Các tế bào được giữ trong DMEM với 10% FBS (Invitrogen, Grand Island, NY, USA).

Hệ gen của Ad6, chủng Tonsil 99 (ATCC VR-1083), được tách dòng như được mô tả ở tài liệu nào đó (xem, ví dụ, Weaver et al., 2013 *PLoS One*. 8:e73313). Băng tương đương với hexon Ad567 ở giữa các vị trí ApaI và SacI tự nhiên được tổng hợp bằng Genscript. Mảnh này được tách dòng vào trong plasmit con thoi pUC57-Ad6 Hexon-FZF chứa Ad6 pVI và gen hexon với băng gen kháng-FRT FRT-Zeocin® ở

giữa chúng để tái tổ hợp cùng loại trong vi khuẩn như được mô tả trong tài liệu nào đó (xem, ví dụ, Campos et al., 2004 *Hum Gene Ther*. 15:1125–1130; và Khare et al., 2012 *J Virol*. 86:2293-2301). Mảnh Ad6 ApaI–SacI được thay thế bằng mảnh Ad57 tạo ra plasmit pUC57–Ad6/57 Hexon-FZF. Cái này được tái tổ hợp vào trong hệ gen Ad6 bằng tái tổ hợp đỏ (Campos et al., 2004 *Hum Gene Ther*. 15:1125-1130). Fig. 59 trình bày bản đồ plasmit của Ad57 bị mất E3. Virut được cứu bằng cách chuyển nạp 293 tế bào và được tạo ra từ 10 đĩa CellStack (Corning Life Sciences, Lowell, MA, USA). Virut biểu hiện protein dung hợp protein phát huỳnh quang-luciferaza (GFP-Luc) có băng biểu hiện CMV-GFP-Luc được chèn vào giữa sợi Ad và E4 và mất E3 để tạo ra khoảng trống để chèn. Virut được tinh sạch trên hai gradien CsCl, và số lượng hạt virut (vp) được tính toán bằng OD260.

Để đánh giá hoạt tính tiêu diệt khối u *in vitro*, tế bào được xử lý tại hệ số bội nhiễm (MOI) được chỉ định xét về vp/tế bào trong DMEM với 5% FBS và chất kháng sinh-kháng nấm (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Năm ngày sau, môi trường được loại bỏ và tế bào được xử lý bằng tím tinh thể (0,05% tím tinh thể, 3,7% formaldehyt, trong muối đệm phosphat; Invitrogen, Grand Island, NY, USA) trong 10 phút. Tế bào được rửa hai lần với PBS và sau đó được ủ qua đêm tại 37°C trong 0,1% natri dodecyl sulfat trong PBS để hòa tan tím tinh thể. Độ hấp thụ của tím tinh thể được đo tại OD595 trên đầu đọc đĩa Beckman Coulter DTX 880. Khả năng sống của tế bào (%) được tính toán bằng cách chia OD của mẫu cho OD trung bình của tế bào đối chứng không được xử lý trên cùng đĩa 96 giếng và nhân số này với 100.

Động vật được nhốt trong Cơ sở Động vật Phòng khám Mayo theo các hướng dẫn của Hiệp hội Đánh giá và Công nhận về Chăm sóc Động vật Phòng thí nghiệm. Nghiên cứu được phê chuẩn bởi Ủy ban Chăm sóc và Sử dụng Động vật của Phòng khám Mayo theo quy định của Đạo luật Phúc lợi Động vật, Chính sách Phúc lợi Động vật PHS. Khối u dưới da được bắt đầu ở chuột trụi lông 4 tuần tuổi (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN, USA) bằng cách tiêm dưới da (s.c.) với 1×10^7 tế bào DU145 trong 100 µL DMEM/50% Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Thể tích khối u được tính toán sử dụng phương trình chiều rộng^2×chiều dài×1/2. Khi khối u đạt thể tích ~200 µL, chuột được phân bổ thành nhiều nhóm khác nhau và được điều trị chỉ bằng cách tiêm i.v tĩnh mạch đuôi. Động vật bị giết chết khi thể tích khối u đạt 2000 µL hoặc nếu động vật suy sụp, gặp nạn hoặc nếu da bị nứt do khối u.

Đối với các phép đo alanin aminotransferaza (ALT) trong máu, nhóm sáu con chuột C57BL/6 đã được tiêm i.v. với 10^{11} vp của Ad5, Ad6 hoặc Ad657 theo tĩnh mạch đuôi và thu máu sau 3 ngày để đo ALT bằng thử nghiệm hoạt tính ALT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Phân tích thống kê được thực hiện với Prism (Graphpad) bằng các biện pháp lặp lại ANOVA hoặc ANOVA một chiều, sau đó là kiểm tra Tukey's HSD. Các đường cong sống sót Kaplan – Meier được vẽ và so sánh bằng bài kiểm tra xếp hạng log.

Gen capsome của Ad57 gần giống với Ad6 ngoại trừ HVR hexon của chúng (Fig. 6 và 7). Để tạo ra virut khảm của Ad57 và Ad6, băng tương ứng với HVR hexon của Ad57 được tái tổ hợp vào trong hệ gen Ad6 kiểu dại (Fig. 8). Virut này được cứu và tạo ra trong 293 tế bào và tinh sạch trên gradien CsCl. Cho rằng hệ gen virut cơ sở là Ad6, virut khảm hexon của chúng được gọi là Ad657 (Fig. 59).

Hoạt tính tiêu diệt khối u *in vitro* được đánh giá bằng cách lây nhiễm tế bào LNCap và DU145 với 10, 100 hoặc 1000 vp/tế bào. Để so sánh mức độ tổn thương gan bằng Ad5, Ad6, và Ad657, liều lượng cao hơn của 10^{11} vp mỗi virut được tiêm theo tĩnh mạch đuôi vào trong chuột C57BL/6 có đủ sức đề kháng. Chuột được tiêm Ad5 trở nên hấp hối trong 2 ngày và được giết chết nhân đạo (Fig. 10A). Khả năng sống sót của Ad5 và Ad6 thấp hơn đáng kể so với PBS (p=0,0001 và 0,0009, tương ứng, bằng phân tích log-rank. Khả năng sống sót của Ad657 cũng giảm so với PBS (p = 0,0578). Khả năng sống sót sau khi tiếp xúc với Ad6 hoặc Ad657 tốt hơn nhiều so với chuột được điều trị Ad5 (p = 0,0001 và 0,0001, tương ứng). Khả năng sống sót của Ad6 và Ad657 không khác biệt về mặt thống kê (p = 0,248).

ALT được đo trong máu vào 3 ngày sau khi tiêm trong động vật Ad6 và Ad657 sống sót. Động vật được điều trị bằng Ad5 không được thử nghiệm, vì hầu hết cả nhóm cần phải giết chết. Thử nghiệm này cho thấy Ad6 gây tổn thương gan ở mức độ tương đối thấp liên quan đến giải phóng enzym ALT của gan trong máu (Fig. 10B). Cả nhóm Ad6 và Ad657 đều có mức ALT thấp, nhưng có ý nghĩa, so với chuột được điều trị bằng PBS (p <0,001 theo ANOVA một chiều với thử nghiệm so sánh nhiều lần của Tukey cho cả hai loại virut). Ad657 có mức ALT thấp hơn Ad6 (p <0,001 theo ANOVA). Điều này phù hợp với mức độ nhiễm Ad6 trong gan cao hơn Ad657 sau khi tiêm i.v. virut biểu hiện luciferaza (Fig. 12). Một động vật Ad657 đã mất sau khi chảy

máu vào ngày 3. Đến 6 ngày, hầu hết động vật Ad6 trở nên hấp hối (Fig. 10A). Ngược lại, 50% động vật Ad657 sống sót quá 2 tuần điều trị.

Để so sánh hoạt tính tiêu diệt khối u của Ad6 và Ad657 chống lại khối u tuyến tiền liệt người DU145, chuột trụi lông được cấy tế bào DU145. Động vật được chia thành các nhóm với kích thước khối u giống nhau trung bình là 200 μL và các nhóm 9 chuột được điều trị một lần bằng đường i.v. với liều lượng 3×10^{10} vp của Ad6 hoặc Ad657 (Fig. 11).

Việc chỉ tiêm i.v. Ad6 và Ad657 này làm giảm kích thước khối u so với động vật đối chứng được tiêm PBS. Khối u nhỏ đi đáng kể ở nhóm Ad6 trong 7 ngày so với nhóm PBS (p<0,05 bằng ANOVA hai yếu tố với thử nghiệm so sánh nhiều lần của Turkey). Khối u trong nhóm Ad657 khác biệt đáng kể so với khối u trong nhóm PBS vào ngày 14 (p<0,01 bằng ANOVA). Cả Ad6 và Ad657 đều duy trì sự khác biệt đáng kể với PBS qua ngày 38 (p<0,0001 bằng ANOVA hai yếu tố). So sánh này kết thúc vào ngày 38 khi động vật đầu tiên trong nhóm PBS bị giết chết do so sánh sau đó sẽ bị sai lệch do thay đổi số lượng động vật. Kích thước khối u trong nhóm Ad6 và Ad657 không khác nhau đáng kể cho đến ngày 38, khi Ad657 có thể tích khối u cao hơn đáng kể (p<0,05) bằng ANOVA hai yếu tố (Fig. 11A). Sự khác nhau giữa kích thước khối u Ad6 và Ad657 kéo dài cho đến ngày 52 (p=0,04 bằng kiểm định T-test), và sau đó khối u khác nhau không đáng kể sau thời điểm này.

Khi sống sót do tất cả các nguyên nhân được đánh giá, cả Ad6 và Ad657 đều kéo dài thời gian sống thêm đáng kể so với động vật điều trị PBS (Fig. 11, p<0,01 và 0,05, tương ứng, bằng phân tích log-rank). Ad6 sống sót do tất cả các nguyên nhân nhiều hơn so với Ad657 (p<0,05). Tuy nhiên, đây là sống sót giả được quy cho tất cả vì ba trong số các động vật Ad657 bị giết theo hướng dẫn của Ủy ban Sử dụng và Chăm sóc Động vật (IACUC) do sự hình thành vết loét trên da thay vì kích thước khối u quá mức. Trong một số trường hợp, vết loét thực sự liên quan đến kiểm soát hiệu quả khối u. Giống như Ad6, Ad657 biểu hiện GFP-luciferaza tạo ra hoạt tính luciferaza đáng kể trong khối u dưới da DU145 xa sau khi chỉ tiêm i.v. (Fig. 12 và Fig. 13). Điều này đưa ra giả thuyết rằng cả Ad6 và Ad657 có thể làm trung gian tiêu diệt khối u trong khối u tuyến tiền liệt sau khi điều chỉ điều trị toàn thân.

Ví dụ này chứng minh rằng Ad657 có thể được sử dụng làm liệu pháp virut tiêu diệt khối u toàn thân hoặc tại chỗ dùng cho ung thư tuyến tiền liệt. Các dữ liệu này

chứng minh hiệu quả bất ngờ của việc chuyển đổi kiểu huyết thanh với các Ad loài C tiêu diệt khối u.

Hoạt tính tiêu diệt khối u của Ad được đánh giá trong tế bào khối u và/hoặc khối u ung thư. Việc chỉ tiêm IV Ad6 so với tế bào khối u phổi A549 được đánh giá (Fig. 28); chỉ tiêm màng bụng (IT) hoặc IV so với khối u tụy được đánh giá (Fig. 29) và chỉ tiêm IV Ad6 so với ung thư thận trong chuột đồng có khả năng miễn dịch được đánh giá (Fig. 30),

Fig. 38 trình bày chụp ảnh luciferaza ở chuột trụi lông. A) 1, 4, 7, 14, 28, và 42 ngày sau khi chỉ tiêm I.V. điều trị Ad6 với khối u tuyến tiền liệt DU145 xa. B) 3, 7, và 19 ngày sau khi chỉ tiêm I.V. Ad5-GFPLUC sao chép vào trong chuột mang khối u tuyến tiền liệt LNCaP.

Có thể kết luận rằng Ad6 đến được tế bào đích ở xa sau khi tiêm IV.

Theo một phương án khác, Ad biểu hiện luciferaza có hoặc không có thư viện peptit tạo ra peptit 12.51 và 12.52 chèn vào trong HVR5 của hexon được ủ trên dòng tế bào được chỉ định, tế bào u sắc tố B16 và tế bào ung thư biểu mô phổi A549, có số lượng hạt virut (vp) được chỉ định và hoạt tính luciferaza được đo lại. Lây nhiễm của tế bào ung thư được cải thiện bởi Ad mang hexon được cải biến peptit được chứng minh (Fig. 31).

Lây nhiễm của tế bào ung thư được cải thiện bởi Ad mang hexon được cải biến peptit.

Ad biểu hiện luciferaza có hoặc không có peptit tạo ra thư viện peptit 12.51 và 12.52 chèn vào trong HVR5 của hexon được ủ trên dòng tế bào ung thư biểu mô tế bào gan, có 10^4 vp của mỗi virut và hoạt tính luciferaza được đo lại. Lây nhiễm của tế bào ung thư được cải thiện bởi Ad mang hexon được cải biến peptit được chứng minh (Fig. 32).

Ví dụ 7. Đáp ứng miễn dịch trực tiếp HIV-1 phân kỳ được tạo ra bằng cách tạo miễn dịch toàn thân và niêm mạc bằng sao chép adenovirut một chu kỳ trong khỉ rezut.

Phần lớn vacxin adenovirut trên cơ sở gen là vectơ Ad khiếm khuyết sao chép (RD-Ad) bị mất gen E1 của chúng để ngăn chúng sao chép và lây nhiễm Ad. Adenovirut phụ thuộc trợ giúp (HD-Ad) bịt mất tất cả các gen Ad và cũng được gọi là khiếm khuyết sao chép. Vacxin Ad bị mất E1 có thể lây nhiễm tế bào, phân phối một bản sao gen kháng nguyên của nó, và biểu hiện chỉ một bản sao duy nhất (ví dụ, "1X") của kháng nguyên này. Chúng an toàn, nhưng không sao chép gen chuyển hoặc biểu

hiện của chúng.

Ngược lại, vacxin Ad có khả năng sao chép (RC-Ad) E1+ có thể lây nhiễm cùng một tế bào, sao chép gen kháng nguyên ADN 10.000 lần, gần như tạo ra nhiều kháng nguyên, và kích thích đáp ứng miễn dịch mạnh hơn so với vectơ bị mất E1. Mặc dù RC-Ad hiệu quả hơn hơn so với RD-Ad, Ad có khả năng sao chép có thể thực sự có nguy cơ gây ra lây nhiễm adenovirut ở người.

Để tận dụng lợi thế của bản sao ADN gen chuyển, nhưng tránh nguy cơ lây nhiễm adenovirut, vectơ Ad một chu kỳ (SC-Ad) bị mất gen dành cho protein muộn quan trọng của virut, pIIIa, được nghiên cứu (Crosby et al., 2014. *Virology* 462-463:158-165; Crosby et al., 2015 *J Virol* 89:669-675; Anguiano-Zarate et al., 2018 *J Infectious Dis* 218:1883-1889; và Crosby et al., 2017 *Genes* (Basel) 8:E79). SC-Ad giữ lại gen E1 của chúng để cho phép nó sao chép hệ gen của nó, nhưng việc vắng mặt pIIIa cản trở việc sản xuất virut lây nhiễm thế hệ con cháu. SC-Ad sao chép hệ gen và gen chuyển của chúng cũng như RC-Ad (lên đến 10.000 lần; Crosby et al., 2014. *Virology* 462-463:158-165). Vectơ RC- và SC-Ad tạo ra nhiều protein gen chuyển hơn so với vectơ RD-Ad. *Virology* 462-463:158-165). SC-Ad tạo ra nhiều đáp ứng miễn dịch mạnh và lâu dài hơn so với hoặc RD-Ad hoặc RC-Ad (Crosby et al., 2015 *J Virol* 89:669-675). Khi so sánh trực diện, SC-Ad tạo ra nhiều kháng thể hơn đáng kể và bảo vệ tốt hơn chống lại virut cúm (Crosby et al., 2017 *J Virol* 91:e00720-16).

Trong nghiên cứu này, khỉ rezut được tạo miễn dịch với SC-Ad biểu hiện trình tự vỏ nhánh B mà thu được từ bệnh nhân HIV-1 trước và sau khi đáp ứng kháng thể của họ trải qua mở rộng phổ trung hòa. Khỉ được tạo miễn dịch bằng cách chỉ tạo miễn dịch toàn thân theo đường IM hoặc bằng cách chỉ tạo miễn dịch trong mũi (IN) niêm mạc. Động vật sau đó được tăng cường bằng cùng hoặc khác đường dùng SC-6 Ad sau đó là protein. Ví dụ này mô tả làm thế nào chiến lược tạo miễn dịch SC-Ad khác nhau tác động đến việc tạo ra liên kết HIV, gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và trung hòa kháng thể cũng như tác động của chúng đến đáp ứng miễn dịch tế bào bao gồm tế bào T trợ giúp có nang (pTfh) trong máu và hạch bạch huyết.

Adenovirut một chu kỳ biểu hiện protein vỏ HIV-1 là gp140.

Trình tự vỏ gp160 nhánh B phát sinh trước (G4) và ngay lập tức đứng trước đỉnh trong việc mở rộng phổ trung hòa kháng thể (F8) từ bệnh nhân HIV VC10014

(Malherbe et al., 2014 *J Virol* 88:12949-12967) được sử dụng làm chất kháng nguyên. Trình tự gp160 G4 và F8 được tối ưu hóa môtip được kết hợp với vào trong SC-Ad trên cơ sở kiểu huyết thanh Ad 6 và 57 của người (xem, ví dụ, Crosby et al., 2014. *Virology* 462-463:158-165; Crosby et al., 2015 *J Virol* 89:669-675; Anguiano-Zarate et al., 2018 *J Infectious Dis* 218:1883-1889; và Nguyen et al., 2018 *Oncolytic Virotherapy* 7:43–51). SC-Ad đối chứng biểu hiện glycoprotein Ebola cũng được sử dụng. Virut được cứu và tinh sạch như được mô tả trong tài liệu nào đó (xem, ví dụ, Crosby et al., 2014. *Virology* 462-463:158-165; Crosby et al., 2015 *J Virol* 89:669-675; và Anguiano-Zarate et al., 2018 *J Infectious Dis* 218:1883-1889).

Gen vỏ F8 được tách dòng từ đối lượng nhiễm HIV nhánh B sử dụng trong vectơ SC-Ad được tối ưu hóa môtip và cải biến bằng cách gây đột biến trực tiếp vị trí để biểu hiện gp140 tam phân không bị phân cắt. Chi tiết về việc biểu hiện, tinh sạch, và việc xác định đặc tính kháng nguyên đã được mô tả trong tài liệu khác (xem, ví dụ, Malherbe et al., 2014 *J Virol* 88:12949-12967).

Khỉ rezut cái trưởng thành (*Macaca mulatta*) có nguồn gốc từ Ấn Độ được nuôi tại Trung tâm Michael Keeling Nghiên cứu và Y học So sánh tại University of Texas MD Anderson Cancer Center, Bastrop TX trong đàn sinh sản không mầm bệnh đặc hiệu. Tất cả các động vật được thực hiện theo các chính sách và thủ tục của Mayo Clinic và University of Texas MD Anderson Cancer Center, các quy định của Đạo luật Phúc lợi Động vật, Chính sách Phúc lợi Động vật PHS, các nguyên tắc của Hướng dẫn NIH về Chăm sóc và Sử dụng Động vật trong Phòng thí nghiệm.

Khỉ được gây mê bằng ketamin và được tạo miễn dịch bằng đường tiêm mũi (IN) hoặc trong cơ (IM) với $2x10^{10}$ hạt virut (vp) của vacxin SC-Ad được chỉ định. Động vật được tăng cường với 50 µg gp140 F8 tái tổ hợp, tam phân, đã tinh sạch kết hợp với tá dược AdjuplexTM bằng đường IM như được mô tả trong tài liệu khác (xem, ví dụ, Malherbe et al., 2014 *J Virol* 88:12949-12967; và Hessell et al., 2016 *J Immunol* 196:3064-3078).

Các mẫu máu tĩnh mạch ngoại vi được thu thập trong EDTA. Trước khi phân lập tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC), huyết tương được phân tách và bảo quản ngay ở -80°C. PBMC được điều chế từ máu trên gradient mật độ Ficoll-Hypaque. Nước bọt và miếng gạc âm đạo được thu lấy cùng với Wek-Cel Spears trong 1 ml PBS

có chứa chất ức chế proteaza, được trộn đều và thu lấy dịch nổi sau ly tâm 2.000 vòng/phút như được mô tả ở tài liệu khác khác (xem, ví dụ, Kozlowski et al., 1997 Infect Immun 65: 1387-1394). Các mẫu được bảo quản đông lạnh ở -80C cho đến lần sử dụng tiếp theo.

Thử nghiệm ELISPOT để phát hiện tế bào sản xuất IFN-γ đặc hiệu kháng nguyên

PBMC mới phân lập được kích thích bằng protein gp140 F8 (1 μg/mL) hoặc Ad6 bất hoạt bởi nhiệt (7,0 $X10^8$ vp/giếng) để xác định số lượng tế bào sản xuất IFN-γ bằng thử nghiệm Điểm miễn dịch liên kết với enzym (ELISPOT) sử dụng phương pháp học được mô tả trong tài liệu khác (xem, ví dụ, Nehete et al., 2017 *Comp Med* 67:67-78; Nehete et al., 2013 *PLoS One* 8:e79836; và Nehete et al., 2017 *J Am Assoc Lab Anim Sci* 56:509-519). Tóm lại, phần ước số của PBMC (10^5/giếng) được gieo vào hai đĩa 96 giếng giống hệt nhau (các đĩa có đáy bằng polyvinyliden difluorit, MAIP S 45, Millipore, Bedford, MA) được phủ sơ bộ với kháng thể IFN-γ sơ cấp và các tế bào bạch huyết được được kích thích hoặc bằng protein Con A, F8 gp140 hoặc Ad6 bị bất hoạt bởi nhiệt. Sau khi ủ trong 30-36 giờ ở 37°C, các tế bào được loại bỏ và các giếng được rửa kỹ bằng PBS và được thực hiện theo quy trình do nhà sản xuất cung cấp. Kết quả được thể hiện bằng tế bào tạo đốm IFN- γ (SFC) trên 10^5 PBMC sau khi trừ hai giếng trùng lặp chỉ có môi trường (đối chứng âm) và được coi là dương tính nếu lớn hơn hai lần nền và lớn hơn 5 SFC/10^5PBMC.

ELISA kháng thể

Hàm lượng kháng thể liên kết vỏ HIV-1 được đo trong các mẫu huyết tương được thu thập tại các khoảng đều nhau chống lại F8 gp140 hoặc SF162 gp140 như được mô tả ở tài liệu khác (Malherbe et al., 2014 *J Virol* 88:12949-12967; và Hessell et al., 2016 *J Immunol* 196:3064-3078).

Thử nghiệm trung hòa

Trung hòa HIV được thực hiện sử dụng thử nghiệm trung hòa TZM-bl như được mô tả ở tài liệu khác khác (Malherbe et al., 2014 *J Virol* 88:12949-12967; và Hessell et al., 2016 *J Immunol* 196:3064-3078). Tất cả các giá trị được tính toán so với các giếng chỉ có virut.

Gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC)

CEM.NKR.CCR5.CD4+-Luc, tế bào đích được lây nhiễm với 50 ng $SHIV_{SF162P3}$ và được nuôi cấy trong 4 ngày như được mô tả trong tài liệu khác (xem, ví dụ, Alpert et al., 2012 *PLoS Pathog* 8:e1002890). Các dung dịch pha loãng liên tiếp hai lần của mỗi mẫu được thêm vào các đích lây nhiễm trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Các tế bào hiệu ứng CD16-KHYG-1 được thêm vào với tỷ lệ tế bào hiệu ứng:đích là 10: 1 và chúng được ủ thêm 8 giờ nữa. Các tế bào được ly giải và hoạt tính luciferaza được đo trên máy đọc đĩa Bio-Tek.

Đếm tế bào theo dòng chảy

Tế bào thu được từ sinh thiết hạch bạch huyết và trực tràng được ủ qua đêm với 0,2 µg gp140 hoặc một mình môi trường cùng với sự có mặt của GolgiPlugTM (BD Biosciences, San Jose, CA, Hoa Kỳ) trong 4 giờ qua. Sau khi nuôi cấy, tế bào được thu hoạch và ủ trên đá trong 45 phút với một tấm gồm kháng thể người phản ứng chéo với các mẫu khỉ rezut. Các tấm này bao gồm các kháng thể được gắn nhãn huỳnh quang sau đây: CD8 (Qdot655), α4β7 (PE) và CXCR5 (PE), tất cả đều thu được từ nguồn chất thử linh trưởng không phải con người; CD69 (BV737, dòng FN50) và FoxP3 (PECy5, dòng: PCH101) thu được từ eBioscience, IL-21 (BV421, dòng: 3A3-N2.1), CD45 (BV786, D058-1283) và CD3 (dòng SP34-2, PE-Cy7-được gắn nhãn) từ BD Bioscience (San Jose, CA); CD4 (Pacific Blue, dòng OKT4) từ ThermoFisher Scientific (Waltham, MA). Độ pha loãng đối với kháng thể được xác định bằng hướng dẫn của nhà sản xuất. Tế bào chết được loại bỏ bằng cách sử dụng kit nhuộm tế bào chết có thể sửa chữa được sống-chết mua từ Invitrogen (Carlsbad, CA). Sau đó, các tế bào được rửa hai lần với PBS chứa 2% FBS và 2 mM EDTA, sau đó được cố định và thấm bằng kit FoxP3 Fix/Perm (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Các chỉ thị nội bào FoxP3 và IL-21 được nhuộm trong dung dịch đệm thẩm thấu. Cả đối chứng bù (OneComp eBeAd, (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) và điều khiển huỳnh quang trừ một (FMO) đều được sử dụng. Tất cả các mẫu được thu thập trên máy phân tích LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences, San Jose, CA) và được phân tích bằng phần mềm FlowJo (FlowJo, LLC, Ashland, Oregon). Xấp xỉ gần 2×10^5 đến 1×10^6 sự kiện được thu thập trên mỗi mẫu.

Thử thách trực tràng với $SHIV_{SF162P3}$

Virut $SHIV_{SF162P3}$ lấy từ R157 thu hoạch lần 3 (3.16.12). Dung dịch gốc có hàm

lượng P27 là 66 ng/ml, hàm lượng Log của ARN là ~9,35, TCID50 trong PBMC khỉ rezut Ấn Độ: 1288/ml, và TCID50 trong tế bào TZM-bl: 4,1 x 10^4/ml. 1 ml dịch pha loãng 1:300 của dung dịch gốc được sử dụng. Cái này bằng 4,3 TCID50 trên PBMC khỉ rezut và 137 TCID50 trên tế bào TZM-bl. Liều lượng này được sử dụng để thử thách trực tràng (IR) hàng tuần. Các mẫu huyết tương được phân tích số lượng bản sao ARN virut SHIV bởi Leidos Biomedical Research, Inc., Frederick National Laboratory. Động vật có bản sao ARN trên 10 được xem là bị lây nhiễm và số lần thử thách cần thiết để lây nhiễm mà động vật được sử dụng làm sự kiện đối với phân tích khả năng sống sót Kaplan-Meier. Khi bị lây nhiễm, động vật không còn được thử thách nữa. Tải lượng virut trong huyết tương được quan sát định kỳ bằng cùng một phương pháp cho đến khi kết thúc nghiên cứu.

Tải lượng virut $SHIV_{SF162P3}$ trong mô

Vào cuối thử nghiệm, PBMC và mô sau khi chết được thu thập. Các mẫu PBMC và mẫu ruột được phân tích ARN virut $SHIV_{SF162P3}$ bằng qPCR. Phần mềm Prism 7 Graphical được sử dụng cho tất cả các phân tích thống kê.

SC-Ad biểu hiện HIV-1 gp160

Trình tự protein vỏ nhánh B (G4 gp160) được nhận biết trước và ngay trước đỉnh trong mở rộng phổ mở rộng trung hòa kháng thể (F8 gp160) từ bệnh nhân HIV VC10014. Trình tự gp160 này được chèn vào trong SC-Ad6 và SC-Ad657 dưới sự kiểm soát mạnh mẽ của vùng gen khởi đầu virut cự bào (Fig. 24A). Ad57 là Ad người loài C gần giống với Ad6 có biến đổi tại vùng siêu biến (HVR) trong hexon của nó và trong gen trốn tránh miễn dịch E3 của nó (Fig. 24B). Hầu hết các kháng thể trung hòa Ad đều hướng đích HVR hexon của Ad (Pichla-Gollon et al., 2007 *J Virol* 81:1680-1689; và Sumida et al., 2005 *J Immunol* 174:7179-7185). Do đó, HVR trong Ad6 được thay thế bằng các HVR từ Ad57 để tạo ra vectơ Ad khảm loài C được gọi là Ad657. Cả SC-Ad6 và SC-Ad657 đều giữ lại toàn bộ các gen Ad chứa E1 và thiếu các gen E3 và pIIIA chức năng (Fig. 24A). Cả hai SC-Ad do đó có thể sao chép hệ gen của chúng để khuếch đại biểu hiện của gp160, nhưng không tạo ra virut Ad con cháu. Cả hai virut này được cứu và được tạo ra trong 293 tế bào và tinh sạch trên gradien CsCl. Khi được sử dụng để lây nhiễm tế bào A549, cả hai vectơ tạo ra gp160 như được xác định bằng thẩm tách miễn dịch.

Vectơ Ad khác nhau được thử nghiệm trước trong khỉ rezut bằng đường trong cơ toàn thân và nhiều đường niêm mạc bao gồm đưa thức ăn bằng ống vào dạ dày, viên nang được phủ tan ở ruột, trong mũi (IN), và trong âm đạo (IVAG). Thử nghiệm SC-Ad-G4 bằng đường IM, IN và IVAG ở động vật nhỏ cho thấy rằng việc mồi bằng đường IVAG tạo ra đáp ứng kháng thể không đáng kể. Ngược lại, việc tạo miễn dịch IN ở cả chuột nhà và chuột đồng tạo ra đáp ứng kháng thể mạnh mẽ. Từ những dữ liệu này và những khó khăn tiềm ẩn trong tiến hành tạo miễn dịch IVAG ở người, đường IN được lựa chọn làm đường tạo miễn dịch niêm mạc ở những nghiên cứu trên khỉ sau này.

Tạo miễn dịch toàn thân và theo đường niêm mạc một lần ở khỉ rezut

$2x10^{10}$ vp của SC-Ad6-G4 Env được sử dụng làm nhóm tiêm chủng vacxin cho 8 khỉ rezut cái bằng cách tạo miễn dịch một lần theo đường IM hoặc IN (Fig. 14). Liều lượng này tương đối thấp, thấp hơn xấp xỉ 7,5 lần so với việc sử dụng vacxin vỏ RC-Ad HIV mới đây phân phối bằng cách tạo miễn dịch theo đường IN và IM kết hợp. Nhóm vectơ đối chứng âm được tạo miễn dịch IN với SC-Ad6 biểu hiện glycoprotein (gp) Ebola. Bốn tuần sau đó, các mẫu huyết tương được phân tích kháng thể liên kết Env chống lại F8 gp140 (Fig. 14). Điều này cho thấy làm lượng liên kết trung bình cao hơn đang kể trong nhóm được tạo miễn dịch theo đường IM sau khi tạo miễn dịch một lần ($p<0,01$ bằng ANOVA). Hàm lượng kháng thể trung hòa (Nab) SF162 cũng được đánh giá tại thời điểm này, nhưng không có ý nghĩa bởi ANOVA đối với các nhóm tạo miễn dịch theo đường riêng rẽ.

Tăng cường theo đường IM so với IN bằng SC-Ad6 tại tuần 4

Đã được báo cáo rằng kháng thể trung hòa kháng adenovirut được tạo ra bởi một lần tạo miễn dịch Ad theo đường IM có thể tránh được bằng cách tạo miễn dịch bằng đường khác (Xiang et al., 2003 *J Virol* 77:10780-10789). Để kiểm tra đường dùng này để có thể tái sử dụng cùng một kiểu huyết thanh Ad trong khỉ, mỗi nhóm được mồi SC-Ad6 được chia thành 2 nhóm 4. Mỗi nhóm được tạo miễn dịch với SC-Ad6 biểu hiện Env F8 thay thế tại tuần 4 theo hoặc đường IM hoặc đường IN. Các mẫu huyết tương được thu vào 3 tuần sau khi tạo miễn dịch cho thấy rằng chuẩn độ liên kết trung điểm ở đọng vật được thúc đẩy mồi bằng nhóm IM-IM, IM-IN, và IN-IM. Không thấy có kháng thể có thể phát hiện nào ở nhóm IN-IN (Fig. 14).

Tạo miễn dịch SC-Ad657 tại tuần 13

Sau đó động vật được tạo miễn dịch bằng chuyển đổi kiểu huyết thanh với SC-Ad657 biểu hiện Env G4 tại tuần 13. Đường tương tự được sử dụng như trong lần tạo miễn dịch trước đó. Hàm lượng tại tuần 15 cho thấy rằng động vật được mồi IM có chuẩn độ liên kết Env được đánh giá là gần 350, nhưng hàm lượng này khác biệt không đáng kể so với đối chứng (Fig. 14). Ngược lại, kháng thể trong nhóm IM-IM-IM cao hơn đáng kể so với cả đối chứng vectơ và nhóm IN-IN-IN ($p < 0,01$). Nhóm IN-IN-IN một lần nữa cho thấy rằng không có kháng thể Env nào thậm chí sau 3 lần tạo miễn dịch.

Tạo miễn dịch bằng Env tam phân tái tổ hợp tại tuần 24

Hầu hết nghiên cứu vacxin HIV làm tăng cường tạo miễn dịch Ad với protein thúc đẩy để khuếch đại đáp ứng kháng thể. Ví dụ, trong nghiên cứu gần đây, vectơ RD-Ad26 được sử dụng hai lần và tăng cường ba lần với protein gp 140 bổ trợ (Barouch et al., 2015 *Science* 349(6245):320-4). Nỗ lực để xác định liệu chiến lược này sẽ tăng cường vacxin SC-Ad, tất cả các nhóm SC-Ad-Env được tăng cường với 50 µg protein gp 140 tam phân F8 tái tổ hợp kết hợp với chất bổ trợ ADJUPLEX™ theo đường IM. Protein tam phân F8 tăng cường chuẩn độ liên kết trung điểm lên hai bậc độ lớn trong tất cả các nhóm (Fig. 14). Việc tạo miễn dịch protein này cũng tăng cường IN-IN-IN đến hàm lượng có thể so sánh với các nhóm khác cho dù không thể phát hiện thấy kháng thể liên kết Env sau lần tạo miễn dịch SC-Ad trước đó.

Liên kết và trung hòa kháng thể trong huyết tương sau lần tăng cường protein thứ hai

Động vật được tăng cường protein thứ hai vào tuần 38. Điều này làm tăng chuẩn độ kháng thể huyết tương liên kết F8 thành gần 10^5 vào tuần 40 và tất cả các nhóm đều khác biệt đáng kể so với đối chứng (Fig. 14). Chuẩn độ kháng thể trung hòa (NAb) chống lại virut SF162 lớp 1A tăng lên 100 đến 10.000 tại tuần 40 (Fig. 15). NAb chống lại virut SS1196 lớp 1B và virut JRCSF lớp 2 tăng lên 100 trong hầu hết các động vật ngoại trừ hai động vật trong nhóm IN-IN-IN mà chuẩn độ của nó tại mức độ nền (Fig. 15).

Hoạt tính ADCC sau lần tăng cường protein thứ hai

Hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) trong huyế tương tuần

40 được kiểm tra chống lại tế bào bị nhiễm $SHIV_{SF162P3}$. Hoạt tính ADCC nhìn chung là lớn hơn ở động vật có ít nhất một lần tạo miễn dịch với SC-Ad niêm mạc (Fig. 16). Tất cả các động vật mà nhận sự tạo miễn dịch qua niêm mạc có % ADCC tối đa cao hơn đáng kể so với động vật đối chứng được tạo miễn dịch với SC-Ad-Ebola ($p < 0,05$, 0,0001, 0,0001 lần lượt đối với IM-IN-IN, IN-IM-IM, và IN-IN-IN). Khi được so sánh bởi chuẩn độ ADCC 50%, chỉ nhóm được mồi SC-Ad theo đường IN có hoạt tính ADCC cao hơn đáng kể so với các đối chứng ($p < 0,05$ và 0,001 bằng ANOVA lần lượt đối với (nhóm IN-IM-IM và IN-IN-IN).

Đáp ứng kháng thể trong nước bọt và nước rửa âm đạo sau khi tăng cường protein thứ hai

Dữ liệu ở trên theo dõi đáp ứng kháng thể trong huyết tương. Mẫu nước bọt và nước rửa âm đạo cũng được thu lại tại tuần 40 và được đo đối với các kháng thể trong các vị trí niêm mạc này. Khi nước bọt và nước rửa âm đạo được đem đi thử nghiệm đối với liên kết env F8 và SF162 bằng ELISA, quan sát thấy các đáp ứng này ở hầu hết các nhóm ngoại trừ nhóm đối chứng SC-Ad-Ebola (Fig. 25).

Dường như có một hiệu ứng vùng trên cá kháng thể niêm mạc này. Trong động vật mà được tạo miễn dịch với SC-Ad chủ yếu bằng đường IN (IM-IN-IN và IN-IN-IN), kháng thể liên kết cao hơn trong nước bọt ở gần vị trí tạo miễn dịch này, nhưng thấp hơn trong vị trí âm đạo xa hơn (Fig. 25). Khi hoạt tính ADCC được đo lại trong các mẫu niêm mạc này, các đáp ứng này khác nhau nhiều (Fig. 17). Mặc dù vậy, hoạt tính ADCC cao hơn được quan sát ở nhóm IN-IN-IN so với động vật đối chứng ($p < 0,05$ bằng ANOVA).

Đáp ứng miễn dịch tế bào hệ thống sau một lần tăng cường protein

PBMC tuần 38 được thử nghiệm đối với tế bào T chống lại Env và chống lại adenovirut bằng ELISPOT trên các mẫu thu thập ngay trước khi tăng cường protein Env F8 lần thứ hai. Tất cả các chuột được tạo miễn dịch Env đều có tế bào tiết IFN-γ đặc hiệu Env trong PBMC của chúng. (Fig. 18A). Hàm lượng SFC IFN-γ đặc hiệu Env thường tăng lên ở động vật được nhận ít nhất một lần tạo miễn dịch qua đường niêm mạc. Tuy nhiên, SFC IFN-γ chỉ cao hơn đáng kể trong nhóm SC-Ad theo đường IN-IN-IN khi chúng được so sánh với động vật đối chứng được tạo miễn dịch bằng SC-Ad Ebola ($p<0,05$ bằng ANOVA). SFC kháng Ad cũng tương đối thấp trong tất cả các

nhóm khi so sánh với SFC kháng Env tại thời điểm này.

Đáp ứng miễn dịch tế bào hoàn thân sau khi tăng cường protein thứ hai

Tại tuần 40,PBMC và tế bào hạch bạch huyết bẹn được đem đi thử nghiệm SFC tiết IFN-γ đặc hiệu Env bằng ELISPOT (Fig. 18B). Lần tăng cường protein này làm tăng SFC tiết IFN-γ đặc hiệu Env trong PBC và hạch bạch huyết đến mức tương tự như trong tất cả động vật được tạo miễn dịch bằng Env.

Vận chuyển tế bào niêm mạc

Phân tích tế bào theo dòng chảy trên các mẫu sinh thiết trực tràng tại tuần 40 cho thấy số lượng tế bào α4β7 CD4 và CD8 tương tự nhau trong các vị trí trực tràng (Fig. 19A). Có xu hướng tăng số lượng trong nhóm được mồi IN nhưng không đạt đến có ý nghĩa. Số lượng tế bào CD69+ CD4+ hoạt hóa trong mô trực tràng là giống nhau giữa các nhóm (Fig. 19B). Tương tự, tế bào FoxP3+ CD4+ trong vị trí niêm mạc này không khác biệt đáng kể (Fig. 19B).

Phân bố tế bào Tfh đặc hiệu kháng nguyên

Tế bào T trợ giúp có nang (Tfh) CXCR5+ IL-21+ CD4+ được đo lại trong các mẫu PBMC và hạch bạch huyết tại tuần 40 (Fig. 20). Động vật được tạo miễn dịch bằng Ad và protein chỉ bằng đường IM có tế bào Tfh ngoại vi (pTfh) đáng kể trong tế bào PBMC cao hơn so với các nhóm khác (Fig. 20). Trong hạch bạch huyết, tế bào Tfh thấp nhất trong nhóm đối chứng và nhóm chỉ IM. Ngược lại, xấp xỉ gần một nửa động vật nhận ít nhất một lần tạo miễn dịch niêm mạc IN có thể phát hiện Tfh trong hạch bạch huyết của chúng sau lần tăng cường protein cuối cùng (Fig. 20).

Thử thách trực tràng với $SHIV_{SF162P3}$

Khỉ đã tạo miễn dịch được thử thách trực tràng với HIV phân lập $SHIV_{SF162P3}$. Bốn động vật đối chứng không được tạo miễn dịch được thêm vào nghiên cứu và mỗi nhóm được thử thách hàng tuần bằng tiêm trực tràng với 1 ml dung dịch gốc thử thách $SHIV_{SF162P3}$ pha loãng 1:3000 được tạo ra bằng NIH. Thử thách này bằng 4.3 $TCID_{50}$ trên PBMC khỉ và 137 $TCID_{50}$ trên tế bào TZM-bl. Sau thử thách lần thứ nhất, 2 động vật trong nhóm đối chứng không được tạo miễn dịch và 2 động vật trong nhóm IM-IM-IM trở thành bị nhiễm (Fig. 21). Một động vật trong mỗi nhóm được tạo miễn dịch theo đường hỗn hợp (IM-IN-IN và IN-IM-IM) trở thành được nhiễm sau một thử

thách. Không có động vật nào trong nhóm IN-IN-IN bị nhiễm sau khi thử thách lần thứ nhất. Tải lượng virut trong huyết tương cho biết rằng tất cả mọi động vật trừ nhóm động vật Eloba đạt được tải lượng virut cao sau 3 lần thử thách (Fig. 22B). Động vật trong nhóm IN-IN-IN chậm trễ trong việc đạt đến tải lượng virut cao này.

Khi tiếp tục thử thách, động vật trong tất cả các nhóm trở nên bị lây nhiễm ngoại trừ một động vật trong nhóm Ebola mà vẫn không bị nhiễm sau 7 lần thử thách. Các alen Trim5α và MHC được kiểm tra hồi cứu (Bảng 2). Phân tích này không tiết lộ các gen bảo vệ công khai trong động vật nhóm Ebola. Hầu hết các động vật nên được phân loại với alen mà có thể giữ chúng bảo vệ vừa phải, nhưng hầu hết các nhóm có ít nhất một động vật có khả năng được bảo vệ cao hơn nhờ alen này. Cần lưu ý rằng 2/4 động vật trong nhóm IM-IM-IM và IN-IN-IN có alen Trim5a và MHC mà có thể dự đoán khả năng bảo vệ bẩm sinh cao hơn chống lại SIVsmm và có lẽ là $SHIV_{SF162P3}$ (Bảng 2).

Bảng 2. Sàng lọc alen gen bảo vệ SIV

Nhóm vacxin	Động vật số	MHC typing	TRIM5alpha	Mức độ bảo vệ virut
Không được tạo miễn dịch	RHJ683	không làm	Cyp A/ TFP	Cao
	RH3-39	không làm	Q/TFP	Vừa phải
	RHJ403	không làm	CypA/Q	Vừa phải
	RHJ791	không làm	Q/TFP	Vừa phải
SC-Ad-Ebov	RH13-005	A11, B01, B17	Q/TFP	Vừa phải
	RH13-087	A08, A11, B01, B17	Q/TFP	Vừa phải
	RH13-043	A08, A11, B17	Q/TFP	Vừa phải
	RH13-135	A08, A11, B17	Q/TFP	Vừa phải
IM-IM-IM	RH13-027	A11, B01, B17	TFP/TFP	Cao
	RH13-031	A08, A11, B01	Cyp A/Q	Vừa phải
	RH13-051	A08, A11, B17	Cyp A/Q	Vừa phải
	RH13-139	A08, A11, B17	TFP/TFP	Cao
IM-IN-IN	RH13-039	A11, B01, B17	Cyp A/Q	Vừa phải
	RH13-045	A08, A11, B01, B17	Q/Q	Nhạy
	RH13-095	A08, A11, B17	Q/TFP	Vừa phải
	RH13-159	A08, A11	Cyp A/TFP	Cao
IN-IM-IM	RH13-013	A11, B17	Cyp A/Q	Vừa phải
	RH13-067	A08, A11, B01, B17	Q/TFP	Vừa phải
	RH13-091	A11, B01, B17	TFP/TFP	Cao
	RH13-121	A08, A11, B17	Q/TFP	Vừa phải
IN-IN-IN	RH13-025	A11, B17	Cyp A/Q	Vừa phải
	RH13-033	A08, A11, B17	Cyp A/ TFP	Cao
	RH13-087	A08, A11, B01, B17	TFP/TFP	Cao
	RH13-125	A08, A11, B17	Q/TFP	Vừa phải

Khi động vật được phân nhóm dựa trên liệu chúng được mồi bằng đường IM hoặc IM với SC-Ad và khả năng sống sót Kaplan-Meier được phân tích, lây nhiễm của tám động vật được mồi theo đường IM song song với lây nhiễm của động vật đối chứng (Fig. 22A). Ngược lại, lây nhiễm bị trì hoãn phần nào đó trong tám con vật được mồi với SC-Ad-Env bằng đường IN niêm mạc.

Tải lượng virut sau khi chết trong mô

Nghiên cứu thử thách được kết thúc 9 tuần sau thử thách lần thứ nhất. PBMC và mô ruột được phân lập, ARN được tinh sạch, và được đánh giá hệ gen virut SHIV (Fig. 22B). PBMC sau khi chết có hàm lượng ARN virut SHIV thay đổi với hàm lượng hơi thấp hơn trong nhóm IN-IN-IN so với trong nhóm IM-IM-IM. ARN virut trung bình trong đại tràng thấp hơn 15 lần trong nhóm IN-IN-IN so với nhóm IM-IM-IM (Fig. 23). Sự khác biệt này không có ý nghĩa bởi ANOVA, nhưng kiểm định T-test hai đuôi cho giá trị p là 0,0079.

Ví dụ này chứng minh rằng vectơ SC-Ad sao chép có thể sử dụng làm nền tảng mạnh mẽ và an toàn để tiêm chủng vacxin chống lại HIV-1 và các bệnh lây nhiễm khác. SC-Ad có thể khuếch đại kháng nguyên và gen xytokin lên đến 10.000 lần trong tế bào người bị nhiễm. đáp ứng miễn dịch được khuếch đại cao hơn những đáp ứng miễn dịch được trung gian bởi vectơ RD-Ad mà hiện đang được thử nghiệm làm vacxin HIV-1 ở người. Vacxin HIV có thể được chuyển sang nền tảng mà khuếch đại gen kháng nguyên HIV bằng cách sử dụng vectơ SC-Ad, ví dụ, vectơ SC-Ad trên cơ sở Ad tái tổ hợp có mức huyết thanh thấp.

Ví dụ 8. Thử nghiệm tế bào lympho T độc (CTL) *in vivo* đối với đáp ứng miễn dịch chống lại kháng nguyên virut viêm gan C (HCV)

Chuột được tạo miễn dịch với Ad657 biểu hiện glycoprotein B (gB) cDNA virut cự bào CMV hoặc kháng nguyên HCV 2.4. Tế bào đồng sinh được tạo xung với peptit HIV và gắn nhãn với cacboxyfluorescein succinimidyl este (CFSE) trước khi tiêm với chuột đã tạo miễn dịch. Quan sát thấy hoạt tính CTL cùng họ chống lại HCV bởi mất các tế bào được gắn nhãn trong HCV, nhưng không thấy với động vật được tạo miễn dịch CMV (Fig. 26).

Ví dụ 9 Ad sao chép có điều kiện (CRAd).

Sơ đồ các đột biến trong Ad6, Ad657 và biến thể của nó bao gồm đột biến trong protein E1 để chuyển hóa virut thành Ad sao chép có điều kiện (CRAd) được trình bày trong Fig. 39 và Fig. 43. Chúng bao gồm dl1101 và/hoặc dl1107 mà lần lượt cản trở liên kết với p300 và pRB.

Fig. 56 trình bày trình tự axit amin đầu N của E1A trong Ad kiểu dại, cũng như biến thể Ad E1A dl1101, E1A dl1107 và E1A dl1101/1107.

Cũng được trình bày là sự thay thế của vùng gen khởi động E1 Ad bằng trình tự ADN vùng gen khởi động đặc hiệu tuyến tiền liệt probasin-E1 nêu trong SEQ ID NO:44 để tạo ra CRAd, Ad-PB (Fig. 55). Vùng gen khởi động probasin phụ thuộc vào androgen, vì vậy sẽ hoạt động trong khối u nhạy androgen như LNCaP, nhưng không hoạt động trong khối u kháng adrogen như DU145.

Tế bào A549 được cho lây nhiễm với biến thể Ad6 hoặc Ad657 chỉ định tại nồng độ chỉ định của virut (vp/tế bào) và khả năng sống sót được đo bằng nhuộm tím tinh thể sau 5 ngày (Fig. 40).

Tiêu diệt tế bào không ung thư bằng Ad sao chép có điều kiện Ad (RD-Ad), Ad6, CRAd6-dl1101/dl1107 hoặc CRAd6-PB. Biến đổi Ad6 và Ad657 để trở thành Ad sao chép có điều kiện (CRAd) đã được chứng minh (Fig. 44).

Tiêu diệt tế bào ung thư bằng Ad5, Ad6, Ad657 có khả năng sao chép và CRAd được chỉ định được trình bày trong Fig. 45. Việc biến đổi Ad6 và Ad657 thành Ad sao chép có điều kiện (CRAd) đã được chứng minh.

Kết quả được trình bày trong Fig. 46 chứng minh việc biến đổi Ad6 và Ad657 thành Ad sao chép có điều kiện (CRAd) trong tế bào ung thư vú.

Kết quả được trình bày trong Fig. 47 chứng minh việc biến đổi Ad6 và Ad657 thành Ad sao chép có điều kiện (CRAd) trong tế bào ung thư tuyến tiêu liệt và tế bào ung thư phổi.

Tác động *in vivo* của Ad6 có khả năng sao chép hoặc CRAd được chỉ định lên sự sinh trưởng của DU145 ở chuột. Fig. 48 chứng minh việc biến đổi Ad6 và Ad657 thành Ad sao chép có điều kiện (CRAd) *in vivo* sau khi chỉ tiêm tĩnh mạch trong chuột mang khối u tuyến tiền liệt người.

Tác động *in vivo* của Ad6 có khả năng sao chép hoặc CRAd được chỉ định lên sự sinh trưởng của DU145 ở chuột. Fig. 49 chứng minh việc biến đổi Ad6 và Ad657 thành Ad sao chép có điều kiện (CRAd) *in vivo* sau khi chỉ tiêm tĩnh mạch trong chuột

mang khối u tuyến tiền liệt người.

Fig. 51 chứng minh rằng việc biến đổi của Ad657 bằng sợi ngắn hơn từ AdC68 tinh tinh làm giảm hiệu quả.

Theo một phương án, virut Ad 6/56/6 có HVR 1 và 7 từ Ad6 và HVR 2-6 từ Ad567. Fig. 52 chứng minh rằng virut Ad 6/56/6 tiêu diệt tế bào ung thư phổi người có và không có biến đổi CRAd.

Tiêu diệt tế bào ung thư bằng biến thể Ad bao gồm đột biến trong protein E3. Chuột đồng Syri có đủ khả năng miễn dịch được cấy khối u ung thư thận HaK dưới da. Khi khối u đạt 200 µl thể tích, chúng được tiêm một lần duy nhất theo đường tĩnh mạch với virut Ad6 chỉ định được tạo cấu trúc có hoặc không có E3 (DE3) và có hoặc không có NHS-PEGyl ngẫu nhiên. Kích thước khối u được đo theo thời gian. Dữ liệu cho thấy rằng việc cắt tất cả các gen E3 khiến cho virut tiêu diệt khối u kém hiệu quả hơn (Ad6-deltaE3-Luc so với Ad6-Luc) (Fig. 58).

Protein sợi Ad là phức hợp gồm ba tiểu phần giống nhau làm trung gian cho bước gắn kết ban đầu. Protein sợi Ad6 bẩm sinh chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:60 và liên kết với CAR.

Theo khía cạnh tiếp theo của sáng chế, Ad tái tổ hợp được biến đổi sợi có protein sợi khác nhau không giống với Ad mẹ được tạo ra. Ad tái tổ hợp bao gồm CRAd, chứa protein capsit từ các chủng Ad khác nhau được tạo ra, ví dụ, Ad tái tổ hợp chứa polypeptit sợi Ad35 khác loại hoặc polypeptit sợi C68 tinh tinh, +/- protein K7 (Fig. 62-69).

Ad khảm, thể khảm sợi AdF35, có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:61 và ngắn hơn so với protein sợi Ad5 và Ad6 và hướng đích lại virut đến CD46.

Ad tái tổ hợp được biến đổi sợi, bao gồm sợi K7 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:62, hướng đích virut đến heparin sulfat proteoglycan và điện tích âm trên tế bào.

Ad khảm, tái tổ hợp, sợi 6/FC68 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:63, là Ad khảm có protein sợi từ adenovirut tinh tinh C68. Protein sợi này ngắn hơn so với protein sợi Ad5 hoặc Ad6 và liên kết với CAR.

Ad khảm, tái tổ hợp, sợi 6/FC68-K7 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:64, là Ad khảm có protein sợi từ adenovirut tinh tinh C68. Protein sợi này ngắn hơn so với protein sợi Ad5 hoặc Ad6. Sợi 6/FC68-K7 liên kết với CAR và được hướng đích lại

tới heparin sulfat và điện tích âm.

Ad khảm, tái tổ hợp, sợi 6/FC68-HI-K7 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:65, là Ad khảm có protein sợi từ adenovirut tinh tinh C68. Protein sợi này ngắn hơn so với protein sợi Ad5 hoặc Ad6. Sợi 6/FC68-HI-K7 liên kết với CAR và được hướng đích lại tới heparin sulfat và điện tích âm.

Ví dụ 10 Chuyển đổi kiểu huyết thanh của Adenovirut

Fig. 41 là sơ đồ trình bày các đợt trị liệu Ad. Theo phương án chuyển đổi kiểu huyết thanh với Ad khác nhau trên thời gian điều trị được lấy làm ví dụ (Fig. 41A).

Hướng đích khối u tuyến tiền liệt sau khi chuyển đổi kiểu huyết thanh của adenovirut tiêu diệt khối u

Chuột mang khối u tuyến tiền liệt DU145 trên sườn của chúng được điều trị chỉ bằng tiêm tĩnh mạch (IV) với Ad657 hoặc CRAd657. Chuột này được điều trị lần thứ hai với virut tiêu diệt khối u Ad6 thay thế hoặc Ad6-F35 biểu hiện GFPLuciferaza và hoạt tính luciferaza được đo lại bằng cách chụp ảnh. Ad6 có hexon Ad6 và sợi hướng đích CAR. Ad6-F35 có hexon Ad6 và sợi Ad35 hướng đích CD46. Fig. 42 chứng minh khả năng trong việc tiêu diệt khối u chuyển đổi kiểu huyết thanh với virut hướng đích khối u với lây nhiễm không hướng đích thấp hơn trong gan.

Trong ví dụ khác về việc chuyển đổi kiểu huyết thanh, chuột mang khối u tuyến tiền liệt LNCaP trên sườn của chúng được điều trị bằng chỉ tiêm tĩnh mạch (IV) với 3e10 hạt virut (vp) của Ad657 hoặc CRAd657. Chuột này được điều trị lần thứ hai vào 5 tháng sau bằng 3e10 vp của virut tiêu diệt khối u Ad6/57/6 thay thế biểu hiện GFPLuciferaza và các biến thể sợi K7 (với 7 lysin được thêm vào), F35 (với sợi Ad35), hoặc KKTK-C68 (sợi C68 tinh tinh được dung hợp sau miền linh hoạt Ad6 KKTK. Virut KKTK-C68 cũng có gen E4 34K được tối ưu hóa mã bộ ba thêm vào để tăng cường khả năng sản xuất virut. Hoạt tính luciferaza được đo bằng cách chụp ảnh 7 ngày sau đó. Tất cả Ad6/57/6 có hexon với HVR1 và 7 từ Ad6 và HVR 2-6 từ Ad57. Ad6/57/6 và KKTK-C68 có sợi hướng đích CAR. Ad6/57/6-F35 có sợi Ad35 hướng đích CD46. K7 tăng cường liên kết với điện tích âm trên tế bào chứa liên kết heparin sulfat proteoglycan. Fig. 70 chứng minh khả năng trong việc tiêu diệt khối u chuyển đổi kiểu huyết thanh với virut hướng đích khối u với lây nhiễm không hướng đích thấp hơn trong gan.

Chuyển đổi kiểu huyết thanh trong quá trình tiêm chủng vacxin cho linh trưởng không phải con người

Trong Fig. 14 đến 25, khỉ rezut được tạo miễn dịch bằng Ad6 sao chép một chu kỳ biểu hiện vỏ HIV và sau đó được tăng cường bằng cách chuyển đổi kiểu huyết thanh với Ad657 một chu kỳ biểu hiện vỏ HIV. Sau khi tạo miễn dịch, mỗi động vật được tăng cường với potein vỏ. Mỗi hình vẽ thể hiện việc tạo ra kháng thể đáp ứng hoặc đáp ứng miễn dịch tế bào và động vật làm cách nào để đẩy lùi thử thách trực tràng với virut $SHIV_{SF162P3}$. Fig. 14 ghi lại giá trị của việc chuyển đổi kiểu huyết thanh khi thay đổi thành Ad657 tạo ra sự gia tăng rõ rệt trong đáp ứng kháng thể.

Ví dụ 11 Vacxin ung thư có hoạt tính tiêu diệt khối u

Chuột BALB/c được tạo miễn dịch với 10^{10} hạt virut của CRAd-657-dl1101/1107-FolR với E3 nguyên bản và biểu hiện thụ thể folat alpha người hoặc với PBS theo đường trong cơ. Huyết thanh được thu lấy vào 2 tuần sau một lần tạo miễn dịch và được phân tích kháng thể thụ thể kháng folat alpha bằng ELISA sử dụng kháng thể kháng IgM để phát hiện (tất cả các kháng thể là IgG tại thời điểm sớm nhất sau khi tạo miễn dịch). Dữ liệu cho thấy rằng việc tạo ra kháng thể chống lại thụ thể folat alpha kháng nguyên ung thư đã biết bằng CRAd này. p – 0,07 bằng kiểm định T test (Fig. 53).

Ví dụ 12 Tác động của gen trốn tránh miễn dịch E3 đến hoạt tính tiêu diệt khối u

Fig. 57 trình bày sơ lược về gen trốn tránh miễn dịch D3 trong Ad. E3 19K bảo vệ tế bào khỏi tế bào T và tế bào NK. Protein RID bảo vệ tế bào bị nhiễm khỏi phối tử gây chết (FAS, TRAIL, TNFR, và EGFR). 14.7K ức chế hoạt hóa về bản chất của quá trình chết tế bào theo chương trình trong tế bào bị nhiễm. Ad loài C cũng biểu hiện 11.6 K đã biết như là protein gây chết adenovirut (ADP). Biểu hiện quá mức ADP làm chết tế bào nhanh hơn, nhưng về tổng thể chết tế bào là như nhau. Các loài 49K liên kết với CD46 trên tế bào T và tế bào NK dẫn đến giảm điều hòa các tế bào này và tiêu diệt tế bào kém hiệu quả hơn ở các tế bào thiếu hụt MHC nhóm I bằng tế bào NK.

Fig. 58 chứng minh rằng việc mất một phần gen

Phương án khác

Cần phải hiểu rằng mặc dù sáng chế đã được mô tả cùng với phần mô tả chi tiết

của nó, phần mô tả ở trên chỉ nhằm minh họa và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế, cái được xác định bởi phạm vi của các yêu cầu bảo hộ. Các khía cạnh, ưu điểm, và biến đổi nằm trong phạm vi của yêu cầu bảo hộ sau đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Adenovirut (Ad) tái tổ hợp bao gồm (a) polypeptit capsit Ad từ chủng Ad6 của người và (b) ít nhất hai polypeptit vùng siêu biến (HVR) hexon từ chủng Ad57 của người, Ad tái tổ hợp đã nêu còn chứa axit nucleic mã hóa cho 4-1BBL, CD40L hoặc tổ hợp của 4-1BBL và CD40L.

2. Adenovirut (Ad) tái tổ hợp bao gồm (a) polypeptit capsit Ad từ chủng Ad6 của người và (b) ít nhất hai polypeptit vùng siêu biến (HVR) hexon từ chủng Ad57 của người, trong đó Ad tái tổ hợp là Ad sao chép có điều kiện (CRAd), CRAd đã nêu còn chứa axit nucleic mã hóa cho 4-1BBL, CD40L hoặc tổ hợp của 4-1BBL và CD40L.

3. Ad tái tổ hợp theo các điểm 1 đến 2, trong đó polypeptit hexon capsit của chủng Ad6 của người bao gồm polypeptit vùng siêu biến (HVR) hexon capsit 1 đến 7 từ chủng Ad57 của người.

4. Ad tái tổ hợp theo các điểm 1 đến 2, trong đó polypeptit hexon capsit của chủng Ad6 của người bao gồm polypeptit vùng siêu biến (HVR) hexon capsit 2 đến 6 từ chủng Ad57 của người.

5. Ad tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, còn chứa polypeptit capsit từ một hoặc nhiều chủng Ad khác nhau, trong đó polypeptit capsit là polypetit sợi khác với polypeptit sợi của chủng Ad6 của người và Ad57 của người.

6. Ad tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, còn chứa đột biến thế axit amin và/hoặc cải biến axit amin, trong đó đột biến thế axit amin là thành xystein trong polypeptit HVR và cải biến axit amin được chọn từ PEG hóa và BAP hóa của xystein trong polypeptit HVR.

7. Ad tái tổ hợp theo điểm 2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44 hoặc SEQ ID NO:45.

8. Adenovirut (Ad) tái tổ hợp bao gồm (a) hệ gen Ad mã hóa cho polypeptit hexon từ chủng Ad6 của người và (b) axit nucleic mã hóa cho ít nhất hai polypeptit vùng siêu biến (HVR) hexon từ chủng Ad57 của người, Ad tái tổ hợp đã nêu còn chứa axit nucleic mã hóa cho 4-1BBL, CD40L hoặc tổ hợp của 4-1BBL và CD40L.

9. Adenovirut (Ad) tái tổ hợp bao gồm (a) hệ gen Ad mã hóa cho polypeptit hexon từ chủng Ad6 của người và (b) axit nucleic mã hóa cho ít nhất hai polypeptit vùng siêu biến (HVR) hexon từ chủng Ad57 của người, trong đó Ad tái tổ hợp là Ad sao chép có điều kiện (CRAd), CRAd đã nêu còn chứa axit nucleic mã hóa cho 4-1BBL, CD40L hoặc tổ hợp của 4-1BBL và CD40L.

10. Ad tái tổ hợp theo các điểm 8 đến 9, trong đó polypeptit hexon capsit của chủng Ad6 của người bao gồm polypeptit vùng siêu biến (HVR) hexon capsit 1 đến 7 từ chủng Ad57 của người.

11. Ad tái tổ hợp theo các điểm 8 đến 9, trong đó polypeptit hexon capsit của chủng Ad6 của người bao gồm polypeptit vùng siêu biến (HVR) hexon capsit 2 đến 6 từ chủng Ad57 của người.

12. Ad tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 10, còn chứa axit nucleic mã hóa cho polypeptit capsit từ một hoặc nhiều chủng Ad khác nhau, trong đó polypeptit capsit là polypeptit sợi khác với polypeptit sợi của chủng Ad6 của người và Ad57 của người.

13. Ad tái tổ hợp theo điểm 9, được cải biến để chứa đột biến mất dl1101 trong axit nuclecic mã hóa cho polypeptit E1, được cải biến để chứa đột biến mất dl1107 trong axit nucleic mã hóa cho polypeptit E1, hoặc được cải biến để chứa đột biến mất dl1101 và đột biến mất dl1107 trong axit nucleic mã hóa cho polypeptit E1.

14. Ad tái tổ hợp theo điểm 13 chứa axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44 hoặc SEQ ID NO:45.

15. Dược phẩm chứa adenovirut (Ad) tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, để sử dụng trong phương pháp điều trị cho động vật có vú mắc bệnh ung thư, trong đó phương pháp đã nêu bao gồm bước cho động vật có vú đã nêu dùng dược phẩm.

16. Dược phẩm chứa adenovirut (Ad) tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, để điều trị bệnh ung thư.

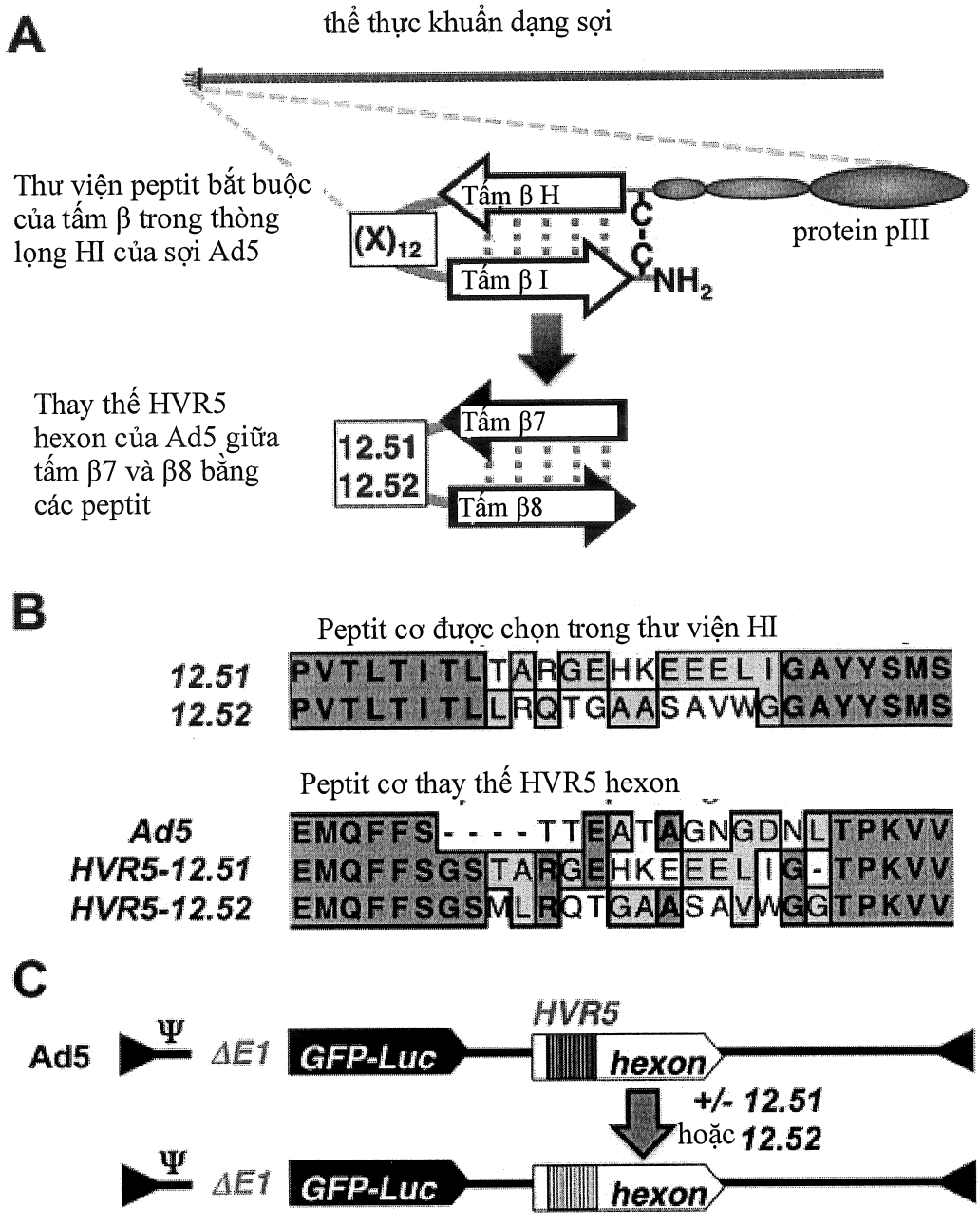

A
thể thực khuẩn dạng sợi
Thư viện peptit bắt buộc của tấm β trong thòng lọng HI của sợi Ad5
Tấm β H
(X)12
Tấm β I
protein pIII
NH2
Thay thế HVR5 hexon của Ad5 giữa tấm β7 và β8 bằng các peptit
12.51
12.52
Tấm β7
Tấm β8
B
Peptit cơ được chọn trong thư viện HI
12.51 PVTLTITLTARGEHKEEELIGAYYSMS
12.52 PVTLTITLLRQTGAASAVWGGAYYSMS
Peptit cơ thay thế HVR5 hexon
Ad5 EMQFFS----TTEATAGNGDNLTPKVV
HVR5-12.51 EMQFFSGSTARGEHKEEELIG-TPKVV
HVR5-12.52 EMQFFSGSMLRQTGAASAVWGGTPKVV
C
Ad5
Ψ
ΔE1
GFP-Luc
HVR5
hexon
+/- 12.51
hoặc 12.52
Ψ
ΔE1
GFP-Luc
hexon

FIG. 1

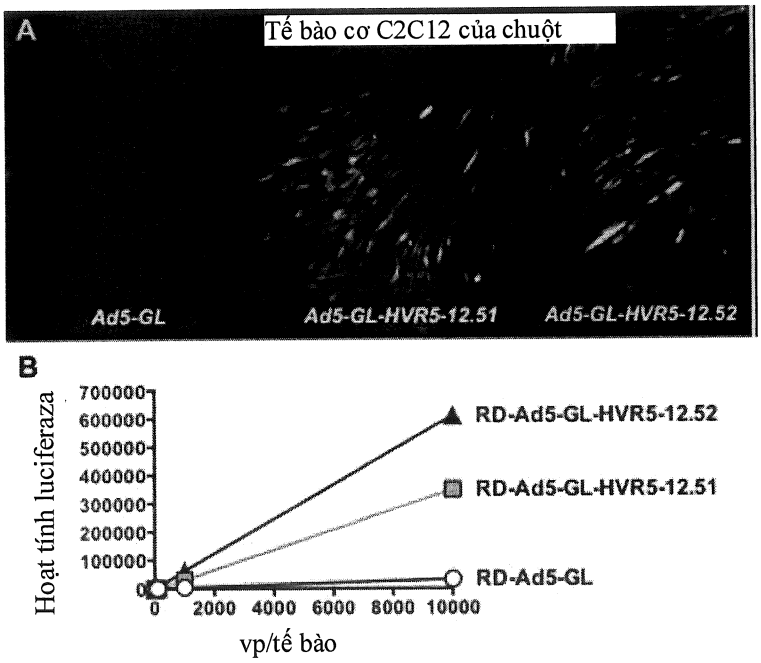

A
Tế bào cơ C2C12 của chuột
Ad5-GL
Ad5-GL-HVR5-12.51
Ad5-GL-HVR5-12.52
B
Hoạt tính luciferaza
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
0
2000
4000
6000
8000
10000
vp/tế bào
RD-Ad5-GL-HVR5-12.52
RD-Ad5-GL-HVR5-12.51
RD-Ad5-GL

FIG. 2

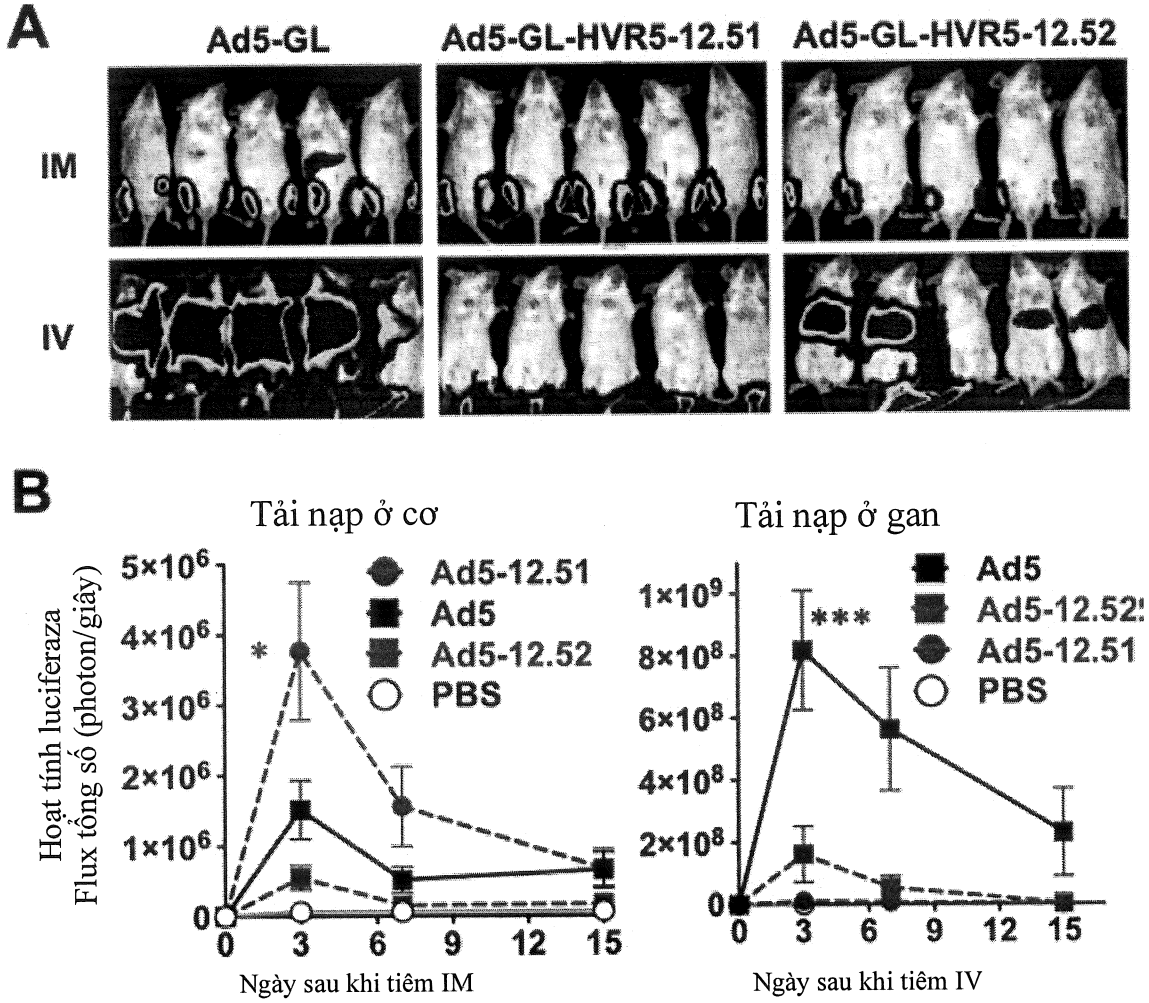

A
Ad5-GL
Ad5-GL-HVR5-12.51
Ad5-GL-HVR5-12.52
IM
IV
B
Tải nạp ở cơ
Tải nạp ở gan
Hoạt tính luciferaza
Flux tổng số (photon/giây)
Ad5-12.51
Ad5
Ad5-12.52
PBS
Ngày sau khi tiêm IM
Ngày sau khi tiêm IV

FIG. 3

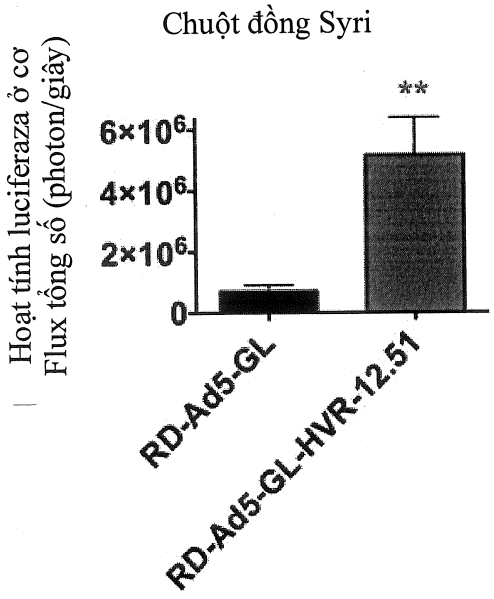

Chuột đồng Syri
Hoạt tính luciferaza ở cơ
Flux tổng số (photon/giây)
**
6×10^6
4×10^6
2×10^6
0
RD-Ad5-GL
RD-Ad5-GL-HVR-12.51

FIG. 4

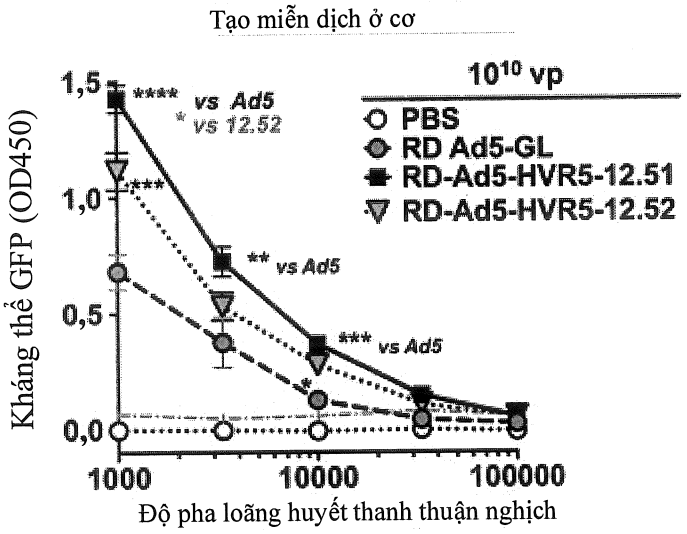

Tạo miễn dịch ở cơ
Kháng thể GFP (OD450)
1,5
1,0
0,5
0,0
1000
10000
100000
Độ pha loãng huyết thanh thuận nghịch
10^10 vp
PBS
RD Ad5-GL
RD-Ad5-HVR5-12.51
RD-Ad5-HVR5-12.52
**** vs Ad5
* vs 12.52
*** vs Ad5
** vs Ad5
*** vs Ad5
*

FIG. 5

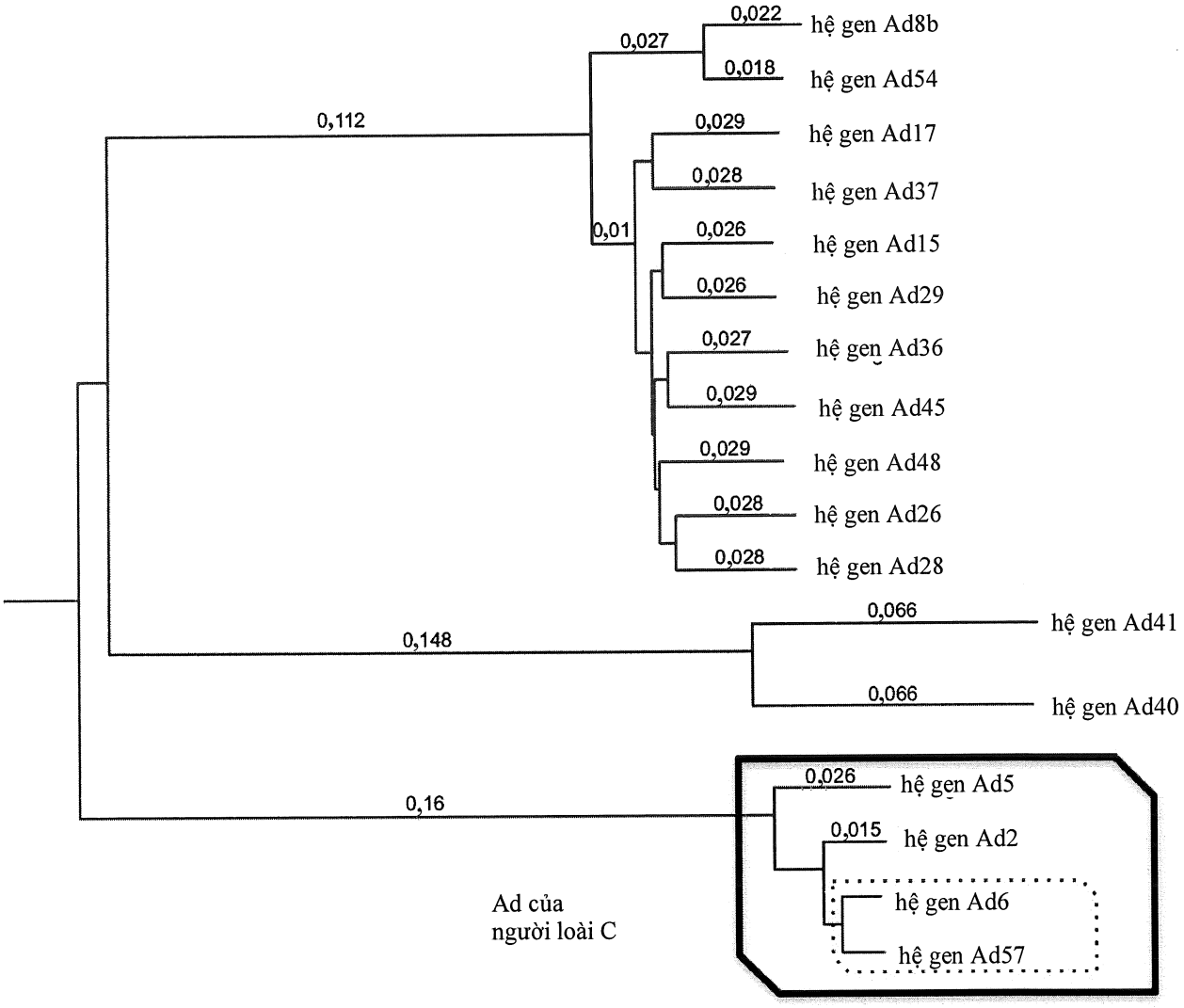

0,022
hệ gen Ad8b
0,027
0,018
hệ gen Ad54
0,112
0,029
hệ gen Ad17
0,028
hệ gen Ad37
0,01
0,026
hệ gen Ad15
0,026
hệ gen Ad29
0,027
hệ gen Ad36
0,029
hệ gen Ad45
0,029
hệ gen Ad48
0,028
hệ gen Ad26
0,028
hệ gen Ad28
0,066
hệ gen Ad41
0,148
0,066
hệ gen Ad40
0,026
hệ gen Ad5
0,16
0,015
hệ gen Ad2
hệ gen Ad6
hệ gen Ad57
Ad của
người loài C

FIG. 6

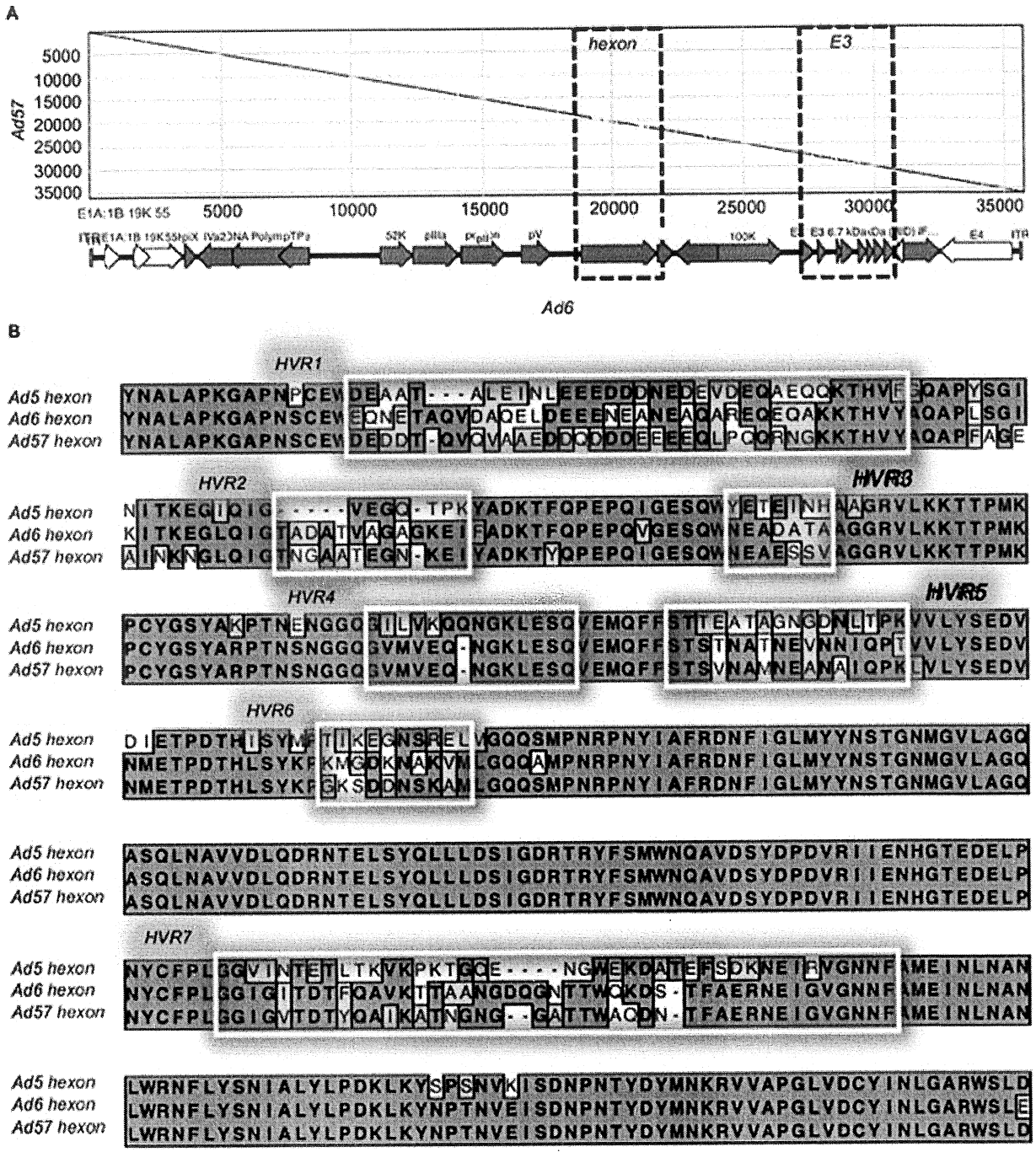

A
hexon
E3
Ad57
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
E1A 1B 19K 55
ITR
E4
Ad6
B
HVR1
HVR2
HVR3
HVR4
HVR5
HVR6
HVR7
Ad5 hexon
Ad6 hexon
Ad57 hexon

FIG. 7

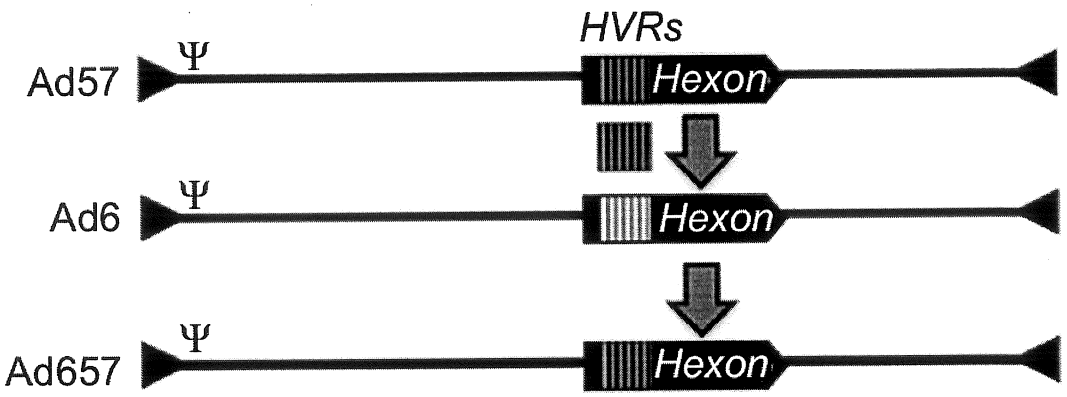


FIG. 8

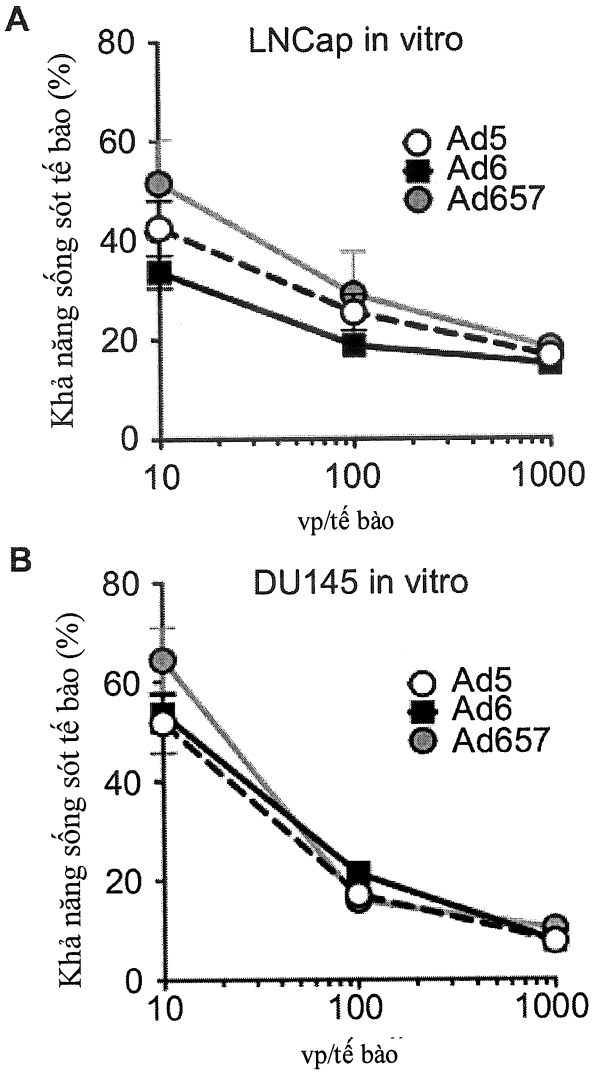

A
LNCap in vitro
Khả năng sống sót tế bào (%)
80
60
40
20
0
Ad5
Ad6
Ad657
10
100
1000
vp/tế bào
B
DU145 in vitro
Khả năng sống sót tế bào (%)
80
60
40
20
0
Ad5
Ad6
Ad657
10
100
1000
vp/tế bào

FIG. 9

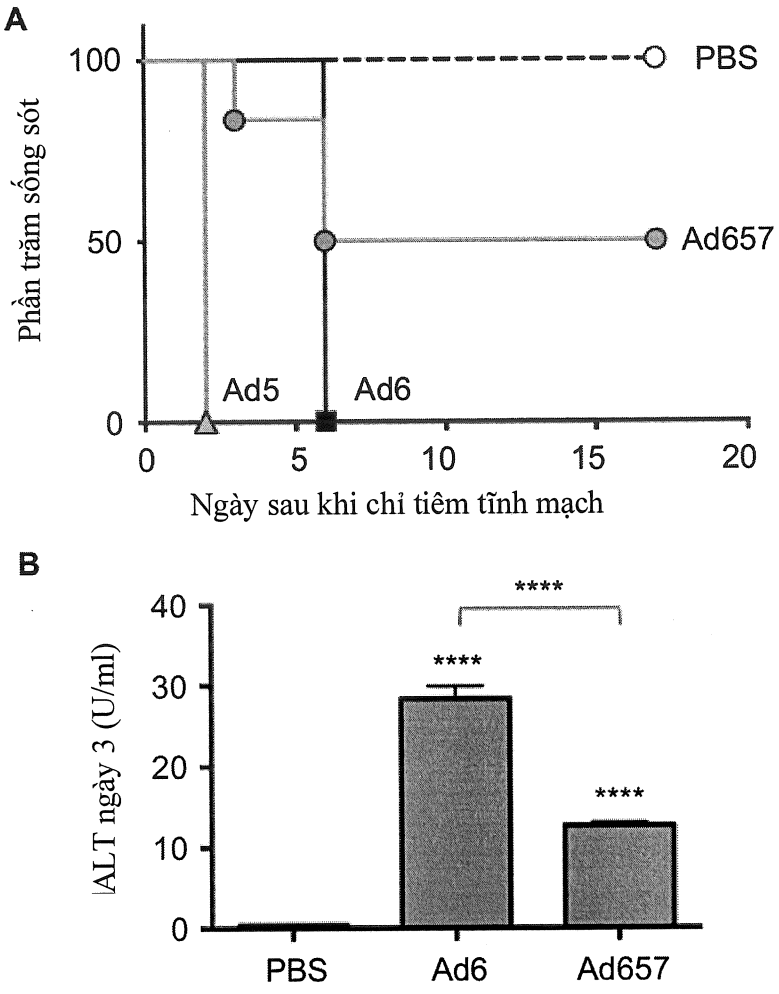

A
100
50
0
Phần trăm sống sót
PBS
Ad657
Ad5
Ad6
0
5
10
15
20
Ngày sau khi chỉ tiêm tĩnh mạch
B
40
30
20
10
0
ALT ngày 3 (U/ml)
****
****
****
PBS
Ad6
Ad657

FIG. 10

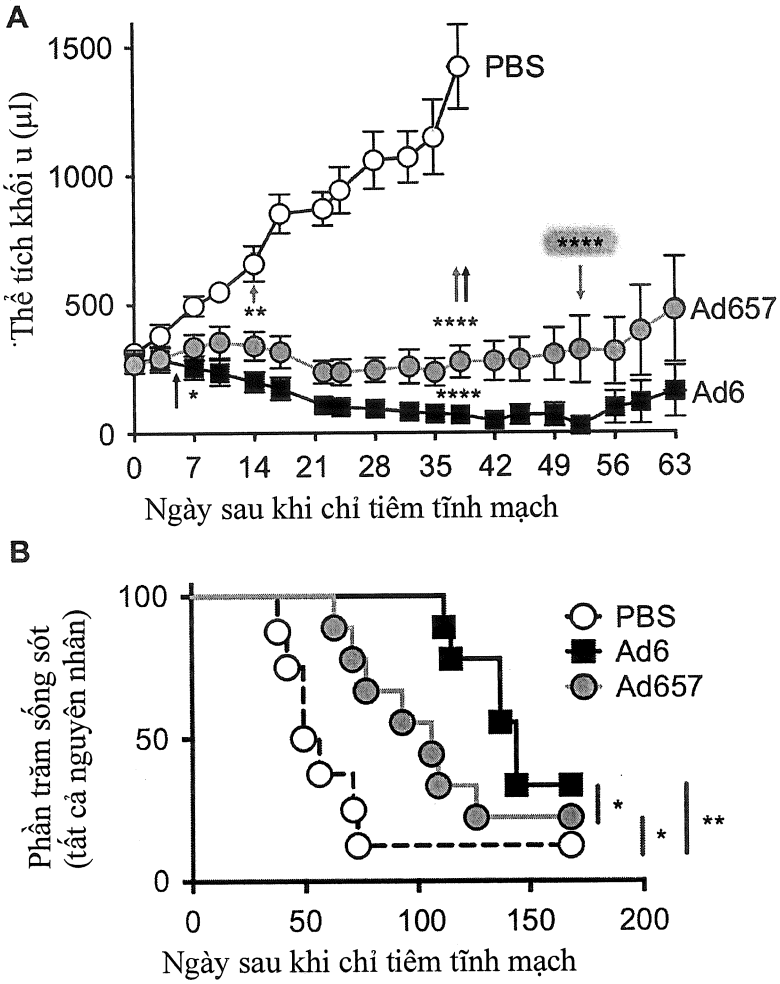

A
1500
1000
500
0
Thể tích khối u (µl)
PBS
Ad657
Ad6
**
****
****
****
*
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63
Ngày sau khi chỉ tiêm tĩnh mạch
B
100
50
0
Phần trăm sống sót (tất cả nguyên nhân)
PBS
Ad6
Ad657
*
*
**
0 50 100 150 200
Ngày sau khi chỉ tiêm tĩnh mạch

FIG. 11

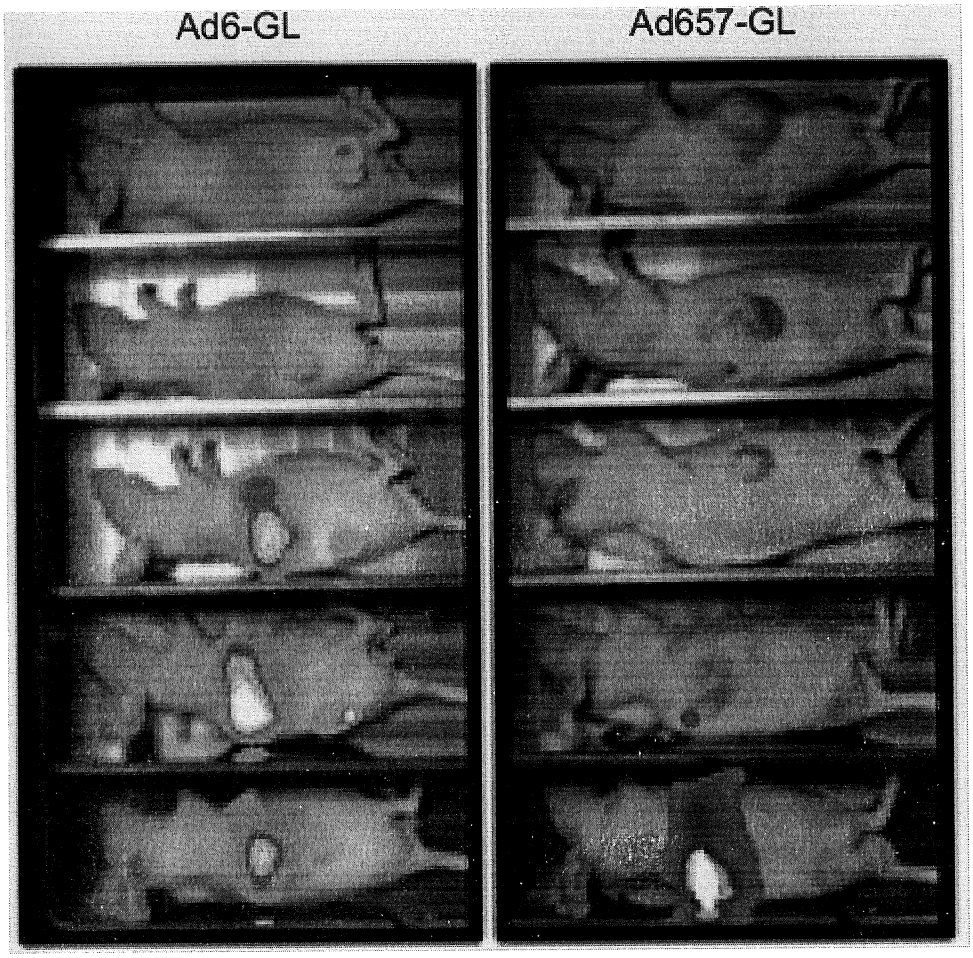


FIG. 12

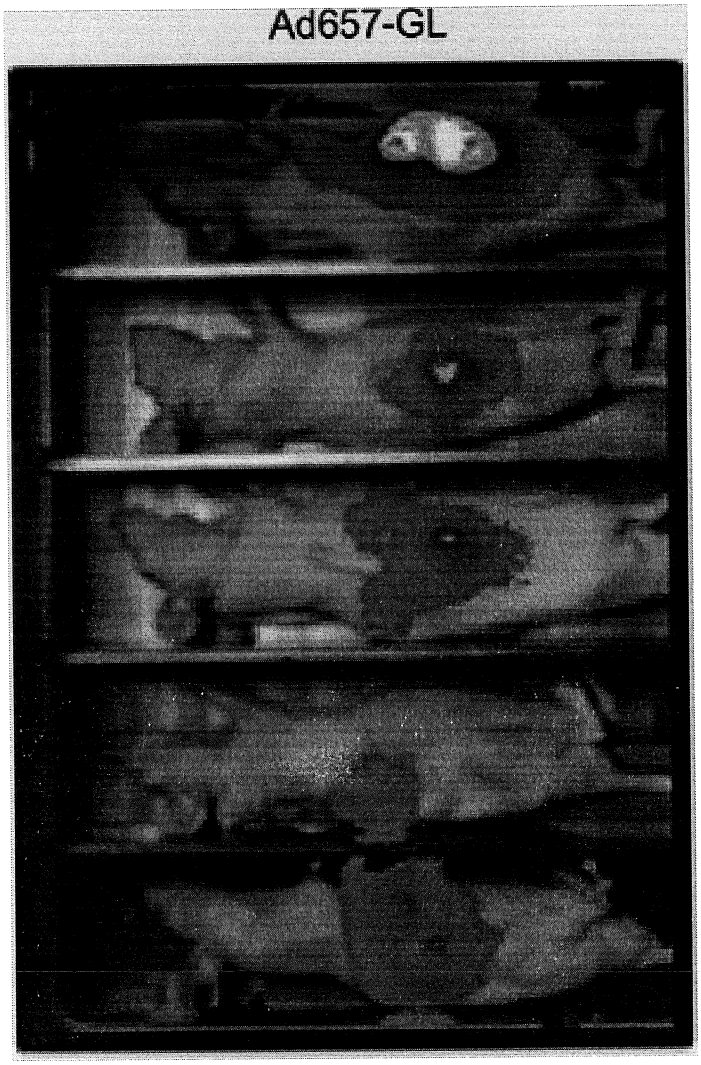


FIG. 13

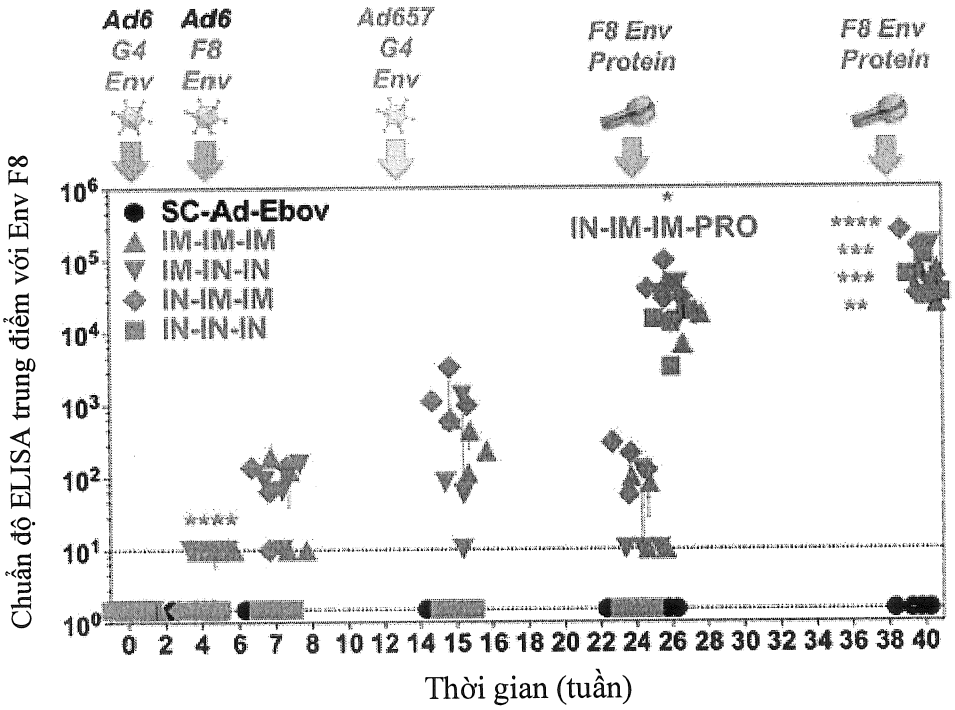

Ad6 G4 Env
Ad6 F8 Env
Ad657 G4 Env
F8 Env Protein
F8 Env Protein
SC-Ad-Ebov
IM-IM-IM
IM-IN-IN
IN-IM-IM
IN-IN-IN
IN-IM-IM-PRO
Chuẩn độ ELISA trung điểm với Env F8
Thời gian (tuần)

FIG. 14

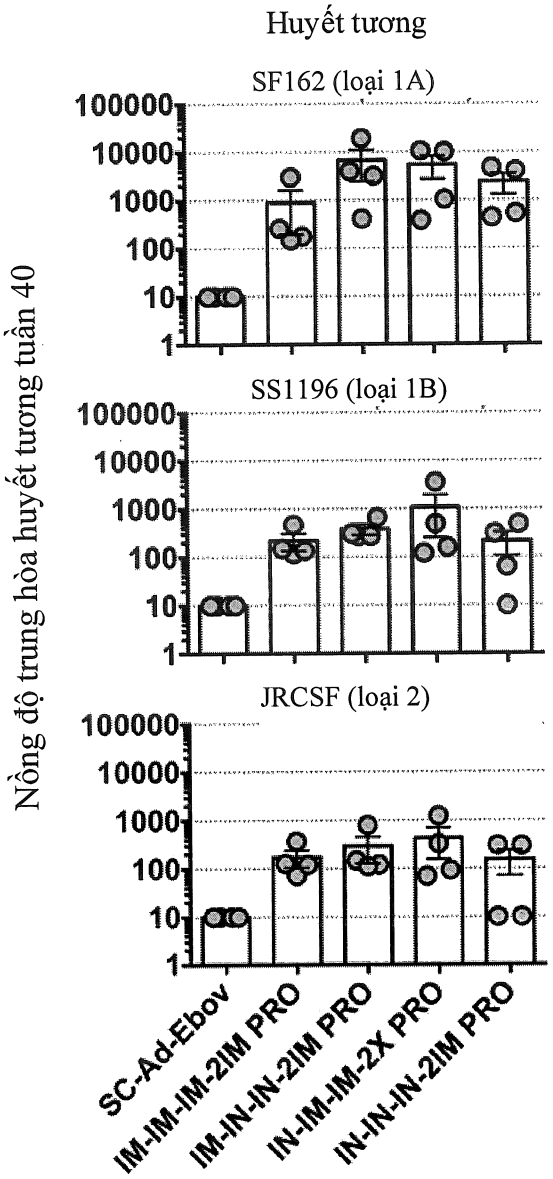

Huyết tương
SF162 (loại 1A)
SS1196 (loại 1B)
JRCSF (loại 2)
Nồng độ trung hòa huyết tương tuần 40
100000
10000
1000
100
10
1
SC-Ad-Ebov
IM-IM-IM-2IM PRO
IM-IN-IN-2IM PRO
IN-IM-IM-2X PRO
IN-IN-IN-2IM PRO

FIG. 15

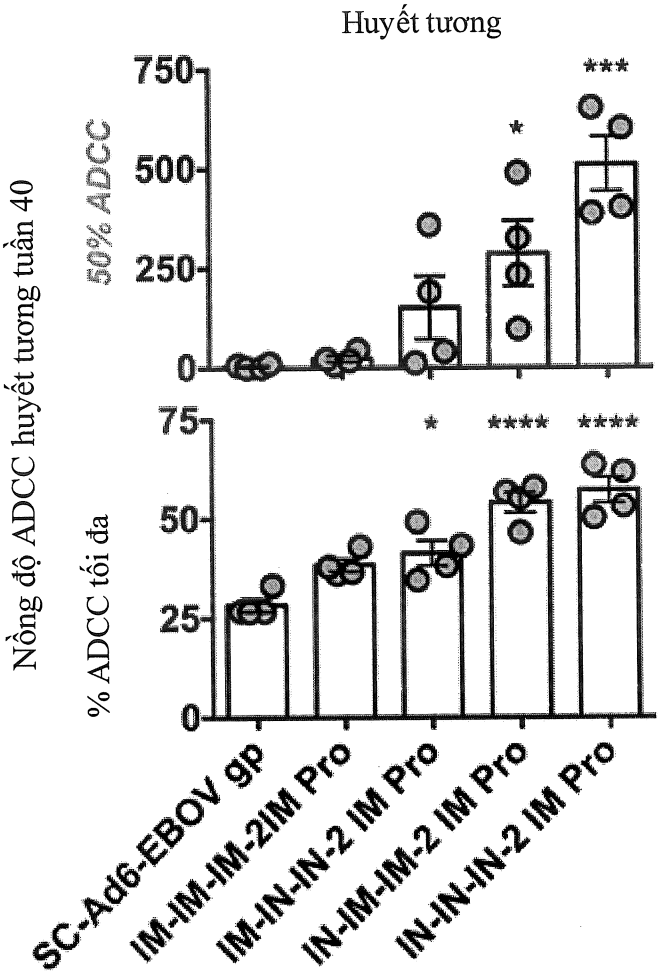

Huyết tương
Nồng độ ADCC huyết tương tuần 40
50% ADCC
750
500
250
0
***
*
% ADCC tối đa
75
50
25
0
*
****
****
SC-Ad6-EBOV gp
IM-IM-IM-2IM Pro
IM-IN-IN-2 IM Pro
IN-IM-IM-2 IM Pro
IN-IN-IN-2 IM Pro

FIG. 16

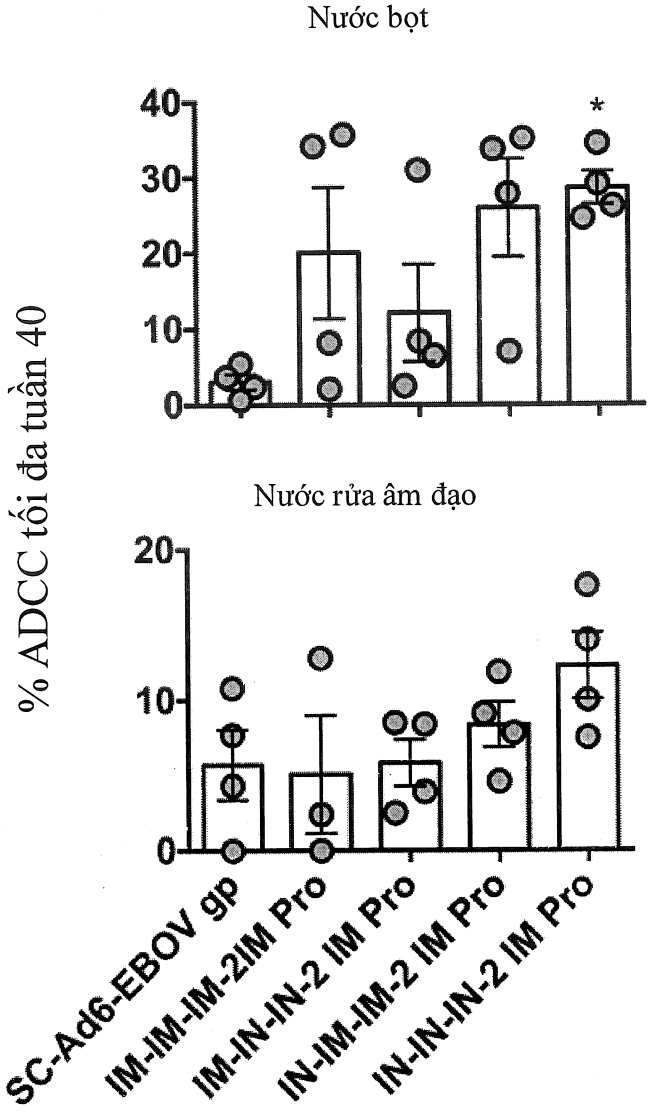

Nước bọt
40
30
20
10
0
*
Nước rửa âm đạo
20
10
0
% ADCC tối đa tuần 40
SC-Ad6-EBOV gp
IM-IM-IM-2IM Pro
IM-IN-IN-2 IM Pro
IN-IM-IM-2 IM Pro
IN-IN-IN-2 IM Pro

FIG. 17

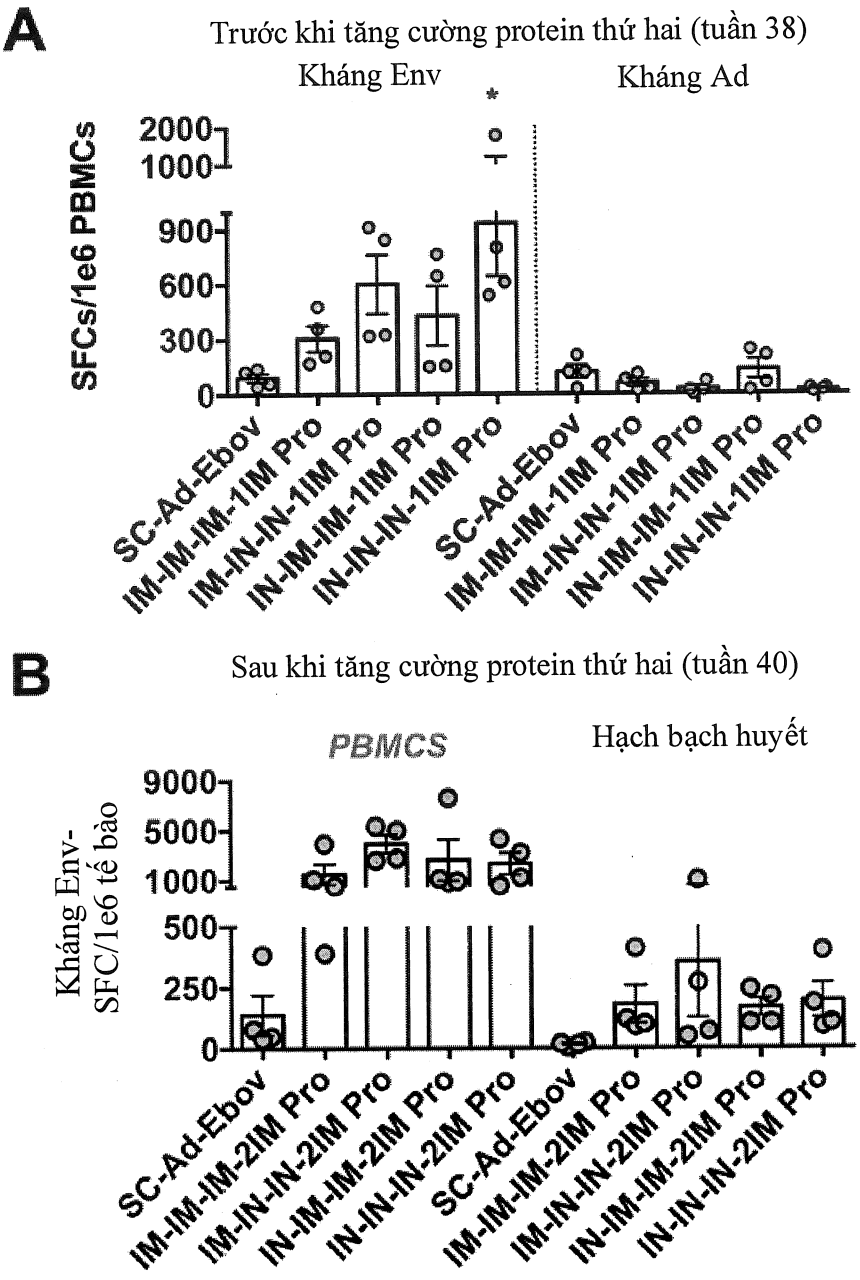

A
Trước khi tăng cường protein thứ hai (tuần 38)
Kháng Env
Kháng Ad
SFCs/1e6 PBMCs
2000
1000
900
600
300
0
*
SC-Ad-Ebov
IM-IM-IM-1IM Pro
IM-IN-IN-1IM Pro
IN-IM-IM-1IM Pro
IN-IN-IN-1IM Pro
SC-Ad-Ebov
IM-IM-IM-1IM Pro
IM-IN-IN-1IM Pro
IN-IM-IM-1IM Pro
IN-IN-IN-1IM Pro
B
Sau khi tăng cường protein thứ hai (tuần 40)
PBMCS
Hạch bạch huyết
Kháng Env-
SFC/1e6 tế bào
9000
5000
1000
500
250
0
SC-Ad-Ebov
IM-IM-IM-2IM Pro
IM-IN-IN-2IM Pro
IN-IM-IM-2IM Pro
IN-IN-IN-2IM Pro
SC-Ad-Ebov
IM-IM-IM-2IM Pro
IM-IN-IN-2IM Pro
IN-IM-IM-2IM Pro
IN-IN-IN-2IM Pro

FIG. 18

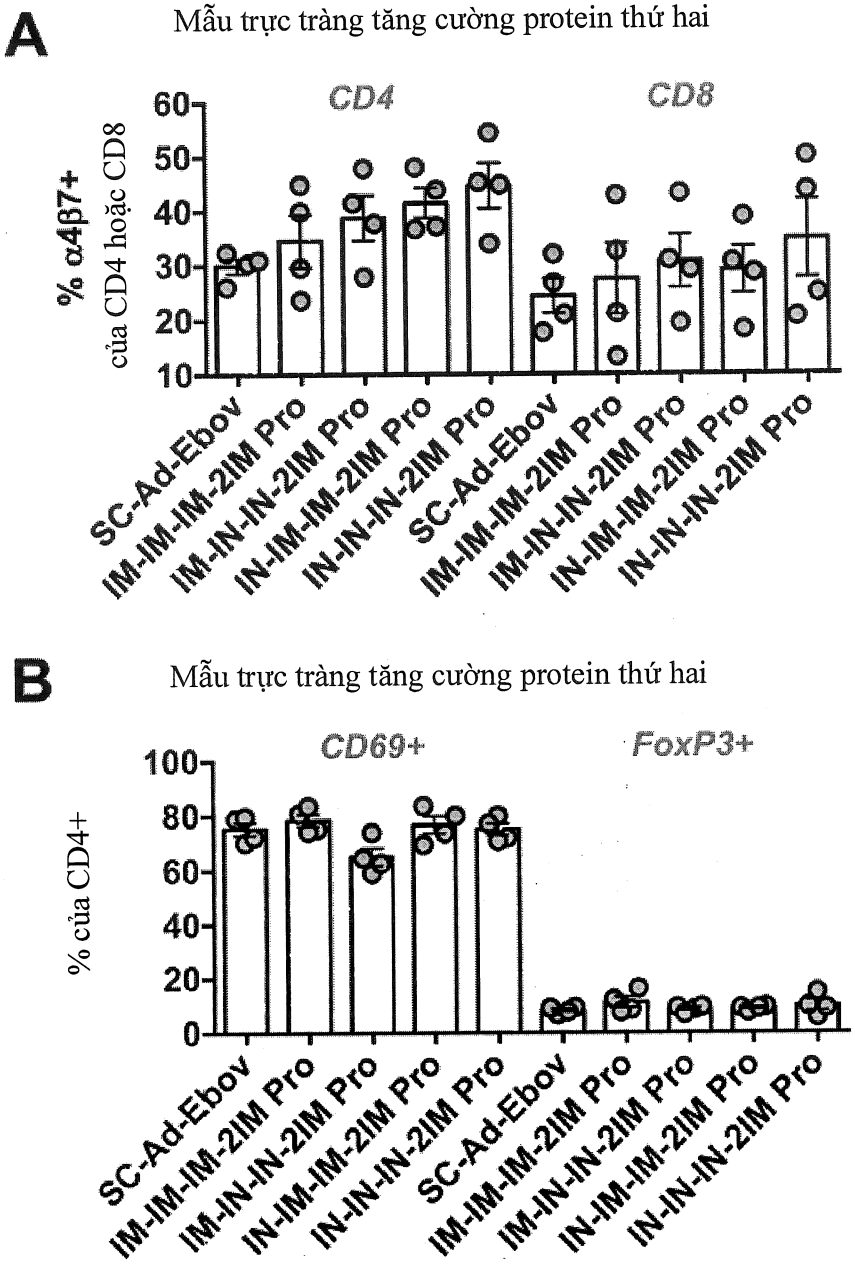

A
Mẫu trực tràng tăng cường protein thứ hai
CD4
CD8
% α4β7+
của CD4 hoặc CD8
60
50
40
30
20
10
SC-Ad-Ebov
IM-IM-IM-2IM Pro
IM-IN-IN-2IM Pro
IN-IM-IM-2IM Pro
IN-IN-IN-2IM Pro
B
Mẫu trực tràng tăng cường protein thứ hai
CD69+
FoxP3+
% của CD4+
100
80
60
40
20
0

FIG. 19

Sau khi tăng cường protein thứ hai (tuần 40)

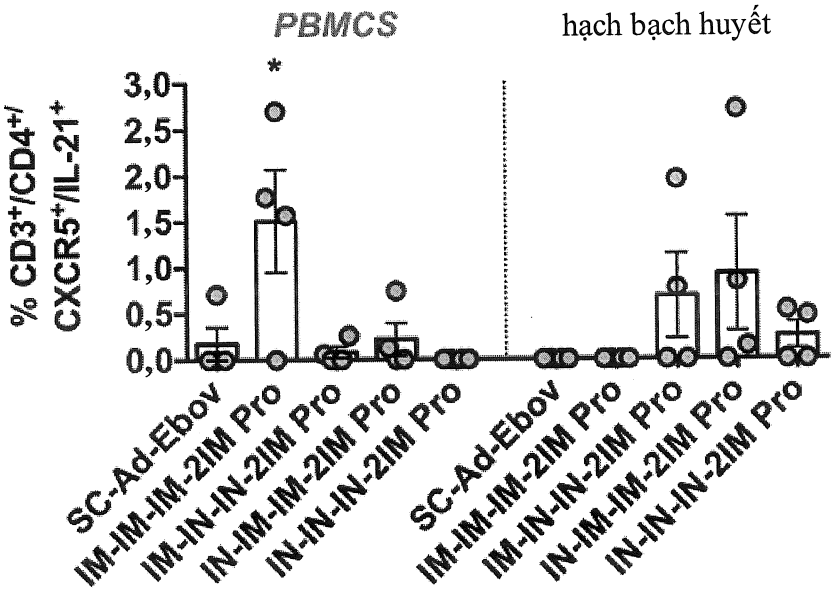


FIG. 20

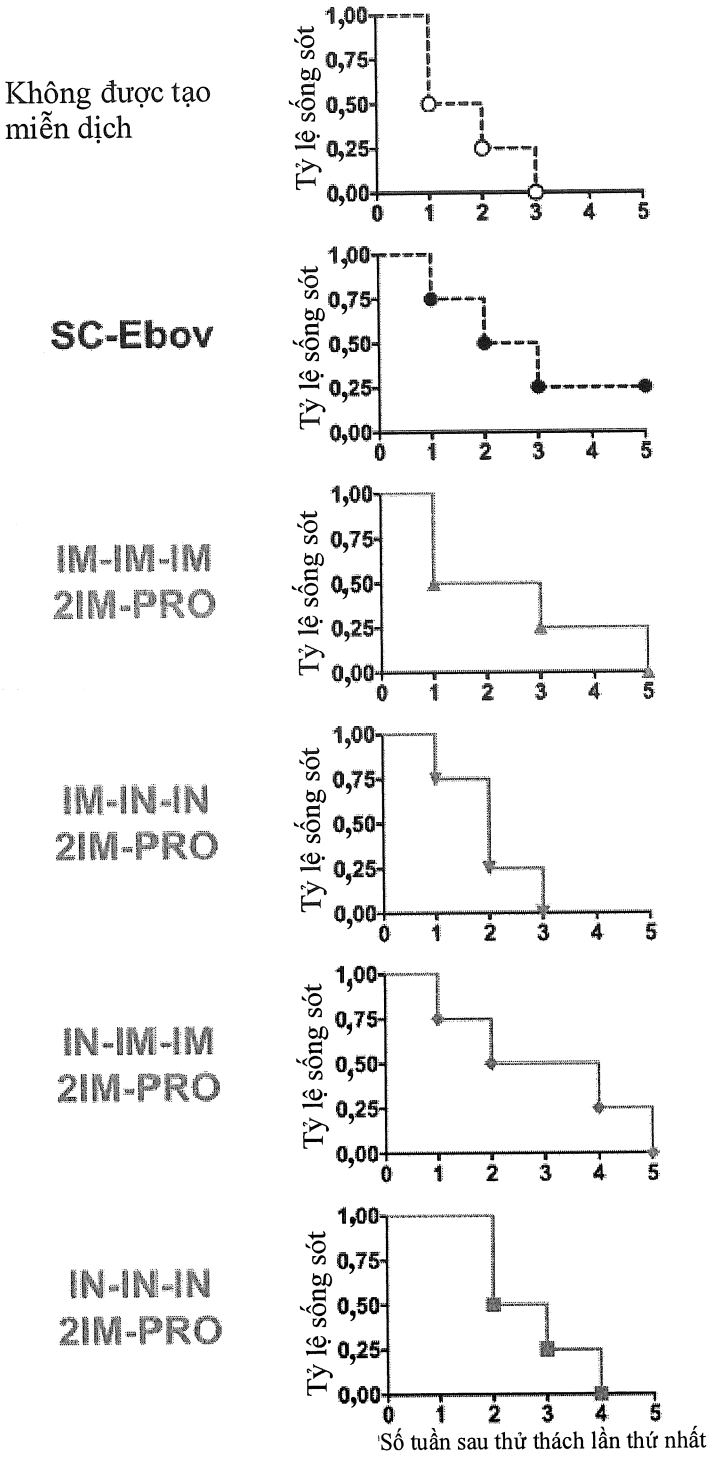

Không được tạo miễn dịch
SC-Ebov
IM-IM-IM 2IM-PRO
IM-IN-IN 2IM-PRO
IN-IM-IM 2IM-PRO
IN-IN-IN 2IM-PRO
Tỷ lệ sống sót
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
0 1 2 3 4 5
Số tuần sau thử thách lần thứ nhất

FIG. 21

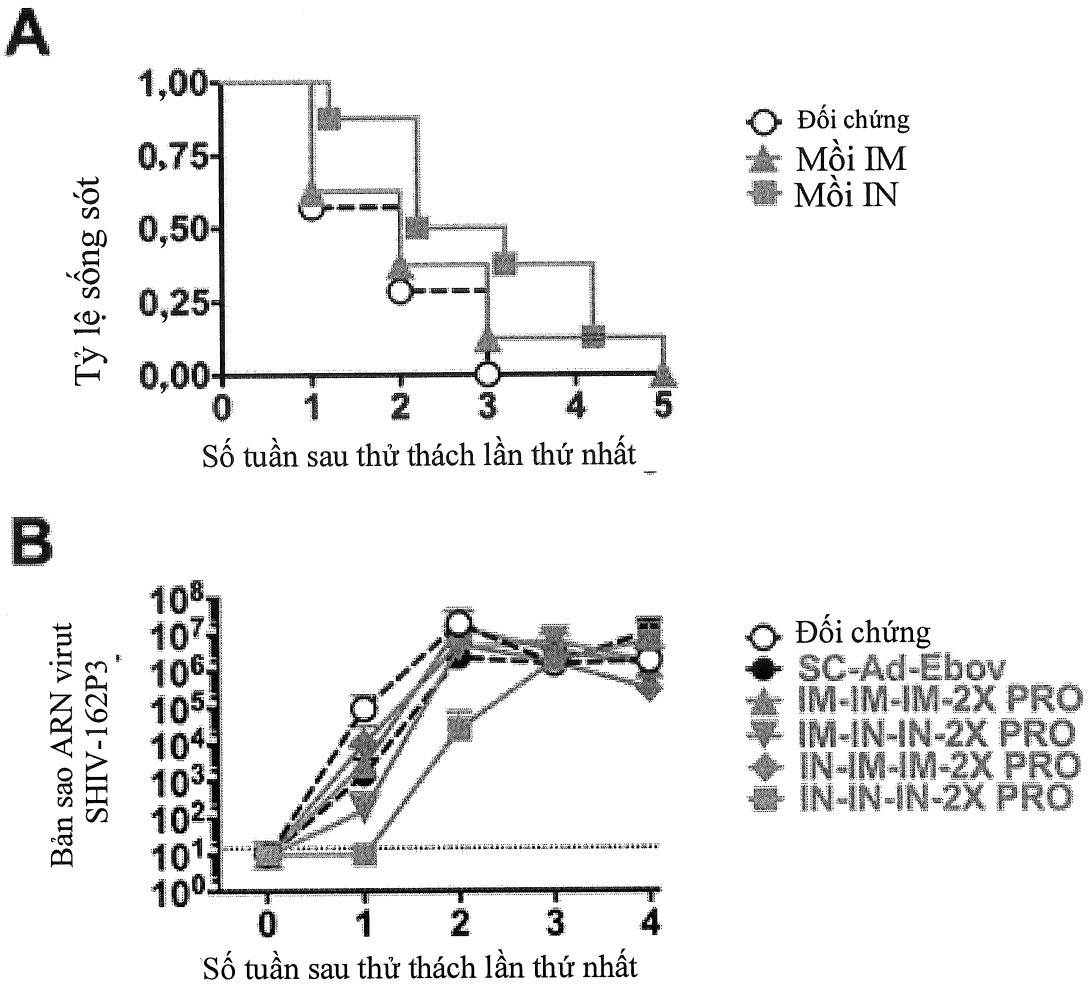

A
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
Tỷ lệ sống sót
0
1
2
3
4
5
Số tuần sau thử thách lần thứ nhất
Đối chứng
Mồi IM
Mồi IN
B
Bản sao ARN virut SHIV-162P3
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
0
1
2
3
4
Số tuần sau thử thách lần thứ nhất
Đối chứng
SC-Ad-Ebov
IM-IM-IM-2X PRO
IM-IN-IN-2X PRO
IN-IM-IM-2X PRO
IN-IN-IN-2X PRO

FIG. 22

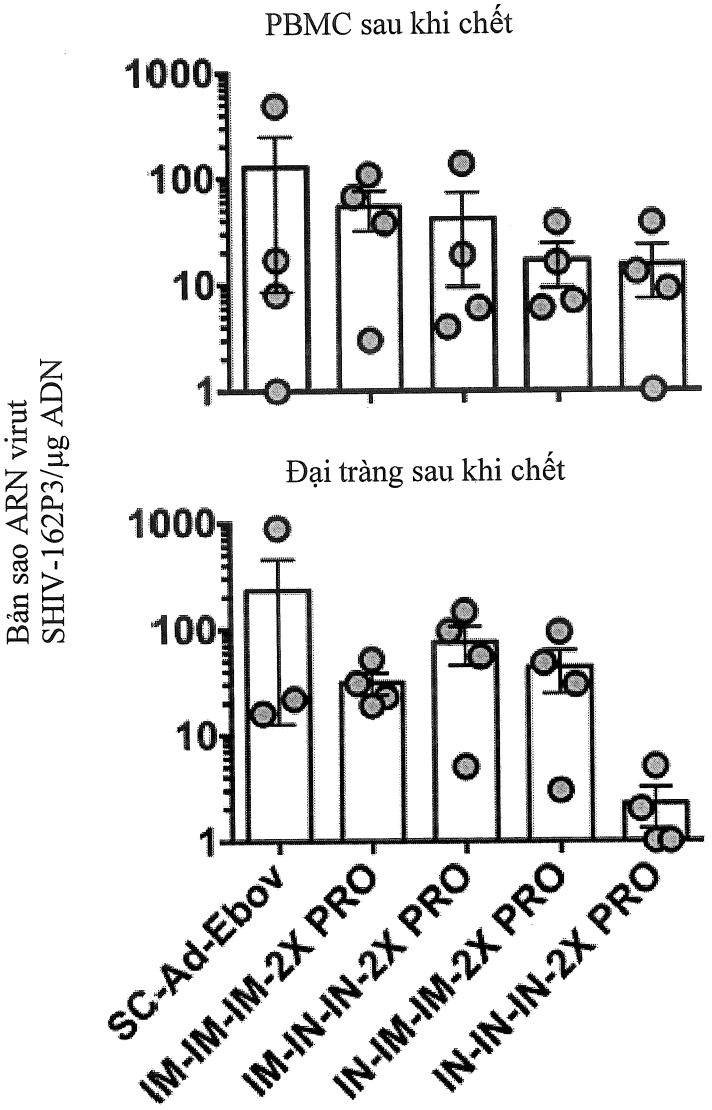

PBMC sau khi chết
1000
100
10
1
Đại tràng sau khi chết
1000
100
10
1
Bản sao ARN virut
SHIV-162P3/µg ADN
SC-Ad-Ebov
IM-IM-IM-2X PRO
IM-IN-IN-2X PRO
IN-IM-IM-2X PRO
IN-IN-IN-2X PRO

FIG. 23

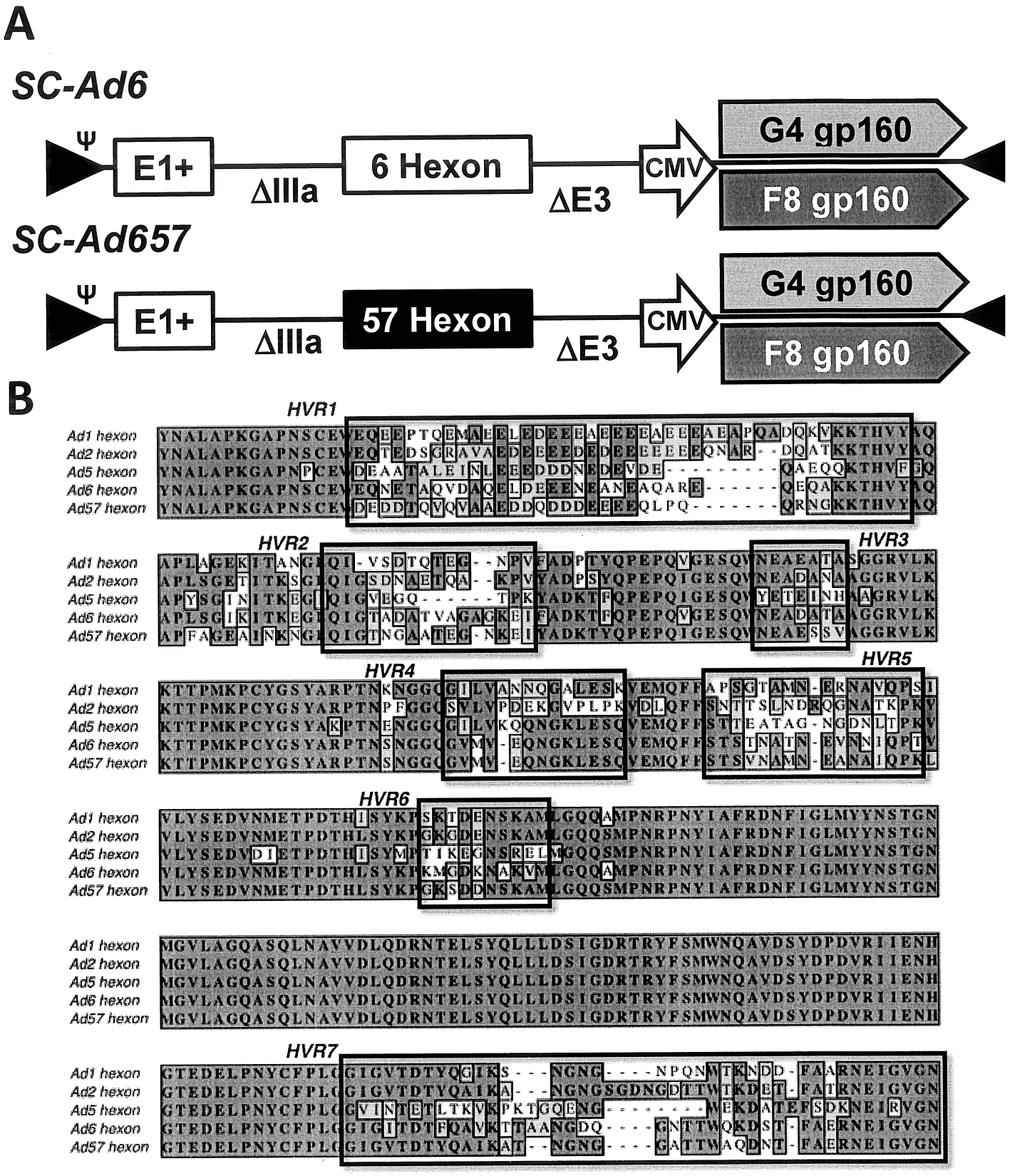

A
SC-Ad6
Ψ
E1+
ΔIIIa
6 Hexon
ΔE3
CMV
G4 gp160
F8 gp160
SC-Ad657
Ψ
E1+
ΔIIIa
57 Hexon
ΔE3
CMV
G4 gp160
F8 gp160
B
HVR1
HVR2
HVR3
HVR4
HVR5
HVR6
HVR7
Ad1 hexon
Ad2 hexon
Ad5 hexon
Ad6 hexon
Ad57 hexon

FIG. 24

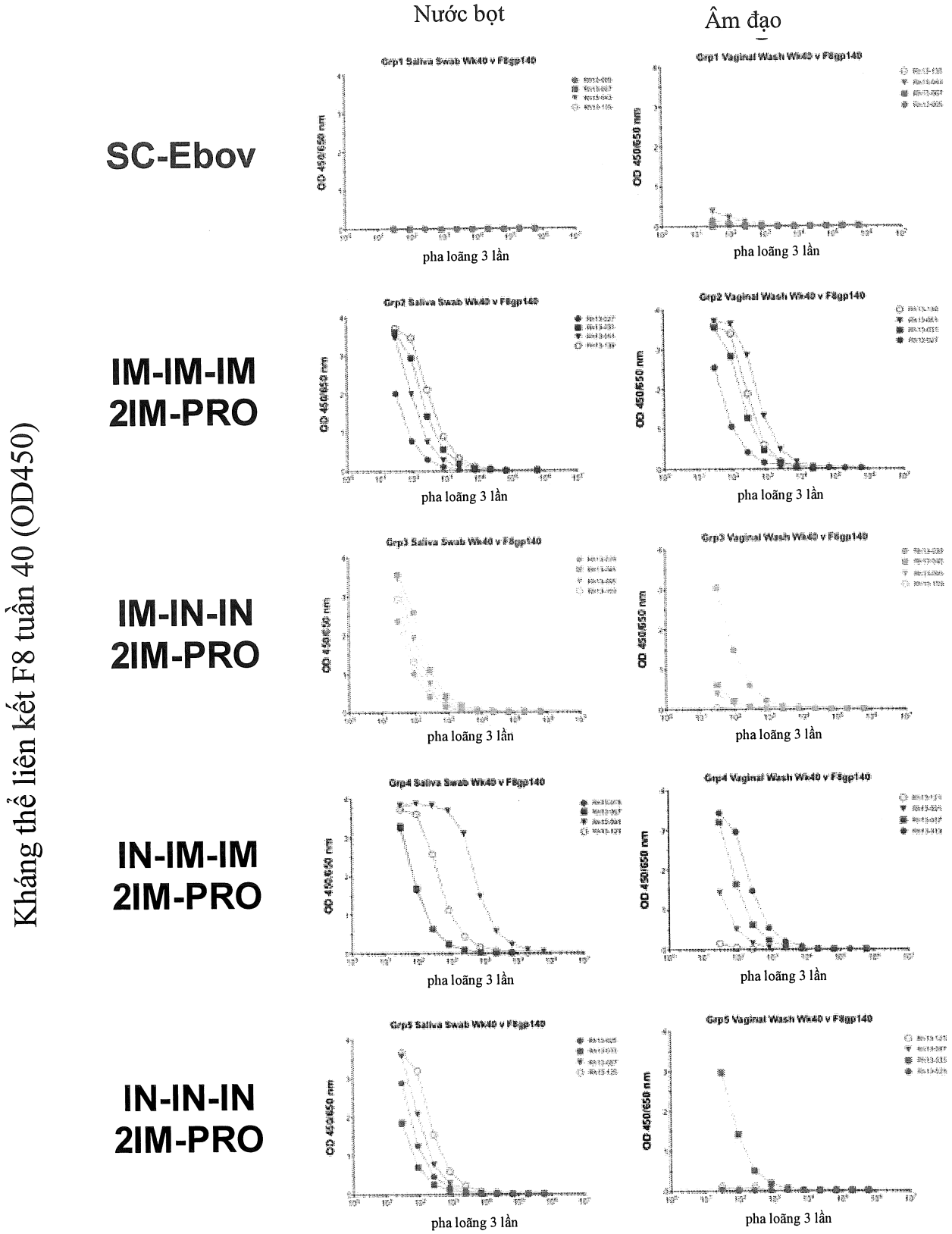

Nước bọt
Âm đạo
SC-Ebov
IM-IM-IM 2IM-PRO
IM-IN-IN 2IM-PRO
IN-IM-IM 2IM-PRO
IN-IN-IN 2IM-PRO
Kháng thể liên kết F8 tuần 40 (OD450)
OD 450/650 nm
pha loãng 3 lần

FIG. 25

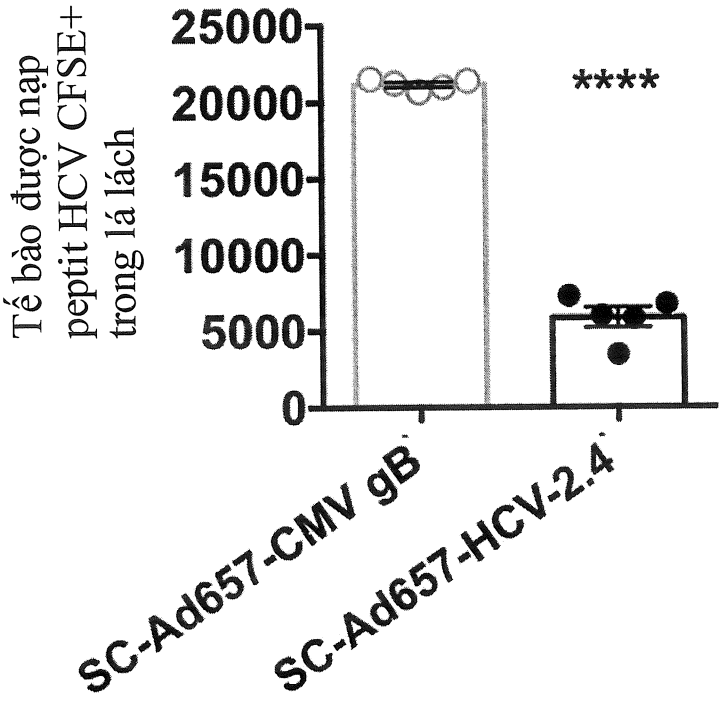

Tế bào được nạp peptit HCV CFSE+ trong lá lách
25000
20000
15000
10000
5000
0
****
SC-Ad657-CMV gB
SC-Ad657-HCV-2.4

FIG. 26

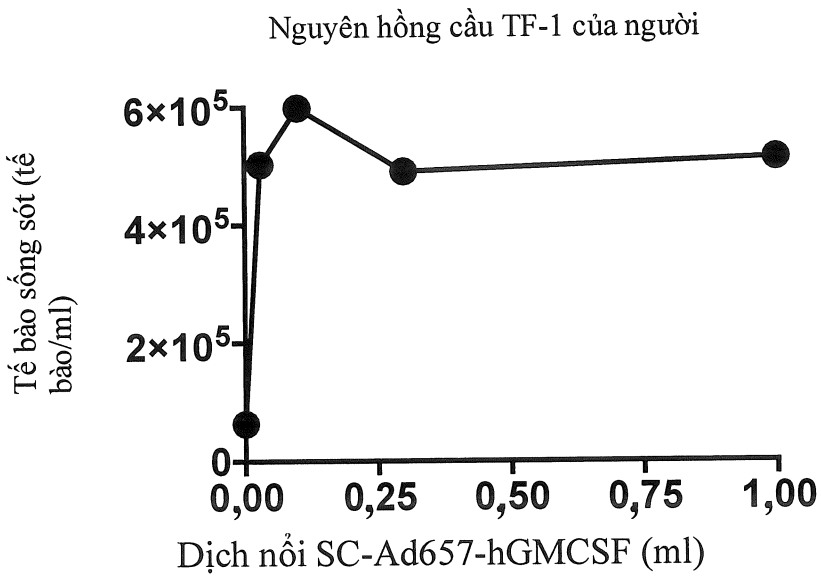

Nguyên hồng cầu TF-1 của người
Tế bào sống sót (tế bào/ml)
6×10^5
4×10^5
2×10^5
0
0,00
0,25
0,50
0,75
1,00
Dịch nổi SC-Ad657-hGMCSF (ml)

FIG. 27

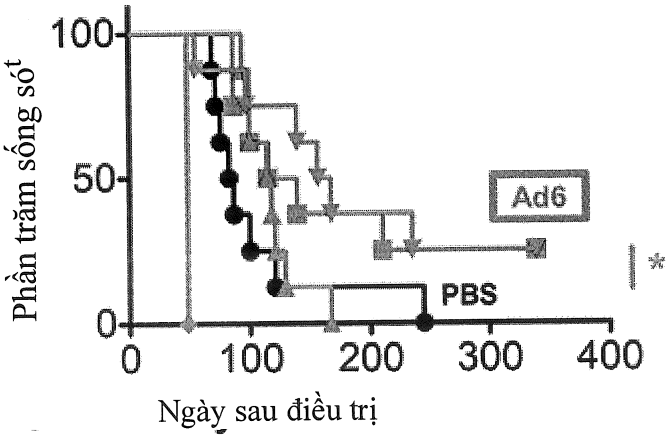

100
50
0
Phần trăm sống sót
Ad6
PBS
*
0
100
200
300
400
Ngày sau điều trị

FIG. 28

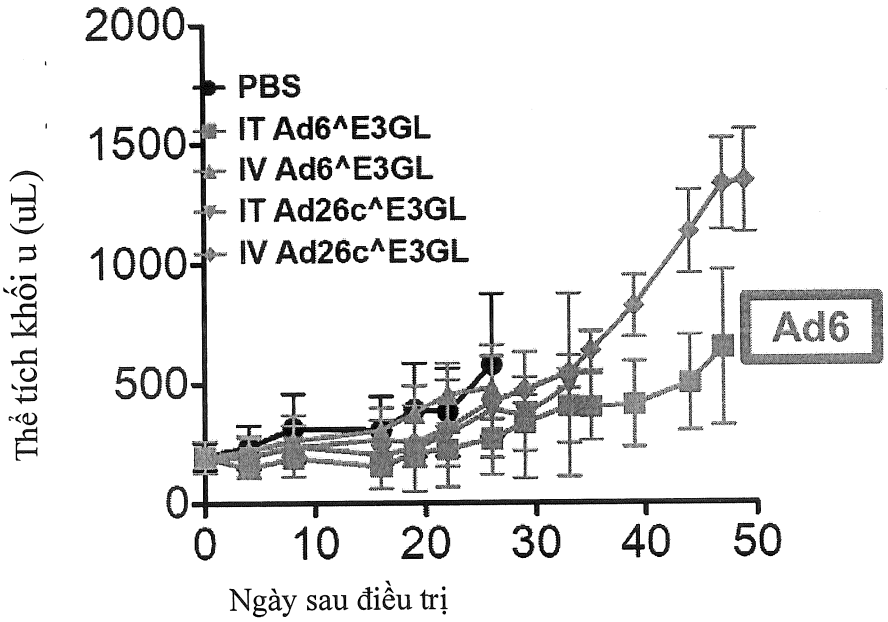

2000
1500
1000
500
0
PBS
IT Ad6^E3GL
IV Ad6^E3GL
IT Ad26c^E3GL
IV Ad26c^E3GL
Ad6
Thể tích khối u (uL)
0
10
20
30
40
50
Ngày sau điều trị

FIG. 29

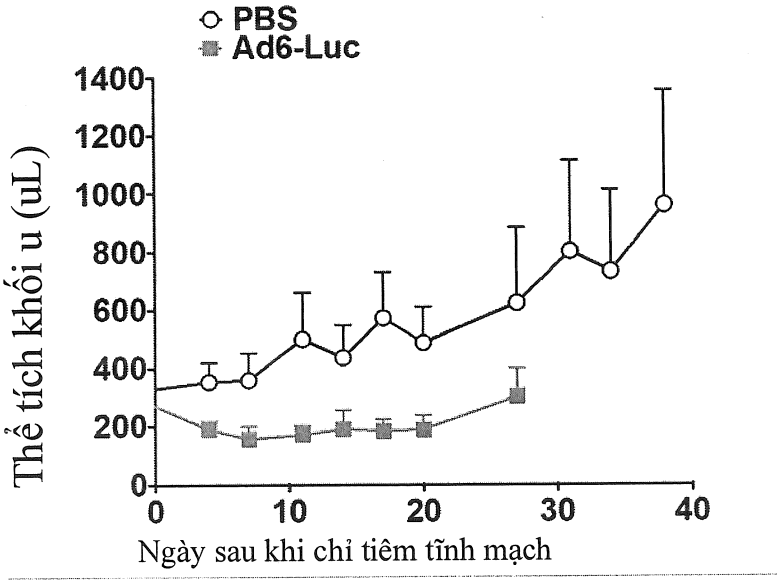
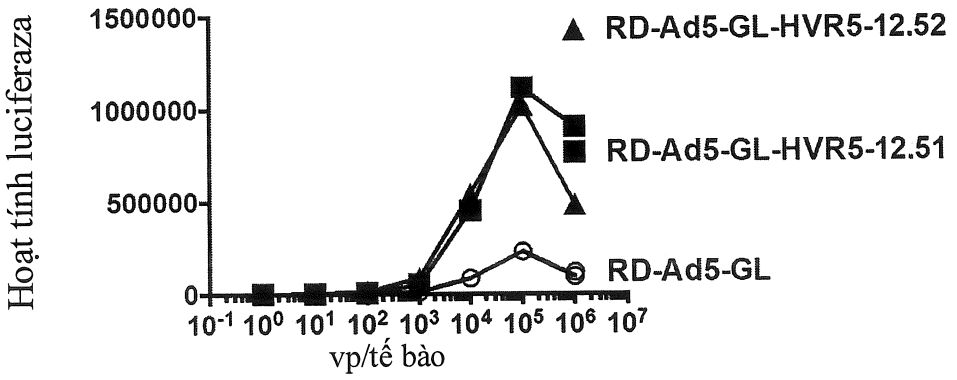

PBS
Ad6-Luc
Thể tích khối u (uL)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
Ngày sau khi chỉ tiêm tĩnh mạch

FIG. 30

Khối u hắc tố B16



Phổi A459

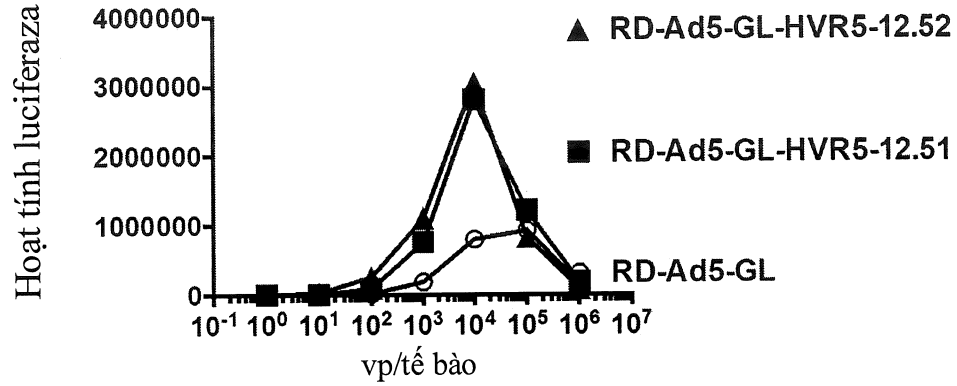


FIG. 31

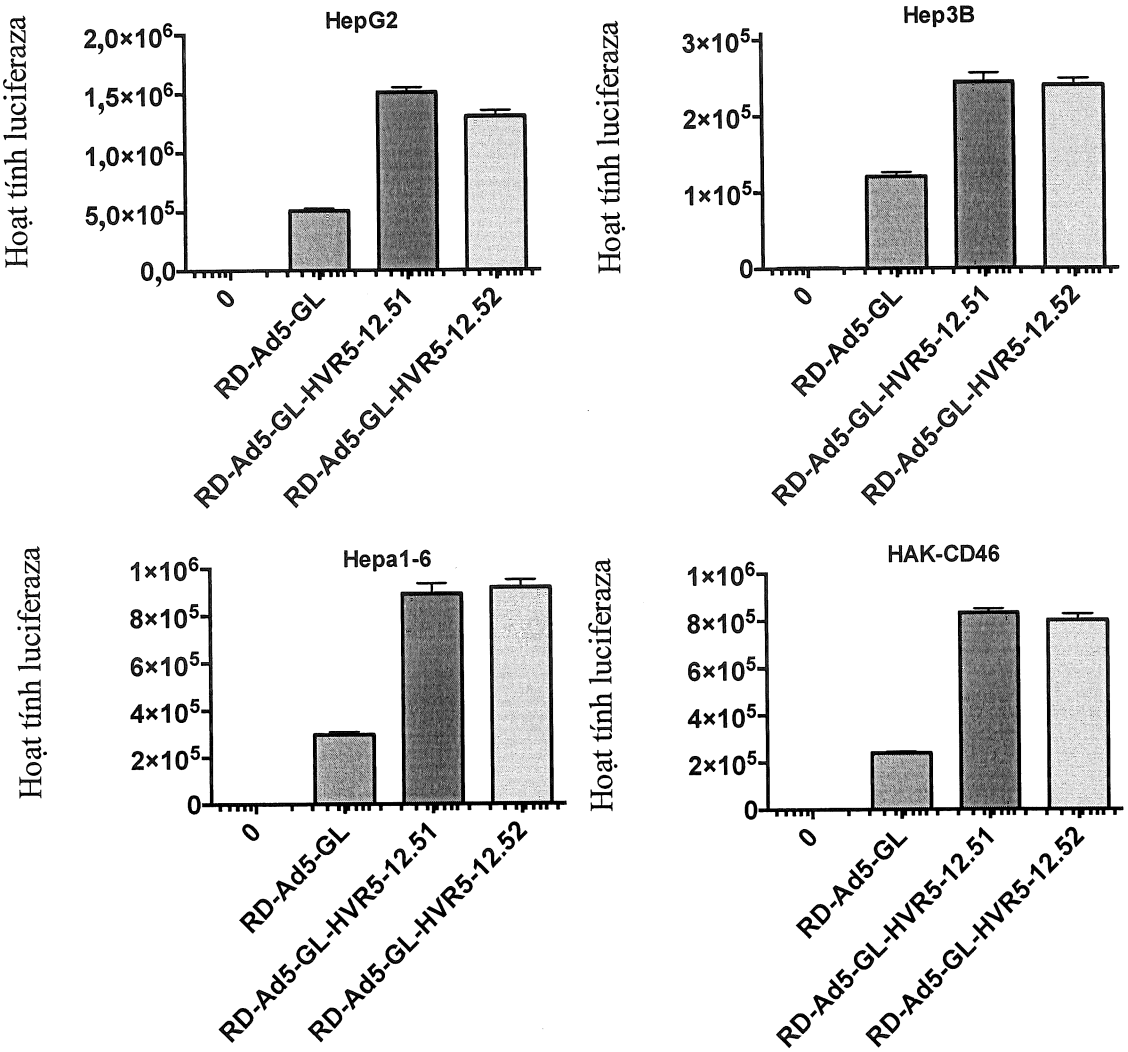
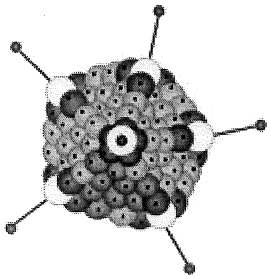
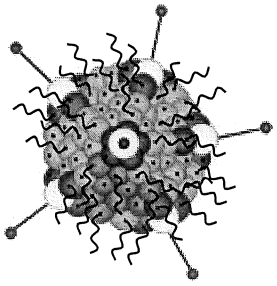

HepG2
Hep3B
Hepa1-6
HAK-CD46
Hoạt tính luciferaza
2,0×10^6
1,5×10^6
1,0×10^6
5,0×10^5
0,0
3×10^5
2×10^5
1×10^5
1×10^6
8×10^5
6×10^5
4×10^5
2×10^5
0
0
RD-Ad5-GL
RD-Ad5-GL-HVR5-12.51
RD-Ad5-GL-HVR5-12.52

FIG. 32

Kết hợp các HVR khác nhau từ Ad6 và Ad657 và chèn thêm phối tử hướng đích và khử hướng đích tế bào



Thêm tổ hợp của các HVR khác nhau

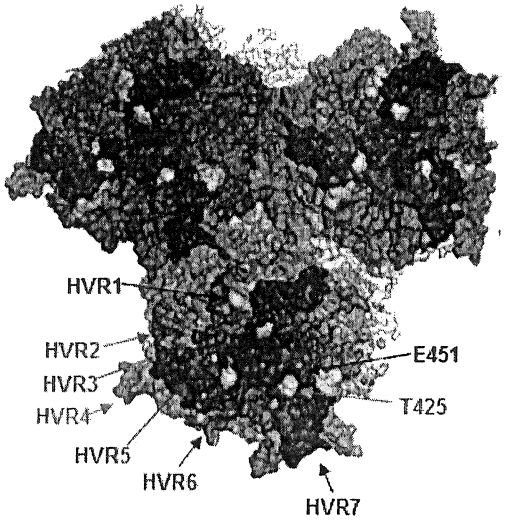


Thêm các peptit vào trong các HVR khác nhau

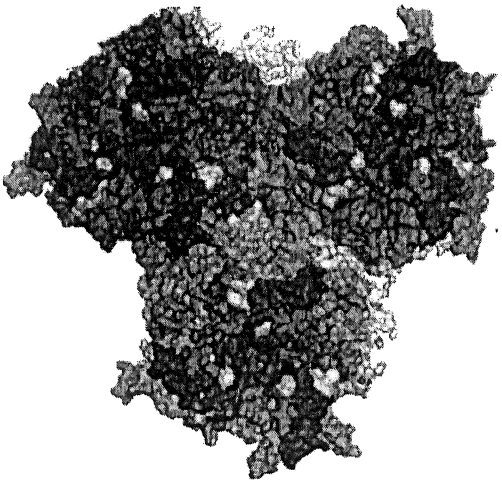
FIG. 33

Fig. 33 (tiếp)

Tam phân Hexon Ad6



Tam phân Hexon Ad57



Tổ hợp Ad6 và Ad57
(ví dụ, 6 HVR1+57 HVR2-7

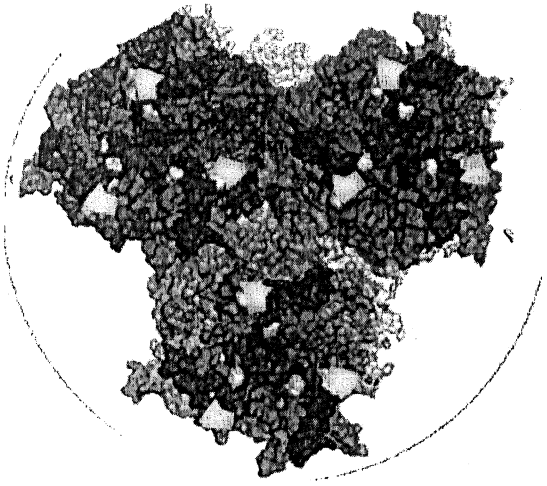
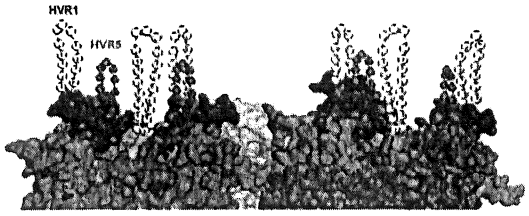
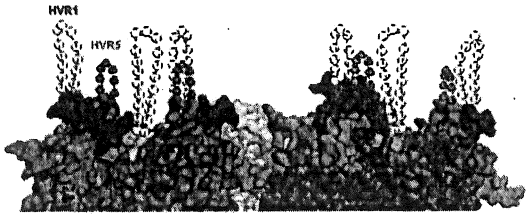


Fig. 33 (tiếp)

Bề mặt tam phân hexon Ad6



Bề mặt tam phân hexon Ad57

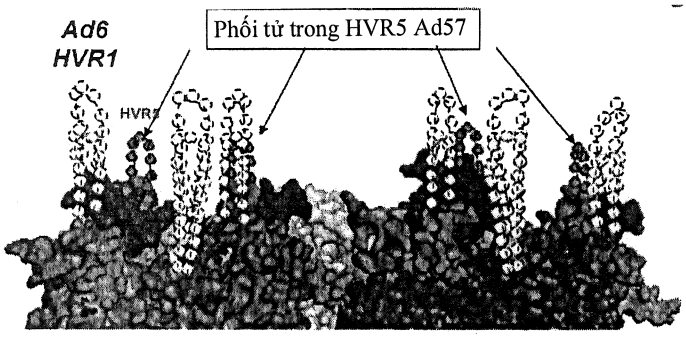


Tổ hợp Ad6 và Ad57

(ví dụ, 6 HVR1+57 HVR2-7)

+/- tổ hợp đoạn chèn hướng đích/khử hướng đích

(ví dụ, HVR trong Ad6 để tránh đại thực bào, peptit được chèn vào trong HVR Ad57 để hướng đích thụ thể và khử hướng đích tế bào gan)



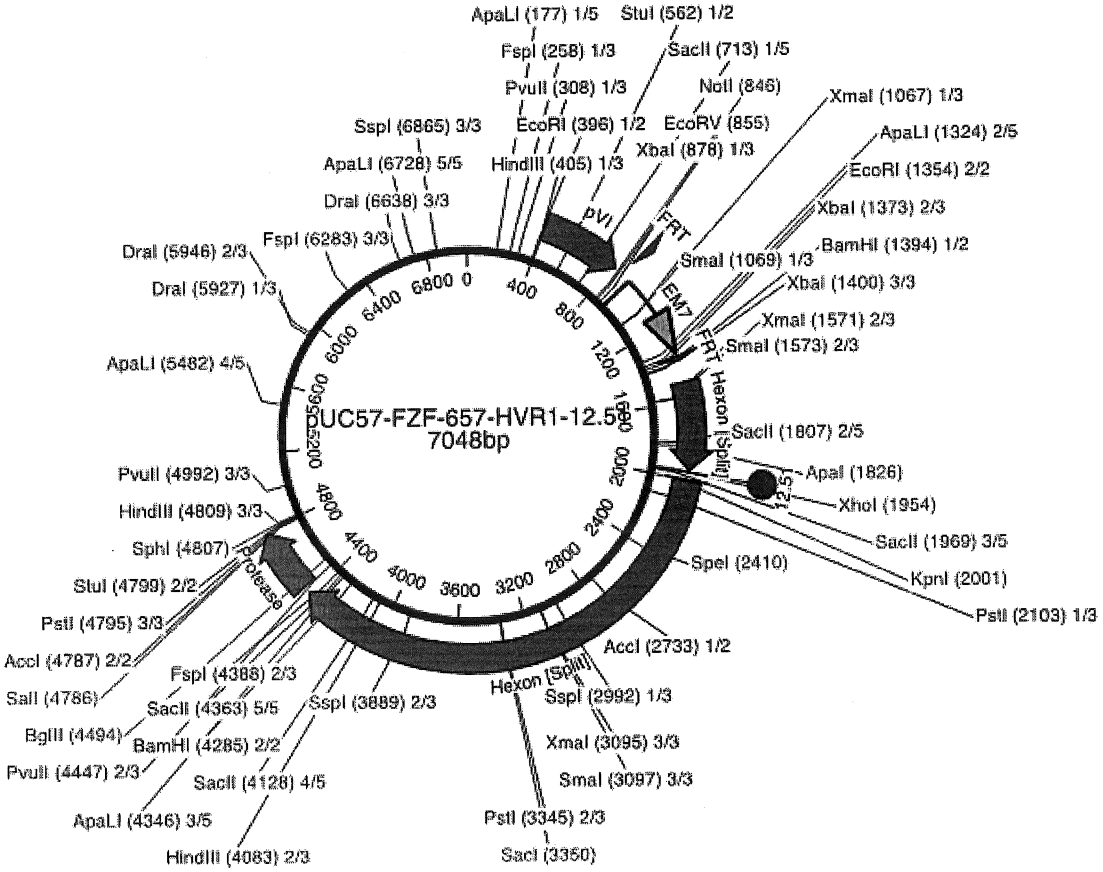

pVI
FRT
EM7
FRT
Hexon (5'pilin)
Protease
Hexon (3'pilin)
pIX
pIVa2
UC57-FZF-657-HVR1-12.5
7048bp
0
400
800
1200
1600
2000
2400
2800
3200
3600
4000
4400
4800
5200
5600
6000
6400
6800
ApaLI (177) 1/5
StuI (562) 1/2
FspI (258) 1/3
SacII (713) 1/5
PvuII (308) 1/3
NotI (846)
SspI (6865) 3/3
EcoRI (396) 1/2
EcoRV (855)
ApaLI (6728) 5/5
HindIII (405) 1/3
XbaI (876) 1/3
DraI (6638) 3/3
FspI (6283) 3/3
DraI (5946) 2/3
DraI (5927) 1/3
ApaLI (5482) 4/5
PvuII (4992) 3/3
HindIII (4809) 3/3
SphI (4807)
StuI (4799) 2/2
PstI (4795) 3/3
AccI (4787) 2/2
SalI (4786)
FspI (4388) 2/3
SacII (4363) 5/5
BglII (4494)
BamHI (4285) 2/2
PvuII (4447) 2/3
SacII (4128) 4/5
ApaLI (4346) 3/5
HindIII (4083) 2/3
SspI (3889) 2/3
AccI (2733) 1/2
SspI (2992) 1/3
XmaI (3095) 3/3
SmaI (3097) 3/3
PstI (3345) 2/3
SacI (3350)
SpeI (2410)
KpnI (2001)
PstI (2103) 1/3
SacII (1969) 3/5
XhoI (1954)
ApaI (1826)
SacII (1807) 2/5
SmaI (1573) 2/3
XmaI (1571) 2/3
XbaI (1400) 3/3
SmaI (1069) 1/3
BamHI (1394) 1/2
XbaI (1373) 2/3
EcoRI (1354) 2/2
ApaLI (1324) 2/5
XmaI (1067) 1/3

FIG. 34

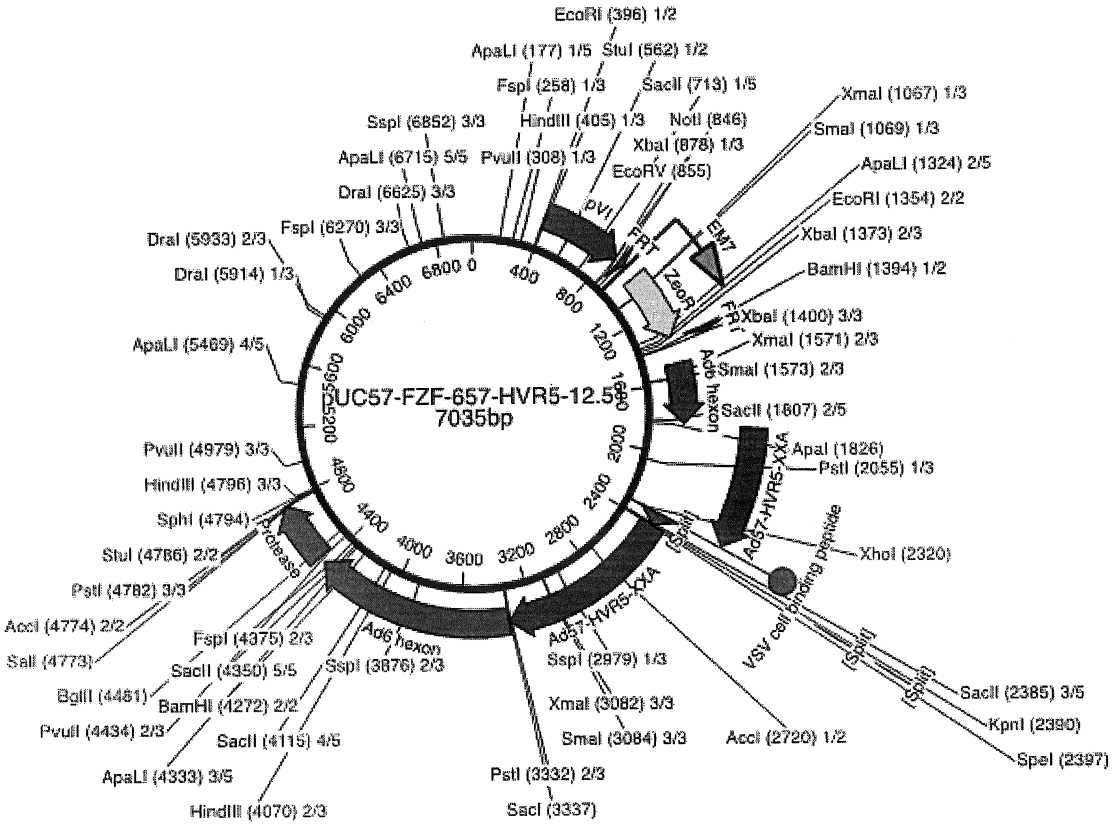

EcoRI (396) 1/2
ApaLI (177) 1/5
StuI (562) 1/2
FspI (258) 1/3
SacII (713) 1/5
SspI (6852) 3/3
HindIII (405) 1/3
NotI (846)
XmaI (1067) 1/3
SmaI (1069) 1/3
ApaLI (6715) 5/5
PvuII (308) 1/3
XbaI (878) 1/3
ApaLI (1324) 2/5
DraI (6625) 3/3
EcoRV (855)
EcoRI (1354) 2/2
DraI (5933) 2/3
FspI (6270) 3/3
pVI
FRT
EM7
XbaI (1373) 2/3
DraI (5914) 1/3
ZeoR
BamHI (1394) 1/2
FRT
XbaI (1400) 3/3
ApaLI (5469) 4/5
XmaI (1571) 2/3
Ad6 hexon
SmaI (1573) 2/3
UC57-FZF-657-HVR5-12.5
7035bp
SacII (1607) 2/5
ApaI (1826)
PvuII (4979) 3/3
PstI (2055) 1/3
HindIII (4796) 3/3
Ad57-HVR5-XXA
SphI (4794)
Protease
StuI (4786) 2/2
XhoI (2320)
PstI (4782) 3/3
VSV cell binding peptide
AccI (4774) 2/2
FspI (4375) 2/3
Ad6 hexon
SalI (4773)
SacII (4350) 5/5
SspI (3876) 2/3
Ad57-HVR5-XXA
SspI (2979) 1/3
SacII (2385) 3/5
BglII (4461)
BamHI (4272) 2/2
XmaI (3082) 3/3
KpnI (2390)
PvuII (4434) 2/3
SacII (4115) 4/5
SmaI (3084) 3/3
AccI (2720) 1/2
SpeI (2397)
ApaLI (4333) 3/5
PstI (3332) 2/3
HindIII (4070) 2/3
SacI (3337)

Fig. 34 (tiếp)

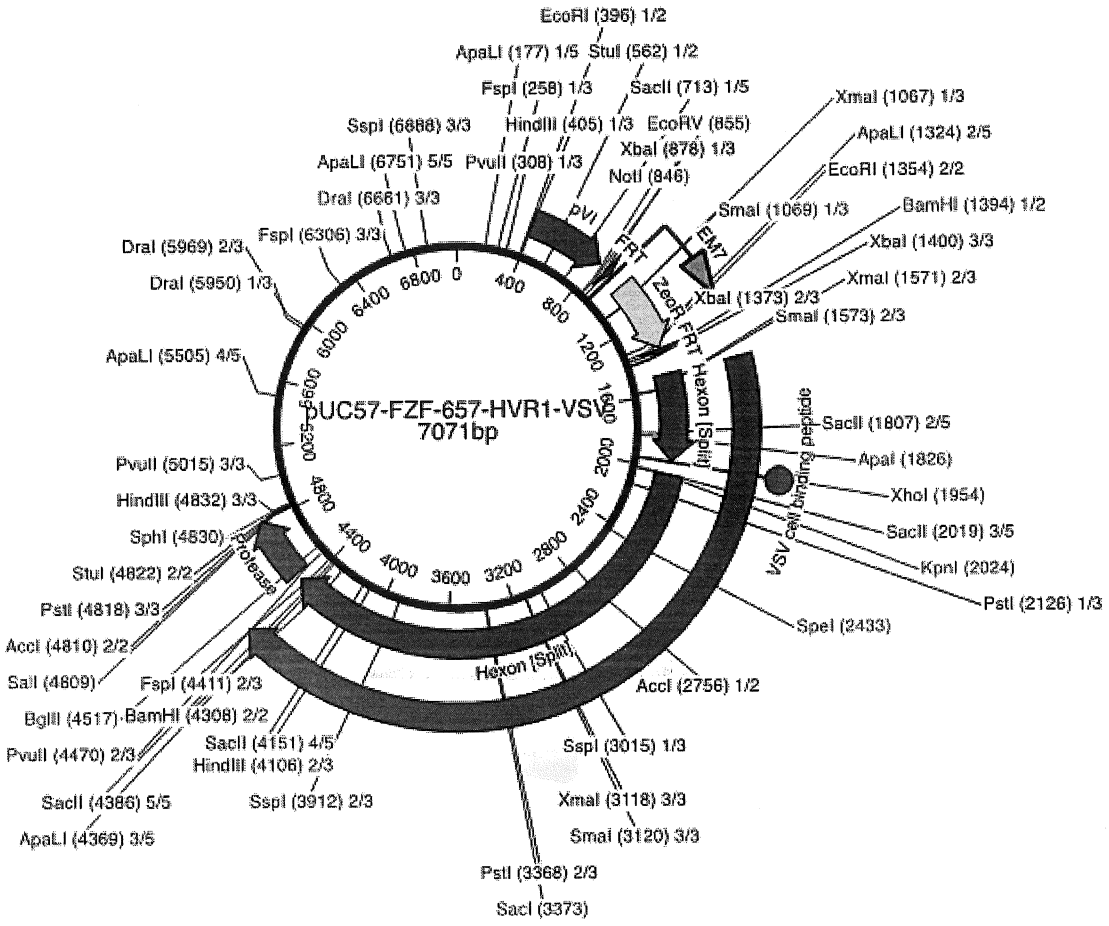

pUC57-FZF-657-HVR1-VSV
7071bp
EcoRI (396) 1/2
ApaLI (177) 1/5
StuI (562) 1/2
FspI (258) 1/3
SacII (713) 1/5
SspI (6888) 3/3
HindIII (405) 1/3
EcoRV (855)
ApaLI (6751) 5/5
PvuII (308) 1/3
XbaI (878) 1/3
DraI (6661) 3/3
NotI (846)
XmaI (1067) 1/3
ApaLI (1324) 2/5
EcoRI (1354) 2/2
SmaI (1069) 1/3
BamHI (1394) 1/2
DraI (5969) 2/3
FspI (6306) 3/3
XbaI (1400) 3/3
DraI (5950) 1/3
XbaI (1373) 2/3
XmaI (1571) 2/3
SmaI (1573) 2/3
ApaLI (5505) 4/5
PvuII (5015) 3/3
SacII (1807) 2/5
ApaI (1826)
HindIII (4832) 3/3
XhoI (1954)
SphI (4830)
SacII (2019) 3/5
StuI (4822) 2/2
KpnI (2024)
PstI (4818) 3/3
PstI (2126) 1/3
AccI (4810) 2/2
SpeI (2433)
SalI (4809)
FspI (4411) 2/3
AccI (2756) 1/2
BglII (4517)
BamHI (4308) 2/2
PvuII (4470) 2/3
SacII (4151) 4/5
SspI (3015) 1/3
HindIII (4106) 2/3
SacII (4386) 5/5
SspI (3912) 2/3
XmaI (3118) 3/3
ApaLI (4369) 3/5
SmaI (3120) 3/3
PstI (3368) 2/3
SacI (3373)
pVI
FRT
EM7
ZeoR
FRT
Hexon (Split)
VSV cell binding peptide
Protease
Hexon (Split)

Fig. 34 (tiếp)

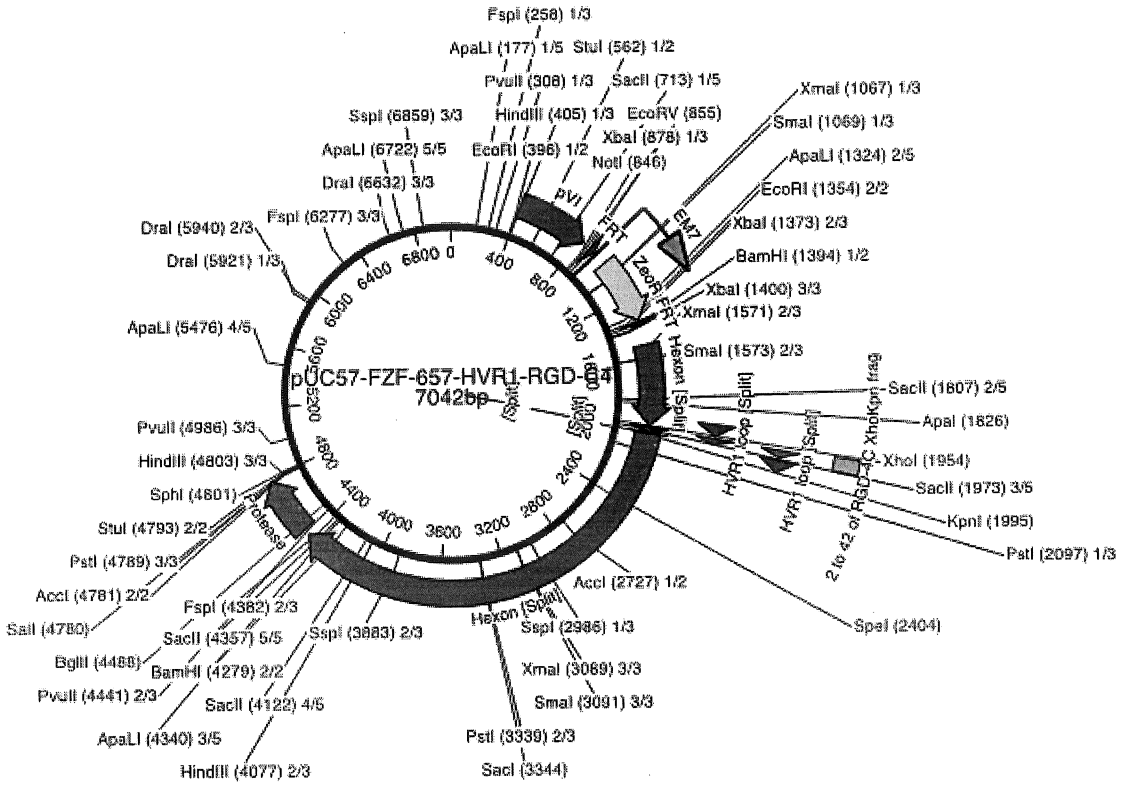

pUC57-FZF-657-HVR1-RGD-C4
7042bp
FspI (258) 1/3
ApaLI (177) 1/5
StuI (562) 1/2
PvuII (308) 1/3
SacII (713) 1/5
SspI (6859) 3/3
HindIII (405) 1/3
EcoRV (855)
ApaLI (6722) 5/5
EcoRI (396) 1/2
XbaI (878) 1/3
NotI (646)
DraI (6632) 3/3
FspI (6277) 3/3
DraI (5940) 2/3
DraI (5921) 1/3
ApaLI (5476) 4/5
PvuII (4986) 3/3
HindIII (4803) 3/3
SphI (4801)
StuI (4793) 2/2
PstI (4789) 3/3
AccI (4781) 2/2
SalI (4780)
FspI (4382) 2/3
SacII (4357) 5/5
BglII (4468)
BamHI (4279) 2/2
PvuII (4441) 2/3
SacII (4122) 4/5
ApaLI (4340) 3/5
HindIII (4077) 2/3
SspI (3883) 2/3
AccI (2727) 1/2
Hexon [Split]
SspI (2986) 1/3
XmaI (3069) 3/3
SmaI (3091) 3/3
PstI (3339) 2/3
SacI (3344)
SpeI (2404)
XmaI (1067) 1/3
SmaI (1069) 1/3
ApaLI (1324) 2/5
EcoRI (1354) 2/2
XbaI (1373) 2/3
BamHI (1394) 1/2
XbaI (1400) 3/3
XmaI (1571) 2/3
SmaI (1573) 2/3
SacII (1607) 2/5
ApaI (1826)
XhoI (1954)
SacII (1973) 3/5
KpnI (1995)
PstI (2097) 1/3
PVI
TRT
EM7
ZeoR
FRT
Protease
HVR1 loop
2 to 42 of RGD-4C
XhoKpn flag

Fig. 34 (tiếp)

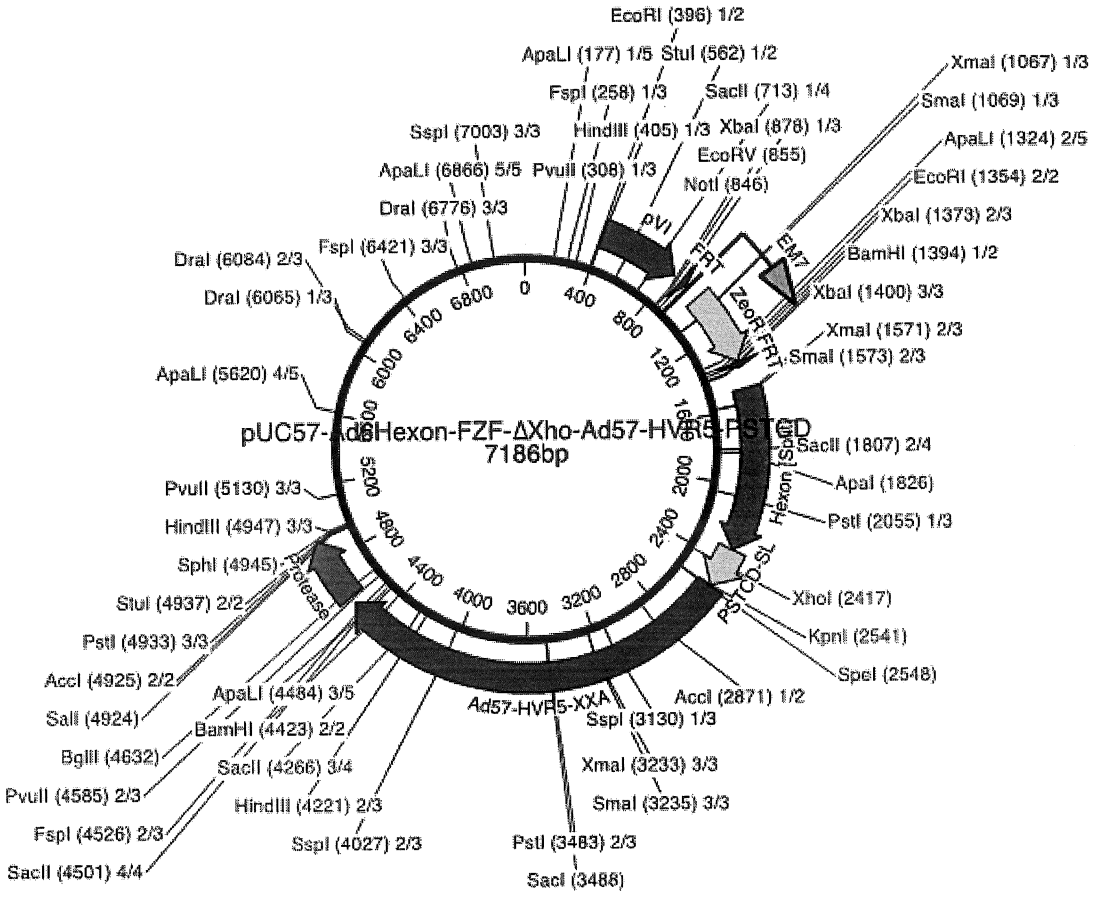

EcoRI (396) 1/2
ApaLI (177) 1/5
StuI (562) 1/2
XmaI (1067) 1/3
FspI (258) 1/3
SacII (713) 1/4
SmaI (1069) 1/3
SspI (7003) 3/3
HindIII (405) 1/3
XbaI (878) 1/3
ApaLI (1324) 2/5
ApaLI (6866) 5/5
PvuII (308) 1/3
EcoRV (855)
EcoRI (1354) 2/2
DraI (6776) 3/3
NotI (846)
XbaI (1373) 2/3
pVI
EM7
BamHI (1394) 1/2
DraI (6084) 2/3
FspI (6421) 3/3
TRT
XbaI (1400) 3/3
DraI (6065) 1/3
ZeoR
FRT
XmaI (1571) 2/3
SmaI (1573) 2/3
ApaLI (5620) 4/5
pUC57-Ad5Hexon-FZF-ΔXho-Ad57-HVR5-PSTCD
7186bp
SacII (1807) 2/4
Hexon
ApaI (1826)
PvuII (5130) 3/3
PstI (2055) 1/3
HindIII (4947) 3/3
SphI (4945)
PSTCD-SL
XhoI (2417)
Protease
StuI (4937) 2/2
KpnI (2541)
PstI (4933) 3/3
SpeI (2548)
AccI (4925) 2/2
ApaLI (4484) 3/5
AccI (2871) 1/2
Ad57-HVR5-XXA
SalI (4924)
BamHI (4423) 2/2
SspI (3130) 1/3
BglII (4632)
SacII (4266) 3/4
XmaI (3233) 3/3
PvuII (4585) 2/3
HindIII (4221) 2/3
SmaI (3235) 3/3
FspI (4526) 2/3
SspI (4027) 2/3
PstI (3483) 2/3
SacII (4501) 4/4
SacI (3486)

Fig. 34 (tiếp)

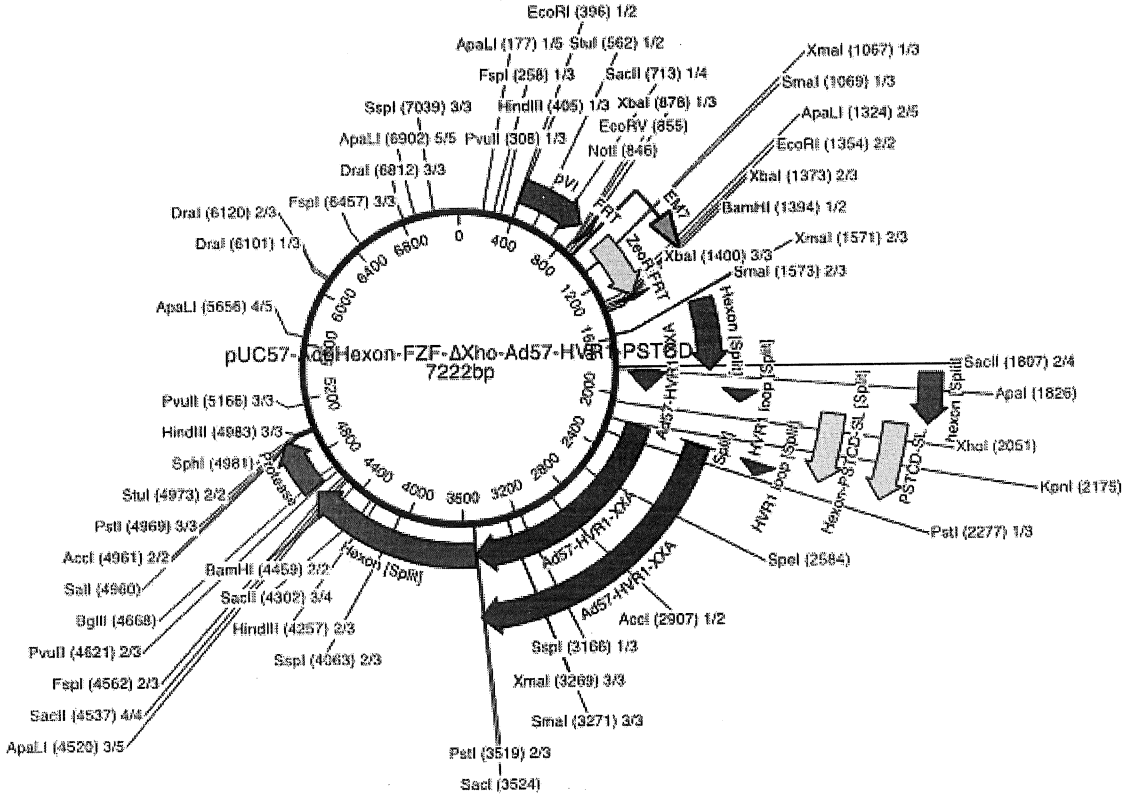

pUC57-Ad57Hexon-FZF-ΔXho-Ad57-HVR1-PSTCD-SL
7222bp
EcoRI (396) 1/2
ApaLI (177) 1/5
SbaI (562) 1/2
FspI (258) 1/3
SacII (713) 1/4
SspI (7039) 3/3
HindIII (405) 1/3
XbaI (876) 1/3
ApaLI (6902) 5/5
PvuII (308) 1/3
EcoRV (855)
DraI (6812) 3/3
NotI (846)
DraI (6120) 2/3
FspI (6457) 3/3
DraI (6101) 1/3
ApaLI (5656) 4/5
PvuII (5166) 3/3
HindIII (4983) 3/3
SphI (4981)
StuI (4973) 2/2
PstI (4969) 3/3
AccI (4961) 2/2
SalI (4960)
BglII (4668)
PvuII (4621) 2/3
FspI (4562) 2/3
SacII (4537) 4/4
ApaLI (4520) 3/5
BamHI (4459) 3/2
SacII (4302) 3/4
HindIII (4257) 2/3
SspI (4063) 2/3
PstI (3519) 2/3
SacI (3524)
SspI (3166) 1/3
XmaI (3269) 3/3
SmaI (3271) 3/3
AccI (2907) 1/2
SpeI (2584)
PstI (2277) 1/3
KpnI (2175)
XhoI (2051)
ApaI (1826)
SacII (1607) 2/4
XmaI (1067) 1/3
SmaI (1069) 1/3
ApaLI (1324) 2/5
EcoRI (1354) 2/2
XbaI (1373) 2/3
BamHI (1394) 1/2
XmaI (1571) 2/3
XbaI (1400) 3/3
SmaI (1573) 2/3
pVI
pIX
EM7
ZeoR
FRT
Hexon (Split)
Ad57-HVR1-XXA
Hexon-PSTCD-SL (Split)
PSTCD-SL
Hexon (Split)
Ad57-HVR1-XXA
Ad57-HVR1-XXA
Hexon (Split)
Ampicillin Resistance

Fig. 34 (tiếp)

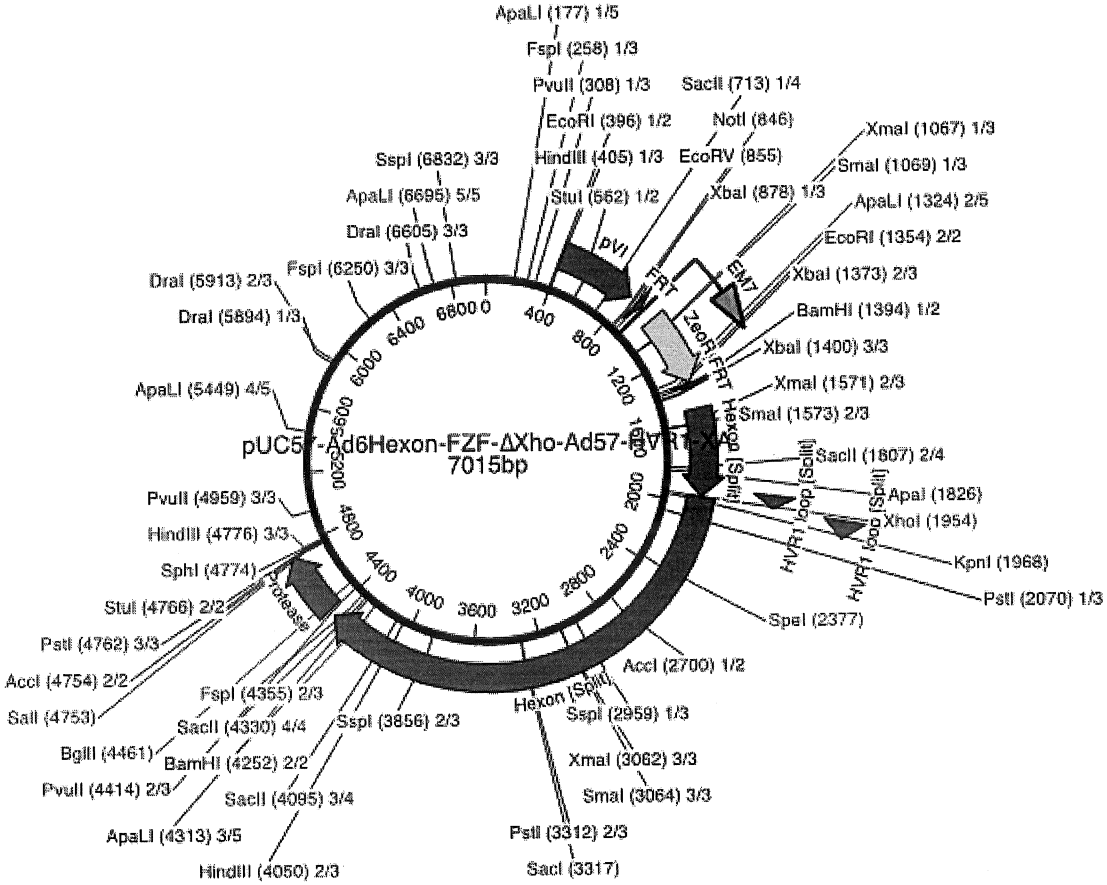

ApaLI (177) 1/5
FspI (258) 1/3
PvuII (308) 1/3
SacII (713) 1/4
EcoRI (396) 1/2
NotI (846)
HindIII (405) 1/3
EcoRV (855)
XmaI (1067) 1/3
SmaI (1069) 1/3
SspI (6832) 3/3
StuI (562) 1/2
XbaI (878) 1/3
ApaLI (1324) 2/5
ApaLI (6695) 5/5
DraI (6605) 3/3
pVI
FRT
EM7
EcoRI (1354) 2/2
FspI (6250) 3/3
DraI (5913) 2/3
DraI (5894) 1/3
ZeoR
FRT
XbaI (1373) 2/3
BamHI (1394) 1/2
XbaI (1400) 3/3
ApaLI (5449) 4/5
XmaI (1571) 2/3
SmaI (1573) 2/3
pUC57-Ad6Hexon-FZF-ΔXho-Ad57-HVR1-Xho
7015bp
SacII (1607) 2/4
ApaI (1826)
XhoI (1954)
PvuII (4959) 3/3
HindIII (4776) 3/3
SphI (4774)
Protease
StuI (4766) 2/2
PstI (4762) 3/3
AccI (4754) 2/2
SalI (4753)
FspI (4355) 2/3
SacII (4330) 4/4
BglII (4461)
BamHI (4252) 2/2
PvuII (4414) 2/3
SacII (4095) 3/4
ApaLI (4313) 3/5
HindIII (4050) 2/3
SspI (3856) 2/3
Hexon (Split)
SspI (2959) 1/3
XmaI (3062) 3/3
SmaI (3064) 3/3
PstI (3312) 2/3
SacI (3317)
SpeI (2377)
AccI (2700) 1/2
KpnI (1968)
PstI (2070) 1/3
HVR1 loop (Split)
HVR1 loop (Split)

Fig. 34 (tiếp)

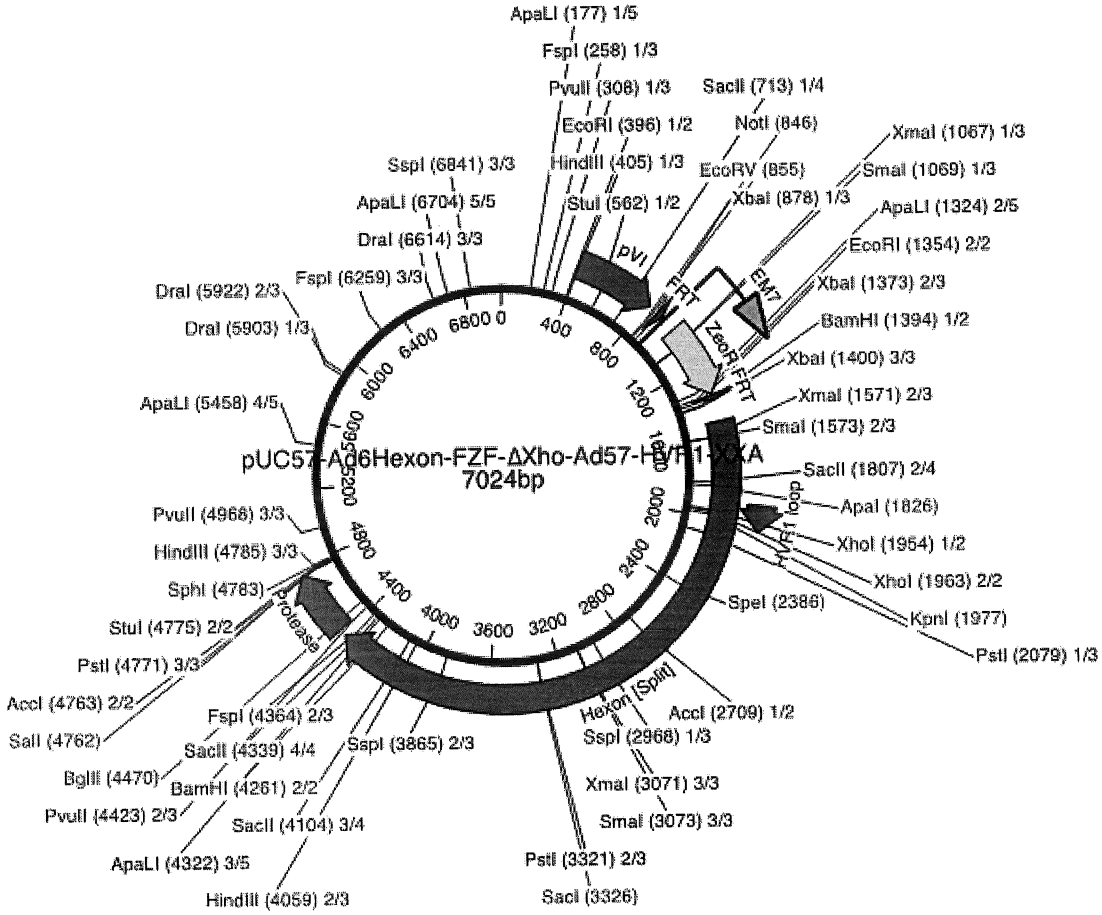

pUC57-Ad6Hexon-FZF-ΔXho-Ad57-HVR1-XXA
7024bp
ApaLI (177) 1/5
FspI (258) 1/3
PvuII (308) 1/3
SacII (713) 1/4
EcoRI (396) 1/2
NotI (846)
HindIII (405) 1/3
EcoRV (855)
XmaI (1067) 1/3
SmaI (1069) 1/3
SspI (6841) 3/3
StuI (562) 1/2
XbaI (878) 1/3
ApaLI (1324) 2/5
ApaLI (6704) 5/5
DraI (6614) 3/3
pVI
FRT
EM7
EcoRI (1354) 2/2
DraI (5922) 2/3
FspI (6259) 3/3
ZeoR
FRT
XbaI (1373) 2/3
DraI (5903) 1/3
BamHI (1394) 1/2
XbaI (1400) 3/3
ApaLI (5458) 4/5
XmaI (1571) 2/3
SmaI (1573) 2/3
SacII (1807) 2/4
ApaI (1826)
HVR1 loop
XhoI (1954) 1/2
PvuII (4966) 3/3
XhoI (1963) 2/2
HindIII (4785) 3/3
SpeI (2386)
SphI (4783)
KpnI (1977)
Protease
StuI (4775) 2/2
PstI (2079) 1/3
PstI (4771) 3/3
AccI (4763) 2/2
FspI (4364) 2/3
Hexon [Split]
AccI (2709) 1/2
SalI (4762)
SacII (4339) 4/4
SspI (3865) 2/3
SspI (2968) 1/3
BglII (4470)
BamHI (4261) 2/2
XmaI (3071) 3/3
PvuII (4423) 2/3
SacII (4104) 3/4
SmaI (3073) 3/3
ApaLI (4322) 3/5
PstI (3321) 2/3
HindIII (4059) 2/3
SacI (3326)

Fig. 34 (tiếp)

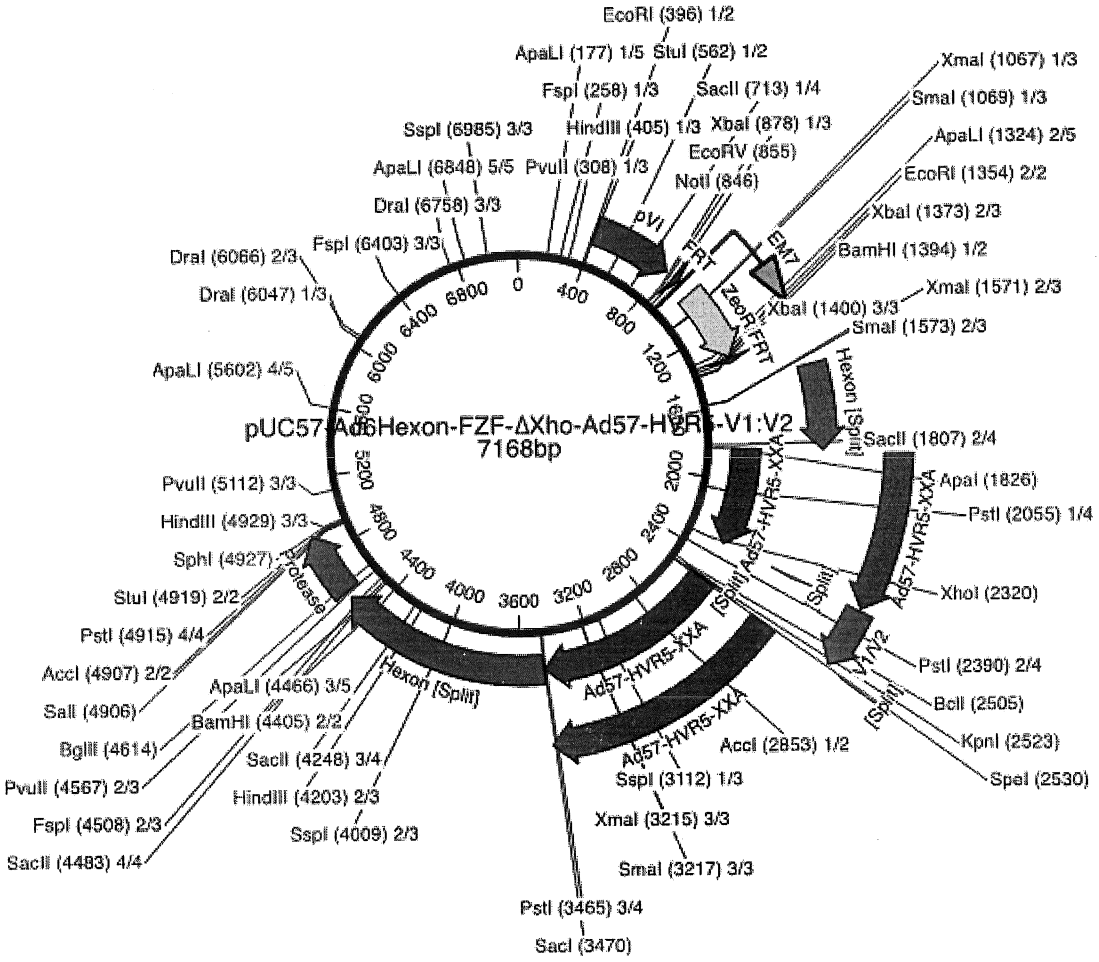

pUC57-Ad6Hexon-FZF-ΔXho-Ad57-HVR5-V1:V2
7168bp
EcoRI (396) 1/2
ApaLI (177) 1/5
StuI (562) 1/2
FspI (258) 1/3
SacII (713) 1/4
HindIII (405) 1/3
XbaI (878) 1/3
SspI (6985) 3/3
EcoRV (855)
ApaLI (6848) 5/5
PvuII (308) 1/3
NotI (846)
DraI (6758) 3/3
pVI
FspI (6403) 3/3
DraI (6066) 2/3
DraI (6047) 1/3
ApaLI (5602) 4/5
PvuII (5112) 3/3
HindIII (4929) 3/3
SphI (4927)
StuI (4919) 2/2
PstI (4915) 4/4
AccI (4907) 2/2
SalI (4906)
BglII (4614)
PvuII (4567) 2/3
FspI (4508) 2/3
SacII (4483) 4/4
ApaLI (4466) 3/5
BamHI (4405) 2/2
SacII (4248) 3/4
HindIII (4203) 2/3
SspI (4009) 2/3
Protease
Hexon [Split]
Ad57-HVR5-XXA
[Split]
Ad57-HVR5-XXA
[Split]
V1:V2
[Split]
AccI (2853) 1/2
SspI (3112) 1/3
XmaI (3215) 3/3
SmaI (3217) 3/3
PstI (3465) 3/4
SacI (3470)
XmaI (1067) 1/3
SmaI (1069) 1/3
ApaLI (1324) 2/5
EcoRI (1354) 2/2
XbaI (1373) 2/3
BamHI (1394) 1/2
XmaI (1571) 2/3
XbaI (1400) 3/3
SmaI (1573) 2/3
EM7
FRT
ZeoR
FRT
Hexon [Split]
SacII (1807) 2/4
ApaI (1826)
PstI (2055) 1/4
XhoI (2320)
PstI (2390) 2/4
BclI (2505)
KpnI (2523)
SpeI (2530)
0
400
800
1200
1600
2000
2400
2800
3200
3600
4000
4400
4800
5200
5600
6000
6400
6800

Fig. 34 (tiếp)

Thêm xystein vào trong HVR Ad657

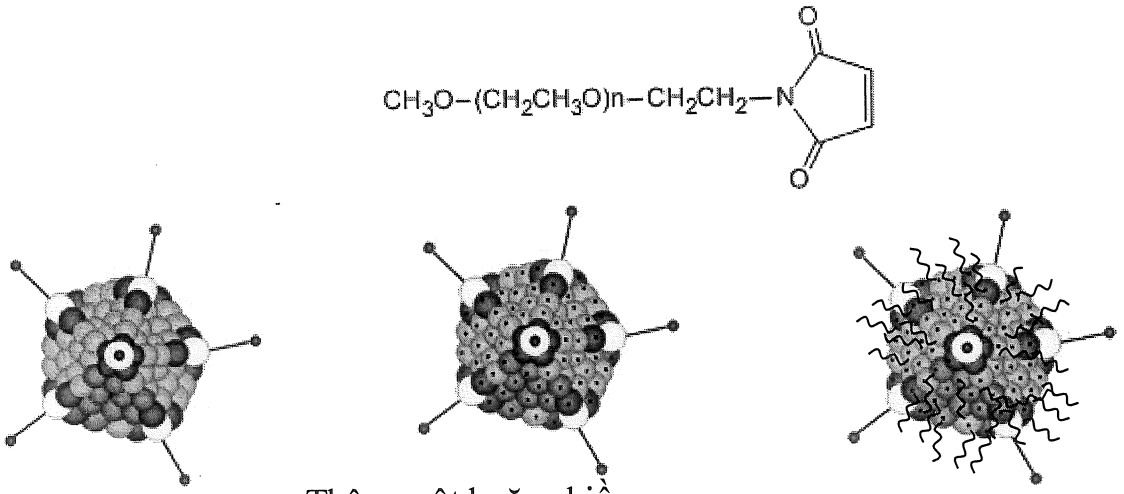
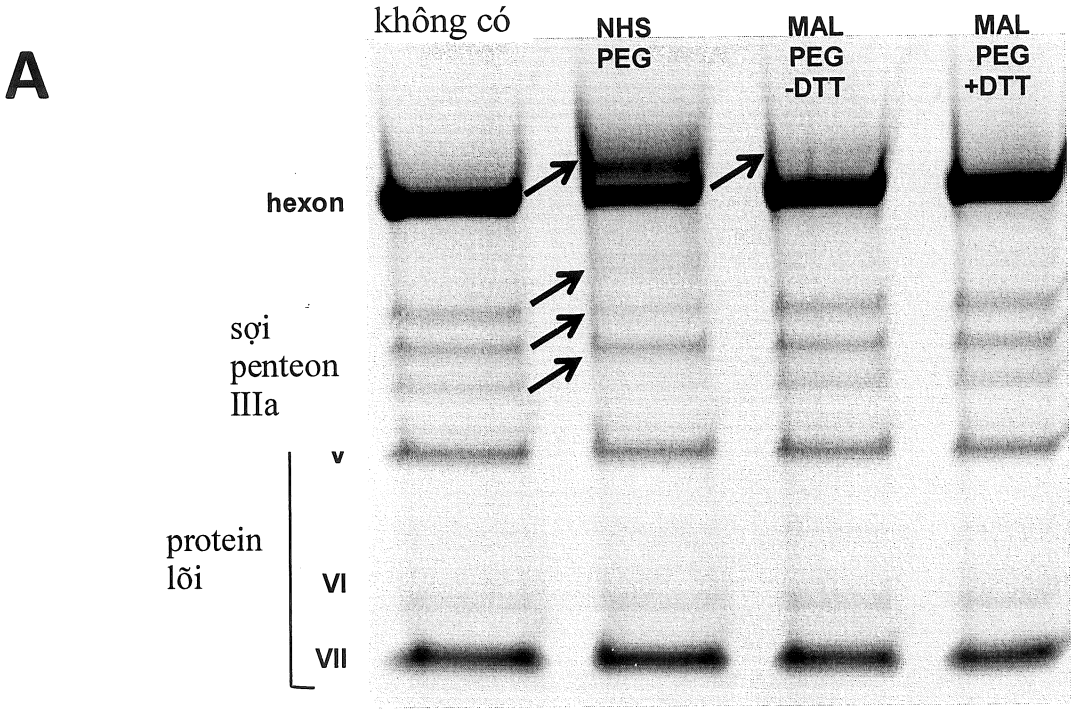


FIG. 35


A
không có
NHS PEG
MAL PEG -DTT
MAL PEG +DTT
hexon
sợi penteon IIIa
protein lõi
V
VI
VII

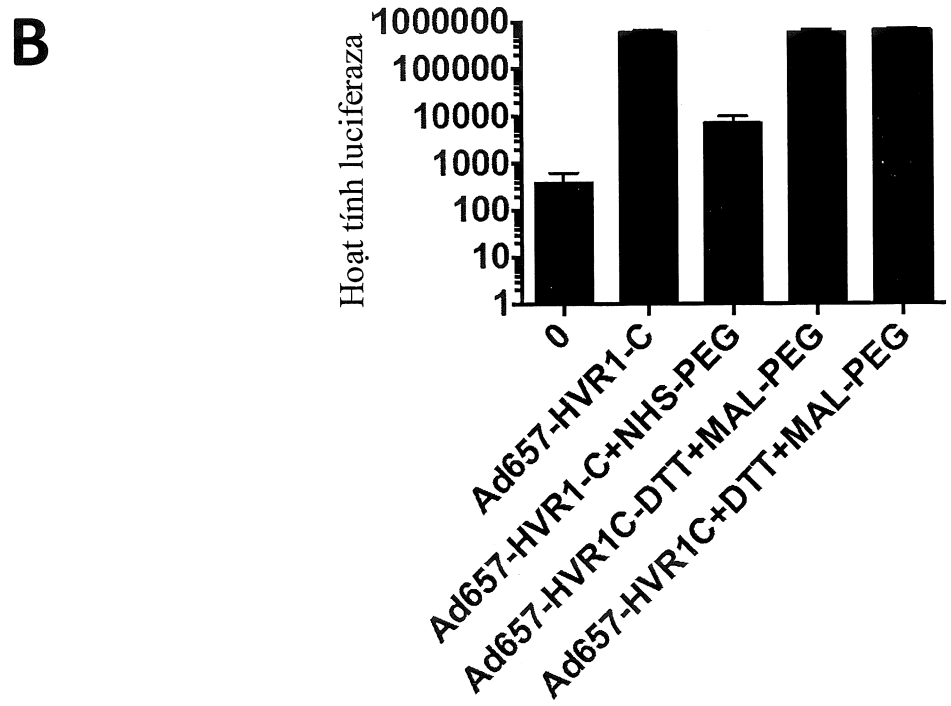
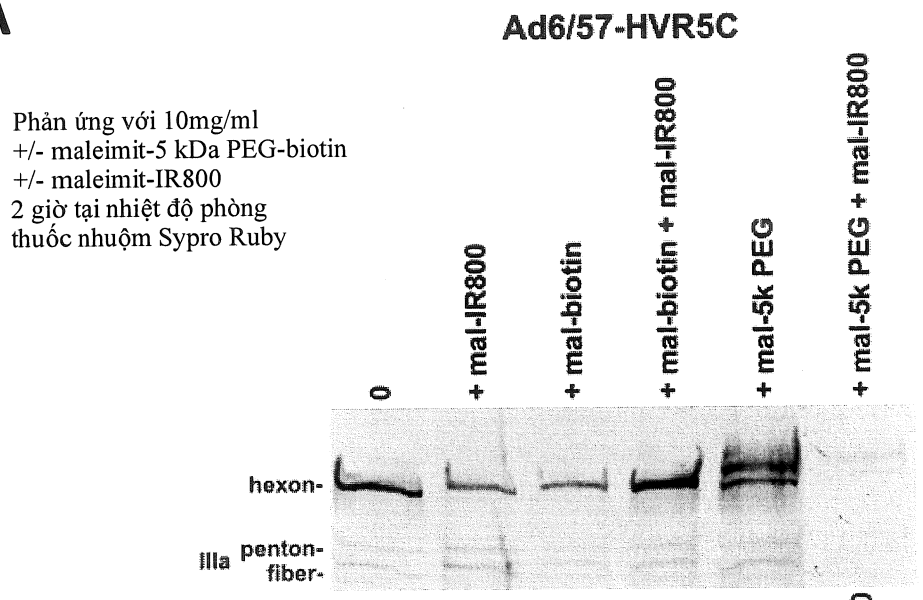
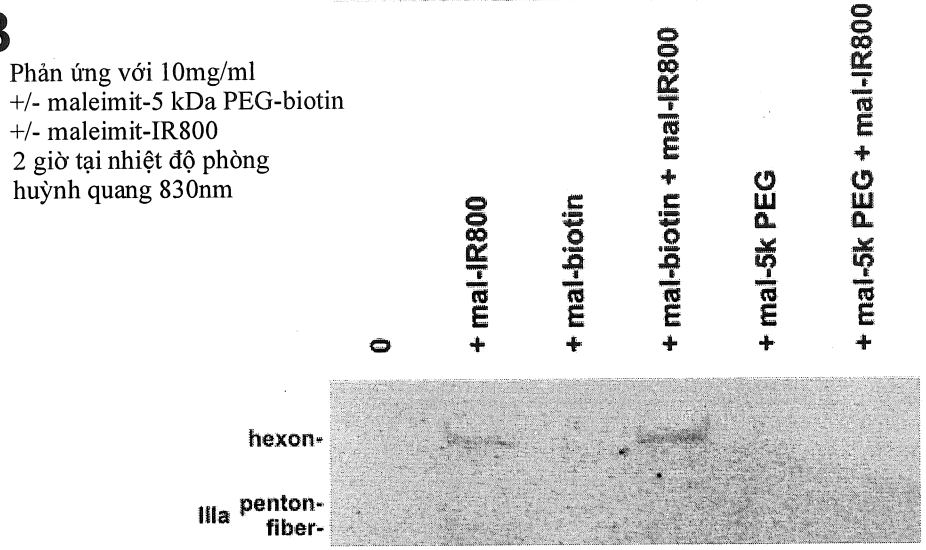

B
Hoạt tính luciferaza
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0
Ad657-HVR1-C
Ad657-HVR1-C+NHS-PEG
Ad657-HVR1C-DTT+MAL-PEG
Ad657-HVR1C+DTT+MAL-PEG

FIG. 36

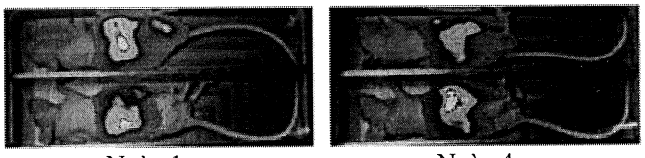
A



B



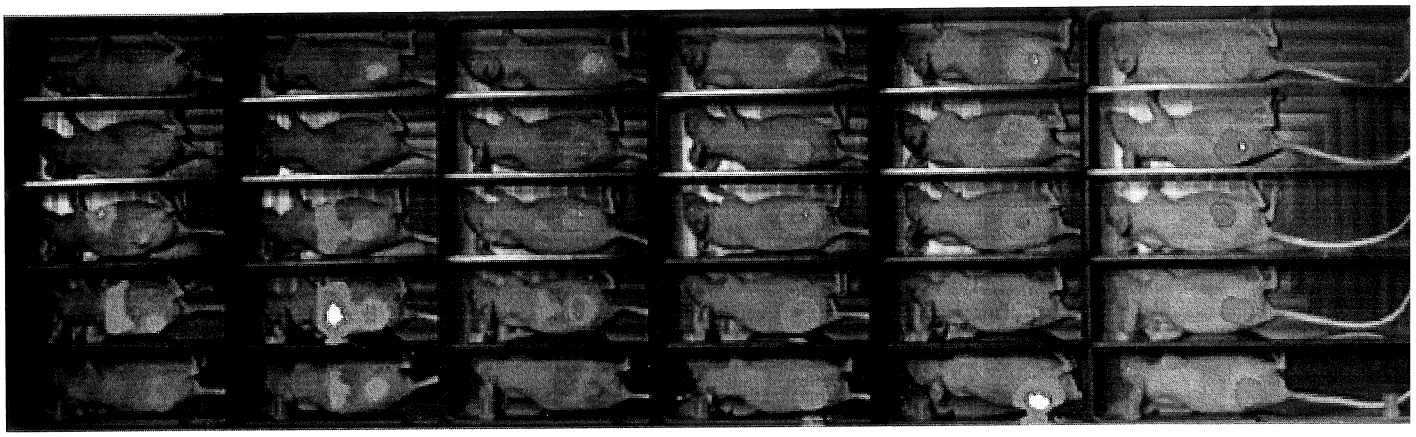
C Chuột cái trụi lông MB11-2013 LNCaP được điều trị với một liều tiêm IP Ad6/57.HVR5.C.GL PEG5KDa 2,35x10e10M/chuột trong 600 uL



Ngày 1 Ngày 4

FIG. 37

A



B

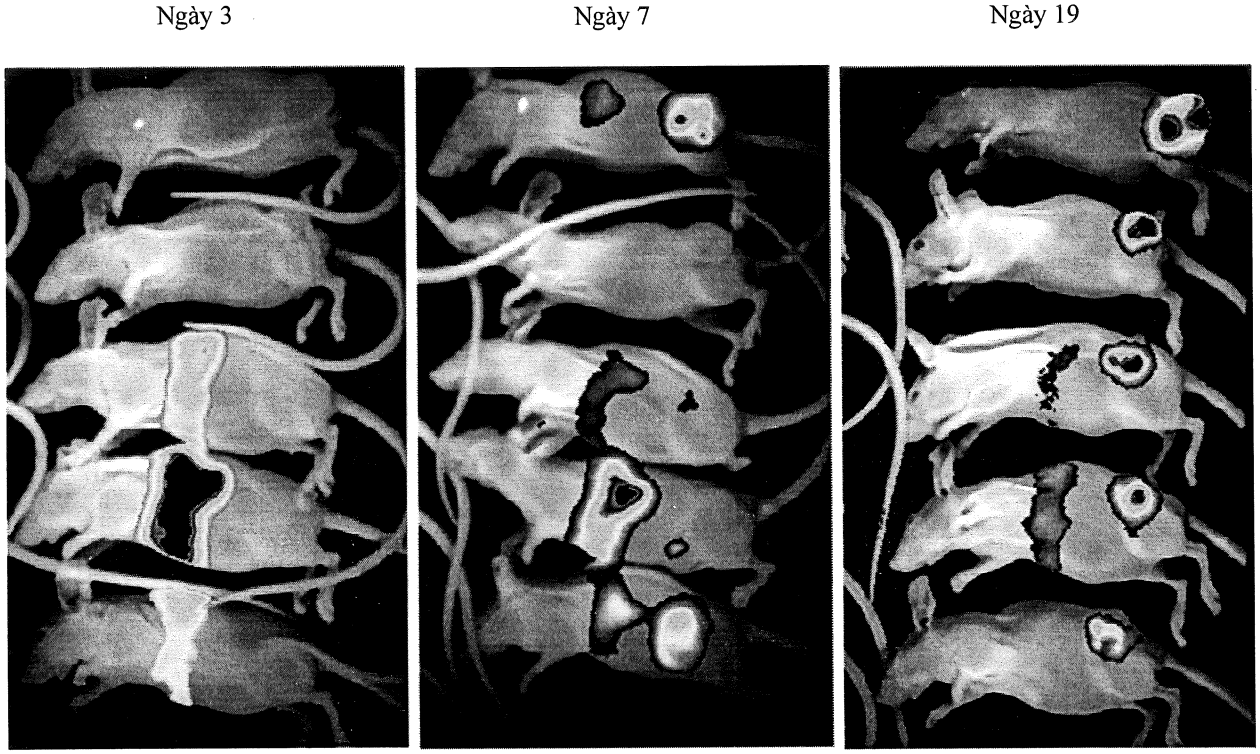


FIG. 38

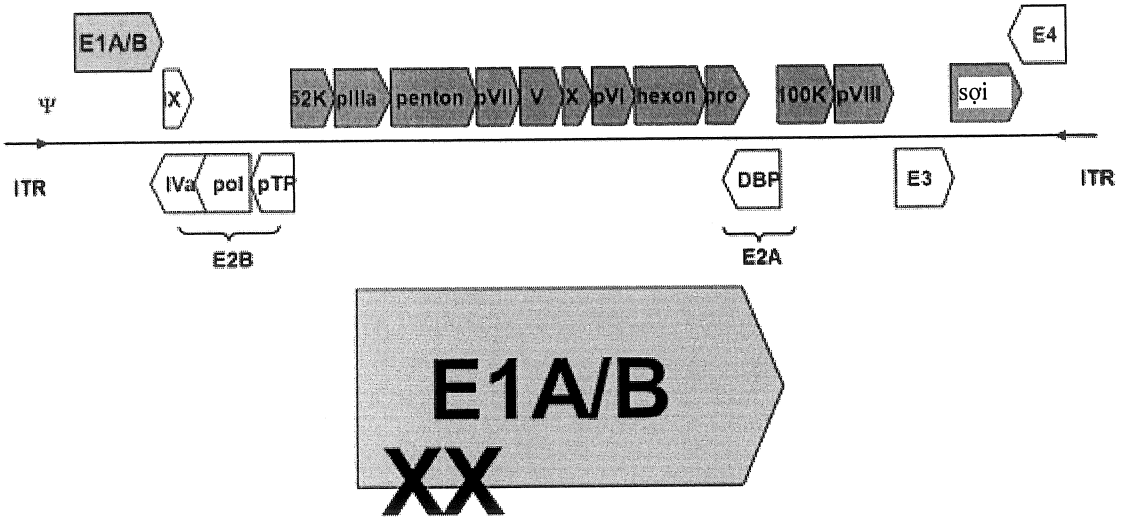

E1A/B
X
Ψ
52K
pIIIa
penton
pVII
V
X
pVI
hexon
pro
100K
pVIII
sqi
E4
ITR
IVa
pol
pTP
DBP
E3
ITR
E2B
E2A
E1A/B
XX

FIG. 39

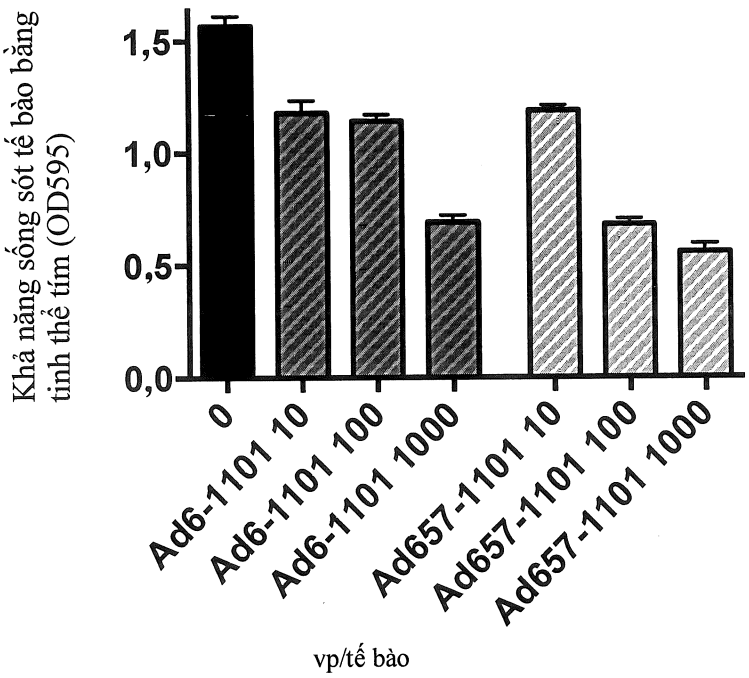

Khả năng sống sót tế bào bằng tinh thể tím (OD595)
1,5
1,0
0,5
0,0
0
Ad6-1101 10
Ad6-1101 100
Ad6-1101 1000
Ad657-1101 10
Ad657-1101 100
Ad657-1101 1000
vp/tế bào

FIG. 40

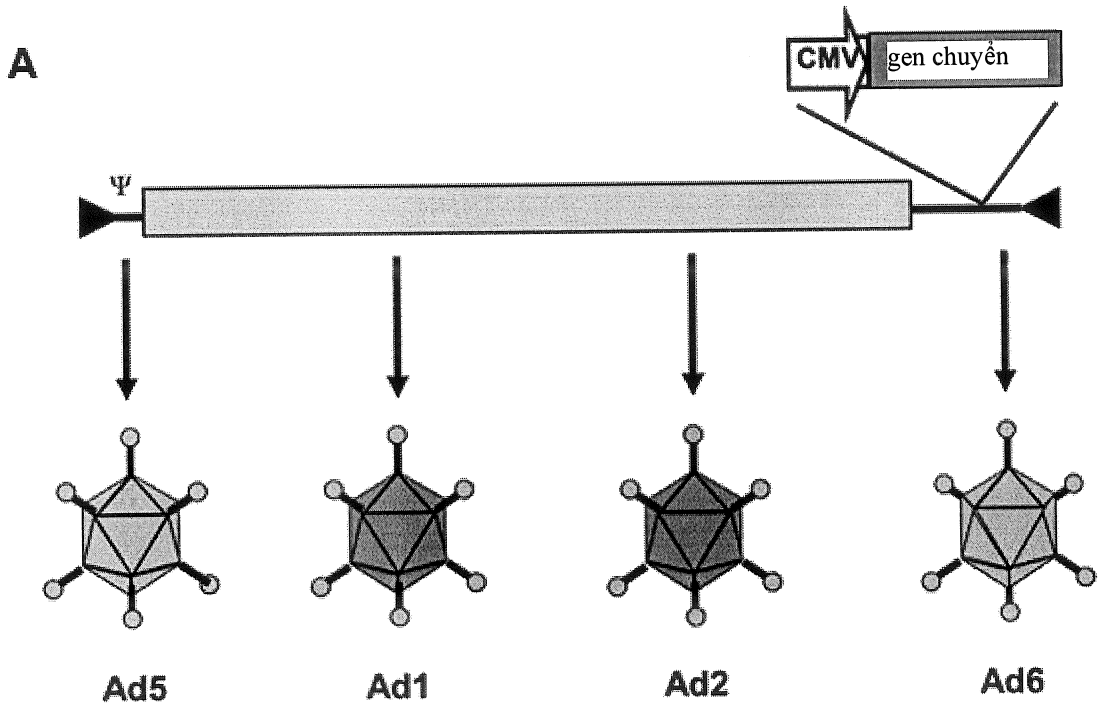
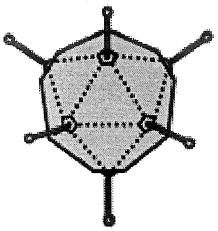

A
CMV
gen chuyển
Ψ
Ad5
Ad1
Ad2
Ad6
B
điều trị đợt 1
Ad hoặc CRAd6
điều trị đợt 2
CRAd6
Ad hoặc CRAd6
điều trị đợt 3
Ad hoặc CRAd6 được phủ polyme (PEG)
điều trị đợt 4
CRAd6 được phủ polyme (PEG)

FIG. 41

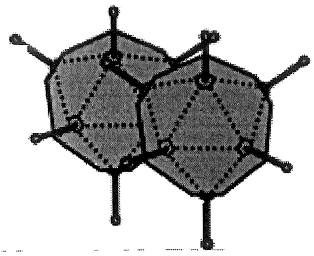
Hướng đích khối u tuyến tiền liệt sau khi chuyển đổi kiểu huyết thanh

điều trị đợt 1

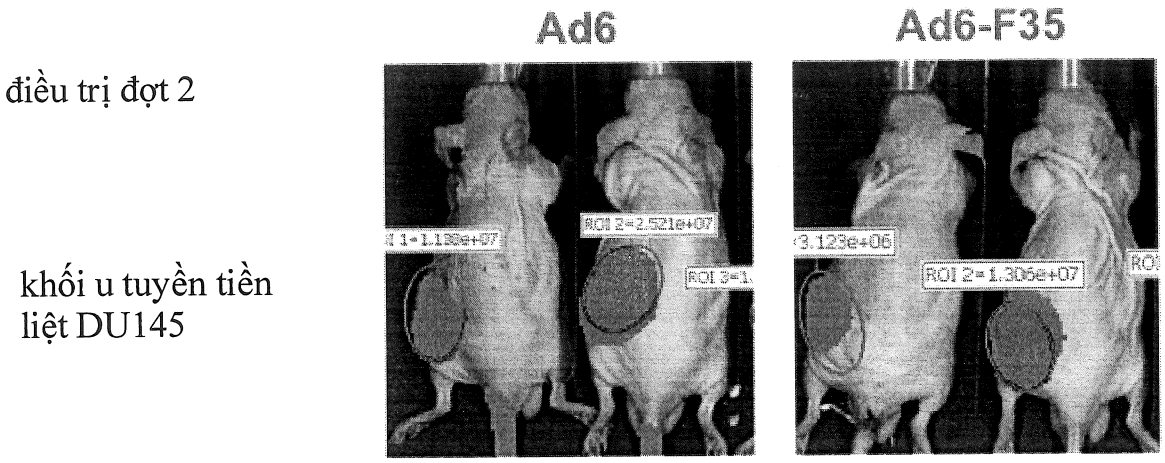


Ad657

điều trị đợt 2



Ad6 hoặc Ad6-F35



hoạt tính luciferaza khối u 3 ngày sau tiêm IV

FIG. 42

RC-Ad



Biểu hiện của E1 được điều khiển bằng vùng gen khởi động E1 bẩm sinh

CRAd-Probasin-E1A (Ad-PB)



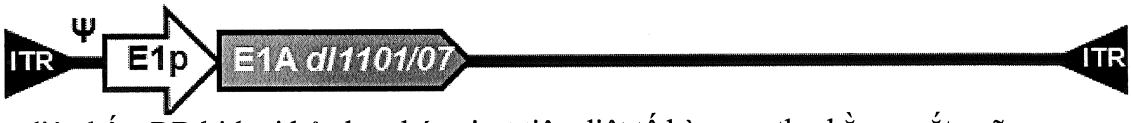
Biểu hiện của E1 được điều khiển bằng vùng gen khởi động probasin đặc hiệu tuyến tiền liệt

CRAd-*dl*1101



Con đường p300 liên kết bị cắt bỏ, nhạy với con đường IFN trong tế bào bình thường

CRAd-*dl*1107



liên kết pRB bị loại bỏ cho phép virut tiêu diệt tế bào ung thư bằng ngắt quãng con đường RB, như xuất hiện trong tế bào bình thường RB+

CRAd-*dl*1101/07



Con đường p300 liên kết bị cắt bỏ, nhạy với con đường IFN trong tế bào bình thường
liên kết pRB bị loại bỏ cho phép virut tiêu diệt tế bào ung thư bằng ngắt quãng con đường RB, như xuất hiện trong tế bào bình thường RB+

FIG. 43

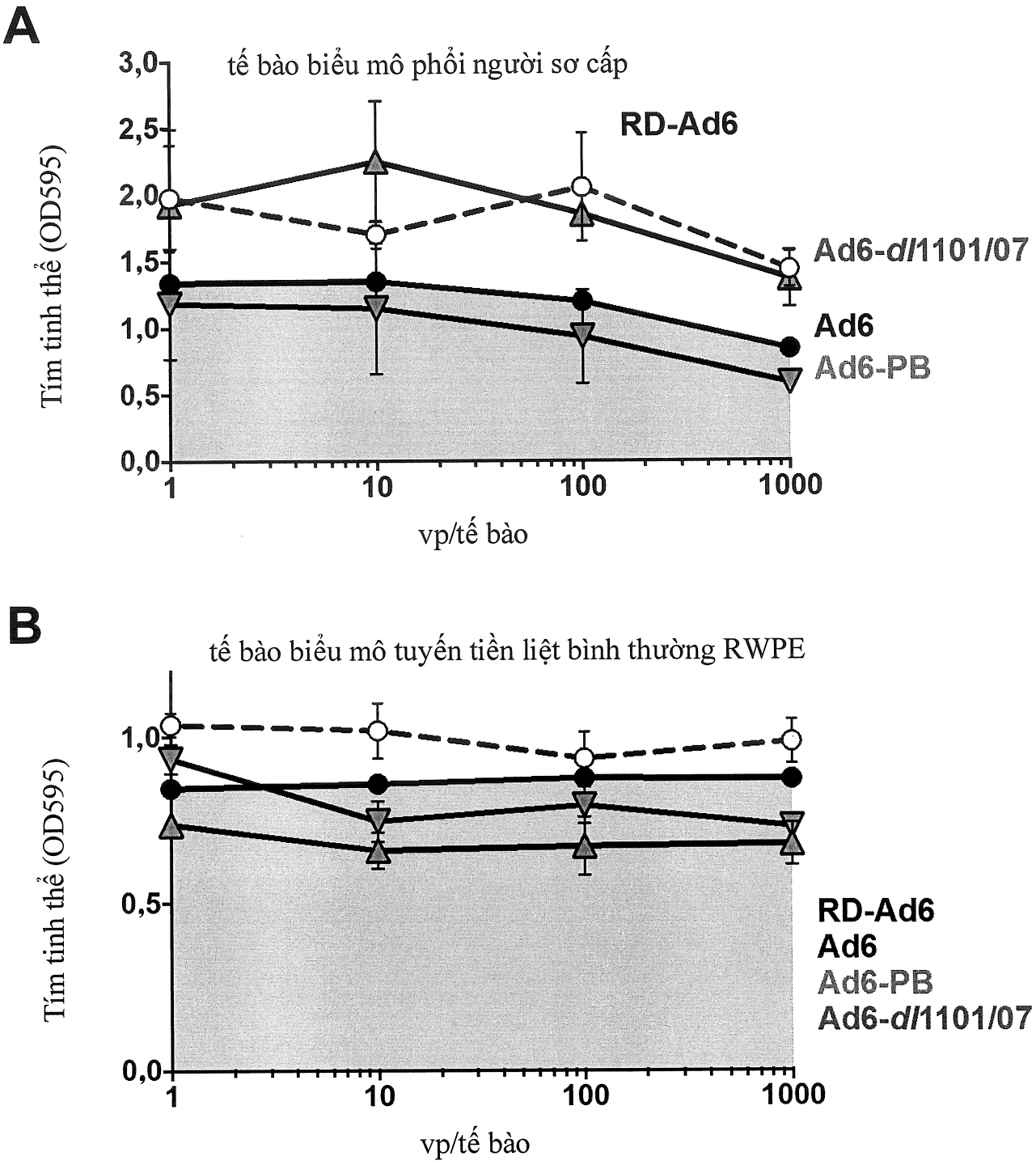

A
tế bào biểu mô phổi người sơ cấp
Tím tinh thể (OD595)
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
1
10
100
1000
vp/tế bào
RD-Ad6
Ad6-dl1101/07
Ad6
Ad6-PB
B
tế bào biểu mô tuyến tiền liệt bình thường RWPE
Tím tinh thể (OD595)
1,0
0,5
0,0
1
10
100
1000
vp/tế bào
RD-Ad6
Ad6
Ad6-PB
Ad6-dl1101/07

FIG. 44

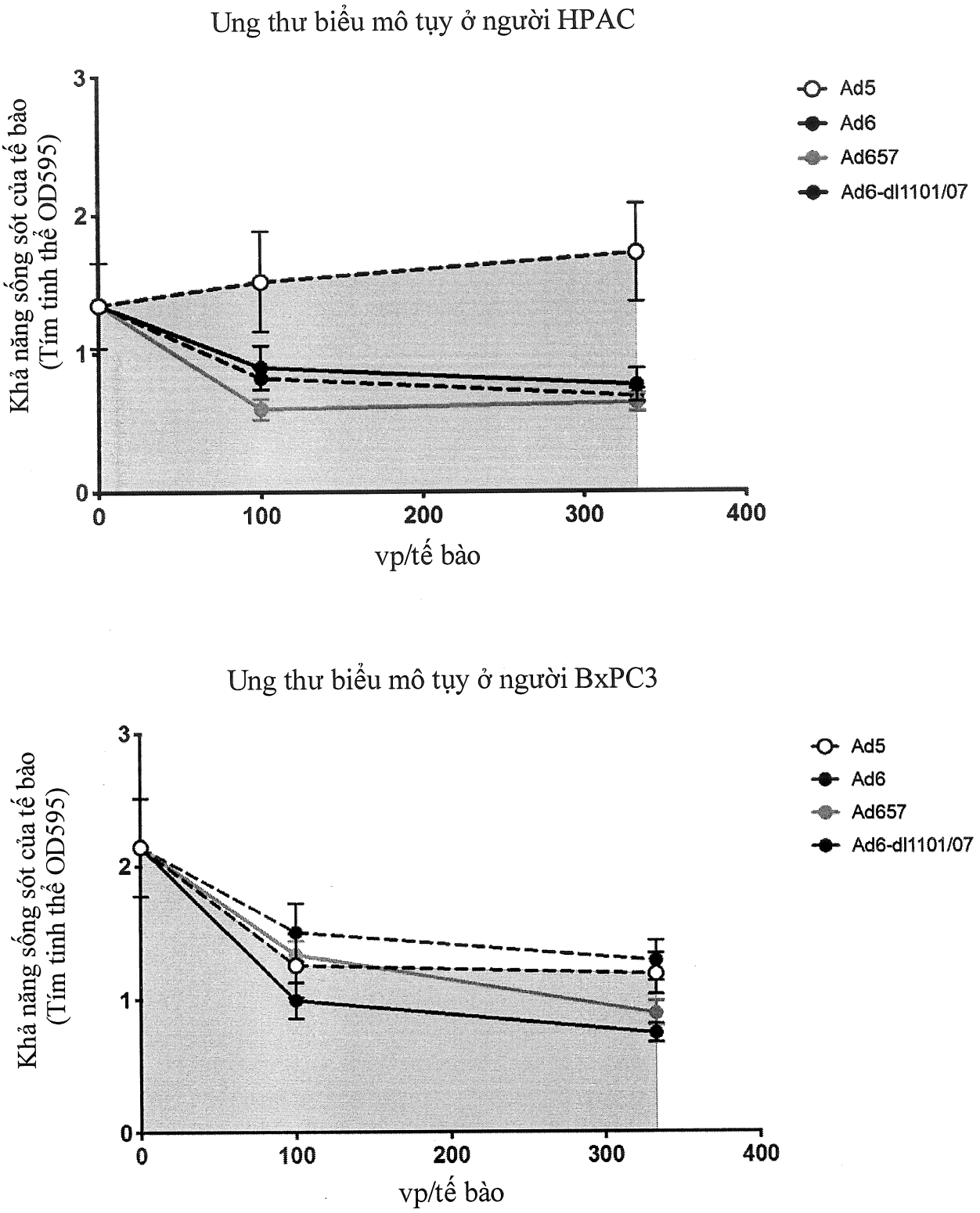

Ung thư biểu mô tụy ở người HPAC
Khả năng sống sót của tế bào
(Tím tinh thể OD595)
3
2
1
0
0
100
200
300
400
vp/tế bào
Ad5
Ad6
Ad657
Ad6-dl1101/07
Ung thư biểu mô tụy ở người BxPC3
Khả năng sống sót của tế bào
(Tím tinh thể OD595)
3
2
1
0
0
100
200
300
400
vp/tế bào
Ad5
Ad6
Ad657
Ad6-dl1101/07

FIG. 45

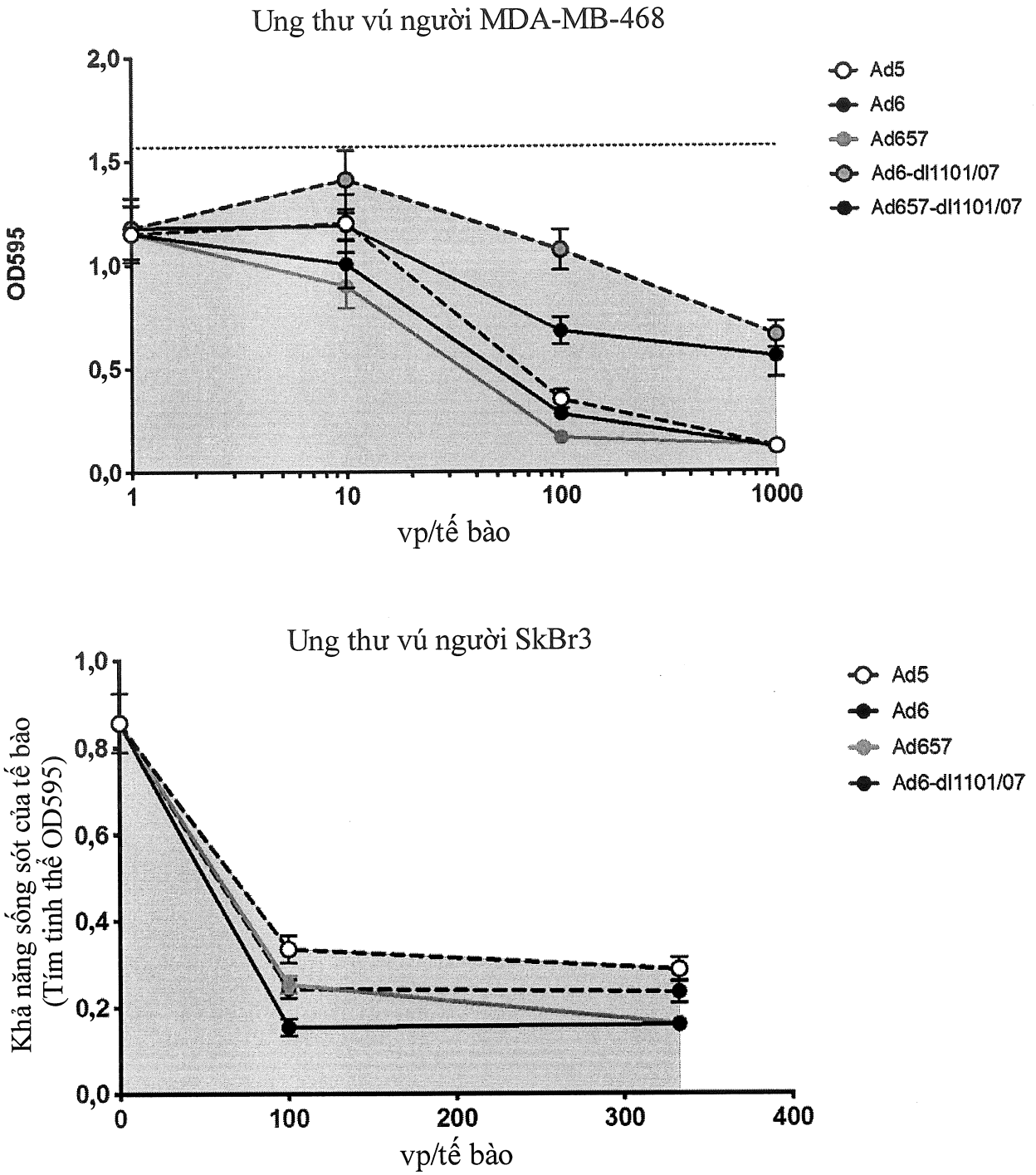

Ung thư vú người MDA-MB-468
OD595
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
1
10
100
1000
vp/tế bào
Ad5
Ad6
Ad657
Ad6-dl1101/07
Ad657-dl1101/07
Ung thư vú người SkBr3
Khả năng sống sót của tế bào
(Tím tinh thể OD595)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0
100
200
300
400
vp/tế bào
Ad5
Ad6
Ad657
Ad6-dl1101/07

FIG. 46

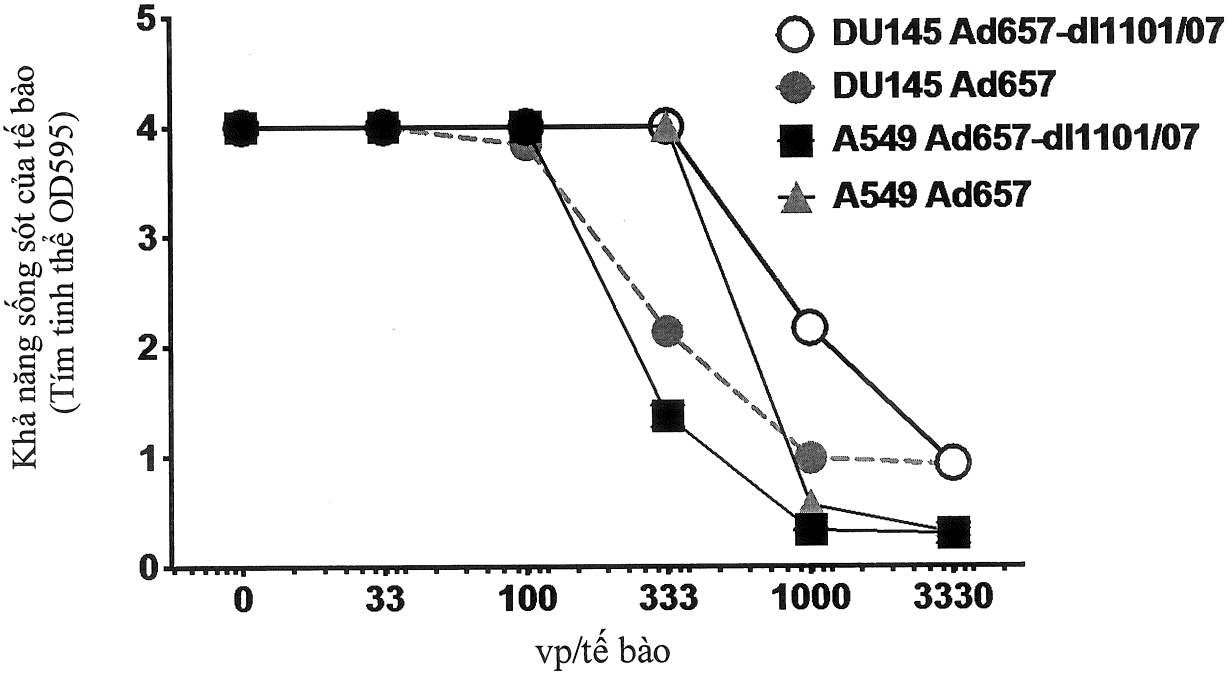

Khả năng sống sót của tế bào
(Tím tinh thể OD595)
5
4
3
2
1
0
0
33
100
333
1000
3330
vp/tế bào
DU145 Ad657-dl1101/07
DU145 Ad657
A549 Ad657-dl1101/07
A549 Ad657

FIG. 47

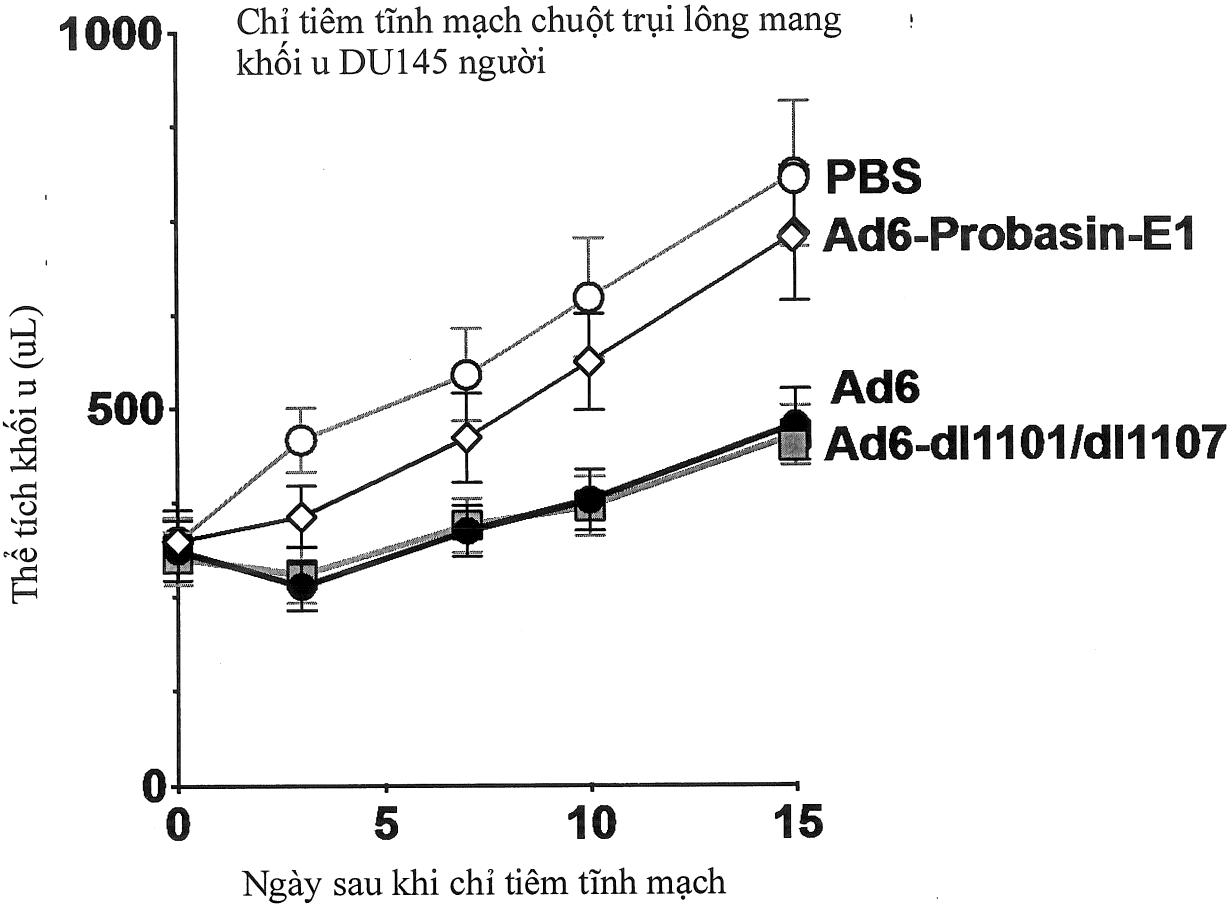

Chỉ tiêm tĩnh mạch chuột trụi lông mang khối u DU145 người
1000
500
0
Thể tích khối u (uL)
0
5
10
15
Ngày sau khi chỉ tiêm tĩnh mạch
PBS
Ad6-Probasin-E1
Ad6
Ad6-dl1101/dl1107

FIG. 48

Khả năng sống sót của việc chỉ tiêm tĩnh mạch Ad DU145

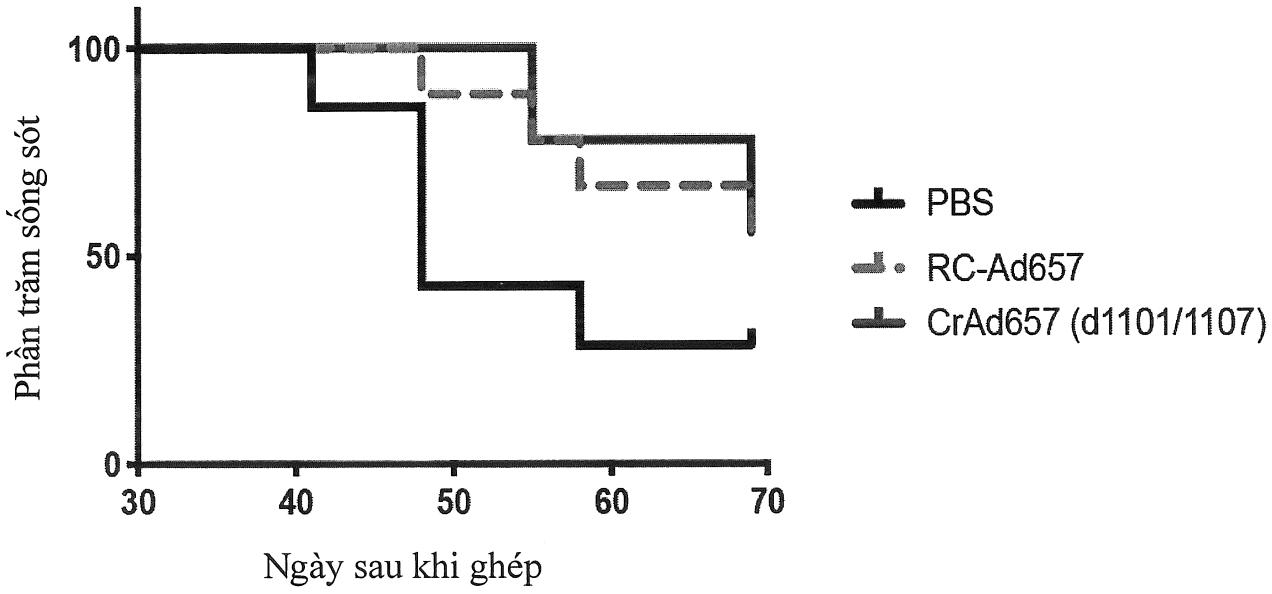
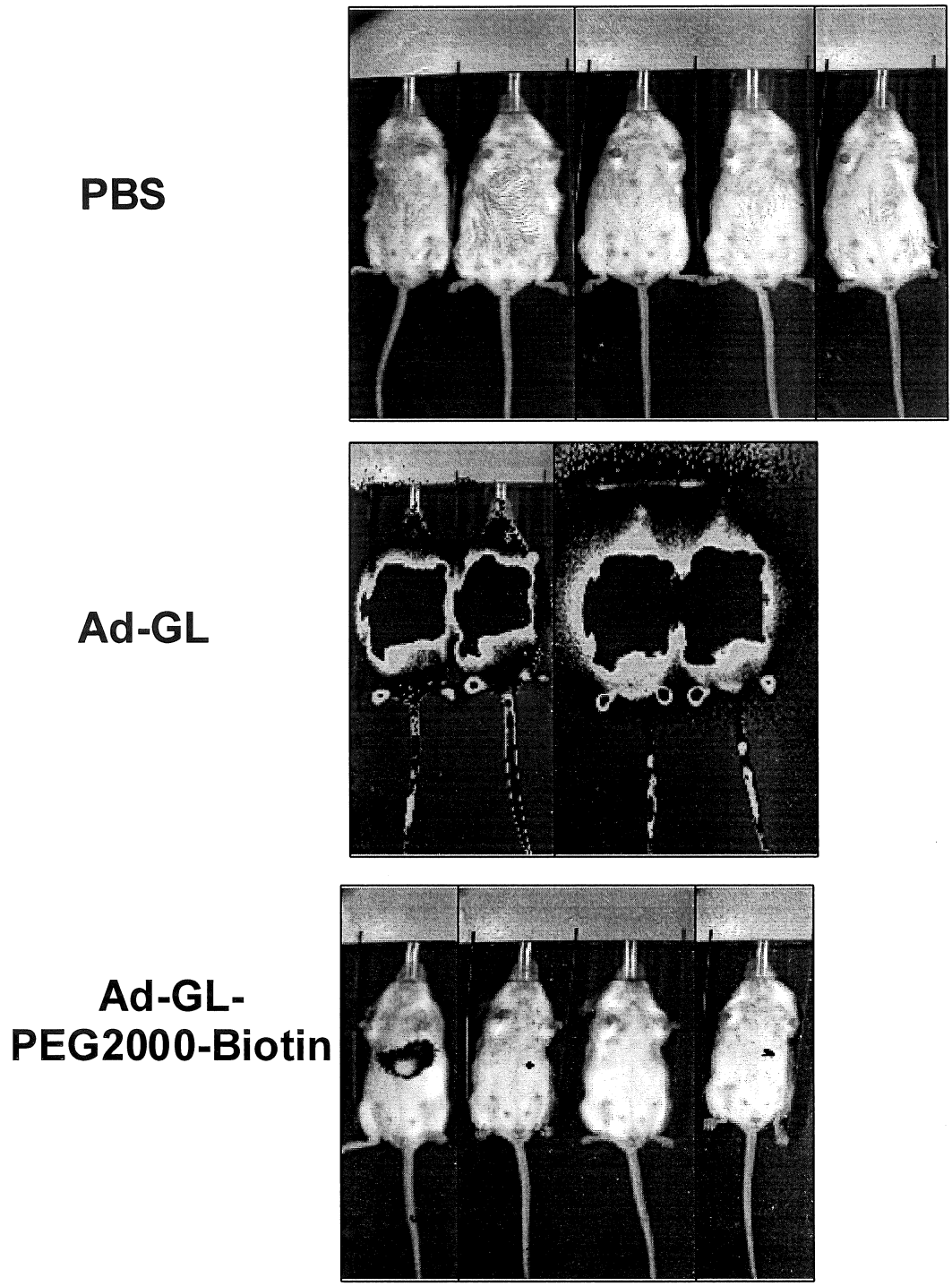


FIG. 49

FIG. 50



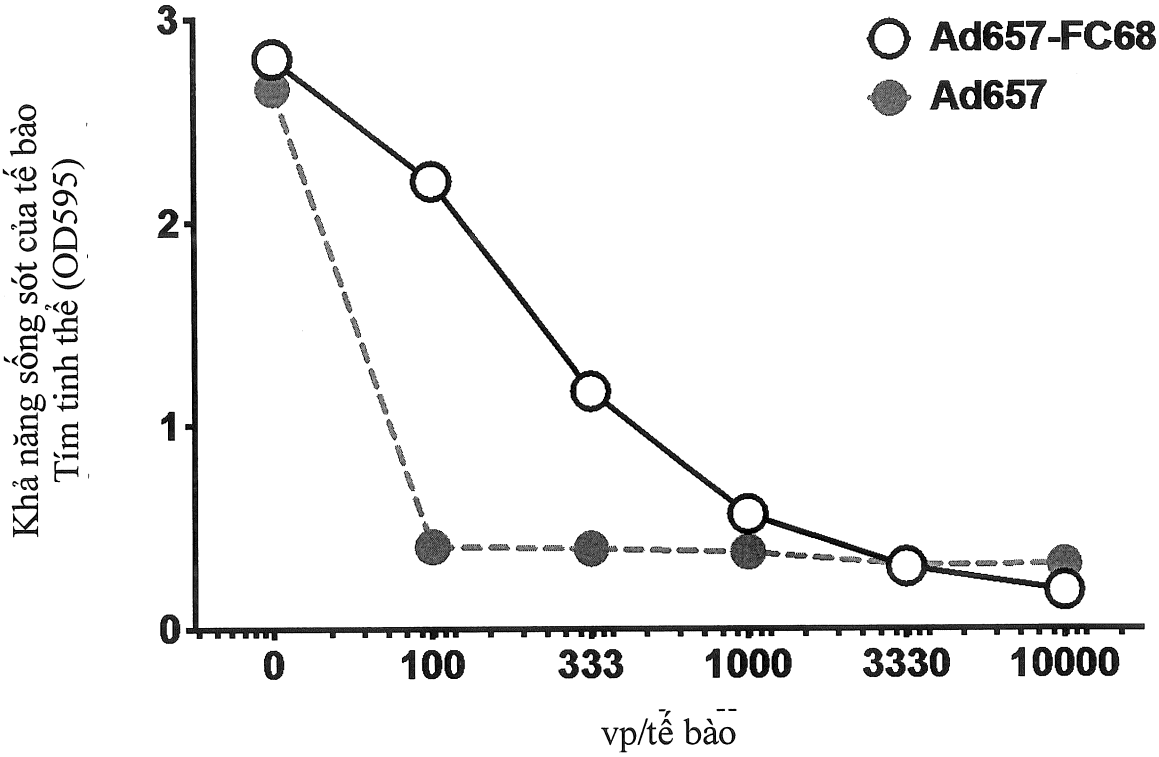

Ad657-FC68
Ad657
Khả năng sống sót của tế bào
Tím tinh thể (OD595)
3
2
1
0
0
100
333
1000
3330
10000
vp/tế bào

FIG. 51

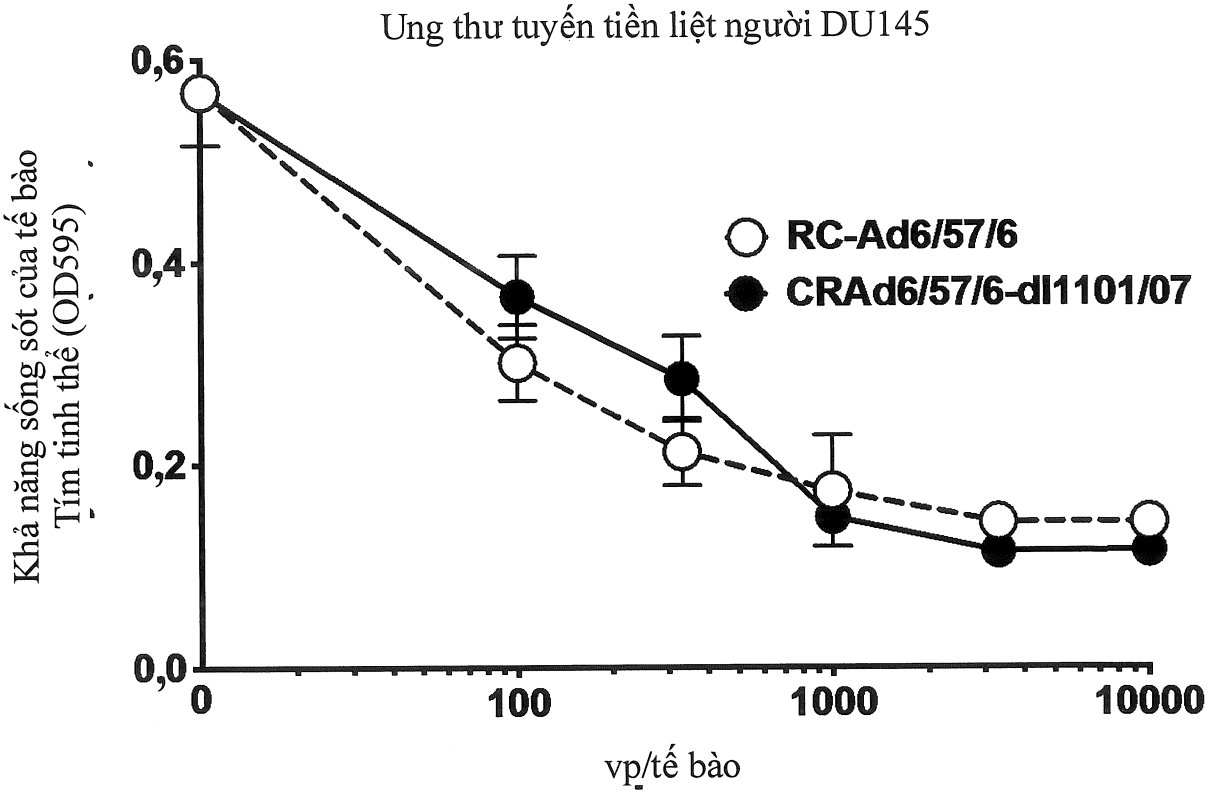

Ung thư tuyến tiền liệt người DU145
Khả năng sống sót của tế bào
Tím tinh thể (OD595)
0,6
0,4
0,2
0,0
0
100
1000
10000
vp/tế bào
RC-Ad6/57/6
CRAd6/57/6-dl1101/07

FIG. 52

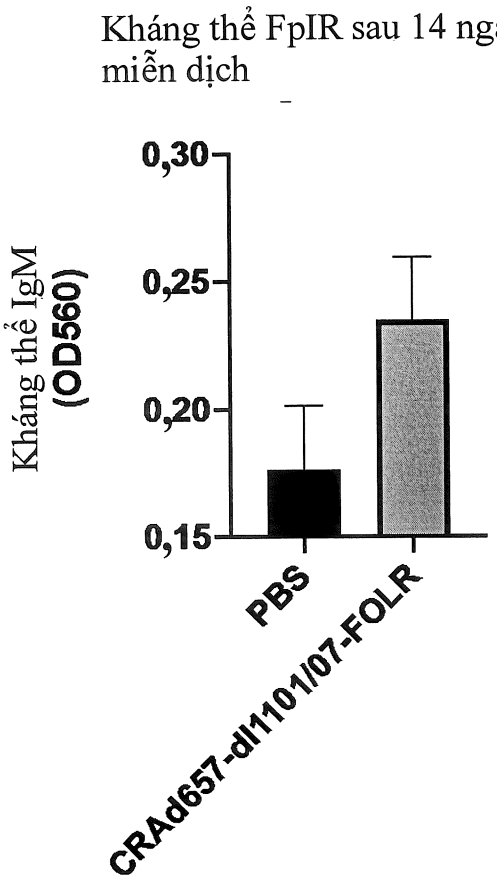

Kháng thể FpIR sau 14 ngày tạo miễn dịch
Kháng thể IgM (OD560)
0,30
0,25
0,20
0,15
PBS
CRAd657-dl1101/07-FOLR

FIG. 53

FIG. 54

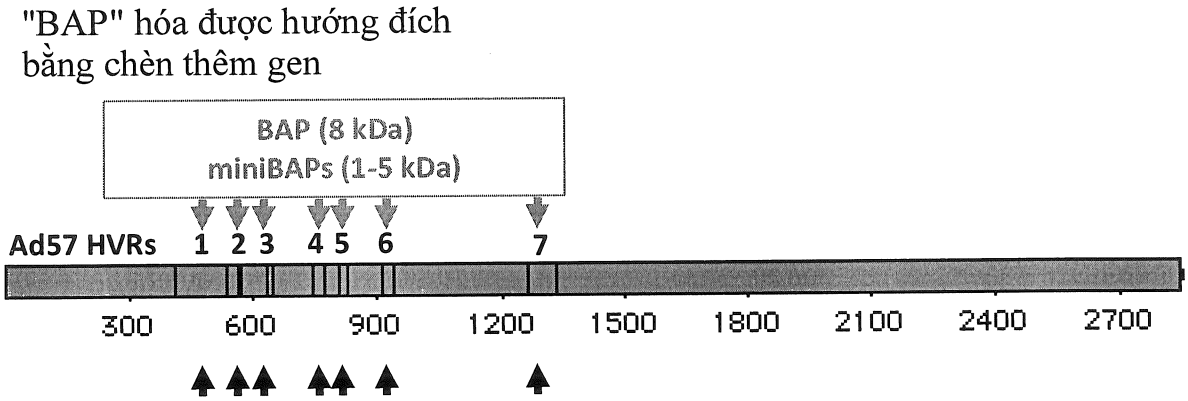

"BAP" hóa được hướng đích
bằng chèn thêm gen
BAP (8 kDa)
miniBAPs (1-5 kDa)
Ad57 HVRs
1 2 3 4 5 6 7
300 600 900 1200 1500 1800 2100 2400 2700
PEGyl hóa được hướng đích
bằng maleimit PEG

FIG. 55

RC-Ad



biểu hiện E1 được điều khiển bằng vùng gen khởi đầu E1 bẩm sinh

CRAd-Probasin-E1A (Ad-PB)



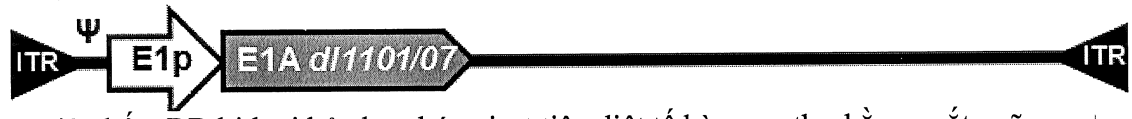
biểu hiện E1 được điều khiển bằng vùng gen khởi đầu probasin đặc hiệu tuyến tiền liệt

CRAd-*dl*1101



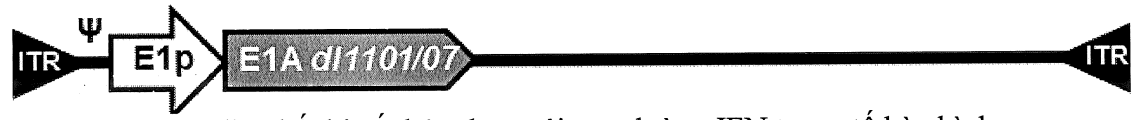
Con đường p300 liên kết bị cắt bỏ, nhạy với con đường IFN trong tế bào bình thường

CRAd-*dl*1107



Liên kết pRB bị loại bỏ cho phép virut tiêu diệt tế bào ung thư bằng ngắt quãng con đường RB, như xuất hiện trong tế bào bình thường RB+

CRAd-*dl*1101/07



Con đường p300 liên kết bị cắt bỏ, nhạy với con đường IFN trong tế bào bình thường
liên kết pRB bị loại bỏ cho phép virut tiêu diệt tế bào ung thư bằng ngắt quãng con đường RB, như xuất hiện trong tế bào bình thường RB+

Đầu N của E1A kiểu dại

MRHIICHGGVITEEMAASLLDQLIEEVLADNLPPPSHFEPPTLHELYDLDVT
APEDPNEEAVSQIFPESVMLAVQEGIDLFTFPPAPGSPEPPHLSRQPEQP
EQRALGPVSMPNLVPEVIDLTCHEAGFPPS (SEQ ID NO:42)

Đầu N của E1A dl1101

MRHIEEVLADNLPPPSHFEPPTLHELYDLDVTAPEDPNEEAVSQIFPESV
MLAVQEGIDLFTFPPAPGSPEPPHLSRQPEQPEQRALGPVSMPNLVPEVI
DLTCHEAGFPPS (SEQ ID NO:43)

Đầu N của E1A dl1107

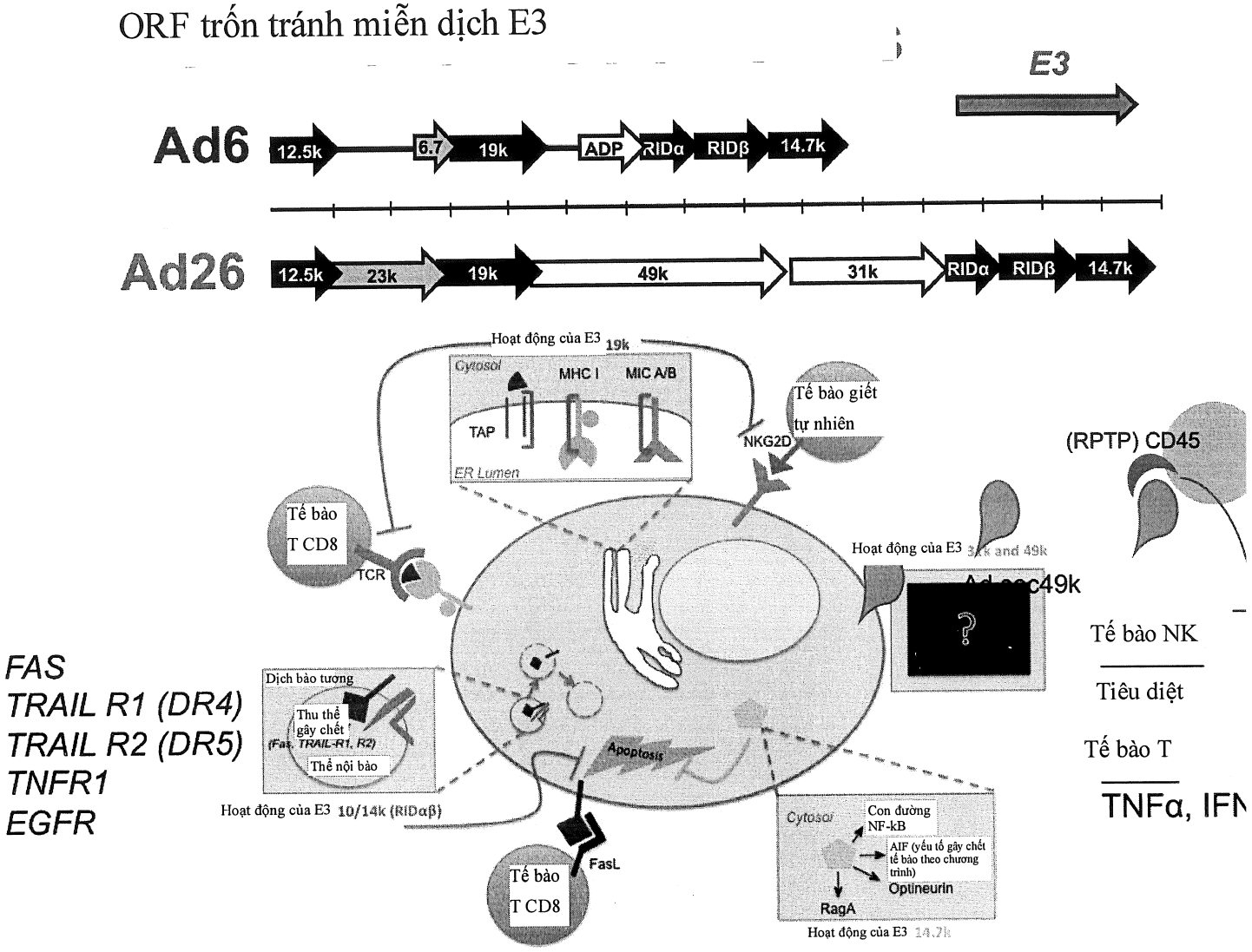
MRHIICHGGVITEEMAASLLDQLIEEVLADNLPPPSHFEPPTLHELYDLDVT
APEDPNEEAVSQIFPESVMLAVQEGIDLFTFPPAPGSPEPPHLSRQPEQP
EQRALGPVCHEAGFPPS (SEQ ID NO:44)

Đầu N của E1A dl1101/dl1107

MRHIEEVLADNLPPPSHFEPPTLHELYDLDVTAPEDPNEEAVSQIFPESV
MLAVQEGIDLFTFPPAPGSPEPPHLSRQPEQPEQRALGPVCHEAGFPPS
(SEQ ID NO:45)

FIG. 56

FIG. 57


ORF trốn tránh miễn dịch E3
E3
Ad6
12.5k
6.7
19k
ADP
RIDα
RIDβ
14.7k
Ad26
12.5k
23k
19k
49k
31k
RIDα
RIDβ
14.7k
Hoạt động của E3 19k
Cytosol
MHC I
MIC A/B
TAP
ER Lumen
Tế bào giết tự nhiên
NKG2D
(RPTP) CD45
Tế bào T CD8
TCR
Hoạt động của E3
Ad
49k
?
Tế bào NK
Tiêu diệt
Tế bào T
TNFα, IFN
FAS
TRAIL R1 (DR4)
TRAIL R2 (DR5)
TNFR1
EGFR
Dịch bào tương
Thu thể gây chết
(Fas, TRAIL-R1, R2)
Thể nội bào
Hoạt động của E3 10/14k (RIDαβ)
Apoptosis
Cytosol
Con đường NF-kB
AIF (yếu tố gây chết tế bào theo chương trình)
Optineurin
RagA
Hoạt động của E3 14.7k
Tế bào T CD8
FasL

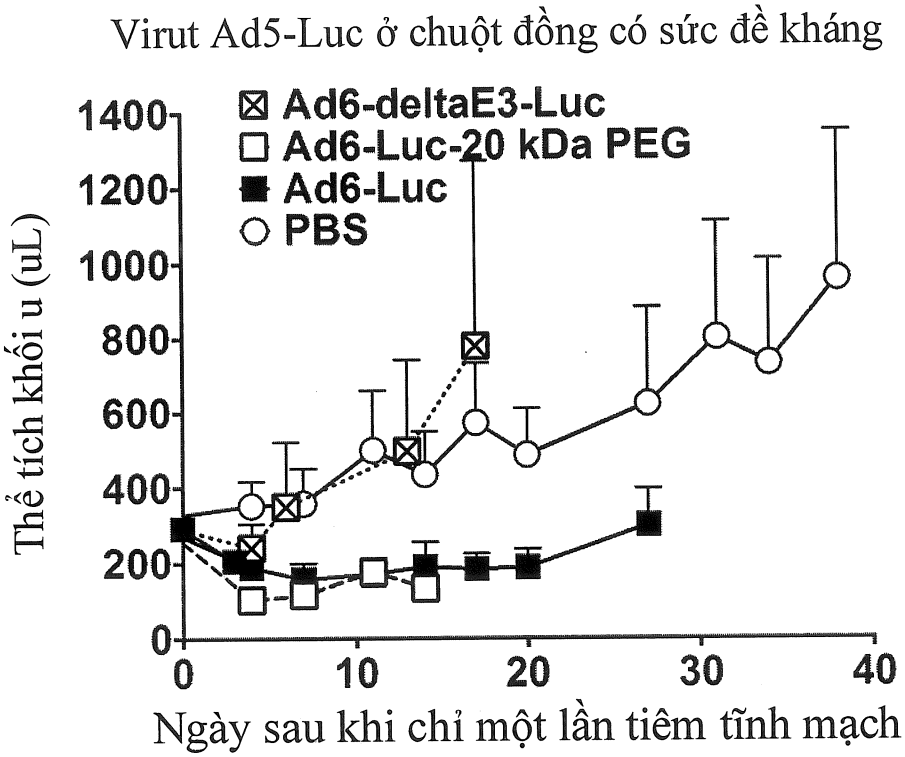

Virut Ad5-Luc ở chuột đồng có sức đề kháng
Ad6-deltaE3-Luc
Ad6-Luc-20 kDa PEG
Ad6-Luc
PBS
Thể tích khối u (uL)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
Ngày sau khi chỉ một lần tiêm tĩnh mạch

FIG. 58

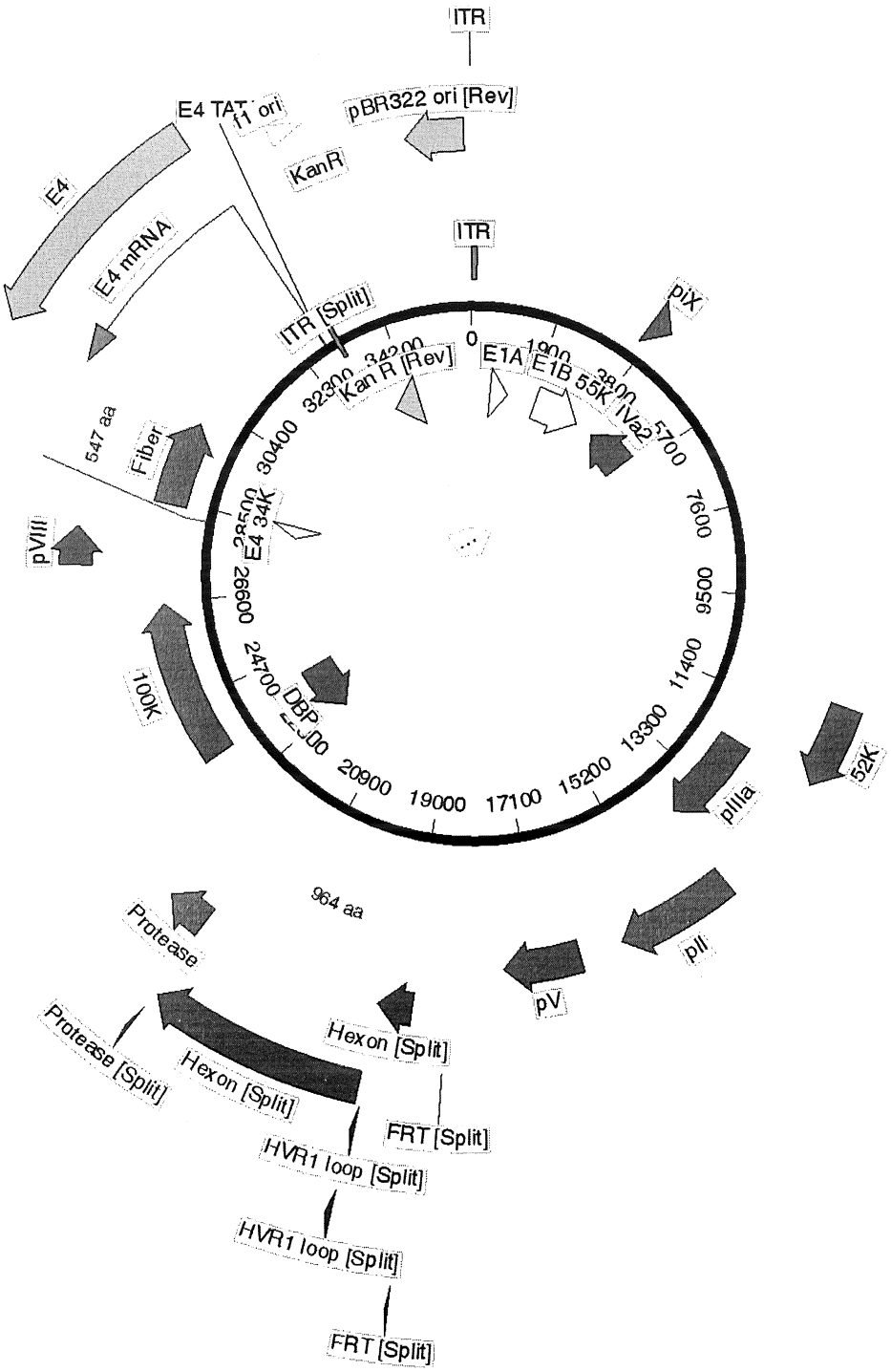

ITR
pBR322 ori [Rev]
E4 TAT
f1 ori
KanR
E4
E4 mRNA
ITR
ITR [Split]
pIX
0
E1A
E1B 55K
IVa2
5700
7600
9500
11400
13300
15200
17100
19000
20900
22800
24700
26600
28500
30400
32300
34200
Kan R [Rev]
547 aa
Fiber
pVIII
E4 34K
100K
DBP
52K
pIIIa
pII
pV
964 aa
Protease
Protease [Split]
Hexon [Split]
Hexon [Split]
FRT [Split]
HVR1 loop [Split]
HVR1 loop [Split]
FRT [Split]

FIG. 59

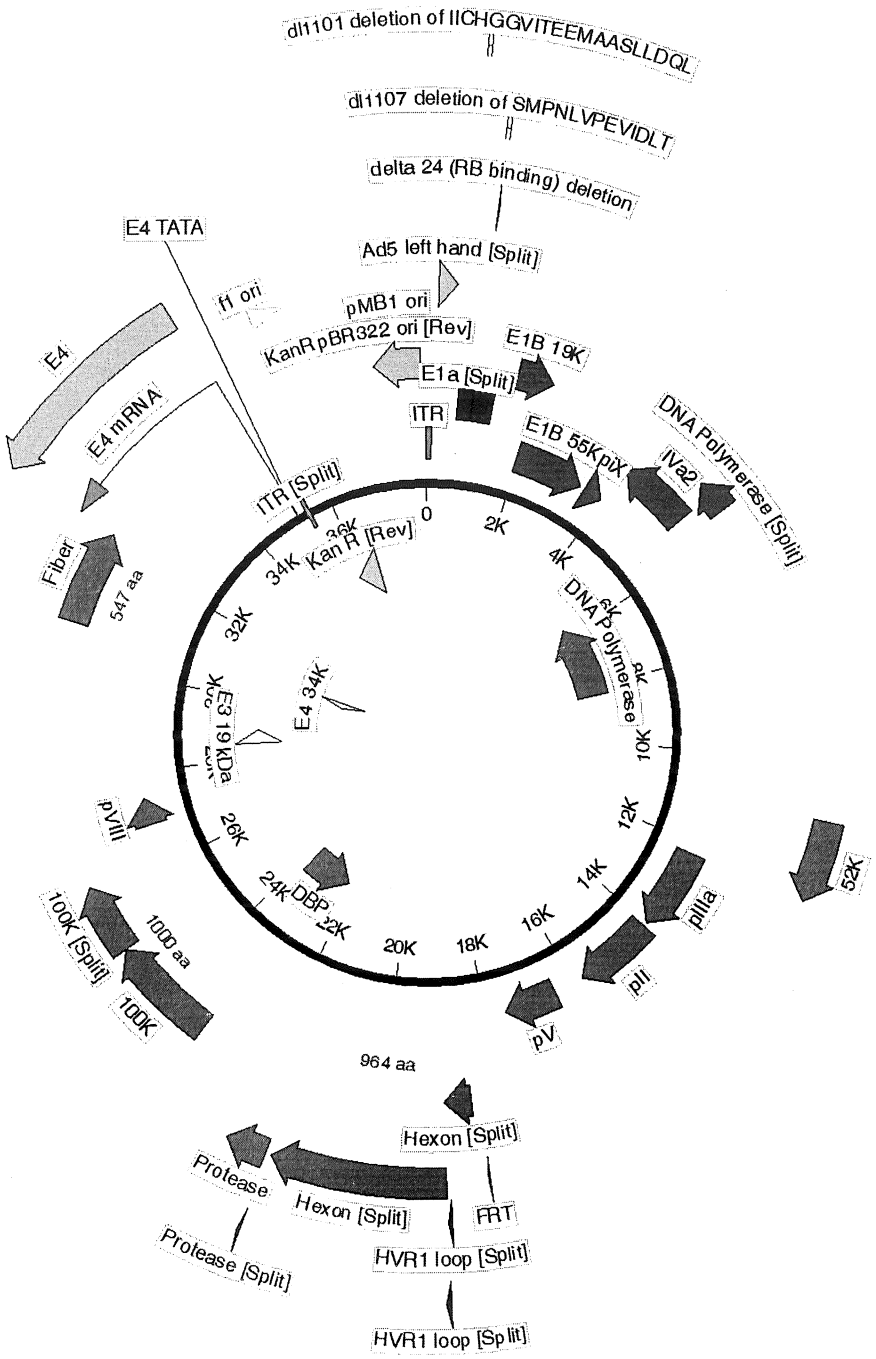

dl1101 deletion of IICHGGVITEEMAASLLDQL
dl1107 deletion of SMPNLVPEVIDLT
delta 24 (RB binding) deletion
Ad5 left hand [Split]
E4 TATA
f1 ori
pMB1 ori
KanR pBR322 ori [Rev]
E1B 19K
E1a [Split]
ITR
E1B 55K
pIX
IVa2
DNA Polymerase [Split]
E4
E4 mRNA
ITR [Split]
Fiber
547 aa
Kan R [Rev]
0
2K
4K
6K
8K
10K
12K
14K
16K
18K
20K
22K
24K
26K
28K
30K
32K
34K
36K
DNA Polymerase
E4 34K
E3 19 kDa
pVIII
100K [Split]
1000 aa
100K
DBP
pIIIa
pIII
pV
52K
964 aa
Hexon [Split]
Protease
Hexon [Split]
FRT
Protease [Split]
HVR1 loop [Split]
HVR1 loop [Split]

FIG. 60

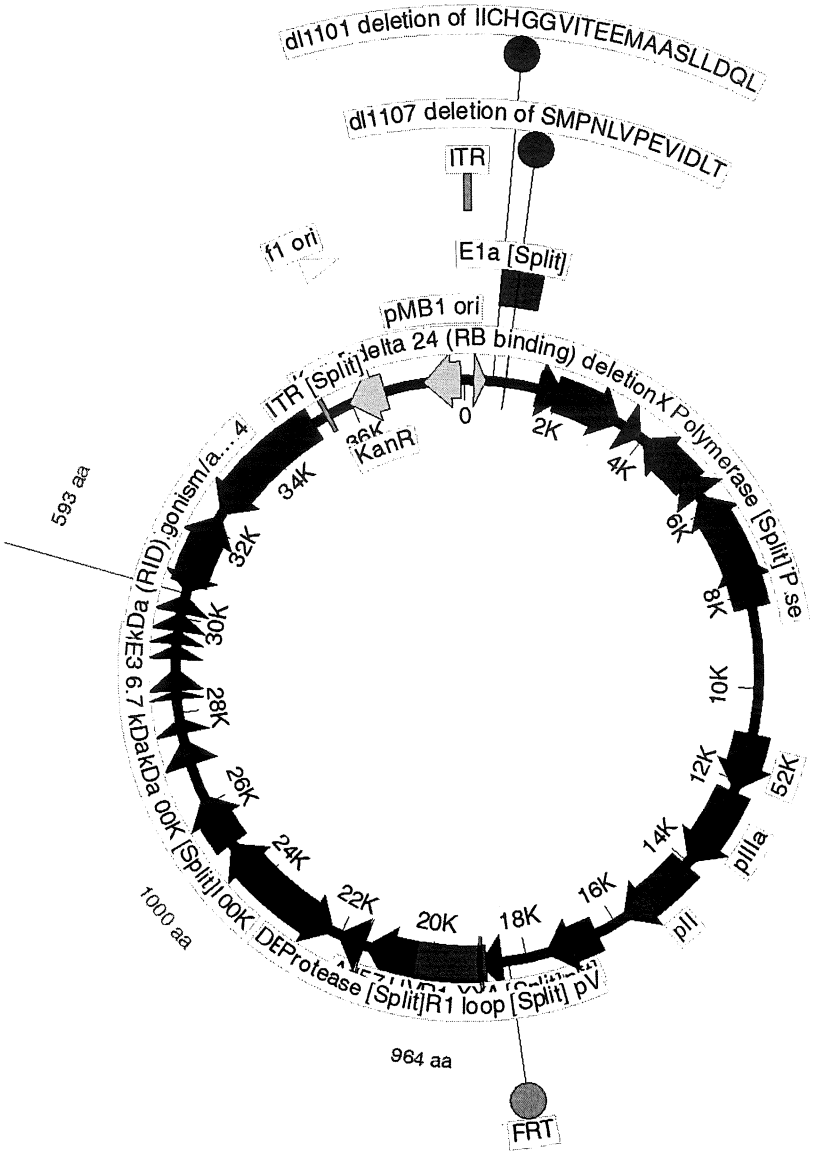

dl1101 deletion of IICHGGVITEEMAASLLDQL
dl1107 deletion of SMPNLVPEVIDLT
ITR
f1 ori
E1a [Split]
pMB1 ori
Delta 24 (RB binding) deletion
X Polymerase [Split] P se
ITR [Split]
KanR
0
2K
4K
6K
8K
10K
12K
52K
pIIIa
14K
pII
16K
18K
20K
22K
24K
26K
28K
30K
32K
34K
gonism/a... 4
593 aa
E3 6.7 kDakDa (RID)
00K [Split]100K DEProtease [Split]R1 loop [Split] pV
1000 aa
964 aa
FRT

FIG. 61

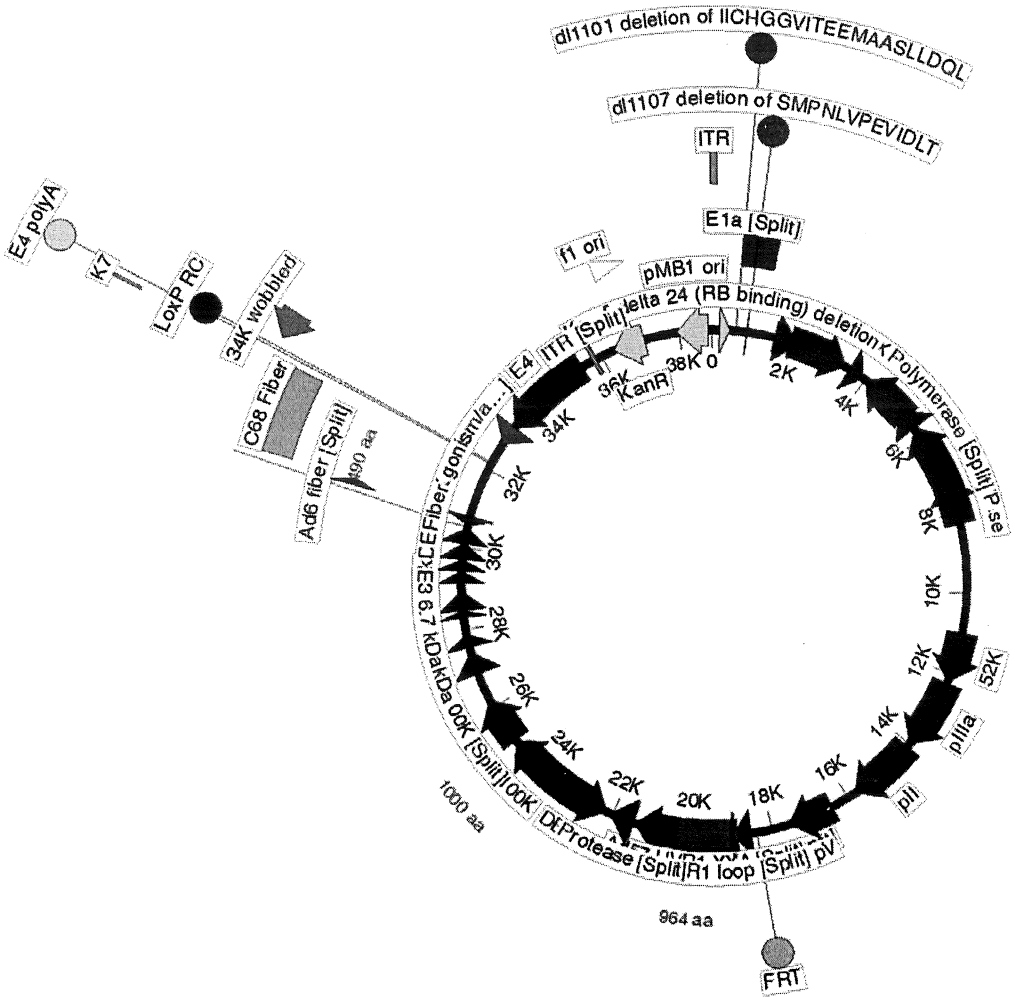

dl1101 deletion of IICHGGVITEEMAASLLDQL
dl1107 deletion of SMPNLVPEVIDLT
ITR
E1a [Split]
f1 ori
pMB1 ori
Delta 24 (RB binding) deletion
E4 polyA
K7
LoxP RC
34K wobbled
C68 Fiber
Ad6 fiber [Split]
190 aa
E4
ITR [Split]
36K
KanR
38K 0
2K
4K
6K
8K
10K
12K
52K
pIIIa
pIII
16K
14K
18K
20K
22K
24K
26K
28K
30K
32K
34K
E3 6.7 kDa
CEFiber:gonsnrla...
100K [Split] 100K
1000 aa
DNPolymerase [Split] Pse
DNProtease [Split] R1 loop [Split] pV
964 aa
FRT

FIG. 62

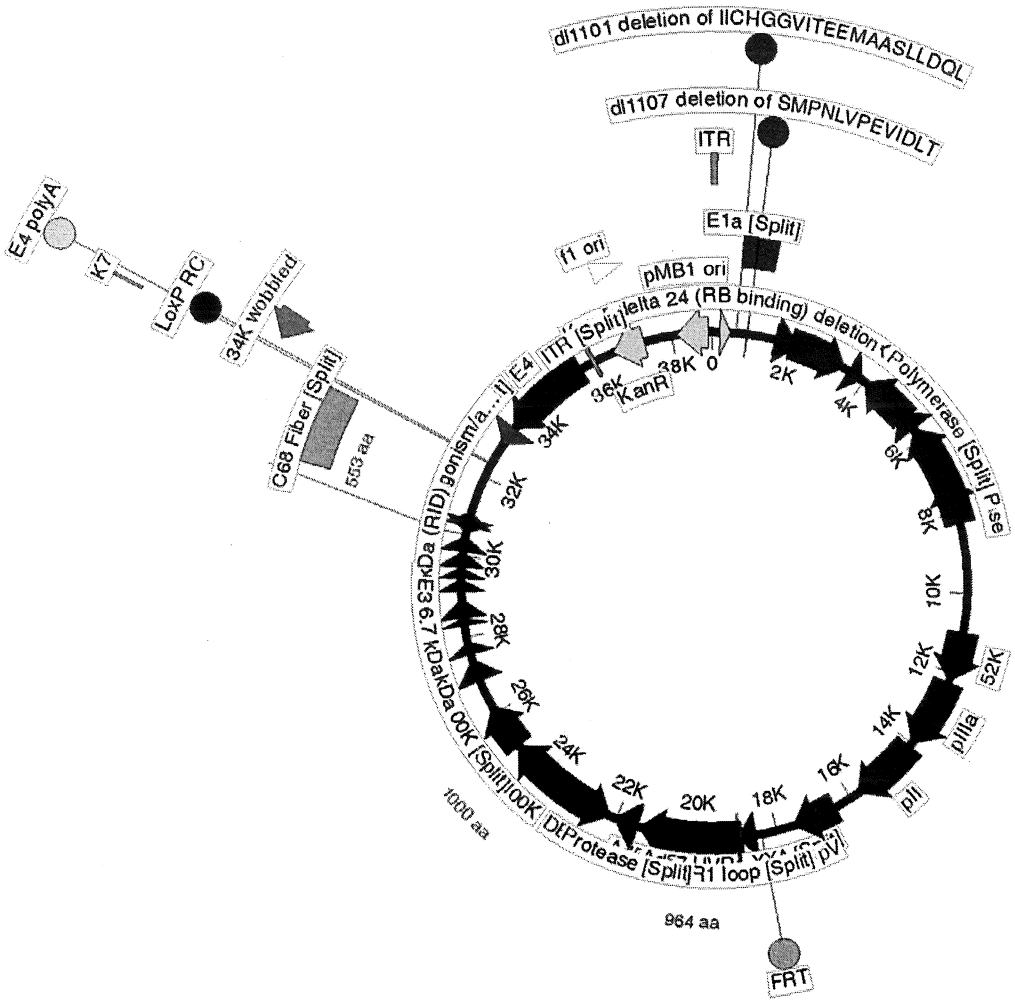

dl1101 deletion of IICHGGVITEEMAASLLDQL
dl1107 deletion of SMPNLVPEVIDLT
ITR
E1a [Split]
f1 ori
pMB1 ori
delta 24 (RB binding) deletion
E4 polyA
K7
LoxP RC
34K wobbled
C68 Fiber [Split]
553 aa
ITR [Split]
E4
KanR
0
2K
4K
6K
8K
10K
12K
52K
pIIIa
pIII
16K
18K
20K
22K
24K
26K
28K
30K
32K
34K
36K
38K
Polymerase [Split]
Pase
(RID) gonism/a...]
100K [Split]
DI Protease [Split]
R1 loop [Split]
pV
964 aa
1000 aa
FRT

FIG. 63

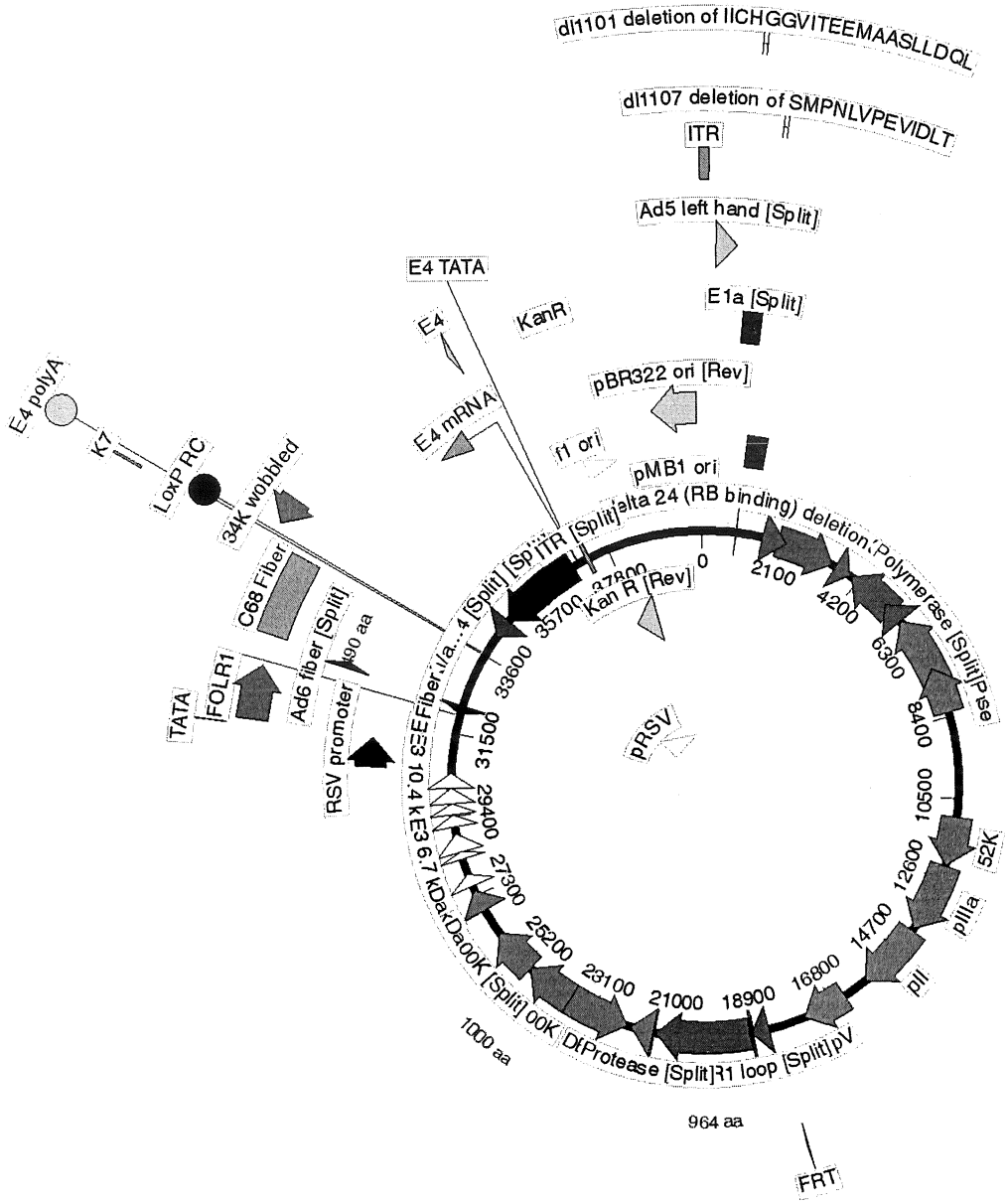

dl1101 deletion of IICHGGVITEEMAASLLDQL
dl1107 deletion of SMPNLVPEVIDLT
ITR
Ad5 left hand [Split]
E1a [Split]
pBR322 ori [Rev]
f1 ori
pMB1 ori
E4 TATA
E4
KanR
E4 mRNA
E4 polyA
K7
LoxP RC
34K wobbled
C68 Fiber
Ad6 fiber [Split]
90 aa
FOLR1
TATA
RSV promoter
ITR [Split]
Kan R [Rev]
pRSV
0
2100
4200
6300
8400
10500
12600
14700
16800
18900
21000
23100
25200
27300
29400
31500
33600
35700
52K
pIIIa
pIII
pV
DfProtease [Split]
R1 loop [Split]
100K [Split]
1000 aa
964 aa
FRT

FIG. 64

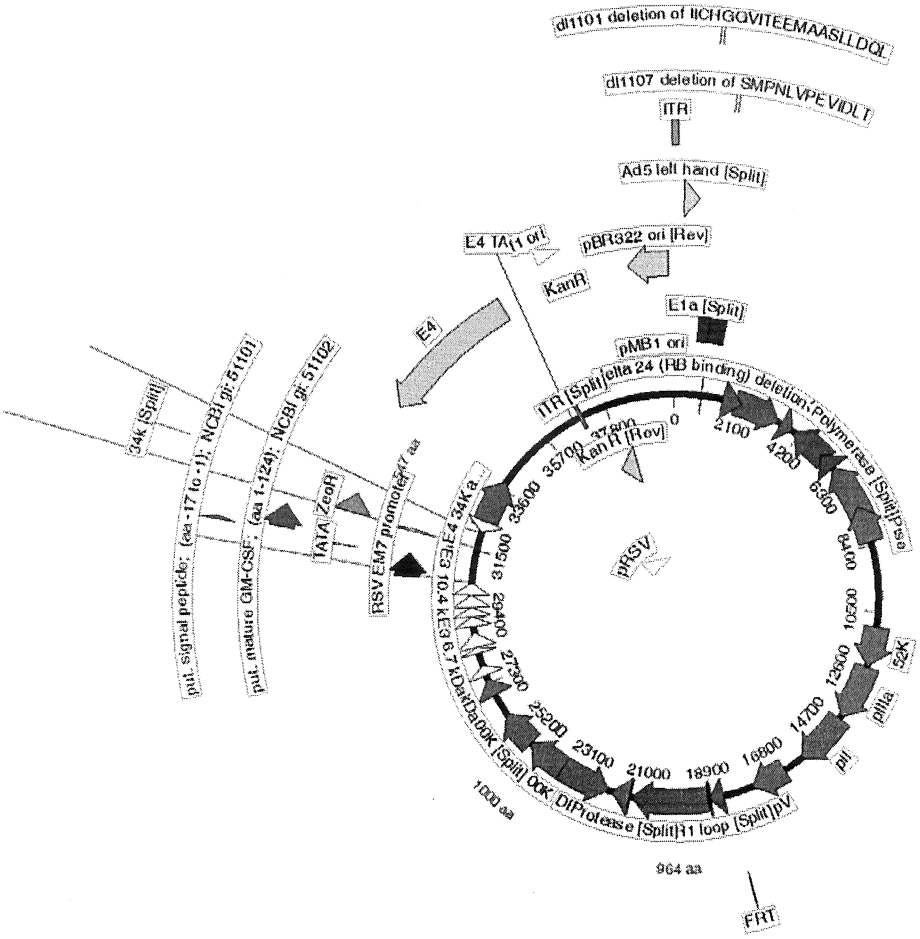

dl1101 deletion of IICHGQVITEEMAASLLDQL
dl1107 deletion of SMPNLVPEVIDLT
ITR
Ad5 left hand [Split]
E4 TA(1 orf
pBR322 ori [Rev]
KanR
E1a [Split]
pMB1 ori
E4
ITR [Split]
delta 24 (RB binding) deletion;Polymerase [Split]Pso
Kan R [Rev]
pRSV
52K
pIIIa
pII
pV
pVI
100K [Split]
DiProtease [Split]
11 loop [Split]
964 aa
1000 aa
FRT
34K [Split]
put. signal peptide: (aa -17 to -1); NCBI gi: 51101
put. mature GM-CSF: (aa 1-124); NCBI gi: 51102
TATA
ZeoR
RSV EM7 promoter
E3
34K a.
E4
6.7kDa
19.4kDa

FIG. 65

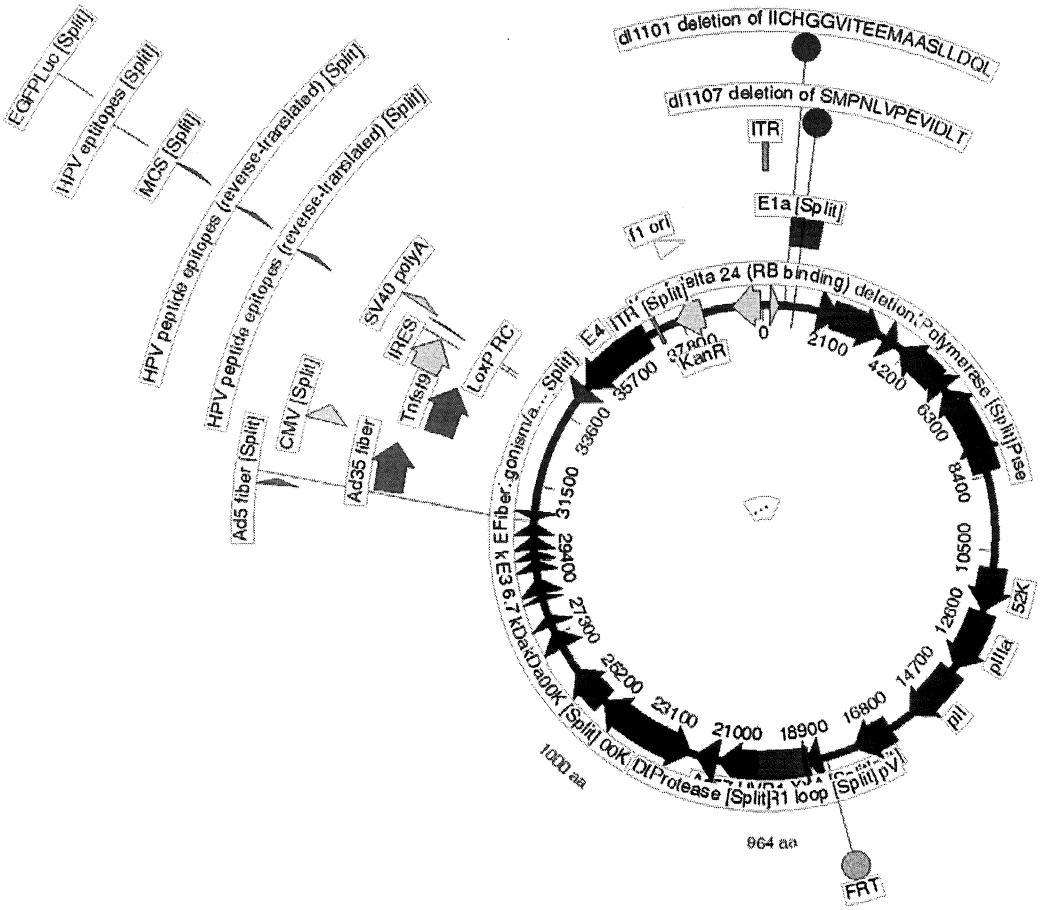

dl1101 deletion of IICHGGVITEEMAASLLDQL
dl1107 deletion of SMPNLVPEVIDLT
ITR
E1a [Split]
f1 ori
delta 24 (RB binding) deletion Polymerase [Split] Pse
E4
ITR [Split]
KanR
0
2100
4200
6300
8400
10500
12600
14700
16800
18900
21000
23100
25200
27300
29400
31500
33600
35700
37800
52K
pIIIa
pIII
pV
R1 loop [Split]
DI Protease [Split]
100K [Split]
E3 6.7 kDa
E3 14.7 kDa
E Fiber - gonsma... - Split
1000 aa
964 aa
FRT
EGFPLuc [Split]
HPV epitopes [Split]
MCS [Split]
HPV peptide epitopes (reverse-translated) [Split]
HPV peptide epitopes (reverse-translated) [Split]
SV40 polyA
IRES
Tnfrsf9
LoxP RC
CMV [Split]
Ad35 fiber
Ad5 fiber [Split]

FIG. 66

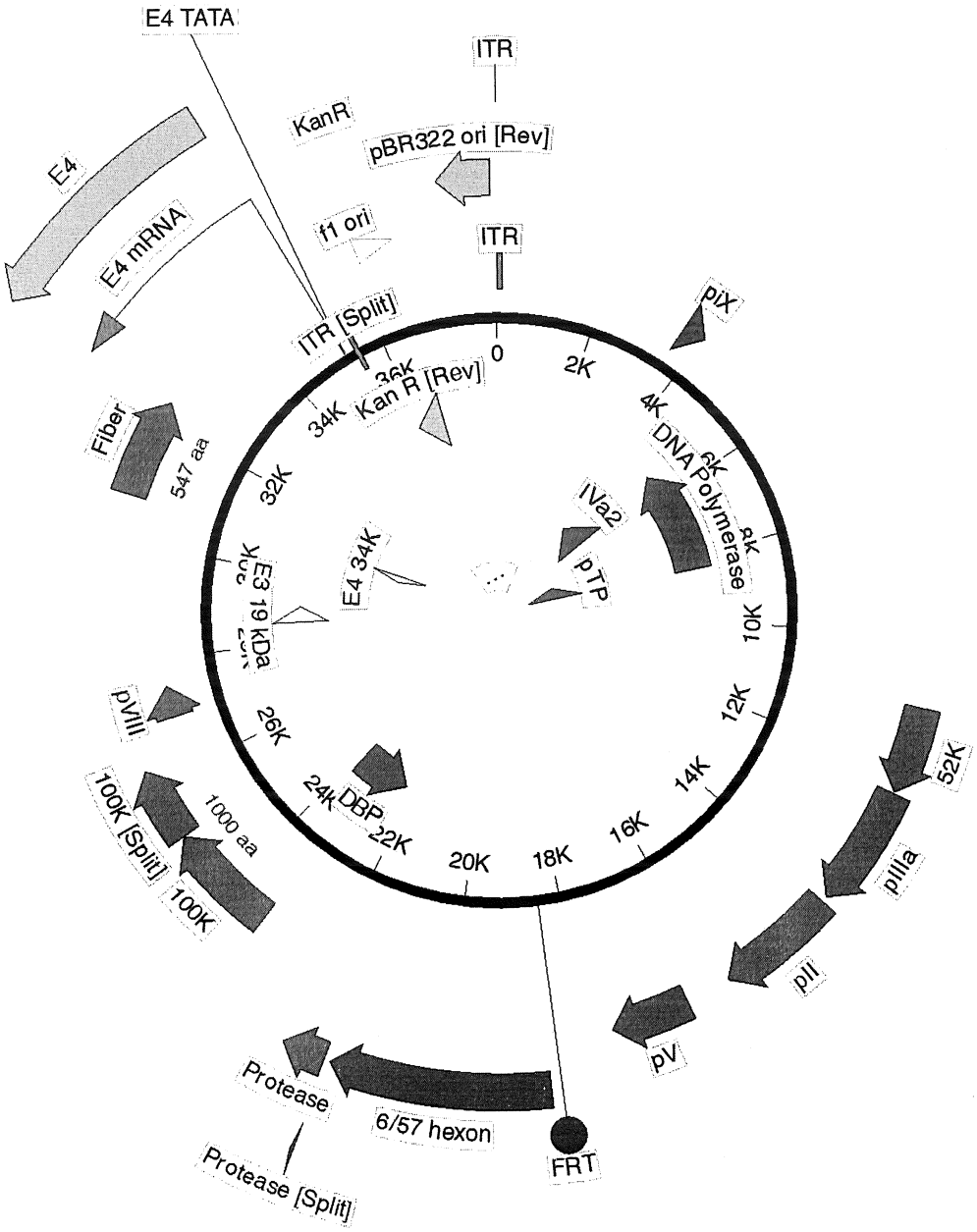

E4 TATA
ITR
KanR
pBR322 ori [Rev]
E4
E4 mRNA
f1 ori
ITR
ITR [Split]
pIX
0
2K
4K
6K
8K
10K
12K
14K
16K
18K
20K
22K
24K
26K
32K
34K
36K
Kan R [Rev]
Fiber
547 aa
DNA Polymerase
IVa2
pTP
E4 34K
E3 19 kDa
pVIII
100K [Split]
1000 aa
100K
DBP
52K
pIIIa
pII
pV
Protease
6/57 hexon
FRT
Protease [Split]

FIG. 67

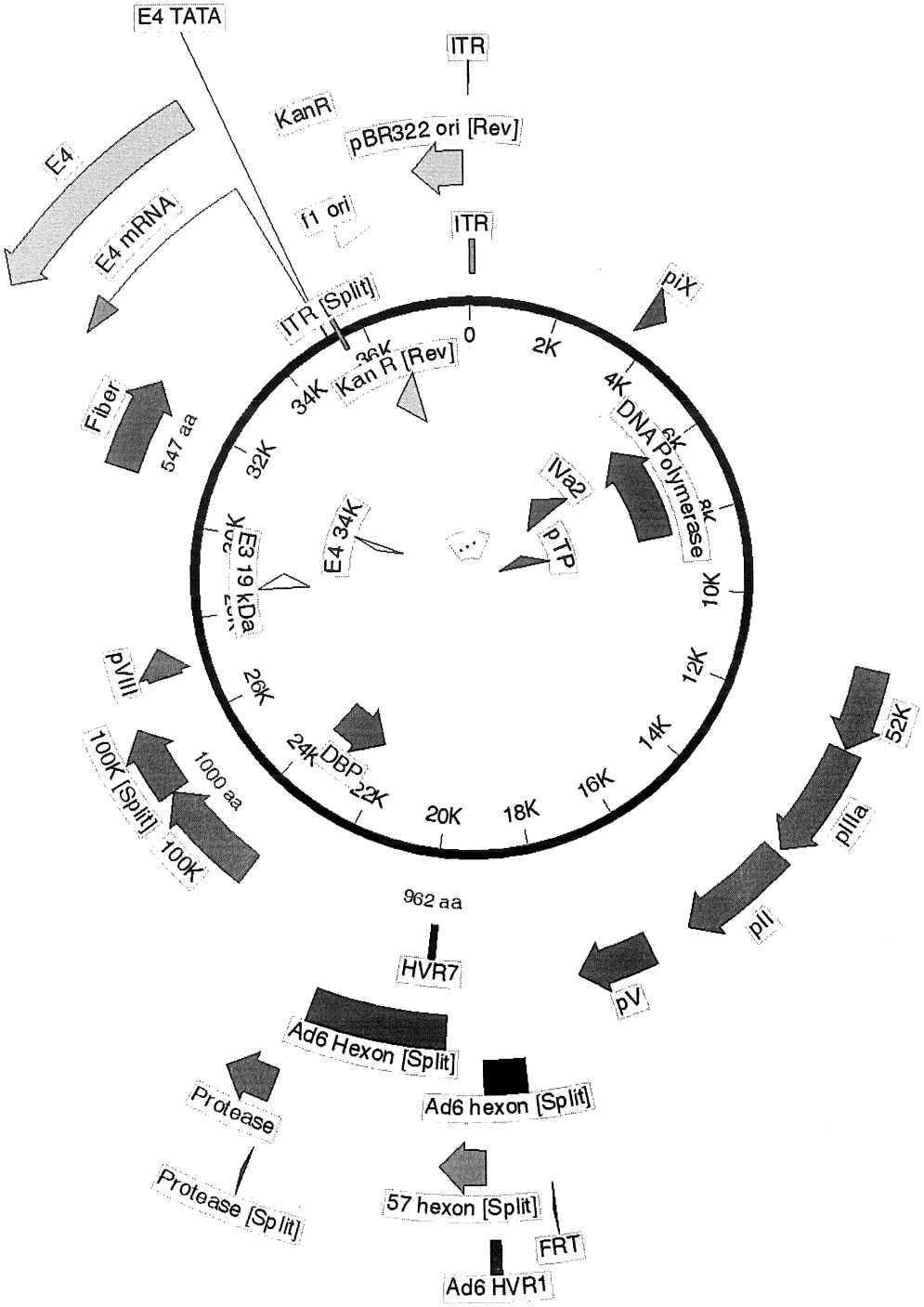

E4 TATA
ITR
KanR
pBR322 ori [Rev]
E4
E4 mRNA
f1 ori
ITR
ITR [Split]
piX
0
2K
4K
6K
8K
10K
12K
14K
16K
18K
20K
22K
24K
26K
32K
34K
Kan R [Rev]
Fiber
547 aa
DNA Polymerase
IVa2
pTP
E4 34K
E3 19 kDa
pVIII
100K [Split]
1000 aa
100K
DBP
52K
pIIIa
pII
pV
962 aa
HVR7
Ad6 Hexon [Split]
Ad6 hexon [Split]
Protease
Protease [Split]
57 hexon [Split]
FRT
Ad6 HVR1

FIG. 68

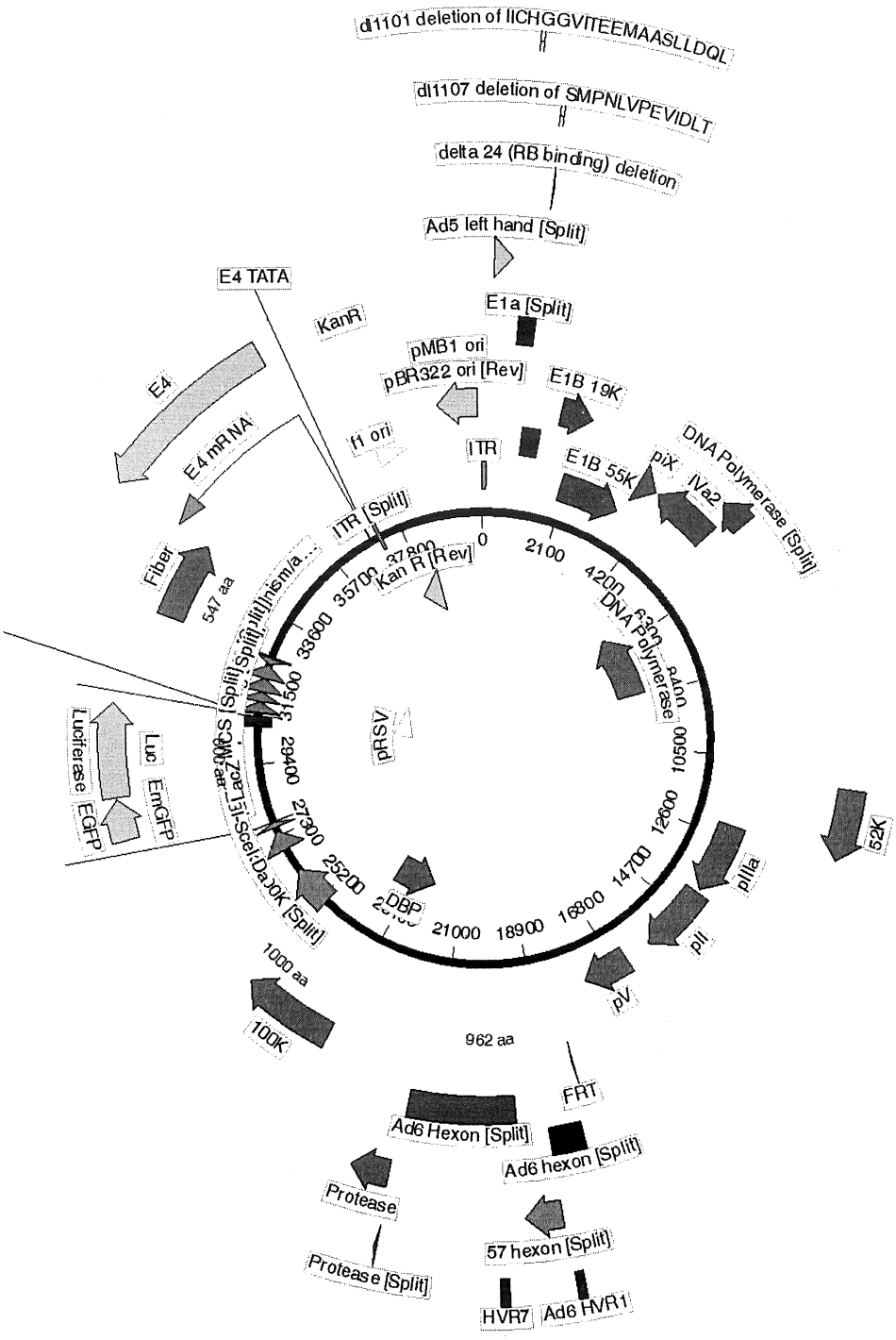
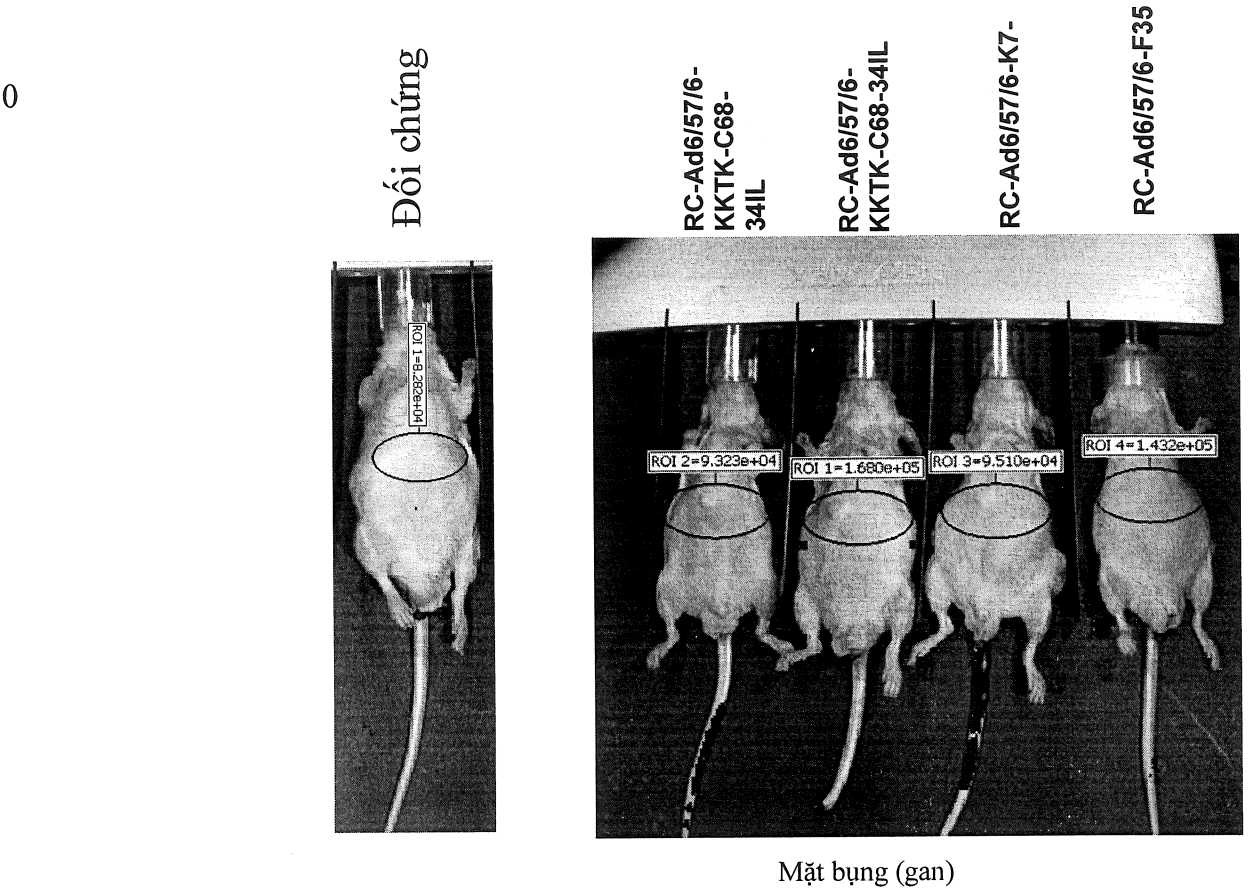

dl1101 deletion of IICHGGVITEEMAASLLDQL
dl1107 deletion of SMPNLVPEVIDLT
delta 24 (RB binding) deletion
Ad5 left hand [Split]
E1a [Split]
E4 TATA
KanR
pMB1 ori
pBR322 ori [Rev]
E1B 19K
E4
E4 mRNA
f1 ori
ITR
E1B 55K
pIX
IVa2
DNA Polymerase [Split]
ITR [Split]
Kan R [Rev]
Fiber
547 aa
pRSV
DNA Polymerase
pIIIa
52K
pIII
pV
962 aa
FRT
Ad6 Hexon [Split]
Ad6 hexon [Split]
Protease
Protease [Split]
57 hexon [Split]
HVR7
Ad6 HVR1
1000 aa
100K
DBP
Luciferase
EGFP
Luc
EmGFP
0
2100
4200
6300
8400
10500
12600
14700
16800
18900
21000
25200
27300
29400
31500
33600
35700
37800

FIG. 69

FIG. 70


Đối chứng
RC-Ad6/57/6-KKTK-C68-34IL
RC-Ad6/57/6-KKTK-C68-34IL
RC-Ad6/57/6-K7-
RC-Ad6/57/6-F35
ROI 1=8.282e+04
ROI 2=9.323e+04
ROI 1=1.680e+05
ROI 3=9.510e+04
ROI 4=1.432e+05
Mặt bụng (gan)
Đối chứng
RC-Ad6/57/6-KKTK-C68-34IL
RC-Ad6/57/6-KKTK-C68-34IL
RC-Ad6/57/6-K7-
RC-Ad6/57/6-F35
ROI 2=2.42e+04
ROI 4=7.990e+04
ROI 3=9.096e+04
ROI 1=2.790e+04
ROI 2=5.034e+05
Sự phát quang
6.0
4.0
x10
2.0
Bức xạ
(p/sec/cm²/sr)
Color Scale
Min = 2.30e4
Max = 7.16e5
Ở mặt sau (khối u bên sườn)

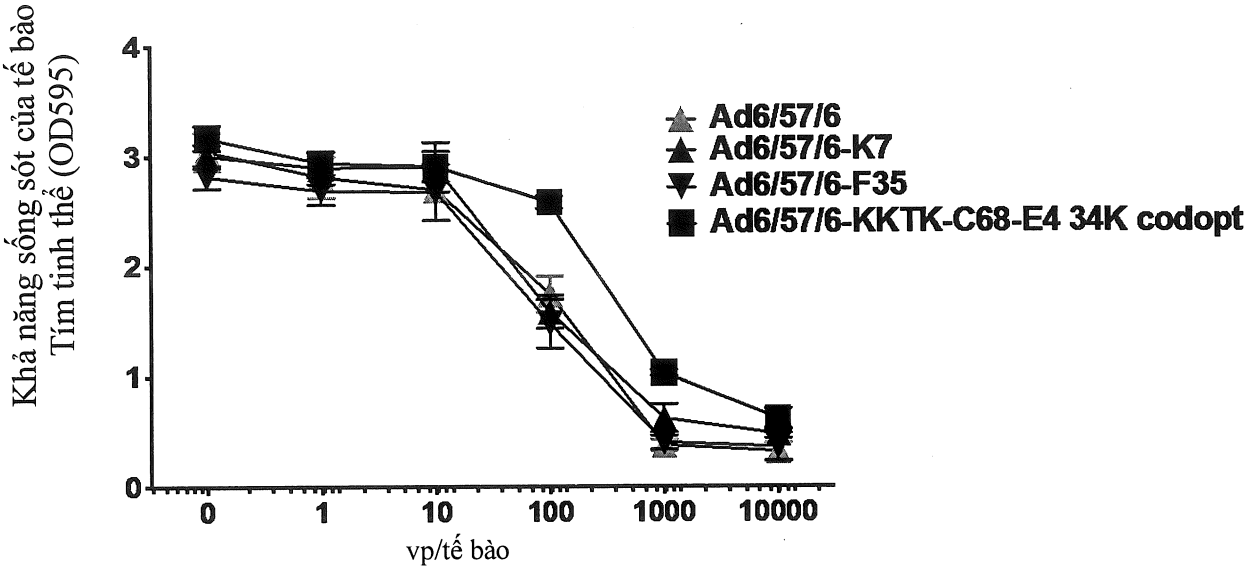

Khả năng sống sót của tế bào
Tím tinh thể (OD595)
4
3
2
1
0
0
1
10
100
1000
10000
vp/tế bào
Ad6/57/6
Ad6/57/6-K7
Ad6/57/6-F35
Ad6/57/6-KKTK-C68-E4 34K codopt

FIG. 71

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH

<120> ADENOVIRUT TÁI TỔ HỢP VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA ADENOVIRUT TÁI TỔ HỢP NÀY

<130> ADZE 1 US SEQ

<150> 62/770,631
<151> 2018-11-21

<160> 65

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 1

Thr Ala Arg Gly Glu His Lys Glu Glu Glu Leu Ile
1 5 10

<210> 2
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 2

Leu Arg Gln Thr Gly Ala Ala Ser Ala Val Trp Gly
1 5 10

<210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 3

Ala Arg Arg Ala Asp Thr Gln Trp Arg Gly Leu Glu
1 5 10

<210> 4
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 4

Gly Thr Trp Leu Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln Ser Cys Gly Tyr Ala
1 5 10 15

Thr Val Thr

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 5

Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys
1 5

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 6

Asn Met Ser Leu Asp Val Asn Arg Lys Ala
1 5 10

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 7

Ile Ser Leu Ser Ser His Arg Ala Thr Trp Val Val
1 5 10

<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 8

Trp Thr Met Gly Leu Asp Gln Leu Arg Asp Ser Ser Trp Ala His Gly
1 5 10 15

Gly Phe Ser Ala
20

<210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 9

Trp Thr Met Gly Leu Asp Gln Leu Arg Gly Asp Ser Ser Trp Ala His
1 5 10 15

Gly Gly Phe Ser
20

<210> 10
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 10

Arg Ser Val Ser Gly Thr Glu Trp Val Pro Met Asn Glu Gln His Arg
1 5 10 15

Gly Ala Ile Trp
20

<210> 11
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 11

Thr Glu Leu Arg Thr His Thr Ser Lys Glu Leu Thr Ile Arg Thr Ala
1 5 10 15

Ala Ser Ser Asp
20

<210> 12
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 12

Asp Arg Ala Ile Gly Trp Gln Asp Lys Leu Tyr Lys Leu Pro Leu Gly
1 5 10 15

Ser Ile His Asn
20

<210> 13
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 13

Met Gly Ser Trp Glu Lys Ala Ala Leu Trp Asn Arg Val Ser Ala Ser
1 5 10 15

Ser Gly Gly Ala
20

<210> 14
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 14

Met Ala Met Gly Gly Lys Pro Glu Arg Pro Ala Asp Ser Asp Asn Val
1 5 10 15

Gln Val Arg Gly
20

<210> 15
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 15

Met Ala Ser Arg Gly Asp Ala Gly Glu Gly Ser Thr Gln Ser Asn Thr
1 5 10 15

Asn Val Pro Ser
20

<210> 16
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 16

Gly Pro Glu Asp Thr Ser Arg Ala Pro Glu Asn Gln Gln Lys Thr Phe
1 5 10 15

His Arg Arg Trp
20

<210> 17
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 17

Met Gly Arg Glu Asp Val Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
1 5 10 15

Leu Gly Gly Ser
20

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 18

Ala Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly
1 5 10

<210> 19
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 19

Ala Cys Asp Cys Arg Glu Asp Val Cys Phe Cys Gly
1 5 10

<210> 20
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 20

Gly Gln Ile Pro Ile Thr Glu Pro Glu Leu Cys Cys Val Pro Trp Thr
1 5 10 15

Glu Ala Phe Tyr
20

<210> 21
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 21

Pro Gln Pro Pro Asn Ser Thr Ala His Pro Asn Pro His Lys Ala Pro
1 5 10 15

Pro Asn Thr Thr
20

<210> 22
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 22

Val Arg Trp Phe Pro Gly Gly Glu Trp Gly Val Thr His Pro Glu Ser
1 5 10 15

Leu Pro Pro Pro
20

<210> 23
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 23

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5 10 15

Lys Lys Lys

<210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 24

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His
1 5 10

<210> 25
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 25

Cys Ala Ala Ala Arg Trp Lys Lys Ala Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala
1 5 10 15

Asn Arg Phe Lys Lys Ile Ser
20

<210> 26
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 26

Glu Asp Pro Gly Phe Phe Asn Val Glu Ile Pro Glu Phe Pro
1 5 10

<210> 27
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 27

Gly Gly His Gly Arg Val Leu Trp Pro Asp Gly Trp Phe Ser Leu Val
1 5 10 15

Gly Ile Ser Pro
20

<210> 28
<211> 21
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 28

Met Ala Arg Thr Val Thr Ala Asn Val Pro Gly Met Gly Glu Gly Met
1 5 10 15

Val Val Val Pro Cys
20

<210> 29
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 29

Gly Val Ser Lys Arg Gly Leu Gln Cys His Asp Phe Ile Ser Cys Ser
1 5 10 15

Gly Val Pro Trp
20

<210> 30
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 30

Asn Gln Ser Ile Pro Lys Val Ala Gly Asp Ser Lys Val Phe Cys Trp
1 5 10 15

Trp Cys Ala Leu
20

<210> 31
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 31

Gln Ser Thr Pro Pro Thr Lys His Leu Thr Ile Pro Arg His Leu Arg
1 5 10 15

Asn Thr Leu Ile
20

<210> 32
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 32

Asp Met Ser Phe Gln Leu Val Thr Pro Phe Leu Lys Ala Leu Pro Thr
1 5 10 15

Gly Trp Arg Gly
20

<210> 33
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 33

Gly Gly His Gly Arg Val Leu Trp Pro Asp Gly Trp Phe Ser Leu Val

1 5 10 15

Gly Ile Ser Pro
20

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 34

Phe Ser Leu Val Gly Ile Ser Pro
1 5

<210> 35
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 35

Gln Ile Met Met Gly Pro Ser Leu Gly Tyr Tyr Met Pro Ser Glu Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Tyr
20

<210> 36
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 36

Ile Ser Trp Asp Ile Trp Arg Trp Trp Tyr Thr Ser Glu Asp Arg Asp
1 5 10 15

Ala Gly Ser Ala
20

<210> 37

<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 37

Val Trp Gly Met Thr Thr Ser Asp His Gln Arg Lys Thr Glu Arg Leu
1 5 10 15

Asp Ser Pro Glu
20

<210> 38
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 38

Met Thr Ser Ala Gln Thr Ser Glu Lys Leu Lys Ala Glu Thr Asp Arg
1 5 10 15

His Thr Ala Glu
20

<210> 39
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 39

Met Gly Ser Arg Ser Ala Val Gly Asp Phe Glu Ser Ala Glu Gly Ser
1 5 10 15

Arg Arg Pro

<210> 40
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 40

Met Gly Arg Thr Val Gln Ser Gly Asp Gly Thr Pro Ala Gln Thr Gln
1 5 10 15

Pro Ser Val Asn
20

<210> 41
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit hướng đích

<400> 41

Met Ala Arg Thr Val Thr Ala Asn Val Pro Gly Met Gly Glu Gly Met
1 5 10 15

Val Val Val Pro
20

<210> 42
<211> 132
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit đầu N của E1A trong Adenovirut

<400> 42

Met Arg His Ile Ile Cys His Gly Gly Val Ile Thr Glu Glu Met Ala
1 5 10 15

Ala Ser Leu Leu Asp Gln Leu Ile Glu Glu Val Leu Ala Asp Asn Leu
20 25 30

Pro Pro Pro Ser His Phe Glu Pro Pro Thr Leu His Glu Leu Tyr Asp
35 40 45

Leu Asp Val Thr Ala Pro Glu Asp Pro Asn Glu Glu Ala Val Ser Gln
50 55 60

Ile Phe Pro Glu Ser Val Met Leu Ala Val Gln Glu Gly Ile Asp Leu

65 70 75 80

Phe Thr Phe Pro Pro Ala Pro Gly Ser Pro Glu Pro Pro His Leu Ser
85 90 95

Arg Gln Pro Glu Gln Pro Glu Gln Arg Ala Leu Gly Pro Val Ser Met
100 105 110

Pro Asn Leu Val Pro Glu Val Ile Asp Leu Thr Cys His Glu Ala Gly
115 120 125

Phe Pro Pro Ser
130

<210> 43
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit đầu N của E1A

<400> 43

Met Arg His Ile Glu Glu Val Leu Ala Asp Asn Leu Pro Pro Pro Ser
1 5 10 15

His Phe Glu Pro Pro Thr Leu His Glu Leu Tyr Asp Leu Asp Val Thr
20 25 30

Ala Pro Glu Asp Pro Asn Glu Glu Ala Val Ser Gln Ile Phe Pro Glu
35 40 45

Ser Val Met Leu Ala Val Gln Glu Gly Ile Asp Leu Phe Thr Phe Pro
50 55 60

Pro Ala Pro Gly Ser Pro Glu Pro Pro His Leu Ser Arg Gln Pro Glu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Gln Arg Ala Leu Gly Pro Val Ser Met Pro Asn Leu Val
85 90 95

Pro Glu Val Ile Asp Leu Thr Cys His Glu Ala Gly Phe Pro Pro Ser
100 105 110

<210> 44
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit đầu N của E1A

<400> 44

Met Arg His Ile Ile Cys His Gly Gly Val Ile Thr Glu Glu Met Ala
1 5 10 15

Ala Ser Leu Leu Asp Gln Leu Ile Glu Glu Val Leu Ala Asp Asn Leu
20 25 30

Pro Pro Pro Ser His Phe Glu Pro Pro Thr Leu His Glu Leu Tyr Asp
35 40 45

Leu Asp Val Thr Ala Pro Glu Asp Pro Asn Glu Glu Ala Val Ser Gln
50 55 60

Ile Phe Pro Glu Ser Val Met Leu Ala Val Gln Glu Gly Ile Asp Leu
65 70 75 80

Phe Thr Phe Pro Pro Ala Pro Gly Ser Pro Glu Pro Pro His Leu Ser
85 90 95

Arg Gln Pro Glu Gln Pro Glu Gln Arg Ala Leu Gly Pro Val Cys His
100 105 110

Glu Ala Gly Phe Pro Pro Ser
115

<210> 45
<211> 99
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit đầu N của E1A

<400> 45

Met Arg His Ile Glu Glu Val Leu Ala Asp Asn Leu Pro Pro Pro Ser
1 5 10 15

His Phe Glu Pro Pro Thr Leu His Glu Leu Tyr Asp Leu Asp Val Thr
20 25 30

Ala Pro Glu Asp Pro Asn Glu Glu Ala Val Ser Gln Ile Phe Pro Glu
35 40 45

Ser Val Met Leu Ala Val Gln Glu Gly Ile Asp Leu Phe Thr Phe Pro
50 55 60

Pro Ala Pro Gly Ser Pro Glu Pro Pro His Leu Ser Arg Gln Pro Glu

65 70 75 80

Gln Pro Glu Gln Arg Ala Leu Gly Pro Val Cys His Glu Ala Gly Phe
85 90 95

Pro Pro Ser

<210> 46
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit liên kết tế bào

<400> 46

Arg Glu Asp Val Tyr
1 5

<210> 47
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit liên kết tế bào ung thư vú

<400> 47

Ile Ser Leu Ser Ser His Arg Ala Thr Trp Val Val
1 5 10

<210> 48
<211> 1608
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> axit nucleic Probasin-E1

<400> 48

Thr Cys Gly Ala Gly Cys Gly Ala Cys Gly Gly Thr Ala Thr Cys Gly
1 5 10 15

Ala Thr Ala Ala Gly Cys Thr Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Thr Ala
20 25 30

Thr Gly Ala Thr Ala Gly Cys Ala Thr Cys Thr Thr Gly Thr Thr Cys

35 40 45

Thr Thr Ala Gly Thr Cys Thr Thr Thr Thr Thr Cys Thr Thr Ala Ala
50 55 60

Thr Ala Gly Gly Gly Ala Cys Ala Thr Ala Ala Ala Gly Cys Cys Cys
65 70 75 80

Ala Cys Ala Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Gly Cys
85 90 95

Cys Thr Gly Ala Ala Gly Ala Ala Thr Gly Gly Gly Ala Cys Ala Gly
100 105 110

Gly Cys Ala Thr Thr Gly Gly Gly Cys Ala Thr Thr Gly Thr Cys Cys
115 120 125

Ala Thr Gly Cys Cys Thr Ala Gly Thr Ala Ala Ala Gly Thr Ala Cys
130 135 140

Thr Cys Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Cys Thr Ala Thr Thr Thr Gly
145 150 155 160

Thr Ala Thr Ala Cys Thr Ala Gly Ala Thr Gly Ala Cys Ala Cys Ala
165 170 175

Ala Thr Gly Thr Thr Cys Thr Ala Gly Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr
180 185 190

Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Cys Ala Thr Cys Ala Thr Gly Thr Thr
195 200 205

Thr Ala Ala Ala Cys Ala Thr Cys Thr Ala Cys Cys Ala Thr Thr Cys
210 215 220

Cys Ala Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Gly
225 230 235 240

Ala Thr Ala Gly Cys Ala Thr Cys Thr Thr Gly Thr Thr Cys Thr Thr
245 250 255

Ala Gly Thr Cys Thr Thr Thr Thr Thr Cys Thr Thr Ala Ala Thr Ala
260 265 270

Gly Gly Gly Ala Cys Ala Thr Ala Ala Ala Gly Cys Cys Cys Ala Cys
275 280 285

Ala Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Gly Cys Cys Thr
290 295 300

Gly Ala Ala Gly Ala Ala Thr Gly Gly Gly Ala Cys Ala Gly Gly Cys

```
305                 310                 315                 320

Ala Thr Thr Gly Gly Gly Cys Ala Thr Thr Gly Thr Cys Cys Ala Thr
                325                 330                 335

Gly Cys Cys Thr Ala Gly Thr Ala Ala Ala Gly Thr Ala Cys Thr Cys
            340                 345                 350

Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Cys Thr Ala Thr Thr Thr Gly Thr Ala
        355                 360                 365

Thr Ala Cys Thr Ala Gly Ala Thr Gly Ala Cys Ala Cys Ala Ala Thr
    370                 375                 380

Gly Thr Cys Ala Ala Thr Gly Thr Cys Thr Gly Thr Gly Thr Ala Cys
385                 390                 395                 400

Ala Ala Cys Thr Gly Cys Cys Ala Ala Cys Thr Gly Gly Gly Ala Thr
                405                 410                 415

Gly Cys Ala Ala Gly Ala Cys Ala Cys Thr Gly Cys Cys Cys Ala Thr
            420                 425                 430

Gly Cys Cys Ala Ala Thr Cys Ala Thr Cys Cys Thr Gly Ala Ala Ala
        435                 440                 445

Ala Gly Cys Ala Gly Cys Thr Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Gly Cys
    450                 455                 460

Ala Gly Gly Ala Ala Gly Cys Thr Ala Cys Thr Cys Thr Gly Cys Ala
465                 470                 475                 480

Cys Cys Thr Thr Gly Thr Cys Ala Gly Thr Gly Ala Gly Gly Thr Cys
                485                 490                 495

Cys Ala Gly Ala Thr Ala Cys Cys Thr Cys Cys Cys Thr Cys Gly Ala
            500                 505                 510

Gly Cys Gly Gly Cys Cys Gly Cys Gly Ala Cys Gly Cys Gly Cys Ala
        515                 520                 525

Gly Thr Gly Thr Ala Thr Thr Thr Ala Thr Ala Cys Cys Cys Gly Gly
    530                 535                 540

Thr Gly Ala Gly Thr Thr Cys Cys Thr Cys Ala Ala Gly Ala Gly Gly
545                 550                 555                 560

Cys Cys Ala Cys Thr Cys Thr Thr Gly Ala Gly Thr Gly Cys Cys Ala
                565                 570                 575

Gly Cys Gly Ala Gly Thr Ala Gly Ala Gly Thr Thr Thr Thr Cys Thr
```

580 585 590

Cys Cys Thr Cys Cys Gly Ala Gly Cys Cys Gly Cys Thr Cys Cys Gly
595 600 605

Ala Cys Ala Cys Cys Gly Gly Gly Ala Cys Thr Gly Ala Ala Ala Ala
610 615 620

Thr Gly Ala Gly Ala Cys Ala Thr Ala Thr Thr Ala Thr Cys Thr Gly
625 630 635 640

Cys Cys Ala Cys Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly Thr Thr Ala Thr Thr
645 650 655

Ala Cys Cys Gly Ala Ala Gly Ala Ala Ala Thr Gly Gly Cys Cys Gly
660 665 670

Cys Cys Ala Gly Thr Cys Thr Thr Thr Thr Gly Gly Ala Cys Cys Ala
675 680 685

Gly Cys Thr Gly Ala Thr Cys Gly Ala Ala Gly Ala Gly Gly Thr Ala
690 695 700

Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly Ala Thr Ala Ala Thr Cys Thr Thr Cys
705 710 715 720

Cys Ala Cys Cys Thr Cys Cys Thr Ala Gly Cys Cys Ala Thr Thr Thr
725 730 735

Thr Gly Ala Ala Cys Cys Ala Cys Cys Thr Ala Cys Cys Cys Thr Thr
740 745 750

Cys Ala Cys Gly Ala Ala Cys Thr Gly Thr Ala Thr Gly Ala Thr Thr
755 760 765

Thr Ala Gly Ala Cys Gly Thr Gly Ala Cys Gly Gly Cys Cys Cys Cys
770 775 780

Cys Gly Ala Ala Gly Ala Thr Cys Cys Cys Ala Ala Cys Gly Ala Gly
785 790 795 800

Gly Ala Gly Gly Cys Gly Gly Thr Thr Thr Cys Gly Cys Ala Gly Ala
805 810 815

Thr Thr Thr Thr Thr Cys Cys Cys Gly Ala Gly Thr Cys Thr Gly Thr
820 825 830

Ala Ala Thr Gly Thr Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly
835 840 845

Gly Ala Ala Gly Gly Gly Ala Thr Thr Gly Ala Cys Thr Thr Ala Thr

```
    850                 855                 860

Thr Cys Ala Cys Thr Thr Thr Thr Cys Cys Gly Cys Cys Gly Gly Cys
865                 870                 875                 880

Gly Cys Cys Cys Gly Gly Thr Thr Cys Thr Cys Cys Gly Gly Ala Gly
                885                 890                 895

Cys Cys Gly Cys Cys Thr Cys Ala Cys Cys Thr Thr Thr Cys Cys Cys
            900                 905                 910

Gly Gly Cys Ala Gly Cys Cys Cys Gly Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys
        915                 920                 925

Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Ala Gly Ala Gly Cys Cys Thr Thr Gly
    930                 935                 940

Gly Gly Thr Cys Cys Gly Gly Thr Thr Thr Cys Thr Ala Thr Gly Cys
945                 950                 955                 960

Cys Ala Ala Ala Cys Cys Thr Thr Gly Thr Gly Cys Cys Gly Gly Ala
                965                 970                 975

Gly Gly Thr Gly Ala Thr Cys Gly Ala Thr Cys Thr Thr Ala Cys Cys
            980                 985                 990

Thr Gly Cys Cys Ala Cys Gly Ala  Gly Gly Cys Thr Gly  Gly Cys Thr
        995                 1000                1005

Thr Thr  Cys Cys Ala Cys Cys  Cys Ala Gly Thr Gly  Ala Cys Gly
    1010                1015                1020

Ala Cys  Gly Ala Gly Gly Ala  Thr Gly Ala Ala Gly  Ala Gly Gly
    1025                1030                1035

Gly Thr  Gly Ala Gly Gly Ala  Gly Thr Thr Thr Gly  Thr Gly Thr
    1040                1045                1050

Thr Ala  Gly Ala Thr Thr Ala  Thr Gly Thr Gly Gly  Ala Gly Cys
    1055                1060                1065

Ala Cys  Cys Cys Cys Gly Gly  Gly Cys Ala Cys Gly  Gly Thr Thr
    1070                1075                1080

Gly Cys  Ala Gly Gly Thr Cys  Thr Thr Gly Thr Cys  Ala Thr Thr
    1085                1090                1095

Ala Thr  Cys Ala Cys Cys Gly  Gly Ala Gly Gly Ala  Ala Thr Ala
    1100                1105                1110

Cys Gly  Gly Gly Gly Gly Ala  Cys Cys Cys Ala Gly  Ala Thr Ala
```

1115 1120 1125

Thr Thr Ala Thr Gly Thr Gly Thr Thr Cys Gly Cys Thr Thr Thr
1130 1135 1140

Gly Cys Thr Ala Thr Ala Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Cys Thr
1145 1150 1155

Gly Thr Gly Gly Cys Ala Thr Gly Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr
1160 1165 1170

Ala Cys Ala Gly Thr Ala Ala Gly Thr Gly Ala Ala Ala Ala Thr
1175 1180 1185

Thr Ala Thr Gly Gly Gly Cys Ala Gly Thr Cys Gly Gly Thr Gly
1190 1195 1200

Ala Thr Ala Gly Ala Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Gly Thr Thr
1205 1210 1215

Thr Gly Gly Thr Gly Thr Gly Gly Thr Ala Ala Thr Thr Thr Thr
1220 1225 1230

Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Thr Thr Thr Thr Thr Ala Cys Ala
1235 1240 1245

Gly Thr Thr Thr Thr Gly Thr Gly Gly Thr Thr Thr Ala Ala Ala
1250 1255 1260

Gly Ala Ala Thr Thr Thr Thr Gly Thr Ala Thr Thr Gly Thr Gly
1265 1270 1275

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Ala Ala Gly Gly Thr Cys
1280 1285 1290

Cys Thr Gly Thr Gly Thr Cys Thr Gly Ala Ala Cys Cys Thr Gly
1295 1300 1305

Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Gly Cys Cys Cys Gly Ala Gly Cys
1310 1315 1320

Cys Ala Gly Ala Ala Cys Cys Gly Gly Ala Gly Cys Cys Thr Gly
1325 1330 1335

Cys Ala Ala Gly Ala Cys Cys Thr Ala Cys Cys Cys Gly Gly Cys
1340 1345 1350

Gly Thr Cys Cys Thr Ala Ala Ala Thr Thr Gly Gly Thr Gly Cys
1355 1360 1365

Cys Thr Gly Cys Thr Ala Thr Cys Cys Thr Gly Ala Gly Ala Cys

1370 1375 1380

Gly Cys Cys Cys Gly Ala Cys Ala Thr Cys Ala Cys Cys Thr Gly
1385 1390 1395

Thr Gly Thr Cys Thr Ala Gly Ala Gly Ala Ala Thr Gly Cys Ala
1400 1405 1410

Ala Thr Ala Gly Thr Ala Gly Thr Ala Cys Gly Gly Ala Thr Ala
1415 1420 1425

Gly Cys Thr Gly Thr Gly Ala Cys Thr Cys Cys Gly Gly Thr Cys
1430 1435 1440

Cys Thr Thr Cys Thr Ala Ala Cys Ala Cys Ala Cys Cys Thr Cys
1445 1450 1455

Cys Thr Gly Ala Gly Ala Thr Ala Cys Ala Cys Cys Cys Gly Gly
1460 1465 1470

Thr Gly Gly Thr Cys Cys Cys Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys
1475 1480 1485

Cys Cys Ala Thr Thr Ala Ala Ala Cys Cys Ala Gly Thr Thr Gly
1490 1495 1500

Cys Cys Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Thr Thr Gly Gly Thr Gly
1505 1510 1515

Gly Gly Cys Gly Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr Gly
1520 1525 1530

Thr Gly Gly Ala Ala Thr Gly Thr Ala Thr Cys Gly Ala Gly Gly
1535 1540 1545

Ala Cys Thr Thr Gly Cys Thr Thr Ala Ala Cys Gly Ala Gly Thr
1550 1555 1560

Cys Thr Gly Gly Gly Cys Ala Ala Cys Cys Thr Thr Thr Gly Gly
1565 1570 1575

Ala Cys Thr Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Thr Ala Ala Ala Cys
1580 1585 1590

Gly Cys Cys Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Ala Thr Ala Ala Gly
1595 1600 1605

<210> 49
<211> 959
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit Hexon

<400> 49

Met Ala Thr Pro Ser Met Met Pro Gln Trp Ser Tyr Met His Ile Ser
1 5 10 15

Gly Gln Asp Ala Ser Glu Tyr Leu Ser Pro Gly Leu Val Gln Phe Ala
20 25 30

Arg Ala Thr Glu Thr Tyr Phe Ser Leu Asn Asn Lys Phe Arg Asn Pro
35 40 45

Thr Val Ala Pro Thr His Asp Val Thr Thr Asp Arg Ser Gln Arg Leu
50 55 60

Thr Leu Arg Phe Ile Pro Val Asp Arg Glu Asp Thr Ala Tyr Ser Tyr
65 70 75 80

Lys Ala Arg Phe Thr Leu Ala Val Gly Asp Asn Arg Val Leu Asp Met
85 90 95

Ala Ser Thr Tyr Phe Asp Ile Arg Gly Val Leu Asp Arg Gly Pro Thr
100 105 110

Phe Lys Pro Tyr Ser Gly Thr Ala Tyr Asn Ala Leu Ala Pro Lys Gly
115 120 125

Ala Pro Asn Ser Cys Glu Trp Asp Glu Asp Asp Thr Gln Val Gln Val
130 135 140

Ala Ala Glu Asp Asp Gln Asp Asp Asp Glu Glu Glu Glu Gln Leu Pro
145 150 155 160

Gln Gln Arg Asn Gly Lys Lys Thr His Val Tyr Ala Gln Ala Pro Phe
165 170 175

Ala Gly Glu Ala Ile Asn Lys Asn Gly Leu Gln Ile Gly Thr Asn Gly
180 185 190

Ala Ala Thr Glu Gly Asn Lys Glu Ile Tyr Ala Asp Lys Thr Tyr Gln
195 200 205

Pro Glu Pro Gln Ile Gly Glu Ser Gln Trp Asn Glu Ala Glu Ser Ser
210 215 220

Val Ala Gly Gly Arg Val Leu Lys Lys Thr Thr Pro Met Lys Pro Cys
225 230 235 240

Tyr Gly Ser Tyr Ala Arg Pro Thr Asn Ser Asn Gly Gly Gln Gly Val
245 250 255

Met Val Glu Gln Asn Gly Lys Leu Glu Ser Gln Val Glu Met Gln Phe
260 265 270

Phe Ser Thr Ser Val Asn Ala Met Asn Glu Ala Asn Ala Ile Gln Pro
275 280 285

Lys Leu Val Leu Tyr Ser Glu Asp Val Asn Met Glu Thr Pro Asp Thr
290 295 300

His Leu Ser Tyr Lys Pro Gly Lys Ser Asp Asp Asn Ser Lys Ala Met
305 310 315 320

Leu Gly Gln Gln Ser Met Pro Asn Arg Pro Asn Tyr Ile Ala Phe Arg
325 330 335

Asp Asn Phe Ile Gly Leu Met Tyr Tyr Asn Ser Thr Gly Asn Met Gly
340 345 350

Val Leu Ala Gly Gln Ala Ser Gln Leu Asn Ala Val Val Asp Leu Gln
355 360 365

Asp Arg Asn Thr Glu Leu Ser Tyr Gln Leu Leu Leu Asp Ser Ile Gly
370 375 380

Asp Arg Thr Arg Tyr Phe Ser Met Trp Asn Gln Ala Val Asp Ser Tyr
385 390 395 400

Asp Pro Asp Val Arg Ile Ile Glu Asn His Gly Thr Glu Asp Glu Leu
405 410 415

Pro Asn Tyr Cys Phe Pro Leu Gly Gly Ile Gly Val Thr Asp Thr Tyr
420 425 430

Gln Ala Ile Lys Ala Thr Asn Gly Asn Gly Gly Ala Thr Thr Trp Ala
435 440 445

Gln Asp Asn Thr Phe Ala Glu Arg Asn Glu Ile Gly Val Gly Asn Asn
450 455 460

Phe Ala Met Glu Ile Asn Leu Asn Ala Asn Leu Trp Arg Asn Phe Leu
465 470 475 480

Tyr Ser Asn Ile Ala Leu Tyr Leu Pro Asp Lys Leu Lys Tyr Asn Pro
485 490 495

Thr Asn Val Glu Ile Ser Asp Asn Pro Asn Thr Tyr Asp Tyr Met Asn
500 505 510

Lys Arg Val Val Ala Pro Gly Leu Val Asp Cys Tyr Ile Asn Leu Gly
515 520 525

Ala Arg Trp Ser Leu Asp Tyr Met Asp Asn Val Asn Pro Phe Asn His
530 535 540

His Arg Asn Ala Gly Leu Arg Tyr Arg Ser Met Leu Leu Gly Asn Gly
545 550 555 560

Arg Tyr Val Pro Phe His Ile Gln Val Pro Gln Lys Phe Phe Ala Ile
565 570 575

Lys Asn Leu Leu Leu Leu Pro Gly Ser Tyr Thr Tyr Glu Trp Asn Phe
580 585 590

Arg Lys Asp Val Asn Met Val Leu Gln Ser Ser Leu Gly Asn Asp Leu
595 600 605

Arg Val Asp Gly Ala Ser Ile Lys Phe Asp Ser Ile Cys Leu Tyr Ala
610 615 620

Thr Phe Phe Pro Met Ala His Asn Thr Ala Ser Thr Leu Glu Ala Met
625 630 635 640

Leu Arg Asn Asp Thr Asn Asp Gln Ser Phe Asn Asp Tyr Leu Ser Ala
645 650 655

Ala Asn Met Leu Tyr Pro Ile Pro Ala Asn Ala Thr Asn Val Pro Ile
660 665 670

Ser Ile Pro Ser Arg Asn Trp Ala Ala Phe Arg Gly Trp Ala Phe Thr
675 680 685

Arg Leu Lys Thr Lys Glu Thr Pro Ser Leu Gly Ser Gly Tyr Asp Pro
690 695 700

Tyr Tyr Thr Tyr Ser Gly Ser Ile Pro Tyr Leu Asp Gly Thr Phe Tyr
705 710 715 720

Leu Asn His Thr Phe Lys Lys Val Ala Ile Thr Phe Asp Ser Ser Val
725 730 735

Ser Trp Pro Gly Asn Asp Arg Leu Leu Thr Pro Asn Glu Phe Glu Ile
740 745 750

Lys Arg Ser Val Asp Gly Glu Gly Tyr Asn Val Ala Gln Cys Asn Met
755 760 765

Thr Lys Asp Trp Phe Leu Val Gln Met Leu Ala Asn Tyr Asn Ile Gly
770 775 780

Tyr Gln Gly Phe Tyr Ile Pro Glu Ser Tyr Lys Asp Arg Met Tyr Ser
785 790 795 800

Phe Phe Arg Asn Phe Gln Pro Met Ser Arg Gln Val Val Asp Asp Thr
805 810 815

Lys Tyr Lys Asp Tyr Gln Gln Val Gly Ile Ile His Gln His Asn Asn
820 825 830

Ser Gly Phe Val Gly Tyr Leu Ala Pro Thr Met Arg Glu Gly Gln Ala
835 840 845

Tyr Pro Ala Asn Val Pro Tyr Pro Leu Ile Gly Lys Thr Ala Val Asp
850 855 860

Ser Ile Thr Gln Lys Lys Phe Leu Cys Asp Arg Thr Leu Trp Arg Ile
865 870 875 880

Pro Phe Ser Ser Asn Phe Met Ser Met Gly Ala Leu Thr Asp Leu Gly
885 890 895

Gln Asn Leu Leu Tyr Ala Asn Ser Ala His Ala Leu Asp Met Thr Phe
900 905 910

Glu Val Asp Pro Met Asp Glu Pro Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu
915 920 925

Val Phe Asp Val Val Arg Val His Gln Pro His Arg Gly Val Ile Glu
930 935 940

Thr Val Tyr Leu Arg Thr Pro Phe Ser Ala Gly Asn Ala Thr Thr
945 950 955

<210> 50
<211> 967
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit Hexon

<400> 50

Met Ala Thr Pro Ser Met Met Pro Gln Trp Ser Tyr Met His Ile Ser
1 5 10 15

Gly Gln Asp Ala Ser Glu Tyr Leu Ser Pro Gly Leu Val Gln Phe Ala
20 25 30

Arg Ala Thr Glu Thr Tyr Phe Ser Leu Asn Asn Lys Phe Arg Asn Pro
35 40 45

Thr Val Ala Pro Thr His Asp Val Thr Thr Asp Arg Ser Gln Arg Leu
50 55 60

Thr Leu Arg Phe Ile Pro Val Asp Arg Glu Asp Thr Ala Tyr Ser Tyr
65 70 75 80

Lys Ala Arg Phe Thr Leu Ala Val Gly Asp Asn Arg Val Leu Asp Met
85 90 95

Ala Ser Thr Tyr Phe Asp Ile Arg Gly Val Leu Asp Arg Gly Pro Thr
100 105 110

Phe Lys Pro Tyr Ser Gly Thr Ala Tyr Asn Ala Leu Ala Pro Lys Gly
115 120 125

Ala Pro Asn Ser Cys Glu Trp Asp Glu Asp Asp Thr Gln Val Gln Val
130 135 140

Ala Ala Glu Asp Asp Gln Asp Asp Asp Ser Ser Cys Ser Ser Gly Gly
145 150 155 160

Thr Glu Glu Glu Glu Gln Leu Pro Gln Gln Arg Asn Gly Lys Lys Thr
165 170 175

His Val Tyr Ala Gln Ala Pro Phe Ala Gly Glu Ala Ile Asn Lys Asn
180 185 190

Gly Leu Gln Ile Gly Thr Asn Gly Ala Ala Thr Glu Gly Asn Lys Glu
195 200 205

Ile Tyr Ala Asp Lys Thr Tyr Gln Pro Glu Pro Gln Ile Gly Glu Ser
210 215 220

Gln Trp Asn Glu Ala Glu Ser Ser Val Ala Gly Gly Arg Val Leu Lys
225 230 235 240

Lys Thr Thr Pro Met Lys Pro Cys Tyr Gly Ser Tyr Ala Arg Pro Thr
245 250 255

Asn Ser Asn Gly Gly Gln Gly Val Met Val Glu Gln Asn Gly Lys Leu
260 265 270

Glu Ser Gln Val Glu Met Gln Phe Phe Ser Thr Ser Val Asn Ala Met
275 280 285

Asn Glu Ala Asn Ala Ile Gln Pro Lys Leu Val Leu Tyr Ser Glu Asp
290 295 300

Val Asn Met Glu Thr Pro Asp Thr His Leu Ser Tyr Lys Pro Gly Lys
305 310 315 320

Ser Asp Asp Asn Ser Lys Ala Met Leu Gly Gln Gln Ser Met Pro Asn
325 330 335

Arg Pro Asn Tyr Ile Ala Phe Arg Asp Asn Phe Ile Gly Leu Met Tyr
340 345 350

Tyr Asn Ser Thr Gly Asn Met Gly Val Leu Ala Gly Gln Ala Ser Gln
355 360 365

Leu Asn Ala Val Val Asp Leu Gln Asp Arg Asn Thr Glu Leu Ser Tyr
370 375 380

Gln Leu Leu Leu Asp Ser Ile Gly Asp Arg Thr Arg Tyr Phe Ser Met
385 390 395 400

Trp Asn Gln Ala Val Asp Ser Tyr Asp Pro Asp Val Arg Ile Ile Glu
405 410 415

Asn His Gly Thr Glu Asp Glu Leu Pro Asn Tyr Cys Phe Pro Leu Gly
420 425 430

Gly Ile Gly Val Thr Asp Thr Tyr Gln Ala Ile Lys Ala Thr Asn Gly
435 440 445

Asn Gly Gly Ala Thr Thr Trp Ala Gln Asp Asn Thr Phe Ala Glu Arg
450 455 460

Asn Glu Ile Gly Val Gly Asn Asn Phe Ala Met Glu Ile Asn Leu Asn
465 470 475 480

Ala Asn Leu Trp Arg Asn Phe Leu Tyr Ser Asn Ile Ala Leu Tyr Leu
485 490 495

Pro Asp Lys Leu Lys Tyr Asn Pro Thr Asn Val Glu Ile Ser Asp Asn
500 505 510

Pro Asn Thr Tyr Asp Tyr Met Asn Lys Arg Val Val Ala Pro Gly Leu
515 520 525

Val Asp Cys Tyr Ile Asn Leu Gly Ala Arg Trp Ser Leu Asp Tyr Met
530 535 540

Asp Asn Val Asn Pro Phe Asn His His Arg Asn Ala Gly Leu Arg Tyr
545 550 555 560

Arg Ser Met Leu Leu Gly Asn Gly Arg Tyr Val Pro Phe His Ile Gln
565 570 575

Val Pro Gln Lys Phe Phe Ala Ile Lys Asn Leu Leu Leu Leu Pro Gly
580 585 590

Ser Tyr Thr Tyr Glu Trp Asn Phe Arg Lys Asp Val Asn Met Val Leu
595 600 605

Gln Ser Ser Leu Gly Asn Asp Leu Arg Val Asp Gly Ala Ser Ile Lys
610 615 620

Phe Asp Ser Ile Cys Leu Tyr Ala Thr Phe Phe Pro Met Ala His Asn
625 630 635 640

Thr Ala Ser Thr Leu Glu Ala Met Leu Arg Asn Asp Thr Asn Asp Gln
645 650 655

Ser Phe Asn Asp Tyr Leu Ser Ala Ala Asn Met Leu Tyr Pro Ile Pro
660 665 670

Ala Asn Ala Thr Asn Val Pro Ile Ser Ile Pro Ser Arg Asn Trp Ala
675 680 685

Ala Phe Arg Gly Trp Ala Phe Thr Arg Leu Lys Thr Lys Glu Thr Pro
690 695 700

Ser Leu Gly Ser Gly Tyr Asp Pro Tyr Tyr Thr Tyr Ser Gly Ser Ile
705 710 715 720

Pro Tyr Leu Asp Gly Thr Phe Tyr Leu Asn His Thr Phe Lys Lys Val
725 730 735

Ala Ile Thr Phe Asp Ser Ser Val Ser Trp Pro Gly Asn Asp Arg Leu
740 745 750

Leu Thr Pro Asn Glu Phe Glu Ile Lys Arg Ser Val Asp Gly Glu Gly
755 760 765

Tyr Asn Val Ala Gln Cys Asn Met Thr Lys Asp Trp Phe Leu Val Gln
770 775 780

Met Leu Ala Asn Tyr Asn Ile Gly Tyr Gln Gly Phe Tyr Ile Pro Glu
785 790 795 800

Ser Tyr Lys Asp Arg Met Tyr Ser Phe Phe Arg Asn Phe Gln Pro Met
805 810 815

Ser Arg Gln Val Val Asp Asp Thr Lys Tyr Lys Asp Tyr Gln Gln Val
820 825 830

Gly Ile Ile His Gln His Asn Asn Ser Gly Phe Val Gly Tyr Leu Ala
835 840 845

Pro Thr Met Arg Glu Gly Gln Ala Tyr Pro Ala Asn Val Pro Tyr Pro
850 855 860

Leu Ile Gly Lys Thr Ala Val Asp Ser Ile Thr Gln Lys Lys Phe Leu
865 870 875 880

Cys Asp Arg Thr Leu Trp Arg Ile Pro Phe Ser Ser Asn Phe Met Ser
885 890 895

Met Gly Ala Leu Thr Asp Leu Gly Gln Asn Leu Leu Tyr Ala Asn Ser
900 905 910

Ala His Ala Leu Asp Met Thr Phe Glu Val Asp Pro Met Asp Glu Pro
915 920 925

Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Phe Asp Val Val Arg Val His
930 935 940

Gln Pro His Arg Gly Val Ile Glu Thr Val Tyr Leu Arg Thr Pro Phe
945 950 955 960

Ser Ala Gly Asn Ala Thr Thr
965

<210> 51
<211> 955
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit Hexon

<400> 51

Met Ala Thr Pro Ser Met Met Pro Gln Trp Ser Tyr Met His Ile Ser
1 5 10 15

Gly Gln Asp Ala Ser Glu Tyr Leu Ser Pro Gly Leu Val Gln Phe Ala
20 25 30

Arg Ala Thr Glu Thr Tyr Phe Ser Leu Asn Asn Lys Phe Arg Asn Pro
35 40 45

Thr Val Ala Pro Thr His Asp Val Thr Thr Asp Arg Ser Gln Arg Leu
50 55 60

Thr Leu Arg Phe Ile Pro Val Asp Arg Glu Asp Thr Ala Tyr Ser Tyr
65 70 75 80

Lys Ala Arg Phe Thr Leu Ala Val Gly Asp Asn Arg Val Leu Asp Met
85 90 95

Ala Ser Thr Tyr Phe Asp Ile Arg Gly Val Leu Asp Arg Gly Pro Thr

100 105 110

Phe Lys Pro Tyr Ser Gly Thr Ala Tyr Asn Ala Leu Ala Pro Lys Gly
115 120 125

Ala Pro Asn Ser Cys Glu Trp Asp Glu Asp Asp Thr Gln Val Gln Val
130 135 140

Ala Ala Glu Asp Asp Gln Asp Asp Asp Glu Glu Glu Glu Gln Leu Pro
145 150 155 160

Gln Gln Arg Asn Gly Lys Lys Thr His Val Tyr Ala Gln Ala Pro Phe
165 170 175

Ala Gly Glu Ala Ile Asn Lys Asn Gly Leu Gln Ile Gly Thr Asn Gly
180 185 190

Ala Ala Thr Glu Gly Asn Lys Glu Ile Tyr Ala Asp Lys Thr Tyr Gln
195 200 205

Pro Glu Pro Gln Ile Gly Glu Ser Gln Trp Asn Glu Ala Glu Ser Ser
210 215 220

Val Ala Gly Gly Arg Val Leu Lys Lys Thr Thr Pro Met Lys Pro Cys
225 230 235 240

Tyr Gly Ser Tyr Ala Arg Pro Thr Asn Ser Asn Gly Gly Gln Gly Val
245 250 255

Met Val Glu Gln Asn Gly Lys Leu Glu Ser Gln Val Glu Met Gln Phe
260 265 270

Phe Ser Thr Ser Ser Cys Ser Ser Gly Gly Thr Pro Lys Leu Val Leu
275 280 285

Tyr Ser Glu Asp Val Asn Met Glu Thr Pro Asp Thr His Leu Ser Tyr
290 295 300

Lys Pro Gly Lys Ser Asp Asp Asn Ser Lys Ala Met Leu Gly Gln Gln
305 310 315 320

Ser Met Pro Asn Arg Pro Asn Tyr Ile Ala Phe Arg Asp Asn Phe Ile
325 330 335

Gly Leu Met Tyr Tyr Asn Ser Thr Gly Asn Met Gly Val Leu Ala Gly
340 345 350

Gln Ala Ser Gln Leu Asn Ala Val Val Asp Leu Gln Asp Arg Asn Thr
355 360 365

Glu Leu Ser Tyr Gln Leu Leu Leu Asp Ser Ile Gly Asp Arg Thr Arg

370 375 380

Tyr Phe Ser Met Trp Asn Gln Ala Val Asp Ser Tyr Asp Pro Asp Val
385 390 395 400

Arg Ile Ile Glu Asn His Gly Thr Glu Asp Glu Leu Pro Asn Tyr Cys
405 410 415

Phe Pro Leu Gly Gly Ile Gly Val Thr Asp Thr Tyr Gln Ala Ile Lys
420 425 430

Ala Thr Asn Gly Asn Gly Gly Ala Thr Thr Trp Ala Gln Asp Asn Thr
435 440 445

Phe Ala Glu Arg Asn Glu Ile Gly Val Gly Asn Asn Phe Ala Met Glu
450 455 460

Ile Asn Leu Asn Ala Asn Leu Trp Arg Asn Phe Leu Tyr Ser Asn Ile
465 470 475 480

Ala Leu Tyr Leu Pro Asp Lys Leu Lys Tyr Asn Pro Thr Asn Val Glu
485 490 495

Ile Ser Asp Asn Pro Asn Thr Tyr Asp Tyr Met Asn Lys Arg Val Val
500 505 510

Ala Pro Gly Leu Val Asp Cys Tyr Ile Asn Leu Gly Ala Arg Trp Ser
515 520 525

Leu Asp Tyr Met Asp Asn Val Asn Pro Phe Asn His His Arg Asn Ala
530 535 540

Gly Leu Arg Tyr Arg Ser Met Leu Leu Gly Asn Gly Arg Tyr Val Pro
545 550 555 560

Phe His Ile Gln Val Pro Gln Lys Phe Phe Ala Ile Lys Asn Leu Leu
565 570 575

Leu Leu Pro Gly Ser Tyr Thr Tyr Glu Trp Asn Phe Arg Lys Asp Val
580 585 590

Asn Met Val Leu Gln Ser Ser Leu Gly Asn Asp Leu Arg Val Asp Gly
595 600 605

Ala Ser Ile Lys Phe Asp Ser Ile Cys Leu Tyr Ala Thr Phe Phe Pro
610 615 620

Met Ala His Asn Thr Ala Ser Thr Leu Glu Ala Met Leu Arg Asn Asp
625 630 635 640

Thr Asn Asp Gln Ser Phe Asn Asp Tyr Leu Ser Ala Ala Asn Met Leu

645 650 655

Tyr Pro Ile Pro Ala Asn Ala Thr Asn Val Pro Ile Ser Ile Pro Ser
660 665 670

Arg Asn Trp Ala Ala Phe Arg Gly Trp Ala Phe Thr Arg Leu Lys Thr
675 680 685

Lys Glu Thr Pro Ser Leu Gly Ser Gly Tyr Asp Pro Tyr Tyr Thr Tyr
690 695 700

Ser Gly Ser Ile Pro Tyr Leu Asp Gly Thr Phe Tyr Leu Asn His Thr
705 710 715 720

Phe Lys Lys Val Ala Ile Thr Phe Asp Ser Ser Val Ser Trp Pro Gly
725 730 735

Asn Asp Arg Leu Leu Thr Pro Asn Glu Phe Glu Ile Lys Arg Ser Val
740 745 750

Asp Gly Glu Gly Tyr Asn Val Ala Gln Cys Asn Met Thr Lys Asp Trp
755 760 765

Phe Leu Val Gln Met Leu Ala Asn Tyr Asn Ile Gly Tyr Gln Gly Phe
770 775 780

Tyr Ile Pro Glu Ser Tyr Lys Asp Arg Met Tyr Ser Phe Phe Arg Asn
785 790 795 800

Phe Gln Pro Met Ser Arg Gln Val Val Asp Asp Thr Lys Tyr Lys Asp
805 810 815

Tyr Gln Gln Val Gly Ile Ile His Gln His Asn Asn Ser Gly Phe Val
820 825 830

Gly Tyr Leu Ala Pro Thr Met Arg Glu Gly Gln Ala Tyr Pro Ala Asn
835 840 845

Val Pro Tyr Pro Leu Ile Gly Lys Thr Ala Val Asp Ser Ile Thr Gln
850 855 860

Lys Lys Phe Leu Cys Asp Arg Thr Leu Trp Arg Ile Pro Phe Ser Ser
865 870 875 880

Asn Phe Met Ser Met Gly Ala Leu Thr Asp Leu Gly Gln Asn Leu Leu
885 890 895

Tyr Ala Asn Ser Ala His Ala Leu Asp Met Thr Phe Glu Val Asp Pro
900 905 910

Met Asp Glu Pro Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Phe Asp Val

915 920 925

Val Arg Val His Gln Pro His Arg Gly Val Ile Glu Thr Val Tyr Leu
930 935 940

Arg Thr Pro Phe Ser Ala Gly Asn Ala Thr Thr
945 950 955

<210> 52
<211> 964
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit Hexon

<400> 52

Met Ala Thr Pro Ser Met Met Pro Gln Trp Ser Tyr Met His Ile Ser
1 5 10 15

Gly Gln Asp Ala Ser Glu Tyr Leu Ser Pro Gly Leu Val Gln Phe Ala
20 25 30

Arg Ala Thr Glu Thr Tyr Phe Ser Leu Asn Asn Lys Phe Arg Asn Pro
35 40 45

Thr Val Ala Pro Thr His Asp Val Thr Thr Asp Arg Ser Gln Arg Leu
50 55 60

Thr Leu Arg Phe Ile Pro Val Asp Arg Glu Asp Thr Ala Tyr Ser Tyr
65 70 75 80

Lys Ala Arg Phe Thr Leu Ala Val Gly Asp Asn Arg Val Leu Asp Met
85 90 95

Ala Ser Thr Tyr Phe Asp Ile Arg Gly Val Leu Asp Arg Gly Pro Thr
100 105 110

Phe Lys Pro Tyr Ser Gly Thr Ala Tyr Asn Ala Leu Ala Pro Lys Gly
115 120 125

Ala Pro Asn Ser Cys Glu Trp Asp Glu Asp Asp Thr Gln Val Gln Val
130 135 140

Ala Ala Glu Asp Asp Gln Asp Asp Asp Ser Ser Gly Gly Thr Glu Glu
145 150 155 160

Glu Glu Gln Leu Pro Gln Gln Arg Asn Gly Lys Lys Thr His Val Tyr
165 170 175

```
Ala Gln Ala Pro Phe Ala Gly Glu Ala Ile Asn Lys Asn Gly Leu Gln
            180                 185                 190

Ile Gly Thr Asn Gly Ala Ala Thr Glu Gly Asn Lys Glu Ile Tyr Ala
        195                 200                 205

Asp Lys Thr Tyr Gln Pro Glu Pro Gln Ile Gly Glu Ser Gln Trp Asn
    210                 215                 220

Glu Ala Glu Ser Ser Val Ala Gly Gly Arg Val Leu Lys Lys Thr Thr
225                 230                 235                 240

Pro Met Lys Pro Cys Tyr Gly Ser Tyr Ala Arg Pro Thr Asn Ser Asn
                245                 250                 255

Gly Gly Gln Gly Val Met Val Glu Gln Asn Gly Lys Leu Glu Ser Gln
            260                 265                 270

Val Glu Met Gln Phe Phe Ser Thr Ser Val Asn Ala Met Asn Glu Ala
        275                 280                 285

Asn Ala Ile Gln Pro Lys Leu Val Leu Tyr Ser Glu Asp Val Asn Met
    290                 295                 300

Glu Thr Pro Asp Thr His Leu Ser Tyr Lys Pro Gly Lys Ser Asp Asp
305                 310                 315                 320

Asn Ser Lys Ala Met Leu Gly Gln Gln Ser Met Pro Asn Arg Pro Asn
                325                 330                 335

Tyr Ile Ala Phe Arg Asp Asn Phe Ile Gly Leu Met Tyr Tyr Asn Ser
            340                 345                 350

Thr Gly Asn Met Gly Val Leu Ala Gly Gln Ala Ser Gln Leu Asn Ala
        355                 360                 365

Val Val Asp Leu Gln Asp Arg Asn Thr Glu Leu Ser Tyr Gln Leu Leu
    370                 375                 380

Leu Asp Ser Ile Gly Asp Arg Thr Arg Tyr Phe Ser Met Trp Asn Gln
385                 390                 395                 400

Ala Val Asp Ser Tyr Asp Pro Asp Val Arg Ile Ile Glu Asn His Gly
                405                 410                 415

Thr Glu Asp Glu Leu Pro Asn Tyr Cys Phe Pro Leu Gly Gly Ile Gly
            420                 425                 430

Val Thr Asp Thr Tyr Gln Ala Ile Lys Ala Thr Asn Gly Asn Gly Gly
        435                 440                 445
```

```
Ala Thr Thr Trp Ala Gln Asp Asn Thr Phe Ala Glu Arg Asn Glu Ile
    450                 455                 460

Gly Val Gly Asn Asn Phe Ala Met Glu Ile Asn Leu Asn Ala Asn Leu
465                 470                 475                 480

Trp Arg Asn Phe Leu Tyr Ser Asn Ile Ala Leu Tyr Leu Pro Asp Lys
                485                 490                 495

Leu Lys Tyr Asn Pro Thr Asn Val Glu Ile Ser Asp Asn Pro Asn Thr
            500                 505                 510

Tyr Asp Tyr Met Asn Lys Arg Val Val Ala Pro Gly Leu Val Asp Cys
        515                 520                 525

Tyr Ile Asn Leu Gly Ala Arg Trp Ser Leu Asp Tyr Met Asp Asn Val
    530                 535                 540

Asn Pro Phe Asn His His Arg Asn Ala Gly Leu Arg Tyr Arg Ser Met
545                 550                 555                 560

Leu Leu Gly Asn Gly Arg Tyr Val Pro Phe His Ile Gln Val Pro Gln
                565                 570                 575

Lys Phe Phe Ala Ile Lys Asn Leu Leu Leu Leu Pro Gly Ser Tyr Thr
            580                 585                 590

Tyr Glu Trp Asn Phe Arg Lys Asp Val Asn Met Val Leu Gln Ser Ser
        595                 600                 605

Leu Gly Asn Asp Leu Arg Val Asp Gly Ala Ser Ile Lys Phe Asp Ser
    610                 615                 620

Ile Cys Leu Tyr Ala Thr Phe Phe Pro Met Ala His Asn Thr Ala Ser
625                 630                 635                 640

Thr Leu Glu Ala Met Leu Arg Asn Asp Thr Asn Asp Gln Ser Phe Asn
                645                 650                 655

Asp Tyr Leu Ser Ala Ala Asn Met Leu Tyr Pro Ile Pro Ala Asn Ala
            660                 665                 670

Thr Asn Val Pro Ile Ser Ile Pro Ser Arg Asn Trp Ala Ala Phe Arg
        675                 680                 685

Gly Trp Ala Phe Thr Arg Leu Lys Thr Lys Glu Thr Pro Ser Leu Gly
    690                 695                 700

Ser Gly Tyr Asp Pro Tyr Tyr Thr Tyr Ser Gly Ser Ile Pro Tyr Leu
705                 710                 715                 720
```

Asp Gly Thr Phe Tyr Leu Asn His Thr Phe Lys Lys Val Ala Ile Thr
725 730 735

Phe Asp Ser Ser Val Ser Trp Pro Gly Asn Asp Arg Leu Leu Thr Pro
740 745 750

Asn Glu Phe Glu Ile Lys Arg Ser Val Asp Gly Glu Gly Tyr Asn Val
755 760 765

Ala Gln Cys Asn Met Thr Lys Asp Trp Phe Leu Val Gln Met Leu Ala
770 775 780

Asn Tyr Asn Ile Gly Tyr Gln Gly Phe Tyr Ile Pro Glu Ser Tyr Lys
785 790 795 800

Asp Arg Met Tyr Ser Phe Phe Arg Asn Phe Gln Pro Met Ser Arg Gln
805 810 815

Val Val Asp Asp Thr Lys Tyr Lys Asp Tyr Gln Gln Val Gly Ile Ile
820 825 830

His Gln His Asn Asn Ser Gly Phe Val Gly Tyr Leu Ala Pro Thr Met
835 840 845

Arg Glu Gly Gln Ala Tyr Pro Ala Asn Val Pro Tyr Pro Leu Ile Gly
850 855 860

Lys Thr Ala Val Asp Ser Ile Thr Gln Lys Lys Phe Leu Cys Asp Arg
865 870 875 880

Thr Leu Trp Arg Ile Pro Phe Ser Ser Asn Phe Met Ser Met Gly Ala
885 890 895

Leu Thr Asp Leu Gly Gln Asn Leu Leu Tyr Ala Asn Ser Ala His Ala
900 905 910

Leu Asp Met Thr Phe Glu Val Asp Pro Met Asp Glu Pro Thr Leu Leu
915 920 925

Tyr Val Leu Phe Glu Val Phe Asp Val Val Arg Val His Gln Pro His
930 935 940

Arg Gly Val Ile Glu Thr Val Tyr Leu Arg Thr Pro Phe Ser Ala Gly
945 950 955 960

Asn Ala Thr Thr

<210> 53
<211> 952
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit Hexon

<400> 53

Met Ala Thr Pro Ser Met Met Pro Gln Trp Ser Tyr Met His Ile Ser
1 5 10 15

Gly Gln Asp Ala Ser Glu Tyr Leu Ser Pro Gly Leu Val Gln Phe Ala
20 25 30

Arg Ala Thr Glu Thr Tyr Phe Ser Leu Asn Asn Lys Phe Arg Asn Pro
35 40 45

Thr Val Ala Pro Thr His Asp Val Thr Thr Asp Arg Ser Gln Arg Leu
50 55 60

Thr Leu Arg Phe Ile Pro Val Asp Arg Glu Asp Thr Ala Tyr Ser Tyr
65 70 75 80

Lys Ala Arg Phe Thr Leu Ala Val Gly Asp Asn Arg Val Leu Asp Met
85 90 95

Ala Ser Thr Tyr Phe Asp Ile Arg Gly Val Leu Asp Arg Gly Pro Thr
100 105 110

Phe Lys Pro Tyr Ser Gly Thr Ala Tyr Asn Ala Leu Ala Pro Lys Gly
115 120 125

Ala Pro Asn Ser Cys Glu Trp Asp Glu Asp Asp Thr Gln Val Gln Val
130 135 140

Ala Ala Glu Asp Asp Gln Asp Asp Asp Glu Glu Glu Glu Gln Leu Pro
145 150 155 160

Gln Gln Arg Asn Gly Lys Lys Thr His Val Tyr Ala Gln Ala Pro Phe
165 170 175

Ala Gly Glu Ala Ile Asn Lys Asn Gly Leu Gln Ile Gly Thr Asn Gly
180 185 190

Ala Ala Thr Glu Gly Asn Lys Glu Ile Tyr Ala Asp Lys Thr Tyr Gln
195 200 205

Pro Glu Pro Gln Ile Gly Glu Ser Gln Trp Asn Glu Ala Glu Ser Ser
210 215 220

Val Ala Gly Gly Arg Val Leu Lys Lys Thr Thr Pro Met Lys Pro Cys
225 230 235 240

Tyr Gly Ser Tyr Ala Arg Pro Thr Asn Ser Asn Gly Gly Gln Gly Val
245 250 255

Met Val Glu Gln Asn Gly Lys Leu Glu Ser Gln Val Glu Met Gln Phe
260 265 270

Phe Ser Thr Ser Ser Gly Gly Thr Pro Lys Leu Val Leu Tyr Ser Glu
275 280 285

Asp Val Asn Met Glu Thr Pro Asp Thr His Leu Ser Tyr Lys Pro Gly
290 295 300

Lys Ser Asp Asp Asn Ser Lys Ala Met Leu Gly Gln Gln Ser Met Pro
305 310 315 320

Asn Arg Pro Asn Tyr Ile Ala Phe Arg Asp Asn Phe Ile Gly Leu Met
325 330 335

Tyr Tyr Asn Ser Thr Gly Asn Met Gly Val Leu Ala Gly Gln Ala Ser
340 345 350

Gln Leu Asn Ala Val Val Asp Leu Gln Asp Arg Asn Thr Glu Leu Ser
355 360 365

Tyr Gln Leu Leu Leu Asp Ser Ile Gly Asp Arg Thr Arg Tyr Phe Ser
370 375 380

Met Trp Asn Gln Ala Val Asp Ser Tyr Asp Pro Asp Val Arg Ile Ile
385 390 395 400

Glu Asn His Gly Thr Glu Asp Glu Leu Pro Asn Tyr Cys Phe Pro Leu
405 410 415

Gly Gly Ile Gly Val Thr Asp Thr Tyr Gln Ala Ile Lys Ala Thr Asn
420 425 430

Gly Asn Gly Gly Ala Thr Thr Trp Ala Gln Asp Asn Thr Phe Ala Glu
435 440 445

Arg Asn Glu Ile Gly Val Gly Asn Asn Phe Ala Met Glu Ile Asn Leu
450 455 460

Asn Ala Asn Leu Trp Arg Asn Phe Leu Tyr Ser Asn Ile Ala Leu Tyr
465 470 475 480

Leu Pro Asp Lys Leu Lys Tyr Asn Pro Thr Asn Val Glu Ile Ser Asp
485 490 495

Asn Pro Asn Thr Tyr Asp Tyr Met Asn Lys Arg Val Val Ala Pro Gly
500 505 510

Leu Val Asp Cys Tyr Ile Asn Leu Gly Ala Arg Trp Ser Leu Asp Tyr
515 520 525

Met Asp Asn Val Asn Pro Phe Asn His His Arg Asn Ala Gly Leu Arg
530 535 540

Tyr Arg Ser Met Leu Leu Gly Asn Gly Arg Tyr Val Pro Phe His Ile
545 550 555 560

Gln Val Pro Gln Lys Phe Phe Ala Ile Lys Asn Leu Leu Leu Leu Pro
565 570 575

Gly Ser Tyr Thr Tyr Glu Trp Asn Phe Arg Lys Asp Val Asn Met Val
580 585 590

Leu Gln Ser Ser Leu Gly Asn Asp Leu Arg Val Asp Gly Ala Ser Ile
595 600 605

Lys Phe Asp Ser Ile Cys Leu Tyr Ala Thr Phe Phe Pro Met Ala His
610 615 620

Asn Thr Ala Ser Thr Leu Glu Ala Met Leu Arg Asn Asp Thr Asn Asp
625 630 635 640

Gln Ser Phe Asn Asp Tyr Leu Ser Ala Ala Asn Met Leu Tyr Pro Ile
645 650 655

Pro Ala Asn Ala Thr Asn Val Pro Ile Ser Ile Pro Ser Arg Asn Trp
660 665 670

Ala Ala Phe Arg Gly Trp Ala Phe Thr Arg Leu Lys Thr Lys Glu Thr
675 680 685

Pro Ser Leu Gly Ser Gly Tyr Asp Pro Tyr Tyr Thr Tyr Ser Gly Ser
690 695 700

Ile Pro Tyr Leu Asp Gly Thr Phe Tyr Leu Asn His Thr Phe Lys Lys
705 710 715 720

Val Ala Ile Thr Phe Asp Ser Ser Val Ser Trp Pro Gly Asn Asp Arg
725 730 735

Leu Leu Thr Pro Asn Glu Phe Glu Ile Lys Arg Ser Val Asp Gly Glu
740 745 750

Gly Tyr Asn Val Ala Gln Cys Asn Met Thr Lys Asp Trp Phe Leu Val
755 760 765

Gln Met Leu Ala Asn Tyr Asn Ile Gly Tyr Gln Gly Phe Tyr Ile Pro
770 775 780

Glu Ser Tyr Lys Asp Arg Met Tyr Ser Phe Phe Arg Asn Phe Gln Pro
785 790 795 800

Met Ser Arg Gln Val Val Asp Asp Thr Lys Tyr Lys Asp Tyr Gln Gln
805 810 815

Val Gly Ile Ile His Gln His Asn Asn Ser Gly Phe Val Gly Tyr Leu
820 825 830

Ala Pro Thr Met Arg Glu Gly Gln Ala Tyr Pro Ala Asn Val Pro Tyr
835 840 845

Pro Leu Ile Gly Lys Thr Ala Val Asp Ser Ile Thr Gln Lys Lys Phe
850 855 860

Leu Cys Asp Arg Thr Leu Trp Arg Ile Pro Phe Ser Ser Asn Phe Met
865 870 875 880

Ser Met Gly Ala Leu Thr Asp Leu Gly Gln Asn Leu Leu Tyr Ala Asn
885 890 895

Ser Ala His Ala Leu Asp Met Thr Phe Glu Val Asp Pro Met Asp Glu
900 905 910

Pro Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Phe Asp Val Val Arg Val
915 920 925

His Gln Pro His Arg Gly Val Ile Glu Thr Val Tyr Leu Arg Thr Pro
930 935 940

Phe Ser Ala Gly Asn Ala Thr Thr
945 950

<210> 54
<211> 1033
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit Hexon

<400> 54

Met Ala Thr Pro Ser Met Met Pro Gln Trp Ser Tyr Met His Ile Ser
1 5 10 15

Gly Gln Asp Ala Ser Glu Tyr Leu Ser Pro Gly Leu Val Gln Phe Ala
20 25 30

Arg Ala Thr Glu Thr Tyr Phe Ser Leu Asn Asn Lys Phe Arg Asn Pro

35 40 45

Thr Val Ala Pro Thr His Asp Val Thr Thr Asp Arg Ser Gln Arg Leu
50 55 60

Thr Leu Arg Phe Ile Pro Val Asp Arg Glu Asp Thr Ala Tyr Ser Tyr
65 70 75 80

Lys Ala Arg Phe Thr Leu Ala Val Gly Asp Asn Arg Val Leu Asp Met
85 90 95

Ala Ser Thr Tyr Phe Asp Ile Arg Gly Val Leu Asp Arg Gly Pro Thr
100 105 110

Phe Lys Pro Tyr Ser Gly Thr Ala Tyr Asn Ala Leu Ala Pro Lys Gly
115 120 125

Ala Pro Asn Ser Cys Glu Trp Asp Glu Asp Asp Thr Gln Val Gln Val
130 135 140

Ala Ala Glu Asp Asp Gln Asp Asp Asp Ser Thr Gly Glu Ile Pro Ala
145 150 155 160

Pro Leu Ala Gly Thr Val Ser Lys Ile Leu Val Lys Glu Gly Asp Thr
165 170 175

Val Lys Ala Gly Gln Thr Val Leu Val Leu Glu Ala Met Lys Met Glu
180 185 190

Thr Glu Ile Asn Ala Pro Thr Asp Gly Lys Val Glu Lys Val Leu Val
195 200 205

Lys Glu Arg Asp Ala Val Gln Gly Gly Gln Gly Leu Ile Lys Ile Gly
210 215 220

Gly Gly Thr Glu Glu Glu Glu Gln Leu Pro Gln Gln Arg Asn Gly Lys
225 230 235 240

Lys Thr His Val Tyr Ala Gln Ala Pro Phe Ala Gly Glu Ala Ile Asn
245 250 255

Lys Asn Gly Leu Gln Ile Gly Thr Asn Gly Ala Ala Thr Glu Gly Asn
260 265 270

Lys Glu Ile Tyr Ala Asp Lys Thr Tyr Gln Pro Glu Pro Gln Ile Gly
275 280 285

Glu Ser Gln Trp Asn Glu Ala Glu Ser Ser Val Ala Gly Gly Arg Val
290 295 300

Leu Lys Lys Thr Thr Pro Met Lys Pro Cys Tyr Gly Ser Tyr Ala Arg

305 310 315 320

Pro Thr Asn Ser Asn Gly Gly Gln Gly Val Met Val Glu Gln Asn Gly
325 330 335

Lys Leu Glu Ser Gln Val Glu Met Gln Phe Phe Ser Thr Ser Val Asn
340 345 350

Ala Met Asn Glu Ala Asn Ala Ile Gln Pro Lys Leu Val Leu Tyr Ser
355 360 365

Glu Asp Val Asn Met Glu Thr Pro Asp Thr His Leu Ser Tyr Lys Pro
370 375 380

Gly Lys Ser Asp Asp Asn Ser Lys Ala Met Leu Gly Gln Gln Ser Met
385 390 395 400

Pro Asn Arg Pro Asn Tyr Ile Ala Phe Arg Asp Asn Phe Ile Gly Leu
405 410 415

Met Tyr Tyr Asn Ser Thr Gly Asn Met Gly Val Leu Ala Gly Gln Ala
420 425 430

Ser Gln Leu Asn Ala Val Val Asp Leu Gln Asp Arg Asn Thr Glu Leu
435 440 445

Ser Tyr Gln Leu Leu Leu Asp Ser Ile Gly Asp Arg Thr Arg Tyr Phe
450 455 460

Ser Met Trp Asn Gln Ala Val Asp Ser Tyr Asp Pro Asp Val Arg Ile
465 470 475 480

Ile Glu Asn His Gly Thr Glu Asp Glu Leu Pro Asn Tyr Cys Phe Pro
485 490 495

Leu Gly Gly Ile Gly Val Thr Asp Thr Tyr Gln Ala Ile Lys Ala Thr
500 505 510

Asn Gly Asn Gly Gly Ala Thr Thr Trp Ala Gln Asp Asn Thr Phe Ala
515 520 525

Glu Arg Asn Glu Ile Gly Val Gly Asn Asn Phe Ala Met Glu Ile Asn
530 535 540

Leu Asn Ala Asn Leu Trp Arg Asn Phe Leu Tyr Ser Asn Ile Ala Leu
545 550 555 560

Tyr Leu Pro Asp Lys Leu Lys Tyr Asn Pro Thr Asn Val Glu Ile Ser
565 570 575

Asp Asn Pro Asn Thr Tyr Asp Tyr Met Asn Lys Arg Val Val Ala Pro

580 585 590

Gly Leu Val Asp Cys Tyr Ile Asn Leu Gly Ala Arg Trp Ser Leu Asp
595 600 605

Tyr Met Asp Asn Val Asn Pro Phe Asn His His Arg Asn Ala Gly Leu
610 615 620

Arg Tyr Arg Ser Met Leu Leu Gly Asn Gly Arg Tyr Val Pro Phe His
625 630 635 640

Ile Gln Val Pro Gln Lys Phe Phe Ala Ile Lys Asn Leu Leu Leu Leu
645 650 655

Pro Gly Ser Tyr Thr Tyr Glu Trp Asn Phe Arg Lys Asp Val Asn Met
660 665 670

Val Leu Gln Ser Ser Leu Gly Asn Asp Leu Arg Val Asp Gly Ala Ser
675 680 685

Ile Lys Phe Asp Ser Ile Cys Leu Tyr Ala Thr Phe Phe Pro Met Ala
690 695 700

His Asn Thr Ala Ser Thr Leu Glu Ala Met Leu Arg Asn Asp Thr Asn
705 710 715 720

Asp Gln Ser Phe Asn Asp Tyr Leu Ser Ala Ala Asn Met Leu Tyr Pro
725 730 735

Ile Pro Ala Asn Ala Thr Asn Val Pro Ile Ser Ile Pro Ser Arg Asn
740 745 750

Trp Ala Ala Phe Arg Gly Trp Ala Phe Thr Arg Leu Lys Thr Lys Glu
755 760 765

Thr Pro Ser Leu Gly Ser Gly Tyr Asp Pro Tyr Tyr Thr Tyr Ser Gly
770 775 780

Ser Ile Pro Tyr Leu Asp Gly Thr Phe Tyr Leu Asn His Thr Phe Lys
785 790 795 800

Lys Val Ala Ile Thr Phe Asp Ser Ser Val Ser Trp Pro Gly Asn Asp
805 810 815

Arg Leu Leu Thr Pro Asn Glu Phe Glu Ile Lys Arg Ser Val Asp Gly
820 825 830

Glu Gly Tyr Asn Val Ala Gln Cys Asn Met Thr Lys Asp Trp Phe Leu
835 840 845

Val Gln Met Leu Ala Asn Tyr Asn Ile Gly Tyr Gln Gly Phe Tyr Ile

850 855 860

Pro Glu Ser Tyr Lys Asp Arg Met Tyr Ser Phe Phe Arg Asn Phe Gln
865 870 875 880

Pro Met Ser Arg Gln Val Val Asp Asp Thr Lys Tyr Lys Asp Tyr Gln
885 890 895

Gln Val Gly Ile Ile His Gln His Asn Asn Ser Gly Phe Val Gly Tyr
900 905 910

Leu Ala Pro Thr Met Arg Glu Gly Gln Ala Tyr Pro Ala Asn Val Pro
915 920 925

Tyr Pro Leu Ile Gly Lys Thr Ala Val Asp Ser Ile Thr Gln Lys Lys
930 935 940

Phe Leu Cys Asp Arg Thr Leu Trp Arg Ile Pro Phe Ser Ser Asn Phe
945 950 955 960

Met Ser Met Gly Ala Leu Thr Asp Leu Gly Gln Asn Leu Leu Tyr Ala
965 970 975

Asn Ser Ala His Ala Leu Asp Met Thr Phe Glu Val Asp Pro Met Asp
980 985 990

Glu Pro Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Phe Asp Val Val Arg
995 1000 1005

Val His Gln Pro His Arg Gly Val Ile Glu Thr Val Tyr Leu Arg
1010 1015 1020

Thr Pro Phe Ser Ala Gly Asn Ala Thr Thr
1025 1030

<210> 55
<211> 1021
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit Hexon

<400> 55

Met Ala Thr Pro Ser Met Met Pro Gln Trp Ser Tyr Met His Ile Ser
1 5 10 15

Gly Gln Asp Ala Ser Glu Tyr Leu Ser Pro Gly Leu Val Gln Phe Ala
20 25 30

```
Arg Ala Thr Glu Thr Tyr Phe Ser Leu Asn Asn Lys Phe Arg Asn Pro
        35                  40                  45

Thr Val Ala Pro Thr His Asp Val Thr Thr Asp Arg Ser Gln Arg Leu
    50                  55                  60

Thr Leu Arg Phe Ile Pro Val Asp Arg Glu Asp Thr Ala Tyr Ser Tyr
65                  70                  75                  80

Lys Ala Arg Phe Thr Leu Ala Val Gly Asp Asn Arg Val Leu Asp Met
                85                  90                  95

Ala Ser Thr Tyr Phe Asp Ile Arg Gly Val Leu Asp Arg Gly Pro Thr
            100                 105                 110

Phe Lys Pro Tyr Ser Gly Thr Ala Tyr Asn Ala Leu Ala Pro Lys Gly
        115                 120                 125

Ala Pro Asn Ser Cys Glu Trp Asp Glu Asp Asp Thr Gln Val Gln Val
    130                 135                 140

Ala Ala Glu Asp Asp Gln Asp Asp Asp Glu Glu Glu Glu Gln Leu Pro
145                 150                 155                 160

Gln Gln Arg Asn Gly Lys Lys Thr His Val Tyr Ala Gln Ala Pro Phe
                165                 170                 175

Ala Gly Glu Ala Ile Asn Lys Asn Gly Leu Gln Ile Gly Thr Asn Gly
            180                 185                 190

Ala Ala Thr Glu Gly Asn Lys Glu Ile Tyr Ala Asp Lys Thr Tyr Gln
        195                 200                 205

Pro Glu Pro Gln Ile Gly Glu Ser Gln Trp Asn Glu Ala Glu Ser Ser
    210                 215                 220

Val Ala Gly Gly Arg Val Leu Lys Lys Thr Thr Pro Met Lys Pro Cys
225                 230                 235                 240

Tyr Gly Ser Tyr Ala Arg Pro Thr Asn Ser Asn Gly Gly Gln Gly Val
                245                 250                 255

Met Val Glu Gln Asn Gly Lys Leu Glu Ser Gln Val Glu Met Gln Phe
            260                 265                 270

Phe Ser Thr Ser Thr Gly Glu Ile Pro Ala Pro Leu Ala Gly Thr Val
        275                 280                 285

Ser Lys Ile Leu Val Lys Glu Gly Asp Thr Val Lys Ala Gly Gln Thr
    290                 295                 300
```

Val Leu Val Leu Glu Ala Met Lys Met Glu Thr Glu Ile Asn Ala Pro
305 310 315 320

Thr Asp Gly Lys Val Glu Lys Val Leu Val Lys Glu Arg Asp Ala Val
325 330 335

Gln Gly Gly Gln Gly Leu Ile Lys Ile Gly Gly Gly Thr Pro Lys Leu
340 345 350

Val Leu Tyr Ser Glu Asp Val Asn Met Glu Thr Pro Asp Thr His Leu
355 360 365

Ser Tyr Lys Pro Gly Lys Ser Asp Asp Asn Ser Lys Ala Met Leu Gly
370 375 380

Gln Gln Ser Met Pro Asn Arg Pro Asn Tyr Ile Ala Phe Arg Asp Asn
385 390 395 400

Phe Ile Gly Leu Met Tyr Tyr Asn Ser Thr Gly Asn Met Gly Val Leu
405 410 415

Ala Gly Gln Ala Ser Gln Leu Asn Ala Val Val Asp Leu Gln Asp Arg
420 425 430

Asn Thr Glu Leu Ser Tyr Gln Leu Leu Leu Asp Ser Ile Gly Asp Arg
435 440 445

Thr Arg Tyr Phe Ser Met Trp Asn Gln Ala Val Asp Ser Tyr Asp Pro
450 455 460

Asp Val Arg Ile Ile Glu Asn His Gly Thr Glu Asp Glu Leu Pro Asn
465 470 475 480

Tyr Cys Phe Pro Leu Gly Gly Ile Gly Val Thr Asp Thr Tyr Gln Ala
485 490 495

Ile Lys Ala Thr Asn Gly Asn Gly Gly Ala Thr Thr Trp Ala Gln Asp
500 505 510

Asn Thr Phe Ala Glu Arg Asn Glu Ile Gly Val Gly Asn Asn Phe Ala
515 520 525

Met Glu Ile Asn Leu Asn Ala Asn Leu Trp Arg Asn Phe Leu Tyr Ser
530 535 540

Asn Ile Ala Leu Tyr Leu Pro Asp Lys Leu Lys Tyr Asn Pro Thr Asn
545 550 555 560

Val Glu Ile Ser Asp Asn Pro Asn Thr Tyr Asp Tyr Met Asn Lys Arg
565 570 575

Val Val Ala Pro Gly Leu Val Asp Cys Tyr Ile Asn Leu Gly Ala Arg
580 585 590

Trp Ser Leu Asp Tyr Met Asp Asn Val Asn Pro Phe Asn His His Arg
595 600 605

Asn Ala Gly Leu Arg Tyr Arg Ser Met Leu Leu Gly Asn Gly Arg Tyr
610 615 620

Val Pro Phe His Ile Gln Val Pro Gln Lys Phe Phe Ala Ile Lys Asn
625 630 635 640

Leu Leu Leu Leu Pro Gly Ser Tyr Thr Tyr Glu Trp Asn Phe Arg Lys
645 650 655

Asp Val Asn Met Val Leu Gln Ser Ser Leu Gly Asn Asp Leu Arg Val
660 665 670

Asp Gly Ala Ser Ile Lys Phe Asp Ser Ile Cys Leu Tyr Ala Thr Phe
675 680 685

Phe Pro Met Ala His Asn Thr Ala Ser Thr Leu Glu Ala Met Leu Arg
690 695 700

Asn Asp Thr Asn Asp Gln Ser Phe Asn Asp Tyr Leu Ser Ala Ala Asn
705 710 715 720

Met Leu Tyr Pro Ile Pro Ala Asn Ala Thr Asn Val Pro Ile Ser Ile
725 730 735

Pro Ser Arg Asn Trp Ala Ala Phe Arg Gly Trp Ala Phe Thr Arg Leu
740 745 750

Lys Thr Lys Glu Thr Pro Ser Leu Gly Ser Gly Tyr Asp Pro Tyr Tyr
755 760 765

Thr Tyr Ser Gly Ser Ile Pro Tyr Leu Asp Gly Thr Phe Tyr Leu Asn
770 775 780

His Thr Phe Lys Lys Val Ala Ile Thr Phe Asp Ser Ser Val Ser Trp
785 790 795 800

Pro Gly Asn Asp Arg Leu Leu Thr Pro Asn Glu Phe Glu Ile Lys Arg
805 810 815

Ser Val Asp Gly Glu Gly Tyr Asn Val Ala Gln Cys Asn Met Thr Lys
820 825 830

Asp Trp Phe Leu Val Gln Met Leu Ala Asn Tyr Asn Ile Gly Tyr Gln
835 840 845

Gly Phe Tyr Ile Pro Glu Ser Tyr Lys Asp Arg Met Tyr Ser Phe Phe
850 855 860

Arg Asn Phe Gln Pro Met Ser Arg Gln Val Val Asp Asp Thr Lys Tyr
865 870 875 880

Lys Asp Tyr Gln Gln Val Gly Ile Ile His Gln His Asn Asn Ser Gly
885 890 895

Phe Val Gly Tyr Leu Ala Pro Thr Met Arg Glu Gly Gln Ala Tyr Pro
900 905 910

Ala Asn Val Pro Tyr Pro Leu Ile Gly Lys Thr Ala Val Asp Ser Ile
915 920 925

Thr Gln Lys Lys Phe Leu Cys Asp Arg Thr Leu Trp Arg Ile Pro Phe
930 935 940

Ser Ser Asn Phe Met Ser Met Gly Ala Leu Thr Asp Leu Gly Gln Asn
945 950 955 960

Leu Leu Tyr Ala Asn Ser Ala His Ala Leu Asp Met Thr Phe Glu Val
965 970 975

Asp Pro Met Asp Glu Pro Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Phe
980 985 990

Asp Val Val Arg Val His Gln Pro His Arg Gly Val Ile Glu Thr Val
995 1000 1005

Tyr Leu Arg Thr Pro Phe Ser Ala Gly Asn Ala Thr Thr
1010 1015 1020

<210> 56
<211> 1015
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit Hexon

<400> 56

Met Ala Thr Pro Ser Met Met Pro Gln Trp Ser Tyr Met His Ile Ser
1 5 10 15

Gly Gln Asp Ala Ser Glu Tyr Leu Ser Pro Gly Leu Val Gln Phe Ala
20 25 30

Arg Ala Thr Glu Thr Tyr Phe Ser Leu Asn Asn Lys Phe Arg Asn Pro
35 40 45

```
Thr Val Ala Pro Thr His Asp Val Thr Thr Asp Arg Ser Gln Arg Leu
    50                  55                  60

Thr Leu Arg Phe Ile Pro Val Asp Arg Glu Asp Thr Ala Tyr Ser Tyr
65                  70                  75                  80

Lys Ala Arg Phe Thr Leu Ala Val Gly Asp Asn Arg Val Leu Asp Met
                85                  90                  95

Ala Ser Thr Tyr Phe Asp Ile Arg Gly Val Leu Asp Arg Gly Pro Thr
            100                 105                 110

Phe Lys Pro Tyr Ser Gly Thr Ala Tyr Asn Ala Leu Ala Pro Lys Gly
        115                 120                 125

Ala Pro Asn Ser Cys Glu Trp Asp Glu Asp Asp Thr Gln Val Gln Val
    130                 135                 140

Ala Ala Glu Asp Asp Gln Asp Asp Asp Glu Glu Glu Glu Gln Leu Pro
145                 150                 155                 160

Gln Gln Arg Asn Gly Lys Lys Thr His Val Tyr Ala Gln Ala Pro Phe
                165                 170                 175

Ala Gly Glu Ala Ile Asn Lys Asn Gly Leu Gln Ile Gly Thr Asn Gly
            180                 185                 190

Ala Ala Thr Glu Gly Asn Lys Glu Ile Tyr Ala Asp Lys Thr Tyr Gln
        195                 200                 205

Pro Glu Pro Gln Ile Gly Glu Ser Gln Trp Asn Glu Ala Glu Ser Ser
    210                 215                 220

Val Ala Gly Gly Arg Val Leu Lys Lys Thr Thr Pro Met Lys Pro Cys
225                 230                 235                 240

Tyr Gly Ser Tyr Ala Arg Pro Thr Asn Ser Asn Gly Gly Gln Gly Val
                245                 250                 255

Met Val Glu Gln Asn Gly Lys Leu Glu Ser Gln Val Glu Met Gln Phe
            260                 265                 270

Phe Ser Thr Ser Ser Ser Asn Phe Thr Arg Glu Gly Asn Val Thr Tyr
        275                 280                 285

Lys Glu Glu Met Asp Lys Val Lys Asn Cys Ser Phe Asn Val Thr Thr
    290                 295                 300

Gly Ile Arg Asp Lys Lys Gln Lys Val Asn Ala Leu Phe Tyr Arg Leu
305                 310                 315                 320
```

Asp Ile Thr Pro Leu Asp Glu Asn Asn Asn Asn Ser Ser Glu Tyr Arg
325 330 335

Leu Ile Asn Ser Gly Gly Thr Pro Lys Leu Val Leu Tyr Ser Glu Asp
340 345 350

Val Asn Met Glu Thr Pro Asp Thr His Leu Ser Tyr Lys Pro Gly Lys
355 360 365

Ser Asp Asp Asn Ser Lys Ala Met Leu Gly Gln Gln Ser Met Pro Asn
370 375 380

Arg Pro Asn Tyr Ile Ala Phe Arg Asp Asn Phe Ile Gly Leu Met Tyr
385 390 395 400

Tyr Asn Ser Thr Gly Asn Met Gly Val Leu Ala Gly Gln Ala Ser Gln
405 410 415

Leu Asn Ala Val Val Asp Leu Gln Asp Arg Asn Thr Glu Leu Ser Tyr
420 425 430

Gln Leu Leu Leu Asp Ser Ile Gly Asp Arg Thr Arg Tyr Phe Ser Met
435 440 445

Trp Asn Gln Ala Val Asp Ser Tyr Asp Pro Asp Val Arg Ile Ile Glu
450 455 460

Asn His Gly Thr Glu Asp Glu Leu Pro Asn Tyr Cys Phe Pro Leu Gly
465 470 475 480

Gly Ile Gly Val Thr Asp Thr Tyr Gln Ala Ile Lys Ala Thr Asn Gly
485 490 495

Asn Gly Gly Ala Thr Thr Trp Ala Gln Asp Asn Thr Phe Ala Glu Arg
500 505 510

Asn Glu Ile Gly Val Gly Asn Asn Phe Ala Met Glu Ile Asn Leu Asn
515 520 525

Ala Asn Leu Trp Arg Asn Phe Leu Tyr Ser Asn Ile Ala Leu Tyr Leu
530 535 540

Pro Asp Lys Leu Lys Tyr Asn Pro Thr Asn Val Glu Ile Ser Asp Asn
545 550 555 560

Pro Asn Thr Tyr Asp Tyr Met Asn Lys Arg Val Val Ala Pro Gly Leu
565 570 575

Val Asp Cys Tyr Ile Asn Leu Gly Ala Arg Trp Ser Leu Asp Tyr Met
580 585 590

Asp Asn Val Asn Pro Phe Asn His His Arg Asn Ala Gly Leu Arg Tyr
595 600 605

Arg Ser Met Leu Leu Gly Asn Gly Arg Tyr Val Pro Phe His Ile Gln
610 615 620

Val Pro Gln Lys Phe Phe Ala Ile Lys Asn Leu Leu Leu Leu Pro Gly
625 630 635 640

Ser Tyr Thr Tyr Glu Trp Asn Phe Arg Lys Asp Val Asn Met Val Leu
645 650 655

Gln Ser Ser Leu Gly Asn Asp Leu Arg Val Asp Gly Ala Ser Ile Lys
660 665 670

Phe Asp Ser Ile Cys Leu Tyr Ala Thr Phe Phe Pro Met Ala His Asn
675 680 685

Thr Ala Ser Thr Leu Glu Ala Met Leu Arg Asn Asp Thr Asn Asp Gln
690 695 700

Ser Phe Asn Asp Tyr Leu Ser Ala Ala Asn Met Leu Tyr Pro Ile Pro
705 710 715 720

Ala Asn Ala Thr Asn Val Pro Ile Ser Ile Pro Ser Arg Asn Trp Ala
725 730 735

Ala Phe Arg Gly Trp Ala Phe Thr Arg Leu Lys Thr Lys Glu Thr Pro
740 745 750

Ser Leu Gly Ser Gly Tyr Asp Pro Tyr Tyr Thr Tyr Ser Gly Ser Ile
755 760 765

Pro Tyr Leu Asp Gly Thr Phe Tyr Leu Asn His Thr Phe Lys Lys Val
770 775 780

Ala Ile Thr Phe Asp Ser Ser Val Ser Trp Pro Gly Asn Asp Arg Leu
785 790 795 800

Leu Thr Pro Asn Glu Phe Glu Ile Lys Arg Ser Val Asp Gly Glu Gly
805 810 815

Tyr Asn Val Ala Gln Cys Asn Met Thr Lys Asp Trp Phe Leu Val Gln
820 825 830

Met Leu Ala Asn Tyr Asn Ile Gly Tyr Gln Gly Phe Tyr Ile Pro Glu
835 840 845

Ser Tyr Lys Asp Arg Met Tyr Ser Phe Phe Arg Asn Phe Gln Pro Met
850 855 860

Ser Arg Gln Val Val Asp Asp Thr Lys Tyr Lys Asp Tyr Gln Gln Val
865 870 875 880

Gly Ile Ile His Gln His Asn Asn Ser Gly Phe Val Gly Tyr Leu Ala
885 890 895

Pro Thr Met Arg Glu Gly Gln Ala Tyr Pro Ala Asn Val Pro Tyr Pro
900 905 910

Leu Ile Gly Lys Thr Ala Val Asp Ser Ile Thr Gln Lys Lys Phe Leu
915 920 925

Cys Asp Arg Thr Leu Trp Arg Ile Pro Phe Ser Ser Asn Phe Met Ser
930 935 940

Met Gly Ala Leu Thr Asp Leu Gly Gln Asn Leu Leu Tyr Ala Asn Ser
945 950 955 960

Ala His Ala Leu Asp Met Thr Phe Glu Val Asp Pro Met Asp Glu Pro
965 970 975

Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Phe Asp Val Val Arg Val His
980 985 990

Gln Pro His Arg Gly Val Ile Glu Thr Val Tyr Leu Arg Thr Pro Phe
995 1000 1005

Ser Ala Gly Asn Ala Thr Thr
1010 1015

<210> 57
<211> 987
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit Hexon

<400> 57

Met Ala Thr Pro Ser Met Met Pro Gln Trp Ser Tyr Met His Ile Ser
1 5 10 15

Gly Gln Asp Ala Ser Glu Tyr Leu Ser Pro Gly Leu Val Gln Phe Ala
20 25 30

Arg Ala Thr Glu Thr Tyr Phe Ser Leu Asn Asn Lys Phe Arg Asn Pro
35 40 45

Thr Val Ala Pro Thr His Asp Val Thr Thr Asp Arg Ser Gln Arg Leu

50 55 60

Thr Leu Arg Phe Ile Pro Val Asp Arg Glu Asp Thr Ala Tyr Ser Tyr
65 70 75 80

Lys Ala Arg Phe Thr Leu Ala Val Gly Asp Asn Arg Val Leu Asp Met
85 90 95

Ala Ser Thr Tyr Phe Asp Ile Arg Gly Val Leu Asp Arg Gly Pro Thr
100 105 110

Phe Lys Pro Tyr Ser Gly Thr Ala Tyr Asn Ala Leu Ala Pro Lys Gly
115 120 125

Ala Pro Asn Ser Cys Glu Trp Asp Glu Asp Asp Thr Gln Val Gln Val
130 135 140

Ala Ala Glu Asp Asp Gln Asp Asp Asp Glu Glu Glu Glu Gln Leu Pro
145 150 155 160

Gln Gln Arg Asn Gly Lys Lys Thr His Val Tyr Ala Gln Ala Pro Phe
165 170 175

Ala Gly Glu Ala Ile Asn Lys Asn Gly Leu Gln Ile Gly Thr Asn Gly
180 185 190

Ala Ala Thr Glu Gly Asn Lys Glu Ile Tyr Ala Asp Lys Thr Tyr Gln
195 200 205

Pro Glu Pro Gln Ile Gly Glu Ser Gln Trp Asn Glu Ala Glu Ser Ser
210 215 220

Val Ala Gly Gly Arg Val Leu Lys Lys Thr Thr Pro Met Lys Pro Cys
225 230 235 240

Tyr Gly Ser Tyr Ala Arg Pro Thr Asn Ser Asn Gly Gly Gln Gly Val
245 250 255

Met Val Glu Gln Asn Gly Lys Leu Glu Ser Gln Val Glu Met Gln Phe
260 265 270

Phe Ser Thr Ser Ser Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile
275 280 285

Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr
290 295 300

Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Ser Gly Gly Thr Pro Lys Leu Val Leu
305 310 315 320

Tyr Ser Glu Asp Val Asn Met Glu Thr Pro Asp Thr His Leu Ser Tyr

325 330 335

Lys Pro Gly Lys Ser Asp Asp Asn Ser Lys Ala Met Leu Gly Gln Gln
340 345 350

Ser Met Pro Asn Arg Pro Asn Tyr Ile Ala Phe Arg Asp Asn Phe Ile
355 360 365

Gly Leu Met Tyr Tyr Asn Ser Thr Gly Asn Met Gly Val Leu Ala Gly
370 375 380

Gln Ala Ser Gln Leu Asn Ala Val Val Asp Leu Gln Asp Arg Asn Thr
385 390 395 400

Glu Leu Ser Tyr Gln Leu Leu Leu Asp Ser Ile Gly Asp Arg Thr Arg
405 410 415

Tyr Phe Ser Met Trp Asn Gln Ala Val Asp Ser Tyr Asp Pro Asp Val
420 425 430

Arg Ile Ile Glu Asn His Gly Thr Glu Asp Glu Leu Pro Asn Tyr Cys
435 440 445

Phe Pro Leu Gly Gly Ile Gly Val Thr Asp Thr Tyr Gln Ala Ile Lys
450 455 460

Ala Thr Asn Gly Asn Gly Gly Ala Thr Thr Trp Ala Gln Asp Asn Thr
465 470 475 480

Phe Ala Glu Arg Asn Glu Ile Gly Val Gly Asn Asn Phe Ala Met Glu
485 490 495

Ile Asn Leu Asn Ala Asn Leu Trp Arg Asn Phe Leu Tyr Ser Asn Ile
500 505 510

Ala Leu Tyr Leu Pro Asp Lys Leu Lys Tyr Asn Pro Thr Asn Val Glu
515 520 525

Ile Ser Asp Asn Pro Asn Thr Tyr Asp Tyr Met Asn Lys Arg Val Val
530 535 540

Ala Pro Gly Leu Val Asp Cys Tyr Ile Asn Leu Gly Ala Arg Trp Ser
545 550 555 560

Leu Asp Tyr Met Asp Asn Val Asn Pro Phe Asn His His Arg Asn Ala
565 570 575

Gly Leu Arg Tyr Arg Ser Met Leu Leu Gly Asn Gly Arg Tyr Val Pro
580 585 590

Phe His Ile Gln Val Pro Gln Lys Phe Phe Ala Ile Lys Asn Leu Leu

595 600 605

Leu Leu Pro Gly Ser Tyr Thr Tyr Glu Trp Asn Phe Arg Lys Asp Val
610 615 620

Asn Met Val Leu Gln Ser Ser Leu Gly Asn Asp Leu Arg Val Asp Gly
625 630 635 640

Ala Ser Ile Lys Phe Asp Ser Ile Cys Leu Tyr Ala Thr Phe Phe Pro
645 650 655

Met Ala His Asn Thr Ala Ser Thr Leu Glu Ala Met Leu Arg Asn Asp
660 665 670

Thr Asn Asp Gln Ser Phe Asn Asp Tyr Leu Ser Ala Ala Asn Met Leu
675 680 685

Tyr Pro Ile Pro Ala Asn Ala Thr Asn Val Pro Ile Ser Ile Pro Ser
690 695 700

Arg Asn Trp Ala Ala Phe Arg Gly Trp Ala Phe Thr Arg Leu Lys Thr
705 710 715 720

Lys Glu Thr Pro Ser Leu Gly Ser Gly Tyr Asp Pro Tyr Tyr Thr Tyr
725 730 735

Ser Gly Ser Ile Pro Tyr Leu Asp Gly Thr Phe Tyr Leu Asn His Thr
740 745 750

Phe Lys Lys Val Ala Ile Thr Phe Asp Ser Ser Val Ser Trp Pro Gly
755 760 765

Asn Asp Arg Leu Leu Thr Pro Asn Glu Phe Glu Ile Lys Arg Ser Val
770 775 780

Asp Gly Glu Gly Tyr Asn Val Ala Gln Cys Asn Met Thr Lys Asp Trp
785 790 795 800

Phe Leu Val Gln Met Leu Ala Asn Tyr Asn Ile Gly Tyr Gln Gly Phe
805 810 815

Tyr Ile Pro Glu Ser Tyr Lys Asp Arg Met Tyr Ser Phe Phe Arg Asn
820 825 830

Phe Gln Pro Met Ser Arg Gln Val Val Asp Asp Thr Lys Tyr Lys Asp
835 840 845

Tyr Gln Gln Val Gly Ile Ile His Gln His Asn Asn Ser Gly Phe Val
850 855 860

Gly Tyr Leu Ala Pro Thr Met Arg Glu Gly Gln Ala Tyr Pro Ala Asn

865 870 875 880

Val Pro Tyr Pro Leu Ile Gly Lys Thr Ala Val Asp Ser Ile Thr Gln
885 890 895

Lys Lys Phe Leu Cys Asp Arg Thr Leu Trp Arg Ile Pro Phe Ser Ser
900 905 910

Asn Phe Met Ser Met Gly Ala Leu Thr Asp Leu Gly Gln Asn Leu Leu
915 920 925

Tyr Ala Asn Ser Ala His Ala Leu Asp Met Thr Phe Glu Val Asp Pro
930 935 940

Met Asp Glu Pro Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Phe Asp Val
945 950 955 960

Val Arg Val His Gln Pro His Arg Gly Val Ile Glu Thr Val Tyr Leu
965 970 975

Arg Thr Pro Phe Ser Ala Gly Asn Ala Thr Thr
980 985

<210> 58
<211> 959
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit Hexon

<400> 58

Met Ala Thr Pro Ser Met Met Pro Gln Trp Ser Tyr Met His Ile Ser
1 5 10 15

Gly Gln Asp Ala Ser Glu Tyr Leu Ser Pro Gly Leu Val Gln Phe Ala
20 25 30

Arg Ala Thr Glu Thr Tyr Phe Ser Leu Asn Asn Lys Phe Arg Asn Pro
35 40 45

Thr Val Ala Pro Thr His Asp Val Thr Thr Asp Arg Ser Gln Arg Leu
50 55 60

Thr Leu Arg Phe Ile Pro Val Asp Arg Glu Asp Thr Ala Tyr Ser Tyr
65 70 75 80

Lys Ala Arg Phe Thr Leu Ala Val Gly Asp Asn Arg Val Leu Asp Met
85 90 95

```
Ala Ser Thr Tyr Phe Asp Ile Arg Gly Val Leu Asp Arg Gly Pro Thr
            100                 105                 110

Phe Lys Pro Tyr Ser Gly Thr Ala Tyr Asn Ala Leu Ala Pro Lys Gly
        115                 120                 125

Ala Pro Asn Ser Cys Glu Trp Asp Glu Asp Asp Thr Gln Val Gln Val
    130                 135                 140

Ala Ala Glu Asp Asp Gln Asp Asp Asp Glu Glu Glu Glu Gln Leu Pro
145                 150                 155                 160

Gln Gln Arg Asn Gly Lys Lys Thr His Val Tyr Ala Gln Ala Pro Phe
                165                 170                 175

Ala Gly Glu Ala Ile Asn Lys Asn Gly Leu Gln Ile Gly Thr Asn Gly
            180                 185                 190

Ala Ala Thr Glu Gly Asn Lys Glu Ile Tyr Ala Asp Lys Thr Tyr Gln
        195                 200                 205

Pro Glu Pro Gln Ile Gly Glu Ser Gln Trp Asn Glu Ala Glu Ser Ser
    210                 215                 220

Val Ala Gly Gly Arg Val Leu Lys Lys Thr Thr Pro Met Lys Pro Cys
225                 230                 235                 240

Tyr Gly Ser Tyr Ala Arg Pro Thr Asn Ser Asn Gly Gly Gln Gly Val
                245                 250                 255

Met Val Glu Gln Asn Gly Lys Leu Glu Ser Gln Val Glu Met Gln Phe
            260                 265                 270

Phe Ser Thr Ser Val Asn Ala Met Asn Glu Ala Asn Ala Ile Gln Pro
        275                 280                 285

Lys Leu Val Leu Tyr Ser Glu Asp Val Asn Met Glu Thr Pro Asp Thr
    290                 295                 300

His Leu Ser Tyr Lys Pro Gly Lys Ser Asp Asp Asn Ser Lys Ala Met
305                 310                 315                 320

Leu Gly Gln Gln Ser Met Pro Asn Arg Pro Asn Tyr Ile Ala Phe Arg
                325                 330                 335

Asp Asn Phe Ile Gly Leu Met Tyr Tyr Asn Ser Thr Gly Asn Met Gly
            340                 345                 350

Val Leu Ala Gly Gln Ala Ser Gln Leu Asn Ala Val Val Asp Leu Gln
        355                 360                 365
```

Asp Arg Asn Thr Glu Leu Ser Tyr Gln Leu Leu Leu Asp Ser Ile Gly
370 375 380

Asp Arg Thr Arg Tyr Phe Ser Met Trp Asn Gln Ala Val Asp Ser Tyr
385 390 395 400

Asp Pro Asp Val Arg Ile Ile Glu Asn His Gly Thr Glu Asp Glu Leu
405 410 415

Pro Asn Tyr Cys Phe Pro Leu Gly Gly Ile Gly Val Thr Asp Thr Tyr
420 425 430

Gln Ala Ile Lys Ala Thr Asn Gly Asn Gly Gly Ala Thr Thr Trp Ala
435 440 445

Gln Asp Asn Thr Phe Ala Glu Arg Asn Glu Ile Gly Val Gly Asn Asn
450 455 460

Phe Ala Met Glu Ile Asn Leu Asn Ala Asn Leu Trp Arg Asn Phe Leu
465 470 475 480

Tyr Ser Asn Ile Ala Leu Tyr Leu Pro Asp Lys Leu Lys Tyr Asn Pro
485 490 495

Thr Asn Val Glu Ile Ser Asp Asn Pro Asn Thr Tyr Asp Tyr Met Asn
500 505 510

Lys Arg Val Val Ala Pro Gly Leu Val Asp Cys Tyr Ile Asn Leu Gly
515 520 525

Ala Arg Trp Ser Leu Asp Tyr Met Asp Asn Val Asn Pro Phe Asn His
530 535 540

His Arg Asn Ala Gly Leu Arg Tyr Arg Ser Met Leu Leu Gly Asn Gly
545 550 555 560

Arg Tyr Val Pro Phe His Ile Gln Val Pro Gln Lys Phe Phe Ala Ile
565 570 575

Lys Asn Leu Leu Leu Leu Pro Gly Ser Tyr Thr Tyr Glu Trp Asn Phe
580 585 590

Arg Lys Asp Val Asn Met Val Leu Gln Ser Ser Leu Gly Asn Asp Leu
595 600 605

Arg Val Asp Gly Ala Ser Ile Lys Phe Asp Ser Ile Cys Leu Tyr Ala
610 615 620

Thr Phe Phe Pro Met Ala His Asn Thr Ala Ser Thr Leu Glu Ala Met
625 630 635 640

Leu Arg Asn Asp Thr Asn Asp Gln Ser Phe Asn Asp Tyr Leu Ser Ala
645 650 655

Ala Asn Met Leu Tyr Pro Ile Pro Ala Asn Ala Thr Asn Val Pro Ile
660 665 670

Ser Ile Pro Ser Arg Asn Trp Ala Ala Phe Arg Gly Trp Ala Phe Thr
675 680 685

Arg Leu Lys Thr Lys Glu Thr Pro Ser Leu Gly Ser Gly Tyr Asp Pro
690 695 700

Tyr Tyr Thr Tyr Ser Gly Ser Ile Pro Tyr Leu Asp Gly Thr Phe Tyr
705 710 715 720

Leu Asn His Thr Phe Lys Lys Val Ala Ile Thr Phe Asp Ser Ser Val
725 730 735

Ser Trp Pro Gly Asn Asp Arg Leu Leu Thr Pro Asn Glu Phe Glu Ile
740 745 750

Lys Arg Ser Val Asp Gly Glu Gly Tyr Asn Val Ala Gln Cys Asn Met
755 760 765

Thr Lys Asp Trp Phe Leu Val Gln Met Leu Ala Asn Tyr Asn Ile Gly
770 775 780

Tyr Gln Gly Phe Tyr Ile Pro Glu Ser Tyr Lys Asp Arg Met Tyr Ser
785 790 795 800

Phe Phe Arg Asn Phe Gln Pro Met Ser Arg Gln Val Val Asp Asp Thr
805 810 815

Lys Tyr Lys Asp Tyr Gln Gln Val Gly Ile Ile His Gln His Asn Asn
820 825 830

Ser Gly Phe Val Gly Tyr Leu Ala Pro Thr Met Arg Glu Gly Gln Ala
835 840 845

Tyr Pro Ala Asn Val Pro Tyr Pro Leu Ile Gly Lys Thr Ala Val Asp
850 855 860

Ser Ile Thr Gln Lys Lys Phe Leu Cys Asp Arg Thr Leu Trp Arg Ile
865 870 875 880

Pro Phe Ser Ser Asn Phe Met Ser Met Gly Ala Leu Thr Asp Leu Gly
885 890 895

Gln Asn Leu Leu Tyr Ala Asn Ser Ala His Ala Leu Asp Met Thr Phe
900 905 910

Glu Val Asp Pro Met Asp Glu Pro Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu
915 920 925

Val Phe Asp Val Val Arg Val His Gln Pro His Arg Gly Val Ile Glu
930 935 940

Thr Val Tyr Leu Arg Thr Pro Phe Ser Ala Gly Asn Ala Thr Thr
945 950 955

<210> 59
<211> 962
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit Hexon

<400> 59

Met Ala Thr Pro Ser Met Met Pro Gln Trp Ser Tyr Met His Ile Ser
1 5 10 15

Gly Gln Asp Ala Ser Glu Tyr Leu Ser Pro Gly Leu Val Gln Phe Ala
20 25 30

Arg Ala Thr Glu Thr Tyr Phe Ser Leu Asn Asn Lys Phe Arg Asn Pro
35 40 45

Thr Val Ala Pro Thr His Asp Val Thr Thr Asp Arg Ser Gln Arg Leu
50 55 60

Thr Leu Arg Phe Ile Pro Val Asp Arg Glu Asp Thr Ala Tyr Ser Tyr
65 70 75 80

Lys Ala Arg Phe Thr Leu Ala Val Gly Asp Asn Arg Val Leu Asp Met
85 90 95

Ala Ser Thr Tyr Phe Asp Ile Arg Gly Val Leu Asp Arg Gly Pro Thr
100 105 110

Phe Lys Pro Tyr Ser Gly Thr Ala Tyr Asn Ala Leu Ala Pro Lys Gly
115 120 125

Ala Pro Asn Ser Cys Glu Trp Glu Gln Asn Glu Thr Ala Gln Val Asp
130 135 140

Ala Gln Glu Leu Asp Glu Glu Glu Asn Glu Ala Asn Glu Ala Gln Ala
145 150 155 160

Arg Glu Gln Glu Gln Ala Lys Lys Thr His Val Tyr Ala Gln Ala Pro
165 170 175

Leu Ser Gly Glu Ala Ile Asn Lys Asn Gly Leu Gln Ile Gly Thr Asn
180 185 190

Gly Ala Ala Thr Glu Gly Asn Lys Glu Ile Tyr Ala Asp Lys Thr Tyr
195 200 205

Gln Pro Glu Pro Gln Ile Gly Glu Ser Gln Trp Asn Glu Ala Glu Ser
210 215 220

Ser Val Ala Gly Gly Arg Val Leu Lys Lys Thr Thr Pro Met Lys Pro
225 230 235 240

Cys Tyr Gly Ser Tyr Ala Arg Pro Thr Asn Ser Asn Gly Gly Gln Gly
245 250 255

Val Met Val Glu Gln Asn Gly Lys Leu Glu Ser Gln Val Glu Met Gln
260 265 270

Phe Phe Ser Thr Ser Val Asn Ala Met Asn Glu Ala Asn Ala Ile Gln
275 280 285

Pro Lys Leu Val Leu Tyr Ser Glu Asp Val Asn Met Glu Thr Pro Asp
290 295 300

Thr His Leu Ser Tyr Lys Pro Gly Lys Ser Asp Asp Asn Ser Lys Ala
305 310 315 320

Met Leu Gly Gln Gln Ser Met Pro Asn Arg Pro Asn Tyr Ile Ala Phe
325 330 335

Arg Asp Asn Phe Ile Gly Leu Met Tyr Tyr Asn Ser Thr Gly Asn Met
340 345 350

Gly Val Leu Ala Gly Gln Ala Ser Gln Leu Asn Ala Val Val Asp Leu
355 360 365

Gln Asp Arg Asn Thr Glu Leu Ser Tyr Gln Leu Leu Leu Asp Ser Ile
370 375 380

Gly Asp Arg Thr Arg Tyr Phe Ser Met Trp Asn Gln Ala Val Asp Ser
385 390 395 400

Tyr Asp Pro Asp Val Arg Ile Ile Glu Asn His Gly Thr Glu Asp Glu
405 410 415

Leu Pro Asn Tyr Cys Phe Pro Leu Gly Gly Ile Gly Ile Thr Asp Thr
420 425 430

Phe Gln Ala Val Lys Thr Thr Ala Ala Asn Gly Asp Gln Gly Asn Thr
435 440 445

```
Thr Trp Gln Lys Asp Ser Thr Phe Ala Glu Arg Asn Glu Ile Gly Val
    450                 455                 460

Gly Asn Asn Phe Ala Met Glu Ile Asn Leu Asn Ala Asn Leu Trp Arg
465                 470                 475                 480

Asn Phe Leu Tyr Ser Asn Ile Ala Leu Tyr Leu Pro Asp Lys Leu Lys
                485                 490                 495

Tyr Asn Pro Thr Asn Val Glu Ile Ser Asp Asn Pro Asn Thr Tyr Asp
            500                 505                 510

Tyr Met Asn Lys Arg Val Val Ala Pro Gly Leu Val Asp Cys Tyr Ile
        515                 520                 525

Asn Leu Gly Ala Arg Trp Ser Leu Asp Tyr Met Asp Asn Val Asn Pro
    530                 535                 540

Phe Asn His Pro Arg His Ala Gly Leu Arg Tyr Arg Ser Met Leu Leu
545                 550                 555                 560

Gly Asn Gly Arg Tyr Val Pro Phe His Ile Gln Val Pro Gln Lys Phe
                565                 570                 575

Phe Ala Ile Lys Asn Leu Leu Leu Leu Pro Gly Ser Tyr Thr Tyr Glu
            580                 585                 590

Trp Asn Phe Arg Lys Asp Val Asn Met Val Leu Gln Ser Ser Leu Gly
        595                 600                 605

Asn Asp Leu Arg Val Asp Gly Ala Ser Ile Lys Phe Asp Ser Ile Cys
    610                 615                 620

Leu Tyr Ala Thr Phe Phe Pro Met Ala His Asn Thr Ala Ser Thr Leu
625                 630                 635                 640

Glu Ala Met Leu Arg Asn Asp Thr Asn Asp Gln Ser Phe Asn Asp Tyr
                645                 650                 655

Leu Ser Ala Ala Asn Met Leu Tyr Pro Ile Pro Ala Asn Ala Thr Asn
            660                 665                 670

Val Pro Ile Ser Ile Pro Ser Arg Asn Trp Ala Ala Phe Arg Gly Trp
        675                 680                 685

Ala Phe Thr Arg Leu Lys Thr Lys Glu Thr Pro Ser Leu Gly Ser Gly
    690                 695                 700

Tyr Asp Pro Tyr Tyr Thr Tyr Ser Gly Ser Ile Pro Tyr Leu Asp Gly
705                 710                 715                 720
```

Thr Phe Tyr Leu Asn His Thr Phe Lys Lys Val Ala Ile Thr Phe Asp
725 730 735

Ser Ser Val Ser Trp Pro Gly Asn Asp Arg Leu Leu Thr Pro Asn Glu
740 745 750

Phe Glu Ile Lys Arg Ser Val Asp Gly Glu Gly Tyr Asn Val Ala Gln
755 760 765

Cys Asn Met Thr Lys Asp Trp Phe Leu Val Gln Met Leu Ala Asn Tyr
770 775 780

Asn Ile Gly Tyr Gln Gly Phe Tyr Ile Pro Glu Ser Tyr Lys Asp Arg
785 790 795 800

Met Tyr Ser Phe Phe Arg Asn Phe Gln Pro Met Ser Arg Gln Val Val
805 810 815

Asp Asp Thr Lys Tyr Lys Asp Tyr Gln Gln Val Gly Ile Ile His Gln
820 825 830

His Asn Asn Ser Gly Phe Val Gly Tyr Leu Ala Pro Thr Met Arg Glu
835 840 845

Gly Gln Ala Tyr Pro Ala Asn Val Pro Tyr Pro Leu Ile Gly Lys Thr
850 855 860

Ala Val Asp Ser Ile Thr Gln Lys Lys Phe Leu Cys Asp Arg Thr Leu
865 870 875 880

Trp Arg Ile Pro Phe Ser Ser Asn Phe Met Ser Met Gly Ala Leu Thr
885 890 895

Asp Leu Gly Gln Asn Leu Leu Tyr Ala Asn Ser Ala His Ala Leu Asp
900 905 910

Met Thr Phe Glu Val Asp Pro Met Asp Glu Pro Thr Leu Leu Tyr Val
915 920 925

Leu Phe Glu Val Phe Asp Val Val Arg Val His Gln Pro His Arg Gly
930 935 940

Val Ile Glu Thr Val Tyr Leu Arg Thr Pro Phe Ser Ala Gly Asn Ala
945 950 955 960

Thr Thr

<210> 60
<211> 528

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit sợi

<400> 60

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro
1 5 10 15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro
20 25 30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser
35 40 45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser His Gly Met Leu Ala Leu
50 55 60

Lys Met Gly Ser Gly Leu Ser Leu Asp Gln Ala Gly Asn Leu Thr Ser
65 70 75 80

Asn Thr Ile Thr Val Ser Gln Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn Ile
85 90 95

Thr Leu Glu Thr Ser Ala Pro Leu Thr Val Ser Ser Gly Ala Leu Thr
100 105 110

Met Ala Thr Thr Ser Pro Leu Val Val Ser Asp Asn Thr Leu Thr Met
115 120 125

Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val Gln Asp Ser Lys Leu Ser Ile Ala
130 135 140

Thr Lys Glu Pro Leu Thr Val Leu Asp Gly Lys Leu Ala Leu Gln Thr
145 150 155 160

Ser Ala Pro Leu Ser Ala Thr Asp Asn Asn Ala Leu Thr Ile Thr Ala
165 170 175

Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Asn Gly Ser Leu Ala Val Thr Met Glu
180 185 190

Asn Pro Leu Tyr Asn Asn Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Ile Gly Gly
195 200 205

Pro Leu Gln Val Ala Thr Asp Ser His Ala Leu Thr Leu Gly Thr Gly
210 215 220

Gln Gly Val Ala Val His Asn Asn Leu Leu His Thr Lys Val Thr Gly

225 230 235 240

Ala Ile Gly Phe Asp Thr Ser Gly Asn Met Glu Leu Lys Thr Gly Asp
245 250 255

Gly Leu Tyr Val Asp Ser Ala Gly Pro Asn Gln Lys Leu His Ile Asn
260 265 270

Leu Asn Thr Thr Lys Gly Leu Ala Phe Asp Asn Thr Ala Ile Thr Ile
275 280 285

Asn Ala Gly Lys Gly Leu Glu Phe Glu Thr Asp Ser Ser Asn Gly Asn
290 295 300

Pro Ile Lys Thr Lys Ile Gly Ser Gly Ile Gln Tyr Asn Thr Asn Gly
305 310 315 320

Ala Met Val Ala Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp Ser Ser Gly
325 330 335

Ala Ile Thr Met Gly Ser Ile Asn Asn Asp Arg Leu Thr Leu Trp Thr
340 345 350

Thr Pro Asp Pro Ser Pro Asn Cys Arg Ile Ala Ser Asp Lys Asp Cys
355 360 365

Lys Leu Thr Leu Ala Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile Leu Gly Thr
370 375 380

Val Ser Ala Leu Ala Val Ser Gly Asn Met Ala Ser Ile Asn Gly Thr
385 390 395 400

Leu Ser Ser Val Asn Leu Val Leu Arg Phe Asp Asp Asn Gly Val Leu
405 410 415

Met Ser Asn Ser Ser Leu Asp Lys Gln Tyr Trp Asn Phe Arg Asn Gly
420 425 430

Asp Ser Thr Asn Gly Gln Pro Tyr Thr Tyr Ala Val Gly Phe Met Pro
435 440 445

Asn Leu Lys Ala Tyr Pro Lys Thr Gln Ser Lys Thr Ala Lys Ser Asn
450 455 460

Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Ser Lys Pro Leu His
465 470 475 480

Phe Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Asp Glu Thr Asn Gln Val Ser Lys
485 490 495

Tyr Ser Ile Ser Phe Ser Trp Ser Trp Asn Ser Gly Gln Tyr Thr Asn

500 505 510

Asp Lys Phe Ala Thr Asn Ser Tyr Thr Phe Ser Tyr Ile Ala Gln Glu
515 520 525

<210> 61
<211> 324
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit sợi

<400> 61

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro
1 5 10 15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro
20 25 30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Thr
35 40 45

Leu Lys Cys Leu Thr Pro Leu Thr Thr Thr Gly Gly Ser Leu Gln Leu
50 55 60

Lys Val Gly Gly Gly Leu Thr Val Asp Asp Thr Asp Gly Thr Leu Gln
65 70 75 80

Glu Asn Ile Arg Ala Thr Ala Pro Ile Thr Lys Asn Asn His Ser Val
85 90 95

Glu Leu Ser Ile Gly Asn Gly Leu Glu Thr Gln Asn Asn Lys Leu Cys
100 105 110

Ala Lys Leu Gly Asn Gly Leu Lys Phe Asn Asn Gly Asp Ile Cys Ile
115 120 125

Lys Asp Ser Ile Asn Thr Leu Trp Thr Gly Ile Asn Pro Pro Pro Asn
130 135 140

Cys Gln Ile Val Glu Asn Thr Asn Thr Asn Asp Gly Lys Leu Thr Leu
145 150 155 160

Val Leu Val Lys Asn Gly Gly Leu Val Asn Gly Tyr Val Ser Leu Val
165 170 175

Gly Val Ser Asp Thr Val Asn Gln Met Phe Thr Gln Lys Thr Ala Asn
180 185 190

Ile Gln Leu Arg Leu Tyr Phe Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Thr Asp
195 200 205

Glu Ser Asp Leu Lys Ile Pro Leu Lys Asn Lys Ser Ser Thr Ala Thr
210 215 220

Ser Glu Thr Val Ala Ser Ser Lys Ala Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala
225 230 235 240

Tyr Pro Phe Asn Thr Thr Thr Arg Asp Ser Glu Asn Tyr Ile His Gly
245 250 255

Ile Cys Tyr Tyr Met Thr Ser Tyr Asp Arg Ser Leu Phe Pro Leu Asn
260 265 270

Ile Ser Ile Met Leu Asn Ser Arg Met Ile Ser Ser Asn Val Ala Tyr
275 280 285

Ala Ile Gln Phe Glu Trp Asn Leu Asn Ala Ser Glu Ser Pro Glu Ser
290 295 300

Asn Ile Ala Thr Leu Thr Thr Ser Pro Phe Phe Phe Ser Tyr Ile Thr
305 310 315 320

Glu Asp Asp Asn

<210> 62
<211> 534
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit sợi

<400> 62

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro
1 5 10 15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro
20 25 30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser
35 40 45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser His Gly Met Leu Ala Leu
50 55 60

Lys Met Gly Ser Gly Leu Ser Leu Asp Gln Ala Gly Asn Leu Thr Ser
65 70 75 80

```
Asn Thr Ile Thr Val Ser Gln Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn Ile
                85                  90                  95

Thr Leu Glu Thr Ser Ala Pro Leu Thr Val Ser Ser Gly Ala Leu Thr
            100                 105                 110

Met Ala Thr Thr Ser Pro Leu Val Val Ser Asp Asn Thr Leu Thr Met
        115                 120                 125

Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val Gln Asp Ser Lys Leu Ser Ile Ala
    130                 135                 140

Thr Lys Glu Pro Leu Thr Val Leu Asp Gly Lys Leu Ala Leu Gln Thr
145                 150                 155                 160

Ser Ala Pro Leu Ser Ala Thr Asp Asn Asn Ala Leu Thr Ile Thr Ala
                165                 170                 175

Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Asn Gly Ser Leu Ala Val Thr Met Glu
            180                 185                 190

Asn Pro Leu Tyr Asn Asn Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Ile Gly Gly
        195                 200                 205

Pro Leu Gln Val Ala Thr Asp Ser His Ala Leu Thr Leu Gly Thr Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Val Ala Val His Asn Asn Leu Leu His Thr Lys Val Thr Gly
225                 230                 235                 240

Ala Ile Gly Phe Asp Thr Ser Gly Asn Met Glu Leu Lys Thr Gly Asp
                245                 250                 255

Gly Leu Tyr Val Asp Ser Ala Gly Pro Asn Gln Lys Leu His Ile Asn
            260                 265                 270

Leu Asn Thr Thr Lys Gly Leu Ala Phe Asp Asn Thr Ala Ile Thr Ile
        275                 280                 285

Asn Ala Gly Lys Gly Leu Glu Phe Glu Thr Asp Ser Ser Asn Gly Asn
    290                 295                 300

Pro Ile Lys Thr Lys Ile Gly Ser Gly Ile Gln Tyr Asn Thr Asn Gly
305                 310                 315                 320

Ala Met Val Ala Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp Ser Ser Gly
                325                 330                 335

Ala Ile Thr Met Gly Ser Ile Asn Asn Asp Arg Leu Thr Leu Trp Thr
            340                 345                 350
```

Thr Pro Asp Pro Ser Pro Asn Cys Arg Ile Ala Ser Asp Lys Asp Cys
355 360 365

Lys Leu Thr Leu Ala Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile Leu Gly Thr
370 375 380

Val Ser Ala Leu Ala Val Ser Gly Asn Met Ala Ser Ile Asn Gly Thr
385 390 395 400

Leu Ser Ser Val Asn Leu Val Leu Arg Phe Asp Asp Asn Gly Val Leu
405 410 415

Met Ser Asn Ser Ser Leu Asp Lys Gln Tyr Trp Asn Phe Arg Asn Gly
420 425 430

Asp Ser Thr Asn Gly Gln Pro Tyr Thr Tyr Ala Val Gly Phe Met Pro
435 440 445

Asn Leu Lys Ala Tyr Pro Lys Thr Gln Ser Lys Thr Ala Lys Ser Asn
450 455 460

Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Ser Lys Pro Leu His
465 470 475 480

Phe Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Asp Glu Thr Asn Gln Val Ser Lys
485 490 495

Tyr Ser Ile Ser Phe Ser Trp Ser Trp Asn Ser Gly Gln Tyr Thr Asn
500 505 510

Asp Lys Phe Ala Thr Asn Ser Tyr Thr Phe Ser Tyr Ile Ala Gln Glu
515 520 525

Lys Lys Lys Lys Lys Lys
530

<210> 63
<211> 425
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit sợi

<400> 63

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro
1 5 10 15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20 25 30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser
35 40 45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Lys Asn Gly Glu Ile Thr Leu
50 55 60

Lys Leu Gly Glu Gly Val Asp Leu Asp Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ser
65 70 75 80

Asn Thr Ala Thr Lys Ala Ala Ala Pro Leu Ser Phe Ser Asn Asn Thr
85 90 95

Ile Ser Leu Asn Met Asp His Pro Phe Tyr Thr Lys Asp Gly Lys Leu
100 105 110

Ser Leu Gln Val Ser Pro Pro Leu Asn Ile Leu Arg Thr Ser Ile Leu
115 120 125

Asn Thr Leu Ala Leu Gly Phe Gly Ser Gly Leu Gly Leu Arg Gly Ser
130 135 140

Ala Leu Ala Val Gln Leu Val Ser Pro Leu Thr Phe Asp Thr Asp Gly
145 150 155 160

Asn Ile Lys Leu Thr Leu Asp Arg Gly Leu His Val Thr Thr Gly Asp
165 170 175

Ala Ile Glu Ser Asn Ile Ser Trp Ala Lys Gly Leu Lys Phe Glu Asp
180 185 190

Gly Ala Ile Ala Thr Asn Ile Gly Asn Gly Leu Glu Phe Gly Ser Ser
195 200 205

Ser Thr Glu Thr Gly Val Asp Asp Ala Tyr Pro Ile Gln Val Lys Leu
210 215 220

Gly Ser Gly Leu Ser Phe Asp Ser Thr Gly Ala Ile Met Ala Gly Asn
225 230 235 240

Lys Glu Asp Asp Lys Leu Thr Leu Trp Thr Thr Pro Asp Pro Ser Pro
245 250 255

Asn Cys Gln Ile Leu Ala Glu Asn Asp Ala Lys Leu Thr Leu Cys Leu
260 265 270

Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Val Val
275 280 285

Gly Ser Gly Asn Leu Asn Pro Ile Thr Gly Thr Val Ser Ser Ala Gln

290 295 300

Val Phe Leu Arg Phe Asp Ala Asn Gly Val Leu Leu Thr Glu His Ser
305 310 315 320

Thr Leu Lys Lys Tyr Trp Gly Tyr Arg Gln Gly Asp Ser Ile Asp Gly
325 330 335

Thr Pro Tyr Thr Asn Ala Val Gly Phe Met Pro Asn Leu Lys Ala Tyr
340 345 350

Pro Lys Ser Gln Ser Ser Thr Thr Lys Asn Asn Ile Val Gly Gln Val
355 360 365

Tyr Met Asn Gly Asp Val Ser Lys Pro Met Leu Leu Thr Ile Thr Leu
370 375 380

Asn Gly Thr Asp Asp Ser Asn Ser Thr Tyr Ser Met Ser Phe Ser Tyr
385 390 395 400

Thr Trp Thr Asn Gly Ser Tyr Val Gly Ala Thr Phe Gly Ala Asn Ser
405 410 415

Tyr Thr Phe Ser Tyr Ile Ala Gln Glu
420 425

<210> 64
<211> 432
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit sợi

<400> 64

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro
1 5 10 15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro
20 25 30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser
35 40 45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Lys Asn Gly Glu Ile Thr Leu
50 55 60

Lys Leu Gly Glu Gly Val Asp Leu Asp Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ser
65 70 75 80

```
Asn Thr Ala Thr Lys Ala Ala Ala Pro Leu Ser Phe Ser Asn Asn Thr
                85                  90                  95

Ile Ser Leu Asn Met Asp His Pro Phe Tyr Thr Lys Asp Gly Lys Leu
            100                 105                 110

Ser Leu Gln Val Ser Pro Pro Leu Asn Ile Leu Arg Thr Ser Ile Leu
        115                 120                 125

Asn Thr Leu Ala Leu Gly Phe Gly Ser Gly Leu Gly Leu Arg Gly Ser
    130                 135                 140

Ala Leu Ala Val Gln Leu Val Ser Pro Leu Thr Phe Asp Thr Asp Gly
145                 150                 155                 160

Asn Ile Lys Leu Thr Leu Asp Arg Gly Leu His Val Thr Thr Gly Asp
                165                 170                 175

Ala Ile Glu Ser Asn Ile Ser Trp Ala Lys Gly Leu Lys Phe Glu Asp
            180                 185                 190

Gly Ala Ile Ala Thr Asn Ile Gly Asn Gly Leu Glu Phe Gly Ser Ser
        195                 200                 205

Ser Thr Glu Thr Gly Val Asp Asp Ala Tyr Pro Ile Gln Val Lys Leu
    210                 215                 220

Gly Ser Gly Leu Ser Phe Asp Ser Thr Gly Ala Ile Met Ala Gly Asn
225                 230                 235                 240

Lys Glu Asp Asp Lys Leu Thr Leu Trp Thr Thr Pro Asp Pro Ser Pro
                245                 250                 255

Asn Cys Gln Ile Leu Ala Glu Asn Asp Ala Lys Leu Thr Leu Cys Leu
            260                 265                 270

Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Val Val
        275                 280                 285

Gly Ser Gly Asn Leu Asn Pro Ile Thr Gly Thr Val Ser Ser Ala Gln
    290                 295                 300

Val Phe Leu Arg Phe Asp Ala Asn Gly Val Leu Leu Thr Glu His Ser
305                 310                 315                 320

Thr Leu Lys Lys Tyr Trp Gly Tyr Arg Gln Gly Asp Ser Ile Asp Gly
                325                 330                 335

Thr Pro Tyr Thr Asn Ala Val Gly Phe Met Pro Asn Leu Lys Ala Tyr
            340                 345                 350
```

Pro Lys Ser Gln Ser Ser Thr Thr Lys Asn Asn Ile Val Gly Gln Val
355 360 365

Tyr Met Asn Gly Asp Val Ser Lys Pro Met Leu Leu Thr Ile Thr Leu
370 375 380

Asn Gly Thr Asp Asp Ser Asn Ser Thr Tyr Ser Met Ser Phe Ser Tyr
385 390 395 400

Thr Trp Thr Asn Gly Ser Tyr Val Gly Ala Thr Phe Gly Ala Asn Ser
405 410 415

Tyr Thr Phe Ser Tyr Ile Ala Gln Glu Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
420 425 430

<210> 65
<211> 441
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit sợi

<400> 65

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro
1 5 10 15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro
20 25 30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser
35 40 45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Lys Asn Gly Glu Ile Thr Leu
50 55 60

Lys Leu Gly Glu Gly Val Asp Leu Asp Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ser
65 70 75 80

Asn Thr Ala Thr Lys Ala Ala Ala Pro Leu Ser Phe Ser Asn Asn Thr
85 90 95

Ile Ser Leu Asn Met Asp His Pro Phe Tyr Thr Lys Asp Gly Lys Leu
100 105 110

Ser Leu Gln Val Ser Pro Pro Leu Asn Ile Leu Arg Thr Ser Ile Leu
115 120 125

Asn Thr Leu Ala Leu Gly Phe Gly Ser Gly Leu Gly Leu Arg Gly Ser
130 135 140

```
Ala Leu Ala Val Gln Leu Val Ser Pro Leu Thr Phe Asp Thr Asp Gly
145                 150                 155                 160

Asn Ile Lys Leu Thr Leu Asp Arg Gly Leu His Val Thr Thr Gly Asp
                165                 170                 175

Ala Ile Glu Ser Asn Ile Ser Trp Ala Lys Gly Leu Lys Phe Glu Asp
            180                 185                 190

Gly Ala Ile Ala Thr Asn Ile Gly Asn Gly Leu Glu Phe Gly Ser Ser
        195                 200                 205

Ser Thr Glu Thr Gly Val Asp Asp Ala Tyr Pro Ile Gln Val Lys Leu
    210                 215                 220

Gly Ser Gly Leu Ser Phe Asp Ser Thr Gly Ala Ile Met Ala Gly Asn
225                 230                 235                 240

Lys Glu Asp Asp Lys Leu Thr Leu Trp Thr Thr Pro Asp Pro Ser Pro
                245                 250                 255

Asn Cys Gln Ile Leu Ala Glu Asn Asp Ala Lys Leu Thr Leu Cys Leu
            260                 265                 270

Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Val Val
        275                 280                 285

Gly Ser Gly Asn Leu Asn Pro Ile Thr Gly Thr Val Ser Ser Ala Gln
    290                 295                 300

Val Phe Leu Arg Phe Asp Ala Asn Gly Val Leu Leu Thr Glu His Ser
305                 310                 315                 320

Thr Leu Lys Lys Tyr Trp Gly Tyr Arg Gln Gly Asp Ser Ile Asp Gly
                325                 330                 335

Thr Pro Tyr Thr Asn Ala Val Gly Phe Met Pro Asn Leu Lys Ala Tyr
            340                 345                 350

Pro Lys Ser Gln Ser Ser Thr Thr Lys Asn Asn Ile Val Gly Gln Val
        355                 360                 365

Tyr Met Asn Gly Asp Val Ser Lys Pro Met Leu Leu Thr Ile Thr Leu
    370                 375                 380

Asn Gly Thr Asp Asp Ser Gly Gly Ser Ser Gly Lys Lys Lys Lys Lys
385                 390                 395                 400

Lys Lys Ala Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Ser Met Ser Phe Ser Tyr
                405                 410                 415
```

Thr Trp Thr Asn Gly Ser Tyr Val Gly Ala Thr Phe Gly Ala Asn Ser
420 425 430

Tyr Thr Phe Ser Tyr Ile Ala Gln Glu
435 440