



(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)



1-0035547

(51)⁷ A61K 39/135; C12N 7/08; A61K 39/125 (13) B

(21) 1-2015-02987

(22) 18/01/2013

(86) PCT/SG2013/000027 18/01/2013

(87) WO2014/112945 24/07/2014

(45) 25/05/2023 422

(43) 26/10/2015 331A

(73) Temasek Life Sciences Laboratory Limited (SG)

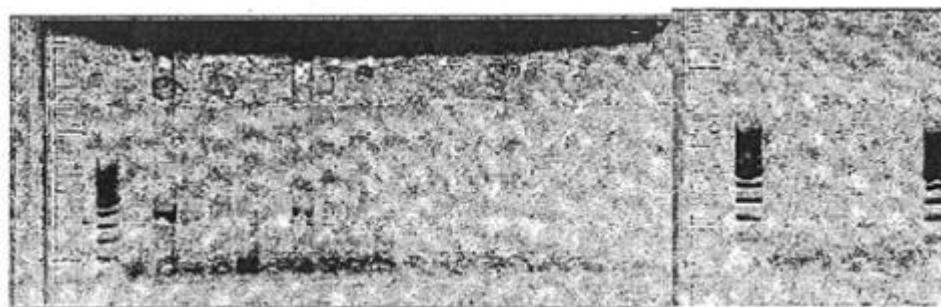
1 Research Link, National University of Singapore, Singapore 117604, Singapore

(72) CHUA, Kaw, Bing (MY).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHỦNG ENTEROVIRUT 71 NHẠY NHIỆT ĐƯỢC LÀM THÍCH NGHI TRONG ĐIỀU KIỆN LẠNH, CHẾ PHẨM VÀ KIT CHỨA CHỦNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh, đặc biệt là các chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh EV71:TLL β P20 và EV71:TLL α P20. Sáng chế cũng đề cập đến các chế phẩm và kit chứa chủng này, và phương pháp tạo ra virut này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh, đặc biệt là các chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh EV71:TLL β P20 và EV71:TLL α P20. Sáng chế cũng đề cập đến các quy trình phát triển các chủng virus nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh, đặc biệt là chủng virus ARN.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các Công bố đơn sáng chế và các tài liệu khác đã sử dụng trong bản mô tả này để giải thích về tình trạng kỹ thuật của sáng chế hoặc đưa ra chi tiết hơn về các vấn đề liên quan, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn, và để thuận tiện được phân vào mục Tài liệu tham khảo.

Bệnh tay chân miệng (hand foot and mouth disease - HFMD) là bệnh gây ra bởi một nhóm virus đường ruột của người về cơ bản thuộc loại virus đường ruột A. Trong số các loại virus này, enterovirus 71 (EV71) và coxsackievirus A16 (CA16) gây ra hơn 90% ca mắc HFMD. Ngoài việc gây ra bệnh HFMD, biết rằng EV71 còn là nguyên nhân gây ra các bệnh thần kinh nghiêm trọng có thể dẫn tới tử vong, đặc biệt là ở trẻ nhỏ.

Enterovirus 71 (EV71) của người là virus nhỏ không có vỏ có kích cỡ khoảng 30 nm với bộ gen ARN sợi đơn dài khoảng 7450 nucleotit. Virus này được phân loại thành các loại *enterovirus A* của người thuộc chi *Enterovirus* trong họ *Picornaviridae* (Alexander và các đồng tác giả, 1994; Melnick, 1996). EV71 được chia thành ba phân nhóm chính (được gọi là A, B, và C), và các phân nhóm B và C còn được chia tiếp thành các phân nhóm nhỏ hơn từ B1 đến B5 và từ C1 đến C5, dựa trên kết quả phân tích phát sinh loài của gen protein capsit chính của nó (VP1) (Bible và các đồng tác giả, 2008). EV71 có liên quan tới nhiều bệnh trên lâm sàng bao gồm bệnh tay chân miệng (HFMD), bệnh viêm màng não vô trùng, bệnh viêm não và chứng liệt tương tự như bệnh viêm tủy xám chủ yếu gặp ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ (Alexander và các đồng tác giả, 1994; Melnick, 1996). Đầu tiên, virus này được phân lập từ một em bé mắc bệnh viêm màng não vô trùng ở California, Mỹ và sau đó được mô tả

là một serotyp mới thuộc chi *Enterovirus* (Schmidt và các đồng tác giả, 1974). Vào những năm sau khi phân lập virus này, đã có thông báo về sự bùng phát của bệnh HFMD kèm theo các biến chứng do virus này gây ra ở nhiều nơi trên thế giới (Blomberg và các đồng tác giả, 1974; Kennett và các đồng tác giả, 1974; Deibel và các đồng tác giả, 1975; Hagiwara và các đồng tác giả, 1978).

Trong những năm gần đây, bệnh nhiễm EV71 đã trở thành gánh nặng và mối quan tâm về sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới, đặc biệt là ở vùng Châu Á-Thái Bình Dương sau khi xảy ra dịch bệnh và sự bùng phát rải rác của EV71 gây độc thần kinh. Khả năng gây độc thần kinh của EV71 lần đầu tiên trở thành mối quan tâm lớn toàn cầu khi bùng phát bệnh ở Bun-ga-ry vào năm 1975 gây ra 705 ca nhiễm bệnh tương tự như bệnh viêm tủy xám đã làm 44 người tử vong (Chumakov và các đồng tác giả, 1979; Shindarov và các đồng tác giả, 1979). Sự bùng phát bệnh có bản chất tương tự xảy ra ở Hung-ga-ry vào năm 1978 gây ra trong nhiều trường hợp một số ca mắc bệnh tương tự như bệnh viêm tủy xám và làm 47 người tử vong (Nagy và các đồng tác giả, 1982). Tiếp đó, một vài bệnh dịch ở mức độ nhẹ hơn như bệnh CNS liên quan tới EV71 đã xảy ra ở Niu-Yoóc, Hồng Kông, Úc và Phi-la-đen-phia (Chomnaitree và các đồng tác giả, 1958; Samuda và các đồng tác giả, 1987; Gilbert và các đồng tác giả, 1988; Hayward và các đồng tác giả, 1989). Ở Nhật Bản, hai bệnh dịch do EV71 gây ra xuất hiện ở hầu hết các ca được đặc trưng bởi HFMD và tỷ lệ mắc bệnh CNS thấp (Tagaya và các đồng tác giả, 1981; Ishimaru và các đồng tác giả, 1980; Hagiwara và các đồng tác giả, 1983). Vào năm 1997, sự bùng phát HFMD nghiêm trọng do EV71 gây độc thần kinh mạnh gây ra xuất hiện ở Ma-lai-xi-a và làm 48 người tử vong. Sự bùng phát bệnh nghiêm trọng hơn xảy ra ở Đài Loan vào năm 1998 làm 100.000 ca mắc HFMD, 405 ca nhiễm bệnh trầm trọng và 78 người tử vong do bệnh viêm não tủy cuống phổi cấp tính kèm theo bệnh suy tim do thần kinh và bệnh phù phổi gây ra (Lum và các đồng tác giả, 1998a; Lum và các đồng tác giả, 1998b; Chang và các đồng tác giả, 1998; Yan và các đồng tác giả, 200; Liu và các đồng tác giả, 2000; Wang và các đồng tác giả, 2000). Tổng số 488.955 ca mắc HFMD cùng với 126 người tử vong đã được ghi lại ở Trung Quốc đại lục vào năm 2008 (vùng trung tâm của người Hoa, 2008). Số lượng ca mắc HFMD được báo cáo là đã tăng lên 1.155.525 ca và 353 người chết vào năm 2009 (Yang và các đồng tác giả, 2011). Vào năm 2010, quốc gia này đã trải qua đợt bùng phát bệnh lớn nhất từ trước đến nay với hơn 1,7 triệu ca mắc HFMD, 27.000 bệnh nhân bị các biến chứng về thần kinh nghiêm trọng và 905 người tử vong. Trong cả ba đợt bùng phát bệnh, hầu hết tất cả các ca mắc bệnh

trầm trọng kèm theo biến chứng về thần kinh và gây tử vong đều do EV71 gây ra (Zeng và các đồng tác giả, 2012).

Hiện nay, vẫn chưa có hiểu biết đầy đủ về phân tử quyết định tính gây độc của virus và cơ chế sinh bệnh của các bệnh nhiễm EV71. Vẫn chưa có loại thuốc kháng virus nào được phê chuẩn để điều trị các bệnh nhiễm khuẩn trầm trọng trên lâm sàng và các biến chứng thần kinh liên quan, cũng như chưa có loại vaccin nào có thể dùng để kiểm soát và ngăn ngừa việc tái diễn các đợt bùng phát bệnh theo định kỳ. Liên quan tới các chiến lược kiểm soát và ngăn ngừa, việc phát triển các vaccin có giá thành hợp lý, đặc biệt là để dùng ở các nước đang phát triển hiện là mối ưu tiên hàng đầu và vô cùng cấp bách. Đã có nhiều loại vaccin kháng EV71 đang được nghiên cứu và phát triển để tạo ra đáp ứng miễn dịch ở các loài gặm nhấm hoặc khỉ (Wu và các đồng tác giả, 2001; Arita và các đồng tác giả, 2005; Chiu và các đồng tác giả, 2006; Arita và các đồng tác giả, 2007; Tung và các đồng tác giả, 2007; Chung và các đồng tác giả, 2008; Chen và các đồng tác giả, 2008; Ong và các đồng tác giả, 2010; Chen và các đồng tác giả, 2011; Lee và Chang, 2010; Xhang và các đồng tác giả, 2010). Mặc dù vaccin chứa hạt giả virus và vaccin tiểu đơn vị chứa peptit trên cơ sở capsit VP1 vẫn nằm trong các chiến lược tiếp tục nghiên cứu phát triển vaccin tiềm năng, nhưng vaccin chứa EV71 đã bất hoạt dùng để tiêm hoặc đã được làm nhược độc để dùng theo đường miệng vẫn là các vaccin có triển vọng nhất dựa trên nhiều kinh nghiệm đã biết trong việc phát triển và sử dụng vaccin chứa virus gây bệnh viêm tủy xám Salk đã bất hoạt dùng để tiêm và vaccin chứa virus gây bệnh viêm tủy xám Sabin sống đã được làm nhược độc để dùng theo đường miệng trong việc kiểm soát và loại trừ gần như triệt để các bệnh nhiễm virus gây bệnh viêm tủy xám kiểu hoang (Zhang và các đồng tác giả, 2010).

Hiện nay, trên thị trường vẫn chưa có loại vaccin nào có tác dụng bảo vệ cho trẻ em chống lại các bệnh nhiễm khuẩn và bệnh tay chân miệng do EV71 gây ra. Dựa trên các thông tin gần đây, hiện có hai trung tâm ở nước Cộng hòa nhân dân Trung hoa, một trung tâm ở Sing-ga-po và một trung tâm ở Đài Loan đang tiến hành nghiên cứu vaccin EV71 đã bất hoạt dùng để tiêm (theo thông cáo báo chí và các mối liên lạc riêng). Phòng nghiên cứu Enterovirus ở Viện quốc gia nghiên cứu các bệnh nhiễm khuẩn (the National Institute of Infectious Diseases), Tokyo, Nhật Bản do tiến sĩ H. Shimizu điều hành đã tiến hành nghiên cứu sâu rộng về quá trình sinh bệnh của EV71 ở khỉ và các chủng EV71 nhạy nhiệt để làm vaccin EV71 sống đã được làm nhược độc dùng theo đường miệng từ những năm 1980 (Arita và các đồng tác giả, 2005; Arita và các đồng tác giả, 2007). Toàn bộ các vaccin dự

tuyến tiềm năng chứa các chủng EV71 nhạy nhiệt này ở nghiên cứu trên khi vẫn có thể gây ra tổn thương thần kinh lan tỏa và gây bệnh ở mô của hệ thần kinh trung ương (CNS) ở mức độ nhẹ hơn so với virus kiểu hoang sau khi tiêm chủng theo đường tĩnh mạch.

Vaccine sống đã được làm nhược độc đã dùng là một ở một trong số các phương pháp chủng ngừa đạt thành công đầu tiên, từ thế kỷ thứ 18 khi một bác sĩ người Anh - Edward Jenner bắt đầu sử dụng virus gây bệnh đậu mùa để chủng ngừa cho trẻ em chống lại bệnh đậu mùa. Các vaccine sống đã được làm nhược độc sử dụng virus hoặc vi sinh vật sống đã được làm yếu đi sao cho chúng không còn khả năng gây bệnh, nhưng vẫn có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ. Các phương pháp truyền thống, cổ điển và di truyền đã thành công ở phạm vi nhất định trong việc làm đã được làm nhược độc virus và vi sinh vật để dùng làm vaccine sống đã được làm nhược độc.⁴⁴⁻⁴⁸ Phương pháp truyền thống đã sử dụng các sinh vật có trong tự nhiên vô hại cho người, như sử dụng virus gây bệnh đậu mùa ở bò hoặc virus gây bệnh đậu mùa ở súc vật. Phương pháp cổ điển bao gồm hàng loạt các chu kỳ nuôi cấy virus hoặc vi sinh vật gây độc trong các điều kiện đã làm đã được làm nhược độc, như ở môi trường nuôi cấy mô hoặc môi trường thô lỏng. Phương pháp di truyền dùng công nghệ sinh học phân tử hiện đại để điều khiển bộ gen nhằm làm giảm tính gây độc của chúng (Huygelen, 1997; Robinson, 2008; Coleman và các đồng tác giả, 2008; Luring và các đồng tác giả, 2010; Kenney và các đồng tác giả, 2011). Trong phương pháp cổ điển, để thu được phenotyp virus nhạy nhiệt làm chất đánh dấu quá trình làm nhược độc, virus kiểu hoang là loại được chọn thông qua kỹ thuật thử nghiệm mảng bằng cách nuôi cấy virus này trong các tế bào thích hợp đã ủ ở nhiệt độ thấp. Sau đó, chủng virus được chọn được cấy truyền nhiều lần ở nhiệt độ ủ thấp đã định (Hagiwara và các đồng tác giả, 1982; Hashimoto và Hagiwara, 1983; Richman và Murphy, 1997).

Mong muốn phát triển được các chủng virus có thể được sử dụng để điều trị các bệnh nhiễm virus mà vẫn giữ được độ ổn định về kiểu hình và tính di truyền trong các môi trường nuôi cấy tế bào *in vitro* đặc hiệu và không gây độc thần kinh ở khỉ sau khi cấy virus theo đường tĩnh mạch. Cũng mong muốn phát triển được chủng virus nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh, bao gồm virus ARN, thu được sau khi cấy truyền hàng loạt trong môi trường nuôi cấy tế bào.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh, đặc biệt là các chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh EV71:TLL β P20 và EV71:TLL α P20. Sáng chế cũng đề xuất các quy trình phát triển các chủng virus nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh, đặc biệt là chủng virus ARN.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh. Theo một phương án, chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh là EV71:TLL β P20 như được nêu trong bản mô tả này. Theo phương án khác, chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh là EV71:TLL α P20 như được nêu trong bản mô tả này.

Các chủng Enterovirut 71 theo sáng chế được điều chế bằng phương pháp làm nhược độc Enterovirut 71 bằng cách sử dụng độ nhạy nhiệt làm chỉ dấu kiểu hình. Phương pháp này là quy trình *in vitro* trong phòng thí nghiệm nhằm biến đổi đặc tính phát triển sinh học của virus cho phù hợp để sao chép tối ưu ở nhiệt độ ủ dưới 30°C. Quy trình thích hợp này, sẽ được mô tả chi tiết dưới đây, được thực hiện từng bước một cách hệ thống bằng cách nhiệt độ ủ giảm dần để nuôi cấy virus cho đến khi đạt được nhiệt độ đích được chọn để sao chép tối ưu virus.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa các chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh nêu trong bản mô tả. Theo một phương án, chế phẩm này bao gồm lượng hữu hiệu của các chủng virus nêu trong bản mô tả. Theo phương án khác, chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều chất mang được dụng hoặc chấp nhận được về mặt sinh lý. Theo phương án khác, chế phẩm là vaccin. Các vaccin chứa chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh nêu trong bản mô tả được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này. Các vaccin như vậy là hữu ích để tạo ra tính miễn dịch chống lại chủng virus bố mẹ bằng cách cho đối tượng dùng vaccin, như người, nhờ sử dụng các kỹ thuật đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này.

Tiếp theo, sáng chế mô tả phương pháp tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở đối tượng, như người, bao gồm bước cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu có tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị hoặc tạo miễn dịch của chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh nêu trong bản mô tả. Theo một phương án, đáp ứng miễn dịch bảo vệ

có khả năng bảo vệ đối tượng chống lại bệnh do Enterovirut 71 gây ra. Theo một phương án, bệnh này là bệnh tay chân miệng. Theo phương án khác, bệnh này là bệnh viêm màng não vô trùng. Theo phương án khác, bệnh này là bệnh viêm não. Theo phương án khác, bệnh này là chứng liệt tương tự như bệnh viêm tủy xám. Theo một phương án, chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh nêu trong bản mô tả được dùng ở dạng vaccin. Theo phương án khác, đối tượng đã bị phơi nhiễm với Enterovirut 71 kiểu hoang. Theo phương án khác, việc dùng chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh nêu trong bản mô tả có tác dụng phòng bệnh cho đối tượng, như người, khỏi bị nhiễm bệnh liên quan tới Enterovirut 71. Theo phương án khác, đối tượng đã bị phơi nhiễm với Enterovirut 71 kiểu hoang. Theo phương án khác, việc dùng chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh nêu trong bản mô tả làm trì hoãn sự khởi phát hoặc làm chậm tốc độ tiến triển của bệnh liên quan tới Enterovirut 71 ở đối tượng đã nhiễm virut, như người.

Theo khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề xuất phương pháp làm nhược độc virut bằng cách sử dụng độ nhạy nhiệt làm chỉ dấu kiểu hình. Theo khía cạnh này, phương pháp phát triển các chủng virut nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh. Phương pháp theo sáng chế là quy trình *in vitro* trong phòng thí nghiệm nhằm biến đổi đặc tính phát triển sinh học của virut cho phù hợp để sao chép tối ưu ở nhiệt độ ừ dưới 30°C. Quy trình thích hợp này được thực hiện từng bước một cách hệ thống có nhiệt độ ừ giảm dần để nuôi cấy virut cho đến khi đạt được nhiệt độ đích được chọn để sao chép tối ưu virut. Do đó, theo sáng chế, phương pháp này bao gồm các bước sau: (i) điều chế dung dịch gốc đối chứng chứa virut bố mẹ kiểu hoang, (ii) ử môi trường nuôi cấy chứa các tế bào đã nhiễm dung dịch gốc đối chứng chứa virut bố mẹ kiểu hoang với liều gây nhiễm (multiplicity of infection - MOI) cao hơn và nhiệt độ ử nằm trong khoảng từ 34°C đến 36°C, tốt hơn là khoảng 34°C, trong năm hoặc nhiều lần cấy truyền cho đến khi tác động gây bệnh tế bào (cytopathic effect - CPE) hoàn toàn thu được ở mỗi lần cấy truyền bằng cách sử dụng dịch cấy có MOI nhỏ hơn và khoảng thời gian ử ngắn hơn đối với mỗi lần cấy truyền để tạo ra được CPE hoàn toàn, (iii) ử môi trường nuôi cấy chứa các tế bào đã nhiễm virut thu được ở bước nêu trên với MOI cao hơn và nhiệt độ ử thấp hơn khoảng từ 1°C đến 3°C so với nhiệt độ ở bước nêu trên trong năm hoặc nhiều lần cấy truyền cho đến khi thu được tác động gây bệnh tế bào (CPE) hoàn toàn ở mỗi lần cấy truyền bằng cách sử dụng dịch cấy có MOI nhỏ hơn và khoảng thời gian ử ngắn hơn đối với mỗi lần cấy truyền để tạo ra được CPE hoàn toàn, và (iv) tiến hành lặp

lại bước (iii) từng bước một cách hệ thống có nhiệt độ ủ giảm dần cho đến khi đạt được nhiệt độ thích hợp để sao chép tối ưu virus. Theo một phương án, nhiệt độ thích hợp nằm trong khoảng từ 26°C đến 29°C, tốt hơn là khoảng 28°C. Theo một phương án, nhiệt độ ủ giảm dần là nhiệt độ thấp nằm trong khoảng từ 1°C đến 2°C.

Theo một phương án, dung dịch gốc đối chứng chứa virus bố mẹ kiểu hoang được điều chế bằng cách ủ môi trường nuôi cấy chứa các tế bào đã nhiễm virus kiểu hoang ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 36°C đến 38°C, tốt hơn là khoảng 37°C trong một hoặc hai lần cấy truyền cho đến khi thu được tác động gây bệnh tế bào (CPE) hoàn toàn. Các phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy chứa virus đã tạo ra được cho vào các lọ hoặc các dụng cụ bảo quản thích hợp khác. Dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy này dùng làm dung dịch gốc đối chứng chứa virus bố mẹ kiểu hoang. Virus bố mẹ kiểu hoang tham chiếu được sử dụng cho quy trình làm làm nhược độc tiếp theo. Theo phương án khác, các phần dung dịch gốc đối chứng chứa virus bố mẹ kiểu hoang được bảo quản ở nhiệt độ thích hợp, như ở -80°C.

Theo một phương án, virus là virus bất kỳ. Theo phương án khác, virus là virus ARN. Theo phương án khác, virus ARN là virus ARN nhiều sợi. Theo phương án khác, virus là thành viên của họ Picornaviridae. Theo phương án khác, virus là thành viên của chi Enterovirus. Theo một phương án, virus là Enterovirus 71 (EV71). Theo phương án khác, virus là coxsackievirus A16 (CA16). Phương pháp theo sáng chế là hữu ích trong việc sản xuất các chủng virus nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh trong số virus bất kỳ trong số các virus này, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các chủng virus nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh EV71 và CA16.

Theo một phương án, tế bào cần nhiễm virus là tế bào bất kỳ có thể chấp nhận được để phát triển virus. Theo một phương án được ưu tiên, các tế bào là các tế bào Vero (ATCC CCL-81). Theo một phương án, các tế bào được duy trì bằng lần cấy truyền thông thường trong môi trường thích hợp để phát triển tế bào. Theo phương án trong đó các tế bào là các tế bào Vero, các tế bào Vero được nuôi cấy trong môi trường Eagle được cải tiến bởi Dulbecco (DMEM) có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bê (fetal calf serum - FCS). Theo một phương án, các tế bào Vero đã được giữ trong DMEM có bổ sung 1% FCS được sử dụng để sản xuất virus bố mẹ kiểu hoang, môi trường nuôi cấy virus, đã được làm nhược độc, điều chỉnh và đánh giá kiểu hình nhạy nhiệt. Theo phương án khác, DMEM được bổ sung 1% FCS để phù hợp với các chủng virus để sao chép ở nhiệt độ ủ giảm từ từ.

Sáng chế cũng đề xuất các chủng virus nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh được sản xuất bằng phương pháp nêu trong bản mô tả. Virus nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh được sản xuất bằng phương pháp nêu trong bản mô tả là hữu ích để sản xuất các vaccine bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này. Các vaccine như vậy là hữu ích để tạo ra tính miễn dịch chống lại chủng virus bố mẹ bằng cách cho đối tượng dùng vaccine nhờ sử dụng các kỹ thuật đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1a thể hiện tế bào đơn nhân ở máu ngoại vi (hình mũi tên), được lấy từ máu khi vào ngày thứ 4 sau khi nhận liều enterovirus 71 (EV71:TLL β P20) theo đường tĩnh mạch, nhuộm dương bằng thử nghiệm miễn dịch phát huỳnh quang không trực tiếp bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng đặc hiệu với virus thương mại.

Fig. 1b là ảnh chụp các gel agarose được điện di đã nhuộm bằng GelRed thể hiện các sản phẩm mô RT-PCR khuếch đại một bước được lấy từ khi đã gây miễn dịch sau ngày thứ 4 (2202F, 2891F) bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi oligonucleotit đặc hiệu để phát hiện enterovirus 71. Kích cỡ mong muốn của sản phẩm khuếch đại RT-PCR bằng 427 bp. Các dải ở hai gel là như sau. *Gel 1*: Dải 1: 100 bp thang ADN; Dải 2: 2202F-Tim; Dải 3: 2202F-Lá lách; Dải 4: 2202F-Hạch bạch huyết; Dải 5: 2202F-Thận; Dải 6: 2202F-Gan; Dải 7: 2891F-Tim; Dải 8: 2891F-Lá lách; Dải 9: 2891F-Hạch bạch huyết; Dải 10: 2891F-Thận; Dải 11: 2891F-Gan; Dải 12: 2202F-Cuống não (Học cầu); Dải 13: 2202F-Cuống não (hành tủy não tủy); Dải 14: 2202F-Vỏ não (Nếp cuộn não); Dải 15: 2202F-Dây cột sống (Cổ); Dải 16: 2202F-Dây cột sống (Vùng thắt lưng); Dải 17: 2202F-Dây cột sống (Vùng ngực); Dải 18: 2891F- Cuống não (hành tủy não tủy); Dải 19: 2891F- Cuống não (Học cầu); Dải 20: 2891F-Vỏ não (Não trái). *Gel 2*: Dải 21: 100 bp thang ADN; Dải 22: 2891F-Vỏ não (Não phải); Dải 23: 2891F- Dây cột sống (Cổ); Dải 24: 2891F- Dây cột sống (Vùng thắt lưng); Dải 25: 2891F- Dây cột sống (Vùng ngực); Dải 26: Không kiểm soát theo khuôn mẫu; Dải 27: 100 bp thang ADN.

Mô tả chi tiết các phương án thực hiện sáng chế

Sáng chế đề cập đến các chủng Enterovirus 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh, đặc biệt là các chủng Enterovirus 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều

kiện lạnh EV71:TLL β P20 và EV71:TLL α P20. Sáng chế cũng đề cập đến các quy trình phát triển các chủng virus nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh, đặc biệt là chủng virus ARN.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến chủng virus nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh. Theo một phương án, chủng Enterovirus 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh là EV71:TLL β P20 như được nêu trong bản mô tả này. Theo phương án khác, chủng Enterovirus 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh là EV71:TLL α P20 như được nêu trong bản mô tả này. EV71:TLL β P20 được lưu giữ vào ngày 25 tháng 10 năm 2012 theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest ở Trung tâm lưu giữ giống nuôi cấy Hoa Kỳ tại 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110, Mỹ và có Số lưu giữ PTA-13285. EV71:TLL α P20 được lưu giữ vào ngày 25 tháng 10 năm 2012 theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest với Trung tâm lưu giữ giống nuôi cấy Hoa Kỳ, và có Số lưu giữ PTA-13284.

Các chủng Enterovirus 71 theo sáng chế được điều chế bằng phương pháp làm nhược độc Enterovirus 71 bằng cách sử dụng độ nhạy nhiệt làm chỉ dấu kiểu hình. Phương pháp là quy trình *in vitro* trong phòng thí nghiệm nhằm biến đổi đặc tính phát triển sinh học của virus cho phù hợp để sao chép tối ưu ở nhiệt độ ủ dưới 30°C. Quy trình thích hợp được thực hiện từng bước một cách hệ thống có nhiệt độ ủ giảm dần để nuôi cấy virus cho đến khi đạt được nhiệt độ đích được chọn để sao chép tối ưu virus. Như nêu trong bản mô tả, các bước là (i) điều chế dung dịch gốc đối chứng chứa virus bố mẹ kiểu hoang, (ii) ủ môi trường nuôi cấy chứa các tế bào đã nhiễm dung dịch gốc đối chứng chứa virus bố mẹ kiểu hoang với liều gây nhiễm (MOI) cao hơn và nhiệt độ ủ khoảng 34°C trong năm hoặc nhiều lần cấy truyền cho đến khi thu được tác động gây bệnh tế bào hoàn toàn (CPE) ở mỗi lần cấy truyền bằng cách sử dụng dịch cấy có MOI nhỏ hơn và khoảng thời gian ủ ngắn hơn đối với mỗi lần cấy truyền để tạo ra được CPE hoàn toàn, (iii) ủ môi trường nuôi cấy chứa các tế bào đã nhiễm virus thu được ở bước nêu trên với MOI cao hơn và nhiệt độ ủ thấp hơn khoảng từ 1°C đến 3°C so với nhiệt độ ở bước nêu trên trong năm hoặc nhiều lần cấy truyền cho đến khi thu được tác động gây bệnh tế bào hoàn toàn (CPE) ở mỗi lần cấy truyền bằng cách sử dụng dịch cấy có MOI nhỏ hơn và khoảng thời gian ủ ngắn hơn đối với mỗi lần cấy truyền để tạo ra được CPE hoàn toàn, và (iv) tiến hành lặp lại bước (iii) từng bước một cách hệ thống có nhiệt độ ủ giảm dần cho đến khi đạt được nhiệt độ đích được chọn để sao chép tối

ưu virut. Theo một phương án, nhiệt độ đích nằm trong khoảng từ 26°C đến 29°C, tốt hơn là khoảng 28°C.

Theo một phương án, dung dịch gốc đối chứng chứa virut bố mẹ kiểu hoang được điều chế bằng cách ủ môi trường nuôi cấy chứa các tế bào đã nhiễm virut kiểu hoang ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 36°C đến 38°C, tốt hơn là khoảng 37°C trong một hoặc hai lần cấy truyền cho đến khi thu được tác động gây bệnh tế bào (CPE) hoàn toàn. Các phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy chứa virut đã tạo ra được cho vào các lọ hoặc các dụng cụ bảo quản thích hợp khác. Dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy này dùng làm dung dịch gốc đối chứng chứa virut bố mẹ kiểu hoang. Virut bố mẹ kiểu hoang tham chiếu được sử dụng cho quy trình làm đã được làm nhược độc tiếp theo. Theo phương án khác, các phần dung dịch gốc đối chứng chứa virut bố mẹ kiểu hoang được bảo quản ở nhiệt độ thích hợp, như ở -80°C.

Theo một phương án, tế bào cần nhiễm virut là tế bào bất kỳ có thể chấp nhận được để phát triển virut. Theo một phương án được ưu tiên, các tế bào là các tế bào Vero (ATCC CCL-81). Theo một phương án, các tế bào được duy trì bằng cách cấy truyền thông thường trong môi trường thích hợp để phát triển tế bào. Theo phương án trong đó các tế bào là các tế bào Vero, các tế bào Vero được nuôi cấy trong môi trường Eagle được cải tiến bởi Dulbecco (DMEM) có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bê (FCS). Theo một phương án, các tế bào Vero được duy trì trong DMEM có bổ sung 1% FCS được sử dụng để sản xuất virut bố mẹ kiểu hoang, môi trường nuôi cấy virut, đã được làm nhược độc, điều chỉnh và đánh giá kiểu hình nhạy nhiệt. Theo phương án khác, DMEM được bổ sung 1% FCS để phù hợp với các chủng virut để sao chép ở nhiệt độ ủ giảm từ từ.

Theo một phương án, virut được xử lý ở mỗi bước của quy trình bằng cách thu được dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy đã làm trong chứa virut và cho dịch nổi trên bề mặt này vào từng bình cầu nuôi cấy tế bào mới tiếp theo, ví dụ, các tế bào Vero, ngay khi virut đạt được tác động gây bệnh tế bào (CPE) hoàn toàn. Theo phương án khác, dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy chứa virut được cho vào ở liều gây nhiễm (MOI) cao hơn 20 ở mỗi thời điểm bắt đầu ủ ở nhiệt độ giảm dần. Sau khi tạo ra thu được CPE hoàn toàn ở các tế bào Vero trong vòng 3 ngày sau khi cấy virut, bình cầu nuôi cấy mới chứa tế bào Vero một lớp đồng nhất được cấy virut có cùng MOI trong ít nhất nhiều hơn ba lần cấy truyền trước khi giảm tiếp xuống MOI nhỏ hơn nằm trong khoảng từ 5 đến 10. Ngay khi nó tạo ra CPE hoàn toàn trong vòng 3 ngày sau khi cấy virut với MOI nhỏ hơn khoảng từ 5 đến 10, thì sau đó quy trình làm nhược độc được chuyển tới pha tiếp theo có nhiệt độ ủ giảm xuống từ từ sau khi xử lý trong

ít nhất hơn ba lần ở MOI nằm trong khoảng từ 5 đến 10. Số ngày cần cho mỗi lần cấy truyền nhanh hay chậm tùy thuộc vào khả năng thích ứng của virus ở mỗi pha ủ ở nhiệt độ thấp tăng dần. Chuyên gia trong lĩnh vực này dễ dàng biết được khi nào đạt được CPE hoàn toàn. Chi tiết hơn về phương pháp điều chế các chủng Enterovirus 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh theo sáng chế được mô tả dưới đây.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa các chủng Enterovirus 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh nêu trong bản mô tả. Theo một phương án, chế phẩm bao gồm lượng hữu hiệu của các chủng virus nêu trong bản mô tả. Theo phương án khác, chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều chất mang được dụng hoặc chấp nhận được về mặt sinh lý. Theo phương án khác, chế phẩm là vaccin. Các vaccin chứa chủng Enterovirus 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh nêu trong bản mô tả được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này. Các vaccin như vậy là hữu ích để tạo ra tính miễn dịch chống lại chủng virus bố mẹ bằng cách cho đối tượng dùng vaccin, như người, bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này.

Cần phải hiểu rằng chủng Enterovirus 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh nêu trong bản mô tả, được sử dụng để tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở đối tượng hoặc để phòng bệnh cho đối tượng khỏi bị nhiễm các bệnh liên quan tới virus hoặc trì hoãn sự khởi phát hoặc làm chậm tốc độ tiến triển của bệnh liên quan tới virus, được dùng cho đối tượng ở dạng chế phẩm còn bao gồm một hoặc nhiều chất mang được dụng hoặc có thể chấp nhận được về mặt sinh lý. Các chất mang được dụng là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều dung dịch đệm phosphat, nước muối đệm phosphat (PBS) có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01 M đến 0,1 M và tốt hơn là bằng 0,05 M, hoặc nước muối 0,9%. Các chất mang như vậy cũng bao gồm dung dịch nước hoặc không phải nước, huyền phù, và nhũ tương. Các chất mang nước bao gồm nước, dung dịch rượu/nước, nhũ tương hoặc huyền phù, môi trường nước muối và môi trường đệm. Ví dụ về các dung môi không phải nước là propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật như dầu ôliu, và este hữu cơ dùng để tiêm như etyl oleat. Các tá dược lỏng dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch natri clorua, dextroza Ringer, dextroza và natri clorua, dầu Ringer được lactat hóa và được cố định. Các tá dược lỏng dùng theo đường tĩnh mạch bao gồm chất đệm lỏng và dưỡng chất, chất đệm điện phân như các chất trên cơ sở dextroza Ringer, và các chất tương tự. Các chế phẩm dạng rắn có thể chứa các chất mang không độc

như, ví dụ, glucoza, sucroza, manitol, sorbitol, lactoza, tinh bột, magie stearat, xenluloza hoặc dẫn xuất xenluloza, natri cacbonat và magie cacbonat. Để dùng ở dạng khí dung, như để phân phối vào phổi và/hoặc qua mũi, tốt hơn nếu chất hoặc chế phẩm được bào chế với chất hoạt động bề mặt không độc, ví dụ, các este hoặc este một phần của axit béo có 6 đến 22 nguyên tử cacbon hoặc glyxerit tự nhiên, và chất đẩy. Các chất mang khác như lexitin có thể được bao gồm để tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân phối qua mũi. Các chất mang được dụng có thể còn bao gồm các lượng nhỏ các chất bổ trợ như chất làm ẩm hoặc chất nhũ hóa, chất bảo quản và các chất phụ gia khác, như, ví dụ, chất diệt khuẩn, chất chống oxy hoá và chất càng hóa, để làm tăng thời gian sử dụng và/hoặc hiệu lực của các thành phần hoạt tính. Các chế phẩm điều chế nhanh có thể, là đã biết trong lĩnh vực này, được bào chế sao cho tạo ra được khả năng giải phóng hoạt chất nhanh, kéo dài hoặc trì hoãn sau khi dùng cho đối tượng.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập tới phương pháp tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở đối tượng, như người, bao gồm bước cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu có tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị hoặc tạo miễn dịch của chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh nêu trong bản mô tả. Theo một phương án, đáp ứng miễn dịch bảo vệ có khả năng bảo vệ đối tượng chống lại bệnh do Enterovirut 71 gây ra. Theo một phương án, bệnh này là bệnh tay chân miệng. Theo phương án khác, bệnh này là bệnh viêm màng não vô trùng. Theo phương án khác, bệnh này là bệnh viêm não. Theo phương án khác, bệnh này là chứng liệt tương tự như bệnh viêm tủy xám. Theo một phương án, chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh nêu trong bản mô tả được dùng ở dạng vaccin. Theo phương án khác, đối tượng được tiếp xúc với Enterovirut 71 kiểu hoang. “Phơi nhiễm” với Enterovirut 71 có nghĩa là quá trình tiếp xúc với Enterovirut 71 để có thể bị nhiễm virut. Theo phương án khác, việc dùng chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh nêu trong bản mô tả có khả năng phòng bệnh cho đối tượng, như người, khỏi bị nhiễm bệnh liên quan tới Enterovirut 71. Từ đó, sáng chế còn đề cập đến chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh hoặc chế phẩm chứa chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh để dùng trong việc phòng bệnh cho đối tượng, như người, khỏi bị nhiễm bệnh liên quan tới Enterovirut 71. Sáng chế còn mô tả việc sử dụng chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh hoặc chế phẩm chứa chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh để sản xuất thuốc phòng bệnh cho đối tượng, như người, khỏi

bị nhiễm bệnh liên quan tới Enterovirut 71. Theo phương án bổ sung, đối tượng đã bị phơi nhiễm với Enterovirut 71 kiểu hoang. Theo phương án khác, việc dùng chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh nêu trong bản mô tả làm trì hoãn sự khởi phát hoặc làm chậm tốc độ tiến triển của bệnh liên quan tới Enterovirut 71 ở đối tượng đã nhiễm virus, như người. Từ đó, sáng chế đề cập tới sáng chế còn đề cập đến chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh hoặc chế phẩm chứa chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh để dùng trong việc phòng bệnh cho đối tượng, như người. Sáng chế còn mô tả việc sử dụng chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh hoặc chế phẩm chứa chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh này để sản xuất thuốc trì hoãn sự khởi phát hoặc làm chậm tốc độ tiến triển của bệnh liên quan tới Enterovirut 71 ở đối tượng bị nhiễm virus, như người

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "việc dùng" có nghĩa là việc phân phối bằng cách sử dụng phương pháp và hệ phân phối bất kỳ trong số các phương pháp và hệ phân phối khác nhau đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này. Việc dùng này có thể được thực hiện, ví dụ, trong màng bụng, trong não, trong tĩnh mạch, qua đường miệng, qua niêm mạc, dưới da, da, trong da, trong cơ, khu trú, ngoài đường tiêu hóa, bằng cách cấy, trong vỏ não, trong bạch huyết, trong chỗ thương tổn, màng ngoài tim, hoặc trên màng cứng. Chất hoặc chế phẩm cũng có thể được dùng ở dạng khí dung, như để phân phối tới phổi và/hoặc qua mũi. Việc dùng có thể được tiến hành, ví dụ, ngay khi, nhiều lần, và/hoặc trong một hoặc nhiều khoảng thời gian kéo dài.

Việc tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở đối tượng có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách cho sử dụng liều sơ bộ của vacxin cho đối tượng, sau khoảng thời gian thích hợp bằng cách dùng một hoặc nhiều vacxin liên tiếp. Khoảng thời gian thích hợp giữa các lần dùng vacxin có thể được xác định dễ dàng bởi chuyên gia trong lĩnh vực này, và thường theo thứ tự từ vài tuần với vài tháng. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở phương pháp, đường dùng hoặc số lần dùng cụ thể bất kỳ.

"Liều hữu hiệu có tác dụng phòng ngừa" hoặc "liều hữu hiệu có tác dụng tạo miễn dịch" là lượng bất kỳ của vacxin, khi được dùng cho đối tượng dễ bị nhiễm virus hoặc dễ bị mắc rối loạn liên quan tới virus, tạo ra cho đối tượng đáp ứng miễn dịch có khả năng bảo vệ đối tượng khỏi bị nhiễm virus hoặc mắc rối loạn. "Bảo vệ" cho đối tượng có nghĩa là làm giảm khả năng nhiễm virus ở đối tượng, hoặc thuyên giảm khả năng khởi phát rối loạn ở đối

tượng, xuống ít nhất là hai lần, tốt hơn là ít nhất là mười lần. Ví dụ, nếu đối tượng có 1% nguy cơ nhiễm virus, thì khả năng nhiễm virus ở đối tượng giảm xuống còn một nửa tức là đối tượng chỉ còn có 0,5% nguy cơ nhiễm virus. Tốt nhất, nếu "liều hữu hiệu có tác dụng phòng ngừa" tạo ra đáp ứng miễn dịch cho đối tượng có khả năng phòng ngừa hoàn toàn cho đối tượng khỏi bị nhiễm virus hoặc phòng ngừa hoàn toàn sự khởi phát của rối loạn ở đối tượng.

Các phương án nhất định về các phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp tạo miễn dịch và điều trị ổn định có thể còn bao gồm bước dùng cho đối tượng ít nhất một chất bổ trợ. "Chất bổ trợ" có nghĩa là chất bất kỳ thích hợp để làm tăng tính sinh miễn dịch của kháng nguyên và tạo ra đáp ứng miễn dịch mạnh ở đối tượng. Rất nhiều chất bổ trợ, bao gồm các chất bổ trợ cụ thể, là thích hợp để sử dụng cùng với vacxin trên cơ sở cả protein lẫn axit nucleic, và các phương pháp kết hợp chất bổ trợ với kháng nguyên, là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này. Các chất bổ trợ thích hợp để sử dụng cùng với quá trình tạo miễn dịch protein bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phen, chất bổ trợ hoàn toàn Freund (FCA), chất bổ trợ không hoàn toàn Freund (FIA), phen bổ trợ, chất bổ trợ trên cơ sở saponin, như Quil A, và QS-21, và các chất tương tự.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp làm đã được làm nhược độc virus bằng cách sử dụng độ nhạy nhiệt làm chỉ dấu kiểu hình. Theo khía cạnh này, phương pháp này phát triển các chủng virus nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh. Phương pháp theo sáng chế là quy trình *in vitro* trong phòng thí nghiệm nhằm biến đổi đặc tính phát triển sinh học của virus cho phù hợp để sao chép tối ưu ở nhiệt độ ừ dưới 30°C. Quy trình thích hợp được thực hiện từng bước một cách hệ thống có nhiệt độ ừ giảm dần để nuôi cấy virus cho đến khi đạt được nhiệt độ đích được chọn để sao chép tối ưu virus.

Do đó, theo sáng chế, phương pháp bao gồm các bước sau: (i) điều chế dung dịch gốc đối chứng chứa virus bố mẹ kiểu hoang, (ii) ử môi trường nuôi cấy chứa các tế bào đã nhiễm dung dịch gốc đối chứng chứa virus bố mẹ kiểu hoang với liều gây nhiễm cao hơn (MOI) và nhiệt độ ử nằm trong khoảng từ 34°C đến 36°C, tốt hơn là khoảng 34°C, trong năm hoặc nhiều lần cấy truyền cho đến khi thu được tác động gây bệnh tế bào (CPE) hoàn toàn ở mỗi lần cấy truyền bằng cách sử dụng dịch cấy có MOI nhỏ hơn và khoảng thời gian ử ngắn hơn đối với mỗi lần cấy truyền để tạo ra được CPE hoàn toàn, (iii) ử môi trường nuôi cấy chứa các tế bào đã nhiễm virus thu được ở bước nêu trên với MOI cao hơn và nhiệt độ ử thấp hơn khoảng từ 1°C đến 3°C so với nhiệt độ ở bước nêu trên trong năm hoặc nhiều lần

cây truyền cho đến khi thu được tác động gây bệnh tế bào hoàn toàn (CPE) ở mỗi lần cấy truyền bằng cách sử dụng dịch cấy có MOI nhỏ hơn và khoảng thời gian ủ ngắn hơn đối với mỗi lần cấy truyền để tạo ra được CPE hoàn toàn, và (iv) tiến hành lặp lại bước (iii) từng bước một cách hệ thống có nhiệt độ ủ giảm dần cho đến khi đạt được nhiệt độ đích được chọn để sao chép tối ưu virus. Theo một phương án, nhiệt độ đích nằm trong khoảng từ 26°C đến 29°C, tốt hơn là khoảng 28°C. Theo một phương án, nhiệt độ ủ giảm dần là nhiệt độ thấp nằm trong khoảng từ 1°C đến 2°C.

Theo một phương án, dung dịch gốc đối chứng chứa virus bố mẹ kiểu hoang được điều chế bằng cách ủ môi trường nuôi cấy chứa các tế bào đã nhiễm virus kiểu hoang ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 36°C đến 38°C, tốt hơn là khoảng 37°C trong một hoặc hai lần cấy truyền cho đến khi thu được tác động gây bệnh tế bào (CPE) hoàn toàn. Các phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy chứa virus đã tạo ra được cho vào các lọ hoặc các dụng cụ bảo quản thích hợp khác. Dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy này dùng làm dung dịch gốc đối chứng chứa virus bố mẹ kiểu hoang. Virus bố mẹ kiểu hoang tham chiếu được sử dụng cho quy trình làm đã được làm nhược độc tiếp theo. Theo phương án khác, các phần dung dịch gốc đối chứng chứa virus bố mẹ kiểu hoang được bảo quản ở nhiệt độ thích hợp, như ở -80°C.

Theo một phương án, virus được xử lý ở mỗi bước của quy trình bằng cách thu lấy dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy đã làm trong chứa virus và cho dịch nổi trên bề mặt này vào từng bình cầu nuôi cấy mới chứa các tế bào, ví dụ, các tế bào Vero, ngay khi virus tạo ra tác động gây bệnh tế bào hoàn toàn (CPE). Theo phương án khác, dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy chứa virus được cấy truyền ở liều gây nhiễm (MOI) cao hơn bằng 20 ở mỗi thời điểm bắt đầu thay đổi từ từ nhiệt độ ủ thấp. Cần lưu ý rằng sau khi tạo ra CPE hoàn toàn ở các tế bào Vero trong vòng 3 ngày sau khi cấy virus, bình cầu nuôi cấy mới chứa tế bào Vero một lớp đồng nhất được cấy virus có cùng MOI trong ít nhất nhiều hơn ba lần cấy truyền trước khi giảm tiếp xuống MOI thấp hơn nằm trong khoảng từ 5 đến 10. Cần lưu ý rằng ngay khi tạo ra được CPE hoàn toàn trong vòng 3 ngày sau khi cấy virus với MOI thấp nằm trong khoảng từ 5 đến 10, thì sau đó quy trình làm nhược độc được chuyển tới pha tiếp theo có nhiệt độ ủ giảm xuống từ từ sau khi cấy truyền ít nhất hơn ba lần ở MOI nằm trong khoảng từ 5 đến 10. Số ngày cần thiết đối với mỗi lần cấy truyền nhanh hay chậm tùy thuộc vào mức độ thích ứng của virus ở mỗi pha ủ ở nhiệt độ thấp tăng dần. Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ dễ dàng biết được rằng khi nào tạo ra được CPE hoàn toàn.

Theo một phương án, virus là virus bất kỳ. Theo phương án khác, virus là virus ARN. Theo phương án khác, virus ARN là virus ARN nhiều sợi. Theo phương án khác, virus là thành viên của họ Picornaviridae. Theo phương án khác, virus là thành viên của chi Enterovirus. Theo một phương án, virus là Enterovirus 71 (EV71). Theo phương án khác, virus là coxsackievirus A16 (CA16). Phương pháp theo sáng chế là hữu ích trong việc sản xuất các chủng virus nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh của virus bất kỳ trong số các virus này, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các chủng virus nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh EV71 và CA16.

Theo một phương án, tế bào cần nhiễm virus là tế bào bất kỳ có thể chấp nhận được để phát triển virus. Theo một phương án được ưu tiên, các tế bào là các tế bào Vero (ATCC CCL-81). Theo một phương án, các tế bào được duy trì bằng cách cấy truyền thông thường trong môi trường thích hợp để phát triển tế bào. Theo một phương án, trong đó các tế bào là các tế bào Vero, các tế bào Vero được nuôi cấy trong môi trường Eagle được cải tiến bởi Dulbecco (DMEM) có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bê (FCS). Theo một phương án, các tế bào Vero được duy trì trong DMEM có bổ sung 1% FCS được sử dụng để sản xuất virus bố mẹ kiểu hoang, môi trường nuôi cấy virus, đã được làm nhược độc, điều chỉnh và đánh giá kiểu hình nhạy nhiệt. Theo phương án khác, DMEM được bổ sung 1% FCS để phù hợp với các chủng virus để sao chép ở nhiệt độ ủ giảm từ từ.

Sáng chế cũng đề cập đến các chủng virus nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh được sản xuất bởi phương pháp nêu trong bản mô tả. Virus nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh được sản xuất bởi phương pháp nêu trong bản mô tả là hữu ích trong việc sản xuất các vaccine bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này. Các vaccine như vậy là hữu ích để tạo ra tính miễn dịch chống lại chủng virus bố mẹ bằng cách cho đối tượng dùng vaccine bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này.

Phương pháp theo sáng chế là thích hợp để sản xuất virus nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh thuộc họ Picornaviridae và chi Enterovirus. Tính hữu dụng này được chứng minh trong bản mô tả này bằng cách sản xuất các chủng EV71 (TLL α) và EV71 (TLL β) nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh được lấy ra qua nhiều lần cấy truyền trong môi trường nuôi cấy tế bào ở nhiệt độ ủ giảm dần. Chủng EV71 (TLL β) vẫn giữ được độ ổn định về kiểu hình và tính di truyền trong các điều kiện nuôi cấy tế bào *in vitro* đặc hiệu và không gây độc thần kinh ở khi sau khi cấy virus theo đường tĩnh mạch.

Tính hữu dụng cũng đã được chứng minh trong bản mô tả này bằng cách sản xuất CA16 nhạy nhiệt thích nghi với điều kiện được lấy ra qua nhiều lần cấy truyền trong môi trường nuôi cấy tế bào ở nhiệt độ ủ giảm dần.

Sáng chế cũng đề cập đến kit để tạo miễn dịch cho đối tượng bằng chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh nêu trong bản mô tả này. Kit này chứa chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh nêu trong bản mô tả, chất mang được dụng, dụng cụ chuyên dùng và hướng dẫn sử dụng nó. Sáng chế bao gồm các phương án khác về kit là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này. Các hướng dẫn sử dụng có thể cung cấp thông tin bất kỳ là hữu ích để trực tiếp dùng chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh nêu trong bản mô tả.

Trừ khi có chỉ dẫn khác, sáng chế đã ứng dụng các kỹ thuật thông thường về hóa học, sinh học phân tử, vi sinh học, ADN tái tổ hợp, di truyền, miễn dịch, sinh học tế bào, nuôi cấy tế bào và sinh học biến đổi gen, là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, Maniatis và các đồng tác giả, 1982, *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Sambrook và các đồng tác giả, 1989, *Molecular Cloning*, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Sambrook và Russell, 2001, *Molecular Cloning*, 3rd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Green và Sambrook, 2012, *Molecular Cloning*, 4th Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Ausubel và các đồng tác giả, 1992, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, bao gồm cả các thông tin cập nhật định kỳ); Glover, 1985, *DNA Cloning* (IRL Press, Oxford); Russell, 1984, *Molecular biology of plants: a laboratory course manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); Guthrie và Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press, New York, 1991); Harlow và Lane, 1988, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); luận án *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Methods In Enzymology*, Cột 154 và

155 (Wu và các đồng tác giả eds.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Riott, *Essential Immunology*, 6th Edition, Công bố khoa học Blackwell, Oxford, 1988; Fire và các đồng tác giả, *RNA Interference Technology: From Basic Science to Drug Development*, Tờ báo của trường đại học Cambridge, Cambridge, 2005; Schepers, *RNA Interference in Practice*, Wiley-VCH, 2005; Engelke, *RNA Interference (RNAi): The Nuts & Bolts of siRNA Technology*, Tờ báo ADN, 2003; Gott, *RNA Interference, Editing, and Modification: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Human Press, Totowa, NJ, 2004; Sohail, *Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application*, CRC, 2004.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả bằng cách viện dẫn tới các ví dụ dưới đây, được đưa ra bằng cách minh họa và không nhằm hạn chế phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ. Các kỹ thuật tiêu chuẩn là đã biết trong lĩnh vực này hoặc các kỹ thuật được mô tả cụ thể dưới đây được sử dụng.

Ví dụ 1

Nguyên liệu và phương pháp để phát triển các chủng Enterovirut 71 (EV71) nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh của người

Quy trình làm được làm thích nghi với điều kiện lạnh, tế bào, virus: Các tế bào Vero (ATCC CCL-81) được duy trì bằng lần cấy truyền thông thường trong môi trường Eagle cải biến Dulbecco (DMEM) có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bê (FCS) được sử dụng để nuôi cấy, đã được làm nhược độc, điều chỉnh và đánh giá virus có kiểu hình nhạy nhiệt. Ba chủng EV71 phân lập có kiểu gen C1, B3 và B4 đã phân lập trong các tế bào Vero từ các mẫu từ chất tiết theo đường miệng, phân và thân não tương ứng của các bệnh nhân bị bệnh tay chân miệng (HFMD) được tinh chế theo màng ngay theo kỹ thuật đã được mô tả trước đó (Dougherty, 1964). Sau khi tinh chế theo màng, dung dịch gốc chứa virus được gọi là các chủng bố mẹ kiểu hoang tương ứng được điều chế theo hai lần cấy truyền trong các tế bào Vero ở 37°C. Tất cả các dung dịch gốc chứa virus và các chủng đã xử lý tương ứng được bảo quản trong tủ lạnh - 80°C.

Các tế bào Vero một lớp đồng nhất mới pha chế trong DMEM chứa 1% FCS được sử dụng để phù hợp với các chủng virus để sao chép ở nhiệt độ ủ giảm từ từ, bắt đầu từ nhiệt độ ủ thấp khởi đầu bằng 34°C. Dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy đã làm trong chứa virus được cho vào từng bình cầu nuôi cấy mới chứa các tế bào Vero ngay khi nó tạo ra được tác động gây bệnh tế bào (CPE) hoàn toàn. Dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy chứa virus được cho vào ở liều gây nhiễm (MOI) cao hơn bằng 20 ở mỗi thời điểm bắt đầu thay đổi từ từ nhiệt độ ủ thấp. Cần lưu ý rằng sau khi tạo ra CPE hoàn toàn trong các tế bào Vero trong vòng 3 ngày sau khi cấy virus, bình cầu nuôi cấy mới chứa tế bào Vero một lớp đồng nhất được ủ bằng virus có cùng MOI trong nhiều hơn ba lần cấy truyền trước khi giảm tiếp xuống MOI thấp hơn nằm trong khoảng từ 5 đến 10. Cần lưu ý rằng ngay khi tạo ra được CPE hoàn toàn trong vòng 3 ngày sau khi cấy virus với MOI thấp hơn nằm trong khoảng từ 5 đến 10, sau đó quy trình làm đã được làm nhược độc được chuyển sang nhiệt độ ủ giảm xuống từ từ tiếp theo sau khi xử lý trong ít nhất hơn ba lần. Nhiệt độ ủ giảm dần từ từ để phát triển các chủng enterovirus 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh trong ví dụ này là 34°C, 32°C, 30°C, 29°C và 28°C.

Điều chỉnh nồng độ virus: Nồng độ virus được xác định bằng cách thử nghiệm vi điều chỉnh ở các tế bào Vero theo phương pháp được mô tả trong Polio Laboratory Manual 2004 của Tổ chức Y tế thế giới kèm theo việc điều chỉnh không đáng kể và nồng độ virus được tính toán bằng 50% liều nhiễm tế bào nuôi cấy (CCID₅₀) trên một millilit theo phương pháp của Reed và Muench (1938). Tóm lại, sau khi xử lý bằng thể tích cloform tương đương để phân tán các hạt virus kết tụ, dịch nổi trên bề mặt virus trong đã pha loãng theo dãy 10 lần được dùng trong DMEM chứa 1% FCS. Tế bào Vero một lớp (10⁴ tế bào trên một lỗ) trong đĩa nuôi cấy mô đáy bằng 96 lỗ được chủng ngừa bằng 100 µl mỗi dung dịch gốc đã pha loãng theo dãy chứa virus và được ủ trong điều kiện môi trường chứa 5% CO₂ ở mỗi nhiệt độ ủ tương ứng trong 5 ngày trước khi quan sát sự có mặt của CPE.

Thử nghiệm về độ nhạy nhiệt: Hai phương pháp được sử dụng để đánh giá đặc tính phát triển của các chủng virus trong các tế bào Vero ở nhiệt độ ủ bằng 28°C, 37°C và 39,5°C. Phương pháp thứ nhất đánh giá được số ngày mà chủng virus tạo ra được CPE hoàn toàn ở các tế bào đã nhiễm (sao chép động học) và phương pháp thứ hai đánh giá được nồng độ của chủng virus trong các tế bào được ủ ở mỗi nhiệt độ thử nghiệm cụ thể. Tóm lại, trong phương pháp thứ nhất, môi trường phát triển trong ba bình cầu nuôi cấy mô T-25 chứa các tế bào Vero một lớp đồng nhất có độ tuổi như nhau được thay thế bằng môi trường duy trì

(DMEM có 1% FCS). Sau đó, môi trường trong mỗi bình cầu được tạo cân bằng tới nhiệt độ cụ thể cần thử nghiệm bằng cách đặt vào các thiết bị ủ tương ứng trong 1 giờ và sau đó được ủ với chủng virus với liều bằng 10 liều gây nhiễm (MOI). Nếu không tạo ra CPE vào giai đoạn cuối của 10 ngày nuôi cấy, dịch nổi trên bề mặt được cho vào bình cầu chứa tế bào Vero một lớp mới pha chế và được ủ tương tự trong 10 ngày tiếp. Không xảy ra quá trình sao chép virus nếu không tạo ra CPE sau khi cấy truyền lần thứ hai. Trong phương pháp thứ hai, huyền phù chứa tế bào Vero với mật độ 10^4 tế bào trên 100 μ l được tạo mầm kết tinh vào mỗi lỗ của ba đĩa môi trường nuôi cấy 96 lỗ và được ủ ở 37°C trong môi trường chứa 5% CO_2 . Sau khi 10 giờ ủ, mỗi đĩa nuôi cấy tế bào sau đó được tạo cân bằng tới nhiệt độ cụ thể cần thử nghiệm bằng cách đặt các thiết bị ủ tương ứng trong 1 giờ. Sau đó, các tế bào trong mỗi lỗ được ủ với 100 μ l dung dịch đã pha loãng 10 lần chứa chủng virus trước khi được chuyển đến các thiết bị ủ có nhiệt độ tương ứng và được ủ trong 5 ngày trước khi sự quan sát sự có mặt của CPE.

Thử nghiệm về độ ổn định di truyền và độ nhạy nhiệt: Để đánh giá độ ổn định di truyền của các chủng virus đã nuôi cấy ở môi trường nuôi cấy và loại tế bào cụ thể, các chủng virus được cho xử lý tiếp hai mươi lần trong môi trường nuôi cấy tế bào với liều chủng ngừa virus bằng 5 MOI và được ủ ở nhiệt độ ủ bằng 28°C . Ở giai đoạn cuối của hai mươi lần cấy truyền, các chủng virus được đánh giá về các đặc tính kiểu hình nhạy nhiệt của chúng bằng cách nuôi cấy ở nhiệt độ ủ bằng 28°C , 37°C và $39,5^{\circ}\text{C}$ như được mô tả trên đây. Sau đó, trình tự nucleotit đầy đủ của các bộ gen tương ứng của chúng được sắp trình tự và được phân tích đối với các bộ gen đầy đủ của virus bố mẹ kiểu hoang tương ứng của chúng.

Việc đảo ngược thử nghiệm về độ nhạy nhiệt được thực hiện trên chủng virus nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh ổn định. Chúng đã chọn được xử lý 5 lần trong các tế bào Vero một lớp được ủ ở nhiệt độ 37°C trong môi trường chứa 5% CO_2 . Ở mỗi lần cấy truyền, liều chủng ngừa virus bằng 10 MOI được sử dụng. Chủng virus ở mỗi lần cấy truyền thu được được đánh giá về đặc tính phát triển của nó trong các tế bào Vero ở nhiệt độ ủ bằng 28°C , 37°C và $39,5^{\circ}\text{C}$ bằng phương pháp tương tự như được mô tả trên đây đối với thử nghiệm tính nhạy nhiệt. Các bộ gen đầy đủ của các chủng virus ở mỗi lần cấy truyền lần lượt ở nhiệt độ ủ bằng 37°C được tạo trình tự và phân tích.

Tách ARN, RT-PCR và tạo trình tự: ARN từ bộ gen của virus được tách ra từ dịch lỏng nuôi cấy chứa các tế bào đã nhiễm ở CPE hoàn toàn bằng cách sử dụng kit tách ARN của virus Viral RNA Extraction Kit có sẵn trên thị trường (Qiagen, Đức). Quá trình tổng hợp

sợi thứ nhất được thực hiện bằng các đoạn mồi đặc hiệu EV71 bằng cách sử dụng Superscript II RNA polymerase (Invitrogen, USA), và PCR tiếp theo có 18 cặp đoạn mồi thoái biến được tiến hành bằng cách sử dụng hỗn hợp GoTaq Green PCR (Promega, USA). Các đoạn đã tạo ra được tạo trình tự bằng cách sử dụng kit tạo trình tự BigDye Terminator (ứng dụng các hệ thống sinh học, Mỹ). 5'-RACE được thực hiện để xác định trình tự virus 5'-UTR bằng cách nối gen nối đã phong bế 5'-cordycepin DT88 (5'-GAA GAG AAG GTG GAA ATG GCG TTT TTG G-cordycepin-3'; SEQ ID NO:1) với đầu 5' của ADN vòng của EV71 bằng cách sử dụng T4 ADN Ligaza tiêu chuẩn (Fermentas, USA), và PCR tiêu chuẩn được thực hiện sau đó bằng cách sử dụng đoạn mồi hỗ trợ DT88 (5'-CCA AAA CGC CAT TTC CAC CTT CTC TTC 3'; SEQ ID NO:2) và đoạn mồi đặc hiệu EV71 (5'-ATT CAG GGG CCG GAG GAC TAC-3'; SEQ ID NO:3). 3'-RACE cũng được tiến hành để xác định trình tự virus 3'-UTR bằng cách sử dụng đoạn mồi oligo-dT (Li và các đồng tác giả, 2005).

Tạo dòng phân tử và tinh chế plasmit: Các đoạn có trình tự không rõ ràng được tạo dòng vào plasmit pZero-2 (Invitrogen, USA) và biến nạp vào các tế bào TOP10 của *E. coli* (Invitrogen, USA). Các plasmit chứa các đoạn EV71 đã tạo dòng được chiết từ ít nhất 10 khuẩn lạc từ mỗi thể biến nạp bằng cách sử dụng kit Plasmid Miniprep đang có trên thị trường (Qiagen, Đức) và trình tự của đoạn đã tách dòng sau đó được xác định.

Các trình tự của đoạn thu được được hợp nhất bằng bộ phần mềm mở về sinh học phân tử của châu Âu (the European Molecular Biology Open Software Suite) (EMBOSS; <http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::merger>) (Rice và các đồng tác giả 2000). Các trình tự đã hợp nhất được sắp hàng với trình tự đối chiếu của chủng EV71 3799-SIN-98 (Số lưu giữ ngân hàng GenBank DQ341354.1) nhờ sử dụng chương trình BioEdit Sequence Alignment Editor phiên bản 7.0.9.0 (Hall, 1997).

Nghiên cứu trên khỉ: Nghiên cứu trên khỉ về độ an toàn và tính sinh miễn dịch của chủng EV71 (EV71:TLLβP20) nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh đã chọn được ký kết với nhà nghiên cứu dựa trên Các điều khoản về động vật của DUKE-NUS, Sing-ga-po. Bảy con khỉ cynomolgus (*Macaca fascicularis*) không mang *Mycobacterium tuberculosis* và virus gây suy giảm miễn dịch ở khỉ: ba con cái (2202F, 2207F, 2891F) và bốn con đực (0791M, 2247M, 2889M, 2890M) có thể trọng trung bình bằng 3,23 Kg (nằm trong khoảng từ 2,44 đến 4,11, SD = 0,7) được sử dụng để nghiên cứu về độ an toàn và tính sinh miễn dịch của EV71: TLLβP20 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh ổn định. Tất cả bảy con khỉ này được sàng lọc trước để không có sự gắn kết (phát huỳnh quang

miễn dịch gián tiếp) và các kháng thể trung hòa kháng EV71. Nghiên cứu và tất cả các quy trình tiến hành trên động vật được phê chuẩn bởi Ủy ban an toàn sinh học và xử lý động vật (the Committee for Biosafety and Animal Handling) và Ủy ban đạo đức DUKE-NUS (the Ethical Committee of DUKE-NUS), Sing-ga-po. Việc quan sát và chủng ngừa virus, chăm sóc động vật và giải phẫu được tiến hành theo hướng dẫn của các ủy ban này.

Trong điều kiện gây mê vào ban ngày bằng ketamine, 1mL dịch cấy virus được chủng ngừa theo đường trong tĩnh mạch ven tĩnh mạch nổi bên phải. Ba con khỉ (2889M, 0791M và 2891F) được cho dùng liều tĩnh mạch bằng EV71:TLL β P20 ở 10^7 CCID₅₀ cho mỗi con khỉ, ba con khỉ khác (2890M, 2202F và 2247M) mỗi con được cho dùng 10^8 CCID₅₀ và con khỉ thứ bảy là con khỉ đối chứng âm tính. Các con khỉ được quan sát hai lần hàng ngày về tình trạng ốm yếu trên lâm sàng, đặc biệt là biểu hiện trên thần kinh và nhiệt độ cơ thể của chúng được ghi lại bằng thiết bị cảm biến nhiệt độ đã cấy trong cơ thể. Phân của mỗi con khỉ được gom hàng ngày và bảo quản ở tủ lạnh -80°C để phân lập virus vào ngày hôm sau. Hai con khỉ, mỗi con đã dùng liều chủng ngừa virus khác nhau, được đem giết trong tình trạng hôn mê sâu sau 4 ngày chủng ngừa (PI). Ở thời điểm mổ xác, các phần khác nhau của hệ thần kinh trung ương (CNS), các mô không thuộc hệ thần kinh và máu được thu gom để phân tích mô bệnh học và virus. Vào ngày 8 PI, bộ hai con khỉ tương tự khác được giết và các loại mô và máu tương tự được thu gom để nghiên cứu mô bệnh học và virus ở thời điểm mổ xác. Hai con khỉ còn lại được cho dùng liều EV71:TLL β P20 lớn tương đương tương ứng vào ngày thứ 14 PI sau khi lấy mẫu máu để đánh giá các kháng thể kháng EV71. Chúng được cho ngủ 16 ngày sau khi nhận liều lớn và các mô CNS được lấy để nghiên cứu mô bệnh học ở thời điểm mổ xác.

Nghiên cứu mô và hóa mô miễn dịch: Các mẫu mô CNS (não, tiểu não, hạch nền, thân não và dây cột sống) và các mô không thuộc hệ thần kinh (hạch bạch huyết, lá lách, gan, thận, phổi và tim) được cố định trong 10% formalin trong nước muối đệm phosphat (PBS) và được nhúng trong parafin sau khi cố định. Dây cột sống được cắt ngang lần lượt thành 10 phần ở cổ, 8 phần ở vùng ngực và 10 phần ở vùng thắt lưng. Các phần parafin, có độ dày 6 μ m, được nhuộm bằng haematoxylin và eosin (H&E) và bằng màu xanh da trời Luxol-fast/màu tím cresyl (phương pháp Kluver-Barrér) sau khi loại bỏ parafin và tái hydrat hoá.

Phát hiện kháng nguyên và phân lập virus từ khỉ: Mẫu máu được thu gom vào ống trơn và được heparin hóa. Các tế bào đơn nhân của máu ngoại vi (PBMC) được lấy từ máu

đã heparin hóa bằng cách sử dụng Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, Sweden). Sau khi rửa hai lần bằng PBS vô trùng, các phần huyền phù PBMC được cấy lên các lỗ của miếng đã phủ Teflon để phát hiện kháng nguyên EV71 bằng thử nghiệm miễn dịch phát huỳnh quang không trực tiếp bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng phát hiện thương mại (số phân loại 3360, Light Diagnostics, USA). Quá trình phân lập virus được thực hiện bằng cách chủng ngừa huyền phù PBMC vào lỗ của đĩa nuôi cấy tế bào 24 lỗ chứa các tế bào Vero một lớp. Quá trình phân lập virus trên mỗi mẫu huyết thanh được thực hiện bằng cách chủng ngừa 50 µl và 100 µl huyết thanh vào các lỗ riêng rẽ của đĩa nuôi cấy tế bào 24 lỗ chứa các tế bào Vero một lớp. Các mô của khi được rửa nhẹ bằng hai dung dịch PBS vô trùng và được làm đồng nhất bằng cách nghiền nhờ sử dụng dụng cụ đã chết và dụng cụ rắn nằm trong ngăn an toàn sinh học nhóm II. Mô đồng nhất (10% khối lượng/thể tích) được điều chế trong DMEM được làm sạch bằng cách ly tâm ở 1000 g trong 10 phút. Dịch nổi trên bề mặt được lọc đã làm sạch qua màng lọc bơm tiêm 0,22 micron và quá trình phân lập virus được thực hiện bằng cách chủng ngừa 100 µl và 200 µl phần lọc này. 10% huyền phù chứa phân được tạo ra trong PBS và làm sạch bằng cách ly tâm ở 1000 g trong 10 phút. Sau khi lọc qua màng lọc bơm tiêm 0,22 micron, quá trình phân lập virus được thực hiện bằng cách chủng ngừa 100 µl và 200 µl phần dịch lọc chứa phân này. Toàn bộ quá trình phân lập virus trên mẫu của khi được thực hiện hai lần với một bộ nuôi cấy tế bào đã chủng ngừa được ủ ở 28°C và bộ còn lại ở 37°C.

Phát hiện phân tử và tạo trình tự bộ gen đầy đủ: Quá trình tách ARN của virus thương mại và kit tinh chế (Qiagen, Đức) được sử dụng để tách ARN từ bộ gen của virus ra khỏi huyết thanh, PBMC và mô đồng nhất đã làm sạch. kit RT-PCR một bước thương mại (Qiagen, Đức) và cặp đoạn mồi oligonucleotit liên ứng (Có nghĩa: 5'-CACCTTGTGATACCAT GGATCAG-3' (SEQ ID NO:4); Đối nghĩa: 5'-GTGAATTAAGAACRCAYCGTGTYT-3' (SEQ ID NO:5)) được khuếch đại ở một phần ba đầu gần của gen VP1 của tất cả các kiểu di truyền EV71 đã sử dụng để khuếch đại phân tử và phát hiện ARN của virus đặc hiệu EV71 sau khi tách ra khỏi các mô. Mười tám cặp đoạn mồi đặc hiệu trình tự dựa trên trình tự bộ gen đầy đủ của EV71:TLLβ được sử dụng để khuếch đại và tạo trình tự bộ gen đầy đủ của EV71 có mặt trong huyết thanh của hai con khi thu được vào ngày thứ 4 và ngày thứ 8 PI. Đoạn PCR đã khuếch đại bất kỳ không tạo ra trình tự chuẩn bằng cách tạo trình tự trực tiếp được tạo dòng vào pZero-2 (Invitrogen, USA)

và biến nạp vào TOP10 *E. coli*. Ít nhất mười khuẩn lạc được chọn từ mỗi thể biến nạp và quá trình tạo trình tự được thực hiện trên các plasmit đã tinh chế mang đoạn xen.

Thử nghiệm gắn kết huyết thanh và các kháng thể trung hòa: Các tế bào Vero đã nhiễm EV71 có kiểu di truyền B3 được thu gom ở CPE gần như hoàn toàn và rửa năm lần bằng PBS vô trùng. Sau khi lần rửa cuối cùng, huyền phù chứa các tế bào đã nhiễm được trộn đồng thời rửa huyền phù chưa nhiễm tế bào Vero với tỷ lệ xấp xỉ 4 tế bào đã nhiễm trên một tế bào chưa nhiễm. Mười microlít huyền phù chứa tế bào đã trộn chứa 250 tế bào được đặt cẩn thận trên mỗi lỗ của tấm đã phủ Teflon 12 lỗ và làm khô trên đĩa ấm. Tấm đã làm khô được cố định trong 10 phút trong axeton lạnh và được sử dụng làm kháng nguyên nội để thử nghiệm về khả năng gắn kết kháng thể EV71 từ dung dịch pha loãng ban đầu với tỷ lệ 1:10 đối với IgM và tỷ lệ 1:20 đối với IgG bằng thử nghiệm miễn dịch phát huỳnh quang không trực tiếp. Trong thử nghiệm đối với nồng độ kháng EV71 IgM, huyết thanh của khí được xử lý với nồng độ thích hợp của protein A (Invitrogen, USA) để loại bỏ IgG trước khi tiến hành pha loãng 2 lần bằng PBS vô trùng.

Nồng độ của kháng thể trung hòa của khí được xác định bằng thử nghiệm vi trung hòa bằng cách sử dụng các tế bào Vero theo phương pháp được mô tả trong Polio Laboratory Manual 2004 của Tổ chức Y tế thế giới kèm theo sự điều chỉnh không đáng kể. Nồng độ của mỗi kiểu di truyền của EV71 sử dụng để trung hòa bằng 100 CCID₅₀ trên 100 µl. Thử nghiệm trung hòa virus được thực hiện bằng cách sử dụng đĩa nuôi cấy đáy bằng 96 lỗ. Dung dịch pha loãng 2 lần của mỗi mẫu huyết thanh được điều chế hai lần với thể tích 100 µl DMEM (1% FCS) bắt đầu bằng tỷ lệ pha loãng 1:10. Thể tích tương đương (100 µl) của dung dịch thao tác chứa virus trong DMEM (1% FCS) chứa 100 CCID₅₀ EV71 được bổ sung vào mỗi lỗ chứa huyết thanh pha loãng và được ủ trong hai giờ ở 37°C. Sau khi ủ, 100 µl huyền phù chứa tế bào Vero trong DMEM (10% FCS) chứa 250 tế bào được bổ sung vào mỗi lỗ. Đĩa nuôi cấy 96 lỗ được đặt cẩn thận và được ủ ở 37°C trong môi trường chứa 5% CO₂. Các đĩa này được đọc hàng ngày cho tới 8 ngày về sự có mặt của CPE ảnh hưởng tới các tế bào Vero ở mỗi lỗ. Nồng độ của các kháng thể trung hòa của mỗi mẫu huyết thanh được xác định bằng lỗ có hệ số pha loãng cao nhất không tạo ra được CPE.

Ví dụ 2

Kết quả về đặc tính kiểu hình và kiểu di truyền của các chủng Enterovirus 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh (EV71:TLL α , EV71:TLL α P20, EV71:TLL β , EV71:TLL β P20 và EV71:TLL β P40)

Ba virus EV71 bố mẹ ban đầu được sử dụng để lấy các chủng được làm thích nghi với điều kiện lạnh tạo ra CPE hoàn toàn ở các tế bào Vero trong vòng 3 ngày sau khi cấy virus với liều chủng ngừa virus bằng 10 MOI và nhiệt độ ủ bằng 37,5°C. Ở cùng liều chủng ngừa virus, virus EV71 bố mẹ ban đầu tạo ra CPE hoàn toàn trong các tế bào Vero trong vòng 5 ngày ở nhiệt độ ủ bằng 39,5°C. Tuy nhiên, toàn bộ ba virus EV71 bố mẹ ban đầu có nguồn gốc từ hai lần cấy truyền đầu tiên trong các tế bào Vero được nuôi cấy ở 37,5°C không tạo ra CPE trong các tế bào Vero ở liều chủng ngừa virus bằng 10 MOI và nhiệt độ ủ bằng 28°C. Lưu ý rằng không tạo ra CPE sau khi xử lý làm mù ở giai đoạn cuối trong vòng 10 ngày nuôi cấy ở 28°C. Không xảy ra quá trình sao chép virus ở các tế bào Vero đã chủng ngừa khi nhuộm các tế bào đã tạo hỗn dịch âm tính trong dịch nổi nuôi cấy ở giai đoạn cuối của 10 ngày nuôi cấy bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng phát hiện kháng EV71 thương mại bằng thử nghiệm miễn dịch phát huỳnh quang không trực tiếp.

Sau hơn 90 lần cấy truyền ở nhiệt độ ủ giảm từ từ, toàn bộ ba chủng EV71 đã xử lý có thể tạo ra CPE hoàn toàn trong các tế bào Vero trong vòng 3 ngày chủng ngừa ở liều chủng ngừa virus ≤ 5 MOI và nhiệt độ ủ 28°C. Các chủng virus được xử lý tiếp ở nhiệt độ ủ 28°C cho đến khi lần xử lý thứ 100. Ở lần cấy truyền thứ 100, các chủng virus có nguồn gốc từ EV71 ban đầu được tách ra từ dịch lỏng trong khoang miệng, mô thần kinh và mẫu phân của bệnh nhân được ký hiệu lần lượt là EV71:TLL, EV71:TLL α và EV71:TLL β . Ở thử nghiệm nhạy nhiệt, toàn bộ ba chủng được làm thích nghi với điều kiện lạnh gây ra CPE hoàn toàn trong các tế bào Vero trong vòng 2 ngày ở nhiệt độ ủ 28°C bằng cách sử dụng liều chủng ngừa virus bằng 10 MOI nhưng 4 ngày đạt được CPE hoàn toàn ở nhiệt độ ủ 37°C. Ở nhiệt độ ủ 39,5°C, không tạo ra CPE đối với toàn bộ ba chủng sau khi 10 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên, EV71:TLL tạo ra CPE 2+ ở ngày nuôi cấy thứ 10 sau khi xử lý làm mù vào bình cầu chứa các tế bào Vero mới pha chế được ủ ở 39,5°C. Không tạo ra CPE đối với EV71:TLL α và EV71:TLL β ngay cả sau hai lần xử lý làm mù trong bình cầu chứa các tế bào Vero mới pha chế được ủ ở 39,5°C. Không có các tế bào tạo huyền phù thu hoạch từ dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy, bao gồm các dịch nổi lấy từ các lần cấy truyền làm mù, được ủ với

EV71:TLL α hoặc EV71:TLL β ở giai đoạn cuối của 10 ngày nuôi cấy để thu được kháng thể đơn dòng phát hiện EV71 nhuộm miễn dịch huỳnh quang dương tính. Khoảng 1% các tế bào đã tạo huyền phù được thu hoạch từ dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy được ủ bằng EV71:TLL để nhuộm dương tính mà không tạo ra CPE sau 10 ngày nuôi cấy.

Nhiệt độ ủ bằng 28°C và 37°C được sử dụng để thử nghiệm nồng độ sao chép virut của ba chủng được làm thích nghi với điều kiện lạnh và thử nghiệm được lặp lại ít nhất 4 lần. Nồng độ của EV71:TLL bằng 1×10^8 CCID₅₀/ml và 2 đến 3×10^7 CCID₅₀/ml khi môi trường nuôi cấy được điều chỉnh được ủ lần lượt ở 28°C và 37°C. EV71:TLL α tạo ra nồng độ virut bằng 1×10^8 CCID₅₀/ml ở nhiệt độ ủ bằng 28°C và nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến $2 \times 10^{5,5-6}$ CCID₅₀/ml ở 37°C. EV71:TLL β tạo ra nồng độ nằm trong khoảng từ 2 đến 5×10^8 CCID₅₀/ml ở nhiệt độ ủ bằng 28°C và nồng độ bằng 1×10^7 CCID₅₀/ml ở 37°C.

Độ ổn định về khả năng được làm thích nghi với điều kiện lạnh của EV71:TLL α và EV71:TLL β được đánh giá bằng cách xử lý cả hai chủng virut trong 20 lần cấy truyền khác trong các tế bào Vero ở nhiệt độ ủ bằng 28°C và liều chủng ngừa virut bằng 10 MOI sau 20 lần cấy truyền bổ sung, EV71:TLL α tạo ra CPE hoàn toàn trong các tế bào được ủ ở 28°C trong vòng 2 ngày PI nhưng không gây ra CPE trong các tế bào được ủ ở 37°C ngay cả sau 2 lần cấy truyền làm mù. Cần lưu ý rằng khả năng để đạt được nồng độ virut bằng 1×10^8 CCID₅₀/ml ở nhiệt độ ủ bằng 28°C. EV71:TLL β duy trì được kiểu hình được làm thích nghi với điều kiện lạnh tương tự về mặt động học phát triển và nồng độ virut ở cả hai nhiệt độ ủ bằng 28°C và 37°C sau 20 lần cấy truyền bổ sung. Độ ổn định về khả năng được làm thích nghi với điều kiện lạnh của EV71:TLL β được đánh giá tiếp bằng cách xử lý nhiều hơn 20 lần cấy truyền khác (40 lần cấy truyền bổ sung từ lần cấy truyền thứ 100) trong các điều kiện nuôi cấy tương tự và nhận thấy rằng vẫn duy trì kiểu hình nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh tương tự.

Đánh giá ngược từ kiểu hình nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh được thực hiện trên EV71:TLL β P20 lần lượt bằng 6 lần cấy truyền virut trong các tế bào Vero được ủ ở 37°C ở mỗi CPE hoàn toàn. Đặc tính phát triển của virut có nguồn gốc từ mỗi môi trường nuôi cấy tương ứng được ủ ở 37°C về mặt phát triển động học và nồng độ virut ở nhiệt độ ủ bằng 28°C, 37°C và 39,5°C được thể hiện trên Bảng 1. Virut không ổn định để tạo ra các hạt nhiễm bệnh nhìn thấy được (không có các tế bào nhuộm miễn dịch huỳnh quang dương tính) trong các tế bào Vero ở nhiệt độ ủ 39,5°C sau 3 quy trình lần lượt trong các tế

bào được ủ ở 37°C và không có khả năng tạo ra CPE hoàn toàn ở môi trường nuôi cấy tế bào ở nhiệt độ ủ bằng 39,5°C ở lần cấy truyền lặp lại thứ 6.

Bảng 1

Đánh giá ngược từ kiểu hình nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh của EV71:TLLβP20 lần lượt sau 6 lần cấy truyền các tế bào Vero được ủ ở 37°C.

Dịch cấy virus	Số ngày để đạt được tác động gây bệnh tế bào (CPE) hoàn toàn			Nồng độ virus trong CCID ₅₀ /ml	
	28°C	37°C	39,5°C	28°C	37°C
EV71:TLLβP20	2	4	Ngày thứ 10: Không tạo ra CPE	2,1 X10 ⁸	1 X10 ⁷
TLLβP20 (37°C-P1)	4	4	Ngày thứ 10: Không tạo ra CPE	1,7 X10 ⁸	3,2 X10 ⁵
TLLβ P20(37°C-P2)	3	4	Một số tế bào chết ở ngày thứ 8 (IFA: -ve)	4,6 X10 ⁷	2,1 X10 ⁷
TLLβP20 (37°C-P3)	3	2	Một số tế bào chết ở ngày thứ 5 (IFA: -ve)	1,7 X10 ⁸	3,1 X10 ⁷
TLLβP20 (37°C-P4)	3	2	Ngày thứ 10: 1+ CPE (IFA: +ve)	3,1 X10 ⁷	4,6 X10 ⁷
TLLβ P20(37°C-P5)	3	2	Ngày thứ 10: 2+ CPE (IFA: +ve)	1 X10 ⁷	3,1 X10 ⁷
TLLβP20 (37°C-P6)	3	2	Ngày thứ 10: 2+ CPE (IFA: +ve)		

Đặc tính phát triển và nồng độ của virus ở mỗi lần cấy truyền được nuôi cấy hoặc được chuẩn độ trong các tế bào Vero ở nhiệt độ ủ bằng 28°C, 37 C và 39,5°C.

P1: Lần cấy truyền 1

IFA: Thử nghiệm miễn dịch phát huỳnh quang không trực tiếp

Các bộ gen đầy đủ của EV71:TLLα và EV71:TLLβ, các chủng tương ứng của chúng sau 20 lần cấy truyền bổ sung (EV71:TLLαP20 và EV71:TLLβP20) và các kiểu hoang bố mẹ ban đầu được tạo trình tự và phân tích. Trình tự nucleotit đối với EV71:TLLαP20 được nêu trong SEQ ID NO:6. Trình tự nucleotit đối với EV71:TLLβP20 được nêu trong SEQ ID NO:7. Sự thay đổi về số ở mỗi đoạn gen của chúng nằm giữa

EV71:TLL α , EV71:TLL α P20 và kiểu hoang bố mẹ ban đầu được thể hiện trên Bảng 2. Sự thay đổi về số nucleotit giữa kiểu hoang bố mẹ ban đầu, EV71:TLL β , EV71:TLL β P20 và EV71:TLL β P40 (40 lần cấy truyền bổ sung) được thể hiện trên Bảng 3. Các bộ gen đầy đủ của các chủng virus có nguồn gốc từ nghiên cứu đảo nhạy nhiệt bằng 6 lần cấy truyền lần lượt ở nhiệt độ ủ 37°C cũng được tạo trình tự và sự thay đổi về số nucleotit đối với EV71:TLL β P20 được thể hiện trên Bảng 4.

Bảng 2

Số nucleotit (NT) và các đột biến axit amin (AA) tương ứng xảy ra trong mỗi đoạn gen của EV71:TLL α và EV71:TLL α P20 so với bộ gen đầy đủ của virus bố mẹ kiểu hoang ban đầu của chúng.

Vị trí gen của virus/Protein		EV71:TLL α		EV71:TLL α P20	
		NT	AA	NT	AA
5'-UTR	"dạng cỏ ba lá"				
(1-747)	IRES	1		2	
P1	VP4	2	1	3	1
(748-3333)	VP2	2	2	2	2
	VP3	2	2	3	3
	VP1	2	2	4	3
P2	2A	2	2	4	3
(3334-5067)	2B	1		1	
	2C	2	1	2	1
P3	3A			1	1
(5068-7326)	3B				
	3C	1	1	1	1
	3D	3	1	3	1
3'-UTR					
(7327-7412)					

Tổng	18	12	26	16
------	----	----	----	----

Bảng 3

Số nucleotit (NT) và các đột biến axit amin (AA) tương ứng xảy ra trong mỗi đoạn gen của EV71:TLL β , EV71:TLL β P20 và EV71:TLL β P40 so với bộ gen của virus bố mẹ kiểu hoang ban đầu của chúng.

Vị trí gen của virus/Protein		EV71:TLL β		EV71:TLL β P20		EV71:TLL β P40	
		NT	AA	NT	AA	NT	AA
5'-UTR	“dạng cỏ ba lá”	2		1		2	
(1-746)	IRES	2		2		3	
P1	VP4					1	
(747-3332)	VP2	4		4		4	
	VP3	2	2	2	2	2	2
	VP1	9	8	8	8	8	8
P2	2A	4	2	4	2	4	2
(3333-5066)	2B	1	1	1	1	1	1
	2C	2		3		3	
P3	3A	1	1	1	1	1	1
(5067-7325)	3B						
	3C	2	2	2	2	2	2
	3D	2	2	2	2	2	2
3'-UTR		1		1		1	
(7326-7411)							
Tổng		32	18	31	18	34	18

Bảng 4

Số nucleotit (NT) và đột biến axit amin (AA) tương ứng xảy ra trong mỗi đoạn gen của các chủng virus có nguồn gốc từ nghiên cứu đảo nhay nhiệt so với bộ gen của EV71:TLLβP20.

Vị trí gen của virus/Protein		TLLβ (37°C-P1)		TLLβ (37°C-P2)		TLLβ (37°C-P3)		TLLβ (37°C-P4)		TLLβ (37°C-P5)		TLLβ (37°C-P6)	
		NT	AA	NT	AA	NT	AA	NT	AA	NT	AA	NT	AA
5'-UTR (1-746)	“dạng cỏ ba lá” IRES			1(R)		1(R)		1(R)					
P1 (747-3332)	VP4												
	VP2												
	VP3												
	VP1							1		1		2	
P2 (3333-5066)	2A											1(R)	
	2B											1(R)	
	2C												
P3 (5067-7325)	3A												
	3B												
	3C												
	3D							1(R)		1(R)		3(1R)	
3'-UTR (7326-7411)													
Tổng				1(R)		2(R)		1(R)		5(2R)		3(1R)	
												6(2R)	
												4(2R)	

Ví dụ 3

Kết quả nghiên cứu trên khí đối với chủng Enterovirus 71 (EV71:TLLβP20) nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh của người

Phát hiện lâm sàng: Việc quan sát tổng thể về tình trạng lâm sàng và đo nhiệt độ cơ thể của khí nghiên cứu được thực hiện hai lần hằng ngày, buổi sáng và buổi tối. Trong bản mô tả này, toàn bộ khí được hoạt động và cho ăn bình thường. Không có con khí nào bị khiếm khuyết thần kinh cục bộ không dễ phát hiện bất kỳ, như yếu chi, run hoặc vận động không bình thường. Không có con khí nào ngoại trừ một con khí (2247M) đã cho dùng liều tĩnh mạch 1×10^8 CCID₅₀/ml bị sốt tăng lên so với mức thấp (39,3°C) vào ngày thứ 3 sau khi cấy virus. Không có con khí nào bị giảm cân ở thời điểm chúng bị đem giết trong tình trạng hôn mê sâu.

Mổ xác khám nghiệm và phát hiện mô bệnh học: Không có tổn thương sau khi chết ở tất cả các khí ở thời điểm mổ xác. Không có phát hiện về mô bệnh học không bình thường ở tất cả các mô của khí được thu gom để kiểm tra mô bệnh học.

Nghiên cứu virus: Quá trình phân lập virus được thực hiện ở huyết tương của khí, PBMC, mẫu phân và tất cả các mô đã được khám nghiệm bằng cách sử dụng các tế bào Vero ở nhiệt độ ủ bằng 28°C và 37°C. Virus được phân lập từ mẫu bất kỳ trong số các mẫu của khí mặc dù xử lý làm mù sau khi 10 ngày nuôi cấy. Một lần cấy truyền làm mù bổ sung trong các tế bào Vero được thực hiện trên huyết tương, mẫu PBMC và mô đồng nhất được thử nghiệm dương tính đối với EV71 bởi RT-PCR. Mặc dù không phân lập được virus, nhưng kháng nguyên của EV71 được phát hiện ở một vài PBMC có nguồn gốc từ máu đã heparin hóa của hai con khí, 2891F (đã nhận 1×10^7 CCID₅₀ EV71:TLLβP20) và 2890M (đã nhận 1×10^8 CCID₅₀ EV71:TLLβP20), được thu gom vào ngày 4 PI bằng thử nghiệm miễn dịch phát huỳnh quang không trực tiếp (Fig. 1a) bằng cách sử dụng các kháng thể đơn dòng thương mại. Kháng nguyên của virus không phát hiện được ở PBMC được lấy từ máu đã heparin hóa của khí được thu gom vào ngày 8 PI.

Trình tự bộ gen đặc hiệu EV71 được phát hiện ở mẫu huyết thanh của toàn bộ các con khí được thu gom vào ngày thứ 4 và ngày thứ 8 PI bằng RT-PCR. Trong số các mô không phải neuron, chỉ có trình tự bộ gen của EV71 được phát hiện ở lá lách đồng nhất của 2 con khí (2202F và 2891F) (Fig. 1b). Trình tự bộ gen của EV71 không được phát hiện ở mô bất kỳ trong số các mô neuron đồng nhất. Bộ gen của EV71:TLLβP20 có mặt trong mẫu huyết thanh của hai con khí (2889M và 2890M) được thu gom vào cả ngày thứ 4 và ngày

thứ 8 PI được tách ra và được tạo trình tự đầy đủ. Số nucleotit (NT) và đột biến axit amin (AA) tương ứng hoặc dạng đảo xảy ra trong mỗi đoạn gen của các chủng virus có mặt trong huyết thanh so với bộ gen của EV71:TLL β P20 được thể hiện trên Bảng 5.

Bảng 5

Số nucleotit (NT) và đột biến axit amin (AA) tương ứng xảy ra trong mỗi đoạn gen của EV71 có mặt trong mẫu huyết thanh của hai con khi (2889M và 2890M) được thu gom vào ngày thứ 4 và ngày thứ 8 PI so với bộ gen đầy đủ của EV71:TLL β P20.

Vị trí gen của virus/Protein		Khi (2889M)				Khi (2890M)			
		Ngày thứ 4		Ngày thứ 8		Ngày thứ 4		Ngày thứ 8	
		NT	AA	NT	AA	NT	AA	NT	AA
5'-UTR	Dạng cỏ ba lá								
(1-746)	IRES								
P1	VP4								
(747-3332)	VP2								
	VP3								
	VP1	1				5	1(R)	6	1(R)
P2	2A	3	2	3	2	3	2	3	2
(3333-5066)	2B								
	2C	2(1R)	1(R)	1		1(R)		1(R)	
P3	3A								
(5067-7325)	3B								
	3C								
	3D	1(R)	1(R)	1(R)	1(R)	1(R)	1(R)	1(R)	1(R)
3'-UTR									
(7326-7411)									

Total	7(3R)	4(2R)	5(1R)	3(1R)	10(2R)	4(2R)	11(2R)	4(2R)
-------	-------	-------	-------	-------	--------	-------	--------	-------

Đáp ứng miễn dịch thể dịch ở khi: Thử nghiệm về sự có mặt của các kháng thể gắn kết (IgM và IgG) trong huyết thanh của khi đã nhận EV71:TLL β P20 tĩnh mạch được thực hiện bằng thử nghiệm miễn dịch phát huỳnh quang không trực tiếp nhờ sử dụng các tế bào đã nhiễm Vero đã điều chế cố định làm kháng nguyên. Nồng độ của IgM và IgG kháng EV71 có mặt trong máu của hai con khi còn lại (2889M và 2890M) được thu gom vào ngày thứ 14 PI, trước khi dùng liều lớn tương đương trong tĩnh mạch, và ngày thứ 30 PI (16 ngày sau khi cấy virus liều lớn) được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6

Nồng độ của các kháng thể gắn kết (IgM và IgG) của con khi sau khi nhận EV71:TLL β P20 tĩnh mạch như được xác định bằng thử nghiệm miễn dịch phát huỳnh quang không trực tiếp bằng cách sử dụng các tế bào đã nhiễm Vero đã điều chế cố định làm kháng nguyên.

Khi	Nồng độ IgM		Nồng độ IgG	
	Ngày thứ 14 PI	Ngày thứ 30 PI	Ngày thứ 14 PI	Ngày thứ 30 PI
2889M	1:20	1:10	1:160	1:320
2890M	1:40	1:40	1:160	1:640

Nồng độ kháng thể trung hòa trong mẫu huyết thanh của hai con khi (2889M và 2890M) được thu gom vào ngày thứ 14 và ngày thứ 30 PI kháng kiểu di truyền A của EV71 (BrCr), B3, B4, B5, C1 và C5 được xác định bằng thử nghiệm vi trung hòa. Nồng độ tương ứng của các kháng thể trung hòa của huyết thanh của khi kháng mỗi kiểu di truyền trong số các kiểu di truyền của EV71 được thể hiện trên Bảng 7.

Bảng 7

Nồng độ của các kháng thể trung hòa kháng nhiều kiểu di truyền của EV71 (A, B3, B4, B5, C1 và C5) có mặt ở huyết tương của hai con khỉ sau khi nhận EV71:TLL β P20 theo đường tĩnh mạch như được xác định bằng thử nghiệm vi trung hòa.

Kiểu di truyền của EV71	Khí			
	2889M		2890M	
	Ngày thứ 14 PI	Ngày thứ 30 PI	Ngày thứ 14 PI	Ngày thứ 30 PI
A (BrCr)	1:20	1:40	1:40	1:80
B3	1:160	1:640	1:160	1:640
B4	1:160	1:640	1:160	1:320
B5	1:80	1:320	1:160	1:320-640
C1	1:40	1:160	1:40	1:160
C5	1:20	1:40	1:20	1:40

Ví dụ 4

Nguyên liệu và phương pháp để phát triển chủng Coxsackievirut A16 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh của người

Nguyên liệu và phương pháp: Các tế bào Vero (ATCC CCL-81) được duy trì bằng cách cấy truyền thông thường trong môi trường Eagle cải biến Dulbecco (DMEM) có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bê (FCS) được sử dụng cho môi trường nuôi cấy virut, đã được làm nhược độc, điều chỉnh và đánh giá tính nhạy nhiệt của coxsackievirut A16. Coxsackievirut A16 (CA16) bố mẹ kiểu hoang để làm nhược độc có nguồn gốc từ chất tiết theo đường miệng của bệnh nhân bị bệnh tay chân miệng (HFMD). Virut được tinh chế dạng mảng ngay theo kỹ thuật đã mô tả trước đó. Sau khi tinh chế mảng, dung dịch gốc chứa virut được gọi là chủng bố mẹ kiểu hoang tương ứng được điều chế theo hai lần cấy truyền trong các tế bào Vero ở 37°C. Tất cả các dung dịch gốc chứa virut và các chủng đã xử lý tương ứng được bảo quản trong tủ lạnh -80°C.

Tế bào Vero một lớp đồng nhất trong DMEM mới pha chế chứa 1% FCS được sử dụng để phù hợp với CA16 kiểu hoang ban đầu để sao chép ở nhiệt độ giảm từ từ bắt đầu từ nhiệt độ ủ thấp ban đầu bằng 34°C. Quy trình cho virut lần lượt vào mỗi bình cầu nuôi cấy mới chứa các tế bào Vero được thực hiện ở tác động gây bệnh tế bào (CPE) hoàn toàn. Virut

được xử lý ở liều gây nhiễm (MOI) cao hơn bằng 20 với sự thay đổi về nhiệt độ ủ giảm xuống từ từ và MOI được giảm xuống nằm trong khoảng từ 5 đến 10 sau nhiều hơn ít nhất ba lần cấy truyền sau khi nó tạo ra CPE hoàn toàn trong vòng 3 ngày sau khi cấy virus. Nó được chuyển tới nhiệt độ ủ giảm từ từ tiếp theo sau nhiều hơn ít nhất ba lần cấy truyền sau khi nó tạo ra CPE hoàn toàn trong vòng 3 ngày sau khi cấy virus với liều MOI nằm trong khoảng từ 5 đến 10. Dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy của mỗi lần cấy truyền lần lượt được bảo quản trong tủ lạnh -80°C để phân tích vào ngày tiếp theo.

Điều chỉnh nồng độ virus: Nồng độ virus được xác định bằng thử nghiệm vi điều chỉnh trong các tế bào Vero theo phương pháp được mô tả trong Polio Laboratory Manual 2004 của Tổ chức Y tế thế giới kèm theo sự điều chỉnh không đáng kể và nồng độ virus được tính toán bằng 50% liều nhiễm nuôi cấy tế bào (CCID₅₀) trên một millilít theo phương pháp của Reed & Munch (1938). Tóm lại, sau khi xử lý bằng thể tích tương đương của cloform để phân tán các hạt virus kết tụ, dung dịch pha loãng 10 lần của dịch nổi trên bề mặt chứa virus đã làm sạch được tiến hành trong DMEM chứa 1% FCS. Tế bào Vero một lớp (10⁴ tế bào trên một lỗ) trong đĩa nuôi cấy mô đáy bằng 96 lỗ được chủng ngừa bằng 100 µl dung dịch pha loãng của mỗi dung dịch gốc chứa virus và được ủ trong môi trường chứa 5% CO₂ ở mỗi nhiệt độ ủ tương ứng trong 5 ngày trước khi sự quan sát về sự có mặt của CPE.

Thử nghiệm nhạy nhiệt: Hai phương pháp được sử dụng để đánh giá đặc tính phát triển của chủng virus được làm thích nghi với điều kiện lạnh trong các tế bào Vero ở nhiệt độ ủ bằng 28°C, 37°C và 39,5°C. Phương pháp thứ nhất đã đánh giá số ngày cần thiết để chủng virus tạo ra được CPE hoàn toàn ở các tế bào đã nhiễm (sao chép động học) và phương pháp thứ hai đã đánh giá nồng độ của chủng virus trong các tế bào được ủ ở mỗi nhiệt độ thử nghiệm cụ thể. Tóm lại, ở phương pháp thứ nhất, môi trường phát triển của ba bình cầu nuôi cấy mô T-25 chứa các tế bào Vero một lớp đồng nhất có độ tuổi như nhau được thay thế bằng môi trường duy trì (DMEM kèm theo 1% FCS). Sau đó, môi trường trong mỗi bình cầu được để cân bằng tới nhiệt độ cụ thể cần được thử nghiệm bằng cách đặt vào các thiết bị ủ tương ứng trong 1 giờ và sau đó được ủ với chủng virus với liều 10 liều gây nhiễm (MOI). Nếu không tạo ra CPE ở giai đoạn cuối trong 10 ngày nuôi cấy, dịch nổi trên bề mặt được cho vào bình cầu chứa tế bào Vero một lớp mới pha chế và được ủ tương tự trong 10 ngày tiếp. Không xảy ra quá trình sao chép virus nếu không tạo ra CPE sau lần cấy truyền thứ hai. Trong phương pháp thứ hai, huyền phù chứa tế bào Vero chứa mật độ 10⁴ tế bào trên 100 µl được tạo mầm kết tinh vào mỗi lỗ của ba đĩa môi trường nuôi cấy 96 lỗ và được ủ ở 37°C

trong môi trường chứa 5% CO₂. Sau khi 10 giờ ủ, mỗi đĩa nuôi cấy tế bào sau đó được tạo cân bằng tới nhiệt độ cụ thể cần thử nghiệm bằng cách đặt vào các thiết bị ủ tương ứng trong 1 giờ. Sau đó, các tế bào trong mỗi lỗ được ủ với 100 µl dung dịch đã pha loãng 10 lần chứa chủng virus trước khi được chuyển đến các thiết bị ủ có nhiệt độ tương ứng và được ủ trong 5 ngày trước khi sự quan sát sự có mặt của CPE.

Ví dụ 5

Kết quả về đặc tính của virus trong các tế bào của chủng Coxsackievirus A16 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh của người

Ở lần cấy truyền thứ 100, ở nhiệt độ giảm từ từ ủ, chủng CA13 được làm thích nghi với điều kiện lạnh có khả năng tạo ra CPE hoàn toàn trong các tế bào Vero trong vòng 3 ngày chủng ngừa ở liều chủng ngừa virus ≤ 5 MOI và nhiệt độ ủ bằng 28°C nhưng cần 4 ngày để tạo ra được CPE hoàn toàn ở nhiệt độ ủ 37°C. Ở nhiệt độ ủ 39,5°C, không tạo ra CPE.

Nhiệt độ ủ 28°C và 37°C được sử dụng để thử nghiệm về nồng độ sao chép virus của chủng CA16 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh. Nồng độ của chủng CA16 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh bằng 1×10^8 CCID₅₀/ml và 1×10^7 CCID₅₀/ml khi các đĩa nuôi cấy đã điều chỉnh được ủ lần lượt ở 28°C và 37°C.

Việc sử dụng thuật ngữ “một” và các thuật ngữ tương tự trong bản mô tả này (đặc biệt là trong phần yêu cầu bảo hộ dưới đây) nên hiểu là bao hàm cả số ít và số nhiều, trừ khi có chỉ dẫn khác ở đây hoặc có nội dung đối lập rõ ràng. Các thuật ngữ “bao gồm,” “có,” “bao gồm,” và “chứa” nên hiểu là các thuật ngữ có kết thúc mở (tức là có nghĩa “bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở,”) trừ khi có chỉ dẫn khác. Việc đề cập tới khoảng trị số trong bản mô tả chỉ nhằm mục đích đưa ra cách viện dẫn riêng rẽ ngắn gọn để chỉ mỗi trị số đều nằm trong khoảng này, trừ khi có chỉ dẫn khác, và mỗi trị số riêng rẽ được đưa vào bản mô tả nêu nó được nêu riêng rẽ trong bản mô tả này. Ví dụ, nếu đề cập đến khoảng 10-15, thì tức là cũng đề cập đến 11, 12, 13, và 14. Tất cả các phương pháp nêu trong bản mô tả có thể được thực hiện theo thứ tự thích hợp bất kỳ trừ khi có chỉ dẫn khác hoặc có nội dung đối lập rõ ràng theo cách khác. Việc sử dụng ví dụ bất kỳ và toàn bộ các ví dụ, hoặc cách diễn đạt được lấy làm ví dụ (ví dụ, “như”) nêu trong bản mô tả này, chỉ nhằm mục đích minh họa chi tiết hơn sáng chế chứ không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế trừ khi có chỉ dẫn khác.

Cách diễn đạt trong bản mô tả này không nên hiểu là chỉ đưa ra yếu tố không bắt buộc như một yếu tố cần thiết để thực hiện sáng chế.

Cần phải hiểu rằng các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế có thể được đưa ra ở dạng nhiều phương án, chỉ có một vài phương án trong số chúng được bộc lộ trong bản mô tả. Các phương án theo sáng chế nêu trong bản mô tả, bao gồm phương án tốt nhất đã biết đối với các tác giả sáng chế để thực hiện sáng chế. Các cải biến của các phương án đó có thể là hiển nhiên đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này khi đọc bản mô tả. Các tác giả sáng chế mong muốn các chuyên gia trong lĩnh vực ứng dụng các cải biến này một cách thích hợp, và các tác giả sáng chế dự định sáng chế cần được thực hiện theo cách khác so với cách nêu trong bản mô tả. Do đó, sáng chế bao gồm toàn bộ các cải biến và các dạng tương đương của đối tượng được đề cập trong phần yêu cầu bảo hộ kèm theo đây như được cho phép bởi luật thích hợp. Ngoài ra, dạng kết hợp bất kỳ của các nguyên tố nêu trên ở tất cả các dạng cải biến của chúng được bao hàm trong sáng chế trừ khi có chỉ dẫn khác hoặc theo cách khác có nội dung trái ngược rõ ràng.

Tài liệu tham khảo

- Alexander J P, Baden L, Pallansch M A, Anderson L J. Enterovirus 71 infection and neurologic disease – United States, 1977-1991. *J Infect Dis* 1994; 169: 905-908.
- Arita M, Shimizu H, Nagata N, Ami Y, Suzuki Y, Sata T, Iwasaki T, Miyamura T. Temperature-sensitive mutants of enterovirus 71 show attenuation in cynomolgus monkeys. *J Gen Virol* 2005; 86: 1391-401.
- Arita M, Nagata N, Iwata N, Ami Y, Suzuki Y, Mizuta K, Iwasaki T, Sata T, Wakita T, Shimizu H. An attenuated strain of enterovirus 71 belonging to genotype A showed a broad spectrum of antigenicity with attenuated neurovirulence in Synomolgus monkeys. *J Virol* 2007; 81(17): 9386-95.
- Bible JM, Iturriza-Gomara M, Megson B, Brown D, Pantelidis P, Earl P, Bendig J, Tong CYW. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 in the United Kingdom from 1998 to 2006. *J Clin Microbiol* 2008; 46(10): 3192-200.
- Blomberg J, Lycke E, Ahlfors K, Johnsson T, Wolontis S, von Ziepel G. New enterovirus type associated with epidemic of aseptic meningitis and/or hand, foot, and mouth disease. *Lancet* 1974; 2: 112.
- Chang L Y, Huang Y C, Lin T Y. Fulminant neurogenic pulmonary oedema with hand, foot and mouth disease. *Lancet* 1998; 352: 367-368.
- Chen HL, Huang JY, Chu TW, Tsai TC, Hung CM, Lin CC, Liu FC, Wang LC, Chen YJ, Lin MF, Chen CM. Expression of VP1 protein in the milk of transgenic mice: a potential oral vaccine protects against enterovirus 71 infection. *Vaccine* 2008; 26(23): 2882-0.
- Chen CW, Lee YP, Wang YF, Yu CK. Formaldehyde-inactivated human enterovirus 71 vaccine is compatible for co-immunization with a commercial pentavalent vaccine. *Vaccine* 2011; 29(15): 2772-6.
- Chinese Center for Disease Control and Prevention, and Office of the World Health Organization in China. 2008. Report on the hand, foot and mouth disease outbreak in Fuyang City, Anhui Province and the prevention and control in China. World Health Organization, Beijing, China. <http://www2.wpro.who.int/NR/rdonlyres/591D6A7B-FB15-4E94-A1E9-1D3381847D60/0/HFMDCCDC20080515ENG.pdf>
- Chiu CH, Chu C, He CC, Lin TY. Protection of neonatal mice from lethal enterovirus 71 infection by maternal immunization with attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing VP1 of enterovirus 71. *Microbes Infect* 2006; 8(7): 1671-8.
- Chomnaitree T, Menegus M A, Schervish-swierkosz E M, Schwalenstocker E. Enterovirus 71 infection: a report of an outbreak with two cases of paralysis and a review of the literature. *Pediatrics* 1982; 671: 489-493.
- Coleman JR, Papamichail D, Skiena S, Fitcher B, Wimmer E, Mueller S. Virus attenuation by genome-scale changes in codon pair bias. *Science* 2008; 320: 1784-87. Doi: 10.1126/science.1155761

Chumakov M, Voroshilova M, Shindarov L M, Lavrova I, Gracheva L, Koroleva M, et al. Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria. *Arch Virol* 1979; 60: 329-340.

Chung YC, Ho MS, Wu JC, Chen WJ, Huang JH, Chou ST, Hu YC. Immunization with virus-like particles of enterovirus 71 elicits potent immune responses and protects mice against lethal challenge. *Vaccine* 2008; 26(15): 1855-62.

Deibel R, Gross L L, Collins D N. Isolation of a new enterovirus. *Proc Soc Exp Biolo Med* 1975; 148: 203-207.

Dougherty RM. Animal virus titration technique. In: *Techniques in Experimental Virology*. Ed; Harris RJC. London and New York: Academic Press 1964;. Chapter 6; 169-224.

Gilbert G L, Dickson K E, Waters M J, Kennett M L, Land S A, Sneddon M. Outbreak of enterovirus 71 infection in Victoria, Australia, with a high incidence of neurologic involvement. *Pediatr Infect Dis* 1988; 7: 484-488.

Hagiwara A, Tagaya I, Yoneyama T. Epidemic of hand, foot, and mouth disease associated with enterovirus 71 infection. *Intervirology* 1978; 9: 60-63.

Hagiwara A, Yoneyama T, Hashimoto I. Isolation of a temperature-sensitive strain of enterovirus 71 with reduced neurovirulence for monkeys. *J Gen Virol* 1982; 64: 499-502.

Hagiwara A, Yoneyama T, Hashimoto I. Isolation of a temperature-sensitive strain of enterovirus 71 with reduced neurovirulence for monkeys. *J Gen Virol* 1983; 64: 499-502.

Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis programme for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Research* 1997; 41: 95-8.

Hashimoto I, and Hagiwara A. Comparative studies on the neurovirulence of temperature-sensitive and temperature-resistant viruses of enterovirus 71 in monkeys. *Acta Neuropathol* 1983; 60: 266-270.

Hayward J C, Gillespie S M, Kaplan K M, Packer R, Pallansch M, Plotkin S, et al. Outbreak of poliomyelitis-like paralysis associated with enterovirus 71. *Pediatr Infect Dis* 1989; 8: 611-616.

Huygelen C. The concept of virus attenuation in the eighteenth and early nineteenth centuries. *Biologicals* 1997; 25: 339-45.

Ishimaru Y, Nakano S, Yamaoka K, Takami S. Outbreaks of hand, foot, mouth disease by enterovirus 71: high incidence of complication disorders of central nervous system. *Arch Dis Child* 1980; 55: 583-588.

Kennett M, Birch C J, Lewis F A, Yung A P, Locarnin S A, Gust I D. Enterovirus type 71 infection in Melbourne. *Bull EHO* 1974; 51: 609-615.

Kenney JL, Volk SM, Pandya J, Wang E, Liang X, Weaver SC. Stability of RNA virus attenuation approaches. *Vaccine* 2011; 29(12): 2230-4. Doi: 10.1016/j.vaccine.2011.01.055

Lauring AS, Jones JO, Andino R. Rationalizing the development of live attenuated virus vaccines. *Nature Biotech* 2010; 28(6): 573-9.

Lee MS, and Chang LY. Development of enterovirus 71 vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2010; 9(2): 149-56.

Li Z, Yu M, Zhang H, Wang HY, Wang LF. Improved rapid amplification of cDNA ends (RACE) for mapping both the 5' and 3' terminal sequences of paramyxovirus genomes. *J Virol Methods* 2005; 130: 154-6.

Liu C C, Tseng H W, Wang S M, Wang J R, Su I J. An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan, 1998: epidemiologic and clinical manifestations. *J Clin Virol* 2000; 17: 23-30.

Lum L C S, Lam S K, Wong K T, Chua K B, Goh A Y T. Neurologic pulmonary oedema and enterovirus 71 encephalomyelitis. *Lancet* 1998a; 352: 1391.

Lum L C S, Wong K T, Lam S K, Chua K B, Goh A Y T, Lim W L, Ong B B, AbuBakar S, Lambert M. Fatal Enterovirus 71 encephalitis. *J Pediatr* 1998b; 133: 795-798.

Melnick J L. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: Fields B N, Knipe D M, Howley P M, *et al.* (3rd ed). *Fields Virology*. Philadelphia. Lippincott-Raven, 1996: 655-712.

Nagy G, Takatsy S, Kukan E, Milialy I, Domok I. Virological diagnosis of enterovirus type 71 infections: experiences gained during an epidemic of acute CNS diseases in Hungary in 1978. *Arch Virol* 1982; 71: 217-227.

Ong KC, Devi S, Cardoso MJ, Wong KT. Formaldehyde-inactivated whole-virus vaccine protects a murine model of enterovirus 71 encephalomyelitis against disease. *J Virol* 2010; 84(1): 661-5.

Reed LJ, and Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938; 27: 493-7.

Rice P, Lonogden I, Bleasby A. EMBOS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genetics* 2000; 16(6): 276-7.

Richman DD, Murphy BR. The association of the temperature-sensitive phenotype with viral attenuation in animals and humans: Implications for development and use of live virus vaccines. *Clin Infect Dis* 1997; 1(3): 413-33.

Robinson HL. Viral attenuation by design. *Nature Biotech* 2008; 26: 1000-1001. Doi:10.1038/nbt0908-1000

Samuda G M, Chang W K, Yeung C Y, Tang P S. Monoplegia caused by enterovirus 71: an outbreak in Hong Kong. *Pediatr Infect Dis* 1987; 6: 206-208.

Schmidt N J, Lennette E H, Ho H H. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J Infect Dis* 1974; 129: 304-309.

Shindarov L M, Chumakov M P, Voroshilova M K, Bojinov S, Vasilenko S M, Jordanov I, *et al.* Epidemiological, clinical and pathomorphological characteristics of epidemic poliomyelitis-like disease caused by enterovirus 71. *J Hyg Epid Microbiol Immun* 1979; 3: 284-295.

Tagaya I, Takayama R, Hagiwara A. A large scale epidemic of hand, foot, mouth disease associated with enterovirus 71 infection in Japan in 1978. *Jpn J Med Sci Biol* 1981; 34: 191-196.

Tung WS, Bakar SA, Sekawi Z, Rosli R. DNA vaccine constructs against enterovirus 71 elicit immune response in mice. *Genet Vaccines Ther* 2007; 5:6.

Wang I R, Tsai H P, Chen P F, Lai Y J, Yan J J, Kiang D, et al. An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan, 1998. II. Laboratory diagnosis and genetic analysis. *J Clin Virol* 2000; 17: 91-99.

Wu CN, Lin YC, Fann C, Liao NS, Shih SR, Ho MS. Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with subunit VP1 vaccines and inactivated virus. *Vaccine* 2001; 20(5-6): 895-904.

Yan J J, Wang J R, Liu C C, Yang H B, Su I J. An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan 1998: A comprehensive pathological, virological, and molecular study on a case of fulminant encephalitis. *J Clin Virol* 2000; 17: 13-22.

Yang F, Zhng T, Hu Y, Wang X, Du J, Li Y Sun S, Sun X, Li Z, Jin Q. Survey of enterovirus infections from hand, foot and mouth disease outbreak in China, 2009. *Virology J* 2011; 8:508. <http://www.virologyj.com/content/8/1/508>.

Zeng M, El Khatib NF, Tu S, Ren P, Xu S, Zhu Q, Mo X, Pu D, Wang X, Altmeyer R. Seroepidemiology of enterovirus 71 infection prior to the 2011 season in children in Shanghai. *J Clin Virol* 2012; 53(4): 285-9.

Zhang D, Lu J, Lu J. Enterovirus 71 vaccine: close but still far. *Int J Infect Dis* 2010; 14(9): e739-43.

Yêu cầu bảo hộ

1. Chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh là chủng EV71:TLL β P20 được nộp lưu tại Trung tâm lưu giữ giống nuôi cấy Hoa Kỳ với Số hiệu lưu giữ PTA-13285 hoặc chủng EV71:TLL α P20 được nộp lưu tại Trung tâm lưu giữ giống nuôi cấy Hoa Kỳ với Số hiệu lưu giữ PTA-13284.
2. Chế phẩm chứa chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh theo điểm 1.
3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm này còn chứa chất mang được dụng.
4. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm này còn chứa chất bổ trợ.
5. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó chế phẩm này còn chứa chất bổ trợ.
6. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm này được bào chế thành vaccin.
7. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó chế phẩm này được bào chế thành vaccin.
8. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó chế phẩm này được bào chế thành vaccin.
9. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó chế phẩm này được bào chế thành vaccin.
10. Kit để tạo miễn dịch cho đối tượng bằng chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh, chứa chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh theo điểm 1 hoặc chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 9, chất mang được dụng, và hướng dẫn sử dụng nó.
11. Kit theo điểm 10, trong đó kit này còn có dụng cụ chuyên dùng.

12. Phương pháp tạo ra vaccin, bao gồm bước sử dụng chủng Enterovirut 71 nhạy nhiệt được làm thích nghi với điều kiện lạnh theo điểm 1.
13. Phương pháp tạo ra vaccin, bao gồm bước sử dụng axit nucleic có trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:7.
14. Axit nucleic được cấu thành từ trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:7 dùng để phát triển vaccin.

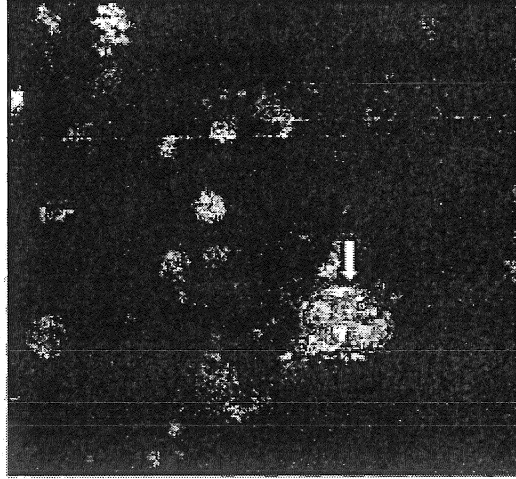


Fig.1a

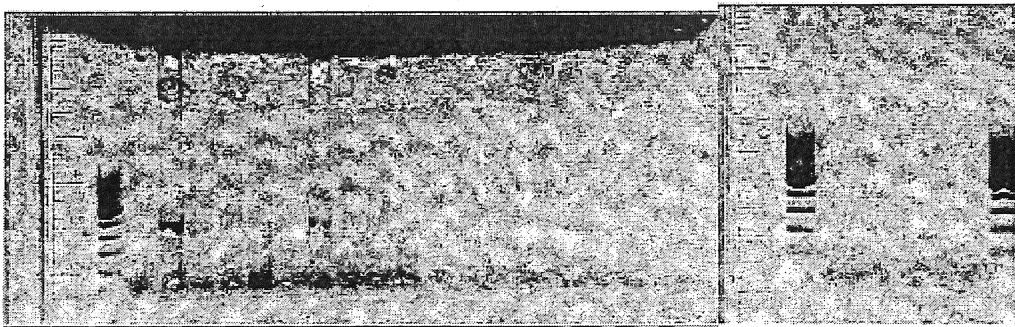


Fig.1b

Danh mục trình tự

<110> Temasek Life Sciences Laboratory Limited

<120> CHŨNG ENTEROVIRUT 71 NHẠY NHIỆT ĐƯỢC LÀM THÍCH NGHI
TRONG ĐIỀU KIỆN LẠNH, CHẾ PHẨM VÀ KIT CHỨA CHŨNG NÀY

<130> 2577-224PCT

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bộ thích ứng oligonucleotit

<220>

<221> misc_feature

<222> (29)..(29)

<223> n là cordycepin

<400> 1

gaagagaagg tggaaatggc gtttttggn

29

<210> 2

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 2

ccaaaacgcc atttcacct tctcttc

27

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 3

attcaggggc cggaggacta c

21

<210> 4

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 4

cacccttgatg ataccatgga tcag

24

<210> 5

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 5

gtgaattaag aacrcaycgt gtyt

24

<210> 6

<211> 7428

<212> ADN

<213> Enterovirus 71, chủng EV71:TLLalphaP20

<400> 6

ttaaaacagc ctgtggggtg caccactca cagggcccac gtggcgctag cactctggtt	60
ctacggaacc tttgtgcgc tgttttacgc cccttcccc atttgcaact tagaagcaat	120
acacaacact gatcaacagc aggcattggc caccagctat gtcttgatca agcatttctg	180
tttccccgga ccgagtatca atagactgtt caccggttg aaggagaaag cgtccgttat	240
ccggctaact acttcgagaa acctagtaac accattgaag ctgcagagtg tttcgctcgg	300
cacttcccc gtgtagatca ggtcgatgag tcttgcaat cccacgggt gaccgtggca	360
gtggctgcgc tggcggcctg cctatggggc aaccatagg acgctctaata gcggacatgg	420
tgccaagagt ctattgagct agttagtggc cctccggccc ctgaatgcgg ctaatcctaa	480
ctgcggagca catgccttca atccagtggg tagtgtgtcg taatgggcaa ctctgcagcg	540
gaaccgacta ctttgggtgt ccgtgtttcc tttattctt atattggctg cttatggtga	600
caattacaga attgttacca tatagctatt ggattggcca tccggtgtgc aatagagcta	660
ttatatacct atttgttggc tttgtaccac taacctaaa atctataacc accctcgact	720
ttatattaac cctcaacaca gtcaagcatg ggctcacagg tgtccactca gcgatccggc	780

tcccacgaga actccaattc agctacagaa ggctccacca ttaattacac taccatcaac	840
tattacaaag actcctatgc tgcgacagcg ggcaaacaga gccttaaaca agaccctgat	900
aagtttgcta accctgtcaa ggacattttc actgaagtgg ctgcgccact gaagtctcca	960
tccgctgaag cttgtggtta cagtgatcgc gtggcacaac tcaccattgg aaactccacc	1020
attactacac aggaggcggc aaacatcata gttggttacg gtgagtggcc ctcatactgc	1080
tctgatgacg acgctacagc ggtggacaaa ccaacgcgcc cagatgtttc agtgaatagg	1140
ttttatacac tggacactaa actgtgggaa aagtcacca aggggtggta ttggaagttt	1200
cctgatgtgt tgactgagac cggagtcttt ggccagaacg cacagtttca ctatttgtat	1260
agatcagggt tttgcattca tgtgcaatgt aacgctagca agttccatca aggagctctg	1320
ttagtcgcca tacttccaga gtatgttata gggacagtgg caggcgggtac aggaacagag	1380
gacagccacc ctccctacat acaaacacaa cctggcgccg acggttttga gctgcagcac	1440
ccgtacgtgc tcgatgctgg gattcctata tcacaattga cagtgtgccc ccatcaatgg	1500
attaacctgc ggaccaataa ctgtgccaca ataatagcgc catatatgaa cacactgcct	1560
ttcgactctg ccctgaacca ttgcaatttt gggctgttgg tagtgcccat tagcccatta	1620

gattttgacc aaggggcaac tccggttatc cctattacaa tcaactctagc tccaatgtgc	1680
tctgagtttg caggtctcag acaggcagtc actcaaggct ttcccactga gccaaaacca	1740
ggaacgaatc aattcttgac caccgatgac ggcgtctcag caccattct accaaatttc	1800
cacccactc catgtattca catacccggt gaagtcagaa acctgcttga gttgtgtcaa	1860
gtggagacta ttcttgaggt taacaacgta cccaccaatg ctaccagtct gatggaaagg	1920
ctacgattcc cgggtgccgc gcaagcgggg aaagggtgaat tgtgtgccgt gtttaaggcc	1980
gacctggaa gagacggtcc atggcaatca acaatgctgg gccagttgtg tggatattac	2040
accagtggt cagggtcact ggaggtcact tttatgttta ccgggtcttt catggccaca	2100
ggtaaaatgc tcatagctta tacacctcct ggcggcccct tacccaaaga tcgggccaca	2160
gcaatgctgg gcacacatgt tatctgggat tttgggctac aatcatctgt cacccttgta	2220
ataccatgga ttagtaatac ccactacagg gcgcatgcc gccgatggagt gttcgactac	2280
tataccacag gactggtcag tatctgggat caaaciaact acgtagttcc aattggggca	2340
ccaacacag cttacataat agcactagcg gcagcccaga agaattttac catgaaactg	2400
tgcaaagaca ccagtcacat attacagaca gcctccattc agggagatag ggtggcagat	2460

gtgatcgaga gctctatagg agatagtgtg agtagggcac ttacccaggc cctgccagca	2520
cccacaggtc aaaacacaca ggtgagcagt catcgactag aactggcga agttccagcg	2580
ctccaagctg ctgaaattgg ggcacgtca aatactagtg atgagagtat gattgagaca	2640
cgatgcgttc ttaactcaca tagtacagca gagaccacct tggacagttt cttcagtagg	2700
gcaggtttgg taggagagat agatctccct cctaagggtg ccaccaatcc aaatggttat	2760
gccaactggg acatagacat aactggttac gcacaaatgc gcaggaaagt ggagctgttc	2820
acctacatgc gctttgatgc ggaattcact ttigtgtcgt gcactcctac tggtgaggtt	2880
gttccacaat tactccagta tatgtttgtt cccctgggtg ctcccaaacc agagtctaaa	2940
gaatcacttg cttggcagac agccacaaac ccctcagtct ttgtcaagtt gactgatccc	3000
ccggcacagg tctcagttcc gttcatgtca cccgcgagcg cttaccagtg gttttaogac	3060
gggtacccca cgtttgagga acacaaacag gagaaagacc tcgagtatgg agcgtgtcct	3120
aataatatga tgggcacttt ctcggtgcga accgtggggt catcaaagtc caagtacttc	3180
ttggttgta gaatatatat gagagtgaag catgtcaggg cgtggatacc tcgccgatg	3240
cgcaaccaa actatttgtt caaagccaac ccaaactatg ccggtgactc cattaacccg	3300

accggcacta gtcgtactgc cattactacc cttggaaagt tcggccagca gtctggggcc	3360
atctacgtgg gcaacttcag agtgggtaat cgtcacctcg ctactcagaa tgactgggcg	3420
aacctcgtct ggaaagacag ctcccgcgac ttattagtgt cgtctaccac cgctcagggc	3480
tgtgatacaa ttgcacgttg tgactgtcaa acaggagtgt actattgtaa ttccaagaga	3540
aagcactatc cagtcagctt ttctaaaccc agcctcatat atgtggaagc tagcgagcat	3600
taccctgcta gataccaatc gcacctaattg cttgcagtgg gccactctga gcccggcgac	3660
tgcgaggagca tcttaaggtg tcaacatggt gtagttggta tagtgtccac ggggtggcaac	3720
gggctcgttg gatttgctga tgtgagggat ctcttggtgt tagatgaaga ggccatggag	3780
caaggtgtgt ccgactacat taaggggctc ggtgacgcgt ttggaacagg cttcactgac	3840
gctgtatcca gggaagttga agcccttagg aaccacctca taggatctga tggagcagtt	3900
gagaaaatcc taaagaacct tattaagctg atttcagcgt tagtaattgt gatcaggagc	3960
gattatgata tggtcaccct cacagcaact ttagccctga ttggttgtca tggaagtcct	4020
tgggcttgga ttaaagccaa gacagcatcc attttaggta tccccatcgc ccagaagcag	4080
agtgccttctt ggctaaagaa atttaatgat atggcgagtg ctgccaaaggg tttagaatgg	4140

atatccaata aaattagcaa gttcattgac tggctcaggg agaagattgt tccagcagct	4200
aaggagaaag cagaatTTTT aaccaatttg aagcaattgc cactattaga gaaccagatc	4260
acaaatttag agcagtcgcg tcgctcacia gaggaccttg aagctatggt tgggaatgtg	4320
tcatacctcg ccattttctg tcgcaagttc caaccattat acgccacgga agctaagcga	4380
gtctatgttc tagagaagag aatgaacaac tacatgcagt tcaagagcaa acaccgtatt	4440
gaacctgtat gtctcatcat tagaggctca ccaggcactg gaaagtccct tgcgaccggt	4500
atcattgttc gggccatagc agacaagtat cactctagtg tgtactcact tccaccagac	4560
cctgaccatt ttgacgggta caaacagcaa gtgggttacag ttatggatga tctgtgtcag	4620
aatcctgacg gcaaagacat gtcattatTT tgccagatgg tgtccaccgt ggattttatc	4680
ccaccaatgg cttctctcga agaaaaggga gtttctttcg catctaaatt tgttatcgca	4740
tccaccaacg ctagcaacat tatagtgcct acagtgtcag attctgacgc cattcgtcgc	4800
aggtttttaca tggattgcga cattgaggtg acagactcat acaaaacaga tttgggtaga	4860
ctagacgctg gacgggctgc taagctatgc tctgagaaca acaccgcaaa cttcaaacga	4920
tgcagcccac tagtgtgtgg gaaagctatt caacttagag acaggaagtc taaggtcagg	4980

tacagcgtgg acacagtggg ctctgaactt attagagaat ataatagcag atccgctatt	5040
ggtaacacaa ttgaagcact attccaaggc ccacccaagt tcaggccaat tagaatcagt	5100
cttgaggaga agccagcccc agacgctatt ggcgatctcc tcgctagtgt agatagcgag	5160
gaagtgcgcc aatactgtag ggagcaaggc tggatcatcc ctgaaactcc caccaatgtt	5220
gaacgacacc ttaatagagc agtgctagtc atgcaatcca tcactactgt ggtggcagtc	5280
gtctcactgg tgtacgttat ttacaagctc tttgcggggg ttcaagggtgc gtactctgga	5340
gtccccaagc aaatgctcaa gaaacctgtc ctccgtacgg caacagtgca ggggccgagt	5400
cttgactttg ctctatcctt actgagaagg aacatcaggc aagtccaaac agatcaaggg	5460
cattttacca tgttaggtgt cagagatcgc ttagccgttc tcccacggca ctcacagccc	5520
gggaagacta tttgggtgga gcacaaactt gtgaacatcc ttgacgcaat tgagctggtg	5580
gatgagcagg gcgttaattt ggaactcaca ttggtgacac tagatactaa tgaaaaattt	5640
agagatatca ccaagttcat tccagagacc attagcggcg ctagtgatgc aacttttagtg	5700
atcaacacag aacagatgcc atcaatgttt gtcccagtgg gggacgtcgt gcagtacggg	5760
ttcttgaacc ttagtggaag gccaaactcat aggaccatga tgtacaattt ccctacaaaa	5820

gcaggacagt gtggaggtgt ggtcacatca gtcggtaaga ttgttggcat tcacattggc	5880
ggcaacgggc gccaaaggtt ctgtgctggt ttgaagagga gttacttcgc aagtgtgcag	5940
ggtgagatcc aatgggtgaa gcctaacaag gaaactggta gactgaacat caatggtcca	6000
actcgacta agctggagcc tagtgtatct catgatgtgt ttgaaggtaa taaggaacca	6060
gcagttttaa caagtaaaga ccctagattg gaggtcgact ttgaacaagc cctgttttcc	6120
aagtatgtgg gcaatgtttt acacgagccc gatgaagacg tgattcaagc tgccctccac	6180
tacgcgaatc aacttaaaca attggacata aacactagca agatgagcat ggaggaagcg	6240
tgctatggca ctgaaaacct ggaagcaata gacctctgca ctagtgccgg gtaccatac	6300
agcgcccttg gcatcaagaa aagagacatt cttgacccca caaccaggga tgtgtctaag	6360
atgaaattct atatggataa atacgggcta gacctgcat actctaccta tgtgaaggat	6420
gagcttaggt ccctggataa aatcaagaaa ggaaaatcac gcttgataga ggctagtagc	6480
ttgaatgact ctgtctacct cagaatgact tttgggcacc tttacgaggt gtttcatgcc	6540
aaccctggca ctgtgactgg ctacgagtg ggttgcaacc cggacgtgtt ttggagcaaa	6600
ctaccgattc tgctgcctgg gtcactcttt gcctttgact actcaggata tgatgctagt	6660

ctcagcccggtatgggttcagggtctagaa gttgtgttac gggagattgg gtattcagag 6720

gaggccgtgt ccctaataga agggatcaac cacacccacc atgtgtaccg gaacaaaaca 6780

tactgtgtac ttggtggaat gccctcgga tgttctggta cttccatctt taattcaatg 6840

atcaacaaca tcatcattag aacccttttg atcaaaacct ttaagggaat agacctggat 6900

gagttgaaca tgggtggccta tggggacgat gtgctggcta gttaccctt tcccattgat 6960

tgccttgagt tggctaagac tggcaaagag tatggtttga ccatgacacc tgcagacaaa 7020

tcacctgtt tcaatgaagt aacatgggaa aatgctacct tctgaagag aggattcttg 7080

ccagaccacc aattcccatt ctttaattcac cctacgatgc ccatgagaga gatccgtgag 7140

tccattcgat ggactaaaga cgcgcgcaac acccaagatc acgtgcgctc cctgtgtctg 7200

ttggcatggc acaatggtaa ggatgaatat gagaagtttg tgagtgtaat tagatcagtt 7260

ccagttggaa aagcgttggc cattcctaatt ttcgagaatc tgagaagaaa ttggctcgaa 7320

ttgttttaatt attacagctt aaagctgaac ccactagaa atctggctgc gttaatgact 7380

agtgggggta aatttgttat aaccagaata gcaaaaaaaaa aaaaaaaaa 7428

<210> 7

<211> 7437

<212> ADN

<213> Enterovirus 71, chủng EV71:TLLbetaP20

<400> 7

ttaaaacagc ctgtgggttg caccactca cagggccac gtggcgctag cactctgatt	60
ctacggaatc tttgtgcgcc tgttttacaa cccccccaa tttgcaactt agaagcaata	120
cacaacactg atcaacagca ggcattggcg accagccatg tcttgatcaa gcacttctgt	180
ttccccggac tgagtatcaa tagactgctc acgcggttga aggagaaaagc gtcggttacc	240
cggctaacta cttcgagaaa cctagtagca ccattgaaac tgcggagtgt ttcgctcggc	300
acttcccccg tgtagatcag gtcgatgagt cactgcaatc cccacgggag accgtggcag	360
tggctgcgct ggcggcctgc ctatggggca acccatagga cgctctaatt tggacatggt	420
gcgaagagtc tattgagcta gttagtagtc ctccggcccc tgaatgcggc taatcctaac	480
tgcggagcac atgccctcaa cccagagggt agtgtgtcgt aacgggcaac tctgcagcgg	540
aaccgactac tttgggtgtc cgtgtttcct tttattctta cattgggtgc ctatgggtgac	600
aatcgagaa ttgttaccat atagctattg gattggccat ccggtgtgca atagagctat	660
tatataccta tttgttggt ttgtaccatt aaccttaaaa tctataacta ccctcaactt	720

tgtattaact ctcaatacag tcaaacatgg gctcacaagt gtctactcag cgatccggct	780
cccacgagaa ctccaattca gctacggaag gctctaccat taattacact accatcaact	840
attacaaaga ctctatgct gcaacagcag gcaaacagag cctcaaaca gaccctgata	900
agtttgctaa ccctgttaag gatattttca ctgaaatggc tgcgccactg aagtctccat	960
ccgctgaagc ttgtggttat agtgatcgcg tggcacaact caccattgga aactccacca	1020
ttactacaca ggaggcggca aacatcatag tcggttatgg tgagtggccc tcatattgct	1080
ctgatgacga tgctacagcg gtggataaac caacgcgccc agatgtgtca gtgaataggt	1140
tttatacatt ggacaccaaa ctgtgggaaa aatcatctaa ggggtgggtat tggaagtttc	1200
ctgatgtatt gactgagacc ggagtctttg gccagaacgc acagtttcac tatttatata	1260
gatcagggtt ttgcattcat gtgcaatgta atgctagcaa gttccatcaa ggagcgctgt	1320
tagtcgctat tcttcagag tatgttatag ggacagtggc aggcggcaca ggtacagagg	1380
acagccaccc tccttacaaa caaacacaac ctggcgctga tggttttgag ctgcagcacc	1440
cgtacgtgct tgatgctggg attcctatat cacaactgac agtgtgcccc catcaatgga	1500
ttaatctgcg gaccaataac tgtgccacga taatagtgcc atatatgaac aactgcctt	1560

tgactctgc ccttaaccat tgcaattttg ggctgttggt agtgcccatt agcccattag	1620
atTTtgacca aggggcaact ccagttatcc ctattacaat cactctagct ccaatgtgct	1680
ctgagtttgc aggtctcaga caggcagtca ctcaaggctt ccctactgag ccaaaccag	1740
gaacaaatca atTTttgacc accgatgacg gcgtctcagc acccattcta ccaaatttcc	1800
acccactcc atgtattcgc ataccggtg aagtcagaaa cctgcttgag ttgtgtcaag	1860
tggagactat tcttgagggt aacaacgtac ccaccaatga taccagtttg atggaaaggc	1920
tacgatttcc agtgtctgcg caagcgggga aagggaatt gtgtgccgtg tttagggccg	1980
accctggaag ggacgggtcca tggcaatcaa caatgctggg ccagctgtgt ggatactaca	2040
ccagtggtc aggatcactg gaggtcactt ttatgtttac cgggtctttt atggccacgg	2100
gtaaaatgct catagcctat acacctctg gtggcccctt acctaaagac cgggctacag	2160
caatgctggg cacgcatggt atctgggatt ttgggttaca atcatctgtc acccttgtga	2220
taccatggat cagtaacacc cactacagag cgcattgccg ggacggagtg ttogattact	2280
ataccacagg actggtcagt atctggtatc aaacaaacta cgtagttcca attggggcac	2340
ccaacacagc ttacataata gcactagcgg cagcccagaa gaattttacc atgaaactgt	2400

gcaaagacac tagtcacata ttacagacag cctccattca gggagatagg gtggcagatg	2460
tgatcgagag ctctatagga aatagtgtga gtagagcact taccagggcc ctgccggcac	2520
ccacaggtca aaacacacag gtgagcagcc accgactaga cactggcgaa gttccagcgc	2580
tccaagctgc tgaaattggg gcatcgtcaa atactagtga tgagagtatg attgaaacac	2640
ggtgcgttct taactcacac agcacagcag aaaccacctt ggatagcttc ttcagtaggg	2700
caggtttggg aggggagata gatctccctc ttaagagcat tactaatctg aatggttatg	2760
tcaactggga tatagacata actggttacg cacagatgcg caggaaagtg gagttgttca	2820
cctacatgcg ctttgatgcg gaattcactt ttgttgctg cactcccacc ggcgagggtg	2880
ttccacaatt tctccagtat atgtttgttc ccctggtgc toccaaacca gaatctagag	2940
aatcacttgc ttggcaaaca gccacaaacc cctcaatttt tgtcaagttg actgatcccc	3000
cagcacaggt ctcagttcca ttcatgtcac ccgcgagcgc ttaccagtgg ttttacgacg	3060
ggtaccctac gtttgagaa cataaacagg agaaagacct tgagtatgga gcgtgtccta	3120
ataatatgat gggcactttc tcggtgcgga ctgtggggtc agcaaagtcc aagtaccctc	3180
tggttgtcag aatatatatg agaatgaaac atgtcagggc atggatacct cgtccgatgc	3240

gcaacccaaaa ctacttggtc aaagccaatc cgaactacgc tggcaactcc attaaaccga	3300
ccggcactag ccgtaatacc attactaccc ttggaaagtt tggccagcaa tctggggcca	3360
tctacgtggg caacttcaga gtgggttaatc gtcacctcgc tactcataat gactggggcga	3420
attccgtctg ggaggacagc tcccgcgacc tactagtgtc gtctactact gccaggggt	3480
gtgatacaat tgcacgttgt gactgtcaaa caggagtgtg ctattgtaac tctaagagaa	3540
agcactatcc agtcagcttc tctaaaccta gcctcactta tgtggaagct agcgagtatt	3600
accctgctag ataccagtct catctcatgc ttgcggcggg tcattctgaa ccaggagatt	3660
gtggtggcat ccttaggtgc cagcacggtg ttgtcggcat tgtgtccact ggtggcaacg	3720
ggcttgttgg ctttgcagat gtcagggatc tcctatgggt ggatgaagaa gcaatggagc	3780
agggtgtgtc cgactacatt aagggaacttg gtgatgcgtt tggaactggc ttcaccgatg	3840
cagtttccag agaagttgag gctcttaaga gccaccttat tgggtctgaa ggagttgtcg	3900
agaagatcct aaagaatttg atcaaattaa tctctgcttt agtcatcgtg attaggagtg	3960
attatgacat ggtcactctc acagcaactt tagctctgat agggtgccac ggtagtcct	4020
gggcatggat taaagcaaaa acagcttcca ttctaggcat ccctattgcc cagaagcaaa	4080

gtgcgtcctg gcttaaaaaa tttaacgata tggccaacgc cgccaagggg ttagagtgga	4140
tctccagtaa gattagtaaa ttcacgcgatt ggctcaaaga gaaaatcata ccagcggcta	4200
gggagaaggt ggagtttctg aacaacttaa aacagttgcc gttgctggag aatcagatct	4260
caaactctaga gcagtctgct gttcacaag aaaatctcga agccatgttc ggaaatgtgt	4320
cgtacctagc tcacttctgc cgcaaattcc aaccactgta cgctacagaa gccaaaagg	4380
tctatgcttt ggagaaaaga atgaacaact acatgcagtt caagagcaaa caccgaattg	4440
aacctgtatg tcttattatt aggggttctc cgggcaccgg gaaatcacta gcaactggca	4500
tcattgctcg ggcaatagca gacaagtatc actcaagtgt gtactcactc ccaccagacc	4560
cggaccactt tgatggatac aaacagcagg tggtcacggg catggatgac ttatgtcaga	4620
accctgacgg caaagatatg tcattgttct gccagatggg gtccacagtg gatttcatcc	4680
caccaatggc ttccctagaa gagaaaggag tttctttcac atctaaattt gtcattgcat	4740
ctactaattc cagcaacatc atagtaccaa cagtgtctga ttctgatgca attcgccgta	4800
ggttctatat ggattgtgat atcgaagtca cggattcata caaaacggac ttgggtaggt	4860
tagatgctgg gcgagccgcc aaattgtgct ctgagaataa cacagcaaat ttcaagcgtt	4920

gtagccact agtgtgtggg aaggccattc agctgagaga tagaaagtcc aaggtcaggt	4980
acagtgtgga cacggtggtt tctgagctca taagggaata caacaacagg tctgctatcg	5040
gtaacacaat tgaagcacta ttccaaggtc cgcctaagtt taaaccata aggattagtc	5100
ttgaagaaaa gccagcccca gacgccatta gtgaccttct tgctagtgtg gatagcgagg	5160
aggtacgcca gtactgtaga gatcaaggtt ggatcattcc agagactcct acaaattgtg	5220
aacggcacct caacagagct gtgctagtca tgcaatccat cactacagtt gtggcagtcg	5280
tttcaactggt gtacgtcatc tacaagctct tcgctggatt ccaaggcgcg tactctgggtg	5340
ctcccaagca gataactcaag aaaccggtc tccgcacggc aacagtgcag ggtccaagtc	5400
tcgatttcgc tctgtctcta ctaaggagga atatcaggca agtgcaaaca gatcaaggac	5460
attttaccat gctgggtgtc agggaccgtt tggctgttct tccacgccac tcccagcccg	5520
gcaaaacaat ctgggtagag cacaaactcg taaacattct ggacgctggt gaactgggtgg	5580
atgaacaagg ggtcaatttg gagctaacct taatcaccct tgacactaat gagaaattca	5640
gagacattac taagttcatc ccggagagca tcagcactgc aagcgatgct accctagtga	5700
tcaacacaga gcacatgccc tcaatgtttg tgccgggtggg ggacgttggt caatatggtt	5760

ttctcaacct tagtgaaaag ccaaccacc gtacatgat gtacaacttt cccaccaagg	5820
cagggcagtg tggaggggtg gtgacatcag ttggaaaggt cattggtata cacataggtg	5880
gtaacggcag acaaggtttc tgtgcgggac ttaagaggag ctatttcgcc agcgagcaag	5940
gagagatcca gtgggtcaag cccaataaag aaactgggag actcaacatc aatgggcaa	6000
ctcgcactaa gctcgaacc agtgatattc atgatgtttt tgagggaac aaggagccag	6060
cagttctaca cagtaaagat cccgcctcg aggtggattt tgagcaggct ttgttctcca	6120
agtacgtagg gaatacacta tatgagcctg atgattacat taaggaggca gctcttcact	6180
acgcaaata gttgaaacag ctggacattg acacctcca gatgagcatg gaggaagcct	6240
gttacggcac tgagaacctt gaggccattg atcttcacac tagtgcagggt taccataca	6300
gtgctctagg aataaagaaa agagacatcc tagattctac tactagggat gtgagcaaga	6360
tgaaatttta tatggacaag tatggcttgg acctacccta ctccacctat gtcaaggatg	6420
agctacgctc gatagataag atcaagaaag ggaagtctcg tttgattgaa gccagcagct	6480
taaatgattc tgtgtacctt aggatgactt ttgggcacct ttatgaaacc ttccatgcaa	6540
accttgaac tgtgaccggt tcagccgtgg gatgcaatcc ggatacattc tggagtaaac	6600

tacccatctt actccctggc tcactctttg ctttcgacta ttcaggatat gatgctagtc	6660
ttagccctgt ctgggttcagg gcattagaat tagttcttag ggaaataggc tacagtgagg	6720
aagcagtttc acttggtgag gggatcaatc acacgcacca tgtataccgc aacaaaactt	6780
actgtgtgct tgggtggcatg ccctctgggt gctcaggaac atccatattc aattcaatga	6840
tcaataacat tattattaga gcactgctca tcaaaacggt caagggcatt gatttagacg	6900
agetcaacat ggttgcttat ggggatgatg tgcttgccag ttaccctttt ccaattgact	6960
gcttggagtt ggcaagaaca ggcaaggagt acggtttaac catgactcct gcagacaaat	7020
ccccatgctt caatgaagtc aattgggata acgcaacctt tctcaaaaga ggcttcttgc	7080
cogatgaaca atttccattc cttatccacc ctaccatgcc aatgaaagaa atccacgagt	7140
ccatacgggtg gaccaaggac gcgcgaaata cccaagatca cgtgcgggtcc ttgtgccttc	7200
tggcatggca caatggtaaa caggaatatg aaaagtttgt gagcgcaatt agatcagtac	7260
cagtaggaaa agtattggct attccaaatt atgagaatct gagacgcaat tggctcgaac	7320
tatttttagag gttaagtata tacctcaacc ccaccaggaa tctggtcgtg aacatgactg	7380
gtgggggtaa atttgttatt accagaatag caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa	7437