



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

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

(11) 
1-0022223

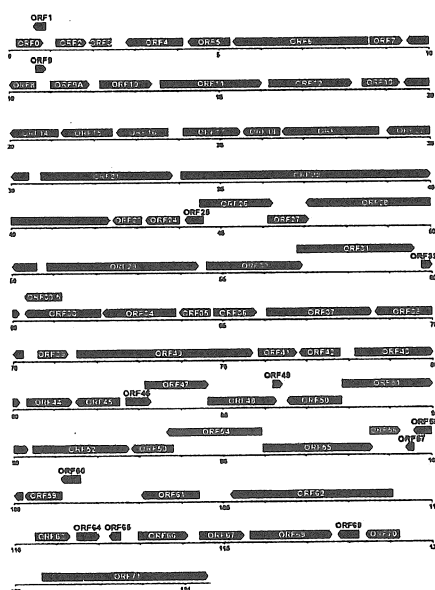
(51)⁷ C07K 14/07, C12N 15/38, 15/63, 5/10,
C12P 21/00, A61K 39/285

(13) B

- (21) 1-2013-02981 (22) 24.02.2012
(86) PCT/KR2012/001408 24.02.2012 (87) WO2012/115474 30.08.2012
(30) 61/446,284 24.02.2011 US
(45) 25.11.2019 380 (43) 27.01.2014 310
(73) MOGAM BIOTECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE (KR)
341 Pojung-Dong, Giheung-Gu, Yongin-Si Kyunggi-Do 446-799, Korea
(72) KIM, Geun Hee (KR), KWON, Shi Nae (KR), LEE, Chan Hee (KR), YOON, Yeop (KR)
(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyến (INVENCO.,LTD)

(54) PROTEIN CỦA CHỦNG VIRUT VARICELLA-ZOSTER, ADN BỘ GEN CỦA CHỦNG VIRUT VARICELLA-ZOSTER, KHUNG ĐỌC MỞ CỦA ADN BỘ GEN, VECTƠ CHỨA ADN BỘ GEN, TẾ BÀO CHỦ CHỨA VECTƠ VÀ CHẾ PHẨM VACCIN CHỨA PROTEIN CỦA CHỦNG VIRUT VARICELLA-ZOSTER NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các chủng virus Varicella-zoster (Varicella-zoster virus: VZV) mới và vaccin phòng bệnh thủy đậu và virus herpes zoster sử dụng các chủng này. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập tới ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06 được phân lập từ bệnh nhân người Hàn Quốc và được nhuộc độc, khung đọc mở (sau đây, được gọi là ORF) của nó, protein được mã hóa bởi ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06 này và ORF của nó và chế phẩm vaccin chứa protein này làm thành phần hoạt tính.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các chủng virus Varicella-zoster (Varicella-zoster virus: VZV) mới và vaccin phòng bệnh thủy đậu và virus herpes zoster sử dụng các chủng này. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập tới ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06 được phân lập từ bệnh nhân người Hàn Quốc và được nhuộc độc, khung đọc mở (sau đây, được gọi là ORF) của nó, protein được mã hóa bởi ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06 này và ORF của nó và chế phẩm vaccin chứa protein này làm thành phần hoạt tính.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virut Varicella-zoster (sau đây gọi là VZV) thuộc họ *Herpes viridae* và là nguyên nhân gây ra bệnh với hai triệu chứng khác nhau (thủy đậu và herpes zoster).

Là chủng VZV được phân lập từ các mẫu xét nghiệm lâm sàng, trình tự nucleotit hoàn chỉnh của chủng Dumas ban đầu đã được báo cáo (Davison, A.J. and Scott, J. E., 1986). Thêm vào đó, các trình tự nucleotit nguyên vẹn đầy đủ của 23 chủng VZV bao gồm chủng Oka mẹ và 3 chủng virus vaccin thu được từ chủng Oka mẹ (chủng vOka, chủng Varivax và chủng Varilrix) đã được báo cáo cho cơ sở dữ liệu ngân hàng gen NCBI cho đến nay.

Hiện nay, nghiên cứu về vùng đặc hiệu để làm nhuộc độc chủng vaccin có thể được thực hiện thông qua phân tích so sánh các trình tự nucleotit nguyên vẹn ở chủng virus vaccin và chủng virus lâm sàng

(Argaw et al., 2000; Gomi et al., 2002; Tillieux et al., 2008; Yamanish, 2008).

Trong khi đó, “Suduvax” chủ yếu được sản xuất bởi Green Cross Corp. là vacxin nhược độc chống bệnh thủy đậu từ năm 1994. Chủng virut MAV/06 được sử dụng để sản xuất Suduvax thu được bằng cách phân lập virut Varicella-zoster từ các nốt phỏng rộp của bệnh nhân Hàn Quốc 33 tháng tuổi bị nhiễm bệnh thủy đậu vào năm 1989 và nuôi cấy chủ yếu VZV đã phân lập trong tế bào phôi của phôi người, và bằng cách kiểm tra nhiều đặc tính khác nhau của virut Varicella-zoster đã xác nhận được rằng VZV nuôi cấy là VZV mới (Park et al., Propagation of Varicella-Zoster Virus isolated in Korea, J. Kor. Soc. Virol. 21, 1-9, 1991).

Suduvax đã được bán trên thị trường Hàn Quốc từ năm 1994 và được sử dụng trên thị trường toàn cầu từ năm 1998. Tuy nhiên, mặc dù hiệu lực và độ an toàn của Suduvax đã được chứng minh trên thị trường, nhưng các đặc điểm sinh học phân tử có khả năng mô tả cơ chế tác dụng và sự nhược độc của vacxin này vẫn chưa được báo cáo.

Các đặc tính sinh học phân tử này là rất quan trọng để làm tăng độ chính xác của việc kiểm soát chất lượng và đảm bảo chất lượng để đảm bảo hiệu lực, độ an toàn và đồng nhất của vacxin đã nhược độc này và nên được kiểm tra ngay.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để giải quyết vấn đề này, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra trình tự bộ gen của chủng VZV MAV/06 mới được phân lập từ bệnh nhân người Hàn Quốc và đã thực hiện phân tích sinh học phân tử bao gồm phân tích ORF và phân tích cây phả hệ chủng VZV MAV/06 phân lập, nhờ đó hoàn thành được sáng chế.

Mục đích của sáng chế là đề xuất ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất khung đọc mở (open reading frame-ORF) của ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất protein được mã hóa bởi ORF của ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất vectơ biểu hiện tái tổ hợp bao gồm ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06 hoặc ORF của nó.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất thể biến nạp bao gồm ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06 hoặc ORF của nó.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất quy trình tổng hợp protein được mã hóa bởi ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06 hoặc ORF của nó.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm vacxin chứa protein của chủng VZV MAV/06 làm thành phần hoạt tính.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

FIG.1 thể hiện bản đồ ORF của chủng VZV MAV/06 (sau đây, được thể hiện là “Suduvax” trong các hình vẽ) theo sáng chế;

FIG.2 thể hiện cây phả hệ của 24 chủng virus VZV dựa vào các trình tự nucleotit nguyên vẹn;

FIG.3 thể hiện cây phả hệ của 24 chủng virus VZV dựa vào các trình tự nucleotit không mã hóa;

FIG.4 thể hiện cây phả hệ đặc trưng của các chủng virus vacxin dựa trên 12 khác biệt về ORF giữa các chủng virus vacxin và chủng virus lâm sàng;

FIG.5 thể hiện mối tương quan giữa chiều dài của các bộ gen và các trình tự lặp lại của các chủng virus VZV;

FIG.6 thể hiện các đột biến giữa ORF0 của chủng VZV MAV/06 theo sáng chế và các chủng virus vacxin Oka;

FIG.7 thể hiện vùng mất đoạn 3-bp trong ORF17 của chủng VZV MAV/06 theo sáng chế;

FIG.8 thể hiện vùng mất đoạn 3-bp trong ORF56 của chủng VZV MAV/06 theo sáng chế;

FIG.9 thể hiện vùng mất đoạn 15-bp trong ORF29 của chủng VZV MAV/06 theo sáng chế; và

FIG.10 thể hiện vùng thêm đoạn 3-bp trong ORF60 của chủng VZV MAV/06 theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để đạt được các mục đích này, sáng chế đề xuất ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06 và ORF của nó.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “khung đọc mở” hoặc “ORF” mà là trình tự bazơ ADN nghĩa là trình tự bazơ ADN được dịch mã thành trình tự axit amin, nghĩa là trình tự bazơ từ codon khởi đầu dịch mã (ví dụ, ATG) đến codon kết thúc (ví dụ, TGA, TAA, và TAG).

Theo một khía cạnh chung, sáng chế đề xuất ADN bộ gen của chủng MAV/06 của virus Varicella-zoster (VZV) có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một khía cạnh chung khác, sáng chế đề xuất ORF của ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06. Chi tiết hơn, ORF này có thể được lựa chọn từ ORF 0 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO:2, ORF 17 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 3, ORF 29 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 4, ORF 56 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 5, và ORF 60 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO:6.

Theo một khía cạnh chung khác, sáng chế đề xuất protein được mã hóa bởi ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06 hoặc ORF của nó. Chi tiết hơn, sáng chế đề xuất protein được mã hóa bởi ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc ORF được lựa chọn từ ORF 0 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 2, ORF 17 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO:3, ORF 29 có trình tự bazơ nêu trong

SEQ ID NO:4, ORF 56 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 5, và ORF 60 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 6.

Theo một khía cạnh chung khác, sáng chế đề xuất vector biểu hiện tái tổ hợp bao gồm ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06 hoặc ORF của nó. Chi tiết hơn, sáng chế đề xuất vector biểu hiện tái tổ hợp bao gồm ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc ORF được chọn từ ORF 0 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 2, ORF 17 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 3, ORF 29 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 4, ORF 56 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 5, và ORF 60 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 6.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vector tái tổ hợp”, mà là vector biểu hiện có khả năng biểu hiện protein đích trong tế bào chủ thích hợp, nghĩa là cấu trúc di truyền chứa yếu tố điều hòa thiết yếu mà đoạn thêm di truyền được liên kết động với nó nhờ đó được biểu hiện. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “liên kết động” nghĩa là trình tự điều hòa sự biểu hiện axit nucleic và trình tự axit nucleic mã hóa protein đích được liên kết chức năng với nhau để thực hiện các chức năng chung. Sự liên kết động với vector tái tổ hợp này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng công nghệ tái tổ hợp di truyền đã được biết rõ trong lĩnh vực mà sáng chế có liên quan đến, và sự phân cắt ADN đặc hiệu vùng và sự liên kết có thể được thực hiện dễ dàng bằng cách sử dụng enzym thường được biết đến trong lĩnh vực mà sáng chế liên quan đến.

Vector biểu hiện thích hợp có khả năng được sử dụng trong sáng chế có thể bao gồm trình tự tín hiệu để gắn đích màng hoặc tiết ngoài các yếu tố điều hòa biểu hiện như trình tự khởi động, codon khởi động, codon kết thúc, tín hiệu polyadenyl hóa, và yếu tố tăng cường. Codon khởi đầu và codon kết thúc thường có thể được xem là một phần của trình tự nucleotit mã hóa protein miễn dịch đích, cần thiết để thực hiện chức năng

ở đối tượng mà được sử dụng cấu trúc di truyền, và phải nằm trong khung cùng với trình tự mã hóa này. Trình tự khởi động này có thể là trình tự cấu tạo hoặc cảm ứng. Ví dụ về trình tự khởi động sẵn có trong tế bào chưa có nhân điển hình có thể bao gồm các trình tự khởi động lac, tac, T3, và T7, nhưng không chỉ giới hạn ở các trình tự này. Ví dụ về trình tự khởi động sẵn có trong các tế bào nhân chuẩn có thể bao gồm trình tự khởi động β -actin, trình tự khởi động hemoglobin của người, trình tự khởi động creatin cơ người, và trình tự khởi động metallothionein người, cũng như trình tự khởi động virus khỉ không đuôi 40 (simian virus 40: SV40), trình tự khởi động virus gây u vú ở chuột (mouse mammary tumor virus: MMTV), trình tự khởi động virus gây suy giảm miễn dịch ở người (human immunodeficiency virus: HIV) như trình tự khởi động đoạn lặp dài ở đầu tận cùng của HIV (long terminal Repeat: LTR), trình tự khởi động virus Moloney, trình tự khởi động cytomegalovirus (CMV), trình tự khởi động Epstein Barr Virus (EBV), và trình tự khởi động virus Rous sarcoma (RSV), nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Vector biểu hiện này có thể bao gồm chỉ thị chọn lọc để lựa chọn tế bào chủ chứa vector này. Chỉ thị chọn lọc này là để lựa chọn các tế bào được biến nạp vector này, và như là chỉ thị chọn lọc, chỉ thị mang lại kiểu hình chọn lọc như kháng thuốc, nhu cầu dinh dưỡng, kháng chất gây độc tế bào, hoặc sự biểu hiện các protein bề mặt có thể được sử dụng. Vì chỉ các tế bào biểu hiện chỉ thị chọn lọc mới sống sót trong môi trường được xử lý bằng chất chọn lọc, nên các tế bào đã biến nạp này có thể được lựa chọn. Ngoài ra, trong trường hợp vector biểu hiện tái bản có thể bao gồm điểm khởi đầu tái bản, mà là trình tự axit nucleic đặc hiệu khởi động sự tái bản. Như là vector biểu hiện tái tổ hợp, vector có nhiều hình dạng khác nhau như plasmid, virus, cosmit, và dạng tương tự, có thể được sử dụng. Loại vector tái tổ hợp không bị giới hạn cụ thể miễn là vector này có thể dùng để biểu hiện gen mong muốn trong nhiều tế bào chủ khác nhau, như tế bào chưa có

nhân điển hình và tế bào nhân chuẩn và tạo ra protein mong muốn, nhưng vector có khả năng tạo ra protein ngoại lai có dạng tương tự với vector ở trạng thái tự nhiên trên quy mô lớn trong khi có trình tự khởi động có hoạt tính mạnh và khả năng biểu hiện mạnh có thể được ưu tiên.

Để biểu hiện protein của chủng VZV MAV/06 được mã hóa bởi một trình tự bazơ bất kỳ được chọn từ các trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 6 theo sáng chế, nhiều tổ hợp tế bào chủ/vector biểu hiện khác nhau có thể được sử dụng. Như là vector biểu hiện thích hợp cho tế bào nhân chuẩn, trình tự điều hòa biểu hiện thu được từ SV40, virus papilloma bò, adenovirus, virus liên hợp adeno, cytomegalovirus, và retrovirus, và các virus tương tự, có thể được sử dụng, nhưng sáng chế này không giới hạn ở chúng. Vector biểu hiện có thể sử dụng trong các tế bào chủ vi khuẩn có thể bao gồm plasmit vi khuẩn thu được từ *Escherichia coli* như pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, vector pUC, col E1, pCR1, pBR322, pMB9, và dẫn xuất của chúng, các plasmit có khoảng tế bào chủ rộng hơn như RP4, ADN thể thực khuẩn được minh họa bằng nhiều dẫn xuất lamda thể thực khuẩn khác nhau như λ gt10, λ gt11, NM989, và các thể thực khuẩn ADN khác như M13, thể thực khuẩn ADN kiểu sợi đơn, hoặc các dẫn xuất tương tự. Vector biểu hiện sẵn có trong các tế bào nấm men có thể là plasmit 2 μ C và dẫn xuất của nó. Vector hữu ích cho tế bào côn trùng có thể là pVL941.

Vector tái tổ hợp này có thể được đưa vào tế bào chủ để tạo ra thể biến nạp. Trong trường hợp này, tế bào chủ thích hợp có thể là tế bào chưa có nhân điển hình như *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* sp., *Pseudomonas* sp., *Proteus mirabilis*, hoặc *Staphylococcus* sp.. Thêm vào đó, tế bào chủ thích hợp này có thể là nấm như *Aspergillus* sp., nấm men như *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces* sp., và *Neurospora crassa*, tế bào nhân

chuẩn như tế bào nhân chuẩn bậc thấp, tế bào nhân chuẩn bậc cao, ví dụ, tế bào côn trùng, hoặc các tế bào tương tự.

Tốt hơn nếu tế bào chủ này có thể thu được từ thực vật và/hoặc động vật có vú. Cụ thể là, tế bào thận khi 7 (COS7), tế bào NSO, SP2/O, tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary: CHO), W138, tế bào thận chuột đồng con (baby hamster kidney: BHK), tế bào thận chó Madin-Darby (Madin-Darby canine kidney: MDCK), dòng tế bào u tủy, tế bào HuT 78, tế bào HEK293, và các tế bào tương tự, có thể được sử dụng, như sáng chế không bị giới hạn vào chúng. Cụ thể là, các tế bào CHO này có thể được ưu tiên hơn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến nạp vào tế bào chủ” có thể bao gồm phương pháp bất kỳ để đưa axit nucleic vào sinh vật, tế bào, mô hoặc cơ quan và được thực hiện bằng cách lựa chọn các kỹ thuật chuẩn thích hợp với tế bào chủ này như được biết trong lĩnh vực này. Các phương pháp này có thể bao gồm phương pháp điện di, phương pháp dung hợp tế bào trần, phương pháp kết tủa canxi phosphat (calcium phosphate: CaPO_4), phương pháp kết tủa canxi clorua (CaCl_2), phương pháp khuấy bằng cách sử dụng sợi silicon cacbua, phương pháp biến nạp qua trung gian agrobacterium, và biến nạp qua trung gian PEG-, dextran sulfat-, hoặc lipofectamin- và biến nạp bằng cách hút ẩm/ức chế, nhưng không giới hạn ở chúng.

Tế bào chủ được biến nạp, trong đó vectơ tái tổ hợp này được biểu hiện, được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng, sao cho protein của chúng VZV MAV/06 được mã hóa bởi bất kỳ một trong số các trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 6 theo sáng chế có thể được tạo ra trên quy mô lớn. Ở đây, môi trường chung và các điều kiện nuôi cấy có thể được lựa chọn một cách thích hợp theo tế bào chủ. Các điều kiện như nhiệt độ, độ pH của môi trường, thời gian nuôi cấy, và các điều kiện tương tự, có thể được kiểm soát một cách thích hợp cho sự sinh trưởng tế

bào trong thời gian nuôi cấy tế bào này và sự sản xuất sinh khối của protein này. Protein của chủng VZV MAV/06 được mã hóa bởi bất kỳ một trong số các trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 6 được tổng hợp tái tổ hợp như được mô tả trên đây có thể được thu hồi từ dịch dung giải của môi trường hoặc tế bào và có thể được tách ra và tinh chế bằng công nghệ tách sinh hóa chung (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Deutscher, M., *Guide to Protein Purification Methods Enzymology*, Vol. 182. Academic Press, Inc., San Diego, CA (1990)). Về công nghệ tách, điện di, ly tâm, lọc gel, kết tủa, thẩm tách, sắc ký (sắc ký trao đổi ion, sắc ký ái lực, sắc ký hấp phụ miễn dịch, sắc ký loại cỡ), tập trung đẳng điện, và nhiều phương pháp cải biến và phương pháp tổng hợp khác nhau của chúng, có thể được sử dụng, nhưng sáng chế không bị giới hạn vào chúng.

Theo một khía cạnh chung khác, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin chứa protein của chủng VZV MAV/06 được mã hóa bởi bất kỳ một trong số các trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 6 làm thành phần hoạt tính. Trong trường hợp này, chế phẩm vaccin này có thể chứa thêm tá dược được dụng. Tá dược bất kỳ có thể được sử dụng miễn là nó thúc đẩy sự tạo thành kháng thể ở thời điểm tiêm tá dược này vào cơ thể để nhờ đó đạt được mục đích của sáng chế. Cụ thể là, ít nhất một hợp chất được chọn từ muối nhôm ($\text{Al}(\text{OH})_3$ hoặc ALPO_4), squalen, sorbitan, polysorbat 80, CpG, liposom, cholesterol, monophosphoryl lipit (MLP) A, và glucopyranosyl lipit A (GLA) có thể được ưu tiên sử dụng, nhưng sáng chế không bị giới hạn vào chúng.

Theo sáng chế, trình tự bộ gen nguyên vẹn của chủng MAV/06 của virus Varicella-zoster được phân lập từ bệnh nhân Hàn Quốc được phân tích và so sánh với các trình tự bazơ của 23 chủng virus VZV, sao cho hiện tượng đa hình của chiều dài của bộ gen giữa các loài do sự biến dạng

của các trình tự lặp lại và điểm khởi đầu tái bản có thể được xác nhận. Thêm vào đó, trình tự nguyên vẹn của virus chủng VZV MAV/06 có thể củng cố nhận thức về các đặc điểm phân tử của các chủng virus vaccine VZV nhược độc qua nghiên cứu tin sinh học, nghiên cứu bộ gen so sánh, và các nghiên cứu tương tự.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết có dựa vào các ví dụ và các hình vẽ kèm theo. Tuy nhiên, phần ví dụ và các hình vẽ của sáng chế đã được mô tả với mục đích minh họa, nhưng phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi chúng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Giải trình tự ADN và virus

Chủng virus MAV/06 thu được bằng cách phân lập virus Varicella-zoster từ các nốt rộp của bệnh nhân Hàn Quốc 33 tháng tuổi bị nhiễm bệnh thủy đậu vào năm 1989 và nuôi cấy sơ bộ VZV đã phân lập trong tế bào phổi của phôi người (Hwang, K.K., Park, S.Y., Kim, S.J., Ryu, Y.W., & Kim, K.H., Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Varicella-Zoster Virus isolated in Korea. J. Kor. Soc. Virol. 21, 201-210, 1991).

Chủng virus MAV/06 nuôi cấy được nuôi cấy cấp hai 55 lần trong tế bào phổi lưỡng bội của phôi chuột lang và người ở nhiệt độ 34 đến 36°C, và qua các thử nghiệm về độ nhạy cảm tế bào và độ nhạy cảm với nhiệt độ, xác nhận được là chủng virus MAV/06 được nuôi cấy cấp hai đã được nhược độc (Hwang et al., Marker test for attenuation of varicella-zoster viruses isolated in Korea). Chủng virus nhược độc được gọi tên là 'MAV/06' và được sử dụng để tổng hợp Suduvax.

Chủng virus MAV/06 nhược độc được nuôi cấy cấp hai liên tiếp trong tế bào phổi lưỡng bội phôi người để tạo ra hạt virus chủ, và hạt virus chủ đã tạo ra này được nuôi cấy cấp hai liên tiếp để tạo ra hạt virus làm việc.

Thêm vào đó “Suduvax”, mà là vacxin cuối cùng, được tạo ra bằng cách sử dụng hạt virus làm việc đã được nuôi cấy cấp hai 5 lần, và việc phân tích trình tự được thực hiện bằng cách sử dụng vacxin cuối cùng này.

ADN được chiết từ nguồn dự trữ chủng virus MAV/06 ở nồng độ là 5,5µg/100µg bằng cách sử dụng mini kit ADN QIAamp (Macrogen). Trình tự ADN được xác định bởi hệ thống chuẩn Genome Sequence FLX của Roche Diagnostics.

23.722 đoạn trình tự có chiều dài trung bình là ~400bp thu được và các đoạn trình tự thu được này được lắp ghép và quan sát bằng cách sử dụng chương trình Consed (<http://bozeman.mbt.washington.edu/consed/consed.html>). Chất lượng trung bình của các đoạn trình tự là 99,99%. Tổng số 99,38% của 124.759 trình tự được bắt cặp với trình tự liên ứng dẫn xuất và mức độ bao phủ là 83 vùng đọc mỗi nucleotit. Các trình tự này được sắp xếp thẳng hàng so với 2 chủng virus tham chiếu Dumas (NC_001348) và Varilrix (DQ008354) và các khoảng trống giữa các contig được lấp đầy bằng cách giải trình tự PCR sử dụng các đoạn mồi thu được từ các contig liền kề.

Trình tự bộ gen nguyên vẹn hoàn chỉnh của chủng virus MAV/06 được đăng ký trong cơ sở dữ liệu ngân hàng gen NCBI (9 tháng 8, 2011) và được thể hiện bằng SEQ ID NO.1. Như được thể hiện trong SEQ ID NO.: 1, xác nhận được là bộ gen của chủng virus MAV/06 có chiều dài là 124.759 bp.

Ví dụ 2: phân tích khung đọc mở

Vị trí của các khung đọc mở (ORF) của chủng virus MAV/06 trong trình tự bộ gen hoàn chỉnh được quyết định bằng nghiên cứu Blast cho 2 chủng virus tham chiếu Dumas (NC_001348) và Varilrix (DQ008354). Có thể xác nhận được là số liệu thu được này bao gồm vị trí nucleotit thứ

nhất và cuối cùng của mỗi ORF trong bộ gen của chủng virus MAV/06 và hướng của ORF.

Thông tin ORF được kiểm tra bằng các chương trình phát hiện ORF như CLC Sequence Viewer (phiên bản 6.1 <http://www.cicbio.com/index.php>) và ORF Finder được cung cấp bởi NCBI. Khi các kết quả của nghiên cứu blast không trùng với các kết quả của chương trình phát hiện ORF, các trình tự nucleotit của các ORF tương ứng được kiểm tra bằng BioEdit Sequence Alignment Editor (khoa vi sinh, trường đại học bang Bắc Carolina, phiên bản 5.0.9 <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) và được sửa thủ công, nhờ đó xác định được các vị trí của các codon khởi đầu và kết thúc. Cuối cùng, tất cả các ORF đã được định vị đều được xác nhận bằng cách nhận dạng các trình tự axit amin đã được dịch mã.

Kết quả của phân tích đã đề cập trên đây được thể hiện trong các mục (1) đến (4) sau đây.

(1) Cấu trúc bộ gen của chủng virus MAV/06 và lập bản đồ ORF

Cấu trúc bộ gen của chủng virus MAV/06 là cấu trúc đặc trưng của chủng virus VZV ở chỗ bộ gen này có thể được chia thành 6 vùng, đó là TRL, UL, IRL, IRS, US, và TRS, và chiều dài của các vùng này lần lượt là 88bp, 104,799bp, 88bp, 7,267bp, 5,232bp, và 7,276bp.

Lượng G+C trong bộ gen của chủng virus MAV/06 xấp xỉ là 46,1%, và tổng chiều dài bộ gen này gần như tương tự với chiều dài của 24 chủng virus VZV. Các chủng virus VZV đã được phân tích trong sáng chế này, và số truy cập ngân hàng gen, chiều dài bộ gen, và lượng G+C của chúng được thể hiện trong bảng 1 sau đây.

Bảng 1: Thông tin về các chủng virus VZV được phân tích trong sáng chế

Chủng	Số truy cập	Quốc gia	Chiều dài (bp)							%G+C
			Bộ gen	TRI	UI	IRI	IRs	Us	TRs	
Dumas	NC001348	Hà Lan	124,884	88	104,836	88	7,320	5,232	7,320	46,0
M2DR	DQ452050	Morocco	124,770	89	104,719	89	7,320	5,232	7,321	46,0
CA123	DQ457052	Mỹ	124,771	100	104,698	98	7,322	5,232	7,321	46,0
SD	DQ479953	Mỹ	125,087	88	104,787	88	7,446	5,232	7,446	46,1
Ke1	DQ479954	Mỹ	125,374	88	104,857	88	7,555	5,232	7,554	46,2
11	DQ479955	Canada	125,370	88	104,906	88	7,529	5,232	7,527	46,2
22	DQ479956	Canada	124,868	88	104,689	88	7,386	5,232	7,385	46,0
03-500	DQ479957	Canada	125,239	88	105,299	88	7,266	5,232	7,266	46,1
36	DQ479958	Canada	125,030	88	104,850	88	7,387	5,232	7,385	46,1
49	DQ479959	Canada	125,041	88	104,916	88	7,358	5,232	7,359	46,1
8	DQ479960	Canada	125,451	89	105,020	88	7,510	5,232	7,512	46,2
32p5	DQ479961	Mỹ	124,945	88	104,760	88	7,389	5,232	7,388	46,1
32p22	DQ479962	Mỹ	125,084	88	104,791	88	7,443	5,232	7,442	46,1
32p72	DQ479963	Mỹ	125,169	88	104,870	88	7,446	5,232	7,445	46,1
NH29_3	DQ674250	Mỹ	124,811	87	104,766	87	7,320	5,230	7,321	46,0
SVETA	EU154348	Nga	124,813	87	104,772	87	7,319	5,230	7,318	46,0
MSP	AY548170	Mỹ	124,883	88	104,848	88	7,313	5,232	7,314	46,0
BC	AY548171	Canada	125,459	88	105,326	88	7,363	5,231	7,363	46,2
HJ0	AJ871403	Đức	124,928	89	104,752	89	7,335	5,230	7,433	46,0
pOka	AB097933	Nhật	125,125	88	104,798	88	7,463	5,225	7,463	46,1
vOka	AB097932	Nhật	125,078	88	104,822	88	7,427	5,232	7,421	46,1
VarilRix	DQ008354	Nhật	124,821	88	104,761	88	7,326	5,231	7,327	46,1
Varivax	DQ008355	Nhật	124,815	88	104,758	88	7,324	5,232	7,325	46,1
MAV06	Nghiên cứu này	Hàn Quốc	124,759	88	104,799	88	7,276	5,232	7,276	46,1

Chủng virus MAV/06 bao gồm 74 ORF. Được xác nhận là trong số các ORF này, 64 ORF là gen UL, và 4 ORF là gen US.

3 gen (ORF 62-64) trong IRS xuất hiện lặp lại theo hướng ngược

lại trong TRS (ORF 69-71), và trong số 74 ORF, 70 ORF xuất hiện theo hướng xuôi, 34 ORF xuất hiện theo hướng ngược. Thêm vào đó, hướng của các ORF được bảo tồn 100% trong các chủng VZV. Bản đồ ORF của chủng virus MAV/06 (được thể hiện là “Suduvax” trong tất cả các hình vẽ) được chỉ ra trong FIG.1.

(2) Phân tích cây phả hệ của chủng virus MAV/06

Dựa trên các trình tự nucleotit nguyên vẹn của các chủng virus nêu trong bảng 1, các cây phả hệ được lập ra bằng cách sử dụng phương pháp kết nối liền kề.

Trình tự nucleotit ORF của chủng virus MAV/06 được sắp xếp thẳng hàng nhiều lần với các trình tự nucleotit và các axit amin của 24 chủng VZV nêu trong bảng 1 đã được đăng ký trong cơ sở dữ liệu ngân hàng gen NCBI, theo cách của ClustalW (ver.2.0.1), sau đó sửa thủ công.

Các tệp kết quả thu được được sử dụng để lập cây phả hệ bằng cách sử dụng các chương trình Dnadist và chương trình lân cận nằm trong gói chương trình Phylip (phiên bản 3.69, <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). Ma trận khoảng cách thu được bằng Kimura-2 tham số. Phân tích cụm được thực hiện bằng phương pháp kết nối liền kề (neighbor-joining: NJ) và phương pháp hợp lý cực đại (maximum-likelihood: ML), và tệp cây phả hệ tạo thành được quan sát bằng chương trình Treeview (phiên bản 1.6.6). Ý nghĩa của các cây phả hệ được xác minh bằng phân tích tự khởi động. Các cây phả hệ được thiết lập từ 1000 bản sao được tạo ra bằng chương trình Seqboot và cây liên ứng được xác định bằng chương trình Consense.

Cây phả hệ được lập ra bằng phương pháp hợp lý cực đại (ML) dựa trên các trình tự nucleotit hoàn chỉnh. Kết quả là, các chủng virus (vOka, Varilrix, và Varivax) bao gồm chủng virus MAV/06, mà là các chủng virus của 4 vacxin virus nhược độc sống, tạo ra một nhóm, và chủng virus M2DR và 8 chủng virus tạo ra nhóm liền kề với nó, như được thể hiện

trong FIG.2. Ngoài ra, chủng virus CA123 độc lập tạo thành nhóm thứ ba, 11, 22, 03-500, và chủng virus HJ0 tạo ra nhóm thứ tư, và số còn lại của các chủng virus lâm sàng này tạo ra nhóm còn lại.

Như kết quả thu được bằng cách lập cây phả hệ sử dụng phương pháp hợp lý tối đa (ML) dựa trên các trình tự nucleotit không mã hóa, chủng virus MAV/06 được phân lập từ bệnh nhân Hàn Quốc và chủng virus Oka phân lập được từ bệnh nhân người Nhật tạo ra nhóm duy nhất (nhóm Japan-Korean (J-K)) như được thể hiện trong FIG.3. Chủng virus pOka được xếp vào trong 4 chủng virus vaccine (vOka, Varilrix, Varivax, và MAV/06) và 19 chủng virus lâm sàng trong cây phả hệ của 24 chủng virus VZV được phân lập dựa vào các trình tự nucleotit hoàn chỉnh và các trình tự axit amin chung nhưng được xếp vào các chủng virus vaccine trong cây phả hệ của 24 chủng virus VZV được tạo ra dựa vào các trình tự nucleotit không mã hóa. Nghĩa là, nói cách khác, được xác nhận là 4 chủng virus vaccine này (vOka, Varilrix, Varivax, và MAV/06) tạo ra nhánh phụ trong nhóm Japan-Korean (J-K) trong cây phả hệ của 24 chủng virus VZV được tạo ra dựa vào các trình tự nucleotit nguyên vẹn và các trình tự axit amin chung nhưng không tạo ra nhánh phụ trong cây phả hệ của 24 chủng virus VZV được tạo ra dựa vào các trình tự nucleotit không mã hóa.

Để xác nhận các ORF chính để phân biệt các chủng virus vaccine và các chủng virus lâm sàng với nhau, 74 cây phả hệ theo các ORF được thiết lập. Trong số này, các cây phả hệ đặc hiệu chủng virus vaccine được xác nhận trong 12 ORF, như được thể hiện trong FIG.4. Vì các ORF có khả năng tạo ra cây phả hệ đặc hiệu chủng virus vaccine nên có các ORF 0, 1, 6, 18, 31, 35, 39, 59, 62, 64, 69, và 71.

(2) Các trình tự lặp lại và phân tích đa hình chiều dài của bộ gen

Chiều dài của các ORF của các chủng virus VZV khó bị biến đổi. Có thể xác nhận được là trong số 74 ORF của các chủng virus VZV, gần

như không có sự khác biệt về chiều dài của ORF 63 giữa các chủng virus VZV. Như được thể hiện trong bảng 2 dưới đây, có thể xác nhận là sự đa hình của chiều dài của 3 ORF (ORF 11, 14, và 22) giữa các chủng này khá là cao do chiều dài của các trình tự lặp lại.

Bảng 2. Trình tự lặp lại của các chủng virus VZV

Chủng	Chiều dài (bp)									Xếp loại ⁴	Xếp loại ⁴
	R1	R2	R3	R4a	R4b	R5	R ¹	G ²	G-R ³	(R)	(G)
Dumas	303	326	72	146	146	200	1,193	124,884	123,691	9	10
M2DR	303	284	27	146	146	200	1,106	124,770	123,664	3	2
CA123	261	284	36	146	146	200	1,073	124,771	123,698	1	3
SD	258	326	72	281	281	200	1,418	125,087	123,669	16	17
Kel	321	326	72	389	389	200	1,697	125,374	123,677	21	22
11	225	326	225	362	362	200	1,700	125,370	123,670	22	21
22	195	284	72	200	200	200	1,151	124,868	123,717	8	8
03-500	225	284	657	92	92	200	1,550	125,239	123,689	20	20
36	321	326	72	227	227	200	1,373	125,030	123,657	13	13
49	321	410	54	200	200	200	1,385	125,041	123,656	14	14
8	258	620	36	335	335	200	1,784	125,451	123,667	23	23
32p5	243	326	54	227	227	200	1,277	124,945	123,668	12	12
32p22	291	326	36	281	281	200	1,415	125,084	123,669	15	16
32p72	291	326	117	281	281	200	1,496	125,169	123,673	19	19
NH29_3	258	326	51	146	146	200	1,127	124,811	123,684	4	4
SVETA	243	326	72	146	146	200	1,133	124,813	123,680	5	5
MSP	258	368	90	146	146	200	1,208	124,883	123,675	10	9
BC	258	326	612	200	200	200	1,796	125,459	123,663	24	24
HJ0	225	326	72	146	254	200	1,223	124,928	123,705	11	11
pOka	225	326	36	281	281	312	1,461	125,125	123,664	18	18
vOka	258	326	27	254	254	312	1,431	125,078	123,647	17	15
VarilRix	258	326	72	146	146	200	1,148	124,821	123,673	6	7
VariVax	258	326	72	146	146	200	1,148	124,815	123,667	6	6
MAV06	273	326	99	92	92	200	1,082	124,759	123,677	2	1
Avg	263,8	336,5	116,9	209,0	213,5	209,3	1,349	125,024	23,675		
Stdev	33,8	65,8	164,5	83,0	82,4	31,6	229,7	224,1	16,0		
CV	0,128	0,196	1,407	0,397	0,386	0,151	0,170	0,00179	0,00013		

¹Tổng số trình tự R²Chiều dài của bộ gen³Chiều dài của bộ gen sau khi mất các trình tự R⁴Xếp loại theo trật tự chiều dài từ ngắn nhất đến dài nhất

Nghĩa là, R1 được định vị trong ORF 11 và được tạo ra bằng cách kết hợp nhiều trình tự khác nhau của yếu tố 18-bp (liên ứng: GGACGCGATCGACGACGA) và yếu tố 15-bp (liên ứng:

GGGAGAGGCGGAGGA). Vì yếu tố 15-bp trong ORF 11 được lặp lại thêm ở chủng virus MAV/06, nên chiều dài của nó khác với chiều dài của chủng virus vacxin Oka.

Ngoài ra, R2 được định vị trong ORF 14 và định hình nhiều yếu tố 42-bp khác nhau (liên ứng: ACCTCGGCCGCTT/aCCCGAAAG/taCCCGATCCCGCCGTCGCGCC C, ở đây chữ cái thường thể hiện độ lệch nhỏ của tổng), và một phần của nó (yếu tố 32-bp) được bao gồm thêm trong R2. Ở chủng virus MAV/06, yếu tố 42-bp trong ORF-11 được lặp lại 7 lần như trong chủng virus vacxin Oka.

Ngoài ra, R3 được đặt ở trung tâm của đầu cùng 3 của ORF 22, và yếu tố 9-bp được sao chép lặp lại. Trình tự liên ứng của yếu tố 9-bp là GC/tCCGC/tG/cCA/g (ở đây, chữ cái thường thể hiện độ lệch nhỏ của tổng này). Số lượng bản sao (n) là rất khác nhau giữa các chủng. Ở chủng virus 03-500, số lượng bản sao là 73, và ở chủng virus vOka, số lượng bản sao là 3. Ở chủng virus MAV/06, số lượng bản sao của yếu tố 9-bp là 11, nhưng ở chủng virus Varilrix và Varivax, số lượng bản sao là 8.

Ngoài ra, R4 và R5 là các vùng không mã hóa. R4 được định hình là yếu tố 27-bp (liên ứng: CCCCCCGCATGGGGAGGGGGCGCGGTA), và một phần của nó (yếu tố 11-bp) được bao gồm thêm trong R4. R4 (R4a) được đặt giữa các ORF 62 và 63 trong IRS, và ngoài ra bỏ thể R4b được đặt giữa ORF 70 và 71 trong TRS. Chiều dài của R4a là giống như chiều dài của R4b, nhưng trong trường hợp của chủng virus HJ0, các chiều dài của R4a và R4b là khác nhau. Vì trong R4b của chủng virus HJ0, yếu tố 27-bp được lặp lại thêm 4 lần nên chiều dài của R4b dài hơn chiều dài của R4a 108bp. Trong trường hợp của chủng virus Varilrix và Varivax, yếu tố 27-bp được lặp lại thêm 5 lần. Trong chủng virus MAV/06, yếu tố 27-bp được lặp lại thêm 3 lần.

R5 được nằm giữa ORF 60 và 61 và được định hình là yếu tố 88-

bp bao gồm yếu tố 24-bp. Hai yếu tố này là khác với các trình tự lặp lại khác. Hai loại trình tự lặp lại có mặt. Chủng virus MAV/06 bao gồm 2 yếu tố 88-bp và một yếu tố 24-bp như hầu hết các chủng virus, nhưng các chủng virus vOka và pOka bao gồm 3 yếu tố 88-bp và hai yếu tố 24-bp.

Xác nhận được bằng cách so sánh chiều dài của các trình tự bộ gen của 24 chủng virus VZV có chiều dài của các trình tự lặp lại là hiện tượng đa hình của các chiều dài của bộ gen của các chủng virus VZV là do chiều dài của trình tự lặp lại này. Chủng virus BC bao gồm trình tự lặp lại dài nhất làm bộ gen dài nhất, nhưng chủng virus MAV/06 bao gồm trình tự lặp lại ngắn nhất thứ hai làm bộ gen ngắn nhất. Chiều dài (700bp) giữa bộ gen dài nhất và bộ gen ngắn nhất là tương tự với độ chênh lệch (724 bp) giữa trình tự lặp lại dài nhất và trình tự lặp lại ngắn nhất. Nếu trình tự lặp lại bị mất khỏi bộ gen, thì chiều dài của bộ gen này bị giảm cùng với sự thay đổi hệ số của biến (coefficient of variation: CV). Khi trình tự lặp lại này bị mất khỏi bộ gen nguyên vẹn, 0,000129 bị mất, và CV được tính toán bằng 0,00179.

Trên thực tế, như được thể hiện trong FIG.5, khi trật tự của chiều dài của bộ gen được thiết lập như trật tự của chiều dài của các trình tự lặp lại, hệ số tương quan (r^2) là 0,9854, mối quan hệ tuyến tính giữa chiều dài của bộ gen của các chủng virus VZV và các trình tự lặp lại này gần như được thiết lập.

(4) Điểm khởi đầu tái bản

Trình tự điểm khởi đầu tái bản (origin of replication: ORI) của chủng virus VZV được đặt giữa các ORF 62 và 63. Chiều dài của trình tự ORI ở chủng virus 36 là 80 bp và chiều dài của trình tự ORI trong chủng virus HJ0 là 108 bp vì số lần lặp lại của các dinucleotit TA và GA khi sắp xếp trình tự ORI là khác nhau.

Như được thể hiện trong bảng 3 sau đây, trình tự ORI ở chủng virus MAV/06 được đặt giữa các vị trí thứ 110.080 và 110.183 của bộ gen, và

15 lần lặp GA trước sau và 11 lần lặp TA trước sau được bao gồm trong đó.

Bảng 3

Bảng 3

Chủng	Khởi đầu	Kết thúc	Chiều dài	(TA) _n ¹	(GA) _m ²
Dumas	110,166	110,263	98	15	8
M2DR	110,052	110,149	98	15	8
CA123	110,050	110,147	98	15	8
SD	110,250	110,337	88	11	7
Kel	110,431	110,514	84	9	7
11	110,455	110,538	84	8	8
22	110,075	110,180	106	13	14
03-500	110,580	110,667	88	11	7
36	110,262	110,341	80	7	7
49	110,300	110,379	80	7	7
8	110,541	110,632	92	13	7
32p5	110,171	110,254	84	9	7
32p22	110,256	110,339	84	9	7
32p72	110,335	110,420	86	10	7
NH29_3	110,094	110,191	98	15	8
SVETA	110,101	110,194	94	13	8
MSP	110,176	110,265	90	12	7
BC	110,708	110,795	88	11	7
HJO	110,085	110,192	108	11	17
pOka	110,268	110,371	104	11	15
vOka	110,264	110,359	96	8	14
Var i l Rix	110,096	110,191	96	8	14
Var i Vax	110,093	110,190	98	8	15
MAVO6	110,080	110,183	104	11	15

¹Số lần lặp lại trước sau TA²Số lần lặp lại trước sau GA

Số lần lặp lại trước sau ở 110.235 vị trí của bộ gen là khác nhau,

nhưng ở chủng virus vaccine Oka và chủng virus MAV/06, nói chung, A được thế bằng G trong các lần lặp GA trước sau ở một vị trí trong số các vị trí nucleotit tương ứng với 110.235 vị trí trong chủng virus Dumas, là chủng virus tham chiếu. Trình tự ORI được nhân đôi bổ sung một cách chính xác giữa các ORF 70 và 71 ngoại trừ trong chủng virus HJ0 và Varilrix: (TA)³(GA)² bị mất ở chủng virus HJ0, và một lần lượt GA trước sau bị mất ở chủng virus Varilrix.

(5) Phân tích các đặc điểm của ORF của chủng virus MAV/06

Chiều dài của ORF0 của chủng virus MAV/06 được tăng lên do đột biến. TGA (vị trí nucleotit thứ 388-390), là codon kết thúc, bị đột biến thành CGA mã hóa arginin (Arg). TGA được dự đoán là codon kết thúc được phát hiện ở vùng kết thúc thấp hơn bị chồng lấp với ORF1. ORF0 mở rộng mã hóa protein mới có 221 gốc axit amin. Cùng một đột biến được xác nhận ở các chủng virus vaccine vOka, Varilrix, và Varivax tương tự khác (FIG.6).

Trong số tất cả các chủng virus lâm sàng, chủng virus pOka bao gồm ORF0 mã hóa 129 axit amin và có chiều dài 390 bp.

Như so với chủng virus Dumas là chủng virus tham chiếu, vì TCT ở vị trí thứ 658 đến 660 và TCA ở vị trí thứ 367 đến 369 lần lượt bị mất khỏi ORF17 (SEQ ID NO.3) và ORF56 (SEQ ID NO: 5) của chủng virus MAV/06, chiều dài của ORF17 và ORF56 bị ngắn đi 3 bp (các FIG.7 và 8). Tất cả các mất đoạn được đề cập trên đây gây ra sự mất gốc axit amin serin (S). Mặt khác, trong ORF60 (SEQ ID NO: 6) của chủng virus MAV/06, ba nucleotit (ATG) được thêm vào ở vị trí thứ 28 (FIG.10). Đáng quan tâm là, một đoạn thêm vào và 2 đoạn mất được phát hiện ra ở tất cả các chủng virus vaccine Oka kể cả chủng virus pOka.

Ngoài ra, ở chủng virus MAV/06 cũng như chủng virus vaccine Oka, chiều dài của ORF19 (SEQ ID NO.: 4) là ngắn hơn so với chiều dài của ORF29 ở chủng Dumas và hầu hết các chủng virus lâm sàng 15bp

(AACATTTCAGGGTCA). Chủng Dumas, mà là chủng virus tham chiếu, và hầu hết các chủng virus lâm sàng bao gồm tiếp tục và lặp lại trình tự 15bp. Trong M2DR, CA123, và 8 chủng virus lâm sàng, chiều dài của ORF60 là giống như chiều dài của ORF60 ở chủng virus vắc xin Oka và chủng virus MAV/06 (FIG.9).

Danh mục trình tự được viện dẫn

SEQ ID NO. 1 là trình tự của ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06.

SEQ ID NO. 2 là ORF0 của ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06.

SEQ ID NO. 3 là ORF17 của ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06.

SEQ ID NO. 4 là ORF29 của ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06.

SEQ ID NO. 5 là ORF56 của ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06.

SEQ ID NO. 6 là ORF60 của ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein của chủng VZV MAV/06 gây ra đáp ứng miễn dịch chống lại virus Varicella-zoster (Varicella-zoster virus: VZV), trong đó protein này được mã hóa bởi khung đọc mở của ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06 được chọn từ nhóm bao gồm ORF0 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO. 2, ORF17 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO. 3, ORF29 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO. 4, ORF56 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO. 5, và ORF60 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO. 6.

2. ADN bộ gen của chủng virus Varicella-zoster (Varicella-zoster virus: VZV) MAV/06 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO. 1, mã hóa protein theo điểm 1.

3. Khung đọc mở (open reading frame: ORF) của ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06 được chọn từ ORF0 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO. 2, ORF17 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO. 3, ORF29 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO. 4, ORF56 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO. 5, và ORF60 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO. 6, mã hóa protein theo điểm 1.

4. Vectơ biểu hiện tái tổ hợp chứa: ADN bộ gen của chủng VZV MAV/06 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc ORF được chọn từ ORF0 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO. 2, ORF17 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO. 3, ORF29 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO. 4, ORF56 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO. 5, và ORF60 có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO. 6.

5. Tế bào chủ để tổng hợp protein theo điểm 1, được biến nạp vector biểu hiện tái tổ hợp theo điểm 4.

6. Tế bào chủ theo điểm 5, trong đó tế bào này được chọn từ tế bào động vật, tế bào thực vật, nấm men, *Escherichia coli*, và tế bào côn trùng.

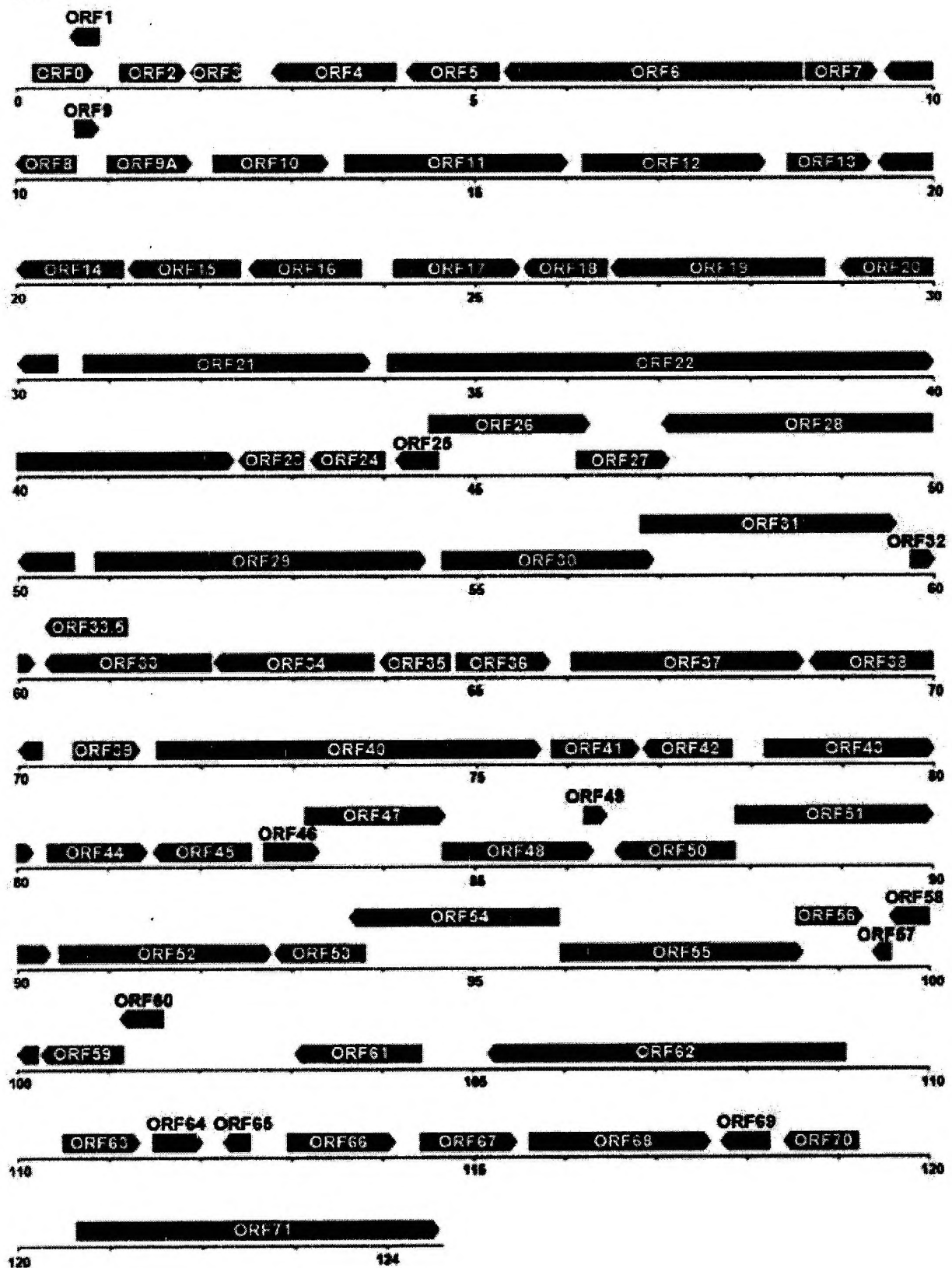
7. Tế bào chủ theo điểm 6, trong đó tế bào này được chọn từ tế bào thận khỉ 7 (COS7), tế bào NSO, tế bào SP2/O, tế bào trứng của chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary: CHO), tế bào WI38, tế bào thận của chuột đồng con (baby hamster kidney: BHK), tế bào thận của chó Madin-Darby (Madin-Darby canine kidney: MDCK), dòng tế bào u tủy, tế bào HuT 78, tế bào HEK293, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* sp., *Pseudomonas* sp., *Proteus mirabilis* hoặc *Staphylococcus* sp., *Aspergillus* sp., *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces* sp., và *Neurospora crassa*.

8. Chế phẩm vaccin virus herpes zoster và thủy đậu, khác biệt ở chỗ, chế phẩm này chứa protein của chủng VZV MAV/06 theo điểm 1 làm thành phần hoạt tính.

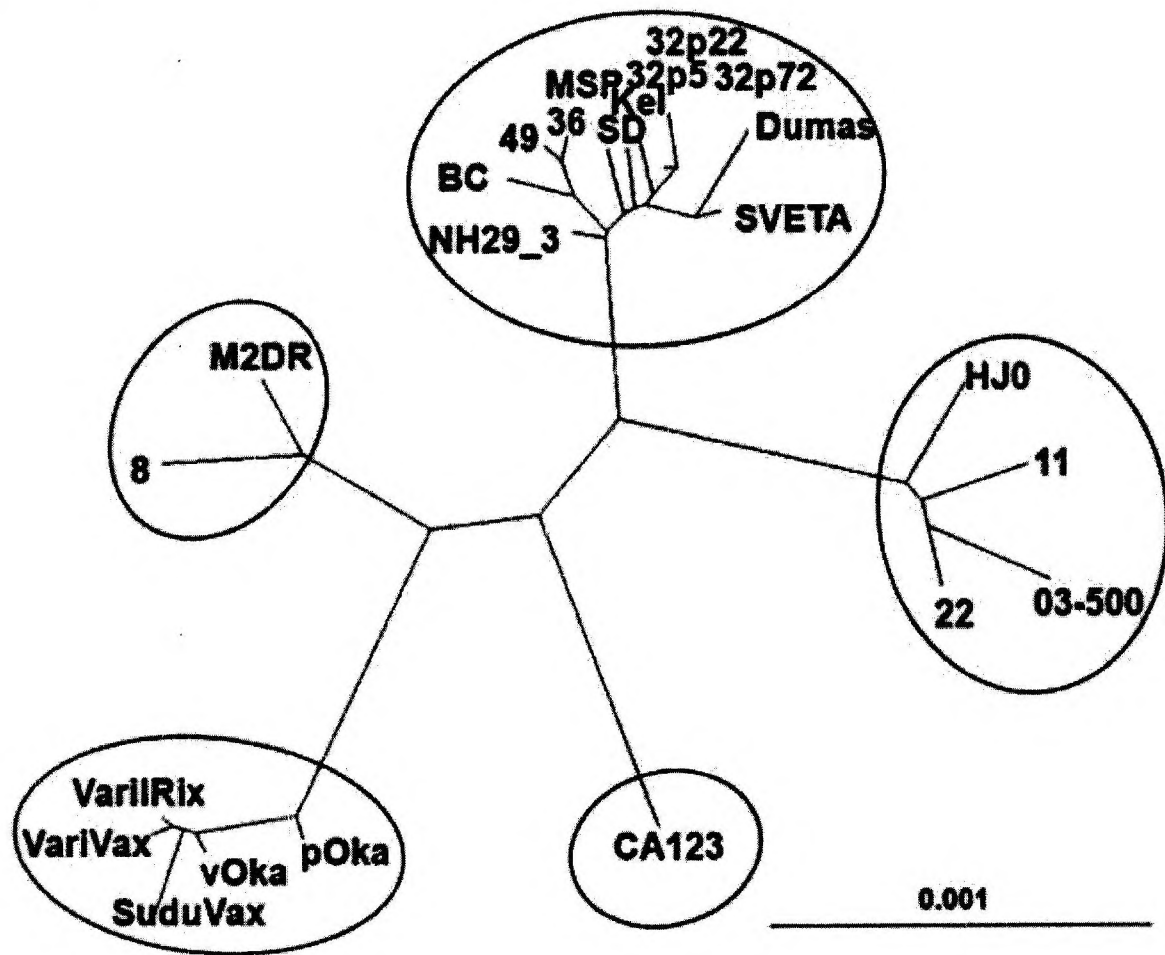
9. Chế phẩm vaccin theo điểm 8, trong đó chế phẩm này chứa thêm tá dược được dùng để thúc đẩy sự tạo thành kháng thể ở thời điểm tiêm tá dược này vào cơ thể.

10. Chế phẩm vaccin theo điểm 9, trong đó tá dược này là ít nhất một tá dược được chọn từ muối nhôm ($\text{Al}(\text{OH})_3$ hoặc ALPO_4), squalen, sorbitan, polysorbate 80, CpG, liposome, cholesterol, monophosphoryl lipid (MPL) A, và glucopyranosyl lipid A (GLA).

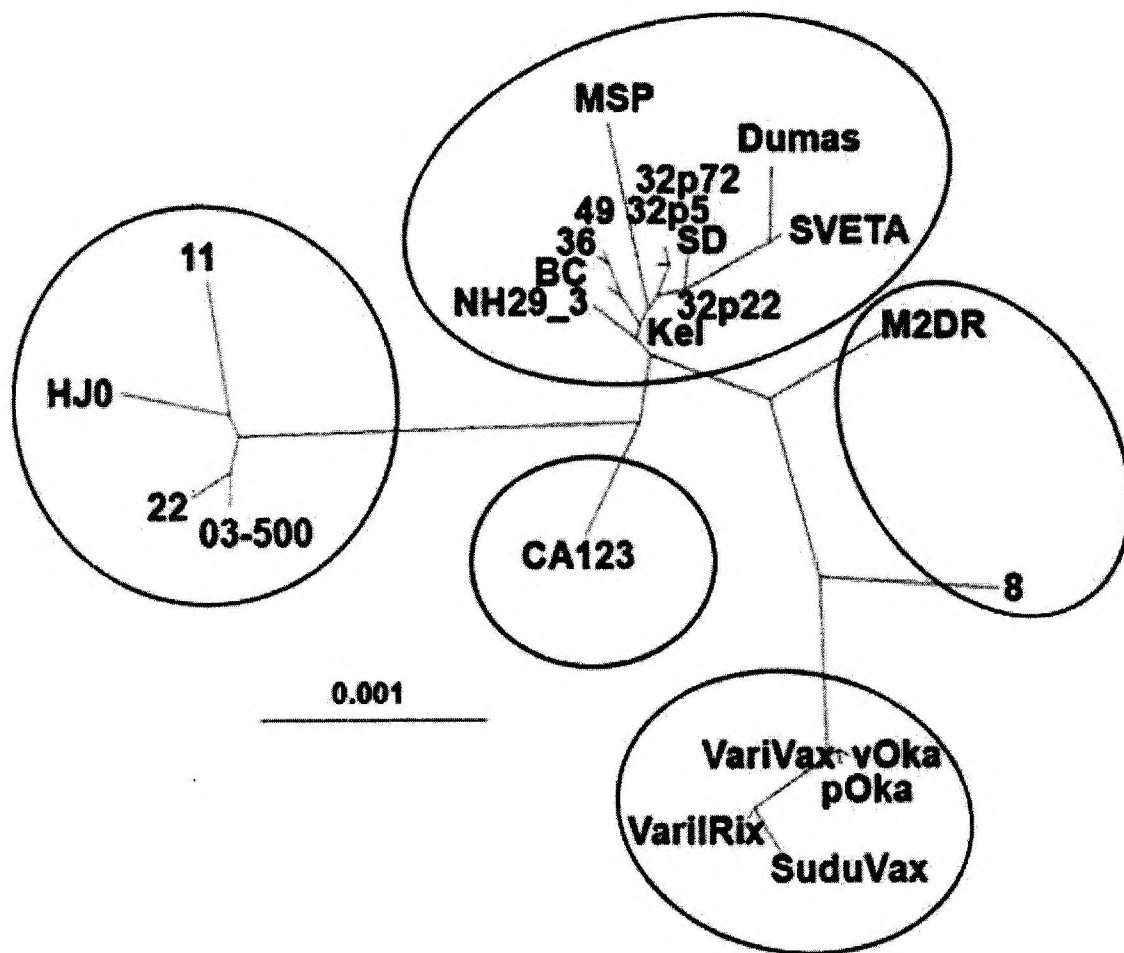
【FIG. 1】



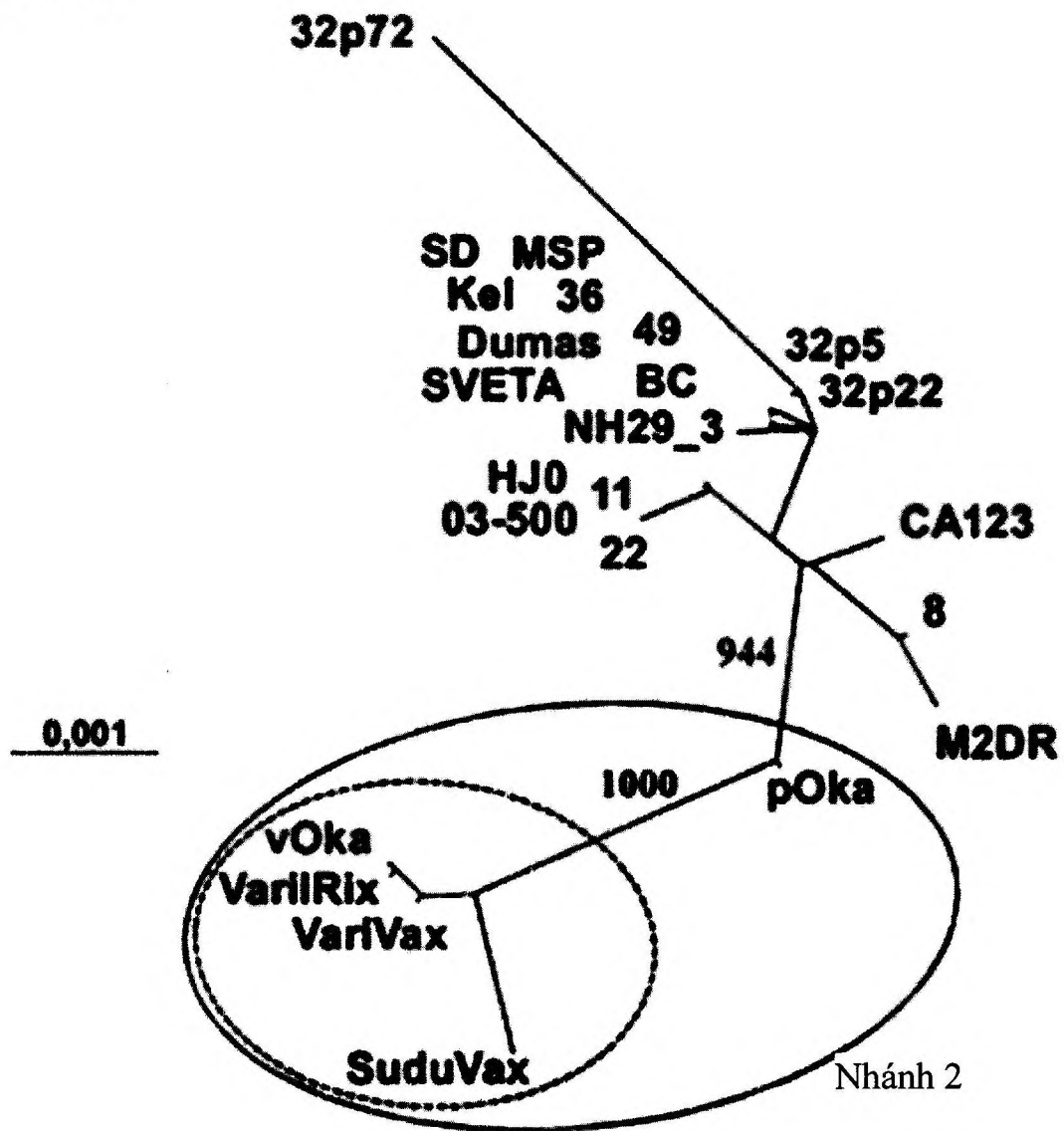
【FIG. 2】



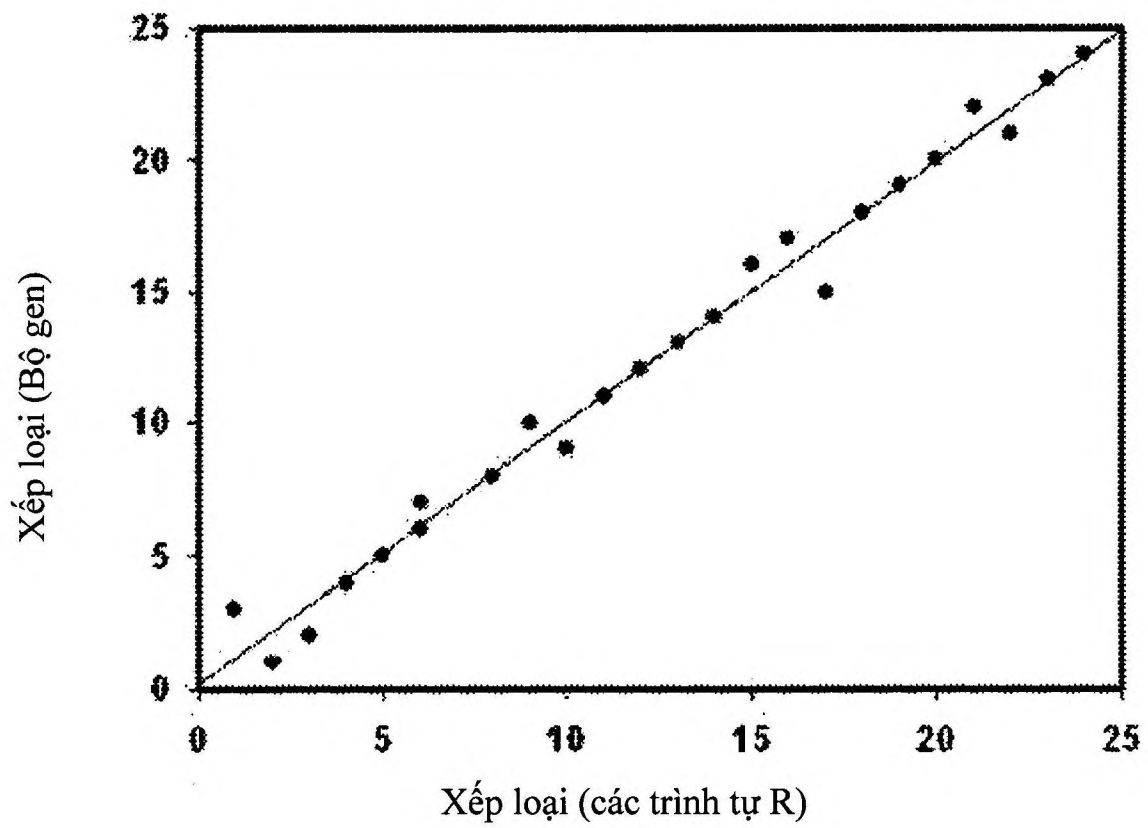
【FIG. 3】



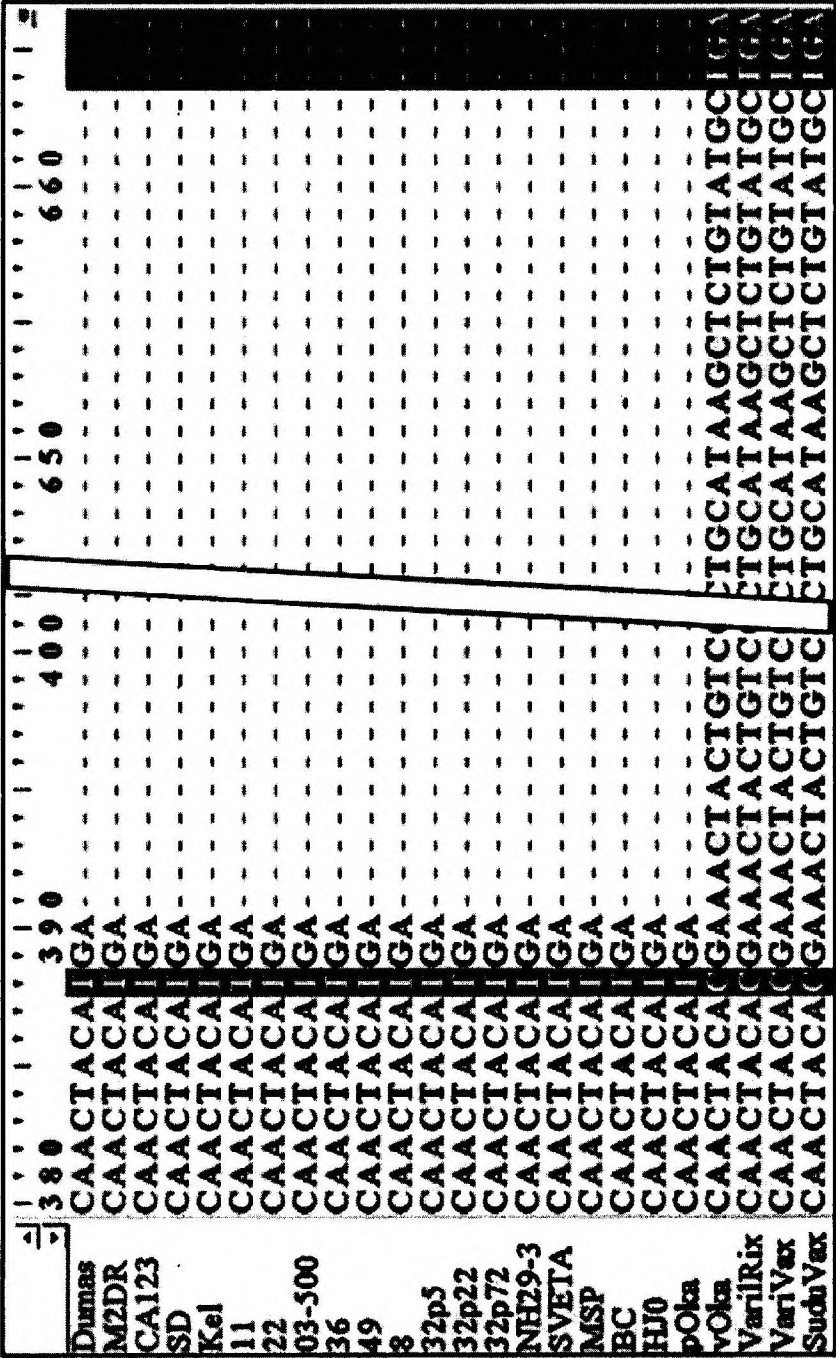
【FIG. 4】



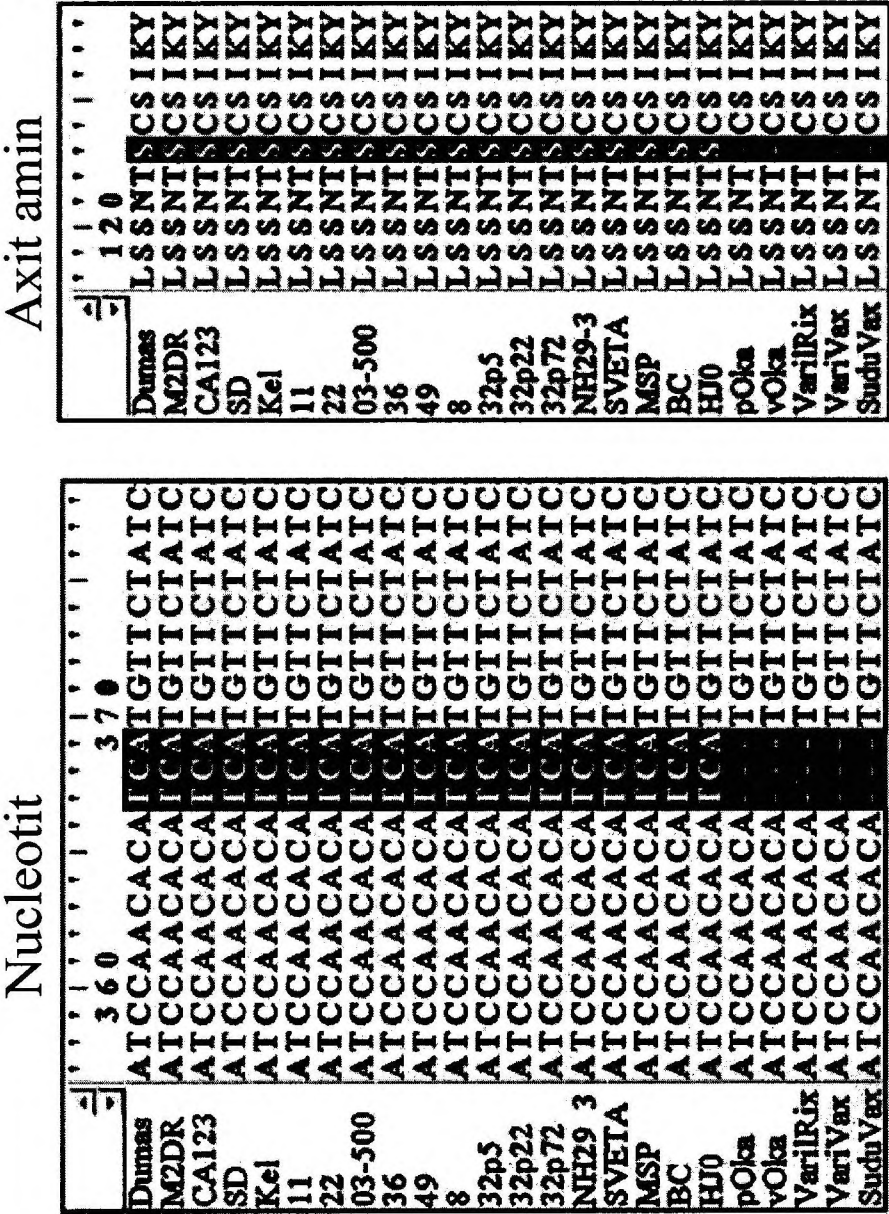
【FIG. 5】



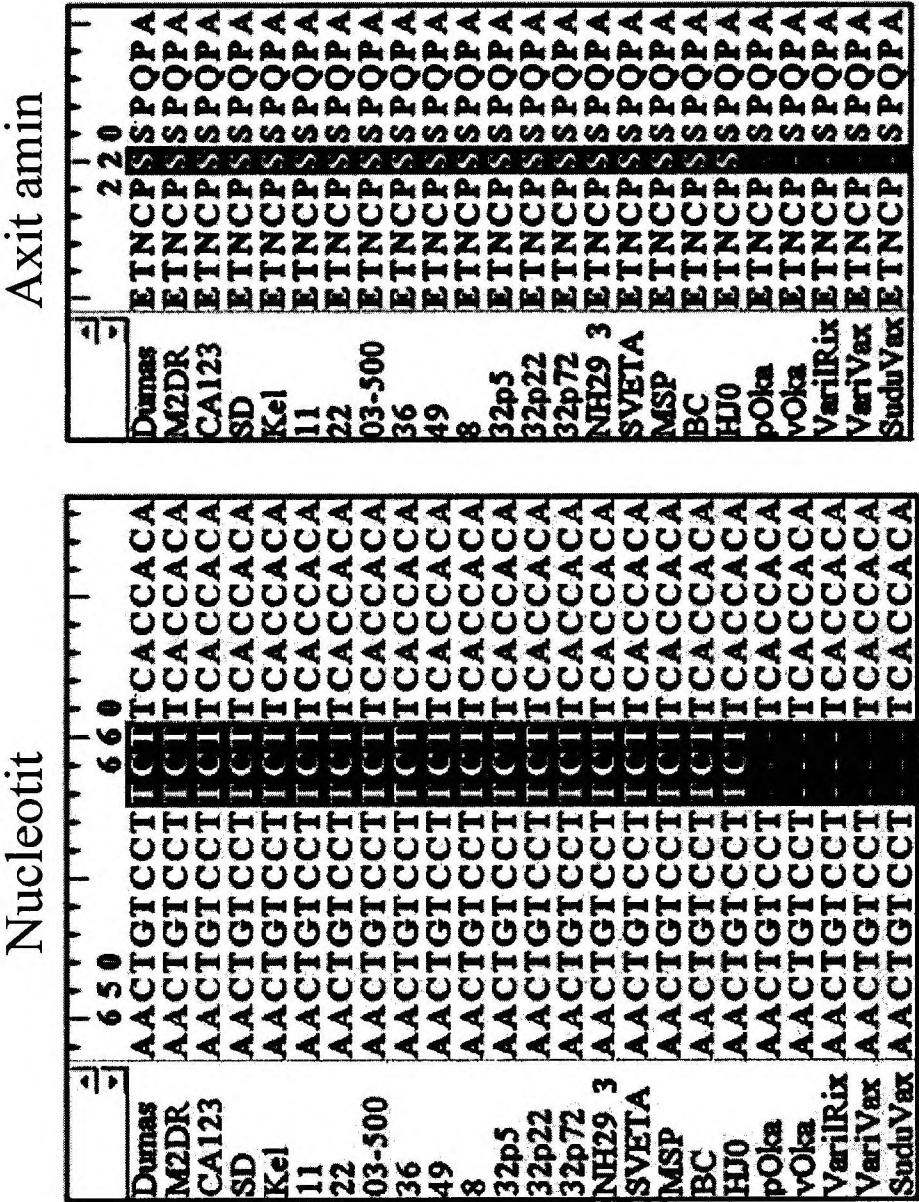
【FIG. 6】



【FIG. 7】



【FIG. 8】

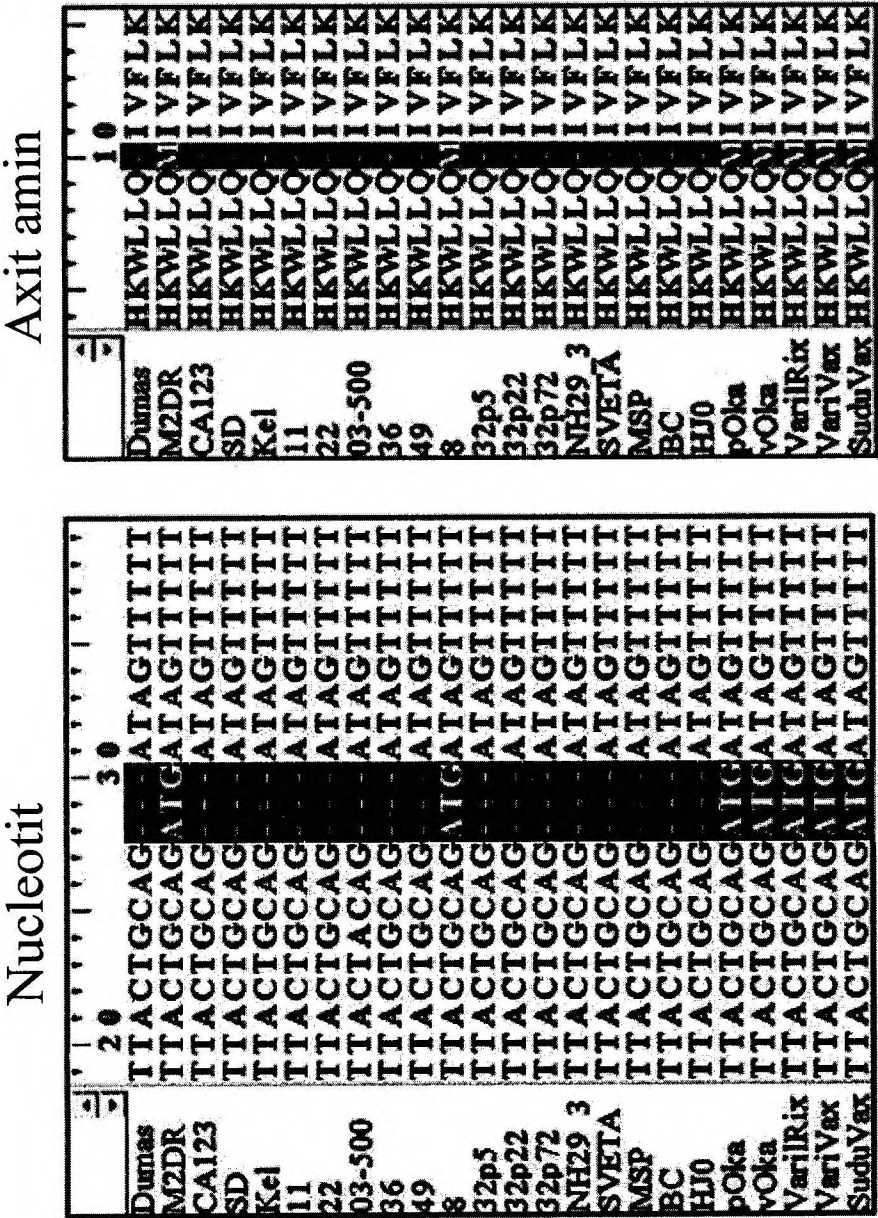


Axit amin

Nucleotit

	3490	3500	3510	3520		1170
Dumas	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
M2DR	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
CA123	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
SD	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
Kel	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
11	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
22	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
03-500	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
36	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
49	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
8	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
32p5	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
32p22	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
32p72	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
NH29 3	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
SVETA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
MSP	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
BC	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
HJO	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
pOka	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
wOka	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
VariRix	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
VariVax	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL
SuduVax	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	AACATTTTCAGGGTCA	ACTGTC	LNI S GS	TV P GL

【FIG. 10】



>MAV/06

GGCCCAGCCCTCTCGCGGCCCCCTCGAGAGAGAAAAAAGCGACCCACCTCCCCGC
 GCGTTTGCGGGGCGACCATCGGGGGGATGGGATTTTTTGCCGGGAAACCCCCCGCCA
 GCCTTTAAACAAAACCCGCGCCTTTTTCGCTCCACCCCTCGTTTACTGCTCGGATGGCCACC
 GTGCACTACTCCCGCCGACCTGGGACCCCGCCGGTCACCCCTCACGTCGTCGCCCGGCATG
 GATGACGTTGCGACCCCCATTCCCTACCTACCCACATACGCCGAGGCCGTGGCAGACGCG
 CCCCCCCTTACAGAAGCCGCGAGAGTCTGGTGTCTCCCCGCCTTTTTCTCACGTG
 GAGAATGGCACCACCCAACAGTCTTACGATTGCCTAGACTGCGCTTATGATGGAATCCAC
 AGACTTCAGCTGGCTTTTCTAAGAATTCGCAAATGCTGTGTACCGGCTTTTTTAATTCTT
 TTTGGTATTCTCACCCTTACTGCTGTCGTGGTCGCCATTGTTGCCGTTTTTCCCGAGGAA
 CCTCCCAACTCAACTACACGAACTACTGTCCGGAAGGGGAAGGTATTTATTCTCGCTTG
 CAGCTTGTGCGCGCTGTATGCACAACAAAAGCTATATATGTCACCAAAGCCAACGTCGCC
 ATCTGGAGTACTACACCCAGTACATTGCATAACCTGTCCATCTGCATTTTCAGTTGCGCG
 GACGCCTTTCTCCGGGATCGTGGCCTTGGGACATCAACCAGCGGAATAAGAACCGCCGGT
 GGTCTTGCCCGAACGACGAGTGGCGACGCGTTGTTCTGCATAAGCTCTGTATGCTGATAC
 ATAAACACAGAGTCTGTATCGCTATCAGATTCGGAACACCTTCCGGTACCCCATACTCC
 GATACCTGGACATTGCGGATCCCAAAAATATAATATTAACAGGATTTGCTTATACTTTG
 CTACAGCTTATATAAATTTATGTGCGATACATCTTAAGTGCATCCGTACGTTATTTATAC
 ATTGCCTGTACGTGAAAAGACTGTGTTACCCAATAAAGGTTCTACAAAAAATGCTTTAT
 TGGGTGTTTGTTTAATAGCTATTATCGTAACCCACCCCGTAAAATCATAAAATGCATGT
 AATTTCTGAGACACTTGCAATATGGGCATGTTCCCGCATTTATTATGGGCTCCACTCTGGT
 GCGTCCCAGTTTAAACGCCACCGCCGAGGAAAATCCCGCGTCAGAAACGCGATGTTTATT
 ACGAGTGCTTGCGGGGAGAACTGTAGACCTGCCAGGCGGAGGAACGTTACACATTACCTG
 TACCAAAACCTATGTAATTATTGGCAAATATAGCAAACCCGCGAACGTCCTTAGCCTTGC
 CCGTCTAATAGGGCGTGCAATGACGCCTGGAGGTGCAAGGACATTTATTATTTTGGCGAT
 GAAGGAAAAGCGATCCACAACGCTTGGGTATGAATGTGGTACGGGCTTGCAATTTACTGGC
 TCCATCTATGGGTACATTTCTCCGCACACACGGTTTAAGTAACAGAGATCTCTGTTTATG
 GCGGGGTAATTTTATGATATGCATATGCAACGTCTTATGTTTTGGGAGAATATCGCGCA
 AAATACCACTGAAACACCTTGTATAACGTGACGTTAACATGCAACTTGACAGAAGACTC
 TGGTGAAGCCGCACTTACCACGTGACACCGACCCACTCTCCCAACCCTAACAGCCCAAGG
 AAGACCAACAGTTTCCAACATTCGTGGAATATTGAAAGGATCCCCCGTCAACAGCCGGT
 CTGTCACCGGGTTAGATTTGCCGAACCTACGAGGGCGTATTGATGTAATCACTAAATAA
 AATACACCTTTTTTTCGATTGTACGTATTTTTTATTTAAATGTGTAGTTCATAGTCCGCCGA
 CAGCCGCTCGGGCTTTTCCCCACATACAACATGATCGTATGCCTCGGATGCACCGGTCC
 AACACTCCGCCGAGAAGGGGGATTACAATGACAGTGATACCCAATAGCCGCCAGATGTA
 CACCCAGCTGTCCGGACTCCAGCATCATCTGCTGAGTTGCGGCGCTGAAGGGTGCATCGC
 ATAGGGTGTTATAATTAGCCATTTCCGGTAACAGTCGTTGGGAATTTAGGAGGCTGCAAA
 ACGGCTGTAGGTCAACATACATTGGGGATTGAGATGGTTTATCTCGACGTCCAAGTCCAA
 TCAAAAAAGCGTGTAATCATCAGCCCGGCCGATGTTGCTCGAAGAGCACATAACCTCT
 TAACACCGTACAGAGGGGATGGCGTCGGTGCATGTGAGTTGGCAGGGCATGTCCACGTTG
 TTTCCAACGCCAGTGGCGGTATAACTTGTGTAACGACGCCAACGGGTGAGTTTAAGAT
 TCACTCGGATGGGTGACTGCTTTCCGGAAGCTCCCGTTGTATCCATTAATTAACGTTG
 GTACACGTCTGGTGTGTGTTTTACCCGAATCAGAGACGGAATTGCAAAGATATCGGTTTG
 AAAGCAATGTAATCCCGCCCATATATCCCAACGTCGCCTTAAAACTCCACAATATTA
 CATTTTTATTAGTCTTTTATTAATATAGAATCACATAAACAATTGATAAAATCAAGGGGT
 GGTGTATAATGATTAAAAATATAAATTGATATGTTTTACAAGCATGAAATAGGTATTTAC
 TATTCTAACAGGTAAATATGCTTAATGATTAAAAATACAAATTAGTATGTTTTGACAAGC
 ATGAAAAAGGTATTTTTTATTTTAGCAGTTAAAGGTACTACACTTAAATATTTACCGTA
 TGGACGGGCGTCAGAAAGATGCCCCGCCCAAGTTGAGAGGGTACATTCAACACGACCACA
 CTCGCGTTGGTGGGTGATTAGGGCCTCTAAACACCGGCCAGACATGACCCGGGTGTATA
 TTCTTGTAACACTTGAACGTTACAACCTGATATCATCATTTCCACAAATTTAGAGCCACG
 GACAACTATATTAGCAATGCGGGCAATCATAACAAACATATAAGTAGTAATACACGTGAT

>ORF0

ATGGCCACCGTGCACTACTCCCGCCGACCTGGGACCCCGCCGGTCACCCTCACGTGCTCC
 CCCGGCATGGATGACGTTGCGACCCCATTCCTACCTACCCACATACGCCGAGGCCGTG
 GCAGACGCGCCCCCCCCCTTACAGAAGCCGCGAGAGTCTGGTGTTCTCCCCGCTCTTTTT
 CCTCACGTGGAGAATGGCACCACCAACAGTCTTACGATTGCCTAGACTGCGCTTATGAT
 GGAATCCACAGACTTCAGCTGGCTTTTCTAAGAATTCGCAAATGCTGTGTACCGGCTTTT
 TTAATTCTTTTTGGTATTCTCACCCTTACTGCTGTCTGGTCGCCATTGTTGCCGTTTTT
 CCCGAGGAACCTCCCAACTCAACTACACGAACTACTGTCCGGAAGGGGAAGGTATTTAT
 TCTCGCTTGCAGCTTGTGCGCGGTGTATGCACAACAAAAGCTATATATGTCACCAAAGCC
 AACGTCGCCCATCTGGAGTACTACCCAGTACATTGCATAACCTGTCCATCTGCATTTTC
 AGTTGCGCGGACGCCTTTCTCCGGGATCGTGGCCTTGGGACATCAACCAGCGGAATAAGA
 ACCGCCGGTGGTCTTGCCCGAACGACGAGTGCGCAGCGCTTGTTCTGCATAAGCTCTGTA
 TGCTGA

>ORF17

ATGGGGCTCTTTGGACTGACACGCTTTATCCATGAACATAAACTGGTTAAACCCAGCATC
 ATTTCAACGCCACCCGGAGTTTTAAACCCCGTGGCGGTAGACGTATGGAACGTATGTAC
 ACATTGTTGGAACGTTTATACCCTGTGGGTAAACGCGAGAATTTACACGGACCATCTGTA
 ACGATACATTGTCTTGGAGTCTTATTGCGGCTATTAACACAACGGTCATACTATCCGATA
 TTTGTATTGGAACGTTGTACAGACGGCCATTATCACGTGGAGCCAAGGCAATTATGTCA
 CGGGCCATGAACCACGATGAAAGGGGAACCTCGGACTTAACCCGTGTTCTACTATCATCC
 AACACATGTTCTATCAAGTATAACAAAACATCGGAAACATATGACAGTGTGTTTCGAAAC
 TCTTCCGCGAGTTGTATTCTAGCGAAGAAAACAAATCCCAGGATATGTTTTTGGACGGT
 TGTCACGACAAACTGACAAGATGATCTGCCTGCGCGACCAAACGTATGCAGTCTTACC
 TCTACAATGCCATCCCGAGGACATCCTAACCATCGATTATATCACAAATTGTGTGCAAGT
 CTTATTAGATGGATGGGGTATGCATACGTGAGGCGGTTGACATTGAGGCGGACGAGGCA
 TGTGCAAACCTTATTTTCATACGCGTACAGTGGCTTTGGTTTATACGACAGATACTGATTTA
 CTCTTCATGGGCTGTGATATTTTGTAGATGCAATTCCTATGTTTGCTCCAGTAGTACGA
 TGTCGCGATTTGCTTCAATATTTAGGAATTACATACCCTGAATTTTTGGTTGCCTTTGTT
 CGCTGTCAGACCGATTTGCATACAAGTGACAACCTAAAATCTGTTGAGCAAGTTATTAG
 GATACCGGCCTGAAAATTCCACATCAAATGGACACTTCAACGCGCTCCCCACTTACGAC
 TCGTGGAGACATGGCGAGGTTTTCAAAGTCTTACCGTAGCCACGTGCGGTAAACAGAA
 AACGGAGTGTCCGTTTCAAATATGCATCTAACCGATCGGAGGTGACAGTAGACGCCAGT
 TGGGCTTTAAACCTTCTGCCACCCTCATCCTCCCCATTGGATAATTTGGAACGCGCATTT
 GTTGAACATATAATCGCCGTGGTAACTCCATTGACCCGCGGTGCGCTAAAGTTAATGAAA
 CGTGTAATATTATGCAAAATACGGCAGACCCATATATGGTTATTAACACCTTATATCAT
 AACTTAAAGGGGGGAAAAAATGGCTCGCCAATACGCACGTATTTTTAAACAGTTTATTCCT
 ACTCCACTCCCCTAAACACTGTATTAACAAAATATTGGAATTAA

>ORF29

ATGGAAAATACTCAGAAGACTGTGACAGTGCCACGGGGCCCTGGGTTACGTTTATGCG
 TGCCGGGTTGAAGATTTGGATCTGGAGGAAATTTCATTTTTGGCCGCTCGTAGCACGGAC
 TCTGATTTGGCTTTATTACCTTTGATGCGTAATTTGACCGTGGAAGAACTTTTACATCC
 AGCCTGGCGGTGGTTTCTGGAGCACGCACTACGGGTCTTGCCGGAGCTGGTATTACCTTA
 AAACCTCACTACCAGTCATTTCTATCCATCTGTCTTTGTCTTTCACGGAGGCAAACACGTT
 TTACCCAGCTCTGCGGCCCAAATCTCACACGCGCGTGTAACGCGGCTCGAGAACGGTTT
 GGGTTTTACGCTGCCAAGGGCCTCCTGTTGACGGTGCTGTTGAGACGACCGGCGCTGAG
 ATATGCACCCGCCTTGGATTAGAGCCAGAAAATACAATATTATACTTGGTGGTCACGGCA
 TTGTTTAAGGAAGCCGTATTTATGTGCAACGTGTTTCTGCATTATGGAGGACTCGATATT
 GTTCATATTAACCATGGGGATGTTATACGTATACCGTTATTTCCGGTACAACCTTTTCATG
 CCCGATGTTAACCGTCTGGTACCCGACCCATTCAACACTCATCACAGGTCTATCGGAGAG
 GGTTTTGTATACCAACACCCTTTTATAACACCGGGTGTGCCATTTAATACATGACTGT
 GTTATTGCTCCCATGGCCGTTGCCTTGCGCGTCAGAAATGTAAGTGGCGTCGCCCCGAGGA
 GCGGCCACCTTGCTTTTGATGAAAATCACGAGGGGGCAGTACTCCCCCTGACATTACG

TACACGTATTTTCAGTCCTCTTCAAGTGGAACCACTACCGCCCGTGGAGCGCGTCGAAAC
 GATGTCAACTCCACGTCTAAGCCTAGCCCATCGGGGGGTTTGAAAGACGGTTGGCGTCT
 ATTATGGCCGCTGACACAGCCTTGACGCAGAAAGTTATATTCAACACTGGAATTTACGAA
 GAAACTCCAACAGATATCAAAGAATGGCCAATGTTTATAGGCATGGAGGGCACTTTGCCA
 AGGCTAAACGCTCTGGGGTCATATACCGCTCGTGTGGCCGGGGTCATTGGTGCGATGGTT
 TTCAGCCCAAATTCTGCGTTGTATCTAACTGAGGTGGAGGATAGCGGGATGACCGAAGCC
 AAGGATGGGGGACCGGGTCCATCATTTAATCGATTTTACCAGTTTGCCGGACCTCATTTA
 GCTGCGAATCCCCAACAGATCGAGATGGCCACGTTCTATCCAGTCAGTCTACGGGTTCA
 TCAAACACAGAGTTTAGCGTGGATTATTTGGCACTCATTTGTGGATTGGAGCACCCCTG
 TTGGCGCGACTGCTTTTTATCTAGAACGCTGTGACGCTGGTGCGTTTACAGGGGGTCAC
 GGGGATGCGTTAAAATATGTTACGGGGACCTTTGACTCTGAAATTCCATGTAGTTTATGT
 GAAAAACACACGCGGCCGGTATGCGCTCACACAACAGTACACCGACTTAGACAACGCATG
 CCGCGATTTGGACAAGCCACCCGTCAACCTATTGGGGTGTTTGAACAATGAACAGCCAA
 TATAGCGACTGCGATCCTCTAGGAACTATGCTCCATATTTAATCCTTCGAAAACCCGGG
 GATCAAACGGAAGCAGCAAAGGCAACCATGCAGGACACTTATAGGGCTACACTAGAACGC
 TTGTTTATCGATCTAGAACAAGAGCGACTACTGGATCGCGGTGCCCCATGTTCTTCCGAG
 GGACTATCGTCTGTCAATTGTGGATCATCCAACGTTTCGTCGCATATTAGACACACTGCGT
 GCGCGTATAGAACAGACAACAACACAATTTATGAAAGTGTTGGTTGAGACCCGCGATTAT
 AAGATCCGTGAAGGATTATCCGAAGCCACCCATTCAATGGCGTTAACGTTTGATCCATAC
 TCAGGAGCATTTTGTCCCATTACCAATTTTTTAGTTAAACGAACACACCTAGCCGTGGTA
 CAAGACTTAGCATTAAAGCCAGTGTCAATTGTGTATTTTACGGACAGCAAGTTGAGGGGCGG
 AACTTTTCGTAACCAATTCCAACCTGTTTTGCGGCGGCGTTTTGTTGACCTGTTTAAATGGG
 GGGTTTATATCAACACGCTCTATAACCGTAACATTATCTGAAGTCTGTATCCGCCCA
 AATCCGACATTGGGACAAGACGCGCCCGCGGGCGTACCTTTGATGGGGATTTAGCGCGC
 GTAAGCGTGGAAGTTATTCGGGATATACGAGTTAAAAATAGGGTCGTTTTTTCAGGTAA
 GTACAAATCTCTCTGAGGCAGCCCGGGCAAGGCTGTAGGCCTTGCAAGTGCGTACCAA
 CGCCAAGAAAAAAGAGTGGATATGTTACACGGGGCCCTAGGGTTTTTGCTTAAACAGTTT
 CACGGCCTGTTATTTCTCGGGGTATGCCACCAACAGTAAATCCCCAACCCGCGAGTGG
 TTTTGGACCCTGTTACAACGCAACCAGATGCCGGCAGATAAACTTACACACGAAGAGATT
 ACCACTATTGCAGCTGTTAAACGTTTTACCGAGGAATATGCAGCACTAACTTTATTAAT
 CTACCCCCAACCTGCATAGGAGAATTAGCCAGTTTTATATGGCAAATCTTATTCTTAAA
 TACTGCGATCATTCACAGTACCTTATAAATACCTTAACTTCTATAATTACGGGTGCCAGG
 CGCCCGCGTGACCCATCATCCGTTTTGCATTGGATTGCTAAAGATGTCACGTCCGCCGCG
 GACATAGAAACCCAAGCAAAGGCGCTTCTTGAAAAACGGAAACTTACCGGAATTATGG
 ACTACGGCTTTTACTTCAACTCATTTAGTCCGCGCGGCCATGAATCAACGTCCCATGGTC
 GTTTTAGGAATAAGCATTAGTAAATATCACGGAGCGGCAGGAAACAACCGCGTCTTTCAG
 GCAGGGAATTGGAGCGGTTTAAACGGGGGTAAAAATGTATGCCCGCTATTTACATTTGAT
 CGCACTCGCCGTTTTATAATAACATGTCCTAGAGGAGGTTTTATCTGCCCGTAACAGGT
 CCCTCGTCGGGAAATCGAGAAACCACCTATCCGACCAAGTTCGCGGTATAATTGTCAGT
 GGCGGGGCCATGGTTCAATTAGCCATATACGCCACGGTTGTGCGTGCAGTGGGCGCTCGA
 GCACAACATATGGCATTGACGACTGGTTAAGTCTTACAGACGATGAGTTTTTAGCCAGA
 GACTTGGAGGAGTTACACGACCAGATTATCCAAACCCTGGAAACGCCCTGGACCGTAGAA
 GGCGCTCTAGAAGCAGTAAAGATTCTAGATGAAAAACGACAGCGGGAGATGGGGAAACC
 CCCACAAACCTAGCATTTAATTTTGATTCTTGTGAACCAAGCCATGACACCACATCTAAC
 GTATTAAACATTTAGGGTCAACTGTCCCTGGTCTTAAACGACCCCCCGAAGATGACGAA
 CTCTTTGATCTTAGTGGTATTCCCATAAAACATGGGAACATTACAATGGAATGATTTAA

>ORF56

ATGAAAAATCCGCAGAAATTAGCGATCACATTCTTGCCGCTCTACGTGATCCCAACGTAC
 ACGTTGTGTATTAAGCATTGTATAAAAACACGCATGCGGGCTTGCTGTTCTCATTTCTA
 GGTTTTGTCTTAAATACACCCGCCATGAGCATCTCTGGACCCCCAACGACGTTTATTTTA
 TATAGGTTACATGGGGTCAGGCGGGTCTTCACTGGACTTTACCGGATCATGAACAAACC
 CTCTACGCATTTACGGGTGGGTCAAGATCAATGGCGGTGAAGACGGACGCTCGATGTGAT
 ACAATGAGCGGTGGTATGATCGTCTTCAACACACCCATACAGTGACCCTGCTAACCATA
 GACTGTTCTACTGACTTTTCATCATACGCATTTACGCACCGGGATTTCCACTTACAGGAC
 AAACCCACGCAACATTTGCGATGCCGTTTATGTCCTGGGTGCGTTCTGACCCAACATCT
 CAGCTGTACAGTAATGTGGGGGGGGTACTATCCGTAATAACGGAAGATGACCTATCCATG

TGTATCTCAATTGTTATATACGGTTTACGGGTAAACAGACCTGACGATCAGACCACACCA
ACACCAACCCCGCACCAGTATACATCGCAAAGGCGGCAGCCTGAAACCAACTGTCCTTCA
CCACAACCGGCCTTTTTTACATCAGACGACGACGTTCTTTCGTTAATATTACGGGACGCC
GCAAACGCGTAA

>ORF60

TCATTGGCATACGCGTTGGAACAAACGGTCGGCTCCCCAGACACATCCATTTTCCGGGAT
ATTTGTGGAAGATGGAGTAGAGTCTACCCATACACCGGAAAGGGCATCCAACAAAGCATC
GCGTATGTCCCGCTTTTATGTTCTTCACCAACAGATTGTGTCAGCCCCTTTAAGGTGAC
GTATGGATTTGTCCAGTACGCCATTTGTTTGTCTTTAAACCAAAGTATAACTTCCGGTAC
TGGACATTTTGTCTTAACCACGATTCCCGATAGCGCCTCGCTGAGGTTTGATACCGGGGG
TGCCGCATAGTCCACGCCTCATATACCGATGACACGCACGGTTCGGTTATAATCAAAC
CACATCCGATAGCGGTTTGGCTCCAAAAAACAACGGAGTGTGCTCTTGGAGATGAAGACA
ATACGCGATTGTGATAGTTTTTAAAAAACTATCATCTGCAGTAACCATTTATGTGATGC
CAT