



(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) 
1-0022527

(51)⁷ **C12N 7/04, A61K 39/205, C12N 15/09**

(13) **B**

(21) 1-2014-00434

(22) 13.07.2012

(86) PCT/JP2012/067927 13.07.2012

(87) WO2013/011942A1 24.01.2013

(30) JP2011-156973 15.07.2011 JP

(45) 25.12.2019 381

(43) 25.06.2014 315

(73) KYORITSU SEIYAKU CORPORATION (JP)

5-10, Kudan-minami 1-chome, Chiyoda-ku Tokyo 1020074 Japan

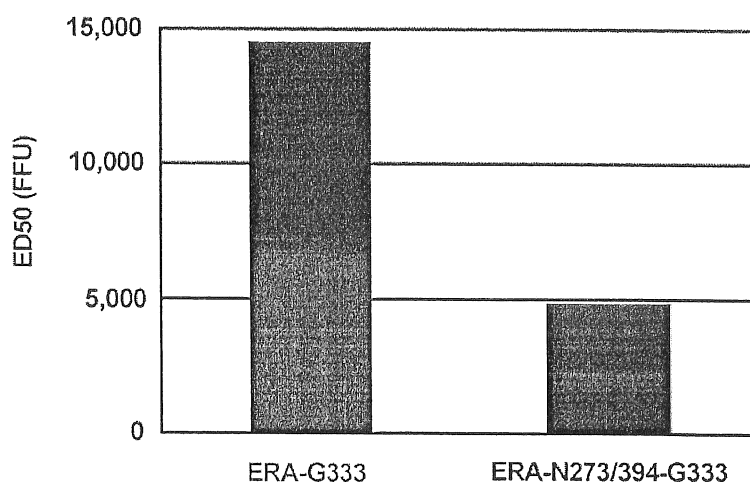
(72) ITO, Naoto (JP), SUGIYAMA, Makoto (JP)

(74) Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) **VIRUT GÂY BỆNH ĐẠI ĐỘT BIẾN, CHẾ PHẨM VACXIN PHÒNG BỆNH ĐẠI CHỨA VIRUT ĐỘT BIẾN NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VACXIN PHÒNG BỆNH ĐẠI**

(57) Sáng chế đề cập đến vaccin phòng bệnh đại an toàn, hiệu quả và giá thành rẻ.

Sáng chế đề cập đến virus gây bệnh đại đột biến bao gồm ít nhất một gốc axit amin không phải là phenylalanin ở vị trí 273 trong protein N, một gốc axit amin không phải là tyrosin ở vị trí 394 trong protein N và một gốc axit amin không phải là arginin hoặc lysin ở vị trí 333 trong protein G trong các protein cấu trúc của virus gây bệnh đại này (ví dụ, chủng ERA-N273/394-G333 trên Fig.2). Việc đưa vào đột biến axit amin ở vị trí 333 trong protein G để làm giảm độc lực và việc đưa vào các đột biến axit amin ở vị trí 273 và 394 trong protein N có thể cải thiện khả năng sinh miễn dịch và có thể làm tăng độ an toàn. Ngoài ra, có thể ngăn chặn sự phục hồi độc lực bằng cách đưa đột biến axit amin vào các vị trí 273 và 394 trong protein N ngay cả khi gốc axit amin ở vị trí 194 trong protein G bị đột biến thành lysin. Điều này có thể làm giảm nguy cơ phục hồi khả năng gây bệnh do đột biến tự phát và ngoài ra còn làm tăng độ an toàn. Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm vaccin phòng bệnh đại chứa virus gây bệnh đại đột biến; và phương pháp sản xuất vaccin phòng bệnh đại.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến virus gây bệnh dại đột biến bao gồm ít nhất một gốc axit amin không phải là phenylalanin ở vị trí 273 trong protein N, một gốc axit amin không phải là tyrosin ở vị trí 394 trong protein N và một gốc axit amin không phải là arginin hoặc lysin ở vị trí 333 trong protein G trong protein cấu trúc của virus gây bệnh dại. Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm vaccin phòng bệnh dại chứa virus gây bệnh dại đột biến này; và phương pháp sản xuất vaccin phòng bệnh dại.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh dại là bệnh truyền nhiễm từ động vật do sự lây nhiễm virus gây bệnh dại qua vết cắn và vết thương tương tự. Hiện nay vẫn chưa tìm ra phương pháp điều trị, và khi phát bệnh thì tỷ lệ tử vong gần như là 100% với các triệu chứng thần kinh dữ dội.

Virus gây bệnh dại lây nhiễm trên phạm vi vật chủ rất rộng, được cho là lây nhiễm cho tất cả động vật có vú, bao gồm người. Nguồn lây nhiễm chính là chó ở các nước đang phát triển, và động vật hoang dã như cáo, gấu trúc, chồn và dơi ở các nước phát triển. Hiện nay, theo ước tính mỗi năm có tới hơn 50.000 người chết vì bệnh dại.

Bệnh dại có thể được phòng ngừa bằng cách tiêm chủng, và hiện nay vaccin bất hoạt phòng bệnh dại đã được sử dụng rộng rãi. Tuy nhiên, đối với vaccin bất hoạt, cần phải có lượng kháng nguyên lớn để đạt được tác dụng đủ, do đó làm tăng giá thành của vaccin. Mặt khác, vaccin sống giảm độc lực đặt ra mối lo ngại về độ an toàn, mặc dù chúng được sản xuất ít tốn kém hơn vaccin bất hoạt. Do đó, vaccin này chưa được sử dụng rộng rãi đặc biệt là ở các nước đang phát triển và các quốc gia tương tự.

Virus gây bệnh dại được xếp vào loài *Rhabdoviridae Lyssavirus*. Hạt virus có dạng hình viên đạn, chiều rộng từ 60 đến 110nm và chiều dài từ 130 đến 250nm, và bao

gồm 5 protein cấu trúc: protein G, protein M, protein N, protein P và protein L. Bộ gen của virus là ARN sợi đơn, âm có chiều dài đủ khoảng 12.000 bazơ trong đó các gen mã hóa cho 5 protein cấu trúc có vị trí theo thứ tự là N, P, M, G và L theo hướng ngược chiều (với phía đầu 3').

Trong những năm gần đây, tiến bộ trong các nghiên cứu về yếu tố gây bệnh quyết định đối với virus gây bệnh dại và các yếu tố tương tự đã phát hiện ra rằng việc thay thế gốc axit amin ở vị trí 333 trong protein G bằng gốc axit amin không phải là arginin hoặc lysin có thể làm suy giảm độc lực của virus này (xem tài liệu phi sáng chế 1 và tài liệu tương tự). Ngoài ra, thực tế, virus mà có đưa vào đột biến axit amin để làm giảm độc lực ở vị trí 333 ở protein G được sử dụng ở châu Âu và các khu vực khác làm vaccin sống giảm độc lực để gây miễn dịch qua đường uống cho động vật hoang dã (xem tài liệu sáng chế 1 và tài liệu tương tự).

Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng virus đột biến giảm độc lực trở nên có độc lực nếu vị trí 194 ở protein G bị đột biến tự phát thành lysin ngay cả khi có đưa đột biến làm giảm độc lực vào vị trí 333 ở protein G (xem tài liệu phi sáng chế 2). Vì lý do này, phát sinh mối lo ngại về sự phục hồi khả năng gây bệnh do đột biến tự phát ở vị trí 194 ở protein G. Do đó, virus đột biến giảm độc lực chỉ có đột biến ở vị trí 333 trong protein G không tắt yếu cho thấy đủ độ an toàn.

Các tác giả sáng chế đã thông báo rằng ở chủng Ni-CE, là chủng gây bệnh dại giảm độc lực, các gốc axit amin ở vị trí 273 và 394 ở protein N của chủng gây bệnh dại là quan trọng đối với đáp ứng kháng virus qua RIG-I (gen I có thể được gây cảm ứng bởi axit retinoic - Retinoic acid-inducible gene I) và khả năng gây bệnh (xem tài liệu phi sáng chế 3).

Ngoài ra, các tài liệu phi sáng chế 4 và 5 mô tả quy trình tổng hợp nhân tạo chủng đột biến virus gây bệnh dại bằng phương pháp di truyền ngược như được mô tả dưới đây.

Danh mục tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế 1: US2011/0064764 A1.

Tài liệu phi sáng chế 1: Dietzschold B et al, “Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus.” Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 70-74, 1983.

Tài liệu phi sáng chế 2: Milosz Faber et al, “A single amino acid change in rabies virus glycoprotein increases virus spread and enhances virus pathogenicity.” Journal of Virology, vol.79, No.22, p14141-14148. 2005.

Tài liệu phi sáng chế 3: Tatsunori Masatani et al, “Amino acids at position 273 và 394 in rabies virus nucleoprotein are important for both evasion of host RIG-I-mediated antiviral response and pathogenicity.” Virus Research 155 (2011) 168-174.

Tài liệu phi sáng chế 4: Naoto Ito et al, “Rescue of rabies virus from cloned cDNA và identification of the pathogenicity-related gene: Glycoprotein gene is associated with virulence for adult mice.” Journal of Virology Vol.75, No.19, p9121-9128, 2001.

Tài liệu phi sáng chế 5: Naoto Ito et al, “Improved recovery of rabies virus from cloned cDNA using a vaccinia virus-free reverse genetics system.” Microbiol Immunol. 2003; 47 (8): 613-7.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần giải quyết

Như mô tả trên đây, vaccin sống giảm độc lực phòng bệnh dại đặt ra mối lo ngại về độ an toàn như sự phục hồi khả năng gây bệnh mặc dù chúng có thể được sản xuất ít tổn kém hơn vaccin bất hoạt. Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất vaccin phòng bệnh dại an toàn, hiệu quả và giá thành rẻ.

Giải pháp để giải quyết vấn đề đặt ra

Các tác giả sáng chế đã phát hiện mới rằng ở virus gây bệnh dại giảm độc lực có đưa vào đột biến thay thế axit amin ở vị trí 333 trong protein G, thuộc protein cấu trúc

của virus gây bệnh dại, có thể đưa vào các đột biến axit amin bổ sung ở các vị trí 273 và 394 trong protein N để cải thiện khả năng gây miễn dịch và độ an toàn. Các tác giả sáng chế cũng phát hiện ra rằng, virus này không trở nên có độc lực ngay cả khi gốc axit amin ở vị trí 194 trong protein G bị đột biến thành lysin.

Do đó, sáng chế đề xuất virus gây bệnh dại đột biến bao gồm ít nhất một gốc axit amin không phải là phenylalanin ở vị trí 273 trong protein N, một gốc axit amin không phải là tyrosin ở vị trí 394 trong protein N và một gốc axit amin không phải là arginin hoặc lysin ở vị trí 333 trong protein G trong các protein cấu trúc của virus gây bệnh dại này. Sáng chế còn đề xuất chế phẩm vaccine phòng bệnh dại chứa virus gây bệnh dại đột biến này và các chế phẩm tương tự.

Việc đưa vào đột biến axit amin ở vị trí 333 trong protein G có thể làm giảm độc lực của virus gây bệnh dại trong khi đó việc đưa vào các đột biến axit amin ở vị trí 273 và 394 trong protein N có thể cải thiện khả năng sinh miễn dịch. Hơn nữa, nếu đưa vào các đột biến axit amin ở vị trí 273 và 394 trong protein N cùng với ở vị trí 333 trong protein G, có thể đạt được tác dụng miễn dịch đủ với liều chất tiêm chủng ít hơn so với trường hợp chỉ đưa vào đột biến ở vị trí 333 trong protein G, dẫn đến liều chất tiêm chủng ít hơn và độ an toàn cao hơn.

Ngoài ra, sự phục hồi độc lực có thể được ngăn chặn bằng cách đưa vào các đột biến axit amin ở vị trí 273 và 394 trong protein N, ngay cả khi gốc axit amin ở vị trí 194 trong protein G bị đột biến thành lysin. Điều này có thể làm giảm khả năng phục hồi khả năng gây bệnh do đột biến tự phát và ngoài ra còn làm tăng độ an toàn.

Do đó, sáng chế hữu dụng làm chế phẩm vaccine phòng bệnh dại chứa virus gây bệnh dại đột biến. Việc dùng chế phẩm vaccine này có thể có tác dụng để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh dại.

Ngoài ra, do virus tái tổ hợp này cũng có thể được tổng hợp nhân tạo bằng cách nuôi cấy tế bào, nên có thể dễ dàng sản xuất chế phẩm vaccine phòng bệnh dại tương đối

rẻ, ví dụ trong trường hợp sử dụng virus này làm vaccine sống giảm độc lực.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Sáng chế có thể làm tăng khả năng sinh miễn dịch. Ngoài ra, sáng chế còn tạo ra vaccine phòng bệnh đại hiệu quả với giá thành rẻ, ít lo ngại về độ an toàn như sự phục hồi khả năng gây bệnh do đột biến tự phát.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sơ đồ minh họa độ chuẩn của kháng thể trung hòa trong huyết thanh máu chuột từ chuột được gây miễn dịch bằng chủng ERA-N273/394-G333 trong ví dụ 3.

Fig.2 thể hiện sơ đồ minh họa trị số ED₅₀ (liều có tác dụng trên 50% đối tượng) của chủng ERA-N273/394-G333 trong ví dụ 4.

Fig.3A thể hiện sơ đồ minh họa tỷ lệ sống sót khi chủng ERA-G194/333 được chủng ngừa vào trong não trong ví dụ 5.

Fig.3B thể hiện sơ đồ minh họa tỷ lệ sống sót khi chủng ERA-N273/394-G194/333 được chủng ngừa vào trong não trong ví dụ 5.

Mô tả chi tiết sáng chế

Virus gây bệnh đại đột biến theo sáng chế

Sáng chế đề xuất virus gây bệnh đại đột biến bất kỳ bao gồm ít nhất một gốc axit amin không phải là phenylalanin ở vị trí 273 trong protein N, một gốc axit amin không phải là tyrosin ở vị trí 394 trong protein N và một gốc axit amin không phải là arginin hoặc lysin ở vị trí 333 trong protein G trong các protein cấu trúc của virus gây bệnh đại. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn bởi các phương pháp tạo virus và phương pháp tương tự, và bao hàm ở phạm vi rộng, ví dụ, các virus đột biến thu được bằng cách chuyển vào phôi gà và/hoặc nuôi cấy tế bào, các virus đột biến thu được bằng cách tổng hợp nhân tạo nhờ sử dụng ADN bổ trợ (complementary DNA-cDNA) và các dạng tương tự.

Virut gây bệnh dại có thể được làm giảm độc lực bằng cách ít nhất lần lượt thay thế phenylalanin ở vị trí 273 trong protein N bằng axit amin khác; tyrosin ở vị trí 394 trong protein N bằng axit amin khác; và arginin hoặc lysin ở vị trí 333 trong protein G bằng axit amin khác trong các protein cấu trúc của virut gây bệnh dại. Các đột biến này có thể cải thiện khả năng sinh miễn dịch và độ an toàn, và làm giảm các nguy cơ như sự phục hồi khả năng gây bệnh do đột biến tự phát.

Không có giới hạn cụ thể về trình tự axit amin ngoại trừ ở các vị trí 273 và 394 trong protein N; và ở vị trí 333 trong protein G miễn là trình tự đó gần như giống với trình tự của chủng virut gây bệnh dại đã biết. Các chủng virut gây bệnh dại có trình tự axit amin đã biết bao gồm, ví dụ, chủng CVS, chủng ERA, chủng *Nishigahara*, chủng HEP-Flury, chủng LEP-Flury, chủng SAD Bern, chủng SAD B19 và các chủng tương tự. Thuật ngữ “gần như giống” có nghĩa là trình tự axit amin trong vùng tương ứng có mức độ tương đồng từ 80 đến 100%, tốt hơn nữa là từ 90 đến 100%.

Không có giới hạn cụ thể về các gốc axit amin ở vị trí 273 trong protein N miễn là chúng là các gốc axit amin không phải là phenylalanin. Ví dụ, ưu tiên là gốc bất kỳ trong số các gốc glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, serin, threonin, xystein, metionin, asparagin, glutamin, prolin, tyrosin, tryptophan, axit aspartic, axit glutamic, arginin, lysin, hoặc histidin. Ưu tiên hơn là gốc bất kỳ trong số các gốc valin, leuxin hoặc isoleuxin, và ưu tiên nhất là leuxin.

Không có giới hạn cụ thể về các gốc axit amin ở vị trí 394 trong protein N miễn là chúng là các gốc axit amin không phải tyrosin. Ví dụ, ưu tiên là gốc bất kỳ trong số các gốc glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, serin, threonin, xystein, metionin, asparagin, glutamin, prolin, phenylalanin, tryptophan, axit aspartic, axit glutamic, arginin, lysin, hoặc histidin. Ưu tiên hơn là gốc bất kỳ trong số các gốc arginin, lysin hoặc histidin, và ưu tiên nhất là histidin.

Không có giới hạn cụ thể về các gốc axit amin ở vị trí 333 trong protein G miễn là

chúng là các gốc axit amin không phải arginin hoặc lysin. Ví dụ, ưu tiên là gốc bất kỳ trong số các gốc glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, serin, threonin, xystein, metionin, asparagin, glutamin, prolin, phenylalanin, tyrosin, tryptophan, axit aspartic, axit glutamic hoặc histidin. Ưu tiên hơn là gốc bất kỳ trong số các gốc glyxin, leuxin, isoleuxin, serin, metionin hoặc axit glutamic, và ưu tiên nhất là axit glutamic.

Virut gây bệnh đại đột biến có leuxin ở vị trí 273 trong protein N, histidin ở vị trí 394 trong protein N và axit glutamic ở vị trí 333 trong protein G bao gồm virut gây bệnh đại đột biến bao gồm protein N có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID: NO. 1 và protein G có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID: NO. 2 là các protein cấu trúc.

Chế phẩm vacxin phòng bệnh đại theo sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm vacxin phòng bệnh đại bất kỳ chứa ít nhất virut gây bệnh đại đột biến nêu trên.

Virut gây bệnh đại đột biến theo sáng chế có thể được sử dụng cho vacxin sống giảm độc lực hoặc vacxin bất hoạt. Tuy nhiên, ưu tiên hơn là sử dụng trong vacxin sống giảm độc lực bởi vì có thể sản xuất các dạng bào chế vacxin phòng bệnh đại tương đối rẻ với hiệu quả cao làm vacxin.

Chất đệm, chất làm đẳng trương, chất làm dịu nhẹ, chất khử trùng, chất chống oxy hóa và các chất tương tự có thể được bổ sung thích hợp vào vacxin theo ý định và mục đích cụ thể.

Ví dụ ưu tiên về các chất đệm có thể bao gồm, ví dụ, các dung dịch đệm như phosphat, axetat, cacbonat, xitrat và các dung dịch tương tự.

Ví dụ ưu tiên về chất làm đẳng trương có thể bao gồm, ví dụ, natri clorua, glyxerin, D-manitol và các chất tương tự.

Ví dụ ưu tiên về chất làm dịu nhẹ có thể bao gồm, ví dụ, rượu benzyl và các chất tương tự.

Ví dụ ưu tiên về chất khử trùng có thể bao gồm, ví dụ, thimerosal, p-hydroxybenzoat este, phenoxyetanol, clobutanol, rượu benzyl, rượu phenetyl, axit dehydroaxetic, axit sorbic, các chất khử trùng khác, chất kháng sinh, chất kháng khuẩn tổng hợp và các chất tương tự.

Ví dụ ưu tiên về chất chống oxi hóa có thể bao gồm, ví dụ, sulfit, axit ascorbic và các chất tương tự.

Ngoài các chất này, chế phẩm có thể còn chứa các thành phần bổ trợ như các chất màu hấp phụ ánh sáng (riboflavin, adenin, adenosin và các chất tương tự) làm các chất bổ trợ cho việc bảo quản và hiệu lực; các chất tạo cặn/khử (vitamin C, axit xitric và các chất tương tự) để làm ổn định; các hợp chất cacbohydrat (sorbitol, lactoza, manitol, tinh bột, sucroza, glucoza, dextran và các chất tương tự); chất phân hủy casein; các vitamin và các chất tương tự.

Không có giới hạn cụ thể về dạng liều của chế phẩm vaccin, và dạng liều bất kỳ đã biết có thể được sử dụng. Ví dụ, có thể sử dụng chế phẩm dạng lỏng. Một cách khác là có thể trộn với thức ăn để dùng qua đường miệng sau khi làm khô lạnh.

Mặt khác, khi sử dụng chế phẩm vaccin bất hoạt, việc làm bất hoạt có thể được thực hiện bằng phương pháp đã biết như xử lý vật lý môi trường nuôi cấy (chiếu tia cực tím, chiếu tia X, xử lý nhiệt, siêu âm và phương pháp tương tự), xử lý hóa học (xử lý bằng các dung môi hữu cơ như formalin, cloroform và các dung môi tương tự; xử lý bằng axit yếu như axit axetic; xử lý bằng cồn, clo, thủy ngân và các chất tương tự) và các phương pháp tương tự.

Ví dụ, việc bất hoạt bằng formalin có thể thực hiện bằng cách bổ sung formalin vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,001 đến 2,0% thể tích, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 1,0%, và làm nhạy môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ từ 4 đến 30°C trong thời gian từ 1 đến 3 ngày. Ví dụ, virus bất hoạt có thể được rửa bằng đệm để loại bỏ các tác nhân làm bất hoạt như formalin; hoặc có thể bổ sung tác nhân

trung hòa vào virus được bất hoạt để trung hòa. Ngoài ra, có thể sử dụng phương pháp lọc qua màng, ly tâm và các phương pháp tương tự để thu hồi virus bất hoạt.

Không có giới hạn cụ thể về lượng virus bất hoạt được chứa trong vaccine bất hoạt. Tuy nhiên, ví dụ, lượng virus trước khi làm bất hoạt tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10^3 đến 10^{11} FFU (đơn vị hình thành ổ bệnh do virus – focus forming unit), tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 10^4 đến 10^{11} FFU.

Khi sử dụng làm chế phẩm vaccine bất hoạt, có thể bổ sung các tá dược đã biết. Các tá dược đã biết bao gồm, ví dụ, dầu động vật (các hydrocacbon không bão hòa và các chất tương tự) hoặc dầu được hydro hóa của chúng; dầu thực vật (dầu cọ, dầu thầu dầu và các loại dầu tương tự) hoặc dầu được hydro hóa của chúng; tá dược trên cơ sở dầu bao gồm manitol oleat khan, parafin lỏng, polybuten, caprylat, oleat, este của axit béo mạch dài và các chất tương tự; tá dược tan trong nước như PCPP, saponin, mangan gluconat, canxi gluconat, mangan glyxerophosphat, nhôm axetat hòa tan, nhôm salixylat, copolyme của acrylat, copolyme của metacrylat, copolyme của anhydrit maleic, polyme của dẫn xuất alkenyl, nhũ tương dầu trong nước, lipid cation chứa ion amoni bậc bốn; các tá dược kết tủa như nhôm hydroxit (alum) và natri hydroxit; các thành phần độc tố từ vi sinh vật như độc tố khuẩn tả, độc tố không bền nhiệt từ *E. coli* và các độc tố tương tự; và bentonit khác; dẫn xuất dipeptit muramyl; intolokin và các chất tương tự. Ngoài ra, có thể sử dụng hỗn hợp của chúng.

Ngoài ra, chế phẩm vaccine này có thể là chế phẩm vaccine kết hợp được trộn với một hoặc nhiều vaccine phòng các bệnh khác.

Phương pháp sản xuất chế phẩm vaccine phòng bệnh đại theo sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp bất kỳ để sản xuất chế phẩm vaccine phòng bệnh đại bao gồm bước tổng hợp nhân tạo virus gây bệnh đại đột biến nêu trên bằng phương pháp nuôi cấy tế bào.

Do virus gây bệnh đại đột biến này cũng có thể được tổng hợp nhân tạo bằng

phương pháp di truyền ngược nhờ sử dụng nuôi cấy tế bào, nên có thể sản xuất chế phẩm vacxin tương đối rẻ với ít sự khác nhau giữa các lô vacxin hơn.

Đầu tiên, chuẩn bị plasmit của bộ gen cho virus gây bệnh đại tái tổ hợp.

Đối với chủng virus gốc gây bệnh đại, ví dụ có thể sử dụng một trong số các chủng nêu trên. Các đột biến được đưa vào trong trình tự bazơ mã hóa cho ba gốc axit amin ở các vị trí 273 và 394 trong protein N và vị trí 333 trong protein G nằm trong ADN bổ trợ (cDNA) của bộ gen có chiều dài đủ của chủng virus gốc gây bệnh đại. Các đột biến có thể được đưa vào bằng phương pháp gây đột biến điểm bất kỳ đã biết như phương pháp PCR gói chông.

Đoạn ADN bổ trợ đột biến được đưa vào vectơ plasmit ở vị trí tách dòng đa điểm bằng cách cắt bằng enzym giới hạn và nối lại và phương pháp tương tự. Trong trường hợp này, ví dụ, đầu 3' của ARN bộ gen sợi dương được tổng hợp nhân tạo được phiên mã nhờ T7 ARN polymeraza có thể giống với trình tự của virus ban đầu bằng cách sắp xếp trình tự vùng khởi động T7 ở vùng phía trước (về phía đầu 3') và trình tự bazơ mã hóa cho ribozym của virus viêm gan D ở vùng phía sau (về phía đầu 5') so với đoạn ADN bổ trợ.

Không có giới hạn cụ thể về các vectơ plasmit, và các vectơ đã biết bất kỳ có thể được sử dụng.

Tiếp theo, plasmit bộ gen cho virus gây bệnh đại tái tổ hợp được chuyển nhiễm bằng nuôi cấy tế bào để cho phép biểu hiện virus gây bệnh đại tái tổ hợp trong dịch nổi nuôi cấy. Không có giới hạn cụ thể về phương pháp chuyển nhiễm, và có thể sử dụng phương pháp đã biết bất kỳ. Ngoài ra, đối với nuôi cấy tế bào, các tế bào bất kỳ đã biết được sử dụng rộng rãi có thể được sử dụng như tế bào BHK, nhưng, ví dụ, nuôi cấy tế bào chủ yếu biểu hiện T7 ARN polymeraza có thể được thiết lập trong trường hợp virus được biểu hiện với T7 ARN polymeraza.

Khi plasmit bộ gen cho virus gây bệnh đại tái tổ hợp được chuyển nhiễm, virus gây bệnh đại đột biến có thể được tổng hợp một cách hiệu quả bằng cách đồng chuyển nhiễm plasmit biểu hiện protein N của virus gây bệnh đại, plasmit biểu hiện protein P của virus gây bệnh đại và plasmit biểu hiện protein L của virus gây bệnh đại làm các plasmit hỗ trợ.

Sau đó, virus gây bệnh đại tái tổ hợp được biểu hiện trong dịch nổi nuôi cấy được bổ sung vào nuôi cấy tế bào để biểu hiện lượng lớn virus tái tổ hợp. Đối với nuôi cấy tế bào được sử dụng trong trường hợp này, ví dụ, tế bào NA từ u nguyên bào thần kinh của chuột, tế bào Vero và các tế bào tương tự có thể được sử dụng.

Có thể thu hồi virus bằng các phương pháp đã biết như ly tâm và lọc qua màng. Ngoài ra, việc sản xuất virus tái tổ hợp có thể được mở rộng để sản xuất lượng lớn bằng cách bổ sung virus thu được vào mẻ nuôi cấy tế bào khác.

Trong trường hợp sử dụng virus tái tổ hợp làm vaccin sống giảm độc lực, ví dụ, chất đệm, chất làm đẳng trương, chất làm dịu nhẹ, chất khử trùng, chất chống oxy hóa và các chất tương tự được bổ sung thích hợp vào virus thu được để tạo ra sản phẩm thương mại. Trong trường hợp sử dụng virus tái tổ hợp làm vaccin bất hoạt, ví dụ, sau khi làm bất hoạt virus bằng phương pháp đã biết, chất đệm, chất làm đẳng trương, chất làm dịu nhẹ, chất khử trùng, chất chống oxy hóa và các chất tương tự được bổ sung thích hợp vào virus thu được để tạo ra sản phẩm thương mại.

Sản xuất chế phẩm vaccin phòng bệnh đại bằng cách sử dụng virus gây bệnh đại đột biến theo sáng chế

Sáng chế đề xuất virus gây bệnh đại đột biến nêu trên được sử dụng theo phương pháp bất kỳ để sản xuất chế phẩm vaccin phòng bệnh đại.

Nhờ sử dụng virus gây bệnh đại đột biến để sản xuất chế phẩm vaccin phòng bệnh đại, có thể sản xuất vaccin phòng bệnh đại tương đối rẻ với số lượng lớn mà ít lo ngại về độ an toàn như sự phục hồi khả năng gây bệnh và cho thấy hiệu quả của vaccin cao hơn. Chế phẩm vaccin phòng bệnh đại chứa ít nhất virus gây bệnh đại đột biến theo sáng chế

để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh dại

Sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin phòng bệnh dại chứa ít nhất virus gây bệnh dại đột biến nêu trên được sử dụng để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh dại theo phương pháp bất kỳ, bao gồm ít nhất bước sử dụng chế phẩm vaccin phòng bệnh dại chứa ít nhất virus gây bệnh dại đột biến nêu trên.

Sáng chế có thể được áp dụng cho các động vật có thể mắc bệnh dại, ví dụ, người và động vật không phải người như chó, mèo, cáo, gấu trúc, chồn, dơi, chuột và các động vật tương tự.

Ví dụ, sự lây nhiễm bệnh dại có thể được phòng ngừa bằng cách sử dụng chế phẩm vaccin phòng bệnh dại cho cá thể khỏe mạnh. Theo cách khác, chế phẩm vaccin phòng bệnh dại có thể được sử dụng tích cực ngay sau khi phơi nhiễm virus gây bệnh dại qua vết cắn nhằm kích thích phản ứng miễn dịch để điều trị bệnh dại.

Chế phẩm vaccin phòng bệnh dại có thể được sử dụng ở dạng dung dịch bằng cách tiêm dưới da, trong da, tiêm bắp và tương tự. Trong trường hợp động vật hoang dã, chế phẩm vaccin có thể được trộn vào thức ăn và loại tương tự để sử dụng qua đường miệng. Khi sử dụng dạng chế phẩm vaccin sống giảm độc lực, vaccin này có thể được sử dụng với lượng, ví dụ, từ 10^3 đến 10^{11} FFU cho mỗi liều để tiêm dưới da, trong da, tiêm bắp và tương tự trong khi đó vaccin này được sử dụng với lượng, ví dụ, từ 10^4 đến 10^{11} FFU cho mỗi liều dùng qua đường miệng. Khi sử dụng dạng chế phẩm vaccin bất hoạt, vaccin này được sử dụng với lượng, ví dụ, từ 10^3 đến 10^{11} virus cho mỗi liều để tiêm dưới da, trong da, tiêm bắp và tương tự trong khi đó vaccin này được sử dụng với lượng, ví dụ, từ 10^4 đến 10^{11} virus cho mỗi liều dùng qua đường miệng. Không có giới hạn cụ thể về tần suất sử dụng, nhưng ưu tiên là sử dụng một liều hoặc một vài liều với khoảng cách thời gian từ một tuần đến ba tháng. Một hoặc nhiều lần sử dụng mỗi năm cũng được ưu tiên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Trong ví dụ 1, virus gây bệnh đại tái tổ hợp được tổng hợp nhân tạo bằng phương pháp di truyền ngược.

Đoạn ADN bổ trợ được khuếch đại bằng phương pháp PCR trong đó trình tự vùng khởi động của T7 và trình tự bazơ mã hóa cho ribozym của virus viêm gan D lần lượt được sắp xếp ở phía trước (về phía đầu 3') và ngay phía sau (về phía đầu 5') trên ADN bổ trợ của bộ gen có chiều dài đủ của chủng ERA, là một trong các chủng virus gây bệnh đại được cố định độc lực. Lưu ý rằng trình tự mã hóa cho ribozym của virus viêm gan D được chèn vào sao cho đầu 3' của ARN bộ gen sợi dương được tổng hợp nhân tạo được phiên mã bởi T7 ARN polymeraza là giống với trình tự của virus gốc ban đầu.

Đoạn ADN bổ trợ được chèn vào vector plasmid pUC19 ở vị trí tách dòng đa điểm bằng cách cắt đoạn bằng enzym giới hạn và nối lại. Plasmid bộ gen chứa ADN bổ trợ của bộ gen có chiều dài đủ của chủng ERA (sau đây được gọi là “plasmid bộ gen của chủng ERA”) được tạo ra nhờ quy trình nêu trên.

Tiếp theo, đoạn ADN bổ trợ, trong đó các đột biến được đưa vào trình tự bazơ của nó sao cho ba gốc axit amin ở các vị trí 273 và 394 trong protein N và ở vị trí 333 trong protein G lần lượt được thay thế bằng leuxin, histidin và axit glutamic của bộ gen có chiều dài đủ của chủng ERA được khuếch đại bằng phương pháp PCR gói chông sử dụng plasmid bộ gen đối với chủng ERA làm khuôn (xem tài liệu phi sáng chế 4).

Bằng cách cắt đoạn nhờ enzym giới hạn và nối lại, vùng mã hóa của ADN bổ trợ của bộ gen có chiều dài đủ trên plasmid bộ gen của chủng ERA được thay thế bằng đoạn ADN bổ trợ của bộ gen có chiều dài đủ đột biến. Plasmid bộ gen chứa ADN bổ trợ của bộ gen có chiều dài đủ của chủng đột biến (chủng ERA-N273/394-G333), trong đó ba đột biến được đưa vào trình tự axit amin của bộ gen chiều dài đủ của chủng ERA, được tạo ra (sau đây được gọi là plasmid bộ gen của “chủng ERA-N273/394-G 333”) nhờ sử dụng quy trình nêu trên (đối với trình tự bazơ của của bộ gen của chủng ERA-N273/394-G333,

xem trình tự SEQ ID: NO. 3).

Ngoài ra, plasmit bộ gen chứa ADN bổ trợ của bộ gen có chiều dài đủ của thể đột biến (chủng ERA-G333), trong đó gốc axit amin ở vị trí 333 trong protein G được thay thế bằng axit glutamic trên bộ gen chiều dài đủ của chủng ERA, được tạo ra (sau đây được gọi là “Plasmit bộ gen của chủng ERA-G333”) nhờ sử dụng quy trình tương tự.

Kết quả từ phân tích trình tự đã chỉ ra rằng các đột biến đích đã có mặt trên mỗi plasmit bộ gen.

Tiếp theo, mỗi virus tái tổ hợp được tổng hợp nhân tạo nhờ sử dụng các plasmit bộ gen này.

Đầu tiên, plasmit biểu hiện protein N của virus gây bệnh dại, plasmit biểu hiện protein P của virus gây bệnh dại và plasmit biểu hiện protein L của virus gây bệnh dại được chuẩn bị làm các plasmit hỗ trợ (xem tài liệu phi sáng chế 5).

Vào ngày trước đó, tế bào BHK chủ yếu biểu hiện T7 ARN polymeraza (sau đây được gọi là “tế bào BHK/T7-9”) được cấy trải trên đĩa nuôi cấy mô 24-giếng. Vào ngày tiếp theo, tế bào BHK/T7-9 được đồng chuyển nhiễm plasmit bộ gen (2µg/giếng) và ba plasmit hỗ trợ (0,4, 0,1 hoặc 0,2µg/mỗi giếng), và được nuôi cấy trong thời gian từ 4 đến 5 ngày. Sau đó, gom dịch nổi nuôi cấy và giữ ở nhiệt độ -80°C.

Ngoài ra, tế bào BHK/T7-9 được chuyển nhiễm được cố định, và sau đó được nhuộm huỳnh quang bằng kháng thể đơn dòng kháng protein N của virus gây bệnh dại. Sau đó, sự biểu hiện của virus đột biến được xác nhận nhờ sử dụng tín hiệu huỳnh quang gia tăng làm dấu hiệu chỉ thị.

Tiếp theo, chuẩn bị dung dịch gốc của virus tái tổ hợp.

Bổ sung dịch nổi nuôi cấy được thu gom, và nuôi cấy tế bào NA từ u nguyên bào thần kinh của chuột. Khi khoảng 50% tế bào bị tách ra do tác động gây bệnh tế bào, gom dịch nổi nuôi cấy. Ly tâm dịch nổi nuôi cấy, và giữ ở nhiệt độ -80°C làm dung dịch gốc

của virus đột biến.

Do độ chuẩn virus đối với virus tái tổ hợp được tổng hợp nhân tạo bằng các quy trình nêu trên.

Cấy trải mỗi dung dịch virus được pha loãng theo thứ tự 10 lần trên tế bào NA trong đĩa nuôi cấy mô 24 giếng với nồng độ 100µL/giếng. Tế bào này được để tĩnh ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 1 giờ để chúng hấp phụ virus, và sau đó rửa các tế bào này. Bổ sung môi trường nuôi cấy chứa 0,5% methylxenluloza vào tế bào, và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong thời gian hai ngày. Sau khi cố định, tế bào nhiễm được nhuộm huỳnh quang bằng kháng thể đơn dòng kháng protein N của virus gây bệnh dại, và đếm số lượng ổ bệnh do virus phát huỳnh quang trong mỗi giếng. Đối với độ chuẩn virus, đếm số lượng đơn vị hình thành ổ bệnh do virus (FFU: Focus forming unit)/mL dựa trên số lượng ổ bệnh trung bình quan sát được trong 3 giếng ở cùng độ pha loãng.

Ví dụ 2

Trong ví dụ 2, nghiên cứu sự tăng sinh của virus tái tổ hợp (chủng ERA-N273/394-G333).

Ủ tế bào Vero được dính bám trên bình nuôi cấy T-25 với chủng ERA hoặc chủng ERA-N273/394-G333 với tỷ lệ gây nhiễm (MOI - multiplicity of infection) = 0,01. Tế bào được để tĩnh ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 1 giờ để chúng hấp phụ virus, và sau đó rửa các tế bào này. Bổ sung 7mL môi trường nuôi cấy vào tế bào này trên mỗi bình, và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C. Vào các ngày 3, 5, 7, 9 và 11 sau khi gây nhiễm, thu lấy 100µL môi trường mỗi lần, và đo độ chuẩn virus như trong ví dụ 1.

Kết quả cho thấy rằng độ chuẩn virus của chủng ERA-N273/394-G333 trong tế bào Vero là 1×10^6 FFU/mL hoặc cao hơn vào ngày thứ 7 sau khi gây nhiễm, và là 1×10^8 FFU/mL hoặc cao hơn vào ngày thứ 11 sau khi gây nhiễm, độ chuẩn này gần như giống với độ chuẩn của chủng ERA. Các kết quả này chỉ ra rằng ngay cả khi các gốc axit amin ở ba vị trí: vị trí 273 và 394 trong protein N và vị trí 333 trong protein G trong các

protein cấu trúc của virus gây bệnh dại bị đột biến đồng thời, virus này không cho thấy suy giảm khả năng tăng sinh.

Ví dụ 3

Trong ví dụ 3, nghiên cứu khả năng sinh miễn dịch của virus tái tổ hợp (chủng ERA-N273/394-G333).

Chủng ERA-G333 hoặc chủng ERA-N273/394-G333 ở 10^4 FFU được chủng ngựa trong cơ vào 5 con chuột ddY mỗi nhóm (chuột cái 6 tuần tuổi) để gây miễn dịch.

Hai tuần sau khi chủng ngựa, rút máu từ chuột được gây miễn dịch, và huyết thanh từ máu của chúng được pha loãng hai lần, và sau đó được làm bất hoạt ở nhiệt độ 56°C trong thời gian 30 phút. Tiếp theo, trộn huyết thanh từ máu được pha loãng theo bậc hai lần này ($25\mu\text{L}$) với dịch virus ($25\mu\text{L}$) chứa chủng CVS tương đương với 200 lần liều gây nhiễm 50% tế bào nuôi cấy mô. Sau khi được làm lạnh bằng hỗn hợp này ở nhiệt độ 4°C qua đêm, kháng thể trung hòa trong huyết thanh máu được pha loãng được làm lạnh bằng virus này.

Cấy trải huyền phù tế bào NA (3×10^5 tế bào/mL, 0,1 mL/giếng) trên đĩa nuôi cấy mô 96-giếng, và ủ với hỗn hợp huyết thanh máu-virus. Nuôi cấy tế bào ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 3 ngày. Sau khi cố định, tế bào nhiễm được nhuộm huỳnh quang bằng kháng thể đơn dòng kháng protein N của virus gây bệnh dại, và đếm độ chuẩn kháng thể trung hòa của virus bằng phương pháp Reed và Munch. Trong khi đó, thực hiện phép đo tương tự đối với huyết thanh chuẩn [$0,5$ đơn vị quốc tế (international unit –IU)/mL]) nhận được từ Office International des Epizooties (OIE) để chuyển độ chuẩn kháng thể trung hòa thành đơn vị quốc tế [IU/mL].

Kết quả được thể hiện trên Fig.1. Fig.1 thể hiện sơ đồ minh họa các độ chuẩn của kháng thể trung hòa của huyết thanh máu chuột từ chuột được gây miễn dịch bằng chủng ERA-N273/394-G333. Trên Fig.1, “ERA-G333” và “ERA-N273/394-G333” trên trục ngang lần lượt thể hiện kết quả từ chuột được gây miễn dịch bằng chủng ERA 333 và kết

quả từ chuột được gây miễn dịch bằng chủng ERA-N273/394-G333. Trục đứng thể hiện độ chuẩn của kháng thể trung hòa (đơn vị = IU/mL) của huyết thanh máu của chuột.

Như được thể hiện trên Fig.1, trong trường hợp thực hiện việc gây miễn dịch bằng cách chủng ngừa trong cơ virus gây bệnh đại tái tổ hợp với liều 10^4 FFU, chủng ERA-N273/394-G333 thể hiện độ chuẩn kháng thể trung hòa là 0,5 IU/mL hoặc cao hơn trong huyết thanh máu của chuột đối với tất cả các cá thể, giá trị này cao hơn so với chủng ERA-G333. Kết quả này đã chứng minh rằng chủng ERA-N273/394-G333 có khả năng sinh miễn dịch cao hơn so với chủng ERA-G333.

Ví dụ 4

Trong ví dụ 4, nghiên cứu virus tái tổ hợp (chủng ERA-N273/394-G333) về trị số ED_{50} (liều có tác dụng trên 50% đối tượng - 50% effective dose).

Chủng ERA-G333 hoặc chủng ERA-N273/394-G333 với liều 10^2 đến 10^5 FFU được chủng ngừa trong cơ vào 5 con chuột ddY mỗi nhóm (chuột cái, 6 tuần tuổi) để gây miễn dịch. Sáu tuần sau khi chủng ngừa, chủng thử thách chuẩn để kiểm tra chất lượng vacxin (chủng CVS) được chủng ngừa trong não vào chuột được gây miễn dịch với liều gấp 25 lần liều gây chết 50%. Mỗi con chuột được quan sát trong 14 ngày, và tính trị số ED_{50} (liều có tác dụng trên 50% đối tượng) của mỗi chủng từ tỷ lệ sống sót của chúng.

Kết quả được thể hiện trên Fig.2. Fig.2 thể hiện sơ đồ minh họa trị số ED_{50} (liều có tác dụng trên 50% đối tượng) của chủng ERA-N273/394-G333. Trên Fig.2, “ERA-G333” và “ERA-N273/394-G333” trên trục ngang lần lượt thể hiện các kết quả từ chủng ERA-G333 và các kết quả từ chủng ERA-N273/394-G333. Trục đứng thể hiện trị số ED_{50} (liều có tác dụng trên 50% đối tượng, đơn vị =FFU).

Như được thể hiện trên Fig.2, trị số ED_{50} (liều có tác dụng trên 50% đối tượng) của chủng ERA-N273/394-G333 là 5.000 FFU hoặc thấp hơn, và có thể thu được tác dụng tương tự từ khoảng 1/3 liều này của chủng ERA-G333.

Kết quả này đề xuất rằng khả năng sinh miễn dịch được cải thiện đối với chủng trong đó các đột biến được đưa vào vị trí 333 trong protein G và các vị trí 273 và 394 trong protein N so với chủng trong đó đột biến chỉ được đưa vào vị trí 333 trong protein G. Ngoài ra, vì khả năng sinh miễn dịch được cải thiện, có khả năng thu được tác dụng miễn dịch tương tự với liều thấp hơn. Do đó, các kết quả từ nghiên cứu này đề xuất rằng liều gây miễn dịch thấp hơn có thể dẫn đến độ an toàn được cải thiện hơn.

Các kết quả nêu trên trong ví dụ 3 và 4 chứng tỏ rằng chủng ERA-N273/394-G333 có khả năng sinh miễn dịch và độ an toàn cao hơn, tức là chủng này hữu dụng làm vaccin sống giảm độc lực để phòng bệnh dại.

Ví dụ 5

Như được mô tả nêu trên, biết rằng đột biến gen thay thế axit amin bằng lysin ở vị trí 194 trong protein G có thể phục hồi độc lực và khả năng gây bệnh của virus gây bệnh dại ngay cả khi virus này đã được làm giảm độc lực bằng cách đưa vào đột biến axit amin ở vị trí 333 trong protein G. Theo đó, trong ví dụ 5, liệu việc đột biến axit amin thành lysin ở vị trí 194 trong protein G của chủng ERA-N273/394-G333 có dẫn đến phục hồi độc lực của virus này hay không được nghiên cứu.

Bằng phương pháp tương tự như trong ví dụ 1, đột biến được đưa vào plasmit bộ gen đối với chủng ERA-N273/394-G333 hoặc plasmit bộ gen đối với chủng ERA-G333 sao cho gốc axit amin ở vị trí 194 trong protein G được thay thế bằng lysin. Nhờ sử dụng các plasmit bộ gen này, bằng phương pháp tương tự như trong ví dụ 1, virus đột biến (chủng ERA-N273/394-G194/333) trong đó các gốc axit amin ở ba vị trí nêu trên và ở vị trí 194 trong protein G bị đột biến trên bộ gen chiều dài đủ của chủng ERA; và virus đột biến (chủng ERA-G194/333), trong đó các gốc axit amin ở các vị trí 333 và 194 trong protein G bị đột biến, được tổng hợp nhân tạo.

Chủng ERA-N273/394-G194/333 hoặc chủng ERA-G194/333 với liều 10^2 đến 10^4 FFU được chủng ngừa vào trong sọ vào 5 con chuột ddY mỗi nhóm (chuột cái, 6 tuần

tuổi). Mỗi con chuột được quan sát trong 18 ngày, và nghiên cứu diễn biến về tỷ lệ sống sót của chúng.

Kết quả được thể hiện trên các Fig.3A và 3B. Fig.3A thể hiện sơ đồ minh họa tỷ lệ sống sót trong trường hợp chủng ngừa vào trong não chủng ERA-G194/333. Fig.3B thể hiện sơ đồ minh họa tỷ lệ sống sót trong trường hợp chủng ngừa vào trong não chủng ERA-N273/394-G194/333. Trên cả hai hình vẽ này, trục ngang và trục đứng lần lượt thể hiện số ngày sau khi chủng ngừa virus và tỷ lệ sống sót (%). Các sơ đồ này thể hiện các kết quả từ trường hợp không sử dụng virus (không gây nhiễm) và kết quả từ trường hợp sử dụng virus với liều 10^2 đến 10^4 FFU.

Như được thể hiện trên Fig.3A, trong trường hợp chủng ERA-G194/333 được chủng ngừa vào trong não, vào ngày thứ 17 sau khi chủng ngừa, tỷ lệ sống sót là 20% với liều chủng ngừa là 10^2 FFU và 40% với liều chủng ngừa là 10^3 FFU, chỉ ra rằng virus thể hiện sự phục hồi độc lực. Ngược lại, như được thể hiện trên Fig.3B, trong trường hợp chủng ERA-N273/394-G194/333 được chủng ngừa vào trong não, tỷ lệ sống sót là 100% ở tất cả các nồng độ, chỉ ra rằng virus không thể hiện sự phục hồi độc lực.

Các kết quả này chỉ ra rằng chủng ERA-N273/394-G333 không thể hiện sự phục hồi độc lực ngay cả khi gốc axit amin ở vị trí 194 trong protein G bị thay thế bằng lysin do đột biến tự phát. Ngoài ra, các kết quả này chỉ ra rằng sự phục hồi độc lực có thể được ngăn chặn bằng cách đưa vào đột biến axit amin ở các vị trí 273 và 394 trong protein N cũng như vị trí 333 trong protein G ngay cả khi gốc axit amin ở vị trí 194 trong protein G bị thay thế bằng lysin, đề xuất rằng mối lo ngại về sự phục hồi khả năng gây bệnh do đột biến tự phát là thấp.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Virut gây bệnh đại đột biến bao gồm ít nhất một gốc axit amin không phải là phenylalanin ở vị trí 273 trong protein N, một gốc axit amin không phải là tyrosin ở vị trí 394 trong protein N và một gốc axit amin không phải là arginin hoặc lysin ở vị trí 333 trong protein G trong các protein cấu trúc của virut gây bệnh đại này (ngoại trừ chủng đột biến Ni-CE mà vị trí 333 trong protein G của nó được thay thế bằng một gốc axit amin không phải là arginin hoặc lysin).
2. Virut gây bệnh đại đột biến theo điểm 1, trong đó gốc axit amin ở vị trí 273 trong protein N là leuxin; gốc axit amin ở vị trí 394 trong protein N là histidin; và gốc axit amin ở vị trí 333 trong protein G là axit glutamic.
3. Virut gây bệnh đại đột biến theo điểm 1 hoặc 2, bao gồm protein N có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID: NO. 1, và protein G có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID: NO. 2 là các protein cấu trúc.
4. Chế phẩm vaccin phòng bệnh đại chứa virut gây bệnh đại đột biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.
5. Phương pháp sản xuất vaccin phòng bệnh đại, bao gồm bước tổng hợp nhân tạo virut gây bệnh đại đột biến bao gồm ít nhất một gốc axit amin không phải là phenylalanin ở vị trí 273 trong protein N, một gốc axit amin không phải là tyrosin ở vị trí 394 trong protein N và một gốc axit amin không phải là arginin hoặc lysin ở vị trí 333 trong protein G (ngoại trừ chủng đột biến Ni-CE mà vị trí 333 trong protein G của nó được thay thế bằng một gốc axit amin không phải là arginin hoặc lysin) bằng cách nuôi cấy tế bào.

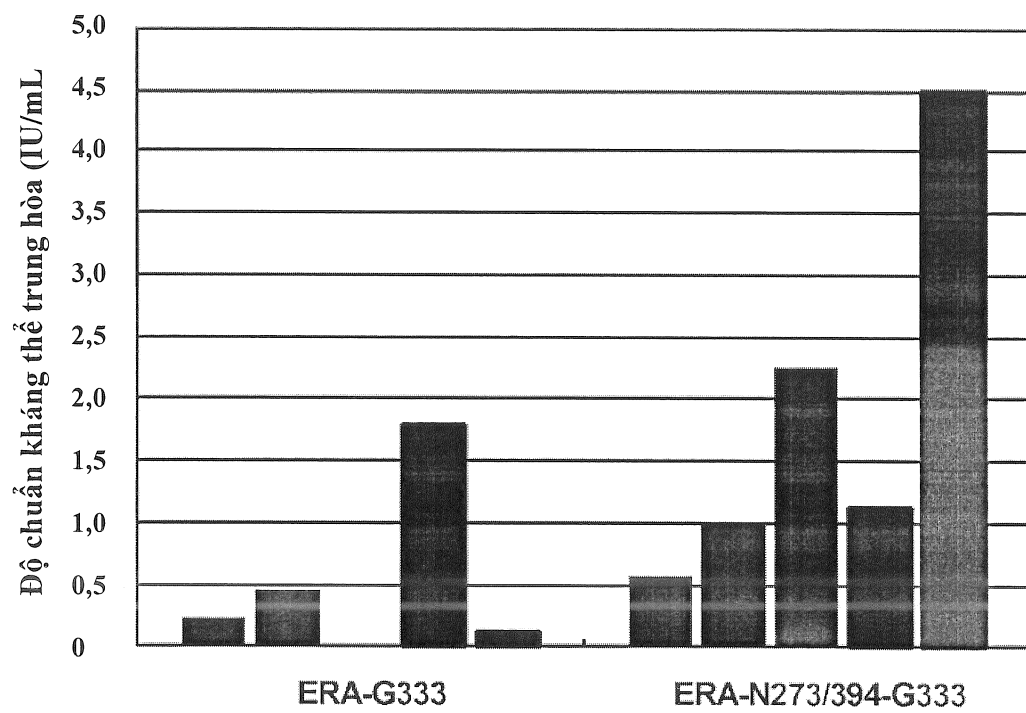


Fig. 1

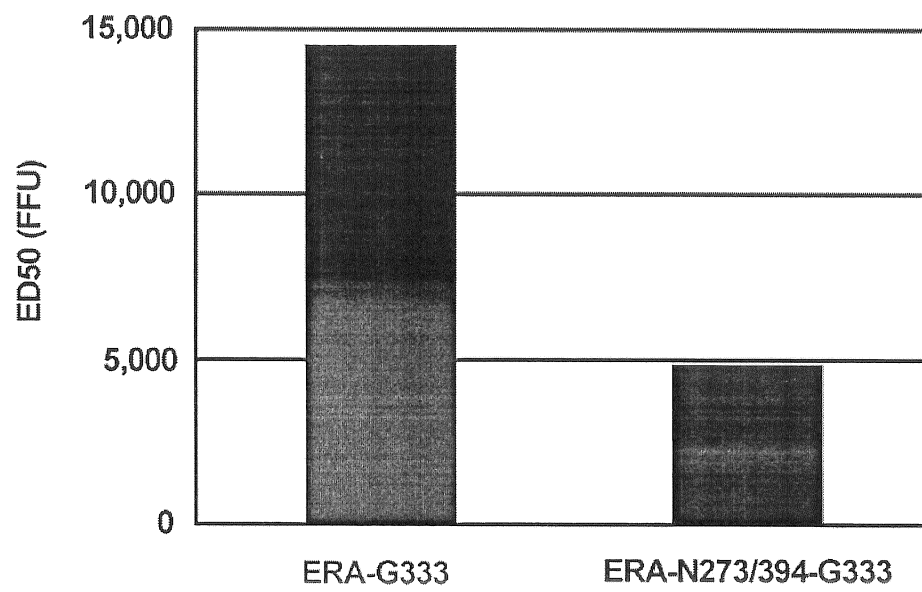


Fig.2

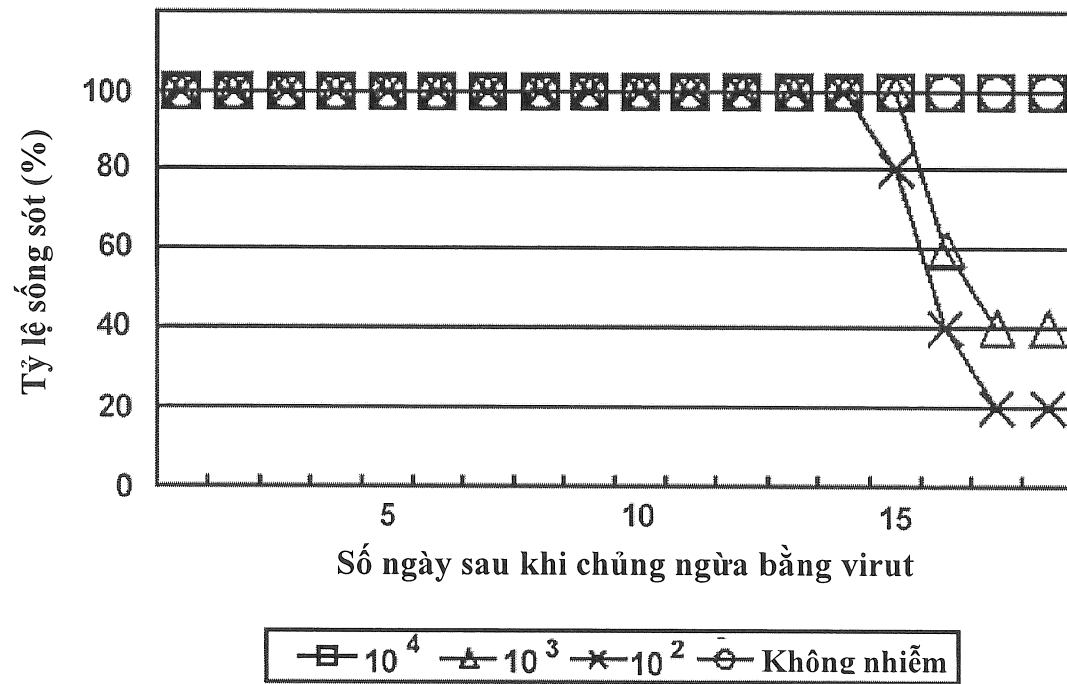


Fig.3A

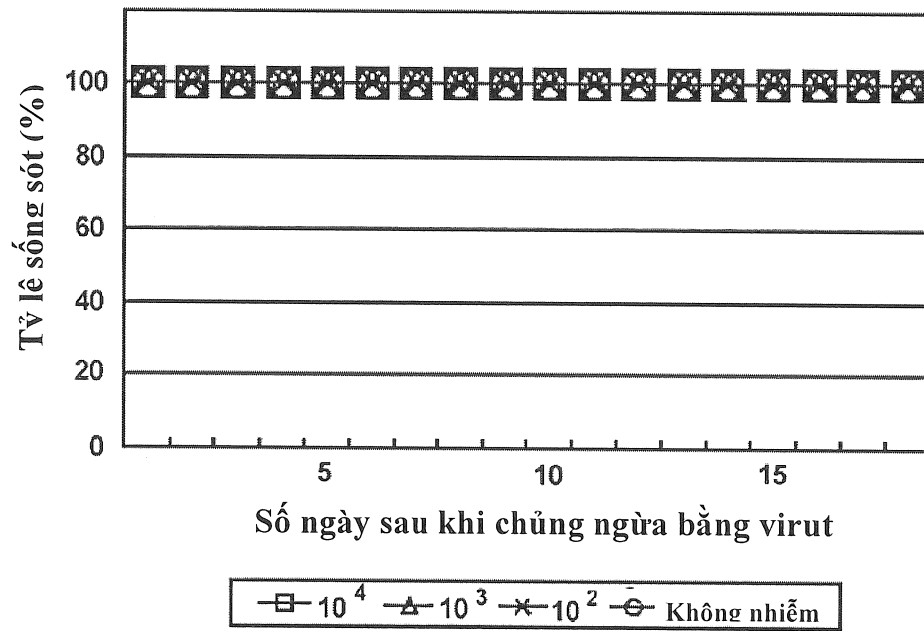


Fig. 3B

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Gifu University

Kyoritsu Seiyaku Corporation

Ito, Naoto

Sugiyama, Makoto

<120> Virut gây bệnh đại đột biến, chế phẩm vacxin phòng bệnh đại chứa virut đột biến này và phương pháp sản xuất vacxin phòng bệnh đại

<130> KR003

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 450

<212> PRT

<213> Virut gây bệnh đại

<400> 1

Met Asp Ala Asp Lys Ile Val Phe Lys Val Asn Asn Gln Val Val Ser

1 5 10 15

Leu Lys Pro Glu Ile Ile Val Asp Gln Tyr Glu Tyr Lys Tyr Pro Ala

20 25 30

Ile Lys Asp Leu Lys Lys Pro Cys Ile Thr Leu Gly Lys Ala Pro Asp

35 40 45

Leu Asn Lys Ala Tyr Lys Ser Val Leu Ser Gly Met Ser Ala Ala Lys

50 55 60

Leu Asp Pro Asp Asp Val Cys Ser Tyr Leu Ala Ala Ala Met Gln Phe

65 70 75 80

Phe Glu Gly Thr Cys Pro Glu Asp Trp Thr Ser Tyr Gly Ile Val Ile
 85 90 95
 Ala Arg Lys Gly Asp Lys Ile Thr Pro Gly Ser Leu Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Asp Val Glu Gly Asn Trp Ala Leu Thr Gly Gly Met Glu Leu
 115 120 125
 Thr Arg Asp Pro Thr Val Pro Glu His Ala Ser Leu Val Gly Leu Leu
 130 135 140
 Leu Ser Leu Tyr Arg Leu Ser Lys Ile Ser Gly Gln Asn Thr Gly Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Asn Ile Ala Asp Arg Ile Glu Gln Ile Phe Glu Thr Ala
 165 170 175
 Pro Phe Val Lys Ile Val Glu His His Thr Leu Met Thr Thr His Lys
 180 185 190
 Met Cys Ala Asn Trp Ser Thr Ile Pro Asn Phe Arg Phe Leu Ala Gly
 195 200 205
 Thr Tyr Asp Met Phe Phe Ser Arg Ile Glu His Leu Tyr Ser Ala Ile
 210 215 220
 Arg Val Gly Thr Val Val Thr Ala Tyr Glu Asp Cys Ser Gly Leu Val
 225 230 235 240
 Ser Phe Thr Gly Phe Ile Lys Gln Ile Asn Leu Thr Ala Arg Glu Ala
 245 250 255
 Ile Leu Tyr Phe Phe His Lys Asn Phe Glu Glu Glu Ile Arg Arg Met
 260 265 270

Leu Glu Pro Gly Gln Glu Thr Ala Val Pro His Ser Tyr Phe Ile His
 275 280 285
 Phe Arg Ser Leu Gly Leu Ser Gly Lys Ser Pro Tyr Ser Ser Asn Ala
 290 295 300
 Val Gly His Val Phe Asn Leu Ile His Phe Val Gly Cys Tyr Met Gly
 305 310 315 320
 Gln Val Arg Ser Leu Asn Ala Thr Val Ile Ala Ala Cys Ala Pro His
 325 330 335
 Glu Met Ser Val Leu Gly Gly Tyr Leu Gly Glu Glu Phe Phe Gly Lys
 340 345 350
 Gly Thr Phe Glu Arg Arg Phe Phe Arg Asp Glu Lys Glu Leu Gln Glu
 355 360 365
 Tyr Glu Ala Ala Glu Leu Thr Lys Thr Asp Val Ala Leu Ala Asp Asp
 370 375 380
 Gly Thr Val Asn Ser Asp Asp Glu Asp His Phe Ser Gly Glu Thr Arg
 385 390 395 400
 Ser Pro Glu Ala Val Tyr Thr Arg Ile Met Met Asn Gly Gly Arg Leu
 405 410 415
 Lys Arg Ser His Ile Arg Arg Tyr Val Ser Val Ser Ser Asn His Gln
 420 425 430
 Ala Arg Pro Asn Ser Phe Ala Glu Phe Leu Asn Lys Thr Tyr Ser Ser
 435 440 445
 Asp Ser
 450

<210> 2

<211> 524

<212> PRT

<213> Virut gây bệnh dại

<400> 2

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu

1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Tyr Thr Ile Pro Asp Lys Leu Gly Pro

20 25 30

Trp Ser Pro Ile Asp Ile His His Leu Ser Cys Pro Asn Asn Leu Val

35 40 45

Val Glu Asp Glu Gly Cys Thr Asn Leu Ser Gly Phe Ser Tyr Met Glu

50 55 60

Leu Lys Val Gly Tyr Ile Leu Ala Ile Lys Met Asn Gly Phe Thr Cys

65 70 75 80

Thr Gly Val Val Thr Glu Ala Glu Thr Tyr Thr Asn Phe Val Gly Tyr

85 90 95

Val Thr Thr Thr Phe Lys Arg Lys His Phe Arg Pro Thr Pro Asp Ala

100 105 110

Cys Arg Ala Ala Tyr Asn Trp Lys Met Ala Gly Asp Pro Arg Tyr Glu

115 120 125

Glu Ser Leu Gln Asn Pro Tyr Pro Asp Tyr Arg Trp Leu Arg Thr Val

130 135 140

Lys Thr Thr Lys Glu Ser Leu Val Ile Ile Ser Pro Ser Val Ala Asp

145 150 155 160

Leu Asp Pro Tyr Asp Arg Ser Leu His Ser Arg Val Phe Pro Ser Gly
 165 170 175
 Lys Cys Ser Gly Val Ala Val Ser Ser Thr Tyr Cys Ser Thr Asn His
 180 185 190
 Asp Tyr Thr Ile Trp Met Pro Glu Asn Pro Arg Leu Gly Met Ser Cys
 195 200 205
 Asp Ile Phe Thr Asn Ser Arg Gly Lys Arg Ala Ser Lys Gly Ser Glu
 210 215 220
 Thr Cys Gly Phe Val Asp Glu Arg Gly Leu Tyr Lys Ser Leu Lys Gly
 225 230 235 240
 Ala Cys Lys Leu Lys Leu Cys Gly Val Leu Gly Leu Arg Leu Met Asp
 245 250 255
 Gly Thr Trp Val Ala Met Gln Thr Ser Asn Glu Thr Lys Trp Cys Pro
 260 265 270
 Pro Asp Gln Leu Val Asn Leu His Asp Phe His Ser Asp Glu Ile Glu
 275 280 285
 His Leu Val Val Glu Glu Leu Val Arg Lys Arg Glu Glu Cys Leu Asp
 290 295 300
 Ala Leu Glu Ser Ile Met Thr Thr Lys Ser Val Ser Phe Arg Arg Leu
 305 310 315 320
 Ser His Leu Arg Lys Leu Val Pro Gly Phe Gly Lys Ala Tyr Thr Ile
 325 330 335
 Phe Asn Lys Thr Leu Met Glu Ala Asp Ala His Tyr Lys Ser Val Glu
 340 345 350

Thr Trp Asn Glu Ile Ile Pro Ser Lys Gly Cys Leu Arg Val Gly Gly

355

360

365

Arg Cys His Pro His Val Asn Gly Val Phe Phe Asn Gly Ile Ile Leu

370

375

380

Gly Pro Asp Gly Asn Val Leu Ile Pro Glu Met Gln Ser Ser Leu Leu

385

390

395

400

Gln Gln His Met Glu Leu Leu Glu Ser Ser Val Ile Pro Leu Val His

405

410

415

Pro Leu Ala Asp Pro Ser Thr Ile Phe Lys Asp Gly Asp Glu Ala Glu

420

425

430

Asp Phe Val Glu Val His Leu Pro Asp Val His Asn Gln Val Ser Gly

435

440

445

Val Asp Leu Gly Leu Pro Asn Trp Gly Lys Tyr Val Leu Leu Ser Ala

450

455

460

Gly Ala Leu Thr Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe Leu Met Thr Cys Cys

465

470

475

480

Arg Arg Val Asn Arg Ser Glu Pro Thr Gln His Asn Leu Arg Gly Thr

485

490

495

Gly Arg Glu Val Ser Val Thr Pro Gln Ser Gly Lys Ile Ile Ser Ser

500

505

510

Trp Glu Ser His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg Leu

515

520

<210> 3

<211> 11932

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bộ gen chiều dài đủ của virus gây bệnh đại đột biến

<400> 3

```

acgcttaaca accagatcaa agaaaaaaca gacattgtca attgcaaagc aaaaatgtaa      60
cacccttaca atggatgccg acaagattgt attcaaagtc aataatcagg tggctctcttt      120
gaagcctgag attatcgtgg atcaatatga gtacaagtac cctgccatca aagatttgaa      180
aaagccctgt ataaccctag gaaaggctcc cgatttaaataa aaagcataca agtcggtttt      240
gtcaggcatg agcgccgcca aacttgatcc tgacgatgta tgttcctatt tggcagcggc      300
aatgcagttt ttgagggga catgtccgga agactggacc agctatggaa tcgtgattgc      360
acgaaaagga gataagatca cccaggttc tctgggtggag ataaaacgta ctgatgtaga      420
aggggaattgg gctctgacag gaggcattga actgacaaga gacccactg tccctgagca      480
tgcgtoctta gtcggtcttc tcttgagtct gtatagggtg agcaaaatat ccgggcaaaa      540
cactggtaac tataagacaa acattgcaga caggatagag cagatttttg agacagcccc      600
ttttgttaaa atcgtggaac accatactct aatgacaact cacaaaatgt gtgctaattg      660
gagtactata ccaaacttca gatttttggc cggaacctat gacatgtttt tctcccggat      720
tgagcatcta tattcagcaa tcagagtggg cacagttgtc actgcttatg aagactgttc      780
aggactggta tcatttactg gggtcataaa acaaatcaat ctcaccgcta gagaggcaat      840
actatatattc ttccacaaga actttgagga agagataaga agaatgctcg agccagggca      900
ggagacagct gttcctcact cttatttcat ccacttccgt tcactaggct tgagtgggaa      960
atctccttat tcatcaaatg ctgttggtca cgtgttcaat ctcatcact ttgtaggatg     1020
ctatatgggt caagtcagat ccctaaatgc aacgggtatt gctgcatgtg ctccctcatga     1080
aatgtctgtt ctagggggct atctgggaga ggaattcttc gggaaaggga catttgaaag     1140
aagattcttc agagatgaga aagaacttca agaatacgag gcggtgaac tgacaaagac     1200
tgacgtagca ctggcagatg atggaactgt caactctgac gacgaggacc acttctcagg     1260

```

tgaaccaga agtccggagg ctgtttatac tcgaatcatg atgaatggag gtcgactaaa	1320
gagatctcac atacggagat atgtctcagt cagttccaat catcaagccc gtccaaactc	1380
attcgccgag tttctaaaca agacatatc gagtgactca taagaagttg aataacaaaa	1440
tgccggaaat ctacggattg tgtatatcca tcatgaaaaa aactaacacc cctcctttcg	1500
aaccatccca aacatgagca agatctttgt caatcctagt gctattagag ccggtctggc	1560
cgatcttgag atggctgaag aaactgttga tctgatcaat agaaatatcg aagacaatca	1620
ggctcatctc caaggggaac ctatagaggt ggacaatctc cctgaggata tggggcgact	1680
tcacctggat gatggaaaat cgcccaacca tggtgagatg gccaaggtgg gagaaggcaa	1740
gtatcgagag gactttcaga tggatgaagg agaggatcct agcttcctgt tccagtcata	1800
cctggaaaat gttggagtcc aaatagtcag acaaatgagg tcaggagaga gattttctcaa	1860
gatatgggtca cagaccgtag aagagattat atcctatgtc gcggtcaact ttcccaaccc	1920
tccaggaaag tottcagagg ataaatcaac ccagactact ggccgagagc tcaagaagga	1980
gacaacaccc actccttctc agagagaaaag ccaatcatcg aaagccagga tggcgggtca	2040
aactgcttct ggccctccag cccttgaatg gtcggccacc aatgaagagg atgatctatc	2100
agtggagggt gagatcgctc accagattgc agaaagtttc tccaaaaaat ataagtttcc	2160
ctctcgatcc tcagggatac tcttgataa ttttgagcaa ttgaaaatga accttgatga	2220
tatagttaaa gaggcaaaaa atgtaccagg tgtgaccctg ttagcccatg acgggtccaa	2280
actcccccta agatgtgtac tgggatgggt cgctttggcc aactctaaga aattccagtt	2340
gttagtcgaa tccgacaagc tgagtaaaat catgcaagat gacttgaatc gctatacatc	2400
ttgctaaccg aacctctccc ctcagtcctt ctagacaata aagtccgaga tgtcctaaag	2460
tcaacatgaa aaaaacaggc aacaccactg ataaaatgaa cttcctacgt aagatagtga	2520
aaaattgcag ggacgaggac actcaaaaac cctctcccgc gtcagcccct ctggatgacg	2580
atgacccgtg gottccaccc cctgaatacg tcccgtgaa agaacctaca agcaagaaga	2640
acatgaggaa cttttgtatc aacggagggg ttaaagtgtg tagcccgaat ggttactcgt	2700
tcaggatcct gcggcacatt ctgaaatcat tcgacgagat atattctggg aatcatagga	2760

tgatcggggtt agtcaaagta gttattggac tggctttgtc aggatctcca gtccctgagg	2820
gcatgaactg ggtatacaaa ttgaggagaa cctttatctt ccagtgggct gattccaggg	2880
gccctcttga aggggaggag ttggaatact ctcaggagat cacttgggat gatgatactg	2940
agttcgtcgg attgcaaata agagtgattg caaaacagtg tcatatccag ggcagaatct	3000
ggtgtatcaa catgaacccg agagcatgtc aactatggtc tgacatgtct cttcagacac	3060
aaagggtccga agaggacaaa gattcctctc tgcttctaga ataatcagat tatatccgc	3120
aaatttatca cttgtttacc tctgcaggag agaacatatg agctcaactc caacccttgg	3180
gagcaatata acaaaaaaac atgttatggt gccattaaac cgctgcattt catcaaagtc	3240
aagttgatta cctttacatt ttgatcctct tggatgtgaa aaaaactatt aacatccctc	3300
aaaagactca aggaaagatg gttcctcagg ctctcctgtt tgtaccctt ctggtttttc	3360
cattgtgttt tgggaaattc cctatttaca cgataccaga caagcttggg ccctggagcc	3420
cgattgacat acatcacctc agctgcccc acaatttggg agtggaggac gaaggatgca	3480
ccaacctgtc aggggttctcc tacatggaac taaaagttgg atacatctta gccataaaaa	3540
tgaacggggtt cacttgcaca ggcgttgtga cggaggctga aacctacact aacttcgttg	3600
gttatgtcac aaccacgttc aaaagaaaagc atttccgccc aacaccagat gcatgtagag	3660
ccgctgatac ctggaagatg gccggtgacc ccagatatga agagtctcta caaaatccgt	3720
accctgacta ccgctggctt cgaactgtaa aaaccaccaa ggagtctctc gttatcatat	3780
ctccaagtgt ggcagatttg gacctatatg acagatccct tactcggagg gtcttccta	3840
gcgggaagtg ctggggagta gcggtgtctt ctacctactg ctccactaac cacgattaca	3900
ccatttggat gcccgagaat ccgagactag ggatgtcttg tgacattttt accaatagta	3960
gaggggaagag agcatccaaa gggagtgaga cttgcggctt tgtagatgaa agaggcctat	4020
ataagtcttt aaaaggagca tgcaaactca agttatgtgg agttctagga cttagactta	4080
tggatggaac atgggtcgcg atgcaaacat caaatgaaac caaatgggtgc cctcccgatc	4140
agttggtgaa cctgcacgac tttcactcag acgaaattga gcaccttgtt gtagaggagt	4200
tggtcaggaa gagagaggag tgtctggatg cactagagtc catcatgaca accaagtcag	4260

tgagtttcag acgtctcagt catttaagaa aacttgtccc tgggttttga aaagcatata	4320
ccatattcaa caagaccttg atggaagccg atgctcacta caagtcagtc gaaacttgga	4380
atgagatcat cccttcaaaa ggggtgttta gagttggggg gaggtgtcat cctcatgtga	4440
acgggggtgtt tttcaatggt ataataattag gacctgacgg caatgtctta atcccagaga	4500
tgcaatcatc cctcctccag caacatatgg agttgtttga atcctcgggt atcccccttg	4560
tgcaccccct ggcagacccg tctaccatth tcaaggacgg tgacgaggcc gaggattttg	4620
ttgaagttca ccttcccgat gtgcacaatc aggtctcagg agttgacttg ggtctccga	4680
actgggggaa gtatgtatta ctgagtgcag gggccctgac tgccttgatg ttgataatth	4740
tcttgatgac atgttgtaga agagtcaatc gatcagaacc tacgcaacac aatctcagag	4800
ggacagggag ggaggtgtca gtcactcccc aaagcgggaa gatcatatct tcatgggaat	4860
cacacaagag tgggggtgag accagactgt gaggactggc cgtcctttca acgatccaag	4920
tctgaagat cacctcccct tgggggggttc tttttgaaaa aaaacctggg ttcaatagtc	4980
ctccttgaac tocatgcaac tgggtagatt caagagtcag gagattttca ttaatcctct	5040
cagttgatca agcaagatca tgtagattct cataataggg gagatcttct agcagtttca	5100
gtgactaacg gtactttcat tctccaggaa ctgacaccaa cagttgtaga caaaccacgg	5160
agtgtctcgg gtgactctgt gcttgggcac agacaaaagg catggtgtgt tccatgatag	5220
cggactcagg atgagttaat tgagagaggc agtcttcctc cctgaagga cataagcagt	5280
agctcacaat catctcgcgt ctgaccaaag tgtgcataat tataaagtgc tgggtcatct	5340
aagcttttca gtcgagaaaa aaacattaga tcagaagaac aactggcaac acttctcaac	5400
ctgagatcta cttcaagatg ctcgatcctg gagagggtcta tgatgaccct attgacccaa	5460
tcgagttaga ggctgaacct agaggaacct ccattgtccc caacatcttg aggaactctg	5520
actacaatct caactctcct ttgatagaag atcctgctag actaatgtta gaatggttaa	5580
aaacagggaa tagaccttat cggatgactc taacagacaa ttgctccagg tctttcagag	5640
ttttgaaaga ttatttcaag aaggtagatt tgggttctct caagggtgggc ggaatggctg	5700
cacagtcaat gatttctctc tggttatatg gtgcccactc tgaatccaac aggagccgga	5760

gatgtataac agacttggcc catttctatt ccaagtcgtc ccccatagag aagctgttga	5820
atctcacgct aggaaataga gggctgagaa tccccccaga gggagtgtta agttgccttg	5880
agaggggttga ttatgataat gcatttggaa ggtatcttgc caacacgtat tcctcttact	5940
tgttcttcca tgtaatcacc ttatacatga acgccctaga ctgggatgaa gaaaagacca	6000
tcctagcatt atggaaagat ttaacctcag tggacatcgg gaaggacttg gtaaagttca	6060
aagaccaa atggtggactg ctgatcgtga caaaggactt tgtttactcc caaagttcca	6120
attgtctttt tgacagaaac tacacactta tgctaaaaga tcttttcttg tctcgcttca	6180
actcctta atggtcttgc tctccccag agccccgata ctcatgatgac ttgatattctc	6240
aactatgcc aactgtacatt gctggggatc aagtcttgc tatgtgtgga aactccggct	6300
atgaagtc ataaaatattg gagccatatg tcgtgaatag tttagtccag agagcagaaa	6360
agtttagggc tctcattcat tccttgggag actttcctgt atttataaaa gacaaggtaa	6420
gtcaacttga agagacgttc ggtccctgtg caagaagggt ctttagggct ctggatcaat	6480
tcgacaacat acatgacttg gtttttgtgt atggctgtta caggcattgg gggcacccat	6540
atatagatta tcgaaagggc ctgtcaaaac tatatgatca gggtcacatt aaaaaagtga	6600
tagataagtc ctaccaggag tgcttagcaa gcggcctagc caggaggatc cttagatggg	6660
gttttgataa gtactccaag tggatatctg attcaagatt cctagcccga gaccaccct	6720
tgactcctta tatcaaaacc caaacatggc cacccaaaca tattgtagac ttggtggggg	6780
atacatggca caagctccc atcacgcaga tctttgagat tcctgaatca atggatccgt	6840
cagaaatatt ggatgacaaa tcacattctt tcaccagacc gagactagct tcttggctgt	6900
cagaaaaccg agggggggcct gttcctagcg aaaaagttat tatcacggcc ctgtctaagc	6960
cgctgtcaa tccccgagag tttctgaggt ctatagacct cggaggattg ccagatgaag	7020
acttgataat tggcctcaag ccaaaggaac gggaattgaa gattgaaggc cgattctttg	7080
ctctaattgc atggaatcta agattgtatt ttgtcatcac tgaaaaactc ttggccaact	7140
acatcttgcc actttttgac gcgctgacta tgacagacaa cctgaacaag gtgtttaaaa	7200
agctgatcga cagggtcacc gggcaagggc ttttggaacta ttcaagggtc acatatgcat	7260

ttcacctgga ctatgaaaag tggaacaacc atcaaagatt agagtcaaca gaggatgtat	7320
tttctgtcct agatcaagtg tttggattga agagagtgtt ttctagaaca cacgagtttt	7380
ttcaaaaggc ctggatctat tattcagaca gatcagacct catcgggtta cgggaggatc	7440
aaatatactg cttagatgcg tccaacggcc caacctgttg gaatggccag gatggcgggc	7500
tagaaggctt acggcagaag ggctggagtc tagtcagctt attgatgata gatagagaat	7560
ctcaaatacag gaacacaaga accaaaatac tagctcaagg agacaaccag gttttatgtc	7620
cgacatatat gttgtcgcca gggctatctc aagaggggct cctctatgaa ttggagagaa	7680
tatcaaggaa tgcactttcg atatacagag ccgtcgagga aggggcatct aagctagggc	7740
tgatcatcaa gaaagaagag accatgtgta gttatgactt cctcatctat ggaaaaaccc	7800
ctttgttttag aggtaacata ttggtgcctg agtccaaaag atggggcaga gtctcttgcg	7860
tctctaataga ccaaatagtc aacctcgcca atataatgtc gacagtgtcc accaatgcmc	7920
taacagtggc acaacactct caatctttga tcaaaccgat gagggatttt ctgctcatgt	7980
cagtacaggc agtctttcac tacctgctat ttagcccaat cttaaaggga agagtttaca	8040
agattctgag cgctgaaggg gagagctttc tcctagccat gtcaaggata atctatctag	8100
atccttcttt gggaggggta tctggaatgt ccctcggaag attccatata cgacagttct	8160
cagaccctgt ctctgaaggg ttatccttct ggagagagat ctggttaagc tcccacgagt	8220
cctggattca cgcgttgtgt caagaggctg gaaaccaga tcttgagag agaacactcg	8280
agagcttcac tcgccttcta gaagatccta ccaccttaaa tatcagagga ggggccagtc	8340
ctaccattct actcaaggat gcaatcagaa aggctttata tgacgaggtg gacaaggtgg	8400
agaattcaga gtttcgagag gcaatcctgt tgtccaagac ccatagagat aattttatac	8460
tcttcttaac atctgttgag cctctgtttc ctcgatttct cagttagcta ttcagttcgt	8520
cttttttggg aatccccgag tcaatcattg gattgataca aaactcccga acgataagaa	8580
ggcagtttag aaagagtctc tcaaaaactt tagaagaatc cttctacaac tcagagatcc	8640
acgggatttag tcggatgacc cagacacctc agaggggttg gggggtgtgg ccttgctctt	8700
cagagagggc agatctactt agggagatct cttggggaag aaaagtggta ggcacgacag	8760

ttcctcacc	ttctgagatg	ttgggggttac	ttcccaagtc	ctctatttct	tgcacttgtg	8820
gagcaacagg	aggaggcaat	cctagagttt	ctgtatcagt	actcccgtcc	tttgatcagt	8880
catttttttc	acgaggcccc	ctaaaggggt	acttgggctc	gtccacctct	atgtcgaccc	8940
agctattcca	tgcattggga	aaagtcacta	atgttcatgt	ggtgaagaga	gctctatcgt	9000
taaaagaatc	tataaactgg	ttcattacta	gagattccaa	cttgggtcaa	gctctaatta	9060
ggaacattat	gtctctgaca	ggccctgatt	tccctctaga	ggaggccccct	gtcttcaaaa	9120
ggacggggtc	agccttgcct	aggttcaagt	ctgccagata	cagcgaagga	gggtattctt	9180
ctgtctgccc	gaacctctct	tctcatatct	ctgttagtac	agacaccatg	tctgatttga	9240
ccaagacgg	gaagaactac	gatttcatgt	tccagccatt	gatgctttat	gcacagacat	9300
ggacatcaga	gctggtacag	agagacacaa	ggctaagaga	ctctacgttt	cattggcacc	9360
tccgatgcaa	caggtgtgtg	agaccattg	acgacgtgac	cctggagacc	tctcagatct	9420
tgcagtttcc	ggatgtgtcg	aaaagaatat	ccagaatggg	ttctggggct	gtgcctcact	9480
tccagaggct	tcccgatata	cgtctgagac	caggagattt	tgaatctcta	agcggtagag	9540
aaaagtctca	ccatatcgga	tcagctcagg	ggctcttata	ctcaatctta	gtggcaattc	9600
acgactcagg	atacaatgat	ggaaccatct	tccctgtcaa	catatacggc	aagggttccc	9660
ctagagacta	tttgagaggg	ctcgcaaggg	gagtattgat	aggatcctcg	atttgcttct	9720
tgacaagaat	gacaaatata	aatattaata	gacctcttga	attgatctca	ggggtaattct	9780
catatattct	cctgaggcta	gataaccatc	cctccttgta	cataatgctc	agagaaccgt	9840
ctcttagagg	agagatatct	tctatccctc	agaaaatccc	cgcgcgttat	ccaaccacta	9900
tgaaagaagg	caacagatca	atcttgtggt	atctccaaca	tgtgctacgc	tatgagcgag	9960
agataatcac	ggcgtctcca	gagaatgact	ggctatggat	cttttcagac	tttagaagtg	10020
ccaaaatgac	gtacctaac	ctcattactt	accagtctca	tcttctactc	cagagggttg	10080
agagaaacct	atctaagagt	atgagagata	acctgogaca	attgagttcc	ttgatgaggc	10140
aggtgctggg	cgggcacgga	gaagatacct	tagagtcaga	cgacaacatt	caacgactgc	10200
taaaagactc	tttacgaagg	acaagatggg	tggatcaaga	ggtgcgccat	gcagctagaa	10260

ccatgactgg agattacagc cccaacaaga aggtgtcccg taaggtagga tgttcagaat 10320
 ggggtctgctc tgctcaacag gttgcagtct ctacctcagc aaacccggcc cctgtctcgg 10380
 agcttgacat aagggccctc tctaagaggt tccagaacct tttgatctcg ggcttgagag 10440
 tggttcagtg ggcaaccggt gtcattata agcttaagcc tattctagat gatctcaatg 10500
 ttttcccatc tctctgcctt gtagttgggg acgggtcagg ggggatatca ggggcagtcc 10560
 tcaacatggt tccagatgcc aagcttgtgt tcaacagtct tttagagggtg aatgacctga 10620
 tggcttccgg aacacatcca ctgcctcctt cagcaatcat gaggggagga aatgatatcg 10680
 tctccagagt gatagatctt gactcaatct gggaaaaacc gtccgacttg agaaacttgg 10740
 caacctggaa atacttccag tcagtccaaa agcagggtcaa catgtcctat gacctatta 10800
 tttgcgatgc agaagttact gacattgcat ctatcaaccg gataaccctg ttaatgtccg 10860
 attttgcatt gtctatagat ggaccactct atttggctct caaaacttat gggactatgc 10920
 tagtaaatcc aaactacaag gctattcaac acctgtcaag agcgttcccc tcggtcacag 10980
 ggtttatcac ccaagtaact tcgtcttttt catctgagct ctacctccga ttctccaaac 11040
 gaggggaagtt tttcagagat gctgagtact tgacctcttc cactcttcga gaaatgagcc 11100
 ttgtgttatt caattgtagc agccccaaga gtgagatgca gagagctcgt tccttgaact 11160
 atcaggatct tgtgagagga tttcctgaag aaatcatatc aaatccttac aatgagatga 11220
 tcataactct gattgacagt gatgtagaat cttttctagt ccacaagatg gttgatgatc 11280
 ttgagttaca gaggggaact ctgtctaaag tggctatcat tatagccatc atgatagttt 11340
 tctccaacag agtcttcaac gtttccaaac ccctaactga ccccttgctc catccaccgt 11400
 ctgatcccaa aatcctgagg cacttcaaca tatgttgcag tactatgatg tatctatcta 11460
 ctgctttagg tgacgtccct agcttcgcaa gacttcacga cctgtataac agacctataa 11520
 cttattactt cagaaagcaa gtcattcgag ggaacgttta tctatcttgg agttgggtcca 11580
 acgacacctc agtggtcaaa agggtagcct gtaattctag cctgagctcg tcatctcact 11640
 ggatcagggt gatttacaag atagtgaaga ctaccagact cgttggcagc atcaaggatc 11700
 tatccagaga agtggaaaga caccttcata ggtacaacag gtggatcacc ctagaggata 11760

tcagatctag atcatcccta ctagactaca gttgcctgtg aaccggatac tcctggaagc 11820
ctgcccattgc taagactctt gtgtgatgta tcttgaaaaa aacaagatcc taaatctgaa 11880
cctttggttg ttgattggt tttctcattt ttgttgttta ttgtttaagc gt 11932