

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-540773

(P2022-540773A)

(43)公表日 令和4年9月20日(2022.9.20)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/40 (2006.01)	C 1 2 N 15/40	4 B 0 6 5
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	4 C 0 8 5
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	4 H 0 4 5
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	Z N A
C 0 7 K 14/18 (2006.01)	C 0 7 K 14/18	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全109頁)

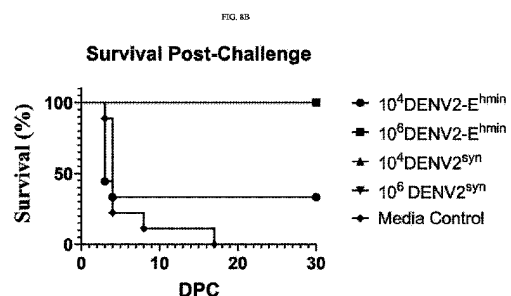
(21)出願番号	特願2021-576889(P2021-576889)	(71)出願人	519102071
(86)(22)出願日	令和2年6月23日(2020.6.23)		コーダージェニックス・インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和4年2月16日(2022.2.16)		C O D A - G E N I X , I N C .
(86)国際出願番号	PCT/US2020/039166		アメリカ合衆国11735-0176 ニューヨーク州ファーマーグデイル、バイオサイエンス・パーク・ドライブ3番
(87)国際公開番号	WO2020/263850	(74)代理人	100102978
(87)国際公開日	令和2年12月30日(2020.12.30)		弁理士 清水 初志
(31)優先権主張番号	62/866,477	(74)代理人	100102118
(32)優先日	令和1年6月25日(2019.6.25)		弁理士 春名 雅夫
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100160923
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,最終頁に続く	(74)代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 弱毒化デングウイルス

(57)【要約】

本発明は、改変型フラビウイルス、例えば改変型デングウイルス1型、2型、3型、4型、これらの組合せ、またはこれらの四価の組合せを提供する。本発明の様々な局面による改変は、親ウイルスと比較して低減されたウイルスタンパク質発現を結果としてもたらし、発現における低減は、ウイルスの1つまたは複数の領域を再コードした結果である。例えば、prM、またはエンベロープ(E)領域が再コードされ得る。様々な態様において、1つまたは複数の領域は、タンパク質コーディング配列のコドンペアバイアスまたはコドン使用頻度バイアスを低減させることにより再コードされる。これらの改変型フラビウイルスは、保護免疫応答を提供するためにワクチン組成物として使用される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

改変型 Deng ウイルスであって、
再コードされた prM タンパク質、再コードされたエンベロープ（E）タンパク質、または両方を含み、

前記再コードされた prM タンパク質が、
その親 prM タンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有し、または

より低い頻度で使用する同義コドンで置換された少なくとも 5 つのコドンを有し、または

その親 prM タンパク質コーディング配列と比較して増加した数の CpG もしくは UpA ジヌクレオチドを有し；かつ

前記再コードされた E タンパク質が、
その親 E タンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有し、または

より低い頻度の同義コドンで置換された少なくとも 5 つのコドンを有し、または

その親 E タンパク質コーディング配列と比較して増加した数の CpG もしくは UpA ジヌクレオチドを有する、
改変型 Deng ウイルス。

10

【請求項 2】

前記 prM タンパク質もしくは E タンパク質または両方の発現が、その親 Deng ウイルスと比較して低減されている、請求項 1 記載の改変型 Deng ウイルス。

20

【請求項 3】

前記再コードされた prM タンパク質が、その親 prM タンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有する、請求項 1 記載の改変型 Deng ウイルス。

【請求項 4】

前記再コードされた prM タンパク質が、より低い頻度で使用する同義コドンで置換された少なくとも 5 つのコドンを有する、請求項 1 記載の改変型 Deng ウイルス。

【請求項 5】

前記再コードされた prM タンパク質が、その親 prM タンパク質コーディング配列と比較して増加した数の CpG または UpA ジヌクレオチドを有する、請求項 1 記載の改変型 Deng ウイルス。

30

【請求項 6】

前記再コードされた E タンパク質が、その親 E タンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有する、請求項 1 記載の改変型 Deng ウイルス。

【請求項 7】

前記再コードされた E タンパク質が、より低い頻度で使用する同義コドンで置換された少なくとも 5 つのコドンを有する、請求項 1 記載の改変型 Deng ウイルス。

【請求項 8】

前記再コードされた E タンパク質が、その親 E タンパク質コーディング配列と比較して増加した数の CpG または UpA ジヌクレオチドを有する、請求項 1 記載の改変型 Deng ウイルス。

40

【請求項 9】

前記再コードされた prM または E タンパク質コーディング配列のそれぞれが、-0.05 未満のコドンペアバイアスを有する、請求項 1 記載の改変型 Deng ウイルス。

【請求項 10】

前記再コードされた prM または E タンパク質コーディング配列のそれぞれの前記コドンペアバイアスが、少なくとも 0.05 低減されている、請求項 1 記載の改変型 Deng ウイルス。

【請求項 11】

50

1型、2型、3型、4型またはこれらの組合せから選択される、請求項1記載の改変型デングウイルス。

【請求項12】

改変型四価デングウイルスである、請求項1記載の改変型デングウイルス。

【請求項13】

請求項1～12のいずれか一項記載の改変型デングウイルスと、
薬学的に許容される賦形剤または担体と
を含む、対象において保護免疫応答を誘導するためのデングワクチン組成物。

【請求項14】

対象において免疫応答を誘発する方法であって、
前記対象に、請求項1～12のいずれか一項記載の改変型デングウイルスを含む有効量の組成物を投与する工程
を含む、方法。

【請求項15】

前記免疫応答が保護免疫応答であり、かつ予防有効用量のまたは治療有効用量の請求項記載のワクチン組成物が投与される、請求項14記載の方法。

【請求項16】

前記対象に、少なくとも1つのアジュバントを投与する工程をさらに含む、請求項14記載の方法。

【請求項17】

前記免疫応答が異種デングウイルスに対して交差保護的である、請求項14記載の方法。

【請求項18】

それを必要とする対象において免疫応答を誘発する方法であって、以下の工程：
プライム用量の、

(i) コドンペア脱最適化もしくはコドン脱最適化、もしくはCpGもしくはUpAジヌクレオチドの増加以外の方法により作製された弱毒化デングウイルス、または

(ii) 再コードされたprMタンパク質、再コードされたエンベロープ(E)タンパク質、もしくは両方を含む改変型デングウイルスであって、

前記再コードされたprMタンパク質が、

その親prMタンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有し、もしくは

より低い頻度で使用する同義コドンで置換された少なくとも5つのコドンを有し、もしくは

その親prMタンパク質コーディング配列と比較して増加した数のCpGもしくはUpAジヌクレオチドを有し、かつ

前記再コードされたEタンパク質が、

その親Eタンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有し、もしくは

より低い頻度の同義コドンで置換された少なくとも5つのコドンを有し、もしくは

その親Eタンパク質コーディング配列と比較して増加した数のCpGもしくはUpAジヌクレオチドを有する、

前記改変型デングウイルス
を投与する工程；および

1つまたは複数のブースト用量の、

(i) コドンペア脱最適化もしくはコドン脱最適化、もしくはCpGもしくはUpAジヌクレオチドの増加以外の方法により作製された弱毒化デングウイルス、または

(ii) 前記改変型デングウイルス
を、それを必要とする前記対象に投与する工程
を含み、

10

20

30

40

50

少なくとも前記プライム用量または前記1つもしくは複数のブースト用量が、前記改変型 Deng ウイルスである、方法。

【請求項 19】

前記1つまたは複数のブースト用量のうちの第1の用量が、前記プライム用量の約2週後に投与される、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

前記 prM タンパク質もしくは E タンパク質または両方の発現が、その親 Deng ウイルスと比較して低減されている、請求項18記載の方法。

【請求項 21】

前記再コードされた prM タンパク質が、その親 prM タンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有する、請求項18記載の方法。

10

【請求項 22】

前記再コードされた prM タンパク質が、より低い頻度で使用される同義コドンで置換された少なくとも5つのコドンを有する、請求項18記載の方法。

【請求項 23】

前記再コードされた prM タンパク質が、その親 prM タンパク質コーディング配列と比較して増加した数の CpG または UpA ジヌクレオチドを有する、請求項18記載の方法。

【請求項 24】

前記再コードされた E タンパク質が、その親 E タンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有する、請求項18記載の方法。

20

【請求項 25】

前記再コードされた E タンパク質が、より低い頻度で使用される同義コドンで置換された少なくとも5つのコドンを有する、請求項18記載の方法。

【請求項 26】

前記再コードされた E タンパク質が、その親 E タンパク質コーディング配列と比較して増加した数の CpG または UpA ジヌクレオチドを有する、請求項18記載の方法。

【請求項 27】

前記再コードされた prM または E タンパク質コーディング配列のそれぞれが、-0.05未満のコドンペアバイアスを有する、請求項18記載の方法。

【請求項 28】

前記再コードされた prM または E タンパク質コーディング配列のそれぞれの前記コドンペアバイアスが、少なくとも0.05低減されている、請求項18記載の方法。

30

【請求項 29】

前記改変型 Deng ウイルスが、1型、2型、3型、4型またはこれらの組合せから選択される、請求項18記載の方法。

【請求項 30】

前記改変型 Deng ウイルスが改変型四価 Deng ウイルスである、請求項18記載の方法。

【請求項 31】

改変型 Deng ウイルスゲノムを作る方法であって、

Deng ウイルスのエンベロープタンパク質をコードするヌクレオチド配列を得る工程；

40

タンパク質発現を低減させるために、前記エンベロープコーディングヌクレオチド配列を再コードする工程；および

改変型 Deng ウイルスゲノムを作るために、前記再コードされたエンベロープコーディングヌクレオチド配列を有する核酸を親 Deng ウイルスゲノム中に置換する工程を含み、ここで、前記再コードされたエンベロープコーディングヌクレオチド配列の発現が前記親ウイルスと比較して低減される、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

50

本出願は、2019年6月25日に出願された米国仮特許出願第62/866,477号に対する35 U.S.C. § 119 (e) の下での優先権の主張を含み、該仮特許出願の全体は参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

発明の分野

本発明は、高度に弱毒化されたフラビウイルス、ならびに特に弱毒化デングウイルスおよびワクチンを提供する。弱毒化ウイルスは、同じ系列のウイルスによる負荷からの保護免疫の他に、異種ウイルスに対する交差保護を提供する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

デングウイルス (DENV) は、ジカウイルス (ZIKV)、ウエストナイルウイルス (WNV)、および黄熱病ウイルス (YFV) を含む同じ属 (フラビウイルス) におけるフラビウイルス (Flaviviridae) 科に属する一本鎖ポジティブセンスRNAウイルスである。世界保健機関 (WHO) によれば、世界人口の半分に近い約25億人の人々に現在DENVのリスクがあり、世界中で毎年5000万のDENV感染症の症例があり得ると概算されている。DENVは系統発生的にZIKVに密接に関連しており、ZIKVおよびチクングニアウイルス (アルファウイルス) の両方と共通の蚊媒介動物ネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) を共有する。旅行者についてDENV感染症のリスクに関する特別な懸念があり、これに加えて米国南部のような場所への伝染病の移入および拡大の懸念がある。DENVの媒介動物ネッタイシマカは米国南部の全体を通じて見出される。ヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*)、アジアンタイガーモスキートもまた、DENVを伝染させる能力がある。DENVが米国におけるヒトスジシマカ (*A. albopictus*) の集団中に入った場合、米国中西部および北東部に広がる非常に拡大された範囲を有することになる。

【0004】

フラビウイルスワクチンの開発は抗体依存性増強 (ADE) の現象により複雑にされる。1つのフラビウイルスへの以前の感染により、個体が、異なる血清型へ再感染した時に、疾患の重症度が増す場合に、ADEは起こる。ADEの間に、第1のウイルスに対する抗体は第2のウイルスに結合するがそれを中和せず、代わりにその感染力を増加させる。DENVは多くの国においてよく見られるため、いかなるワクチン戦略も、確立されたデング免疫を有する集団に対する影響力を考慮するべきである。基礎となるDENV免疫を有する人々は、DENV免疫がDENVワクチン株の感染力を増強して増加した有害事象に繋がる可能性があるため、生DENVワクチンからの増加した有害事象を経験する可能性があることに留意することは価値がある。これらは、生、不活性化または抗原/VLP/骨格キャリアのいずれであれ、DENVワクチンを開発する場合に考慮される必要がある妥当なシナリオである。ADEに起因してフラビウイルス感染症を増強する高い可能性のため、全てのワクチン開発戦略は、任意の所与のDENVワクチンがどのようにフラビウイルスまたはその後のフラビウイルス感染に対する既存の抗体と相互作用し得るのかを考慮する必要がある。

【0005】

デングウイルスは、フラビウイルス科の蚊媒介性フラビウイルスの4つの血清型 (DENV1~4) を含んでいた。デングウイルスは、40~65ナノメートルの直径の、C (コア)、M (膜)、およびE (エンベロープ) 糖タンパク質を含む正二十面体ビリオンを有するエンベロープウイルスである。デングウイルスゲノムは、構造 (C、prM、E) ならびに非構造 (NS1、NS2、NS3、NS4、およびNS5) タンパク質をコードする10,000~11,000塩基の長さの単一ポジティブ鎖RNA分子である。デングウイルスは細胞質中でそれらのゲノムを転写および複製し、ゲノムは単一のポリペプチドに翻訳され、該ポリペプチドは宿主およびウイルスの両方のタンパク質により切断およびプロセッシングされる。デングウイルスは、熱帯地域において国際的に懸念されている新興の病原体であり、個々の血清型は遺伝学および抗原的に別個のウイルスである。

【0006】

10

20

30

40

50

よって、感染症を予防しまたは低減させるためのワクチンを開発する必要性が当該技術分野において依然として存在する。

【発明の概要】

【0007】

多数の同義ヌクレオチド突然変異によるE領域の改変により作られた、再コードされた Dengue ウイルスは、致死的な野生型負荷に対する保護免疫および異なる系列に対する交差保護の提供において高度に有効であることが本明細書に記載される。さらに、ウイルスは例外的な安全性プロファイルを有する。

【0008】

よって、本発明の様々な態様は、ウイルスタンパク質の発現がEコーディング領域のコードンペア脱最適化を通じて低減された、弱毒化 Dengue ウイルスを提供する。ある特定の態様において、Eは、標的とされる唯一のウイルスタンパク質コーディング領域である。ある特定の態様において、E以外の別の Dengue ウイルスタンパク質コーディング領域が脱最適化される場合、低減はEの低減と比較して小さい。本発明によれば、本発明のウイルスタンパク質の発現における低減は、タンパク質コーディング配列における変化により、例えば、タンパク質コーディング配列のコードンペアバイアスを低下させること、希少コドン置換すること、G+C含有量を改変すること、CGおよび/もしくはTA（もしくはUA）ジヌクレオチド含有量を改変すること、または組合せにより達成される。低減された発現はまた、タンパク質の調節配列に対する改変により達成され得る。

【0009】

ある特定の態様において、コードンペアバイアスを低減させることは、低減され得るコードンペアスコアを有する親タンパク質コーディング配列中のコードンペアを同定すること、およびコードンペアをより低いコードンペアスコアを有するコードンペアで置換することによりコードンペアバイアスを低減させることを含む得る。他の態様において、コードンペアバイアスを低減させることは、親タンパク質コーディング配列のコードンを再編成することを含む。ある特定の態様において、Eタンパク質コーディング配列は、-0.1未満、または-0.2未満、または-0.3未満、または-0.4未満のコードンペアバイアスを有する。タンパク質コーディング配列のコードンペアバイアス（すなわち、オープンリーディングフレーム）は、Coleman et al., 2000および本明細書に記載されるように計算される。

【0010】

本発明の態様において、Eタンパク質コーディング配列の発現は、1つまたは複数のコードンを、宿主中でより低い頻度である同義コードンで置き換えることにより、低減される。

【0011】

本発明の態様において、Eタンパク質コーディング配列DENV血清型は、同じDENV血清型の異なる株または同種株からのバックグラウンドに存在する。

【0012】

本発明はまた、対象において保護免疫応答を誘導するための Dengue ワクチン組成物であって、wtウイルスと少なくとも90%の抗原同一性を維持しながらウイルス翻訳が低減されたウイルスを含む、 Dengue ワクチン組成物を提供する。一部の態様において、ウイルス翻訳は、wtウイルスと少なくとも95、96、97、98または99%の抗原同一性を維持しながら低減される。一部の態様において、ウイルス翻訳は、wtウイルスと100%の抗原同一性を維持しながら低減される。

【0013】

本発明はまた、対象において保護免疫応答を誘発する方法であって、対象に、予防または治療有効用量の、弱毒化 Dengue ウイルスを含むワクチン組成物を投与する工程、を含み、ウイルスタンパク質の発現が少なくとも10%低減される、方法を提供する。様々な態様において、ウイルスタンパク質の発現は、少なくとも15%、少なくとも20%または少なくとも25%低減される。本発明の態様において、ワクチンの弱毒化ウイルスと同じ系列の Dengue ウイルスに対して有効な免疫応答が誘発される。別の態様において、異種 Dengue ウイルスに対して有効な免疫応答が誘発される。

10

20

30

40

50

【0014】

本発明はまた、弱毒化 Deng ウイルスゲノムを作る方法であって、(a) ゲノムヌクレオチドを得る工程、(b) 発現を低減させるために、エンベロープコーディングヌクレオチド配列を再コードする工程、および発現を低減させるために、非構造タンパク質3コーディングヌクレオチド配列を再コードする工程、ならびに弱毒化 Deng ウイルスゲノムを作るために、再コードされたヌクレオチド配列を Deng ウイルスゲノム中に置換する工程を含む、方法を提供する。ある特定の態様において、E領域のみが標的とされる。一部の態様において、別のウイルスタンパク質コーディング領域の発現もまた低減される。

【0015】

本発明はまた、オーバーラッピングPCRを使用するT7ポリメラーゼによる感染性ウイルスRNAゲノムの転写のための鋳型 Deng ウイルスDNA配列を構築する方法を提供する。同種骨格を有する全ての Deng ゲノムを、5'末端から開始する3つの断片(断片1:nt1~3596;断片2:nt3030~6959、および断片3:nt:nt6851~末端)に分割し、化学的/生化学的に合成した。感染性cDNAクローンを構築する代わりに、ロングオーバーラップ伸長PCR戦略を使用して、全長 Deng ゲノム(または同時にsyn-wtおよびmin Deng ゲノム)を得た。DENV2 16681骨格中の異種 Deng ゲノムを構築するために、DENV2 16681 5'UTR、CドメインおよびprM/M、個々のDENV血清型からのE(野生型または脱最適化型)ドメインならびに小さい比率のDENV2 16681 NS1ドメインを含有する、第1の2.5Kb断片を合成した。全てのNSドメインおよび3'UTRを含有する8Kb DENV2 16681骨格を、野生型または脱最適化型DENV2 16681をコードする感染性クローンから得た。非対称融合PCR法を使用して、2.5Kbおよび8Kb断片を融合させた。

【0016】

本発明の様々な態様は、改変型 Deng ウイルスであって、再コードされたprMタンパク質、再コードされたエンベロープ(E)タンパク質、または両方を含み、再コードされたprMタンパク質が、その親prMタンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有し、またはより低い頻度で使用される同義コドンで置換された少なくとも5つのコドンを有し、またはその親prMタンパク質コーディング配列と比較して増加した数のCpGもしくはUpAジヌクレオチドを有し、かつ再コードされたEタンパク質が、その親Eタンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有し、またはより低い頻度で使用される同義コドンで置換された少なくとも5つのコドンを有し、またはその親Eタンパク質コーディング配列と比較して増加した数のCpGもしくはUpAジヌクレオチドを有する、改変型 Deng ウイルスを提供する。

【0017】

様々な態様において、prMタンパク質もしくはEタンパク質または両方の発現は、その親 Deng ウイルスと比較して低減され得る。

【0018】

様々な態様において、再コードされたprMタンパク質は、その親prMタンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有する。様々な態様において、再コードされたprMタンパク質は、より低い頻度で使用される同義コドンで置換された少なくとも5つのコドンを有し得る。様々な態様において、再コードされたprMタンパク質は、その親prMタンパク質コーディング配列と比較して増加した数のCpGまたはUpAジヌクレオチドを有し得る。様々な態様において、再コードされたEタンパク質は、その親Eタンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有し得る。様々な態様において、再コードされたEタンパク質は、より低い頻度で使用される同義コドンで置換された少なくとも5つのコドンを有し得る。様々な態様において、再コードされたEタンパク質は、その親Eタンパク質コーディング配列と比較して増加した数のCpGまたはUpAジヌクレオチドを有し得る。様々な態様において、再コードされたprMまたはEタンパク質コーディング配列のそれぞれは、-0.05未満のコドンペアバイアスを有し得る。様々な態様において、再コードされたprMまたはEタンパク質コーディング配列のそれぞれのコドンペアバイアスは、少なくとも0.05低減され得る。

【0019】

様々な態様において、改変型デングウイルスは、1型、2型、3型、4型またはこれらの組合せから選択され得る。様々な態様において、改変型デングウイルスは改変型四価デングウイルスである。

【0020】

本発明の様々な態様は、本明細書において上記されるような改変型デングウイルスと、薬学的に許容される賦形剤または担体とを含む、対象において保護免疫応答を誘導するためのデングワクチン組成物を提供する。本発明の様々な態様は、対象において免疫応答を誘発する方法であって、対象に、本明細書において上記されるような改変型デングウイルスと、薬学的に許容される賦形剤または担体とを含む有効用量の組成物を投与する工程、を含む、方法を提供する。

10

【0021】

様々な態様において、免疫応答は保護免疫応答であり得、かつ請求項に記載の予防有効用量のまたは治療有効用量のワクチン組成物が投与され得る。様々な態様において、免疫応答は異種デングウイルスに対して交差保護的であり得る。

【0022】

様々な態様において、方法は、対象に、少なくとも1つのアジュバントを投与する工程をさらに含み得る。

【0023】

本発明の様々な態様は、それを必要とする対象において免疫応答を誘発する方法であって、プライム用量の、(i) コドンペア脱最適化もしくはコドン脱最適化、もしくはCpGもしくはUpAジヌクレオチドの増加以外の方法により作製された弱毒化デングウイルス、または(ii) 再コードされたprMタンパク質、再コードされたエンベロープ(E)タンパク質、もしくは両方を含む改変型デングウイルスであって、再コードされたprMタンパク質が、その親prMタンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有し、もしくはより低い頻度で使用される同義コドンで置換された少なくとも5つのコドンを有し、もしくはその親prMタンパク質コーディング配列と比較して増加した数のCpGもしくはUpAジヌクレオチドを有し、かつ再コードされたEタンパク質が、その親Eタンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有し、もしくはより低い頻度の同義コドンで置換された少なくとも5つのコドンを有し、もしくはその親Eタンパク質コーディング配列と比較して増加した数のCpGもしくはUpAジヌクレオチドを有する、改変型デングウイルスを投与する工程；および1つまたは複数のブースト用量の、(i) コドンペア脱最適化もしくはコドン脱最適化、もしくはCpGもしくはUpAジヌクレオチドの増加以外の方法により作製された弱毒化デングウイルス、または(ii) 改変型デングウイルスをそれを必要とする対象に投与する工程、を含み、少なくともプライム用量または1つもしくは複数のブースト用量が改変型デングウイルスである、方法を提供する。

20

30

【0024】

様々な態様において、1つまたは複数のブースト用量のうちの第1の用量は、プライム用量の約2週後に投与され得る。

40

【0025】

様々な態様において、prMタンパク質もしくはEタンパク質または両方の発現は、その親デングウイルスと比較して低減され得る。

【0026】

様々な態様において、再コードされたprMタンパク質は、その親prMタンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有し得る。様々な態様において、再コードされたprMタンパク質は、より低い頻度で使用される同義コドンで置換された少なくとも5つのコドンを有し得る。様々な態様において、再コードされたprMタンパク質は、その親prMタンパク質コーディング配列と比較して増加した数のCpGまたはUpAジヌクレオチドを有し得る。様々な態様において、再コードされたEタンパク質は、そ

50

の親Eタンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有し得る。様々な態様において、再コードされたEタンパク質は、より低い頻度で使用する同義コドンで置換された少なくとも5つのコドンを有し得る。様々な態様において、再コードされたEタンパク質は、その親Eタンパク質コーディング配列と比較して増加した数のCpGまたはUpAジヌクレオチドを有し得る。様々な態様において、再コードされたprMまたはEタンパク質コーディング配列のそれぞれは、-0.05未満のコドンペアバイアスを有する。様々な態様において、再コードされたprMまたはEタンパク質コーディング配列のそれぞれのコドンペアバイアスは、少なくとも0.05低減される。

【0027】

様々な態様において、改変型デングウイルスは、1型、2型、3型、4型またはこれらの組合せから選択される。様々な態様において、改変型デングウイルスは改変型四価デングウイルスである。

【0028】

本発明の様々な態様は、改変型デングウイルスゲノムを作る方法であって、デングウイルスのエンベロープタンパク質をコードするヌクレオチド配列を得る工程；タンパク質発現を低減させるために、エンベロープコーディングヌクレオチド配列を再コードする工程、および改変型デングウイルスゲノムを作るために、再コードされたエンベロープコーディングヌクレオチド配列を有する核酸を親デングウイルスゲノム中に置換する工程、を含み、ここで、再コードされたエンベロープコーディングヌクレオチド配列の発現が親ウイルスと比較して低減される、方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1A】図1は、動物成分フリー条件下でのVero細胞中での増殖を用いる、SAVE-脱最適化された生弱毒化デングワクチン候補の迅速な構築を示す。ヒトORFeomeに関する、デングprM/E遺伝子およびそれらのSAVE-脱最適化された対応物のコドンペアバイアス。コドンペアバイアス(CPB)は所与の遺伝子オープンリーディングフレーム(ORF)の平均コドンペアスコアとして表される。正および負のCPB値は、ORFにおけるそれぞれ統計的に過剰または過小提示されたコドンペアの優勢性(predominance)を表す。赤丸は、本発明者らの分析の時点における公知の注釈付けされたヒト遺伝子(ORFeome)の大部分となる14,795のヒトORFの、それぞれのCPBを示す。野生型E遺伝子のCPBは、ヒト宿主細胞の遺伝子の正常な範囲内に入る。SAVEを介するコドンペア「脱最適化」後に、結果としてもたらされた脱最適化されたprM/E遺伝子セグメントは、それらの極めて負のCPBにより明らかなように、過小提示されたヒトコドンペアによって優勢的にコードされており、いかなるヒト遺伝子からも劇的に異なる。B. 野生型および合成的に「脱最適化」されたキメラデングワクチンバリエーションのcDNAゲノム。SAVE-脱最適化された合成のEをde novoで合成し、オーバーラッピングPCRを使用してWT DENVゲノムに個々にサブクローニングして、合成的に「脱最適化」された断片をそれぞれ含有する8つの独立したcDNAゲノムを得た。本発明者らは、wt DENV1~4の感染性cDNAゲノムを構築し、次にVero(全てのDENV WT、E-W/MIN、およびE-MINウイルス)またはBHK細胞へのRNAのトランスフェクションを介して、脱最適化型DENVワクチン候補のための、十分に感染性である複製性ウイルスを回収した。

【図1B】図1Aの説明を参照のこと。

【図2】Eコーディング領域中の脱最適化された配列の長さを低減させることにより弱毒化を減少させまたは免疫原性を増加させるための、サブクローニング戦略のダイアグラムを示す。第2世代のデングワクチン候補は、アミノ酸配列を100%同一に保ちながら、脱最適化された領域を全長(E-min)からおおよそ半分の長さ(W-E-Min)まで低減させるSAVEプラットフォームの柔軟性を活用する。

【図3】動物成分フリー条件下でのVero細胞中での異種骨格デングワクチン候補の増殖を示す。DENV1~4 E-Minを使用して、0.01のMOIで、動物成分フリー条件下でVero細胞に感染させ、感染後10日の過程にかけて上清を複数ステップ増殖曲線において1日

10

20

30

40

50

毎に滴定した。DENV2、DENV3、およびDENV4候補は $1\sim 2\times 10^5$ FFU/mlの力価に達したが、DENV1 E-Minの力価は他と比較して約 $1\log_{10}$ 低減した。

【図4】図4A～4Cは、全長DENV1骨格における合成DENV1 WTウイルス（図4A）ならびにDENV1 WTに由来する弱毒化生ワクチン候補DENV1 E-W/MIN（図4B）およびE-MIN（図4C）について、Vero細胞において実行した複数ステップ増殖曲線を示す。合成DENV1 WTは33℃および37℃においてVero細胞中で良好に増殖する。DENVに典型的に、ウイルス収率における一時的な低減が39℃において観察されたが、力価は7dpiまでに37℃のレベルまで回復した。DENV1 E-W/MINは、しかしながら、33℃および37℃の両方において、使い物にはなるがDENV1 WTよりも約10倍低い力価に達した。DENV1 E-MINはVero細胞において高度に弱毒化され、感染後10～14日目から33℃で検出可能な力価に達しただけだった。

10

【図5】合成DENV2 WTウイルス（全長DENV2骨格中）ならびにDENV2 WTに由来する弱毒化生ワクチン候補DENV2 E-W/MINおよびE-MINについて、Vero細胞において実行した複数ステップ増殖曲線を示す。DENV2 E-W/MINおよびE-MINは両方ともインビトロで弱毒化され、E-W/MINについて $1\sim 2\log_{10}$ FFU/mlの低減、およびより顕著にDENV2 E-MINについて $2\sim 3\log_{10}$ FFU/mlの低減であった（図3）。増殖速度論的には遅れたが、1～2日毎の定期的な培地交換により、ウイルス力価はDENV2 E-W/MINについて $>10^6$ FFU/mlに達した。重要なことに、弱毒化はE領域における脱最適化の程度と相関した。温度感受性（37℃および39℃における力価の差異）は、感染後4日を通じてDENV2-WTおよびDENV2 E-W/MINについて類似していたが、5、6、および7日目に有意な差異があった。6DPIを通じていかなる温度においても複製がなかったため、DENV2 E-MINについて温度感受性は観察されなかった。しかしながら、7～14日目からDENV2 E-MINは検出可能なウイルスを産生し始めた（但し33℃および37℃においてのみ）。

20

【図6】合成DENV3 WTウイルス（全長DENV3骨格中）ならびにDENV3 WTに由来する弱毒化生ワクチン候補DENV3 E-W/MINおよびE-MINについて、Vero細胞において実行した複数ステップ増殖曲線を示す。DENV3 E-W/MINは39℃においてWTよりも温度感受性であったことが明らかであり、感染後3、4、5、および7日目に、有意により大きい差異が観察可能であった。DENV3 E-MINは39℃においてVero細胞中で最小レベルの複製を有したので、37℃から39℃への、ウイルス収率における差異は 10^7 FFU/mlもの大きさであった。しかしながら、許容可能な温度で生育した場合、DENV3 E-MINは、cGMP製造のために有望な高い力価に達した。

30

【図7】合成DENV4 WTウイルス（全長DENV4骨格中）ならびにDENV4 WTに由来する弱毒化生ワクチン候補DENV4 E-W/MINおよびE-MINについて、Vero細胞において実行した複数ステップ増殖曲線を示す。DENV4 WTおよびE-W/MINは両方ともVero細胞中で高い力価まで増殖し、ピークDENV4 E-W/MIN力価は、33℃および37℃において約10倍低かったが依然として高かった（約 10^7 FFU/ml）。両方のウイルスとも39℃において部分的に制約されたが、DENV1～3で見られる程度までの制約ではなかった。5日目に、WTと比較して37℃から39℃への、力価における、小さいが有意な（約5倍）変化が観察された。DENV4 E-MINはVero細胞において弱毒化され、ピーク力価はWTよりも100倍低かった。33℃および37℃におけるDENV4 E-MINの複製は類似していたが、DENV4 E-MINは39℃において生存可能でなく感染後1～14日目に検出可能なウイルスはなかった。

40

【図8A】図8A～8Bは、AG129マウスにおけるDENV2ワクチン候補の弱毒化、免疫原性、および有効性の評価を示す。DENV2 16681骨格に基づくDENV-2 E-minを、インターフェロナルファまたはガンマ受容体を欠いたAG129マウスにおいて、免疫原性/用量漸増研究において試験した。2つの異なる濃度でDENV-2 E-minまたはDENV-2 16681を用いて動物を免疫化した。結果的な中和抗体力価を決定し、DENV2のマウス適応性の致死株、D2S10に対してもたらされた保護有効性を評価した。

【図8B】図8Aの説明を参照のこと。

50

【図9】本発明者らのDENV2候補の臨床的関連性を向上させるための、異種DENV2 16681骨格中のDENV-2/NI/BID-V533/2005に由来するE配列を有する構築されたD2-E-minおよびD2-1/2-E-minを示す。本発明者らのウイルスの免疫原性を向上させるための、半分のwt DENV-2/NI/BID-V533/2005配列および半分のCPDからなるE領域を有するD2-1/2-E-minを本発明者らは試験した。AG129およびBALB/cマウス (n=5) に、 10^6 または 10^4 FFUのD2-E-min、D2-1/2-E-min、またはD2-WTE (WT DENV-2/NI/BID-V533/2005 E領域を有するDENV2 16681骨格) をワクチン接種した。DENV2 D2-E-minにおいては死亡も病的状態も観察されず、D2-1/2-E-min群は少なくとも100倍の弱毒化を示した。本発明者らの候補の免疫原性は、CPDの程度を低減させることにより向上し、D2-1/2-E-minからの血清のPRNT50値はD2-E-Minワクチン接種AG129マウスと比較して、より高かった。追加的に、高い中和抗体価がD2-1/2-E-minワクチン接種と共に維持され、 10^6 (GM=3447) および 10^4 (GM=2867) FFUワクチン接種群の間で有意な差異は観察されなかった。免疫コンピテントBALB/cマウスにおいて、D2-E-minおよびD2-1/2-E-minは両方とも、野生型と同等の中和抗体のレベルを生じさせた。

10

【図10A】図10A~10Bは、DENV-3/VE/BID-V2268/2008からのコドン脱最適化prMEカセットを有するDENV-2株16681骨格を含むDENV-3ワクチン候補DENV D2/D3-E-minの免疫原性および保護有効性を試験するために使用されたAG129マウスを示す。病原性DENV3 C0360/94を用いた負荷に対するこの候補ワクチンの免疫原性および有効性を評価するためにこの研究を設計した。第1の免疫化は全ての動物によって良好に忍容され、大きな関連付けられる体重喪失はなく、臨床的徴候を発症した動物はいなかった。 1.2×10^7 PFU DENV-3 C0360/94を用いた致死性負荷後に、培地対照群の動物は急速な進行性の感染症を発症し、これは8/9の動物において致死性であり、死亡した動物で 4.0 ± 0.8 日の死亡平均日数 (mean day of death; MDD) であった。より高い接種物のDENV D2/D3-E-minを用いた免疫化は有意な保護を提供し、群中の動物で、致死も病的状態 (>10%の体重喪失により測定される) もなかった。

20

【図10B】図10Aの説明を参照のこと。

【図11A】図11A~11Bは、DENV4からのコドン脱最適化prMEカセットを有するDENV-2株16681骨格を含むDENV-4ワクチン候補DENV D2/D4-E-minおよびD2/D4-1/2-E-minの免疫原性および保護有効性を試験するために使用されたAG129マウスを示す。AG 129マウスに、 10^6 のD2/D4-E-min (N=12)、 10^6 のD2/D4-1/2-E-min (N=12)、 10^6 のD2/D4-WTE、または対照としての培地 (N=9) をワクチン接種した。病原性DENV4 703/4を用いた負荷に対するこの候補ワクチンの免疫原性および有効性を評価するためにこの研究を設計した。全ての株を用いた第1の免疫化は全ての群の動物により良好に忍容され、5日の観察期間にかけて持続的な体重喪失はなかったが、D2/D4-WTE群において1匹のマウスは第2の免疫化の前に安楽死させる必要があり、また第2の免疫化後に追加的な動物の死亡があった。他のいずれのワクチン群における動物も進行性の体重喪失を経験しなかった。血清を35日目に収集して負荷の前の中和抗体について試験し、また負荷後30日目に全ての生存動物から収集してFRNT50により最終力価を試験した。Vero細胞を用いた96ウェルプレートの方法を使用して、50 FFUのDENV4 WTウイルスと共にインキュベートされた1:64~1:32784の血清希釈液を使用して、各血清試料を2連で試験した。各ワクチン候補は35 DPIにおいて免疫原性であり、D2/D4-E-min (GMT 332.9) およびD2/D4-1/2-E-min (GMT 738.4) を用いたワクチン接種は、D2/D4-WTE (GMT 1640) を用いたワクチン接種よりも低かった。負荷後2日目 (days post-challenge; DPC) において、D2/D4-WTEを接種された4/12のマウスにおいてウイルス血症が検出された。他の2つのウイルスを用いて免疫化されたマウスの全てで、ウイルス血症レベルはアッセイの検出限界 (500ゲノム当量/ml) 未満であった。DENV-4 703/4負荷は急速な進行性の感染症を生じさせ、培地対照群において一様に致死性であった。追加的に、D2/D4-E-minを用いて免疫化された3匹の動物は致死性な感染症を経験し、この群における他の動物は研究の継続期間にわたり健常なまま

30

40

50

であった。重要なことに、DENV-4 703/4負荷後のD2/D4-1/2-E-min免疫化動物のいずれにおいても、致死も、体重喪失により決定されるような病的状態の証拠も見られなかった。

【図11B】図11Aの説明を参照のこと。

【図12】IFN α 受容体ノックアウトマウスにおいて免疫原性について試験されたDENV 1~4 WTの他に、DENV2~4のワクチン候補を示す。全てのWTウイルスはこれらのマウスにおいて高度に免疫原性であり、中和抗体力価は、 >1024 であった。DENV2-E-W/MINは、 10^6 および 10^4 FFUの両方の用量においてDENV2 WTウイルスと等しく免疫原性であった。DENV3ウイルスの免疫原性は、用量の減少および脱最適化の増加と共に減衰したが、DENV3 E-W/MINは 10^4 FFUの用量において依然として高度に免疫原性であった（約1024のFRNT50）。マウスにおいて乏しい免疫原性であったDENV2 16681骨格における異種DENV4 WTと比較して、DENV4 E-W/MINおよびWTの免疫原性における著しい向上に本発明者らは気付いた。

【図13】DENV3 C0360/94を用いた致死的負荷に対するAG129マウスにおける四価ワクチン接種の免疫原性および有効性を示す。AG129マウスに、0および21日目に 10^6 IFUの一価D2/D3-E-minワクチン（N=16；10匹の雄および6匹の雌）をワクチン接種、 10^6 IFUの4つの一価DENV E-minウイルスのそれぞれを含有する四価ワクチンをワクチン接種（N=16；10匹の雄および6匹の雌）、または培地を用いてモックワクチン接種（N=13；8匹の雄および5匹の雌）した。FRNT50による中和抗体の測定のために、負荷の前に血清を収集した。一価ワクチンを用いて免疫化されたマウスの全てで、検出可能な中和抗体力価（20~160の範囲）が生じた。四価ワクチン製剤を用いて免疫化されたマウスにおいて、力価は一般に、より低かった（ $<20\sim80$ の範囲）。35日目に、全ての残存マウスを、腹腔内経路により送達された 10^7 IFUのDENV3 C0360/94を用いて負荷した。予測されたように、培地対照群の動物は急速な進行性の感染症を発症し、これは8/9（89%）の動物において致死的であり、死亡した動物で 4.1 ± 0.4 日の死亡平均日数（MDD）であった。一価DENV D2/D3-E-minまたは四価ワクチンを用いた免疫化は有意な保護を提供し、いずれの群の動物でも、致死も病的状態（ $>10\%$ の体重喪失により測定される）もなかった。

【図14】同種骨格ウイルスの弱毒化 -ワクチン株 対 wtのフォーカスサイズ- を示し、ワクチンウイルスはインビトロで、wtと比較してより小さく広がった。DENV1~4 WT、E-W/MIN、またはE-MINを感染させ、33℃、37℃、または39℃の温度で3日間インキュベートしたVero細胞について個々のフォーカス面積（ mm^2 ）を計算した。本発明者らは、ImageJソフトウェア（NIH、v1.52a）を使用して、各ウイルスのフォーカス形成単位（FFU）サイズの分析を完了した。FFAプレートの各画像をImageJを使用して、バイナリー8ビット画像に変換し（例を図2に提示する）、FFU面積を測定するためのスケールを24ウェルプレートのウェルの直径（15.5mm）に設定した。「analyze particles」機能を使用して、各FFUの面積をImageJにより計算し、結果をシダックの多重比較検定（GraphPad Prism 8.1.2）により比較した。

【図15】四価同種骨格ワクチンについてのインビボ免疫原性データを示す。四価および一価同種骨格 Dengue ワクチン候補は、IFN α 受容体ノックアウトマウスにおいて0および21日目に皮下経路により送達された 10^6 または 10^4 FFUでのワクチン接種後に免疫原性であった。DENV1~4 wtの各株に対するワクチン接種後0、21、および35日目におけるフォーカス低減中和50%試験を使用して、中和抗体を試験した。

【発明を実施するための形態】

【0030】

詳細な説明

本明細書において参照される全ての参考文献は、全体的に記載されたのと同様にそれらの全体が参照により組み入れられる。他に定義されなければ、本明細書において使用される科学技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。当業者は、本発明の実施において使用され得る、本明細書に記載のもの

と類似または同等の多くの方法および材料を認識するであろう。実際に、本発明は、記載される方法および材料に何ら限定されない。本発明の目的のために、以下の用語が以下において定義される。

【0031】

本明細書において使用される場合、「約」という用語は、参照される数値的表示との繋がりで使用される場合、本明細書において他に特に提供されなければ、参照される数値的表示にその参照される数値的表示の最大5%をプラスまたはマイナスしたものを意味する。例えば、「約50%」という表現は45%~55%の範囲をカバーする。様々な態様において、「約」という用語は、参照される数値的表示との繋がりで使用される場合、請求項において特に提供される場合、参照される数値的表示にその参照される数値的表示の最大4%、3%、2%、1%、0.5%、または0.25%をプラスまたはマイナスしたものを意味し得る。

10

【0032】

コドンペアバイアス(CPB)は、所与の遺伝子オープンリーディングフレーム(ORF)の平均コドンペアスコアとして表される。

【0033】

「対象」は、任意の動物または人工的に改変された動物を意味する。動物としては、ヒト、非ヒト霊長動物、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、フェレット、齧歯動物、例えばマウス、ラットおよびモルモット、ならびに鳥が挙げられるがこれらに限定されない。人工的に改変された動物としては、ヒト免疫系を有するSCIDマウスが挙げられるがこれに限定されない。好ましい態様において、対象はヒトである。鳥の態様は、家畜化された家禽種であり、これにはニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、およびガンが含まれるがこれらに限定されない。

20

【0034】

「ウイルス宿主」は、任意の動物もしくは人工的に改変された動物、またはウイルスが感染できる昆虫を意味する。動物としては、ヒト、非ヒト霊長動物、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、フェレット、齧歯動物、例えばマウス、ラットおよびモルモット、ならびに鳥が挙げられるがこれらに限定されない。人工的に改変された動物としては、ヒト免疫系を有するSCIDマウスが挙げられるがこれに限定されない。特有の態様において、ウイルス宿主はヒトである。鳥の態様は、家畜化された家禽種であり、これにはニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、およびガンが含まれるがこれらに限定されない。昆虫としては、蚊が挙げられるがこれに限定されない。

30

【0035】

「予防有効用量」は、ウイルス感染症に罹りやすいまたはウイルス関連障害に罹患しやすい対象に投与された場合に、ウイルスに感染することまたは障害に罹患することから対象を保護する免疫応答を対象において誘導する、ワクチンの任意の量である。対象を「保護」することは、少なくとも2倍、好ましくは少なくとも10倍、25倍、50倍、または100倍、対象がウイルスに感染する可能性を低減させ、または対象において障害の開始の可能性を低下させることを意味する。例えば、対象がウイルスに感染する1%の可能性を有する場合、対象がウイルスに感染する可能性における2倍の低減は、ウイルスに感染する0.5%の可能性を対象が有することを結果としてもたらす。

40

【0036】

本明細書において使用される場合、「治療有効用量」は、ワクチンが有効な障害に罹患した対象に投与された場合に、対象が障害および/またはその症状の低減、軽快または退縮を経験することを引き起こす免疫応答を対象において誘導する、ワクチンの任意の量である。好ましい態様において、障害および/またはその症状の再発が予防される。他の好ましい態様において、対象は障害および/またはその症状を治癒される。

【0037】

本発明は、ウイルス感染および疾患から保護するために使用され得る弱毒化 Dengue ウイルスおよび弱毒化 Dengue ウイルスの作製に関する。ワクチン接種における基本的な前提

50

、非常に高い用量（「ペプチドもしくはウイルス様粒子」）またはこれらの伝統的に優勢な抗原性ポリペプチドの生ウイルス感染（「ChimeriVax」）に対応する用量が単独で十分なワクチン有効性のために十分であることを仮定したワクチンレシピエントへの保護的抗原の十分な送達である。それらの予測とは別に、本発明は反対のアプローチから利益を受ける。本発明は、ウイルスタンパク質の発現が低減されており、ワクチン製造にとって有用な優れた増殖特性を有するが、並外れた安全性プロファイルおよび増強された保護的特徴を持つ、弱毒化デングウイルスを提供する。弱毒化ウイルスは、野生型ウイルスとほぼ同等に増殖し、LD₅₀値により明らかになるような、高度に弱毒化された表現型を有し、同じ株のデングウイルスによる負荷からの保護免疫の提供において著しく有効であり、そしてまた他の株のデングウイルスによる負荷からの保護免疫を提供する。

10

【0038】

本発明のある特定の態様において、本発明の弱毒化デングウイルスは、再コードされたプレ膜（prM）/エンベロープ（E）コーディング領域を含む。C、NS1、NS2、NS3、NS4、またはNS5タンパク質コーディング領域が再コードされない態様において、それらの配列における突然変異および他のバリエーションを排除するものではなく、それらの配列において為されるいかなる突然変異またはバリエーションも弱毒化に対してほとんどまたは全く効果を有しないことを意味するにすぎない。弱毒化に対してほとんどまたは全く効果がないことは、以下の1つまたは両方を含む：（1）C、NS1、NS2、NS3、NS4、またはNS5コーディング領域における突然変異またはバリエーションが、バリエーションC、NS1、NS2、NS3、NS4、またはNS5コーディング領域が試験デングウイルスにおける唯一のバリエーションである場合に、ウイルス複製またはウイルス感染力を20%より大きく低減させない；（2）C、NS1、NS2、NS3、NS4、またはNS5コーディング領域のいずれかにおける突然変異またはバリエーションが、そのコーディング配列中のヌクレオチドの10%よりも少ない。請求項において特に提供される場合、弱毒化に対してほとんどまたは全く効果がないことは、以下の1つまたは両方を含む：（1）C、NS1、NS2、NS3、NS4、またはNS5コーディング領域における突然変異またはバリエーションが、バリエーションC、NS1、NS2、NS3、NS4、またはNS5コーディング領域が試験デングウイルスにおける唯一のバリエーションである場合に、ウイルス複製またはウイルス感染力を10%より大きく低減させない；（2）C、NS1、NS2、NS3、NS4、またはNS5コーディング領域のいずれかにおける突然変異またはバリエーションが、そのコーディング配列中のヌクレオチドの5%よりも少ない。

20

30

【0039】

様々な態様において、本発明のウイルスは弱毒化されている。本発明の態様において、野生型と比較して、ウイルスは、同じアミノ酸配列であるが異なるヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質を有する野生型ウイルスと比較して、AG129マウスモデルにおいて少なくとも10倍弱毒化されており、少なくとも50倍弱毒化されており、または少なくとも100倍弱毒化されており、または少なくとも200倍弱毒化されており、または少なくとも500倍弱毒化されており、または少なくとも1000倍弱毒化されており、少なくとも2000倍弱毒化されている。

【0040】

弱毒化ウイルスはまた、同じ株の野生型ウイルスから高度に保護的である。本発明の態様において、ウイルスの保護用量（PD₅₀）は、例えば本明細書において例示されるように、マウスモデルにより測定される場合のものである。

40

【0041】

本発明の弱毒化ウイルスはまた、安全性の大きいマージン（すなわち、LD₅₀およびPD₅₀の間の差異）を呈し、そのためLD₅₀/PD₅₀の比として本明細書において定義される高い安全性係数を有する。本発明のある特定の態様において、安全性係数は、少なくとも10²、または少なくとも10³、または少なくとも10⁴、または少なくとも10⁵、または少なくとも2×10⁵、または少なくとも3×10⁵、または少なくとも4×10⁵または少なくとも5×10⁵、または少なくとも10⁶、または少なくとも2×10⁶、または少なくとも

50

3×10^6 、または少なくとも 4×10^6 、または少なくとも 5×10^6 である。ある特定の態様において、安全性係数は、 $10^2 \sim 10^3$ 、または $10^3 \sim 10^4$ 、または $10^4 \sim 10^5$ 、または $10^5 \sim 10^6$ である。

【0042】

本発明の弱毒化ウイルスはまた、同じ血清型内のデングウイルスの異種株から高度に保護的である。本発明のある特定の態様において、本発明の弱毒化ウイルスの保護用量（ PD_{50} ）は、例えば本明細書において例示されるように、マウスモデルにより測定される場合に、1000PFU未満、または750PFU未満、または500PFU未満、または200PFU未満、または100PFU未満、または50PFU未満である。

【0043】

本発明の弱毒化ウイルスのEタンパク質コーディング配列の再コーディングは、本明細書において議論される開示に照らして当業者により為されているまたは為され得る。本発明によれば、ヌクレオチド置換は、Eコーディング配列中の複数の位置において操作され、置換により複数の同義コドンを経ゲノムに導入する。ある特定の態様において、同義コドン置換は、ゲノム中の、コドンバイアス、コドンペアバイアス、頻度の低いコドンもしくは低い頻度で存在するコドンペアの密度、RNA二次構造、CGおよび/もしくはTA（もしくはUA）ジヌクレオチド含有量、C+G含有量、翻訳フレームシフト部位、翻訳休止部位、microRNA認識配列の存在もしくは非存在またはこれらの任意の組合せを変更する。コドン置換は、Eコーディング配列の全体を通じて分布した複数の位置、またはEコーディング配列の部分に制約された複数の位置において操作されてもよい。伴われる多数の欠陥（すなわち、ヌクレオチド置換）のため、本発明は、安定的に弱毒化されたウイルスおよび生ワクチンを製造する手段を提供する。

【0044】

以下にさらに議論されるように、一部の態様において、ウイルスコーディング配列は、1つまたは複数のコドンを、デング宿主（例えば、哺乳動物、ヒト、蚊）において、より低い頻度で使用される同義コドンで置換することにより、再コードされる。一部の態様において、ウイルスコーディング配列は、1つまたは複数のコドンを、デングウイルスにおいて、より低い頻度で使用される同義コドンで置換することにより、再コードされる。ある特定の態様において、同義コドンで置換されるコドンの数は少なくとも5個である。一部の態様において、少なくとも10個、または少なくとも20個のコドンが同義コドンで置換される。一部の態様において、同義コドンで置換されるコドンの数は、少なくとも30個、または少なくとも40個、または少なくとも50個、または少なくとも75個、または少なくとも100個、または少なくとも125個、または少なくとも150個、または少なくとも175個である。

【0045】

一部の態様において、ウイルスコドンペアは、コドンペアバイアスを低減させる（すなわち、その値を低下させる）ように再コードされる。ある特定の態様において、コドンペアバイアスは、低減され得るコドンペアスコアを有するEコーディング配列中のコドンペアを同定すること、およびコドンペアをより低いコドンペアスコアを有するコドンペアで置換することによりコドンペアバイアスを低減させることにより低減される。一部の態様において、コドンペアのこの置換は、配列の既存のコドンを再編成するという形態を取る。一部のそのような態様において、コドンペアのサブセットは、同義コドンのサブセットを再編成することにより置換される。他の態様において、コドンペアは、再編成された同義コドンの数を最大化することにより置換される。コドンの再編成は、全体的にウイルスコーディング配列について低減された（より大きい負とされた）コドンペアバイアスに繋がり、また再編成は多くの位置において減少したCPSを結果としてもたすが、他の位置において付随するCPSの増加があることがあり、しかし平均で、改変された配列のコドンペアスコア、およびそのためCPBは低減されることが留意される。一部の態様において、コドンまたはコドンペアの再コーディングは、Eコーディング配列のG+C含有量を変更することを考慮に入れ得る。一部の態様において、コドンまたはコドンペアの再コ

10

20

30

40

50

ーディングは、Eコーディング配列中のCGおよび/またはTAジヌクレオチドの頻度を変更することを考慮に入れ得る。

【0046】

ある特定の態様において、再コードされたEタンパク質コーディング配列は、-0.05未満、または-0.06未満、または-0.07未満、または-0.08未満、または-0.09未満、または-0.1未満、または-0.11未満、または-0.12未満、または-0.13未満、または-0.14未満、または-0.15未満、または-0.16未満、または-0.17未満、または-0.18未満、または-0.19未満、または-0.2未満、または-0.25未満、または-0.3未満、または-0.35未満、または-0.4未満、または-0.45未満、または-0.5未満のコドンペアバイアスを有する。ある特定の態様において、再コードされたEタンパク質コーディング配列のコドンペアバイアスは、それが由来する親Eタンパク質コーディング配列と比較して、少なくとも0.05、または少なくとも0.06、または少なくとも0.07、または少なくとも0.08、または少なくとも0.09、または少なくとも0.1、または少なくとも0.11、または少なくとも0.12、または少なくとも0.13、または少なくとも0.14、または少なくとも0.15、または少なくとも0.16、または少なくとも0.17、または少なくとも0.18、または少なくとも0.19、または少なくとも0.2、または少なくとも0.25、または少なくとも0.3、または少なくとも0.35、または少なくとも0.4、または少なくとも0.45、または少なくとも0.5低減される。ある特定の態様において、それは、計算が為されるべきEタンパク質コーディング配列、例えば、野生型ウイルスのEタンパク質コーディング配列と比較したものである。

10

20

【0047】

ある特定の態様において、Eタンパク質コーディング配列の同義コドンの再編成は、それが由来する親Eタンパク質コーディング配列と比較して、少なくとも0.05、または少なくとも0.06、または少なくとも0.07、または少なくとも0.08、または少なくとも0.09、または少なくとも0.1、または少なくとも0.11、または少なくとも0.12、または少なくとも0.13、または少なくとも0.14、または少なくとも0.15、または少なくとも0.16、または少なくとも0.17、または少なくとも0.18、または少なくとも0.19、または少なくとも0.2、または少なくとも0.25、または少なくとも0.3、または少なくとも0.35、または少なくとも0.4、または少なくとも0.45、または少なくとも0.5のコドンペアバイアスの低減を提供する。ある特定の態様において、それは、計算が為されるべきEタンパク質コーディング配列、例えば、野生型ウイルスのEタンパク質コーディング配列と比較したものである。

30

【0048】

通常、これらの置換および変更は、コードされるタンパク質のアミノ酸配列を変更することなく為され、コードされるウイルスタンパク質の発現を低減させる。ある特定の態様において、本発明はまた、保存的であってもそうでなくてもよい、コードされるタンパク質中の非同義コドンの置換およびアミノ酸置換を結果としてもたらす、Eコーディング配列中の変更を含む。様々な態様において、最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個のヌクレオチド置換が存在する。

【0049】

ほとんどのアミノ酸は1つより多くのコドンによりコードされる。表1における遺伝コードを参照されたい。例えば、アラニンは、GCU、GCC、GCA、およびGCGによりコードされる。3つのアミノ酸（Leu、Ser、およびArg）は6つの異なるコドンによりコードされ、TrpおよびMetのみが独特のコドンを持つ。「同義」コドンは、同じアミノ酸をコードするコドンである。そのため、例えば、CUU、CUC、CUA、CUG、UUA、およびUUGは、Leuをコードする同義コドンである。同義コドンは等しい頻度で使用されない。一般に、特定の生物において最も頻繁に使用されるコドンは、コグネイトtRNAが豊富に存在するコドンであり、これらのコドンの使用はタンパク質翻訳の速度および/または正確性を増強する。反対に、ほとんど使用されないコドンのためのtRNAは相対的に低いレベルで見出され、希少コドンの使用は、翻訳の速度および/または正確性を低減させる

40

50

と考えられる。

【 0 0 5 0 】

(表 1) 遺伝コード

U	C	A	G		
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	終止	終止	A
	Leu	Ser	終止	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

^a 特定のアミノ酸をコードする各コドン中の第1のヌクレオチドは最も左の列に示され、第2のヌクレオチドは上の行に示され、第3のヌクレオチドは最も右の列に示される。

【 0 0 5 1 】

コドンバイアス

本明細書において使用される場合、「希少」コドンは、特定のアミノ酸のために最も頻繁に使用されるコドンよりも有意に低い頻度でmRNA中に存在するそのアミノ酸をコードする少なくとも2つの同義コドンのうちの1つである。そのため、希少コドンは、最も頻繁に使用されるコドンよりも約2倍低い頻度で存在し得る。好ましくは、希少コドンは、アミノ酸のための最も頻繁に使用されるコドンよりも少なくとも3倍、より好ましくは少なくとも5倍低い頻度で存在する。反対に、「高頻度」コドンは、特定のアミノ酸のために最も低い頻度で使用されるコドンよりも有意に高い頻度でmRNA中に存在するそのアミノ酸をコードする少なくとも2つの同義コドンのうちの1つである。高頻度コドンは、アミノ酸のための最も低い頻度で使用されるコドンよりも約2倍、好ましくは少なくとも3倍、より好ましくは少なくとも5倍高い頻度で存在し得る。例えば、ヒト遺伝子は、ロイシンコドンCTGを40%の確率で使用するが、同義のCTAは7%の確率でしか使用しない(表2を参照)。そのため、CTGは高頻度コドンである一方、CTAは希少コドンである。これらの使用頻度と大まかに合致して、CTGを認識するtRNAの遺伝子のためにゲノム中に6つのコピーがある一方、CTAを認識するtRNAの遺伝子には2つのコピーのみが存在する。同様に、ヒト遺伝子は、セリンのために高頻度コドンTCTおよびTCCをそれぞれ18%および22%の確率で使用するが、希少コドンTCGは5%の確率でしか使用しない。TCTおよびTCCは、ゲノム中に10コピーの、その遺伝子を有する同じtRNAによってゆらぎを介して読まれ、TCGは、4つのコピーしか有しないtRNAにより読まれる。非常に活発に翻訳されるmRNAは、最も高い頻度のコドンのみを使用するように強くバイアスされていることが周知である。これは、リボソームタンパク質および解糖酵素のための遺伝子を含む。他方、相対的に豊富でないタンパク質のためのmRNAは希少コドンを使用し得る。

【 0 0 5 2 】

(表 2) ホモサピエンスにおけるコドン用法 (ソース: www.kazusa.or.jp/codon/)

10

20

30

40

50

アミノ酸	コドン	数	/1000	比率
Gly	GGG	636457.00	16.45	0.25
Gly	GGA	637120.00	16.47	0.25
Gly	GGT	416131.00	10.76	0.16
Gly	GGC	862557.00	22.29	0.34
Glu	GAG	1532589.00	39.61	0.58
Glu	GAA	1116000.00	28.84	0.42
Asp	GAT	842504.00	21.78	0.46
Asp	GAC	973377.00	25.16	0.54
Val	GTG	1091853.00	28.22	0.46
Val	GTA	273515.00	7.07	0.12
Val	GTT	426252.00	11.02	0.18
Val	GTC	562086.00	14.53	0.24
Ala	GCG	286975.00	7.42	0.11
Ala	GCA	614754.00	15.89	0.23
Ala	GCT	715079.00	18.48	0.27
Ala	GCC	1079491.00	27.90	0.40
Arg	AGG	461676.00	11.93	0.21

10

20

30

40

50

Arg	AGA	466435.00	12.06	0.21
Ser	AGT	469641.00	12.14	0.15
Ser	AGC	753597.00	19.48	0.24
Lys	AAG	1236148.00	31.95	0.57
Lys	AAA	940312.00	24.30	0.43
Asn	AAT	653566.00	16.89	0.47
Asn	AAC	739007.00	19.10	0.53
Met	ATG	853648.00	22.06	1.00
Ile	ATA	288118.00	7.45	0.17
Ile	ATT	615699.00	15.91	0.36
Ile	ATC	808306.00	20.89	0.47
Thr	ACG	234532.00	6.06	0.11
Thr	ACA	580580.00	15.01	0.28
Thr	ACT	506277.00	13.09	0.25
Thr	ACC	732313.00	18.93	0.36
Trp	TGG	510256.00	13.19	1.00
エンド	TGA	59528.00	1.54	0.47
Cys	TGT	407020.00	10.52	0.45
Cys	TGC	487907.00	12.61	0.55
エンド	TAG	30104.00	0.78	0.24
エンド	TAA	38222.00	0.99	0.30
Tyr	TAT	470083.00	12.15	0.44
Tyr	TAC	592163.00	15.30	0.56
Leu	TTG	498920.00	12.89	0.13
Leu	TTA	294684.00	7.62	0.08
Phe	TTT	676381.00	17.48	0.46
Phe	TTC	789374.00	20.40	0.54
Ser	TCG	171428.00	4.43	0.05
Ser	TCA	471469.00	12.19	0.15
Ser	TCT	585967.00	15.14	0.19
Ser	TCC	684663.00	17.70	0.22
Arg	CGG	443753.00	11.47	0.20
Arg	CGA	239573.00	6.19	0.11
Arg	CGT	176691.00	4.57	0.08
Arg	CGC	405748.00	10.49	0.18
Gln	CAG	1323614.00	34.21	0.74
Gln	CAA	473648.00	12.24	0.26
His	CAT	419726.00	10.85	0.42
His	CAC	583620.00	15.08	0.58
Leu	CTG	1539118.00	39.78	0.40
Leu	CTA	276799.00	7.15	0.07
Leu	CTT	508151.00	13.13	0.13
Leu	CTC	759527.00	19.63	0.20
Pro	CCG	268884.00	6.95	0.11
Pro	CCA	653281.00	16.88	0.28
Pro	CCT	676401.00	17.48	0.29
Pro	CCC	767793.00	19.84	0.32

10

20

30

40

【 0 0 5 3 】

高発現される遺伝子が高頻度コドンを使用する傾向は「コドンバイアス」と呼ばれる。リボソームタンパク質のための遺伝子は、61個のコドンのうちの20～25個の最も頻度の高いもののみを使用する可能性があり、高いコドンバイアスを有する（1に近いコドンバイアス）。発現が乏しい遺伝子は、61個全てのコドンを使用する可能性があり、ほとんどまたは全くコドンバイアスを有しない（0に近いコドンバイアス）。頻繁に使用されるコドンは、より大量のコグネイトtRNAが発現されるコドンであり、またこれらのコドンの使用は、翻訳がより迅速に、もしくはより正確に、または両方で進行することを可能にすると考えられる。例えば、PVカプシドタンパク質は非常に活発に翻訳され、高いコ

50

ドンバイアスを有する。

【0054】

コドンペアバイアス

追加的に、所与の生物は、所与のコドンAの最も近接したコドンネイバーに対する選好性を有し、これはコドンペア利用におけるバイアスと称される。既存のコドンを変化させることのない、コドンペアバイアスの変化は、タンパク質合成の速度およびタンパク質の産生に影響を及ぼし得る。

【0055】

コドンペアバイアスは、8つの異なるコドンペアによりコードされ得るアミノ酸ペアAla-Gluを考慮することにより説明され得る。（表2に示されるような）各個々のコドンの頻度以外の要因がコドンペアの頻度の原因とならない場合、8つのエンコーディングのそれぞれの予測される頻度は、2つの関連するコドンの頻度を掛けることにより計算され得る。例えば、この計算により、コドンペアGCA-GAAは、全てのAla-Gluコーディングペアのうち0.097の頻度（ 0.23×0.42 ；表2における頻度に基づく）で起こると予測される。各コドンペアの予測される（仮説上の）頻度をヒトゲノムにおいて実際に観察される頻度に関連付けるために、合計で14,795個のヒト遺伝子を含む一貫して注釈付けされたヒトコーディング領域のコンセンサスCDS（CCDS）データベースを使用した。遺伝子のこのセットは、ヒトコーディング配列の最も包括的な表現である。遺伝子のこのセットを使用して、コドン使用の頻度を、コドンの出現の数を同じアミノ酸をコードする全ての同義コドンの数で割ることにより再計算した。予測されたように、頻度は、以前に報告されたもの、例えば表2に与えられるものと密接に相関した。軽微な頻度バリエーションは、84949個のヒトコーディング配列（ヒト遺伝子の実際の数よりもはるかに多い）が計算に含まれたKazusa DNA Research Institute (www.kazusa.or.jp/codon/codon.html)におけるコドン用法データベースにより提供されたデータにおけるオーバーサンプリング効果に起因する可能性がある。そのように計算されたコドン頻度を次に使用して、最初に2つの関連するコドンの頻度を互いに掛け（表3の予測される頻度を参照）、次にこの結果に、問題とするコドンペアによりコードされるアミノ酸ペアが起こる観察された頻度（CCDSデータセット全体中）を掛けることにより、予測されるコドンペア頻度を計算した。コドンペアGCA-GAAの例において、この第2の計算は、（Kazusaデータセットを使用する第1の計算における0.097と比較して）0.098の予測される頻度を与える。最後に、14,795個のヒト遺伝子のセットにおいて観察されるような実際のコドンペア頻度を、セット中の各コドンペアの出現の総数をカウントし、それを同じアミノ酸ペアをコードするセット中の全ての同義コーディングペアの数で割ることにより決定した（表3；観察された頻度）。14,795個のヒト遺伝子のセットに基づく、3721（ 61^2 ）個のコドンペアの完全なセットについての頻度および観察/予測された値を表3として本明細書に提供する。

【0056】

（表3）アミノ酸ペアAla-Gluにより例示されるコドンペアスコア

アミノ酸ペア	コドンペア	予測される頻度	観察される頻度	観察/予測比
AE	GCAGAA	0.098	0.163	1.65
AE	GCAGAG	0.132	0.198	1.51
AE	GCCGAA	0.171	0.031	0.18
AE	GCCGAG	0.229	0.142	0.62
AE	GCGGAA	0.046	0.027	0.57
AE	GCGGAG	0.062	0.089	1.44
AE	GCTGAA	0.112	0.145	1.29
AE	GCTGAG	0.150	0.206	1.37
合計		1.000	1.000	

【0057】

コドンペアの観察された頻度/予測された頻度の比が1より大きい場合、コドンペアは過剰提示されていると言われる。比が1より小さい場合、それは過小提示されていると言われる。例において、コドンペアGCA-GAAは1.65倍過剰提示されており、コーディングペアGCC-GAAは5倍より大きく過小提示されている。

【0058】

多くの他のコドンペアは非常に強いバイアスを示し；一部のペアは過小提示されており、他のペアは過剰提示されている。例えば、コドンペアGCCGAA (Ala Glu) およびGATCTG (Asp Leu) は3~6倍過小提示されており（好ましいペアはそれぞれGCAGAGおよびGACCTGである）、コドンペアGCCAAG (Ala Lys) およびAATGAA (Asn Glu) は約2倍過剰提示されている。コドンペアバイアスはアミノ酸のペアの頻度とも、個々のコドンの頻度とも関係ないということは注目に値する。例えば、過小提示されたペアGATCTG (Asp Leu) は、最も頻繁なLeuコドン (CTG) を使用している。

10

【0059】

以下においてより十分に議論されるように、コドンペアバイアスは、コーディング配列の全長にわたり平均された、コーディング配列中の各コドンペアのスコアを考慮に入れる。本発明によれば、コドンペアバイアスは、

$$CPB = \sum_{i=1}^k \frac{CPS_i}{K-1}$$

20

により決定される。

【0060】

よって、コーディング配列についての類似したコドンペアバイアスは、例えば、部分配列に対する最小化されたコドンペアスコア、またはコーディング配列の全長に対する適度に減少されたコドンペアスコアにより、得られ得る。

【0061】

コドンペアバイアスの計算

可能な3721個の非「終止」含有コドンペアのあらゆる個々のコドンペア（例えば、GTT-GCT）は、遺伝子の所与の「トレーニングセット」に特有の割り当てられた「コドンペアスコア」、または「CPS」を持つ。所与のコドンペアのCPSは、遺伝子のこのセット（この例ではヒトゲノム）において予測された数に対する、出現の観察された数の、対数比、として定義される。特定のコドンペアの出現の実際の数（または換言すれば特定のアミノ酸ペアが特定のコドンペアによりコードされている可能性）の決定は単純に、コーディング配列の特定のセット中のコドンペアの出現の実際の数のカウントすることである。しかしながら、予測される数の決定には追加の計算が必要とされる。予測される数は、Gutman and Hatfieldと同様にアミノ酸頻度およびコドンバイアスの両方から独立するように計算される。すなわち、予測される頻度は、アミノ酸が特有のコドンによりコードされる回数の相対的な割合に基づいて計算される。正のCPS値は所与のコドンペアが統計的に過剰提示されていることを表し、負のCPSはペアがヒトゲノムにおいて統計的に過小提示されていることを示す。

30

40

【0062】

ヒトの文脈においてこれらの計算を行うために、合計で14,795個の遺伝子を含む、一貫して注釈付けされたヒトコーディング領域の最も最近のコンセンサスCDS (CCDS) データベースを使用した。このデータセットは、コドンおよびコドンペア、ならびにそのためアミノ酸およびアミノ酸ペアの頻度をゲノムスケールで提供した。

【0063】

Federov et al. (2002) のパラダイムを使用して、Gutman and Hatfield (1989) のアプローチをさらに増強した。これは、特定のアミノ酸ペアをコードする隣接する

50

コドンのコドン頻度および非ランダムな連合性から独立して所与のコドンペアの予測される頻度の計算を可能とした。CPBを計算するために使用した詳細な式は、参照により組み入れられるWO 2008/121992およびWO 2011/044561に開示されている。

$$S(P_{ij}) = \ln \left(\frac{N_o(P_{ij})}{N_e(P_{ij})} \right) = \ln \left(\frac{N_o(P_{ij})}{F(C_i)F(C_j)N_o(X_{ij})} \right)$$

【0064】

計算において、 P_{ij} は、その同義群中で $N_o(P_{ij})$ の頻度で出現するコドンペアである。 C_i および C_j は、それらの同義群中でそれぞれ頻度 $F(C_i)$ および $F(C_j)$ で出現する、 P_{ij} を構成する2つのコドンである。より明示的には、 $F(C_i)$ は、対応するアミノ酸 X_i が全てのコーディング領域を通じてコドン C_i によりコードされる頻度であり、 $F(C_j) = N_o(C_j) / N_o(X_j)$ であり、ここで $N_o(C_i)$ および $N_o(X_i)$ は、それぞれコドン C_i およびアミノ酸 X_i の出現の観察される数である。 $F(C_j)$ はそれに応じて計算される。さらに、 $N_o(X_{ij})$ は、全てのコーディング領域を通じたアミノ酸ペア X_{ij} の出現の数である。 P_{ij} のコドンペアバイアススコア $S(P_{ij})$ を、 $N_e(P_{ij})$ の出現の予測される数に対する、観察される頻度 $N_o(P_{ij})$ の、対数オッズ比、として計算した。

【0065】

上記の式を使用して、ヒトCCDSデータセット全体を使用することにより計算された対応するゲノム $N_e(P_{ij})$ 値と比較した場合に、個々のコーディング配列中の個々のコドンペアが過剰提示または過小提示されたかどうかを次に決定した。この計算は、ヒトコーディング領域中の過剰提示されたコドンペアについて正の $S(P_{ij})$ スコア値、および過小提示されたコドンペアについて負の値を、結果としてもたらした。

【0066】

以下の式：

$$S(P_{ij}) = \sum_{l=1}^k \frac{S(P_{ij})^l}{k-1}$$

にしたがって全てのコドンペアスコアを平均することにより、個々のコーディング配列の「組み合わせた」コドンペアバイアスを計算した。

【0067】

コーディング領域全体のコドンペアバイアスはそのため、領域を構成する個々のコドンペアスコアの全てを加え、この和をコーディング配列の長さで割ることにより計算される。

【0068】

コドンペアバイアスの計算、コドンペアバイアスを変更するためのアルゴリズムの実行
コドンペアバイアスを定量化するためのアルゴリズムを開発した。あらゆる可能な個々のコドンペアに「コドンペアスコア」、または「CPS」を与えた。CPSは、全てのヒトコーディング領域にかけての各コドンペアの出現の予測される数に対する、観察される数の、比の自然対数、として定義され、ヒトは、再コードされるべき本ワクチンウイルスの宿主種となる。

$$CPS = \ln \left(\frac{F(AB)_o}{\frac{F(A) \times F(B)}{F(X) \times F(Y)} \times F(XY)} \right)$$

【0069】

特定のコドンペアの観察される出現の計算は直接的であるが（遺伝子セット内の実際の数）、コドンペアの出現の予測される数には追加の計算が必要とされる。本発明者らは、

Gutman and Hatfieldに類似して、アミノ酸頻度およびコドンバイアスの両方から独立するようにこの予測される数を計算する。すなわち、予測される頻度は、アミノ酸が特有のコドンによりコードされる回数の相対的な割合に基づいて計算される。正のCPS値は所与のコドンペアが統計的に過剰提示されていることを表し、負のCPSはペアがヒトゲノムにおいて統計的に過小提示されていることを示す。

【0070】

これらの計算されたCPSを使用して、コドンペアスコアの平均を取ること、そのため遺伝子全体についてコドンペアバイアス（CPB）を与えることにより、過剰または過小提示されたコドンペアの使用として、任意のコーディング領域を次に評価することができる。

10

$$CPB = \sum_{i=1}^k \frac{CPS_i}{k-1}$$

【0071】

示された式を使用して全ての注釈付けされたヒト遺伝子についてCPBを計算し、プロットした（図1）。グラフ中の各点は単一のヒト遺伝子のCPBに対応する。分布のピークは0.07の正のコドンペアバイアスを有し、これは全ての注釈付けされたヒト遺伝子についての平均スコアである。また、負のコドンペアバイアスを有する非常に少数の遺伝子がある。CPBを定義および計算するために確立された式を次に使用してこのバイアス进行操作した。

20

【0072】

コドンペアバイアスを低減させて弱毒化するためのアルゴリズム

タンパク質コーディング配列の再コーディングは、例えば、勾配降下法、またはシミュレーテッドアニーリング、または他の最小化ルーチンを使用して、コンピュータの補助を用いてまたは用いずに行われ得る。出発配列中に存在するコドンを再編成する手順の例は、以下の工程により表される：

30

（1）野生型ウイルスゲノム配列を得る。

（2）弱毒化設計のために標的化するタンパク質コーディング配列を選択する。

（3）非コーディング機能を有する既知のまたは推量されるDNAセグメントをロックダウンする。

（4）再設計されたタンパク質中の残りのアミノ酸のための所望のコドン分布を選択する。

（5）少なくとも2つの同義のロックされていないコドンの位置のランダムなシャッフルを行い、コドンペアスコアを計算する。

（6）任意でシミュレーテッドアニーリング手順を用いてコドンペアスコアをさらに低減させる（または増加させる）。

（7）過度の二次構造および望ましくない制限部位について結果としてもたらされた設計を検査する：

40

・該当する場合、工程（5）に行くか、または問題がある領域を野生型配列で置き換えることにより設計を矯正し、工程（8）に行く。

（8）ウイルス設計に対応するDNA配列を合成する。

（9）ウイルス構築物を作製し、ウイルス表現型を評価する：

・弱毒化され過ぎている場合、サブクローン構築物を調製し、9に行く；

・弱毒化が不十分の場合、2に行く。

【0073】

コドンペアバイアスを低減させることによるウイルスの弱毒化は、参照により組み入れられるWO 2008/121992およびWO 2011/044561に開示されている。

【0074】

全長フラビウイルスもしくはデングゲノム配列または野生型フラビウイルスもしくはデ

50

ングゲノム配列中に埋め込まれたコドンペア脱最適化配列を得る方法は、例えば、オーバーラップ伸長PCR戦略、またはロングPCRベースの融合戦略を使用して、感染性cDNAクローンを構築する工程を含み得る。

【0075】

改変型フラビウイルス

本発明の様々な態様は、ウイルスタンパク質の発現が親ウイルスと比較して低減された改変型フラビウイルス属ウイルスを提供する。発現の低減は、prM、もしくはエンベロープ(E)領域または両方を再コードした結果である。一部の態様において、親ウイルスは野生型フラビウイルスであり、そのため、比較は野生型ウイルスまたは野生型ウイルス中の配列に対して為される。

【0076】

様々な態様において、Eタンパク質コーディング配列は、タンパク質コーディング配列のコドンペアバイアスまたはコドン使用頻度バイアスを低減させることにより再コードされる。様々な態様において、コドンペアバイアスを低減させることは、低減され得るコドンペアスコアを有する親タンパク質コーディング配列中のコドンペアを同定すること、およびコドンペアをより低いコドンペアスコアを有するコドンペアで置換することによりコドンペアバイアスを低減させることを含む。他の態様において、コドンペアバイアスを低減させることは、親タンパク質コーディング配列のコドンを再編成することを含む。

【0077】

様々な態様において、再コードされたprM/Eタンパク質コーディング配列のそれぞれは、-0.05未満、-0.1未満、または-0.2未満、または-0.3未満、または-0.4未満のコドンペアバイアスを有する。

【0078】

ある特定の態様において、再コードされたprMタンパク質コーディング配列は、-0.05未満、または-0.06未満、または-0.07未満、または-0.08未満、または-0.09未満、または-0.1未満、または-0.11未満、または-0.12未満、または-0.13未満、または-0.14未満、または-0.15未満、または-0.16未満、または-0.17未満、または-0.18未満、または-0.19未満、または-0.2未満、または-0.25未満、または-0.3未満、または-0.35未満、または-0.4未満、または-0.45未満、または-0.5未満のコドンペアバイアスを有する。

【0079】

ある特定の態様において、再コードされたEタンパク質コーディング配列は、-0.05未満、または-0.06未満、または-0.07未満、または-0.08未満、または-0.09未満、または-0.1未満、または-0.11未満、または-0.12未満、または-0.13未満、または-0.14未満、または-0.15未満、または-0.16未満、または-0.17未満、または-0.18未満、または-0.19未満、または-0.2未満、または-0.25未満、または-0.3未満、または-0.35未満、または-0.4未満、または-0.45未満、または-0.5未満のコドンペアバイアスを有する。

【0080】

ある特定の態様において、再コードされたprMタンパク質コーディング配列のコドンペアバイアスは、それが由来する親prMタンパク質コーディング配列と比較して、少なくとも0.05、または少なくとも0.06、または少なくとも0.07、または少なくとも0.08、または少なくとも0.09、または少なくとも0.1、または少なくとも0.11、または少なくとも0.12、または少なくとも0.13、または少なくとも0.14、または少なくとも0.15、または少なくとも0.16、または少なくとも0.17、または少なくとも0.18、または少なくとも0.19、または少なくとも0.2、または少なくとも0.25、または少なくとも0.3、または少なくとも0.35、または少なくとも0.4、または少なくとも0.45、または少なくとも0.5低減される。

【0081】

ある特定の態様において、再コードされたEタンパク質コーディング配列のコドンペア

10

20

30

40

50

バイアスは、それが由来する親Eタンパク質コーディング配列と比較して、少なくとも0.05、または少なくとも0.06、または少なくとも0.07、または少なくとも0.08、または少なくとも0.09、または少なくとも0.1、または少なくとも0.11、または少なくとも0.12、または少なくとも0.13、または少なくとも0.14、または少なくとも0.15、または少なくとも0.16、または少なくとも0.17、または少なくとも0.18、または少なくとも0.19、または少なくとも0.2、または少なくとも0.25、または少なくとも0.3、または少なくとも0.35、または少なくとも0.4、または少なくとも0.45、または少なくとも0.5低減される。ある特定の態様において、それは、計算が為されるべきEタンパク質コーディング配列、例えば、野生型ウイルスのEタンパク質コーディング配列と比較したものである。

10

【0082】

様々な態様において、Eタンパク質コーディング配列は、その親ウイルスと比較してCpGまたはUpAジヌクレオチドの数を増加させることにより再コードされる。様々な態様において、Eタンパク質コーディング配列は、その親ウイルスと比較してG+C含有量を改変することにより再コードされる。

【0083】

様々な態様において、Eタンパク質コーディング配列は、1つまたは複数のコドンを、ウイルス宿主、例えば、ヒトにおいてより頻度が低い同義コドンで置き換えることにより再コードされる。

【0084】

様々な態様において、Eタンパク質コーディング配列は、1つまたは複数のコドンを、ウイルス自体においてより頻度が低い同義コドンで置き換えることにより再コードされる。

20

【0085】

一部の態様において、prMタンパク質コーディング配列中の同義コドンで置換されたコドンの数は、少なくとも5個、または少なくとも10個、または少なくとも30個、または少なくとも30個、または少なくとも40個、または少なくとも50個、または少なくとも75個、または少なくとも100個、または少なくとも150個である。

【0086】

一部の態様において、Eタンパク質コーディング配列中の同義コドンで置換されたコドンの数は、少なくとも5個、または少なくとも10個、または少なくとも30個、または少なくとも30個、または少なくとも40個、または少なくとも50個、または少なくとも75個、または少なくとも100個、または少なくとも125個、または少なくとも150個、または少なくとも175個である。

30

【0087】

様々な態様において、親ウイルスは、デング熱ウイルス、ウエストナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、スpondウェニウイルス、ジカウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、およびポワッサンウイルスからなる群より選択されるフラビウイルスである。様々な態様において、親ウイルスは天然の分離株である。様々な態様において、親ウイルスは天然の分離株の突然変異体である。

40

【0088】

改変型デングウイルス

本発明の様々な態様は、改変型フラビウイルスとしての改変型デングウイルスを提供する。

【0089】

様々な態様において、ウイルスタンパク質の発現が親ウイルスと比較して低減されており、発現の低減が、prM、もしくはエンベロープ(E)領域、または両方を再コードした結果である、改変型デングウイルスが提供される。一部の態様において、親デングウイルスは野生型デングウイルスである。そのため、比較は野生型デングウイルスに対して為され得る。

50

【0090】

様々な態様において、Eタンパク質コーディング配列の1つまたは両方は、タンパク質コーディング配列のコドンペアバイアスまたはコドン使用頻度バイアスを低減させることにより再コードされる。様々な態様において、コドンペアバイアスを低減させることは、低減され得るコドンペアスコアを有する親タンパク質コーディング配列中のコドンペアを同定すること、およびコドンペアをより低いコドンペアスコアを有するコドンペアで置換することによりコドンペアバイアスを低減させることを含む。様々な態様において、コドンペアバイアスを低減させることは、親タンパク質コーディング配列のコドンを再編成することを含む。

【0091】

本発明の様々な態様は、改変型デングウイルスであって、再コードされたprMタンパク質、再コードされたエンベロープ（E）タンパク質、または両方を含み、再コードされたprMタンパク質が、その親prMタンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有し、またはより低い頻度で使用される同義コドンで置換された少なくとも5つのコドンを有し、またはその親prMタンパク質コーディング配列と比較して増加した数のCpGもしくはUpAジヌクレオチドを有し、かつ再コードされたEタンパク質が、その親Eタンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有し、またはより低い頻度で使用される同義コドンで置換された少なくとも5つのコドンを有し、またはその親Eタンパク質コーディング配列と比較して増加した数のCpGもしくはUpAジヌクレオチドを有する、改変型デングウイルスを提供する。様々な態様において、「その親タンパク質コーディング配列」は、「野生型デングタンパク質コーディング配列」、例えば、「野生型デングEタンパク質コーディング配列」、「野生型デングprMタンパク質コーディング配列」である。

【0092】

様々な態様において、prMタンパク質もしくはEタンパク質または両方の発現は、その親デングウイルスと比較して低減される。

【0093】

様々な態様において、再コードされたprMタンパク質は、その親prMタンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有する。様々な態様において、再コードされたprMコーディング配列のコドンペアバイアスは、少なくとも0.05低減される。ある特定の態様において、デングウイルスの再コードされたprMタンパク質コーディング配列のコドンペアバイアスは、それが由来する親デングウイルスのprMタンパク質コーディング配列と比較して、少なくとも0.06、または少なくとも0.07、または少なくとも0.08、または少なくとも0.09、または少なくとも0.1、または少なくとも0.11、または少なくとも0.12、または少なくとも0.13、または少なくとも0.14、または少なくとも0.15、または少なくとも0.16、または少なくとも0.17、または少なくとも0.18、または少なくとも0.19、または少なくとも0.2、または少なくとも0.25、または少なくとも0.3、または少なくとも0.35、または少なくとも0.4、または少なくとも0.45、または少なくとも0.5低減される。ある特定の態様において、それは、計算が為されるべきprMタンパク質コーディング配列、例えば、野生型デングウイルスのprMタンパク質コーディング配列と比較したものである。

【0094】

様々な態様において、再コードされたprMタンパク質は、より低い頻度で使用される同義コドンで置換された少なくとも5つのコドンを有する。様々な態様において、再コードされたprMタンパク質は、より低い頻度で使用される同義コドンで置換された少なくとも10個、20個、25個、30個、35個、40個、45個、50個または55個のコドンを有し得る。一部の態様において、より低い頻度で使用される同義コドンでの置換は、ウイルス宿主、例えば、ヒト、蚊において、より低い頻度で使用されるものである。一部の態様において、より低い頻度で使用される同義コドンでの置換は、ウイルス自体においてより低い頻度で使用されるものである。

【0095】

様々な態様において、再コードされたprMタンパク質は、その親prMタンパク質コーディング配列と比較して増加した数のCpGまたはUpAジヌクレオチドを有する。様々な態様において、再コードされたprMタンパク質は、その親prMタンパク質コーディング配列と比較して15～55個のCpGまたはUpAジヌクレオチドの増加を有する。様々な態様において、再コードされたprMタンパク質は、その親prMタンパク質コーディング配列と比較して約15個、20個、25個、30個、35個、40個、45個または55個のCpGまたはUpAジヌクレオチドの増加を有する。

【0096】

様々な態様において、再コードされたEタンパク質は、その親Eタンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有する。様々な態様において、Eタンパク質コーディング配列のコドンペアバイアスは、その親Eタンパク質コーディング配列と比較して少なくとも0.05低減される。ある特定の態様において、デングウイルスの再コードされたEタンパク質コーディング配列のコドンペアバイアスは、それが由来するその親デングウイルスのEタンパク質コーディング配列と比較して、少なくとも0.06、または少なくとも0.07、または少なくとも0.08、または少なくとも0.09、または少なくとも0.1、または少なくとも0.11、または少なくとも0.12、または少なくとも0.13、または少なくとも0.14、または少なくとも0.15、または少なくとも0.16、または少なくとも0.17、または少なくとも0.18、または少なくとも0.19、または少なくとも0.2、または少なくとも0.25、または少なくとも0.3、または少なくとも0.35、または少なくとも0.4、または少なくとも0.45、または少なくとも0.5低減される。ある特定の態様において、それは、計算が為されるべきEタンパク質コーディング配列、例えば、野生型デングウイルスのEタンパク質コーディング配列と比較したものである。

【0097】

様々な態様において、再コードされたEタンパク質は、より低い頻度で使用される同義コドンで置換された少なくとも5つのコドンを含む。様々な態様において、再コードされたEタンパク質は、より低い頻度で使用される同義コドンで置換された少なくとも10個、20個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、65個、70個、75個、80個、85個、90個、95個、100個、125個、150個、または175個のコドンを含む。一部の態様において、より低い頻度で使用される同義コドンでの置換は、ウイルス宿主、例えば、ヒト、蚊において、より低い頻度で使用されるものである。一部の態様において、より低い頻度で使用される同義コドンでの置換は、ウイルス自体においてより低い頻度で使用されるものである。

【0098】

様々な態様において、再コードされたEタンパク質は、その親Eタンパク質コーディング配列と比較して増加した数のCpGまたはUpAジヌクレオチドを有する。様々な態様において、再コードされたprMタンパク質は、その親Eタンパク質コーディング配列と比較して5～12個のCpGまたはUpAジヌクレオチドの増加を有する。様々な態様において、再コードされたprMタンパク質は、その親Eタンパク質コーディング配列と比較して約5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個または12個のCpGまたはUpAジヌクレオチドの増加を有する。

【0099】

様々な態様において、再コードされたprMまたはEタンパク質コーディング配列のそれぞれは、-0.05未満のコドンペアバイアスを有する。ある特定の態様において、再コードされたprMタンパク質コーディング配列は、-0.05未満、または-0.06未満、または-0.07未満、または-0.08未満、または-0.09未満、または-0.1未満、または-0.11未満、または-0.12未満、または-0.13未満、または-0.14未満、または-0.15未満、または-0.16未満、または-0.17未満、または-0.18未満、または-0.19未満、または-0.2未満、または-0.25未満、または-0.3未満、または-0.35未満、または-0.4未満、または-0.45未満、または-0.5未満のコドンペアバイアスを有する。ある特定の態様において、再コ

10

20

30

40

50

ードされたEタンパク質コーディング配列は、-0.05未満、または-0.06未満、または-0.07未満、または-0.08未満、または-0.09未満、または-0.1未満、または-0.11未満、または-0.12未満、または-0.13未満、または-0.14未満、または-0.15未満、または-0.16未満、または-0.17未満、または-0.18未満、または-0.19未満、または-0.2未満、または-0.25未満、または-0.3未満、または-0.35未満、または-0.4未満、または-0.45未満、または-0.5未満のコドンペアバイアスを有する。

【0100】

様々な態様において、改変型デングウイルスは、1型、2型、3型、4型またはこれらの組合せから選択される。例えば、1型および2型、1型および3型、1型および4型、2型および3型、2型および4型、または3型および4型である。追加の例は、1型、2型および3型；1型、3型および4型；または2型、3型および4型である。様々な態様において、改変型デングウイルスは改変型四価デングウイルス（すなわち、1型、2型、3型および4型）である。

10

【0101】

方法

様々な態様は、対象において免疫応答を誘発する方法であって、対象に、本明細書において上記されるような本発明の改変型デングウイルスを含む有効用量の組成物を投与する工程を含む、方法を提供する。

【0102】

様々な態様において、免疫応答は保護免疫応答であり、かつ $10^3 \sim 10^7$ の予防有効用量のまたは治療有効用量の請求項に記載のワクチン組成物が投与される。様々な態様において、免疫応答は保護免疫応答であり、かつ 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、または 10^7 の予防有効用量のまたは治療有効用量の請求項に記載のワクチン組成物が投与される。様々な態様において、方法は、対象に、少なくとも1つのアジュバントを投与する工程をさらに含む。様々な態様において、免疫応答は異種デングウイルスに対して交差保護的である。

20

【0103】

様々な態様は、それを必要とする対象において免疫応答を誘発する方法であって、それを必要とする対象に、プライム用量の、(i) コドンペア脱最適化もしくはコドン脱最適化、もしくはCpGもしくはUpAジヌクレオチドの増加以外の方法により作製された弱毒化デングウイルス、または(ii) 再コードされたprMタンパク質、再コードされたエンペロープ(E)タンパク質、もしくは両方を含む改変型デングウイルスであって、再コードされたprMタンパク質が、その親prMタンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有し、もしくはより低い頻度で使用される同義コドンで置換された少なくとも5つのコドンを含む、もしくはその親prMタンパク質コーディング配列と比較して増加した数のCpGもしくはUpAジヌクレオチドを有し、かつ再コードされたEタンパク質が、その親Eタンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有し、もしくはより低い頻度の同義コドンで置換された少なくとも5つのコドンを含む、もしくはその親Eタンパク質コーディング配列と比較して増加した数のCpGもしくはUpAジヌクレオチドを有する、改変型デングウイルスを投与する工程；および1つまたは複数のブースト用量の、(i) コドンペア脱最適化もしくはコドン脱最適化、もしくはCpGもしくはUpAジヌクレオチドの増加以外の方法により作製された弱毒化デングウイルス、または(ii) 改変型デングウイルスを投与する工程、を含み、少なくともプライム用量または1つもしくは複数のブースト用量が改変型デングウイルスである、方法を提供する。

30

40

【0104】

様々な態様において、1つまたは複数のブースト用量のうちの第1の用量は、プライム用量の約2週後に投与される。

【0105】

様々な態様において、prMタンパク質もしくはEタンパク質または両方の発現は、その親デングウイルスと比較して低減される。様々な態様において、親デングウイルスは野生

50

型 Deng ウイルスである。

【0106】

様々な態様において、再コードされた prM タンパク質は、その親 prM タンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有する。様々な態様において、再コードされた prM コーディング配列のコドンペアバイアスは、少なくとも 0.05 低減される。ある特定の態様において、Deng ウイルスの再コードされた prM タンパク質コーディング配列のコドンペアバイアスは、それが由来する親 Deng ウイルスの prM タンパク質コーディング配列と比較して、少なくとも 0.06、または少なくとも 0.07、または少なくとも 0.08、または少なくとも 0.09、または少なくとも 0.1、または少なくとも 0.11、または少なくとも 0.12、または少なくとも 0.13、または少なくとも 0.14、または少なくとも 0.15、または少なくとも 0.16、または少なくとも 0.17、または少なくとも 0.18、または少なくとも 0.19、または少なくとも 0.2、または少なくとも 0.25、または少なくとも 0.3、または少なくとも 0.35、または少なくとも 0.4、または少なくとも 0.45、または少なくとも 0.5 低減される。ある特定の態様において、それは、計算が為されるべき prM タンパク質コーディング配列、例えば、野生型 Deng ウイルスの prM タンパク質コーディング配列と比較したものである。

10

【0107】

様々な態様において、再コードされた prM タンパク質は、より低い頻度で使用される同義コドンで置換された少なくとも 5 つのコドンを有する。様々な態様において、再コードされた prM タンパク質は、より低い頻度で使用される同義コドンで置換された少なくとも 10 個、20 個、25 個、30 個、35 個、40 個、45 個、50 個または 55 個のコドンを有し得る。一部の態様において、より低い頻度で使用される同義コドンでの置換は、ウイルス宿主、例えば、ヒト、蚊において、より低い頻度で使用されるものである。一部の態様において、より低い頻度で使用される同義コドンでの置換は、ウイルス自体においてより低い頻度で使用されるものである。

20

【0108】

様々な態様において、再コードされた prM タンパク質は、その親 prM タンパク質コーディング配列と比較して増加した数の CpG または UpA ジヌクレオチドを有する。様々な態様において、再コードされた prM タンパク質は、その親 prM タンパク質コーディング配列と比較して 15~55 個の CpG または UpA ジヌクレオチドの増加を有する。様々な態様において、再コードされた prM タンパク質は、その親 prM タンパク質コーディング配列と比較して約 15 個、20 個、25 個、30 個、35 個、40 個、45 個または 55 個の CpG または UpA ジヌクレオチドの増加を有する。ある特定の態様において、それは、計算が為されるべき prM タンパク質コーディング配列、例えば、野生型 Deng ウイルスの prM タンパク質コーディング配列と比較したものである。

30

【0109】

様々な態様において、再コードされた E タンパク質は、その親 E タンパク質コーディング配列と比較して低減されたコドンペアバイアスを有する。様々な態様において、E タンパク質コーディング配列のコドンペアバイアスは、その親 E タンパク質コーディング配列と比較して少なくとも 0.05 低減される。ある特定の態様において、Deng ウイルスの再コードされた E タンパク質コーディング配列のコドンペアバイアスは、それが由来するその親 Deng ウイルスの E タンパク質コーディング配列と比較して、少なくとも 0.06、または少なくとも 0.07、または少なくとも 0.08、または少なくとも 0.09、または少なくとも 0.1、または少なくとも 0.11、または少なくとも 0.12、または少なくとも 0.13、または少なくとも 0.14、または少なくとも 0.15、または少なくとも 0.16、または少なくとも 0.17、または少なくとも 0.18、または少なくとも 0.19、または少なくとも 0.2、または少なくとも 0.25、または少なくとも 0.3、または少なくとも 0.35、または少なくとも 0.4、または少なくとも 0.45、または少なくとも 0.5 低減される。ある特定の態様において、それは、計算が為されるべき E タンパク質コーディング配列、例えば、野生型 Deng ウイルスの E タンパク質コーディング配列と比較したものである。

40

50

【0110】

様々な態様において、再コードされたEタンパク質は、より低い頻度で使用する同義コドンで置換された少なくとも5つのコドンを含む。様々な態様において、再コードされたEタンパク質は、より低い頻度で使用する同義コドンで置換された少なくとも10個、20個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、65個、70個、75個、80個、85個、90個、95個、100個、125個、150個、または175個のコドンを含む。一部の態様において、より低い頻度で使用する同義コドンでの置換は、ウイルス宿主、例えば、ヒト、蚊において、より低い頻度で使用するものである。一部の態様において、より低い頻度で使用する同義コドンでの置換は、ウイルス自体においてより低い頻度で使用するものである。

10

【0111】

様々な態様において、再コードされたEタンパク質は、その親Eタンパク質コーディング配列と比較して増加した数のCpGまたはUpAジヌクレオチドを含む。様々な態様において、再コードされたprMタンパク質は、その親Eタンパク質コーディング配列と比較して5〜12個のCpGまたはUpAジヌクレオチドの増加を含む。様々な態様において、再コードされたprMタンパク質は、その親Eタンパク質コーディング配列と比較して約5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個または12個のCpGまたはUpAジヌクレオチドの増加を含む。ある特定の態様において、それは、計算が為されるべきEタンパク質コーディング配列、例えば、野生型デングウイルスのEタンパク質コーディング配列と比較したものである。

20

【0112】

様々な態様において、再コードされたprMまたはEタンパク質コーディング配列のそれぞれは、-0.05未満のコドンペアバイアスを含む。ある特定の態様において、再コードされたprMタンパク質コーディング配列は、-0.05未満、または-0.06未満、または-0.07未満、または-0.08未満、または-0.09未満、または-0.1未満、または-0.11未満、または-0.12未満、または-0.13未満、または-0.14未満、または-0.15未満、または-0.16未満、または-0.17未満、または-0.18未満、または-0.19未満、または-0.2未満、または-0.25未満、または-0.3未満、または-0.35未満、または-0.4未満、または-0.45未満、または-0.5未満コドンペアバイアスを含む。ある特定の態様において、再コードされたEタンパク質コーディング配列は、-0.05未満、または-0.06未満、または-0.07未満、または-0.08未満、または-0.09未満、または-0.1未満、または-0.11未満、または-0.12未満、または-0.13未満、または-0.14未満、または-0.15未満、または-0.16未満、または-0.17未満、または-0.18未満、または-0.19未満、または-0.2未満、または-0.25未満、または-0.3未満、または-0.35未満、または-0.4未満、または-0.45未満、または-0.5未満のコドンペアバイアスを含む。

30

【0113】

様々な態様において、改変型デングウイルスは、1型、2型、3型、4型またはこれらの組合せから選択される。例えば、1型および2型、1型および3型、1型および4型、2型および3型、2型および4型、または3型および4型である。追加の例は、1型、2型および3型；1型、3型および4型；または2型、3型および4型である。様々な態様において、改変型デングウイルスは改変型四価デングウイルス（すなわち、1型、2型、3型および4型）である。

40

【0114】

改変型フラビウイルス属ウイルスゲノムを作る方法

本発明の様々な態様は、改変型フラビウイルス属ウイルスゲノムを作る方法を提供する。方法は、フラビウイルス属ウイルスのエンベロープタンパク質をコードするヌクレオチド配列およびフラビウイルス属ウイルスの非構造3タンパク質をコードするヌクレオチド配列を得る工程；タンパク質発現を低減させるために、エンベロープコーディングヌクレオチド配列を再コードする工程、およびタンパク質発現を低減させるために、非構造タンパク質3コーディングヌクレオチド配列を再コードする工程、ならびに改変型フラビウイ

50

ルス属ウイルスゲノムを作るために、再コードされたエンベロープコーディングヌクレオチド配列を有する核酸および再コードされた非構造タンパク質3コーディングヌクレオチド配列を有する核酸を親フラビウイルス属ウイルスゲノム中に置換する工程、を含み、ここで、再コードされたエンベロープコーディングヌクレオチド配列の発現および再コードされた非構造タンパク質3コーディングヌクレオチド配列の発現が親ウイルスと比較して低減される。

【0115】

本発明の様々な態様は、改変型 Deng ウイルスゲノムを作る方法であって、Deng ウイルスのエンベロープタンパク質をコードするヌクレオチド配列および Deng ウイルスの非構造3タンパク質をコードするヌクレオチド配列を得る工程；タンパク質発現を低減させるために、エンベロープコーディングヌクレオチド配列を再コードする工程、およびタンパク質発現を低減させるために、非構造タンパク質3コーディングヌクレオチド配列を再コードする工程、ならびに改変型 Deng ウイルスゲノムを作るために、再コードされたエンベロープコーディングヌクレオチド配列を有する核酸および再コードされた非構造タンパク質3コーディングヌクレオチド配列を有する核酸を親 Deng ウイルスゲノム中に置換する工程、を含み、ここで、再コードされたエンベロープコーディングヌクレオチド配列の発現および再コードされた非構造タンパク質3コーディングヌクレオチド配列の発現が親ウイルスと比較して低減される、方法を提供する。

10

【0116】

本発明の様々な態様は、改変型 Deng ウイルスゲノムを作る方法であって、Deng ウイルスのエンベロープタンパク質をコードするヌクレオチド配列を得る工程；タンパク質発現を低減させるために、エンベロープコーディングヌクレオチド配列を再コードする工程、および改変型 Deng ウイルスゲノムを作るために、再コードされたエンベロープコーディングヌクレオチド配列を有する核酸を親 Deng ウイルスゲノム中に置換する工程、を含み、ここで、再コードされたエンベロープコーディングヌクレオチド配列の発現が親ウイルスと比較して低減される、方法を提供する。

20

【0117】

本発明の様々な態様によれば、ウイルス弱毒化は、E コーディング配列のコドンペア脱最適化を通じてウイルスタンパク質の発現を低減させることにより達成される。コーディング配列の発現を低減させるための1つのやり方はコドンペアバイアスにおける低減であるが、他の方法もまた単独でまたは組合せて使用され得る。コドンバイアスが増加されてもよいが、コドンペアバイアスを調整することが特に有利である。例えば、コドンバイアスを通じてウイルスを弱毒化することは、一般的なコドンの排除を一般に必要とし、そのためヌクレオチド配列の複雑性が低減される。対照的に、コドンペアバイアスの低減または最小化は、はるかにより大きな配列多様性、ならびに結果的に核酸二次構造、アニーリング温度、および他の物理的および生化学的特性に対するより大きな制御を維持しながら達成され得る。

30

【0118】

タンパク質コーディング配列のコドンペアバイアス（すなわち、オープンリーディングフレーム）は、上記に記載され、および Coleman et al., 2008 に記載されるように計算される。

40

【0119】

ウイルス弱毒化および誘導または保護免疫応答は、本明細書に開示される方法およびアッセイが挙げられるがこれらに限定されない、当業者に周知のやり方で確認され得る。非限定的な例としては、プラークアッセイ、増殖測定、試験動物における致死の低減、および野生型ウイルスによるその後の感染からの保護が挙げられる。

【0120】

様々な態様において、本発明は、高度に弱毒化されており、かつ複数の Deng 型および/またはサブタイプに対して免疫を誘導する、ウイルスを提供する。そのような Deng ウイルスの種類としては、血清群1、2、3、および4のウイルスが挙げられる。弱毒化され

50

た Deng タンパク質 コーディング 配列 の例 が以下に 提供 される。

【 0 1 2 1 】

(表 4) 発現低減 Deng ウイルス 遺伝子

遺伝子	WT コーディング配列 SEQ ID NO:	再コードされたコーディング配列 SEQ ID NO:
DENV1-WT	1	
DENV1-E-Min		2
DENV2-WT	3	
DENV2-E-Min		4
DENV3-WT	5	
DENV3-E-Min		6
DENV4-WT	7	
DENV4-E-Min		8
DENV1-E-W/Min		9
DENV2-E-W/Min		10
DENV3-E-W/Min		11
DENV4-E-W/Min		12

10

【 0 1 2 2 】

組成物

20

様々な態様は、本明細書に記載されるような本発明の改変型フラビウイルスを含む、対象において免疫応答を誘導するためのフラビウイルス組成物を提供する。

【 0 1 2 3 】

様々な態様は、本明細書に記載されるような本発明の改変型フラビウイルスを含む、対象において保護免疫応答を誘導するためのフラビウイルスワクチン組成物を提供する。

【 0 1 2 4 】

様々な態様は、本明細書において上記されるような本発明の改変型 Deng ウイルスと、薬学的に許容される賦形剤または担体とを含む、対象において免疫応答を誘導するための改変型 Deng ウイルス組成物を提供する。

【 0 1 2 5 】

30

様々な態様は、本明細書において上記されるような本発明の改変型 Deng ウイルスと、薬学的に許容される賦形剤または担体とを含む、対象において保護免疫応答を誘導するための Deng ワクチン組成物を提供する。

【 0 1 2 6 】

様々な態様において、改変型 Deng ウイルスは、1 型、2 型、3 型、4 型またはこれらの組合せから選択される。

【 0 1 2 7 】

様々な態様において、改変型 Deng ウイルスは、1 型および 2 型改変型 Deng ウイルス；1 型および 3 型改変型 Deng ウイルス；1 型および 4 型改変型 Deng ウイルス；2 型および 3 型改変型 Deng ウイルス；2 型および 4 型改変型 Deng ウイルス；3 型および 4 型改変型 Deng ウイルスである。

40

【 0 1 2 8 】

様々な態様において、改変型 Deng ウイルスは、1 型、2 型および 3 型改変型 Deng ウイルス；1 型、2 型および 4 型改変型 Deng ウイルス；1 型、3 型および 4 型改変型 Deng ウイルス；または 2 型、3 型および 4 型改変型 Deng ウイルスである。

【 0 1 2 9 】

様々な態様において、改変型 Deng ウイルスは改変型四価 Deng ウイルス；（1 型、2 型、3 型および 4 型）。

【 0 1 3 0 】

野生型および改変型 Deng ウイルスの非限定的な例が、本明細書に記載される。

50

【 0 1 3 1 】

SEQ ID NO:1 – DENV-1-VN-BID-V1774-2007(WT)

AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAGAACAGTTTCGAATCGGAAGCTTGCTTAACGTAGTTCT
AACAGTTTTTTTATTAGAGAGCAGATCTCTGATGAACAACCAACGGAAAAAGACGGCTCGACCG
TCTTTCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCGCGTGTCAACTGTTTCACAGTTGGCGAAGAGA
TTCTCAAAAGGATTGCTCTCAGGCCAAGGACCCATGAAATTGGTGATGGCTTTTCATAGCATTCC
TAAGATTTCTAGCCATACCCCCAACAGCAGGAATTTTGGCTAGATGGGGTTCATTCAAGAAGA
GTGGAGCGATCAAAGTGCTACGGGGTTTCAAGAAAGAAATCTCAAACATGTTGAATATAATGA
ATAGAAGGAAAAGATCTGTGACCATGCTCCTTATGCTGATGCCTACAGCCTTGGCGTTCCATTT
GACTACACGAGGGGGAGAGCCGCACATGATAGTCAGCAAGCAGGAAAAGAGGAAAGTCACTCT
TGTTTAAGACCTCAGCAGGTGTCAACATGTGCACCCTTATAGCGATGGATTTGGGAGAGTTATG
TGAGGACACAATGACTTACAAATGCCCTCGAATCACTGAAACTGAACCAGATGACGTTGATTG
TTGGTGTAATGCCACAGACACATGGGTGACCTATGGAACATGTTCCCAAACCTGGCGAGCACCG
ACGAGACAAACGTTCCGTCGCACTGGCCCCACACGTGGGACTTGTTTGGAAACAAGAACCGA

10

20

30

40

50

AACGTGGATGTCCTCTGAAGGCGCTTGGAAACAGATACAAAGAGTGGAGACTTGGGCCCTGA
GACACCCAGGATTCACGGTGATAGCCCTTTTTCTAGCACATGCCATAGGAACATCCATCACCC
AGAAAGGGATTATTTTCATTTTGTTAATGCTGGTAACACCATCCATGGCCATGCGATGCGTGGG
AATAGGCAGCAGGGACTTCGTGGAAGGACTGTCAGGAGCAACTTGGGTAGATGTGGTACTGG
AACATGGAAGTTGCGTCACCACCATGGCAAAAGACAAACCAACATTGGACATTGAACTCTTGA
AGACGGAAGTCACAAACCCTGCCGTCCTGCGCAAACTGTGCATTGAAGCTAAAATATCAAACA
CCACCACCGACTCAAGATGTCCAACACAAGGAGAAGCCACACTAGTGGAGAACAAGACGCG
AACTTTGTGTGTCGACGAACGTTTGTGGACAGAGGCTGGGGCAATGGCTGTGGCCTCTTCGGA
AAAGGAAGCCTAATAACGTGTGCAAAGTTCAAGTGTGTGACAAAACCTGGAAGGAAAGATAGT
TCAATATGAGAACTTGAATATTTCAGTAATAGTCACCGTTCACACCGGAGACCAGCATCAAGT
GGGAAATGAAAGCACAGAACATGGGACAACCTGCAACTATAACACCTCAAGCTCCTACGACGG
AAATACAGCTGACCGACTACGGAGCTCTTACATTGGATTGTTACCTAGAACAGGACTAGACT
TTAATGAAATGGTGTGTGTTGACAATGAAAGAAAAATCATGGCTAGTCCACAAACAATGGTTTT
TAGACCTACCACTGCCTTGGACCTCGGGAGCTTCAACATCACAAGAGACTTGGAACAGACAAG
ATTTGCTGGTGACATTTAAGACAGCTCATGCAAAGAAGCAGGAAGTAGTCGTACTAGGATCAC
AAGAAGGAGCAATGCACACTGCGTTGACCGGAGCGACAGAAATCCAAACGTCTGGAACGACA
ACAATTTTTGCAGGACACTTGAAATGCAGACTAAAGATGGACAAACTGACTCTAAAAGGGATG
TCATATGTGATGTGCACAGGCTCATTCAAGCTAGAGAAAGAAGTGGCTGAGACCCAGCATGGA
ACCGTTCTAGTGCAGATTAAATACGAAGGAACAGATGCACCATGCAAGATCCCTTTTTTCGACC
CAAGATGAAAAAGGAGTAACCCAGAATGGGAGATTGATAACAGCTAACCCCATAGTTACTGA
CAAAGAAAAACCAGTCAACATTGAGGCAGAACCGCCCTTTGGTGAGAGTTACATCGTAATAGG
AGCAGGTGAAAAAGCTTTGAACTAAGCTGGTTCAAGAAAGGAAGCAGCATAGGGAAAATGT
TTGAGGCAACTGCCAGAGGAGCACGAAGGATGGCCATACTGGGAGACACCGCATGGGACTTT
GGTTCATATAGGAGGAGTGTTACGTCGTGTGGAAAATTAGTACACCAGATTTTTGGAACTGCAT
ATGGAGTTTTTGTTCAGCGGTGTTTCCTGGACCATGAAAATAGGAATAGGGGTTCTGCTGACATG
GCTGGGATTAACTCAAGGAGCACGTCCCTTTTCGATGACGTGCATTGCAGTTGGCCTAGTAAC
ACTATACCTAGGAGTCATGGTTCAGGCGGATTTCAGGATGTGTAATTAATTGGAAAGGTAGAGA
ACTCAAGTGTGGAAGTGGCATTTTTGTACCAATGAAGTTCACACTTGGACAGAGCAATACAA
ATTTCAAGCTGACTCCCCTAAGAGACTATCAGCAGCCATCGGGAAGGCATGGGAGGAGGGTGT
GTGTGGAATTCGATCAGCAACTCGTCTCGAGAACATCATGTGGAAGCAAATATCAAATGAACT
GAATCACATCTTACTTGAAAATGATATGAAATTCACAGTGGTTGTAGGAGATGTTGCTGGGAT
CTTGGCTCAAGGAAAGAAAATGATTAGGCCACAACCCATGGAATACAAATACTCGTGGA
GCTGGGGAAAGGCTAAAATCATAGGGGCAGATGTACAGAACACCACCTTCATCATCGATGGCC
CAAACACCCCAGAATGCCCTGATGACCAAAGAGCATGGAACATTTGGGAAGTTGAGGACTAT
GGATTTGGAATTTTCACGACAAACATATGGCTGAAATTGCGTGATTCTACACCCAAGTGTGTG
ACCACCGGCTAATGTCAGCTGCCATCAAGGACAGCAAGGCAGTTCACGCTGACATGGGGTACT
GGATAGAAAGTGAAAAGAACGAGACCTGGAAGCTGGCAAGAGCCTCATTCATAGAAGTTAAA

10

20

30

40

50

ACATGTATCTGGCCAAAATCCCACACTCTATGGAGCAATGGAGTTCTGGAAAGTGAAATGATA
ATTCCAAAGATCTATGGAGGACCAATATCTCAGCACAACTACAGACCAGGATATTTTACACAA
GCAGCAGGGCCGTGGCACCTAGGCAAGTTGGAAGTGGATTTTGATTTGTGTGAGGGTACCACA
GTTGTTGTGGATGAACATTGTGGAAATCGAGGACCATCTCTTAGGACCACAACAGTCACAGGA
AAGATAATTCATGAATGGTGTTCAGATCTTGCACGCTACCACCCTTACGTTTCAGAGGAGAA
GATGGGTGCTGGTACGGTATGGAAATCAGACCAGTCAAGGAAAAAGGAAGAAAATCTAGTCAA
ATCAATGGTCTCTGCAGGGTCAGGGGAAGTGGACAGCTTTTCACTAGGACTGCTATGCATATC
AATAATGATCGAGGAGGTGATGAGATCCAGATGGAGTAGAAGAATGCTGATGACTGGAACAC
TGGCTGTGTTCTTCCTTCTCATAATGGGACAATTGACATGGAACGATCTGATCAGATTATGCAT
CATGGTTGGAGCCAACGCTTCCGACAGGATGGGGATGGGAACGACGTACCTAGCCCTGATGGC
CACTTTTAAAAATGAGACCGATGTTTCGCTGTAGGGCTATTATTTTCGAGACTAACATCCAGAGAA
GTTCTTCTTCTAACAATTGGATTGAGTCTAGTGGCATCTGTGGAGTTACCAAATTCCTTGGAGG
AGCTGGGGGGATGGACTTGCAATGGGCATTATGATTTTAAAAATTATGACTGACTTTCAATCACA
TCAGCTGTGGGCTACCTTGCTGTCTTGACATTTATCAAAACAACGTTTTCTTGCACTACGCAT
GGAAGACAATGGCTATGGTACTGTCAATTGTATCTCTCTTCCCTTTATGCCTGTCCACGACCTC
CCAAAAACAACATGGCTTCCGGTGCTATTGGGATCCCTTGGATGCAAACCACTAACCATGTTT
CTTATAGCAGAAAAACAAAATCTGGGGAAGGAGAAGTTGGCCCCCTCAATGAAGGAATCATGGC
TGTTGGAATAGTCAGCATCCTACTAAGTTCACTCCTCAAAAAATGATGTACCGCTAGCTGGGCCA
CTAATAGCTGGAGGCATGCTAATAGCATGTTATGTTATATCTGGAAGCTCAGCCGACCTATCAT
TAGAGAAAGCGGCTGAGGTCTCCTGGGAAGAAGAAGCAGAACACTCTGGTGCCCTCACACAAC
ATATTAGTGGAAGTCCAAGATGATGGAACCATGAAGATAAAGGATGAAGAGAGAGATGACAC
GCTAACCATTCTCCTTAAAGCAACTCTGTTAGCAGTTTCAGGGGTGTACCCATTATCAATACCA
GCGACCCCTTTTCGTGTGGTACTTTTGGCAGAAAAAGAAAACAGAGATCTGGAGTGTTATGGGAC
ACACCCAGCCCTCCAGAAGTGGAAGAGCAGTTCTTGATGATGGTATCTATAGAATTATGCAG
AGAGGACTGTTGGGCAGGTCCCAAGTAGGGGTAGGAGTTTTCCAAGAAAAACGTGTTCCACACA
ATGTGGCATGTCACCAGGGGAGCTGTACTCATGTATCAAGGGAAGAGATTGGAACCGAGCTGG
GCCAGTGTCAAAAAAGACCTGATCTCATATGGAGGAGGTTGGAGGCTTCAAGGATCCTGGAAC
ACAGGAGAAGAAGTGCAGGTGATTGCTGTTGAACCAGGGAAAAACCCCAAAAATGTACAAAC
AGCGCCGGGCACCTTTAAGACCCCTGAAGGTGAAGTTGGAGCCATTGCCCTAGACTTTAAACC
TGGCACATCTGGATCTCCCATCGTGAACAGAGAAGGAAAAATAGTAGGTCTTTATGGAAATGG
AGTAGTGACAACAAGTGAACCTACGTCAGTGCCATAGCTCAAGCCAAAGCATCACAAGAAG
GGCCCTACCAGAGATTGAAGACGAGGTGTTTAGGAAAAGAACTTAACAATAATGGACCTA
CATCCAGGATCGGGGAAAAACAAGAAGATATCTTCCAGCCATAGTCCGTGAGGCCATAAAAAAG
GAAGCTGCGCACACTAATCCTGGCTCCCAAGGGTTGTGCGCTCCGAAATGGCAGAGGCGCT
CAAGGGAATGCCAATAAGGTACCAACAACAGCAGTGAAGAGTGAACATACAGGAAAAGAG
ATAGTTGACCTCATGTGTACGCCACTTTACCATGCGCCTCCTGTCTCCCGTAAGAGTTCCCA
ATTACAACATGATCATCATGGATGAAGCACATTTACCGATCCATCCAGTATAGCGGCCAGAG

10

20

30

40

50

GGTACATCTCAACCCGAGTGGGCATGGGTGAAGCAGCTGCAATCTTCATGACAGCCACTCCCC
CAGGATCAGTGGAGGCCTTTCCACAGAGCAACGCAGTTATCCAAGATGAGGAAAGAGACATT
CCTGAGAGATCATGGAACCTCAGGCTATGAGTGGATCACTGACTTCCCAGGTAAAACAGTTTGG
TTTGTTCGAAGCATTAAATCAGGAAATGACATTGCCAACTGCTTAAGAAAGAATGGGAAACGG
GTGATTCAATTGAGCAGGAAAACCTTTGATACAGAGTACCAAAAAACAAAAACAACGACTG
GGACTACGTCGTCACAACAGACATCTCCGAAATGGGAGCAAATTTCCGAGCCGACAGGGTGAT
AGACCCAAGACGGTGTCTGAAACCGGTAAATACTAAAAGATGGTCCAGAGCGTGTCAATTTTAGC
AGGACCAATGCCAGTGAAGTGTGGCCAGTGGCGCTCAGAGGAGAGGAAGAATTGGAAGGAACC
ACAATAAGGAAGGTGATCAGTACATCTACATGGGACAGCCTTTAAACAACGATGAAGATCAC
GCTCACTGGACAGAAGCAAAAATGCTCCTTGATAATATAAACACACCAGAAGGGATTATCCCA
GCCCTCTTTGAGCCAGAGAGAGAAAAGAGTGCAGCAATAGACGGGGAATACAGACTGCGGGG
TGAAGCAAGGAAAACGTTTGTGGAGCTCATGAGAAGAGGAGATCTACCTGTCTGGCTATCCTA
CAAAGTTGCCCTCAGAAGGCTTCCAGTACTCTGACAGAAGATGGTGCTTTGACGGGGAAAGGAA
CAACCAGGTGTTGGAGGAGAACATGGACGTGGAGATCTGGACAAAAGAAGGAGAAAGAAAG
AAACTACGACCCCGCTGGCTGGATGCCAGAACATACTCAGACCCACTAGCCCTGCGCGAGTTT
AAAGAGTTTGCAGCAGGGAGAAGAAGCGTCTCAGGTGATTTAATATTAGAAATAGGGAAAGCT
TCCACAACACTTGACGCAAAGGGGCCAGAATGCCCTGGACAACCTGGTTATGTTGCACAACCTC
CGAACAAGGAGGCAGAGCCTATAGACATGCAATGGAAGAACTGCCAGACACCATAGAAACGT
TGATGCTCCTAGCTTTGATAGCTGTGTAACTGGTGGAGTGACACTGTTCTTCTATCAGGAAG
GGGCCTAGGGAAAACATCTATCGGCCTACTCTGCGTAATGGCTTCAAGCGTACTGCTATGGAT
GGCCAGTGTGGAGCCCCATTGGATAGCGGCCTCCATCATACTGGAGTTCTTCTGATGGTGCTG
CTTATTCCAGAGCCAGACAGACAACGCCTCCGCAGGACAACCAGCTGGCATATGTGGTGATA
GGTTTGTATTTCATGATACTGACAGTAGCAGCCAATGAGATGGGACTGCTGGAAACCACAAAG
AAAGACTTAGGGATTGGCCATGTGGCTGTTGAAAATCACCACCATGCCGCAATGCTGGACGTA
GACTTACATCCAGCTTCAGCCTGGACCTCTATGCAGTGGCCACAACAATTATCACTCCCATGA
TGAGGCACACAATCGAAAACACAACGGCAAACATTTCCCTGACAGCCATTGCAAACCAGGCA
GCTATATTGATGGGACTTGACAAAGGATGGCCAATATCGAAGATGGACATAGGAGTTCCACTT
CTCGCCTTGGGGTGCTATTCCCAGGTGAATCCACTGACGCTGACAGCGGCGGTATTGATGCTAG
TGGCTCATTACGCCATAATTGGACCTGGACTGCAAGCAAAAGCTACTAGAGAAGCTCAAAAAA
GGACAGCGGCCGGAATAATGAAAAATCCAACCGTTGATGGAATTGTTGCAATAGATTTGGACC
CTGTGGTTTATGATGCAAAATTTGAAAAACAACCTAGGCCAAATAATGTTGTTGATACTATGCAC
ATCACAGATCCTCTTGATGCGGACTACATGGGCCTTGTGCGAGTCCATCACAACCTGGCCACTGG
ACCTCTGACCACGCTTTGGGAGGGATCTCCAGGAAAATTTTGAACACCACGATAGCGGTTTC
CATGGCAAACATTTTCAGAGGAAGTTATCTAGCAGGAGCAGGTCTGGCCTTCTCATTAAATGAA
ATCTCTAGGAGGAGGTAGGAGAGGCACGGGAGCCCAAGGGGAAACACTGGGAGAGAAATGG
AAAAGACAGCTGAACCAACTGAGCAAGTCAGAATTTAACACCTATAAAAGGAGTGGGATTAT
GGAAGTGGACAGATCCGAAGCCAAAGAGGGATTGAAAAGAGGAGAAACAACCAACATGCA

10

20

30

40

50

GTGTCGAGAGGAACCGCTAAACTGAGGTGGTTCGTGGAGAGGAACCTTGTGAAACCAGAAGG
GAAAGTCATAGACCTCGGTTGTGGAAGAGGTGGCTGGTCATACTATTGCGCTGGGCTGAAGAA
AGTCACAGAAGTGAAGGGGTATACAAAAGGAGGACCTGGACATGAGGAACCAATCCCAATGG
CGACCTATGGATGGAACCTAGTAAAGCTGCACTCTGGGAAAGACGTATTTTTTATACCACCTG
AGAAATGTGACACCCTTTTGTGTGATATTGGTGAGTCCTCTCCAAACCAACTATAGAGGAAG
GAAGAACGCTACGCGTCCTAAAGATGGTGGAACCATGGCTCAGAGGAAAACCAATTTTGCATAA
AAATTCTGAATCCCTACATGCCAAGTGTGGTGGAACCTCTGGAGCAAATGCAAAGAAAACATG
GAGGAATGCTAGTGCGAAATCCACTTTCAAGAAATTCTACTCATGAAATGTATTGGGTTTCATG
TGGAACAGGAAACATTGTGTGCAGCAGTAAACATGACATCTAGAATGTTGCTAAATCGATTAC
AATGGCTCACAGGAAACCAACATATGAAAGAGACGTGGACCTAGGCGCCGGAACAAGACATG
TGGCAGTGGAACCAGAGGTAGCCAACCTAGATATCATTGGCCAGAGGATAGAGAACATAAAA
CATGAACATAAGTCAACATGGCATTATGATGAGGACAATCCATATAAAACATGGGCCTATCAT
GGATCATATGAGGTCAAGCCATCAGGATCAGCCTCATCCATGGTCAATGGCGTGGTGAAACTG
CTCACAAACCATGGGATGTCATCCCTATGGTCACACAAATAGCCATGACTGACACTACACCC
TTTGGACAACAGAGGGTGTTTAAAGAGAAAAGTTGACACACGCACACCAAAAAGCAAAACGGGG
CACAGCACAAATCATGGAGGTGACAGCCAAGTGGTTATGGGGTTTTCTTTCTAGAAACAAGAA
ACCAAGAATTTGCACAAGAGAGGAGTTTCAAGAAAAGTTAGGTCAAACGCAGCCATTGGAG
CAGTGTTCTGTTGATGAAAAATCAATGGAACCTCAGCAAAAGAAGCAGTGGAAGATGAGCGTTCT
GGGACCTTGTGCATAGAGAGAGGGAGCTTCACAAACAGGGAAAATGTGCTACGTGTGTTTACA
ACATGATGGGGAAGAGAGAGAAAAAGCTAGGAGAGTTCGGAAAGGCAAAAGGAAGTCGTGC
AATATGGTACATGTGGTTGGGAGCACGCTTTCTAGAGTTCGAAGCTCTTGGTTTCATGAACGAA
GATCACTGGTTCAGCAGAGAGAATTCCTCAGCGGAGTGGAAGGAGAAGGACTCCACAAACT
TGGATATATACTCAGAGACATATCAAAGATTCCAGGGGGAAACATGTATGCAGATGACACAGC
CGGATGGGATACAAGGATAACAGAGGATGACCTTCAGAATGAGGCCAGAATTACTGACATCA
TGGAACCCGAACATGCCCTCCTGGCTAAGTCAATCTTCAAGTTAACCTACCAAAAATAAGGTGG
TAAGGGTACAGAGACCAGCAAAAAATGGAACCGTGATGGATGTCATATCCAGACGTGACCAG
AGAGGAAGTGGTCAGGTTCGGAACCTTATGGCTTAAACACTTTTACCAACATGGAAGCCCAGCTG
ATAAGACAAATGGAGTCTGAGGGAATCTTTTACCCAGCGAATTAGAGACCCCAAATTTAGCC
GAGAGAGTTCTCGACTGGCTGGAAAAATATGGCGTCGAAAGGCTGAAAAGAATGGCAATCAG
CGGAGATGACTGCGTAGTGAAACCAATTGATGATAGGTTTGCAACAGCCTTGACAGCTCTGAA
TGATATGGGAAAAGTAAGAAAAGATATACCACAATGGGAACCTTCAAAAGGATGGAATGATT
GGCAACAAGTGCCTTTTTGTTCACACCACTTCCACCAGCTGATTATGAAGGATGGGAGGGAAA
TAGTGGTGCCATGCCGCAACCAAGATGAACTTGTGGGTAGGGCTAGAGTATCACAAGGTGCTG
GATGGAGCCTGAGAGAAACTGCATGCCTAGGCAAGTCATATGCACAAATGTGGCAGCTGATGT
ACTTCCACAGGAGAGACCTGAGACTAGCCGCTAATGCTATCTGTTTCAGCCGTTCCAGTTGATTG
GATCCCAACCAGCCGTACCACCTGGTCGATCCATGCCCATCACCAATGGATGACAACAGAAGA
CATGCTGTCAGTGTGGAATAGGGTTTGGATAGAGGAAAACCCATGGATGGAGGACAAAACCC

10

20

30

40

50

ACATATCCAGTTGGGGAGATGTTCCATATTTAGGAAAAAGGGAAGACCAATGGTGTGGATCCC
TGATAGGCTTAACAGCAAGGGCCACCTGGGGCCACCAACATACAAGTGGCCATAAACCAAGTG
AGAAGACTAATTGGGAATGAGAATTATCTAGATTACATGACATCAATGAAGAGATTCAAGAAC
GAGAGTGATCCCGAAGGGGCACTCTGGTGAGTCAACACATTTACAAAATAAAGGAAAAATAAG
AAATCAAACAAGGCAAGAAGTCAGGCCGGATTAAGCCATAGTACGGTAAGAGCTATGCTGCC
TGTGAGCCCCGTCTAAGGACGTAAAATGAAGTCAGGCCGAAAGCCACGGCTTGAGCAAAACCG
TGCTGCCTGTAGCTCCATCGTGGGGATGTAAAAACCTGGGAGGCTGCAACCCATGGAAGCTGT
ACGCATGGGGTAGCAGACTAGTGGTTAGAGGAGACCCCTCCCGAAACATAACGCAGCAGCGG
GGCCCAACACCAGGGGAAGCTGTACCCTGGTGGTAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCCC
GCATAACAATAAACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCTACAGCAT
CATTCCAGGCACAGAACGCCAGAAAATGGAATGGTGCTGTTGAATCAACAGGTTCT

10

SEQ ID NO:2 – DENV-1-VN-BID-V1774-2007-EMin

AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAGAACAGTTTTCGAATCGGAAGCTTGCTTAACGTAGTTCT
AACAGTTTTTTATTAGAGAGCAGATCTCTGATGAACAACCAACGGAAAAAGACGGCTCGACCG
TCTTTCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCGCGTGTCAACTGTTTCACAGTTGGCGAAGAGA
TTCTCAAAAGGATTGCTCTCAGGCCAAGGACCCATGAAATTGGTGATGGCTTTCATAGCATTCC
TAAGATTTCTAGCCATACCCCCAACAGCAGGAATTTTGGCTAGATGGGGTTCATTCAAGAAGA
GTGGAGCGATCAAAGTGCTACGGGGTTTCAAGAAAGAAATCTCAAACATGTTGAATATAATGA
ATAGAAGGAAAAGATCTGTGACCATGCTCCTTATGCTGATGCCTACAGCCTTGGCGTTCCATTT
GACTACACGAGGGGGAGAGCCGCACATGATAGTCAGCAAGCAGGAAAGAGGAAAGTCACTCT
TGTTTAAGACCTCAGCAGGTGTCAACATGTGCACCCCTTATAGCGATGGATTTGGGAGAGTTATG
TGAGGACACAATGACTTACAAATGCCCTCGAATCACTGAAACTGAACCAGATGACGTTGATTG
TTGGTGTAATGCCACAGACACATGGGTGACCTATGGAACATGTTCCCAAACCTGGCGAGCACCG
ACGAGACAAACGTTCCGTCGCACTGGCCCCACACGTGGGACTTGGTTTGGAAACAAGAACCGA
AACGTGGATGTCCTCTGAAGGCGCTTGGAACAGATACAAAGAGTGGAGACTTGGGCCCTGA
GACACCCAGGATTACGGTGATAGCCCTTTTCTAGCACATGCCATAGGAACATCCATCACCC
AGAAAGGGATTATTTTCATTTTGTAAATGCTGGTAACACCATCCATGGCCATGCGATGCGTAGG
GATAGGGTCACGCGATTTTCGTGCAAGGACTATCCGGAGCGACATGGGTGACGTCGTAAGTGA
ACACGGATCATGCGTTACGACTATGGCTAAAGACAAACCTACACTAGACATAGAGTTACTGAA
AACCGAAGTTACGAATCCCGCCGTACTGCGAAAATTGTGTATCGAAGCGAAAATTAGCAATAC
GACTACAGACTCTAGGTGTCCTACACAAGGCGAAGCGACATTGGTTCGAAGAACAGGACGCTA
ACTTCGTATGTAGACGAACATTCGTCGATAGGGGGTGGGGAAACGGATGCGGATTGTTGCGTA
AAGGATCACTGATTACATGCGCAAAGTTCAAATGCGTTACGAAACTGGAAGGTAAAATAGTGC
AATACGAAAACCTAAAGTATAGCGTAATCGTTACAGTGCATACCGGAGACCAACATCAGGTGCG
GAAACGAATCAACCGAACACGGAACAACCGCAACAATTACACCACAGGCACCTACAACCGAA
ATTCAACTAACCGATTACGGAGCTTTACACTAGATTGCTCACCTAGAACCGGATTGGACTTTA

20

30

40

50

ACGAAATGGTACTGTTGACTATGAAGGAGAAATCATGGTTAGTGCATAAACAATGGTTTCTAG
ACCTACCACTACCATGGACTAGCGGAGCGAGTACGTCACAGGAAACATGGAATAGACAGGAC
CTATTGGTGACATTTAAGACCCGCACACGCTAAGAAGCAGGAAGTCGTAGTGTAGGGTCACAA
GAGGGAGCAATGCATACCGCACTAACCGGAGCAACCGAAATACAGACTAGCGGAACTACAAC
GATTTTTGCCGGTCACTGAAATGTAGACTGAAGATGGACAACTGACACTTAAAGGAATGTC
ATACGTTATGTGTACGGGATCCTTTAAGCTCGAAAAAGAGGTTGCCGAAACGCAACACGGAAC
AGTGCTAGTGCAAATTAATATGAGGGAACCGACGCACCATGTAAGATACCGTTTAGTACGCA
AGACGAAAAGGGCGTTACGCAAAAACGGAAGACTGATTACCGCTAACCCATCGTTACAGACA
AAGAGAAACCCGTTAACATAGAGGCCGAACCACCTTTTGGCGAATCATATATAGTGATAGGCG
CAGGCGAAAAAGCACTAAAGCTGTCTATGGTTCAAAAAAGGATCTAGCATAGGGAAGATGTTT
GAAGCAACCGCTAGGGGAGCTAGACGAATGGCAATACTGGGAGATACCGCATGGGACTTCGG
ATCGATAGGGGGAGTGTTTACTAGCGTAGGTAAGTTGGTGCATCAGATATTCGGAACCGCATA
CGGAGTGTGTTTAGCGGAGTGTCTATGGACTATGAAGATAGGGATAGGAGTGCTATTGACATG
GCTCGGACTGAATTCGAGATCGACTAGCCTATCTATGACATGCATAGCCGTCGGACTGGTTAC
ACTGTATCTAGGCGTAATGGTGCAAGCAGATTCCAGGATGTGTAATTAATTGGAAAGGTAGAGA
ACTCAAGTGTGGAAGTGGCATTTTTGTCAACCAATGAAGTTCACACTTGGACAGAGCAATACAA
ATTTCAAGCTGACTCCCCCTAAGAGACTATCAGCAGCCATCGGGAAGGCATGGGAGGAGGGTGT
GTGTGGAATTCGATCAGCAACTCGTCTCGAGAACATCATGTGGAAGCAAATATCAAATGAACT
GAATCACATCTTACTTGAAAAATGATATGAAATTCACAGTGGTTGTAGGAGATGTTGCTGGGAT
CTTGGCTCAAGGAAAGAAAATGATTAGGCCACAACCCATGGAATACAAATACTCGTGGA
GCTGGGGAAAGGCTAAAATCATAGGGGCAGATGTACAGAACACCACCTTCATCATCGATGGCC
CAAACACCCCAGAATGCCCTGATGACCAAAGAGCATGGAACATTTGGGAAGTTGAGGACTAT
GGATTTGGAATTTTACGACAAAATATGGCTGAAATTGCGTGATTCTTACACCCAAGTGTGTG
ACCACCGGCTAATGTCAGCTGCCATCAAGGACAGCAAGGCAGTTCACGCTGACATGGGGTACT
GGATAGAAAGTGAAAAGAACGAGACCTGGAAGCTGGCAAGAGCCTCATTCATAGAAGTTAAA
ACATGTATCTGGCCAAAATCCCACACTCTATGGAGCAATGGAGTTCTGGAAAGTGAAATGATA
ATTCAAAAGATCTATGGAGGACCAATATCTCAGCACAACCTACAGACCAGGATATTTTACACAA
GCAGCAGGGCCGTGGCACCTAGGCAAGTTGGAAGTGGATTTTGTGTTGTGAGGGTACCACA
GTTGTTGTGGATGAACATTGTGGAAATCGAGGACCATCTCTTAGGACCACAACAGTCACAGGA
AAGATAATTCATGAATGGTGTTCAGATCTTGACACGCTACCAACCTTACGTTTCAGAGGAGAA
GATGGGTGCTGGTACGGTATGGAAATCAGACCAGTCAAGGAAAAGGAAGAAAATCTAGTCAA
ATCAATGGTCTCTGCAGGGTCAGGGGAAGTGGACAGCTTTTCACTAGGACTGCTATGCATATC
AATAATGATCGAGGAGGTGATGAGATCCAGATGGAGTAGAAGAATGCTGATGACTGGAACAC
TGGCTGTGTTCTTCTCTCATAATGGGACAATTGACATGGAACGATCTGATCAGATTATGCAT
CATGGTTGGAGCCAACGCTTCCGACAGGATGGGGATGGGAACGACGTACCTAGCCCTGATGGC
CACTTTTAAAAATGAGACCGATGTTTCGCTGTAGGGCTATTATTTTCGAGACTAACATCCAGAGAA
GTTCTTCTTCTAACAATTGGATTGAGTCTAGTGGCATCTGTGGAGTTACCAAATTCCTTGGAGG

10

20

30

40

50

AGCTGGGGGATGGACTTGCAATGGGCATTATGATTTTAAAATTATTGACTGACTTTCAATCACA
TCAGCTGTGGGCTACCTTGCTGTCTTGACATTTATCAAAACAACGTTTTCTTGCACTACGCAT
GGAAGACAATGGCTATGGTACTGTCAATTGTATCTCTCTTCCCTTTATGCCTGTCCACGACCTC
CCAAAAACAACATGGCTTCCGGTGCTATTGGGATCCCTTGATGCAAACCACTAACCATGTTT
CTTATAGCAGAAAACAAAATCTGGGGAAGGAGAAGTTGGCCCCCTCAATGAAGGAATCATGGC
TGTTGGAATAGTCAGCATCCTACTAAGTTCACCTCTCAAAAATGATGTACCGCTAGCTGGGCCA
CTAATAGCTGGAGGCATGCTAATAGCATGTTATGTTATATCTGGAAGCTCAGCCGACCTATCAT
TAGAGAAAGCGGCTGAGGTCTCCTGGGAAGAAGAAGCAGAACACTCTGGTGCCTCACACAAC
ATATTAGTGGAAGTCCAAGATGATGGAACCATGAAGATAAAGGATGAAGAGAGAGATGACAC
GCTAACCATTCTCCTTAAAGCAACTCTGTTAGCAGTTTCAGGGGTGTACCCATTATCAATACCA
GCGACCCTTTTCTGTGGTACTTTTGGCAGAAAAAGAAAACAGAGATCTGGAGTGTTATGGGAC
ACACCCAGCCCTCCAGAAGTGGAAGAGCAGTTCTTGATGATGGTATCTATAGAATTATGCAG
AGAGGACTGTTGGGCAGGTCCCAAGTAGGGGTAGGAGTTTTCCAAGAAAAACGTGTTCCACACA
ATGTGGCATGTCACCAGGGGAGCTGTACTCATGTATCAAGGGAAGAGATTGGAACCGAGCTGG
GCCAGTGTCAAAAAGACCTGATCTCATATGGAGGAGGTTGGAGGCTTCAAGGATCCTGGAAC
ACAGGAGAAGAAGTGCAGGTGATTGCTGTTGAACCAGGGAAAAACCCCAAAATGTACAAAC
AGCGCCGGGCACCTTTAAGACCCCTGAAGGTGAAGTTGGAGCCATTGCCCTAGACTTTAAACC
TGGCACATCTGGATCTCCCATCGTGAACAGAGAAGGAAAAATAGTAGGTCTTTATGGAAATGG
AGTAGTGACAACAAGTGGAACCTACGTCAGTGCCATAGCTCAAGCCAAAGCATCACAGAAG
GGCCCTACCAGAGATTGAAGACGAGGTGTTTAGGAAAAGAACTTAACAATAATGGACCTA
CATCCAGGATCGGGGAAAACAAGAAGATATCTTCCAGCCATAGTCCGTGAGGCCATAAAAAG
GAAGCTGCGCACACTAATCCTGGCTCCCAAGGGTTGTCGCTTCCGAAATGGCAGAGGCGCT
CAAGGGAATGCCAATAAGGTACCAACAACAGCAGTGAAGAGTGAACATACAGGAAAAGAG
ATAGTTGACCTCATGTGTACGCCACTTTACCATGCGCCTCCTGTCTCCCGTAAGAGTTCCCA
ATTACAACATGATCATCATGGATGAAGCACATTTACCGATCCATCCAGTATAGCGGCCAGAG
GGTACATCTCAACCCGAGTGGGCATGGGTGAAGCAGCTGCAATCTTCATGACAGCCACTCCCC
CAGGATCAGTGGAGGCCTTTCCACAGAGCAACGCAGTTATCCAAGATGAGGAAAAGAGACATT
CCTGAGAGATCATGGAACCTCAGGCTATGAGTGGATCACTGACTTCCCAGGTAAAACAGTTTGG
TTTGTTCGAAGCATTAAATCAGGAAATGACATTGCCAACTGCTTAAGAAAGAATGGGAAACGG
GTGATTCAATTGAGCAGGAAAACCTTTGATACAGAGTACCAAAAAACAAAAACAACGACTG
GGACTACGTCGTCAACAACAGACATCTCCGAAATGGGAGCAAATTTCCGAGCCGACAGGGTGAT
AGACCCAAGACGGTGTCTGAAACCGGTAATACTAAAAGATGGTCCAGAGCGTGTCATTTTAGC
AGGACCAATGCCAGTGACTGTGGCCAGTGCCGCTCAGAGGAGAGGAAGAATTGGAAGGAACC
ACAATAAGGAAGGTGATCAGTACATCTACATGGGACAGCCTTTAAACAACGATGAAGATCAC
GCTCACTGGACAGAAGCAAAAATGCTCCTTGATAATATAAACACACCAGAAGGGATTATCCCA
GCCCTCTTTGAGCCAGAGAGAGAAAAGAGTGCAGCAATAGACGGGGAATACAGACTGCGGGG
TGAAGCAAGGAAAACGTTTGTGGAGCTCATGAGAAGAGGAGATCTACCTGTCTGGCTATCCTA

10

20

30

40

50

CAAAGTTGCCTCAGAAGGCTTCCAGTACTCTGACAGAAGATGGTGCTTTGACGGGGAAAGGAA
CAACCAGGTGTTGGAGGAGAACATGGACGTGGAGATCTGGACAAAAGAAGGAGAAAGAAAG
AAACTACGACCCCGCTGGCTGGATGCCAGAACATACTCAGACCCACTAGCCCTGCGCGAGTTT
AAAGAGTTTGCAGCAGGGAGAAGAAGCGTCTCAGGTGATTTAATATTAGAAATAGGGAAGCT
TCCACAACACTTGACGCAAAGGGCCCAGAATGCCCTGGACAACCTGGTTATGTTGCACAACCTC
CGAACAAGGAGGCAGAGCCTATAGACATGCAATGGAAGAACTGCCAGACACCATAGAAACGT
TGATGCTCCTAGCTTTGATAGCTGTGTTAACTGGTGGAGTGACACTGTTCTTCCTATCAGGAAG
GGGCCTAGGGAAAACATCTATCGGCCTACTCTGCGTAATGGCTTCAAGCGTACTGCTATGGAT
GGCCAGTGTGGAGCCCCATTGGATAGCGGCCTCCATCATACTGGAGTTCTTCCTGATGGTGCTG
CTTATTCCAGAGCCAGACAGACAACGCACCTCCGCAGGACAACCAGCTGGCATATGTGGTGATA
GGTTTGTATTTCATGATACTGACAGTAGCAGCCAATGAGATGGGACTGCTGGAAACCACAAAG
AAAGACTTAGGGATTGGCCATGTGGCTGTTGAAAATCACCACCATGCCGCAATGCTGGACGTA
GACTTACATCCAGCTTCAGCCTGGACCTCTATGCAGTGGCCACAACAATTATCACTCCCATGA
TGAGGCACACAATCGAAAACACAACGGCAAACATTTCCCTGACAGCCATTGCAAACCAGGCA
GCTATATTGATGGGACTTGACAAAGGATGGCCAATATCGAAGATGGACATAGGAGTTCCACTT
CTCGCCTTGGGGTGCTATTCCCAGGTGAATCCACTGACGCTGACAGCGGCGGTATTGATGCTAG
TGGCTCATTACGCCATAATTGGACCTGGACTGCAAGCAAAAGCTACTAGAGAAGCTCAAAAAA
GGACAGCGGCCGGAATAATGAAAAATCCAACCGTTGATGGAATTGTTGCAATAGATTTGGACC
CTGTGGTTTATGATGCAAAATTTGAAAAACAACCTAGGCCAAATAATGTTGTTGATACTATGCAC
ATCACAGATCCTCTTGATGCGGACTACATGGGCCTTGTGCGAGTCCATCACACTGGCCACTGG
ACCTCTGACCACGCTTTGGGAGGGATCTCCAGGAAAATTTTGGAACACCACGATAGCGGTTTC
CATGGCAAACATTTTCAGAGGAAGTTATCTAGCAGGAGCAGGTCTGGCCTTCTCATTAAATGAA
ATCTCTAGGAGGAGGTAGGAGAGGCACGGGAGCCCAAGGGGAAACACTGGGAGAGAAATGG
AAAAGACAGCTGAACCAACTGAGCAAGTCAGAATTTAACACCTATAAAAGGAGTGGGATTAT
GGAAGTGGACAGATCCGAAGCCAAAGAGGGATTGAAAAGAGGAGAGAAAACAACCAACATGCA
GTGTCGAGAGGAACCGCTAAACTGAGGTGGTTCGTGGAGAGGAACCTTGTGAAACCAGAAGG
GAAAGTCATAGACCTCGGTTGTGGAAGAGGTGGCTGGTCATACTATTGCGCTGGGCTGAAGAA
AGTCACAGAAGTGAAGGGGTATACAAAAGGAGGACCTGGACATGAGGAACCAATCCCAATGG
CGACCTATGGATGGAACCTAGTAAAGCTGCACTCTGGGAAAGACGTATTTTTTATACCACCTG
AGAAATGTGACACCCTTTTGTGTGATATTGGTGAGTCCTCTCCAAACCAACTATAGAGGAAG
GAAGAACGCTACGCGTCTAAAGATGGTGGAAACCATGGCTCAGAGGAAACCAATTTTGCATAA
AAATTCTGAATCCCTACATGCCAAGTGTGGTGGAACTCTGGAGCAAATGCAAAGAAAACATG
GAGGAATGCTAGTGCAGAAATCCACTTTCAAGAAATTCTACTCATGAAATGTATTGGGTTTCATG
TGGAACAGGAAACATTGTGTGTCAGCAGTAAACATGACATCTAGAATGTTGCTAAATCGATTAC
AATGGCTCACAGGAAACCAACATATGAAAGAGACGTGGACCTAGGCGCCGGAACAAGACATG
TGGCAGTGGAAACCAGAGGTAGCCAACCTAGATATCATTGGCCAGAGGATAGAGAACATAAAA
CATGAACATAAGTCAACATGGCATTATGATGAGGACAATCCATATAAAACATGGGCCTATCAT

10

20

30

40

50

GGATCATATGAGGTCAAGCCATCAGGATCAGCCTCATCCATGGTCAATGGCGTGGTGAACTG
CTCACCAAACCATGGGATGTATCCCTATGGTCACACAAATAGCCATGACTGACACTACACCC
TTTGGACAACAGAGGGTGTTTAAAGAGAAAAGTTGACACACGCACACCAAAAGCAAAACGGGG
CACAGCACAAATCATGGAGGTGACAGCCAAGTGGTTATGGGGTTTTCTTTCTAGAAAACAAGAA
ACCAAGAATTTGCACAAGAGAGGAGTTCACAAGAAAAAGTTAGGTCAAACGCAGCCATTGGAG
CAGTGTTCTGTGATGAAAATCAATGGAACCTCAGCAAAAGAAGCAGTGGAAGATGAGCGGTCT
GGGACCTTGTGCATAGAGAGAGGGAGCTTCACAAACAGGGAAAATGTGCTACGTGTGTTTACA
ACATGATGGGGAAGAGAGAGAAAAAGCTAGGAGAGTTCGGAAAGGCAAAAGGAAGTCGTGC
AATATGGTACATGTGGTTGGGAGCACGCTTTCTAGAGTTCGAAGCTCTTGGTTTCATGAACGAA
GATCACTGGTTCAGCAGAGAGAATTCATCTCAGCGGAGTGGAAGGAGAAGGACTCCACAAACT
TGGATATATACTCAGAGACATATCAAAGATTCCAGGGGGAAACATGTATGCAGATGACACAGC
CGGATGGGATACAAGGATAACAGAGGATGACCTTCAGAATGAGGCCAGAATTACTGACATCA
TGGAACCCGAACATGCCCTCCTGGCTAAGTCAATCTTCAAGTTAACCTACCAAAATAAGGTGG
TAAGGGTACAGAGACCAGCAAAAAATGGAACCGTGATGGATGTCATATCCAGACGTGACCAG
AGAGGAAGTGGTCAGGTTCGGAACCTTATGGCTTAAACACTTTTACCAACATGGAAGCCCAGCTG
ATAAGACAAATGGAGTCTGAGGGAATCTTTTACCCAGCGAATTAGAGACCCCAAATTTAGCC
GAGAGAGTTCTCGACTGGCTGGAAAAATATGGCGTCGAAAGGCTGAAAAGAATGGCAATCAG
CGGAGATGACTGCGTAGTGAAACCAATTGATGATAGGTTTGCAACAGCCTTGACAGCTCTGAA
TGATATGGGAAAAGTAAGAAAAGATATACCACAATGGGAACCTTCAAAAGGATGGAATGATT
GGCAACAAGTGCCTTTTTGTTCACACCACTTCCACCAGCTGATTATGAAGGATGGGAGGGAAA
TAGTGGTGGCATGCCGCAACCAAGATGAACTTGTGGGTAGGGCTAGAGTATCACAAGGTGCTG
GATGGAGCCTGAGAGAACTGCATGCCTAGGCAAGTCATATGCACAAATGTGGCAGCTGATGT
ACTTCCACAGGAGAGACCTGAGACTAGCCGCTAATGCTATCTGTTCAGCCGTTCCAGTTGATTG
GATCCCAACCAGCCGTACCACCTGGTCGATCCATGCCCATCACCAATGGATGACAACAGAAGA
CATGCTGTCTAGTGTGGAATAGGGTTTGGATAGAGGAAAACCCATGGATGGAGGACAAAACCC
ACATATCCAGTTGGGGAGATGTTCCATATTTAGGAAAAAGGGAAGACCAATGGTGTGGATCCC
TGATAGGCTTAACAGCAAGGGCCACCTGGGCCACCAACATACAAGTGGCCATAAACCAAGTG
AGAAGACTAATTGGGAATGAGAATTATCTAGATTACATGACATCAATGAAGAGATTCAAGAAC
GAGAGTGATCCCGAAGGGGCACTCTGGTGAGTCAACACATTTACAAAATAAAGGAAAATAAG
AAATCAAACAAGGCAAGAAGTCAGGCCGGATTAAGCCATAGTACGGTAAGAGCTATGCTGCC
TGTGAGCCCCGTCTAAGGACGTAAAAATGAAGTCAGGCCGAAAGCCACGGCTTGAGCAAACCG
TGCTGCCTGTAGCTCCATCGTGGGGATGTAAAAACCTGGGAGGCTGCAACCCATGGAAGCTGT
ACGCATGGGGTAGCAGACTAGTGGTTAGAGGAGACCCCTCCCGAAACATAACGCAGCAGCGG
GGCCCAACACCAGGGGAAGCTGTACCCTGGTGGTAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCCC
GCATAACAATAAACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCTACAGCAT
CATTCCAGGCACAGAACGCCAGAAAATGGAATGGTGTGTTGAATCAACAGGTTCT

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:3 – DENV-2-NI-BID-V533-2005

AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAAGACAGATTCTTTGAGGGAGCTAAGCTCAACGTAGTT
CTAACAGTTTTTTAATTAGAGAGCAGATCTCTGATGAATAACCAACGAAAAAAGGCGAGAAGT
ACGCCTTTCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCGCGTGTCAACTGTGCAACAGCTGACAAAG
AGATTCTCACTTGAATGCTGCAAGGACGCGGACCATTAAAACTGTTTCATGGCCCTTGTGGCGT
TCCTTCGTTTCCTAACAAATCCCACCAACAGCAGGGATACTAAAAAGATGGGGAACGATCAAAA
AATCAAAAGCTATCAATGTTTTGAGAGGGTTCAGGAAAGAGATTGGAAGGATGCTGAACATCT
TGAACAAGAGACGCAGGACAGCAGGCGTGATTGTTATGTTGATTCCAACAGCGATGGCGTTCC
ATTTAACCACACGCAATGGAGAACCACACATGATCGTTGGTAGGCAGGAGAAAGGGAAAAGT
CTTCTGTTCAAAACAGAGGATGGTGTTAACAATGTGTACTCTCATGGCCATAGACCTTGGTGAAT
TGTGTGAAGATACAATCACGTACAAGTGTCTCTCCTCAGACAAAATGAACCAGAAGACATAG
ATTGTTGGTGCAACTCTACGTCCACATGGGTAACCTTATGGGACATGTACCACCACAGGAGAAC
ACAGAAGAGAAAAAAGATCAGTGGCGCTCGTTCCACATGTAGGTATGGGACTGGAGACACGA
ACTGAAACATGGATGTCATCAGAAGGGGCTGGAACATGTTTCAAGAGAATTGAAACCTGGATC
TTGAGACATCCAGGTTTTTACCATAATGGCAGCAATCCTGGCATAACCCATAGGAACGACACAT
TTCCAAAGGGCCTTGATTTTCACTTTTACTGACAGCTGTGCTCCTTCAATGACAATGCGCTGCA
TAGGAATATCAAATAGAGACTTCGTAGAAGGGGTTTCAGGAGGAAGCTGGGTTGACATAGTCT
TAGAACATGGAAGTTGTGTGACGACGATGGCAAAAAACAAACCAACATTGGATTTTGAAGTGA
TAAAAACAGAAGCCAAACAACCTGCCACTCTAAGGAAGTACTGTATAGAAGCAAAGCTGACC
AACACAACAACAGAATCGCGTTGCCAACACAAGGGGAACCCAGTCTAAATGAGGAGCAGGA
CAAAAGGTTTCATCTGCAAACACTCCATGGTAGACAGAGGATGGGGAAATGGATGTGGATTATT
TGGAAAGGGAGGCATTGTGACCTGTGCTATGTTTACATGCAAAAAGAACATGGAAGGAAAAG
TCGTGCAGCCAGAAAAATTTGGAATACACCATCGTGATAACACCTCACTCAGGAGAGGAGCACG
CTGTAGGTAAATGACACAGGAAAGCATGGCAAGGAAATCAAAATAACACCACAGAGCTCCATC
ACAGAAGCAGAACTGACAGGCTATGGCACTGTACGATGGAGTGCTCTCCGAGAACGGGCCTC
GACTTCAATGAGATGGTACTGCTGCAGATGGAAGACAAAGCTTGGCTGGTGCACAGGCAATGG
TTCCTAGACCTGCCGTTACCATGGCTACCCGGAGCGGACACACAAGGATCAAATTGGATACAG
AAAGAGACATTGGTCACCTTTCAAAAATCCCCACGCGAAGAAACAGGATGTCGTTGTCTTAGGG
TCTCAAGAAGGGGCCATGCACACGGCACTCACAGGGGCCACAGAAATCCAGATGTCATCAGG
AACTTACTGTTTACAGGACATCTCAAGTGCAGGCTGAGAATGGACAAACTACAGCTCAAAGG
AATGTCATACTCTATGTGTACAGGAAAGTTTAAAAATGTGAAGGAAATAGCAGAAACACAACA
TGGAACAATAGTTATCAGAGTACAATATGAAGGGGACGTTCTCCATGCAAGATCCCTTTTGA
GATAACAGATTTGAAAAAAGACACGTCTTAGGTGCTTGATTACAGTTAACCCAATCGTAAC
AGAAAAAGATAGCCAGTCAACATAGAAGCAGAACCTCCATTCGGAGACAGCTACATCATTAT
AGGAGTAGAGCCGGGACAATTGAAACTCAATTGGTTTAAGAAGGGAAAGTTCCATCGGCCAAA
TGTTTGAGACAACAATGAGAGGAGCAAAGAGAATGGCCATTTTAGGTGACACAGCCTGGGAC
TTTGGATCCCTGGGAGGAGTGTTTACATCTATAGGAAAGGCTCTCCACCAAGTTTTTCGGAGCAA

10

20

30

40

50

TCTATGGGGCTGCTTTTAGTGGGGTCTCATGGACTATGAAAAATCCTCATAGGAGTCATCATCAC
ATGGATAGGAATGAATTCACGTAGCACCTCACTGTCTGTGTCGCTAGTATTGGTGGGCGTTGTG
ACACTGTACCTGGGAGCTATGGTGAAGCTGATAGTGGTTGCGTTGTGAGCTGGAAAAATAAA
GAACTGAAATGTGGCAGCGGGATCTTCATCACAGATAACGTACACACATGGACAGAACAAATAT
AAGTTCCAACCAGAATCCCCCTCAAACTAGCTTCAGCTATCCAAAAAGCTCATGAAGAGGGC
ATTTGTGGAATCCGCTCAGTAACAAGATTGGAGAATCTGATGTGGAAACAAATAACACCAGAA
TTGAATCATATTCTATCAGAAAAATGAGGTAAAGTTGACCATTATGACAGGAGACATTAGAGGA
ATCATGCAGGCAGGAAAACGATCCTTGCGGCCCCAGCCCACTGAGCTGAAGTACTCATGGAAA
ACATGGGGAAAGGCGAAAAATGCTCTCCACAGAGTCTCACAATCAGACCTTTCTTATTGATGGC
CCTGAAACAGCAGAATGCCCCAACACAAACAGAGCCTGGAACTCGCTGGAAGTTGAAGACTA
TGGTTTTGGAGTTTTACCACCAATATATGGCTGAAATTGAGAGAAAAACAGGATGTATTTTGT
GACTCAAACTCATGTCAGCGGCCATTAAAGACAACAGAGCCGTTTCATGCTGATATGGGTTAT
TGGATAGAAAGTGCCTCAATGACACATGGAAGATGGAGAAAGCCTCCTTCATTGAAGTTAAA
AGCTGCCACTGGCCAAAGTCACACACCCTTTGGAGCAATGGAGTATTAGAAAGTGAGATGATA
ATCCCCAAAAATTTTGCCGGGCCAGTGTCAACACAACACTACAGACCAGGCTACCATACACAA
ACAGCAGGACCTTGGCATCTAGGTAAGCTTGAGATGGACTTTGATCTCTGCGAAGGAACACTACA
GTGGTGGTGACTGAGGACTGTGGAAATAGAGGACCCTCTTTAAGAACGACCACTGCCTCTGGA
AAACTCATAACAGAATGGTGTCTGCCGATCTGCACACTACCACCTCTAAGATACAGAGGTGAG
GATGGATGCTGGTACGGGATGGAAATCAGACCATTGAAAGAGAAAGAAGAGAATTTGGTCAA
CTCCTTGGTCACAGCCGGACATGGGCAGATTGACAACTTTTCCTACTAGGAGTCTTGGGAATGGC
ACTGTTCTCTGGAAGAAATGCTCAGGACCCGAATAGGAACGAAACATGCAATACTGCTAGTTGC
AGTATCTTTTGTGACATTGATTACTGGGAACATGTCTTTTAGAGACCTGGGAAGAGTGATGGTT
ATGGTGGGCGCTACCATGACGGATGACATAGGTATGGGAGTGACTTATCTTGCCCTACTAGCA
GCTTTTAAGGTTAGACCAACTTTTGCAGCTGGACTACTCTTAAGAAAACCTGACCTCCAAGGAAT
TGATGATGGCCACCATAGGAATCGCACTCTTTCCCAAAGCACCATAACCAGAGACCATTTCTTG
AACTGACTGATGCATTAGCCCTGGGCATGATGGTCCTCAAAATAGTGAGAAATATGGAAAAAT
ACCAATTGGCAGTGACTATCATGGCTATTTTCATGTGTCCCAAATGCAGTGATACTGCAAAACGC
ATGGAAGGTGAGTTGCACAATATTGGCAGCGGTGTCCGTTTCACCACTGCTCTTAACATCCTCA
CAGCAGAAAGCGGATTGGATACCACTGGCATTGACGATAAAAGGTCTCAATCCAACAGCCATT
TTTTTAACAACCTCTCTCGAGGACCAGCAAGAAAAGGAGCTGGCCGCTAAATGAAGCTATCATG
GCAGTTGGGATGGTGAGCATTTTAGCCAGTTCTCTCTAAAGAATGATATTCCTATGACAGGTC
CATTAGTGGCTGGAGGACTCCTCACCGTATGTTACGTGCTCACTGGACGATCGGCCGATTTGGA
ACTGGAGAGAGCTGCCGATGTAAAATGGGAAGATCAGGCAGAAATATCAGGAAGCAGCCCAA
TCCTGTCAATAACAATATCAGAAGATGGCAGCATGTGATAAAAAATGAAGAGGAAGAACAA
ACACTGACCATACTCATCAGAACGGGATTGTTGGTGATCTCAGGAGTCTTCCAGTATCGATAC
CAATTACGGCAGCAGCATGGTACCTGTGGGAAGTAAAGAAACAACGGGCTGGAGTACTGTGG
GACGTCCCTTCACCCCCACCAGTGGAAGAAAGCCGAACCTGGAGGATGGAGCCTACAGAAATCAA

10

20

30

40

50

GCAAAGAGGGATCCTTGGATATTCTCAGATTGGAGCCGGAGTTTACAAAGAAGGAACATTCCA
TACAAATGTGGCACGTACACGTGGTGCTGTTCTGATGCATAGAGGGAAGAGGATTGAACCATC
ATGGGCAGATGTCAAGAAAGACCTAATATCATATGGAGGAGGCTGGAAGCTAGAAGGAGAAT
GGAAGGAAGGAGAGGAAGTCCAAGTCCTGGCATTGGAACCTGGAAAAAATCCAAGAGCCGTC
CAAACGAAACCTGGAATATTCAAAACCAACACCGGAACCATAGGCGCCGTATCTCTGGACTTT
TCCCCTGGAACGTCAGGATCTCCAATCGTCGACAGAAAAGGAAAAGTTGTGGGTCTTTACGGT
AATGGTGTGTGTCACAAGGAGTGGAGCATATGTAAGTGCTATAGCCCAGACCGAAAAAAGCATT
GAAGACAATCCAGAGATCGAAGATGACATTTTCCGAAAGAAAAGATTGACCATCATGGACCTC
CATCCAGGAGCAGGAAAGACAAAAAGATACCTTCCAGCCATAGTTAGAGAAGCCATAAAACG
TGGCTTGAGAACATTGATCCTGGCTCCCACTAGAGTAGTGGCAGCTGAAATGGAGGAAGCTCT
TAGAGGACTTCCAATAAGATACCAAACTACAGCCATCAAAACCGAGCATACCGGGCGGGAGA
TCGTGGACCTAATGTGTCATGCCACATTTACTATGAGGCTGTTATCACCAGTCAGAGTGCCAAA
TTACAACCTGATCATCATGGACGAAGCCCACTTCACAGACCCAGCAAGTATAGCAGCTAGAGG
ATACATTTCAACTCGAGTAGAGATGGGTGAAGCAGCCGGGATTTTCATGACAGCCACTCCTCC
GGGAAGTAGAGACCCATTTCTCAGAGCAATGCACCAATTATGGATGAGGAAAGAGAAATCC
CTGAGCGTTCATGGAATTCAGGACACGAATGGGTACGGATTTTAAGGGGAAGACTGTTTGGT
TTGTTCCAAGTATAAAAGCAGGAAATGATATAGCAGCTTGTCTTAGGAAAAATGGAAAGAAA
GTGATACAACCTCAGTAGGAAGACTTTTGGACTCTGAGTATGTTAAGACTAGAGCCAATGATTGG
GACTTTGTGGTCACAACTGACATTTTCAGAAATGGGTGCCAACTTCAAGGCTGAGAGGGTTATA
GACCCCAGACGTTGCATGAAACCAGTTATACTAACAGATGGCGAGGAGCGGGTGATCTTGGCT
GGACCTATGCCAGTGACCCACTCTAGTGCAGCGCAAAGAAGAGGGGAGAATAGGAAGAAATCC
AAAAATGAAATGACCAGTACATATACATGGGGGAACCTCTTGAAAAATGATGAAGACTGTG
CACATTGGAAAGAAGCTAAAATGCTCCTAGATAACATCAACACACCTGAAGGAATCATTCTTA
GTATGTTTCGAACCAGAGCGTGAAAAAGTGGATGCCATTGATGGTGAATACCGTTTGAGAGGAG
AAGCAAGGAAAAACCTTTGTGGACCTAATGAGAAGAGGGGACTTACCAGTCTGGTTGGCCTACA
AAGTGGCAGCTGAAGGCATCAACTACGCAGACAGAAAGTGGTGTTTTGATGGAATTAAGAAC
AACCAAATACTGGAAGAAAATATGGAAGTGGAAATCTGGACAAAAGAAGGGGAAAAGGAAAA
AATTAATAACCCAGATGGTTGGATGCTAGGATCTATTCTGACCCACTAGCACTAAAAGAATTCA
AGGAATTTGCAGCTGGAAGAAAATCTTTGACCCTGAACCTAATCACAGAAATGGGTAGGCTTC
CAACTTTTCATGACTCAGAAAGCAAGAAACGCACTGGACAACCTGGCTGTGCTGCATACGGCTG
AGGCAGGTGGAAGGGCGTACAATCATGCTCTCAGTGAAGTCCGGAGACCCCTGGAGACACTG
CTCCTACTGACACTTCTGGCAACAGTCACAGGAGGAATCTTCTTATTCTTAATGAGCGGAAAAAG
GTATAGGGAAGATGACCCCTGGGAATGTGTTGCATAATCACGGCTAGTATCCTCCTATGGTATG
CACAGATACAACCACACTGGATAGCAGCTTCAATAATACTGGAGTTTTTCTCATAGTTTTGCT
CATTCCAGAACCAGAAAAACAGAGAACACCCCAAGACAACCAATTGACCTACGTTGTCATAGC
CATCCTCACAGTGGTGGCCGCAACCATGGCAAACGAGATGGGTTTCTGGAAAAAACAAGA
AAGACCTCGGATTGGGAAGCATTACAACCCAGGAATCTGAGAGCAATATCCTGGACATAGATC

10

20

30

40

50

TACGCCCTGCATCAGCATGGACGCTGTATGCCGTAGCTACAACATTTGTACACCAATGTTGAG
ACATAGCATTGAAAATTCCTCAGTGAATGTCTCCCTAACAGCCATTGCTAACCAAGCTACAGTG
CTAATGGGTCTTGGGAAAGGATGGCCATTGTCAAAGATGGACATTGGAGTTCCCCCTCCTTGCC
ATTGGATGCTATTACAAAGTCAACCCTATAACTCTCACAGCAGCTCTCCTTTTATTGGTAGCAC
ATTATGCCATTATAGGGCCAGGACTTCAAGCAAAAGCAACCAGAGAAGCCCAGAAAAGAGCA
GCAGCAGGCATCATGAAAAACCAACAGTCGATGGAATAACAGTGATTGACCTAGAACCAAT
ACCCTATGATCCAAAATTTGAAAAGCAGTTAGGACAAGTAATGCTCCTAATCCTCTGCGTGACT
CAAGTATTAATGATGAGGACTACATGGGCTTTATGTGAGGCTCTAACCCTAGCGACCGGGGCC
ATCTCCACACTGTGGGAAGGAAATCCAGGGAGGTTTTGGAACACTACCATTCAGTGTCAATG
GCTAACATCTTTAGGGGGAGCTACTTGGCCGGAGCTGGACTTCTCTTTTCCATCATGAAAAACA
CAACAAACACAAGAAGAGGAACTGGCAACATAGGAGAGACACTTGGAGAAAAATGGAAAAG
TCGATTAAACGCACTGGGGAAAAGTGAATTTCAAATCTACAAGAAAAGTGGAATCCAGGAAG
TGGATAGAACCCTAGCAAAAGAAGGTATCAAAAGAGGAGAAACGGACCACCATGCTGTGTGCG
CGAGGTTTCAGCAAACTGAGATGGTTCGTCGAGAGAAATATGGTACACCCGAAGGGAAGGT
GGTGGATCTCGGTTGCGGCAGAGGGGGCTGGTCATACTATTGCGGGGGACTAAAGAATGTAAG
AGAAGTCAAAGGCCTAACAAAAGGAGGACCAGGACATGAAGAACCCATCCCCATGTCAACAT
ATGGGTGGAATCTAGTGCGTCTGCAAAGTGGAGTTGACGTTTTCTTCACCCCGCCAGAAAAGT
GTGATACATTGTTGTGTGACATAGGGGAGTCGTACCAAATCCCACGATAGAAGCAGGACGAA
CACTCAGAGTCCTCAACTTAGTGAAAAATTGGTTGAACAATAACACCCAATTTTGCATAAAGG
TCCTCAACCCATATATGCCTTCAGTCATAGAAAAAATGGAAGCATTACAAAGGAAATATGGAG
GAGCCTTAGTGAGGAATCCACTCTCACGAACTCCACGCATGAAATGTACTGGGTATCTAATG
CCACCGGGAACATAGTGTCTCAGTGAACATGATTTCAAGGATGTTGATTAACAGATTACAA
TGAAACACAAGAAAGCCACTTACGAGCCAGATGTTGACCTAGGAAGTGGAACCCGCAACATT
GGAATTGAAAGTGAGATACCAAATCTAGACATAATAGGAAAGAGAATAGAGAAAATAAAACA
AGAGCATGAAACATCATGGCACTATGATCAAGACCACCCATACAAAACGTGGGCTTACCATGG
CAGCTATGAAACAAAACAACTGGATCAGCATCATCTATGGTGAACGGAGTGGTCAGATTGCT
GACAAAACCTTGGGACGTCGTCCCTATGGTGACACAGATGGCAATGACAGACACGACTCCTTT
TGGACAACAGCGCTTTTCAAAGAGAAAGTAGACACGAGAACCCAAGAACCGAAGGAAGGCA
CAAAGAACTGATGAAAATTACGGCAGAGTGGCTTTGGAAAGAACTAGGAAAGAAAAAGACA
CCTAGGATGTGTACCAGAGAAGAATTCACAAGAAAAGTGAGAAGCAATGCAGCCTTGGGGGC
CATATTCAGTATGAGAACAAATGGAAATCGGCACGTGAGGCTGTTGAAGATGGTAGGTTCTG
GGAGCTGGTTGACAGGGAAAGAAATCTCCATCTTGAAGGAAAGTGTGAAACATGTGTGTACA
ACATGATGGGAAAAAGAGAGAAGAACTAGGGGAGTTCGGCAAGGCAAAAGGTAGCAGAGC
CATATGGTACATGTGGCTTGGAGCACGCTTCTTAGAGTTTGAAGCCCTAGGATTCTGAATGAA
GATCACTGGTTCTCCAGAGGGAACCTCCCTGAGTGGAGTGGAAGGAGAAGGGCTGCACAGGCT
AGGCTACATTTTAAGAGACGTGGGCAAGAAGGAAGGGGGGGCAATGTACGCCGATGATACAG
CAGGATGGGACACAAGAATCACACTAGAAGACTTAAAAAATGAAGAAATGGTAACGAACCAC

10

20

30

40

50

ATGAAAGGAGAACACAAGAACTAGCCGAGGCCATATTCAAACCTAACGTACCAAAACAAGGT
GGTGCGTGTGCAAAGACCAACACCAAGAGGTACAGTAATGGATATCATATCGAGAAGAGACC
AAAGAGGCAGTGGGCAAGTCGGCACCTATGGCCTTAATACCTTCACCAATATGGAAGCCCAAT
TAATTAGACAGATGGAGGGAGAAGGAATCTTCAAAAGCATTTCAGCACCTGACAGCCACAGAA
GAAATCGCTGTACAGAACTGGCTAGCAAGAGTGGGGCGTGAAAGGCTATCAAGAATGGCAAT
CAGTGGAGATGATTGTGTGTAAACCTATAGATGACAGATTTGCAAGTGTCTTAAACAGCTCTA
AATGACATGGGAAAAGTTAGAAAAGATATACAACAATGGGAACCTTCAAGAGGATGGAACGA
TTGGACACAAGTGCCTTTCTGTTCACACCACTTTTCATGAGTTAGTCATGAAAGATGGTCGCGTG
CTCGTAGTCCCATGCAGAAACCAAGATGAACTGATTGGTAGAGCCCGAATTTCCAGGGAGCT
GGGTGGTCTTTGAAAGAGACGGCCTGTTTGGGAAAGTCTTACGCCCAAATGTGGACTCTGATG
TACTTCCACAGACGTGACCTCAGACTGGCGGCCAAATGCCATCTGCTCGGCAGTCCCGTCACATT
GGGTTCACAAGTCGAACAACCTGGTCCATACACGCTAAGCATGAATGGATGACGACGGAA
GACATGCTGGCAGTCTGGAACAGGGTGTGGATCCAAGAAAACCCGTGGATGGAAGATAAAAC
TCCAGTGGAATCATGGGAAGAAGTCCCATACTTGGGAAAAAGAGAAGACCAATGGTGC GGCT
CATTGATTGGGCTAACAAGCAGGGCTACCTGGGCAAAGAACATCCAACAGCAATAAATCAA
GTCAGATCCCTTATAGGCAATGAGGAATACACAGACTACATGCCATCCATGAAGAGATTTAGA
AGGGAAGAGGAAGAGGCAGGTGTCTGTGTGTAAGGCAAACTAACATGAAACAAGGCTAA
AAGTCAGGTTCGATTAAAGCCATAGTACGGAAAAAACTATGCTACCTGTGAGCCCCGTCCAAGG
ACGTTAAAAGAAGTCAGGCCATCACAAAATGCCACAGCTTGAGTAAACTGTGCAGCCTGTAGC
TCCACCTGAGGAGGTGTAAAAAACCTGGGAGGCCACAAACCATGGAAGCTGTACGCATGGCG
TAGTGGACTAGCGGTTAGAGGAGACCCCTCCCTTACAAATCGCAGCAAACAACGGGGGCCCA
AGGTGAGATGAAGCTGTAATCTCACTGGAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCCCAAAAC
AAAAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTCAGCATCATTCCA
GGCACAGAACGCCAGAAAATGGAATGGTGTCTGTTGAATCAACAGGTTCT

10

20

SEQ ID NO: 4 – DENV-2-NI-BID-V533-2005-E-Min

AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAAGACAGATTCTTTGAGGGAGCTAAGCTCAACGTAGTT
CTAACAGTTTTTTAATTAGAGAGCAGATCTCTGATGAATAACCAACGAAAAAAGGCGAGAAGT
ACGCCTTTCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCGCGTGTCAACTGTGCAACAGCTGACAAAG
AGATTCTCACTTGAATGCTGCAAGGACGCGGACCATTAAAACGTTCATGGCCCTTGTGGCGT
TCCTTCGTTTCCTAACAATCCCAACAGCAGGGATACTAAAAAGATGGGGAACGATCAAAA
AATCAAAAGCTATCAATGTTTTGAGAGGGTTCAGGAAAGAGATTGGAAGGATGCTGAACATCT
TGAACAAGAGACGCAGGACAGCAGGCGTGATTGTTATGTTGATTCCAACAGCGATGGCGTTCC
ATTTAACCACACGCAATGGAGAACCACACATGATCGTTGGTAGGCAGGAGAAAGGGAAAAGT
CTTCTGTTCAAAACAGAGGATGGTGTTAACATGTGTACTCTCATGGCCATAGACCTTGGTGAAT
TGTGTGAAGATACAATCACGTACAAGTGTCTCTCCTCAGACAAAATGAACCAGAAGACATAG
ATTGTTGGTGCAACTCTACGTCCACATGGGTAACCTTATGGGACATGTACCACACAGGAGAAC

30

40

50

ACAGAAGAGAAAAAAGATCAGTGGCGCTCGTTCCACATGTAGGTATGGGACTGGAGACACGA
ACTGAAACATGGATGTCATCAGAAGGGGCCTGGAAACATGTTTACAGAGAATTGAAACCTGGATC
TTGAGACATCCAGGTTTTACCATAATGGCAGCAATCCTGGCATAACCCATAGGAACGACACAT
TTCCAAAGGGCCTTGATTTTTCATTTTACTGACAGCTGTCGCTCCTTCAATGACAATGAGATGCA
TAGGGATATCGAATCGCGATTTTCGTGCAAGGCGTATCCGGAGGGTCATGGGTCGACATCGTAC
TCGAACACGGATCATGCGTTACGACTATGGCTAAGAATAAGCCTACACTAGACTTCGAACTGA
TTAAGACAGAGGCTAAGCAACCGGCAACATTGCGTAAGTACTGTATCGAAGCGAAACTGACTA
ACACTACAACCGAATCTAGATGCCCTACACAGGGCGAACCTAGTCTGAACGAAGAGCAAGAC
AAAAGGTTTATATGCAAACACTCTATGGTCGATCGCGGATGGGGAAACGGATGCGGATTGTTT
GGTAAGGGGGGAATCGTTACATGCGCTATGTTTACATGTAAAAAAATATGGAGGGAAAGGT
CGTGCAACCAGAGAATCTCGAATATACAATCGTAATCACACCGCATAGCGGAGAGGAACACG
CAGTCGAAACGATACCGGAAAACACGGAAAAGAGATTAAAGATTACACCACAGAGCTCCATA
ACCGAAGCCGAACCTGACAGGGTACGGAAACAGTGACAATGGAATGCTCACCTAGAACAGGCCT
AGACTTTAACGAAATGGTGTTACTGCAAATGGAAGACAAAGCATGGTTAGTGCATAGGCAATG
GTTTTTAGACCTACCACTACCATGGTTGCCCGAGCCGATACACAGGGATCGAACTGGATACA
GAAAGAGACACTCGTTACGTTTAAAAACCCACACGCTAAAAAACAGGACGTAGTCGTACTCGG
ATCACAGGAAGGCGCAATGCATACCGCATTGACAGGCGCTACAGAGATACAGATGTCTAGCG
GAAATCTGTTGTTTACAGGGCATCTGAAATGTAGACTGAGAATGGACAAACTGCAATTGAAGG
GAATGTCATACTCTATGTGTACGGGTAAGTTTAAGATAGTCAAAGAGATAGCCGAAACACAAC
ACGGAACAATCGTAATTAGGGTGCAATACGAAGGCGACGGGTACCATGTAAAGATACCATTCG
AAATTACAGACCTCGAAAAAAGACACGTACTCGGAAGACTGATAACAGTGAATCCGATCGTTA
CGGAAAAAGACTCACCCGTTAATATCGAAGCCGAACCACTTCGGAGACTCATACATAATAA
TCGGAGTCGAACCCGGACAATTGAAACTGAATTGGTTTAAAAAAGGGTCATCAATCGGACAAA
TGTTGCAAAACAATATGAGAGGCGCTAAGCGTATGGCTATACTCGGAGACACAGCATGGGACT
TCGGATCCTTAGGGGGAGTGTTTACGTCAATCGGTAAGGCACTACACCAGGTATTTCGGAGCGA
TATACGGAGCCGCATTTAGCGGAGTGTCGTGGACAATGAAGATACTGATCGGAGTGATAATCA
CATGGATCGGAATGAATAGTAGGTCTACAAGTCTATCCGTTAGCTTAGTGTTAGTCGGAGTCGT
TACACTGTATCTAGGCGCTATGGTGCAAGCCGATAGTGGTTGCGTTGTGAGCTGGAAAAATAA
AGAACTGAAATGTGGCAGCGGGATCTTCATCACAGATAACGTACACACATGGACAGAACAAAT
ATAAGTTCCAACCAGAATCCCCTTCAAACTAGCTTCAGCTATCCAAAAAGCTCATGAAGAGG
GCATTGTGGAATCCGCTCAGTAACAAGATTGGAGAATCTGATGTGGAAACAAATAACACCAG
AATTGAATCATATTCTATCAGAAAAATGAGGTAAAGTTGACCATTATGACAGGAGACATTAGAG
GAATCATGCAGGCAGGAAAAACGATCCTTGCGGCCCCAGCCCACTGAGCTGAAGTACTCATGGA
AAACATGGGGAAAGGCGAAAAATGCTCTCCACAGAGTCTCAAACTCAGACCTTTCTTATTGATG
GCCCTGAAACAGCAGAATGCCCAACACAAACAGAGCCTGGAACCTCGCTGGAAGTTGAAGAC
TATGGTTTTGGAGTTTTACCACCAATATATGGCTGAAATTGAGAGAAAAACAGGATGTATTTT
GTGACTCAAACTCATGTACAGCGGCCATTAAAGACAACAGAGCCGTTTCATGCTGATATGGGTT

10

20

30

40

50

ATTGGATAGAAAAGTGCACCTCAATGACACATGGAAGATGGAGAAAAGCCTCCTTCATTGAAGTTA
AAAGCTGCCACTGGCCAAAGTCACACACCCTTTGGAGCAATGGAGTATTAGAAAAGTGAGATGA
TAATCCCCAAAAAATTTTGGCCGGCCAGTGTCAACACAACACTACAGACCAGGCTACCATACAC
AAACAGCAGGACCTTGGCATCTAGGTAAGCTTGAGATGGACTTTGATCTCTGCGAAGGAACTA
CAGTGGTGGTGAAGTGTGGAAATAGAGGACCCTCTTTAAGAACGACCACTGCCTCTG
GAAAACCTCATAACAGAATGGTGCTGCCGATCCTGCACACTACCACCTCTAAGATACAGAGGTG
AGGATGGATGCTGGTACGGGATGGAATCAGACCATTGAAAGAGAAAGAAGAGAATTTGGTC
AACTCCTTGGTCAACGCCGGACATGGGCAGATTGACAACCTTTTCACTAGGAGTCTTGGGAATG
GCACTGTTCTTGGAAAGAAATGCTCAGGACCCGAATAGGAACGAAACATGCAATACTGCTAGTT
GCAGTATCTTTTGTGACATTGATTACTGGGAACATGTCTTTTAGAGACCTGGGAAGAGTGATGG
TTATGGTGGGCGCTACCATGACGGATGACATAGGTATGGGAGTGACTTATCTTGGCCCTACTAGC
AGCTTTTAAGGTAGACCAACTTTTGCAGCTGGACTACTCTTAAGAAAACCTGACCTCCAAGGA
ATTGATGATGGCCACCATAGGAATCGCACTCCTTTCCCAAAGCACCATAACCAGAGACCAATTCTT
GAACTGACTGATGCATTAGCCCTGGGCATGATGGTCTCCTCAAATAGTGAGAAATATGGAAAAA
TACCAATTGGCAGTGACTATCATGGCTATTTTCATGTGTCCCAAATGCAGTGATACTGCAAAACG
CATGGAAGGTGAGTTGCACAATATTGGCAGCGGTGTCCGTTTCACCACTGCTCTTAACATCCTC
ACAGCAGAAAGCGGATTGGATACCACTGGCATTGACGATAAAAGGTCTCAATCCAACAGCCAT
TTTTTTAACAACCTCTCTCGAGGACCAGCAAGAAAAGGAGCTGGCCGCTAAATGAAGCTATCAT
GGCAGTTGGGATGGTGAGCATTTTAGCCAGTTCTCTCCTAAAGAATGATATTCCTATGACAGGT
CCATTAGTGCTGGAGGACTCCTCACCGTATGTTACGTGCTCACTGGACGATCGGCCGATTTGG
AACTGGAGAGAGCTGCCGATGTAAAATGGGAAGATCAGGCAGAAATATCAGGAAGCAGCCCA
ATCCTGTCAATAACAATATCAGAAGATGGCAGCATGTGATAAAAAATGAAGAGGAAGAACA
AACTGACCATACTCATCAGAACGGGATTGTTGGTGATCTCAGGAGTCTTTCCAGTATCGATA
CCAATTACGGCAGCAGCATGGTACCTGTGGGAAGTAAAGAAACAACGGGCTGGAGTACTGTG
GGACGTCCCTTACCCCCACCACTGGAAAAAGCCGAACCTGGAGGATGGAGCCTACAGAATCA
AGCAAAGAGGGATCCTTGGATATTCTCAGATTGGAGCCGGAGTTTACAAAGAAGGAACATTCC
ATACAATGTGGCACGTACACGTGGTGCTGTCTGATGCATAGAGGGAAGAGGATTGAACCAT
CATGGGCAGATGTCAAGAAAGACCTAATATCATATGGAGGAGGCTGGAAGCTAGAAGGAGAA
TGGAAGGAAGGAGAGGAAGTCCAAGTCTTGGCATTGGAACCTGGAAAAAATCCAAGAGCCGT
CCAAACGAAACCTGGAATATTCAAACCAACACCGGAACCATAGGCGCCGTATCTCTGGACTT
TTCCCCTGGAACGTACAGGATCTCCAATCGTCGACAGAAAAGGAAAAGTTGTGGGTCTTTACGG
TAATGGTGTGTGACAAGGAGTGGAGCATATGTAAGTGCTATAGCCAGACCGAAAAAAGCAT
TGAAGACAATCCAGAGATCGAAGATGACATTTTCCGAAAGAAAAGATTGACCATCATGGACCT
CCATCCAGGAGCAGGAAAGACAAAAAGATACCTTCCAGCCATAGTTAGAGAAGCCATAAAAC
GTGGCTTGAGAACATTGATCCTGGTCCCACTAGAGTAGTGGCAGCTGAAATGGAGGAAGCTC
TTAGAGGACTTCCAATAAGATACCAAACCTACAGCCATCAAACCGAGCATACCGGGCGGGAG
ATCGTGGACCTAATGTGTCATGCCACATTTACTATGAGGCTGTTATCACCAGTCAGAGTGCCAA

10

20

30

40

50

ATTACAACCTGATCATCATGGACGAAGCCCACTTCACAGACCCAGCAAGTATAGCAGCTAGAG
GATACATTTCAACTCGAGTAGAGATGGGTGAAGCAGCCGGGATTTTCATGACAGCCACTCCTC
CGGGAAGTAGAGACCCATTTCTCAGAGCAATGCACCAATTATGGATGAGGAAAGAGAAATC
CCTGAGCGTTCATGGAATTCAGGACACGAATGGGTACGGATTTTAAGGGGAAGACTGTTTGG
TTTGTTCGAAGTATAAAAGCAGGAAATGATATAGCAGCTTGTCTTAGGAAAAATGGAAAGAAA
GTGATACAACTCAGTAGGAAGACTTTTGAAGTCTGAGTATGTTAAGACTAGAGCCAATGATTGG
GACTTTGTGGTCACTGACATTTTCAAGAAATGGGTGCCAACTTCAAGGCTGAGAGGGTTATA
GACCCAGACGTTGCATGAAACCAGTTATACTAACAGATGGCGAGGAGCGGGTGATCTTGGCT
GGACCTATGCCAGTGACCCACTCTAGTGCAGCGCAAAGAAGAGGGGAGAATAGGAAGAAATCC
AAAAATGAAAATGACCAGTACATATACATGGGGGAACCTCTTGAAAATGATGAAGACTGTG
CACATTGGAAAGAAGCTAAAATGCTCCTAGATAACATCAACACACCTGAAGGAATCATTCTTA
GTATGTTTGAACAGAGCGTGAAAAAGTGGATGCCATTGATGGTGAATACCGTTTGAGAGGAG
AAGCAAGGAAAACCTTTGTGGACCTAATGAGAAGAGGGGACTTACCAGTCTGGTTGGCCTACA
AAGTGGCAGCTGAAGGCATCACTACGCAGACAGAAAGTGGTGTGTTTATGGAATTAAGAAC
AACCAAATACTGGAAGAAAATATGGAAGTGGAAATCTGGACAAAAGAAGGGGAAAGGAAAA
AATTAACCCAGATGGTTGGATGCTAGGATCTATTCTGACCCACTAGCACTAAAAGAATTCA
AGGAATTTGCAGCTGGAAGAAAATCTTTGACCCCTGAACCTAATCACAGAAATGGGTAGGCTTC
CACTTTTCATGACTCAGAAAGCAAGAAACGCACTGGACAACCTGGCTGTGCTGCATACGGCTG
AGGCAGGTGGAAGGGCGTACAATCATGCTCTCAGTGAAGTCCCGAGACCCCTGGAGACACTG
CTCCTACTGACACTTCTGGCAACAGTACAGGAGGAATCTTCTTATTCTTAATGAGCGGAAAAAG
GTATAGGGAAGATGACCCTGGGAATGTGTTGCATAATCACGGCTAGTATCCTCCTATGGTATG
CACAGATACAACCACACTGGATAGCAGCTTCAATAATACTGGAGTTTTTCTCATAGTTTTGCT
CATTCCAGAACCAGAAAAACAGAGAACACCCCAAGACAACCAATTGACCTACGTTGTCATAGC
CATCCTCACAGTGGTGGCCGCAACCATGGCAAACGAGATGGGTTTCTGGAAAAACCAAGA
AAGACCTCGGATTGGGAAGCATTACAACCCAGGAATCTGAGAGCAATATCCTGGACATAGATC
TACGCCCTGCATCAGCATGGACGCTGTATGCCGTAGCTACAACATTTGTACACCAATGTTGAG
ACATAGCATTGAAAATTCTCAGTGAATGTCTCCCTAACAGCCATTGCTAACCAAGCTACAGTG
CTAATGGGTCTTGGGAAAGGATGGCCATTGTCAAAGATGGACATTGGAGTTCCCTCCTTGCC
ATTGGATGCTATTCAAGTCAACCCCTATAACTCTCACAGCAGCTCTCCTTTTATTGGTAGCAC
ATTATGCCATTATAGGGCCAGGACTTCAAGCAAAAGCAACCAGAGAAGCCAGAAAAGAGCA
GCAGCAGGCATCATGAAAAACCAACAGTCGATGGAATAACAGTGATTGACCTAGAACCAAT
ACCCATATGATCCAAAAATTTGAAAAGCAGTTAGGACAAGTAATGCTCCTAATCCTCTGCGTGACT
CAAGTATTAATGATGAGGACTACATGGGCTTTATGTGAGGCTCTAACCCCTAGCGACCGGGCCC
ATCTCCCACTGTGGGAAGGAAATCCAGGGAGGTTTTGGAACACTACCATTGCAGTGTCAATG
GCTAACATCTTTAGGGGGAGCTACTTGGCCGGAGCTGGACTTCTCTTTTCCATCATGAAAAACA
CAACAAACACAAGAAGAGGAACTGGCAACATAGGAGAGACACTTGGAGAAAAATGGAAAAG
TCGATTAAACGCACTGGGGAAAAGTGAATTTCAAATCTACAAGAAAAGTGAATCCAGGAAG

10

20

30

40

TGGATAGAACCCTAGCAAAAGAAGGTATCAAAAGAGGAGAAACGGACCACCATGCTGTGTCG
CGAGGTTTCAGCAAACTGAGATGGTTCGTCGAGAGAAATATGGTCACACCGGAAGGGAAGGT
GGTGGATCTCGGTTGCGGCAGAGGGGGCTGGTCATACTATTGCGGGGGACTAAAGAATGTAAG
AGAAGTCAAAGGCCTAACAAAAGGAGGACCAGGACATGAAGAACCCATCCCCATGTCAACAT
ATGGGTGGAATCTAGTGCGTCTGCAAAGTGGAGTTGACGTTTTCTTCACCCCGCCAGAAAAGT
GTGATACATTGTTGTGTGACATAGGGGAGTCGTACCAAATCCCACGATAGAAGCAGGACGAA
CACTCAGAGTCCTCAACTTAGTGGAATAATTGGTTGAACAATAACACCCAATTTTGCATAAAGG
TCCTCAACCCATATATGCCTTCAGTCATAGAAAAAATGGAAGCATTACAAAGGAAATATGGAG
GAGCCTTAGTGAGGAATCCACTCTCACGAACTCCACGCATGAAATGTACTGGGTATCTAATG
CCACCGGGAACATAGTGTCTCAGTGAACATGATTTCAAGGATGTTGATTAACAGATTACAA
TGAAACACAAGAAAGCCACTTACGAGCCAGATGTTGACCTAGGAAGTGGAACCCGCAACATT
GGAATTGAAAGTGAGATACCAAATCTAGACATAATAGGAAAGAGAATAGAGAAAATAAAACA
AGAGCATGAAACATCATGGCACTATGATCAAGACCACCCATACAAAACGTGGGCTTACCATGG
CAGCTATGAAACAAAACAACTGGATCAGCATCATCTATGGTGAACGGAGTGGTCAGATTGCT
GACAAAACCTTGGGACGTCGTCCCTATGGTGACACAGATGGCAATGACAGACACGACTCCTTT
TGGACAACAGCGCGTTTTCAAAGAGAAAGTAGACACGAGAACCCAAGAACCGAAGGAAGGCA
CAAAGAACTGATGAAAATTACGGCAGAGTGGCTTTGGAAAGAACTAGGAAAGAAAAAGACA
CCTAGGATGTGTACCAGAGAAGAATTCACAAGAAAAGTGAGAAGCAATGCAGCCTTGGGGGC
CATATTCATGATGAGAACAAATGGAATCGGCACGTGAGGCTGTTGAAGATGGTAGGTTCTG
GGAGCTGGTTGACAGGGAAAGAAATCTCCATCTTGAAGGAAAAGTGTGAAACATGTGTGTACA
ACATGATGGGAAAAAGAGAGAAGAACTAGGGGAGTTCGGCAAGGCAAAAGGTAGCAGAGC
CATATGGTACATGTGGCTTGGAGCACGCTTCTTAGAGTTTGAAGCCCTAGGATTCCTGAATGAA
GATCACTGGTTCTCCAGAGGGAACCTCCTGAGTGGAGTGGAAGGAGAAGGGCTGCACAGGCT
AGGCTACATTTTAAGAGACGTGGGCAAGAAGGAAGGGGGGGCAATGTACGCCGATGATACAG
CAGGATGGGACACAAGAATCACACTAGAAGACTTAAAAAATGAAGAAATGGTAACGAACCAC
ATGAAAGGAGAACACAAGAACTAGCCGAGGCCATATTCAAATAACGTACCAAAACAAGGT
GGTGCCTGTGCAAAGACCAACACCAAGAGGTACAGTAATGGATATCATATCGAGAAGAGACC
AAAGAGGCAGTGGGCAAGTCGGCACCTATGGCCTTAATACCTTCACCAATATGGAAGCCCAAT
TAATTAGACAGATGGAGGGAGAAGGAATCTTCAAAAGCATTACAGCACCTGACAGCCACAGAA
GAAATCGCTGTACAGAACTGGCTAGCAAGAGTGGGGCGTGAAAGGCTATCAAGAATGGCAAT
CAGTGGAGATGATTGTGTTGTAAAACCTATAGATGACAGATTTGCAAGTGCTTTAACAGCTCTA
AATGACATGGGAAAAGTTAGAAAAGATATACAACAATGGGAACCTTCAAGAGGATGGAACGA
TTGGACACAAGTGCCTTTCTGTTACACCACTTTTCATGAGTTAGTCATGAAAGATGGTCGCGTG
CTCGTAGTCCCATGCAGAAACCAAGATGAACTGATTGGTAGAGCCCGAATTTCCAGGGAGCT
GGGTGGTCTTTGAAAGAGACGGCCTGTTTGGGAAAGTCTTACGCCCAAATGTGGACTCTGATG
TACTTCCACAGACGTGACCTCAGACTGGCGGCAAATGCCATCTGCTCGGCAGTCCCGTCACATT
GGGTTCACAAAGTCGAACAACCTGGTCCATACACGCTAAGCATGAATGGATGACGACGGAA

10

20

30

40

50

GACATGCTGGCAGTCTGGAACAGGGTGTGGATCCAAGAAAACCCGTGGATGGAAGATAAAAC
TCCAGTGGAATCATGGGAAGAAGTCCCATACTTGGGAAAAAGAGAAGACCAATGGTGCGGCT
CATTGATTGGGCTAACAAGCAGGGCTACCTGGGCAAAGAACATCCAAACAGCAATAAATCAA
GTCAGATCCCTTATAGGCAATGAGGAATACACAGACTACATGCCATCCATGAAGAGATTTAGA
AGGGAAGAGGAAGAGGCAGGTGTCCTGTGGTAGAAGGCAAACTAACATGAAACAAGGCTAA
AAGTCAGGTCCGATTAAGCCATAGTACGGAAAAAACTATGCTACCTGTGAGCCCCGTCCAAGG
ACGTTAAAAGAAGTCAGGCCATCACAAAATGCCACAGCTTGAGTAAACTGTGCAGCCTGTAGC
TCCACCTGAGGAGGTGTAAAAAACCTGGGAGGCCACAAACCATGGAAGCTGTACGCATGGCG
TAGTGGACTAGCGGTAGAGGAGACCCCTCCCTTACAAATCGCAGCAAACAACGGGGGCCCCA
AGGTGAGATGAAGCTGTAATCTCACTGGAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCCCAAAAC
AAAAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTCAGCATCATTCCA
GGCACAGAACGCCAGAAAATGGAATGGTGCTGTTGAATCAACAGGTTCT

10

SEQ ID NO: 5 – DENV-3-VE-BID-V2268-2008

AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAGAACAGTTTCGACTCGGAAGCTTGCTTAACGTAGTGCT
AACAGTTTTTTATTAGAGAGCAGATCTCTGATGAACAACCAACGGAAGAAGACGGGAAAAAC
GTCTATCAATATGCTGAAACGCGTGAGAAACCGTGTGTCAACTGGATCACAGTTGGCGAAGAG
ATTCTCAAAAGGACTGCTGAACGGCCAGGGACCAATGAAATTGGTTATGGCGTTCATAGCTTT
CCTCAGATTTCTAGCCATTCCACCAACAGCAGGAGTCTTGGCTAGATGGGGAACCTTCAAGAA
GTCGGGGGGCCATTAAGGTCTGAAAGGCTTTAAGAAGGAGATCTAAACATGCTGAGCATAAT
CAACAAACGGAAAAAGACATCGCTCTGTCTCATGATGATATTGCCAGCAGCACTTGCTTTCCA
CTTGACTTCACGAGATGGAGAGCCGCGCATGATTGTGGGGAAGAATGAAAGAGGAAAATCCC
TACTTTTTAAGACAGCCTCTGGAATTAACATGTGCACACTCATAGCCATGGACTTGGGAGAGAT
GTGTGATGACACGGTCACTTACAAATGCCCCCATATTACCGAAGTGGAACCTGAAGACATTGA
CTGCTGGTGCAACCTCACATCAACATGGGTGACTTATGGAACGTGCAATCAAGCCGGAGAGCA
TAGACGCGATAAGAGATCAGTGGCGTTAGCTCCCCATGTCGGCATGGGACTGGATACACGCAC
CCAAACTTGGATGTCCGGCTGAAGGAGCTTGGAGGCAAGTCGAGAAGGTAGAGACATGGGCCC
TTAGGCACCCAGGGTTCACCATACTAGCCCTATTTCTTGCCATTACATAGGCACTTCCTTGAC
CCAGAAGGTGGTTATTTTTATACTGCTAATGCTGGTCACCCCATCCATGACAATGAGATGTGTG
GGAGTAGGAAACAGAGATTTTGTGGAAGGACTATCAGGAGCTACGTGGGTTGACGTGGTGCTC
GAGCACGGGGGGTGTGTGACCACCATGGCTAAGAACAAGCCCACGTTGGATATAGAGCTTCA
GAAGACCGAGGCCACCAACTGGCGACCCTAAGGAAGCTATGCATTGAGGGGAAAATCACCA
ACATAACAACCTGACTCAAGATGTCCTACCCAAGGGGAAGCGGTTTTGCCTGAGGAGCAGGACC
AAAACCTACGTGTGTAAGCATACATACGTAGACAGAGGCTGGGGGAACGGATGTGGTTTGTGTTG
GTAAGGGAAGCTTGGTAACATGTGCGAAATTTCAATGCCTGGAACCAATAGAGGGAAAAAGTG
GTGCAATATGAGAACCTCAAATACACCGTTATCATCACAGTGACACAGGAGACCAACACCAG
GTGGGAAATGAAACGCAGGGAGTCACGGCTGAGATAACACCTCAGGCATCAACCACTGAAGC

20

30

40

50

CATCTTGCTGAATATGGAACCCCTTGGGCTAGAATGCTCACCGACAGGTTTGGACTIONCAAT
GAAATGATCTTGCTAACAAATGAAGAACAAGCATGGATGGTACATAGACAATGGTTTTTTGAC
CTACCTCTACCATGGACATCAGGAGCTACAACGGAAACACCAACCTGGAACAGGAAGGAGCT
TCTTGTGACATTTAAAAACGCACATGCGAAGAAACAAGAAGTAGTTGTTCTTGGGTCGCAAGA
GGGAGCAATGCATACCGCATTGACAGGAGCCACAGAAATCCAAAACCTCAGGAGGCACAAGCA
TTTTTGCGGGGCACTTAAAATGTAGACTTAAGATGGACAAATTAGAACTCAAGGGGATGAGCT
ATGCAATGTGCACGAATACCTTTGTGTTGAAGAAAAGAAGTCTCAGAAACGCAGCATGGGACAA
TACTTATCAAGGTCGAGTACAAAGGGGAAGATGTACCTTGCAAGATTCTTTCTCCACAGAGG
ATGGACAAGGGAAAGCTCACAATGGCAGACTGATTACAGCCAACCCAGTGGTGACTAAGAAG
GAGGAGCCTGTCAATATTGAGGCTGAACCTCCTTTTGGGGAAAAGCAATATAGTAATTGGAATT
GGAGACAACGCCTTGAAAATCAACTGGTACAAGAAGGGAAGCTCTATTGGGAAGATGTTGCA
GGCCACTGCTAGAGGTGCAAGGCGCATGGCCATCTTGGGAGACACAGCTTGGGACTTTGGATC
AGTGGGTGGTGTCTGAACTCATTAGGCCAAAATGGTGCACCAAATATTCGGAAGTGCTTACAC
AGCCCTATTTCAGTGGAGTCTCTTGGGTAATGAAAATTTGGAATAGGAGTTCTCTTGACTTGGATA
GGGTTGAATTCAAAAAACACATCCATGTCATTTTCATGCATTGCGATAGGAATCATCACACTCT
ATCTGGGAGCTGTGGTGCAAGCTGACATGGGGTGTGTTATAAACTGGAAAGGCAAAGAACTCA
AGTGTGGAAGTGGAATCTTCGTCACCAACGAGGTCCATACCTGGACAGAGCAATACAAATTCC
AAGCAGACTCCCCAAAAAGATTGGCGACAGCCATTGCAGGCGCTTGGGAGAATGGAGTGTGC
GGAATTAGGTCAACAACCAGAATGGAGAATCTCCTGTGGAAGCAAATAGCCAATGAACTGAA
CTACATATTGTGGGAAAACAATATCAAATTAACGGTTGTGTGGGCGATATAATTGGGGTCTTA
GAGCAAGGGAAAAGAACAATAACACCACAACCCATGGAGCTAAAATACTCATGGAAAACGTG
GGGAAAGGCAAAAATAGTGACAGCTGAAACACAAAATTCTTCTTTCATAATAGATGGACCAA
ACACACCGGAGTGTCCAAGTGCCTCAAGAGCATGGAATGTGTGGGAGGTGGAAGATTACGGG
TTCGGAGTCTTCACAACCAACATATGGCTGAAAACCTCCGAGAGGTGTATACCCAACCTATGTGAC
CATAGGTAAATGTGCGCAGCCGTCAAGGATGAAAGGGCCGTACATGCCGACATGGGCTATTGG
ATAGAAAGTCAAAAGAATGGAAGTTGGAAGCTAGAAAAAGCATCCCTCATAGAGGTGAAAAC
CTGCACATGGCCAAAATCACATACCCTTTGGAGTAATGGTGTGTTAGAGAGTGACATGATCAT
TCCAAAAAGTCTAGCTGGTCTTATCTCGCAACACAACCTACAGGCCCGGGTACCACACCCAGAC
GGCGGGACCTTGGCATTAGGAAAATTAGAGCTGGACTTCAACTATTGTGAAGGAACAACAGT
TGTCATCACAGAAAACCTGTGGGACAAGAGGCCCATCATTGAGAAACAACAACAGTGTGAGGGA
AGTTAATACACGAATGGTGTGCGCTCGTGCACACTTCCTCCCCTGCGATACATGGGAGAAG
ACGGTTGCTGGTATGGCATGGAAATCAGACCCATCAGTGAGAAAGAAGAAAAACATGGTAAAG
TCTTTAGTCTCAGCGGAAGTGGAGAGGTGGACAACCTCACAATGGGTGTCTTGTGTTTGGCA
ATCCTCTTTGAAGAGGTGATGAGAGGAAAATTTGGGAAGAAACACATGATTGCGGGGGTTTTTC
TTCACGTTTGTACTCCTTCTCTCAGGGCAAATAACATGGAGAGATATGGCGCACACACTAATAA
TGATTGGGTCCAATGCATCTGACAGGATGGGAATGGGCGTCACCTACCTAGCTTTAATTGCAA
CATTTAAATCCAGCCATTTTTGGCTTTGGGATTTTTCCTAAGAAAACCTGACATCCAGAGAAAA

10

20

30

40

50

TTTATTGTTAGGAGTTGGGCTGGCTATGGCAACAACGTTACAACCTGCCAGAGGACATTGAACA
AATGGCAAATGGAATCGCTCTGGGGCTCATGGCTCTCAAACCTGATAACACAATTTGAAACATA
CCAACTATGGACAGCATTAAATCTCCTTAACGTGTTCAAATACAATTTTTACGTTGACTGTTGCC
TGGAGAACAGCCACCCTGATTTTGGCTGGAGTTTCACTTTTACCAGTGTGCCAGTCTTCGAGTA
TGAGGAAAACAGACTGGCTTCCAATGACAGTGGCAGCTATGGGAGTTCCACCTCTACCACTTT
TTATTTTTAGCTTAAAAGACACACTCAAAAGGAGAAGCTGGCCACTGAATGAAGGGGTGATGG
CTGTTGGGCTTGTGAGCATTCTGGCCAGTTCTCTCCTTAGAAATGATGTACCCATGGCTGGACC
ATTAGTGGCCGGGGGCTTGCTGATAGCGTGCTACGTCATAACTGGCACGTCAGCAGACCTCAC
CGTAGAAAAAGCAGCAGATGTAACATGGGAGGAAGAGGCTGAGCAAACAGGAGTGTCACACA
ACTTAATGATCACAGTTGATGATGATGGAACAATGAGAATAAAAGATGATGAGACTGAGAAT
ATCTTAACAGTGCTTTTTGAAAACAGCATTACTAATAGTGTGTCAGGAATCTTTCCATACTCCATAC
CCGCAACATTGTTGGTCTGGCATACTTGGCAAAAAGCAAACCCAAAGATCCGGCGTTCTATGGG
ATGTACCCAGCCCTCCAGAGACACAGAAAGCAGAACTGGAAGAAGGGGTCTATAGGATCAAA
CAGCAAGGAATTTTTGGGAAAACCCAAGTAGGGGTGGAGTACAGAAAAGAAGGAGTCTTTCA
CACCATGTGGCACGTTACAAGAGGGGCAGTGTGACATATAATGGGAAAAGACTGGAACCAA
ATTGGGCTAGCGTGAAAAAAGATCTGATTTTCATACGGAGGAGGATGGAGATTGAGCGCACAA
TGGCAAAAGGGGGAGGAGGTGCAGGTTATTGCCGTAGAGCCTGGGAAGAACCCAAAGAACTT
TCAAACCATGCCAGGCACCTTTTCAGACTACAACAGGGGAAATAGGAGCAATTGCACTGGATTT
CAAGCCCGAACTTCAGGATCTCCTATCATAAACAGAGAGGGAAAGGTAGTGGGACTGTATG
GCAATGGAGTGGTTACAAAGAATGGTGGCTACGTCAGCGGAATAGCGCAAACGAATGCAGAA
CCAGATGGACCGACACCAGAATTGGAAGAAGAGATGTTCAAAAAGCGAAATCTAACCATAAT
GGATCTTCATCCTGGGTCAGGAAAGACACGGAAATACCTTCCAGCTATTGTTAGAGAGGCAAT
CAAGAGACGTTTGAGAACTCTAATTCTGGCACCAACAAGGGTGGTTGCAGCTGAGATGGAAGA
AGCATTGAAAGGGCTCCCAATAAGGTACCAACAACAGCAACAAAATCTGAACACACAGGAA
GAGAGATTGTTGATCTGATGTGCCACGCAACGTTCACAATGCGTCTGCTGTACCAGTTAGGGT
TCCAAACTATAACTTGATAATAATGGATGAAGCCCATTTACAGACCCAGCCAGTATAGCTGC
TAGAGGGTACATATCAACTCGTGTGGAAATGGGAGAAGCAGCCGCAATATTCATGACAGCAAC
GCCCCCTGGAACAGCTGATGCCTTTCCCCAGAGCAACGCTCCAATTCAAGATGAAGAAAGGGA
CATACCAGAACGCTCATGGAATTCAGGCAATGAATGGATAACCGACTTCGCTGGGAAAACGGT
GTGGTTTGTCCCCAGCATTAAAGCCGGAATGACATAGCAAATTGCCTGCGGAAAAACGGGAA
AAAGGTCATTCAACTTAGTAGGAAGACTTTTGACACAGAATATCAGAAAACCAAACCTGAATGA
TTGGGACTTTGTGGTGACGACTGACATTTAGAAAATGGGGGCCAATTTCAAAGCAGATAGAGT
GATCGACCCAAGAAGATGTCTCAAACCAGTGATCCTGACAGATGGACCAGAGCGGGTGATCCT
GGCTGGACCAATGCCAGTCACCGCAGCGAGTGCTGCGCAAAGGAGAGGGAGAGTTGGCAGGA
ACCCACAAAAAGAAAATGACCAGTACATATTCACGGGCCAGCCTCTCAACAATGATGAAGAC
CATGCTCACTGGACAGAAGCAAAAATGCTGCTGGACAACATTAACACACCAGAAGGGATCAT
ACCAGCTCTCTTTGAGCCAGAAAGGAGAAGTCAGCCGCCATAGACGGTGAGTATCGCCTGAA

10

20

30

40

50

AGGTGAGTCCAGGAAGACTTTCGTGGAACATGAGGAGGGGTGACCTTCCAGTCTGGTTAGC
CCATAAAGTAGCATCAGAAGGGATCAAATATACAGATAGAAAATGGTGCTTTGATGGACAAC
GTAATAATCAAATTTTGAAGAGAACATGGATGTGGAAATCTGGACAAAGGAAGGAGAAAAG
AAAAAATTGAGACCTAGGTGGCTTGATGCTCGCACCTATTCAGATCCCTTAGCACTCAAGGAA
TTCAAGGACTTTGCGGCTGGCAGGAAGTCAATAGCCCTTGATCTTGTGACAGAAATAGGAAGA
GTGCCCTTCACACCTAGCTCATAGAACGAGAAACGCTCTGGACAATCTGGTGATGCTGCATACG
TCAGAACATGGCGGTAAGGCCTACAGGCATGCGGTGGAGGAACTACCAGAGACAATGGAAAC
ACTCCTACTCTTGGGACTCATGATCTTGTGACAGGTGGAGCAATGCTTTTCTTAATATCAGGT
AAAGGGATTGGAAAGACTTCAATAGGACTCATTTGTGTAATTGCTTCCAGCGGCATGTTGTGG
ATGGCCGAAATCCCCTCCAATGGATCGCGTCGGCCATAGTCCTGGAGTTTTTTATGATGGTGT
TGCTTATACCAGAACCAGAGAAGCAGAGAACCCCCAAGACAACCAACTCGCATATGTCGTGA
TAGGCATACTTACACTGGCAGCAATAATAGCAGCCAATGAAATGGGATTGTTGGAAACTACAA
AGAGAGATTTAGGAATGTCTAAGGAGCCAGGTGTTGTTTCTCCAACCAGCTATTTAGATGTGG
ACTTGCACCCAGCATCAGCCTGGACATTGTACGCTGTGGCCACTACAGTAATAACACCAATGT
TAAGACATACCATAGAGAATTCCACAGCAAATGTGTCTTGGCAGCTATAGCCAACCAGGCAG
TGGTCCTGATGGGTTTGGACAAAGGATGGCCAAATCAAAAATGGACTTAGGAGTACCCCTGC
TGGCATTGGGTTGCTATTACAAAGTGAACCCACTGACTCTAACAGCGGCAGTACTCTTGCTGAT
CACACATTATGCCATTATAGGTCCAGGATTGCAGGCAAAAGCCACCCGTGAAGCTCAGAAAAG
GACAGCTGCTGGAATAATGAAGAATCCAACAGTGGATGGGATAATGACAATAGACCTAGATC
CTGTAATATATGATTCAAAATTTGAAAAGCAACTGGGACAGGTTATGCTCCTGGTTTTGTGTGC
AGTTCAACTTTTGTAAATGAGAACATCATGGGCCTTGTGTGAAGCTTTAACCCTAGCTACAGGA
CCAATAACAACACTCTGGGAAGGATCACCTGGGAAGTTTTGGAACACCACGATAGCTGTTTCC
ATGGCGAACATTTTATAGAGGGAGCTATTTAGCAGGAGCTGGGCTTGCTTTCTCTATTATGAAAT
CAGTTGGAACAGGGAAGAGGAACAGGCTCACAGGGTGAACTTTGGGAGAAAAATGGAA
AAAGAAGTTAAATCAATTATCCCGGAAAGAGTTTGACCTTTACAAGAAATCTGGAATCACTGA
GGTGGATAGAACAGAAGCCAAAGAAGGGTTGAAAAGAGGAGAAATAACACATCATGCCGTGT
CCAGAGGTAGTGCAAACTTCAATGGTTTGTGGAGAGAAACATGGTCATTCCCGAAGGAAGA
GTTATAGACTTGGGCTGTGGAAGAGGAGGCTGGTCATTTACTGTGCAGGACTGAAAAAGTC
ACAGAAGTGCGAGGATACACAAAAGGCGGTCCAGGACACGAAGAACCAGTACCTATGTCCAC
ATATGGATGGAACATAGTTAAGTTAATGAGTGGAAAGGATGTGTTTTATCTTCCACCTGAAAA
GTGTGACACCTGTTGTGCGACATTGGAGAATCTTCACCAAGCCCAACAGTGAAGAAAGCAG
AACTATAAGAGTTTTGAAGATGGTTGAACCATGGCTAAAGAACAACCAATTTTGTATTAAAGT
ATTGAACCTTACATGCCAACTGTGATTGAGCACCTAGAAAAGACTACAAAGGAAACATGGAGG
AATGCTTGTGAGAAATCCACTTTCACGAAACTCCACGCACGAAATGTACTGGATATCCAATGG
CACAGGTAACATTGTCGCTTCAGTCAACATGGTATCTAGACTGCTACTGAACAGGTTACGATG
ACACACAGAAGACCCACCATTGAGAAAGATGTGGATTTAGGAGCAGGAACTCGACATGTTAA
TGCGGAACCAGAAACACCCAACATGGATGTCATTGGGGAAAGAAATAAAAGGATCAAGGAGG

10

20

30

40

50

AGCATAATTCAACATGGCACTACGATGACGAAAACCCCTACAAAACGTGGGCTTACCATGGAT
CTTATGAAGTCAAAGCCACAGGCTCAGCCTCCTCCATGATAAATGGAGTCGTGAACTCCTCA
CTAAACCATGGGATGTGGTGCCCATGGTGACACAGATGGCAATGACAGATACAACTCCATTTG
GCCAGCAGAGAGTCTTTAAAGAGAAAAGTGACACACAGGACACCCAGGTCCATGCCAGGAACA
AGAAGGGTTATGGGGATCACAGCGGAGTGGCTCTGGAGAACCCTGGGAAGGAATAAAAAACC
CAGGTTATGCACAAGGGAAGAGTTTACAAAAAAGGTCAGAACTAACGCAGCCATGGGAGCTG
TTTTACAGAGGAGAACCAATGGGACAGCGCGAAAAGCTGCTGTTGAGGATGAGGATTTTTGGA
AACTTGTGGACAGAGAACGTGAACCTCCACAACTGGGCAAGTGTGGAAGCTGTGTTTACAACA
TGATGGGTAAGAGAGAGAAGAACTTGGAGAGTTTGGCAAAGCAAAAGGCAGTAGAGCTATA
TGGTACATGTGGTTGGGAGCCAGGTACCTTGAGTTCGAAGCCCTTGGATTCTTAAATGAAGAC
CACTGGTTCTCGCGTGAGAACTCTTACAGTGGAGTGGAAAGGAGAAGGACTGCACAAGCTAGGC
TATATATTAAGGGACATTTCCAAGATACCCGGAGGAGCTATGTATGCTGATGACACAGCTGGT
TGGGACACAAGAATAACAGAAGATGACCTGCACAATGAGGAAAAGATCACACAGCAAATGGA
CCCTGAACACAGGCAGTTAGCGAACGCTATATTTAAGCTCACATACCAAAACAAAGTGGTCAA
AGTTCAACGACCGACTCCAACAGGCACGGTAATGGATATCATATCTAGGAAAGACCAAAAGAG
GCAGTGGACAGGTAGGAACTTATGGTCTGAATACATTCACCAACATGGAAGCCCAGTTAATCA
GACAAATGGAAGGAGAAGGTGTGCTGTCAAAGGCAGACCTCGAGAACCCTCATCTGCCAGAG
AAGAAAATTACACAATGGTTGGAAACCAAGGAGTGGAGAGGTTAAAAAGAATGGCCATAAG
TGGGGATGACTGCGTGGTGAAACCAATCGATGACAGGTTGCTAATGCCCTGCTCGCTCTGAA
CGACATGGGAAAGGTTGCGAAAGACATACCTCAATGGCAGCCATCAAAGGGATGGCATGATT
GGCAACAGGTTTCCTTCTGCTCCCACTTTTCATGAATTGATCATGAAAGATGGAAGAAAAGTT
GGTGGTTCCCTGCAGACCCCAGGACGAACTAATAGGAAGGGCAAGAATCTCTCAAGGAGCGG
GATGGAGCCTTAGAGAAACCGCATGTCTGGGGAAAGCCTACGCTCAAATGTGGAGTCTCATGT
ATTTTCACAGAAGAGACCTCAGACTAGCATCCAACGCCATATGTTTCAGCAGTACCAGTCCACT
GGGTCCCCACAAGTAGAACGACATGGTCTATTACGCTCACCATCAGTGGATGACCACAGAAG
ACATGCTTACTGTCTGGAACAGAGTGTGGATCGAGGACAATCCATGGATGGAAGACAAAACCTC
CAGTCACAACCTGGGAAAATGTTCCATATCTAGGGAAGAGAGAAGACCAATGGTGCGGATCA
CTTATTGGTCTCACTTCCAGAGCAACCTGGGCCCAGAACATACCCACAGCAATTCAACAGGTT
AGAAGCCTTATAGGCAATGAAGAGTTTCTGGACTACATGCCTTCAATGAAGAGATTTAGGAAG
GAGGAGGAGTCGGAGGGAGCCATTTGGTAAACGTCAGGAAGTGAAAAAGAGGTTAACTGTCA
GGCCATATTAAGCCACAGTACGGAAGAAGCTGTGCTGCCTGTGAGCCCCGTCCAAGGACGTTA
AAAGAAGAAGTCAGGCCCCAAAGCCACGGTTTGAGCAAACCGTGCTGCCTGTAGCTCCGTCGT
GGGGACGTAAACCTGGGAGGCTGCAAACTGTGGAAGCTGTACGCACGGTGTAGCAGACTAG
CGTTAGAGGAGACCCCTCCCATGACACAACGCAGCAGCGGGGCCCCGAGCACTGAGGGAAGC
TGTACCTCCTTGCAAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCCGCAAATAAAAAACAGCATATTG
ACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTCAGCATCATTCAGGCACAGAACGCCAGA
AAATGGAATGGTGTGTTGAATCAACAGGTTCT

10

20

30

40

50

SEQ ID NO: 6 – DENV-3-VE-BID-V2268-2008-E-Min

AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAGAACAGTTTCGACTCGGAAGCTTGCTTAACGTAGTGCT
AACAGTTTTTTATTAGAGAGCAGATCTCTGATGAACAACCAACGGAAGAAGACGGGAAAACC
GTCTATCAATATGCTGAAACGCGTGAGAAACCGTGTGTCAACTGGATCACAGTTGGCGAAGAG
ATTCTCAAAGGACTGCTGAACGGCCAGGGACCAATGAAATTGGTTATGGCGTTCATAGCTTT
CCTCAGATTTCTAGCCATTCCACCAACAGCAGGAGTCTTGGCTAGATGGGGAACCTTCAAGAA
GTCGGGGGGCCATTAAGGTCTGAAAGGCTTTAAGAAGGAGATCTCAAACATGCTGAGCATAAT
CAACAAACGGAAAAAGACATCGCTCTGTCTCATGATGATATTGCCAGCAGCACTTGCTTTCCA
CTTGACTTCACGAGATGGAGAGCCGCGCATGATTGTGGGGAAGAATGAAAGAGGAAAAATCCC
TACTTTTTTAAGACAGCCTCTGGAATTAACATGTGCACACTCATAGCCATGGACTTGGGAGAGAT
GTGTGATGACACGGTCACTTACAAATGCCCCCATATTACCGAAGTGGAACCTGAAGACATTGA
CTGCTGGTGCAACCTCACATCAACATGGGTGACTTATGGAACGTGCAATCAAGCCGGAGAGCA
TAGACGCGATAAGAGATCAGTGGCGTTAGCTCCCCATGTCGGCATGGGACTGGATACACGCAC
CCAAACTTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTGGAGGCAAGTCGAGAAGGTAGAGACATGGGCCC
TTAGGCACCCAGGGTTCACCATACTAGCCCTATTTCTTGCCCATACATAGGCACTTCCTTGAC
CCAGAAGGTGGTTATTTTTTATACTGCTAATGCTGGTCACCCCATCCATGACAATGAGATGCGTG
GGCGTAGGGAATAGAGACTTTGTAGAGGGATTGAGCGGAGCGACATGGGTGACGTCGTACT
CGAACACGGGGGGTGCGTGACGACTATGGCTAAGAATAAGCCTACACTCGATATCGAACTGCA
AAAAACCGAAGCGACACAATTGGCGACATTGCGCAAACTATGTATCGAAGGTAAGATTACGA
ACATTACAACCGATAGTAGATGCCCTACACAAGGCGAAGCCGTTCTACCTGAGGAGCAAGACC
AAAACCTACGTATGTAAGCATACATACGTGATAGGGGGTGGGGGAACGGATGCGGATTGTTTCG
GTAAGGGGTGATTGGTTCATGCGCTAAGTTCCAATGCTTAGAGCCTATCGAGGGTAAGGTGG
TACAATACGAAAACCTTAAGTATACCGTGATAATTACAGTTCATACCGGAGACCAACACCAAG
TGGGAAACGAGACACAGGGAGTGACAGCCGAAATTACGCCTCAGGCTAGTACAACCGAAGCG
ATACTACCCGAATACGGAACATTGGGGTGGAGTGTTCACCTAGAACCGGATTGGACTTTAAC
GAAATGATACTGTTGACTATGAAAAACAAGGCATGGATGGTGCATAGGCAATGGTTTTTTGAC
CTACCATTGCCCTGGACTAGCGGAGCGACAACCGAAACACCTACATGGAATAGAAAAGAGCTC
CTAGTGACATTTAAAAACGCTCACGCTAAGAAGCAGGAAGTGGTCGTTTTAGGGTCACAGGAG
GGAGCTATGCATACCGCACTAACCGGAGCGACTGAGATACAGAATAGCGGAGGGACATCAAT
CTTCGCCGGACACCTTAAGTGATGAAAAATGGACAACTTGAGCTTAAGGGGATGTCATA
CGCTATGTGTACGAACACATTTCGTGCTGAAAAAAGAGGTAAGCGAAACGCAACACGGAACGA
TACTGATTAAGGTTGAGTATAAGGGCGAAGACGTCCCATGTAAGATACCTTTTTTCGACAGAGG
ACGGACAGGGTAAGGCCCATACGGAAGACTGATTACCGCTAACCCAGTGGTGACCAAAAAA
GAGGAACCACTCAATATCGAAGCCGAACCTCCATTCGGAGAGTCAAACATAGTGATAGGGAT
AGGCGATAACGCACTTAAGATTAAGTGGTACAAAAAAGGGTCATCAATCGGTAAGATGTTTGA
GGCAACCGCTAGGGGGCTAGACGGATGGCCATACTCGGAGACACCGCATGGGACTTCGGAT

10

20

30

40

50

CCGTGGGGGGGGTACTTAACTCACTCGGTAAAGATGGTGCACCAAATTTTCGGATCCGCATATA
CCGCTCTATTTAGCGGAGTGTTCATGGGTGATGAAAATCGGAATCGGAGTTCTATTGACATGGA
TCGGATTGAACTCTAAGAATACATCTATGTTCATTTTCATGTATCGCAATCGGAATTATTACGCT
ATATCTCGGAGCCGTAGTGCAAGCCGACATGGGGTGTGTTATAAACTGGAAAGGCAAAGAACT
CAAGTGTGGAAGTGGAAATCTTCGTACCAACGAGGTCCATACCTGGACAGAGCAATACAAATT
CCAAGCAGACTCCCCAAAAAGATTGGCGACAGCCATTGCAGGCGCTTGGGAGAATGGAGTGT
GCGGAATTAGGTCAACAACCAGAATGGAGAATCTCCTGTGGAAGCAAATAGCCAATGAACTG
AACTACATATTGTGGGAAAACAATATCAAATTAACGGTTGTTGTGGGCGATATAATTGGGGTCT
TTAGAGCAAGGGAAAAGAACAATAACACCACAACCCATGGAGCTAAAATACTCATGGAAAAC
GTGGGGAAAAGGCAAAAATAGTGACAGCTGAAACACAAAATTCTTCTTTCATAATAGATGGACC
AAACACACCGGAGTGTCCAAGTGCCTCAAGAGCATGGAATGTGTGGGAGGTGGAAGATTACG
GGTTCGGAGTCTTCACAACCAACATATGGCTGAAACTCCGAGAGGTGTATACCCAACATATGTG
ACCATAGGTTAATGTTCGGCAGCCGTCAAGGATGAAAGGGCCGTACATGCCGACATGGGCTATT
GGATAGAAAAGTCAAAAGAATGGAAGTTGGAAGCTAGAAAAAGCATCCCTCATAGAGGTGAAA
ACCTGCACATGGCCAAAATCACATACCCTTTGGAGTAATGGTGTGTTAGAGAGTGACATGATC
ATTCCAAAAAGTCTAGCTGGTCTTATCTCGCAACACAACACTACAGGCCCGGGTACCACACCCAG
ACGGCGGGACCTTGGCATTAGGAAAATTAGAGCTGGACTTCAACTATTGTGAAGGAACAACA
GTTGTATCACAGAAAAGTGTGGGACAAGAGGCCCATCATTGAGAACAACAACAGTGTGACG
GAAGTTAATACACGAATGGTGTCTGCCGCTCGTGCACACTTCCTCCCCTGCGATACATGGGAGA
AGACGGTTGCTGGTATGGCATGGAAATCAGACCCATCAGTGAGAAAGAAGAAAACATGGTAA
AGTCTTTAGTCTCAGCGGGAAGTGGAGAGGTGGACAACCTTCACAATGGGTGTCTTGTGTTTGG
CAATCCTCTTTGAAGAGGTGATGAGAGGAAAATTTGGGAAGAAAACATGATTGCGGGGGTTT
TCTTCACGTTTGTACTCCTTCTCTCAGGGCAAATAACATGGAGAGATATGGCGCACACACTAAT
AATGATTGGGTCCAATGCATCTGACAGGATGGGAATGGGCGTCACCTACCTAGCTTTAATTGC
AACATTTAAAAATCCAGCCATTTTTGGCTTTGGGATTTTTCTTAAGAAAAGTACATCCAGAGAA
AATTTATTGTTAGGAGTTGGGCTGGCTATGGCAACAACGTTACAACCTGCCAGAGGACATTGAA
CAAATGGCAAATGGAATCGCTCTGGGGCTCATGGCTCTCAAACCTGATAACACAATTTGAAACA
TACCAACTATGGACAGCATTAAATCTCCTTAACGTGTTCAAATACAATTTTTACGTTGACTGTTG
CCTGGAGAACAGCCACCCTGATTTTGGCTGGAGTTTCACTTTTACCAGTGTGCCAGTCTTCGAG
TATGAGGAAAACAGACTGGCTTCCAATGACAGTGGCAGCTATGGGAGTTCCACCTCTACCACT
TTTTATTTTTAGCTTAAAAGACACACTCAAAGGAGAAGCTGGCCACTGAATGAAGGGGTGAT
GGCTGTGGGCTTGTGAGCATTCTGGCCAGTTCTCTCCTTAGAAATGATGTACCCATGGCTGGA
CCATTAGTGGCCGGGGGCTTGCTGATAGCGTGCTACGTCATAACTGGCACGTCAGCAGACCTC
ACCGTAGAAAAAGCAGCAGATGTAACATGGGAGGAAGAGGCTGAGCAAACAGGAGTGTCCCA
CAACTTAATGATCACAGTTGATGATGATGGAACAATGAGAATAAAAGATGATGAGACTGAGA
ATATCTTAACAGTGCTTTTTGAAAACAGCATTACTAATAGTGTGAGGAATCTTTCCATACTCCAT
ACCCGCAACATTGTTGGTCTGGCATACTTGGCAAAAGCAAACCCAAAGATCCGGCGTTCTATG

10

20

30

40

50

GGATGTACCCAGCCCTCCAGAGACACAGAAAGCAGAACTGGAAGAAGGGGTCTATAGGATCA
AACAGCAAGGAATTTTTGGGAAAACCCAAGTAGGGGTGGAGTACAGAAAGAAGGAGTCTTT
CACACCATGTGGCACGTTACAAGAGGGGCAGTGTTGACATATAATGGGAAAAGACTGGAACC
AAATTGGGCTAGCGTGAAAAAAGATCTGATTTTCATACGGAGGAGGATGGAGATTGAGCGCAC
AATGGCAAAAGGGGGAGGAGGTGCAGGTTATTGCCGTAGAGCCTGGGAAGAACCCAAAGAAC
TTTCAAACCATGCCAGGCACTTTTCAGACTACAACAGGGGAAATAGGAGCAATTGCACTGGAT
TTCAAGCCCCGAACTTCAGGATCTCCTATCATAAACAGAGAGGGAAAGGTAGTGGGACTGTAT
GGCAATGGAGTGGTTACAAAGAATGGTGGCTACGTCAGCGGAATAGCGCAAACGAATGCAGA
ACCAGATGGACCGACACCAGAATTGGAAGAAGAGATGTTCAAAAAGCGAAATCTAACCATAA
TGGATCTTCATCTGGGTACAGAAAGACACGGAAATACCTTCCAGCTATTGTTAGAGAGGCAA
TCAAGAGACGTTTGAGAACTCTAATTCTGGCACCAACAAGGGTGGTTGCAGCTGAGATGGAAG
AAGCATTGAAAGGGCTCCCAATAAGGTACCAAAACAACAGCAACAAAATCTGAACACACAGGA
AGAGAGATTGTTGATCTGATGTGCCACGCAACGTTTACAATGCGTCTGCTGTCACCAGTTAGG
GTTCCAAACTATAACTTGATAATAATGGATGAAGCCCATTTCACAGACCCAGCCAGTATAGCT
GCTAGAGGGTACATATCAACTCGTGTGGAAATGGGAGAAGCAGCCGCAATATTCATGACAGCA
ACGCCCCCTGGAACAGCTGATGCCTTTCCCAGAGCAACGCTCCAATTCAAGATGAAGAAAGG
GACATACCAGAACGCTCATGGAATTCAGGCAATGAATGGATAACCGACTTCGCTGGGAAAAC
GGTGTGGTTTGTCCCCAGCATTAAGCCGGAAATGACATAGCAAATTGCCTGCGGAAAAACGG
GAAAAAGGTCATTCAACTTAGTAGGAAGACTTTTGACACAGAATATCAGAAAACCAAATGA
ATGATTGGGACTTTGTGGTGACGACTGACATTTTCAGAAATGGGGGGCCAATTTCAAAGCAGATA
GAGTGATCGACCCAAGAAGATGTCTCAAACCAAGTGATCCTGACAGATGGACCAGAGCGGGTG
ATCCTGGCTGGACCAATGCCAGTCACCGCAGCGAGTGCTGCGCAAAGGAGAGGGAGAGTTGG
CAGGAACCCACAAAAAGAAAATGACCAGTACATATTCACGGGCCAGCCTCTCAACAATGATG
AAGACCATGCTCACTGGACAGAAGCAAAAATGCTGCTGGACAACATTAACACACCAGAAGGG
ATCATACCAGTCTCTTTGAGCCAGAAAGGGAGAAGTCAGCCGCCATAGACGGTGAGTATCGC
CTGAAAGGTGAGTCCAGGAAGACTTTCTGTGGAATCATGAGGAGGGGTGACCTTCCAGTCTGG
TTAGCCCATAAAGTAGCATCAGAAGGGATCAAATATACAGATAGAAAATGGTGCTTTGATGGA
CAACGTAATAATCAAATTTTAGAAGAGAACATGGATGTGGAAATCTGGACAAAGGAAGGAGA
AAAGAAAAAATTGAGACCTAGGTGGCTTGATGCTCGCACCTATTCAGATCCCTTAGCACTCAA
GGAATTCAAGGACTTTGCGGCTGGCAGGAAGTCAATAGCCCTTGATCTTGTGACAGAAATAGG
AAGAGTGCCTTCACACCTAGCTCATAGAACGAGAAACGCTCTGGACAATCTGGTGATGCTGCA
TACGTCAGAACATGGCGGTAAAGGCCTACAGGCATGCGGTGGAGGAACTACCAGAGACAATGG
AAACACTCCTACTCTTGGGACTCATGATCTTGTGACAGGTGGAGCAATGCTTTTCTTAATATC
AGGTAAAGGGATTGGAAAGACTTCAATAGGACTCATTTGTGTAATTGCTTCCAGCGGCATGTT
GTGGATGGCCGAAATCCCCTCCAATGGATCGCGTCGGCCATAGTCCTGGAGTTTTTTATGATG
GTGTTGCTTATACAGAACCAGAGAAGCAGAGAACCCCCCAAGACAACCAACTCGCATATGTC
GTGATAGGCATACTTACACTGGCAGCAATAATAGCAGCCAATGAAATGGGATTGTTGGAAACT

10

20

30

40

50

ACAAAGAGAGATTTAGGAATGTCTAAGGAGCCAGGTGTTGTTTCTCCAACCAGCTATTTAGAT
GTGGACTTGACCCAGCATCAGCCTGGACATTGTACGCTGTGGCCACTACAGTAATAACACCA
ATGTTAAGACATACCATAGAGAATTCCACAGCAAATGTGTCCTTGGCAGCTATAGCCAACCAG
GCAGTGGTCCTGATGGGTTTGGACAAAGGATGGCCAATATCAAAAATGGACTTAGGAGTACCC
CTGCTGGCATTGGGTTGCTATTACAAAGTGAACCCACTGACTCTAACAGCGGCAGTACTCTTGC
TGATCACACATTATGCCATTATAGGTCCAGGATTGCAGGCCAAAAGCCACCCGTGAAGCTCAGA
AAAGGACAGCTGCTGGAATAATGAAGAATCCAACAGTGGATGGGATAATGACAATAGACCTA
GATCCTGTAAATATATGATTCAAAAATTTGAAAAGCAACTGGGACAGGTTATGCTCCTGGTTTTGT
GTGCAGTTCAACTTTTTGTTAATGAGAACATCATGGGCCTTGTGTGAAGCTTTAACCCTAGCTAC
AGGACCAATAACAACACTCTGGGAAGGATCACCTGGGAAGTTTTGGAACACCACGATAGCTGT
TTCCATGGCGAACATTTTTAGAGGGAGCTATTTAGCAGGAGCTGGGCCTTGCTTTCTCTATTATG
AAATCAGTTGGAACAGGGAAAAGAGGAACAGGCTCACAGGGTGAACTTTGGGAGAAAAATG
GAAAAAGAAGTTAAATCAATTATCCCGGAAAGAGTTTGACCTTTACAAGAAATCTGGAATCAC
TGAGGTGGATAGAACAGAAGCCAAAGAAGGGTTGAAAAGAGGAGAAATAACACATCATGCCG
TGTCCAGAGGTAGTGCAAACTTCAATGGTTTGTGGAGAGAAACATGGTCATTCCCGAAGGAA
GAGTTATAGACTTGGGCTGTGGAAGAGGAGGCTGGTCATATTACTGTGCAGGACTGAAAAAG
TCACAGAAGTGCGAGGATACACAAAAGGCGGTCCAGGACACGAAGAACCAGTACCTATGTCC
ACATATGGATGGAACATAGTTAAGTTAATGAGTGGAAAGGATGTGTTTTATCTTCCACCTGAA
AAGTGTGACACCCTGTTGTGCGACATTGGAGAATCTTCACCAAGCCCAACAGTGGAAAGAAAGC
AGAACTATAAGAGTTTTGAAGATGGTTGAACCATGGCTAAAGAACAACCAATTTTGTATTTAA
GTATTGAACCCTTACATGCCAACTGTGATTGAGCACCTAGAAAAGACTACAAAGGAAACATGGA
GGAATGCTTGTGAGAAATCCACTTTCACGAACTCCACGCACGAAATGTACTGGATATCCAAT
GGCACAGGTAACATTGTTCGCTTCAGTCAACATGGTATCTAGACTGCTACTGAACAGGTTACG
ATGACACACAGAAGACCCACCATTGAGAAAGATGTGGATTTAGGAGCAGGAACTCGACATGT
TAATGCGGAACCAGAAACACCCAACATGGATGTCAATTGGGGAAAAGAATAAAAAGGATCAAGG
AGGAGCATAATTCAACATGGCACTACGATGACGAAAACCCCTACAAAACGTGGGCTTACCATG
GATCTTATGAAGTCAAAGCCACAGGCTCAGCCTCCTCCATGATAAATGGAGTCGTGAAACTCC
TCACTAAACCATGGGATGTGGTGCCCATGGTGACACAGATGGCAATGACAGATACAACTCCAT
TTGGCCAGCAGAGAGTCTTTAAAGAGAAAAGTGGACACCAGGACACCCAGGTCCATGCCAGGA
ACAAGAAGGGTTATGGGGATCACAGCGGAGTGGCTCTGGAGAACCCTGGGAAGGAATAAAAA
ACCCAGGTTATGCACAAGGGAAGAGTTTACAAAAAAGGTCAGAACTAACGCAGCCATGGGAG
CTGTTTTTACAGAGGAGAACCAATGGGACAGCGCGAAAGCTGCTGTTGAGGATGAGGATTTTT
GGAACTTGTGGACAGAGAACGTGAACTCCACAACTGGGCAAGTGTGGAAGCTGTGTTTACA
ACATGATGGGTAAGAGAGAGAAGAACTTGGAGAGTTTGGCAAAGCAAAAGGCAGTAGAGCT
ATATGGTACATGTGGTTGGGAGCCAGGTACCTTGAGTTCGAAGCCCTTGGATTCTTAAATGAA
GACCACTGGTTCTCGCGTGAGAACTCTTACAGTGGAGTGGAAGGAGAAGGACTGCACAAGCTA
GGCTATATATTAAGGGACATTTCCAAGATACCCGGAGGAGCTATGTATGCTGATGACACAGCT

10

20

30

40

50

GGTTGGGACACAAGAATAACAGAAGATGACCTGCACAATGAGGAAAAGATCACACAGCAAAT
GGACCCTGAACACAGGCAGTTAGCGAACGCTATATTTAAGCTCACATACCAAAACAAAGTGGT
CAAAGTTCAACGACCGACTCCAACAGGCACGGTAATGGATATCATATCTAGGAAAGACCAAA
GAGGCAGTGGACAGGTAGGAACCTTATGGTCTGAATACATTACCAACATGGAAGCCCAGTTAA
TCAGACAAATGGAAGGAGAAGGTGTGCTGTCAAAGGCAGACCTCGAGAACCCTCATCTGCCA
GAGAAGAAAATTACACAATGGTTGGAAACCAAGGAGTGGAGAGGTTAAAAAGAATGGCCAT
AAGTGGGGATGACTGCGTGGTGAAACCAATCGATGACAGGTTGCTAATGCCCTGCTCGCTCT
GAACGACATGGGAAAGGTTTCGGAAGACATACCTCAATGGCAGCCATCAAAGGGATGGCATG
ATTGGCAACAGGTTCTTTCTGCTCCCACCACTTTCATGAATTGATCATGAAAGATGGAAGAAA
GTTGGTGGTTCCCTGCAGACCCCCAGGACGAACTAATAGGAAGGGCAAGAATCTCTCAAGGAGC
GGGATGGAGCCTTAGAGAAACCGCATGTCTGGGGAAGCCTACGCTCAAATGTGGAGTCTCAT
GTATTTTCACAGAAGAGACCTCAGACTAGCATCCAACGCCATATGTTTCAGCAGTACCAGTCCA
CTGGGTCCCCACAAGTAGAACGACATGGTCTATTACGCTCACCATCAGTGGATGACCACAGA
AGACATGCTTACTGTCTGGAACAGAGTGTGGATCGAGGACAATCCATGGATGGAAGACAAAA
CTCCAGTCACAACCTGGGAAAATGTTCCATATCTAGGGAAGAGAGAAGACCAATGGTGC GGAT
CACTTATTGGTCTCACTTCCAGAGCAACCTGGGCCCAGAACATACCCACAGCAATTCAACAGG
TTAGAAGCCTTATAGGCAATGAAGAGTTTCTGGACTACATGCCTTCAATGAAGAGATTTAGGA
AGGAGGAGGAGTCGGAGGGAGCCATTTGGTAAAAAGTGAAGTGAAGGAGGTTAACTGT
CAGGCCATATTAAGCCACAGTACGGAAGAAGCTGTGCTGCCTGTGAGCCCCGTCCAAGGACGT
TAAAAGAAGAAGTCAGGCCCCAAAGCCACGGTTTGAGCAAAACCGTGCTGCCTGTAGCTCCGTC
GTGGGGACGTAAAACCTGGGAGGCTGCAAACTGTGGAAGCTGTACGCACGGTGTAGCAGACT
AGCGGTTAGAGGAGACCCCTCCCATGACACAACGCAGCAGCGGGGCCCCGAGCACTGAGGGAA
GCTGTACCTCCTTGCAAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCCGCAAATAAAAAACAGCATAT
TGACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTCAGCATCATTCCAGGCACAGAACGCCA
GAAAATGGAATGGTGTGTTGAATCAACAGGTTCT

10

20

SEQ ID NO:7 – DENV4_Syn_WT

30

AGTTGTTAGTCTGTGTGGACCGACAAGGACAGTTCCAAATCGGAAGCTTGCTTAACACAGTTCT
AACAGTTTGTTTAAATAGAGAGCAGATCTCTGAAAAATGAACCAACGAAAAAAGGTGGTTA
GACCACCTTTCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCGCGTATCAACCCCTCAAGGGTTGGTGA
AGAGATTCTCAACCGGACTTTTTTCTGGGAAAGGACCCTTACGGATGGTGTAGCATTTCATCAC
GTTTTTGCAGAGTCCTTTCCATCCCACCAACAGCAGGGATTCTGAAGAGATGGGGACAGTTGAA
GAAAAATAAGGCCATCAAGATACTGATTGGATTTCAGGAAGGAGATAGGCCGCATGCTGAACA
TCTTGAACGGGAGAAAAAGGTCAACGATAACATTGTTGTGCTTGATTCCCACCGTAATGGCGT
TTCATTGTCAACAAGAGATGGCGAACCCCTCATGATAGTGGCAAAACATGAAAGGGGGAGA
CCTCTCTTGTTTAAGACAACAGAGGGGATCAACAAATGCACTCTCATTGCCATGGACTTGGGTG
AAATGTGTGAGGACACTGTCACGTATAAATGCCCCCTACTGGTCAATACCGAACCTGAAGACA

40

50

TTGATTGCTGGTGCAACCTCACGTCTACCTGGGTCATGTATGGGACATGCACCCAGAGCGGAG
AACGGAGACGAGAGAAGCGCTCAGTAGCTTTGACACCACATTCAGGAATGGGATTGGAAACA
AGAGCTGAGACATGGATGTCATCGGAAGGGGCTTGGAAGCATGCTCAGAGAGTAGAGAGCTG
GATACTCAGAAACCCAGGATTTGCGCTCTTGGCAGGATTTATGGCTTATATGATTGGGCAAAC
AGGAATCCAGCGAACTGTCTTCTTTGTCTAATGATGCTGGTCGCCCCATCCTACGGAATGCGG
TGCGTAGGAGTAGGAAACAGAGACTTTGTGGAAGGAGTCTCAGGTGGAGCATGGGTTCGACCT
GGTGCTAGAACATGGAGGATGCGTCACAACCATGGCCCAGGGAAAACCAACCTTGGATTTTGA
ACTGACTAAGACAACAGCTAAGGAAGTGGCTCTGTTAAGAACCTATTGCATTGAAGCCTCAAT
ATCAAACATAACTACGGCAACAAGATGTCCAACGCAAGGAGAGCCTTATCTGAAAGAGGAAC
AGGACCAACAGTACATCTGCCGGAGAGATGTGGTAGACAGAGGATGGGGCAATGGCTGTGGC
TTGTTTGAAAAAGGAGGAGTTGTGACATGTGCGAAGTTTTTCATGTTTCGGGGAAGATAACAGGC
AATCTGGTCCAAATTGAGAACCTTGAATACACAGTGGTTGTAACAGTCCACAATGGAGACACC
CATGCAGTAGGAAATGACACATCCAATCATGGAGTTACAGCCACGATAACTCCCAGGTCACCA
TCGGTAGAAGTCAAATTGCCGGACTATGGAGAACTAACACTCGATTGTGAACCCAGGTCTGGA
ATTGACTTTAATGAGATGATCCTAATGAAAAAGAAAAACATGGCTCGTCATAAGCAA
TGGTTTTTGATCTGCCTCTTCCATGGACAGCAGGAGCAGACATCAGAGGTTCACTGGAATT
ACAAAGAGAGAATGGTGACGTTCAAGGTTCTCATGCCAAGAGACAGGATGTGACAGTGCTG
GGATCTCAGGAAGGAGCCATGCATTCTGCCCTCGCTGGAGCCACAGAAGTGGACTCCGGTGAT
GGAAATCACATGTTTGCAGGACATCTCAAGTGCAAAGTCCGTATGGAGAAATTGAGAATCAAG
GGAATGTCATACACGATGTGTTTCAGGAAAGTTTTCAATTGACAAAGAGATGGCAGAAACACAG
CATGGGACAACAGTGGTGAAAGTCAAGTATGAAGGTGCTGGAGCTCCGTGTAAAGTCCCCATA
GAGATAAGAGATGTAAACAAGGAAAAAGTGGTTGGGCGCGTTATCTCATCCACCCCTTTGGCT
GAGAATACCAACAGTGTAACCAACATAGAATTAGAACCCCTTTGGGGACAGCTACATTGTG
ATAGGTGTTGGAAACAGCGCATTAACACTCCATTGGTTTCAGGAAAGGGAGTTCCATTGGCAAG
ATGTTTGAGTCCACATACAGAGGTGCAAAACGAATGGCCATTCTAGGTGAAACAGCTTGGGAT
TTTGGTTCCGTTGGTGGACTGTTACATCATTGGGAAAGGCTGTACACCAGGTTTTTGAAGCG
TGATACAACCATGTTTGGAGGAGTCTCATGGATGATTAGAATCCTAATTGGGTTCTTAGTGTT
GTGGATTGGCACGAATTCAAGGAACACTTCAATGGCCATGACGTGCATAGCTGTTGGAGGAAT
TACTCTGTTTTTGGGCTTCACAGTTCAAGCGGACATGGGTTGTGTGGTGTGATGGAGTGGGAGA
GAATTGAAGTGTGGAAGCGGAATTTTTGTGGTTGACAACGTGCACACTTGGACAGAACAGTAC
AAATTCCAACCAGAGTCCCCAGCGAGACTAGCGTCTGCAATATTAAATGCCCACAAAGATGGG
GTCTGTGGAATTAGATCAACCACGAGGCTGGAAAAATGTTATGTGGAAGCAAATAACCAATGAG
CTAAACTATGTTCTCTGGGAAGGAGGACATGATCTCACTGTAGTGGCTGGGGATGTGAAAGGG
GTGTTGACCAAGGGCAAGAGAGCACTCACACCCCCAGCGAGTGATCTGAAATATTCATGGAAG
ACATGGGGGAAAGCAAAAATCTTCACCCCTGAAGCAAGAAACAGCACATTTTAAATAGACGG
ACCAGACACCTCTGAATGCCCCAATGAACGAAGGGCATGGAATCTTTTGAGGTGGAAGACTA
TGGATTTGGCATGTTACGACCAACATATGGATGAAATTCCGAGAAGGAAGTTCAGAAGTGTG

10

20

30

40

50

TGACCACAGGTTAATGTCAGCTGCAATTAAAGACCAGAAAGCTGTGCATGCTGACATGGGTTA
TTGGATAGAGAGCTCAAAAAACCAGACCTGGCAGATAGAGAGAGCATCTCTTATTGAAGTGA
AAACATGTCTGTGGCCCAAGACCCATACACTGTGGAGCAATGGAGTGCTGGAAAGCCAGATGC
TTATTCCAAAATCATATGCAGGCCCTTTTTCACAGCACAATTACCGCCAGGGCTATGCTACGCA
AACCGTGGGTCCATGGCACTTAGGCCAACTAGAGATAGACTTTGGAGAATGCCCCGGAACAAC
AGTCACAATTCAGGAGAATTGTGACCATAGAGGCCCATCTTTGAGGACCACCACTGCATCTGG
AAAAGTAGTCACGCAATGGTGTGCGGCTCCTGCACGATGCCCCCTTAAGGTTCTTAGGAGA
AGATGGGTGCTGGTATGGGATGGAGATTAGGCCCTTGAGTGAAAAAGAGAACATGGTCA
AATCACAGGTGACGGCCGGACAGGGCACATCGGAACTTTTTCAATGGGTCTGTTGTGCCTGA
CCTTGTGTTGTGGAAGAATGCTTGAGGAGAAGAGTACCAGGAAACACATGATATTAGCTGTGG
TAATCACTCTTTGTGCTATCATCCTGGGGGGCCTCACATGGATGGACTTGCTACGAGCCCTCAT
CATGTTGGGGGACACTATGTCTGGTAGAATAGGAGGACAGACCCACCTAGCCATCATGGCAGT
GTTCAAGATGTCACCGGGATACGTGCTGGGTGTGTTTTAAGGAACTCACTTCAAGAGAGAC
AGCACTAATGGTAATAGGAATGGCCATGACAACAACACTTTCAATTCCACATGACCTCATGGA
ACTCATTGATGGAATATCACTAGGACTAATTTTGCTAAAAATAGTAACACAGTTTGACAACAC
CCAAGTGGGAACCTTAGCTCTTTCCTTGACTTTCATAAGATCAACAATGTCATTGGTCATGGCT
TGGAGGACCATTATGGCTGTGTTGTTGTGGTGCACACTCATTCTTTGTGCAGGACAAGCTGTC
TTCAAAAACAGTCTCATTGGGTAGAAATAACAGCACTCATCCTAGGAGCCCAAGCTCTGCCAG
TGTACCTAATGACTCTTATGAAAGGAGCCTCAAGAAGATCTTGGCCTCTTAACGAAGGCATAA
TGGCTGTGGGTTTGGTTAGTCTCTTAGGAAGCGCTCTTTTAAAGAATGATGTCCCTTAGCTGG
CCCAATGGTGGCAGGAGGCTTACTTCTGGCGGCTTACGTAATGAGTGGCAGCTCAGCAGATCT
GTCAGTAGAGAAGGCCGCTAATGTGCAGTGGGATGAAATGGCAGACATAACAGGCTCAAGTC
CAATCATAGAAGTGAAGCAAGATGAGGATGGCTCTTCTCCATACGGGACGTCGAGGAAACCA
ATATGATAACCCCTTTTGGTGAAACTGGCACTGATAACGGTGTGAGGTCTCTACCCCTTGGCAAT
TCCAATCACAATGACCTTATGGTACATGTGGCAAGTGAAAACACAAAGATCAGGAGCCCTGTG
GGACGTCCCTTACCCGCCGCACTCAAAAAGCCGCACTGTCTGAAGGAGTGTACAGGATCAT
GCAAAGAGGGTTATTCGGGAAAACCTCAGGTTGGAGTAGGGATACACATGGAAGGTGTATTICA
CACAATGTGGCATGTTACAAGAGGATCGGTGATCTGCCACGAGACTGGGAGATTGGAGCCATC
TTGGGCTGATGTCAGGAATGACATGATATCATACGGTGGGGGATGGAGGCTTGGAGATAAATG
GGACAAAGAAGAAGACGTTTCAAGGTCCTCGCTATAGAACCAGGGAAAAATCCCAAACATGTCC
AAACGAAACCTGGCCTTTTCAAGACCCCTAACTGGAGAAATTGGAGCAGTAACATTAGATTTCA
AACCCGGAACGTCTGGTTCTCCATTATCAACAGGAAAGGAAAAGTCATCGGACTCTATGGAA
ATGGAGTGGTCACCAAATCAGGTGATTACGTCACTGCCATAACACAAGCCGAAAGAATTGGA
GAGCCAGATTATGAAGTGGATGAGGACATTTTTCGAAAGAAAAGACTAACTATAATGGACTTA
CACCCCGGAGCCGGAAGACAAAAAGAAATCTTCCATCAATAGTGAGAGAAGCCTTAAAAAG
GAGGCTGCGAACTTTGATTTTGGCTCCACGAGAGTGGTGGCGGCCGAGATGGAAGAGGCCCT
ACGTGGACTGCCAATCCGTTACCAAACCCAGCTGTAAAATCAGAACACACAGGAAGAGAGA

10

20

30

40

50

TTGTAGACCTCATGTGCCATGCAACCTTCACAACAAGACTTTTGTTCATCAACCAGAGTTCCAAA
CTACAACCTTATAGTAATGGATGAAGCACATTTACCGATCCTTCCAGTGTGCGGGCTAGAGG
ATACATTTTCGACCAGGGTGAAAATGGGAGAGGCAGCAGCCATCTTCATGACCGCAACCCCTCC
CGGAGCGACAGATCCCTTTCCCCAGAGCAACAGCCCAATAGAAGACATCGAGAGAGAGATTCTC
CGGAAAGGTCATGGAACACAGGGTTGCGACTGGATAACAGACTACCAAGGGAAAACCTGTGTGG
TTTGTTCAGCATAAAAAGCTGGAAATGACATTGCAAATTGTTTGAGAAAAGTCGGGAAAAGAAA
GTTATCCAGTTGAGTAGGAAAACCTTTGATACAGAATATCCAAAAACGAAACTCACGGACTGG
GACTTTGTGGTCACTACAGACATATCTGAAATGGGGGCTAACTTTAGAGCTGGGAGAGTGATA
GACCCTAGAAGATGCCTCAAGCCAGTTATCCTAACAGATGGGGCCAGAGAGAGTCATCTTAGCA
GGTCCTATTCCAGTGACTCCAGCAAGCGCTGCTCAGAGAAGAGGGCGAATAGGAAGGAACCC
AGCACAAGAAGACGACCAATACGTTTTCTCCGGAGACCCACTAAAAAATGATGAAGACCATG
CCCACTGGACAGAAGCAAAGATGCTGCTTGACAATATCTACACCCAGAAAGGGATCATTCCAA
CATTGTTTGGTCCGGAAGGGAAAAAACCAAGCTATTGATGGAGAGTTTCGCCTCAGAGGGG
AACAAAGGAAGACTTTTGTGGAATTAATGAGGAGAGGAGACCTTCCGGTGTGGCTGAGTTATA
AGGTAGCTTCTGCTGGCATTCTTACAAAGATCGGGAATGGTGCTTTACTGGGGAAAAGAAATA
ACCAAATTTTAGAAGAAAACATGGAGGTTGAAATTTGGACTAGAGAGGGAGAAAAGAAAAAA
CTGAGGCCAAAATGGTTAGATGCACGTGTATACGCTGACCCCATGGCTTTGAAGGATTTCAAG
GAGTTTGCCAGTGGAAGGAAGAGTATAACTCTCGACATCCTAACAGAGATCGCCAGTTTGCCA
ACTTACCTTTCTCTAGGGCCAAGCTCGCCCTTGACAACATAGTTATGCTCCACACAACAGAAA
GAGGAGGGAGGGCTATCAACATGCCCTGAACGAACTTCCGGAGTCACTGGAAACACTCATGC
TTGTAGCCTTACTAGGAGCTATGACAGCAGGTATCTTCTGTTTTTTCATGCAAGGGAAAGGAAT
AGGGAAATTGTCAATGGGTTTGATAACCATTGCGGTGGCTAGTGGCTTGCTCTGGGTAGCAGA
AATTCAACCCAGTGGATAGCGGCCTCAATCATACTGGAGTTTTTTCTCATGGTACTGTTGATA
CCAGAACCAGAAAAACAAAGGACCCCAAGACAATCAATTGATCTACGTCATATTGACCATT
CTCACCATTATTGGTCTAATAGCAGCCAACGAGATGGGGCTGATAGAAAAACAAAAACGGA
TTTTGGGTTTTACCAGGTAAAAACAGAAACCACCATCCTCGATGTGGACCTGAGACCAGCTTC
AGCATGGACGCTCTATGCGGTAGCCACCACAATTCTGACTCCCATGCTGAGACACACCATAGA
AAATACGTCGGCCAACCTATCTTTAGCAGCCATCGCCAACCAGGCAGCCGTCCTAATGGGGCT
TGGAAAAGGATGGCCACTCCACAGAATGGACCTCGGTGTGCCGCTGTTAGCAATGGGATGCTA
TTCTCAAGTGAACCAACAACCTTGACAGCATCCTTAGTCATGCTTTTAGTCCATTATGCAATA
ATAGGCCCAGGATTGCAGGCAAAAGCCACAAGAGAGGCCCAAGAAAGGACAGCTGCTGGAAT
CATGAAAAATCCCACAGTGGACGGGATAACAGTGATAGATCTAGAACCAATATCCTATGACCC
AAAATTTGAAAAGCAATTAGGGCAGGTATGTTACTCGTCTTGTGTGCTGGACAACACTACTCTTG
ATGAGAACACATGGGCTTTCTGTGAAGTTTGTGACTTTGGCCACAGGACCAATCTTGACCTTGT
GGGAGGGCAACCCGGGAAGGTTTTGGAACACGACCATAGCCGTATCTACCGCCAACATTTTCA
GGGGAAGTTATTTGGCAGGAGCTGGACTGGCTTTTCACTCATAAAGAATGCACAAACCCCA
GGAGGGGAACCTGGGACCACAGGAGAGACTGGGAGAGAAGTGGAAGAGACAGCTAAACTC

10

20

30

40

50

ATTAGACAGGAAAGAGTTTGAAGAGTATAAAAAGAAGTGGAATACTAGAAGTGGACAGGACTG
AAGCCAAGTCCGCCCTGAAAGATGGGTCTAAAATCAAGCATGCAGTATCTAGAGGGTCCAGTA
AGATCAGATGGATTGTTGAGAGAGGGATGGTAAAGCCAAAGGGGAAAGTTGTAGATCTTGGC
TGTGGGAGAGGAGGATGGTCTTATTACATGGCGACACTCAAGAACGTGACTGAAGTGAAAGG
GTATACAAAAGGAGGTCCAGGACATGAAGAACCGATTCCCATGGCTACTTATGGCTGGAATTT
GGTCAAACCTCCATTACAGGGGTTGACGTGTCTACAAAACCCACAGAGCAAGTGGACACCCTGCT
CTGTGATATTGGGGAGTCATCTTCTAATCCAACAATAGAGGAAGGAAGAACATTAAGAGTTTT
GAAGATGGTGGAGCCATGGCTCTCTTCAAAACCTGAATTCTGCATCAAAGTCTCTCAACCCCTA
CATGCCAACAGTCATAGAGGAGCTGGAGAAAACCTGCAGAGAAAACACGGTGGGAACCTTGTC
GATGCCCCGTGTCCAGGAACTCCACCCATGAGATGTATTGGGTGTCAGGAGCGTCGGGAAATA
TTGTGAGCTCTGTGAACACAACATCAAAGATGTTGTTGAACAGGTTCAACAAGGCATAGGA
AACCCACTTATGAGAAGGACGTAGATCTTGGGGCAGGAACGAGAAGTGTCTCTACTGAAACA
GAAAAACCAGACATGACAATCATTGGGAGAAAGGCTTCAGCGATTGCAAGAGGAGCACAAAGA
AACATGGCATTATGATCAGGAAAACCCATACAGAACCTGGGCGTATCATGGAAGCTATGAAGC
TCCTTCGACAGGCTCTGCATCCTCCATGGTGAACGGGGTGGTGAACTGCTAACAAAACCCCTG
GGATGTGATTCCAATGGTGAAGTCAAGTATGACAGATACAACCCCTTTTGGGCAACAAAG
AGTGTTCAAAGAGAAGGTGGATACCAGAACGCCGCAACCAAAACAGGCACACGAATGGTTA
TGACCACGACAGCCAATTGGCTATGGGCCCTCCTTGGAAGAAGAAAAATCCAGACTGTGTA
CAAGGGAAGAGTTCATCTCAAAAGTTAGATCAAACGCAGCCATAGGCGCAGTCTTTCAGGAAG
AACAAGGATGGACATCAGCCAGTGAAGCTGTGAATGACAGCCGGTTTTTGGGAACTGGTTGACA
AAGAAAGGGCCCTTCACCAGGAAGGGAAATGTGAATCGTGTGTCTATAACATGATGGGAAAA
CGTGAGAAAAAGTTAGGAGAGTTTGGCAGAGCCAAGGGAAGCCGAGCAATCTGGTACATGTG
GCTGGGAGCGCGGTTTTCTGGAATTTGAAGCCCTGGGTTTTTTGAATGAAGATCACTGGTTTTGGC
AGAGAAAATTCATGGAGTGGAGTGAAGGGGAAGGTCTGCACAGATTGGGATACATCCTGGA
GGAGATAGACAAGAAGGATGGAGACCTAATGTATGCTGATGACACAGCAGGTTGGGACACAA
GAATCACTGAGGATGACCTTCAAAATGAGGAACTGATCACGGAACAGATGGCTCCCCACCACA
AGATCCTAGCCAAAGCCATTTTCAAACCTAACCTATCAAAACAAAGTGGTGAAAGTCTCTAGAC
CCACACCGAGAGGAGCGGTGATGGATATCATATCCAGGAAAGACCAAGAGGTAGTGGACAA
GTTGGAACATATGGTTTGAACACATTACCAACATGGAAGTTCAACTCATCCGCCAAATGGAA
GCTGAAGGAGTCATCACACAAGATGACATGCAGAACCAAAAGGGTTGAAAGAAAGAGTTGA
GAAATGGCTGAGAGAGTGTGGTGTGACAGGTTAAAGAGGATGGCAATCAGTGGAGACGATT
GCGTGGTGAAGCCCCTAGATGAGAGGTTTGGCACTTCCCTCCTCTTCTTGAACGACATGGGAA
AGGTGAGGAAAGACATTCCGCAGTGGGAACCATCTAAGGGATGGAAAACTGGCAAGAGGTT
CCTTTTTGCTCCCATCACTTTCACAAAGATCTTATGAAGGATGGCCGCTCACTAGTTGTTCCATG
TAGAAACCAGGATGAACTGATAGGGAGAGCCAGAATCTCGCAGGGGGCTGGATGGAGCTTAA
GAGAAACAGCCTGCCTGGGCAAAGCTTACGCCAGATGTGGTTCGCTTATGTACTTCCACAGAA
GGGATCTGCGTTTTAGCCTCCATGGCCATATGCTCAGCAGTTCCAACGGAATGGTTTCCAACAAG

10

20

30

40

50

CAGAACAACATGGTCAATCCATGCTCATCACCAATGGATGACCACTGAAGACATGCTCAAAGT
GTGGAACAGAGTGTGGATAGAAGACAACCCCAATATGATTGACAAGACTCCAGTCCATTTCGTG
GGAAGATATACCTTACCTAGGGAAAAGAGAGGATTTGTGGTGTGGATCCCTGATTGGACTTTC
TTCTAGAGCCACCTGGGCGAAGAACATTCACACGGCCATAACTCAGGTCAGGAACCTTGATCGG
AAAAGAGGAATACGTGGATTACATGCCAGTAATGAAAAGATACAGTGCTCCTTCAGAGAGTG
AAGGAGTTCTGTAATTACCAACAACAAACACCAAAGGCTATTGAAGTCAGGCCACTTGTGCCA
CGGTTTGAGCAAACCGTGCTGCCTGTAGCTCCGCCAATAATGGGAGGCGTAATAATCCCTAGG
GAGGCCATGCGCCACGGAAGCTGTACGCGTGGCATATTGGACTAGCGGTTAGAGGAGACCCCT
CCCATCACTGACAAAACGCAGCAAAAGGGGGCCCCGAAGCCAGGAGGAAGCTGTACTCCTGGT
GGAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCCCAACACAAAAACAGCATATTGACGCTGGGAAA
GACCAGAGATCCTGCTGTCTCTACAACATCAATCCAGGCACAGAGCGCCGCAAGATGGATTGG
TGTGTTGATCCAACAGGTTCT

10

SEQ ID NO:8 – DENV-4-EMin

AGTTGTTAGTCTGTGTGGACCGACAAGGACAGTTCCAAATCGGAAGCTTGCTTAACACAGTTCT
AACAGTTTGTAAATAGAGAGCAGATCTCTGGAAAAATGAACCAACGAAAAAAGGTGGTTA
GACCACCTTTCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCGCGTATCAACCCCTCAAGGGTTGGTGA
AGAGATTCTCAACCGGACTTTTTTCTGGGAAAAGGACCCTTACGGATGGTGTAGCATTTCATCAC
GTTTTTGCGAGTCCTTTCCATCCCACCAACAGCAGGGATTCTGAAGAGATGGGGACAGTTGAA
GAAAAATAAGGCCATCAAGATACTGATTGGATTTCAGGAAGGAGATAGGCCGCATGCTGAACA
TCTTGAACGGGAGAAAAAGGTCAACGATAACATTGTTGTGCTTGATTCCCACCGTAATGGCGT
TTCACTTGTCAACAAGAGATGGCGAACCCCTCATGATAGTGGCAAAACATGAAAGGGGGAGA
CCTCTCTTGTAAAGACAACAGAGGGGATCAACAAATGCACTCTCATTGCCATGGACTTGGGTG
AAATGTGTGAGGACACTGTCACGTATAAATGCCCCCTACTGGTCAATACCGAACCTGAAGACA
TTGATTGCTGGTGCAACCTCACGTCTACCTGGGTATGTATGGGACATGCACCCAGAGCGGAG
AACGGAGACGAGAGAAGCGCTCAGTAGCTTTGACACCACATTCAGGAATGGGATTGGAAACA
AGAGCTGAGACATGGATGTCATCGGAAGGGGCTTGGAAGCATGCTCAGAGAGTAGAGAGCTG
GATACTCAGAAACCCAGGATTTGCGCTCTTGGCAGGATTTATGGCTTATATGATTGGGCAAAC
AGGAATCCAGCGAAGTGTCTTCTTGTCTAATGATGCTGGTCGCCCCATCCTACGGAATGAGA
TGCGTAGGCGTAGGTAATCGCGATTTTCGTTGAGGGAGTGTACAGGCGGAGCATGGGTCTGATCTG
GTAAGTCAACACGGAGGATGCGTTACGACTATGGCACAGGGAAAACCGACATTGGACTTTGAG
TTGACTAAGACAACCGCTAAAGAGGTGCGACTATTGCGAACATACTGTATCGAAGCGTCAATT
TCGAATATTACAACCGCTACTAGGTGTCCTACACAGGGCGAACCATACTTAAAGAGGAACAG
GACCAACAGTATATTTGTAGAAGAGACGTAGTCGATAGGGGGTGGGGAAACGGATGCGGATT
GTTTCGGTAAGGGGGGAGTCGTTACATGCGCTAAGTTCTCATGTTCCGGTAAGATTACCGGTAA
CTTAGTGCAAATTGAGAATCTCGAATATACCGTAGTCGTTACAGTGCATAACGGAGACACACA
CGCAGTCGGAAACGATACATCTAACCATGGCGTAACCGCTACAATTACACCTAGGTCACCATC

20

30

40

50

CGTTGAGGTAAAGTTGCCCCGATTACGGCGAACTGACACTCGATTGCGAACCTAGATCCGGAAT
AGACTTTAACGAAATGATACTGATGAAAATGAAAAAAGACATGGTTAGTGCATAAGCAAT
GGTTTCTCGACTTACCCCTACCTTGGACCGCCGGAGCCGATACTAGCGAAGTGCCTGGAATT
ACAAAGAGAGAATGGTTACATTTAAAGTGCCACACGCTAAGAGACAGGACGTTACAGTGTTA
GGGTCACAGGAGGGAGCTATGCATAGCGCACTAGCCGGAGCAACCGAAGTCGATAGCGGAGA
CGGAAATCATATGTTCCGCGACATCTGAAATGCAAAGTGAGAATGGAGAAAATTGCGGATTAA
GGGAATGTCATACACTATGTGTTCCGGTAAGTTTTCGATTGACAAAGAGATGGCCGAAACGCA
ACACGGAACAACAGTCGTTAAGGTTAAGTACGAAGGAGCCGGAGCTCCGTGTAAAGTGCCAA
TCGAAATTAGAGACGTTAACAAAGAGAAAAGTGGTCGGAAGAGTGATATCTAGTACACCCCTA
GCCGAAAATACGAATTCGGTTACGAATATCGAACTCGAACCCCCCTTTGGAGACTCATACATA
GTGATAGGAGTGGGTAATTCGCACTCACGTTGCACTGGTTTCAGAAAGGGATCATCAATCGGG
AAGATGTTTGAATCAACATATAGGGGAGCGAAAAGAATGGCTATATTGGGCGAAACCGCATG
GGACTTCGGATCAGTCGGAGGACTGTTTACGAGTCTGGGTAAAGCCGTACATCAGGTATTCGG
ATCAGTGTATACAACAATGTTTGGCGGAGTGTCATGGATGATACGGATACTGATAGGGTTTCT
AGTGTGTGATCGGAACGAACTCACGTAATACGTCTATGGCTATGACATGTATTGCCGTAGG
GGGATTACACTGTTTCTGGGATTTACAGTGCAAGCAGACATGGGTGTGTGGTGTTCATGGAG
TGGGAGAGAATTGAAGTGTGGAAGCGGAATTTTTGTGGTTGACAACGTGCACACTTGGACAGA
ACAGTACAAATTCGAACAGAGTCCCCAGCGAGACTAGCGTCTGCAATATTAAATGCCACAA
AGATGGGGTCTGTGGAATTAGATCAACCACGAGGCTGGAAAATGTTATGTGGAAGCAAATAA
CCAATGAGCTAACTATGTCTCTGGGAAGGAGGACATGATCTCACTGTAGTGGCTGGGGATG
TGAAAGGGGTGTTGACCAAGGGCAAGAGAGCACTCACACCCCCAGCGAGTGATCTGAAATAT
TCATGGAAGACATGGGGGAAAGCAAAAATCTTCACCCCTGAAGCAAGAAACAGCACATTTTAA
ATAGACGGACCAGACACCTCTGAATGCCCAATGAACGAAGGGCATGGAATTCCTTTGAGGTG
GAAGACTATGGATTTGGCATGTTACGACCAACATATGGATGAAATTCGAGAAGGAAGTTCA
GAAGTGTGTGACCACAGGTTAATGTCAGCTGCAATTAAAGACCAGAAAGCTGTGCATGCTGAC
ATGGGTTATTGGATAGAGAGCTCAAAAAACCAGACCTGGCAGATAGAGAGAGCATCTCTTATT
GAAGTGAAAACATGTCTGTGGCCCAAGACCCATACACTGTGGAGCAATGGAGTGCTGGAAAG
CCAGATGCTTATTCCAAAATCATATGCAGGCCCTTTTTCACAGCACAAATACCGCCAGGGCTAT
GCTACGCAAACCGTGGGTCCATGGCACTTAGGCAAACTAGAGATAGACTTTGGAGAATGCCCC
GGAACAACAGTCACAATTCAGGAGAATTGTGACCATAGAGGCCCATCTTTGAGGACCACCACT
GCATCTGGA AAACTAGTCACGCAATGGTGTGCGGCTCTGCACGATGCCCCCTTAAGGTCTT
TAGGAGAAGATGGGTGCTGTTATGGGATGGAGATTAGGCCCTTGAGTGAAAAAGAAGAGAAC
ATGGTCAAATCACAGGTGACGGCCGGACAGGGCACATCGGAAACTTTTTCAATGGGTCTGTTG
TGCTTGACCTTGTTTGTGGAAGAATGCTTGAGGAGAAGAGTCACCAGGAAACACATGATATTA
GCTGTGGTAATCACTCTTTGTGCTATCATCTGGGGGGCCTCATGATGGATGGACTTGCTACGAG
CCCTCATCATGTTGGGGGACACTATGTCTGGTAGAATAGGAGGACAGACCCACCTAGCCATCA
TGGCAGTGTTCAGATGTCACCGGGATACGTGCTGGGTGTGTTTTTAAGGAACTCACTTCAAG

10

20

30

40

50

AGAGACAGCACTAATGGTAATAGGAATGGCCATGACAACAACACTTTCAATTCCACATGACCT
CATGGAACTCATTGATGGAATATCACTAGGACTAATTTTGCTAAAAATAGTAACACAGTTTGA
CAACACCCAAGTGGGAACCTTAGCTCTTCCCTTGACTTTCATAAGATCAACAATGTCATTGGTC
ATGGCTTGAGGACCATTATGGCTGTGTTGTTTGTGGTCACACTCATTCTTTGTGCAGGACAA
GCTGTCTTCAAAAACAGTCTCATTGGGTAGAAATAACAGCACTCATCCTAGGAGCCCAAGCTC
TGCCAGTGTACCTAATGACTCTTATGAAAGGAGCCTCAAGAAGATCTTGGCCTCTTAACGAAG
GCATAATGGCTGTGGGTTTGGTTAGTCTCTTAGGAAGCGCTCTTTTAAAGAATGATGTCCCTTT
AGCTGGCCCAATGGTGGCAGGAGGCTTACTTCTGGCGGCTTACGTAATGAGTGGCAGCTCAGC
AGATCTGTCACTAGAGAAGGCCGCTAATGTGCAGTGGGATGAAATGGCAGACATAACAGGCT
CAAGTCCAATCATAGAAGTGAAGCAAGATGAGGATGGCTCTTTCTCCATACGGGACGTCGAGG
AAACCAATATGATAACCTTTTGGTGAAACTGGCACTGATAACGGTGTGAGGTCTCTACCCCTT
GGCAATTCCAATCACAATGACCTTATGGTACATGTGGCAAGTGAAAACACAAAGATCAGGAGC
CCTGTGGGACGTCCCTTACCCGCCGCACTCAAAAAGCCGCACTGTCTGAAGGAGTGTACAG
GATCATGCAAAGAGGGTTATTCGGGAAAACCTCAGGTTGGAGTAGGGATACACATGGAAGGTG
TATTTACACAATGTGGCATGTTACAAGAGGATCGGTGATCTGCCACGAGACTGGGAGATTGG
AGCCATCTTGGGCTGATGTCAGGAATGACATGATATCATAACGGTGGGGGATGGAGGCTTGGAG
ATAAATGGGACAAAGAAGAAGACGTTTCAGGTCCTCGCTATAGAACCAGGGAAAAATCCCAAA
CATGTCCAAACGAAACCTGGCCTTTTCAAGACCCTAACTGGAGAAATTGGAGCAGTAACATTA
GATTTCAAACCCGGAACGTCTGGTTCTCCCATATCAACAGGAAAGGAAAAGTCATCGGACTC
TATGGAAATGGAGTGGTCACCAATCAGGTGATTACGTCAGTGCCATAACACAAGCCGAAAAG
AATTGGAGAGCCAGATTATGAAGTGGATGAGGACATTTTTTCGAAAGAAAAGACTAACTATAAT
GGACTTACACCCCGAGCCGGAAGACAAAAAGAATTCTTCCATCAATAGTGAGAGAAGCCTT
AAAAAGGAGGCTGCGAACTTTGATTTTGGCTCCCACGAGAGTGGTGGCGGCCGAGATGGAAG
AGGCCCTACGTGGACTGCCAATCCGTTACCAAACCCAGCTGTAAAATCAGAACACACAGGAA
GAGAGATTGTAGACCTCATGTGCCATGCAACCTTCAACAAGACTTTTGTATCAACCAGAG
TTCCAAACTACAACCTTATAGTAATGGATGAAGCACATTTACCGATCCTTCCAGTGTGCGGGC
TAGAGGATACATTTTCGACCAGGGTGGAAATGGGAGAGGCAGCAGCCATCTTCATGACCGCAA
CCCCTCCCGGAGCGACAGATCCCTTTCCCCAGAGCAACAGCCCAATAGAAGACATCGAGAGAG
AGATTCCGGAAGGTCATGGAACACAGGGTTCGACTGGATAACAGACTACCAAGGGAAAACCT
GTGTGGTTTGTTCACAGCATAAAAGCTGGAAATGACATTGCAAATTGTTTGAGAAAGTCGGGA
AAGAAAGTTATCCAGTTGAGTAGGAAAACCTTTGATACAGAATATCCAAAAACGAAACTCACG
GACTGGGACTTTGTGGTCACTACAGACATATCTGAAATGGGGGCTAACTTTAGAGCTGGGAGA
GTGATAGACCCTAGAAGATGCCTCAAGCCAGTTATCCTAACAGATGGGCCAGAGAGAGTCATC
TTAGCAGGTCTATTCCAGTGACTCCAGCAAGCGCTGCTCAGAGAAGAGGGCGAATAGGAAG
GAACCCAGCACAAGAAGACGACCAATACGTTTTCTCCGGAGACCCACTAAAAAATGATGAAG
ACCATGCCCCTGGACAGAAGCAAAGATGCTGCTTGACAATATCTACACCCAGAAAGGGATCA
TTCCAACATTGTTTGGTCCGGAAGGGAAAAAACCCTAAGCTATTGATGGAGAGTTTCGCCTCA

10

20

30

40

50

GAGGGGAACAAAGGAAGACTTTTGTGGAATTAATGAGGAGAGGAGACCTTCCGGTGTGGCTG
AGTTATAAGGTAGCTTCTGCTGGCATTCTTACAAAGATCGGGAATGGTGCTTTACTGGGGAAA
GAAATAACCAAATTTTAGAAGAAAACATGGAGGTTGAAATTTGGACTAGAGAGGGAGAAAAG
AAAAAACTGAGGCCAAAATGGTTAGATGCACGTGTATACGCTGACCCCATGGCTTTGAAGGAT
TTCAAGGAGTTTGCCAGTGGAAGGAAGAGTATAACTCTCGACATCCTAACAGAGATCGCCAGT
TTGCCAACTTACCTTTTCTCTAGGGCCAAGCTCGCCCTTGACAACATAGTTATGCTCCACACAA
CAGAAAGAGGAGGGAGGGCCTATCAACATGCCCTGAACGAACTTCCGGAGTCACTGGAAACA
CTCATGCTTGTAGCCTTACTAGGAGCTATGACAGCAGGTATCTTCCTGTTTTTCATGCAAGGGA
AAGGAATAGGGAAATTGTCAATGGGTTTGATAACCATTCGGGTGGCTAGTGGCTTGCTCTGGG
TAGCAGAAATTCAACCCCACTGGATAGCGGCCTCAATCATACTGGAGTTTTTTCTCATGGTACT
GTTGATACCAGAACCAGAAAAACAAAGGACCCACAAGACAATCAATTGATCTACGTCATATT
GACCATTCTCACCATTATTGGTCTAATAGCAGCCAACGAGATGGGGCTGATAGAAAAACAAA
AACGGATTTTGGGTTTTACCAGGTAAAAACAGAAACCACCATCCTCGATGTGGACCTGAGACC
AGCTTCAGCATGGACGCTCTATGCGGTAGCCACCACAATTCTGACTCCCATGCTGAGACACAC
CATAGAAAATACGTCGGCCAACCTATCTTTAGCAGCCATCGCCAACCAGGCAGCCGTCCTAAT
GGGGCTTGAAAAGGATGGCCACTCCACAGAATGGACCTCGGTGTGCCGCTGTTAGCAATGGG
ATGCTATTCTCAAGTGAACCCAACAACCTTGACAGCATCCTTAGTCATGCTTTTAGTCCATTAT
GCAATAATAGGCCCAGGATTGCAGGCAAAAGCCACAAGAGAGGCCCAGAAAAGGACAGCTGC
TGGAATCATGAAAAATCCACAGTGGACGGGATAACAGTGATAGATCTAGAACCAATATCCTA
TGACCCAAAATTTGAAAAGCAATTAGGGCAGGTATGTTACTCGTCTTGTGTGCTGGACAACT
ACTCTTGATGAGAACAACATGGGCTTTCTGTGAAGTTTTGACTTTGGCCACAGGACCAATCTTG
ACCTTGTGGGAGGGCAACCCGGGAAGGTTTTGGAACACGACCATAGCCGTATCTACCGCCAAC
ATTTTCAGGGGAAGTTATTTGGCAGGAGCTGGACTGGCTTTTTCACTCATAAAGAATGCACAA
ACCCCAAGGAGGGGAAGTGGGACCACAGGAGAGACACTGGGAGAGAAGTGGAAAGAGACAGC
TAACTCATTAGACAGGAAAGAGTTTGAAGAGTATAAAAGAAGTGGAACTAGAAAGTGGAC
AGGACTGAAGCCAAGTCCGCCCTGAAAGATGGGTCTAAAATCAAGCATGCAGTATCTAGAGG
GTCCAGTAAGATCAGATGGATTGTTGAGAGAGGGATGGTAAAGCCAAAGGGGAAAGTTGTAG
ATCTTGGCTGTGGGAGAGGAGGATGGTCTTATTACATGGCGACACTCAAGAACGTGACTGAAG
TGAAAGGGTATACAAAAGGAGGTCCAGGACATGAAGAACCGATTCCCATGGCTACTTATGGCT
GGAATTTGGTCAAACTCCATTTCAGGGGTTGACGTGTTCTACAAACCCACAGAGCAAGTGGACA
CCCTGCTCTGTGATATTGGGGAGTCATCTTCTAATCCAACAATAGAGGAAGGAAGAACATTAA
GAGTTTTGAAGATGGTGGAGCCATGGCTCTCTTCAAAACCTGAATTCTGCATCAAAAGTCCTCAA
CCCCTACATGCCAACAGTCATAGAGGAGCTGGAGAACTGCAGAGAAAACACGGTGGGAACC
TTGTCAGATGCCCCGTGTCCAGGAACTCCACCCATGAGATGTATTGGGTGTCAGGAGCGTCGG
GAAATATTGTGAGCTCTGTGAACACAACATCAAAGATGTTGTTGAACAGGTTTACAACAAGGC
ATAGGAAACCCACTTATGAGAAGGACGTAGATCTTGGGGCAGGAACGAGAAGTGTCTCTACTG
AAACAGAAAAACCAGACATGACAATCATTGGGAGAAGGCTTCAGCGATTGCAAGAGGAGCAC

10

20

30

40

50

AAAGAAACATGGCATTATGATCAGGAAAACCCATACAGAACCTGGGCGTATCATGGAAGCTA
TGAAGCTCCTTCGACAGGCTCTGCATCCTCCATGGTGAACGGGGTGGTGAAACTGCTAACAAA
ACCCTGGGATGTGATTCCAATGGTGACTCAGTTAGCCATGACAGATACAACCCCTTTTGGGCA
ACAAAGAGTGTTCAAAGAGAAGGTGGATACCAGAACGCCGCAACCAAAACCAGGCACACGAA
TGGTTATGACCACGACAGCCAATTGGCTATGGGCCCTCCTTGGAAGAAGAAAAATCCCAGAC
TGTGTACAAGGGAAGAGTTTCATCTCAAAAGTTAGATCAAACGCAGCCATAGGCGCAGTCTTTC
AGGAAGAACAAGGATGGACATCAGCCAGTGAAGCTGTGAATGACAGCCGGTTTTTGGGAACTG
GTTGACAAAAGAAAGGGCCCTTACCAGGAAGGGAAATGTGAATCGTGTGTCTATAACATGATG
GGAAAACGTGAGAAAAAGTTAGGAGAGTTTGGCAGAGCCAAGGGAAGCCGAGCAATCTGGTA
CATGTGGCTGGGAGCGCGTTTTCTGGAATTTGAAGCCCTGGGTTTTTTGAATGAAGATCACTGG
TTTGGCAGAGAAAATTCATGGAGTGGAGTGGAAAGGGGAAGGTCTGCACAGATTGGGATACAT
CCTGGAGGAGATAGACAAGAAGGATGGAGACCTAATGTATGCTGATGACACAGCAGGTTGGG
ACACAAGAATCACTGAGGATGACCTTCAAAATGAGGAACTGATCACGGAACAGATGGCTCCC
CACCACAAGATCCTAGCCAAAGCCATTTTCAAACCTAACCTATCAAAACAAAGTGGTGAAAGTC
CTCAGACCCACACCGAGAGGAGCGGTGATGGATATCATATCCAGGAAAGACCAAAGAGGTAG
TGGACAAGTTGGAACATATGGTTTTGAACACATTACCAACATGGAAGTTCAACTCATCCGCCA
AATGGAAGCTGAAGGAGTCATCACACAAGATGACATGCAGAACCCAAAAGGGTTGAAAGAAA
GAGTTGAGAAATGGCTGAGAGAGTGTGGTGTGACAGGTTAAAGAGGATGGCAATCAGTGGA
GACGATTGCGTGGTGAAGCCCTAGATGAGAGGTTTGGCACTTCCCTCCTCTTCTTGAACGACA
TGGGAAAGGTGAGGAAAGACATTCCGCAGTGGGAACCATCTAAGGGATGGAAAACTGGCAA
GAGGTTCTTTTGTCTCCCATCACTTTCACAAGATCTTTATGAAGGATGGCCGCTCACTAGTTGT
TCCATGTAGAAACCAGGATGAACTGATAGGGAGAGCCAGAATCTCGCAGGGGGCTGGATGGA
GCTTAAGAGAAACAGCCTGCCTGGGCAAAGCTTACGCCCAGATGTGGTTCGCTTATGTACTTCC
ACAGAAGGGATCTGCGTTTAGCCTCCATGGCCATATGCTCAGCAGTTCCAACGGAATGGTTTCC
AACAAGCAGAAACATGGTCAATCCATGCTCATACCAATGGATGACCACTGAAGACATGCT
CAAAGTGTGGAACAGAGTGTGGATAGAAGACAACCCCAATATGATTGACAAGACTCCAGTCC
ATTCGTGGGAAGATATACCTTACCTAGGGAAAAGAGAGGATTTGTGGTGTGGATCCCTGATTG
GACTTTCTTCTAGAGCCACCTGGGCGAAGAACATTACACGGCCATAACTCAGGTCAGGAACT
TGATCGGAAAAGAGGAATACGTGGATTACATGCCAGTAATGAAAAGATACAGTGCTCCTTCAG
AGAGTGAAGGAGTTCTGTAATTACCAACAACAAACACCAAAAGGCTATTGAAGTCAGGCCACTT
GTGCCACGGTTTGTAGCAAACCGTGCTGCCTGTAGCTCCGCCAATAATGGGAGGCGTAATAATC
CCTAGGGAGGCCATGCGCCACGGAAGCTGTACGCGTGGCATATTGGACTAGCGGTTAGAGGA
GACCCCTCCCATCACTGACAAAACGCAGCAAAAGGGGGCCCCGAAGCCAGGAGGAAGCTGTAC
TCCTGGTGGAAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCCCAACACAAAAACAGCATATTGACGC
TGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCTACAACATCAATCCAGGCACAGAGCGCCGCAAGAT
GGATTGGTGTGTTGATCCAACAGGTTCT

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:9 – DENV-1-VN-BID-V1774-2007-E-W/Min

AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAGAACAGTTTCGAATCGGAAGCTTGCTTAACGTAGTTCT
AACAGTTTTTTATTAGAGAGCAGATCTCTGATGAACAACCAACGGAAAAAGACGGCTCGACCG
TCTTTCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCGCGTGTCAACTGTTTCACAGTTGGCGAAGAGA
TTCTCAAAAGGATTGCTCTCAGGCCAAGGACCCATGAAATTGGTGATGGCTTTCATAGCATTCC
TAAGATTTCAGCCATACCCCCAACAGCAGGAATTTTGGCTAGATGGGGTTCATTCAAGAAGA
GTGGAGCGATCAAAGTGCTACGGGGTTTCAAGAAAGAAATCTCAAACATGTTGAATATAATGA
ATAGAAGGAAAAGATCTGTGACCATGCTCCTTATGCTGATGCCTACAGCCTTGGCGTTCCATTT
GACTACACGAGGGGGAGAGCCGCACATGATAGTCAGCAAGCAGGAAAGAGGAAAGTCACTCT
TGTTTAAGACCTCAGCAGGTGTCAACATGTGCACCCCTTATAGCGATGGATTTGGGAGAGTTATG
TGAGGACACAATGACTTACAAATGCCCTCGAATCACTGAAACTGAACCAGATGACGTTGATTG
TTGGTGTAATGCCACAGACACATGGGTGACCTATGGAACATGTTCCCAAACCTGGCGAGCACCG
ACGAGACAAACGTTCCGTCGCACTGGCCCCACACGTGGGACTTGGTTTGGAAACAAGAACCGA
AACGTGGATGTCTCTGAAGGCGCTTGGAACAGATACAAAGAGTGAGACTTGGGCCCTGA
GACACCCAGGATTCACGGTGATAGCCCTTTTTCTAGCACATGCCATAGGAACATCCATCACCC
AGAAAGGGATTATTTTCATTTTGTTAATGCTGGTAACACCATCCATGGCCATGCGATGCGTGGG
AATAGGCAGCAGGGACTTCGTGGAAGGACTGTGAGGAGCAACTTGGGTAGATGTGGTACTGG
AACATGGAAGTTGCGTCACCACCATGGCAAAAGACAAACCAACATTGGACATTGAACTCTTGA
AGACGGAAGTCACAAACCCTGCCGTCCTGCGCAAACTGTGCATTGAAGCTAAAATATCAAAACA
CCACCACCGACTCAAGATGTCCAACACAAGGAGAAGCCACACTAGTGAAGAACAAGACGCG
AACTTTGTGTGTCGACGAACGTTTGTGGACAGAGGCTGGGGCAATGGCTGTGGCCTCTTCGGA
AAAGGAAGCCTAATAACGTGTGCAAAGTTCAAGTGTGTGACAAAACCTGGAAGGAAAGATAGT
TCAATATGAGAACTTGAAATATTCAGTAATAGTCAACCGTTCACACCGGAGACCAGCATCAAGT
GGGAAATGAAAGCACAGAACATGGGACAACCTGCAACTATAACACCTCAAGCTCCTACGACGG
AAATACAGCTGACCGACTACGGAGCTCTTACATTGGATTGTTACCTAGAACAGGACTAGACT
TTAATGAAATGGTGTGTTGTGACAATGAAAGAAAAATCATGGCTAGTCCACAAACAATGGTTTT
TAGACCTACCACTGCCTTGGACCTCGGGAGCTTCAACATCACAAGAGACTTGGAACAGACAAG
ATTTGCTGGTGACATTTAAGACAGCTCATGCAAAGAAGCAGGAAGTAGTAGTGTAGGGTCAC
AAGAGGGAGCAATGCATACCGCACTAACCGGAGCAACCGAAATACAGACTAGCGGAACTACA
ACGATTTTTTGCCGGTCACCTGAAATGTAGACTGAAGATGGACAACTGACACTTAAAGGAATG
TCATACGTTATGTGTACGGGATCCTTTAAGCTCGAAAAAGAGGTTGCCGAAACGCAACACGGA
ACAGTGCTAGTGCAAATTAATATGAGGGAACCGACGCACCATGTAAGATACCGTTTAGTACG
CAAGACGAAAAGGGCGTTACGCAAAACGGAAGACTGATTACCGCTAACCTATCGTTACAGA
CAAAGAGAAACCCGTTAACATAGAGGCCGAACCACTTTTGGCGAATCATATATAGTGATAGG
CGCAGGCGAAAAAGCACTAAAGCTGTCATGGTTCAAAAAAGGATCTAGCATAGGGAAGATGT
TCGAAGCAACCGCTAGGGGAGCTAGACGAATGGCAATACTGGGAGATACCGCATGGGACTTC
GGATCGATAGGGGGAGTGTTTACTAGCGTAGGTAAGTTGGTGCATCAGATATTCGGAACCGCA

10

20

30

40

50

TACGGAGTGTGTTTATAGCGGAGTGTTCATGGACTATGAAGATAGGGATAGGAGTGCTATTGACA
TGGCTCGGACTGAATTCGAGATCGACTAGCCTATCTATGACATGCATAGCCGTCGGACTGGTTA
CACTGTATCTAGGCGTAATGGTGCAAGCAGATTTCAGGATGTGTAATTAATTGGAAAGGTAGAG
AACTCAAGTGTGGAAGTGGCATTGTTTGTACCAATGAAGTTCACACTTGGACAGAGCAATACA
AATTTCAAGCTGACTCCCCTAAGAGACTATCAGCAGCCATCGGGAAGGCATGGGAGGAGGGT
GTGTGTGGAATTCGATCAGCAACTCGTCTCGAGAACATCATGTGGAAGCAAATATCAAATGAA
CTGAATCACATCTTACTTGAAAATGATATGAAAATTCACAGTGGTTGTAGGAGATGTTGCTGGG
ATCTTGGCTCAAGGAAAGAAAATGATTAGGCCACAACCCATGGAATACAAATACTCGTGGA
AAGCTGGGGAAAGGCTAAAATCATAGGGGCAGATGTACAGAACACCACCTTCATCATCGATG
GCCCAAACACCCAGAATGCCCTGATGACCAAAGAGCATGGAACATTTGGGAAGTTGAGGAC
TATGGATTTGGAATTTTCACGACAAACATATGGCTGAAATTGCGTGATTCTACACCCAAGTGT
GTGACCACCGGCTAATGTCAGCTGCCATCAAGGACAGCAAGGCAGTTCACGCTGACATGGGGT
ACTGGATAGAAAGTGAAAAGAACGAGACCTGGAAGCTGGCAAGAGCCTCATTATAGAAGTT
AAAACATGTATCTGGCCAAAATCCCACACTCTATGGAGCAATGGAGTTCTGGAAAGTGAAATG
ATAATTCCAAAGATCTATGGAGGACCAATATCTCAGCACAACACTACAGACCAGGATATTTTACA
CAAGCAGCAGGGCCGTGGCACCTAGGCAAGTTGGAAGTGGATTTTGATTGTGTGAGGGTACC
ACAGTTGTTGTGGATGAACATTGTGGAATCGAGGACCATCTCTTAGGACCACAACAGTCACA
GGAAAGATAATTCATGAATGGTGTGTCAGATCTTGCACGCTACCACCTTACGTTTCAGAGGA
GAAGATGGGTGCTGGTACGGTATGGAATCAGACCAGTCAAGGAAAAGGAAGAAAATCTAGT
CAAATCAATGGTCTCTGCAGGGTCAGGGGAAGTGGACAGCTTTTCACTAGGACTGCTATGCAT
ATCAATAATGATCGAGGAGGTGATGAGATCCAGATGGAGTAGAAGAATGCTGATGACTGGAA
CACTGGCTGTGTTCTTCTTCATAATGGGACAATTGACATGGAACGATCTGATCAGATTATG
CATCATGGTTGGAGCCAACGCTTCCGACAGGATGGGGATGGGAACGACGTACCTAGCCCTGAT
GGCCACTTTTAAAATGAGACCGATGTTTCGCTGTAGGGCTATTATTTTCGCAGACTAACATCCAGA
GAAGTTCTTCTTCTAACAATTGGATTGAGTCTAGTGGCATCTGTGGAGTTACCAAATTCCTTGG
AGGAGCTGGGGGATGGACTTGCAATGGGCATTATGATTTTAAAATTATTGACTGACTTTCAATC
ACATCAGCTGTGGGCTACCTTGCTGTCTTGACATTTATCAAAACAACGTTTTCTTGCACTAC
GCATGGAAGACAATGGCTATGGTACTGTCAATTGTATCTCTCTTCCCTTTATGCCTGTCCACGA
CCTCCCAAAAAACAACATGGCTTCCGGTGCTATTGGGATCCCTTGGATGCAAACCACTAACCA
TGTTTCTTATAGCAGAAAAACAATCTGGGGAAGGAGAAGTTGGCCCCTCAATGAAGGAATCA
TGGCTGTGGAATAGTCAGCATCCTACTAAGTTCACCTCTCAAAAATGATGTACCGCTAGCTGG
GCCACTAATAGCTGGAGGCATGCTAATAGCATGTTATGTTATATCTGGAAGCTCAGCCGACCT
ATCATTAGAGAAAGCGGCTGAGGTCTCTGGGAAGAAGAAGCAGAACACTCTGGTGCCTCAC
ACAACATATTAGTGGAAGTCCAAGATGATGGAACCATGAAGATAAAGGATGAAGAGAGAGAT
GACACGCTAACCATTTCTCTTAAAGCAACTCTGTTAGCAGTTTCAGGGGTGTACCCATTATCAA
TACCAGCGACCCCTTTTCGTGTGGTACTTTTGGCAGAAAAAGAAACAGAGATCTGGAGTGTAT
GGGACACACCCAGCCCTCCAGAAGTGGAAAGAGCAGTTCTTGATGATGGTATCTATAGAATTA

10

20

30

40

50

TGCAGAGAGGACTGTTGGGCAGGTCCCAAGTAGGGGTAGGAGTTTTCCAAGAAAACGTGTTCC
ACACAATGTGGCATGTCACCAGGGGAGCTGTACTCATGTATCAAGGGAAGAGATTGGAACCG
AGCTGGGCCAGTGTCAAAAAAGACCTGATCTCATATGGAGGAGGTTGGAGGCTTCAAGGATCC
TGGAACACAGGAGAAGAAGTGCAGGTGATTGCTGTTGAACCAGGGAAAAACCCCAAAAATGT
ACAAACAGCGCCGGGCACCTTTAAGACCCCTGAAGGTGAAGTTGGAGCCATTGCCCTAGACTT
TAAACCTGGCACATCTGGATCTCCCATCGTGAACAGAGAAGGAAAAATAGTAGGTCTTTATGG
AAATGGAGTAGTGACAACAAGTGGAACTACGTCAGTGCCATAGCTCAAGCCAAAGCATCAC
AAGAAGGGCCCCCTACCAGAGATTGAAGACGAGGTGTTTAGGAAAAGAACTTAACAATAATG
GACCTACATCCAGGATCGGGGAAAACAAGAAGATATCTTCCAGCCATAGTCCGTGAGGCCATA
AAAAGGAAGCTGCGCACACTAATCCTGGCTCCCACAAGGGTTGTCGCTTCCGAAATGGCAGAG
GCGCTCAAGGGAATGCCAATAAGGTACCAAACAACAGCAGTGAAGAGTGAACATACAGGAAA
AGAGATAGTTGACCTCATGTGTACGCCACTTTCACCATGCGCCTCCTGTCTCCCGTAAGAGTT
CCCAATTACAACATGATCATCATGGATGAAGCACATTTACCGATCCATCCAGTATAGCGGCC
AGAGGGTACATCTCAACCCGAGTGGGCATGGGTGAAGCAGCTGCAATCTTCATGACAGCCACT
CCCCCAGGATCAGTGGAGGCCTTTCCACAGAGCAACGCAGTTATCCAAGATGAGGAAAAGAGA
CATTCTGAGAGATCATGGAACCTCAGGCTATGAGTGGATCACTGACTTCCCAGGTAAAACAGT
TTGGTTTGTTCGAAGCATTAAATCAGGAAATGACATTGCCAACTGCTTAAGAAAGAAATGGGAA
ACGGGTGATTCAATTGAGCAGGAAAACCTTTGATACAGAGTACCAAAAAACAACG
ACTGGGACTACGTCGTCACAACAGACATCTCCGAAATGGGAGCAAATTTCCGAGCCGACAGGG
TGATAGACCAAGACGGTGTCTGAAACCGGTAATACTAAAAGATGGTCCAGAGCGTGTCATTT
TAGCAGGACCAATGCCAGTGAAGTGTGGCCAGTGCCGCTCAGAGGAGAGGAAGAATTGGAAGG
AACCACAATAAGGAAGGTGATCAGTACATCTACATGGGACAGCCTTTAAACAACGATGAAGA
TCACGCTCACTGGACAGAAGCAAAAATGCTCCTTGATAATATAAACACACCAGAAGGGATTAT
CCCAGCCCTCTTTGAGCCAGAGAGAGAAAAGAGTGCAGCAATAGACGGGGAATACAGACTGC
GGGGTGAAGCAAGGAAAACGTTTGTGGAGCTCATGAGAAGAGGAGATCTACCTGTCTGGCTAT
CCTACAAAGTTGCCTCAGAAGGCTTCCAGTACTCTGACAGAAGATGGTGCTTTGACGGGGAAA
GGAACAACCAGGTGTTGGAGGAGAACATGGACGTGGAGATCTGGACAAAAGAAGGAGAAAAG
AAAGAACTACGACCCCGCTGGCTGGATGCCAGAACATACTCAGACCCACTAGCCCTGCGCGA
GTTTAAAGAGTTTGCAGCAGGGAGAAGAAGCGTCTCAGGTGATTTAATATTAGAAATAGGGAA
GCTTCCACAACACTTGACGCAAAGGGCCAGAATGCCCTGGACAACCTGGTTATGTTGCACAA
CTCCGAACAAGGAGGCAGAGCCTATAGACATGCAATGGAAGAACTGCCAGACACCATAGAAA
CGTTGATGCTCCTAGCTTTGATAGCTGTGTTAACTGGTGGAGTGACACTGTTCTTCCTATCAGG
AAGGGGCCCTAGGGAAAACATCTATCGGCCTACTCTGCGTAATGGCTTCAAGCGTACTGCTATG
GATGGCCAGTGTGGAGCCCCATTGGATAGCGGCCTCCATCATACTGGAGTTCTTCCTGATGGTG
CTGCTTATTCCAGAGCCAGACAGACAACGCACTCCGAGGACAACCAGCTGGCATATGTGGTG
ATAGGTTTGTATTTCATGATACTGACAGTAGCAGCCAATGAGATGGGACTGCTGGAAACCACA
AAGAAAGACTTAGGGATTGGCCATGTGGCTGTTGAAAATCACCACCATGCCGCAATGCTGGAC

10

20

30

40

50

GTAGACTTACATCCAGCTTCAGCCTGGACCCCTCTATGCAGTGGCCACAACAATTATCACTCCCA
TGATGAGGCACACAATCGAAAACACAACGGCAAAACATTTCCCTGACAGCCATTGCAAACCAG
GCAGCTATATTGATGGGACTTGACAAAGGATGGCCAATATCGAAGATGGACATAGGAGTTCCA
CTTCTCGCCTTGGGGTGCTATTCCCAGGTGAATCCACTGACGCTGACAGCGGCGGTATTGATGC
TAGTGGCTCATTACGCCATAATTGGACCTGGACTGCAAGCAAAAGCTACTAGAGAAGCTCAAA
AAAGGACAGCGGCCGGAATAATGAAAAATCCAACCGTTGATGGAATTGTTGCAATAGATTTGG
ACCCTGTGGTTTATGATGCAAAATTTGAAAAACAACCTAGGCCAAATAATGTTGTTGATACTATG
CACATCACAGATCCTCTTGATGCGGACTACATGGGCCCTGTGCGAGTCCATCACACTGGCCACT
GGACCTCTGACCACGCTTTGGGAGGGATCTCCAGGAAAAATTTTGAACACCACGATAGCGGTT
TCCATGGCAAACATTTTCAGAGGAAGTTATCTAGCAGGAGCAGGTCTGGCCTTCTCATTAAATGA
AATCTCTAGGAGGAGGTAGGAGAGGCACGGGAGCCCAAGGGGAAACACTGGGAGAGAAAATG
GAAAAGACAGCTGAACCAACTGAGCAAGTCAGAAATTTAACACCTATAAAAGGAGTGGGATTA
TGGAAGTGGACAGATCCGAAGCCAAAGAGGGATTGAAAAGAGGAGAAAACAACCAAAACATGC
AGTGTGAGAGGAACCGCTAAACTGAGGTGGTTTCGTGGAGAGGAACCTTGTGAAACCAGAAG
GGAAAGTCATAGACCTCGGTTGTGGAAGAGGTGGCTGGTCATACTATTGCGCTGGGCTGAAGA
AAGTCACAGAAGTGAAGGGGTATACAAAAGGAGGACCTGGACATGAGGAACCAATCCCAATG
GCGACCTATGGATGGAACCTAGTAAAGCTGCACTCTGGGAAAGACGTATTTTTTATACCACT
GAGAAATGTGACACCTTTTGTGTGATATTGGTGAGTCTCTCCAAACCAACTATAGAGGAA
GGAAGAACGCTACGCGTCCTAAAGATGGTGGAACCATGGCTCAGAGGAAACCAATTTTGCATA
AAAATTCGTAATCCCTACATGCCAAGTGTGGTGGAACCTCTGGAGCAAATGCAAAGAAAAACAT
GGAGGAATGCTAGTGCGAAATCCACTTTCAAGAAATTCTACTCATGAAATGTATTGGGTTTCAT
GTGGAACAGGAAACATTGTGTCAGCAGTAAACATGACATCTAGAATGTTGCTAAATCGATTCA
CAATGGCTCACAGGAAACCAACATATGAAAGAGACGTGGACCTAGGCGCCGGAACAAGACAT
GTGGCAGTGGAACAGAGGTAGCCAACCTAGATATCATTGGCCAGAGGATAGAGAACATAAA
ACATGAACATAAGTCAACATGGCATTATGATGAGGACAATCCATATAAAACATGGGCCTATCA
TGGATCATATGAGGTCAAGCCATCAGGATCAGCCTCATCCATGGTCAATGGCGTGGTGAAACT
GCTCACCAAACCATGGGATGTATCCCTATGGTTCACACAAATAGCCATGACTGACACTACACC
CTTTGGACAACAGAGGGTGTAAAGAGAAAAGTTGACACACGCACACCAAAAGCAAAACGGG
GCACAGCACAAATCATGGAGGTGACAGCCAAGTGGTTATGGGGTTTTCTTTCTAGAAACAAGA
AACCAAGAATTTGCACAAGAGAGGAGTTCACAAGAAAAGTTAGGTCAAACGCAGCCATTGGA
GCAGTGTTCGTTGATGAAAATCAATGGAACCTCAGCAAAAGAAGCAGTGGAAGATGAGCGGTT
CTGGGACCTTGTGCATAGAGAGAGGGAGCTTCACAAACAGGGAAAAATGTGCTACGTGTGTTTA
CAACATGATGGGGAAGAGAGAGAAAAAGCTAGGAGAGTTCGGAAAGGCAAAAGGAAGTCGT
GCAATATGGTACATGTGGTTGGGAGCACGCTTTCTAGAGTTCGAAGCTCTTGGTTTCATGAACG
AAGATCACTGGTTCAGCAGAGAGAATTCCTCAGCGGAGTGGAAGGAGAAGGACTCCACAAA
CTTGGATATATACTCAGAGACATATCAAAGATTCCAGGGGGAAACATGTATGCAGATGACACA
GCCGGATGGGATACAAGGATAACAGAGGATGACCTTCAGAATGAGGCCAGAATTACTGACAT

10

20

30

40

50

CATGGAACCCGAACATGCCCTCCTGGCTAAGTCAATCTTCAAGTTAACCTACCAAAAATAAGGT
GGTAAGGGTACAGAGACCAGCAAAAAATGGAACCGTGATGGATGTCATATCCAGACGTGACC
AGAGAGGAAGTGGTCAGGTCGGAACCTTATGGCTTAAACACTTTCACCAACATGGAAGCCCAGC
TGATAAGACAAATGGAGTCTGAGGGAATCTTTTCACCCAGCGAATTAGAGACCCCAAATTTAG
CCGAGAGAGTTCTCGACTGGCTGGAAAAATATGGCGTCGAAAGGCTGAAAAGAATGGCAATC
AGCGGAGATGACTGCGTAGTGAAACCAATTGATGATAGGTTTGCAACAGCCTTGACAGCTCTG
AATGATATGGGAAAAGTAAGAAAAGATATACCACAATGGGAACCTTCAAAAGGATGGAATGA
TTGGCAACAAGTGCCTTTTTGTTACACCACTTCCACCAGCTGATTATGAAGGATGGGAGGGA
AATAGTGGTGCCATGCCGCAACCAAGATGAACCTTGTGGGTAGGGCTAGAGTATCACAAGGTGC
TGGATGGAGCCTGAGAGAACTGCATGCCTAGGCAAGTCATATGCACAAATGTGGCAGCTGAT
GTACTTCCACAGGAGAGACCTGAGACTAGCCGCTAATGCTATCTGTTACGCCGTTCCAGTTGAT
TGGATCCCAACCAGCCGTACCACCTGGTCGATCCATGCCCATCACCAATGGATGACAACAGAA
GACATGCTGTCACTGTGGAATAGGGTTTGGATAGAGGAAAACCCATGGATGGAGGACAAAAC
CCACATATCCAGTTGGGGAGATGTTCCATATTTAGGAAAAAGGGAAGACCAATGGTGTGGATC
CCTGATAGGCTTAACAGCAAGGGCCACCTGGGCCACCAACATACAAGTGGCCATAAACCAAGT
GAGAAGACTAATTGGGAATGAGAATTATCTAGATTACATGACATCAATGAAGAGATTCAAGA
ACGAGAGTGATCCCGAAGGGGCACTCTGGTGAGTCAACACATTTACAAAATAAAGGAAAAATA
AGAAATCAAACAAGGCAAGAAGTCAGGCCGGATTAAAGCCATAGTACGGTAAGAGCTATGCTG
CCTGTGAGCCCCGTCTAAGGACGTAAAATGAAGTCAGGCCGAAAGCCACGGCTTGAGCAAAC
CGTGCTGCCTGTAGCTCCATCGTGGGGATGTAAAAACCTGGGAGGCTGCAACCCATGGAAGCT
GTACGCATGGGGTAGCAGACTAGTGGTTAGAGGAGACCCCTCCCAGAACATAACGCAGCAGC
GGGGCCCAACACCAGGGGAAGCTGTACCCTGGTGGTAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCC
CCGCATAACAATAAACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCTACAGC
ATCATTCCAGGCACAGAACGCCAGAAAATGGAATGGTGCTGTTGAATCAACAGGTTCT

10

20

SEQ ID NO:10 – DENV-2-NI-BID-V533-2005-E-W/Min

AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAAGACAGATTCTTTGAGGGAGCTAAGCTCAACGTAGTT
CTAACAGTTTTTTAATTAGAGAGCAGATCTCTGATGAATAACCAACGAAAAAAGGCGAGAAGT
ACGCCTTTCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCGCGTGTCAACTGTGCAACAGCTGACAAAG
AGATTCTCACTTGAATGCTGCAAGGACGCGGACCATTAAAACCTGTTTCATGGCCCTTGTGGCGT
TCCTTCGTTTCCTAACAATCCACCAACAGCAGGGATACTAAAAAGATGGGGAACGATCAAAA
AATCAAAAGCTATCAATGTTTTGAGAGGGTTCAGGAAAGAGATTGGAAGGATGCTGAACATCT
TGAACAAGAGACGCAGGACAGCAGGCGTGATTGTTATGTTGATTCCAACAGCGATGGCGTTCC
ATTTAACCACACGCAATGGAGAACCACACATGATCGTTGGTAGGCAGGAGAAAGGGAAAAGT
CTTCTGTTCAAAACAGAGGATGGTGTTAATGTGTACTCTCATGGCCATAGACCTTGGTGAAT
TGTGTGAAGATACAATCACGTACAAGTGTCTCTCCTCAGACAAAATGAACCAGAAGACATAG
ATTGTTGGTGCAACTCTACGTCCACATGGGTAACCTTATGGGACATGTACCACACAGGAGAAC

30

40

50

ACAGAAGAGAAAAAAGATCAGTGGCGCTCGTTCCACATGTAGGTATGGGACTGGAGACACGA
ACTGAAACATGGATGTCATCAGAAGGGGCCTGGAAACATGTTTACAGAGAATTGAAACCTGGATC
TTGAGACATCCAGGTTTTACCATAATGGCAGCAATCCTGGCATAACCCATAGGAACGACACAT
TTCCAAAGGGCCTTGATTTTCACTTTACTGACAGCTGTCGCTCCTTCAATGACAATGCGCTGCA
TAGGAATATCAAATAGAGACTTCGTAGAAGGGGTTTCAGGAGGAAGCTGGGTTGACATAGTCT
TAGAACATGGAAAGTTGTGTGACGACGATGGCAAAAAACAAACCAACATTGGATTTTGAAGTGA
TAAAAACAGAAGCCAAACAACCTGCCACTCTAAGGAAGTACTGTATAGAAGCAAAGCTGACC
AACACAACAACAGAATCGCGTTGCCAACACAAGGGGAACCCAGTCTAATGAGGAGCAGGAC
AAAAGGTTTCATCTGCAAACACTCCATGGTAGACAGAGGATGGGGAAATGGATGTGGATTATTT
GGAAAGGGAGGCATTGTGACCTGTGCTATGTTTACATGCAAAAAGAACATGGAAGGAAAAGT
CGTGCAGCCAGAAAATTTGGAATACACCATCGTGATAACACCTCACTCAGGAGAGGAGCACGC
TG TAGGTAATGACACAGGAAAGCATGGCAAGGAAATCAAAATAACACCACAGAGCTCCATCA
CAGAAGCAGAACTGACAGGCTATGGCACTGTACGATGGAGTGCTCTCCGAGAACGGGCCTCG
ACTTCAATGAGATGGTACTGCTGCAGATGGAAGACAAAGCTTGGCTGGTGCACAGGCAATGGT
TCCTAGACCTGCCGTTACCATGGCTACCCGGAGCGGACACACAAGGATCAAATTGGATACAGA
AAGAGACATTGGTCACTTTCAAAAATCCCCACGCGAAGAAACAGGACGTAGTCGTACTCGGAT
CACAGGAAGGCGCAATGCATACCGCATTGACAGGCGCTACAGAGATACAGATGTCTAGCGGA
AATCTGTTGTTTACAGGGCATCTGAAATGTAGACTGAGAATGGACAACTGCAATTGAAGGGA
ATGTCATACTCTATGTGTACGGGTAAGTTTAAGATAGTCAAAGAGATAGCCGAAACACAACAC
GGAACAATCGTAATTAGGGTGCAATACGAAGGCGACGGGTACCATGTAAGATACCATTCGA
AATTACAGACCTCGAAAAAGACACGTACTCGGAAGACTGATAACAGTGAATCCGATCGTTAC
GGAAAAAGACTCACCCGTTAATATCGAAGCCGAACCACCATTCGGAGACTCATAATAATAAT
CGGAGTCGAACCCGGACAATTGAAACTGAATTGGTTTAAAAAAGGGTCATCAATCGGACAAAT
GTTGAAACAACATATGAGAGGCGCTAAGCGTATGGCTATACTCGGAGACACAGCATGGGACTT
CGGATCCTTAGGGGGAGTGTTTACGTCAATCGGTAAAGGCACTACACCAGGTATTCGGAGCGAT
ATACGGAGCCGCATTTAGCGGAGTGTCGTGGACAATGAAGATACTGATCGGAGTGATAATCAC
ATGGATCGGAATGAATAGTAGGTCTACAAGTCTATCCGTTAGCTTAGTGTTAGTCGGAGTCGTT
ACACTGTATCTAGGCGCTATGGTGCAAGCCGATAGTGGTTGCGTTGTGAGCTGGAAAAATAAA
GAACTGAAATGTGGCAGCGGGATCTTCATCACAGATAACGTACACACATGGACAGAACAAATAT
AAGTTCCAACCAGAAATCCCTTCAAACTAGCTTCAGCTATCCAAAAAGCTCATGAAGAGGGC
ATTTGTGGAATCCGCTCAGTAACAAGATTGGAGAATCTGATGTGGAAACAAATAACACCAGAA
TTGAATCATATTCTATCAGAAAAATGAGGTAAAGTTGACCATTATGACAGGAGACATTAGAGGA
ATCATGCAGGCAGGAAAAACGATCCTTGCGGCCCCAGCCACTGAGCTGAAGTACTCATGGAAA
ACATGGGGAAAGGCGAAAAATGCTCTCCACAGAGTCTACAATCAGACCTTTCTTATTGATGGC
CCTGAAACAGCAGAATGCCCCAACACAAACAGAGCCTGGAACCTCGTGGAAGTTGAAGACTA
TGGTTTTGGAGTTTTACCACCAATATATGGCTGAAATTGAGAGAAAAACAGGATGTATTTTGT
GACTCAAACTCATGTACAGCGGCCATTAAAGACAACAGAGCCGTTTCATGCTGATATGGGTTAT

10

20

30

40

50

TGGATAGAAAAGTGCACCTCAATGACACATGGAAGATGGAGAAAAGCCTCCTTCATTGAAGTTAAA
AGCTGCCACTGGCCAAAGTCACACACCCTTTGGAGCAATGGAGTATTAGAAAAGTGAGATGATA
ATCCCCAAAAAATTTTGGCCGGCCAGTGTCAACACAACACTACAGACCAGGCTACCATACACAA
ACAGCAGGACCTTGGCATCTAGGTAAGCTTGAGATGGACTTTGATCTCTGCGAAGGAACTACA
GTGGTGGTGAAGTGAAGTGTGGAAATAGAGGACCCTCTTTAAGAACGACCACTGCCTCTGGA
AAACTCATAACAGAATGGTGTGCTGCCGATCCTGCACACTACCACCTCTAAGATACAGAGGTGAG
GATGGATGCTGGTACGGGATGGAAATCAGACCATTGAAAGAGAAAAGAAGAGAATTTGGTCAA
CTCCTTGGTCAAGCCGGACATGGGCAGATTGACAACCTTTTCACTAGGAGTCTTGGGAATGGC
ACTGTTCTTGGAAAGAAATGCTCAGGACCCGAATAGGAACGAAACATGCAATACTGCTAGTTGC
AGTATCTTTTGTGACATTGATTACTGGGAACATGTCTTTTAGAGACCTGGGAAGAGTGATGGTT
ATGGTGGGCGCTACCATGACGGATGACATAGGTATGGGAGTGACTTATCTTGGCCCTACTAGCA
GCTTTTAAGGTTAGACCAACTTTTGCAGCTGGACTACTCTTAAGAAAAGTACCTCCAAGGAAT
TGATGATGGCCACCATAGGAATCGCACTCCTTTCCCAAAGCACCATAACCAGAGACCATTTCTTG
AACTGACTGATGCATTAGCCCTGGGCATGATGGTCTCAAAATAGTGAGAAATATGGAAAAAT
ACCAATTGGCAGTGAAGTATCATGGCTATTTTCATGTGTCCCAAATGCAGTGATACTGCAAAACGC
ATGGAAGGTGAGTTGCACAATATTGGCAGCGGTGTCCGTTTCACCACTGCTCTTAACATCCTCA
CAGCAGAAAAGCGGATTGGATACCACTGGCATTGACGATAAAAGGTCTCAATCCAACAGCCATT
TTTTTAACAACCTCTCTCGAGGACCAGCAAGAAAAGGAGCTGGCCGCTAAATGAAGCTATCATG
GCAGTTGGGATGGTGAAGATTTTAGCCAGTTCTCTCTAAAGAATGATATTCTATGACAGGTC
CATTAGTGGCTGGAGGACTCCTCACCGTATGTTACGTGCTCACTGGACGATCGGCCGATTGGA
ACTGGAGAGAGCTGCCGATGTAAAATGGGAAGATCAGGCAGAAATATCAGGAAGCAGCCCAA
TCCTGTCAATAACAATATCAGAAGATGGCAGCATGTGATAAAAAATGAAGAGGAAGAACAA
ACACTGACCATACTCATCAGAACGGGATTGTTGGTGAATCTCAGGAGTCTTTCCAGTATCGATAC
CAATTACGGCAGCAGCATGGTACCTGTGGGAAGTAAAGAAAACAACGGGCTGGAGTACTGTGG
GACGTCCCTTACCCCCACCAAGTGGAAAAAGCCGAACCTGGAGGATGGAGCCTACAGAATCAA
GCAAAGAGGGATCCTTGGATATTCTCAGATTGGAGCCGGAGTTTACAAAGAAGGAACATTCCA
TACAAATGTGGCACGTACACGTGGTGTCTGTATGATGCATAGAGGGAAGAGGATTGAACCATC
ATGGGCAGATGTCAAGAAAGACCTAATATCATATGGAGGAGGCTGGAAGCTAGAAGGAGAAT
GGAAGGAAGGAGAGGAAGTCCAAGTCTGGCATTGGAACCTGGAAAAAATCCAAGAGCCGTC
CAAACGAAACCTGGAATATTCAAACCAACACCGGAACCATAGGCGCCGTATCTCTGGACTTT
TCCCCTGGAACGTCAAGATCTCCAATCGTCGACAGAAAAGGAAAAGTTGTGGGTCTTTACGGT
AATGGTGTGTGTACAAGGAGTGGAGCATATGTAAGTGCTATAGCCCAGACCGAAAAAAGCATT
GAAGACAATCCAGAGATCGAAGATGACATTTTCCGAAAGAAAAGATTGACCATCATGGACCTC
CATCCAGGAGCAGGAAAGACAAAAAGATACCTTCCAGCCATAGTTAGAGAAGCCATAAAACG
TGGCTTGAGAACATTGATCCTGGCTCCCACTAGAGTAGTGGCAGCTGAAATGGAGGAAGCTCT
TAGAGGACTTCCAATAAGATACCAAACTACAGCCATCAAAACCGAGCATACCGGGCGGGAGA
TCGTGGACCTAATGTGTCATGCCACATTTACTATGAGGCTGTTATCACCAGTCAGAGTGCCAAA

10

20

30

40

50

TTACAACCTGATCATCATGGACGAAGCCCACTTCACAGACCCAGCAAGTATAGCAGCTAGAGG
ATACATTTCAACTCGAGTAGAGATGGGTGAAGCAGCCGGGATTTTCATGACAGCCACTCCTCC
GGGAAGTAGAGACCCATTTCTCAGAGCAATGCACCAATTATGGATGAGGAAAGAGAAATCC
CTGAGCGTTCATGGAATTCAGGACACGAATGGGTACGGATTTTAAGGGGAAGACTGTTTGGT
TTGTTCCAAGTATAAAAGCAGGAAATGATATAGCAGCTTGTCTTAGGAAAAATGGAAAGAAA
GTGATACAACTCAGTAGGAAGACTTTTGACTCTGAGTATGTTAAGACTAGAGCCAATGATTGG
GACTTTGTGGTCACAACTGACATTTTCAGAAATGGGTGCCAACTTCAAGGCTGAGAGGGTTATA
GACCCAGACGTTGCATGAAACCAGTTATACTAACAGATGGCGAGGAGCGGGTGATCTTGGCT
GGACCTATGCCAGTGACCCACTCTAGTGCAGCGCAAAGAAGAGGGGAGAATAGGAAGAAATCC
AAAAATGAAATGACCAGTACATATACATGGGGGAACCTCTTGAAATGATGAAGACTGTG
CACATTGGAAAGAAGCTAAAATGCTCCTAGATAACATCAACACACCTGAAGGAATCATTCTTA
GTATGTTTGAACAGAGCGTGAAAAAGTGGATGCCATTGATGGTGAATACCGTTTGAGAGGAG
AAGCAAGGAAAACCTTTGTGGACCTAATGAGAAGAGGGGACTTACCAGTCTGGTTGGCCTACA
AAGTGGCAGCTGAAGGCATCAACTACGCAGACAGAAAGTGGTGTGTTTGATGGAATTAAGAAC
AACCAAATACTGGAAGAAAATATGGAAGTGGAAATCTGGACAAAAGAAGGGGAAAGGAAAA
AATTAACCCAGATGGTTGGATGCTAGGATCTATTCTGACCCACTAGCACTAAAAGAATTCA
AGGAATTTGCAGCTGGAAGAAAATCTTTGACCCTGAACCTAATCACAGAAATGGGTAGGCTTC
CAACTTTTCATGACTCAGAAAGCAAGAAACGCACTGGACAACCTGGCTGTGCTGCATACGGCTG
AGGCAGGTGGAAGGGCGTACAATCATGCTCTCAGTGAAGTCCCGAGACCCTGGAGACACTG
CTCCTACTGACACTTCTGGCAACAGTCACAGGAGGAATCTTCTTATTCTTAATGAGCGGAAAAAG
GTATAGGGAAGATGACCCTGGGAATGTGTTGCATAATCACGGCTAGTATCCTCCTATGGTATG
CACAGATACAACCACACTGGATAGCAGCTTCAATAATACTGGAGTTTTTCTCATAGTTTTGCT
CATTCCAGAACCAGAAAAACAGAGAACACCCCAAGACAACCAATTGACCTACGTTGTCATAGC
CATCCTCACAGTGGTGGCCGCAACCATGGCAAACGAGATGGGTTTCCTGGAAAAACCAAGA
AAGACCTCGGATTGGGAAGCATTACAACCCAGGAATCTGAGAGCAATATCCTGGACATAGATC
TACGCCCTGCATCAGCATGGACGCTGTATGCCGTAGCTACAACATTTGTACACCAATGTTGAG
ACATAGCATTGAAAATTCCCTCAGTGAATGTCTCCCTAACAGCCATTGCTAACCAAGCTACAGTG
CTAATGGGTCTTGGGAAAGGATGGCCATTGTCAAAGATGGACATTGGAGTTCCCCTCCTTGCC
ATTGGATGCTATTCACAAGTCAACCCTATAACTCTCACAGCAGCTCTCCTTTTATTGGTAGCAC
ATTATGCCATTATAGGGCCAGGACTTCAAGCAAAAGCAACCAGAGAAGCCAGAAAAGAGCA
GCAGCAGGCATCATGAAAAACCAACAGTCGATGGAATAACAGTGATTGACCTAGAACCAAT
ACCCTATGATCCAAAAATTTGAAAAGCAGTTAGGACAAGTAATGCTCCTAATCCTCTGCGTGACT
CAAGTATTAATGATGAGGACTACATGGGCTTTATGTGAGGCTCTAACCCCTAGCGACCGGGCCC
ATCTCCCACTGTGGGAAGGAAATCCAGGGAGGTTTTGGAACACTACCATTGCAGTGTCAATG
GCTAACATCTTTAGGGGGAGCTACTTGGCCGGAGCTGGACTTCTCTTTTCCATCATGAAAAACA
CAACAAACACAAGAAGAGGAACTGGCAACATAGGAGAGACACTTGGAGAAAAATGGAAAAG
TCGATTAAACGCACTGGGGAAAAGTGAATTTCAAATCTACAAGAAAAGTGAATCCAGGAAG

10

20

30

40

50

TGGATAGAACCCTAGCAAAAAGAAGGTATCAAAAAGAGGAGAAACGGACCACCATGCTGTGTCG
CGAGGTTTCAGCAAACTGAGATGGTTCGTCGAGAGAAATATGGTCACACCGGAAGGGAAGGT
GGTGGATCTCGGTTGCGGCAGAGGGGGCTGGTCATACTATTGCGGGGGACTAAAGAATGTAAG
AGAAGTCAAAGGCCTAACAAAAGGAGGACCAGGACATGAAGAACCCATCCCCATGTCAACAT
ATGGGTGGAATCTAGTGCGTCTGCAAAGTGGAGTTGACGTTTTCTTCACCCCGCCAGAAAAGT
GTGATACATTGTTGTGTGACATAGGGGAGTCGTACCAAATCCCACGATAGAAGCAGGACGAA
CACTCAGAGTCCTCAACTTAGTGGAATAATTGGTTGAACAATAACACCCAATTTTGCATAAAGG
TCCTCAACCCATATATGCCTTCAGTCATAGAAAAAATGGAAGCATTACAAAGGAAATATGGAG
GAGCCTTAGTGAGGAATCCACTCTCACGAACTCCACGCATGAAATGTACTGGGTATCTAATG
CCACCGGGAACATAGTGTCATCAGTGAACATGATTTCAAGGATGTTGATTAACAGATTCACAA
TGAAACACAAGAAAGCCACTTACGAGCCAGATGTTGACCTAGGAAGTGGAACCCGCAACATT
GGAATTGAAAGTGAGATACCAAATCTAGACATAATAGGAAAGAGAATAGAGAAAATAAAACA
AGAGCATGAAACATCATGGCACTATGATCAAGACCACCCATACAAAACGTGGGCTTACCATGG
CAGCTATGAAACAAAACAACTGGATCAGCATCATCTATGGTGAACGGAGTGGTCAGATTGCT
GACAAAACCTTGGGACGTCGTCCCTATGGTGACACAGATGGCAATGACAGACACGACTCCTTT
TGGACAACAGCGCGTTTTCAAAGAGAAAGTAGACACGAGAACCCAAGAACCGAAGGAAGGCA
CAAAGAACTGATGAAAATTACGGCAGAGTGGCTTTGGAAAGAACTAGGAAAGAAAAAGACA
CCTAGGATGTGTACCAGAGAAGAATTCACAAGAAAAGTGAGAAGCAATGCAGCCTTGGGGGC
CATATTTACTGATGAGAACAAATGGAATCGGCACGTGAGGCTGTTGAAGATGGTAGGTTCTG
GGAGCTGGTTGACAGGGAAAGAAATCTCCATCTTGAAGGAAAAGTGTGAAACATGTGTGTACA
ACATGATGGGAAAAAGAGAGAAGAACTAGGGGAGTTCGGCAAGGCAAAAGGTAGCAGAGC
CATATGGTACATGTGGCTTGGAGCACGCTTCTTAGAGTTTGAAGCCCTAGGATTCCTGAATGAA
GATCACTGGTTCTCCAGAGGGAACCTCCTGAGTGGAGTGGAAGGAGAAGGGCTGCACAGGCT
AGGCTACATTTTAAGAGACGTGGGCAAGAAGGAAGGGGGGGCAATGTACGCCGATGATACAG
CAGGATGGGACACAAGAATCACACTAGAAGACTTAAAAAATGAAGAAATGGTAACGAACCAC
ATGAAAGGAGAACACAAGAACTAGCCGAGGCCATATTCAAATAACGTACCAAAACAAGGT
GGTGCCTGTGCAAAGACCAACACCAAGAGGTACAGTAATGGATATCATATCGAGAAGAGACC
AAAGAGGCAGTGGGCAAGTCGGCACCTATGGCCTTAATACTTCACCAATATGGAAGCCCAAT
TAATTAGACAGATGGAGGGAGAAGGAATCTTCAAAAGCATTACAGCACCTGACAGCCACAGAA
GAAATCGCTGTACAGAACTGGCTAGCAAGAGTGGGGCGTGAAAGGCTATCAAGAATGGCAAT
CAGTGGAGATGATTGTGTTGTAAAACCTATAGATGACAGATTTGCAAGTGCTTTAACAGCTCTA
AATGACATGGGAAAAGTTAGAAAAGATATACAACAATGGGAACCTTCAAGAGGATGGAACGA
TTGGACACAAGTGCCTTTCTGTTACACCACTTTTCATGAGTTAGTCATGAAAGATGGTCGCGTG
CTCGTAGTCCCATGCAGAAACCAAGATGAACTGATTGGTAGAGCCCGAATTTCCCAGGGAGCT
GGGTGGTCTTTGAAAGAGACGGCCTGTTTGGGAAAGTCTTACGCCCAAATGTGGACTCTGATG
TACTTCCACAGACGTGACCTCAGACTGGCGGCAAATGCCATCTGCTCGGCAGTCCCGTCACATT
GGGTTCACAAAGTCGAACAACCTGGTCCATACACGCTAAGCATGAATGGATGACGACGGAA

10

20

30

40

50

GACATGCTGGCAGTCTGGAACAGGGTGTGGATCCAAGAAAACCCGTGGATGGAAGATAAAAC
TCCAGTGGAATCATGGGAAGAAGTCCCATACTTGGGAAAAAGAGAAGACCAATGGTGCGGCT
CATTGATTGGGCTAACAAGCAGGGCTACCTGGGCAAAGAACATCCAAACAGCAATAAATCAA
GTCAGATCCCTTATAGGCAATGAGGAATACACAGACTACATGCCATCCATGAAGAGATTTAGA
AGGGAAGAGGAAGAGGCAGGTGTCCTGTGGTAGAAGGCAAACTAACATGAAACAAGGCTAA
AAGTCAGGTCCGATTAAGCCATAGTACGGAAAAAACTATGCTACCTGTGAGCCCCGTCCAAGG
ACGTTAAAAGAAGTCAGGCCATCACAAAATGCCACAGCTTGAGTAAACTGTGCAGCCTGTAGC
TCCACCTGAGGAGGTGTAAAAAACCTGGGAGGCCACAAACCATGGAAGCTGTACGCATGGCG
TAGTGGACTAGCGGTAGAGGAGACCCCTCCCTTACAAATCGCAGCAAACAACGGGGGCCCCA
AGGTGAGATGAAGCTGTAATCTCACTGGAAGGACTAGAGGTAGAGGAGACCCCCCAAAAC
AAAAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTCAGCATCATTCCA
GGCACAGAACGCCAGAAAATGGAATGGTGCTGTTGAATCAACAGGTTCT

10

SEQ ID NO:11 – DENV-3-VE-BID-V2268-2008-E-W/Min

AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAGAACAGTTTCGACTCGGAAGCTTGCTTAACGTAGTGCT
AACAGTTTTTTATTAGAGAGCAGATCTCTGATGAACAACCAACGGAAGAAGACGGGAAAAAC
GTCTATCAATATGCTGAAACGCGTGAGAAACCGTGTGTCAACTGGATCACAGTTGGCGAAGAG
ATTCTCAAAAGGACTGCTGAACGGCCAGGGACCAATGAAATTGGTTATGGCGTTCATAGCTTT
CCTCAGATTTCTAGCCATTCCACCAACAGCAGGAGTCTTGGCTAGATGGGGAACCTTCAAGAA
GTCGGGGGGCCATTAAGGTCTGAAAGGCTTTAAGAAGGAGATCTCAAACATGCTGAGCATAAT
CAACAAACGGAAGAACATCGCTCTGTCTCATGATGATATTGCCAGCAGCACTTGCTTTCCA
CTTGACTTCACGAGATGGAGAGCCGCGCATGATTGTGGGGAAGAATGAAAGAGGAAAATCCC
TACTTTTTAAGACAGCCTCTGGAATTAACATGTGCACACTCATAGCCATGGACTTGGGAGAGAT
GTGTGATGACACGGTCACTTACAAATGCCCCCATATTACCGAAGTGGAACCTGAAGACATTGA
CTGCTGGTGCAACCTCACATCAACATGGGTGACTTATGGAACGTGCAATCAAGCCGGAGAGCA
TAGACGCGATAAGAGATCAGTGGCGTTAGCTCCCCATGTCGGCATGGGACTGGATACACGCAC
CCAAACTTGGATGTCCGGCTGAAGGAGCTTGGAGGCAAGTCGAGAAGGTAGAGACATGGGCCC
TTAGGCACCCAGGGTTCACCATACTAGCCCTATTTCTTGCCATTACATAGGCACTTCCTTGAC
CCAGAAGGTGGTTATTTTATACTGCTAATGCTGGTCACCCCATCCATGACAATGAGATGTGTG
GGAGTAGGAAACAGAGATTTTGTGGAAGGACTATCAGGAGCTACGTGGGTTGACGTGGTGCTC
GAGCACGGGGGTGTGTGACCACCATGGCTAAGAACAAGCCCACGTTGGATATAGAGCTTCA
GAAGACCGAGGCCACCAACTGGCGACCCTAAGGAAGCTATGCATTGAGGGGAAAATCACCA
ACATAACAACCTGACTCAAGATGTCCTACCCAAGGGGAAGCGGTTTTGCCTGAGGAGCAGGACC
AAAACCTACGTGTGTAAGCATACATACGTAGACAGAGGCTGGGGGAACGGATGTGGTTTGTGTTG
GTAAGGGGAAGCTTGGTAACATGTGCGAAATTTCAATGCCTGGAACCAATAGAGGGAAAAGTG
GTGCAATATGAGAACCTCAAATACACCGTTATCATCACAGTGACACAGGAGACCAACACCAG
GTGGGAAATGAAACGCAGGGAGTCACGGCTGAGATAACACCTCAGGCATCAACCACTGAAGC

20

30

40

50

CATCTTGCTGAATATGGAACCCCTTGGGCTAGAATGCTCACACGGACAGGTTTGGACTTCAAT
GAAATGATCTTGCTAACAATGAAGAACAAAGCATGGATGGTACATAGACAATGGTTTTTTGAC
CTACCTCTACCATGGACATCAGGAGCTACAACGGAAACACCAACCTGGAACAGGAAGGAGCT
TCTTGTGACATTTAAAAACGCACATGCGAAGAAACAAGAAGTAGTCGTTTTAGGGTCACAGGA
GGGAGCTATGCATACCGCACTAACC GGAGCGACTGAGATACAGAATAGCGGAGGGACATCAA
TCTTCGCCGGACACCTTAAGTG TAGATTGAAAAATGGACAACTTGAGCTTAAGGGGATGTCAT
ACGCTATGTGTACGAACACATTTCGTGCTGAAAAAAGAGGTAAGCGAAACGCAACACGGAACG
ATACTGATTAAGGTTGAGTATAAGGGCGAAGACGTCCCATGTAAGATACCTTTTTTCGACAGAG
GACGGACAGGGTAAGGCCATAACGGAAGACTGATTACCGCTAACCCAGTGGTGACCAAAAA
AGAGGAACCAGTCAATATCGAAGCCGAACCTCCATTTCGGAGAGTCAAAACATAGTGATAGGGA
TAGGCGATAACGCACCTTAAGATTAAGTGGTACAAAAAAGGGTCATCAATCGGTAAGATGTTTG
AGGCAACCGCTAGGGGGGCTAGACGGATGGCCATACTCGGAGACACCGCATGGGACTTCGGA
TCCGTGGGGGGGGTACTTAACCTCACTCGGTAAGATGGTGCACCAAATTTTCGGATCCGCATAT
ACCGCTCTATTTAGCGGAGTGTATGGGTGATGAAAATCGGAATCGGAGTTCTATTGACATGG
ATCGGATTGAACTCTAAGAATACATCTATGTCATTTTCATGTATCGCAATCGGAATTATTACGC
TATATCTCGGAGCCGTAGTGCAAGCCGACATGGGGTGTGTTATAAACTGGAAAGGCAAAGAAC
TCAAGTGTGGAAGTGAATCTTCGTCACCAACGAGGTCCATACCTGGACAGAGCAATACAAAT
TCCAAGCAGACTCCCCAAAAAGATTGGCGACAGCCATTGCAGGCGCTTGGGAGAATGGAGTGT
GCGGAATTAGGTCAACAACCAGAATGGAGAATCTCCTGTGGAAGCAAATAGCCAATGAACTG
AACTACATATTGTGGGAAAACAATATCAAATTAACGGTTGTTGTGGGCGATATAATTGGGGTC
TTAGAGCAAGGGAAAAGAACACTAACACCACAACCCATGGAGCTAAAATACTCATGGAAAAC
GTGGGGAAAGGCAAAAATAGTGACAGCTGAAACACAAAATTCTTCTTTCATAATAGATGGACC
AAACACACCGGAGTGTCCAAGTGCCTCAAGAGCATGGAATGTGTGGGAGGTGGAAGATTACG
GGTTCGGAGTCTTCAACAACCAACATATGGCTGAAACTCCGAGAGGTGTATACCCAACATATGTG
ACCATAGGTAAATGTGCGCAGCCGTCAAGGATGAAAGGGCCGTACATGCCGACATGGGCTATT
GGATAGAAAAGTCAAAAAGATGGAAGTTGGAAGCTAGAAAAAGCATCCCTCATAGAGGTGAAA
ACCTGCACATGGCCAAAATCACATACCCTTTGGAGTAATGGTGTGTTAGAGAGTGACATGATC
ATTCCAAAAAGTCTAGCTGGTCCATCTCGCAACACAACCTACAGGCCCGGGTACCACACCCAG
ACGGCGGGACCTTGGCATTTAGGAAAATTAGAGCTGGACTTCAACTATTGTGAAGGAACAACA
GTTGTCATCACAGAAAACCTGTGGGACAAGAGGCCCATCATTGAGAAACAACAACAGTGTCAGG
GAAGTTAATACACGAATGGTGTGCCGCTCGTGCACACTTCCTCCCCTGCGATACATGGGAGA
AGACGGTTGCTGGTATGGCATGGAAATCAGACCCATCAGTGAGAAAGAAGAAAACATGGTAA
AGTCTTTAGTCTCAGCGGGAAGTGGAGAGGTGGACAACCTTCACAATGGGTGTCTTGTGTTTGG
CAATCCCTCTTTGAAGAGGTGATGAGAGGAAAAATTTGGGAAGAAAACACATGATTGCGGGGGTTT
TCTTCACGTTTGTACTCCTTCTCTCAGGGCAAATAACATGGAGAGATATGGCGCACACACTAAT
AATGATTGGGTCCAATGCATCTGACAGGATGGGAATGGGCGTCACCTACCTAGCTTTAATTGC
AACATTTAAAAATCCAGCCATTTTTGGCTTTGGGATTTTTTCCTAAGAAAACCTGACATCCAGAGAA

10

20

30

40

50

AATTTATTGTTAGGAGTTGGGCTGGCTATGGCAACAACGTTACAACCTGCCAGAGGACATTGAA
CAAATGGCAAATGGAATCGCTCTGGGGCTCATGGCTCTCAAACCTGATAACACAATTTGAAACA
TACCAACTATGGACAGCATTAAATCTCCTTAACGTGTTCAAATACAATTTTTACGTTGACTGTTG
CCTGGAGAACAGCCACCCTGATTTTGGCTGGAGTTTCACTTTTACCAGTGTGCCAGTCTTCGAG
TATGAGGAAAACAGACTGGCTTCCAATGACAGTGGCAGCTATGGGAGTTCCACCTCTACCACT
TTTTATTTTTAGCTTAAAAGACACACTCAAAGGAGAAGCTGGCCACTGAATGAAGGGGTGAT
GGCTGTTGGGCTTGTGAGCATTCTGGCCAGTTCTCTCCTTAGAAATGATGTACCCATGGCTGGA
CCATTAGTGGCCGGGGGCTTGTGTATAGCGTGTCTACGTCATAACTGGCACGTCAGCAGACCTC
ACCGTAGAAAAAGCAGCAGATGTAACATGGGAGGAAGAGGCTGAGCAAACAGGAGTGTCCCA
CAACTTAATGATCACAGTTGATGATGATGGAACAATGAGAATAAAAGATGATGAGACTGAGA
ATATCTTAACAGTGTCTTTGAAAACAGCATTACTAATAGTGTGTCAGGAATCTTTCATACTCCAT
ACCCGCAACATTGTTGGTCTGGCATACTTGGCAAAAAGCAAACCCAAAGATCCGGCGTTCTATG
GGATGTACCCAGCCCTCCAGAGACACAGAAAGCAGAACTGGAAGAAGGGGTCTATAGGATCA
AACAGCAAGGAATTTTTGGGAAAACCCAAGTAGGGGTGGAGTACAGAAAGAAGGAGTCTTT
CACACCATGTGGCACGTTACAAGAGGGGCAGTGTGACATATAATGGGAAAAGACTGGAACC
AAATTGGGCTAGCGTGAAAAAAGATCTGATTTTCATACGGAGGAGGATGGAGATTGAGCGCAC
AATGGCAAAAGGGGGAGGAGGTGCAGGTTATTGCCGTAGAGCCTGGGAAGAACCCAAAGAAC
TTTCAAACCATGCCAGGCACTTTTCAGACTACAACAGGGGAAATAGGAGCAATTGCACTGGAT
TTCAAGCCCGGAACCTCAGGATCTCCTATCATAAACAGAGAGGGAAAGGTAGTGGGACTGTAT
GGCAATGGAGTGGTTACAAAGAATGGTGGCTACGTCAGCGGAATAGCGCAAACGAATGCAGA
ACCAGATGGACCGACACCAGAATTGGAAGAAGAGATGTTCAAAAAGCGAAATCTAACCATAA
TGGATCTTCATCTGGGTCAGGAAAAGACACGGAAATACCTTCCAGCTATTGTTAGAGAGGCAA
TCAAGAGACGTTTGAGAACTCTAATTCTGGCACCAACAAGGGTGGTTGCAGCTGAGATGGAAG
AAGCATTGAAAGGGCTCCCAATAAGGTACCAAAACAACAGCAACAAAATCTGAACACACAGGA
AGAGAGATTGTTGATCTGATGTGCCACGCAACGTTTACAATGCGTCTGCTGTACCCAGTTAGG
GTTCCAAACTATAACTTGATAATAATGGATGAAGCCCATTTACAGACCCAGCCAGTATAGCT
GCTAGAGGGTACATATCAACTCGTGTGGAATGGGAGAAGCAGCCGCAATATTCATGACAGCA
ACGCCCCCTGGAACAGCTGATGCCTTTCCCAGAGCAACGCTCCAATTCAAGATGAAGAAAGG
GACATACCAGAACGCTCATGGAATTCAGGCAATGAATGGATAACCGACTTCGCTGGGAAAAC
GGTGTGGTTTTGTCCCCAGCATTAAGCCGGAAATGACATAGCAAATTGCCTGCGGAAAAACGG
GAAAAAGGTCATTCAACTTAGTAGGAAGACTTTTGACACAGAATATCAGAAAAACCAACTGA
ATGATTGGGACTTTGTGGTGACGACTGACATTTTCAGAAATGGGGGCCAATTTCAAAGCAGATA
GAGTGATCGACCCAAGAAGATGTCTCAAACCAAGTGATCCTGACAGATGGACCAGAGCGGGTG
ATCCTGGCTGGACCAATGCCAGTCACCGCAGCGAGTGCTGCGCAAAGGAGAGGGAGAGTTGG
CAGGAACCCACAAAAAGAAAATGACCAGTACATATTCACGGGCCAGCCTCTCAACAATGATG
AAGACCATGCTCACTGGACAGAAGCAAAAATGCTGCTGGACAACATTAACACACCAGAAGGG
ATCATACCAGCTCTCTTTGAGCCAGAAAGGGAGAAGTCAGCCGCCATAGACGGTGAGTATCGC

10

20

30

40

50

CTGAAAGGTGAGTCCAGGAAGACTTTTCGTGGAACATCATGAGGAGGGGTGACCTTCCAGTCTGG
TTAGCCCATAAAGTAGCATCAGAAGGGATCAAATATACAGATAGAAAATGGTGCTTTGATGGA
CAACGTAATAATCAAATTTTAGAAGAGAACATGGATGTGGAAATCTGGACAAAGGAAGGAGA
AAAGAAAAAATTGAGACCTAGGTGGCTTGATGCTCGCACCTATTCAGATCCCTTAGCACTCAA
GGAATTCAAGGACTTTGCGGCTGGCAGGAAGTCAATAGCCCTTGATCTTGTGACAGAAATAGG
AAGAGTGCCTTCACACCTAGCTCATAGAACGAGAAACGCTCTGGACAATCTGGTGATGCTGCA
TACGTCAGAACATGGCGGTAAAGGCCTACAGGCATGCGGTGGAGGAACTACCAGAGACAATGG
AAACACTCCTACTCTTGGGACTCATGATCTTGTGACAGGTGGAGCAATGCTTTTCTTAATATC
AGGTAAAGGGATTGGAAAGACTTCAATAGGACTCATTTGTGTAATTGCTTCCAGCGGCATGTT
GTGGATGGCCGAAATCCCCTCCAATGGATCGCGTCGGCCATAGTCCTGGAGTTTTTTATGATG
GTGTTGCTTATACCAGAACCAGAGAAGCAGAGAACCCCCAAGACAACCAACTCGCATATGTC
GTGATAGGCATACTTACACTGGCAGCAATAATAGCAGCCAATGAAATGGGATTGTTGGAAACT
ACAAAGAGAGATTTAGGAATGTCTAAGGAGCCAGGTGTTGTTTCTCCAACCAGCTATTTAGAT
GTGGACTTGCACCCAGCATCAGCCTGGACATTGTACGCTGTGGCCACTACAGTAATAACACCA
ATGTTAAGACATACCATAGAGAATTCCACAGCAAATGTGTCCTTGGCAGCTATAGCCAACCAG
GCAGTGGTCCTGATGGGTTTGGACAAAGGATGGCCAATATCAAAAATGGACTTAGGAGTACCC
CTGCTGGCATTGGGTTGCTATTACAAAGTGAACCCACTGACTCTAACAGCGGCAGTACTCTTGC
TGATCACACATTATGCCATTATAGGTCCAGGATTGCAGGCAAAAGCCACCCGTGAAGCTCAGA
AAAGGACAGCTGCTGGAATAATGAAGAATCCAACAGTGGATGGGATAATGACAATAGACCTA
GATCCTGTAATATATGATTCAAAATTTGAAAAGCAACTGGGACAGGTTATGCTCCTGGTTTTGT
GTGCAGTTCAACTTTTGTTAATGAGAACATCATGGGCCTTGTGTGAAGCTTTAACCCTAGCTAC
AGGACCAATAACAACACTCTGGGAAGGATCACCTGGGAAGTTTTGGAACACCACGATAGCTGT
TTCCATGGCGAACATTTTTAGAGGGAGCTATTTAGCAGGAGCTGGGCTTGCTTTCTCTATTATG
AAATCAGTTGGAACAGGGAAGAGGAACAGGCTCACAGGGTGAACTTTGGGAGAAAAATG
GAAAAAGAAGTTAAATCAATTATCCCGGAAAGAGTTTGACCTTTACAAGAAATCTGGAATCAC
TGAGGTGGATAGAACAGAAGCCAAAGAAGGGTTGAAAAGAGGAGAAATAACACATCATGCCG
TGTCAGAGGTAGTGCAAACTTCAATGGTTTGTGGAGAGAAACATGGTCAATCCCGAAGGAA
GAGTTATAGACTTGGGCTGTGGAAGAGGAGGCTGGTCATATTACTGTGCAGGACTGAAAAAG
TCACAGAAGTGCGAGGATACACAAAAGGCGGTCCAGGACACGAAGAACCAGTACCTATGTCC
ACATATGGATGGAACATAGTTAAGTTAATGAGTGGAAAGGATGTGTTTTATCTTCCACCTGAA
AAGTGTGACACCTGTTGTGCGACATTGGAGAATCTTCACCAAGCCCAACAGTGAAGAAAGC
AGAACTATAAGAGTTTTGAAGATGGTTGAACCATGGCTAAAGAACAACCAATTTTGTATTAAA
GTATTGAACCTTACATGCCAACTGTGATTGAGCACCTAGAAAAGACTACAAAGGAAACATGGA
GGAATGCTTGTGAGAAATCCACTTTCACGAACTCCACGCACGAAATGTACTGGATATCCAAT
GGCACAGGTAACATTGTCGCTTCAGTCAACATGGTATCTAGACTGCTACTGAACAGGTTACG
ATGACACACAGAAGACCCACCATTGAGAAAGATGTGGATTAGGAGCAGGAACTCGACATGT
TAATGCGGAACCAGAAACACCAACATGGATGTCAATTGGGGAAAGAATAAAAAGGATCAAGG

10

20

30

40

50

AGGAGCATAATTCAACATGGCACTACGATGACGAAAAACCCCTACAAAACGTGGGCTTACCATG
GATCTTATGAAGTCAAAGCCACAGGCTCAGCCTCCTCCATGATAAATGGAGTCGTGAAACTCC
TCACTAAACCATGGGATGTGGTGCCCATGGTGACACAGATGGCAATGACAGATACAACTCCAT
TTGGCCAGCAGAGAGTCTTTAAAGAGAAAGTGGACACCAGGACACCCAGGTCCATGCCAGGA
ACAAGAAGGGTTATGGGGATCACAGCGGAGTGGCTCTGGAGAACCCTGGGAAGGAATAAAAA
ACCCAGGTTATGCACAAGGGAAGAGTTTACAAAAAAGGTCAGAACTAACGCAGCCATGGGAG
CTGTTTTTCACAGAGGAGAACCAATGGGACAGCGCGAAAGCTGCTGTTGAGGATGAGGATTTTT
GGAAACTTGTGGACAGAGAACGTGAACTCCACAACTGGGCAAGTGTGGAAGCTGTGTTTACA
ACATGATGGGTAAGAGAGAGAAGAACTTGGAGAGTTTGGCAAAGCAAAGGCAGTAGAGCT
ATATGGTACATGTGGTTGGGAGCCAGGTACCTTGAGTTCGAAGCCCTTGGATTCTTAAATGAA
GACCACTGGTTCTCGCGTGAGAACTCTTACAGTGGAGTGGAAGGAGAAGGACTGCACAAGCTA
GGCTATATATTAAGGGACATTTCCAAGATACCCGGAGGAGCTATGTATGCTGATGACACAGCT
GGTTGGGACACAAGAATAACAGAAGATGACCTGCACAATGAGGAAAAGATCACACAGCAAAT
GGACCCTGAACACAGGCAGTTAGCGAACGCTATATTTAAGCTCACATACCAAAACAAAGTGGT
CAAAGTTCAACGACCGACTCCAACAGGCACGGTAATGGATATCATATCTAGGAAAGACCAAA
GAGGCAGTGGACAGGTAGGAACTTATGGTCTGAATACATTCACCAACATGGAAGCCCAGTTAA
TCAGACAAATGGAAGGAGAAGGTGTGCTGTCAAAGGCAGACCTCGAGAACCCTCATCTGCCA
GAGAAGAAAATTACACAATGGTTGGAAACCAAAGGAGTGGAGAGGTTAAAAAGAATGGCCAT
AAGTGGGGATGACTGCGTGGTGAAACCAATCGATGACAGGTTGCTAATGCCCTGCTCGCTCT
GAACGACATGGGAAAGGTTTCGGAAGACATACCTCAATGGCAGCCATCAAAGGGATGGCATG
ATTGGCAACAGGTTCTTTCTGCTCCCACCACTTTCATGAATTGATCATGAAAGATGGAAGAAA
GTTGGTGGTTCCCTGCAGACCCCAGGACGAACTAATAGGAAGGGCAAGAATCTCTCAAGGAGC
GGGATGGAGCCTTAGAGAAACCGCATGTCTGGGGAAAGCCTACGCTCAAATGTGGAGTCTCAT
GTATTTTCACAGAAGAGACCTCAGACTAGCATCCAACGCCATATGTTACAGCAGTACCAGTCCA
CTGGGTCCCCACAAGTAGAACGACATGGTCTATTACGCTCACCATCAGTGGATGACCACAGA
AGACATGCTTACTGTCTGGAACAGAGTGTGGATCGAGGACAATCCATGGATGGAAGACAAAA
CTCCAGTCAACAACCTGGGAAAATGTTCCATATCTAGGGAAGAGAGAAGACCAATGGTGC GGAT
CACTTATTGGTCTCACTTCCAGAGCAACCTGGGCCCAGAACATACCCACAGCAATTCAACAGG
TTAGAAGCCTTATAGGCAATGAAGAGTTTCTGGACTACATGCCTTCAATGAAGAGATTTAGGA
AGGAGGAGGAGTCGGAGGGAGCCATTTGGTAAAAACGTAGGAAGTGAAAAAGAGGTTAACTGT
CAGGCCATATTAAGCCACAGTACGGAAGAAGCTGTGCTGCCTGTGAGCCCCGTCCAAGGACGT
TAAAAGAAGAAGTCAGGCCCCAAAGCCACGGTTTGAGCAAAACCGTGCTGCCTGTAGCTCCGTC
GTGGGGACGTAAAACCTGGGAGGCTGCAAACTGTGGAAGCTGTACGCACGGTGTAGCAGACT
AGCGGTTAGAGGAGACCCCTCCCATGACACAACGCAGCAGCGGGGCCCCGAGCACTGAGGGAA
GCTGTACCTCCTTGCAAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCCCGCAAATAAAAAACAGCATAT
TGACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTCAGCATCATTCAGGCACAGAACGCCA
GAAAATGGAATGGTGTGTTGAATCAACAGGTTCT

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:12 – DENV4_Syn_E-W/Min

AGTTGTAGTCTGTGTGGACCGACAAGGACAGTTCCAAATCGGAAGCTTGCTTAACACAGTTCT
AACAGTTTGTTTAAATAGAGAGCAGATCTCTGGAAAAATGAACCAACGAAAAAAGGTGGTTA
GACCACCTTTCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCGCGTATCAACCCCTCAAGGGTTGGTGA
AGAGATTCTCAACCGGACTTTTTTCTGGGAAAGGACCCTTACGGATGGTGCTAGCATTTCATCAC
GTTTTTGCGAGTCCTTTCCATCCCAACAGCAGGGATTCTGAAGAGATGGGGACAGTTGAA
GAAAAATAAGGCCATCAAGATACTGATTGGATTAGGAAGGAGATAGGCCCGCATGCTGAACA
TCTTGAAACGGGAGAAAAAGGTCAACGATAACATTGTTGTGCTTGATTCCCACCGTAATGGCGT
TTCACTTGTCAACAAGAGATGGCGAACCCCTCATGATAGTGGCAAAACATGAAAGGGGGAGA
CCTCTCTTGTTTAAGACAACAGAGGGGATCAACAAATGCACTCTCATTGCCATGGACTTGGGTG
AAATGTGTGAGGACACTGTCACGTATAAATGCCCCCTACTGGTCAATACCGAACCTGAAGACA
TTGATTGCTGGTGCAACCTCACGTCTACCTGGGTCATGTATGGGACATGCACCCAGAGCGGAG
AACGGAGACGAGAGAAGCGCTCAGTAGCTTTGACACCACATTCAGGAATGGGATTGGAAACA
AGAGCTGAGACATGGATGTCATCGGAAGGGGCTTGGAAGCATGCTCAGAGAGTAGAGAGCTG
GATACTCAGAAACCCAGGATTTGCGCTCTTGCGCAGGATTTATGGCTTATATGATTGGGCAAAC
AGGAATCCAGCGAACTGTCTTTTGTCTTAATGATGCTGGTCGCCCCATCTACGGAATGCGG
TGCGTAGGAGTAGGAAACAGAGACTTTGTGGAAGGAGTCTCAGGTGGAGCATGGGTGACCT
GGTGCTAGAACATGGAGGATGCGTCACAACCATGGCCAGGGAAAACCAACCTTGGATTTTGA
ACTGACTAAGACAACAGCTAAGGAAGTGGCTCTGTTAAGAACCTATTGCATTGAAGCCTCAAT
ATCAAACATAACTACGGCAACAAGATGTCCAACGCAAGGAGAGCCTTATCTGAAAGAGGAAC
AGGACCAACAGTACATCTGCCGGAGAGATGTGGTAGACAGAGGATGGGGCAATGGCTGTGGC
TTGTTTGAAAAAGGAGGAGTTGTGACATGTGCGAAGTTTTTCATGTTCCGGGAAGATAACAGGC
AATCTGGTCCAAATTGAGAACCTTGAATACACAGTGGTTGTAACAGTCCACAATGGAGACACC
CATGCAGTAGGAAATGACACATCCAATCATGGAGTTACAGCCACGATAACTCCCAGGTCACCA
TCGGTAGAAGTCAAATTGCCGACTATGGAGAACTAACACTCGATTGTGAACCCAGGTCTGGA
ATTGACTTTAATGAGATGATCCTAATGAAAATGAAAAAGAAAACATGGCTCGTGATAAGCAA
TGGTTTTTGGATCTGCCTCTTCCATGGACAGCAGGAGCAGACACATCAGAGGTTCACTGGAATT
ACAAAGAGAGAATGGTGACGTTCAAGGTTCTCATGCCAAGAGACAGGACGTTACAGTGTTAG
GGTCACAGGAGGGAGCTATGCATAGCGCACTAGCCGGAGCAACCGAAGTCGATAGCGGAGAC
GGAAATCATATGTTCCGGGACATCTGAAATGCAAAGTGAGAATGGAGAAATTGCGGATTAA
GGGAATGTCATACACTATGTGTTCCGGTAAGTTTTTCGATTGACAAAGAGATGGCCGAAACGCA
ACACGGAACAACAGTCGTTAAGGTTAAGTACGAAGGAGCCGGAGCTCCGTGTAAAGTGCCAA
TCGAAATTAGAGACGTTAACAAAGAGAAAGTGGTCGGAAGAGTGATATCTAGTACACCCCTA
GCCGAAAATACGAATTCGGTTACGAATATCGAACTCGAACCCCCCTTTGGAGACTCATACATA
GTGATAGGAGTGGGTAAATTCGCACTCACGTTGCACTGGTTCAGAAAGGGATCATCAATCGGG
AAGATGTTCTGAATCAACATATAGGGGAGCGAAAAGAATGGCTATATTGGGCGAAACCGCATG

10

20

30

40

50

GGACTTCGGATCAGTCGGAGGACTGTTTACGAGTCTGGGTAAGGCCGTACATCAGGTATTCGG
ATCAGTGTATACAACAATGTTTGGCGGAGTGTCATGGATGATACGGATACTGATAGGGTTTCT
AGTGTGTGGATCGGAACGAACACGTAATACGTCTATGGCTATGACATGTATTGCCGTAGG
GGGGATTACACTGTTTCTGGGATTTACAGTGCAAGCAGACATGGGTTGTGTGGTGTTCATGGAG
TGGGAGAGAATTGAAGTGTGGAAGCGGAATTTTTGTGGTTGACAACGTGCACACTTGGACAGA
ACAGTACAAATTTCAACCAGAGTCCCCAGCGAGACTAGCGTCTGCAATATTAAATGCCCACAA
AGATGGGGTCTGTGGAATTAGATCAACCACGAGGCTGGAAAATGTTATGTGGAAGCAAATAA
CCAATGAGCTAAACTATGTTCTCTGGGAAGGAGGACATGATCTCACTGTAGTGGCTGGGGATG
TGAAAGGGGTGTTGACCAAGGGCAAGAGAGCACTCACACCCCCAGCGAGTGTCTGAAATAT
TCATGGAAGACATGGGGGAAAGCAAAAATCTTCACCCCTGAAGCAAGAAACAGCACATTTTAA
ATAGACGGACCAGACACCTCTGAATGCCCAATGAACGAAGGGCATGGAATTCCTTTGAGGTG
GAAGACTATGGATTTGGCATGTTACGACCAACATATGGATGAAATTCCGAGAAGGAAGTTCA
GAAGTGTGTGACCACAGGTAAATGTCAGCTGCAATTAAGACCAGAAAGCTGTGCATGCTGAC
ATGGGTTATTGGATAGAGAGCTCAAAAAACCAGACCTGGCAGATAGAGAGAGCATCTCTTATT
GAAGTGAAAACATGTCTGTGGCCCAAGACCCATACACTGTGGAGCAATGGAGTGCTGGAAAG
CCAGATGCTTATTCCAAAATCATATGCAGGCCCTTTTTACAGCACAATTACCGCCAGGGCTAT
GCTACGCAAACCGTGGGTCCATGGCACTTAGGCAAACCTAGAGATAGACTTTGGAGAATGCCCC
GGAACAACAGTCACAATTCAGGAGAATTGTGACCATAGAGGCCCATCTTTGAGGACCACT
GCATCTGGAAAACCTAGTCACGCAATGGTGTGCGCTCCTGCACGATGCCCCCTTAAGGTTCT
TAGGAGAAGATGGGTGCTGGTATGGGATGGAGATTAGGCCCTTGAGTGAAAAAGAGAAGAAC
ATGGTCAAATCACAGGTGACGGCCGGACAGGGCACATCGGAAACTTTTTCAATGGGTCTGTTG
TGCCTGACCTTGTTTGTGGAAGAATGCTTGAGGAGAAGAGTCACCAGGAAACACATGATATTA
GCTGTGGTAATCACTCTTTGTGCTATCATCCTGGGGGGCCTCACATGGATGGACTTGCTACGAG
CCCTCATCATGTTGGGGGACACTATGTCTGGTAGAATAGGAGGACAGACCCACCTAGCCATCA
TGGCAGTGTTCAGATGTCACCGGGATACGTGCTGGGTGTGTTTTAAGGAAACTCACTTCAAG
AGAGACAGCACTAATGGTAATAGGAATGGCCATGACAACAACACTTTCAATTCCACATGACCT
CATGGAACTCATTGATGGAATATCACTAGGACTAATTTTGCTAAAAATAGTAACACAGTTTGA
CAACACCCAAGTGGGAACCTTAGCTCTTTCCTTGACTTTCATAAGATCAACAATGTCATTGGTC
ATGGCTTGGAGGACCATTATGGCTGTGTTGTTTGTGGTCACACTCATTCTTTGTGCAGGACAA
GCTGTCTTCAAAAACAGTCTCATTGGGTAGAAATAACAGCACTCATCCTAGGAGCCCAAGCTC
TGCCAGTGTACCTAATGACTCTTATGAAAGGAGCCTCAAGAAGATCTTGGCCTCTTAACGAAG
GCATAATGGCTGTGGGTTTGGTTAGTCTCTTAGGAAGCGCTCTTTTAAAGAATGATGTCCCTTT
AGCTGGCCCAATGGTGGCAGGAGGCTTACTTCTGGCGGCTTACGTAATGAGTGGCAGCTCAGC
AGATCTGTCACTAGAGAAGGCCGCTAATGTGCAGTGGGATGAAATGGCAGACATAACAGGCT
CAAGTCCAATCATAGAAGTGAAGCAAGATGAGGATGGCTCTTCTCCATACGGGACGTCGAGG
AAACCAATATGATAACCCCTTTTGGTGAAACTGGCACTGATAACGGTGTGAGGTCTCTACCCCTT
GGCAATTCCAATCACAATGACCTTATGGTACATGTGGCAAGTGAAAACACAAAGATCAGGAGC

10

20

30

40

50

CCTGTGGGACGTCCCTTCACCCGCCGCACTCAAAAAGCCGCACTGTCTGAAGGAGTGACAG
GATCATGCAAAGAGGGTTATTCGGGAAAACCTCAGGTTGGAGTAGGGATACACATGGAAGGTG
TATTTACACAATGTGGCATGTTACAAGAGGATCGGTGATCTGCCACGAGACTGGGAGATTGG
AGCCATCTTGGGCTGATGTCAGGAATGACATGATATCATAACGGTGGGGGATGGAGGCTTGGAG
ATAAATGGGACAAAGAAGAAGACGTTTCAGGTCCTCGCTATAGAACCAGGGAAAAATCCCAAA
CATGTCCAAACGAAACCTGGCCTTTTCAAGACCCTAACTGGAGAAAATTGGAGCAGTAACATTA
GATTTCAAACCCGGAACGTCTGGTTCTCCATTATCAACAGGAAAAGGAAAAGTCATCGGACTC
TATGGAAATGGAGTGGTCACCAAATCAGGTGATTACGTCAGTGCCATAACACAAGCCGAAAAG
AATTGGAGAGCCAGATTATGAAGTGGATGAGGACATTTTTTCGAAAGAAAAGACTAACTATAAT
GGACTTACACCCCGAGCCGGAAGACAAAAAGAATTCTTCCATCAATAGTGAGAGAAGCCTT
AAAAAGGAGGCTGCGAACTTTGATTTTGGCTCCCACGAGAGTGGTGGCGGCCGAGATGGAAG
AGGCCCTACGTGGACTGCCAATCCGTTACCAAACCCAGCTGTAAAATCAGAACACACAGGAA
GAGAGATTGTAGACCTCATGTGCCATGCAACCTTCACAACAAGACTTTTGTTCATCAACCAGAG
TTCCAAACTACAACCTTATAGTAATGGATGAAGCACATTTACCGATCCTTCCAGTGTGCGGGC
TAGAGGATACATTTGACCAGGGTGGAAATGGGAGAGGCAGCAGCCATCTTCATGACCGCAA
CCCCTCCCGGAGCGACAGATCCCTTTCCCCAGAGCAACAGCCCAATAGAAGACATCGAGAGAG
AGATTCCGAAAGGTCATGGAACACAGGGTTGCACTGGATAACAGACTACCAAGGGAAAACCT
GTGTGGTTTTGTTCCAGCATAAAAGCTGGAAATGACATTGCAAATTGTTTGAGAAAAGTCGGGA
AAGAAAGTTATCCAGTTGAGTAGGAAAACCTTTGATACAGAATATCCAAAAACGAAACTCACG
GACTGGGACTTTGTGGTCACTACAGACATATCTGAAATGGGGGGCTAACTTTAGAGCTGGGAGA
GTGATAGACCCTAGAAGATGCCTCAAGCCAGTTATCCTAACAGATGGGCCAGAGAGAGTCATC
TTAGCAGGTCCATTTCAGTGACTCCAGCAAGCGCTGCTCAGAGAAGAGGGCGAATAGGAAG
GAACCCAGCACAGAAGACGACCAATACGTTTTCTCCGGAGACCCACTAAAAAATGATGAAG
ACCATGCCCCTGGACAGAAGCAAAGATGCTGCTTGACAATATCTACACCCAGAAAGGGATCA
TTCCAACATTGTTTGGTCCGGAAGGGAAAAAACCAAGCTATTGATGGAGAGTTTCGCCTCA
GAGGGGAACAAAGGAAGACTTTTGTGGAATTAATGAGGAGAGGAGACCTTCCGGTGTGGCTG
AGTTATAAGGTAGCTTCTGCTGGCATTTCTTACAAAGATCGGGAATGGTGCTTTACTGGGGAAA
GAAATAACCAAATTTTAGAAGAAAACATGGAGGTTGAAATTTGGACTAGAGAGGGAGAAAAG
AAAAAACTGAGGCCAAAATGGTTAGATGCACGTGTATACGCTGACCCCATGGCTTTGAAGGAT
TTCAAGGAGTTTGCCAGTGGAAGGAAGAGTATAACTCTCGACATCCTAACAGAGATCGCCAGT
TTGCCAACTTACCTTTCTCTAGGGCCAAGCTCGCCCTTGACAACATAGTTATGCTCCACACAA
CAGAAAGAGGAGGGAGGGCCTATCAACATGCCCTGAACGAACTTCCGGAGTCACTGGAAACA
CTCATGCTTGTAGCCTTACTAGGAGCTATGACAGCAGGTATCTTCTGTTTTTCATGCAAGGGA
AAGGAATAGGGAAATTGTCAATGGGTTTGATAACCATTGCGGTGGCTAGTGGCTTGCTCTGGG
TAGCAGAAATTCAACCCCACTGGATAGCGGCCTCAATCATACTGGAGTTTTTTCTCATGGTACT
GTTGATACCAGAACCAGAAAAACAAAGGACCCCAAGACAATCAATTGATCTACGTTCATATT
GACCATTTCTACCATTTATTGGTCTAATAGCAGCCAACGAGATGGGGCTGATAGAAAAAACAA

10

20

30

40

50

AACGGATTTTGGGTTTTACCAGGTAAAAACAGAAACCACCATCCTCGATGTGGACCTGAGACC
AGCTTCAGCATGGACGCTCTATGCGGTAGCCACCACAATTCTGACTCCCATGCTGAGACACAC
CATAGAAAATACGTCGGCCAACCTATCTTTAGCAGCCATCGCCAACCAGGCAGCCGTCCTAAT
GGGGCTTGGAAAAGGATGGCCACTCCACAGAATGGACCTCGGTGTGCCGCTGTTAGCAATGGG
ATGCTATTCTCAAGTGAACCCAAACAACCTTGACAGCATCCTTAGTCATGCTTTTAGTCCATTAT
GCAATAATAGGCCAGGATTGCAGGCAAAAGCCACAAGAGAGGCCAGAAAAGGACAGCTGC
TGGAATCATGAAAAATCCACAGTGGACGGGATAACAGTGATAGATCTAGAACCAATATCCTA
TGACCCAAAATTTGAAAAGCAATTAGGGCAGGTATGTTACTCGTCTTGTGTGCTGGACAACCT
ACTCTTGATGAGAACACATGGGCTTTCTGTGAAGTTTTGACTTTGGCCACAGGACCAATCTTG
ACCTTGTTGGGAGGGCAACCCGGGAAGGTTTTGGAACACGACCATAGCCGTATCTACCGCCAAC
ATTTTCAGGGGAAGTTATTTGGCAGGAGCTGGACTGGCTTTTTCACTCATAAAGAATGCACAA
ACCCCCAGGAGGGGAACCTGGGACCACAGGAGAGACACTGGGAGAGAAGTGAAGAGACAGC
TAACTCATTAGACAGGAAAGAGTTTGAAGAGTATAAAAGAAGTGAATACTAGAAAGTGGAC
AGGACTGAAGCCAAGTCCGCCCTGAAAGATGGGTCTAAAATCAAGCATGCAGTATCTAGAGG
GTCCAGTAAGATCAGATGGATTGTTGAGAGAGGGATGGTAAAGCCAAAGGGGAAAGTTGTAG
ATCTTGGCTGTGGGAGAGGAGGATGGTCTTATTACATGGCGACACTCAAGAACGTGACTGAAG
TGAAAGGTATACAAAAGGAGGTCCAGGACATGAAGAACCGATTCCCATGGCTACTTATGGCT
GGAATTTGGTCAAACTCCATTGAGGGGTTGACGTGTTCTACAAACCCACAGAGCAAGTGGACA
CCCTGCTCTGTGATATTGGGGAGTCATCTTCTAATCCAACAATAGAGGAAGGAAGAACATTAA
GAGTTTTGAAGATGGTGGAGCCATGGCTCTCTTCAAAACCTGAATTCTGCATCAAAAGTCCTCAA
CCCCTACATGCCAACAGTCATAGAGGAGCTGGAGAAACTGCAGAGAAAACACGGTGGGAACC
TTGTCAGATGCCCCGCTGTCCAGGAACTCCACCCATGAGATGTATTGGGTGTCAGGAGCGTCGG
GAAATATTGTGAGCTCTGTGAACACAACATCAAAGATGTTGTTGAACAGGTTCAACAACAGGC
ATAGGAAACCCACTTATGAGAAGGACGTAGATCTTGGGGCAGGAACGAGAAGTGTCTCTACTG
AAACAGAAAAACCAGACATGACAATCATTGGGAGAAGGCTTCAGCGATTGCAAGAGGAGCAC
AAAGAAACATGGCATTATGATCAGGAAAAACCCATACAGAACCTGGGCGTATCATGGAAGCTA
TGAAGCTCCTTCGACAGGCTCTGCATCCTCCATGGTGAACGGGGTGGTGAAACTGCTAACAAA
ACCCTGGGATGTGATTCCAATGGTGACTCAGTTAGCCATGACAGATACAACCCCTTTTGGGCA
ACAAAGAGTGTTCAAAGAGAAGGTGGATACCAGAACGCCGCAACCAAAACCAGGCACACGAA
TGGTTATGACCACGACAGCCAATTGGCTATGGGCCCTCCTTGGAAAGAAGAAAAATCCAGAC
TGTGTACAAGGAAGAGTTCATCTCAAAGTTAGATCAAACGCAGCCATAGGCGCAGTCTTTC
AGGAAGAACAAGGATGGACATCAGCCAGTGAAGCTGTGAATGACAGCCGGTTTTTGGGAACTG
GTTGACAAAGAAAGGGCCCTTACCAGGAAGGGAAAATGTGAATCGTGTGTCTATAACATGATG
GGAAAACGTGAGAAAAAGTTAGGAGAGTTTGGCAGAGCCAAGGGAAGCCGAGCAATCTGGTA
CATGTGGCTGGGAGCGCGTTTCTGGAATTTGAAGCCCTGGGTTTTTTGAATGAAGATCACTGG
TTTGGCAGAGAAAATTCATGGAGTGGAGTGAAGGGGAAGGTCTGCACAGATTGGGATACAT
CCTGGAGGAGATAGACAAGAAGGATGGAGACCTAATGTATGCTGATGACACAGCAGGTTGGG

10

20

30

40

50

ACACAAGAATCACTGAGGATGACCTTCAAAATGAGGAACTGATCACGGAACAGATGGCTCCC
CACCACAAGATCCTAGCCAAAGCCATTTTCAAACCTATCAAAACAAAGTGGTGAAAGTC
CTCAGACCCACACCGAGAGGAGCGGTGATGGATATCATATCCAGGAAAGACCAAAGAGGTAG
TGGACAAGTTGGAACATATGGTTTGAACACATTCACCAACATGGAAGTTCAACTCATCCGCCA
AATGGAAGCTGAAGGAGTCATCACACAAGATGACATGCAGAACCCAAAAGGGTTGAAAGAAA
GAGTTGAGAAATGGCTGAGAGAGTGTGGTGTGACAGGTTAAAGAGGATGGCAATCAGTGGA
GACGATTGCGTGGTGAAGCCCCTAGATGAGAGGTTTGGCACTTCCCTCCTCTTCTTGAACGACA
TGGGAAAGGTGAGGAAAGACATTCCGCAGTGGAACCATCTAAGGGATGGAAAACTGGCAA
GAGGTTCCCTTTTTGCTCCCATCACTTTCACAAGATCTTTATGAAGGATGGCCGCTCACTAGTTGT
TCCATGTAGAAACCAGGATGAACTGATAGGGAGAGCCAGAATCTCGCAGGGGGCTGGATGGA
GCTTAAGAGAAACAGCCTGCCTGGGCAAAGCTTACGCCCAGATGTGGTTCGCTTATGTACTTCC
ACAGAAGGGATCTGCGTTTAGCCTCCATGGCCATATGCTCAGCAGTTCCAACGGAATGGTTTCC
AACAAGCAGAACAACATGGTCAATCCATGCTCATCACCAATGGATGACCACTGAAGACATGCT
CAAAGTGTGGAACAGAGTGTGGATAGAAGACAACCCCAATATGATTGACAAGACTCCAGTCC
ATTCTGTGGGAAGATATACCTTACCTAGGGAAAAGAGAGGATTTGTGGTGTGGATCCCTGATTG
GACTTTCTTCTAGAGCCACCTGGGCGAAGAACATTCACACGGCCATAACTCAGGTCAGGAACT
TGATCGGAAAAGAGGAATACGTGGATTACATGCCAGTAATGAAAAGATACAGTGCTCCTTCAG
AGAGTGAAGGAGTTCTGTAATTACCAACAACAACACCAAAGGCTATTGAAGTCAGGCCACTT
GTGCCACGGTTTGAGCAAACCGTGCTGCCTGTAGCTCCGCCAATAATGGGAGGCGTAATAATC
CCTAGGGAGGCCATGCGCCACGGAAGCTGTACGCGTGGCATATTGGACTAGCGGTTAGAGGA
GACCCCTCCCATCACTGACAAAACGCAGCAAAAGGGGGCCCGAAGCCAGGAGGAAGCTGTAC
TCCTGGTGGAAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCCCAACACAAAAACAGCATATTGACGC
TGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCTACAACATCAATCCAGGCACAGAGCGCCGCAAGAT
GGATTGGTGTGTTGATCCAACAGGTTCT

10

20

30

【0132】

本発明は、本明細書に記載の弱毒化ウイルスのいずれかと、薬学的に許容される担体とを含む、対象において免疫応答を誘導するための組成物を提供する。様々な態様において、組成物はワクチン組成物であり、かつ免疫応答は保護免疫応答である。

【0133】

本発明の弱毒化ウイルスは、対象において免疫応答（もしくは保護免疫応答）を誘発するためまたは対象をウイルス関連疾患から予防しもしくは対象がそれに罹患する可能性を低減させるために使用される場合、薬学的に許容される担体を追加的に含む組成物の形態で対象に投与されることが理解されるべきである。薬学的に許容される担体は当業者に周知であり、0.01～0.1Mおよび好ましくは0.05Mのリン酸緩衝液、リン酸緩衝化食塩水（PBS）、または0.9%の食塩水のうちの1つまたは複数が挙げられるがこれらに限定されない。そのような担体としてはまた、水性または非水性溶液、懸濁液、およびエマルションが挙げられる。水性担体としては、水、アルコール性/水性溶液、エマルションまたは懸濁液、食塩水および緩衝化媒体が挙げられる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えばオリーブ油、および注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチルである。非経口ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸リンゲル液および

40

50

固定油が挙げられる。静脈内ビヒクルとしては、流体および栄養補充液、電解質補充液、例えばリンゲルのデキストロースに基づくものなどが挙げられる。固体組成物は、非毒性固体担体、例えば、グルコース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、セルロースまたはセルロース誘導体、炭酸ナトリウムおよび炭酸マグネシウムなどを含んでもよい。例えば肺および/または鼻腔内送達などのための、エアロゾル中での投与のために、剤または組成物は、好ましくは、非毒性界面活性剤、例えば、C6～C22脂肪酸または天然グリセリドのエステルまたは部分エステル、および噴射剤と共に製剤化される。鼻腔内送達を促すために追加の担体、例えばレシチンが含まれてもよい。薬学的に許容される担体は、活性成分の貯蔵寿命および/または有効性を増強する、微量の助剤物質、例えば湿潤剤または乳化剤、防腐剤ならびに他の添加剤、例えば、抗微生物剤、抗酸化剤およびキレート剤をさらに含み得る。本組成物は、当該技術分野において周知のように、対象への投与後に活性成分の迅速な、持続的なまたは遅延された放出を提供するように製剤化され得る。

10

【0134】

本組成物またはワクチン組成物の様々な態様において、弱毒化ウイルスは、(i) 感染細胞中でのウイルスタンパク質の合成およびプロセッシングを実質的に変更せず；(ii) wtウイルスと類似した量の、感染細胞当たりのビリオンを産生し；かつ/または(iii) wtウイルスよりも実質的に低いビリオン特異的な感染力を呈する。さらなる態様において、弱毒化ウイルスは、対応するwtウイルスと実質的に類似した免疫応答を宿主動物において誘導する。

20

【0135】

本発明はまた、野生型宿主細胞中で生存不能な弱毒化ウイルスについて許容的となるように特別に単離または操作された改変型宿主細胞系を提供する。弱毒化ウイルスが通常（野生型）の宿主細胞中で増殖できない態様において、それは増殖のために特有のヘルパー細胞系に絶対的に依存する。これは、ワクチン製造用のウイルスの生成のための非常に高いレベルの安全性を提供する。本改変型細胞系の様々な態様は弱毒化ウイルスの増殖を許容し、前記細胞系のゲノムは、希少なtRNAをコードする遺伝子の数を増加させるように変更されている。

【0136】

免疫応答を誘発する方法

様々な態様は、対象において免疫応答を誘発する方法であって、対象に、本発明の改変型フラビウイルスを含む有効用量の組成物を投与する工程を含む、方法を提供する。特定の態様は、対象において保護免疫応答を誘発する方法であって、対象に、本発明の改変型フラビウイルスを含む予防または治療有効用量のワクチン組成物を投与する工程を含む、方法を提供する。様々な態様において、免疫応答は異種フラビウイルス属ウイルスに対して交差保護的である。

30

【0137】

様々な態様において、方法は、対象に、少なくとも1つのアジュバントを投与する工程をさらに含む。アジュバントの非限定的な例は本明細書において議論される。特定の態様は、対象において免疫応答を誘発する方法であって、対象に、本発明の改変型 Dengue ウイルスを含む予防または治療有効用量のワクチン組成物を投与する工程を含む、方法を提供する。

40

【0138】

様々な態様は、対象において免疫応答を誘発する方法であって、対象に、本発明の改変型 Dengue ウイルスを含む有効用量の組成物を投与する工程を含む、方法を提供する。

【0139】

様々な態様は、対象において保護免疫応答を誘発する方法であって、対象に、本発明の改変型 Dengue ウイルスを含む予防または治療有効用量のワクチン組成物を投与する工程を含む、方法を提供する。

【0140】

50

様々な態様において、方法は、対象に、少なくとも1つのアジュバントを投与する工程をさらに含む。アジュバントの非限定的な例は本明細書において記載される。

【0141】

様々な態様において、免疫応答は異種 Dengue ウイルスに対して交差保護的である。

【0142】

本発明の様々な態様は、それを必要とする対象において免疫応答を誘発する方法であって、それを必要とする対象に、プライム用量の、コドンペア脱最適化もしくはコドン脱最適化、もしくは CpG もしくは UpA ジヌクレオチドの増加以外の方法により作製された弱毒化フラビウイルス、またはウイルスタンパク質の発現が親ウイルスと比較して低減されており、発現の低減が prM、もしくはエンベロープ (E) 領域を再コードした結果である、改変型フラビウイルスを投与する工程；および1つまたは複数のブースト用量の、コドンペア脱最適化もしくはコドン脱最適化、もしくは CpG もしくは UpA ジヌクレオチドの増加以外の方法により作製された弱毒化フラビウイルス、または改変型フラビウイルスを投与する工程、を含み、少なくともプライム用量または1つもしくは複数のブースト用量が改変型ウイルスである、方法を提供する。様々な態様において、1つまたは複数のブースト用量のうちの第1の用量は、プライム用量の約2週後に投与される。

10

【0143】

様々な態様において、フラビウイルスは Dengue ウイルスである。

【0144】

様々な態様において、Eタンパク質コーディング配列タンパク質コーディング配列の1つまたは両方は、タンパク質コーディング配列のコドンペアバイアスまたはコドン使用頻度バイアスを低減させることにより再コードされる。様々な態様において、コドンペアバイアスを低減させることは、低減され得るコドンペアスコアを有する親タンパク質コーディング配列中のコドンペアを同定すること、およびコドンペアをより低いコドンペアスコアを有するコドンペアで置換することによりコドンペアバイアスを低減させることを含む。

20

【0145】

様々な態様において、コドンペアバイアスを低減させることは、親タンパク質コーディング配列のコドンを再編成することを含む。様々な態様において、Eタンパク質コーディング配列は、親ウイルスと比較して CpG または UpA ジヌクレオチドの数を増加させることにより再コードされる。様々な態様において、再コードされた prM/Eタンパク質コーディング配列のそれぞれは、-0.05未満、または-0.06未満、または-0.07未満、または-0.08未満、または-0.09未満、または-0.1未満、または-0.11未満、または-0.12未満、または-0.13未満、または-0.14未満、または-0.15未満、または-0.16未満、または-0.17未満、または-0.18未満、または-0.19未満、または-0.2未満、または-0.25未満、または-0.3未満、または-0.35未満、または-0.4未満、または-0.45未満、または-0.5未満のコドンペアバイアスを有する。様々な態様において、Eタンパク質コーディング配列の1つまたは両方は、1つまたは複数のコドンを、ウイルス宿主（例えば、ヒト）においてより頻度が低い同義コドンで置き換えることにより再コードされる。一部の態様において、同義コドンで置換されたコドンの数は、少なくとも5個、または少なくとも10個、または少なくとも30個、または少なくとも30個、または少なくとも40個、または少なくとも50個、または少なくとも75個、または少なくとも100個、または少なくとも200個または少なくとも300個、または少なくとも400個、または少なくとも500個である。

30

40

【0146】

追加的に、本発明は、対象において保護免疫応答を誘発する方法であって、対象に、予防または治療有効用量の本明細書に記載のワクチン組成物のいずれかを投与する工程を含む、方法を提供する。本発明はまた、対象がウイルス関連疾患に罹患することを予防する方法であって、対象に、予防有効用量の本ワクチン組成物のいずれかを投与する工程を含む、方法を提供する。上記の方法の態様において、対象は病原性ウイルスに曝露されてい

50

る。病原性ウイルスに「曝露されている」は、感染が結果的に起こり得るようなウイルスとの接触を意味する。

【0147】

本発明はさらに、ウイルスに感染した対象においてウイルス関連疾患の開始を遅延させ、またはその進行の速度を緩慢化させる方法であって、対象に、治療有効用量の本ワクチン組成物のいずれかを投与する工程を含む、方法を提供する。

【0148】

本明細書において使用される場合、「投与する工程」は、当業者に公知の様々な方法および送達システムのいずれかを使用して送達することを意味する。投与する工程は、例えば、鼻腔内に、腹腔内に、脳内に、静脈内に、経口的に、経粘膜的に、皮下に、経皮的に、皮内に、筋肉内に、外用で、非経口的に、インプラントを介して、髄腔内に、リンパ内に、病巣内に、心臓周囲に、または硬膜外に行われ得る。剤または組成物はまた、例えば肺および/または鼻腔内送達などのために、エアロゾル中で投与されてもよい。投与する工程は、例えば、1回、複数回、および/または1つもしくは複数の延長された期間にかけて行われてもよい。

【0149】

対象において保護免疫応答を誘発することは、例えば、一次用量のワクチンを対象に投与し、続いて好適な時間的期間の後にワクチンの1回または複数回のその後の投与を行うことにより達成され得る。ワクチンの投与の間の好適な時間的期間は、当業者により容易に決定され得、通常、数週～数か月のオーダーである。本発明は、しかしながら、いかなる特定の投与の方法、経路または頻度にも限定されない。

【0150】

様々な態様において、本発明は、それを必要とする対象において免疫応答を誘発する方法であって、プライム用量の、コドンペア脱最適化もしくはコドン脱最適化、もしくはCpGもしくはUpAジヌクレオチドの増加以外の方法により作製された弱毒化フラビウイルス、またはウイルスタンパク質の発現が親ウイルスと比較して低減されており、発現の低減がprM、もしくはエンベロープ(E)領域、もしくは両方を再コードした結果である、改変型フラビウイルスを投与する工程；および1つまたは複数のブースト用量の、コドンペア脱最適化もしくはコドン脱最適化、もしくはCpGもしくはUpAジヌクレオチドの増加以外の方法による弱毒化フラビウイルス、または改変型フラビウイルスをそれを必要とする対象に投与する工程、を含み、少なくともプライム用量または1つもしくは複数のブースト用量が改変型ウイルスである、方法を提供する。

【0151】

様々な態様において、1つまたは複数のブースト用量は、プライム用量の約2週後に投与される。様々な態様において、2、3、4、または5つのブースト用量が投与される。様々な態様において、ブースト用量の間の間隔は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10週であり得る。追加の態様において、ブースト用量の間の間隔は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12か月であり得る。非限定的な例として、プライム用量が投与され得、その約2週後に第1のブースト用量が投与され得、第1のブースト用量の約1か月後に第2のブースト用量が投与され得、第2のブースト用量の約6か月後に第3のブースト用量が投与され得る。別の非限定的な例として、プライム用量が投与され得、その約2週後に第1のブースト用量が投与され得、第1のブースト用量の約6か月後に第2のブースト用量が投与され得、第2のブースト用量の約12か月後に第3のブースト用量が投与され得る。さらなる態様において、追加のブースト投薬は、周期的に、例えば、5年毎、10年毎などで、投与され得る。

【0152】

様々な態様において、フラビウイルスはデングウイルスである。様々な態様において、フラビウイルスは、デング熱ウイルス、ジカウイルス、ウエストナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、スpondウェニウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、およびポワッサンウイルスからなる群より選択される。

【0153】

様々な態様において、Eタンパク質コーディング配列の1つまたは両方は、タンパク質コーディング配列のコドンペアバイアスまたはコドン使用頻度バイアスを低下させることにより再コードされる。様々な態様において、Eタンパク質コーディング配列は、親ウイルスと比較してCpGまたはUpAジヌクレオチドの数を増加させることにより再コードされる。

【0154】

様々な態様において、コドンペアバイアスを低減させることは、低減され得るコドンペアスコアを有する親タンパク質コーディング配列中のコドンペアを同定すること、およびコドンペアをより低いコドンペアスコアを有するコドンペアで置換することによりコドンペアバイアスを低減させることを含む。

10

【0155】

様々な態様において、コドンペアバイアスを低減させることは、親タンパク質コーディング配列のコドンを再編成することを含む。

【0156】

様々な態様において、それは改変型ウイルスにおけるCpGジヌクレオチドの増加を含む。

【0157】

様々な態様において、それは改変型ウイルスにおけるUpAジヌクレオチドの増加を含む。

20

【0158】

様々な態様において、再コードされたprM/Eタンパク質コーディング配列はそれぞれ、-0.05未満、または-0.06未満、または-0.07未満、または-0.08未満、または-0.09未満、または-0.1未満、または-0.11未満、または-0.12未満、または-0.13未満、または-0.14未満、または-0.15未満、または-0.16未満、または-0.17未満、または-0.18未満、または-0.19未満、または-0.2未満、または-0.25未満、または-0.3未満、または-0.35未満、または-0.4未満、または-0.45未満、または-0.5未満のコドンペアバイアスを有する。

【0159】

ある特定の態様において、再コードされたprMタンパク質コーディング配列、Eタンパク質コーディング配列、または両方のコドンペアバイアスは、それが由来する親prM/Eタンパク質コーディング配列と比較して、少なくとも0.05、または少なくとも0.06、または少なくとも0.07、または少なくとも0.08、または少なくとも0.09、または少なくとも0.1、または少なくとも0.11、または少なくとも0.12、または少なくとも0.13、または少なくとも0.14、または少なくとも0.15、または少なくとも0.16、または少なくとも0.17、または少なくとも0.18、または少なくとも0.19、または少なくとも0.2、または少なくとも0.25、または少なくとも0.3、または少なくとも0.35、または少なくとも0.4、または少なくとも0.45、または少なくとも0.5低減される。

30

【0160】

様々な態様において、prMタンパク質コーディング配列、Eタンパク質コーディング配列、または両方は、1つまたは複数のコドンを、ウイルス宿主においてより頻度が低い同義コドンで置き換えることにより再コードされる。一部の態様において、同義コドンで置換されたコドンの数は、少なくとも5個、または少なくとも10個、または少なくとも30個、または少なくとも30個、または少なくとも40個、または少なくとも50個、または少なくとも75個、または少なくとも100個、または少なくとも200個または少なくとも300個、または少なくとも400個、または少なくとも500個である。

40

【0161】

様々な態様において、プライム用量は、皮下に、筋肉内に、皮内に、または鼻腔内に投与される。

【0162】

50

様々な態様において、1つまたは複数のブースト用量は、腫瘍内に、静脈内に、または髄腔内に投与される。

【0163】

プライム投薬およびブースト投薬の間のタイミングは、例えば、感染または疾患のステージ（例えば、非感染、感染、感染後の日数）、および患者の健康状態に依存して変動し得る。様々な態様において、1つまたは複数のブースト用量は、プライム用量の約2週後に投与される。すなわち、プライム用量が投与され、その約2週後にブースト用量が投与される。

【0164】

様々な態様において、投薬量は、プライム投薬およびブースト投薬の間で変動し得る。非限定的な例として、プライム用量は、ブースト用量と比較してより少ないコピーのウイルスを含有し得る。

【0165】

他の態様において、コドンペア脱最適化もしくはコドン脱最適化、もしくはCpGもしくはUpAジヌクレオチドの増加以外の方法により作製された弱毒化ウイルスまたは本発明の改変型ウイルスの型は、プライムおよびブースト投薬の間で変動し得る。非限定的な一例において、本発明の改変型ウイルスはプライム用量において使用され得、かつ同じまたは異なる科、属、種、群または目の（コドンペア脱最適化もしくはコドン脱最適化、またはCpGもしくはUpAジヌクレオチドの増加以外の方法により作製された）弱毒化ウイルスはブースト用量において使用され得る。

【0166】

他の態様において、投与の経路は、プライム用量およびブースト用量の間で変動し得る。非限定的な例において、プライム用量は皮下に投与され得、かつブースト用量は注射を介して腫瘍中に投与され得、アクセス可能な、またはアクセスが困難な腫瘍について、ブースト用量は静脈内に投与され得る。

【0167】

本免疫化および治療方法のいずれかのある特定の態様は、対象に、少なくとも1つのアジュバントを投与する工程をさらに含む。「アジュバント」は、対象において抗原の免疫原性を増強し、免疫応答を増強するために好適な任意の剤を意味する。タンパク質ベースおよび核酸ベースの両方のワクチンとの使用のために好適な、粒子状アジュバントを含めて多数のアジュバント、ならびにアジュバントを抗原と組み合わせる方法は当業者に周知である。核酸ベースのワクチンのための好適なアジュバントとしては、Quil A、イミキモド、レシキモド、および精製されたタンパク質または核酸の形態で送達されるインターロイキン-12が挙げられるがこれらに限定されない。タンパク質免疫化との使用のために好適なアジュバントとしては、ミョウバン、フロイント不完全アジュバント（FIA）、サポニン、Quil A、およびQS-21が挙げられるがこれらに限定されない。

【0168】

本発明はまた、本発明の弱毒化ウイルスを用いる対象の免疫化のためのキットを提供する。キットは、弱毒化ウイルス、薬学的に許容される担体、アプリケーション、およびその使用のための説明資料を含む。さらなる態様において、弱毒化ウイルスは、1つまたは複数のデングウイルス、1つまたは複数の日本脳炎ウイルス、1つまたは複数のウエストナイルウイルス、1つまたは複数の黄熱病ウイルス、1つまたは複数のジカウイルスなどであってもよい。特定のウイルスの多数の異なる分離株に対して宿主を免疫化することが望まれる場合に1つより多くのウイルスが好ましいことがある。本発明は、当業者に公知のキットの他の態様を含む。使用説明書は、弱毒化ウイルスの投与を指導する任意の情報を提供し得る。

【0169】

本出願の全体を通じて、様々な刊行物、参考文献、教科書、技術マニュアル、特許、および特許出願が参照された。これらの刊行物、特許、特許出願および他の文献の教示および開示の全体は、本発明が関係する技術分野の状態をより十分に記載するために参照によ

10

20

30

40

50

り本出願に組み入れられる。しかしながら、本明細書における参考文献の参照は、そのような参考文献は本発明に対する先行技術であるという承認として解釈されるべきではない。

【0170】

本明細書に開示される発明の原理におけるバリエーションが当業者により為され得ることが理解および予期されるべきであり、そのような改変は本発明の範囲内に含まれることが意図される。以下の実施例は本発明をさらに説明するが、いかなる意味でも本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。従来の方法、例えば組換えプラスミドの構築、宿主細胞へのウイルス構築物のトランスフェクション、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、および免疫学的技術において用いられる従来の方法の詳細な説明は、Sambrook et al. (1989) および Coligan et al. (1994) を含めて、多数の刊行物から得られ得る。本明細書において言及される全ての参考文献は、それらの全体が参照に本出願に組み入れられる。WO 2008/121992 および WO 2011/044561 の内容は参照により組み入れられる。

10

【実施例】

【0171】

実施例1

SAVE-脱最適化された生弱毒化デングワクチン候補の迅速な設計および構築

標的配列を選択するために、本発明者らは最近10年の全てのDENVウイルス分離株の全てのprM-E配列を用いて開始し、NCBI Virus Variation Databaseにおいて利用可能なアミノ酸コンセンサス配列解析を行った。コンセンサス配列は通常、実際のウイルスとして決して存在しないので、それを本発明者らの設計の基礎として使用することは賢明でない。本発明者らは、何が機能し何が機能しないのかを教示する天然のウイルス進化が好ましいと考える。そのため、コンセンサス配列に最も同一性の高い複製性ウイルスの実際のゲノムを同定するためにtblastnアルゴリズムを使用して各血清型についてのコンセンサス配列をGenbank全体に対して次に検索し、本発明者らは次いでこの配列を本発明者らの標的配列として使用した。追加的に、標的配列はデータベース中で珍しいもの（起こり得るシーケンシングアーティファクト）であってはならず、珍しい場合、本発明者らは、2つまたはそれより多くの独立したウイルス分離株により表されるコンセンサスに対して次に最も高い同一性の配列を選択する。最も関連するおよび複製性のヒト分離株を決定するためのこの検索アルゴリズムは、（1）真性のヒト分離株であり、かつ（2）単一の配列がそうであり得るのと同じだけDENV配列空間の残りの部分に対して相同的である、配列を結果としてもたらす。このアプローチを使用して、本発明者らは、標的prM-E抗原配列を選び出すための以下のウイルスを同定した：DENV-1/VN/BID-V1774/2007、DENV-2/NI/BID-V533/2005、DENV-3/VE/BID-V2268/2008、DENV-4/US/BID-V2448/1999。本発明者らはDENV-2/NI/BID-V533/2005のE-Minを使用してDENVワクチンプログラムを開始し、このプロセスを介して選択された他の3つのE遺伝子を含有する生弱毒化株を生成させた（図1）。野生型prM/E遺伝子のCPBはヒト宿主細胞の遺伝子の正常な範囲内に入る。SAVEを介するコドンペア「脱最適化」後に、結果としてもたらされた脱最適化されたprM/E遺伝子セグメントは、それらの極めて負のCPBにより明らかなように、過小提示されたヒトコドンペアによって優勢的にコードされており、いかなるヒト遺伝子からも劇的に異なる。図1からのSAVE-脱最適化された合成のprM/Eをde novoで合成し、オーバーラッピングPCRを使用してWT DENVゲノムに個々にサブクローニングして、合成的に「脱最適化」された断片をそれぞれ含有する6つの独立したcDNAゲノムを得た。本発明者らは、wt DENV1~4の感染性cDNAゲノムを構築し、次にVeroまたはBHK細胞へのRNAのトランスフェクションを介して、脱最適化型DENVワクチン候補のための、十分に感染性である複製性ウイルスを回収した。

20

30

40

【0172】

実施例2

第2世代デングウイルスワクチン候補を作製するためのSAVEプラットフォームの柔軟性

50

の活用

弱毒化および免疫原性を微調整するために、SAVEプラットフォームを使用して第2世代のデングウイルスワクチン候補を構築した（図2）。第2世代のデングワクチン候補は、アミノ酸配列を同種骨格中で100%同一に保ちながら、脱最適化された領域を2014bp（E-min）から997bp（W-E-Min）まで、またはさらに664bp（W-W-E-Min）まで低減させるSAVEプラットフォームの柔軟性を活用する。

【0173】

実施例3

動物成分フリー条件下でのVero細胞中での異種骨格デングワクチン候補の増殖

将来的なcGMP製造のための製造条件およびインビトロでの弱毒化のための試験を最適化するために、DENV1~4 E-Minを使用して、0.01のMOIで、動物成分フリー条件下でVero細胞に感染させ、感染後10日の過程にかけて上清を複数ステップ増殖曲線において1日毎に滴定した。DENV2、DENV3、およびDENV4候補は $1\sim 2\times 10^5$ FFU/mlの力価に達したが、DENV1 E-Minの力価は他と比較して約 $1\log_{10}$ 低減した（図3）。

【0174】

実施例4

Vero細胞中での同種骨格デングウイルス1型ワクチン候補の増殖、および弱毒化の機構としての温度感受性についての試験

低い（33℃）、中間の（37℃）、および高い（39℃）温度で実行した増殖速度論を使用して、脱最適化された候補のための製造条件を最適化し、インビトロでの弱毒化のための試験を行い、弱毒化の機構を説明する手段としての温度感受性の増加についてCPDバリエーションを調べた。合成DENV1 WTウイルス（全長DENV1骨格中）ならびにDENV1 WTに由来する弱毒化生ワクチン候補DENV1 E-W/MINおよびE-MINについて、Vero細胞において複数ステップ増殖曲線を実行した。合成DENV1 WTは33℃および37℃においてVero細胞中で良好に増殖する。DENVに典型的に、ウイルス収率における一時的な低減が39℃において観察されたが、力価は7dpiまでに37℃のレベルまで回復した。DENV1 E-W/MINは、しかしながら、33℃および37℃の両方において、使い物にはなるがDENV1 WTよりも約10倍低い力価に達した。DENV1 E-MINはVero細胞において高度に弱毒化され、感染後10~14日目から33℃で検出可能な力価に達しただけだった。

【0175】

実施例5

Vero細胞中での同種骨格デングウイルス2型ワクチン候補の増殖、および弱毒化の機構としての温度感受性についての試験

低い（33℃）、中間の（37℃）、および高い（39℃）温度で実行した増殖速度論を使用して、脱最適化された候補のための製造条件を最適化し、インビトロでの弱毒化のための試験を行い、弱毒化の機構を説明する手段としての温度感受性の増加についてCPDバリエーションを調べた。合成DENV2 WTウイルス（全長の相同DENV2骨格中）ならびにDENV2 WTに由来する弱毒化生ワクチン候補DENV2 E-W/MINおよびE-MINについて、Vero細胞において複数ステップ増殖曲線を実行した。DENV2 E-W/MINおよびE-MINは両方ともインビトロで弱毒化され、E-W/MINについて $1\sim 2\log_{10}$ FFU/mlの低減、およびより顕著にDENV2 E-MINについて $2\sim 3\log_{10}$ FFU/mlの低減であった（図3）。増殖速度論的には遅れたが、1~2日毎の定期的な培地交換により、ウイルス力価はDENV2 E-W/MINについて $>10^6$ FFU/mlに達した。重要なことに、弱毒化はE領域における脱最適化の程度と相関した。温度感受性（37℃および39℃における力価の差異）は、感染後4日を通じてDENV2-WTおよびDENV2 E-W/MINについて類似していたが、5、6、および7日目に有意な差異があった。6DPIを通じていかなる温度においても複製がなかったため、DENV2 E-MINについて温度感受性は観察されなかった。しかしながら、7~14日目からDENV2 E-MINは検出可能なウイルスを産生し始めた（但し33℃および37℃においてのみ）。

【0176】

実施例6

Vero細胞中での同種骨格デングウイルス3型ワクチン候補の増殖、および弱毒化の機構としての温度感受性についての試験

低い（33℃）、中間の（37℃）、および高い（39℃）温度で実行した増殖速度論を使用して、脱最適化された候補のための製造条件を最適化し、インビトロでの弱毒化のための試験を行い、弱毒化の機構を説明する手段としての温度感受性の増加についてCPDバリエーションを調べた。合成DENV3 WTウイルス（全長DENV3骨格中）ならびにDENV3 WTに由来する弱毒化生ワクチン候補DENV3 E-W/MINおよびE-MINについて、Vero細胞において複数ステップ増殖曲線を実行した。DENV3 E-W/MINは39℃においてWTよりも温度感受性であったことが明らかであり、感染後3、4、5、および7日目に、有意により大きい差異が観察可能であった。DENV3 E-MINは39℃においてVero細胞中で最小レベルの複製を有したので、37℃から39℃への、ウイルス収率における差異は 10^7 FFU/mlもの大きさであった。しかしながら、許容可能な温度で生育した場合、DENV3 E-MINは、cGMP製造のために有望な高い力価に達した。

【0177】

実施例7

Vero細胞中での同種骨格デングウイルス4型ワクチン候補の増殖、および弱毒化の機構としての温度感受性についての試験

低い（33℃）、中間の（37℃）、および高い（39℃）温度で実行した増殖速度論を使用して、脱最適化された候補のための製造条件を最適化し、インビトロでの弱毒化のための試験を行い、弱毒化の機構を説明する手段としての温度感受性の増加についてCPDバリエーションを調べた。合成DENV4 WTウイルス（全長DENV4骨格中）ならびにDENV4 WTに由来する弱毒化生ワクチン候補DENV4 E-W/MINおよびE-MINについてVero細胞において複数ステップ増殖曲線を実行した。DENV4 WTおよびE-W/MINは両方ともVero細胞中で高い力価まで増殖し、ピークDENV4 E-W/MIN力価は、33℃および37℃において約10倍低かったが依然として高かった（約 10^7 FFU/ml）。両方のウイルスとも39℃において部分的に制約されたが、DENV1～3で見られる程度までの制約ではなかった。5日目に、WTと比較して37℃から39℃への、力価における、小さいが有意な（約5倍）変化が観察された。DENV4 E-MINはVero細胞において弱毒化され、ピーク力価はWTよりも100倍低かった。33℃および37℃におけるDENV4 E-MINの複製は類似していたが、DENV4 E-MINは39℃において生存可能でなく感染後1～14日目に検出可能なウイルスはなかった。

【0178】

実施例8

AG129マウスにおけるDENV2ワクチン候補の弱毒化、免疫原性、および有効性の評価

上記のように、AG129成体マウスモデルは、フラビウイルスワクチンおよび治療法の研究のために認められてきている。本発明者らはAG129マウスを使用して、（1） 10^6 の用量での、各合成的に誘導された野生型ウイルスDENV（陽性対照）；（2）2つの用量（ 10^4 および 10^6 PFU）のワクチン候補を試験した。生存、体重、および臨床的徴候のデータを、実験の過程の全体を通じて1日毎に収集した。SAVE-脱最適化型DENV株は、合成の野生型ウイルスと比較して弱毒化されていた。DENV2 16681骨格に基づくDENV-2 E-minは、弱毒化されており、かつ新生ICRマウスにおいて免疫原性であることが示されている。この免疫原性/用量漸増研究において、ワクチンをAG129マウスにおいて初めて評価した。2つの異なる濃度でDENV-2 E-minまたはDENV-2 16681を用いて動物を免疫化した。結果的な中和抗体力価を決定し、DENV2のマウス適応性の致死株、D2S10に対してもたらされた保護有効性を評価した[3]。いずれかの用量でいずれかのウイルスを用いて免疫化された動物のいずれも、臨床的徴候を示さなかった。1回目の免疫化の2日後に血清を免疫化マウスから収集し、ウイルス血症をRT-PCRにより決定した。ウイルスRNAは、DENV-2 16681のより高い接種物を用いて免疫化された55%（5/9）の動物、およびより低い接種物を与えられた11%（1/9）の動物において検

出されたが、DENV-2 E-minを用いて免疫化されたマウスのいずれにおいても検出されなかった。使用したRT-PCRプライマーは、このウイルスにおいてコドン脱最適化されたウイルスE遺伝子を標的とせず、それらはアッセイに含まれるDENV-2 E-minウイルスRNAを成功裏に増幅させた。結果として、この研究においてウイルス血症の検出ができなかったことが最適以下のRT-PCR増幅の結果であるとは思われず、ワクチンウイルスがインビボで非常に低いレベルのウイルス血症を生じさせたことを示している。免疫化レジメンが完了したら、ウイルス負荷の前に全てのマウスから血清を収集した。免疫化された動物は全て、D2S10を用いるウイルス負荷の前に検出可能なDENV-2中和抗体力価を有した。各ワクチン群についてのデータの散布図は、DENV-2 E-minおよびDENV-2 16681の両方についてワクチン用量の増加と共に中和抗体力価の増加があったこと、ならびにE-min免疫化マウスにおいて見られた力価は、対応する用量のDENV-2 16681を用いて免疫化されたマウスにおけるものよりも低かったことを実証する。培地対照群の動物は急速な進行性の感染症を発症し、全ての動物が死亡した。低用量のDENV-2 E-minワクチンを用いて免疫化されたマウスは保護されず、高い致死（67%）および死亡平均日数（MDD）を経験し、これは培地対照において見られたものと有意に異ならなかった。対照的に、高用量のDENV-2 E-minワクチンおよび両方の用量のDENV-2 16681を用いて免疫化された動物は、DENV-2 D2S10負荷からの有意な保護を経験した。30日の観察期間の間にこれらの群のいずれにおいても、致死も、体重の10%を超える喪失によって示されるような病的状態もなかった。予測されたように、サンプリングされた日の両方において全ての培地対照動物の血清中に高いレベルのウイルスRNAが検出された。ウイルスRNAはまた、両方の日により低い用量のE-minを用いて免疫化された動物の全てにおいて検出された。これらの動物におけるレベルは、2日目に対照におけるものと同等であったが、3日目に、有意により低かった。高用量のEminを用いて免疫化された動物について、2日目に2/4の動物の血清中にウイルスRNAが検出され、ウイルス血症動物におけるRNAレベルは対照よりも有意に低かった。3日目に、ウイルスRNAは、いずれの高用量E-min動物の血清においても検出されなかった。全体的に、高用量のEminを用いた免疫化は、ウイルス血症が検出された動物の数を有意に低減させた（2/8対8/8； $p < 0.01$ ）。DENV-2 16681を用いて免疫化されたマウスについて、サンプリングされた2日のいずれにおいてもいずれかの免疫化用量での動物のいずれからの血清中にもウイルスRNAは検出されなかった。

10

20

30

【0179】

実施例9

コドンペア脱最適化の滴定はAG129マウスにおいて向上したDENV2ワクチン候補に繋がる

本発明者らのDENV2候補の臨床的関連性を向上させるために、本発明者らは次に異種DENV2 16681骨格中のDENV-2/N1/BID-V533/2005に由来するE配列を有するD2-E-minおよびD2-1/2-E-minを構築した。弱毒化の程度はCPD配列の低減によりDENV2において滴定され得ることを先行する研究は示しているため、本発明者らのウイルスの免疫原性を向上させるために、半分のwt DENV-2/N1/BID-V533/2005配列および半分のCPDからなるE領域を有するD2-1/2-E-minを試験した。AG129およびBALB/cマウス（ $n=5$ ）に 10^6 または 10^4 FFUのD2-E-min、D2-1/2-E-min、またはD2-WTE（WT DENV-2/N1/BID-V533/2005 E領域を有するDENV2 16681骨格）をワクチン接種した。興味深いことに、実験的DENV-2/N1/BID-V533/2005 E領域の導入は毒性の増加を結果としてもたらし、 10^6 または 10^4 FFUを感染させた全てのAG129マウスは安楽死が必要であった。感染したBALB/cマウスにおいてもいずれのCPD DENV2群においても、死亡も病的状態も観察されなかった。

40

【0180】

E領域中のCPD配列の低減は、D2-E-Minワクチン接種AG129マウスと比較してD2-1/2-E-minからの血清のPRNT50値における、有意な、約4倍の増加（ $p = .0002$ 、チューデントt検定）と関連付けられた。追加的に、高い中和抗体力価がD2-1/2-E-minワ

50

クチン接種と共に維持され、 10^6 (GM=3447) および 10^4 (GM=2867) FFU ワクチン接種群の間に有意な差異は観察されなかった。免疫コンピテント BALB/c マウスにおいて、D2-E-min および D2-1/2-E-min は両方とも、野生型と同等の中和抗体のレベルを生み出した。

【0181】

実施例10

AG129 マウスにおける DENV3 ワクチン候補の免疫原性および保護有効性の評価

AG129 マウスを使用して、DENV-3/VE/BID-V2268/2008 からのコドン脱最適化 prME カセットを有する DENV-2 株 16681 骨格を含む DENV-3 ワクチン候補 DENV D2/D3-E-min の免疫原性および保護有効性を試験した。病原性 DENV-3 CO360/94 を用いた負荷に対するこの候補ワクチンの免疫原性および有効性を評価するためにこの研究を設計した。第1の免疫化は全ての動物によって良好に忍容され、大きな関連付けられる体重喪失はなく、臨床的徴候を発症した動物はいなかった。類似した結果が2回目の免疫化後に見られたが、予想外なことに、群3 (10^6 FFU DENV D2/D3-WT) の1匹の動物は急速な進行性の体重喪失を発症し、免疫化後2日目に安楽死を必要とする瀕死状態となった。同じ群からの第2の動物はその後予想外なことに、免疫化の2週間後かつ病原性 DENV-3 を用いる負荷の前に死亡した。 1.2×10^7 PFU DENV-3 CO360/94 を用いた致死性負荷後に、培地対照群の動物は急速な進行性の感染症を発症し、これは8/9の動物において致死性であり、死亡した動物で 4.0 ± 0.8 日の死亡平均日数 (mean day of death; MDD) であった。より高い接種物の DENV D2/D3-E-min を用いた免疫化は有意な保護を提供し、群中の動物で、致死も病的状態 ($>10\%$ の体重喪失により測定される) もなかった。DENV D2/D3-E-min のより低い接種物を用いた免疫化もまた保護的であり、単一の動物のみが致死性な感染症を発症した。DENV-3 負荷の前に DENV D2/D3-WT ウイルスを与えられた動物もまた保護され、いずれの群においても致死はなかったが、より高い接種物の群の2匹の動物は元々の体重の $>10\%$ を喪失した。

【0182】

実施例11

AG129 マウスにおける DENV4 ワクチン候補の免疫原性および保護有効性の評価

AG129 マウス ($n=12$) を使用して、皮下に送達された 10^6 FFU の用量において、D2/D4-WTE ($n=12$) および培地免疫化モック対照マウス ($n=9$) と比較した、異種 D2/D4-E-min および D2/D4-1/2-E-Min ウイルスの免疫原性および保護有効性を試験した。全てのマウスを研究の0および21日目に免疫化し、ウイルス血症を決定するために2日目に、および中和抗体の滴定のために35日目に、血清を収集した。35日目に、 10^7 PFU DENV4 703/4 の腹腔内注射によりマウスに負荷した。負荷されたマウスの体重を計測し、病的状態についてモニターしてウイルス負荷の影響力を評価した。追加的に、各群からの5匹の動物を麻酔し、負荷後2日目に後眼窩出血により血液を収集し、残りの動物は3日目に qRT-PCR によりウイルス血症レベルを決定した。負荷後30日目に研究を終え、負荷後 PRNT50 値の決定のために、全ての生存動物から血清を収集した。全ての株を用いた第1の免疫化は全ての群の動物により良好に忍容され、5日の観察期間にかけて持続的な体重喪失はなかったが、D2/D4-WTE 群において1匹のマウスは第2の免疫化の前に安楽死させる必要があり、また第2の免疫化後に追加的な動物の死亡があった。他のいずれのワクチン群における動物も進行性の体重喪失を経験しなかった。負荷後2日目 (days post-challenge; DPC) において、D2/D4-WTE を接種された4/12のマウスにおいてウイルス血症が検出された。他の2つのウイルスを用いて免疫化されたマウスの全てで、ウイルス血症レベルはアッセイの検出限界 (500 ゲノム当量/ml) 未満であった。DENV-4 703/4 負荷は急速な進行性の感染症を生じさせ、培地対照群において一様に致死性であった。追加的に、D2/D4-E-min を用いて免疫化された3匹の動物は致死性な感染症を経験し、この群における他の動物は研究の継続期間にわたり健常なままであった。重要なことに、DENV-4 703/4 負荷後の D2/D4-1/2-E-min 免疫化動物のいずれにおいても、致死も、体重喪失により決定されるような病的状態の証拠も見られなかった。

【0183】

実施例12

A129マウスにおける同種DENV1～4ワクチン候補の免疫原性

IFN α 受容体ノックアウトマウスにおいて、免疫原性についてDENV1～4 WTの他に、DENV2～4のワクチン候補を試験した。全てのWTウイルスはこれらのマウスにおいて高度に免疫原性であり、中和抗体力価は、 >1024 であった。DENV2-E-W/MINは、 10^6 および 10^4 FFUの両方の用量においてDENV2 WTウイルスと等しく免疫原性であった。DENV3ウイルスの免疫原性は、用量の減少および脱最適化の増加と共に減衰したが、DENV3 E-W/MINは 10^4 FFUの用量において依然として高度に免疫原性であった（約1024のFRNT50）。A129マウスにおいて乏しい免疫原性であったDENV2 16681骨格における異種DENV4 WTと比較して、DENV4 E-W/MINおよびWTの免疫原性における著しい向上に本発明者らは気付いた。

10

【0184】

実施例13

AG129マウスにおける四価ワクチン接種およびDENV3負荷に対する有効性

IFN α/β およびIFN γ 受容体の二重ノックアウトについてホモ接合であるAG129マウスは、感染に対する感受性の増加に起因してフラビウイルスワクチン候補を試験するために使用される。本発明者らはAG129マウスを使用して、それらを0および21日目に 10^6 IFUの一価D2/D3-E-minワクチン（N=16；10匹の雄および6匹の雌）、 10^6 IFUの4つの一価DENV E-minウイルスのそれぞれを含有する四価ワクチン（N=16；10匹の雄および6匹の雌）、または培地（N=13；8匹の雄および5匹の雌）を用いてワクチン接種することにより、本発明者らのDENVワクチンの四価製剤を試験した。両方の免疫化は全ての動物により良好に忍容され、いずれの動物も臨床的徴候および大きな体重喪失（ $\geq 10\%$ ）を発症しなかった。FRNT50による中和抗体の測定のために、負荷の前に血清を収集した。一価ワクチンを用いて免疫化されたマウスの全てで、検出可能な中和抗体力価（20～160の範囲）が生じた。四価ワクチン製剤を用いて免疫化されたマウスにおいて、力価は一般に、より低かった（ $<20\sim 80$ の範囲）。35日目に、全ての残存マウスを、腹腔内経路により送達された 10^7 IFUのDENV3 C0360/94を用いて負荷した。予測されたように、培地対照群の動物は急速な進行性の感染症を発症し、これは8/9（89%）の動物において致死性であり、死亡した動物で 4.1 ± 0.4 日の死亡平均日数（MDD）であった。一価DENV D2/D3-E-minまたは四価ワクチンを用いた免疫化は有意な保護を提供し、いずれの群中の動物でも、致死も病的状態（ $>10\%$ の体重喪失により測定される）もなかった。ウイルスRNAは8/9の対照動物において検出され、力価は負荷後2および3日目に同等であった。

20

30

【0185】

実施例14

同種ワクチンの四価および各株についてのインビボLD50データは、神経弱毒化（neuroattenuation）を示す。週齢マウスに、示される用量として合成wt DENV1～4ウイルスを含有する $10\mu\text{l}$ の接種物を注射した。各マウスの体重を2週まで1日毎に計測し、可能な場合は常に人道的な早期エンドポイント（体重増加がないこと、不全麻痺、後肢麻痺）により死亡を決定した。

40

ウイルス	LD50 (FFU)	MTD (10 FFU)
DENV1 WT	0.4	7
DENV1 E-W/MIN	2.2	10
DENV2 WT	≤3.4	9
DENV2 E-W/MIN	17.8	>14
DENV3 WT	3.7	10
DENV3 E-W/MIN	1,931	N.D.
DENV4 WT	0.13	8
DENV4 E-W/MIN	2.5	11.5
四価E-W/Min	7.9	10

10

20

30

40

50

【0186】

本発明の様々な態様が詳細な説明において上で記載される。これらの説明は上記の態様を直接的に記載するが、当業者は本明細書に示され、記載される特有の態様に対する改変および/またはバリエーションを想像し得ることが理解される。本明細書の範囲内に入る任意のそのような改変またはバリエーションもまた本明細書に含まれることが意図される。特に記載されなければ、明細書および請求項における単語および語句は、応用可能な技術分野の当業者にとって通常および慣例の意味を与えられることが本発明者らの意図である。

【0187】

本出願の出願時に出願人が知る本発明の様々な態様の以上の記載が提示され、例証および説明の目的のために意図される。本明細書は網羅的であることも、本発明を開示される正確な形態に限定することも意図せず、上記の教示に照らして多くの改変およびバリエーションが可能である。記載される態様は、本発明の原理およびその実際の応用を説明するためならびに当業者が本発明を様々な態様においておよび想定される特定の用途に適するような様々な改変と共に利用することを可能にするために役立つ。したがって、本発明は、本発明を実行するために開示された特定の態様に限定されないことが意図される。

【0188】

本発明の特定の態様を示し、記載してきたが、本明細書における教示に基づいて、本発明およびそのより広い局面から離れることなく変更および改変が為され得ること、ならびにしたがって、添付の請求項は、本発明の真の精神および範囲内にあるような全てのそのような変更および改変をそれらの範囲内に包含することは当業者に明らかであろう。一般に、本明細書において使用される用語は、「オープン」な用語として一般に意図されることが当業者により理解されるであろう（例えば、「含む」（including）という用語は、「含むがそれに限定されない」として解釈されるべきであり、「有する」という用語は、「少なくとも～を有する」として解釈されるべきであり、「含む」（includes）という用語は、「含むがそれに限定されない」として解釈されるべきである、など）。

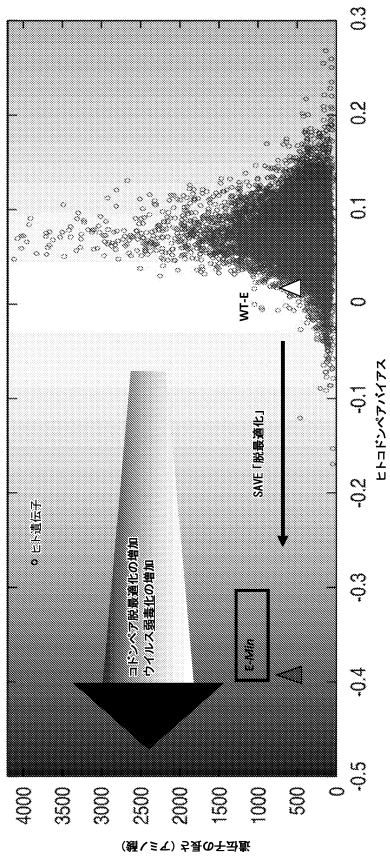
【0189】

本明細書において使用される場合、「含む」（comprising）または「含む」（comprises）という用語は、態様にとって有用な、組成物、方法、およびその各々の構成要素に関して使用されるが、有用なものまたは有用でないもののいずれであれ、不特定の構成要素の包含に対してオープンである。一般に、本明細書において使用される用語は、「オープン」な用語として一般に意図されることが当業者により理解されるであろう（例えば、「含む」（including）という用語は、「含むがそれに限定されない」として解釈されるべきであり、「有する」という用語は、「少なくとも～を有する」として解釈されるべきであり、「含む」（includes）という用語は、「含むがそれに限定されない」として解釈されるべきである、など）。含む（including）、含有する、または有するなどの用語の同義語としての「含む」（comprising）というオープンエンドの用語が、本発明を記載およびクレームするために本明細書において使用されるが、本発明、またはそ

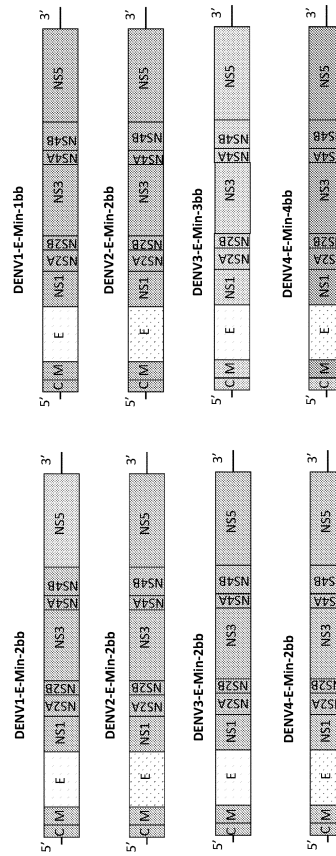
の態様は、「からなる」または「から本質的になる」などの代替的な用語を使用して代替的に記載され得る。

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】



10

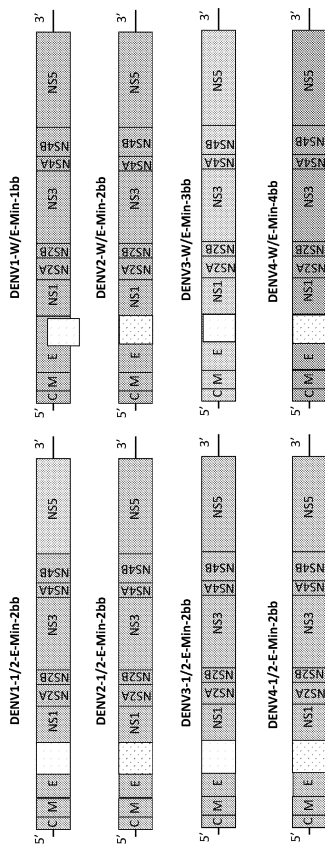
20

30

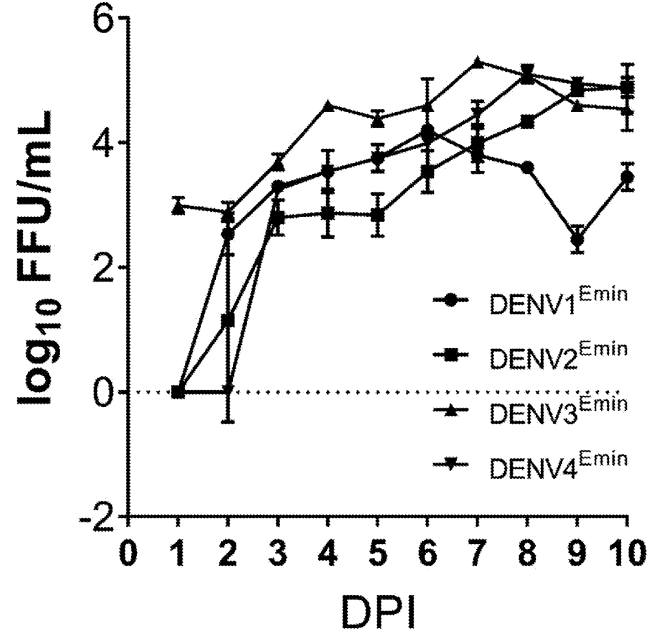
40

50

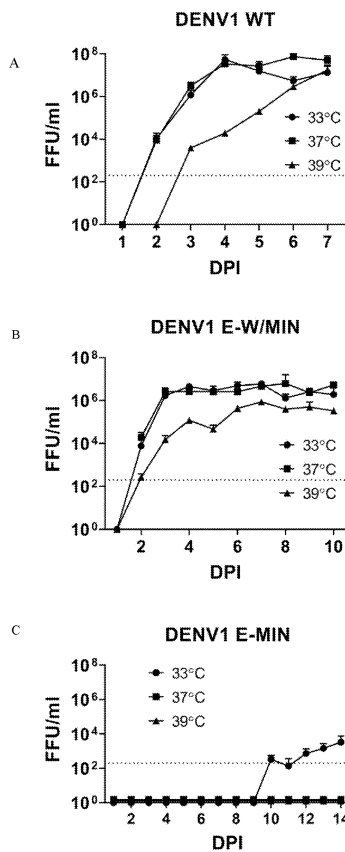
【図 2】



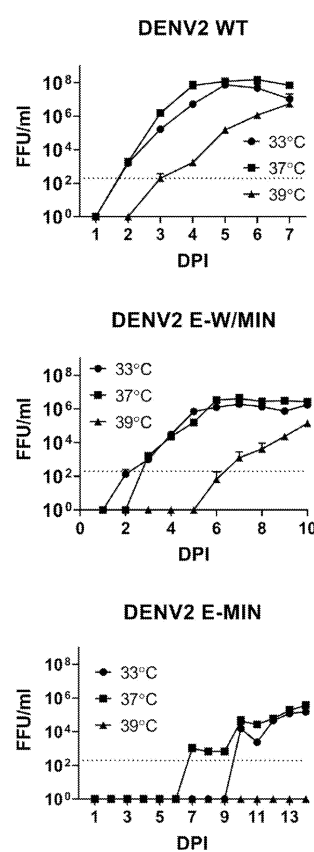
【図 3】



【図 4】



【図 5】



10

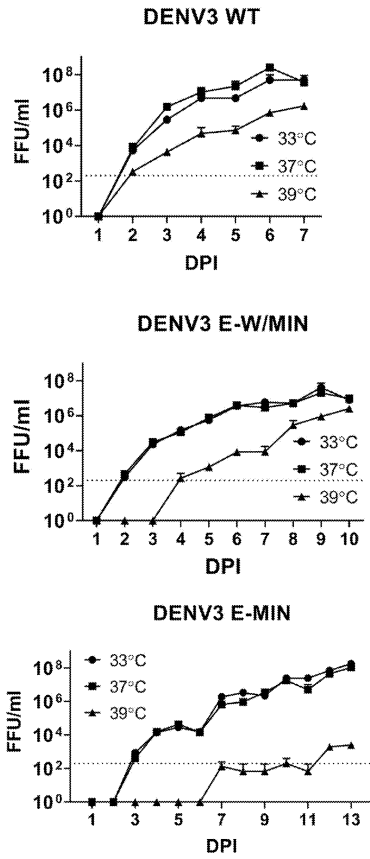
20

30

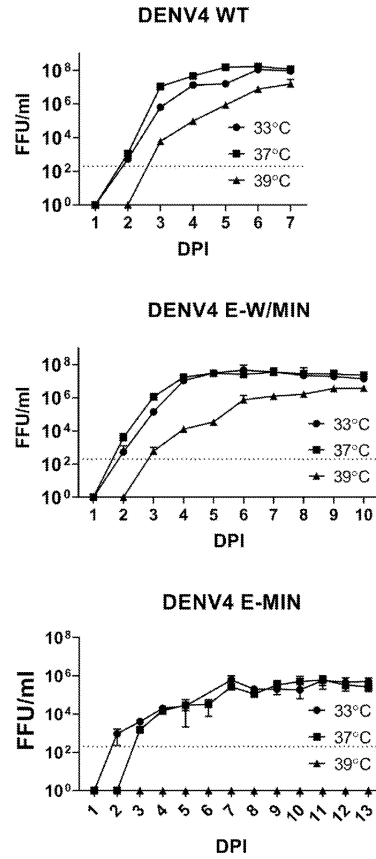
40

50

【図 6】



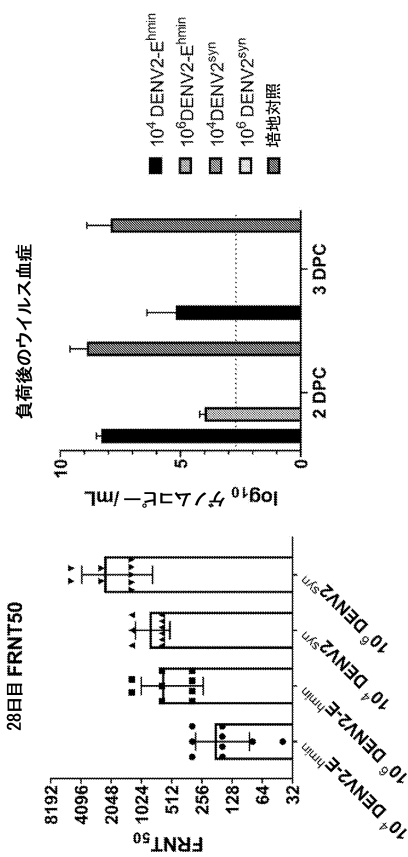
【図 7】



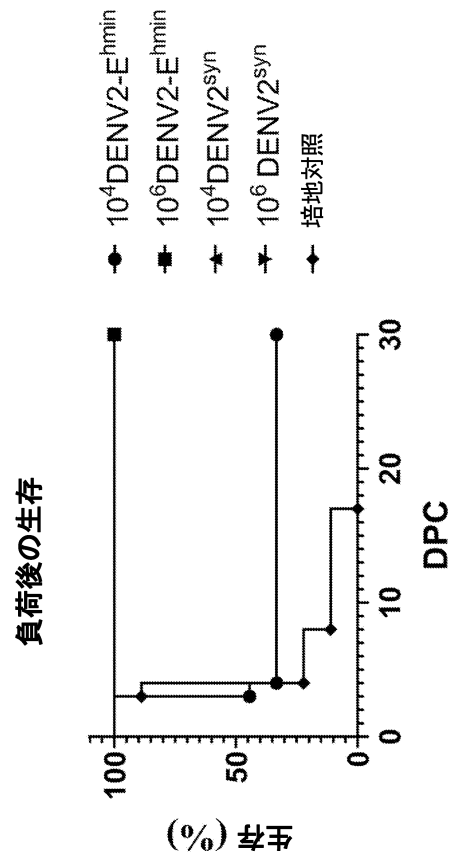
10

20

【図 8 A】



【図 8 B】

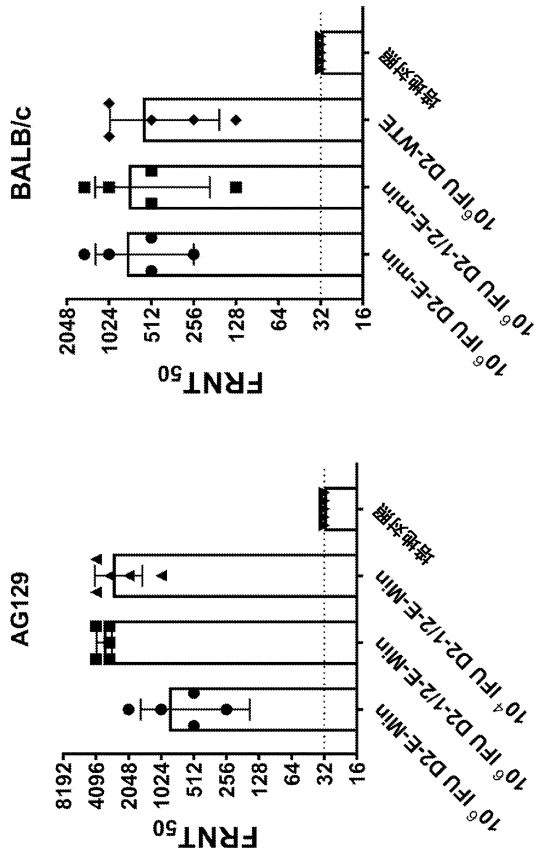


30

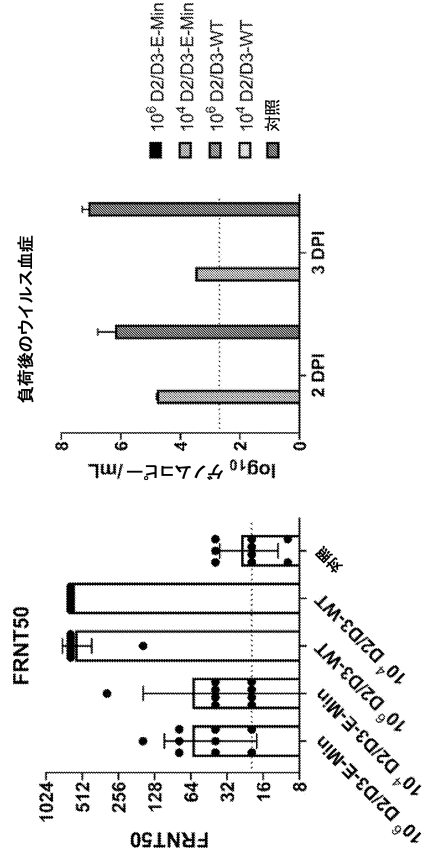
40

50

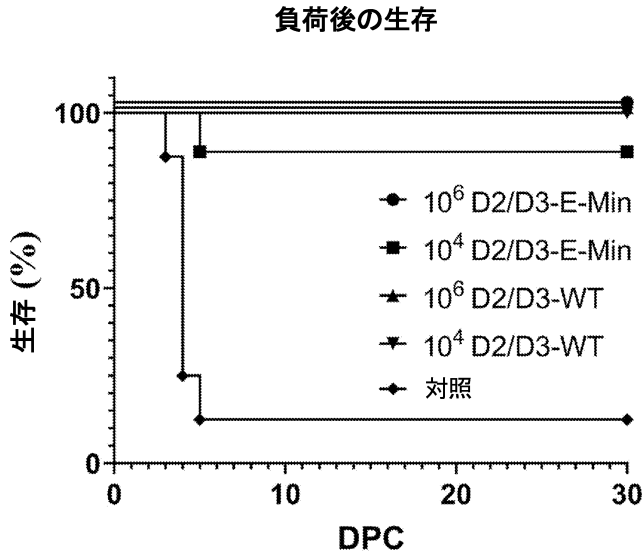
【図 9】



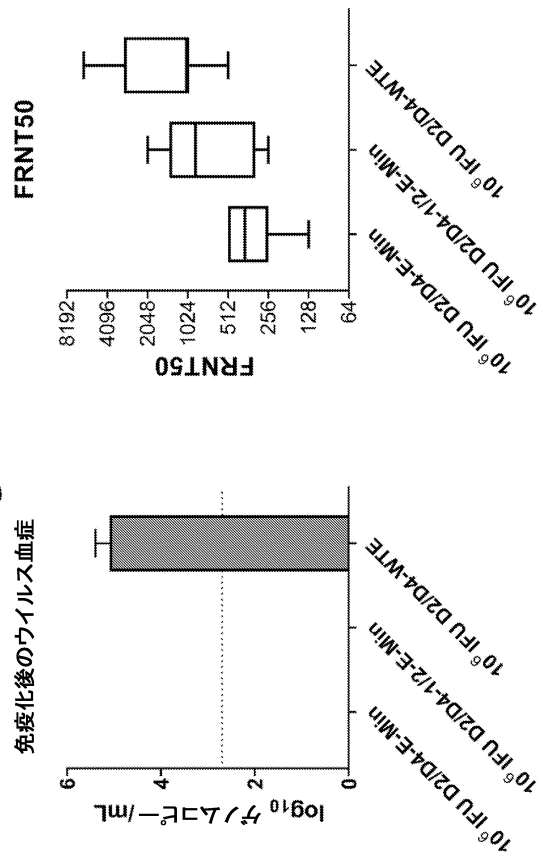
【図 10 A】



【図 10 B】



【図 11 A】



10

20

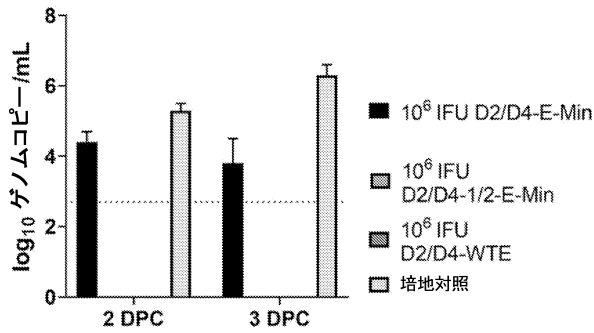
30

40

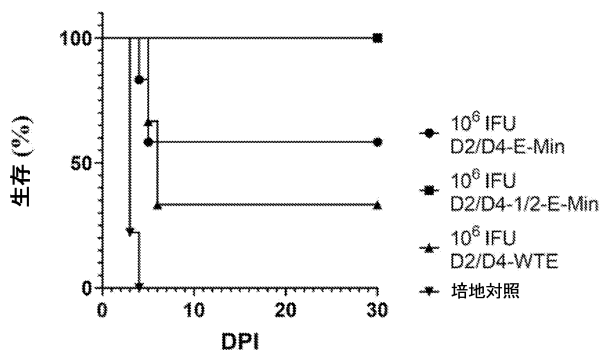
50

【図 1 1 B】

負荷後のウイルス血症

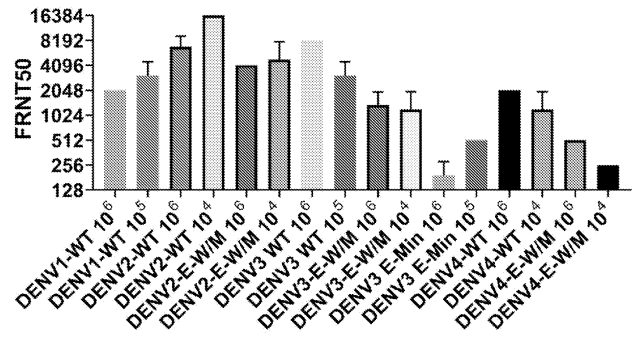


負荷後の生存

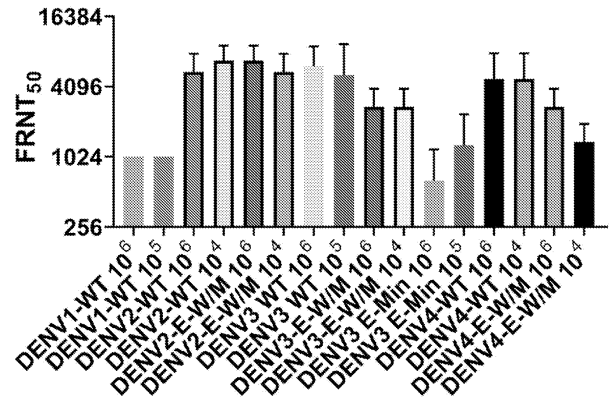


【図 1 2】

21 DPI FRNT50



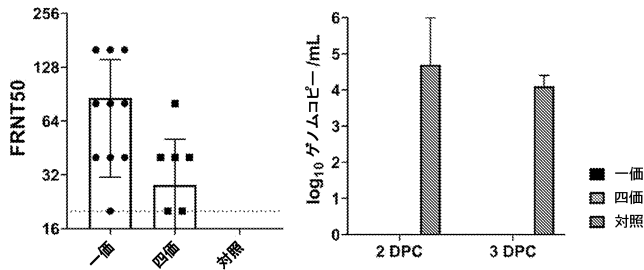
35 DPI FRNT50



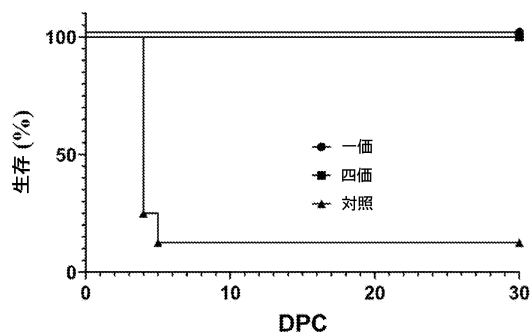
【図 1 3】

FRNT50

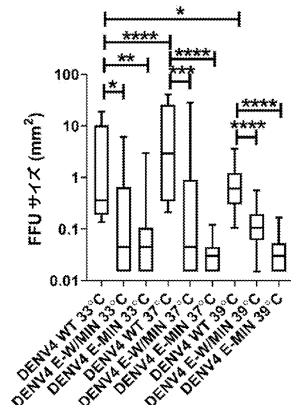
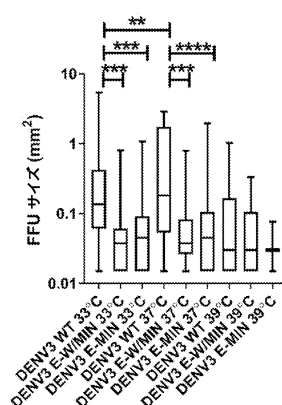
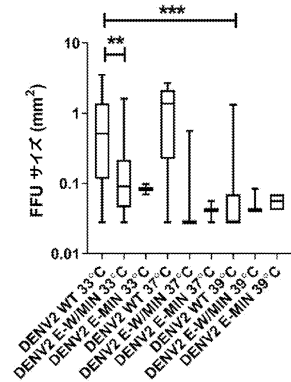
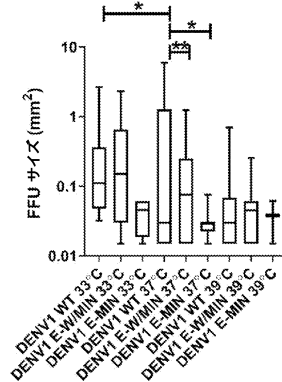
負荷後のウイルス血症



負荷後の生存



【図 1 4】



10

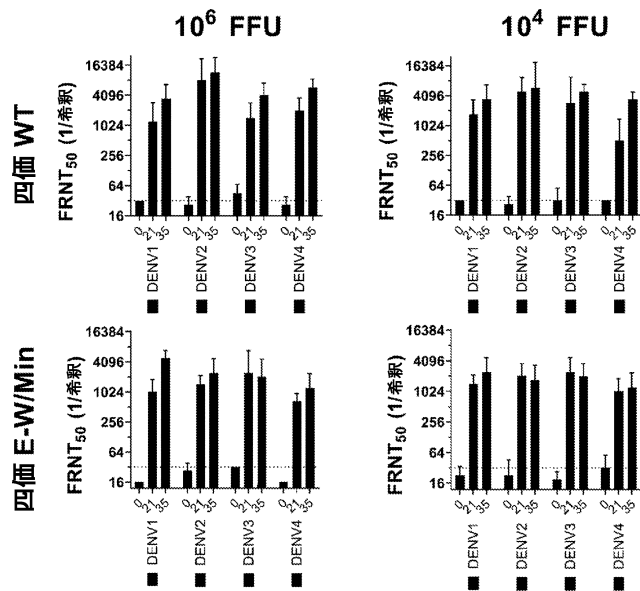
20

30

40

50

【図 15】



【配列表】

2022540773000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US20/39166
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 39/12; C12N 7/00; A61K 39/00; A61P 31/14 (2020.01) CPC - A61K 39/12; C12N 7/00; A61K 39/00; Y02A 50/30; A61P 31/14 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2019/0002837 A1 (The Research Foundation for The State University of New York) 03 January 2019; abstract; [0010]-[0011], [0017], [0018], [0019]-[0020], [0030], [0033], [0035], [0061], [0062], [0067], [0097], [0100], [0105], [0106], [0111] - [0112], [0116], [0119], [0147]-[0148], [0152], [0154], claims 1, 17, 18, 21, 22	1-12, 13/1-13/12, 14/1-14/12, 15/14/1-15/14/12, 16/14/1-16/14/12, 17/14/1-17/14/12, 18-31
A	US 2008/0118530 A1 (KEW, OM, et al.) 22 May 2008; entire document	1-12, 13/1-13/12, 14/1-14/12, 15/14/1-15/14/12, 16/14/1-16/14/12, 17/14/1-17/14/12, 18-31
P,X	WO 2019/172982 A1 (CODAGENIX INC.) 12 September 2019; entire document	1-12, 13/1-13/12, 14/1-14/12, 15/14/1-15/14/12, 16/14/1-16/14/12, 17/14/1-17/14/12, 18-31
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 September 2020 (14.09.2020)		Date of mailing of the international search report 24 SEP 2020
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ミューラー ステッフエン

アメリカ合衆国 1 1 0 2 4 ニューヨーク州 グレート ネック ゲイ ドライブ 7

(72)発明者 コールマン ジョン ロバート

アメリカ合衆国 1 0 9 1 3 ニューヨーク州 プロベルト パイン グレン ドライブ 1 8

(72)発明者 スタウフト チャールズ

アメリカ合衆国 2 1 0 4 5 メリーランド州 コロンビア ブルリング レーン 9 4 2 4

(72)発明者 ワン イン

アメリカ合衆国 1 1 7 2 0 ニューヨーク州 サウス セタウキット キャリー コート 5

F ターム (参考) 4B065 AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA44

4C085 AA03 BA51 DD62 EE01

4H045 AA10 AA20 AA30 BA09 CA01 EA20

【要約の続き】

負荷後の生存

