

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 39/12 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780043955.3

[43] 公开日 2009 年 9 月 23 日

[11] 公开号 CN 101541344A

[22] 申请日 2007.11.30

[21] 申请号 200780043955.3

[30] 优先权

[32] 2006.12.1 [33] FR [31] 0655255

[86] 国际申请 PCT/FR2007/052431 2007.11.30

[87] 国际公布 WO2008/065315 法 2008.6.5

[85] 进入国家阶段日期 2009.5.26

[71] 申请人 赛诺菲巴斯德有限公司

地址 法国里昂

[72] 发明人 B·盖伊 V·巴班 R·福拉特
J·兰

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 段家荣 林 森

权利要求书 2 页 说明书 20 页 序列表 24 页

[54] 发明名称

针对 4 种登革热血清型的免疫方法

[57] 摘要

本发明涉及在患者中诱导抗 4 种登革热血清型的保护的方法,包括:(a)第一次给药单价疫苗,该单价疫苗包含第一登革热血清型的疫苗病毒,和(b)第二次给药四价疫苗,该四价疫苗包含 4 种登革热血清型的疫苗病毒,其中,在给药所述单价疫苗之后至少 30 天至最多 12 个月给药所述四价疫苗。

1. 登革热疫苗病毒用于制备用于抗登革热病毒的免疫的单价疫苗和四价疫苗的用途，其包括

(a)第一次给药单价疫苗，该单价疫苗包含第一血清型登革热的疫苗病毒，和

(b)第二次给药四价疫苗，该四价疫苗包含 4 种登革热血清型的疫苗病毒，其中，在给药所述单价疫苗之后至少 30 天至最多 12 个月给药所述四价疫苗。

2. 根据权利要求 1 的用途，其中在第一次给药(a)期间使用的所述疫苗病毒选自血清型 1 或 2 登革热疫苗病毒。

3. 根据权利要求 1 或 2 的用途，其中在第一次给药(a)期间使用的所述疫苗病毒选自 VDV1 和 VDV2 毒株。

4. 根据权利要求 1-3 任一项的用途，其中在四价疫苗中使用的疫苗病毒为 Chimerivax™ DEN-1、2、3 和 4。

5. 根据权利要求 1-4 任一项的用途，其中血清型 1、2、3 和 4 登革热的疫苗病毒的数量在 10^3 到 10^6 DICC₅₀ 的范围内。

6. 根据权利要求 1-5 任一项的用途，其中单价疫苗包含 10^4 DICC₅₀ 的 VDV1 或 VDV2 和四价疫苗包含 10^5 DICC₅₀ 的 Chimerivax™ DEN-1、2、3 和 4。

7. 根据权利要求 1-5 任一项的用途，其中单价疫苗包含 10^4 DICC₅₀ 的 VDV1 或 VDV2，四价疫苗包含 10^5 DICC₅₀ 的 Chimerivax™ DEN-1、2、3 和 10^3 DICC₅₀ 的 Chimerivax™ DEN-4。

8. 根据权利要求 1-7 任一项的用途，其中所述第二次给药(b)在所述第一次给药(a)之后 30 至 60 天实施。

9. 抗登革热病毒的免疫试剂盒，其包括至少含有以下的盒子：

(a)包含单价疫苗的第一容器，所述单价疫苗含有第一登革热血清型的疫苗病毒，

(b)包含四价疫苗的第二容器，所述四价疫苗含有 4 种登革热血清型的疫苗病毒。

10. 根据权利要求 9 的免疫试剂盒，其至少包括：

(a) 含有单价疫苗的第一容器，所述单价疫苗包含 VDV1 或 VDV2 疫苗病毒，

(b) 含有四价疫苗的第二容器，所述四价疫苗包含 4 种 Chimerivax™ DEN-1、2、3 和 4。

11. 根据权利要求 10 的免疫试剂盒，其中所述单价疫苗包含 10^4 DICC₅₀ 的 VDV1 或 VDV2，所述四价疫苗包含 10^5 DICC₅₀ 的 Chimerivax™ DEN-1、2、3 和 4。

12. 根据权利要求 10 的免疫试剂盒，其中所述单价疫苗包含 10^4 DICC₅₀ 的 VDV1 或 VDV2，所述四价疫苗包含 10^5 DICC₅₀ 的 Chimerivax™ DEN-1、2、3 和 10^3 DICC₅₀ 的 Chimerivax™ DEN-4。

针对 4 种登革热血清型的免疫方法

本发明涉及用于在患者中诱导针对 4 种登革热血清型的保护的方法，其包括：

(a) 第一次给药单价疫苗，该单价疫苗包含第一血清型登革热的疫苗病毒，和

(b) 第二次给药四价疫苗，该四价疫苗包含 4 种登革热血清型的疫苗病毒，和

其中在第一次给药(a)之后至少 30 天至最多 12 个月实施第二次给药(b)。

登革热疾病是由四种黄病毒属的病毒引起的，这四种病毒具有相似血清型，但在抗原方面有区别(Gübler 等，1988 在：Epidemiology of arthropod-borne viral disease 中. Monath TPM, 编者 Boca Raton(FL): CRC Press: 223-60; Kautner 等，1997, J. of Pediatrics, 131: 516-524; Rigau-Pérez 等，1998, Lancet; 352: 971-977; Vaughn 等，1997, J. Infect. Dis; 176: 322-30)。感染登革热血清型可以产生临床疾病谱，该谱从非特异的病毒综合征到严重的致死出血性疾病。在蚊叮咬之后登革热的潜伏期是大约 4 天(从 3 到 14 天)。登革热的特征在于双相发热(*fièvre biphasique*)、头痛、身体各个部分的疼痛、虚脱、疹、淋巴结病(*lymphadénopathie*) (Kautner 等，1997, J. of Pediatrics, 131: 516-524; Rigau-Pérez 等，1998, Lancet; 352: 971-977)。病毒血症期与发热期相同(Vaughn 等，1997, J. Infect. Dis.; 176: 322-30)。在 7 到 10 天后完成登革热的治愈，但通常有延长的虚弱。经常出现白细胞和血小板数目的减少。

出血性登革热是严重的发热疾病，特征在于内环境稳定的异常和血管通透性(*perméabilité*)的升高，其可以引起血容量不足和低血压(伴有休克综合征的登革热)，常常因严重的内出血而复杂化。出血性登革热的死亡率在没有治疗的情况下可以达到 10%，但在大多数有治疗经验的中心是 $\leq 1\%$ (WHO Technical Guide, 1986. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control, p. 1-2. World Health Organization, Geneva, Switzerland)。

登革热的常规实验室诊断是基于病毒的分离和/或检测登革热病毒特异性抗体。

登革热是继疟疾之后第二重要的热带传染性疾病，超过半数的世界人口生活在具有流行病传播风险的区域内。每年，登革热的病例估计为5千万到1亿，由于出血性登革热就医的患者的病例为500,000，死亡的数目为25,000。在亚洲、太平洋区域、非洲、拉丁美洲和加勒比地区，登革热是地方病。超过100个热带国家对于登革热病毒的感染是地方性的，在这些国家的60个中已经记录了出血性登革热(Gubler, 2002, *TRENDS in Microbiology*. 10: 100-103; Monath, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 2395-2400)。许多充分描述的因素似乎与登革热有关：人口增长；无计划的和不受控制的城市化，特别是与贫穷相关；空中旅行的增加；缺乏对蚊子的有效控制，以及卫生和公众健康基础设施的恶化(Gubler, 2002, *TRENDS in Microbiology*. 10: 100-103)。旅游者和移居国外的个体越来越多地被警告防登革热(Shirtcliffe等, 1998, *J. Roy. Coll. Phys. Lond.*; 32: 235-237)。美国军队在登革热地方性流行的热带地区内部署期间，登革热在美国军队中构成了发热性疾病的主要原因之一(DeFraites等, 1994, *MMWR* 1994; 43: 845-848)。

病毒在涉及到人类和埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)的循环(cycle)中得到维持，其中埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)是与人共处的在白天叮咬的蚊子，其倾向于以人为食。人类中的感染起始于受感染的埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)吸血时病毒的注入。唾液中的病毒主要沉积在血管外的组织中。在接种后的被传染的第一类细胞是树突状细胞，其然后迁移到淋巴结(Wu 等, 2000, *Nature Med.*, 7: 816-820)。在皮肤中和在淋巴结中的初始复制之后，病毒在急性发热期期间病毒在血液中出现，一般是3到5天。

与树突状细胞一起，这些单核细胞和巨噬细胞处在登革热病毒的第一目标之中。对同型再感染的保护是完全的，可能持续终生，但是不同登革热类型之间的交叉保护持续少于数周到数月(Sabin, 1952, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 1: 30-50)。因而，个体可能经历不同血清型的感染。理论上，登革热的二次感染理论上是发生严重的登革热疾病的风险因素。然而，出血性登革热是多因素的：这些因素包括涉及的病毒的毒株、以及患者的年龄、免疫状态和遗传易感性。两种因素在出血性登

革热的发生中起到主要作用：具有高病毒血症(virémie)的快速病毒复制(疾病的严重度与病毒血症的水平相关；Vaughn等，2000，J. Inf. Dis.，181：2-9)以及具有高水平的炎症性介质释放的明显的炎症性反应(réponse inflammatoire)(Rothman and Ennis，1999，Virology，257：1-6)。没有一种抗登革热的特效治疗。登革热治疗的特征是卧床、用解热和镇痛药控制发热和疼痛以及摄取充足的液体。出血性登革热的治疗需要体液损耗的平衡、凝血因子的替换和肝素输注。

预防措施当前是基于控制媒介和采取个人防护措施，这些是难以实施和昂贵的。现在还没有抗登革热的疫苗被批准。考虑到上述四种登革热血清型在世界上传播，并且已经报道被涉及到出血登革热(fièvre hémorragique dengue)的病例中，因此，免疫接种理想地应当提供抗这四种血清型登革热病毒的保护。

当通过四价疫苗进行免疫时，可以达到优势性地引起仅仅抗一种或最多3种血清型的反应。因此存在对一种方法的需要，这种方法可以减少不同血清型之间的干扰并可以诱导抗4种登革热血清型的中和抗体(anticorps neutralisant)。

本发明人发现当用仅仅一种血清型的减毒活疫苗进行初次免疫后给药用来诱导抗4种血清型反应的疫苗制剂，可以产生包含中和4种血清型的抗体的免疫反应，该第二次免疫是在第一给药后30天至12个月实施。

本发明人特别地证实在单价免疫DEN-2后的四价免疫DEN-1,2,3,4在所有经免疫的猴子中诱导抗四种血清型的反应。相反地，仅仅四价免疫不能诱导令人满意的抗4种中的两种反应，甚至在加强剂量(rappel)后也如此。

通过根据本发明的方法产生的免疫反应因而是数量上和质量上是更强的(覆盖所有血清型)。

根据第一个目的，本发明因而涉及可以在患者中诱导抗4种登革热血清型(4 sérotypes de la dengue)的中和抗体的反应的方法，其包括：

(a)第一次给药单价疫苗，该单价疫苗包含第一血清型登革热的疫苗病毒，和

(b)第二次给药四价疫苗，该四价疫苗包含4种登革热血清型的疫苗病毒和

其中,在第一次给药(a)之后至少30天至最多12个月实施第二次给药(b)。

根据本发明的免疫方法的特定的实施方式,在第一次给药(a)期间使用的所述疫苗病毒选自血清型1或2的登革热疫苗病毒。

根据本发明的免疫方法另一种特定的实施方式,在第一次给药(a)期间使用的所述疫苗病毒选自VDV1和VDV2毒株。

根据本发明的方法的另一种特定的实施方式,在四价疫苗中使用的所述疫苗病毒选自Chimerivax™ DEN-1、2、3和4。

根据本发明的方法的另一种特定的实施方式,血清型1、2、3和4登革热疫苗病毒的数量在 10^3 到 10^6 DICC₅₀的范围内。

根据本发明的方法的另一种特定的实施方式,单价疫苗包含 10^4 DICC₅₀的VDV1或VDV2,四价疫苗包含 10^5 DICC₅₀的Chimerivax™ DEN-1、2、3和 10^3 DICC₅₀的Chimerivax™ DEN-4。

根据本发明的方法的另一种实施方式,所述第二次给药(b)在所述第一次给药(a)之后30至60天实施。

本发明还一个目的是抗登革热病毒的免疫试剂盒,其包括至少含有(a)包含单价组合物或疫苗的第一容器,所述单价组合物或疫苗含有第一登革热血清型的疫苗病毒,(b)包含四价组合物或疫苗的第二容器,所述四价组合物或疫苗含有4种登革热血清型的疫苗病毒。

根据一种实施方式,根据本发明的试剂盒至少包含:

(a) 含有单价疫苗的第一容器,所述单价疫苗包含VDV1或VDV2疫苗病毒,

(b) 含有四价疫苗的第二容器,所述四价疫苗包含4种Chimerivax™ DEN-1、2、3和4。

根据一种特定的实施方式,根据本发明的试剂盒包含含有 10^4 DICC₅₀的VDV1或VDV2的单价疫苗和包含 10^5 DICC₅₀的Chimerivax™ DEN-1、2、3和 10^3 DICC₅₀的Chimerivax™ DEN-4的四价疫苗。

本发明因此还涉及登革热疫苗病毒用于制备用于抗登革热病毒的免疫的单价疫苗和四价疫苗的用途,其中所述单价疫苗包含第一血清型的登革热疫苗病毒,所述四价疫苗包含4种登革热血清型的疫苗病毒,并且其中该四价疫苗是在给药单价疫苗后至少30天至最多12个

月进行给药的。

在下文的描述中将更详细地描述本发明。

定义

“登革热病毒”或“DEN”是正链、单链 ARN 病毒，其属于黄病毒(*flaviviridae*)科黄病毒属。基因组 ARN 在 5'末端含有 I 型帽(*coiffe de type I*)，但是在 3'末端缺少 poly-A 尾部(*queue poly-A*)。基因组结构由以下元件组成：5'非编码区(NCR)、结构蛋白质(衣壳(C)、膜前(*pré-membrane*) / 膜 (*prM/M*)、包膜 (E)) 和非结构蛋白(NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5)，和 3'NCR。基因组病毒 ARN 与衣壳蛋白缔合以形成核壳。在黄病毒的情况中，DEN 病毒基因组编码不间断的编码区域，其被翻译成单个聚蛋白质。

在本发明的范围中，对于“登革热疫苗病毒”，理解为任何病毒形式的能够诱导特异的包含抗体的免疫反应的登革热病毒，优选的是任何病毒形式的可以在人类中对抗登革热病毒感染的免疫计划的框架内可使用的登革热病毒。对于“登革热疫苗病毒”，因而理解为灭活病毒、减毒病毒(*virus atténués*)，或重组蛋白质如登革热病毒的包膜蛋白。

如果不再在允许的细胞上进行复制，则疫苗病毒被认为是“灭活的”。

如果在 37°C 或 39°C 在 Huh-7、VERO 和/或 C6/36 肝细胞上生长之后，所述疫苗病毒具有的最大滴度最高为用野生型亲本毒株在相同培养条件下获得的和如通过利用相同滴定方法测量的最大滴度的 1/10，则疫苗病毒被认为是“减毒的”。因而在上文鉴定的三种细胞类型的至少一种上显示了降低的生长的疫苗病毒在本发明的范围中被认为是“减毒的”。

可以用于人类的疫苗病毒具有正的效益/风险比率，所述比率一般可以满足为获得销售授权的规定要求。在本发明的范围中使用的登革热疫苗病毒优选地是减毒病毒，这样它不会在人类中诱导疾病。有益地，所述疫苗病毒在大部分进行疫苗接种的个体中仅产生最多中等强度(即，中度到弱，或甚至没有)的副作用，而同时保存它诱导中和抗体反应的能力。

作为可以在本发明的范围中可使用的登革热疫苗病毒的非限制性

实例，可以提及：灭活疫苗病毒、减毒疫苗病毒，如减毒毒株 VDV-1、VDV-2，例如在申请：WO02/66621、WO0057904、WO0057908、WO0057909；WO0057910、WO02/0950075 和 WO02/102828 中描述的毒株，或嵌合体。所述嵌合病毒具有表现出上文所定义的减毒病毒的特征的特性。所有表达登革热病毒的包膜蛋白并诱导包含中和血清型(由其产生所述包膜蛋白)的抗体的免疫反应的嵌合病毒因而可以用于本发明的范围中。作为非限制性实例，可以提及的是：如在例如专利申请 WO 98/37911 中所描述的 Chimerivax™ 登革热，如在例如专利申请 WO 9640933 和 WO0160847 中描述的登革热/登革热嵌合体。例如，血清型 1 登革热疫苗病毒可以是 VDV1 疫苗毒株或 Chimerivax™ DEN-1，特别是 YF17D/DEN-1 病毒，或是 DEN-1 16007/PDK13 毒株。血清型 2 登革热疫苗病毒可以例如是 VDV2 疫苗毒株或 Chimerivax™ DEN-2，特别是 YF17D/DEN-2 病毒，或是 DEN-2 16681/PDK53 毒株。血清型 3 登革热疫苗病毒可以是 Chimerivax™ DEN-3，特别是 YF17D/DEN-3 病毒。血清型 4 登革热疫苗病毒可以是 Chimerivax™ DEN-4，特别是 YF17D/DEN-4 病毒。可以参考在这里提到的申请以获得所提到的毒株的精确描述和它们的获得方法。

“VDV”或“Vero 登革热疫苗”表示适应 Vero 细胞的活的减毒登革热病毒毒株(即，能够在 Vero 细胞上以显著水平可繁殖地(de façon reproductible)进行复制)，并且能够在灵长类中、特别是在人类中诱导特异的体液反应，包括诱导中和抗体。

“VDV-1”是由 DEN-1 16007 野生型毒株获得的，其在 PDK 细胞上经历了 11 次传代(DEN-116007/PDK11)，其然后在 32℃ 在 Vero 细胞中进行扩增(amplifiée)，纯化它的 ARN 并将其转染到 Vero 细胞中。与疫苗毒株 DEN-1 16007/PDK13(在 PDK-原代狗肾脏(Primary Dog Kidney)-细胞上 13 次传代)相比，VDV-1 毒株具有 14 个另外的突变。DEN-1 16007/PDK13 毒株，也称为“LAV1”，在以 Mahidol University 名义的专利申请 EP1159968 中得到描述，并以编号 I-2480 保藏在 Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(CNCM)。VDV-1 毒株的完整序列在序列 SEQ ID NO: 1 中给出。所述毒株可以容易地由所述序列进行再生(reproduite)。VDV-1 毒株的制备和鉴定(caractérisation)方法已经在以 Sanofi-Pasteur 和 Center for Disease Control and

Prevention(疾病控制和预防中心)名义提交的编号 WO 2006/134433 的国际专利申请中得到描述。

“VDV-2”是由 DEN-2 16681 野生型毒株得到,其通过 PDK 细胞经历了 50 次传代(DEN-2 16681/PDK50)、进行了噬斑纯化(*purifiée par plaque*),并提取它的 ARN 并纯化然后转染到 Vero 细胞中。然后通过噬斑纯化和在 Vero 细胞中扩增获得了 VDV-2 毒株。与疫苗毒株 DEN-2 16681/PDK53(通过 PDK 细胞 53 次传代)相比,VDV-2 毒株具有 10 个另外的突变,其中 4 个突变是沉默的(*silencieuses*)。DEN-2 16681/PDK53 毒株,也被称为“LAV2”,在 Mahidol University 名义的专利申请 EP1159968 中得到描述,并以编号 I-2481 保藏在 Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(CNCM)。VDV-2 毒株的完整序列在序列 SEQ ID NO: 2 中给出。所述 VDV-2 毒株可以容易地由所述序列进行复制。VDV-2 毒株的制备和鉴定(*caractérisation*)方法已经在以 Sanofi-Pasteur 和 Center for Disease Control and Prevention 名义提交的编号为 WO 2006/134433 的国际专利申请中得到描述。

VDV 1 和 2 毒株通过在 Vero 细胞中扩增进行制备。收获所产生的病毒,并通过过滤来净化(*clarifiés*)细胞碎片。ADN 通过酶处理进行消化。通过超滤除去杂质。可以通过浓缩方法来提高传染性滴度。在添加稳定剂之后,毒株在使用前以冻干的或冷冻的形式进行保存,然后即时地进行重建(*reconstituées*)。

对于“ChimeriVaxTM登革热”或“CYD”,表示嵌合的黄热病(YF)病毒,其包含 YF 病毒的骨架(*squelette*),其中编码膜前和包膜蛋白的序列被 DEN 病毒的序列替换。因而把含有登革热血清型 1 毒株(DEN-1)的 prM 和 E 序列的嵌合 YF 病毒称为“CYD-1 或 CYD DEN1”。把含有 DEN-2 毒株的 prM 和 E 序列的嵌合 YF 病毒称为“CYD-2 或 CYD DEN2”。把描述含有 DEN-3 毒株的 prM 和 E 序列的嵌合 YF 病毒称为“CYD-3 或 CYD DEN3”。把含有 DEN-4 毒株的 prM 和 E 序列的嵌合 YF 病毒称为“CYD-4 或 CYD DEN4”。这些 ChimeriVaxTM登革热的制备已经在国际专利申请 WO 98/37911 和 WO 03/101397 中得到详细描述,可以参考这些文献以获得制备它们的方法的精确说明。通过利用来自 DEN1 PUO359(TYP1140)、DEN2 PUO218、DEN3 PaH881/88 和 DEN4 1288(TVP 980)毒株的 prM 和 E 序列产生在实施例中描述的嵌

合体。登革热病毒的任何毒株可以在本发明的范围中用于构建嵌合体。

优选地，嵌合的 YF 病毒包括减毒的黄热病毒株 YF17D 的骨架 (Theiler M 和 Smith HH(1937) J Exp. Med 65, 第 767-786 页) (YF17D/DEN-1、YF17D/DEN-2、YF17D/DEN-3、YF17D/DEN-4 病毒)。可以使用的 YF17D 毒株的实例包括 YF17D204(YF-Vax®, Sanofi-Pasteur, Swifwater, PA, USA; Stamaril®, Sanofi-Pasteur, Marcy l'Etoile, France; ARILVAX™, Chiron, Speke, Liverpool, UK; FLAVIMUN®, Berna Biotech, Bern, Switzerland); YF17D-204 France(X15067, X15062); YF17D-204,234 US(Rice 等, 1985, Science, 229: 726-733)、或相关的毒株 YF17DD(Genbank 索取号 U17066)、YF17D-213(Genbank 索取号 U17067)和由 Galler 等(1998, Vaccines 16(9/10): 1024-1028)描述的 YF17DD 毒株。可在人类中使用任何其它的减毒黄热病病毒的毒株也可以在本发明的范围中用于构建嵌合体。

根据特定的实施方式，对于在不同给药中使用的每种血清型，疫苗病毒以 10^3 - 10^5 DICC₅₀ 的量存在。

根据特定的实施方式，疫苗病毒 VDV1 或 VDV2 在单价疫苗中以 10^4 DICC₅₀ 的水平存在。

根据特定的实施方式，Chimerivax™ DEN-1、2、3 在三价疫苗中以 10^5 DICC₅₀ 的水平存在，Chimerivax™ DEN-4 在四价疫苗中以 10^3 DICC₅₀ 的水平存在。

通过每种血清型在 Vero 细胞中的扩增来制备每种 Chimerivax™ 单价登革热疫苗病毒(血清型 1、2、3 和 4)。更特别地，在无血清的培养基中在贴壁的 Vero 细胞(cellules Vero adhérentes)中分别地产生上述四种病毒。通过过滤净化细胞碎片的病毒收获物接着通过超滤和色谱法来浓缩和纯化，以除去来自宿主细胞的 ADN。在添加稳定剂之后，在使用前疫苗毒株以冷冻的或冻干的形式进行保存，然后即时被重建。相同的方法适用于上述四种嵌合体。

除了药学上可接受的赋形剂之外，当它仅含有单一的登革热血清型疫苗病毒时，剂、组合物或疫苗是“单价的”。当它含有四种登革热血清型疫苗病毒时，剂、组合物或疫苗是“四价的”。所述多价组合物通过简单地混合单价的组合物而获得。

对于“患者”表示可能感染登革热的人(儿童或成年人)，特别是具

有感染风险的人，例如，在存在登革热的地区中旅行的人或这些地区的居民。因而该术语包括未接触过登革热病毒的(naïve)人以及接触过病毒的(non-naïve)人。

初次单价免疫后的四价免疫

根据第一个方面，本发明的目的因此为抗登革热病毒的免疫方法。

事实上，本发明人特别地已经表明了第一次给药单价疫苗后 30 天至 12 个月给药 4 种血清型可以获得抗 4 种血清型的有效保护。因而，根据本发明的方法在抗登革热的免疫策略的范围中具有非常特别的益处。

根据本发明，第一次免疫可以使用包含所述 4 种登革热血清型的任一种的疫苗病毒的单价组合物或疫苗进行实施，第二次给药使用所有所述 4 种疫苗血清型来进行。根据特别的实施方式，血清型 1 或 2 的登革热疫苗病毒，优选地血清型 2 用于第一次给药。优选地，在第一次给药中使用的登革热疫苗病毒是减毒登革热病毒并且不是由嵌合病毒进行构建(constitué)。根据特定的实施方式，VDV1 或 VDV2 毒株，优选地 VDV2 毒株被用作在第一次给药中的疫苗病毒。

活的减毒疫苗病毒用于第二次给药中，优选地为表达 4 种血清型的登革热病毒的抗原的嵌合病毒，特别是 Chimerivax™ DEN1、2、3 和 4。

根据特别的实施方式，本发明因此覆盖了以下方案：

- (a) VDV1 (b) CYD DEN-1、2、3 和 4
- (ia) VDV2 (b) CYD DEN-1、2、3 和 4

在本发明的范围中，对于“疫苗或组合物”，理解为包含“免疫有效量”的登革热疫苗病毒的组合物，即，对于诱导包含中和抗体的特异性免疫反应充足量的登革热病毒，其可以例如通过以下在实施例 1 中描述的血清中和测试进行证实。当如此测定的中和抗体的滴度大于或等于 1:10(单位：1/稀释度(dilution))时，血清被认为对于中和抗体的存在是阳性的(positif)。

疫苗毒株的量通常是以病毒噬斑形成单位(PFU)或以感染 50%组织培养物的剂量或以感染 50%细胞培养的剂量(DICC₅₀)进行表示的。例如，根据本发明的组合物对于单价的或四价的组合物可以含有 10 到 10⁶ DICC₅₀、特别是 10³ 到 10⁵ DICC₅₀ 的血清型 1、2、3 或 4 登革热疫苗病

毒。因而，在根据本发明的组合物或用途中，血清型 1、2、3 和 4 登革热疫苗病毒的剂量优选地各自在 10 到 10^6 DICC₅₀ 的范围内，如 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 或 10^6 DICC₅₀，特别是在 10^3 到 10^5 DICC₅₀ 的范围内。上述疫苗病毒可以以相同的或不同的剂量进行使用，其可以根据所使用的疫苗病毒的性质和获得的免疫反应的强度进行调整。

根据本发明的方法的特定实施方式，在单价或四价组合物或疫苗中的活的减毒疫苗病毒的量为 10^3 - 10^5 DICC₅₀。根据特定的实施方式，该单价疫苗包含 10^4 DICC₅₀ 的 VDV1 或 VDV2，优选 VDV2。根据特定的实施方式，该四价疫苗包含 10^5 DICC₅₀ 的 Chimerivax™ DEN-1、2、3 和 4。根据一种有利的实施方式，该四价疫苗包含 10^5 DICC₅₀ 的 Chimerivax™ DEN-1、2、3 和 10^3 DICC₅₀ 的 Chimerivax™ DEN-4。

在本发明的范围内，第二次给药(b)在给药(a)后 30 天至最多 12 个月实施。根据有利的实施方式，第二次给药在第一次给药(a)后 30 天至 60 天实施。

中和抗体反应有利地是可持久的，即，它可以在第二次给药后直到至少 6 个月时在血清中可被检测到。

疫苗病毒以组合物或疫苗的形式进行给药，它们可以根据本领域技术人员已知的任何方法来制备。通常，一般为冻干形式的病毒与药学上可接受的赋形剂(如，水或磷酸盐缓冲盐水溶液)、润湿剂或稳定剂混合。对于“药学上可接受的赋形剂”，理解为任何溶剂、分散介质、填料等等，其在人类或动物中不产生继发反应，例如过敏性反应。根据所选的药物形式、给药方法和途径来选择赋形剂。在“Remington: The Science & Practice of Pharmacy”中描述了合适的赋形剂以及与药物制剂有关的要求，这代表了本领域的参考文献。

优选地，所述疫苗组合物以可注射的形式进行制备，并且可以对应于液体溶液、悬浮液或乳液的形式。所述组合物特别地可以包括缓冲的水溶液，以将 pH 值维持在大约 6-9(如在环境温度下使用 pH 计进行测定)。

虽然添加佐剂不是必需的，然而所述组合物可以包含这样的化合物，即，提高、刺激或增强同时给药的疫苗病毒所诱导的细胞或体液免疫反应的物质。本领域技术人员能够从在疫苗领域中通常使用的佐剂中选择在本发明的范围内可以适用 0 的佐剂。

根据本发明的组合物或疫苗可以根据疫苗接种中通常使用的任何途径进行给药,例如胃肠外途径(特别是皮内的、皮下的或肌内的),有益地通过皮下途径。优选地,所述组合物或疫苗是通过皮下途径(有利地在左侧三角肌区和右侧三角肌区域处)给药的可注射组合物。

进行给药的组合物或疫苗的体积取决于给药途径。对于皮下注射,体积一般在 0.1 至 1.0 ml 之间,优选地大约 0.5 ml。

给药全部血清型 1 到 4 的最佳时期是暴露于登革热病毒之前大约 1 到 3 个月。所述疫苗可以在成年人和儿童中作为感染登革热病毒的预防性处理进行给药。因而目标人群包括未接触登革热病毒的(即,先前没有进行免疫过)或接触过病毒的人。

血清型 1 到 4 登革热疫苗病毒的加强剂量给药(administrations de rappel)也可以例如在给药根据本发明的第二次给药(b)之后 6 个月至 10 年之间,例如,6 个月、1 年、3 年、5 年或 10 年时进行。所述加强剂量给药有益地将通过使用相同的组合物或疫苗(即,相同的疫苗病毒)且优选地在与用于第二次给药(b)的条件相同的给药条件(解剖学部位和给药途径)下进行实施。

干扰现象可以通过一种或多种血清型相对于其他血清型占优势(dominance)进行解释,因而与用来制造疫苗候选物(来自 VDV 或 Chimerivax™)的工艺无关。因而根据本发明的方法一般地可以应用于任何登革热疫苗病毒。

因此本发明目的还包含登革热疫苗病毒用于制备用来抗登革热病毒的免疫的单价疫苗和四价疫苗的用途,其中该单价疫苗包含第一血清型登革热疫苗病毒,该四价疫苗包含 4 种登革热血清型的疫苗病毒,并且其中该四价疫苗在给药单价疫苗后至少 30 天至最多 12 个月进行给药。

为了说明在本发明的用途范围内可使用的疫苗和条件,可以参考关于根据本发明的免疫方法所给出的说明。

根据另一方面,本发明的目的为抗 4 种血清型登革热病毒的免疫试剂盒。根据本发明的试剂盒包含如在上面关于所提出的免疫方法中所定义的组合物或疫苗。根据本发明的试剂盒因此包含含有不同容器的盒子,所述容器包含上述组合物和疫苗,有利地包含解释性说明手册,所述说明手册包含用于给药所述组合物或疫苗的信息。

根据一种实施方式，本发明的目的因此为抗登革热病毒的免疫试剂盒，所述盒子至少包含(a)第一容器，其含有包含第一登革热血清型的疫苗病毒的单价疫苗，和(b)第二容器，其含有包含4种登革热血清型的疫苗病毒的四价疫苗。

对于可以在本发明的试剂盒中使用的登革热疫苗、组合物或疫苗病毒的描述，可以参考上面关于根据本发明的免疫方法所给出的说明。

根据一种特定的实施方式，根据本发明的试剂盒至少包含：

(a)第一容器，其含有包含 VDV1 或 VDV2 的疫苗病毒的单价疫苗，和

(b)第二容器，其含有包含4种 Chimerivax™ DEN-1、2、3 和 4 的四价疫苗。

根据一种特定的实施方式，根据本发明的试剂盒包含至少一种单价疫苗，其包含 10^4 DICC₅₀ 的 VDV1 或 VDV2，和四价疫苗，其包含 10^5 DICC₅₀ 的 Chimerivax™ DEN-1, 2, 3 和 10^3 DICC₅₀ 的 Chimerivax™ DEN-4。

根据本发明的试剂盒可以含有如上所述的容器的单个实例或几个实例。

如果所使用的疫苗是冻干的形式，则所述试剂盒将有益地包含至少一个额外的容器，其含有可以重建可注射疫苗剂的稀释剂。任何药学上可接受的稀释剂都可以用来进行该行为，通常是水或磷酸盐缓冲的水溶液。

本发明通过以下实施例进行说明。

实施例

实施例 1: 通过在猴子中先后注射单价组合物然后四价组合物的抗4种血清型登革热病毒的免疫

在猴模型中测试了病毒血症和免疫原性。特别地，病毒血症已被鉴定为与人类中疾病的毒力和严重度相关的因素之一，因而构成了必须要考虑的重要参数。对于免疫原性，它是在所提供的保护的评价范围中的关键参数。

1.1 材料和方法:

根据关于动物实验的欧洲指令(Directives Européennes)对猴子进行

实验。对来自于毛里塔尼亚的猕猴(*Macaca fascicularis*)进行免疫。在免疫之前,猴子被隔离六周。

用 0.5 ml 的疫苗组合物在臂部通过皮下途径对猴子进行免疫。在用氯胺酮(Imalgene, Merial)轻度麻醉之后,通过在腹股沟静脉或隐静脉处穿刺采集血液。在每次免疫之后的第 0 天和第 28 天,采样 5 ml 的血液以评估抗体反应,而在第 2 和第 10 天之间,采样 1 ml 的血液以评估病毒血症。血液采集到冰上,并在冰上保存直到血清分离。为此,在 4°C 离心血液 20 分钟,并将采集的血清在 -80°C 保存直到测试之时。

病毒血症的测量

通过定量的实时 RT-PCT(qRT-PCR)监控疫苗接种后的病毒血症。位于 DEN1 和 DEN2 毒株的 NS5 基因中的两套引物(amorces)和探针(sonde)被用来分别定量 VDV-1 和 VDV-2 的 ARN。位于 YF 病毒的 NS5 基因中的第三套 2 个引物和 1 个探针被用来定量 CYD 的 ARN。最后,4 套不同 CYD 血清型的特定引物和探针(位于 E(DEN)/NS1(YF)基因的接点处)被用来鉴定对于 ARN NS5 YF 为阳性的样品中的血清型(也参见表 I)。在 T7 启动子控制下,含有每种 PCR 的目标区域(région ciblée par chaque PCR)的 7 种质粒在体外被转录,以产生一系列合成的 ARN,其在每次 RT-PCT 分析中被包括作为内部参照(référence interne)。通过分光光度法测定这些合成的 ARN 的量,所获得的 ARN 的量被转化成 ARN 拷贝数并用 GEQ(基因组当量)进行表示。

利用 Macherey Nagel 的“Nucleospin 96 virusTM” ARN 提取试剂盒,根据厂家的说明书提取 0.140 ml 猴子血清,然后将纯化后的 ARN 用 0.140 ml(0.090 ml, 然后 0.05 ml)的无 RNA 酶(RNase)的水进行洗提。为了避免重复的冷冻/解冻循环,在提取之后立刻对 5 µl 的所述 ARN 制品进行第一次定量。在 70°C 冷冻其余的体积。

除了“Qiagen QauntitectTM probes” RT-PCR 定量试剂盒(Qiagen)的组分之外,反应混合物在 25 µl 的总体积中还含有 10 皮摩尔的每种引物、4 皮摩尔的每种探针和 5 µl ARN。对于测试的 ARN 的情况,将 5 µl 的纯化制剂直接加入到该反应混合物中,而不用任何预先稀释步骤。将合成的 ARN 在无 RNA 酶(RNase)的水中以 1/10 进行稀释,平行地对 5 µl 中含有大约 10 至 10⁶ GEQ 的 7 个稀释度进行定量以获得标准曲线。

定量反应通过 Applied Biosystem 的 ABIPrism 700™ 设备通过使用以下程序来进行：50℃/30 分钟，95℃/15 分钟，然后 40 个 95℃/15 秒-60℃/60 秒的循环。

根据所述目标 PCR，在这个测试中的病毒 ARN 的定量的极限是 2.9 到 3.3 $\log_{10}$ GEQ/ml (800-2000 GEQ/ml; 4-10 GEQ/反应)(标准偏差： $\pm 0.3 \log_{10}$)。

通过分析 0.140 ml 的阴性猴血清样品(DO)(在其中已添加已知量的已用于免疫的传染性的病毒颗粒(CYD 或 VDV))，与上述分析平行地建立传染性滴度和病毒 ARN 量之间的相关性。所述对照血清已被制备为在 5 μ l 中包含大约 1 PFU 和大约 100 PFU 的两个稀释度(分别地 2.3 和 4.3 $\log_{10}$ PFU/ml)。

在这些实施例中使用的测试中，GEQ 和 PFU 之间的相关性如下：对于那些对 YF 或 CYD 为阳性(*sera positifs en YF ou CYDs*)的血清，GEQ/PFU 比率为 2.7 $\log_{10}$ (即：1 PFU=500 GEQ)。对于那些对 VDV1 或 VDV2 为阳性的血清，GEQ/PFU 比率为 2.5 $\log_{10}$ (即：1 PFU=320 GEQ)。

对于 qRT-PCR YF 和 CYDs，定量的极限是 <3.3 $\log_{10}$ GEQ/ml(即：<4 PFU/ml)，对于 qRT-PCR VDV1 和 VDV2，是 <2.9 $\log_{10}$ GEQ/ml(即：<2.5 PFU/ml)。

所使用的引物和探针在以下表 1 中给出，其中按每次分析的顺序列出了正义引物(*amorces sens*)和反义引物(*amorces anti-sens*)和探针。

表 1

序列		
Y F	YF-NS5 正义	5' GCACGGATGTAACAGACTGAAGA (23 bases)
	YF NS5 反义	5' CCAGGCCGAACCTGTCAT (18 bases)
	YF-NS5	5' Fam- CGACTGTGTGGTCCGCCCATC -Tamra (22 bases)
CYD1 特异	CYD1- 正义	5' CAT TGC AGT TGG CCT GGT AA (20 b)
	CYD1- 反义	5' CTT TGG CAA GAG AGA GCT CAA GT (23 b)
	CYD1-	5' Fam-CCG ATC AAG GAT GCG CCA TCA-Tamra (21 b)
CYD2 特异	CYD2 正义	5' GTG GGA GTC GTG ACG CTG TA (20 b)
	CYD2 反义	5' GTT GAT GGC GCA TCC TTG ATC (21 b)
	CYD2	5' Fam-TGG GAG TTA TGG TGG GCG CCG-Tamra (21 b)
CYD3 特异	CYD3 正义	5' AAA ACA CTT CCA TGT CAT TTT CAT G (25b)
	CYD3 反义	5' GTT GAT GGC GCA TCC TTG ATC (21 b)
	CYD3-	5'Fam-TGCCATAGGAATTATCACACTCTATCTGGGAGC-Tamra (33b)
CYD4 特异	CYD4 正义	5' CTT AGT ATT GTG GAT TGG CAC GAA (24 b)
	CYD4 反义	5' GCG CCA ACT GTG AAA CCT AGA (21 b)
	CYD4-	5'Fam-AGAAACACTTCAATGGCAATGACGTGCAT-Tamra (29 b)
VDV1 特异	VDV1-NS5 正义	5' TCG CAA CAG CCT TAA CAG C (19 b)
	VDV1-NS5 反义	5' ACT ATC TCC CTC CCA TCC TTC (21 b)
	VDV1-NS5	5' Fam-TTC ACA CCA CTT CCA C-MGB/NFQ (16 b)
VDV2 特异	VDV2-NS5 正义	5' AAT GAC AGA CAC GAC TCC (18 b)
	VDV2-NS5 反义	5' CCC AAA ACC TAC TAT CTT CAA C (22 b)
	VDV2-NS5	5' Fam-TGG AAG TCG GCA CGT GA-MGB/NFQ (17 b)

中和抗体的测量(血清中和测试)(SN50)

通常, 利用 PRNT50 测试(通过 PFU 数量的 50%的降低的中和测试)测量登革热抗体。由于这种测试是费力的和消耗大量材料, 我们开发了 SN50 测试, 其基于 DICC50 测试中测量的单位数的 50%的降低。

在 96 孔平板中, 将 0.120 ml 的每种去补体后的血清(sérum décomplémenté)添加到每孔 0.480 ml 稀释剂(ISCove 4% SVF)中。通过将 0.150 ml 血清转移到 0.450 ml 稀释剂中制备因数为 6(facteur 6)的系列稀释度。450 μ l 的 2.7 $\log_{10}$ DICC50/ml 的病毒稀释度添加到每孔中以获得 25 DICC50/孔。平板在 37°C 孵育 1 小时。然后将 0.1 ml 的每种稀释液分配到 96 孔平板的 6 个孔中, 在该平板中在实验开始前的 3 天已经以 8000 细胞/孔的密度、在 0.1 ml 的 ISCOVE 4% SVF 的培养基中接种(ensemencées)了 VERO 细胞。在 37°C 在存在 5% CO₂ 时孵育 6 天之后, 细胞在 4°C 用乙醇/丙酮(70/30)混合物固定 15 分钟, 然后在 PBS 中洗涤 3 次, 并在存在 0.05 ml 的 1/2000 稀释度的抗黄病毒单克隆抗体(mAb 4G2, 其从 ATCC H-B112 杂交瘤获得)时在 37°C 进行孵育 1 小时。

然后洗涤上述平板两次,在存在 0.05 ml 的 1/1000 稀释度的与碱性磷酸酶结合的抗小鼠 IgG 时在 37℃ 孵育 1 小时。裂解噬斑(plages de lyse)通过添加 0.05ml 的染色底物(substrate coloré): BCIP/NBT 进行显现。利用如以下定义的 Karber 公式计算中和抗体滴度:

$$\log_{10}SN50=d + f/N(X + N/2),$$

其中:

d 代表产生 100%中和的稀释度(即,6 个阴性复制子(réplicate),即,没有显示感染征兆的复制子)

f: 代表以 $\log_{10}$ 表示的稀释因数 (例如, 1:4 的稀释因数, $f=0.6$)

N: 代表复制子/稀释度的数目($N=6$)

X: 除了稀释度 d 之外, 没有显示感染征兆的孔的总数,
病毒检测的极限是 10 SN50(即 $1.0 \log_{10}SN50$)。

已用于中和的病毒毒株是 DEN1 16007、DEN2 16681、DEN3 16562 或 DEN4 1036 毒株。

对于所述对照样品, 重新滴定了起始的病毒稀释度。

在 SN50 测试中测量的中和滴度和通常在 PRNT50 测试中测量的中和滴度之间的相关性是: $\log_{10}PRNT50=\log_{10}SN50 + 0.2$

1.2 同时免疫的评估

对年龄和重量相当的两组 4 只猴子进行免疫(参见表 2)。

通过皮下途径、使用 23G1 针、使用 10^5 DICC₅₀ 每种血清型 CYD DEN 1-4(用于四价疫苗)和使用剂量 10^4 DICC₅₀ 单价 VDV-2 在臂部进行免疫。

表 2: 组分和免疫方案的组合

猴子		
组	免疫	
	第 0 天	第 56 天
组 1	VDV 2 单价	ChimeriVax 四价登革热 1234
组 2	四价登革热 1234	ChimeriVax 四价登革热 1234

在一次免疫(第 0+28 天)和两次免疫(第 56+28 天)之后获得的免疫原性结果在表 3 中被给出。
病毒血症结果在表 4 中被给出。

表 3: SN50 中和滴度 (单位 1/稀释度)

猴子			第 0+28 天				第 56+28 天					
ID	免疫		VDV 2	CYD 1234	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4
	第0 天	第56 天										
AM762	VDV 2	CYD 1234	10	501	-	10	63	1005	63	200		
AM839			-	802	-	-	80	1271	63	504		
AM905			20	158	-	-	318	1010	252	506		
AN011			13	1005	-	-	252	1271	319	1010		
几何平均值			11	503	<10	<10	142	1131	134	477		
AM496	CYD 1234	CYD 1234	50	-	16	32	100	40	80	252		
AM645			-	-	13	31	16	-	-	63		
AM766			-	-	-	32	20	-	-	80		
AM813			25	-	-	13	63	13	20	63		
几何平均值			13	<10	<10	25	38	11	14	95		

- : 滴度 < 10

表 4: 病毒血症分析 (单位: log10 GEQ/mL)

		初次免疫										加强									
组	猴子	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天	第8天	第9天	第10天	第58天	第59天	第60天	第61天	第62天	第63天	第64天	第65天	第66天		
1 初次 加强 VDV 2 CYD 1,2,3,4	AM762	<2.7	<2.7	<2.7	<2.7	4.77	4.89	4.84	4.47	<2.7	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	3.65	3.59	<3.2		
	AM839	5.11	4.51	4.19	4.19	4.56	3.69	<2.7	<2.7	<2.7	4.98	4.66	4.43	3.79	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2		
	AM905	<2.7	<2.7	<2.7	<2.7	4.16	4.31	4.16	3.50	4.14	<3.2	<3.2	3.08	3.42	3.39	<3.2	<3.2	4.08	4.32		
	AN011	<2.7	<2.7	3.75	4.29	4.35	4.22	3.51	<2.7	3.28	3.55	3.42	<3.2	<3.2	3.42	3.37	3.67	3.09	3.97		
2 初次 加强 CYD 1,2,3,4	AM496	4.22	3.36	3.74	4.15	3.44	<3.1	3.58	<3.1	<3.1	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2		
	AM645	4.21	3.61	2.82	3.51	3.65	3.24	<3.1	3.47	3.44	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2		
	AM766	3.97	3.06	3.38	4.19	3.80	3.73	<3.1	<3.1	<3.1	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2		
	AM813	4.81	4.60	3.17	<3.1	<3.1	<3.1	<3.1	<3.1	<3.1	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2		

CYD1
CYD4
VDV2

概括地，结果可以概述如下：

- 根据本发明的给药方案可以定性地和定量地提高使用包含两次相同的四价疫苗的方案获得的中和抗体反应。

- 与在 VDV2 单价初次免疫后进行的 CYD-1、2、3、4 免疫在所有猴子中诱导了提高水平的抗上述四种血清型的反应，这与包含 2 次四价疫苗免疫的方案相反。

- 如预期地，使用 VDV2 进行的初次免疫诱导了几乎专一地抗血清型 2 的反应，其在某些动物中具有低强度的抗血清型 1 和 4 的交叉反应性。

- 在初次免疫后观察到具有 VDV2 的病毒血症，其主要由 CYD-4 在第二次给药(b)后引起的(组 1)。在没接触过病毒的动物中，在四价疫苗的初次免疫引起的病毒血症中没有观察到明显不同(组 2)。因此可以得出结论由本发明提出的方案在第二次给药后不利于血清型 1、3 和 4 的病毒血症的出现。

上述实施例因此显示出根据本发明的免疫方法改善了登革热的疫苗病毒的免疫原性，而不损害后者的安全性。

在本申请中引用的所有公开物以其整体引入作为参考。

<110> Sanofi Pasteur

<120> 针对 4 种登革热血清型的免疫方法

<130> PM 0608

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 10735

<212> DNA

<213> 登革热病毒

<400> 1

agttgttagt ctacgtggac cgacaagaac agtttcgaat cggaagcttg cttaacgtag 60

ttctaacagt tttttattag agagcagatc tctgatgac aaccaacgaa aaaagacggg 120

tcgaccgtct ttcaatatgc tgaaacgcgc gagaaaccgc gtgtcaactg tttcacagtt 180

ggcgaagaga ttctcaaaag gattgctctc aggccaagga cccatgaaat tggatgatggc 240

tttcatagca ttcttaagat ttctagccat accccaaca gcaggaattt tggttagatg 300

gggtcattc aagaagaatg gagegattaa agtgttacgg ggtttcaaga gagaaatctc 360

aaacatgcta aacataatga acaggaggaa aagatccgtg accatgctcc ttatgctgct 420

gcccacagcc ctggcgttcc atctgacgac acgaggggga gagccgcata tgatagttag	480
caagcaggaa agaggaaagt cactttttgtt caagacctet gcagggtgtca acatgtgcac	540
cctcattgcg atggatttgg gagagtgtg tgaggacacg atgacctaca aatgcccccg	600
gatcactgag gcggaaccag atgacgttga ctgttggtgc aatgccacgg acacatgggt	660
gacctatgga acgtgctctc aaactggcga acaccgacga gacaaacgtt ccgtcgcatt	720
ggccccacac gtggggccttgc cctagaaac aagagccgaa acgtggatgt cctctgaagg	780
tgcttggaag cagatacaaa aagtagagac ttgggctctg agacatccag gattcacggt	840
gatagccctt tttctagcac atgcatagg aacatccatc acccagaaag ggatcatttt	900
cattttgctg atgctggtaa caccatctat ggccatgcga tgcgtgggaa taggcaacag	960
agacttcgtg gaaggactgt caggagcaac atgggtggat gtggtactgg agcatggaag	1020
ttgcgtcacc accatggcaa aaaacaaacc aacactggac attgaactct tgaagacgga	1080
ggtcacaaac cctgcagttc tgcgtaaatt gtgcattgaa gctaaaatat caaacaccac	1140
caccgattcg agatgtccaa cacaaggaga agccacactg gtggaagaac aagacgcgaa	1200
ctttgtgtgc cgacgaacgt tcgtggacag aggtctgggc aatggctgtg ggetattcgg	1260
aaaaggtagt ctaataacgt gtgccaagtt taagtgtgtg acaaaactag aaggaaagat	1320
agctcaatat gaaaacctaa aatattcagt gatagtcacc gtccacactg gagatcagca	1380

ccaggtggga aatgagacta cagaacatgg aacaactgca accataacac ctcaagctcc	1440
tacgtcggaa atacagctga cegactacgg aaccettaca ttagattgtt cacctaggac	1500
agggctagat tttaacgaga tgggtgttgc gacaatgaaa aagaaatcat ggcttgtcca	1560
caaacagtgg tttctagact taccactgcc ttggacctct ggggctttaa catcccaaga	1620
gacttggaac agacaagatt tactggtcac atttaagaca gctcatgcaa agaagcagga	1680
agtagtcgta ctaggatcac aagaaggagc aatgcacact gcgctgactg gagcgacaga	1740
aatccaaacg tcaggaacga caacaatttt cgcaggacac ctaaaatgca gactaaaaat	1800
ggacaaaacta actttaaaag ggatgtcata tgtgatgtgc acaggctcat tcaagttaga	1860
gaaagaagtg gctgagaccc agcatggaac tgttctggtg caggttaa atgaaggaac	1920
agacgcacca tgcaagattc ccttttcgac ccaagatgag aaaggagcaa ccagaatgg	1980
gagattaata acagccaacc ccatagtcac tgacaaagaa aaaccagtca atattgaggc	2040
agaaccaccc tttggtgaga gctacatcgt ggtaggagca ggtgaaaaag ctttgaaact	2100
aagctggttc aagaaaggaa gcagcatagg gaaaatgttt gaagcaactg cccgaggagc	2160
acgaaggatg gccattctgg gagacaccgc atgggacttc ggttctatag gaggagtgtt	2220
cacgtctatg ggaaaactgg tacaccaggt ttttggaact gcatatggag ttttgtttag	2280
cggagtttct tggaccatga aaataggaat agggattctg ctgacatggc taggattaaa	2340

ttcaaggaac acgtcccttt cggatgatgtg catcgagtt ggcattgtca cactgtacct	2400
aggagtcattg gttcaggcag attcgggatg tgtaatcaac tggaaaggca gagaacttaa	2460
atgtggaagc ggcatttttg tcactaatga agttcacact tggacagagc aatacaaatt	2520
ccaggctgac tcccccaaga gactatcagc agccattggg aaggcatggg aggagggtgt	2580
gtgtggaatc cgatcagcca ctggtctcga gaacatcatg tggaaacaaa tatcaaatga	2640
attgaaccac atcctacttg aaaatgacat gaaatttaca gtggctgtgg gagacgttag	2700
tggaatcttg gcccaaggaa aaaaaatgat taggccacaa cccatggaac acaaatactc	2760
gtggaaaagc tggggaaaag ctaaaatcat aggagcggat gtacagaaca ccaccttcat	2820
catcgacggc ccaaacaccc cagaatgcc tgacaatcaa agagcatgga atatttgga	2880
agtagaggac tatggatttg ggattttcac gacaaacata tggttgaaat tgcgtgactc	2940
ctacacccaa gtatgtgacc accggtgat gtcagctgcc attaaggaca gcaaggcagt	3000
ccatgctgac atgggggtact ggatagaaag tgaaaagaac gagacatgga agttggcgag	3060
agcctccttt atagaagtta agacatgcat ctggccaaaa tcccacactc tatggagcaa	3120
tggagttctg gaaagtgaat tgataattcc aaagatatat ggaggaccaa tatctcagca	3180
caactacaga ccaggatatt tcacacaaac agcagggcgg tggcacctag gcaagttgga	3240
actagatttc gatTTTTgtg aaggtaccac agttgttgtg gatgaacatt gtggaaatcg	3300

aggaccatct ctcagaacca caacagtcac aggaaagata atccatgaat ggtgctgcag	3360
atcttgtacg ctaccccccc tacgtttcaa aggggaagac ggggtgttggc acggcatgga	3420
aatcagacca gtgaaggaca aggaagagaa cctgggtcaag tcaatggctc ctgcagggtc	3480
aggagaagtg gacagctttt cactaggact gctatgcata tcaataatga ttgaagaagt	3540
gatgagatcc agatggagca aaaaaatgct gatgactgga acaatggctg tgttcctcct	3600
tcttataatg ggacaattga catggagtga tctgatcagg ttatgtatta tggttggagc	3660
caacgcttca gacaagatgg ggatgggaac aacgtaccta gctttaatgg ccactttcaa	3720
aatgagacca atgttcgccc tcgggtctatt atttcgcaga ctaacatcta gagaagttct	3780
tcttcttaca attggcttga gcctgggtggc atccgtggag ctaccaagtt ccctagagga	3840
gctgggggat ggacttgcaa taggcatcat gatgttgaaa ttattgactg attttcagtc	3900
acaccageta tgggtactc tgetatcctt gacatttatt aaaacaactt ttccattgca	3960
ctatgcatgg aagacaatgg ctatgggtact gtcaattgta tctctcttcc ctttatgcct	4020
gtccacgacc tctcaaaaaa caacatggct tccgggtgctg ttgggatctc ttggatgcaa	4080
accactaccc atgtttctta taacagaaaa caaaatctgg ggaaggaaga gttggccctt	4140
caatgaagga attatggctg ttggaatagt tagtattcta ctaagttcac ttttaaaaaa	4200
tgatgtgccc ctageccggcc cattaatagc tggaggcatg ctaatagcat gttatgtcat	4260

atccggaagc tcagctgatt tatcactgga gaaagcggct gaggtctcct gggaggaaga	4320
agcagaacac tcaggcgcct cacacaacat actagtagag gtccaagatg atggaacat	4380
gaagataaaa gatgaagaga gagatgacac gctcaccatt ctccttaaag caactctgct	4440
ggcagtctca ggggtgtacc caatgtcaat accagegacc ctttttgtgt ggtatttttg	4500
gcagaaaaag aaacagagat caggagtgc atgggacaca cccagecccc cagaagtga	4560
aagagcagtt cttgatgatg gcatctatag aattttgcaa agaggactgt tgggcaggtc	4620
ccaagtagga gtaggagttt tccaagaagg cgtgttcac acaatgtggc acgtcactag	4680
gggagctgtc ctcatgtatc aaggaaaaag gctggaacca agctgggcca gtgtcaaaaa	4740
agacttgatc tcatatggag gaggttggag gttccaagga tcctggaaca cgggagaaga	4800
agtacaggtg attgctgttg aaccgggaaa aaaccccaaa aatgtacaaa caacgccggg	4860
tacettcaag acccctgaag gcgaagttgg agccatagcc ttagacttta aacctggcac	4920
atctggatct cccatcgtaa acagagaggg aaaaatagta ggtctttatg gaaatggagt	4980
ggtgacaaca agcggaaactt acgttagtgc catagctcaa gctaaggcat cacaagaagg	5040
gcctctacca gagattgagg acaaggtgtt taggaaaaga aacttaaca taatggacct	5100
acatccagga tcgggaaaaa caagaagata ccttcagcc atagtccgtg aggccataaa	5160
aaggaagctg cgcacgctaa tcctagctcc cacaagagtt gtcgcttctg aaatggcaga	5220

ggcactcaag ggagtgccaa taaggtatca gacaacagca gtgaagagtg aacacacagg	5280
aaaggagata gttgacctta tgtgccacgc cactttcacc atgcgcctcc tgtctcccg	5340
gagagtcccc aattataaca tgattatcat ggatgaagca cacttcaccg atccagccag	5400
catagcagcc agagggtaca tctcaaccgc agtgggtatg ggtgaagcag ctgcgatctt	5460
tatgacagcc actccccag gatcgggtga ggcctttcca cagagcaatg caattatcca	5520
agatgaggaa agagacattc ctgagagatc atggaaactca ggctatgact ggatcactga	5580
ttttccaggt aaaacagtct ggtttggtcc aagcatcaaa tcaggaaatg acattgccaa	5640
ctgtttaaga aaaaacggga aacgggtgat ccaattgagc agaaaaacct ttgacactga	5700
gtaccagaaa acaaaaaaca acgactggga ctatgtcgtc acaacagaca ttcccgaaat	5760
gggagcaaat ttccgggcgc acagggtaat agaccaagg cgggtgtctga aaccggtaat	5820
actaaaagat ggtccagagc gcgtcattct agccggaccg atgccagtga ctgtggccag	5880
tgccgcccag aggagaggaa gaattggaag gaacaaaaac aaggaaggtg atcagtatat	5940
ttacatggga cagcctttaa aaaatgatga ggaccacgct cattggacag aagcaaagat	6000
gtccttgac aatataaaca caccagaagg gattatccca gccctctttg agccggagag	6060
agaaaagagt gcagctatag acggggaata cagactgcgg ggtgaagcaa ggaaaacgtt	6120
cgtggagctc atgagaagag gggatctacc agtctggcta tctacaaag ttgcctcaga	6180

aggcttccag tactccgaca gaaggtggtg cttcgatggg gaaaggaaca accaggtgtt	6240
ggaggagaac atggacgtgg agatctggac aaaagaagga gaaagaaaga aactacgacc	6300
tcgctggttg gacgccagaa catactctga cccactggct ctgcgcgagt ttaaagagtt	6360
tgcagcagga agaagaagcg tctcaggtga cctaataatta gaaataggga aacttccaca	6420
acatttgacg caaagggecc agaatgcttt ggacaacttg gtcatgttgc acaattccga	6480
acaaggagga aaagcctata gacatgctat ggaagaactg ccagacacaa tagaaacgtt	6540
gatgctccta gccttgatag ctgtgttgac tgggtggagt acgctgttct tcctatcagg	6600
aagaggtcta ggaaaaacat ctatcggtt actctgcgtg atggcctcaa gcgcactgtt	6660
atggatggcc agtgtggagc cccattggat agcggcctcc atcatactgg agttctttct	6720
gatggtactg cttattccag agccagacag acagcgcact ccacaggaca accagctagc	6780
atatgtggtg ataggtctgt tattegtgat attgacagtg gcagccaatg agatgggatt	6840
attggaaacc acaaagaaag acctggggat tggccatgta gctgctgaaa accaccacca	6900
tgctacaatg ctggacgtag acctacatcc agcttcagcc tggaccctct atgcagtggc	6960
cacaacaatc atcactccta tgatgagaca cacaattgaa aacacaacgg caaatatttc	7020
cctgacagcc atcgcaaacc aagcagctat attgatggga cttgacaagg gatggccaat	7080
atcgaagatg gacataggag ttccacttct cgccttgggg tgctattccc aagtgaatcc	7140

gctgacactg atagcggcag tattgatgct agtagctcat tacgccataa ttggacctgg	7200
actgcaagca aaagctacta gagaagctca aaaaagaaca gcggttgga taatgaaaaa	7260
tccaactgtc gacgggattg ttgcaataga cttagatccc gtggtttacg atgcaaaatt	7320
tgaaaaacag ctaggccaaa taatgttggt gatactttgc acatcacaga ttcttttgat	7380
gcggactaca tgggccttgt gtgaatccat cacattggct actggacctc tgaccactct	7440
ttgggaggga tctccaggaa aattctggaa caccacaata gcggtatcca tggcaaacad	7500
tttcaggggg agttatctag caggagcagg tctggccttc tcattaatga aatctctagg	7560
aggaggtagg agaggcacgg gagcccaagg gaaacactg ggagaaaaat ggaaaagaca	7620
actaaacca ctgagcaagt cagaattcaa tacttacaag aggagtggga ttatggaggt	7680
ggatagatcc gaagccaaag aggactgaa aagaggagaa acaaccaaac acgcagtatc	7740
gagaggaacg gccaaactga ggtggttcgt ggagaggaac cttgtgaaac cagaaggga	7800
agtcatagac ctcggttgtg gaagagggtg ctggtcatat tattgcgctg ggtgaagaa	7860
agtcacagaa gtgaaaggat acacaaaagg aggacctgga catgaggaac caatcccaat	7920
ggcgacctat ggatggaacc tagtaaggct gcaactccga aaagatgtat tttttatacc	7980
acctgagaaa tgtgacaccc ttttgtgtga tattggtgag tcctctccga acccaactat	8040
agaggaagga agaacgttac gtgttctgaa aatggtggaa ccatggctca gaggaacca	8100

at tt tgcata aaa attctaa atccctatat gccgagcgtg gtagaaactc tggaacaaat	8160
gcaaagaaaa catggaggaa tgctagtgcg aaacccactc tcaagaaatt ccacccatga	8220
aatgtactgg gtttcatgtg gaacaggaaa cattgtgtca gcagtaaaca tgacatctag	8280
aatgttgcta aatcggttca caatggctca caggaagcca acatatgaaa gagacgtgga	8340
cttaggcgct ggaacaagac atgtggcagt agaaccagag gtagccaacc tagatatcat	8400
tggccagagg atagagaata taaaaaatga acataagtca acatggcatt atgatgagga	8460
caatccatac aaaacatggg cctatcatgg atcatatgag gttaagccat caggatcggc	8520
ctcatccatg gtcaatggcg tggtagatt gtcacaaaa ccatgggatg ttatcccat	8580
ggtcacacaa atagccatga ctgataccac accctttgga caacagaggg tgtttaaaga	8640
gaaagttgac acgcgcacac caaaagcaaa acgtggcaca gcacaaatta tggaagtgac	8700
agccaggtgg ttatggggtt tcctttctag aaacaaaaaa cccagaattt gcacaagaga	8760
ggagtttaca agaaaagtta ggtcaaacgc agctattgga gcagtgttcg ttgatgaaaa	8820
tcaatggaac tcggcaaaag aagcagtgga agacgaacgg ttctgggaac ttgtccacag	8880
agagagggag cttcataaac aggggaaatg tgccacgtgt gtctacaata tgatggggaa	8940
gagagagaaa aaattaggag agttcggaaa ggcaaaagga agtcgtgcaa tatggtacat	9000
gtggttggga gcacgcttcc tagagtttga agcccttggg ttcatgaatg aagatcactg	9060

gttcagtaga gagaattcac tcagtggagt ggaaggagaa ggactccaca aacttggata	9120
catactcaga gacatatcaa ggattccagg ggggaacatg tatgcagatg acacagccgg	9180
atgggacaca agaataacag aggatgatct ccagaatgag gctaaaatca ctgacatcat	9240
ggagcccgaa catgccctgc tggctacgtc aatctttaag ctgacctacc aaaataaggt	9300
ggtaagggtg cagagaccag caaaaaatgg aaccgtgatg gatgttatat ccagacgtga	9360
ccagagaggc agtggacagg ttggaactta tggcttaaac actttcacca acatggaggc	9420
ccaactgata agacaaatgg agtctgaggg aatcttttta cccagcgaat tggaaacccc	9480
aaatctagcc ggaagagttc tcgactgggt ggaaaaatat ggtgtcgaaa ggctgaaaag	9540
aatggcaatc agcggagatg actgtgtggt gaaaccaatt gatgacaggt tcgcaacagc	9600
cttaacagct ttgaatgaca tgggaaaagt aagaaaagac ataccacaat gggaaccttc	9660
aaaaggatgg aatgattggc aacaagtgc tttctgttca caccatttc accagctaat	9720
tatgaaggat gggagggaga tagtgggtgcc atgccgcaac caagatgaac ttgtggggag	9780
ggccagagta tcacaaggcg ccggatggag cctgagagaa accgcatgcc taggcaagtc	9840
atatgcacaa atgtggcagc tgatgtatct ccacaggaga gacctgagac tggcggctaa	9900
cgtatttgt tcagccgttc cagttgattg ggtcccaacc agccgcacca cctggtcgat	9960
ccatgccccat caccaatgga tgacaacaga agacatgtta tcagtatgga atagggtctg	10020

gatagaggaa aacccatgga tggaggataa gactcatgtg tccagttggg aagaagttcc 10080

atacctagga aagagggaag atcagtgggtg tggatccctg ataggetttaa cagcaagggc 10140

cacctgggcc actaatatac aagtggccat aaaccaagtg agaaggctca ttgggaatga 10200

gaattatcta gattacatga catcaatgaa gagattcaag aatgagagtg atcccgaagg 10260

ggcactctgg taagtcaaca cattcacaaa ataaaggaaa ataaaaaatc aaatgaggca 10320

agaagtcagg ccagattaag ccatagtacg gtaagagcta tgctgcctgt gagccccgtc 10380

caaggacgta aaatgaagtc aggccgaaag ccacggtttg agcaagccgt gctgcctgtg 10440

gtcccatcgt ggggatgtaa aaacccggga ggctgcaacc catggaagct gtacgcatgg 10500

ggtagcagac tagtggttag aggagacccc tccaagaca caacgcagca gcggggccca 10560

acaccagggg aagctgtacc ctggtggtaa ggactagagg ttagaggaga cccccgcgt 10620

aacaataaac agcatattga cgctgggaga gaccagagat cctgctgtct ctacagcate 10680

attccaggca cagaacgcca gaaaatggaa tgggtgctgtt gaatcaacag gttct 10735

- <210> 2
- <211> 10723
- <212> DNA
- <213> 登革热病毒

<400> 2

agttgttagt ctacgtggac cgacaaagac agattctttg agggagctaa gctcaatgta 60

gttctaacag ttttttaatt agagagcaga tctctgatga ataaccaacg gaaaaaggcg	120
aaaaacacgc ctttcaatat gctgaaacgc gagagaaacc gcgtgtcgac tgtgcaacag	180
ctgacaaaga gattctcact tggaatgctg cagggacgag gaccattaaa actgttcatg	240
gccctgggtgg cgttccttcg tttcctaaca atcccaccaa cagcagggat attgaagaga	300
tggggaacaa ttaaaaaatc aaaagctatt aatgttttga gagggttcag gaaagagatt	360
ggaaggatgc tgaacatctt gaataggaga cgcagatctg caggcatgat cattatgctg	420
attccaacag tgatggcggt ccatttaacc acacgtaacg gagaaccaca catgatcgtc	480
agcagacaag agaaaggga aagtcttctg tttaaacag aggttggcgt gaacatgtgt	540
acctcatgg ccatggacct tggatgaattg tgtgaagaca caatcacgta caagtgtccc	600
cttctcaggc agaatgagcc agaagacata gactgttggg gcaactctac gtccacgtgg	660
gtaacttatg ggacgtgtac caccatggga gaacatagaa gagaaaaaag atcagtggca	720
ctcgttccac atgtgcgaat gggactggag acacgaactg aaacatggat gtcacagaa	780
ggggcctgga aacatgtcca gagaattgaa acttggatct tgagacatcc aggttcacc	840
atgatggcag caatcctggc atacaccata ggaacgacac atttcaaag agccctgatt	900
ttcatcttac tgacagctgt cactccttca atgacaatgc gttgcatagg aatgtcaaat	960
agagactttg tggaaggggt ttcaggagga agctgggttg acatagtctt agaacatgga	1020

agctgtgtga cgacgatggc aaaaaacaaa ccaacattgg attttgaact gataaaaaaca	1080
gaagccaaac agcctgccac cctaaggaag tactgtatag aggcaaagct aaccaacaca	1140
acaacagaat ctgctgccc aacacaaggg gaaccagcc taaatgaaga gcaggacaaa	1200
aggttcgtct gcaaacactc catggtagac agaggatggg gaaatggatg tggactattt	1260
ggaaaggag gcattgtgac ctgtgctatg ttcagatgca aaaagaacat ggaaggaaaa	1320
gttgtgcaac cagaaaactt ggaatacacc atttgtataa cacctcactc aggggaagag	1380
catgcagtcg gaaatgacac aggaaaacat ggcaaggaaa tcaaaataac accacagagt	1440
tccatcacag aagcagaatt gacaggttat ggcactgtca caatggagtg ctctccaaga	1500
acgggcctcg acttcaatga gatggtgttg ctgcagatgg aaaataaagc ttggctggtg	1560
cacaggcaat ggttcctaga cctgccgtta ccatggttgc ccggagcgga cacacaagag	1620
tcaaattgga tacagaagga gacattggtc actttcaaaa atcccatgc gaagaaacag	1680
gatgttggtg ttttaggatc ccaagaaggg gccatgcaca cagcacttac aggggccaca	1740
gaaatccaaa tgtcatcagg aaacttactc ttcacaggac atctcaagtg caggctgaga	1800
atggacaagc tacagctcaa aggaatgtca tactctatgt gcacaggaaa gtttaaagtt	1860
gtgaaggaaa tagcagaaac acaacatgga acaatagtta tcagagtgca atatgaaggg	1920
gacggctctc catgcaagat cccctttgag ataatggatt tggaaaaaag acatgtctta	1980

ggtcgctga ttacagtcaa cccaattgtg acagaaaaag atagcccagt caacatagaa	2040
gcagaacctc catttggaga cagctacatc atcataggag tagagccggg acaactgaag	2100
ctcaactggg ttaagaaagg aagttctatc ggccaaatgt ttgagacaac aatgaggggg	2160
gcgaagagaa tggccatttt aggtgacaca gcctgggatt ttggatcctt gggaggagtg	2220
tttacatcta taggaaaggc tctccaccaa gtctttggag caatctatgg agctgccttc	2280
agtggggttt catggactat gaaaatectc ataggagtca ttatcacatg gataggaatg	2340
aattcacgca gcacctcact gtctgtgaca ctagtattgg tgggaattgt gacctgtat	2400
ttgggagtca tgggtgcaggc cgatagtggg tgcgttgta gctggaaaaa caaagaactg	2460
aatgtggca gtgggatttt catcacagac aacgtgcaca catggacaga acaatacaaa	2520
ttccaaccag aatccccttc aaaactagct tcagctatcc agaaagccca tgaagaggac	2580
atttgtggaa tccgctcagt aacaagactg gagaatctga tgtggaaaca aataacacca	2640
gaattgaatc acattctatc agaaaatgag gtgaagttaa ctattatgac aggagacatc	2700
aaaggaatca tgcaggcagg aaaacgatct ctgcggcctc agcccactga gctgaagtat	2760
tcatggaaaa catggggcaa agcaaaaatg ctctctacag agtctcataa ccagaccttt	2820
ctcattgatg gccccgaaac agcagaatgc cccaacacaa atagagcttg gaattcgttg	2880
gaagttgaag actatggctt tggagtattc accaccaata tatggctaaa attgaaagaa	2940

aaacaggatg tattctgcga ctcaaaactc atgtcagcgg ccataaaaga caacagagcc	3000
gtccatgccg atatgggtta ttggatagaa agtgcactca atgacacatg gaagatagag	3060
aaagcctctt tcattgaagt taaaaactgc cactggccaa aatcacacac cctctggage	3120
aatggagtgc tagaaagtga gatgataatt ccaaagaatc tcgctggacc agtgtctcaa	3180
cacaactata gaccaggeta ccatacacia ataacaggac catggcatct aggtaagctt	3240
gagatggact ttgatttctg tgatggaaca acagtggtag tgactgagga ctgcggaaat	3300
agaggaccct ctttgagaac aaccactgcc tctggaaaac tcataacaga atggtgctgc	3360
cgatcttgca cattaccacc gctaagatac agaggtgagg atgggtgctg gtacgggatg	3420
gaaatcagac cattgaagga gaaagaagag aatttggta actccttggc cacagctgga	3480
catgggcagg tcgacaactt ttcactagga gtcttgggaa tggcattgtt cctggaggaa	3540
atgcttagga cccgagtagg aacgaaacat gcaatactac tagttgcagt ttcttttgtg	3600
acattgatca cagggaacat gtcctttaga gacctgggaa gagtgatggt tatggtaggc	3660
gccactatga cggatgacat aggtatgggc gtgacttate ttgccctact agcagccttc	3720
aaagtcagac caacttttgc agctggacta ctcttgagaa agctgacctc caaggaattg	3780
atgatgacta ctataggaat tgtactcttc tcccagagca ccataccaga gaccattctt	3840
gagttgactg atgcgttagc cttaggeatg atggctctca aaatggtgag aaatatggaa	3900

aagtatcaat tggcagtgac tatcatggct atcttgtgcg tcccaaacgc agtgatatta	3960
caaaacgcat ggaaagtgag ttgcacaata ttggcagtgg tgtccgtttc cccactgttc	4020
ttaacatcct cacagcaaaa aacagattgg ataccattag cattgacgat caaaggcttc	4080
aatccaacag ctatTTTTTct aacaaccctc tcaagaacca gcaagaaaag gagctggcca	4140
ttaaattgagg ctatcatggc agtcgggatg gtgagcattt tagccagttc tctcctaaaa	4200
aatgatattc ccatgacagg accattagtg gctggagggc tctcactgt gtgctacgtg	4260
ctcactggac gatcggccga ttTggaactg gagagagcag ccgatgtcaa atgggaagac	4320
caggcagaga tatcaggaag cagtccaate ctgtcaataa caatatcaga agatgggtage	4380
atgtcgataa aaaatgaaga ggaagaacaa aactgacca tactcattag aacaggattg	4440
ctggtgatct caggactttt tctgtatca ataccaatca cggcagcagc atggtacctg	4500
tgggaagtga agaaacaacg ggccggagta ttgtgggatg ttcttcacc cccacccatg	4560
ggaaaggctg aactggaaga tggagcctat agaattaage aaaaagggat tcttgatat	4620
tccagatcg gagccggagt ttacaaagaa ggaacattcc atacaatgtg gcatgtcaca	4680
cgtggcgtg ttctaatgca taaaggaaag aggattgaac caacatgggc ggacgtcaag	4740
aaagacctaa tatcatatgg aggaggctgg aagttagaag gagaatggaa ggaaggagaa	4800
gaagtccagg tattggcact ggagcctgga aaaaatccaa gagccgtcca aacgaaacct	4860

ggtcttttca aaaccaacgc cggaacaata ggtgctgtat ctctggactt ttctcctgga	4920
acgtcaggat ctccaattat cgacaaaaaa ggaaaagttg tgggtcttta tggtaatggt	4980
gttgttacaa ggagtggagc atatgtgagt gctatagccc agactgaaaa aagcattgaa	5040
gacaaccag agatcgaaga tcacattttc cgaaagagaa gactgaccat catggacctc	5100
caccaggag cgggaaagac gaagagatac cttccggcca tagtcagaga agctataaaa	5160
cggggtttga gaacattaat cttggecccc actagagttg tggcagctga aatggaggaa	5220
gcccttagag gacttccaat aagataccag accccagcca tcagagctga gcacaccggg	5280
cgggagattg tggacctaat gtgtcatgcc acatttacca tgaggctgct atcaccagtt	5340
agagtgccaa actacaacct gattatcatg gacgaagccc atttcacaga cccagcaagt	5400
atagcagcta gaggatacat ctcaactcga gtggagatgg gtgaggcagc tgggattttt	5460
atgacagcca ctccccggg aagcagagac ccatttcctc agagcaatgc accaatcata	5520
gatgaagaaa gagaaatccc tgaacgctcg tggaattccg gacatgaatg ggtaacggat	5580
tttaaaggga agactgtttg gttcgttcca agtataaaaag caggaaatga tatagcagct	5640
tgctgagga aaaatggaaa gaaagtata caactcagta ggaagacctt tgattctgag	5700
tatgtcaaga ctagaaccaa tgattgggac ttcgtggta caactgacat ttcagaaatg	5760
ggtgccaaatt tcaaggtga gagggttata gacccagac gctgcatgaa accagtcata	5820

ctaacagatg gtgaagagcg ggtgattctg gcaggaccta tgccagtgac ccactctagt	5880
gcagcacaaa gaagaggag aataggaaga aatccaaaa atgagaatga ccagtacata	5940
tacatggggg aacctctgga aaatgatgaa gactgtgcac actggaaaga agctaaaatg	6000
ctcctagata acatcaacac gccagaagga atcattccta gcatgttcga accagagcgt	6060
gaaaagggtg atgccattga tggcgaatac cgcttgagag gagaagcaag gaaaaccttt	6120
gtagacttaa tgagaagagg agacctacca gtctgggttg cctacagagt ggcagctgaa	6180
ggcatcaact acgcagacag aagggtggtg tttgatggag tcaagaacaa ccaaatecta	6240
gaagaaaacg tggaagttga aatctggaca aaagaagggg aaaggaagaa attgaaaccc	6300
agatgggttg atgctaggat ctattctgac ccactggcgc taaaagaatt taaggaattt	6360
gcagccggaa gaaagtctct gacctgaac ctaatcacag aaatgggtag gctcccaacc	6420
ttcatgactc agaaggcaag agacgcactg gacaacttag cagtgtgca cacggctgag	6480
gcaggtggaa gggcgtacaa ccatgctctc agtgaactgc cggagacct ggagacattg	6540
cttttactga cacttctggc tacagtcacg ggagggatct ttttattctt gatgagcgca	6600
aggggcatag ggaagatgac cctgggaatg tgctgcataa tcacggctag catcctccta	6660
tggtacgcac aaatacagcc aacttgata gcagettcaa taatactgga gttttttctc	6720
atagttttgc ttattccaga acctgaaaa cagagaacac cccaagacaa ccaactgacc	6780

tacgttgtea tagccatcct cacagtgggtg gccgcaacca tggcaaacga gatgggtttc	6840
ctagaaaaaa cgaagaaaga tctcggattg ggaagcattg caaccagca acccgagagc	6900
aacatcctgg acatagatct acgtcctgca tcagcatgga cgctgtatgc cgtggccaca	6960
acatttgtaa caccaatggt gagacatagc attgaaaatt cctcagtga tgtgtcccta	7020
acagctatag ccaaccaagc cacagtgtta atgggtctcg ggaaaggatg gccattgtca	7080
aagatggaca tcggagttec cttctcggc attggatgct actcacaagt caaccccata	7140
actctcacag cagctctttt cttattggta gcacattatg ccatcatagg gccaggactc	7200
caagcaaaag caaccagaga agctcagaaa agagcagcgg cgggcatcat gaaaaacca	7260
actgtcgatg gaataacagt gattgacct gateccaatac cttatgatcc aaagtttgaa	7320
aagcagttgg gacaagtaat gctcctagtc ctctgcgtga ctcaagtatt gatgatgagg	7380
actacatggg ctctgtgtga ggctttaacc ttagctaccg ggcccatctc cacattgtgg	7440
gaaggaaatc caggagagtt ttggaacaat accattgcgg tgtcaatggc taacattttt	7500
agagggagtt acttgccgg agctggactt ctcttttcta ttatgaagaa cacaaccaac	7560
acaagaaggg gaactggcaa cataggagag acgcttgag agaaatggaa aagccgattg	7620
aacgcattgg gaaaaagtga attccagatc tacaagaaaa gtggaatcca ggaagtggat	7680
agaaccttag caaaagaagg cattaaaaga ggagaaacgg accatcacgc tgtgtcgcga	7740

ggctcagcaa aactgagatg gttcgttgag agaaacatgg tcacaccaga agggaaagta	7800
gtggacctcg gttgtggcag aggaggctgg tcatactatt gtggaggact aaagaatgta	7860
agagaagtca aaggcctaac aaaaggagga ccaggacacg aagaacccat ccccatgtca	7920
acatatgggt ggaatctagt gcgtcttcaa agtggagttg acgttttctt catcccgcca	7980
gaaaagtgtg acacattatt gtgtgacata ggggagtcac caccaaacc cactgtggaa	8040
gcaggacgaa cactcagagt ccttaactta gtagaaaatt ggttgaacaa caacactcaa	8100
ttttgcataa aggttctcaa cccatatatg cctcagtcac tagaaaaaat ggaagcacta	8160
caaaggaaat atggaggagc cttagttagg aatccactct caccgaaact caccatgag	8220
atgtactggg tatccaatgc ttccgggaac atagtgtcat cagtgaacat gatttcaagg	8280
atgttgatca acagatttac aatgagatac aagaaagcca cttacgagcc ggatgttgac	8340
ctcgggaagc gaaccgtaa catcgggatt gaaagtgaga taccaaacct agatataatt	8400
gggaaaagaa tagaaaaaat aaagcaagag catgaaacat catggcacta tgaccaagac	8460
caccataca aaacgtgggc ataccatggt agctatgaaa caaacagac tggatcagca	8520
tcatccatgg tcaacggagt ggtcaggctg ctgacaaaac cttgggacgt tgtcccatg	8580
gtgacacaga tggcaatgac agacacgact ccatttggac aacagcgcgt ttttaaagag	8640
aaagtggaca cgagaaccca agaaccgaaa gaaggcacga agaaactaat gaaaataaca	8700

gcagagtggc ttggaaga attaggaag aaaaagacac ccaggatgtg caccagagaa	8760
gaattcacia gaaaggtgag aagcaatgca gccttggggg ccatattcac tgatgagaac	8820
aagtggaagt cggcacgtga ggctgttgaa gatagtaggt ttgggagct ggttgacaag	8880
gaaaggaatc tccatcttga aggaaagtgt gaaacatgtg tgtacaacat gatgggaaaa	8940
agagagaaga agctagggga attcggcaag gcaaaaggca gcagagccat atggtacatg	9000
tgcttggag cacgcttctt agagtttgaa gccctaggat tcttaaatga agatcactgg	9060
ttctccagag agaactccct gagggtgag gaaggagaag ggctgcacia gctaggttac	9120
attctaagag acgtgagcaa gaaagaggga ggagcaatgt atgccgatga caccgcagga	9180
tgggatacaa aaatcacact agaagacctt aaaaatgaag agatggtaac aaaccacatg	9240
gaaggagaac acaagaaact agccgaggcc attttcaaac taacgtacca aaacaagggtg	9300
gtgcgtgtgc aaagaccaac accaagaggc acagtaatgg acatcatatc gagaagagac	9360
caaagaggta gtggacaagt tggcacctat ggactcaata ctttcaccaa tatggaagcc	9420
caactaatca gacagatgga gggagaagga gtctttaaaa gcattcagca cctaacaatc	9480
acagaagaaa tcgctgtgca aaactgggtt gcaagagtgg ggcgcgaaag gttatcaaga	9540
atggccatca gtggagatga ttgtgttgtg aaacctttag atgacaggtt cgcaagcgt	9600
ttaacagctc taaatgacat gggaaagatt aggaaagaca tacaacaatg ggaaccttca	9660

agaggatgga atgattggac acaagtgecc ttctgttcac accatttcca tgagttaatc 9720
 atgaaagacg gtcgcgtact cgttgttcca tgtagaaacc aagatgaact gattggcaga 9780
 gcccgaatct cccaaggagc aggggtggtct ttgcgggaga cggcctgttt ggggaagtct 9840
 tacgccc aaa tgtggagctt gatgtacttc cacagacgcg acctcaggt ggcggcaaat 9900
 gctatttget cggcagtacc atcacattgg gttccaacaa gtcgaacaac ctggtecata 9960
 catgctaaac atgaatggat gacaacggaa gacatgctga cagtctggaa cagggtgtgg 10020
 attcaagaaa acctatggat ggaagacaaa actccagtgg aaacatggga ggaaatccca 10080
 tacttgggga aaagagaaga ccaatggtgc ggctcattga ttgggttaac aagcagggcc 10140
 acctgggcaa agaacatcca agcagcaata aatcaagtta gatcccttat aggcaatgaa 10200
 gaatacacag attacatgcc atccatgaaa agattcagaa gagaagagga agaagcagga 10260
 gttctgtggt agaaagcaaa actaacatga aacaaggcta gaagtcaggt cggattaagc 10320
 catagtaagg aaaaaactat gctacctgtg agccccgtcc aaggacgtta aaagaagtca 10380
 ggccatcata aatgcatag cttgagtaaa ctatgcagcc tgtagctcca cctgagaagg 10440
 tgtaaaaaat ccgggaggcc acaaaccatg gaagctgtac gcatggcgta gtggactagc 10500
 ggtagggga gacccctccc ttacaaatcg cagcaacaat gggggcccaa ggcgagatga 10560
 agctgtagtc tcgctggaag gactagaggt tagaggagac cccccgaaa caaaaaacag 10620

catattgacg ctgggaaaga ccagagatcc tgctgtctcc tcagcatcat tccaggcaca 10680

gaacgccaga aaatggaatg gtgctgttga atcaacaggt tct 10723