

發明專利說明書

公告本

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：96/43/13

Co7k 14/18 2006.01)

※ 申請日期：96.11.14

C12N 7/04 2006.01)

※IPC 分類：A61K³⁹/12 2006.01)

C12R 1/43 2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

針對 4 個登革熱血清型的免疫方法

METHOD OF IMMUNIZATION AGAINST THE 4 SEROTYPES OF
DENGUE FEVER

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

法商賽諾菲巴斯德公司

SANOFI PASTEUR

代表人：(中文/英文)

納勒里 史考菲爾

SCHAEFFER, NATHALIE

住居所或營業所地址：(中文/英文)

法國里昂市龐特巴斯德大道2號

2, AVENUE PONT PASTEUR - F 69007 LYON, FRANCE

國 籍：(中文/英文)

法國 FRANCE

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 布魯諾 蓋
GUY, BRUNO
2. 費洛尼格 巴本
BARBAN, VERONIQUE
3. 雷米 佛瑞特
FORRAT, REMI
4. 琴 連
LANG, JEAN

國 籍：(中文/英文)

1. 法國 FRANCE
2. 法國 FRANCE
3. 法國 FRANCE
4. 法國 FRANCE

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 法國；2006年12月01日；0655255

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明係關於在患者體內誘發針對 4 種登革熱血清型之保護之方法，其包含：

(a)投與一單價疫苗，該單價疫苗包含登革熱第一血清型之疫苗病毒，及

(b)投與一四價疫苗，該四價疫苗包含登革熱四個血清型之疫苗病毒，

其中投與(b)係在投與(a)之後至少 30 天與不超過 12 個月之間進行。

六、英文發明摘要：

The invention relates to a method for inducing protection against the 4 serotypes of dengue fever in a patient, comprising:

(a)the administration of a monovalent vaccine comprising a vaccinal virus of a first serotype of dengue fever, and

(b)the administration of a tetravalent vaccine comprising vaccinal viruses of the four serotypes of dengue fever,

in which administration (b) is made between at least 30 days and not more than 12 months following the first administration (a).

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於在患者體內誘發針對4種登革熱血清型之保護之方法，其包含：

(a)包含第一登革熱血清型之疫苗病毒的單價疫苗之第一投藥，

(b)包含四個登革熱血清型之疫苗病毒的四價疫苗之第二投藥，且

其中第二投藥(b)係在第一投藥(a)後至少30天與不超過12個月之間進行。

【先前技術】

登革熱係由血清型類似但抗原觀點不同之黃病毒屬(flavivirus genus)的四種病毒引起(Gübler等人，1988, in: Epidemiology of arthropod-borne viral disease. Monath TPM編，Boca Raton (FL): CRC Press: 223-60；Kautner等人，1997, J. of Pediatrics, 131: 516-524；Rigau-Pérez等人，1998, Lancet, 352: 971-977；Vaughn等人，1997, J. Infect. Dis., 176: 322-30)。登革熱血清型感染可產生非特异性病毒症候群至嚴重致命性出血疾病範圍之臨床疾病。蚊子叮咬後之登革熱潛伏期為約4天(3至14天)。登革熱特徵為兩相發熱、頭疼、身體各部分疼痛、虛脫、出疹及淋巴腺病(Kautner等人，1997, J. of Pediatrics, 131: 516-524；Rigau-Pérez等人，1998, Lancet, 352: 971-977)。病毒血症期與發熱期相同(Vaughn等人，1997, J. Infect. Dis.,

176: 322-30)。登革熱之治癒在7至10天後完成，但常見長期衰弱。常常發生白血球數及血小板數減少。

出血性登革熱為嚴重發熱疾病，其特徵為體內穩態異常及血管滲透性增加，此可導致低血容量症及低血壓(具有休克症候群之登革熱)，常併發嚴重內部出血。出血性登革熱若無治療則死亡率可達到10%，但在多數經歷治療之狀況下 $\leq 1\%$ (WHO Technical Guide, 1986. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control, 第1-2頁. World Health Organization, Geneva, Switzerland)。

登革熱之常規實驗室診斷係基於病毒分離及/或對登革熱病毒有特異性之抗體的偵測。

登革熱為僅次於瘧疾之第二嚴重傳染性熱帶病，一半以上世界人口居住於存在流行性傳播風險的地區。據估計，每年有五千萬至一億例登革熱，500,000名患者因出血性登革熱就醫，而25,000名死亡。登革熱在亞洲、太平洋地區、非洲、拉丁美洲及加勒比海為地方病。登革熱病毒感染為100個以上熱帶國家之地方病且出血性登革熱在此等國家之60個中已有文獻記錄 (Gubler, 2002, TRENDS in Microbiology, 10: 100-103 ; Monath, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 2395-2400)。眾多經良好描述之因素看似與登革熱有牽連：人口增長、無計劃及不受控制的都市化，尤其與貧窮、航空旅行增加、缺乏有效蚊子控制及衛生與公眾健康基礎設施建設惡化有關 (Gubler, 2002, TRENDS in Microbiology, 10: 100-103)。已向旅行者及移

民多次提出關於登革熱之警告(Shirtcliffe等人，1998, J. Roy. Coll. Phys. Lond., 32: 235-237)。登革熱為美國軍隊在以登革熱為地方病之熱帶地區操練期間發熱疾病的主要起因之一(DeFraites等人，1994, MMWR, 1994, 43: 845-848)。

病毒維持在涉及人類及埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)之循環內，該蚊子為在日間叮咬之家庭蚊子，且愛好自人類取食。人類之感染係由受感染之埃及伊蚊取食血液期間的病毒感染開始。唾液病毒主要沈積於血管外組織中。接種後感染之第一類細胞為乳頭狀細胞，其接著遷移至淋巴神經節中(Wu等人，2000, Nature Med., 7: 816-820)。在皮膚及淋巴神經節中開始複製後，病毒在急性發熱階段過程中出現於血液中，一般歷時3至5天。

單核細胞及巨噬細胞與乳頭狀細胞同為登革熱病毒之第一目標。同型再感染之保護完成且很可能持續終生，但不同類型登革熱之間的交叉保護持續少於數週至數月(Sabin, 1952, Am. J. Trop. Med. Hyg., 1: 30-50)。因此，個體可能受到不同血清型之感染。登革熱之第二次感染理論上為患上數種登革熱之風險因素。然而，出血性登革熱為多因子-因素包括所涉及之病毒株及患者之年齡、免疫狀態及遺傳偏好。兩種因素在出血性登革熱之出現中起主要作用-高水準病毒血症之快速病毒複製(the severity of the disease being associated with the level of viremia; Vaughn等人，2000, J. Inf. Dis., 181: 2-9)及釋放高含量發炎性介

體的主要發炎反應(Rothman and Ennis, 1999, Virology, 257: 1-6)。不存在針對登革熱之特定治療。登革熱之治療為症狀性的，需要臥床休息、由退熱劑及止痛劑控制發熱及疼痛，及適當飲水。出血性登革熱之治療需要平衡液體損失、置換凝血因子及輸注肝素。

預防性量測當前係基於難以應用且高成本之載體控制及個人保護量測。目前無經核可之登革熱疫苗。倘若世界上有四個登革熱血清型在傳播，且其已報導為涉及於出血性登革熱狀況中，則接種疫苗應理想地賦予針對四個登革熱病毒血清型之保護。

當以四價疫苗進行免疫時，可能主要針對僅一個或至多三個血清型引發反應。因此，需要可能減少不同血清型之間的干擾且可能引發針對4種登革熱血清型之中和抗體的方法。

【發明內容】

本發明者已發現在以僅一個血清型之減毒活疫苗初步免疫後，投與意欲引發針對4種血清型之反應的疫苗調配物時可能產生包含中和4種血清型之抗體的免疫反應，在第一投藥後30天至12個月進行第二免疫。

【實施方式】

本發明者尤其展示單價DEN-2免疫後之四價DEN-1、2、3、4免疫在所有受免疫猴子體內引發針對四個血清型之反應。反言之，即使在輔強劑之後的單獨四價免疫僅引發針對4種血清型中之兩者的滿意反應。

因此，由本發明方法產生之免疫反應在數量上及品質上較高(涵蓋所有血清型)。

根據第一目標，本發明因此係關於可能引發針對患者體內4種登革熱血清型之中和抗體反應的方法，包含：

(a)包含第一登革熱血清型之疫苗病毒的單價疫苗之第一投藥，

(b)包含4種登革熱血清型之疫苗病毒的四價疫苗之第二投藥，且

其中第二投藥(b)係在第一投藥(a)後至少30天與不超過12個月之間進行。

根據本發明免疫方法之一特定實施例，第一投藥(a)中所用之疫苗病毒係選自包含登革熱血清型1或2之疫苗病毒之群。

根據本發明免疫方法之另一特定實施例，該第一投藥(a)中所用之疫苗病毒係選自包含病毒株VDV1及VDV2之群。

根據本發明方法之另一特定實施例，四價疫苗中所用之該等疫苗病毒為Chimerivax™ DEN-1、2、3及4。

根據本發明方法之另一特定實施例，登革熱血清型1、2、3及4之疫苗病毒數量係在 10^3 至 10^6 DICC₅₀之範圍內。

根據本發明方法之另一特定實施例，單價疫苗包含約 10^4 DICC₅₀之VDV1或VDV2且四價疫苗包含約 10^5 DICC₅₀之Chimerivax™ DEN-1、2、3及 10^3 DICC₅₀之Chimerivax™ DEN-4。

根據本發明方法之另一實施例，第二投藥(b)係在第一

投藥(a)後30至60天進行。

本發明之另一目標為針對登革熱病毒之免疫套組，其包含一容器，該容器至少含有(a)含有包含第一登革熱血清型之疫苗病毒之單價組合物或疫苗的第一容器，(b)含有包含4種登革熱血清型之疫苗病毒之四價組合物或疫苗的第二容器。

根據一實施例，本發明之套組至少包含：

(a)含有包含VDV1或VDV2疫苗病毒之單價疫苗的第一容器，

(b)含有包含4種Chimerivax™ DEN-1、2、3及4之四價疫苗的第二容器。

根據一特定實施例，本發明之套組包含一包含約 10^4 DICC₅₀之VDV1或VDV2之單價疫苗及一包含約 10^5 DICC₅₀之Chimerivax™ DEN-1、2、3及約 10^3 DICC₅₀之Chimerivax™ DEN-4之四價疫苗。

因此，本發明亦係關於登革熱疫苗病毒用於製造用以針對登革熱病毒免疫之單價疫苗及四價疫苗的用途，其中單價疫苗包含第一登革熱血清型之疫苗病毒，四價疫苗包含4種登革熱血清型之疫苗病毒，且其中四價疫苗係在單價疫苗投與後至少30天與不超過12個月之間投與。

本發明現將在以下說明書中更詳細地描述。

定義

"登革熱病毒"或"DEN"為屬於黃病毒(*flaviviridae*)家族之黃病毒屬的正單鏈RNA病毒。RNA中之染色體組在5'端

含有I型末端成員但在3'端不含聚A尾。染色體組之組織包含以下元件：非編碼區(NCR)5'、結構蛋白(衣殼(C)、預膜/膜(prM/M)、包膜(E))及非結構蛋白(NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5)及NCR 3'。病毒染色體組RNA與衣殼蛋白結合形成核鞘。在黃病毒之狀況下，DEN病毒染色體組編碼轉譯為單個聚合蛋白之不間斷編碼區。

在本發明上下文中，"疫苗登革熱病毒"意謂能引發特異性免疫反應(包含中和抗體)的登革熱病毒之任何病毒形式，其較佳包括可用於在人體內針對登革熱病毒感染之免疫程式內容中之登革熱病毒的所有病毒形式。疫苗登革熱病毒因此意謂滅活病毒、減毒病毒及重組蛋白(諸如登革熱病毒之包膜蛋白)。此等物質之眾多實例為此項技術中已知的。

若疫苗病毒在允許細胞中不再複製，則認為疫苗病毒經"滅活"。

若在37°C或39°C下在Huh-7、VERO及/或C6/36肝細胞中生長後，疫苗病毒具有比以野生親本病毒株在相同培養條件下且使用相同測定效價之方法量測所獲得之最大效價低至少10倍的最大效價，則認為該疫苗病毒經"減毒"。因此在本發明上下文中認為在上文所鑑別之三個細胞型之至少一者中具有降低之生長的疫苗病毒經"減毒"。

可用於人類之疫苗病毒具有正的益處/風險比，該比率一般滿足獲得市場授權之法定及規章要求。用於本發明上下文中之疫苗登革熱病毒較佳為以在人體內不引起疾病之

方式減毒的病毒。有利地，該疫苗病毒在多數接種疫苗之個體內僅造成至多中等強度(亦即，中等至輕微，或零)之副作用，而仍保持其引發中和抗體反應之能力。

可用於本發明上下文中之登革熱疫苗病毒可由非限制性實例之方式引用：減活疫苗病毒、減毒疫苗病毒(諸如，減毒病毒株 VDV-1、VDV-2)、例如申請案 WO02/66621、WO0057904、WO0057908、WO0057909、WO0057910、WO02/0950075及WO02/102828中所述之病毒株、或嵌合體。嵌合病毒具有特殊特點，其具有上文定義之減毒病毒之特徵。表現登革熱病毒之包膜蛋白且引發免疫反應之所有嵌合病毒(包含中和包膜蛋白起源之血清型的抗體)因此可用於本發明之上下文中。可藉由非限制性實例之方式提及：諸如專利申請案 WO 98/37911中所述之登革熱 Chimerivax™、諸如專利申請案 WO9640933及WO0160847中所述之登革熱/登革熱嵌合體。登革熱血清型1之疫苗病毒可(例如)為疫苗病毒株 VDV1或 Chimerivax™ DEN-1，尤其 YF17D/DEN-1病毒，或亦為 DEN-1 16007/PDK13病毒株。登革熱血清型2之疫苗病毒可(例如)為疫苗病毒株 VDV2或 Chimerivax™ DEN-2，尤其 YF17D/DEN-2病毒，或亦為 DEN-2 16681/PDK53病毒株。登革熱血清型3之疫苗病毒可為 Chimerivax™ DEN-3，尤其為 YF17D/DEN-3病毒。登革熱血清型4之疫苗病毒可為 Chimerivax™ DEN-4，尤其為 YF17D/DEN-4病毒。可參看本文鑑別之申請案關於所提及病毒株之精確描述及其獲得方法。

"VDV"或"Vero登革熱疫苗"表示適於Vero細胞(亦即，能以顯著含量在Vero細胞中可再生複製)且能在靈長類動物及尤其人類體內引發特異性體液反應(包括引發中和抗體)之減毒活登革熱病毒株。

"VDV-1"係由野生DEN-1 16007病毒株獲得之病毒株，其已經歷11次PDK細胞繼代(DEN-1 16007/PDK11)且隨後在32℃下在Vero細胞中擴增，其RNA已在Vero細胞中純化且轉染。VDV-1病毒株相較於DEN-1 16007/PDK13疫苗病毒株(13次PDK-原代狗腎-細胞繼代)具有14種額外突變。亦稱為"LAV1"之DEN-1 16007/PDK13病毒株已描述於以Mahidol大學名義且以National Microorganisms Cultures Collection (CNCM)在編號I-2480下申請之專利申請案EP1159968中。VDV-1病毒株之完整序列給定於序列SEQ ID NO:1中。此病毒株可易於自彼序列再生。製備及表徵VDV-1病毒株之方法已描述於以Sanofi-Pasteur及the Center for Disease Control and Prevention名義以編號WO/2006/134433申請之國際專利申請案中。

"VDV-2"係由野生病毒株DEN-2 16681獲得之病毒株，其已經歷50次PDK細胞繼代(DEN-2 16681/PDK50)、培養盤純化，其RNA在Vero細胞中轉染前已經提取及純化。VDV-2病毒株已隨後在Vero細胞中藉由培養盤純化及擴增而獲得。VDV-2病毒株相較於DEN-2 16681/PDK53疫苗病毒株(53次PDK細胞繼代)具有10個額外突變，包括4種沉默突變。亦稱為"LAV2"之DEN-2 16681/PDK53病毒株已描述

於以 Mahidol 大學名義且以 National Microorganisms Cultures Collection (CNCM)在編號I-2481下申請之專利申請案EP1159968中。VDV-2病毒株之完整序列係給定於序列SEQ ID NO:2中。VDV-2病毒株可易於自彼序列再生。製備及表徵VDV-2病毒株之方法已描述於以Sanofi-Pasteur及the Center for Disease Control and Prevention名義以編號WO/2006/134443申請之國際專利申請案中。

在Vero細胞中藉由擴增製備VDV 1及2病毒株。藉由過濾自細胞碎片採集及純化所產生之病毒。藉由以酶處理來分解DNA。藉由超濾來消除雜質。可藉由濃縮法增加傳染效價。添加穩定劑後，將病毒株在使用前以凍乾或冷凍形式保存，且接著在需要時復水。

"ChimeriVax™登革熱"或"CYPD"意謂嵌合黃熱病(YF)病毒，其包含編碼預膜及包膜蛋白之序列已由DEN病毒之彼等序列置換的YF病毒骨架。因此，含有登革熱血清型1病毒株(DEN-1)之prM及E序列之嵌合YF病毒係稱為"CYPD-1或CYPD DEN1"。含有DEN-2病毒株之prM及E序列之嵌合YF係稱為"CYPD-2或CYPD DEN2"。含有DEN-3病毒株之prM及E序列之嵌合YF病毒係稱為"CYPD-3或CYPD DEN3"。含有DEN-4病毒株之prM及E序列之嵌合YF病毒係稱為"CYPD-4或CYPD DEN4"。此等登革熱ChimeriVax™之製備已詳細描述於國際專利申請案WO 98/37911及WO 03/101397中，可參看該申請案獲得其製備方法之精確描述。實例中所述之嵌合體已藉由使用來自病毒株DEN 1 PU0359

(TYP1140)、DEN2 PUO218、DEN3 PaH881/88及DEN 4 1228 (TVP 980)之prM及E序列而產生。在本發明之上下文中，任何登革熱病毒株可用於建構嵌合體。

較佳地，嵌合YF病毒包含減毒黃熱病病毒株YF17D骨架(Theiler M.及Smith H.H. (1937) J. Exp. Med., 65, 第767-786頁)(病毒YF17D/DEN-1、YF17D/DEN-2、YF17D/DEN-3、YF17D/DEN-4)。可使用之YF17D病毒株之實例包括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等人, 1985, Science, 229: 726-733), 亦或有關病毒株YF17DD(Genbank寄存編號U17066)、YF17D-213(Genbank寄存編號U17067)及Galler等人(1998, Vaccines, 16(9/10): 1024-1028)所述之病毒株YF17DD。在本發明之上下文中，可將可用於人類之任何其他減毒黃熱病病毒株用於建構嵌合體。

當術語"約"結合數量使用時，意謂加上或減去彼數量之10%，例如"約 10^4 "意謂 $10^4 \pm 10^3$ 。

根據一特定實施例，對於多種投藥中所用之各血清型而言，疫苗病毒係以 10^3 至 10^5 DICC₅₀之量存在於疫苗中。

根據一特定實施例，疫苗病毒VDV1或VDV2係以約 10^4 DICC₅₀之含量存在於單價疫苗中。

根據一特定實施例，Chimerivax™ DEN-1、2、3係以約 10^5 DICC₅₀之含量存在於四價疫苗中且Chimerivax™ DEN-4係以約 10^3 DICC₅₀之含量存在於四價疫苗中。

各單價ChimeriVax™登革熱疫苗病毒(血清型1、2、3及4)已藉由使各血清型在Vero細胞中擴增而製備。更特定言之，四種病毒係在黏附Vero細胞中在無血清培養基中單獨製備。接著將藉由過濾自細胞碎片純化之病毒採集物藉由超濾及層析來濃縮及純化以自宿主細胞移除DNA。添加穩定劑後，將疫苗病毒株在使用前以冷凍或凍乾形式保存，且接著視需要復水。對四種嵌合體應用相同方法。

當劑量、組合物或疫苗除醫藥學上可接受之賦形劑外含有單個登革熱血清型之疫苗病毒時，其為"單價"的。當劑量、組合物或疫苗含有四個登革熱血清型之疫苗病毒時，其為"四價"的。藉由使單價組合物簡單混合獲得多價組合物。

"患者"意謂可能受登革熱感染之個體(兒童或成人)，尤其處於感染風險中之個體，諸如在存在登革熱之地區旅行或在彼等地區居住之個體。因此，該術語包括未感染過登革熱病毒及彼等感染過登革熱病毒之個體。

初始單價免疫後之四價免疫

在第一態樣中，本發明因此係關於針對登革熱病毒之免疫方法。

實際上，本發明者尤其已展示在第一投與單價疫苗後30天至12個月後投與4種血清型，使得可能獲得針對4種血清

型之有效保護。在針對登革熱之免疫策略之上下文中，本發明方法因此尤其受關注。

根據本發明，第一免疫可使用包含4種登革熱血清型中任一者之疫苗病毒的單價組合物或疫苗進行，第二投藥係以所有4種疫苗血清型進行。根據一特定實施例，登革熱疫苗病毒血清型1或2(較佳血清型2)係用於第一投藥。較佳地，第一投藥中所用之登革熱疫苗病毒為減毒登革熱病毒且不為嵌合病毒。根據一特定實施例，病毒株 VDV1 或 VDV2(較佳病毒株 VDV2)係用作第一投藥中之疫苗病毒。

第二投藥中使用減毒活疫苗病毒，較佳表現四個登革熱病毒血清型之抗原(尤其 Chimerivax™ DEN1、2、3及4)的嵌合病毒。

根據特定實施例，本發明因此包括以下系統：

-(a)VDV1 (b) CYD DEN-1、2、3及4

-(b)VDV2 (b) CYD DEN-1、2、3及4。

在本發明上下文中，"疫苗組合物"意謂包含"免疫有效量"之登革熱疫苗病毒的組合物，亦即足夠量之引發特異性免疫反應(包含中和抗體)之登革熱疫苗病毒，此可由(例如)下文實例1中所述之血清中和(seroneutralization)測試揭示。當所測定之中和抗體之效價不小於1:10(單一：1/稀釋)時，認為中和抗體存在下之血清為陽性的。

疫苗病毒株之數量通常根據病毒蝕斑形成單位(PFU)或感染50%組織培養物之劑量亦或感染50%細胞培養物(DICC₅₀)之劑量表示。舉例而言，對於單價或四價組合物

而言，本發明組合物可含有 10 至 10^6 DICC_{50} ，尤其 10^3 至 10^5 DICC_{50} 登革熱血清型1、2、3或4疫苗病毒。因此，在本發明組合物或應用中，登革熱血清型1、2、3及4疫苗病毒之劑量較佳各自在 10 至 10^6 DICC_{50} 之範圍內(諸如 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 或 10^6 DICC_{50})，尤其 10^3 至 10^5 DICC_{50} 之範圍內。疫苗病毒可以相同或不同劑量使用，此可根據所用疫苗病毒種類及所獲得之免疫反應強度來調整。

根據本發明方法之一特定實施例，單價及四價組合物或疫苗中之減毒活疫苗病毒之量為 10^3 至 10^5 DICC_{50} 。根據一特定實施例，單價疫苗包含約 10^4 DICC_{50} 之VDV1或VDV2，較佳VDV2。根據一特定實施例，四價疫苗包含 10^5 DICC_{50} 之Chimerivax™ DEN-1、2、3及4。根據一有利實施例，四價疫苗包含約 10^5 DICC_{50} 之Chimerivax™ DEN-1、2及3及約 10^3 DICC_{50} 之Chimerivax™ DEN-4。

在本發明之上下文中，第二投藥(b)係在第一投藥(a)後30天與不超過12個月之間進行。根據一有利實施例，第二投藥係在第一投藥(a)後30天至60天進行。

中和抗體反應有利地為持久的，亦即其可在第二投藥後高達至少6個月在血清中偵測到。

疫苗病毒係以可藉由彼等熟習此項技術者已知之任何方法製備之組合物或疫苗形式投與。通常，將一般為凍乾形式之病毒與醫藥學上可接受之賦形劑(諸如水或磷酸鹽緩衝之生理食鹽水溶液)、濕潤劑或穩定劑混合。"醫藥學上可接受之賦形劑"意謂不在人類或動物體內產生任何副反

應(例如過敏反應)之任何溶劑、分散介質、填料等。賦形劑係基於所選醫藥形式、投藥方法及途徑來選擇。適當賦形劑及醫藥調配物之要求係描述於代表所述領域中參考著作之"Remington: The Science & Practice of Pharmacy"中。

較佳地，將疫苗組合物製備為可注射形式，且其可為液體溶液、懸浮液或乳液之形式。組合物尤其可包含以將pH值保持於約6與9之間(在環境溫度下使用pH計測定)的方式緩衝之水溶液。

儘管不必添加佐劑，但組合物仍可包括該化合物，亦即增加、刺激或加強藉由同時投與疫苗病毒引發之細胞或體液免疫反應之物質。彼等熟習此項技術者將能夠自習知用於疫苗領域之佐劑中選擇在本發明上下文中適當的佐劑。

本發明之組合物或疫苗可藉由接種疫苗中習知使用之任何方式投與，例如非經腸(尤其為皮內、皮下或肌肉內)，有利地為皮下。較佳地，組合物或疫苗為有利地在左三角肌或右三角肌區域中皮下投與之可注射組合物。

所投與之疫苗組合物之體積將視投藥方法而定。在皮下注射之狀況下，體積一般介於0.1與1.0 ml之間，較佳為約0.5 ml。

投與所有血清型1至4之最佳時期為在暴露於登革熱病毒之前的約1至3個月。接種疫苗可作為針對成人及兒童體內登革熱感染之預防性治療而投與。因此，目標人群包括未受登革熱病毒感染(亦即，先前未經免疫)或受登革熱病毒感染之個體。

亦可在本發明之第二投藥(b)之投與後(例如)6個月與10年之間，例如6個月、1年、3年、5年或10年，使用登革熱血清型1至4之疫苗病毒進行輔強投與。輔強投與將有利地使用相同組合物或疫苗(亦即，相同疫苗病毒)且較佳在與第二投藥(b)所用相同之投藥條件(解剖部位及投藥方法)下進行。

干擾現象可由一或多個血清型相對於其他血清型之優勢來解釋且因此與用於製備候選疫苗(來自VDV或Chimerivax™)之技術無關。因此，一般可將本發明之方法用於所有登革熱疫苗病毒。

因此，本發明亦欲涵蓋登革熱疫苗病毒用於製造用以針對登革熱病毒免疫之單價疫苗及四價疫苗的用途，其中單價疫苗包含第一登革熱血清型之疫苗病毒，四價疫苗包含4種登革熱血清型之疫苗病毒，其中四價疫苗係在單價疫苗投與後至少30天與不超過12個月之間投與。

在涉及本發明之用途的上下文中對於疫苗及使用條件之描述而言，可參看關於本發明之免疫方法提供之描述。

根據另一態樣，本發明係以針對四個登革熱病毒血清型之免疫套組為其目標。本發明之套組包含與所提議之免疫方法有關的如上所定義之組合物或疫苗。本發明之套組因此包含一含有多種容器之容器，該等容器含有組合物或疫苗，及有利地(且視情況)說明手冊(包括該等組合物或該等疫苗之投藥的有用資訊)。

根據一實施例，本發明因此係關於針對登革熱病毒之免

疫苗套組、一至少含有(a)含有包含第一登革熱血清型之疫苗病毒之單價疫苗的第一容器，及(b)含有包含4種登革熱血清型之疫苗病毒之四價疫苗的第二容器之容器。

對於可用於本發明套組中之疫苗、組合物或登革熱疫苗病毒之描述而言，可參看上文關於本發明免疫方法提供之描述。

根據一特定實施例，本發明之套組至少包含：

(a)含有包含VDV1或VDV2疫苗病毒之單價疫苗的第一容器，及

(b)含有包含4 Chimerivax™ DEN-1、2、3及4之四價疫苗的第二容器。

根據一特定實施例，本發明之套組包含至少一個包含約 10^4 DICC₅₀之VDV1或VDV2之單價疫苗及包含約 10^5 DICC₅₀之Chimerivax™ DEN-1、2、3及約 10^3 DICC₅₀之Chimerivax™ DEN-4的四價疫苗。

本發明之套組可含有上文所述容器之單個實例或多個實例。

若所用疫苗係呈凍乾形式，則套組將較佳地包含至少一種其他容器，其含有可用於使可注射劑量之疫苗復水的稀釋劑。任何醫藥學上可接受之稀釋劑可用於此目的，習知地為水或磷酸鹽緩衝之水溶液。

本發明係藉由以下實例說明。

實例1：藉由在猴子體內連續注射單價組合物隨後四價組合物從而針對4種登革熱病毒血清型之免疫

在猴子模型中測試病毒血症及免疫原性。病毒血症尤其已鑑別為與人體內疾病之毒性及嚴重性有關的因素中之一者，且因此構成必須考慮之重要參數。對於免疫原性而言，此為評估所賦予之保護之內容的關鍵參數。

1.1 材料及方法

根據與動物實驗有關之歐洲指令(European Directives)進行對猴子之實驗。對來自毛里塔尼亞(Mauritania)之食蟹猴(*cynomolgus monkey*, *Macaca fascicularis*)進行免疫。在免疫前，將猴子檢疫六週。

將猴子以 0.5 ml 疫苗組合物在手臂中經皮下免疫。以氯胺酮(Imalgene, Merial)溫和麻醉後，藉由刺破腹股溝或隱靜脈來收集血液。在各免疫後第0天及第28天，取樣 5 ml 血液以評估抗體反應，而在第2天與第10天之間取樣 1 ml 血液以評估病毒血症。在冰上收集血液且於冰上保存直至分離出血清。為此，將血液在 4°C 下離心分離 20 分鐘，且將所收集之血清在 -80°C 下儲存直至測試時間。

病毒血症之量測

藉由定量即時 RT-PCT (qRT-PCR) 監測接種疫苗後之病毒血症。分別將位於 DEN1 及 DEN2 病毒株之 NS5 基因中的兩組引子及探針用於定量 VDV-1 及 VDV-2 之 RNA。將位於 YF 病毒之 NS5 基因中之第三組 2 個引子及 1 個探針用於定量 CYD 之 RNA。最終，將位於 E (DEN)/NS1 (YF) 基因接合處之不同 CYD 血清型的 4 組引子及特異性探針用於鑑別對 NS5 YF RNA 呈陽性之樣本中的血清型(亦參見表 1)。在促進劑

T7控制下將7個含有由各PCR靶向之區域的質體活體外轉錄以產生一系列合成RNA，其作為內部參考包括於各RT-PCT測試中。藉由分光光度計測定合成RNA，將所獲得之RNA之量轉化為RNA複本之數目且表示為GEQ(染色體組等效物)。

使用購自Macherey Nagel之"Nucleospin 96 virus™"RNA提取套組根據製造商說明書提取0.140 ml猴子血清，且接著將純化RNA以0.140 ml(0.090 ml，接著0.05 ml)無RNase之水溶離。為了避免重複冷凍/融化循環，在以5 µl該RNA製劑提取後立即進行第一次定量。將剩餘體積在70°C下冷凍。

除"Qiagen Qauntitect™探針"RT-PCR定量套組(Qiagen)之組份外，反應混合物以25 µl之總體積含有10 pmol之各引子，4 pmol之各探針及5 µl RNA。在測試下之RNA狀況下，將5 µl純製劑無需先前稀釋階段而直接添加至反應混合物中。將合成RNA以1/10倍稀釋於無RNase之水中，且平行定量含有約10至10⁶ GEQ之5 µl 7次稀釋液以產生校準曲線。

使用購自Applied Biosystem之ABI Prism 700™設備，使用以下程式進行定量反應：50°C /30分鐘，95°C /15分鐘，隨後95°C /15秒-60°C /60秒之40次循環。

根據PCR目標(標準差：+/-0.3 log₁₀)，此測試中病毒RNA之定量限值為2.9至3.3 log₁₀GEQ/ml(800至2000 GEQ/ml；每次反應4至10 GEQ)。

藉由對添加有已知量之用於免疫之病毒傳染性顆粒 (CYD或VDV)的 0.140 ml陰性猴血清(DO)樣本進行分析，與測試平行建立傳染性效價與病毒RNA定量之間的相互關係。在 5 μ l含有約 1 PFU及約 100 PFU之兩個稀釋液(分別 2.3與 4.3 $\log_{10}$ PFU/ml)中製備該等對照血清。

在實例所用之測試中，GEQ與PFU之間的相互關係係如下：YF或CYD血清陽性之GEQ/PFU比 2.7 $\log_{10}$ (亦即，1 PFU=500 GEQ)；VDV1或VDV2血清陽性之GEQ/PFU比 2.5 $\log_{10}$ (亦即，1 PFU=320 GEQ)。

定量限值對 YF 及 CYDs qRT-PCR 而言為 <3.3 $\log_{10}$ GEQ/ml(亦即 <4 PFU/ml)，且對於VDV1及VDV2 qRT-PCR而言為 <2.9 $\log_{10}$ GEQ/ml(亦即 <2.5 PFU/ml)。

所用引子及探針係展示於下表 1 中，其中列出正義及反義引子及探針以用於各測試。

表 1

序列			
Y F	YF-NS5	正義	5' GCACGGATGTAACAGACTGAAGA (23 鹼基)
	YF-NS5	反義	5' CCAGGCCGAACCTGTCAT (18 鹼基)
	YF-NS5		5' Fam-CGACTGTGTGGTCCGGCCCATC-Tamra (22 鹼基)
CYD1 spe	CYD1-	正義	5' CAT TGC AGT TGG CCT GGT AA (20 b)
	CYD1-	反義	5' GTT TGG CAA GAG AGA GCT CAA (23 b)
	CYD1-		5' Fam-CCG ATC AAG GAT GCG CCA TCA-Tamra (21 b)
CYD2 spe	CYD2-	正義	5' GTG GGA GTC GTG ACG CTG TA (20 b)
	CYD2-	反義	5' GTT GAT GGC GCA TCC TTG ATC (21 b)
	CYD2-		5' Fam-TGG GAG TTA TGG TGG GCG CCG-Tamra (21 b)
CYD3 spe	CYD3-	正義	5' AAA ACA CTT CCA TGT CAT TTT CAT G (25b)
	CYD3-	反義	5' GTT GAT GGC GCA TCC TTG ATC (21 b)
	CYD3-		5' Fam-TGCGATAGGAATTATCACACTCTATCTGGGAGC-Tamra (33 b)
CYD4 spe	CYD4-	正義	5' CTT AGT ATT GTG GAT TGG CAC GAA (24 b)
	CYD4-	反義	5' GCG CCA ACT GTG AAA CCT AGA (21 b)
	CYD4-		5' Fam-AGAAACACTTCAATGGCAATGACGTGCAT-Tamra (29 b)
VDV1 spe	VDV1-NS5	正義	5' TCG CAA CAG CCT TAA CAG C(19 b)
	VDV1-NS5	反義	5' ACT ATC TCC CTC CCA TCC TTC (21 b)
	VDV1-NS5		5' Fam-TTC ACA CCA CTT CCA C-M GB/NFQ (16 b)

VDV2 株	VDV2-NS5	正義	5' AAT GAC AGA CAC GAC TCC (18 b)
	VDV2-NS5	反義	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)

中和抗體之量測(血清中和測試)(SN50)

習知地，使用 PRNT50 測試(藉由將 PFU 數目減少至 50% 來測試中和性)量測登革熱抗體。因為此測試繁瑣且消耗許多材料，吾人已研發出基於 DICC50 測試中所量測之單元數目減少 50% 之 SN50 測試。

在 96 孔培養盤中，將 0.120 ml 各去補體血清添加至各孔中之 0.480 ml 稀釋劑(ISCove 4% SVF)中。藉由將 0.150 ml 血清轉移至 0.450 ml 稀釋劑中來進行因子為 6 之連續稀釋。將含有 $2.7 \log_{10}$ DICC50/ml 之 450 μ l 病毒稀釋液添加至各孔中，以獲得每孔 25 DICC50。將培養盤在 37°C 下培育 1 小時。接著將 0.1 ml 各稀釋液分布於 96 孔培養盤之 6 個孔中，其中已在開始實驗前將 VERO 細胞以每孔 8000 個細胞之密度在 0.1 ml ISCOVE 4% SVF 培養基中接種 3 天。在 37°C 下在 5% CO₂ 存在下培育 6 天後，在 4°C 下使用乙醇/丙酮(70/30)混合物將細胞固定 15 分鐘，且接著在 PBS 中洗滌 3 次，且在 37°C 下在抗黃病毒單株抗體(自 ATCC H-B112 融合瘤獲得之 mAb 4G2)之 0.05 ml 1/2000 倍稀釋液存在下培育 1 小時。接著將培養盤洗滌兩次，且在 37°C 下在與鹼金屬磷酸酶結合之抗小鼠 IgG 的 0.05 ml 1/1000 倍稀釋液存在下培育 1 小時。藉由添加 0.05 ml 染色受質：BCIP/NBT 來揭示溶胞蝕斑。使用如下定義之 Karber 等式計算中和抗體效價：

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

其中：

d：表示提供100%中和之稀釋(亦即，6個陰性複本，亦即不呈現感染徵象)

f：表示以 $\log_{10}$ 形式之稀釋因子(例如，稀釋因子為1:4， $f=0.6$)

N：表示複本/稀釋數目($N=6$)

X：不具感染徵象之孔總數，其中例外為稀釋d。

病毒偵測之限值為10 SN50(亦即 $1.0 \log_{10}\text{SN50}$)。

用於中和之病毒株為病毒株 DEN1 16007、DEN2 16681、DEN3 16562或DEN4 1036。

在對照狀況下，起始病毒稀釋液經再滴定。

SN50測試中所量測之中和效價與PRNT50測試中習知量測之中和效價之間的相互關係為： $\log_{10}\text{PRNT50} = \log_{10}\text{SN50} + 0.2$ 。

1.2同時免疫之評估

使2組4隻相等年齡及體重之猴子免疫(參見表2)。

使用23G1針頭以 10^5 DICC₅₀之量的四價疫苗的各CYD DEN 1至4血清型及 10^4 DICC₅₀之量的單價VDV-2-在手臂中經皮下進行免疫。

表2：各組之組合物及免疫方法

猴子		
組	免疫	
	D0	D56
第1組	單價 VDV 2	四價登革熱 1234 ChimeriVax

猴子		
組	免疫	
	D0	D56
第 2 組	四價登革熱 1234 ChimeriVax	四價登革熱 1234 ChimeriVax

一次免疫 (D0+28) 及二次免疫 (D56+28) 後獲得之免疫原性結果係展示於表 3 中。

病毒血癥結果係於表 4 中提供。

表 3：SN50 中和效價(單位 1/稀釋)

猴子			D0+28				D56+28					
ID	免疫		D0	D56	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4
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			
幾何平均值			11	503	≤10	≤10	142	131	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		
幾何平均值			13	≤10	≤10	25	38	11	14	95		

: 效價 <10

表 4：病毒血症分析(單位：log10 GEQ/mL)

		第一免疫										輔強劑									
組	猴子	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D58	D59	D60	D61	D62	D63	D64	D65	D66		
1 初始 VDV 2 輔強劑 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	3.11	<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	4.86	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	3.09	3.42	3.39	<3.2	<3.2	4.08	4.22		
	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	4.67	5.09	4.97		
2 初始 CYD 1、2、 3、4 輔強劑 CYD 1、2、 3、4	AM496	4.22	3.36	3.71	4.15	3.14	<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

簡言之，結果可概述如下：

本發明之投藥方法在由包含兩個相同四價疫苗免疫之系統獲得之中和抗體反應中產生定性及定量增加。

一在初始單價VDV2免疫後進行之CYD-1、2、3、4免疫在所有猴子體內引發針對四個血清型之高水準反應，與包含2個四價疫苗免疫之系統不同。

如所預期，以VDV2進行之初始免疫在一些動物體內引發幾乎專門針對血清型2之反應，具有低水準之針對血清型1及4的交叉反應性。

在初始免疫後對VDV2觀測到病毒血症，且該病毒血症主要係由第二投藥(b)後之CYD-4引起(第1組)。在未經感染動物體內以四價疫苗進行第一免疫後引發之病毒血症中未觀測到顯著差異(第2組)。因此可推斷，本發明提出之系統在第二投藥後不促使血清型1、2、3及4之病毒血症的出現。

因此，實例展示本發明之免疫方法改良登革熱疫苗病毒之免疫原性而未不利影響後期安全性。

本文引用之所有公開案以引用的方式全文併入本文中。在公開案與本說明書之間衝突之狀況下，以本說明書為主。

序列表

< 110 > 法商賽諾菲巴斯德公司
 < 120 > 針對4個登革熱血清型的免疫方法
 < 130 > PM 0608
 < 140 > 096143113
 < 141 > 2007-11-14
 < 150 > 0655255
 < 151 > 2006-12-01
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 10735
 <212> DNA
 <213> 登革熱病毒

<400> 1
 agttgttagt ctacgtggac cgacaagaac agtttcgaat cggaagcttg cttaacgtag 60
 ttctaacagt tttttattag agagcagatc tctgatgatc aaccaacgaa aaaagacggg 120
 tcgaccgtct ttcaatatgc tgaaacgcgc gagaaaccgc gtgtcaactg tttcacagtt 180
 ggcgaagaga ttctcaaaag gattgctctc aggccaagga cccatgaaat tgggtgatggc 240
 tttcatagca ttcttaagat ttctagccat accccaaca gcaggaattt tggctagatg 300
 gggctcattc aagaagaatg gagcgattaa agtggttacg ggtttcaaga gagaaatctc 360
 aaacatgcta aacataatga acaggaggaa aagatccgtg accatgctcc ttatgctgct 420
 gccacagcc ctggcgttcc atctgacgac acgaggggga gagccgcata tgatagttag 480
 caagcaggaa agaggaaagt cacttttggt caagacctct gcaggtgtca acatgtgcac 540
 cctcattgct atggatttgg gagagtgtgt tgaggacacg atgacctaca aatgcccccg 600
 gatcactgag gcggaaccag atgacgttga ctgttggtgc aatgccacgg acacatgggt 660
 gacctatgga acgtgctctc aaactggcga acaccgacga gacaaacgtt ccgtcgcatt 720
 ggccccacac gtggggcttg gcctagaaac aagagccgaa acgtggatgt cctctgaagg 780
 tgcttggaag cagatacaaa aagtagagac ttgggctctg agacatccag gattcacggt 840
 gatagccctt tttctagcac atgccatagg 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
 ggtcaciaac cctgcagttc tgcgtaaatt gtgcattgaa gctaaaatat caaacaccac 1140
 caccgattcg agatgtccaa cacaaggaga agccacactg gtggaagaac aagacgcgaa 1200
 ctttgtgtgc cgacgaacgt tcgtggacag aggctggggc aatggctgtg ggctattcgg 1260
 aaaaggtagt ctaataacgt gtgccaagtt taagtgtgtg acaaaactag aaggaaagat 1320
 agtcaatat gaaaacctaa aatattcagt gatagtcacc gtccacactg gagatcagca 1380
 ccagggtggga aatgagacta cagaacatgg aacaactgca accataacac ctcaagctcc 1440
 tacgtcggaa atacagctga ccgactacgg aacccttaca ttagattggt cacctaggac 1500

agggctagat	tttaacgaga	tggtgttgct	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
ggacaaacta	actttaaaag	ggatgtcata	tgtgatgtgc	acaggctcat	tcaagttaga	1860
gaaagaagtg	gctgagaccc	agcatggaac	tgttctgggtg	cagggttaa	atgaaggaa	1920
agacgcacca	tgcaagattc	ccttttcgac	ccaagatgag	aaaggagcaa	cccagaatgg	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
ttcaaggaa	acgtcccttt	cggatgatgtg	catcgcagtt	ggcatggtca	cactgtacct	2400
aggagtcatg	gttcaggcag	attcgggatg	tgtaatcaac	tggaaaggca	gagaacttaa	2460
atgtggaagc	ggcatttttg	tcactaatga	agttcacact	tggacagagc	aatacaaatt	2520
ccaggctgac	tcccccaaga	gactatcagc	agccattggg	aaggcatggg	aggaggggtg	2580
gtgtggaatc	cgatcagcca	ctcgtctcga	gaacatcatg	tggaaacaaa	tatcaaata	2640
attgaaccac	atcctacttg	aaaatgacat	gaaatttaca	gtggtcgtgg	gagacgttag	2700
tggaatcttg	gccaaggaa	aaaaaatgat	taggccacaa	cccatggaac	acaaatactc	2760
gtggaaaagc	tggggaaaag	ctaaaatcat	aggagcggat	gtacagaaca	ccaccttcat	2820
catcgacggc	ccaaacaccc	cagaatgccc	tgacaatcaa	agagcatgga	atatttgga	2880
agtagaggac	tatggatttg	ggattttcac	gacaaacata	tggttgaaat	tgcgtgactc	2940
ctacacccaa	gtatgtgacc	accggctgat	gtcagctgcc	attaaggaca	gcaaggcagt	3000
ccatgctgac	atgggggtact	ggatagaaag	tgaaaagaac	gagacatgga	agttggcgag	3060
agcctccttt	atagaagtta	agacatgcat	ctggccaaaa	tcccacactc	tatggagcaa	3120
tggagttctg	gaaagtga	tgataattcc	aaagatatat	ggaggaccaa	tatctcagca	3180
caactacaga	ccaggatatt	tcacacaaac	agcagggccg	tggcacctag	gcaagttgga	3240
actagatttc	gattttttgtg	aaggtaccac	agttgttgtg	gatgaacatt	gtggaaatcg	3300
aggaccatct	ctcagaacca	caacagtcac	aggaaagata	atccatgaat	ggtgctgcag	3360
atcttgtacg	ctaccccccc	tacgtttcaa	aggggaagac	gggtgttggt	acggcatgga	3420
aatcagacca	gtgaaggaca	aggaagagaa	cctgggtcaag	tcaatggtct	ctgcagggtc	3480
aggagaagtg	gacagctttt	cactaggact	gctatgcata	tcaataatga	ttgaagaagt	3540

gatgagatcc	agatggagca	aaaaaatgct	gatgactgga	acactggctg	tggtcctcct	3600
tcttataatg	ggacaattga	catggagtga	tctgatcagg	ttatgtatta	tggttggagc	3660
caacgcttca	gacaagatgg	ggatgggaac	aacgtaccta	gctttaatgg	ccactttcaa	3720
aatgagacca	atgttcgccg	tcgggctatt	atttcgcaga	ctaacatcta	gagaagttct	3780
tcttcttaca	attggcttga	gcctgggtggc	atccgtggag	ctaccaagtt	ccctagagga	3840
gctgggggat	ggacttgcaa	taggcatcat	gatgttgaaa	ttattgactg	attttcagtc	3900
acaccagcta	tgggctactc	tgctatcctt	gacattttatt	aaaacaactt	tttcattgca	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
tgatgtgccg	ctagccggcc	cattaatagc	tggaggcatg	ctaatagcat	gttatgtcat	4260
atccggaagc	tcagctgatt	tatcactgga	gaaagcggct	gaggtctcct	gggaggaaga	4320
agcagaacac	tcaggcgctt	cacacaacat	actagtagag	gttcaagatg	atggaaccat	4380
gaagataaaa	gatgaagaga	gagatgacac	gctcaccatt	ctccttaaag	caactctgct	4440
ggcagtctca	ggggtgtacc	caatgtcaat	accagcgacc	ctttttgtgt	ggtatttttg	4500
gcagaaaaag	aaacagagat	caggagtgtc	atgggacaca	cccagcccc	cagaagtgga	4560
aagagcagtt	cttgatgatg	gcatctatag	aattttgcaa	agaggactgt	tgggcaggtc	4620
ccaagtagga	gtaggagttt	tccaagaagg	cgtgttccac	acaatgtggc	acgtcactag	4680
gggagctgtc	ctcatgtatc	aaggaaaaag	gctggaacca	agctgggcca	gtgtcaaaaa	4740
agacttgatc	tcatatggag	gaggttggag	gtttcaagga	tcctggaaca	cgggagaaga	4800
agtacaggtg	attgctgttg	aaccgggaaa	aaaccccaaa	aatgtacaaa	caacgccggg	4860
taccttcaag	acccttgaag	gcgaagtggg	agccatagcc	ttagacttta	aacctggcac	4920
atctggatct	cccacgtaa	acagagaggg	aaaaatagta	ggtctttatg	gaaatggagt	4980
ggtgacaaca	agcgggaactt	acgttagtgc	catagctcaa	gctaaggcat	cacaagaagg	5040
gcctctacca	gagattgagg	acaaggtgtt	taggaaaaga	aacttaacaa	taatggacct	5100
acatccagga	tcgggaaaaa	caagaagata	ccttcagacc	atagtccgtg	aggccataaa	5160
aaggaagctg	cgcacgctaa	tcctagctcc	cacaagagtt	gtcgcttctg	aaatggcaga	5220
ggcactcaag	ggagtgccaa	taaggatatca	gacaacagca	gtgaagagtg	aacacacagg	5280
aaaggagata	gttgacctta	tgtgccacgc	cactttcacc	atgcgcctcc	tgtctcccgt	5340
gagagttccc	aattataaca	tgattatcat	ggatgaagca	cacttcaccg	atccagccag	5400
catagcagcc	agaggggtaca	tctcaaccgc	agtgggtatg	ggtgaagcag	ctgcgatctt	5460
tatgacagcc	actccccag	gatcgggtgga	ggcctttcca	cagagcaatg	caattatcca	5520
agatgaggaa	agagacattc	ctgagagatc	atggaactca	ggctatgact	ggatcactga	5580

ttttccaggt	aaaacagtct	ggtttgttcc	aagcatcaaa	tcaggaaatg	acattgccaa	5640
ctgtttaaga	aaaaacggga	aacgggtgat	ccaattgagc	agaaaaacct	ttgacactga	5700
gtaccagaaa	acaaaaaaca	acgactggga	ctatgtcgtc	acaacagaca	tttccgaaat	5760
gggagcaaat	ttccgggccg	acagggtaat	agaccaaggg	cgggtgtctga	aaccggtaat	5820
actaaaagat	ggtccagagc	gcgtcattct	agccggaccg	atgccagtga	ctgtggccag	5880
tgccgcccag	aggagaggaa	gaattggaag	gaacaaaaac	aaggaagggtg	atcagtatat	5940
ttacatggga	cagcctttaa	aaaatgatga	ggaccacgct	cattggacag	aagcaaagat	6000
gctccttgac	aatataaaca	caccagaagg	gattatccca	gccctctttg	agccggagag	6060
agaaaagagt	gcagctatag	acggggaata	cagactgcgg	ggtgaagcaa	ggaaaacgtt	6120
cgtggagctc	atgagaagag	gggatctacc	agtctggcta	tcctacaaag	ttgcctcaga	6180
aggcttccag	tactccgaca	gaagggtggtg	cttcgatggg	gaaaggaaca	accagggtgtt	6240
ggaggagaac	atggacgtgg	agatctggac	aaaagaagga	gaaagaaaga	aactacgacc	6300
tcgctggttg	gacgccagaa	catactctga	cccactggct	ctgcgcgagt	ttaaagagtt	6360
tgacgagga	agaagaagcg	tctcaggtga	cctaataatta	gaaataggga	aacttccaca	6420
acatttgacg	caaagggccc	agaatgcttt	ggacaacttg	gtcatgttgc	acaattccga	6480
acaaggagga	aaagcctata	gacatgctat	ggaagaactg	ccagacacaa	tagaaacgtt	6540
gatgctccta	gccttgatag	ctgtgttgac	tgggtggagtg	acgctgttct	tcctatcagg	6600
aagagggtcta	ggaaaaacat	ctatcggtct	actctgcgtg	atggcctcaa	gcgcactggt	6660
atggatggcc	agtgtggagc	cccattggat	agcggcctcc	atcatactgg	agttctttct	6720
gatggtactg	cttattccag	agccagacag	acagcgcact	ccacaggaca	accagctagc	6780
atatgtgggtg	ataggtctgt	tattcgtgat	attgacagtg	gcagccaatg	agatgggatt	6840
attggaaacc	acaaagaaag	acctggggat	tggccatgta	gctgctgaaa	accaccacca	6900
tgctacaatg	ctggacgtag	acctacatcc	agcttcagcc	tggaccctct	atgcagtggc	6960
cacaacaatc	atcactccta	tgatgagaca	cacaattgaa	aacacaacgg	caaataatttc	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	gcggctggaa	taatgaaaaa	7260
tccaactgtc	gacgggattg	ttgcaataga	cttagatccc	gtggtttacg	atgcaaaatt	7320
tgaaaaacag	ctaggccaaa	taatgttggt	gatactttgc	acatcacaga	ttcttttgat	7380
gcggactaca	tgggccttgt	gtgaatccat	cacattggct	actggacctc	tgaccactct	7440
ttgggagggg	tctccaggaa	aattctggaa	caccacaata	gcggtatcca	tggcaaakat	7500
tttcaggggg	agttatctag	caggagcagg	tctggccttc	tcattaatga	aatctctagg	7560
aggaggtagg	agaggcacgg	gagcccaagg	ggaaacactg	ggagaaaaat	ggaaaagaca	7620

actaaaccaa	ctgagcaagt	cagaattcaa	tacttacaag	aggagtggga	ttatggaggt	7680
ggatagatcc	gaagccaaag	agggactgaa	aagaggagaa	acaaccaaac	acgcagtatc	7740
gagaggaacg	gccaaactga	ggtggttcgt	ggagaggaac	cttgtgaaac	cagaagggaa	7800
agtcatagac	ctcggttggt	gaagaggtgg	ctgggtcatat	tattgcgctg	ggctgaagaa	7860
agtcacagaa	gtgaaaggat	acacaaaagg	aggacctgga	catgaggaac	caatcccaat	7920
ggcgacctat	ggatggaacc	tagtaaggct	gcactccgga	aaagatgtat	tttttatacc	7980
acctgagaaa	tgtgacaccc	ttttgtgtga	tattggtgag	tcctctccga	acccaactat	8040
agaggaagga	agaacgttac	gtgttctgaa	aatggtggaa	ccatggctca	gaggaaacca	8100
attttgcata	aaaattctaa	atccctatat	gccgagcgtg	gtagaaactc	tggaacaaat	8160
gcaaagaaaa	catggaggaa	tgctagtgcg	aaaccctctc	tcaagaaatt	ccacccatga	8220
aatgtactgg	gtttcatgtg	gaacaggaaa	catttgtgtca	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	tggtgagatt	gctcaccaaa	ccatgggatg	ttatccccat	8580
ggtcacacaa	atagccatga	ctgataccac	accctttgga	caacagaggg	tgtttaaaga	8640
gaaagttagc	acgcgcacac	caaaagcaaa	acgtggcaca	gcacaaatta	tggaagttagc	8700
agccaggtgg	ttatgggggt	tcctttctag	aaacaaaaaa	cccagaattt	gcacaagaga	8760
ggagtttaca	agaaaagtta	ggtcaaacgc	agctattgga	gcagtgttcg	ttgatgaaaa	8820
tcaatggaac	tcggcaaaaag	aagcagtgga	agacgaacgg	ttctgggaac	ttgtccacag	8880
agagagggag	cttcataaac	aggggaaatg	tgccacgtgt	gtctacaata	tgatggggaa	8940
gagagagaaa	aaattaggag	agttcggaag	ggcaaaaagga	agtcgtgcaa	tatggtacat	9000
gtggttgga	gcacgcttcc	tagagtttga	agcccttggt	ttcatgaatg	aagatcactg	9060
gttcagtaga	gagaattcac	tcagtggagt	ggaaggagaa	ggactccaca	aacttgata	9120
catactcaga	gacatatcaa	ggattccagg	ggggaacatg	tatgcagatg	acacagccgg	9180
atgggacaca	agaataacag	aggatgatct	ccagaatgag	gctaaaatca	ctgacatcat	9240
ggagcccgaa	catgccctgc	tggctacgtc	aatctttaag	ctgacctacc	aaaataaggt	9300
ggtaaggggtg	cagagaccag	caaaaaatgg	aaccgtgatg	gatgttatat	ccagacgtga	9360
ccagagaggc	agtggacagg	ttggaactta	tggcttaaac	actttcacca	acatggaggc	9420
ccaactgata	agacaaatgg	agtctgaggg	aatcttttta	cccagcgaat	tggaaccccc	9480
aaatctagcc	ggaagagttc	tcgactgggt	ggaaaaatat	gggtgcgaaa	ggctgaaaag	9540
aatggcaatc	agcggagatg	actgtgtggt	gaaaccaatt	gatgacaggt	tcgcaacagc	9600
cttaacagct	ttgaatgaca	tgggaaaagt	aagaaaagac	ataccacaat	gggaaccttc	9660

```

aaaaggatgg aatgattggc aacaagtgcc tttctgttca caccacttcc accagctaata 9720
tatgaaggat gggagggaga tagtggtgcc atgccgcaac caagatgaac ttgtggggag 9780
ggccagagta tcacaaggcg ccggatggag cctgagagaa accgcatgcc taggcaagtc 9840
atatgcacaa atgtggcagc tgatgtattt ccacaggaga gacctgagac tggcggctaa 9900
cgctatttgt tcagccgttc cagttgattg ggtcccaacc agccgcacca cctggctgat 9960
ccatgccccat caccaatgga tgacaacaga agacatgtta tcagtatgga atagggctctg 10020
gatagaggaa aacccatgga tggaggataa gactcatgtg tccagttggg aagaagttcc 10080
atacctagga aagaggggaag atcagtgggtg tggatccctg ataggcttaa cagcaagggc 10140
cacctgggcc actaatatac aagtggccat aaaccaagtg agaaggctca ttgggaatga 10200
gaattatcta gattacatga catcaatgaa gagattcaag aatgagagtg atcccgaagg 10260
ggcactcttg taagtcaaca cattcacaaa ataaaggaaa ataaaaaatc aaatgaggca 10320
agaagtcagg ccagattaag ccatagtacg gtaagagcta tgctgcctgt gagccccgtc 10380
caaggacgta aaatgaagtc aggccgaaag ccacggtttg agcaagccgt gctgcctgtg 10440
gctccatcgt ggggatgtaa aaacccggga ggctgcaacc catggaagct gtacgcatgg 10500
ggtagcagac tagtggttag aggagacccc tccaagaca caacgcagca gcggggccca 10560
acaccagggg aagctgtacc ctggtggtaa ggactagagg ttagaggaga ccccccgcgt 10620
aacaataaac agcatattga cgctgggaga gaccagagat cctgctgtct ctacagcatc 10680
attccaggca cagaacgcca gaaaatggaa tgggtgctgtt gaatcaacag gttct 10735

```

```

<210> 2
<211> 10723
<212> DNA
<213> 登革熱病毒

```

```

<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
gccctgggtg cgttccttcg tttcctaaca atcccaccaa cagcagggat attgaagaga 300
tggggaacaa ttaaaaaatc aaaagctatt aatgttttga gagggttcag gaaagagatt 360
ggaaggatgc tgaacatctt gaataggaga cgcagatctg caggcatgat cattatgctg 420
attccaacag tgatggcgtt ccatttaacc acacgtaacg gagaaccaca catgatcgtc 480
agcagacaag agaaagggaa aagtcttctg tttaaaacag aggttggcgt gaacatgtgt 540
accctcatgg 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 aggcttcacc	840
atgatggcag caatcctggc atacaccata ggaacgacac atttccaaag agccttgatt	900
ttcatcttac tgacagctgt cactccttca atgacaatgc gttgcatagg aatgtcaaat	960
agagactttg tggaaggggt ttcaggagga agctgggttg acatagtctt agaacatgga	1020
agctgtgtga cgacgatggc aaaaaacaaa ccaacattgg attttgaact gataaaaaca	1080
gaagccaaac agcctgccac cctaaggaag tactgtatag aggcaaagct aaccaacaca	1140
acaacagaat ctcgctgccc aacacaaggg gaacccagcc taaatgaaga gcaggacaaa	1200
aggttcgtct gcaaacactc catggtagac agaggatggg gaaatggatg tggactattt	1260
ggaaagggag gcattgtgac ctgtgctatg ttcagatgca aaaagaacat ggaaggaaaa	1320
gttgtgcaac cagaaaactt ggaatacacc attgtgataa cacctcactc aggggaagag	1380
catgcagtcg gaaatgacac aggaaaacat ggcaaggaaa tcaaaataac accacagagt	1440
tccatcacag aagcagaatt gacaggttat ggcaactgtca caatggagtg ctctccaaga	1500
acgggcctcg acttcaatga gatggtgttg ctgcagatgg aaaataaagc ttggctggtg	1560
cacaggcaat ggttcctaga cctgccgtta ccatggttgc ccggagcggg cacacaagag	1620
tcaaattgga tacagaagga gacattggtc actttcaaaa atcccatgc gaagaaacag	1680
gatgttgttg 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 cccttttgag ataatggatt tggaaaaaag acatgtctta	1980
ggtcgcctga ttacagtcaa cccaattgtg acagaaaaag atagcccagt caacatagaa	2040
gcagaacctc catttgagga cagctacatc atcataggag tagagccggg acaactgaag	2100
ctcaactggt ttaagaaagg aagttctatc ggccaaatgt ttgagacaac aatgaggggg	2160
gcgaagagaa tggccatttt aggtgacaca gcctgggatt ttggatcctt gggaggagtg	2220
tttacatcta taggaaaggc tctccaccaa gtctttggag caatctatgg agctgccttc	2280
agtggggttt catggactat gaaaatcctc ataggagtca ttatcacatg gataggaatg	2340
aattcacgca gcacctcact gtctgtgaca ctagtattgg tgggaattgt gacactgtat	2400
ttgggagtca tgggtgcaggc cgatagtggg tgcgttgtga gctggaaaaa caaagaactg	2460
aaatgtggca gtgggatttt catcacagac aacgtgcaca catggacaga acaatacaaa	2520
ttccaaccag aatccccttc aaaactagct tcagctatcc agaaagccca tgaagaggac	2580
atgtgtggaa tccgctcagt aacaagactg gagaatctga tgtggaaaca aataacacca	2640
gaattgaatc acattctatc agaaaatgag gtgaagttaa ctattatgac aggagacatc	2700
aaaggaatca tgcaggcagg aaaacgatct ctgcggcctc agccactga 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	ccataaaaaga	caacagagcc	3000
gtccatgccg	atatgggtta	ttggatagaa	agtgcaactca	atgacacatg	gaagatagag	3060
aaagcctctt	tcattgaagt	taaaaactgc	cactggccaa	aatcacacac	cctctggagc	3120
aatggagtgc	tagaaagtga	gatgataatt	caaagaatc	tcgctggacc	agtgtctcaa	3180
cacaactata	gaccaggcta	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	aatttggtca	actccttggg	cacagctgga	3480
catgggcagg	tcgacaactt	ttcactagga	gtcttgggaa	tggcattggt	cctggaggaa	3540
atgcttagga	cccagtagg	aacgaaacat	gcaatactac	tagttgcagt	ttcttttgtg	3600
acattgatca	cagggaacat	gtcctttaga	gacctgggaa	gagtgatggt	tatggtaggc	3660
gccactatga	cggatgacat	aggtatggg	gtgacttata	ttgccctact	agcagccttc	3720
aaagtcagac	caacttttgc	agctggacta	ctcttgagaa	agctgacctc	caaggaattg	3780
atgatgacta	ctataggaat	tgtactcctc	tcccagagca	ccataccaga	gaccattctt	3840
gagttgactg	atgcgttagc	cttaggcatg	atggctctca	aaatggtgag	aaatatggaa	3900
aagtatcaat	tggcagtgac	tatcatggct	atcttgtgcg	tcccaaacgc	agtgatatta	3960
caaaacgcat	ggaaagtgag	ttgcacaata	ttggcagtg	tgtccgtttc	cccactgttc	4020
ttaacatcct	cacagcaaaa	aacagattgg	ataccattag	cattgacgat	caaaggtctc	4080
aatccaacag	ctatttttct	aacaaccctc	tcaagaacca	gcaagaaaag	gagctggcca	4140
ttaaattgagg	ctatcatggc	agtcgggatg	gtgagcattt	tagccagttc	tctcctaaaa	4200
aatgatattc	ccatgacagg	accattagtg	gctggagggc	tcctcactgt	gtgctacgtg	4260
ctcactggac	gatcggccga	tttggaaactg	gagagagcag	ccgatgtcaa	atgggaagac	4320
caggcagaga	tatcaggaag	cagtccaatc	ctgtcaataa	caatatcaga	agatggtagc	4380
atgtcgataa	aaaatgaaga	ggaagaacaa	acactgacca	tactcattag	aacaggattg	4440
ctggtgatct	caggactttt	tcctgtatca	ataccaatca	cggcagcagc	atggtacctg	4500
tgggaagtga	agaaacaacg	ggccggagta	ttgtgggatg	ttccttcacc	cccacccatg	4560
ggaaaggctg	aactggaaga	tggagcctat	agaattaagc	aaaaagggat	tcttgatat	4620
tcccagatcg	gagccggagt	ttacaaagaa	ggaacattcc	atacaatgtg	gcatgtcaca	4680
cgtggcgctg	ttctaattgca	taaaggaaag	aggattgaac	caacatgggc	ggacgtcaag	4740
aaagacctaa	tatcatatgg	aggaggctgg	aagttagaag	gagaatggaa	ggaaggagaa	4800
gaagtccagg	tattggcact	ggagcctgga	aaaaatccaa	gagccgtcca	aacgaaacct	4860

ggctcttttca aaaccaacgc cggaacaata ggtgctgtat ctctggactt ttctcctgga	4920
acgtcaggat ctccaattat cgacaaaaaa ggaaaagttg tgggtcttta tggtaatggt	4980
gttgttacaa ggagtggagc atatgtgagt gctatagccc agactgaaaa aagcattgaa	5040
gacaacccag agatcgaaga tcacattttc cgaaagagaa gactgaccat catggacctc	5100
cacccaggag cgggaaagac gaagagatac cttccggcca tagtcagaga agctataaaa	5160
cggggtttga gaacattaat cttggccccc 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 ggtcacggat	5580
tttaaagggg agactgtttg gttcgttcca agtataaaaag caggaaatga tatagcagct	5640
tgcttgagga aaaatggaaa gaaagtgata caactcagta ggaagacctt tgattctgag	5700
tatgtcaaga ctagaaccaa tgattgggac ttcgtggtta caactgacat ttcagaaatg	5760
ggtgccattt tcaaggctga gagggttata gaccccagac gctgcatgaa accagtcata	5820
ctaacagatg gtgaagagcg ggtgattctg gcaggaccta tgccagtgc cactctagt	5880
gcagcacaaa gaagagggag aataggaaga aatccaaaaa 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 gtctggttgg cctacagagt ggcagctgaa	6180
ggcatcaact acgcagacag aagggtggtg tttgatggag tcaagaacaa ccaaactcta	6240
gaagaaaacg tggaagttga aatctggaca aaagaagggg aaaggaagaa attgaaaccc	6300
agatggttgg atgctaggat ctattctgac cactggcgc taaaagaatt taaggaattt	6360
gcagccggaa gaaagtctct gaccctgaac ctaatcacag aaatgggtag gctcccaacc	6420
ttcatgactc agaaggcaag agacgcactg gacaacttag cagtgtgca cacggctgag	6480
gcagggtgaa gggcgtacaa ccatgctctc agtgaactgc cggagaccct ggagacattg	6540
cttttactga cacttctggc tacagtcacg ggagggatct ttttattctt gatgagcgca	6600
aggggcatag ggaagatgac cctgggaatg tgctgcataa tcacggctag catcctccta	6660
tggtacgcac aaatacagcc acactggata gcagcttcaa taatactgga gttttttctc	6720
atagttttgc ttattccaga acctgaaaaa cagagaacac cccaagacaa ccaactgacc	6780
tacgttgtca tagccatcct cacagtgggtg gccgcaacca tggcaaacga gatgggtttc	6840
ctagaaaaaa cgaagaaaga tctcggattg ggaagcattg caaccagca acccgagagc	6900

aacatcctgg	acatagatct	acgtcctgca	tcagcatgga	cgctgtatgc	cgtaggccaca	6960
acatttggtta	caccaatggt	gagacatagc	attgaaaatt	cctcagtga	tgtgtcccta	7020
acagctatag	ccaaccaagc	cacagtgtta	atgggtctcg	ggaaaggatg	gccattgtca	7080
aagatggaca	tcggagttcc	ccttctcgcc	attggatgct	actcacaagt	caaccccata	7140
actctcacag	cagctctttt	cttattggtta	gcacattatg	ccatcatagg	gccaggactc	7200
caagcaaaag	caaccagaga	agctcagaaa	agagcagcgg	cgggcatcat	gaaaaaccca	7260
actgtcgatg	gaataacagt	gattgaccta	gatccaatac	cttatgatcc	aaagtttgaa	7320
aagcagttgg	gacaagtaat	gctcctagtc	ctctgcgtga	ctcaagtatt	gatgatgagg	7380
actacatggg	ctctgtgtga	ggctttaacc	ttagctaccg	ggcccatctc	cacattgtgg	7440
gaaggaaatc	cagggagggtt	ttggaacact	accattgcgg	tgtcaatggc	taacattttt	7500
agagggagtt	acttggccgg	agctggactt	ctcttttcta	ttatgaagaa	cacaaccaac	7560
acaagaaggg	gaactggcaa	cataggagag	acgcttgagg	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	gttggtggcag	aggaggctgg	tcatactatt	gtggaggact	aaagaatgta	7860
agagaagtca	aaggcctaac	aaaaggagga	ccaggacacg	aagaacccat	ccccatgtca	7920
acatatgggt	ggaatctagt	gcgtcttcaa	agtggagttg	acgttttctt	catcccgcga	7980
gaaaagtgtg	acacattatt	gtgtgacata	ggggagtcac	caccaaattc	cacagtggaa	8040
gcaggacgaa	cactcagagt	ccttaactta	gtagaaaatt	ggttgaacaa	caacactcaa	8100
ttttgcataa	aggttctcaa	cccataatg	ccctcagtc	tagaaaaaat	ggaagcacta	8160
caaaggaaat	atggaggagc	cttagtgagg	aatccactct	cacgaaactc	cacacatgag	8220
atgtactggg	tatccaatgc	ttccgggaac	atagtgtcat	cagtgaacat	gattttcaagg	8280
atgttgatca	acagatttac	aatgagatac	aagaaagcca	cttacgagcc	ggatgttgac	8340
ctcgggaagc	gaacccgtaa	catcgggatt	gaaagtgaga	taccaaacct	agatataatt	8400
gggaaaagaa	tagaaaaaat	aaagcaagag	catgaaacat	catggcacta	tgaccaagac	8460
caccataca	aaacgtgggc	ataccatggg	agctatgaaa	caaaacagac	tggatcagca	8520
tcatccatgg	tcaacggagt	ggtcaggctg	ctgacaaaac	cttgggacgt	tgtccccatg	8580
gtgacacaga	tggcaatgac	agacacgact	ccatttgagc	aacagcgcgt	ttttaaaagag	8640
aaagtggaca	cgagaaccca	agaaccgaaa	gaaggcacga	agaaactaat	gaaaataaca	8700
gcagagtggc	tttggaagaa	attaggggag	aaaaagacac	ccaggatgtg	caccagagaa	8760
gaattcacia	gaaaggtgag	aagcaatgca	gccttggggg	ccatattcac	tgatgagaac	8820
aagtgggaag	cggcacgtga	ggctgttgaa	gatagtaggt	tttgggagct	ggttgacaag	8880
gaaaggaatc	tccatcttga	aggaaagtgt	gaaacatgtg	tgtacaacat	gatgggaaaa	8940

agagagaaga agctagggga attcggcaag gcaaaaggca gcagagccat atggtacatg	9000
tggcttggag cacgcttctt agagtttgaa gccctaggat tcttaaataga agatcactgg	9060
ttctccagag agaactccct gagtggagtg gaaggagaag ggctgcacaa gctaggttac	9120
attctaagag acgtgagcaa gaaagagggg ggagcaatgt atgccgatga caccgcagga	9180
tgggatacaa aaatcacact agaagaccta 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 aaactgggtta gcaagagtgg ggcgcgaaa gttatcaaga	9540
atggccatca gtggagatga ttgtgtttg aaacctttag atgacagggt cgcaagcgct	9600
ttaacagctc taaatgacat gggaaagatt aggaaagaca tacaacaatg ggaaccttca	9660
agaggatgga atgattggac acaagtggcc ttctgttcac accatttcca tgagttaatc	9720
atgaaagacg gtcgcgtact cggtgttcca tgtagaaacc aagatgaact gattggcaga	9780
gcccgaatct cccaaggagc aggggtggtct ttgcgggaga cggcctgttt ggggaagtct	9840
tacgccccaa tgtggagctt gatgtacttc cacagacgcg acctcaggct ggcggcaaat	9900
gctatttgct cggcagtacc atcacattgg gttccaacaa gtcgaacaac ctggtccata	9960
catgctaaac atgaatggat gacaacggaa gacatgctga cagtctggaa cagggtgtgg	10020
attcaagaaa acccatggat ggaagacaaa actccagtgg aaacatggga ggaaatccca	10080
tacttgggga aaagagaaga ccaatggtgc ggctcattga ttgggttaac aagcaggggcc	10140
acctgggcaa agaacatcca agcagcaata aatcaagtta gatcccttat aggcaatgaa	10200
gaatacacag attacatgcc atccatgaaa agattcagaa gagaagagga agaagcagga	10260
gttctgtggt agaaagcaaa actaacatga aacaaggcta gaagtcagggt cggattaagc	10320
catagtacgg aaaaaactat gctacctgtg agccccgtcc aaggacgtta aaagaagtca	10380
ggccatcata aatgccatag cttgagtaaa ctatgcagcc tgtagctcca cctgagaagg	10440
tgtaaaaaat ccgggaggcc acaaaccatg gaagctgtac gcatggcgta gtggactagc	10500
ggttagggga gaccctccc 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

102年 4月30日修(更)正本

第 096143113 號專利申請案
中文申請專利範圍替換本(102 年 4 月)

公告本

十、申請專利範圍：

1. 一種登革熱疫苗病毒之用途，其係用於製造用於產生對抗登革熱病毒之免疫作用之單價或四價疫苗，其中該免疫作用包含：

(a)第一次投與包含第一登革熱血清型之疫苗病毒的單價疫苗，其中該疫苗病毒係選自由病毒株 VDV1 及 VDV2 所組成之群，其中病毒株 VDV1 之序列如序列 SEQ ID NO: 1 所示，及病毒株 VDV2 之序列如序列 SEQ ID NO: 2 所示；

(b)第二次投與包含 4 種登革熱血清型之疫苗病毒的四價疫苗，

其中該四價疫苗係在該單價疫苗投與後至少 30 天與不超過 12 個月之間投與。

2. 如請求項 1 之用途，其中該四價疫苗中所用之疫苗病毒為 Chimerivax™ DEN-1、2、3 及 4。
3. 如請求項 1 或 2 之用途，其中登革熱疫苗病毒血清型 1、2、3 及 4 之量係在 10^3 至 10^6 DICC₅₀ 之範圍內。
4. 如請求項 1 或 2 之用途，其中該單價疫苗包含 10^4 DICC₅₀ 之 VDV1 或 VDV2，且四價疫苗包含 10^5 DICC₅₀ 之 Chimerivax™ DEN-1、2、3 及 4。
5. 如請求項 1 或 2 之用途，其中該單價疫苗包含 10^4 DICC₅₀ 之 VDV1 或 VDV2 且該四價疫苗包含 10^5 DICC₅₀ 之 Chimerivax™ DEN-1、2、3 及 10^3 DICC₅₀ 之 Chimerivax™ DEN-4。

6. 如請求項1或2之用途，其中該第二次投與(b)係在第一次投與(a)之30至60天後進行。
7. 一種對抗登革熱病毒之免疫套組，其包含至少含有下列之盒子：(a)第一容器，其含有包含第一登革熱血清型之疫苗病毒之單價疫苗，其中該疫苗病毒係選自由病毒株VDV1及VDV2所組成之群，其中病毒株VDV1之序列如序列SEQ ID NO: 1所示，及病毒株VDV2之序列如序列SEQ ID NO: 2所示；(b)第二容器，其含有包含4種登革熱血清型之疫苗病毒的四價疫苗。
8. 如請求項7之免疫套組，其至少包含：
 - (a)第一容器，其含有包含VDV1或VDV2疫苗病毒之單價疫苗，
 - (b)第二容器，其含有包含4種Chimerivax™ DEN-1、2、3及4之四價疫苗。
9. 如請求項8之免疫套組，其中該單價疫苗包含 10^4 DICC₅₀之VDV1或VDV2，且四價疫苗包含 10^5 DICC₅₀之Chimerivax™ DEN-1、2、3及4。
10. 如請求項8之免疫套組，其中該單價疫苗包含 10^4 DICC₅₀之VDV1或VDV2，且四價疫苗包含 10^5 DICC₅₀之Chimerivax™ DEN-1、2、3及 10^3 DICC₅₀之Chimerivax™ DEN-4。