



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0096272
(43) 공개일자 2020년08월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/12 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01) A61K 47/22 (2017.01)
A61K 47/26 (2017.01) A61K 47/38 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01) A61K 9/19 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/12 (2013.01)
A61K 47/183 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7019204

(22) 출원일자(국제) 2018년12월03일

심사청구일자 2020년07월02일

(85) 번역문제출일자 2020년07월02일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/063541

(87) 국제공개번호 WO 2019/112921

국제공개일자 2019년06월13일

(30) 우선권주장

62/595,842 2017년12월07일 미국(US)

(71) 출원인

머크 샤프 앤드 돔 코퍼레이션

미국 뉴저지 (우편번호 07065-0907) 라웨이 이스
트 링컨 애비뉴 126

(72) 발명자

리안, 마이클, 에스.

미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770

마틴, 세리-앤, 피.

미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장덕순, 심미성

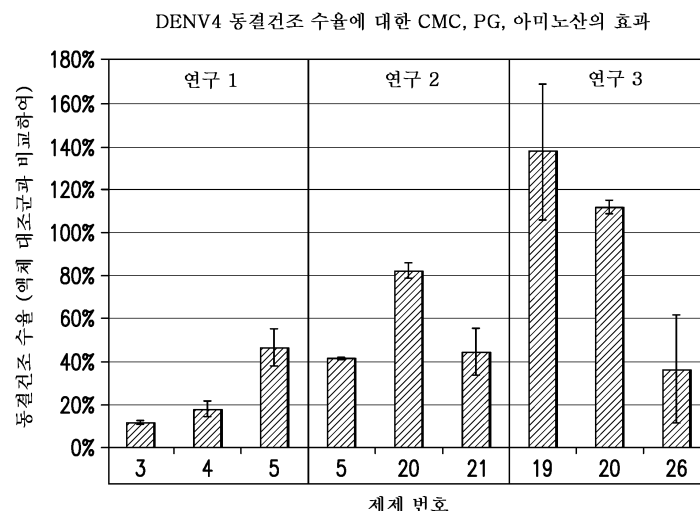
전체 청구항 수 : 총 38 항

(54) 발명의 명칭 **덴기 바이러스 백신 조성물의 제제**

(57) 요약

본 발명은 적어도 1종의 생 약독화 덴기 바이러스 또는 생 약독화 키메라 플라비바이러스를 포함하는 덴기 바이러스 백신, 완충제, 당, 셀룰로스 유도체, 글리콜 또는 당 알콜, 임의로 알칼리 또는 알칼리성 염 및 아미노산의 제제; 및 적어도 1종의 생 약독화 덴기 바이러스 또는 생 약독화 키메라 플라비바이러스를 포함하는 덴기 바이러스 백신, 완충제, 적어도 150 mg/ml의 당, 담체, 및 임의로 알칼리 또는 알칼리성 염 및 아미노산의 제제에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/22 (2013.01)

A61K 47/26 (2013.01)

A61K 47/38 (2013.01)

A61K 9/08 (2013.01)

A61K 9/19 (2013.01)

A61P 31/14 (2018.01)

A61K 2039/5254 (2013.01)

A61K 2039/55505 (2013.01)

(72) 발명자

존스, 모리사

미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770

스텐브로, 저스틴

미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770

밤바니, 아킬레췌

미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770

블루, 제프리 토마스

미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770

픽슬리, 하이디 조앤

미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770

그린-트렉슬러, 에린, 제이.

미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770

이소피, 린 앤

미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770

명세서

청구범위

청구항 1

적어도 1종의 생 약독화 땡기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스 (LACV)를 포함하는 생 약독화 땡기 백신, pH 약 6.5 내지 8.5의 완충제, 당, 글리콜 또는 당 알콜, 및 카르복시메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스 (HPC), 히드록시프로필 메틸셀룰로스 (HPMC), 2-히드록시에틸 셀룰로스 (2-HEC), 크로스카르멜로스 및 메틸 셀룰로스, 또는 그의 제약상 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 셀룰로스 유도체, 임의로 알칼리 또는 알칼리성 염, 및 임의로 Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro 및 Glu, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산을 포함하는 제제.

청구항 2

제1항에 있어서, 완충제가 숙시네이트, 히스티딘, 포스페이트, 트리스, 비스-트리스, MES, MOPS, HEPES, 아세테이트 및 시트레이트, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 제제.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 알칼리 또는 알칼리성 염이 염화마그네슘, 염화칼슘, 염화칼륨, 염화나트륨 또는 그의 조합인 제제.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 당이 트레할로스 또는 수크로스인 제제.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 셀룰로스 유도체가 카르복시메틸 셀룰로스의 제약상 허용되는 염인 제제.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 글리콜이 프로필렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 제제.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 글리콜 또는 당 알콜이 프로필렌 글리콜 또는 글리세롤인 제제.

청구항 8

제1항에 있어서, 약 100-10,000,000 pfu/ml의 적어도 1종의 생 약독화 땡기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스 (LACV)를 포함하는 생 약독화 땡기 백신, pH 약 6.5 내지 8.5의 완충제, 약 50-300 mg/ml 당, 약 2.5-10.0 mg/ml 프로필렌 글리콜 (PG) 또는 글리세롤, 및 약 0.3-10 mg/ml 소듐 카르복시메틸셀룰로스 (소듐 CMC), 임의로 약 10-150 mM NaCl, 및 임의로 약 10-100 mM의 Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro 및 Glu, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산을 포함하는 제제.

청구항 9

제1항에 있어서, 약 100-100,000 pfu/ml의 적어도 1종의 생 약독화 땡기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스 (LACV)를 포함하는 생 약독화 땡기 백신, 약 5-300 mM의 pH 약 7.0 내지 8.0의 히스티딘, 트리스, 비스-트리스 또는 포스페이트 완충제, 또는 그의 조합, 약 50-300 mg/ml 당, 약 3-10 mg/ml 프로필렌 글리콜 또는 글리세롤, 및 약 3-10 mg/ml 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 임의로 약 15-75 mM NaCl, 및 임의로 약 10-75 mM의 Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro 및 Glu, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산을 포함하는 제제.

청구항 10

제1항에 있어서, 약 600-20,000 pfu/ml의 적어도 1종의 생 약독화 땡기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스 (LACV)를 포함하는 생 약독화 땡기 백신, 약 5-300 mM의 pH 약 7.0-8.0의 인산칼륨 완충제, 약 60-120 mg/ml 수크로스, 약 3-7 mg/ml 프로필렌 글리콜 또는 글리세롤, 약 3-7 mg/ml의 평균 분자량 약 90,000을 갖는 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 및 약 30-90 mM NaCl, 및 임의로 약 10-75 mM의 아미노산 Leu, Lys 또는 Glu, 또는 그의 조합을 포함하는 제제.

청구항 11

제1항에 있어서, 약 600-20,000 pfu/ml의 적어도 1종의 생 약독화 땡기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스 (LACV)를 포함하는 생 약독화 땡기 백신, 약 11 mM의 pH 약 7.0-8.0의 인산칼륨 완충제, 약 90 mg/ml 수크로스, 약 5 mg/ml 프로필렌 글리콜 또는 글리세롤, 약 5 mg/ml의 평균 분자량 약 90,000을 갖는 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 및 약 75 mM NaCl을 포함하는 제제.

청구항 12

제1항에 있어서, 약 600-20,000 pfu/ml의 적어도 1종의 생 약독화 땡기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스 (LACV)를 포함하는 생 약독화 땡기 백신, 약 11 mM의 pH 약 7.0-8.0의 인산칼륨 완충제, 약 90 mg/ml 수크로스, 약 5 mg/ml 프로필렌 글리콜, 약 5 mg/ml의 평균 분자량 약 90,000을 갖는 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 약 50 mM NaCl, 및 약 25 mM Leu를 포함하는 제제.

청구항 13

제1항에 있어서, 약 600-20,000 pfu/ml의 적어도 1종의 생 약독화 땡기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스 (LACV)를 포함하는 생 약독화 땡기 백신, 약 11 mM의 pH 약 7.5의 인산칼륨 완충제, 약 90 mg/ml 수크로스, 약 5 mg/ml 프로필렌 글리콜, 약 5 mg/ml의 평균 분자량 약 90,000을 갖는 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 및 약 30 mM NaCl을 포함하는 제제.

청구항 14

제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 약 90-200 mg/ml 트레할로스를 추가로 포함하는 제제.

청구항 15

제1항에 있어서, 약 600-20,000 pfu/ml의 적어도 1종의 생 약독화 땡기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스 (LACV)를 포함하는 생 약독화 땡기 백신, 약 11 mM의 pH 약 7.5-8의 인산칼륨 완충제, 약 90 mg/ml 수크로스, 약 110 mg/ml 트레할로스, 약 5 mg/ml 프로필렌 글리콜, 약 5 mg/ml의 평균 분자량 약 90,000을 갖는 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 약 50 mM NaCl, 및 약 25mM Leu를 포함하는 제제.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 약 0.0001 내지 5% w/v의 폴록사머 188 및 폴록사머 407로부터 선택된 계면활성제를 추가로 포함하는 제제.

청구항 17

약 20-200,000,00 pfu/ml의 적어도 1종의 생 약독화 땡기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스 (LACV)를 포함하는 생 약독화 땡기 백신, pH 약 6.5 내지 8.5의 완충제, 약 150-300 mg/ml의 당, 폴리비닐피롤리돈 (PVP), 카르복시메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스 (HPC), 히드록시프로필 메틸셀룰로스 (HPMC), 2-히드록시에틸 셀룰로스 (2-HEC), 크로스카르멜로스 및 메틸 셀룰로스 또는 그의 제약상 허용되는 염, 인간 혈청 알부민 (HSA) 및 젤라틴으로 이루어진 군으로부터 선택된 담체; 임의로 약 5-100 mM의 알칼리 염 또는 알칼리성 염; 및 임의로 아미노산 Gln, Pro 또는 Glu, 또는 그의 조합을 포함하는 제제.

청구항 18

제17항에 있어서, 완충제가 숙시네이트, 히스티딘, 포스페이트, 트리스, 비스-트리스, MES, MOPS, HEPES, 아세트레이트 및 시트레이트, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 제제.

청구항 19

제17항에 있어서, 알칼리 또는 알칼리성 염이 염화마그네슘, 염화칼슘, 염화칼륨, 염화나트륨 또는 그의 조합인 제제.

청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 당이 트레할로스 또는 수크로스 또는 그의 조합인 제제.

청구항 21

제20항에 있어서, 수크로스 대 트레할로스 비가 1:1 내지 1:4인 제제.

청구항 22

제17항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 담체가 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, HPMC, HSA 또는 젤라틴인 제제.

청구항 23

제17항에 있어서, 약 100-10,000,000 pfu/ml의 적어도 1종의 생 약독화 뎅기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스 (LACV)를 포함하는 생 약독화 뎅기 백신, pH 약 6.5-8.0의 완충제, 약 150-300 mg/ml의 수크로스와 트레할로스의 조합으로서의 당, 약 0.3 내지 40 mg/ml 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, HSA, HPMC 또는 젤라틴, 임의로 약 10-100 mM 알칼리 또는 알칼리성 염, 및 임의로 약 5-25 mM Glu를 포함하는 제제.

청구항 24

제17항에 있어서, 약 100-100,000 pfu/ml의 적어도 1종의 생 약독화 뎅기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스 (LACV)를 포함하는 생 약독화 뎅기 백신, 약 5-300 mM의 pH 약 7.0 내지 8.0의 히스티딘, 트리스 또는 포스페이트 완충제, 또는 그의 조합, 약 50-100 mg/ml 수크로스, 약 90-200 mg/ml 트레할로스, 약 0.3-10 mg/ml 소듐 카르복시메틸 셀룰로스 또는 약 10-40 mg/ml 젤라틴, 및 약 30-90 mM 알칼리 또는 알칼리성 염을 포함하는 제제.

청구항 25

제17항에 있어서, 약 600-20,000 pfu/ml의 적어도 1종의 생 약독화 뎅기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스 (LACV)를 포함하는 생 약독화 뎅기 백신, 약 5-20 mM의 pH 약 7.0-8.0의 인산칼륨, 약 75 mg/ml 수크로스, 약 175 mg/ml 트레할로스, 약 5 mg/ml의 평균 분자량 약 90,000을 갖는 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 및 약 30 mM NaCl을 포함하는 제제.

청구항 26

제17항에 있어서, 약 600-20,000 pfu/ml의 적어도 1종의 생 약독화 뎅기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스 (LACV)를 포함하는 생 약독화 뎅기 백신, 약 5-20 mM의 pH 약 7.0-8.0의 인산칼륨, 약 75 mg/ml 수크로스, 약 175 mg/ml 트레할로스, 약 25 mg/ml 젤라틴, 및 약 30 mM NaCl을 포함하는 제제.

청구항 27

제17항에 있어서, 약 600-20,000 pfu/ml의 적어도 1종의 생 약독화 뎅기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스 (LACV)를 포함하는 생 약독화 뎅기 백신, 약 5-20 mM의 pH 약 7-8의 인산칼륨, 약 250 mg/ml 수크로스, 및 약 50 mg/ml PVP K12를 포함하는 제제.

청구항 28

제17항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 약 0.0001 내지 5% w/v의 폴록사머 188 및 폴록사머 407로부터 선택된 계면활성제를 추가로 포함하는 제제.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 알루미늄 아주반트를 추가로 포함하는 제제.

청구항 30

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 동결 또는 동결건조된 제제.

청구항 31

제8항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 용액 중에서 재구성된 제제.

청구항 32

제8항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조 또는 마이크로웨이브 진공 건조 전에 수용액인 제제.

청구항 33

제31항에 있어서, 재구성이 약 0.5-1.0 ml 염수 용액, 물 또는 정박테리아 주사용수 (BWF1) 및 임의로 알루미늄 아주반트를 포함하는 희석제로 수행되는 것인 제제.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 생 약독화 뎅기 백신이 4가인 제제.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, LAV 또는 LACV가 3' 비번역 (UTR) 영역의 TL-2 스템-루프 구조에 상응하는 약 30개 뉴클레오타이드의 결실을 함유하는 바이러스 게놈을 포함하는 것인 제제.

청구항 36

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 생 약독화 뎅기 바이러스 (LAV)가 3' 비번역 (UTR) 영역의 TL-2 스템-루프 구조에 상응하는 약 30개 뉴클레오타이드의 결실을 함유하고 뎅기 혈청형 3에 대해 면역원성인 바이러스 게놈을 포함하고, 여기서 LAV의 바이러스 게놈은 Δ30 결실로부터 상류에 있는, 3'UTR의 TL-3 구조에 상응하는 뉴클레오타이드의 결실을 추가로 함유하는 것인 제제.

청구항 37

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 백신이 rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30/31 및 rDEN4Δ30인 적어도 4종의 생 약독화 뎅기 바이러스 (LAV)를 포함하는 것인 제제.

청구항 38

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 백신이 rDEN1Δ30-1545, rDEN2/4Δ30 (ME)-1495,7163, rDEN3Δ30/31-7164 및 rDEN4Δ30-7132,7163,8308인 적어도 4종의 생 약독화 뎅기 바이러스 (LAV)를 포함하는 것인 제제.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 적어도 1종의 생 약독화 뎅기 바이러스 또는 생 약독화 키메라 플라비바이러스를 포함하는 뎅기 바이러스 백신, 완충제, 당, 셀룰로스 유도체 및 당 알콜 또는 글리콜, 및 임의로 아미노산 및 알칼리 또는 알칼리성 염의 제제; 및 적어도 1종의 생 약독화 뎅기 바이러스 또는 생 약독화 키메라 플라비바이러스를 포함하는 뎅기 바이러스 백신, 완충제, 적어도 150 mg/ml의 당, 담체, 및 임의로 알칼리 또는 알칼리성 염 또는 알칼리 또는 알칼리성 염 및 아미노산의 제제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

플라비비리다에(Flaviviridae) 과는 황열 바이러스 (YF), 뎅기 바이러스의 4종의 혈청형 (DENV-1, DENV-2,

DENV-3 및 DENV-4), 일본 뇌염 바이러스 (JE), 진드기-매개된 뇌염 바이러스 (TBE), 웨스트 나일 바이러스 (WN), 세인트 루이스 뇌염 바이러스 (SLE), 및 약 70종의 다른 질환 유발 바이러스를 포함한다. 플라비바이러스는 단일 양성-가닥 RNA 게놈을 함유하는 소형 외피보유 바이러스이다. 10종의 유전자 산물은 단일 오픈 리딩 프레임에 의해 코딩되고, 다음 순서로 조직화된 폴리단백질로서 번역된다: 캡시드 (C), "전구막" (prM, 이는 세포로부터 비리온 방출 직전에 "막" (M)으로 프로세싱됨), "외피" (E), 이어서 비-구조 (NS) 단백질 NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b 및 NS5 (문헌 [Chambers, T. J. et al., Annual Rev Microbiol (1990) 44:649-688; Henchal, E. A. and Putnak, J. R., Clin Microbiol Rev. (1990) 3:376-396]에서 검토됨). 이어서, 숙주뿐만 아니라 바이러스에 의해 코딩되는 프로테아제에 의해 매개된 정밀한 프로세싱 사건을 통해 개별 플라비바이러스 단백질이 생산된다.

[0003] 플라비바이러스의 외피는 숙주 세포 막으로부터 유래되고, 바이러스에 의해 코딩되는 막 고정된 막 (M) 및 외피 (E) 당단백질을 함유한다. E 당단백질은 가장 큰 바이러스 구조 단백질이고, 세포 표면 부착 및 엔도솜내 융합 활성을 담당하는 기능적 도메인을 함유한다. 또한, 이것은 보호 면역과 연관된 바이러스 중화 항체의 생산을 유도하는 숙주 면역계의 주요 표적이다.

[0004] 뎅기 바이러스는 아에데스(*Aedes*) 속, 주로 에이. 아에집티(*A. aegypti*) 및 에이. 알보픽투스(*A. albopictus*)의 모기에 의해 인간에게 전염된다. 뎅기 바이러스에 의한 감염은 불현성 또는 경도 열성 질병부터, 전형적 뎅기 열 (DF)을 거쳐, 뎅기 출혈열/뎅기 쇼크 증후군 (DHF/DSS)에 이르는 다양한 임상 양상을 유발한다. 뎅기열은 고열, 두통, 관절 및 근육 통증, 발진, 림프절병증 및 백혈구감소증을 특징으로 한다 (Gibbons, R. V. and D. W. Vaughn, British Medical Journal (2002) 324:1563-1566). DHF/DSS는 아동에서 보다 흔한 감염의 보다 중증의 형태로서, 점상출혈 및 반상출혈의 존재부터 자발적 중증 출혈 및 심각한 쇼크에 이르는 혈관 투과성 및/또는 중증 출혈성 징후로 나타난다. 진단 및 즉각적인 의료 개입이 없을 때, DHF/DSS의 돌연 발병 및 급속 진행은 치료되지 않는 한 치명적일 수 있다.

[0005] 뎅기 바이러스는 전세계 이환율 및 사망률의 측면에서 절지동물-전염 바이러스의 가장 유익한 군이며, 적어도 3천6백만건의 뎅기열 사건 및 250,000 내지 500,000건의 DHF/DSS 사건을 포함하여 매년 1억건의 뎅기 감염이 발생하는 것으로 추정된다 ([Gubler, D. J., Clin. Microbiol. Rev. (1998) 11:480-496]; [Gibbons, 상기 문헌]). 전세계 인구 증가, 특히 열대지방 전체에 걸친 인구의 도시화 및 지속적인 모기 방제 조치의 결여 하에, 뎅기의 모기 매개체는 열대, 아열대 및 일부 온대 지역 전체에 걸쳐 그 분포를 확장하였고, 이 때문에 전세계 인구의 절반을 넘는 인구가 뎅기 감염의 위험에 노출되고 있다. 현대의 항공 여행 및 인간 이동은 뎅기 혈청형의 전세계 분포를 촉진하였고, 이에 의해 다중 혈청형의 뎅기가 많은 지역에서 현재 풍토병성이다. 지난 20년 이상 동안 뎅기 전염병의 빈도 및 DHF/DSS의 발생률이 증가하여 왔다. 예를 들어, 동남 아시아에서, DHF/DSS는 아동 입원 및 사망의 주요 원인이다 ([Gubler, 상기 문헌]; [Gibbons and Vaughn, 상기 문헌]).

[0006] 현재까지, 플라비바이러스 백신의 개발은 혼합적인 성공을 거두었다. 플라비바이러스에 의해 유발되는 질환에 대해 보호하기 위한 백신 후보를 생산하려는 노력으로 실시된 것이 다음 4가지 기초 접근법이다: 생 약독화, 불활성화된 전체 바이러스, 재조합 서브유닛 단백질 및 DNA-기반 백신. 황열 바이러스용 생 약독화 백신은 수십 년 동안 이용가능하였고, 보다 최근에는 일본 뇌염용 생 약독화 백신이 세계 다양한 국가에서 등록되었다. 불활성화된 전체 바이러스 백신의 사용은 TBE 및 JE 바이러스에 대해 입증되었고, 여러 등록된 제품이 이용가능하다. 문헌 [Heinz et al. Flavivirus and flavivirus vaccines. Vaccine 30: 4301-06 (2012)].

[0007] 상기 강조된 YF, JE 및 TBE 백신의 성공에도 불구하고, 뎅기 바이러스에 대한 백신을 개발하기 위한 생-약독화 바이러스 및 불활성화된 바이러스 방법의 사용은 유의한 도전에 직면하였다. 뎅기 바이러스의 4종의 혈청형 (DENV1, DENV2, DENV3 및 DENV4)이 존재하고, 각각의 혈청형의 균주는 세계의 뎅기 풍토병성 지역 전체에 걸쳐 순환하는 것으로 밝혀져 있다. 천연 감염은 감염성 혈청형에 오래 지속되는 면역을 부여하지만, 다른 뎅기 혈청형에는 그렇지 않다. 보다 중증의 형태의 질환 (DHF/DSS)은 뎅기 바이러스의 하나의 혈청형으로 감염된 후에 또 다른 혈청형으로의 제2 감염이 이어지는 2차 뎅기 감염 후에 가장 종종 발생한다. DHF 및 DSS와 2차 뎅기 감염의 보다 빈번한 연관성은 한 바이러스 유형으로의 감염에 의해 유도된 비-중화 항체가 제2 뎅기 바이러스 유형의 감염성을 증진시키는 것 (항체 의존성 증진 - ADE)에 기인한 것으로 가정되었다.

[0008] 현재까지, 대다수의 임상 시험된 백신은 생 약독화 백신이다. 비-복제 백신 후보의 사용이 또한 연구되고 있다. 예를 들어, 아이비 등(Ivy et al.) (미국 특허 6,432,411)은 DEN1-4 80% E (DENV-2 외피 폴리펩티드의 아미노산 1-395에 상응하는 DEN1-4의 펩티드 영역) 단백질을 포함하는 4가 서브유닛 백신을 개시하고 있다. 아이비 등은 상기 문헌에서 또한 DENV 1-4 80% E 및 이스코매트릭스(ISCOMATRIX)® 아주반트를 포함하는 조성물을

보고하고 있다. 콜러 등(Coller et al.) (WO 2012/154202)은 DEN 1-4의 DEN1-4 80% E를 포함하는 4가 제제를 개시하고 있다. 불활성화된 바이러스는 또한 잠재적 백신 후보로서 또는 유효 백신의 성분으로서 사용될 수 있다 (Putnak et al. Vaccine 23: 4442-4452 (2005), US 6190859, US 6254873 및 Sterner et al. WO 2007/002470). 생 약독화 덩기 바이러스 백신 및 비-복제 덩기 백신을 포함하는 조성물은 국제 특허 출원 번호 PCT/US14/042625 (WO2014/204892)에 개시되어 있다.

[0009] 전체 바이러스는 체액성 및 세포성 면역 반응을 생성하는 능력으로 인해 여러 백신 제품에서 통상적으로 사용되는 항원 중 하나이다. 전체 바이러스를 함유하는 백신 제품은 이들이 열, 동결/해동 및 다른 가공 스트레스에 민감하여 상당한 효력 손실을 초래하므로 안정화에 어려움을 겪고 있다. 이들 제품은 전형적으로 동결된 채로 (-20℃ 미만) 또는 건조 분말로서 저장된다. 동결 제품은 효력 손실을 방지하기 위해 엄격한 저온-유통체계 요건을 필요로 하므로 저장 및 분배가 용이하지 않다. 전체 바이러스, 특히 외피보유 바이러스의 건조는 종종 건조 공정 동안 직면하는 동결 및 건조 스트레스로 인해 상당한 효력 손실을 초래한다. 따라서, 관련 기술분야에서는 덩기 바이러스의 안정한 제제를 생성할 필요성이 있다.

발명의 내용

[0010] 본 발명은 생 약독화 덩기 백신의 안정한 제제를 제공한다. 셀룰로스 유도체 및 당 알콜 또는 글리콜의 첨가는 건조 후 안정성 및/또는 수율을 개선시켰다. 대안적으로, 적어도 150 mg/ml의 당의 첨가는 마이크로웨이브 건조 후 안정성 및/또는 수율을 개선시켰다.

[0011] 한 측면에서, 본 발명은 적어도 1종의 생 약독화 덩기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스 (LACV)를 포함하는 생 약독화 덩기 백신, pH 약 6.5 내지 8.5의 완충제, 당, 글리콜 또는 당 알콜, 및 카르복시메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스 (HPC), 히드록시프로필 메틸셀룰로스 (HPMC), 2-히드록시에틸 셀룰로스 (2-HEC), 크로스카르멜로스 및 메틸 셀룰로스, 또는 그의 제약상 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 셀룰로스 유도체; 임의로 알칼리 또는 알칼리성 염, 및 임의로 Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro 또는 Glu, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산을 포함하는 제제를 제공한다.

[0012] 한 실시양태에서, 완충제는 숙시네이트, 히스티딘, 포스페이트, 트리스, 비스-트리스, MES, MOPS, HEPES, 아세테이트 및 시트레이트, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 알칼리 또는 알칼리성 염은 염화마그네슘, 염화칼슘, 염화칼륨, 염화나트륨 또는 그의 조합이다. 추가 실시양태에서, 당은 트레할로스 또는 수크로스이다. 한 실시양태에서, 셀룰로스 유도체는 카르복시메틸 셀룰로스의 제약상 허용되는 염이다. 또 다른 실시양태에서, 글리콜은 프로필렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리메틸렌 글리콜 모노메틸 에테르로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 실시양태에서, 당 알콜은 글리세롤이다.

[0013] 또 다른 측면에서, 제제는 약 100-10,000,000 pfu/ml의 적어도 1종의 생 약독화 덩기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스를 포함하는 생 약독화 덩기 백신, pH 약 6.5 내지 8.5의 완충제, 약 50-300 mg/ml 당, 약 2.5-10.0 mg/ml 프로필렌 글리콜 (PG) 또는 글리세롤, 및 약 0.3-10 mg/ml 소듐 카르복시메틸셀룰로스 (소듐 CMC), 임의로 약 10-150 mM NaCl, 및 임의로 약 10-100 mM의 Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro 또는 Glu, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산; 약 100-100,000 pfu/ml의 생 약독화 덩기 백신, 약 5-300 mM의 pH 약 7.0 내지 8.0의 히스티딘, 트리스, 비스-트리스 또는 포스페이트 완충제, 또는 그의 조합, 약 50-300 mg/ml 당, 약 3-10 mg/ml 프로필렌 글리콜 또는 글리세롤, 및 약 3-10 mg/ml 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 임의로 약 15-75 mM NaCl, 및 임의로 약 10-75 mM의 Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro 또는 Glu 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산; 약 600-20,000 pfu/ml의 생 약독화 덩기 백신, 약 5-300 mM의 pH 약 7.0-8.0의 인산칼륨 완충제, 약 60-120 mg/ml 수크로스 또는 트레할로스 또는 그의 조합, 약 3-7 mg/ml 프로필렌 글리콜 또는 글리세롤 및 약 3-7 mg/ml의 평균 분자량 약 90,000을 갖는 소듐 카르복시메틸셀룰로스 및 약 30-90 mM NaCl 및 임의로 약 10-75 mM 아미노산 Leu, Lys 또는 Glu 또는 그의 조합; 약 600-20,000 pfu/ml의 생 약독화 덩기 백신, 약 11 mM의 pH 약 7.0-8.0의 인산칼륨 완충제, 약 90 mg/ml 수크로스, 약 5 mg/ml 프로필렌 글리콜 또는 글리세롤, 약 5 mg/ml의 평균 분자량 약 90,000을 갖는 소듐 카르복시메틸셀룰로스 및 약 75 mM NaCl; 약 600-20,000 pfu/ml의 생 약독화 덩기 백신, 약 11 mM의 pH 약 7.0-8.0의 인산칼륨 완충제, 약 90 mg/ml 수크로스, 약 5 mg/ml 프로필렌 글리콜, 약 5 mg/ml의 평균 분자량 약 90,000을 갖는 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 약 50 mM NaCl, 및 약 25 mM Leu; 약 600-20,000 pfu/ml의 생 약독화 덩기 백신, 약 11 mM의 pH 약 7.5의 인산칼륨 완충제, 약 90 mg/ml 수크로스, 약 5 mg/ml 프로필렌 글리콜, 약 5 mg/ml의 평균 분자량 약 90,000을 갖는 소듐 카르복시메틸셀룰로스 및 약 30 mM NaCl을 포함한다. 상

기 실시양태의 한 측면에서, 제제는 약 90-200 mg/ml 트레할로스를 추가로 포함한다.

[0014] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 제제는 약 600-20,000 pfu/ml의 적어도 1종의 생 약독화 뎅기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스를 포함하는 생 약독화 뎅기 백신, 약 11 mM의 pH 약 7.5-8의 인산칼륨 완충제, 약 90 mg/ml 수크로스, 약 110 mg/ml 트레할로스, 약 5 mg/ml 프로필렌 글리콜, 약 5 mg/ml의 평균 분자량 약 90,000을 갖는 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 약 50 mM NaCl, 및 약 25mM Leu를 포함한다. 상기 실시양태의 한 측면에서, 제제는 약 0.0001 내지 5% w/v의 폴록사머 188 및 폴록사머 407로부터 선택된 계면활성제를 추가로 포함한다.

[0015] 본 발명은 또한 약 100-10,000,000 pfu/ml의 적어도 1종의 생 약독화 뎅기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스를 포함하는 생 약독화 뎅기 백신, pH 약 6.5 내지 8.5의 완충제, 약 150-300 mg/ml의 당, 폴리비닐피롤리돈 (PVP), 카르복시메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스 (HPC), 히드록시프로필 메틸셀룰로스 (HPMC), 2-히드록시에틸 셀룰로스 (2-HEC), 크로스카르멜로스, 메틸 셀룰로스 또는 그의 제약상 허용되는 염, 인간 혈청 알부민 (HSA) 및 젤라틴으로 이루어진 군으로부터 선택된 담체; 임의로 약 5-100 mM의 알칼리 염 또는 알칼리성 염; 임의로 아미노산 Gln, Pro 또는 Glu, 또는 그의 조합을 포함하는 제제를 제공한다.

[0016] 한 실시양태에서, 완충제는 숙시네이트, 히스티딘, 포스페이트, 트리스, 비스-트리스, MES, MOPS, HEPES, 아세트레이트 및 시트레이트, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 알칼리 또는 알칼리성 염은 염화마그네슘, 염화칼슘, 염화칼륨, 염화나트륨 또는 그의 조합이다. 추가 실시양태에서, 당은 트레할로스 또는 수크로스 또는 그의 조합이다. 한 실시양태에서, 수크로스 대 트레할로스 비는 1:1 내지 1:4이다. 또 다른 실시양태에서, 담체는 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, HPMC, HSA 또는 젤라틴이다.

[0017] 추가 측면에서, 본 발명은 약 200-100,000 pfu/ml의 적어도 1종의 생 약독화 뎅기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스를 포함하는 생 약독화 뎅기 백신, pH 약 6.5-8.0의 완충제, 약 150-300 mg/ml의 수크로스와 트레할로스의 조합으로서의 당, 약 0.3 내지 40 mg/ml 소듐 CMC, HSA, HPMC 또는 젤라틴, 임의로 약 10-100 mM 알칼리 또는 알칼리성 염, 및 임의로 약 5-25 mM 글루탐산; 약 600-20,000 pfu/ml의 생 약독화 뎅기 백신, 약 5-300 mM의 pH 약 7.0 내지 8.0의 히스티딘, 트리스 또는 포스페이트 완충제, 또는 그의 조합, 약 50-100 mg/ml 수크로스, 약 90-200 mg/ml 트레할로스, 약 0.3-10 mg/ml 소듐 CMC 또는 약 10-40 mg/ml 젤라틴, 및 약 30-90 mM 알칼리 또는 알칼리성 염; 약 600-20,000 pfu/ml의 생 약독화 뎅기 백신, 약 5-20 mM의 pH 약 7-8의 인산칼륨, 약 75 mg/ml 수크로스, 약 175 mg/ml 트레할로스, 약 5 mg/ml의 평균 분자량 약 90,000을 갖는 소듐 CMC, 및 약 30 mM NaCl; 약 600-20,000 pfu/ml의 생 약독화 뎅기 백신, 약 5-20 mM의 pH 약 7.0-8.0의 인산칼륨, 약 75 mg/ml 수크로스, 약 175 mg/ml 트레할로스, 약 25 mg/ml 젤라틴, 및 약 30 mM NaCl; 약 600-20,000 pfu/ml의 생 약독화 뎅기 백신, 약 5-20 mM의 pH 약 7.0-8.0의 인산칼륨, 약 250 mg/ml 수크로스, 및 약 50 mg/ml PVP K12의 제제를 제공한다. 상기 실시양태의 한 측면에서, 제제는 약 0.0001 내지 5% w/v의 폴록사머 188 및 폴록사머 407로부터 선택된 계면활성제를 추가로 포함한다.

[0018] 상기 실시양태의 특정 측면에서, 제제는 알루미늄 아주반트를 추가로 포함한다. 상기 제제는 동결 또는 동결건조될 수 있거나 또는 용액 중에서 재구성될 수 있다. 한 실시양태에서, 재구성은 약 0.5-1.0 ml 염수 용액, 물 또는 정박테리아 주사용수 (BWFI) 및 임의로 알루미늄 아주반트를 포함하는 희석제로 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 동결건조 또는 마이크로웨이브 진공 건조 전에 수용액이다.

[0019] 한 실시양태에서, 생 약독화 뎅기 백신은 4가 생 약독화 뎅기 바이러스 또는 생 약독화 키메라 플라비바이러스를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, LAV 또는 LACV는 3' 비번역 (UTR) 영역의 TL-2 스템-루프 구조에 상응하는 약 30개 뉴클레오티드의 결실을 함유하는 바이러스 게놈을 포함하고; 이는 바이러스의 복제 능력을 감소시킨다. 추가 실시양태에서, 생 약독화 뎅기 바이러스는 3' 비번역 (UTR) 영역의 TL-2 스템-루프 구조에 상응하는 약 30개 뉴클레오티드의 결실을 함유하고 뎅기 혈청형 3에 대해 면역원성인 바이러스 게놈을 포함하는 LAV이고, 여기서 LAV의 바이러스 게놈은 Δ30 결실로부터 상류에 있는, 3'UTR의 TL-3 구조에 상응하는 뉴클레오티드의 결실을 추가로 함유한다.

[0020] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 생 약독화 뎅기 백신은 DEN1Δ30 바이러스, DEN2/4Δ30 바이러스 (DEN4 백본 상의 DEN2 Δ30LACV), DEN3Δ30 바이러스 및 DEN4Δ30 바이러스를 포함하는 생 약독화 4가 백신이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 생 약독화 뎅기 바이러스는 rDEN1Δ30-1545, rDEN2/4Δ30 (ME)-1495,7163, rDEN3Δ30/31-7164 및 rDEN4Δ30-7132,7163,8308을 포함하는 LAV이다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1: DEN4 제제에서 DENV4 동결건조 수율에 대한 소듐 CMC, PG, 아미노산의 효과.
- 도 2: DEN4 제제에서 DENV4 안정성에 대한 소듐 CMC, PG, 아미노산의 효과. 제제 26 (*)은 25℃에서의 저장 후 케이크 붕괴로 인해 시험하지 않았다.
- 도 3: DEN4 제제에서 DENV4 동결건조 수율에 대한 당 알콜의 효과.
- 도 4: DEN4 제제에서 DENV4 안정성에 대한 당 알콜의 효과.
- 도 5: DEN4 제제에서 DENV4 동결건조 수율에 대한 pH의 효과.
- 도 6: DEN4 제제에서 DENV4 안정성에 대한 pH의 효과.
- 도 7: DEN4 제제에서 DENV4 동결건조 수율에 대한 완충제의 효과.
- 도 8: DEN4 제제에서 DENV4 안정성에 대한 완충제의 효과.
- 도 9: DEN4 제제에서 DENV4 동결건조 수율에 대한 NaCl 농도의 효과.
- 도 10: DEN4 제제에서 DENV4 안정성에 대한 NaCl 농도의 효과.
- 도 11: 땀기 혈청형의 동결건조 수율에 대한 프로필렌 글리콜 및 글리세롤의 효과.
- 도 12: 땀기 혈청형의 안정성에 대한 프로필렌 글리콜 및 글리세롤의 효과.
- 도 13: 동결, 마이크로웨이브 건조 (MVD) 및 동결건조 (1yo) DEN1 제제의 상대 효력에 대한 L-15 농도의 효과.
- 도 14: 동결, 마이크로웨이브 건조 (MVD) 및 동결건조 (1yo) DEN2 제제의 상대 효력에 대한 L-15 농도의 효과.
- 도 15: 동결, 마이크로웨이브 건조 (MVD) 및 동결건조 (1yo) DEN3 제제의 상대 효력에 대한 L-15 농도의 효과.
- 도 16: 동결, 마이크로웨이브 건조 (MVD) 및 동결건조 (1yo) DEN4 제제의 상대 효력에 대한 L-15 농도의 효과.
- 도 17: 동결, 마이크로웨이브 건조 (MVD) 및 동결건조 (1yo) DEN1 제제의 상대 효력.
- 도 18a-b: a) 1주 후 37℃에서 4가 제제의 안정성. b) 1개월 후 25℃에서의 4가 제제의 안정성.
- 도 19a-d: 18개월까지 3개월마다 시험된 2-8℃에서의 4가 제제 (DEN1-DEN4)의 안정성.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한, 단수 형태는 복수 지시대상을 포함한다.
- [0023] "또는"에 대한 언급은 문맥에서 나타난 가능성들 중 하나를 명백하게 지시하지 않는 한, 어느 하나 또는 둘 다의 가능성을 나타낸다. 일부 경우에, "및/또는"은 어느 하나 또는 둘 다의 가능성을 강조하는데 사용되었다.
- [0024] 물질 또는 조성물의 양 (예를 들어, mM 또는 M), 제제 성분의 백분율 (v/v 또는 w/v), 용액/제제의 pH, 또는 방법에서 단계를 특징화하는 파라미터의 값 등을 수식할 때, 용어 "약"은, 예를 들어 물질 또는 조성물의 제조, 특징화 및/또는 사용에 수반되는 전형적인 측정, 취급 및 샘플링 절차를 통해; 이들 절차에서의 기기 오류를 통해; 조성물을 제조 또는 사용하는데, 또는 절차를 수행하는데 사용되는 성분의 제조, 공급원 또는 순도에서의 차이 등을 통해 발생할 수 있는 수량의 변동을 지칭한다. 특정 실시양태에서, "약"은 ± 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% 또는 10%의 변동을 의미할 수 있다.
- [0025] 용어 "별킹제"는 동결-건조된 생성물의 구조를 제공하는 작용제를 포함한다. 별킹제에 사용되는 통상의 예는 만니톨, 글리신 및 락토스를 포함한다. 제약상 우아한 케이크를 제공하는 것 이외에도, 별킹제는 또한 붕괴 온도를 변화시키고, 동결-해동 보호를 제공하고, 장기 저장에 걸친 단백질 안정성을 증진시키는 것에 관하여 유용한 품질을 부여할 수 있다. 이들은 또한 장성 개질제로서의 역할을 할 수 있다.
- [0026] "땀기 바이러스 참조 샘플"은 땀기 바이러스 제제 시험 샘플과 동일한 땀기 바이러스 제제 성분 및 비를 갖고, 땀기 바이러스 제제를 땀기 바이러스 제제 시험 샘플과 동일한 조건 하에 건조 (즉, 동결건조, 마이크로웨이브 건조, 리오스피어 건조)시킨 직후의 고체 조성물, 또는 땀기 바이러스의 감염성 손실이 없거나 최소인 조건에서

저장 (즉, -70°C 이하에서 저장)한 상기 건조된 고체 조성물; 또는 -70°C 에서 동결된 고형 탱기 바이러스 제제를 지칭한다.

- [0027] "글리콜"은 2개의 히드록실 기를 갖는 화학적 화합물을 지칭한다.
- [0028] "감염성 손실"은 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 탱기 바이러스 참조 샘플에 대해 탱기 바이러스 시험 샘플의 바이러스 복제 손실을 비교하는 것을 지칭한다. 한 실시양태에서, 감염성 손실은 탱기 상대 감염성 검정을 사용하여 측정된다. 또 다른 실시양태에서, 감염성 손실은 플라크 검정을 사용하여 측정된다.
- [0029] 용어 "동결건조", "동결건조된" 및 "동결-건조된"은 건조시키고자 하는 물질을 먼저 동결시키고, 이어서 진공 환경에서 승화에 의해 얼음 또는 동결 용매를 제거하는 공정을 지칭한다. 저장시 동결건조 제품의 안정성을 증진시키기 위해 사전-동결건조된 제제 내에 부형제가 포함될 수 있다.
- [0030] 본원에 사용된 "리오스피어"는 실질적으로 구형 또는 타원형인, 치료적 활성제를 포함하는 동결 건조된 단일체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 리오스피어 직경은 약 2 내지 약 12 mm, 바람직하게는 2 내지 8 mm, 예컨대 2.5 내지 6 mm 또는 2.5 내지 5 mm이다. 일부 실시양태에서, 리오스피어의 부피는 약 20 내지 550 μL , 바람직하게는 20 내지 100 μL , 예컨대 20 내지 50 μL 이다. 리오스피어가 실질적으로 구형이 아닌 실시양태에서, 리오스피어의 크기는 더 긴 치수 대 더 짧은 치수의 비인 종횡비에 관하여 기재될 수 있다. 리오스피어의 종횡비는 0.5 내지 2.5, 바람직하게는 0.75 내지 2, 예컨대 1 내지 1.5일 수 있다.
- [0031] 본원에 사용된 "마이크로웨이브 진공 건조"는 승화를 통해 백신 제제의 건조된 백신 제품 (바람직하게는, < 6% 수분)을 형성하기 위해 마이크로웨이브 방사선 (방사 에너지 또는 비-이온화 방사선으로도 공지됨)을 이용하는 건조 방법을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 마이크로웨이브 건조는 US2016/0228532에 기재된 바와 같이 수행된다. 한 실시양태에서, 마이크로웨이브 방사선은 진행과 포맷이다.
- [0032] 본원에 사용된 "재구성된 용액"은 재구성된 용액 중에 고체 형태 (예컨대 동결건조 케이크)의 건조된 바이러스가 분산되도록 바이러스를 희석제 중에 용해시킴으로써 제조된 것이다. 재구성된 용액은 투여 (예를 들어 근육 내 투여)에 적합하고, 임의로 피하 투여에 적합할 수 있다.
- [0033] 본원에 사용된 "염(들)"은 무기 산 및/또는 유기 산과 형성된 산성 염, 뿐만 아니라 무기 염기 및/또는 유기 염기와 형성된 염기성 염을 나타낸다. 다른 염이 또한 유용할지라도, 제약상 허용되는 (즉, 비-독성의 생리학상 허용되는) 염이 바람직하다. 예시적인 염기성 염은 암모늄 염, 알칼리 금속 염, 예컨대 나트륨, 리튬 및 칼륨 염, 알칼리 토금속 염, 예컨대 칼슘 및 마그네슘 염, 아연 염, 유기 염기 (예를 들어, 유기 아민), 예컨대 N-Me-D-글루카민, 콜린, 트로메타민, 디시클로헥실아민, t-부틸 아민과의 염, 및 아미노산, 예컨대 아르기닌, 리신의 염 등을 포함한다.
- [0034] "당 알콜"은 당으로부터 유도된 폴리올을 지칭하고, 화학식 $\text{HOCH}_2(\text{CHOH})_n\text{CH}_2\text{OH}$ ($n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$ 또는 10)를 갖는다. 예는 만니톨, 소르비톨, 에리트리톨, 크실리톨 및 글리세롤을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0035] 본원에 사용된 "x% (w/v)"는 x g/100 ml과 동등하다 (예를 들어 5% w/v는 50 mg/ml과 동일함).
- [0036] 본원에서 "LAV"로도 지칭되는 용어 "생 약독화 탱기 바이러스"는 탱기 바이러스의 질량 유발 능력이 야생형 탱기 바이러스와 비교하여 감소된 것을 의미한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 바이러스가 배양, 계대 또는 증식될 때 돌연변이를 겪을 수 있음을 이해할 것이다. LAV는 클로닝 목적을 위해 도입된 돌연변이 이외에도 이들 자연 발생 돌연변이를 함유할 수 있다. LAV는 이들 돌연변이를 갖지 않거나 또는 1개 이상을 갖는 균질 또는 불균질 집단일 수 있다.
- [0037] 용어 "생 약독화 키메라 바이러스" (대안적으로 "생 약독화 키메라 플라비바이러스") 또는 "LACV"는, 바이러스 게놈이 제1 플라비바이러스의 핵본 (C, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B 및 NS5 유전자 포함) 및 제2 플라비바이러스의 전구막 (prM) 및 외피 (E) 유전자를 포함하고, 제2 플라비바이러스가 DENV1, DENV2, DENV3 또는 DENV4로부터 선택된 것인 생 약독화 키메라 바이러스를 지칭한다. 제1 플라비바이러스는 상이한 탱기 혈청형 또는 또 다른 플라비바이러스, 예컨대 황열 바이러스일 수 있다.
- [0038] 용어 " $\Delta 30$ LAV"는 생 약독화 DEN1, DEN2, DEN3 또는 DEN4 바이러스이며, 여기서 LAV는 3' 비번역 (UTR) 영역의 TL2 스템-루프 구조에 상응하는 약 30개 뉴클레오타이드 (nt)인 약 nt 143에서 약 nt 172의 결실을 함유하는 바이러스 게놈을 포함하고, 이는 바이러스의 복제 능력을 감소시키는 것인 바이러스를 지칭한다 (WO 03/092592

및 [Whitehead et al., 미국 특허 번호 8,337,860] 참조).

- [0039] 용어 " $\Delta 30$ LACV"는 DENV 1-4로부터의 생 약독화 키메라 플라비바이러스 (LACV)이며, 여기서 LACV는 3' UTR 영역의 TL2 스템-루프 구조에 상응하는 약 30개 nt인 약 nt 143에서 약 nt 172의 결실을 함유하는 바이러스 게놈을 포함하고, 이는 바이러스의 복제 능력을 감소시키는 것인 바이러스를 지칭한다 (WO 03/092592 및 [Whitehead et al., 미국 특허 번호 8,337,860] 참조).
- [0040] 용어 " $\Delta 30/\Delta 31$ LAV"는 생 약독화 DEN1, DEN2, DEN3 또는 DEN4 바이러스이며, 여기서 바이러스 게놈은 3' UTR의 TL2 스템-루프 구조의 약 30개 nt의 결실을 포함하고, 3' UTR의 약 nt 258-228에서의 약 31개 nt의 별개의 비인접 상류 결실을 추가로 포함하며, 이러한 결실은 탱기 3'UTR의 TL-3 상동 구조의 5' 경계에 이르기까지 결실이 연장되도록 TL-3 상동 구조를 차지하는 서열을 제거하는 것인 바이러스를 지칭한다. 문헌 [Whitehead et al., 미국 특허 번호 8,337,860]을 참조한다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, DEN3 LAV는 $\Delta 30/\Delta 31$ 돌연변이를 포함한다.
- [0041] 용어 " $\Delta 30/\Delta 31$ LACV"는 상기 기재된 바와 같은 생 약독화 키메라 DEN1, DEN2, DEN3 또는 DEN4 바이러스이며, 여기서 키메라 바이러스의 바이러스 게놈은 3' UTR의 TL2 스템-루프 구조의 30개 nt 결실을 포함하고, 상기 기재된 바와 같이 TL-3 구조를 결실시키는 3' UTR의 별개의 비인접 상류 31개 nt 결실을 추가로 포함하는 것인 바이러스를 지칭한다.
- [0042] 용어 "LATV" 또는 "생 약독화 4가 탱기 백신" 또는 "LATV 백신"은 유효량의 DEN1 LAV 또는 LACV, DEN2 LAV 또는 LACV, DEN3 LAV 또는 LACV 및 DEN4 LAV 또는 LACV를 포함하는 백신을 지칭한다. 한 실시양태에서, 탱기 LAV 또는 LACV 중 적어도 하나는 상기 및 WO 03/092592에 기재된 바와 같이 3' UTR에 TL-2 구조의 $\Delta 30$ 돌연변이를 포함한다. 일부 바람직한 실시양태에서, LATV는 하기 특징부를 포함한다: (1) DENV1 LAV인 rDEN1 $\Delta 30$, 여기서 DENV1 바이러스 게놈은 3' UTR에서의 TL2 스템-루프 구조에 상응하는 30개 nt 결실을 포함함; (2) DENV4 백신 상에 DENV2 prM 및 E 유전자를 포함하는 DENV2 LACV인 rDEN2/4 $\Delta 30$, 여기서 DEN4 백신은 3' UTR에서의 TL2 스템-루프 구조에 상응하는 30개-nt 결실을 포함함; (3) DENV3 LAV인 rDEN3 $\Delta 30/\Delta 31$, 여기서 DENV3 바이러스 게놈은 3' UTR에서의 TL2 스템-루프 구조에 상응하는 30개 nt 결실 및 3' UTR의 TL-3 구조에 상응하는 별개의 비인접 상류 31개 nt 결실을 포함함; 및 (4) DENV4 LAV인 rDEN4 $\Delta 30$, 여기서 DENV4 바이러스 게놈은 3' UTR에서의 TL2 스템-루프 구조에 상응하는 30개 nt 결실을 포함함 (WO2016106107의 도 1 참조).
- [0043] "비-복제 백신"은 재조합 서브유닛 백신, 불활성화 백신, 접합체 백신 또는 DNA 백신으로부터 선택된, 탱기 바이러스 감염 또는 그의 임상 증상의 예방 또는 치료를 위한 탱기 바이러스 백신을 지칭한다.
- [0044] "불활성화 백신"은 유효량의 사멸 또는 불활성 전체 탱기 바이러스 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 백신을 지칭하며, 여기서 바이러스는 화학물질, 열 또는 방사선을 포함한 임의의 수단에 의해 불활성화된다. 불활성화 백신은 불활성화 후 낮은 잔류 감염성, 예를 들어 불활성화 후 <5 플라크 형성 단위 (PFU)/mL를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 불활성화 후 매우 낮은 양의 잔류 감염성, 예를 들어 ≤ 4 PFU/mL, ≤ 3 PFU/mL, 또는 ≤ 2 PFU/mL, <1 PFU/mL, ≤ 0.5 PFU/mL, 또는 ≤ 0.1 PFU/mL가 존재한다. 특정한 백신의 PFU는, 예를 들어 플라크 검정, 면역염색 검정, 또는 바이러스 감염성을 검출하기 위한 관련 기술분야에 공지된 다른 방법을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0045] "접합체 백신"은 담체 단백질에 공유 부착된 탱기 항원을 포함하는 백신을 지칭한다.
- [0046] "DNA 백신"은 탱기 단백질, 탱기 단백질 단편 및 탱기 융합 단백질 및 그의 변이체를 포함한, 탱기 단백질 항원을 코딩하는 뉴클레오타이드의 서열을 포함하는 백신이다. DNA 백신은 프로모터에 작동가능하게 연결된, 관심 항원을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 플라스미드 (예를 들어 DNA 또는 바이러스 플라스미드)를 포함한다.
- [0047] "서브유닛 백신"은 완전한 탱기 바이러스가 아닌 1종 이상의 탱기 항원 성분, 예컨대 탱기 면역원성 에피토프, 탱기 단백질, 탱기 항원 융합 단백질, 예를 들어 상이한 탱기 혈청형 항원의 융합체, 또는 탱기 단백질 단편을 포함하는 백신을 지칭한다. 본원에 사용된 서브유닛 백신은 1가 (단일 탱기 항원을 포함함) 또는 다가 (1종 초과 항원 성분을 포함함)일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 서브유닛 백신은 4가이다.
- [0048] 용어 "프라임-부스트"는 (1) 치료를 필요로 하는 환자에게 제1 탱기 바이러스 백신 조성물을 투여하는 단계이며, 여기서 조성물은 (a) 적어도 1종의 생 약독화 탱기 바이러스 (LAV) 또는 생 약독화 키메라 플라비바이러스 (LACV) 및 (b) 제약상 허용되는 담체를 포함하는 것인 단계; (2) 미리 결정된 양의 시간이 경과하기를 기다리는 단계; 및 (3) 상기 환자에게 제2 탱기 바이러스 백신 조성물 또는 비-복제 탱기 백신을 투여하는 단계

를 포함하는 치료 요법을 지칭한다. 제2 Deng 바이러스 백신 조성물은 제1 Deng 바이러스 백신 조성물과 동일하거나 상이할 수 있다. 한 실시양태에서, 제2 Deng 바이러스 백신은 생 약독화 Deng 백신 또는 재조합 Deng 서브유닛 백신이다. 본 발명의 조성물에 사용되는 Deng 바이러스 백신은 인간 환자에서 상동 Deng 바이러스에 대한 바이러스 중화 항체 반응을 유도하는데 유용하다.

[0049] 용어 "치료"는 치유적 치료 및 예방적 또는 방지적 조치 둘 다를 지칭한다. "치료를 필요로 하는" 개체 또는 환자는 임의의 임상 증상을 나타내든지 아니든지 간에 Deng 감염이 이미 존재하는 자 뿐만 아니라 Deng로 감염될 위험이 있는 자를 포함한다. 본 발명의 Deng 백신 조성물로 환자를 치료하는 것은 환자에서 Deng에 대한 면역 반응을 유도/증가시키는 것, 1종 이상의 Deng 바이러스에 대한 바이러스 중화 항체 반응을 유도하는 것, Deng로 감염된 환자에서 Deng의 임상 징후의 가능성을 예방, 호전, 제거 또는 감소시키는 것, Deng열, DHF 또는 DSS 및/또는 Deng 감염과 연관된 다른 질환 또는 합병증이 발생할 가능성을 예방 또는 감소시키는 것, Deng 감염의 임상 증상 및/또는 Deng와 연관된 다른 질환 또는 합병증의 중증도 또는 지속기간을 감소시키는 것, 및 Deng 감염의 가능성을 예방 또는 감소시키는 것 중 하나 이상을 포함한다.

[0050] 용어 "제약 유효량" 또는 "유효량"은 환자에서 Deng에 대한 면역 반응을 유도/증가시키는 것, 환자에서 Deng에 대한 바이러스 중화 항체 반응을 유도/증가시키는 것, Deng 감염의 가능성을 예방 또는 감소시키는 것, Deng 재발 감염의 가능성을 예방 또는 감소시키는 것, Deng로 감염된 환자에서 Deng 감염의 임상 징후를 예방, 호전 또는 제거하는 것, Deng열, DHF 및/또는 DSS를 예방하는 것, 또는 Deng와 연관된 질환의 중증도 또는 지속기간을 감소시키는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는 목적하는 효과를 생성하기 위해 환자에 충분한 백신 조성물이 도입되는 것을 의미한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이러한 수준이 달라질 수 있다는 것을 인식한다.

[0051] 용어 "면역 반응"은 세포-매개된 (T-세포) 면역 반응 및/또는 항체 (B-세포) 반응을 지칭한다.

[0052] 용어 "환자"는 면역적격 개체 및 면역손상 개체 둘 다를 비롯한, Deng 바이러스, 예컨대 DEN1, DEN2, DEN3 또는 DEN4에 감염될 수 있어 본원에 기재된 Deng 백신 조성물을 받을 포유동물을 지칭한다. 바람직한 실시양태에서, 환자는 인간이다. 본원에 정의된 "환자"는 자연적인 감염 또는 백신접종을 통해 Deng로 이미 감염된 자 또는 후속적으로 노출될 수 있는 자를 포함한다.

[0053] "이스콤(ISCOM)-유사 아주반트"는 사포닌, 콜레스테롤 및 인지질로 구성되어, 함께 그의 기능에 기여하는 독특한 구형의 케이지-유사 구조를 갖는 특징적인 케이지-유사 입자를 형성하는 면역 자극 복합체 (ISCOM)를 포함하는 아주반트이다 (검토를 위해, 문헌 [Barr and Mitchell, Immunology and Cell Biology 74: 8-25 (1996)] 참조). 이 용어는 항원을 사용하여 생산되고 이스콤™ 입자 내에 항원을 포함하는 이스콤™ 아주반트, 및 항원 없이 생산되는 중공 이스콤-유형 아주반트인 이스콤™ 매트릭스 아주반트 둘 다를 포함한다. 본원에 제공된 조성물 및 방법의 바람직한 실시양태에서, 이스콤-유형 아주반트는 항원 없이 제조되는 이스콤™ 매트릭스 입자 아주반트, 예컨대 이스코매프릭스™이다 (이스콤™ 및 이스코매프릭스™는 오스트레일리아 파크빌 소재 씨에스엘 리미티드(CSL Limited)의 등록 상표임).

[0054] 명칭 "rDEN1Δ30-1545"는 바이러스 게놈이 (1) 3' UTR의 TL2 스템-루프 구조의 30개 nt 결실 및 (2) 벡로 세포에서의 바이러스의 성장 적응 후에 발생한 뉴클레오타이드 위치 1545에서의 G로의 치환을 포함하는 것인 재조합 Deng 1 바이러스를 지칭한다.

[0055] 명칭 "rDEN2/4 Δ 30(ME)-1495,7163"는 바이러스 게놈이 (1) (i) 3' UTR의 TL2 스템-루프 구조의 30개 nt 결실 및 (ii) 벡로 세포에서의 바이러스의 성장 적응 후에 발생한 뉴클레오타이드 위치 1495에서의 U로의 치환 및 위치 7163에서의 C로의 치환을 포함하는 Deng 4 백본 (C, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 유전자), 및 (2) Deng 2 prM 및 E 유전자를 포함하는 것인 재조합 키메라 Deng 2/4 바이러스를 지칭한다.

[0056] 명칭 "rDEN3Δ30/31-7164"는 바이러스 게놈이 (1) 3' UTR의 TL2 스템-루프 구조의 30개 nt 결실 및 (2) 3'UTR에서 Δ30 돌연변이의 상류에 있는, TL-3 구조를 결실시키는 별개의 31개 nt 결실, 및 (3) 벡로 세포에서의 바이러스의 성장 적응 후에 발생한 뉴클레오타이드 위치 7164에서의 C로의 치환을 포함하는 것인 재조합 Deng 3 바이러스를 지칭한다.

[0057] 명칭 "rDEN4Δ 30-7132,7163,8308"은 바이러스 게놈이 (1) 3' UTR의 TL2 스템-루프 구조의 30개 nt 결실 및 (2) 벡로 세포에서의 바이러스의 성장 적응 후에 발생한 뉴클레오타이드 위치 7132에서의 U로의 치환, 위치 7163에서의 C로의 치환 및 위치 8308에서의 G로의 치환을 포함하는 것인 재조합 Deng 4 바이러스를 지칭한다.

[0058] "V180"은 각각의 4종의 Deng 바이러스 혈청형 (DENV1, DENV2, DENV3 및 DENV4)으로부터 말단절단된 외피 당단백질 (DEN-80E)로 구성된 4가 서브유닛 백신이며, 여기서 E 단백질은 각각 그의 N-말단에서의 아미노산 잔기 1로

부터 시작하여 야생형 E의 길이의 대략 80%로 구성되고, 이에 따라 상기 E 단백질이 숙주 세포에서 재조합적으로 발현될 때 성장 배지 내로 분비가능한 것인 백신을 지칭한다. 문헌 [Coller et al. WO 2012/154202]을 참조한다.

[0059] 하기 약어가 본원에 사용되고, 하기 의미를 갖는다: C는 탱기 캡시드 유전자이고, DEN (대안적으로 DENV)는 탱기 바이러스이고, DF는 탱기열이고, DHF는 탱기 출혈열이고, DSS는 탱기 쇼크 증후군이고, h는 시간이고, GMT는 기하 평균 역가이고, IM은 근육내이고, IMX는 이스코매트릭스™이고, JE는 일본 뇌염이고, LAV는 생 약독화 바이러스이고, NS (NS1-NS5에 사용된 것)는 비-구조이고, nt는 뉴클레오티드이고, PFU는 플라크 형성 단위이고, prM은 탱기 전구막 유전자이고, SC는 피하이고, TBE는 진드기-매개된 뇌염이고, UTR은 비번역 영역이고, WN (대안적으로 WNV)은 웨스트 나일 바이러스이고, YF (대안적으로 YFV)는 황열 바이러스이고, wt는 야생형이다.

[0060] 생 약독화 탱기 바이러스 백신

[0061] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명의 탱기 바이러스 백신 조성물은 탱기 바이러스 유형 1 (DEN1), 탱기 바이러스 유형 2 (DEN2), 탱기 바이러스 유형 3 (DEN3) 및 탱기 바이러스 유형 4 (DEN4)로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 LAV, 또는 LACV를 포함하는 생 약독화 탱기 백신을 포함한다. 한 실시양태에서, LAV 또는 LACV는 3'UTR에 TL-2 Δ30 변형을 포함하는 바이러스 게놈을 포함하며, 여기서 LAV 또는 LACV는 탱기에 대한 면역 반응을 유도하거나, 탱기에 대한 바이러스 중화 항체 반응을 유도하거나, 감염에 대해 보호하거나 감염의 가능성을 감소시키거나, 또는 그의 임상 징후의 중증도 또는 지속기간을 감소시킨다. 본 발명의 실시양태에서, 생 약독화 탱기 백신은 1가, 2가, 3가 또는 4가이고, 즉 각각 DEN 혈청형 1-4 중 1, 2, 3 또는 4종에 대해 면역 반응을 유도하거나 그에 대해 보호한다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 생 약독화 탱기 백신은 4가이고, 즉 DEN 혈청형 1-4에 대해 면역 반응을 유도하거나 그에 대해 보호하고, DEN1, DEN2, DEN3 및 DEN4 성분을 포함하며, 여기서 각각의 성분은 LAV 또는 LACV이다.

[0062] 본 발명의 추가의 실시양태에서, 생 약독화 탱기 백신은 4가 LAV 또는 "LATV"이다 (즉, 본원에 정의된 바와 같이 DENV 1-4로부터의 생 약독화 탱기 바이러스 또는 DENV 1-4로부터의 생 약독화 키메라 플라비바이러스 또는 그의 조합을 포함하며, 여기서 LAV 또는 LACV 중 적어도 하나는 Δ30LAV 또는 Δ30LACV임). 본 발명의 추가의 실시양태에서, 생 약독화 탱기 백신은 4가이고, 적어도 1종의 키메라 플라비바이러스를 포함하며; 여기서 키메라 플라비바이러스는 단일 탱기 바이러스 혈청형의 prM 및 E 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 상이한 플라비바이러스의 캡시드 및 비-구조 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 바이러스 게놈을 포함하고, 여기서 키메라 플라비바이러스는 약독화된다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 키메라 플라비바이러스의 캡시드 및 비구조 단백질은 prM 및 E 단백질과 상이한 탱기 혈청형으로부터의 것이다.

[0063] 본 발명의 일부 실시양태에서, 본 발명의 LATV의 각각의 LAV 또는 LACV 성분은 독립적으로 바이러스 게놈의 3'UTR에 TL-2 Δ30 변형을 포함하는 약독화 키메라 플라비바이러스 또는 약독화 탱기 바이러스인 생 약독화 바이러스를 포함한다. 탱기 바이러스의 약독화는 TL-2 Δ30 변형을 통해 달성된다. 그러나, 위치 1495, 1545, 7132, 7163, 7164 및 8308에서의 돌연변이를 포함하나 이에 제한되지 않는 추가의 약독화 돌연변이가 또한 백신의 1종 이상의 성분에 포함될 수 있다. 약독화 돌연변이는 관련 기술분야에 공지된 방법을 포함한 여러 기술에 의해, 예컨대 조직 배양에서의 연속 계대배양을 통해 또는 보다 한정된 유전자 조작을 통해 달성될 수 있다. 탱기 바이러스 및 키메라 탱기 바이러스를 약독화시키는데 유용한 돌연변이는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, WO 02/095075, WO 2006/44857, US 특허 번호 7,189,403, US 특허 번호 8,337,860, WO 2003/103571, WO 2000/014245, 및 WO 2008/022196을 참조한다. 공지된 약독화 탱기 균주, 예컨대 WO 06/134433, WO 2006/134443, WO 2007/141259, WO 96/40933, WO 2000/057907, WO 2000/057908, WO 2000/057909, WO 2000/057910, 및 WO 2007/015783에 기재된 균주가 또한 본원의 조성물에 사용될 수 있다.

[0064] 본 발명의 조성물의 바람직한 실시양태는 4가 생 약독화 탱기 백신 (LATV)을 포함한다. 이러한 4가 생 약독화 백신은 4종의 약독화 탱기 바이러스 (LAV), 3종의 LAV와 1종의 약독화 키메라 플라비바이러스 균주 (LACV), 2종의 탱기 LAV와 2종의 LACV, 1종의 탱기 LAV와 3종의 LACV, 또는 4종의 LACV를 포함할 수 있다.

[0065] 바람직한 실시양태에서, LATV는 하기 특징부를 포함한다: (1) DENV1 LAV인 rDEN1Δ30, 여기서 DENV1 바이러스 게놈은 3' UTR에서의 TL2 스템-루프 구조에 상응하는 30개 nt 결실을 포함함; (2) DENV4 백본 상에 DENV2 prM 및 E 유전자를 포함하는 DENV2 LACV인 rDEN2/4Δ30, 여기서 DEN4 백본은 3' UTR에서의 TL2 스템-루프 구조에 상응하는 30개-nt 결실을 포함함; (3) DENV3 LAV인 rDEN3 Δ30/Δ31, 여기서 DENV3 바이러스 게놈은 3' UTR에서의 TL2 스템-루프 구조에 상응하는 30개 nt 결실 및 3' UTR의 TL-3 구조에 상응하는 별개의 비인접 상류 31개 nt 결실을 포함함; 및 (4) DENV4 LAV인 rDEN4Δ30, 여기서 DENV4 바이러스 게놈은 3' UTR에서의 TL2 스템-루프

구조에 상응하는 30개 nt 결실을 포함함.

[0066] 키메라 플라비바이러스를 포함하는 본 발명의 실시양태에서, 각각의 키메라 플라비바이러스는 단일 탱기 바이러스 혈청형의 prM 및 E 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 상이한 플라비바이러스의 캡시드 및 비-구조 단백질 (즉 "백본")을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 바이러스 게놈을 포함하고, 여기서 각각의 키메라 플라비바이러스는 약독화된. 재조합 생 약독화 플라비바이러스 군주의 구축 방법은 베이스로서 공지된 약독화 군주의 사용을 포함할 수 있으며, 여기서 방법은 관심있는 관련 바이러스로부터의 적절한 유전자 (prM 및 E)를 베이스 바이러스의 등가 유전자 대신 사용하는 것을 포함한다. 예를 들어, 이러한 접근법은 WNV에 사용되어 왔으며, 여기서 키메라 바이러스는 WNV의 prM 및 E 유전자를 포함하는 약독화 DEN-4 군주에 기초한 유형간 (intertypic) 키메라이다 (Bray, M. et al., J. Virol. (1996) 70:4162-4166; Chen, W., et al., J. Virol. (1995) 69:5186-5190; Bray, M. and Lai, C.-J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:10342-10346; Lai, C. J. et al., Clin. Diagn. Virol. (1998) 10:173-179).

[0067] 또 다른 접근법은 재조합 키메라 백신을 개발하기 위해 베이스로서 YF 17D 약독화 황열 군주를 사용한 것이며, 이는 이전에 JE 바이러스, DEN 바이러스 및 WN 바이러스에 대해 사용되었다. 황열 백신을 포함하는 키메라 황열 백신은 임의의 황열 군주, 예를 들어 YFV 17D로부터의 prM 및 E 단백질을 코딩하는 유전자를 탱기 혈청형의 것으로 대체함으로써 구축될 수 있다. DNA 클로닝 후, RNA를 전사시키고 베타 세포 내로 형질감염시켜, YFV 17D 복제 기구 및 관련 탱기 바이러스의 외부 코드를 보유하는 키메라 바이러스를 수득한다. 문헌 [Guirakhoo et al., Journal of Virology, 74(12): 5477-5485 (2000); Guy et al., Vaccine 28: 632-649 (2010); Monath T.P. Adv Virus Res (2003) 61:469-509; Monath et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103:6694; 및 WO 98/37911]을 참조한다. 따라서, 본 발명의 일부 실시양태에서, 생 약독화 탱기 백신은 (1) 단일 탱기 혈청형의 prM 및 E 단백질 및 황열 백신을 포함하는 적어도 1종의 키메라 플라비바이러스 및 (2) 3'UTR의 TL-2 스템-루프 구조의 30개-뉴클레오타이드 결실을 포함하는 바이러스 게놈을 포함하는 적어도 1종의 LAV 또는 LACV를 포함한다.

[0068] 본 발명의 조성물에 유용한 키메라 생 약독화 플라비바이러스는 탱기 키메라 바이러스를 또한 포함할 수 있으며, 여기서 바이러스 게놈은 단일 탱기 바이러스 혈청형의 prM 및 E 유전자 및 상이한 탱기 바이러스 혈청형의 캡시드 및 비구조 유전자를 포함한다. 키메라 바이러스가 제2 탱기 혈청형으로부터의 백본을 포함하는 실시양태에서, 탱기 백본은 TL-2 스템-루프 구조에 상응하는 3'UTR의 약 30개-뉴클레오타이드의 결실을 포함하고, 임의로 추가의 약독화 돌연변이를 포함할 수 있다. 임의의 약독화 탱기 바이러스 또는 야생형 탱기 바이러스는 약독화 탱기 백본 또는 야생형 탱기 바이러스 백본에 TL-2 스템-루프 구조의 30개-뉴클레오타이드 결실을 도입함으로써 키메라 바이러스 백본으로서 사용될 수 있다. 탱기 바이러스 백본의 약독화는 연속 계대배양을 통해, 규정된 유전자 돌연변이의 도입을 통해, 또는 공지된 약독화 탱기 군주의 사용을 통해 달성될 수 있다. 탱기 키메라 백신은, 예를 들어 문헌 [Whitehead et al. WO 03/092592]에 기재되어 있다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 생 약독화 백신은 키메라 플라비바이러스를 포함하며, 여기서 캡시드 및 비구조 단백질은 prM 및 E 단백질과 상이한 탱기 혈청형으로부터의 것이다.

[0069] 본 발명의 탱기 바이러스 백신 조성물은 유효량의 생 약독화 바이러스 백신을 포함한다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 생 약독화 탱기 백신의 효력은 10 내지 약 1×10^7 플라크 형성 단위 (PFU)이다. 대안적 실시양태에서, 생 약독화 탱기 백신의 효력은 약 1×10^2 내지 약 1×10^6 PFU이다. 다른 실시양태에서, 생 약독화 탱기 백신의 효력은 약 1×10^3 내지 약 1×10^5 PFU이다.

[0070] 바이러스 플라크 검정은 바이러스 샘플 중 플라크 형성 단위의 수 (pfu)를 결정한다. 간략하게, 탱기 이뮤노플라크 검정에서, 단층으로 전면생장한 숙주 세포 (예를 들어, 베타 세포)를 다양한 희석물의 탱기 바이러스로 감염시키고, 바이러스 감염이 무차별적으로 확산되는 것을 방지하기 위해 메틸셀룰로스를 함유하는 반-고체 오버레이 배지로 덮는다. 바이러스 감염된 세포(들)는 용해되어 인접 세포로 감염을 확산시킬 것이고, 여기서 감염부터 용해까지의 주기가 반복된다. 감염된 세포는 플라크 (비감염 세포에 의해 둘러싸인 감염된 베타 세포의 군)를 형성할 것이고, 이는 고정 및 항 탱기 혈청형 특이적 모노클로날 항체 (mAb)를 사용한 면역-염색 후 육안으로 관찰될 수 있다. 플라크를 계수하고, 결과를 희석 배율과 조합하여 사용함으로써 샘플 중 mL당 플라크 형성 단위 (pfu/mL)의 수를 계산한다. pfu/mL 단위의 탱기 효력 결과는 샘플 내의 감염성 입자의 수를 나타내고, 형성된 각각의 플라크가 하나의 감염성 바이러스 입자를 대표한다는 가정에 기초한다.

[0071] 탱기 서브유닛 백신

[0072] 본 발명의 일부 실시양태에서, 제제는 1종 이상의 탱기 항원 단백질을 포함하는 재조합 탱기 서브유닛 백신을

추가로 포함한다. 본 발명의 이러한 측면의 바람직한 실시양태에서, 재조합 땡기 서브유닛 백신은 1종 이상의 땡기 단백질, 융합 단백질, 또는 그의 단편 또는 단편들을 포함한다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 재조합 땡기 서브유닛 백신은 땡기 외피 또는 E 단백질 또는 그의 단편을 포함한다.

[0073] 추가의 바람직한 실시양태에서, 재조합 땡기 서브유닛 백신은 4가지고, 즉 모든 4종의 땡기 혈청형에 대한 면역 반응을 표적화한다. 재조합 땡기 서브유닛 백신은 4종의 재조합 땡기 단백질 또는 4종 미만의, 예를 들어 재조합 DEN1 단백질, 재조합 DEN2 단백질 및 재조합 DEN3/4 융합 단백질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 재조합 땡기 서브유닛 백신은 재조합 발현 시스템을 사용하여 생산되고 분비된 DEN1-4의 땡기 바이러스 외피 당단백질 또는 그의 단편 (예를 들어 DEN1-80E, DEN2-80E, DEN3-80E, DEN4-80E, 또는 DEN4-80EZip)을 포함한다. 상기 서브유닛 백신은 하기에 보다 상세히 기재된 바와 같이 아주반트를 임의로 포함할 수 있다.

[0074] 본 발명의 이러한 측면의 일부 실시양태에서, 재조합 땡기 서브유닛 백신은 1종 이상의 정제된 땡기 바이러스 외피 ("E") 단백질, 제약상 허용되는 부형제를 포함하며, 여기서 E 단백질은 각각 그의 N-말단에서의 아미노산 잔기 1로부터 시작하여 야생형 E의 길이의 대략 80%로 구성되고, 이에 따라 상기 E 단백질이 숙주 세포에서 재조합적으로 발현될 때 성장 배지 내로 분비가능하고, 여기서 조성물은 인간 대상체에서 중화 항체의 생산을 유도한다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 재조합 땡기 서브유닛 백신은 유효량의 아주반트를 추가로 포함한다. 본 발명의 일부 실시양태에서, DEN-4 E 단백질은 US 6,749,857 및 WO 2012/154202에 기재된 바와 같이 이량체 ("DEN4-80EZip")이다.

[0075] 본 발명의 이러한 측면의 일부 실시양태에서, 상기 기재된 조성물 내의 E 단백질은 곤충 숙주 세포에서 재조합적으로 생산되고 발현된다. 추가의 바람직한 실시양태에서, E 단백질은 드로소필라 멜라노가스터 슈나이더 (*Drosophila melanogaster* Schneider) 2 (S2) 숙주 세포에서 재조합적으로 생산되고 발현된다.

[0076] 재조합 땡기 바이러스 E 단백질은 드로소필라 슈나이더 2 (S2) 세포를 사용하는 세포 배양 발현 시스템에 의해 생산될 수 있다. 이러한 시스템은 천연-유사 구조를 유지하는 재조합 땡기 외피 단백질을 생산하는 것으로 입증되었다 (Cuzzubbo et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol. (2001) 8:1150-55; Modis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (2003) 100:6986-91; Modis et al., Nature (2004) 427:313-9; Zhang et al., Structure (2004) 12(9):1607-18). 이러한 발현 시스템은 다른 플라비바이러스, 예컨대 웨스트 나일, 일본 뇌염, C형 간염 및 진드기 매개된 뇌염 바이러스로부터의 다른 재조합 외피 단백질을 발현하는 것으로 또한 밝혀졌다. 재조합 땡기 외피 단백질은 C-말단에서 말단절단되어 천연 외피 단백질의 80% ("80E")를 남길 수 있다. 따라서 80E는 그의 N-말단의 아미노산 1에서 시작하여 E 단백질의 연속 아미노산의 대략 처음 80%로서 정의된다.

[0077] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명의 상기 측면의 일부 실시양태는 그의 N-말단에서의 아미노산 잔기 1로부터 시작하여 야생형 E의 길이의 대략 80%로 이루어진 말단절단된 80E 단백질을 포함한다. 본 발명의 일부 실시양태에서 사용된 E 단백질은 단백질의 막 앵커 부분 (카르복시 말단에서 E의 대략 마지막 10%)을 결실시킨다. 다시 말해서, 본 발명의 구체적 실시양태에서 사용된 말단절단된 80E 단백질은 그의 N-말단의 아미노산 1에서 시작하여 E의 연속 아미노산의 처음 90%까지로 이루어지고, 이에 따라 세포의 배지 내로 분비될 수 있어 회수를 용이하게 한다. 말단절단은 80E 부분을 막 앵커 부분과 연결하는 E 단백질의 "스텝" 부분을 추가로 결실시킬 수 있고; 스텝 부분은 중요한 항원성 에피토프를 함유하지 않으므로 바람직한 항원, DEN1-80E, DEN2-80E, DEN3-80E, DEN4-80E 또는 DEN4-80EZip에 포함되지 않는다. E 단백질의 90% 초과에서 100% 미만이 클로닝 및 분비될 수 있고, 즉 단백질은 카르복시 말단절단된, 길이의 90%+일 수 있고, 말단절단된 E 단백질이 분비가능한 한 막 관통 도메인의 일부분을 포함할 수 있다. "분비가능한"은 발현 시스템에서 형질전환된 세포로부터 분비될 수 있고 전형적으로 분비될 수 있다는 것을 의미한다. 따라서, 관련 기술분야의 통상의 기술자는, 본 발명의 조성물 및 방법에 유용한 땡기 E 단백질은 단백질이 분비가능한 한 분원에 예시된 80%로부터 달라질 수 있다는 것을 인식할 것이다. 본 발명의 각각의 측면의 바람직한 실시양태에서, DEN E 단백질은 외피 단백질의 N-말단 아미노산 으로부터 시작하여 제393 내지 제401 아미노산 범위의 아미노산에서 끝나는, 예를 들어 땡기 바이러스 유형 2의 아미노산 1에서 아미노산 395인, 길이의 약 80%이다. 본 발명의 각각의 측면의 대안적인 실시양태에서, 땡기 E 단백질은 그의 N-말단의 아미노산 1에서 시작하여 E의 연속 아미노산의 약 75%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 98%일 수 있다. 본원의 본 발명의 측면들의 예시적 실시양태에서, DEN E 단백질은 그의 N-말단의 아미노산 1에서 시작하여 E 단백질의 연속 아미노산의 대략 80%이고; 예컨대 서열식별번호: 1에 제시된 바와 같은 DEN1-80E, 서열식별번호: 2에 제시된 바와 같은 DEN2-80E, 서열식별번호: 3에 제시된 바와 같은 DEN3-80E 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 DEN4-80E이다.

[0078] 분비된 E 단백질은 DEN4-80EZip 단백질에서와 같이 이량체화를 용이하게 하는 도메인을 추가로 함유할 수 있고,

이에 따라 재조합 단백질의 면역원성이 추가로 증진된다. 예시적인 DEN4-80EZip 단백질은 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명의 이러한 측면의 일부 실시양태에서, 조성물에 포함된 DEN1, DEN2 및 DEN3 80E 항원은 단량체이고, DEN4 80E 항원은 이량체이다.

[0079] 본 발명의 이러한 측면의 대안적 실시양태에서, 조성물 내의 DEN1-80E, DEN2-80E, DEN3-80E 및 DEN4-80E 단백질은 단량체이다. 이러한 실시양태에서, DEN4 성분은 DEN1, DEN2 및 DEN3 단백질의 개별 양의 약 1.5 내지 약 3배, 바람직하게는 DEN1, DEN2 및 DEN3 성분 (단백질)의 양의 약 2배의 양으로 존재한다. 본 발명의 이러한 측면의 바람직한 실시양태에서, 조성물 내의 DEN1:DEN2:DEN3:DEN4 항원의 비는 대략 1:1:1:2이다.

[0080] Deng E 단백질을 포함하는 본 발명의 실시양태에서, 조성물 내의 각각의 E 단백질의 양은 약 0.5 μ g 내지 약 500 μ g이다. 대안적 실시양태에서, 각각의 E 단백질의 양은 약 0.5 μ g 내지 약 450 μ g, 0.5 μ g 내지 약 400 μ g, 0.5 μ g 내지 약 350 μ g, 0.5 μ g 내지 약 300 μ g, 0.5 μ g 내지 약 250 μ g, 0.5 μ g 내지 약 200 μ g, 0.5 μ g 내지 약 150 μ g, 0.5 μ g 내지 약 100 μ g, 0.5 μ g 내지 약 50 μ g, 5.0 μ g 내지 약 500 μ g, 5.0 μ g 내지 약 450 μ g, 5.0 μ g 내지 약 400 μ g, 5.0 μ g 내지 약 350 μ g, 5.0 μ g 내지 약 300 μ g, 5.0 μ g 내지 약 250 μ g, 5.0 μ g 내지 약 200 μ g, 5.0 μ g 내지 약 150 μ g, 5.0 μ g 내지 약 100 μ g, 5.0 μ g 내지 약 50 μ g, 10 μ g 내지 약 500 μ g, 10 μ g 내지 약 450 μ g, 10 μ g 내지 약 400 μ g, 10 μ g 내지 약 350 μ g, 10 μ g 내지 약 300 μ g, 10 μ g 내지 약 250 μ g, 10 μ g 내지 약 200 μ g, 10 μ g 내지 약 150 μ g, 10 μ g 내지 약 100 μ g, 10 μ g 내지 약 50 μ g, 25 μ g 내지 약 500 μ g, 25 μ g 내지 약 450 μ g, 25 μ g 내지 약 400 μ g, 25 μ g 내지 약 350 μ g, 25 μ g 내지 약 300 μ g, 25 μ g 내지 약 250 μ g, 25 μ g 내지 약 200 μ g, 25 μ g 내지 약 150 μ g, 25 μ g 내지 약 100 μ g, 또는 25 μ g 내지 약 50 μ g이다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 조성물 내의 각각의 E 단백질의 양은 약 1.0 μ g 내지 약 100 μ g이다. 추가 실시양태에서, 조성물 내의 각각의 E 단백질의 양은 대략 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500 μ g으로부터 선택된다.

[0081] 불활성화 Deng 백신

[0082] 본원의 불활성화 Deng 백신은 1종 이상의 전체 불활성화된 Deng 바이러스 및/또는 1종 이상의 불활성화된 Deng 키메라 바이러스를 포함한다. 본 발명의 이러한 측면의 일부 실시양태에서, 불활성화 Deng 백신은 4가지이고, 전체 불활성화 DEN1, DEN2, DEN3 및 DEN4를 포함한다. 대안적 실시양태에서, 불활성화 백신은 4종의 불활성화 키메라 Deng 바이러스를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 불활성화 백신은 4가지이고, 1종 이상의 전체 불활성화된 Deng 바이러스 및 1종 이상의 불활성화된 Deng 키메라 바이러스, 예를 들어 불활성화 전체 DEN1 바이러스, 불활성화 전체 DEN2 바이러스, 불활성화 DEN3 키메라 바이러스 및 불활성화 DEN4 키메라 바이러스를 포함한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 백신 조성물이 모든 4종의 Deng 혈청형을 표적화하는 한, 본 발명의 4가 조성물 및 방법에 불활성화 전체 또는 키메라 DEN 바이러스의 임의의 조합이 사용될 수 있다는 것을 인식한다.

[0083] 본 발명의 조성물 및 방법에 유용한 불활성화 Deng 백신은 문헌 [Putnak et al. Vaccine 23: 4442-4452 (2005), US 6190859, US 6254873 및 Sterner et al. WO 2007/002470]에 기재되어 있다. 대안적으로, Deng 바이러스 균주 및 키메라 Deng 균주/키메라 플라비바이러스 균주는 조성물에 사용하기 위해 관련 기술분야에 공지된 방법을 통해, 예를 들어 화학물질, 열 또는 방사선에 의해 불활성화될 수 있다.

[0084] 따라서, 본 발명은 또한 유효량의 생 약독화 Deng 백신 및 비-복제 Deng 백신을 포함하는 상기 제제에 관한 것이며, 여기서 생 약독화 Deng 백신은 적어도 1종의 생 약독화 Deng 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스 (LACV)를 포함하고, 여기서 LAV 또는 LACV는 3'UTR에서의 TL-2 스템-루프 구조의 30 개-뉴클레오타이드 결절을 포함하는 바이러스 게놈을 포함한다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 본 발명의 Deng 바이러스 백신 조성물의 비-복제 Deng 백신은 재조합 Deng 서브유닛 백신 또는 불활성화 Deng 백신으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 제제는 동결건조, 동결, 마이크로웨이브 건조되거나, 또는 유효량의 생 약독화 Deng 백신 및 비-복제 Deng 백신을 갖는 리오스피어를 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 생 약독화 Deng 백신의 제제는 비-복제 Deng 백신, 예를 들어 V180을 포함하는 액체 용액으로 재구성된다.

[0085] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 생 약독화 및 비-복제 Deng 백신은 4가지이다 (즉 DEN1, DEN2, DEN3 및 DEN4 성분을 포함하거나 또는 DEN1, DEN2, DEN3 및 DEN4에 대한 면역 반응을 유도함).

[0086] 아주반트

[0087] 백신을 관심 항원에 대한 면역 반응을 증진시킬 수 있는 화합물 (아주반트로 공지됨)과 공-투여하는 것은 광범위하게 연구되어 왔다. 관심 항원에 대한 면역 반응을 증가시키는 것 이외에도, 일부 아주반트는 목적하는 면

역 반응을 유발하는데 필요한 항원의 양을 감소시키거나 또는 임상 요법에 필요한 주사 횟수를 감소시켜 지속적인 면역 반응을 유도하고 질환으로부터의 보호를 제공하는데 사용될 수 있다.

[0088] 이를 위해, 본 발명의 덩기 바이러스 백신 제제는 아주반트를 사용할 수 있다. 본원에 기재된 제제의 아주반트는 상기 기재된 바와 같은 목적하는 기능을 수행하고, 조성물의 LAV 또는 LACV를 불활성화시키지 않거나 그의 역가에 유의하게 영향을 미치지 않는 임의의 아주반트일 수 있다.

[0089] 알루미늄-기재 화합물은 60여년 전에 아주반트 활성을 갖는 것으로 결정되었다 (검토를 위해, 문헌 [Lindblad, E.B. Immunol. and Cell Biol. 82: 497-505 (2004); Baylor et al. Vaccine 20: S18-S23 (2002)] 참조). 알루미늄 아주반트는 일반적으로 적절한 투여량으로 사용될 때 안전한 것으로 간주된다. 다수가 전세계 규제 기관에 의해 인간에 대한 투여용으로 승인되었다.

[0090] 따라서, 알루미늄-기재 화합물, 예컨대 수산화알루미늄 ($\text{Al}(\text{OH})_3$), 알루미늄 히드록시포스페이트 (AlPO_4), 무정형 알루미늄 히드록시포스페이트 술페이트 (AAHS), 또는 소위 "명반" ($\text{KAl}(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (문헌 [Klein et al., Analysis of aluminum hydroxyphosphate vaccine adjuvants by Al MAS NMR., J. Pharm. Sci. 89(3): 311-21 (2000)] 참조)이 본원에 제공된 조성물과 조합될 수 있다. 본원에 제공된 본 발명의 실시양태에서, 알루미늄 아주반트는 알루미늄 히드록시포스페이트 또는 AAHS이다. 대안적 실시양태에서, 알루미늄 아주반트는 본원에서 "APA"로 지칭되는 알루미늄 포스페이트 아주반트이다. 다른 실시양태에서, 아주반트는 수산화알루미늄이다.

[0091] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 표적화 덩기 바이러스에 대한 면역 반응을 증가시키는데 안전하면서도 효과적인 알루미늄 아주반트의 최적 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 알루미늄의 안전성 프로파일 뿐만 아니라 FDA-허가 백신에 포함된 알루미늄의 양의 논의에 대해, 문헌 [Baylor et al., Vaccine 20: S18-S23 (2002)]을 참조한다. 일반적으로, 알루미늄 아주반트의 효과적이고 안전한 용량은 용량당 50 μg 내지 1.25 mg의 원소 알루미늄 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 내지 2.5 mg/mL 농도)으로 다양하다.

[0092] 따라서, 본 발명의 구체적 실시양태는 생 약독화 덩기 바이러스 백신을 포함하고 알루미늄 아주반트를 추가로 포함하는 조성물을 포함한다. 본 발명의 실시양태에서, 덩기 조성물은 백신 용량당 약 50 μg 내지 약 1.25 mg의 원소 알루미늄을 포함하는 아주반트를 포함한다. 다른 실시양태에서, 백신 조성물의 용량당 알루미늄 아주반트는 약 100 μg 내지 약 1.0 mg, 약 100 μg 내지 약 900 μg , 약 100 μg 내지 약 850 μg , 약 100 μg 내지 약 800 μg , 약 100 μg 내지 약 700 μg , 약 100 μg 내지 약 600 μg , 약 100 μg 내지 약 500 μg , 약 100 μg 내지 약 400 μg , 약 100 μg 내지 약 300 μg , 약 100 내지 약 250 μg , 약 200 μg 내지 약 1.25 mg, 약 200 μg 내지 약 1.0 mg, 약 200 μg 내지 약 900 μg , 약 200 μg 내지 약 850 μg , 약 200 μg 내지 약 800 μg , 약 200 μg 내지 약 700 μg , 약 200 μg 내지 약 600 μg , 약 200 μg 내지 약 500 μg , 약 200 μg 내지 약 400 μg , 약 200 μg 내지 약 300 μg , 약 300 μg 내지 약 1.25 mg, 약 300 μg 내지 약 1.0 mg, 약 300 μg 내지 약 900 μg , 약 300 μg 내지 약 850 μg , 약 300 μg 내지 약 800 μg , 약 300 μg 내지 약 700 μg , 약 300 μg 내지 약 600 μg , 약 300 μg 내지 약 500 μg , 약 300 μg 내지 약 400 μg , 약 400 μg 내지 약 1.25 mg, 약 400 μg 내지 약 1.0 mg, 약 400 μg 내지 약 900 μg , 약 400 μg 내지 약 850 μg , 약 400 μg 내지 약 800 μg , 약 400 μg 내지 약 700 μg , 약 400 μg 내지 약 600 μg , 약 400 μg 내지 약 500 μg , 약 500 μg 내지 약 1.25 mg, 약 500 μg 내지 약 1.0 mg, 약 500 μg 내지 약 900 μg , 약 500 μg 내지 약 850 μg , 약 500 μg 내지 약 800 μg , 약 500 μg 내지 약 700 μg , 약 500 μg 내지 약 600 μg , 약 600 μg 내지 약 1.25 mg, 약 600 μg 내지 약 1.0 mg, 약 600 μg 내지 약 900 μg , 약 600 μg 내지 약 850 μg , 약 600 μg 내지 약 800 μg , 또는 약 600 μg 내지 약 700 μg 범위의 양의 원소 알루미늄을 포함한다.

[0093] 본 발명의 덩기 바이러스 백신 조성물과 함께 사용될 수 있는 다른 아주반트는 CpG 올리고뉴클레오타이드를 함유하거나 또는 TLR4 및 TLR9와 같은 톨-유사 수용체에 대해 작용하는 다른 분자 (검토를 위해, 문헌 [Daubenberg, C.A., Curr. Opin. Mol. Ther. 9(1):45-52 (2007); Duthie et al., Immunological Reviews 239(1): 178-196 (2011); Hedayat et al., Medicinal Research Reviews 32(2): 294-325 (2012)] 참조), 예를 들어 리포폴리사카라이드, 모노포스포릴 지질 A 및 아미노알킬 글루코사미나이드 4-포스페이트를 함유하는 아주반트를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 조성물에 유용한 추가의 아주반트는 면역자극 올리고뉴클레오타이드 (IMO; 예를 들어 미국 7,713,535 및 미국 7,470,674 참조); T-헬퍼 에피토프, 지질-A 및 유도체 또는 그의 변형, 리포솜, 인산칼슘, 시토카인 (예를 들어 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자 (GM-CSF), IL-2, IFN- α , Flt-3L), CD40, CD28, CD70, IL-12, 열-쇼크 단백질 (HSP) 90, CD134 (OX40), CD137, 코백신 (CoVaccine) HT, 비-이온성 블록 공중합체, 불완전한 프로틴트 아주반트, 케모카인, 콜레라 독소; 이. 콜라이

(*E. coli*) 열-불안정성 장독소; 백일해 독소; 뮤라밀 디펩티드, 뮤라밀 펩티드 유사체, MF59, SAF, 면역자극 복합체, 생분해성 마이크로구체, 폴리포스파젠; 합성 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0094] 본원에 기재된 조성물과 함께 사용하기 위한 추가의 아주반트는 사포닌 (예를 들어, QS21)을 단독으로 함유하거나 이를 콜레스테롤 및 인지질과 조합하여 ISCOM ("면역 자극 복합체"; 검토를 위해, 문헌 [Barr and Mitchell, Immunology and Cell Biology 74: 8-25 (1996); 및 Skene and Sutton, Methods 40: 53-59 (2006)] 참조)의 특징적인 형태로 함유하는 아주반트이다. 이러한 아주반트는 본원에서 "사포닌-기재 아주반트"로 지칭된다. 본원의 조성물의 구체적 실시양태에서, 돌연변이체 독소 및/또는 독소 단백질은 이스콧-유형 아주반트 또는 항원 없이 제조되는 이스콧 매트릭스 입자 아주반트인 이스콧, 예컨대 이스코매트릭스™ (이스콧™ 및 이스코매트릭스™는 오스트레일리아 파크빌 소재 씨에스엘 리미티드의 등록 상표임)와 조합된다.

[0095] 제제

[0096] 본 발명의 제제 또는 조성물은 적어도 1종의 생 약독화 뎅기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스 (LACV)를 포함하는 생 약독화 뎅기 백신, pH 약 6.5 내지 8.5의 완충제, 당, 글리콜 또는 당 알콜, 및 카르복시메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스 (HPC), 히드록시프로필 메틸셀룰로스 (HPMC), 2-히드록시에틸 셀룰로스 (2-HEC), 크로스카르멜로스 및 메틸 셀룰로스, 또는 그의 제약상 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 셀룰로스 유도체; 임의로 알칼리 또는 알칼리성 염, 및 임의로 Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro 또는 Glu, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산을 포함한다.

[0097] 본 발명의 또 다른 측면에서, 제제는 약 20-200,000,00 pfu/ml의 적어도 1종의 생 약독화 뎅기 바이러스 (LAV) 또는 적어도 1종의 생 약독화 키메라 플라비바이러스를 포함하는 생 약독화 뎅기 백신, pH 약 6.5 내지 8.5의 완충제, 약 150-300 mg/ml의 당, 폴리비닐피롤리돈 (PVP), 카르복시메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스 (HPC), 히드록시프로필 메틸셀룰로스 (HPMC), 2-히드록시에틸 셀룰로스 (2-HEC), 크로스카르멜로스, 메틸 셀룰로스 또는 그의 제약상 허용되는 염, 인간 혈청 알부민 (HSA) 및 젤라틴으로 이루어진 군으로부터 선택된 담체; 및 임의로 약 5-100 mM의 알칼리 염 또는 알칼리성 염; 임의로 아미노산 Gln, Pro 또는 Glu, 또는 그의 조합을 포함한다.

[0098] 한 실시양태에서, 생 약독화 뎅기 백신은 제제 중 100-10,000,000 pfu/ml, 100-100,000 pfu/ml 또는 600-20,000 pfu/ml의 농도로 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 생 약독화 뎅기 백신은 제제 중 200-200,000 pfu/ml, 600-200,000 pfu/ml 또는 600-100,000 pfu/ml의 농도로 존재한다.

[0099] 바람직한 실시양태에서, 셀룰로스 유도체는 음이온성이고, 생 약독화 뎅기 백신 제제 중 약 0.3-10 mg/ml, 1-10 mg/ml, 3-7 mg/ml 또는 5 mg/ml의 염, 예를 들어 카르복시메틸 셀룰로스 나트륨 또는 칼륨을 형성한다. 카르복시메틸 셀룰로스 염은 약 700,000의 평균 분자량을 갖는 고 점도 유형; 약 250,000의 평균 분자량을 갖는 중간 점도 유형; 및 약 90,000의 평균 분자량을 갖는 저 점도 유형으로 이용가능하다. 한 실시양태에서, 셀룰로스 유도체는 생 약독화 뎅기 백신 제제 중 약 0.3-1.5 mg/ml의 약 700,000의 평균 분자량을 갖는 카르복시메틸 셀룰로스 염이다. 또 다른 실시양태에서, 셀룰로스 유도체는 약 1-4 mg/ml의 약 250,000의 평균 분자량을 갖는 카르복시메틸 셀룰로스 염이다. 추가 실시양태에서, 셀룰로스 유도체는 약 3-7 또는 3-10 mg/ml의 약 90,000의 평균 분자량을 갖는 카르복시메틸 셀룰로스 염이다. 추가 실시양태에서, 셀룰로스 유도체는 약 0.3-10 mg/ml의 약 50,000 내지 1000,000의 평균 분자량을 갖는 카르복시메틸 셀룰로스 염이다.

[0100] 한 실시양태에서, 완충제는 약 5-300 mM, 5-20 mM, 10-12 mM 또는 11 mM의 포스페이트, 숙시네이트, 히스티딘, 트리스, MES, MOPS, HEPES, 아세테이트 및 시트레이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0101] 알칼리 또는 알칼리성 염은 안정화 효과를 제공할 수 있고, 약 10-150 mM, 10-100 mM, 15-75 mM, 30-90 mM, 75 mM, 50 mM 또는 30 mM의 염화마그네슘, 염화칼슘, 염화칼륨, 염화나트륨 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0102] 아미노산은 10-100, 10-75, 10-50, 20-30, 또는 25 mM의 Val, Ile, Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro 및 Glu 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 아미노산은 10-100, 10-75, 10-50, 20-30, 또는 25 mM의 Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro 및 Glu 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 한 실시양태에서, 아미노산은 Lys, Leu 또는 Glu이다. 또 다른 실시양태에서, 아미노산은 Leu 및 Glu이다. 또 다른 실시양태에서, 아미노산은 Leu, Lys, Glu 또는 Ala이다. 또 다른 실시양태에서, 아미노산은 Leu이다.

[0103] 당 및 글리콜 또는 당 알콜은 동결보호 또는 안정화 부형제로서 작용할 수 있다. 한 실시양태에서, 당은 50-

300 mg/ml의 농도이다. 또 다른 실시양태에서, 당은 약 60-120 mg/ml, 90-110 mg/ml 또는 80-100 mg/ml의 트레할로스 또는 수크로스 또는 그의 조합이다. 한 실시양태에서, 수크로스 대 트레할로스 비는 1:1 내지 1:4이다. 또 다른 실시양태에서, 수크로스는 90 mg/ml이고, 트레할로스는 90-200 mg/ml, 바람직하게는 110 mg/ml이다. 또 다른 실시양태에서, 글리콜은 프로필렌 글리콜이고, 당 알콜은 약 2.5-7.5 mg/ml, 3-7 mg/ml 또는 5 mg/ml의 글리세롤 또는 소르비톨이다.

[0104] 본 발명의 조성물은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 1종 이상의 방법에 의해, 예컨대 비경구로, 경점막으로, 경피로, 근육내로, 정맥내로, 피내로, 비강내로, 피하로, 복강내로 대상체에게 투여될 수 있고, 그에 따라 제제화될 수 있다.

[0105] 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 액체 제제의 표피 주사, 근육내 주사, 정맥내, 동맥내, 피하 주사, 또는 호흡기내 점막 주사를 통해 투여된다. 주사용 액체 제제는 용액 등을 포함한다. 본 발명의 조성물은 단일 용량 바이알, 다중-용량 바이알 또는 사전-충전된 시린지로서 제제화될 수 있다.

[0106] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 경구로 투여되고, 따라서 경구 투여에 적합한 형태로, 즉, 고체 또는 액체 제제로서 제제화된다. 고체 경구 제제는 정제, 캡슐, 환제, 과립, 펠릿 등을 포함한다. 액체 경구 제제는 용액, 현탁액, 분산액, 에멀전, 오일 등을 포함한다.

[0107] 본 발명의 한 측면에서, 제제는 동결건조, 동결, 마이크로웨이브 건조로부터 또는 리오스피어의 생성을 통해 제조된 고체 건조 제제이다. 한 실시양태에서, 고체 건조 제제는 실시예 7에 기재된 마이크로웨이브 건조 공정에 의해 수득가능하거나 그로부터 제조된다. 제제는 -70°C, -20°C, 2-8°C 또는 실온 (25 또는 37°C)에서 저장될 수 있다. 건조 제제는 단위 용량 바이알 내의 성분의 중량 면에서 표현될 수 있지만, 이는 상이한 용량 또는 바이알 크기에 따라 달라진다. 대안적으로, 본 발명의 건조 제제는 동일한 샘플 (예를 들어 바이알) 내의 약물 물질 (DS)의 중량과 비교한 성분의 중량 비로서의 성분의 양으로 표현될 수 있다. 이러한 비는 백분율로서 표현될 수 있다. 이러한 비는 바이알 크기, 투여 및 재구성 프로토콜과 관계없이 본 발명의 건조 제제의 고유의 특성을 반영한다. 다른 실시양태에서, 제제는 리오스피어이다.

[0108] 본 발명의 또 다른 측면에서, 제제는 재구성된 용액이다. 건조 고체 제제는 임상 요인, 예컨대 투여 또는 투약 경로에 따라 상이한 농도로 재구성될 수 있다. 예를 들어, 건조 제제는 피하 투여를 위해 필요한 경우 고농도로 (즉 적은 부피로) 재구성될 수 있다. 또한, 특정한 대상체에 대해 고용량 투여가 요구되는 경우, 특히 주사 부피가 최소화되어야 하는 피하로 투여되는 경우, 고농도가 또한 필요할 수 있다. 이어서, 물 또는 등장성 완충제에 의한 후속 희석을 용이하게 사용하여 약물 제품을 더 낮은 농도로 희석할 수 있다. 더 낮은 농도의 약물 제품에서 등장성이 요망되는 경우, 건조 분말을 표준 저부피 물 중에 재구성시킨 다음, 등장성 희석제, 예컨대 0.9% 염화나트륨으로 추가로 희석할 수 있다.

[0109] 재구성은 완전한 수화를 보장하도록 일반적으로 약 25°C의 온도에서 수행되지만, 원한다면 다른 온도가 사용될 수 있다. 재구성에 요구되는 시간은, 예를 들어 희석제의 유형, 부형제(들) 및 바이러스 또는 단백질의 양에 좌우될 것이다. 예시적인 희석제는 멸균수, 정박테리아 주사용수 (BWFI), pH 완충 용액 (예를 들어 포스페이트-완충 염수), 멸균 염수 용액, 링거액 또는 텍스트로스 용액을 포함한다. 재구성 부피는 약 0.5-1.0 ml, 바람직하게는 0.5 ml 또는 0.7 ml일 수 있다. 한 실시양태에서, 단일 용량은 0.5 ml의 부피를 갖는다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 희석제로 본 발명의 제제를 재구성하는 단계를 포함하는, 액체 제제를 제조하는 방법을 제공한다.

[0110] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 제제는 동결건조, 동결, 마이크로웨이브 건조 또는 리오스피어의 생성 전에 제조된 수용액이다.

[0111] 리오스피어를 제조하는 공정

[0112] 리오스피어를 제조하는 공정은 미국 특허 공개 US20140294872 (이의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 개시되어 있다. 방법은 실질적으로 구형인 형상을 갖는 적어도 1개의 액체 액적을 고체 편평 표면 (즉, 임의의 샘플 웰 또는 공동이 없음) 상에 분배하는 단계, 액적을 극저온 물질과 접촉시키지 않으면서 액적을 표면 상에서 동결시키는 단계 및 동결된 액적을 동결건조시켜 실질적으로 구형의 형상인 건조 펠릿을 생성하는 단계를 포함한다. 미국 특허 번호 9,119,794 (이의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)는 또한 리오스피어를 형성하는 공정을 개시한다. 공동을 함유하는 고체 요소 상에 수성 매질 혼합물을 함유하는 단일 부피를 형성한다. 고체 요소를 혼합물의 동결 온도 미만으로 냉각시키고, 공동에 혼합물을 충전하고, 혼합물을 공동에 존재하는 동안 고체화하여 단일 형태를 형성한다. 단일 형태를 진공에서 건조시켜 리오스피어를 제공한다.

- [0113] 다른 실시양태에서, 리오스피어는 실질적으로 구형인 형상으로 형성되고, 목적하는 생물학적 물질의 액체 조성물의 액적을 편평 고체 표면, 특히 어떠한 공동도 갖지 않는 표면 상에서 동결시킨 후 단일 형태를 동결건조시킴으로써 제조된다. 미국 특허 출원 공개 번호 US2014/0294872 (이의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)는 리오스피어를 형성하는 유사한 공정을 개시한다.
- [0114] 간략하게, 일부 실시양태에서, 공정은 실질적으로 구형인 형상을 갖는 적어도 1개의 액체 액적을 고체 편평 표면 (즉, 임의의 샘플 웰 또는 공동이 없음) 상에 분배하는 단계, 액적을 극저온 물질과 접촉시키지 않으면서 액적을 표면 상에서 동결시키는 단계 및 동결된 액적을 동결건조시켜 실질적으로 구형의 형상인 건조 펠릿을 생성하는 단계를 포함한다. 공정은 동시에 고체 편평 표면 상에 목적하는 수의 액적을 분배하고, 액적을 동결시키고, 동결된 액적을 동결건조시킴으로써 다수의 건조 펠릿을 제조하는 고처리량 모드로 사용될 수 있다. 이러한 공정에 의해 액체 제제로부터 제조된 펠릿은 고농도의 생물학적 물질 (예컨대 단백질 치료제)을 가질 수 있고, 건조 펠릿의 세트로 조합될 수 있다.
- [0115] 일부 실시양태에서, 고체 편평 표면은 금속 플레이트의 상부 표면이며, 이 금속 플레이트는 그의 상부 표면을 -90°C 이하의 온도에서 유지하도록 적합화된 히트 싱크와 물리적으로 접촉하고 있는 하부 표면을 포함한다. 금속 플레이트의 상부 표면은 액체 제제의 동결점 훨씬 미만이기 때문에, 액적은 본질적으로 액적의 하부 표면이 금속 플레이트의 상부 표면과 접촉하면서 즉각적으로 동결된다.
- [0116] 다른 실시양태에서, 고체 편평 표면은 소수성이고, 분배 단계 동안 0°C 초과로 유지되는 박막의 상부 표면을 포함한다. 분배된 액적은 박막을 제제의 동결 온도 미만의 온도로 냉각시킴으로써 동결된다.
- [0117] 동결건조 공정
- [0118] 본 발명의 동결건조 제제는 사전-동결건조 용액의 동결건조 (동결-건조)에 의해 형성된다. 동결-건조는 제제를 동결시킨 후에 1차 건조에 적합한 온도에서 물을 승화시켜 달성된다. 이러한 조건 하에, 생성물 온도는 제제의 공융점 또는 붕괴 온도 미만이다. 전형적으로, 1차 건조에 대한 보관 온도는, 전형적으로 약 30 내지 250 mTorr 범위의 적합한 압력에서 약 -50 내지 25°C 범위일 것이다 (단 생성물은 1차 건조 동안 동결된 상태로 유지됨). 제제, 샘플을 보유하는 용기 (예를 들어, 유리 바이알)의 크기 및 유형, 및 액체의 부피는 건조에 요구되는 시간을 좌우할 것이고, 이는 수시간 내지 수일 (예를 들어, 40-60시간) 범위일 수 있다. 2차 건조 단계는, 주로 사용된 용기의 유형 및 크기 및 단백질의 유형에 따라, 약 0-40°C에서 수행될 수 있다. 2차 건조 시간은 생성물 내의 목적하는 잔류 수분 수준에 의해 좌우되며, 전형적으로 적어도 약 5시간이 걸린다. 전형적으로, 동결건조 제제의 수분 함량은 약 5% 미만, 바람직하게는 약 3% 미만이다. 압력은 1차 건조 단계 동안 사용된 것과 동일할 수 있다. 동결-건조 조건은 제제, 바이알 크기 및 동결건조 트레이에 따라 달라질 수 있다.
- [0119] 일부 경우에, 전달 단계를 피하기 위해 재구성이 수행될 용기 내에서 제제를 동결건조시키거나 마이크로웨이브 건조시키는 것이 바람직할 수 있다. 이 경우에 용기는, 예를 들어 2, 3, 5, 10 또는 20 ml 바이알일 수 있다.
- [0120] 사용 방법
- [0121] 본 발명의 실시양태는 또한, (a) 요법 (예를 들어, 인체의); (b) 의약; (c) DEN1, DEN2, DEN3 및/또는 DEN4를 포함한 뎅기 바이러스 복제의 억제; (d) DEN1, DEN2, DEN3 및/또는 DEN4 중 1종 이상에 대한 면역 반응 또는 보호 면역 반응의 유도; (e) 1종 이상의 유형의 뎅기에 대한 바이러스 중화 항체 반응의 유도; (f) 뎅기 바이러스에 의한 감염의 치료 또는 예방; (g) 뎅기 바이러스 감염의 재발의 예방; (h) 뎅기 바이러스 감염과 연관된 병리학적 증상의 진행, 발병 또는 중증도의 감소, 또는 뎅기 바이러스 감염의 가능성의 감소, 또는 (i) 뎅기열, 뎅기 출혈열 및 뎅기 쇼크 증후군을 포함하나 이에 제한되지는 않는 뎅기-연관 질환(들)의 치료, 예방, 또는 그의 발병, 중증도 또는 진행의 지연에 (i) 사용하거나, (ii) 이를 위한 의약 또는 조성물로서 사용하거나, 또는 (iii) 이를 위한 의약의 제조에서 사용하기 위한, 본원에 기재된 뎅기 백신 조성물 또는 제제 중 1종 이상을 포함한다. 이들 용도에서, 뎅기 백신 조성물은 임의로 1종 이상의 아주반트 (예를 들어, 본원에 기재된 AAHS, 인산알루미늄, 수산화알루미늄, 예컨대 알히드로겔(Alhydrogel)®, 또는 다른 알루미늄 염 아주반트, 사포닌-기재 아주반트, 예컨대 이스코메트릭스™ (씨에스엘, 리미티드), TLR-효능제, 또는 지질 나노입자)와 조합되어 사용될 수 있다.
- [0122] 예방적 치료는 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 뎅기 바이러스 백신 조성물을 사용하여 수행될 수 있다. 본 발명의 조성물은 일반 집단 또는 뎅기 감염의 위험이 증가된 사람, 예를 들어 아에데스 속의 모기가 창궐하는 지역에 살거나 이 지역으로 여행을 떠날 사람에게 투여될 수 있다.

- [0123] "치료를 필요로 하는" 자는 이미 뎅기로 감염된 (예를 들어 DEN1, DEN2, DEN3 또는 DEN4 중 1종 이상으로 감염된) 자, 뿐만 아니라 감염되기 쉬운 자 또는 감염 가능성의 감소가 요망되는 임의의 사람을 포함한다.
- [0124] 본 발명의 뎅기 바이러스 백신 조성물은 관련 기술분야에 널리 공지된 기술을 사용하여 제제화되고 환자에게 투여될 수 있다. 제약 투여에 대한 가이드라인은 일반적으로, 예를 들어 문헌 [Vaccines Eds. Plotkin and Orenstein, W.B. Sanders Company, 1999; Remington's Pharmaceutical Sciences 20th Edition, Ed. Gennaro, Mack Publishing, 2000; 및 Modern Pharmaceutics 2nd Edition, Eds. Banker and Rhodes, Marcel Dekker, Inc., 1990]에 제공되어 있다.
- [0125] 따라서, 본 발명은 환자에게 면역학적 유효량의 본원에 기재된 임의의 뎅기 바이러스 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 뎅기 감염에 대한 보호 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 뎅기 바이러스 백신 조성물은 지카, 홍역, 볼거리 및 풍진, 또는 수두 등의 질환을 치료하거나 예방하기 위한 다른 백신과 조합되어 공-투여된다.
- [0126] 또한, 뎅기 감염의 치료 방법 또는 뎅기 감염과 연관된 임의의 병리학적 상태의 치료 방법이 본 발명에 의해 제공되고, 상기 치료는 감염의 예방, 및 임상 증상의 중증도의 감소, 질환 진행의 지연 또는 방지, 및/또는 감염 가능성 또는 그의 임상 증상의 감소를 포함하고; 상기 방법은 환자에게 면역학적 유효량의 본원에 기재된 임의의 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0127] 본 발명의 추가의 실시양태는 환자에게 본 발명의 2종 이상의 조성물을 프라임/부스트 요법으로 투여하는 것을 포함한다. 따라서, 본 발명은 뎅기 감염의 예방 또는 그의 가능성의 감소를 필요로 하는 환자에서 뎅기 감염을 예방하거나 또는 뎅기 감염의 가능성을 감소시키는 방법에 관한 것이며, 이는
- [0128] (a) 환자에게 본 발명의 제1 뎅기 바이러스 백신 조성물을 투여하는 단계;
- [0129] (b) 단계 (a) 후 미리 결정된 양의 시간이 경과하기를 기다리는 단계;
- [0130] (c) 환자에게 본 발명의 제2 뎅기 바이러스 백신 조성물을 투여하는 단계; 및
- [0131] (d) 임의로 단계 (b) 및 (c)를 반복하는 단계
- [0132] 를 포함하고, 이에 의해 환자에서 뎅기 감염이 예방되거나 또는 뎅기에 감염될 가능성이 감소된다.
- [0133] 상기 방법의 실시양태에서, 본 발명의 뎅기 바이러스 백신 조성물은 동결된 액체 형태이다. 대안적 실시양태에서, 뎅기 바이러스 백신 조성물은 동결건조되거나 또는 마이크로웨이브 건조되고, 멸균 희석제로 재구성된 후에 환자에게 투여된다.
- [0134] 본 발명의 뎅기 바이러스 백신 조성물의 제1 투여와 본 발명의 뎅기 바이러스 백신 조성물의 제2 투여 또는 그 이후의 임의의 투여 사이의 시간의 양은 약 2주 내지 약 2년이다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 다중 투여 사이에 2개월 내지 12개월의 시간이 경과한다. 본 발명의 이러한 측면의 대안적 실시양태에서, 백신 조성물의 각각의 용량의 각각의 투여 사이의 시간의 양은 독립적으로 2주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월, 18개월, 19개월, 20개월, 21개월, 22개월, 23개월 및 24개월로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0135] 본 발명의 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 뎅기 바이러스 백신 조성물은 동일하다. 대안적 실시양태에서, 제1 및 제2 뎅기 바이러스 백신 조성물은 동일하지 않다.
- [0136] 본 발명의 뎅기 바이러스 백신 조성물은 상이한 경로에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 비경구로, 즉 피내, 피하 또는 근육내 주사에 의해 투여된다. 피하 및 근육내 투여는, 예를 들어 바늘 또는 제트 주사기를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0137] 본원에 기재된 조성물은 투여 제제에 상용성인 방식으로, 및 뎅기 감염의 치료 및/또는 뎅기 감염 가능성의 감소에 면역학적 효과적인 양으로 투여될 수 있다. 본 발명의 문맥에서, 환자에게 투여되는 용량은 시간이 경과함에 따라 환자에서 유익한 반응, 예컨대 뎅기 바이러스 수준의 감소를 가져오기에, 또는 뎅기 감염의 가능성을 감소시키기에 충분하여야 한다. 투여될 뎅기 바이러스 백신의 양은 연령, 성별, 체중 및 전반적 건강 상태를 비롯하여 치료될 대상체에 좌우될 수 있다. 이와 관련하여, 투여가 필요한 백신의 정확한 양은 진료의의 판단에 좌우될 것이다. 뎅기 감염에 대한 치료 또는 예방에서 투여될 백신의 유효량을 결정할 때, 의사는 순환 혈장 수준, 질환의 진행, 및 항-뎅기 항체의 생산을 평가할 수 있다. 임의의 사건에서, 본 발명의 면역원성 조성

물의 적합한 투여량은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0138] 적합한 투여 요법은 바람직하게는 환자의 연령, 체중, 성별 및 의학적 상태; 투여 경로; 목적하는 효과; 및 사용되는 특정한 조성물을 비롯하여 관련 기술분야에 널리 공지된 인자를 고려하여 결정된다. 투여 시기는 관련 기술분야에 널리 공지된 인자에 좌우되고, 2주 내지 24개월 범위일 수 있다. 초기 투여 후에, 항체 역가를 유지 및/또는 부스팅하기 위해 1회 이상의 추가의 용량이 투여될 수 있다.

[0139] 본 발명은 또한 Dengue 감염 또는 그의 증상이 예방 또는 호전되어야 하는 환자에게 Dengue 바이러스 백신의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, Dengue 감염을 예방하거나 또는 그의 증상을 예방 또는 호전시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 이러한 측면의 추가 실시양태는 Dengue 바이러스 백신 조성물의 투여 후에 미리 결정된 양의 시간이 경과하도록 하는 단계 및 Dengue 바이러스 백신 조성물의 제2 용량을 투여하는 단계를 포함한다.

[0140] 상기 기재된 방법에서, 제1 Dengue 백신은 바람직하게는 4가지이고, DEN1, DEN2, DEN3 및 DEN4 성분을 포함하며, 여기서 각각의 성분은 본원에 기재된 바와 같은 생 약독화 Dengue 바이러스 또는 생 약독화 키메라 플라비바이러스를 포함한다. 예시적 실시양태에서, 생 약독화 Dengue 백신은 4종의 키메라 플라비바이러스를 포함하며, 여기서 각각의 키메라 플라비바이러스는 단일 Dengue 바이러스 혈청형의 prM 및 E 단백질 및 상이한 플라비바이러스의 캡시드 및 비-구조 단백질을 포함하고, 여기서 각각의 키메라 플라비바이러스는 약독화된. 특정 실시양태에서, 4종의 키메라 플라비바이러스의 캡시드 및 비구조 단백질은 황열 바이러스로부터의 것이다. 대안적 실시양태에서, 각각의 4종의 키메라 플라비바이러스의 캡시드 및 비구조 단백질은 prM 및 E 단백질과는 상이한 Dengue 혈청형으로부터의 것이다.

[0141] 본 발명의 이러한 측면의 일부 실시양태에서, 제2 Dengue 백신은 DEN1, DEN2, DEN3 및 DEN4로부터의 Dengue E 단백질 또는 그의 단편을 포함하는 4가 재조합 Dengue 서브유닛 백신이다. 본 발명의 이러한 방법에 유용한 서브유닛 백신은 본원에 기재되어 있다. 바람직한 실시양태에서, E 단백질은 각각 그의 N-말단에서의 아미노산 잔기 1로부터 시작하여 DEN1, DEN2, DEN3 및 DEN4의 야생형 E의 길이의 약 80%로 구성된다.

[0142] 실시예

[0143] 이들 연구에 사용된 생 약독화 Dengue 바이러스 서열의 예는 rDEN1 - rDEN1Δ30-1545 PMVS (서열식별번호: 6); rDEN2 - rDEN2/4 Δ 30(ME)-1495,7163 PMVS (서열식별번호: 7); rDEN3 - rDEN3Δ30/31-7164 PMVS (서열식별번호: 8); 및 rDEN4 - rDEN4 Δ 30-7132,7163,8308 PMVS (서열식별번호: 9)이다.

[0144] 표 1: PMVS DENV1 서열 변화의 요약

뉴클레오타이드 번호	유전자	뉴클레오타이드 변화		단백질 아미노산 번호	아미노산 변화	
		wt	PMVS		wt	PMVS
1544*	E	A	C	484	Lys	Arg
1545	E	A	G	484	Lys	Arg
1549*	E	A	G	485	Ser	Ser

[0145]

[0146] *안정화 및 클로닝 목적을 위해 도입됨

[0147] 표 2: PMVS DENV2 서열 변화의 요약

뉴클레오티드 번호	유전자	뉴클레오티드 변화		단백질 아미노산 번호	아미노산 변화	
		원래 cDNA 클론	PMVS		원래 cDNA 클론	PMVS
183	C	T	C	28	Leu	Leu
1490	E	G	A	184	Glu	Glu
1495	E	C	U	186	Ser	Phe
7132	NS4b	C	U	102	Thr	Ile
7163	NS4b	A	C	112	Leu	Phe
7166	NS4b	C	G	113	Val	Val
7169	NS4b	T	C	114	His	His

[0148]

[0149] 표 3: PMVS DENV3 서열 변화의 요약

뉴클레오티드 번호	유전자	뉴클레오티드 변화		단백질 아미노산 번호	아미노산 변화	
		wt	PMVS		wt	PMVS
1539	E	A	G	202	Lys	Arg
1681	E	A	G	250	Val	Val
2095	E	C	U	388	Ile	Ile
7164	NS4b	T	C	115	Val	Ala
7304	NS4b	T	C	162	Ser	Pro
8082	NS5	A	G	173	Lys	Arg
10533	3'UTR	G	A	N/A	N/A	N/A

[0150]

[0151] 표 4: PMVS DENV4 서열 변화의 요약

뉴클레오티드 번호	유전자	뉴클레오티드 변화		단백질 아미노산 번호	아미노산 변화	
		원래 cDNA 클론	PMVS		원래 cDNA 클론	PMVS
2440	NS1	T	C	6	Val	Ala
7132	NS4b	C	U	102	Thr	Ile
7153	NS4b	T>C	U	109	Val>Ala	Val
7163	NS4b	A	C	112	Leu	Phe
8308	NS5	A>G	G	249	Lys>Arg	Arg

[0152]

[0153] 상기 표에서의 DENV1, 2, 3 및 4 야생형 및 본래의 cDNA 클론은 문헌 [Whitehead, S. S. et al., J Virol 77:1653-1657 (2003); Blaney, J. E. et al. The American journal of tropical medicine and hygiene 71:811-821 (2004); Blaney, J. E., Jr. et al., BMC Infect Dis 4:39 (2004); Durbin, A. P. et al., The American journal of tropical medicine and hygiene 65:405-413 (2001)]에 기재된 땡기 바이러스 혈청형에 상응한다.

[0154] 상기 버전의 생 약독화 땡기 바이러스는 하기 실시예에서 DENV1 또는 DEN1, DENV2 또는 DEN2, DENV3 또는 DEN3 및 DENV4 또는 DEN4로 지칭된다. 실시예 1-6의 경우, 제제는 각각의 DENV1, DENV2, DENV3 또는 DENV4의 2×10^5 pfu/ml의 효력을 가졌다. 실시예 7-10의 경우, 제제는 각각의 DEN1, DEN2, DEN3 또는 DEN4의 1.5×10^5 pfu/ml의

효력을 가졌다.

[0155] 실시예 1

[0156] DENV4에 대한 CMC, PG 및 아미노산의 효과 (덴그박시아(Dengvaxia)® 제제와의 비교)

[0157] 3가지 개별 연구를 수행하여 DENV4의 동결건조 수율 및 안정성에 대한 다양한 부형제의 효과를 조사하였다. 제제는 하기 표 5에 열거된다.

[0158] 표 5: 제제 조성

제제 번호	조성
1	11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 30mM 염화나트륨 pH 7.5
2	11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스 pH 7.5
3	11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 75mM 염화나트륨 pH 7.5
4	11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 75mM 염화나트륨, 5mg/mL 소듐 카르복시메틸셀룰로스 pH 7.5
5	11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 75mM 염화나트륨, 5mg/mL 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 5mg/mL 프로필렌 글리콜 pH 7.5
13	11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 25mg/mL 소르비톨, 75mM 염화나트륨, 5mg/mL 소듐 카르복시메틸셀룰로스 pH 7.5
18	11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 50mM 염화나트륨, 5mg/mL 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 5mg/mL 프로필렌 글리콜, 25mM L 아르기닌 pH 7.5
19	11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 50mM 염화나트륨, 5mg/mL 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 5mg/mL 프로필렌 글리콜, 25mM L 글루탐산 pH 7.5
20	11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 50mM 염화나트륨, 5mg/mL 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 5mg/mL 프로필렌 글리콜, 25mM L 류신 pH 7.5
21	11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 50mM 염화나트륨, 5mg/mL 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 5mg/mL 프로필렌 글리콜, 25mM L 프롤린 pH 7.5
22	11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 75mM 염화나트륨, 5mg/mL 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 5mg/mL 글리세롤 pH 7.5
25	11mM 트리스, 90mg/mL 수크로스, 75mM 염화나트륨, 5mg/mL 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 5mg/mL 프로필렌 글리콜 pH 7.5
26	6mM 트리스, 37.5mg/mL 소르비톨, 75mg/mL 수크로스, 55mg/mL 트레할로스, 2.5mg/mL 우레아, 15mg/mL 아미노산 혼합물 [†]
45	11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 50mM 염화나트륨, 5mg/mL 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 5mg/mL 프로필렌 글리콜 pH 7.5
46	11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 30mM 염화나트륨, 5mg/mL 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 5mg/mL 프로필렌 글리콜 pH 7.5
47	11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 15mM 염화나트륨, 5mg/mL 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 5mg/mL 프로필렌 글리콜 pH 7.5
50	11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 50mM 염화칼륨, 5mg/mL 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 5mg/mL 프로필렌 글리콜 pH 7.5
55	11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 75mM 염화나트륨, 5mg/mL 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 5mg/mL 글리세롤, 5mg/mL 우레아 pH 7.5

[0159]

56	11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 페놀 레드가 없는 201mg/mL 라이보비즈 L-15 배지*, 5mg/mL 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 5mg/mL 프로필렌 글리콜 pH 7.5
57	5.5mM 트리스, 5.5mM L 히스티딘, 90mg/mL 수크로스, 50mM 염화나트륨, 5mg/mL 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 5mg/mL 프로필렌 글리콜, 25mM L 류신 pH 7.5
81	11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 75mM 염화나트륨, 5mg/mL 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 5mg/mL 프로필렌 글리콜, 25mM L 류신 pH 7.5
98	11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 50mM 염화나트륨, 5mg/mL 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 5mg/mL 프로필렌 글리콜, 25mM L 류신, 0.01% 폴록사머 188 pH 7.5
104	11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 50mM 염화나트륨, 5mg/mL 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 5mg/mL 프로필렌 글리콜, 25mM L 류신, 25mM L 글루탐산, pH 7.5

[0160]

[0161]

*페놀 레드가 없는 라이보비즈 L-15 배지는 하이클론 래보라토리즈, 인크.(Hyclone Laboratories, Inc.)에 의해 제조된 용액이다.

[0162]

연구 1: DENV4를 11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스 및 75mM NaCl 중에서 (제제 3), 5mg/mL 소듐 카르복시메틸셀룰로스 (소듐 CMC)를 첨가하거나 (제제 4) 또는 5mg/mL 소듐 CMC 및 5mg/mL 프로필렌 글리콜을 첨가하여 (제제 5) 제제화하였다.

[0163]

연구 2: 제제 5를 11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 50mM NaCl, 5mg/mL 소듐 CMC 및 5mg/mL 프로필렌 글리콜 뿐만 아니라 25mM 류신 (제제 20) 또는 25mM 프롤린 (제제 21)을 함유하는 대등한 제제와 비교하여 시험하였다.

[0164]

연구 3: 제제 20을 11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 50mM NaCl, 5mg/mL 소듐 CMC 및 5mg/mL 프로필렌 글리콜 및 25mM 글루탐산을 함유하는 대등한 제제 (제제 19) 및 37.5mg/mL 소르비톨, 75mg/mL 수크로스, 55mg/mL 트레할로스, 25mg/mL 우레아, 6mM 트리스, 15mg/mL의 아미노산 혼합물로 이루어진 탱그박시아® 제제 (제제 26)와 비교하여 시험하였다.

[0165]

모든 연구를 위해, 샘플을 동결시키고, 일부분을 동결된 액체 대조군으로서 -70°C에서 저장하고, 일부분을 동결 건조시켰다. 동결건조 후, 일부 샘플을 대조군으로서 -70°C에서 저장하고, 나머지를 25°C에서 1주 동안 두었다. 인큐베이션 후, 25°C 샘플을 동결시키고, 동결된 액체 대조군 및 동결된 동결건조된 대조군과 함께 탱기 상대 감염성 검정 (DRIA)으로 시험하였다. 각각의 샘플의 2개의 개별 바이알을 시험하였다.

[0166]

DRIA는 외피 단백질의 발현을 기초로 하여 탱기 바이러스 제제 샘플의 감염성을 측정하는데 사용되는 세포-기반 상대 감염성 검정이다. 배로 세포를 96-웰 마이크로-타이터 플레이트에 플레이팅하고, 24시간 동안 인큐베이션 한 다음, DEN1, DEN2, DEN3 및/또는 DEN4 참조 표준물 및 시험 물품에 추가로 시험될 혈청형에 특이적인 양성 대조군의 연속 희석물로 감염시켰다. 감염된 세포를 48시간 동안 인큐베이션하고, 이어서 세포를 묶은 포름알데히드 용액으로 고정시켰다. 이어서, 고정된 세포를 투과화시킨 후, 1차 항체 (토끼 항-DEN 혈청형-특이적 MAb)를 플레이트에 첨가하고, 밤새 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척한 후, 2차 항체 (당나귀 NL637-접합된 항-토끼 IgG, 알앤디 시스템즈(R&D Systems))를 웰에 첨가하고, 실온에서 > 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척한 후, 미니맥스(MiniMax) 영상화 관독기 (몰레큘라 디바이시스(Molecular Devices))를 사용하는 영상 분석을 위한 준비로 PBS를 웰에 첨가하였다. 감소된 4 파라미터 로지스틱 곡선 피트를 사용하여 소프트맥스 프로(SoftMAX Pro) 소프트웨어 (몰레큘라 디바이시스)를 사용하여 샘플의 상대 효력 (%RP) (참조 표준물 대비)을 계산하였다.

[0167]

동결건조 감염성 결과를 동결된 액체 대조군 감염성 결과로 나눔으로써 동결건조 수율을 계산하였다. 25°C에서 1주 동안 저장 후 로그 손실을 계산하기 위해, 감염성 값을 로그 스케일로 전환시키고, 각각의 제제에 대해 -70°C에서 동결건조된 대조군 결과로부터 1주 25°C 로그 결과를 차감하였다.

[0168]

소듐 CMC와 프로필렌 글리콜의 조합에서 상승작용적 효과가 관찰되었고, 이는 개선된 동결건조 수율 및 안정성을 가져왔다. 류신의 첨가는 수율 및 안정성을 추가로 개선시켰다. 소듐 CMC, 프로필렌 글리콜 및 류신 또는 글루탐산을 함유하는 제제는 탱그박시아 제제에 비해 개선된 동결건조 수율을 제공하였다. 도 1-2를 참조한다.

제제 26에 대한 1주 25℃ 안정성 시점은 25℃에서의 저장 후 케이크 붕괴로 인해 시험하지 않았다.

- [0169] 실시예 2
- [0170] DENV4에 대한 당 알콜의 효과:
- [0171] DENV4를 11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 75mM NaCl, 및 5mg/mL 소듐 CMC pH 7.5의 베이스 제제 중에서, 5mg/mL 프로필렌 글리콜 (제제 5), 5mg/mL 글리세롤 (제제 22), 또는 25mg/mL 소르비톨 (제제 13)을 당 알콜로서 사용하여 제제화하였다.
- [0172] 샘플을 동결시키고, 일부분을 동결된 액체 대조군으로서 -70℃에서 저장하고, 일부분을 동결건조시켰다. 동결건조 후, 일부 샘플을 -70℃에서 저장하고, 나머지를 25℃에서 1주 동안 두었다. 인큐베이션 후, 25℃ 샘플을 동결시키고, 동결된 액체 대조군 및 동결된 동결건조된 대조군과 함께 탱기 상대 감염성 검정으로 시험하였다. 각각의 샘플의 2개의 개별 바이알을 시험하였다.
- [0173] 동결건조 감염성 결과를 동결된 액체 대조군 감염성 결과로 나눔으로써 동결건조 수율을 계산하였다. 25℃에서 1주 동안 저장 후 로그 손실을 계산하기 위해, 감염성 값을 로그 스케일로 전환시키고, 각각의 제제에 대해 -70℃에서 동결건조된 대조군 결과로부터 1주 25℃ 로그 결과를 차감하였다.
- [0174] 본 실시예는 프로필렌 글리콜 및 글리세롤 둘 다가 소르비톨과 비교하여 DENV4 동결건조 수율 및 안정성을 개선시켰다는 것을 입증한다 (도 3 및 4 참조).
- [0175] 실시예 3
- [0176] DENV4에 대한 pH의 효과:
- [0177] DENV4를 제제 22 (11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 75mM NaCl, 5mg/mL 소듐 CMC, 5mg/mL 글리세롤, pH 7.0, 7.5 또는 8.0) 중에서 제제화하였다.
- [0178] 샘플을 동결시키고, 일부분을 동결된 액체 대조군으로서 -70℃에서 저장하고, 일부분을 동결건조시켰다. 동결건조 후, 일부 샘플을 -70℃에서 저장하고, 나머지를 25℃에서 1주 동안 두었다. 인큐베이션 후, 25℃ 샘플을 동결시키고, 동결된 액체 대조군 및 동결된 동결건조된 대조군과 함께 탱기 상대 감염성 검정으로 시험하였다. 각각의 샘플의 2개의 개별 바이알을 시험하였다.
- [0179] 동결건조 감염성 결과를 동결된 액체 대조군 감염성 결과로 나눔으로써 동결건조 수율을 계산하였다. 25℃에서 1주 동안 저장 후 로그 손실을 계산하기 위해, 감염성 값을 로그 스케일로 전환시키고, 각각의 제제에 대해 -70℃에서 동결건조된 대조군 결과로부터 1주 25℃ 로그 결과를 차감하였다.
- [0180] 도 5 및 6은 DENV4가 pH 7.0 내지 pH 8.0의 제제 22 중에서 제제화될 수 있다는 것을 입증한다.
- [0181] 실시예 4
- [0182] DENV4에 대한 완충제의 효과:
- [0183] 연구 1에서, DENV4를 90mg/mL 수크로스, 75mM NaCl, 5mg/mL 소듐 CMC 및 5mg/mL 글리세롤의 베이스 제제 중에서 pH 7.5로 조정된 대안적 완충제 시스템을 사용하여 제제화하였다. 베이스 제제 이외에, 제제 22는 11mM 인산칼륨을 함유하였고, 제제 25는 11mM 트리스를 함유하였다.
- [0184] 연구 2에서, DENV4를 90mg/mL 수크로스, 75mM NaCl, 5mg/mL 소듐 CMC 및 5mg/mL 프로필렌 글리콜의 베이스 제제 중에서 pH 7.5로 조정된 대안적 완충제 시스템을 사용하여 제제화하였다. 베이스 제제 이외에, 제제 5는 11mM 인산칼륨을 함유하였고, 제제 57은 5.5mM 히스티딘과 5.5mM 트리스의 조합을 함유하였다.
- [0185] 샘플을 동결시키고, 일부분을 동결된 액체 대조군으로서 -70℃에서 저장하고, 일부분을 동결건조시켰다. 동결건조 후, 일부 샘플을 -70℃에서 저장하고, 나머지를 25℃에서 1주 동안 두었다. 인큐베이션 후, 25℃ 샘플을 동결시키고, 동결된 액체 대조군 및 동결된 동결건조된 대조군과 함께 탱기 상대 감염성 검정으로 시험하였다. 각각의 샘플의 2개의 개별 바이알을 시험하였다.
- [0186] 동결건조 감염성 결과를 동결된 액체 대조군 감염성 결과로 나눔으로써 동결건조 수율을 계산하였다. 25℃에서 1주 동안 저장 후 로그 손실을 계산하기 위해, 감염성 값을 로그 스케일로 전환시키고, 각각의 제제에 대해 -70℃에서 동결건조된 대조군 결과로부터 1주 25℃ 로그 결과를 차감하였다.
- [0187] 도 7 및 8은 DENV4가 인산칼륨, 트리스, 또는 히스티딘과 트리스의 조합을 포함한 pH 7.5의 다양한 완충제 시스

템 중에서 제제화될 수 있다는 것을 입증한다.

- [0188] 실시예 5
- [0189] DENV4에 대한 NaCl의 효과:
- [0190] DENV4를 11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 5mg/mL 소듐 CMC 및 5mg/mL 프로필렌 글리콜의 베이스 제제 중에서 15-75mM의 농도 범위의 NaCl을 사용하여 제제화하였다.
- [0191] 샘플을 동결시키고, 일부분을 동결된 액체 대조군으로서 -70℃에서 저장하고, 일부분을 동결건조시켰다. 동결 건조 후, 일부 샘플을 -70℃에서 저장하고, 나머지를 25℃에서 1주 동안 두었다. 인큐베이션 후, 25℃ 샘플을 동결시키고, 동결된 액체 대조군 및 동결된 동결건조된 대조군과 함께 탱기 상대 감염성 검정으로 시험하였다. 각각의 샘플의 2개의 개별 바이알을 시험하였다.
- [0192] 동결건조 감염성 결과를 동결된 액체 대조군 감염성 결과로 나눔으로써 동결건조 수율을 계산하였다. 25℃에서 1주 동안 저장 후 로그 손실을 계산하기 위해, 감염성 값을 로그 스케일로 전환시키고, 각각의 제제에 대해 -70℃에서 동결건조된 대조군 결과로부터 1주 25℃ 로그 결과를 차감하였다.
- [0193] 도 9 및 10은 25℃에서 1주 동안의 DENV4 동결건조 수율 및 안정성이 NaCl 농도가 15-75mM 범위였을 때 유사하였다는 것을 보여준다.
- [0194] 실시예 6
- [0195] 모든 탱기 혈청형에 대한 프로필렌 글리콜 및 글리세롤의 효과:
- [0196] DENV1, DENV2, DENV3 및 DENV4를 pH 7.5의 제제 5 (11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 75mM NaCl, 5mg/mL CMC, 5mg/mL 프로필렌 글리콜), 제제 20 (11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 50mM NaCl, 5mg/mL CMC, 5mg/mL 프로필렌 글리콜 및 25mM 류신), 및 제제 22 (11mM 인산칼륨, 90mg/mL 수크로스, 75mM NaCl, 5mg/mL CMC, 5mg/mL 글리세롤) 중에서 1가 약물 제품으로서 제조하였다.
- [0197] 샘플을 동결시키고, 일부분을 동결된 액체 대조군으로서 -70℃에서 저장하고, 일부분을 동결건조시켰다. 동결 건조 후, 일부 샘플을 -70℃에서 저장하고, 나머지를 25℃에서 1주 동안 두었다. 인큐베이션 후, 25℃ 샘플을 동결시키고, 동결된 액체 대조군 및 동결된 동결건조된 대조군과 함께 탱기 상대 감염성 검정으로 시험하였다. 각각의 샘플의 2개의 개별 바이알을 시험하였다.
- [0198] 동결건조 감염성 결과를 동결된 액체 대조군 감염성 결과로 나눔으로써 동결건조 수율을 계산하였다. 25℃에서 1주 동안 저장 후 로그 손실을 계산하기 위해, 감염성 값을 로그 스케일로 전환시키고, 각각의 제제에 대해 -70℃에서 동결건조된 대조군 결과로부터 1주 25℃ 로그 결과를 차감하였다.
- [0199] 도 11 및 12는 프로필렌 글리콜 및 글리세롤이 수크로스, NaCl 및 소듐 CMC와 조합되었을 때 모든 4종의 혈청형을 안정화시킨다는 것을 보여준다.
- [0200] 실시예 7
- [0201] SPG (수크로스, 인산칼륨, 글루탐산)를 하기 표 6에 나타난 농도를 갖는 10X 용액으로서 제조하였다.
- [0202] 표 6
- | | |
|--|-------------|
| 수크로스 (결정) | 746.2mg/mL |
| KH ₂ PO ₄ (일염기성, 무수) | 5.17 mg/mL |
| K ₂ HPO ₄ (이염기성, 무수) | 12.54 mg/mL |
| L-글루탐산 (일나트륨 염, 1수화물) | 11.2 mg/mL |
- [0203]
- [0204] 하기 다른 용액을 또한 제조하였다: 650 mg/mL 수크로스, 650 mg/mL 트레할로스, 2수화물, 200 mg/mL 젤라틴, 150 mg/mL 아르기닌, 및 20 mg/mL 인간 혈청 알부민 (HSA).
- [0205] SPG, 수크로스, 트레할로스, 젤라틴, 아르기닌 및 HSA를 PES 0.22 μm 스테리컬 필터로 여과하였다. 용액, 라이보비츠 L-15 및 DEN1을 합하여 하기 나타난 최종 제제를 수득하였다:

[0206] 표 7

Rx#	제제
1	250 mg/mL L-15, 11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75mg/mL 수크로스
2	250 mg/mL L-15, 11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75mg/mL 수크로스, 175 mg/mL 트레할로스
4	250 mg/mL L-15, 11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75mg/mL 수크로스, 175 mg/mL 트레할로스, 2.5mg/mL HAS
5	250 mg/mL L-15, 11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75mg/mL 수크로스, 175 mg/mL 트레할로스, 25 mg/mL 젤라틴
6	250 mg/mL L-15, 11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 150 mg/mL 수크로스
7	250 mg/mL L-15, 11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75 mg/mL 수크로스, 75 mg/mL 트레할로스
9	250 mg/mL L-15, 11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75 mg/mL 수크로스, 75 mg/mL 트레할로스, 40 mg/mL 아르기닌
11	450 mg/mL L-15, 11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75 mg/mL 수크로스
12	450 mg/mL L-15, 11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75 mg/mL 수크로스, 175 mg/mL 트레할로스, 25 mg/mL 젤라틴
13	450 mg/mL L-15, 11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75 mg/mL 수크로스, 75 mg/mL 트레할로스, 40 mg/mL 아르기닌

[0207]

[0208]

제제를 2R 유리 바이알 내에 0.5mL 충전량으로 충전하고, 15분 동안 -115℃에서 동결시켰다. 동결되었을 때, 바이알을 마이크로웨이브 진공 건조기 (MVD)에서 건조시켰다. 건조되었을 때, 일부 바이알을 25℃에서 1주 동안 안정하게 두었다. 이어서, 탱기 상대 감염성 검정 (DRIA)을 사용하는 효력 시험에 바이알을 제출하였다.

[0209]

마이크로웨이브 건조 공정

[0210]

마이크로웨이브 진공 건조기 (MVD)에서 건조된 물질을 급속 동결시키고, 즉시 건조 챔버 내에 로딩하였다. 신속하게 챔버에 100mTorr 미만으로 진공을 걸었다. 진공 설정점에 도달하였을 때, 물질의 건조를 시작하기 위해 마그네트론 (즉 마그네트론 수 및 전력 출력)을 선택하였다. 선택된 마그네트론 (예를 들어 총 4개의 마그네트론 중 2개의 마그네트론)을 균일한 전력 분포를 위해 30초마다 키고 끄는 사이클의 알고리즘을 갖는 스캐닝 모드로 마이크로웨이브 (방사선이 진행과 포맷으로 적용됨)를 작동시켰다. 추가로, 장치 상단에 물을 로딩하면 마이크로웨이브가 샘플을 단일 통과하여 반사된 마이크로웨이브로부터의 임의의 간섭을 최소화함으로써 승화 제어 가능하게 한다. 전력을 건조 사이클 전체에 걸쳐 증가시켜 30 내지 45℃의 최종 온도를 달성하였다. 건조되었을 때, 챔버에서 진공을 해제하고, 물질을 밀봉하였다.

[0211]

표 8

Rx#	1	2	4	5	6	7	9	11	12	13
Rx	250 mg/mL L-15, 11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75mg/mL 수크로스	250 mg/mL L-15, 11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75mg/mL 수크로스, 175 mg/mL 트레할로스	250 mg/mL L-15, 11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75mg/mL 수크로스, 175 mg/mL 트레할로스, 2.5mg/mL HAS	250 mg/mL L-15, 11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75mg/mL 수크로스, 175 mg/mL 트레할로스, 25 mg/mL 젤라틴	250 mg/mL L-15, 11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 150 mg/mL 수크로스	250 mg/mL L-15, 11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75 mg/mL 수크로스, 75 mg/mL 트레할로스	250 mg/mL L-15, 11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75 mg/mL 수크로스, 75 mg/mL 트레할로스, 40 mg/mL 아르기닌	450 mg/mL L-15, 11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75 mg/mL 수크로스	450 mg/mL L-15, 11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75 mg/mL 수크로스, 175 mg/mL 트레할로스, 25 mg/mL 젤라틴	450 mg/mL L-15, 11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75 mg/mL 수크로스, 75 mg/mL 트레할로스, 40 mg/mL 아르기닌
F/T 수율 (%)	55	88	142	102	61	69	53	23	98	29
건조 수율 (%)	62	59	67	83	64	78	6	167	98	10
평균 로그 손실	0.45	0.26	0.23	0.19	0.33	0.35	3.65	0.36	0.27	2.11

[0212]

[0213]

동결/해동 (F/T) 수율, 건조 수율 및 25℃에서 1주 동안의 로그 손실을 모든 제제에 대해 결정하였다. 동결/해

동 (F/T) 수율은 보고된 상대 효력을 -70°C 에서의 동결된 대조군에 대한 예상 상대 효력으로 나눔으로써 계산하였다. 건조 수율은 건조된 물질의 상대 효력을 동결된 대조군의 상대 효력으로 나눔으로써 계산하였다. 로그 손실은 T0 시점의 건조된 물질 및 1주 25°C 안정성 물질의 상대 효력을 Log10 계산에 의해 로그로 전환시킴으로써 계산하였다. 수를 로그로 전환하였으면, T0 시점으로부터 안정성 시점을 차감하여 25°C 에서 1주 동안의 로그 손실을 결정하였다.

[0214] 제제 2, 4, 5 및 12는 F/T 수율, 건조 수율 및 25°C 에서 1주 동안의 로그 손실의 최상의 조합을 나타냈다. 이들 4종의 제제 모두는 $\geq 25\%$ 디사카라이드 (수크로스 및/또는 트레할로스)를 함유하였다.

[0215] 표 9: 표 7에서의 제제의 부형제 범위의 요약

부형제	양 (0.5mL 용량당)
수크로스	37.5mg-75mg
인산칼륨 (일염기성, 무수)	$\sim 0.26\text{mg}$
인산칼륨 (이염기성, 무수)	$\sim 0.63\text{mg}$
L-글루탐산 (일나트륨 염, 1수화물)	0.56mg
트레할로스	37.5mg-87.5mg
인간 혈청 알부민 (HSA)	1.25mg
아르기닌	20mg
젤라틴	12.5mg

[0216]

[0217] 실시예 8

[0218] SPG (수크로스, 인산칼륨, 글루탐산)를 실시예 7에 따라 제조하였다. 하기 다른 용액을 또한 제조하였다: 650 mg/mL 수크로스, 650 mg/mL 트레할로스, 5M 염화나트륨 (NaCl) 및 10 mg/mL 소듐 카르복시메틸 셀룰로스 (소듐 CMC).

[0219] 모든 용액을 PES $0.22\mu\text{m}$ 스테리컬 필터로 여과하였다. 용액과 탱기 바이러스 DEN1 또는 DEN4를 합하여 결과 표에 나타난 최종 제제를 수득하였다.

[0220] 제제를 2R 유리 바이알 내에 0.5mL 충전량으로 충전하고, 15분 동안 -115°C 에서 동결시켰다. 동결되었을 때, 바이알을 마이크로웨이브 진공 건조기 (MVD)에서 건조시켰다. 건조되었을 때, 일부 바이알을 25°C 에서 1주 동안 안정하게 두었다. 이어서, 탱기 상대 감염성 검정 (DRIA)을 사용하는 효력 시험에 바이알을 제출하였다.

[0221] 표 10

제제	DEN1 평균 로그 손실 25°C 1주	DEN4 평균 로그 손실 25°C 1주	잔류 수분 (%)
11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75 mg/mL 수크로스, 175 mg/mL 트레할로스	0.55	0.55	5.65±0.75
11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75 mg/mL 수크로스, 175 mg/mL 트레할로스, 30mM NaCl	0.46	0.54	5.61±0.40
11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75 mg/mL 수크로스, 175 mg/mL 트레할로스, 30mM NaCl, 5 mg/mL 소듐 CMC	0.60	0.59	4.58±0.33
11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75 mg/mL 수크로스, 75 mg/mL 트레할로스	1.12	0.95	3.71±0.22
11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75 mg/mL 수크로스, 75 mg/mL 트레할로스, 30mM NaCl	0.96	0.51	4.75±0.54
11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75 mg/mL 수크로스, 75 mg/mL 트레할로스, 30mM NaCl, 5 mg/mL 소듐 CMC	1.07	0.65	3.98±0.01
11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75 mg/mL 트레할로스	0.83	1.82	2.20±0.12
11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 75 mg/mL 트레할로스, 30mM NaCl	1.18	1.33	3.43±0.19

[0222]

[0223]

로그 손실은 T0 시점의 건조된 물질 및 1주 25°C 안정성 물질의 상대 효력을 Log10 계산에 의해 로그로 전환시킴으로써 계산하였다. 수를 로그로 전환하였으면, T0 시점으로부터 안정성 시점을 차감하여 25°C에서 1주 동안의 로그 손실을 결정하였다.

[0224]

결과는 ≥25% 디사카라이드를 함유하는 DEN1 제제의 경우 25°C 1주에서의 최저 로그 손실이 관찰되었다는 것을 나타냈다. ≥15% 디사카라이드 및 30mM 염을 갖는 DEN4 제제는 1주에 25°C에서 최저 로그 손실을 가졌다. ≥15% 디사카라이드 및 염을 함유하는 제제의 경우, 소듐 CMC의 첨가는 잔류 수분을 감소시키는데 도움이 되었다.

[0225]

표 11: 표 10에서의 제제의 부형제 범위의 요약

부형제	양 (0.5mL 용량당)
수크로스	0mg-37.5mg
인산칼륨 (일염기성, 무수)	~0.26mg
인산칼륨 (이염기성, 무수)	~0.63mg
L-글루탐산 (일나트륨 염, 1수화물)	0.56mg
트레할로스	37.5mg-87.5mg
소듐 카르복실메틸 셀룰로스	2.5mg
염화나트륨	0.88mg

[0226]

[0227]

실시예 9

[0228]

제제는 1x SPG (11mM 인산칼륨, 6mM L-글루탐산, 0.22M 수크로스)와 가변량의 L-15 (90%, 45% 및 25%) 및 DEN1, DEN2, DEN3 또는 DEN4였다. 라이보비즈 L-15에서의 주요 성분은 NaCl (137.39mM)이다. 따라서, 90% L-15는 123.65mM NaCl과 동일하고, 45% L-15는 61.83mM NaCl과 동일하고, 25% L-15는 34.35mM NaCl과 동일하다.

[0229]

제제를 2R 유리 바이알 내에 0.5mL 충전량으로 충전하고, 15분 동안 -115°C에서 동결시켰다. 동결되었을 때, 바이알을 마이크로웨이브 진공 건조기 (MVD)에서 건조시켰다. 이어서, 탱기 상대 감염성 검정 (DRIA)을 사용하여 효력 시험에 바이알을 제출하였다.

[0230]

MVD 하에 신속하게 건조된 제제는 동결건조 하에 더 느리게 건조된 제제보다 더 안정하였다 (도 13-16 참조). 상기 제제에서, ≥61.83mM NaCl의 염 농도는 건조 동안 DEN4 안정성을 개선시키는 것으로 보이며, 이는 다른 3가지 유형 (DEN1, DEN2 및 DEN3)에서는 관찰되지 않는다.

- [0231] 실시예 10
- [0232] 하기 용액을 또한 제조하였다: 500 mg/mL 수크로스, 250 mg/mL 트레할로스, 1M 염화나트륨 (NaCl), 및 10 mg/mL 소듐 카르복시메틸 셀룰로스 (소듐 CMC), 100mg/mL 폴리비닐피롤리돈 (PVP), 100mM 인산칼륨, 500mg/mL 프로필렌 글리콜, 및 멸균수.
- [0233] 모든 용액을 PES 0.22 μ m 스테리컵 필터로 여과하였다. 용액과 탱기 바이러스 (DEN1)를 합하여 하기 제제를 수득하였다: 11mM 인산칼륨, 90 mg/mL 수크로스, 5 mg/mL 소듐 CMC, 5 mg/ml PG; 11mM 인산칼륨, 200 mg/mL 수크로스, 50 mg/ml PVP K12; 11mM 인산칼륨, 75 mg/mL 수크로스, 175 mg/ml 트레할로스, 30 mM NaCl, 5 mg/ml CMC.
- [0234] 제제를 2R 유리 바이알 내에 0.5mL 충전량으로 충전하고, 15분 동안 -115°C에서 동결시켰다. 동결되었을 때, 바이알을 마이크로웨이브 진공 건조기 (MVD) 또는 동결건조기 (Lyo)에서 건조시켰다. 이어서, 탱기 상대 감염성 검정 (DRIA)을 사용하는 효력 시험에 바이알을 제출하였다.
- [0235] 도 17은 마이크로웨이브 진공 건조기에서 건조된 제제에 대한 바이알의 상대 효력이 동결건조기에서 건조된 경우보다 더 크거나 같다는 것을 보여준다.
- [0236] 표 12: 도 17에서의 제제의 부형제 범위의 요약

부형제	양 (0.5mL 용량당)
수크로스	37.5mg-100mg
인산칼륨 (일염기성, 무수)	~0.26mg
인산칼륨 (이염기성, 무수)	~0.63mg
트레할로스	87.5mg
소듐 카르복시메틸 셀룰로스	2.5mg
염화나트륨	0.88mg
PVP K12	25mg
프로필렌 글리콜	2.5mg

- [0237]
- [0238] 실시예 11
- [0239] DENV1, DENV2, DENV3 및 DENV4의 4가 제제 (제제 20)를 동결건조시키고, 37°C에서 1주 동안 (도 18a), 25°C에서 1개월 동안 (도 18b) 및 2-8°C에서 18개월 동안 (도 19a-d) 저장하였다. 각각의 시점에서 플라크 검정 (본 명세서에서 앞서 기재된 바와 같음)에 의해 효력을 분석하였다. -70°C에서 저장된 대조군 샘플을 각각의 안정성 시점과 동일하게 실행되는 검정으로 플라크 검정에 의해 시험하였다. 안정성 샘플의 로그 결과를 -70°C 대조군 샘플의 로그 결과로부터 차감하여 각각의 시점에 대한 로그 손실을 계산하였다. 도 18a-b 및 19a-d는 4가 제제 20에서 각각의 혈청형에 대한 시간 경과에 따른 로그 손실을 보여준다. 오차 막대는 각각의 시점에서 계산된 로그 손실의 평균의 2 표준 오차를 나타낸다. 제제 20은 각각 1주, 1개월 및 18개월에 관찰된 최소의 효력 손실에 의해 입증되는 바와 같이, 37°C, 25°C 및 2-8°C에서 4가 백신 내의 모든 4종의 탱기 혈청형에 대한 열 안정성을 제공한다.
- [0240] 실시예 12
- [0241] 고처리량 플라크 검정
- [0242] 고처리량 플라크 검정인 "마이크로플라크 (μ P)" 검정은 96-웰 마이크로플레이트에서 실행되는 자동화 최소화 탱기 플라크 검정이다. 간략하게, 배로 세포를 흑색 벽의 투명 바닥 조직-배양 플레이트 내의 2% L-글루타민을 함유하는 옵티프로(OptiPro) SFM 중에 웰당 40,000개 세포로 시딩하였다. 세포를 37°C, 5% pCO₂, >90% rH에서 밤새 부착되도록 하였다. 바이러스를 OptiMEM 감소된 혈청 배지 중에 사전-희석하고, 초저 부착 플레이트 내의 배지 중에 1:2로 추가로 연속 희석하였다. 세포 플레이트로부터 완만한 흡인을 사용하여 식물 배지를 제거하고, 25 μ L/웰의 접종물을 연속 희석 플레이트로부터 세포 플레이트로 옮겼다. 바이러스 흡착을 37°C, 5% pCO₂, >90% rH에서 4시간 동안 진행시켰다. 흡착 인큐베이션 후, 175 μ L/웰 오버레이 배지를 모든 웰에 첨가하여 바이러스 분비 및 확산을 억제하였다. 혈청형에 따라, 감염을 상기 언급된 인큐베이션 조건에서 2 또는 3일 동안 진행시켰다.
- [0243] 감염 인큐베이션 후, 오버레이 배지를 제거하고, 세포를 PBS 중 3.7% 포름알데히드로 고정시켰다. 플레이트에

PBS 중 0.5% 트리톤 X-100을 투과화시킨 후, PBS 중 1% BSA로 차단시켰다. 유형 특이적 토끼 모노클로날 항체, 이어서 항-토끼 알렉사플루오르(AlexaFluor)488을 사용하여 바이러스 플라크를 형광 염색하였다. 퍼킨 엘머 엔사이트(Perkin Elmer EnSight)를 사용하여 플레이트를 영상화하고, 자동화 계수 알고리즘에 의해 형광 플라크를 계수하였다. 역가는 계수 기준 (유형 의존성) 내에 있는 유효한 물체 수를 함유하는 웰로부터 하기 방정식을 사용하여 결정한다:

$$\text{바이러스 역가} \left(\frac{\text{PFU}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{계수한 플라크}}{\text{접종물 부피 (mL)}} \times \text{총 희석률}$$

[0244]

[0245]

DENV1, DENV2, DENV3 및 DENV4의 4가 제제를 표 13에 상술된 제제 중에서 동결건조시키고 25℃에서 1주 동안 저장하는 2가지 연구를 수행하였다. 각각의 제제는 9% 수크로스, 11mM 인산칼륨, 50mM NaCl, 25mM Leu (pH 7.5) 및 가변량의 CMC 또는 PG를 함유한다. 각각의 시점에서 상기 기재된 고처리량 플라크 검정에 의해 효력을 분석하였다. -70℃에서 저장된 대조군 샘플을 또한 검정에서 시험하였다. 안정성 샘플의 로그 결과를 -70℃ 대조군 샘플의 로그 결과로부터 차감하여 각각의 시점에 대한 로그 손실을 계산하였다. 표 14a 및 14b는 다양한 4가 제제 중 각각의 혈청형에 대한 시간 경과에 따른 로그 손실을 보여준다. 다양한 조합의 0.2% - 1% CMC 또는 PG의 농도는 서로 유사한 안정성을 나타내고 조합이 없는 제제에 비해 증가된 안정성을 나타낸다.

[0246]

표 13. 4가 제제

전체 제제	제제 변동	제제 번호
9% 수크로스, 11mM 인산칼륨, 50mM NaCl, 25mM Leu, pH 7.5	CMC 또는 PG 부제	140
9% 수크로스, 11mM 인산칼륨, 0.5% CMC, 50mM NaCl, 25mM Leu, pH 7.5	CMC 단독	141
9% 수크로스, 11mM 인산칼륨, 0.2% CMC, 0.2% 프로필렌 글리콜, 50mM NaCl, 25mM Leu, pH 7.5	0.2% CMC, 0.2% PG	142
9% 수크로스, 11mM 인산칼륨, 0.3% CMC, 0.3% 프로필렌 글리콜, 50mM NaCl, 25mM Leu, pH 7.5	0.3% CMC, 0.3% PG	143
9% 수크로스, 11mM 인산칼륨, 0.5% CMC, 0.5% 프로필렌 글리콜, 50mM NaCl, 25mM Leu, pH 7.5	0.5% CMC, 0.5% PG	20
9% 수크로스, 11mM 인산칼륨, 0.8% CMC, 0.8% 프로필렌 글리콜, 50mM NaCl, 25mM Leu, pH 7.5	0.8% CMC, 0.8% PG	144
9% 수크로스, 11mM 인산칼륨, 0.9% CMC, 0.9% 프로필렌 글리콜, 50mM NaCl, 25mM Leu, pH 7.5	0.9% CMC, 0.9% PG	145
9% 수크로스, 11mM 인산칼륨, 0.8% CMC, 0.5% 프로필렌 글리콜, 50mM NaCl, 25mM Leu, pH 7.5	0.8% CMC, 0.5% PG	138
9% 수크로스, 11mM 인산칼륨, 0.5% CMC, 0.8% 프로필렌 글리콜, 50mM NaCl, 25mM Leu, pH 7.5	0.5% CMC, 0.8% PG	139
9% 수크로스, 11mM 인산칼륨, 0.3% CMC, 0.5% 프로필렌 글리콜, 50mM NaCl, 25mM Leu, pH 7.5	0.3% CMC, 0.5% PG	123

[0247]

[0248]

표 14a. 25℃에서의 안정성에 대한 CMC 및 PG의 농도의 효과.

제제	제제 번호	DENV1 로그 손실 1주 25℃	DENV2 로그 손실 1주 25℃	DENV3 로그 손실 1주 25℃	DENV4 로그 손실 1주 25℃
CMC 또는 PG 부제	140	0.41	0.38	0.42	0.43
CMC 단독	141	0.47	0.40	0.52	0.31
0.2% CMC, 0.2% PG	142	0.23	0.20	0.27	0.10
0.3% CMC, 0.3% PG	143	0.27	0.18	0.15	0.04
0.5% CMC, 0.5% PG	20	0.18	0.16	0.23	0.04
0.8% CMC, 0.8% PG	144	0.22	0.17	0.09	0.22
0.9% CMC, 0.9% PG	145	0.16	0.12	0.03	0.16
0.8% CMC, 0.5% PG	138	0.15	0.07	0.21	-0.01
0.5% CMC, 0.8% PG	139	0.20	0.12	0.18	0.04
0.3% CMC, 0.5% PG	123	0.22	0.13	0.10	0.08

[0249]

[0250] 표 14b. 25℃에서의 안정성에 대한 CMC 및 PG의 농도의 효과.

제제	제제 번호	DENV1 로그 손실 1주 25°C	DENV2 로그 손실 1주 25°C	DENV3 로그 손실 1주 25°C	DENV4 로그 손실 1주 25°C
0.5% CMC, 0.5% PG	20	0.19	0.30	0.15	0.06
0.2% CMC, 0.5% PG	122	0.20	0.15	0.21	0.07
0.3% CMC, 0.5% PG	123	0.26	0.12	0.16	0.02
0.4% CMC, 0.5% PG	124	0.26	0.33	0.33	0.10
0.1% CMC, 0.5% PG	125	0.27	0.33	0.22	0.16
0.5% CMC, 0.2% PG	126	0.23	0.20	0.30	0.11
0.5% CMC, 0.3% PG	127	0.31	0.28	0.22	0.14
0.5% CMC, 0.7% PG	128	0.24	0.20	0.15	0.14
0.5% CMC, 0.1% PG	129	0.23	0.15	0.16	0.19

[0251]

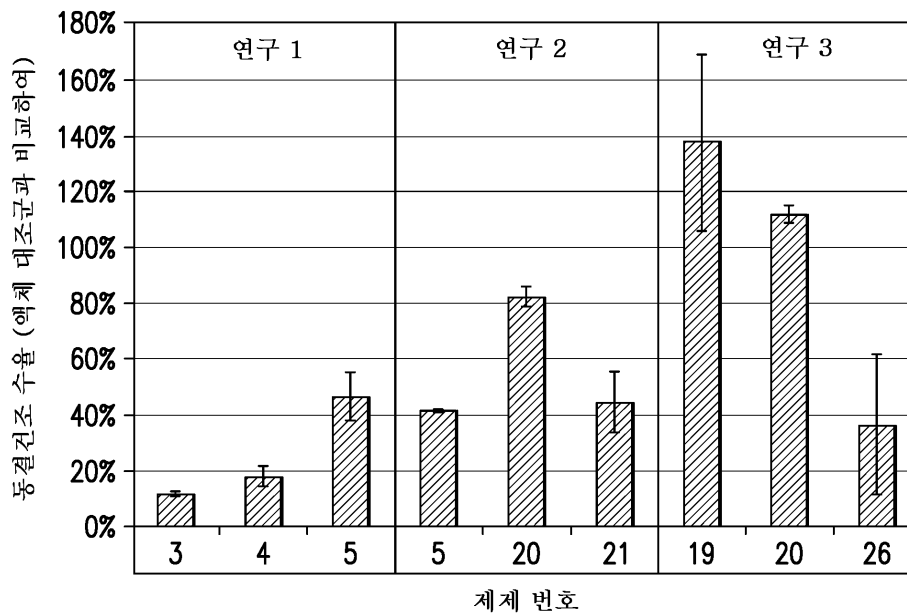
[0252] 본원에 언급된 모든 간행물은 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 방법론 및 물질을 기재 및 개시하기 위한 목적으로 참조로 포함된다.

[0253] 본원의 본 발명의 다양한 실시양태를 첨부된 도면과 관련해서 기재하긴 하였지만, 본 발명이 바로 이들 실시양태로만 제한되지는 않고, 첨부된 청구범위에 정의된 바와 같은 본 발명의 범주 또는 취지를 벗어나지 않으면서 다양한 변화 및 변형이 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이루어질 수 있다는 것을 이해하여야 한다.

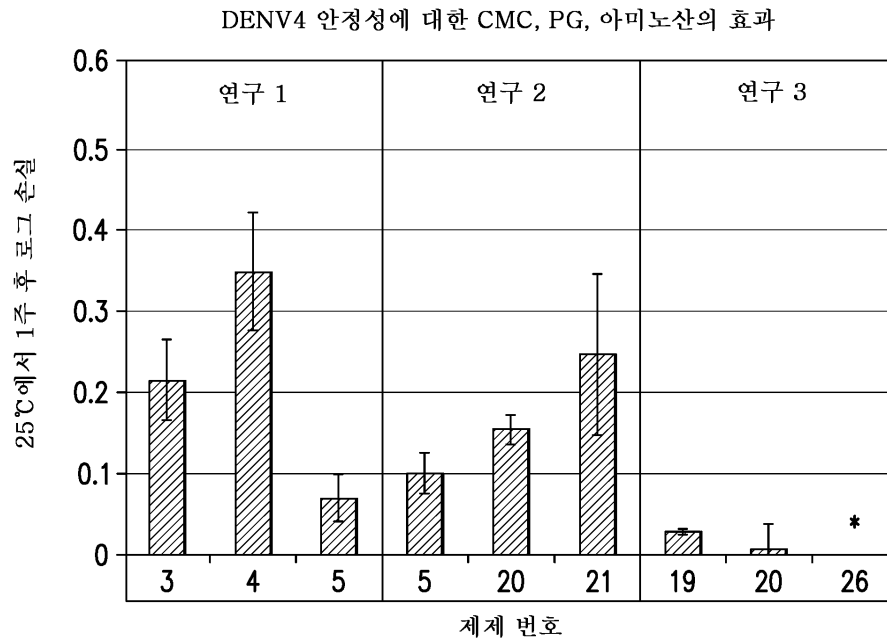
도면

도면1

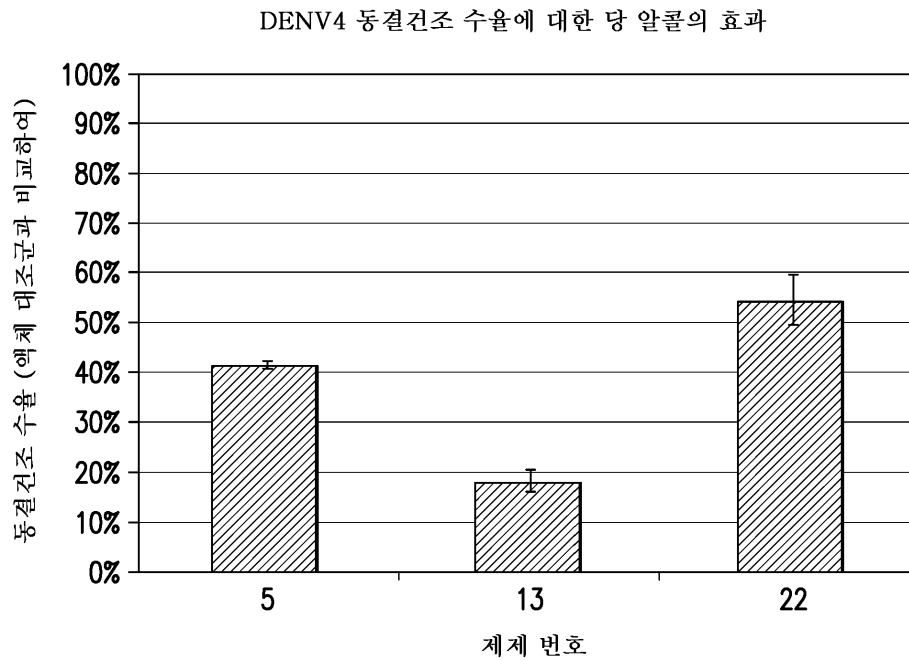
DENV4 동결건조 수율에 대한 CMC, PG, 아미노산의 효과



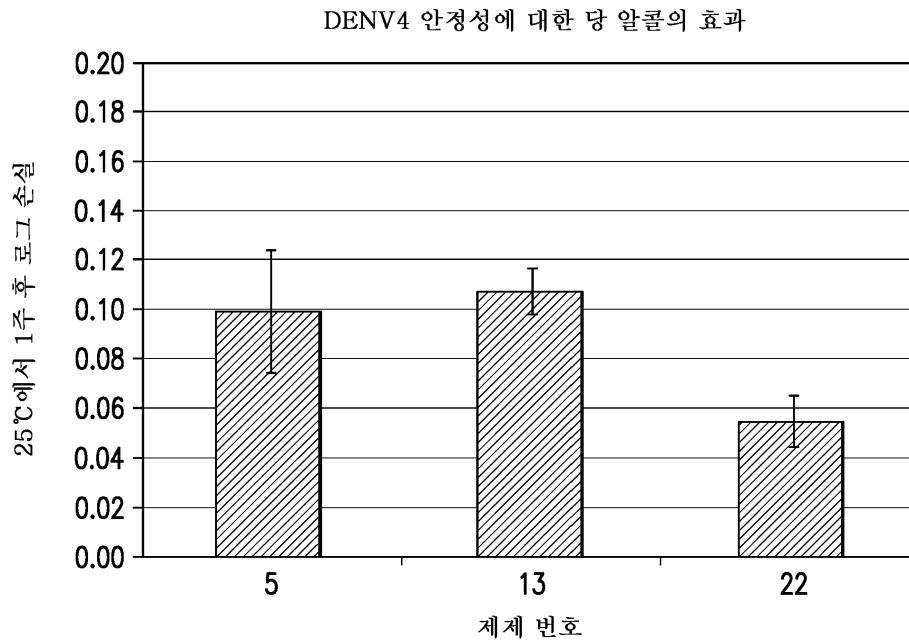
도면2



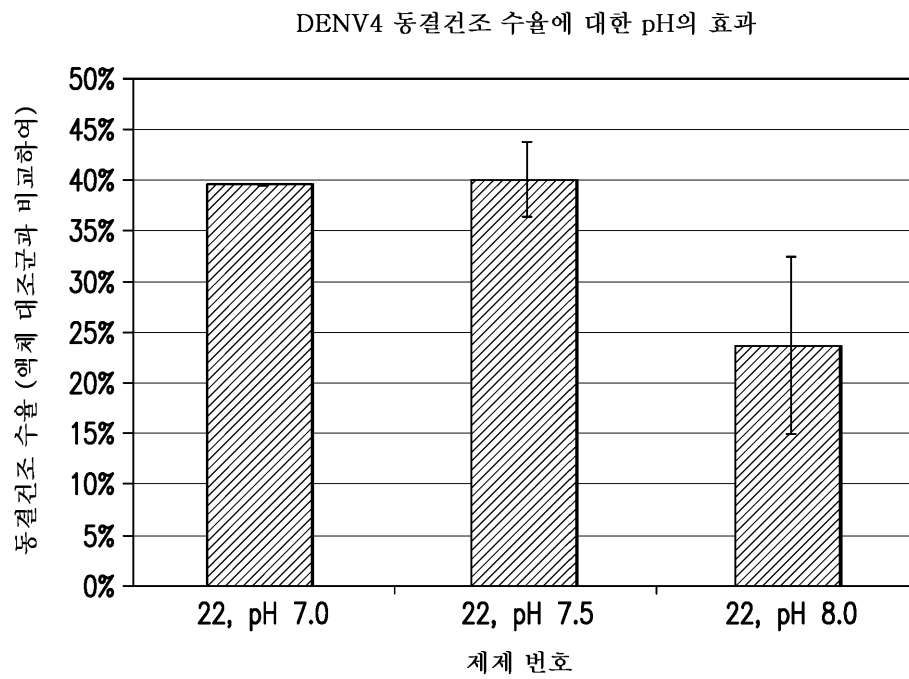
도면3



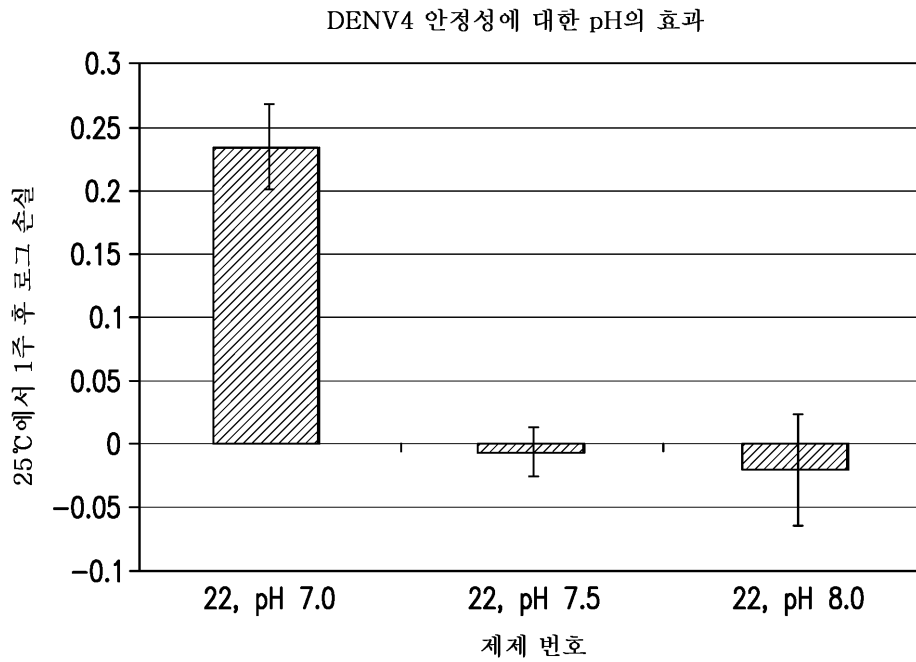
도면4



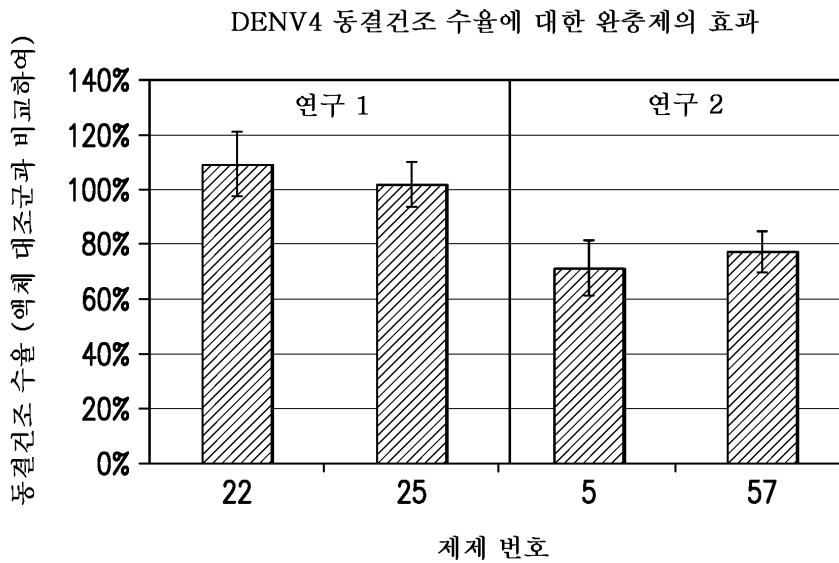
도면5



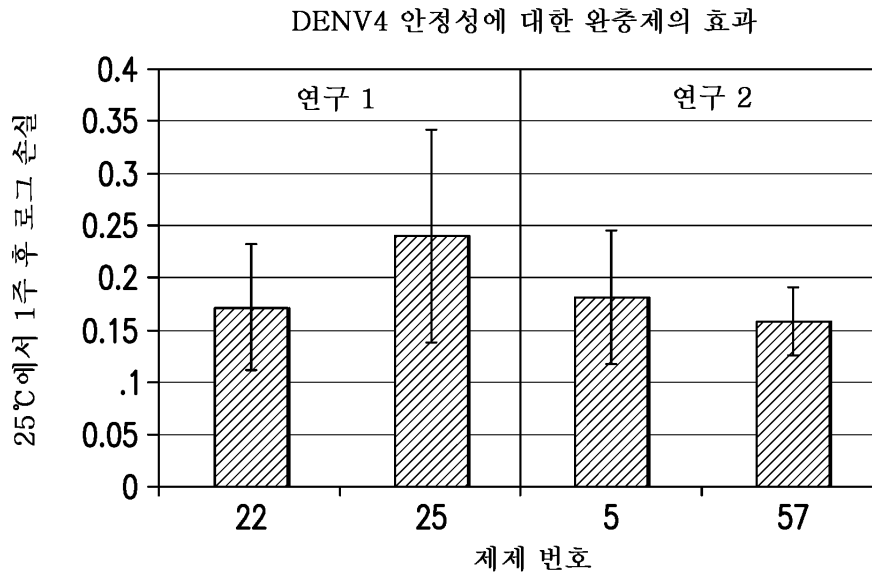
도면6



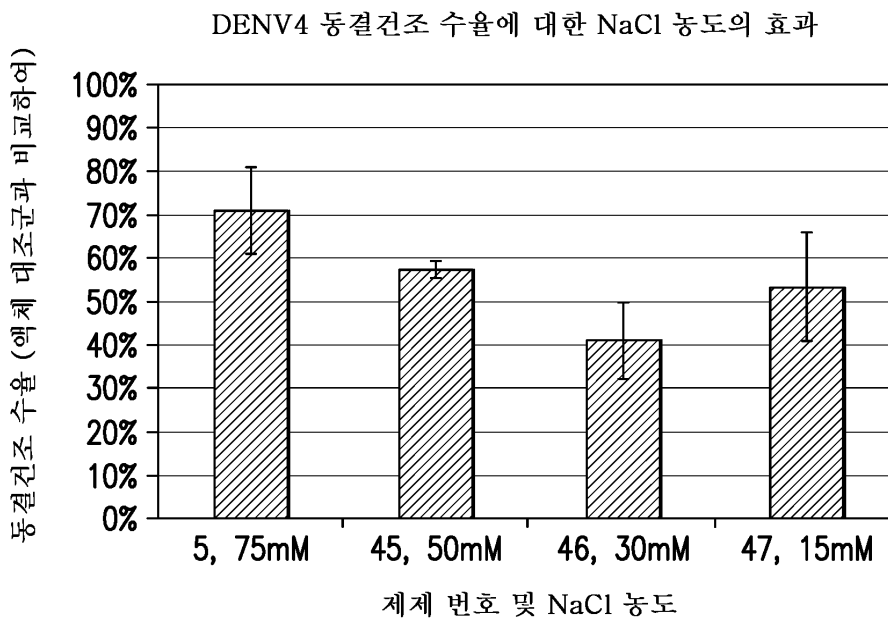
도면7



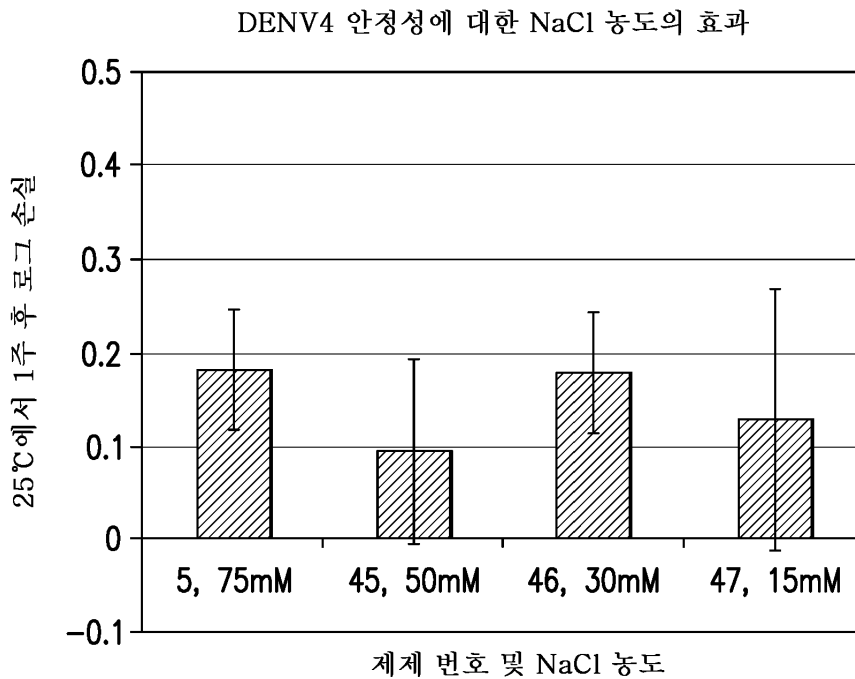
도면8



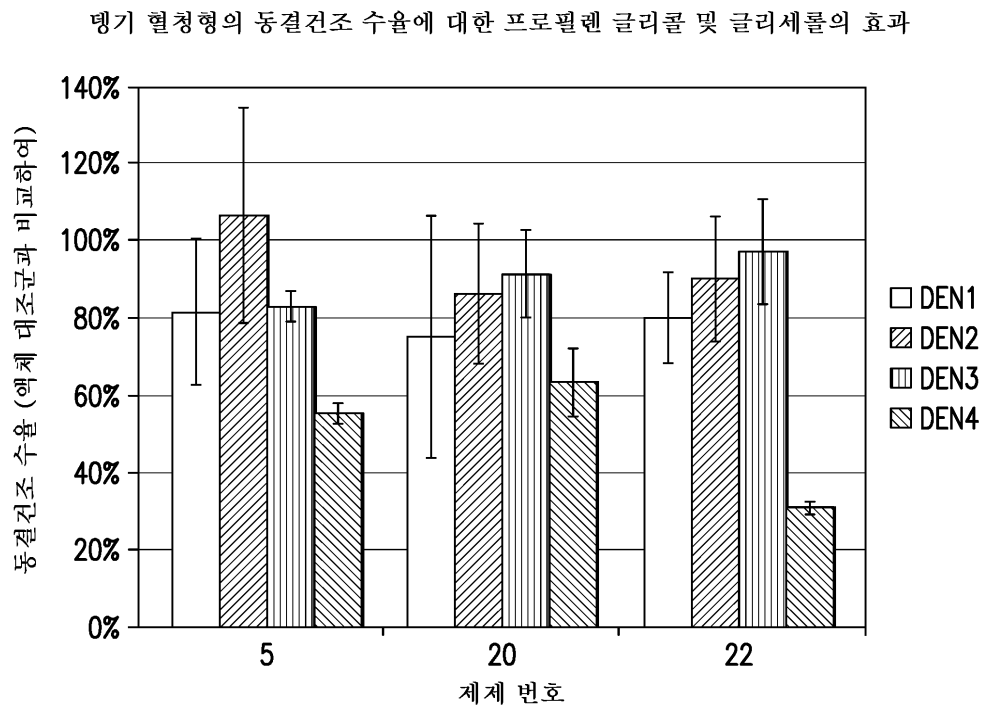
도면9



도면10

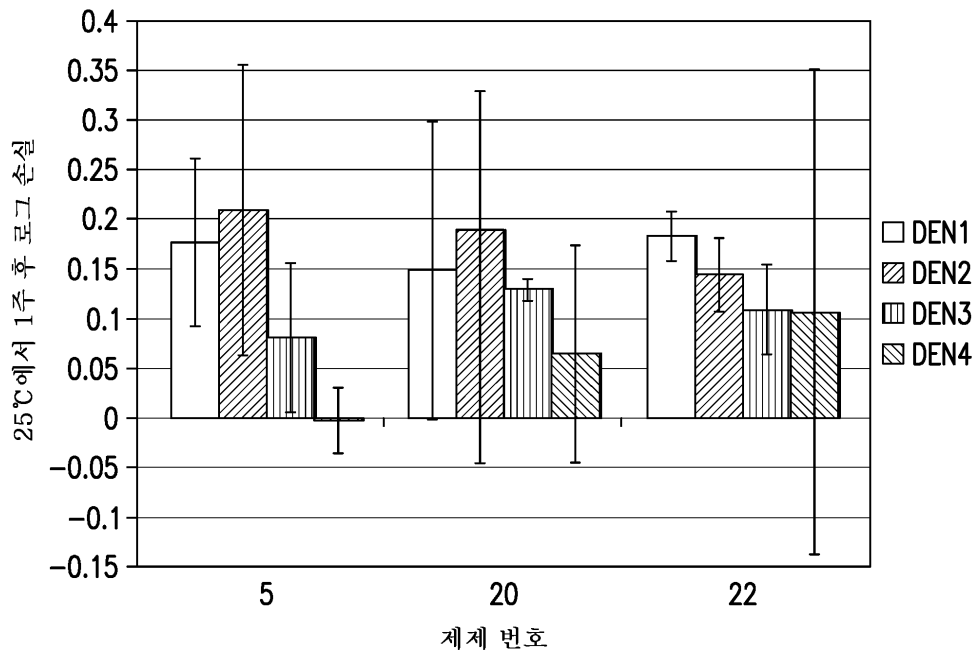


도면11



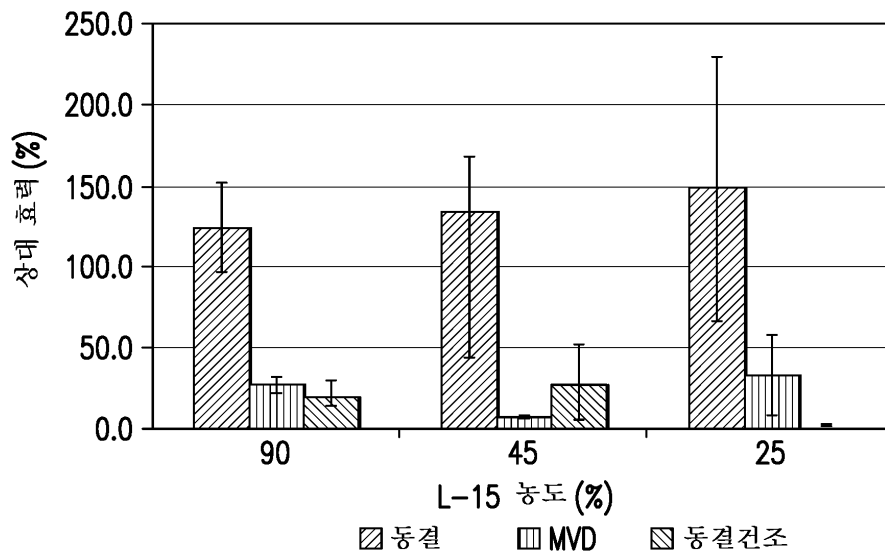
도면12

헝기 혈청형의 안정성에 대한 프로필렌 글리콜 및 글리세롤의 효과

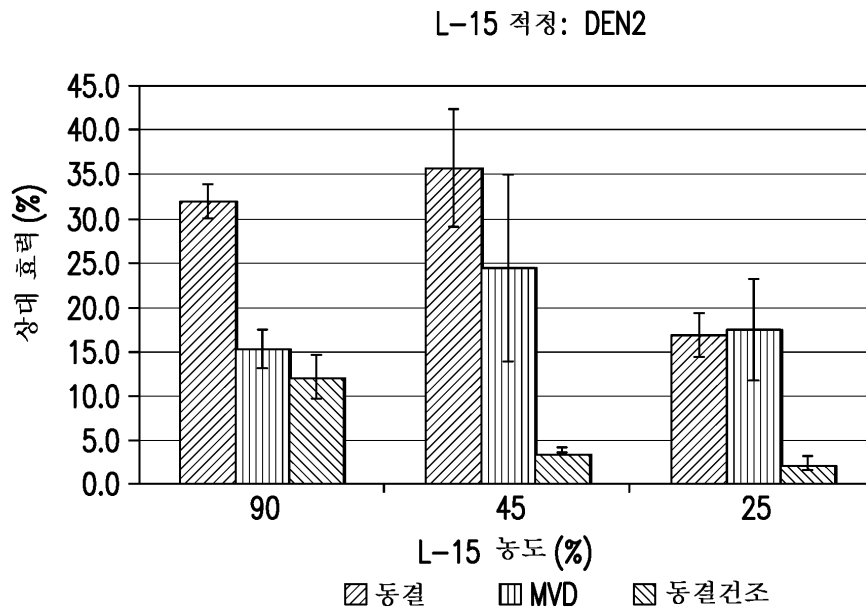


도면13

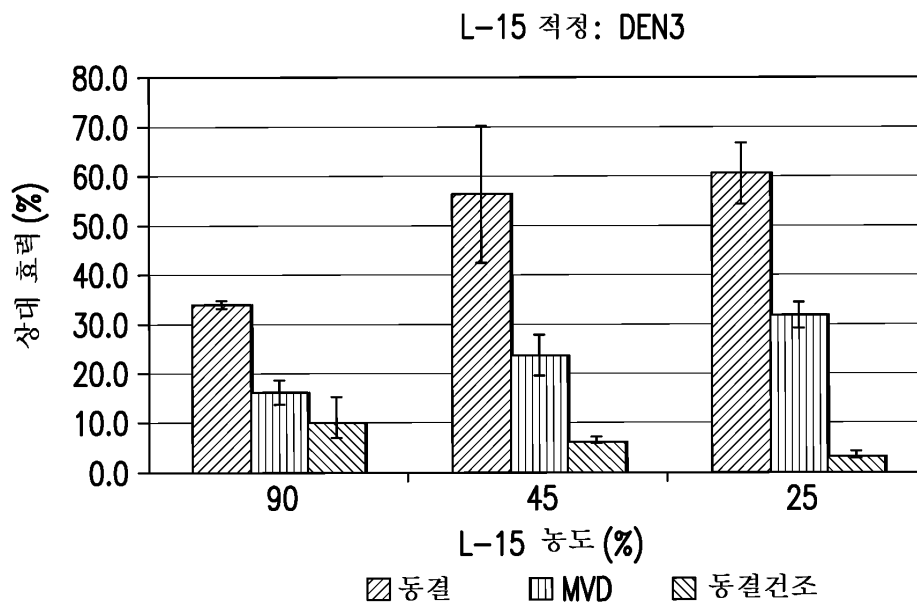
L-15 적정: DEN1



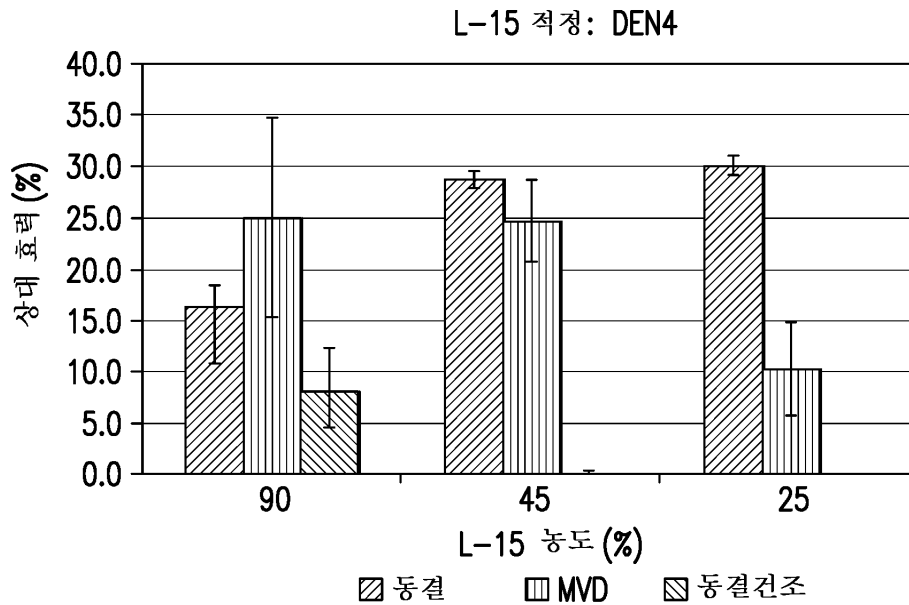
도면14



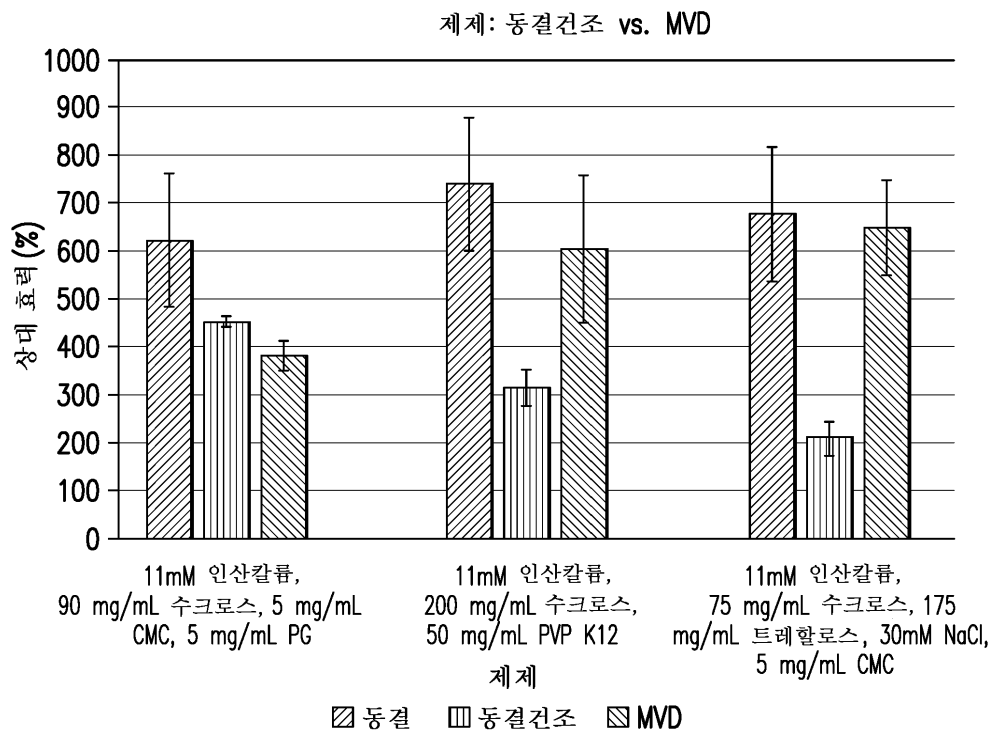
도면15



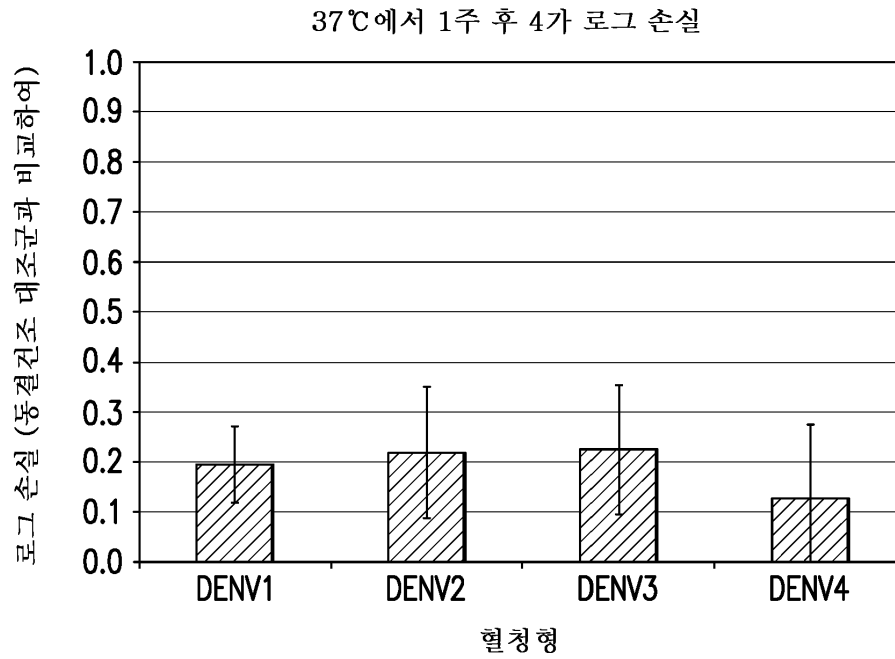
도면16



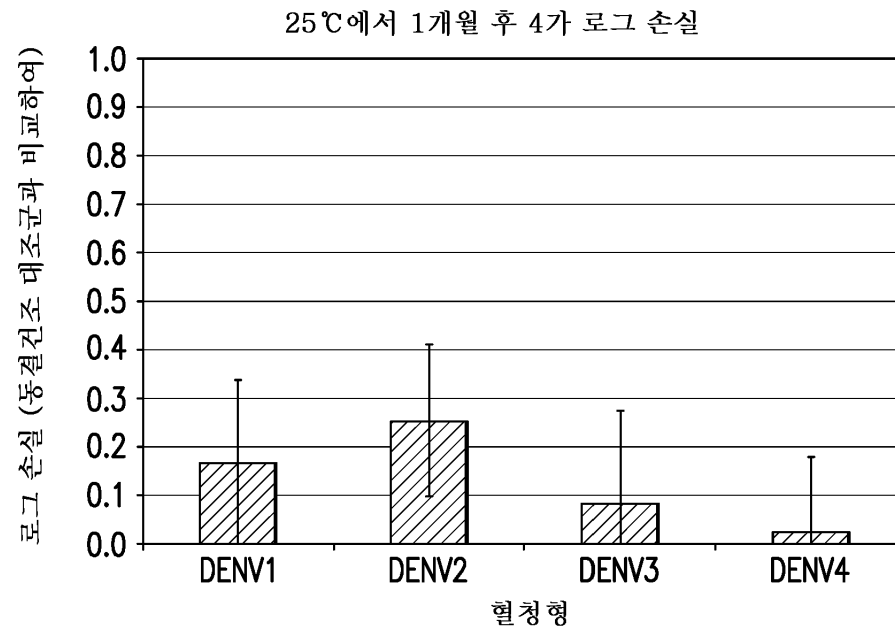
도면17



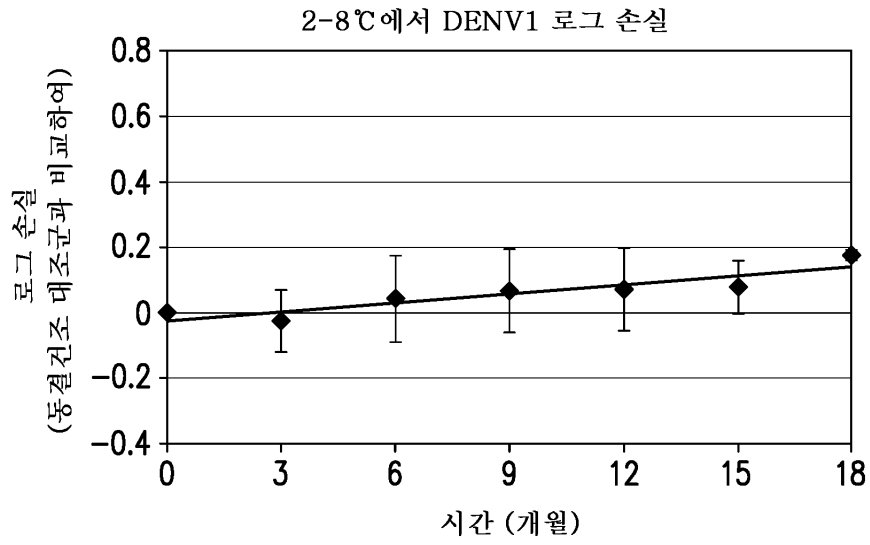
도면18a



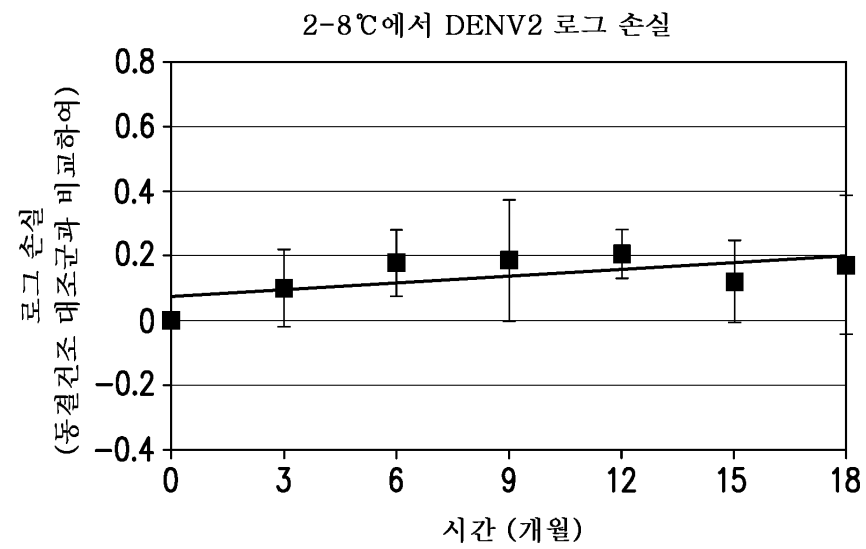
도면18b



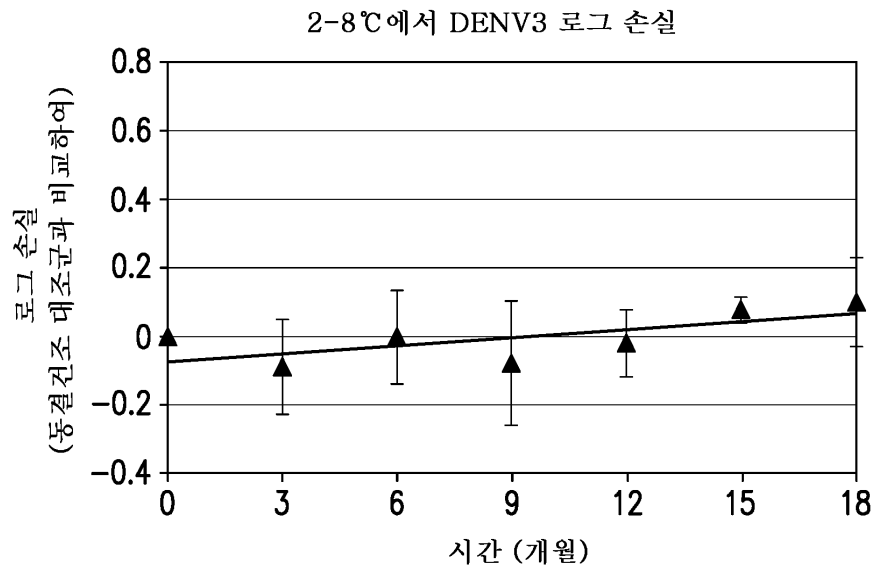
도면19a



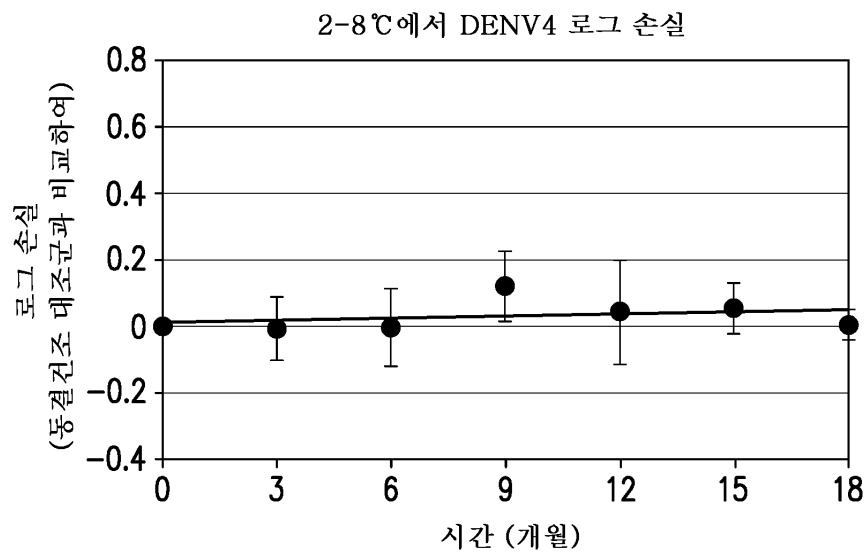
도면19b



도면19c



도면19d



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Merck Sharp & Dohme Corp.

Ryan, Michael S.

Martin, Sherrie-Ann P.

Jones, Morrisa C.

Stanbro, Justin

Bhambhani, Akhilesh

Blue, Jeffrey Thomas

Pixley, Heidi Joanne

Green-Trexler, Erin, J.

Isopi, Lynne Anne

<120> FORMULATIONS OF DENGUE VIRUS VACCINE COMPOSITIONS

<130> 24547-WO-PCT

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 395

<212> PRT

<213> Dengue 1

<400> 1

Met Arg Cys Val Gly Ile Gly Ser Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser

1 5 10 15

Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr

20 25 30

Thr Met Ala Lys Asp Lys Pro Thr Leu Asp Ile Glu Leu Leu Lys Thr

35 40 45

Glu Val Thr Asn Pro Ala Val Leu Arg Lys Leu Cys Ile Glu Ala Lys

50 55 60

Ile Ser Asn Thr Thr Thr Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala

65 70 75 80

Thr Leu Val Glu Glu Gln Asp Ala Asn Phe Val Cys Arg Arg Thr Phe

85 90 95

Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser

100 105 110

Leu Ile Thr Cys Ala Lys Phe Lys Cys Val Thr Lys Leu Glu Gly Lys

115 120 125

Ile Val Gln Tyr Glu Asn Leu Lys Tyr Ser Val Ile Val Thr Val His

130 135 140

Thr Gly Asp Gln His Gln Val Gly Asn Glu Ser Thr Glu His Gly Thr

145 150 155 160
 Thr Ala Thr Ile Thr Pro Gln Ala Pro Thr Ser Glu Ile Gln Leu Thr
 165 170 175
 Asp Tyr Gly Ala Leu Thr Leu Asp Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp
 180 185 190

 Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Thr Met Lys Glu Lys Ser Trp Leu Val
 195 200 205
 His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ser Gly Ala
 210 215 220
 Ser Thr Ser Gln Glu Thr Trp Asn Arg Gln Asp Leu Leu Val Thr Phe
 225 230 235 240
 Lys Thr Ala His Ala Lys Lys Gln Glu Val Val Val Leu Gly Ser Gln
 245 250 255

 Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Thr
 260 265 270
 Ser Gly Thr Thr Thr Ile Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys
 275 280 285
 Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Met Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly
 290 295 300
 Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val
 305 310 315 320

 Leu Val Gln Ile Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro
 325 330 335
 Phe Ser Thr Gln Asp Glu Arg Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile
 340 345 350
 Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu
 355 360 365
 Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Ile Gly Ala Gly Glu
 370 375 380

 Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly
 385 390 395

<210> 2

<211> 395

<212> PRT

<213> Dengue 2

<400> 2

Met Arg Cys Ile Gly Ile Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser

1 5 10 15

Gly Gly Ser Trp Val Asp Ile Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr

20 25 30

Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr

35 40 45

Glu Ala Lys Gln Pro Ala Thr Leu Arg Lys Tyr Cys Ile Glu Ala Lys

50 55 60

Leu Thr Asn Thr Thr Thr Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro

65 70 75 80

Thr Leu Asn Glu Glu Gln Asp Lys Arg Phe Val Cys Lys His Ser Met

85 90 95

Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly

100 105 110

Ile Val Thr Cys Ala Met Phe Thr Cys Lys Lys Asn Met Glu Gly Lys

115 120 125

Ile Val Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Val Val Ile Thr Pro His

130 135 140

Ser Gly Glu Glu His Ala Val Gly Asn Asp Thr Gly Lys His Gly Lys

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Tyr Gly Thr Val Thr Met Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp

180 185 190

Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Gln Met Lys Asp Lys Ala Trp Leu Val

195 200 205

His Arg Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Leu Pro Gly Ala

210 215 220
 Asp Thr Gln Gly Ser Asn Trp Ile Gln Lys Glu Thr Leu Val Thr Phe
 225 230 235 240

 Lys Asn Pro His Ala Lys Lys Gln Asp Val Val Val Leu Gly Ser Gln
 245 250 255
 Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Met
 260 265 270
 Ser Ser Gly Asn Leu Leu Phe Thr Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Arg
 275 280 285
 Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly
 290 295 300

 Lys Phe Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile
 305 310 315 320
 Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro
 325 330 335
 Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile
 340 345 350
 Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu
 355 360 365

 Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro
 370 375 380
 Gly Gln Leu Lys Leu Asp Trp Phe Lys Lys Gly
 385 390 395
 <210> 3
 <211> 393
 <212> PRT
 <213> Dengue 3
 <400> 3
 Met Arg Cys Val Gly Val Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Gly Cys Val Thr

20	25	30	
Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Ile Glu Leu Gln Lys Thr			
35	40	45	
Glu Ala Thr Gln Leu Ala Thr Leu Arg Lys Leu Cys Ile Glu Gly Lys			
50	55	60	
Ile Thr Asn Ile Thr Thr Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala			
65	70	75	80
Ile Leu Pro Glu Glu Gln Asp Gln Asn Tyr Val Cys Lys His Thr Tyr			
85	90	95	
Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser			
100	105	110	
Leu Val Thr Cys Ala Lys Phe Gln Cys Leu Glu Ser Ile Glu Gly Lys			
115	120	125	
Val Val Gln His Glu Asn Leu Lys Tyr Thr Val Ile Ile Thr Val His			
130	135	140	
Thr Gly Asp Gln His Gln Val Gly Asn Glu Thr Gln Gly Val Thr Ala			
145	150	155	160
Glu Ile Thr Pro Gln Ala Ser Thr Val Glu Ala Ile Leu Pro Glu Tyr			
165	170	175	
Gly Thr Leu Gly Leu Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn			
180	185	190	
Glu Met Ile Leu Leu Thr Met Lys Asn Lys Ala Trp Met Val His Arg			
195	200	205	
Gln Trp Phe Phe Asp Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ser Gly Ala Thr Thr			
210	215	220	
Glu Thr Pro Thr Trp Asn Arg Lys Glu Leu Leu Val Thr Phe Lys Asn			
225	230	235	240
Ala His Ala Lys Lys Gln Glu Val Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly			
245	250	255	
Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Asn Ser Gly			
260	265	270	

Gly Thr Ser Ile Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp
275 280 285

Lys Leu Glu Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ala Met Cys Leu Asn Thr Phe
290 295 300

Val Leu Lys Lys Glu Val Ser Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Leu Ile
305 310 315 320

Lys Val Glu Tyr Lys Gly Glu Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser
325 330 335

Thr Glu Asp Gly Gln Gly Lys Ala His Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala
340 345 350

Asn Pro Val Val Thr Lys Lys Glu Glu Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu
355 360 365

Pro Pro Phe Gly Glu Ser Asn Ile Val Ile Gly Ile Gly Asp Lys Ala
370 375 380

Leu Lys Ile Asn Trp Tyr Lys Lys Gly
385 390

<210> 4

<211> 395

<212> PRT

<213> Dengue 4

<400> 4

Met Arg Cys Val Gly Val Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser
1 5 10 15

Gly Gly Ala Trp Val Asp Leu Val Leu Glu His Gly Gly Cys Val Thr
20 25 30

Thr Met Ala Gln Gly Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr
35 40 45

Thr Ala Lys Glu Val Ala Leu Leu Arg Thr Tyr Cys Ile Glu Ala Ser
50 55 60

Ile Ser Asn Ile Thr Thr Ala Thr Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Glu Glu Gln Asp Gln Gln Tyr Ile Cys Arg Arg Asp Val
 85 90 95
 Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly
 100 105 110
 Val Val Thr Cys Ala Lys Phe Ser Cys Ser Gly Lys Ile Thr Gly Asn
 115 120 125
 Leu Val Gln Ile Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Val Val Val Thr Val His
 130 135 140

 Asn Gly Asp Thr His Ala Val Gly Asn Asp Thr Ser Asn His Gly Val
 145 150 155 160
 Thr Ala Thr Ile Thr Pro Arg Ser Pro Ser Val Glu Val Lys Leu Pro
 165 170 175
 Asp Tyr Gly Glu Leu Thr Leu Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly Ile Asp
 180 185 190
 Phe Asn Glu Met Ile Leu Met Lys Met Lys Lys Lys Thr Trp Leu Val
 195 200 205

 His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Ala Ala Gly Ala
 210 215 220
 Asp Thr Ser Glu Val His Trp Asn Tyr Lys Glu Arg Met Val Thr Phe
 225 230 235 240
 Lys Val Pro His Ala Lys Arg Gln Asp Val Thr Val Leu Gly Ser Gln
 245 250 255
 Glu Gly Ala Met His Ser Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Val Asp Ser
 260 265 270

 Gly Asp Gly Asn His Met Tyr Ala Gly His Leu Lys Cys Lys Val Arg
 275 280 285
 Met Glu Lys Leu Arg Ile Lys Gly Met Ser Tyr Thr Met Cys Ser Gly
 290 295 300
 Lys Phe Ser Ile Asp Lys Glu Met Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Thr
 305 310 315 320
 Val Val Lys Val Lys Tyr Glu Gly Ala Gly Ala Pro Cys Lys Val Pro

325 330 335
 Ile Glu Ile Arg Asp Val Asn Lys Glu Lys Val Val Gly Arg Ile Ile
 340 345 350
 Ser Ser Thr Pro Phe Ala Glu Tyr Thr Asn Ser Val Thr Asn Ile Glu
 355 360 365
 Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Asp
 370 375 380
 Ser Ala Leu Thr Leu His Trp Phe Arg Lys Gly
 385 390 395
 <210> 5
 <211> 451

 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DEN4-80EZip
 <400> 5
 Met Arg Cys Val Gly Val Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser
 1 5 10 15
 Gly Gly Ala Trp Val Asp Leu Val Leu Glu His Gly Gly Cys Val Thr
 20 25 30
 Thr Met Ala Gln Gly Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr
 35 40 45
 Thr Ala Lys Glu Val Ala Leu Leu Arg Thr Tyr Cys Ile Glu Ala Ser

 50 55 60
 Ile Ser Asn Ile Thr Thr Ala Thr Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro
 65 70 75 80
 Tyr Leu Lys Glu Glu Gln Asp Gln Gln Tyr Ile Cys Arg Arg Asp Val
 85 90 95
 Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly
 100 105 110
 Val Val Thr Cys Ala Lys Phe Ser Cys Ser Gly Lys Ile Thr Gly Asn

 115 120 125

Leu Val Gln Ile Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Val Val Val Thr Val His
 130 135 140
 Asn Gly Asp Thr His Ala Val Gly Asn Asp Thr Ser Asn His Gly Val
 145 150 155 160
 Thr Ala Thr Ile Thr Pro Arg Ser Pro Ser Val Glu Val Lys Leu Pro
 165 170 175
 Asp Tyr Gly Glu Leu Thr Leu Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly Ile Asp
 180 185 190
 Phe Asn Glu Met Ile Leu Met Lys Met Lys Lys Lys Thr Trp Leu Val
 195 200 205
 His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Ala Ala Gly Ala
 210 215 220
 Asp Thr Ser Glu Val His Trp Asn Tyr Lys Glu Arg Met Val Thr Phe
 225 230 235 240
 Lys Val Pro His Ala Lys Arg Gln Asp Val Thr Val Leu Gly Ser Gln
 245 250 255
 Glu Gly Ala Met His Ser Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Val Asp Ser
 260 265 270
 Gly Asp Gly Asn His Met Tyr Ala Gly His Leu Lys Cys Lys Val Arg
 275 280 285
 Met Glu Lys Leu Arg Ile Lys Gly Met Ser Tyr Thr Met Cys Ser Gly
 290 295 300
 Lys Phe Ser Ile Asp Lys Glu Met Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Thr
 305 310 315 320
 Val Val Lys Val Lys Tyr Glu Gly Ala Gly Ala Pro Cys Lys Val Pro
 325 330 335
 Ile Glu Ile Arg Asp Val Asn Lys Glu Lys Val Val Gly Arg Ile Ile
 340 345 350
 Ser Ser Thr Pro Phe Ala Glu Tyr Thr Asn Ser Val Thr Asn Ile Glu
 355 360 365
 Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Asp

370 375 380
 Ser Ala Leu Thr Leu His Trp Phe Arg Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 385 390 395 400
 Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Arg Met Lys
 405 410 415
 Gln Leu Glu Asp Lys Val Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn Tyr His Leu
 420 425 430
 Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Leu Val Gly Glu Arg Gly Gly

435 440 445
 Cys Gly Gly
 450

<210> 6
 <211> 10705
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DENV1
 <400> 6

aguuguuagu cuacguggac cgacaagaac aguuuuugaau cggaagcuug cuuaacguag 60
 uucuaacagu uuuuuuuuag agagcagauc ucugaugaac aaccaacgga aaaagacggg 120
 ucgaccgucu uucauuuagc ugaaacgcgc gagaaaccgc guguaacug uuucacaguu 180
 ggcgaagaga uucuaaaaag gauugcuuuc aggccaagga cccaugaaa uggugauggc 240
 uuuuuauagca uuccuaagau uucuaagccau accuccaaca gcaggaaaau uggcuagaug 300

 gggcucauuc aagaagaau gagcgaucaa aguuuuacgg gguuucaaga aagaaaucuc 360
 aaacauugug aacauaaua acaggaggaa aagaucugug accaugcucc ucaugcugcu 420
 gccacagcc cuggcguucc aucugaccac ccgaggggga gagccgcaca ugauaguuaug 480
 caagcaggaa agaggaaaau cacuuuuguu uaagaccucu gcagguguca acaugugcac 540
 ccuuauugca auggaauugg gagaguuaug ugaggacaca augaccuaca aaugcccccg 600
 gaucacugag acggaaccag augacguuga cuguuggugc aaugccacgg agacaugggg 660
 gaccuaugga acauguucuc aaacugguga acaccgacga gacaaacguu ccgucgcacu 720

 ggcaccacac guagggcuug gucuagaaac aagaaccgaa acguggaugu ccucugaagg 780
 cgcuuggaaa caauuacaaa aaguggagac cugggcucug agacaccag gauucacggg 840
 gauagccuu uuucuaagcac augccauagg acauccauc acccagaaag ggaucauuuu 900

uauuuugcug augcugguaa cuccauccau ggccaugcgg ugcguuggaa uaggcaacag	960
agacuucgug gaaggacugu caggagcuac guggguggau gugguacugg agcauggaag	1020
uugcgucacu accauggcaa aagacaaacc aacacuggac auugaacucu ugaagacgga	1080
ggucacaaac ccugccgucc ugcgcaaacu gugcauugaa gcuaaaauau caaacaccac	1140
caccgauucg agauguccaa cacaaggaga agccacgcug guggaagaac aggacacgaa	1200
cuuugugugu cgacgaacgu ucguggacag aggcuggggc aaugguugug ggcuaauucgg	1260
aaaagguagc uuaauaacgu gugcuaaguu uaagugugug aaaaaucgg aaggaaagau	1320
aguccaaau gaaaacuuua aaauuucagu gauagucacc guacacacug gagaccagca	1380
ccaaguugga aaugagacca cagaacaugg aacaacugca accauaacac cucaagcucc	1440
cacgucggaa auacagcuga cagacuacgg agcucuaaca uuggauuguu caccuagaac	1500
agggcuagac uuuuauagaga ugguguuguu gacaauggaa aaacgaucgu ggcucgucca	1560
caaacaauagg uuucuagacu uaccacugcc ugggaccucg ggggcuuca cauccaaga	1620
gacuuggaau agacaagacu ugcuggucac auuuuagaca gcucaugcaa aaaagcagga	1680
aguagucgua cuaggaucac aagaaggagc aaugcacacu gcguugacug gagcgacaga	1740
aauccaaacg ucuggaacga caacaauuuu ugcaggacac cugaaaugca gacuaaaaau	1800
ggauaaacug acuuuuuag ggaugucuaa uguuauugc acagggucau ucaaguuaga	1860
gaaggaagug gcugagacc agcauggaac uguucuagug cagguuauu acgaaggaac	1920
agaugcacca ugcaagauc ccuucuguc ccaagaugag aaggagaua cccagaauagg	1980
gagauugaua acagccaacc ccuagucac ugacaaagaa aaaccaguca acauugaagc	2040
ggagccaccu uuugugaga gcuacauugu gguaggagca ggugaaaaag cuuugaaacu	2100
aagcugguuc aagaagggaa gcagauuagg gaaaauguu gaagcaacug cccguggagc	2160
acgaaggau gccauccugg gagacacugc augggacuuc gguucuauag gagggguguu	2220
cacgucugug ggaaaacuga uacaccagau uuugggacu gcguaggag uuuuguucag	2280
cgguguuucu uggaccauga agauaggaau agggauucug cugacauggc uaggauuaaa	2340
cucaaggagc acguccuuu caaugacgug uaucgcaguu ggcaugguca cacuguaccu	2400
aggagucaug guucaggcgg acucgggaug uguuaucaac uggaaaggca gagaacuaa	2460
auguggaagc ggcauuuuug ucaccaauga aguccacacc uggacagagc aaauaaaau	2520
ccaggccgac ucccuaaga gacuacagc ggccauuggg aaggcauggg aggagggugu	2580
guguggaauu cgauagcca cucgucucga gaacauaug uggaagcaaa uaucaaauga	2640
auuaaacac aucuacuug aaaaugacau gaaauuuaca guggucguag gagacguuag	2700
uggaauucuug gccaaggaa agaaaugau uaggccacaa ccauggaac acaauacuc	2760

guggaaaagc uggggaaaag ccaaaaucan aggagcagau guacagaaua ccacuucau	2820
caucgacggc ccaaacaccc cagaauagccc ugauaaccan agagcaugga acuuuuggga	2880
aguugaagac uauggauuug gaauuuucac gacaaacaua ugguugaaau ugcgugacuc	2940
cuacacucan gugugugacc accggcuauu gucagcugcc aucaaggaua gcaaagcagu	3000
ccaugcugac auaggguacu ggauagaaag ugaanaagac gagacuugga aguuggcaag	3060
agccuccuuc auagaaguua agacaugcau cuggccaaaa ucccacacuc uauggagcan	3120
uggaguccug gaaagugaga ugauaauccc aaagauauau ggaggaccaa uaucucagca	3180
caacuacaga ccaggauuuu ucacacaaac agcagggccg uggcacuugg gcaaguuaga	3240
acuagauuuu gauuuauug aagguaccac uguuguugug gaugaacauu guggaaaucg	3300
aggaccaucu cuuagaacca caacagucac aggaagaca auccaugaau ggugcuguag	3360
aucuugcacg uuaccccccc uacguuucan aggagaagac gggugcuggu acggcaugga	3420
aaucagacca gucaaggaga aggaagagaa ccuaguuaag ucaauugucu cugcaggguc	3480
aggagaagug gacaguuuuu cacuaggacu gcuaugcaua ucaauaaga ucgaagaggu	3540
aaugagaucc agauggagca gaaaaaugcu gaugacugga acauuggcug uguuccuccu	3600
ucucacaau ggaacaaua cauggaaga ucugaucagg cuauguaua ugguuggagc	3660
caacgcuca gacaagaugg ggaugggaac aacguaccua gcuuugaugg ccacuuucag	3720
aaugagacca auguucgcag ucgggcuacu guuucgcaga uuaacauca gagaaguucu	3780
ucuucuuaca guuggauuga gucugguggc aucuguagaa cuacaaaau ccuagagga	3840
gcuaggggau ggacuugcan ugggcaucau gauguagaaa uuacugacug auuuucaguc	3900
acaucagcua ugggcuaccu ugcugucuuu aacauuuguc aaaacaacu uuucauugca	3960
cuaugcagg aagacaau gcuagauacu gucaauugua ucucucucc cuuuugccu	4020
guccacgacu ucuaaaaaa caacauggcu uccgguguug cugggaucuc uuggaugcan	4080
accacuaacc auguuucuu uacagaaaa caaaucugg ggaaggaaaa gcuggccucu	4140
caaugaagga auuauugcug uuggauagu uagcauucu cuaaguucac uucuaagaa	4200
ugaugugcca cuagcuggcc cacuaauagc uggaggcaug cuaauagcau guuauucau	4260
aucuggaagc uggccgauu uaucacugga gaaagcggcu gaggucuccu gggaagaaga	4320
agcagaacac ucuggugccu cacacaacau acuauuggag guccaagaug auggaaccu	4380
gaaaauaaag gaugaagaga gagaugacac acucaccau cuccucaaag caacucugcu	4440
agcaaucuca gggguauacc caaugucau accggcgacc cucuuugugu gguuuuuug	4500

gcagaaaaag aaacagagau caggagugcu augggacaca cccagcccuc cagaagugga 4560

aagagcaguc cuugaugaug gcauuuauag aaauuccaa agaggauugu ugggcagguc 4620

ucaaguagga guaggaguuu uucaagaagg cguguuccac acaauguggc acgucaccag 4680

gggagcuguc cucauguacc aagggaagag acuggaacca aguugggcca gugucaaaaa 4740

agacuugauc ucauauaggag gagguuggag guuuaagga uccuggaacg cgggagaaga 4800

agugcaggug auugcuguug aaccggggaa gaaccccaaa aauguacaga cagcgccggg 4860

uaccuuaag accccugaag gcgaaguugg agccauagcu cuagacuuua aaccggcac 4920

aucuggaucu ccuaucguga acagagaggg aaaaauagua ggucuuuug gaauggagu 4980

ggugacaaca agugguaccu acgucaguc cauagcuca gcuaaagca cacaagaagg 5040

gccucuacca gagauaggag acgagguguu uaggaaaaga aacuuacaa uaauggaccu 5100

acaucaggga ucgggaaaaa caagaagaua ccuuccagcc auaguccgug aggccauaaa 5160

aagaaagcug cgcacgcuag ucuuagcucc cacaagagu gucgcuucug aaauggcaga 5220

ggcgcucaag ggaauccaa uaagguauca gacaacagca gugaagagug aacacacggg 5280

aaaggagaua guugaccuua ugugucacgc cacuuucacu augcgucucc ugucuccugu 5340

gagaguuccc aaauuaaua ugauuaucau ggaugaagca cauucaccg auccagccag 5400

cauagcagcc agaggguaua ucucaacccg aguggguauug ggugaagcag cugcgauuuu 5460

caugacagcc acuc(cccccg) gaucggugga ggccuuucca cagagcaaug caguuaacca 5520

agaugaggaa agagacauuc cugaaagau auggaacuca ggcuauagcu ggaucacuga 5580

uuucccaggu aaaacagucu gguuuuucc aagcaucaa ucaggaaaug acauugccaa 5640

cuguuuuaga aagaauaggga aacggguggu ccaauugagc agaaaaacu uugacacuga 5700

guaccagaaa acaaaaaaua acgacugggga cuauuuguc acaacagaca uauccgaaau 5760

gggagcaaac uuccgagccg acaggguaua agacccgagg cggugccuga aaccgguaua 5820

acuaaaagau ggcccagagc gugucauucu agccggaccg augccaguga cugugcuaag 5880

cgccgcccag aggagaggaa gaauuggaag gaacccaaa aaggaaggcg aucaguauau 5940

uuacauggga cagccucuaa aaaaugauga ggaccacgcc cauuggacag aagcaaaaau 6000

gcuccuugac aacauaaaca caccagaagg gauuaucce gccucuuug agccggagag 6060

agaaaagagu gcagcaauag acggggaaua cagacuacgg ggugaagcga ggaacguu 6120

cguggagcuc augagaagag gagaucuacc ugucuggcua uccuacaaag uugccucaga 6180

aggcuuccag uacuccgaca gaagguggug cuuugauggg gaaaggaaca accagguguu 6240

ggaggagaac auggacgugg agaucggac aaaagaagga gaaagaaaga aacuacgacc 6300

ccgcuggcug gaugccagaa cauacucuga cccacuggcu cugcgcaau ucaaagagu 6360

cgcagcagga agaagaagcg ucucagguga ccuaauauua gaaauaggga aacuuccaca 6420
 acauuuuacg caaagggccc agaacgccuu ggacaauug guuauuguugc acaacucuga 6480
 acaaggagga aaagccuaua gacacgccau ggaagaacua ccagacacca uagaaacguu 6540
 aaugcuccua gcuuugauag cugugcugac ugguggagug acguuguucu uccuaucagg 6600

 aaggggucua ggaaaaacau ccuauggccu acucugcgug auugccucaa gugcacuguu 6660
 auggauggcc aguguggaac ccuauuggau agcggccucu aucuacugg aguucuuucu 6720
 gaugguguug cuuauuccag agccggacag acagcgcacu ccacaagaca accagcuagc 6780
 auacguggug auaggucugu uauucaugau auugacagug gcagccaaug agaugggauu 6840
 acuggaaacc acaagaagg accuggggau uggucaugca gcugcugaaa accaccauca 6900
 ugcucaaug cuggacguag accuacaucc agcuucagcc uggacucucu augcaguggc 6960
 cacaacaauu aucacuccca ugaugagaca cacaauugaa aacacaacgg caauauuuuc 7020

 ccugacagcu auugcaaacc aggcagcuau auugauggga cuugacaagg gauggccaau 7080
 aucaaagaug gacauaggag uuccacuucu cgccuugggg ugcuaauuc aggugaaccc 7140
 gcugacgcug acagcggcgg uauuuauugcu aguggcucuu uaugccauaa uggacccgg 7200
 acugcaagca aaagcuacua gagaagcuca aaaaaggaca gcagccggaa uaaugaaaaa 7260
 cccaacuguc gacgggaucg uugcaauaga uuuggacccu gugguuuacg augcaaaaau 7320
 ugaaaaaacg cuaggccaaa uaauguuguu gauacuuugc acaucacaga uccuccugau 7380
 gcggaccaca ugggccuugu gugaauccau cacacuagcc acuggaccuc ugaccacgcu 7440

 uugggaggga ucuccaggaa aaucucggaa caccacgaua gcggugucca uggcaaacau 7500
 uuuuagggga aguuaucuag caggagcagg ucuggccuuu ucauuauuga aaucucuagg 7560
 aggagguagg agaggcacgg gagcccaagg ggaaacacug ggagaaaaau ggaaaagaca 7620
 gcuaaaccaa uugagcaagu cagaauucaa cacuuacaaa aggaguggga uuauagaggu 7680
 ggauagaucu gaagccaaag agggguuuaa aagaggagaa acgacuaaac acgcaguguc 7740
 gagaggaacg gccaaacuga ggugguuugu ggagaggaac cuugugaaac cagaagggaa 7800
 agucauagac cucgguugug gaagaggugg cuggucauau uauugcgug ggcugaagaa 7860

 agucacagaa gugaaaggau acacgaaagg aggaccugga caugaggaac caaucccau 7920
 ggcaaccuau ggauggaac uaguaaagcu auacuccggg aaagauguau ucuuuacacc 7980
 accugagaaa ugugacacc ucuuguguga uauuggugag uccucuccga acccaacuau 8040
 agaagaagga agaacguuac guguucuaaa gaugguggaa ccauggcua gaggaacca 8100
 auuuugcau aaaaucuaa aucccuauau gccgagugug guagaaacu uggagcaau 8160
 gcaaagaaaa cauggaggaa ugcuaugcg aauccacuc ucaagaaacu ccacucauga 8220

aauguacugg guuucaugug gaacaggaaa cauuguguca gcaguaaaca ugacaucuag	8280
aaugcugcua aaucgauuca caauggcuca caggaagcca acauaugaaa gagacgugga	8340
cuuaggcgcu ggaacaagac auguggcagu agaaccagag guggccaacc uagauaucu	8400
uggccagagg auagagaaua uaaaaaaga acacaaauc acauggcauu augaugagga	8460
caauccauac aaaaauaggg ccuaucaugg aucauaugag gucaagccau caggauacgc	8520
cucauccaug gucaauaggug uggugagacu gcuaaccaa ccaugggaug ucauuccau	8580
ggucacacaa auagccauga cugacaccac acccuuugga caacagaggg uguuuuaga	8640
gaaaguugac acgcuacac caaaagcgaa acgaggcaca gcacaaaua uggaggugac	8700
agccaggugg uuaugggguu uucucucuag aaacaaaaa cccagaauu gcacaagaga	8760
ggaguucaca agaaaaguca ggucaaagc agcuauugga gcaguguucg uugaugaaa	8820
ucaauuggaac ucagcaaaag aggcagugga agaugaacgg uucugggacc uugugcacag	8880
agagaggag cuucaaaaac aaggaaaug ugccacgugu gucuacaaca ugaugggaaa	8940
gagagagaaa aaauuaggag aguucggaaa ggcaaaagga agucgcgca uauuguacau	9000
gugguuggga gcgcuuuu uagaguuga agccuuggu uucaugaug aagaucacug	9060
guucagcaga gagaauucac ucaguggagu ggaaggagaa ggacucca aacuuggaua	9120
cauacucaga gacauaucaa agauuccagg gggaaaauug uaugcagaug acacagccgg	9180
auaggacaca agaauaacag aggaugaucu ucagaauag gccaaaauca cugacaucau	9240
ggaaccugaa caugcccuu uggccacguc aaucuuuag cuaaccuacc aaaacaaggu	9300
aguaaggug cagagaccag cgaaaaaug aaccgugaug gaugucauau ccagacguga	9360
ccagagagga aguggacagg uuggaaccua ugguuuuac accuucacca acauggaggc	9420
ccaacuaaua agacaaaugg agucugaggg aaucuuuua cccagcgau uggaaacccc	9480
aaaucugcc gaaagagucc ugcacugguu gaaaaaacau ggcaccgaga ggcugaaaag	9540
aauggcauc aguggagaug acuguguggu gaaaccauu gaugacagau uugcaacagc	9600
cuuaacgcu uugaauagac ugggaaaggu aagaaaagac auaccgcau gggaaccuuc	9660
aaaaggauagg aaugauuggc aacaagugcc uuucuguuca caccuuuucc accagcugau	9720
uauaaggau gggagggaga uaguggugcc augccgcaac caagaugaac uuguagguag	9780
ggccagagua ucacaaggcg ccggauggag cuugagagaa acugcaugcc uaggcaaguc	9840
auaugcaca auguggcagc ugauguacuu ccacaggaga gacuugagau uagcggcuaa	9900
ugcuauucgu ucagccguuc caguugauug ggucccaacc agccguacca ccuggucgau	9960

ccaugccac caucaaugga ugacaacaga agacauguug ucagugugga auaggguuug	10020
gauagaggaa aacccaugga uggaggacaa gacucaugug uccaguuggg aagacguucc	10080
auaccuagga aaaagggaag aucaauggug uggauccua auaggcuua cagcacgagc	10140
caccugggcc accaacauc aaguggccau aaaccaagug agaaggcuca uugggauga	10200
gaauuauca gacuuga caucaugaa gagaucaaa aacgagagug auccgaagg	10260
ggcacucugg uaagccaacu cauucacaaa auaaagaaa auaaaaaauc aaacaaggca	10320
agaagucagg ccggaauaag ccuagcacg guaagagcua ugcugccugu gagccccguc	10380
caaggacgua aaugaaguc aggccgaaag ccacgguug agcaagccgu gcugccugua	10440
gcuccaucgu ggggauguua aaaccggga ggcugcaaac cauggaagcu guacgcaugg	10500
gguagcagac uaguguuag aggagacccc uccaagaca caacgcagca gcggggccca	10560
agacuagagg uuagaggaga ccccccgcac aacaacaaac agcauuuga cgcugggaga	10620
gaccagagau ccugcugucu cuacagcau auuccaggca cagaucggaa gaaauggaa	10680
uggugcuguu gaaucaacag guucu	10705
<210> 7	
<211> 10618	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DENV2	
<400> 7	
aguuguuagu cuguguggac cgacaaggac aguuccaaau cggaagcuug cuuaacacag	60
uucuaacagu uuguuugaau agagagcaga ucucuggaaa aaugaacca cgaaaaagg	120
ugguuagacc accuuucaau augcugaaac gcgagagaaa ccgcuauca acccucaag	180
ggcuggugaa gagauuca accggacuuu uuucugggaa aggaccuua cggauggugc	240
uagcauucac caguuuuuug cgaguccuuu ccauccacc aacagcaggg auucugaaga	300
gauggggaca guugaagaaa aaauaggcca ucaagauacu gauuggauuc aggaaggaga	360
uaggccgcau gcugaacauc uugaacggga gaaaagguc ugcaggcaug aucauuugc	420
ugauuccaac agugauggcg uuccauuuua ccacacguua cggagaacca cacaugaucg	480
ucaguagaca agagaaaggg aaaagucuuc uguuuuuuac agaggauugu gugaacaugu	540
guaccucau ggccauggac cuuggugaau ugugugaaga uacaucacg uacaaguguc	600
cucuucucag gcagaauga ccagaagaca uagauuguug gugcaacuc acguccacu	660
ggguaacuua ugggacgugu accaccacag gagaacacag aagagaaaa agaucagugg	720
cacucguucc acauguggga augggacugg agacacgaac ugaacaugg augucaucag	780

aaggggccug gaaacaugcc cagagaauug aaacuuggau cuugagacau ccaggcuuaa	840
ccauaauggc agcaauccug gcuaacacca uaggaacgac acauuuccaa agagcccuga	900
uuuucacuu acugacagcu gucgucuuu caaugacaau gcguugcaua ggaauaucaa	960
auagagacuu uguagaagg gguucaggag gaagcugggu ugacauaguc uuagaacaug	1020
gaagcugugu gacgacgaug gcaaaaaaca aaccaacauu ggauuuugaa cugauaaaaa	1080
cagaagccaa acaaccugcc acucuaagga aguacuguau agaggcaaag cugaccaaca	1140
caacaacaga aucucgcugc ccaacacaag gagaaccuag ccuaaauugaa gagcaggaca	1200
aaagguucgu cugcaaacac uccauggugg acagaggaug gggaaaugga uguggauuau	1260
uugaaaaagg aggcauugug accugugcua uguucacaug caaaaagaac auggaaggaa	1320
aagucgugca accagaaaac uuggaauaca ccuuugugau aacaccucac ucagggggaag	1380
agcaugcagu cggaauugac acaggaauac auggcaagga aaucuuuaua acaccacaga	1440
guuccaucac agaagcagag uugacaggcu auggcacugu cacgauggaa ugcuuuccga	1500
gaacgggccu cgacuucuuu gagauggugu ugcugcauuu ggaauuuuuu gcuuggcugg	1560
ugcacaggca augguuccua gaccugccgu ugccauggcu gcccggagcg gacacacaag	1620
gaucaauuug gauacagaaa gagacauugg ucacuuucaa aaaucccau gcgaagaaac	1680
aggauguugu uguuuuggga uccaagaag gggccaugca cacagcacuc acaggggcca	1740
cagaaaucca gaugucauca ggaacuuac uguucacagg acaucucaag ugcaggcuga	1800
ggauggacaa acucacagc aaaggaugu cauacucuau gugcacagga aaguuuuuag	1860
uugugaagga aaauagcaga acacaacaug gaacaauagu uaucagagua caauugaag	1920
gggacggguu uccauguaag auccuuuuug agauaaugga uuuggaaaaa agacauguuu	1980
uaggucccu gauuacaguc aacccaucg uaacagaaaa agauagcca gucaacauag	2040
aagcagaacc uccaucgga gacagcuaca ucaucauagg aguagagccg ggacaauuga	2100
agcucaacug guuuuagaaa ggaaguucua ucggccaaau guuugagaca acaaugaggg	2160
gagcgaagag aauggccauu uuaggugaca cagcuuggga uuugggauc cugggaggag	2220
uguuuacau uauaggaaag gcucuccacc aaguuuucgg agcaaucuau ggggcugccu	2280
ucagugggu cucauggacu augaaaauc ucauaggagu cauuuacaca uggauaggaa	2340
ugaacucgag gaacacuua auggcuauga cgugcauagc uguuggagga aucacucugu	2400
uucugggcuu cacaguuaa gcagacaugg guuguguggc gucauggagu gggaaagaau	2460
ugaagugugg aagcggaauu uuugugguug acaacugca cacuuggaca gaacaguaca	2520

aaauucaacc agagucccca gcgagacuag cgucugcaau auuaaaugcc caciaaagaug	2580
gggucugugg aaauagauca accacgaggc uggaaaaugu cauguggaag caaauaacca	2640
acgagcuaaa cuauguucuc uggaagaggag gacaugaccu cacuguagug gcuggggaug	2700
ugaagggggu guugacaaa ggcaagagag cacucacacc cccagugagu gaucugaaaau	2760
auucauggaa gacauaggga aaagcaaaaa ucuucacccc agaagcaaga aaugcacau	2820
uuuuauaga cggaccagac accucugaau gccccauga acgaagagca uggaacucuc	2880
uugaggugga agacuaugga uuuggcaugu ucacgaccaa cauauuggaug aaauccgag	2940
aaggaaguuc agaagugugu gaccacaggu uaaugucagc ugcauuuaa gaucagaaag	3000
cugugcaugc ugacaugggu uauuggauag agagcucaaa aaaccagacc uggcagauag	3060
agaaagcauc ucuuuuugaa gugaaaacau gucuguggcc caagaccac acacugugga	3120
gcauaggagu gcuggaaagc cagaugcuca uucaaaaauc auaugcgggc ccuuuuucac	3180
agcacaauua ccgccagggc uauccacgc aaaccguggg ccauggcac uuaggcaau	3240
uagagauaga cuuuggagaa ugccccgaa caacagucac aaucaggag gauugugacc	3300
auagaggccc aucuuugagg accaccacug caucuggaaa acuagucag caauggugcu	3360
gccgcuccug cacgaugccu ccuuaaggu ucuugggaga agauaggugc ugguauggga	3420
uggagauuag gcccuugagu gaaaaagaag agaacauggu caaauacag gugacggccg	3480
gacagggcac aucagaaacu uuuuuauagg gucuguugug ccugaccuug uuuguggaag	3540
aaugcuugag gagaagaguc acuaggaaac acaugauuu aguuguggug aucacucuuu	3600
gugcuaucau ccugggagc cucacaugga uggacuuacu acgagcccuc aucauguug	3660
gggacacuau gucugguaga auaggaggac agauccaccu agccaauaug gcaguguuca	3720
agaugucacc aggauacgug cugggugugu uuuaaggaa acucacuua agagagacag	3780
cacuaauggu aaauaggau gccaugacaa cggugcuuuc aaauccacau gaccuuauagg	3840
aacucauuga uggaauauca cugggacuaa uuuuugcuua aaauaguaaca caguugaca	3900
acaccaagu gggaaccuua gcucuuccu ugacuuuau aagaucaca augccauugg	3960
ucauggcug gaggaccau auggcugugu uguuuuggu cacacuauu ccuuuguca	4020
ggacaagcug ucucaaaaa cagucuuuu ggguagaaau aacagcacuc auccuaggag	4080
cccaagcucu gccaguguac cuauagacuc uuaugaaagg agccucaaga agaucuuggc	4140
cucuuaacga gggcauaaag gcuguggguu ugguaugcu cuuaggaagc gcucuuaa	4200
agaauaugu ccuuuugcu ggcccauagg uggcaggagg cuuacuucug gcggcuuacg	4260
ugaugagugg uagcucagca gaucugucac uagagaaggc cgccaacgug cagugggaug	4320
aaauaggcaga cauaacaggc ucaagcccaa ucauagaagu gaagcaggau gaauaggcu	4380

cuuucuccau acgggacguc gaggaacca auaugauaac ccuuuuggug aaacuggcac	4440
ugauaacagu gucaggucuc uaccccuugg caauuccagu cacaugacc uuaugguaca	4500
uguggcaagu gaaaacacaa agaucaggag ccuguggga cgucuccuca cccgcugcca	4560
cuaaaaaagc cgcacugucu gaaggagugu acaggaucau gcaaagaggg uuauucggga	4620
aaacucaggu uggaguaggg auacacaugg aagguguauu ucacacaauug uggcauguua	4680
caagaggauac agugaucugc cacgagacug ggagauugga gccaucuugg gcugacguca	4740
ggaaugacau gauaucauac ggugggggau ggaggcuugg agacaaaugg gacaaagaag	4800
aagacguuca gguccucgcc auagaaccag gaaaaaucc uaaacauguc caaacgaaac	4860
cuggccuuuu caagaccua acuggagaaa uggagcagu aacauuagau uucaaacccg	4920
gaacgucugg uucuccauc aucaacagga aaggaaaagu caucggacuc uauggaaaug	4980
gaguaguuaac caaaucaggu gauuacguca gugccauaac gcaagccgaa agaauuggag	5040
agccagauua ugaaguggau gaggacauuu uucgaaagaa aagauuaacu auaauggacu	5100
uacaccccg agcuggaaag acaaaaagaa uucuccauc aaugugaga gaagccuuaa	5160
aaaggaggcu acgaacuuug auuuuagcuc ccacgagagu gguggcgcc gagauggaag	5220
aggccuacg uggacugcca auccguuauc agaccccgagc ugugaaaauca gaacacacag	5280
gaagagagau uguagaccuc augugucaug caaccuucac aacaagacuu uugucaucaa	5340
ccaggguucc aaauuacaac cuuauaguga uggauagaagc acauuucacc gauccuucua	5400
gugucgcggc uagaggauac aucucacca ggguggaaau gggagaggca gcagccauu	5460
ucaugaccgc aacccuccc ggagcgacag auccuuucc ccagagcaac agcccaauag	5520
aagacaucga gagggaaaau ccggaaaggu cauggaacac aggguucgac uggauaacag	5580
acuaccaagg gaaaacugug ugguuuguuc ccagcauaaa agcuggaaa gacauugcaa	5640
auuguuugag aaagucggga aagaauguua uccaguugag uaggaaaacc uuugauacag	5700
aguauccaaa aacgaaacuc acggacuggg acuuuuggu cacuacagac auaucugaaa	5760
ugggggcca uuuuagagcc gggagaguga uagaccuag aagaugccuc aagccaguua	5820
uccuaccaga ugggccagag agagucuuu uagcaggucc uauuccagug acuccagcaa	5880
gcgcugcuca gagaagaggg cgaauaggaa ggaaccagc acaagaagac gaccaauacg	5940
uuuucuccgg agaccacua aaaaauaug aagauaugc ccacuggaca gaagcaaaga	6000
ugcugcuuga caauaucuac accccagaag ggaucuuucc aacauuguuu gguccgaaa	6060
gggaaaaaac ccaagccauu gauggagagu uucgccucag aggggaacaa aggaagacuu	6120
uuguggaauu aaugaggaga ggagaccuuc cgguguggcu gagcuauaag guagcuucug	6180
cuggcauuuc uuacaaagau cgggaauugu gcuucacagg ggaaagaaau aaccaaauu	6240

uagaagaaaa cauggagguu gaaauuugga cuagagaggg agaaaagaaa aagcuaaggc	6300
caagaugguu agaugcacgu guauacgcug accccauggc uuugaaggau uucaaggagu	6360
uugccagugg aaggaagagu auaacucucg acauccuaac agagaaugcc aguuugccaa	6420
cuuaccuuuc cucuagggcc aagcucgccc uugauaaccu agucaugcuc cacacaacag	6480
aaagaggagg gagggccuau caacacgccc ugaacgaacu uccggaguca cuggaaacac	6540
ucaugcuugu agcuuuacua ggugcuaua cagcaggcau cuuccuguuu uucaugcaag	6600
ggaaaggaa agggaaauug ucaauugggu ugauaaccu ugcgguggc aguggcuugc	6660
ucuggguagc agaaauuca cccagugga uagcggccuc aaucuuacua gaguuuuuuc	6720
ucaugguacu guugauaccg gaaccagaaa aacaaaggac cccacaagac aaucuuuga	6780
ucucgucuu auugaccau cucaccau uuggucuaa agcagccaac gagauggggc	6840
ugauuagaaa aacaaaaacg gaaauugggu uuuaaccaggu aaaaacagaa accaccauc	6900
ucgaugugga cuugagacca gcuucagcau ggacgcucua ugcaguagcc accacaauuc	6960
ugacucccau gcugagacac accauagaaa acacgucggc caaccuauu cuagcagcca	7020
uugccaacca ggagccguc cuaauugggc uuggaaaagg auggccgcuc cacagaauug	7080
accucggugu gccgcuguua gcauugggau gcuauucua agugaacca auaaccuuga	7140
cagcauccuu agucaugcuu uucgugcacu augcauaau agggccagga uugcaggcaa	7200
aagccacaag agaggccag aaaaggacag cugcugggau caugaaaaau cccacagugg	7260
acgggauaac aguaauagau cuagaacaa uauccuuga cccaaaauu gaaaagcaau	7320
uagggcaggu caugcuacua gucuugugug cuggacaacu acucuugaug agaacaacau	7380
gggcuuucug ugaagucuug acuuuggcca caggaccau cuugaccuug ugggagggca	7440
acccgggaag guuuugaac acgaccuag ccguauccac cgccaacau uucaggggaa	7500
guuacuuggc gggagcugga cuggcuuuu cacucauaa gaaugcaca accccuagga	7560
ggggaacugg gaccacagga gagacacugg gagagaagug gaagagacag cuaaacucau	7620
uagacagaaa agaguuugaa gaguaaaaa gaaguggaau acuagaagug gacaggacug	7680
aagccaaguc ugcccugaaa gaugggucua aaaucaagca ugcagauca agagggucca	7740
guaagaucag auggauugu gagagaggga ugguaagcc aaaagggaaa guuguagau	7800
uuggcugugg gagaggagga uggucuauu acauggcgac acucaagaac gugacugaag	7860
ugaaagggua uacaaaagga gguccaggac augaagaacc gauuccaug gcuacuuuag	7920
guuggaauuu ggucaaacuc cauucagggg uugacuguu cuacaaacc acagagcaag	7980

uggacacccu gcucugugau auuggggagu caucuucuaa uccaacaaua gaggaaggaa	8040
gaacauuaag aguuuugaag augguggagc cauggcucuc uucaaaaccu gaauucugca	8100
ucaaaguccu uaaccccuac augccaacag ucuaagaaga gcuggagaaa cugcagagaa	8160
aacauggugg gaaccuuguc agauggccgc uguccaggaa cuccaccuau gagauguauu	8220
gggugucagg agcgucggga aacauuguga gcucugugaa cacaacauca aagauguugu	8280
ugaacagguu cacaacaagg cauaggaaac ccacuuuga gaaggacgua gaucuugggg	8340
caggaacgag aagugucucc acugaaacag aaaaaccaga caugacaauc auugggagaa	8400
ggcuucagcg auugcaagaa gagcacaag aaaccuggca uuauaucag gaaaaccuau	8460
acagaaccug ggcguaucau ggaagcuau aagcuccuuc gacaggcucu gcauccucca	8520
uggugaacgg ggugguaaaa cugcuaaca aaccuggga ugugauucca auggugacuc	8580
aguuagccau gacagauaca accccuuug ggcaacaaag aguguucaa gagaaggugg	8640
auaccagaac accacaacca aaaccggua cacgaauugu uauagaccag acagccauu	8700
ggcugugggc ccuccuugga aagaagaaa auccagacu ggcacaagg gaagaguuca	8760
ucuaaaagu uagaucuaac gcagccauag gcgcagucuu ucaggaagaa cagggaugga	8820
caucagccag ugaagcugug aaugacagcc gguuuuggga acugguugac aaagaaagg	8880
cccuacacca ggaagggaau ugugaauugu gugucuuaa caugauggga aaacgugaga	8940
aaaaguuagg agaguuuggc agagccaagg gaagccgagc aaucugguac auguggcugg	9000
gagcgcgguu ucuggaauuu gaagccugg guuuuuugaa ugaagauac ugguuuggca	9060
gagaaaauuc auggagugga guggaagggg aaggucugca cagauuggga uauauccugg	9120
aggagauaga caagaaggau ggagaccuaa uguauugcuga ugacacagca ggcugggaca	9180
caagaauac ugaggaugac cuucaaaaug aggaacugau cacggaacag auggcucucc	9240
accacaagau ccuagccaaa gccauuuuca aacuaaccua ucaaaacaaa guggugaaag	9300
uccucagacc cacaccgagg ggagcgguga uggauaucau auccaggaaa gaccaagag	9360
guaguggaca aguuggaaca uauuguuuga acacauucac caacauaggaa guucaacua	9420
uccgcaaaau ggaagcugaa ggagucuaa cacaagauga caugcagaac ccaaaaggu	9480
ugaaagaaag aguugagaaa uggcugaaag aguguggugu cgacagguua aagaggau	9540
caucagugg agacauugc guggugaagc ccuagauga gagguuugc acuccucc	9600
ucuucugaa cgacauagg aaggugagga aagacauucc gcagugggaa ccaucuaagg	9660
gauggaaaaa cuggcaagag guuccuuuuu gcuccacca cuuucacaag aucuuuuga	9720
aggauggccg cucacuugu guuccaugga gaaaccagga ugaacuguaa gggagagcca	9780
gaaucucgca gggagcugga uggagcuuaa gagaaacagc cugccugggc aaagcuuacg	9840

cccagaugug gucgcuuauug uacuuccaca gaagggaucu gcguuuagcc uccauggcca	9900
uaugcucagc aguuccaagc gauggguuuc caacaagcag aacaacagg ucaauccacg	9960
cucaucacca guggaugacc acugaagaua ugcucaaaagu guggaacaga guguggauag	10020
aagacaaccc uaauaugacu gacaagacuc caguccauuc gugggaagau auaccuuacc	10080
uagggaaaag agaggauuug ugguguggau ccugauugg acuuucucc agagccaccu	10140
gggcgaagaa cauucacacg gccauaacc aggucaggaa ccugaucgga aaagaggau	10200
acguggauua caugccagua augaaaagau acagugcucc uucagagagu gaaggaguuc	10260
uguauuuacc aacaacaaac accaaaggcu auugaaguca ggccacuugu gccacgguuu	10320
gagcaaacgg ugcugccugu agcuccgcca auauugggag gcguauuuuu cccagggag	10380
gccaugcgcc acggaagcug uacgcguggc auauuggacu agcgguuaga ggagaccccu	10440
cccaucacug acaaaacgca gcaaaagggg gcccaagacu agagguuaga ggagaccccc	10500
ccaacacaaa aacagcauau ugacgcuggg aaagaccaga gaucugcug ucucugcaac	10560
aucaauccag gcacagagcg ccgcaaugau gauugguguu guugaucua cagguucu	10618
<210> 8	
<211> 10645	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DENV3	
<400> 8	
aguuguuagu cuacuggac cgacaagaac aguucgacu cggaagcuug cuuacguag	60
uacugacagu uuuuuuuuag agagcagauc ucugaugaac aaccaacgga aaaagacggg	120
aaaaccgucu aucaauaugc ugaaacgcu gaaaaaccgu gugucaacug gaucacaguu	180
ggcgaagaga uucuaagag gacugcugaa cggccaagga ccaaugaaau ugguuauaggc	240
guucauagcu uuccucagau uucuaagccau uccaccgaca gcaggagucu uggcuagaug	300
gggaaccuuu aagaagucgg gggcuauuaa gguccugaga ggcuucaaga aggagaucuc	360
aaacaugcug agcauuauca acagacggaa aaagacaucg cucugucua ugaugauguu	420
accagcaaca cuugcuuucc acuugacuuc acgagaugga gagccgcgca ugauuguggg	480
gaagaauгаа agaggaaaau ccuacuuuu uaagacagcc ucuggaauca acauggcac	540
acucauagcc auggaauugg gagagaugug ugaugacacg guccacuaca aaugccccc	600
cauuacugaa guggagccug aagacauuga cugcuggugc aaccuuacau cgacugggu	660
gaccuacgga acgugcaauc aagcuggaga gcacagacgc gacaaaagau cgguggcguu	720

agcuccccac	gucggcaugg	gacuggacac	acgcacccaa	accuggaugu	cggcugaagg	780
agcuuggaga	caggucgaga	agguagagac	augggccuuu	aggcaccag	gguucacaa	840
acuagcccua	uuucuuugcc	auuacauagg	cacuuccuug	accagaaaag	ugguuuuuu	900
cauacuacua	augcugguca	ccccauccau	gacaaugaga	ugcgugggag	uaggaaacag	960
agaauuuug	gaaggccuau	caggagcuac	guggguugac	guggugcucg	agcacggugg	1020
gugugugacu	accauggcua	agaacaagcc	cacgcuggau	auagagcucc	agaagaccga	1080
ggccacccaa	cuggcgaccc	uaaggaaacu	auguauugag	ggaaaaaua	ccaacguaac	1140
aaccgacuca	aggugcccca	cccaagggga	agcgauuuua	ccugaggagc	aggaccagaa	1200
ccacgugugc	aagcacacau	acguggacag	aggcugggga	aacgguugug	guuuguuugg	1260
caagggaagc	cugguaacau	gcgcgaaauu	ucaauguuug	gaaucaauag	agggaaaagu	1320
ggugcagcau	gagaaccuca	aaucacaccg	caucaucaca	gugcacacag	gagaucaaca	1380
ccagguggga	aaugaaacgc	agggagucac	ggcugagaua	acaccccagg	caucaaccgu	1440
ugaagccauc	uuaccugaau	auggaaccu	ugggcuagaa	ugcucaccac	ggacagguuu	1500
agauuucaau	gaaaugauuu	uguugacaau	gaagaacaga	gcauggaugg	uacauagaca	1560
augguuuuuu	gaccuaccuu	uaccauggac	aucaggagcu	acaacagaaa	caccaaccug	1620
gaauaagaaa	gagcuucuug	ugacauucaa	aaacgcacau	gcaaaaaagc	aagaaguagu	1680
gguccuugga	ucgcaagagg	gagcaaugca	cacagcacug	acaggagcua	cagagaacca	1740
aaccucagga	ggcacaagua	uuuuugcggg	gcacuuaaaa	uguagacuca	agauggacaa	1800
auuggaacuc	aaggggauga	gcuauccaau	gugcuugaau	gccuuugugu	ugaagaaaga	1860
agucuccgaa	acgcaacaug	ggacaauacu	caucaagguu	gaguacaaag	gggaagaugc	1920
accuugcaag	auuccuuuu	ccacggagga	uggacaaggg	aaagcccaca	auggcagacu	1980
gaucacagcu	aaccagugg	ugaccaagaa	ggaggagccu	gucaauauug	aggcagaacc	2040
uccuuuuggg	gaaagcaaua	uaguaauugg	aaugggagac	aaagccuuga	aaauaacug	2100
guacaagaag	ggaagcucga	uugggaagau	guucgaggcc	acugccagag	gugcaaggcg	2160
cauggccauc	uugggagaca	cagccuggga	cuuuggauca	guagguggug	uuuuuuuuu	2220
auuaggaaaa	auggugcacc	aaauuuuugg	aagugcuuac	acagcccuau	uuaguggagu	2280
cuccuggaua	augaaaauug	gaauaggugu	ccuuuuuacc	uggauagggu	ugaauucaa	2340
aaacacuagu	augagcuuuu	gcugcauugu	gauaggaauc	auuacacucu	aucugggagc	2400
cguggugcaa	gcugacaugg	ggugugucau	aaacuggaaa	ggcaaagaac	ucaaauugg	2460
aaguggaauu	uucgucacua	augaggucca	caccuggaca	gagcaauaca	aauuucaagc	2520
agacuccccc	aaaagacugg	cgacagccau	ugcaggcgcu	ugggagaaug	gagugugcgg	2580

aaucaggucg acaaccagaa uggagaaccu cuuguggaag caaaauagcca augaacugaa	2640
cuacauuuu ugggaaaaca acaucaaaau aacggguagu gugggugaua uaaauggggu	2700
cuuagagcaa gggaaaagaa cacuaacacc acaaccaug gaacuaaaau auucauggaa	2760
aaauaggga aaggcgaaga uagugacagc ugaacacaa aaauccucu ucauaauaga	2820
ugggccaaac acaccagagu guccaagugc cucaagagca uggaauugu gggaggugga	2880
agauuacggg uucggagucu ucacaacuaa cauauggcug aaacuccgag agauguacac	2940
ccaacuauu gaccacaggc uaaugucggc agccguuaag gaugagaggc ccguacacgc	3000
cgacaugggc uauuggauag aaagccaaaa gaauuggaagu uggaagcuag aaaaggauc	3060
ccuauuagag guaaaaaccu gcacauggc aaaaucacac acucuugga gcauaggugu	3120
gcuagagagu gacauauca ucccaaagag ucuggcuggu ccuauucgc aacacaacua	3180
caggcccga uaccacacc aaacggcagg accuggcac uuaggaaaau uggagcugga	3240
cuucaacuau ugugaaggaa caacaguugu caucacagaa aaauuggga caagaggccc	3300
aucacugaga acaacaacag ugucaggga guugauacac gaauugguu gccgcucug	3360
uacacuuccu cccugcgau acaugggaga agacggcugc ugguauaggca uggaaaauag	3420
acccuuuuu gagaaagaag agaacauggu aaagucuuu gucucagcag ggaguggaaa	3480
gguggauaac uucacaauug gugucuugug uuuggcauc cuuuuugaag aggugaugag	3540
aggaaaauu gggaaaaagc acaugauugc agggguucuc uucacguuug uacuccuuc	3600
cucagggcaa auaacaugga gagacaugc gcacacacuc auaugauug gguccaacgc	3660
cucugacaga augggaauug gcgucacuaa ccuagcauug auugcaacau uaaaaauca	3720
gccauuuuug gcuuugggau ucuuccugag gaaacugaca ucuagagaaa auuuauuguu	3780
gggaguuggg uuggccauug caacaacguu acaacugcca gaggacauug aacaauggc	3840
gaauugaaau gcuuagggc ucauggcucu uaaaaaua acacaauuug aaacauacca	3900
acuauaggag gcauuagucu ccuauaugug uucaaaaua auuuucacgu ugacuguugc	3960
cuggagaaca gccaccuga uuuggccgg aaauucucu uugccagugu gccagucuuc	4020
gagcauaggg aaaacagauu ggcucccau ggcuguggca gcuauaggag uuccacccu	4080
accacuuuu auuuucagu ugaagauac gcucaaaagg agaagcuggc cacugaauga	4140
gggggugaug gcuguuggac uugugaguau ucuagcuagu ucucuccua ggaauagcu	4200
gcccaggcu ggaccuuag uggcuggggg cuugcugaua gcgugcuacg ucauaacugg	4260
cacgucagca gaccucacug uagaaaaagc agcagaugug acaugggagg aagaggcuga	4320
gcaaacagga guguccaca auuuauugau cacaguugau gacgauggaa caaugagaau	4380

aaaagau gau gagacugaga acaucuuaac agugcuuuug aaaacagcau uacuaauagu	4440
gucaggcauu uuuccauacu ccuacccgc aacacuguug gucuggcaca cuuggcaaaa	4500
gcaaacccaa agauccggug uccuauaggga cguucccagc cccccagaga cacagaaagc	4560
agaacuggaa gaagggguuu auaggaucaa gcagcaagga auuuuuggga aaaccaagu	4620
ggggguugga guacaaaaag aaggaguuuu ccacaccaug uggcacguca caagaggagc	4680
aguguugaca cacaauaggga aaagacugga accaaacugg gcuagcguga aaaaagau cu	4740
gauuucauac ggaggaggau ggaaauugag ugcacaaugg caaaaaggag aggaggugca	4800
gguuuuugcc guagagccug ggaagaaccc aaagaacuuu caaaccaugc caggcauuuu	4860
ccagacaaca acaggggaga uaggagcgau ugcacuggac uucaagccug gaacuucagg	4920
aucucccauc auaaacagag agggaaaggu acugggauug uauaggcaaug gaguggucac	4980
aaagaauugu ggcuauugca guggaaugc acaaacaaau gcagaaccag acggaccgac	5040
accagaguug gaagaagaga uguuacaaaa gcgaaucua accauaaugg aucuccauc	5100
cgggucagga aagacgcgga aaauaucuucc agcuauuguu agagaggcaa ucaagagacg	5160
cuuaaggacu cuauuuuugg caccaacaag gguaguugca gcugagaugg aagaagcauu	5220
gaaagggcuc ccauaaaggu aucaacaac ugcaacaaaa ucugaacaca caggagaga	5280
gauuguugau cuauugucc acgcaacguu cacaaucggu uugcugucac cagucagggu	5340
uccaaacuac aacuugauaa uauuggauga ggcuauuuc acagaccag ccaguauagc	5400
ggcuagaggg uacauaucaa cucguguagg aaugggagag gcagccgcaa uuuuauagc	5460
agccacaccc ccuggaacag cugaugccuu uccucagagc aacgcuccaa uucaauga	5520
agaaagagac auaccagaac gcuauggaa uucaggcaau gaauaggaua ccgacuuugc	5580
cgggaagacg guguguuug ucccuagcau caaagcugga aaugacauag caaacugcuu	5640
gcggaaaaau ggaaaaaagg ucauucaacu uaguaggaag acuuuugaca cagaauauca	5700
aaagacuaaa cuaaaugauu gggacuuugu ggugacaaca gacuuucag aaugggagc	5760
cauuuucaaa gcagacagag ugaucgacc aagaagau cucaagccag ugauuuugac	5820
agacggaccc gagcgcguga uccuggcggg accaaugcca gucaccguag cgagcgugc	5880
gcaaaggaga gggagaguug gcaggaaccc aaaaaagaa aaugaccau acauuuuau	5940
gggccagccc cucauuauug augaagacca ugcucacugg acagaagcaa aaugcugcu	6000
agacaauac aacacaccag aagggaucuu accagcucuc uuugaaccag aaaggagaa	6060
gucagccgcc auagacggcg aaauaccgcu gaagggugag uccaggaaga ccuucugga	6120

acucaugagg aggggugacc ucccaguuug gcuagcccau aaaguagcau cagaagggau	6180
caaaauaaca gauagaaagu gguguuuuga uggagaacgc aacaaucaaa uuuuagagga	6240
gaauauggau guggaaaucu ggacaaagga aggagaaaag aaaaaauuga gaccuaggug	6300
gcuugaugcc cgcacuuuuu cagaucuuu agcgcucaag gaauucaagg acuuugcggc	6360
ugguagaaag ucaaauugccc uugaucuugu gacagaaaua ggaagagugc cuucacacuu	6420
agcucacaga acgagaaacg ccucggacaa ucuggugaug uugcacacgu cagaacaugg	6480
cgggaggggc uacaggcaug caguggagga acuaccagaa acaauggaaa cacucuuacu	6540
ccugggacuc augauccugu uaacaggugg agcaaugcuu uucuugauau cagguaaagg	6600
gauuggaaag acuucaauag gacucauuug uguagcugcu uccagcggua uguuauggau	6660
ggcugauguc ccacuccaau ggauccguc ugccauaguc cuggaguuuu uuaugauggu	6720
guuacuuuaa ccagaaccag aaaaagcagag aacuccccaa gacaaauaac ucgcuaaugu	6780
cgugauaggc auacucacac uggcugcaau aguagcagcc aaugaaaagg gacuguugga	6840
aaccacaaag agagaauuag gaauugccaa agaaccaggu guuguuucuc caaccagcua	6900
uuuggaugug gacuugcacc cagcaucagc cuggacauug uacgcugugg ccacaacagu	6960
aauaacacca auguugagac auaccuaga gaauuccaca gcaauugugu ccucggcagc	7020
uauagccaac caggcagugg uccugauggg uuuagacaaa ggauggccga uaucgaaaau	7080
ggacuuaggc gugccacuau uggcacuggg uuguuuuua caagugaacc cacuaacucu	7140
cacagcggca guucuccugc uagccacgca uuaugcuau auagguccag gauugcaggc	7200
aaaagccacu cgugaagcuc aaaaaaggac agcugcugga auaaugaaga auccaacggu	7260
ggaugggaua augacaauag accuagauc uguauauuac gaucacaaa uugaaaagca	7320
acuaggacag guuauugcucc uggauucugug ugcaguucua cuuuuguuaa ugagaacauc	7380
augggcuuuu uguagaagcuc uaaccuagc cacaggacca auaacaacac ucugggaagg	7440
aucaccuggg aaguucugga acaccacgau agcuguuucc auggcgaaca ucuuagagg	7500
gagcuuuua gcaggagcug ggcuugcuuu uucuaucaug aaauagauug gaacaggaaa	7560
gagagggaca ggucacagg gugaaacuu ggagaaaaag uggaaaaaga aaugaaauca	7620
auuaccccg aaagaguug accuuuacaa gaaauccgga aucacugaag uggauagaac	7680
agaagccaaa gaagguuga aaagaggaga aaauacacac caugccgugu ccagaggcag	7740
cgaaaaacu caaugguucg uggagagaaa cauggucauc cccgaaggaa gagucauaga	7800
cuuaggcugu ggaagaggag gcuggucaua uuauugugca ggacugaaaa aaguacaga	7860
agugcgagga uacacaaaa gcgcccagg acaugaagaa ccaguaccua ugucuacua	7920
cggauugaac auagucaagu uaagagugg aaaggaugug uuuuauuc caccugaaaa	7980

gugugauacu cuauugugug acauuggaga aucuucacca agcccaacag uggaagaaag	8040
cagaaccaua agagucuuga agaugguuga accauggcua agaaaaaacc aguuuugcau	8100
uaaaguuuug aacccuuaca ugccaacugu gauugagcac cuagaaagac uacaaaggaa	8160
acauaggagga augcuuguga gaaauccacu cucacgaaac uccacgcacg aaauguacug	8220
gauaucuaau ggcacaggca auaucguuuc uucagucaac augguaucca gauugcuacu	8280
uaacagauuc acaaugacac auaggagacc caccuagag aaagaugugg auuuaggagc	8340
ggggaccgca caugucaaug cggaaccaga aacaccaac auggauguca ugggggaaag	8400
aauaagaagg aucaaggagg agcauaguuc aacauggcac uaugaugaug aaaauccuaa	8460
uaaaacgugg gcuuaccaug gauccuuga aguuuaggcc acaggcucag ccuccuccau	8520
gauaaaugga gucgugaaac uccucacgaa accaugggau guggugccca uggugacaca	8580
gauggcaaug acggauacaa ccccauucgg ccagcaaagg guuuuuuaag agaaagugga	8640
caccaggaca cccagaccua ugccaggaac aagaaagguu auggagauca cagcggaug	8700
gcuuuggaga acccugggaa ggaacaaaag acccagauua uguacgagag aggaguucac	8760
aaaaaagguc agaaccaacg cagcuauuggg cgccguuuuu acagaggaga accaauggga	8820
cagugcuaga gcugcuguug aggaugaaga auucuggaaa cucuggaca gagaacguga	8880
acuccacaaa uugggcaagu guggaagcug cguuuacaac augaugggca agagagagaa	8940
gaaacuugga gaguuuggca aagcaaaagg caguagagcc auauuguaca ugugguuggg	9000
agccagauac cuugaguucg aagcacucgg auucuuaau gaagaccauu gguucucgcg	9060
ugaaaacucu uacaguggag uagaaggaga aggacugcac aagcugggau acaucuaaag	9120
agacauuucc aagauacccg gaggagcuau guaugcugau gacacagcug guugggacac	9180
aagaauaaca gaagaugacc ugcacauga ggaaaaaauc acacagcaa uggaccucga	9240
acacaggcag uuagcaaag cuauuuucaa gcucacauac caaaacaaag uggucaaagu	9300
ucaacgacca acuccaaagg gcacgguaau ggacaucaua ucuaggaaag accaaagagg	9360
caguggacag gugggaacuu auggucugaa uacauucacc acauggaag ccaguuuau	9420
cagacaaug gaaggagaag guguguuguc gaaggcagac cucgagaacc cucaucugcu	9480
agagaagaaa guuacacaau gguuggaaac aaaaggagug gagagguuaa aaagaauggc	9540
caucagcggg gaugauugcg uggugaaacc aaugaugac agguucgcca augccucgu	9600
ugcccugaau gacauuggaa aaguuaaggaa ggacauaccu caauggcagc caucaaaggg	9660
auggcaugau uggcaacagg ucccuuucug cuccaccac uuucaugaau ugaucugaa	9720
agauggaaga aaguugguag uuccucgag accucaggau gaauuaauc ggagagcgag	9780
aaucucucaa ggagcaggau ggagccuag agaaacugca ugccuaggga aagccuacgc	9840

ccaaaugugg acucucaugu acuuucacag aagagauuu agacuagcau ccaacgccau 9900

auguucagca guaccagucc auuggguccc cacaagcaga acgacguggu cuauucaugc 9960

ucaccaucag uggaugacua cagaagacau gcuuacuguu uggaacaggg uguggauaga 10020

ggauaaacca uggauggaag acaaaacucc agucaaaacc uggaagaug uuccauaucu 10080

agggaagaga gaagaccaau ggugcggauc acucauuggu cucacuucca gagcaaccug 10140

ggcccagaac auacuuacgg caauccaaca ggugagaagc cuuauaggca augaagaguu 10200

ucuggacuac augccuucga ugaagagauu caggaaggag gaggagucag agggagccau 10260

uugguaaacg uaggaaguga aaaagaggca aacugucagg ccaccuuaag ccacaguacg 10320

gaagaagcug ugcagccugu gagccccguc caaggacguu aaaagaagaa gucaggccca 10380

aaagccacgg uuugagcaaa ccgugcugcc uguggcuccg ucguggggac guaaaaccug 10440

ggaggcugcg acuagcgguu agaggagacc ccucccguga cacaacgcag cagcggggcc 10500

caagacuaga gguuagagga gacccccgc aaauaaaaac agcauuuga cgcugggaga 10560

gaccagagau ccugcugucu ccucagcauc auuccaggca cagaaccca gaaaauaggaa 10620

uggugcuguu gaaucaacag guucu 10645

<210> 9

<211> 10618

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DENV4

<400> 9

aguuguuagu cuguguggac cgacaaggac aguuccaaau cggaagcuug cuuaacacag 60

uucuaacagu uuguuugaau agagagcaga ucucuggaaa aaugaaccaa cgaaaaaagg 120

ugguuagacc accuuucaau augcugaaac gcgagagaaa ccgcguauca accccucaag 180

ggugugugaa gagauucua accggacuuu uuucugggaa aggaccuuu cggauggugc 240

uagcauucau cacguuuuug cgaguccuuu ccaucccacc aacagcaggg auucugaaga 300

gauggggaca guugaagaaa aaauaggcca ucaagauacu gauuggauuc aggaaggaga 360

uaggccgcga gcugaacauc uugaacggga gaaaaagguc aacgauaaca uugcugugcu 420

ugauucccac cguaauggcg uuuuuccuca gcacaagaga uggcgaaccc cucaugauag 480

uggcaaaaca ugaaaggggg agaccucucu uguuuuagac aacagagggg aucaaaaau 540

gcacucucau ugccauggac uugggugaaa ugugugagga cacugucag uauaaaugcc 600

ccuacuggu caauaccgaa ccugaagaca uugauugcug gugcaaccuc acgucuaccu 660

gggucaugua ugggacaugc acccagagcg gagaacggag acgagagaag cgcucaguag	720
cuuaaacacc acauucagga augggauugg aaacaagagc ugagacaugg augucaucgg	780
aaggggcuug gaagcaugcu cagagaguag agagcuggau acucagaaac ccaggauucg	840
cgucucuuggc aggauuuau gcuuauauga uugggcaaac aggaauccag cgaacugucu	900
ucuuuuguccu aaugaugcug gucgccccau ccuacggaau gcgaugcgua ggaguaggaa	960
acagagacuu uguggaagga gucucaggug gagcaugggu cgaccuggug cuagaacaug	1020
gaggaugcgu cacaaccaug gcccaggga aaccaaccuu ggauuuugaa cugacuaaga	1080
caacagccaa ggaaguggu cuuuuagaa ccuauugcau ugaagccuca auaucaaaaca	1140
uaacuacggc aacaagaugu ccaacgcaag gagagccuua ucugaaagag gaacaggacc	1200
aacaguacau uugccggaga gaugugguag acagagggu gggcaauggc uguggcuuugu	1260
uuggaaaagg aggaguugug acaugugcga aguuuucaug uucggggaag auaacaggca	1320
auuuggucca aaugagaac cuugaauaca cagugguugu aacaguccac aauggagaca	1380
cccaugcagu aggaaaugac acauccaau auggaguua agccaugaua acucccaggu	1440
caccuuggu ggaagucaaa uugccggacu auggagaacu aacacucgau ugugaaccca	1500
ggucuggaau ugacuuuau gagaugauuc ugaugaaaau gaaaaagaaa acauggcucg	1560
ugcauaagca augguuuuug gaucugccuc uuccauggac agcaggagca gacacaucag	1620
agguucacug gaauuacaaa gagagaugg ugacauuuu gguuccucau gccaagagac	1680
aggaugugac agucugggga ucucaggaag gagccaugca uucugcccuc gcuggagcca	1740
cagaagugga cuccggugau ggaaucaca uguuugcagg acaucuaag ugcaaagucc	1800
guauggagaa auugagaauc aagggaauu cauacacgau guguucagga aaguuuucaa	1860
uugacaaaga gauggcagaa acacagcaug ggacaacagu ggugaaaguc aaguaugaag	1920
gugcuggagc uccguguaaa gucccauag agauaagaga uguaaacaag gaaaaagugg	1980
uugggcguau caucucaucc acccuuugg cugagaauac caacagugua accaacauag	2040
aaauagaacc ccccuuuggg gacagcuaca uagugauagg uguuggaaac agcgcauuua	2100
cacuccauug guucagga aaaggauucca uuggcaagau guuugagucc acauacagag	2160
gugcaaacg aauggccaau cuaggugaaa cagcuuggga uuuugguucc guugguggac	2220
uguucacauc auugggaaa gcugugcacc agguuuuugg aaguguguau acaaccaugu	2280
uuggaggagu cucauggaug auuagaaucc uauuugggu cuuaguguug uggauuggca	2340
cgaacucgag gaacacuua auggcuauga cgugcauagc uguuggagga aucacucugu	2400
uucugggcuu cacaguuaa gcagacaugg guuguguggc gucauggagu gggaaagaa	2460

ugaagugugg aagcggaaau uuugugguug acaacgugca cacuuggaca gaacaguaca	2520
aaauucaacc agagucccca gcgagacuag cgucugcaau auuaaaugcc cacaagaug	2580
gggucugugg aaauagauca accacgaggc uggaaaaugu cauguggaag caaauaacca	2640
acgagcuaaa cuauguucuc ugggaaggag gacaugaccu cacuguagug gcuggggaug	2700
ugaagggggu guugacaaa ggcaagagag cacucacacc cccagugagu gaucugaaau	2760
auucauggaa gacaugggga aaagcaaaaa ucuucacccc agaagcaaga aaugcacau	2820
uuuuauaga cggaccagac accucugaau gccccauga acgaagagca uggaacucuc	2880
uugaggugga agacuugga uuugcangu ucacgaccaa cauauugga aauuccgag	2940
aaggaaguuc agaagugugu gaccacaggu uaaugucagc ugcauuuaa gaucagaaag	3000
cugugcaguc ugacaugggu uauuggauag agagcucaaa aaaccagacc uggcagauag	3060
agaaagcauc uuuuuugaa gugaaaacau gucuguggcc caagaccac acacugugga	3120
gcaauaggagu gcuggaaagc cagaugcuca uuccaaaauc auaugcgggc ccuuuuucac	3180
agcacaauua ccgccagggc uauccacgc aaaccguggg cccauggcac uuaggcaau	3240
uagagauaga cuuuggagaa ugccccgga caacagucac aaucaggag gauugugacc	3300
auaggggcc aucuuagg accaccacug caucuggaaa acuagucag caauggugcu	3360
gccgcuccug cacgaugccu ccuuuaggu ucuugggaga agaugggugc ugguauugga	3420
uggagauuag gcccuugagu gaaaaagaag agaacauggu caaaucacag gugacggccg	3480
gacaggcac aucagaaau uuuuucaug gucuguugug ccugaccuug uuuguggaag	3540
aaugcuugag gagaagaguc acuaggaaac acaugauuu aguuguggug aucacucuuu	3600
gugcuaucau ccugggaggc cucacaugga uggacuuacu acgagccuc aucauguug	3660
gggacacau gucugguaga auaggaggac agauccacu agccauaug gcaguguuca	3720
agaugucacc aggauacgug cugggugugu uuuaaggaa acucacuua agagagacag	3780
cacuaauggu aauggaauug gccaugacaa cggugcuuuc aaauccacu gaccuuauug	3840
aacucauuga uggaauauca cugggacuaa uuugcuaaa aauguaaca caguugaca	3900
acaccaagu gggaaccuua gcucuuccu ugacuuuau aagaucaca augccauug	3960
ucauggcuug gaggaccau auggcugugu uguuuuggu cacacuaau ccuuugugca	4020
ggacaagcug ucuuacaaaa cagucuaau ggguagaaau aacagcacuc auccuaggag	4080
ccaagcucu gccaguguac cuaaugacuc uuauaaaagg agccucaaga agaucuuggc	4140
cucuuaacga gggcauaaag gcuguggguu ugguuagucu cuuaggaagc gcucuuaa	4200

agaauaugu cccuuuagcu ggcccaaugg uggcaggagg cuuacuucug gcggcuuacg	4260
ugaugagugg uagcucagca gaucugucac uagagaaggc cgccaacgug cagugggaug	4320
aaauggcaga cauaacaggc ucaagcccaa ucauagaagu gaagcaggau gaagauggcu	4380
cuuucuccau acgggacguc gaggaaacca auaugauaac ccuuuuggug aaacuggcac	4440
ugauaacagu gucaggucuc uaccccuugg caauuccagu cacaugacc uuaugguaca	4500
uguggcaagu gaaaacacaa agaucaggag ccuguggga cgucuccuca cccgcugcca	4560
cuaaaaaagc cgcacugucu gaaggagugu acaggaucau gcaaagaggg uuauucggga	4620
aaacucaggu uggaguaggg auacacaugg aagguguauu ucacacaauug uggcauguua	4680
caagaggau agugaucugc cacgagacug ggagauugga gccaucuugg gcugacguca	4740
ggaugacau gauaucuac gguggggggau ggaggcuugg agacaaaugg gacaaagaag	4800
aagacguuca ggucucgcc auagaaccag gaaaaaucc uaaacauguc caaacgaaac	4860
cuggccuuu caagaccua acuggagaaa uggagcagu aacauuagau uucaaaccg	4920
gaacgucugg uucuccauc aucaacagga aaggaaaagu caucggacuc uauggaaug	4980
gaguaguac caaaucaggu gauuacguca gugccauaac gcaagccgaa agaauuggag	5040
agccagauua ugaaguggau gaggacauu uucgaaagaa aagauuacu auauaggacu	5100
uacaccccg agcuggaaag acaaaaagaa uuucuccauc aaugugaga gaagccuua	5160
aaaggaggcu acgaacuug auuuuagcuc ccacgagagu gguggcgcc gagauggaag	5220
aggccuacg uggacugcca auccguuac agaccccgagc ugugaaauca gaacacacag	5280
gaagagagau uguagaccuc augugucag caaccuucac aacaagacu uugucaucaa	5340
ccaggguucc aaauuacaac cuuauaguga uggauaagc acuuuucc gaucuuuua	5400
gugucgcgcg uagaggauac aucugacca ggguggaaau gggagaggca gcagccaucu	5460
ucaugaccgc aacccuccc ggagcgacag auccuuucc ccagagcaac agcccaauag	5520
aagacaucga gagggaaau ccggaagggu cauggaacac agggauucgac uggauaacag	5580
acuaccaagg gaaaacugug ugguuuuguuc ccagcauaaa agcuggaaau gacauugcaa	5640
auuguuugag aaagucggga aagaaaguua uccaguugag uaggaaaacc uuugauacag	5700
aguauccaaa aacgaaacuc acggacuggg acuuugugu cacuacagac auaucugaaa	5760
ugggggcca uuuuagagcc gggagaguga uagaccuag aagaugccuc aagccaguua	5820
uccuaccaga ugggccagag agagucuuu uagcaggucc uauuccagug acuccagcaa	5880
gcgcugcuca gagaagaggg cgaauaggaa ggaaccagc acaagaagac gaccaauacg	5940
uuuucuccg agaccacua aaaaauaug aagauaugc ccacuggaca gaagcaaaga	6000
ugcugcuuga caauaucuac accccagaag ggaucuuucc aacauuguu gguccgaaa	6060

gggaaaaaac ccaagccauu gauggagagu uucgccucag aggggaacaa aggaagacuu	6120
uuguggaauu aaugaggaga ggagaccuuc cgguguggcu gagcuauaag guagcuucug	6180
cuggcauuuc uuacaaagau cgggaauggu gcuucacagg ggaaagaaau aaccaaauuu	6240
uagaagaaaa cauggagguu gaaauuugga cuagagaggg agaaaagaaa aagcuaaggc	6300
caagaugguu agaugcacgu guauacgcug accccauggc uuugaaggau uucaaggagu	6360
uugccagugg aaggaagagu auaacucucg acauccuaac agagauugcc aguuugccaa	6420
cuuaccuuuc cucuagggcc aagcucgccc uugauaacau agucaugcuc cacacaacag	6480
aaagaggagg gagggccuau caacacgccc ugaacgaacu uccggaguca cuggaaacac	6540
ucaugcuugu agcuuuacua ggugcuuga cagcaggcau cuuccuguuu uucaugcaag	6600
ggaaaggaa agggaaauug ucaauggguu ugauaaccau ugcgguggcu aguggcuugc	6660
ucuggguagc agaaauuca cccagugga uagcggccuc aaucuaucua gaguuuuuuc	6720
ucaugguacu guugauaccg gaaccagaaa aacaaaggac cccacaagac aaucuuuga	6780
ucuacgucau auugaccau cucaccauca uuggucuaau agcagccaac gagauggggc	6840
ugauugaaaa acaaaaacg gauuuugggu uuuaccaggu aaaaacagaa accaccaucc	6900
ucgaugugga cuugagacca gcuucagcau ggacgcucua ugcaguagcc accacaauuc	6960
ugacucccau gcugagacac accauagaaa acacgucggc caaccuauuc cuagcagcca	7020
uugccaacca ggcagccguc cuaauggggc uuggaaaagg auggccgcuc cacagaauug	7080
accucggugu gccgcuguua gcauugggau gcuauucua agugaacca auaaccuuga	7140
cagcauccuu agucaugcuu uucguccauu augcauaau agggccagga uugcaggcaa	7200
aagccacaag agaggcccag aaaaggacag cugcugggau caugaaaaau cccacagugg	7260
acgggauaac aguaauagau cuagaaccaa uauccuuga cccaaaauuu gaaaagcaau	7320
uagggcaggu caugcuacua gucuugugug cuggacaacu acucuugaug agaacaacau	7380
gggcuuucug ugaagucuu acuuuggcca caggaccaau cuugaccuug ugggagggca	7440
acccgggaag guuuugaac acgaccuag ccguauccac cgccaacauu uucaggggaa	7500
guuacuuggc gggagcugga cuggcuuuuu cacucauaaa gaaugcaca accccuagga	7560
ggggaacugg gaccacagga gagacacugg gagagaagug gaagagacag cuaaacucau	7620
uagacagaaa agaguuugaa gaguauaaaa gaaguggaau acuagaagug gacaggacug	7680
aagccaaguc ugcccugaaa gaugggucua aaaucaagca ugcaguauca agagggucca	7740
guaagaucag auggauuguu gagagaggga ugguaaagcc aaaagggaaa guuguagauc	7800
uuggcugugg gagaggagga uggucuuaau acauggcgac acucaagaac gugacugaag	7860
ugaaagggua uacaaaagga gguccaggac augaagaacc gauuccaug gcuacuuau	7920

guuggaauuu ggucaaacuc cauucagggg uugacguguu cuacaaaccc acagagcaag	7980
uggacacccu gcucugugau auuggggagu caucuucuaa uccaacaaua gaggaaggaa	8040
gaacauuaag aguuuugaag augguggagc cauggcucuc uucaaaaccu gaaucugca	8100
ucaaguccu uaacccuac augccaacag ucauagaaga gcuggagaaa cugcagagaa	8160
aacauggugg gaaccuugc agaugcccg cuguccaggaa cuccaccuau gagauguauu	8220
gggugucagg agcgucggga aacauuguga gcucugugaa cacaacauca aagauguugu	8280
ugaacagguu cacaacaagg cauaggagac ccacuuuga gaaggacgua gaudiugggg	8340
caggacagag aagugucucc acugaaacag aaaaaccaga caugacaauc auugggagaa	8400
ggcuucagcg auugcaagaa gagcacaag aaaccuggca uuaugaucag gaaaaccuau	8460
acagaaccug ggcguaucau ggaagcuau aagcuccuuc gacaggcucu gcauccucca	8520
uggugaacgg gguguaaaa cugcuacaa aaccuggga ugugauucca auggugacuc	8580
aguuagccau gacagauaca accccuuuug ggcaacaaag aguguucaa gagaaggugg	8640
auaccagaac accacaacca aaaccggua cacgaauugu uauaccacg acagccauu	8700
ggcugugggc ccuccuuga aagaagaaaa auccagacu ggcacaagg gaagaguua	8760
ucuaaaagu uagaucacac gcagccauag gcgcagucuu ucaggaagaa cagggaugga	8820
caucagccag ugaagcugug aaugacagcc gguuuuggga acugguugac aaagaaagg	8880
ccuacacca ggaagggaau ugugaauugc gugucuaua caugauggga aaacgugaga	8940
aaaaguuaag agaguuuugc agagccaagg gaagccgagc aaucugguac augugcugc	9000
gagcgcgguu ucuggaauu gaagcccugc guuuuuugaa ugaagaucac ugguuuggca	9060
gagaaaauc auggagugga guggaagggg aaggucugca cagauuggga uauauccugc	9120
aggagauaga caagaaggau ggagaccuaa uguauugcuga ugacacagca ggcugggaca	9180
caagaauac ugaggauagc cucaaaaug aggaacugau cacggaacag auggcucucc	9240
accacaagau ccuagccaaa gccauuuuca aacuaaccua ucaaaacaaa guggugaaag	9300
uccucagacc cacaccgagg ggagcgguga uggauaucau auccaggaaa gaccaaagag	9360
guaguggaca aguuggaaca uauuguuuga acacauucac caacauggaa guucaacua	9420
uccgcaaaau ggaagcugaa ggagucuaa cacaagaua caugcagaac ccaaaagggu	9480
ugaaaagaa aguuagagaa uggcugaaa agugugugu cgacagguua aagaggauug	9540
caucagugg agacgauugc guggugaagc ccuagauga gagguuugc acuuuccucc	9600
ucuuuugaa cgacauaggga aaggugagga aagacauucc gcagugggaa ccaucuaagg	9660

gauggaaaaa cuggcaagag guuccuuuuu gcucccacca cuuucacaag aucuuuuga	9720
aggauaggccg cucacuaguu guuccaugua gaaaccagga ugaacugaua gggagagcca	9780
gaaucucgca gggagcugga uggagcuuaa gaaaaacagc cugccugggc aaagcuuacg	9840
cccagaugug gucgcuuug uacuuccaca gaagggaucu gcguuuagcc uccauggcca	9900
uaugcucagc aguuccaagc gauggguuuc caacaagcag aacaacagg ucaauccacg	9960
cucaucacca guggaugacc acugaagaua ugcucaaagu guggaacaga guguggauag	10020
aagacaacc uauaugacu gacaagacuc caguccauuc gugggaagau auaccuuacc	10080
uagggaaaag agaggauuug ugguguggau ccugauugg acuuucucc agagccaccu	10140
gggcgaagaa cauucacag gccauaacc aggucaggaa ccugaucgga aaagaggau	10200
acguggauua caugccagua augaaaagau acagugcucc uucagagagu gaaggaguuc	10260
uguauuuacc aacaacaaac accaaaggcu auugaaguca ggccacuugu gccacgguuu	10320
gagcaaaccg ugcugccugu agcuccgcca auaaugggag gcguauuuuu cccagggag	10380
gccaugcgcc acggaagcug uacgcguggc auauuggacu agcgguuaga ggagaccccu	10440
cccaucacug aaaaaacgca gcaaaagggg gcccaagacu agagguuaga ggagaccccc	10500
ccaacacaaa aacagcauau ugacgcuggg aaagaccaga gaucugcug ucucugcaac	10560
aucaauccag gcacagagcg ccgcaaugau gauugguguu guugaucua cagguucu	10618