



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201336508 A

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 09 月 16 日

(21)申請案號：102119488

(22)申請日：中華民國 96 (2007) 年 09 月 20 日

(51)Int. Cl.：

A61K39/12 (2006.01)

A61K39/125 (2006.01)

C07K14/18 (2006.01)

A61P31/12 (2006.01)

(30)優先權：2006/10/04

法國

0608660

(71)申請人：賽諾菲巴斯德公司 (法國) SANOFI PASTEUR (FR)

法國

(72)發明人：蓋 布魯諾 GUY, BRUNO (FR)；佛瑞特 雷米 FORRAT, REMI (FR)；連 琴
LANG, JEAN (FR)；巴本 費洛尼格 BARBAN, VERONIQUE (FR)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：0 共 46 頁

(54)名稱

對抗 4 種登革熱血清型之免疫方法

METHOD OF IMMUNIZATION AGAINST THE 4 DENGUE SEROTYPES

(57)摘要

本發明係關於一種用於在患者中誘發對抗 4 種登革熱血清型保護力的方法，其包括：(a)第一系列投予(i)一劑第一種血清型之疫苗用登革熱病毒及一劑第二種血清型之疫苗用登革熱病毒；及(ii)一劑第三種血清型之疫苗用登革熱病毒及一劑第四種血清型之疫苗用登革熱病毒，及(b)第二系列投予(i)及(ii)劑，其中(i)及(ii)劑係在不同解剖部位同時投予，且其中該第二系列係在第一系列之後至少 30 天至最多 12 個月時實施。



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201336508 A

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 09 月 16 日

(21)申請案號：102119488

(22)申請日：中華民國 96 (2007) 年 09 月 20 日

(51)Int. Cl.：

A61K39/12 (2006.01)

A61K39/125 (2006.01)

C07K14/18 (2006.01)

A61P31/12 (2006.01)

(30)優先權：2006/10/04

法國

0608660

(71)申請人：賽諾菲巴斯德公司 (法國) SANOFI PASTEUR (FR)

法國

(72)發明人：蓋 布魯諾 GUY, BRUNO (FR)；佛瑞特 雷米 FORRAT, REMI (FR)；連 琴

LANG, JEAN (FR)；巴本 費洛尼格 BARBAN, VERONIQUE (FR)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：0 共 46 頁

(54)名稱

對抗 4 種登革熱血清型之免疫方法

METHOD OF IMMUNIZATION AGAINST THE 4 DENGUE SEROTYPES

(57)摘要

本發明係關於一種用於在患者中誘發對抗 4 種登革熱血清型保護力的方法，其包括：(a)第一系列投予(i)一劑第一種血清型之疫苗用登革熱病毒及一劑第二種血清型之疫苗用登革熱病毒；及(ii)一劑第三種血清型之疫苗用登革熱病毒及一劑第四種血清型之疫苗用登革熱病毒，及(b)第二系列投予(i)及(ii)劑，其中(i)及(ii)劑係在不同解剖部位同時投予，且其中該第二系列係在第一系列之後至少 30 天至最多 12 個月時實施。

發明摘要

※ 申請案號：102119488 (由96135167分割)

※ 申請日：96.9.20

※IPC 分類：A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/125 (2006.01)

C07K 14/18 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

【發明名稱】

對抗4種登革熱血清型之免疫方法

METHOD OF IMMUNIZATION AGAINST THE 4 DENGUE
SEROTYPES

○ 【中文】

本發明係關於一種用於在患者中誘發對抗4種登革熱血清型保護力的方法，其包括：

(a) 第一系列投予(i)一劑第一種血清型之疫苗用登革熱病毒及一劑第二種血清型之疫苗用登革熱病毒；及(ii)一劑第三種血清型之疫苗用登革熱病毒及一劑第四種血清型之疫苗用登革熱病毒，及

(b) 第二系列投予(i)及(ii)劑，其中(i)及(ii)劑係在不同解剖部位同時投予，且

○ 其中該第二系列係在第一系列之後至少30天至最多12個月時實施。

【英文】

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

(a) a first series of administrations (i) of a dose of a vaccinal dengue virus of a first serotype and of a dose of a vaccinal dengue virus of a second serotype, and (ii) of a dose of a vaccinal dengue virus of a third serotype and of a dose of a vaccinal dengue virus of a fourth serotype, and

(b) a second series of administrations of doses (i) and (ii), in which the doses (i) and (ii) are administered simultaneously at separate anatomical sties, and

in which the second series is implemented at least 30 days to at most 12 months after the first series.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：（無）

【本代表圖之符號簡單說明】：

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

·
·
·

【發明名稱】

對抗4種登革熱血清型之免疫方法

METHOD OF IMMUNIZATION AGAINST THE 4 DENGUE
SEROYPES

【技術領域】

本發明係關於在患者中誘發對抗4種登革熱血清型保護力的方法，包括

(a) 第一系列投予(i)一劑第一種血清型之疫苗用登革熱病毒及一劑第二種血清型之疫苗用登革熱病毒；及(ii)一劑第三種血清型之疫苗用登革熱病毒及一劑第四種血清型之疫苗用登革熱病毒，及

(b) 第二系列投予(i)及(ii)劑，其中(i)及(ii)劑係在不同解剖部位同時投予，且

其中該第二系列(b)係在第一系列(a)之後至少30天至最多12個月時實施。

【先前技術】

登革熱疾病係由黃病毒屬的四種病毒所引起，該四種病毒之血清型類似，但在抗原性方面不同(Gübler等人，1988年於：Epidemiology of arthropod-borne viral disease. Monath TPM，編輯，Boca Raton (FL): CRC Press: 223-60；Kautner等人，1997, J. of Pediatrics, 131: 516-524；Rigau-Pérez等人，1998, Lancet；352: 971-977；Vaughn等人，1997, J Infect Dis；176: 322-30)。感染登革熱血清型可產生非特異性病毒症候群至致死性嚴重出血熱疾病之臨床疾病譜。蚊子叮咬後登革熱之潛伏期大約為4天(在3至14天範圍內)。登革

熱特徵為雙相熱、頭痛、身體多個部位疼痛、衰竭、出疹、淋巴結病及白血球減少(Kautner等人，1997, *J. of Pediatrics*, 131: 516-524；Rigau-Pérez等人，1998, *Lancet*；352: 971-977)。病毒血症期與發熱期相同(Vaughn等人，1997, *J. Infect. Dis*；176: 322-30)。自登革熱恢復發生於7至10天之後，但常會有後遺虛弱。常見白細胞及血小板數降低。

出血性登革熱係嚴重的發熱疾病，其特徵為內環境穩定異常及血管滲透性增加，此可導致血容量不足及高血壓(登革熱伴隨休克症候群)，並常因嚴重內出血而複雜化。若不治療，出血性登革熱之死亡率可達到10%，但在有治療經驗之大部分中心死亡率為1%(WHO technical Guide, 1986. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control*, p1-2. World Health Organization, Geneva, Switzerland)。

登革熱常規實驗室診斷係基於分離病毒及/或檢測登革熱病毒特异性抗體。

登革熱係瘧疾之後的第二最常見的熱帶感染性疾病，有超過一半的世界人口居住於有傳染病傳播風險之地區。每年，估計登革熱病例為5千萬-1億，出血性登革熱住院患者病例為50萬，且死亡數為2.5萬。登革熱係亞洲、太平洋地區、非洲、拉丁美洲及加勒比海的地方病。超過100個熱帶國家有地方性登革熱病毒感染，且在該等國家中有60個具有出血性登革熱記錄(Gubler, 2002, *TRENDS in Microbiology*. 10:100-103; Monath, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 91: 2395-2400)。一些詳細闡釋的因素顯示與登革熱有關：人口增長；無計劃及無控制的城市化，尤其與貧窮伴隨；空中旅行增加；對蚊子缺乏有效控制及衛生基礎設施與公共健康惡化(Gubler, 2002, *TRENDS in Microbiology*. 10:100-103)。越來越多旅行及移居國外的個人被警告患有登革熱(Shirtcliffe等人，1998, *J. Roy. Coll. Phys. Lond.*; 32:

235-237)。在美國部隊部署於有地方性登革熱之熱帶地區期間登革熱已成為美國部隊中發熱性疾病的一個主要原因(DeFraites等人，1994, MMWR 1994; 43: 845-848)。

病毒維持於涉及人類與埃及伊蚊(一種在白天咬人的家蚊，且其喜歡依靠人類維持生命)之循環中。當受感染之埃及伊蚊吸食血液時，藉由注射病毒開始感染人類。唾液中之病毒主要停留於血管外組織中。接種後首先被感染之細胞種類係樹突細胞，其隨後轉移至淋巴結(Wu等人，2000, *Nature Med.*; 7:816-820)。在皮膚及淋巴結中起始複製後，在急性發熱期間病毒在血液中一般出現3至5天。

單核細胞及巨噬細胞連同樹突細胞皆屬於登革熱病毒之首選靶標。對抗同型再感染之保護係完全的且可能持續一生，但各種登革熱類型間之交叉保護持續時間少於數周至數月(Sabin, 1952, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 1: 30-50)。因此，個體可能受不同血清型之感染。理論上，二次感染登革熱係發生嚴重登革熱疾病之風險因素。然而，出血性登革熱與多種因素相關：該等因素包括所涉及之病毒株，亦及患者之年齡、免疫狀態及遺傳性素因。兩種因素在出血性登革熱發生中起主要作用：病毒快速複製併發高病毒血症(疾病之嚴重程度與病毒血症之水平相關；Vaughn等人，2000, *J. Inf. Dis.*; 181: 2-9)及大量炎症性反應並釋放高水平炎性介質(Rothman and Ennis, 1999, *Virology*; 257: 1-6)。對抗登革熱無專一療法。用於登革熱之治療係針對症狀之強制臥床、以退熱劑及止痛劑控制發燒及疼痛、及攝入足夠流體。用於出血性登革熱之治療需平衡流體流失、置換凝血因子並輸注肝素。

目前之預防措施係基於控制載體並採取個體預防步驟，此不易實施且花費昂貴。當前尚無對抗登革熱之疫苗獲得批准。鑒於此四種登革熱血清型在世界上之傳播且因為已報道其與登革熱出血性發燒病例相關，因此免疫應能理想地賦予對抗登革熱病毒之四種血清型之保

護作用。

用於投予登革熱病毒之不同解剖部位之用途已在文獻中得以闡述。

因此，Halstead等人(1973, Am. J. Trop. Med. Hyg., 22:375-381)已展示在2個或4個不同的解剖部位針對4種不同血清型投予野生型登革熱病毒可誘發對抗後續感染之保護。然而，作者觀察到與在單一部位實施免疫相比，此類分離免疫並無優越性。

當以四價疫苗形式投予時，登革熱病毒之減毒病毒形式在人體內可導致干擾。此現象具體闡述於以下公開案中：Gubler D.J. Clin. Microbiol. Rev. 1998; 11 (3):480-96; Rothman A.L.等人，Vaccine 2001; 19:4694-9。

Zhou H與Deem MW. (Vaccine. 2006 Mar 24; 24(14): 2451-9)已開發一種僅基於使用CD8抗原決定部位之數學模型且目的在於模擬在4種登革熱血清型之CD8抗原決定部位間之干擾。根據該理論模型，避免干擾之最佳途徑係使用次要CD8抗原決定部位實施首次免疫，然後藉由在不同解剖部位投予4種血清型中每一種之相同的CD8抗原決定部位加強免疫。

因此，需要一種用於減少各種血清型間之干擾並用於誘導對抗此4種登革熱血清型之中和抗體的方法。

【發明內容】

發明人已證明可能產生可中和4種血清型之抗體的同源免疫反應，其中該等4種血清型係分別成對地在不同解剖部位投予第一系列，並隨後在第一次投予4種血清型後30天至12個月實施之第二系列投予。

發明人已特別證明，在兩個不同解剖部位同時進行DEN-1,2二價免疫與DEN-3,4二價免疫，且隨後在相同條件下以相同疫苗劑進行加

強免疫，可在經免疫之所有猴中誘發對抗此四種血清型之高度反應(除在一隻動物中之一種血清型外)。相反地，在單一部位實施四價免疫可能僅可對4種血清型中之兩種誘發令人滿意的反應。

因此，根據本發明方法產生之免疫反應在量及質上更強(涵蓋所有血清型)。

根據第一個目標，因此本發明係關於一種用於在患者中誘發對抗4種登革熱血清型之同源保護力的方法，其包括

(a)第一系列投予(i)一次劑量之第一種血清型之疫苗用登革熱病毒及一劑第二種血清型之疫苗用登革熱病毒；及(ii)一劑第三種血清型之疫苗用登革熱病毒及一劑第四種血清型之疫苗用登革熱病毒，及

(b)第二系列投予(i)及(ii)劑，其中(i)及(ii)劑係在不同解剖部位同時投予，且

其中第二系列係在第一系列之後至少30天至最多12個月實施。

根據本發明方法之另一實施例，疫苗用登革熱病毒(i)係以單一的二價疫苗劑量形式投予。

根據本發明方法之另一實施例，疫苗用登革熱病毒(ii)係以單一的二價疫苗劑量形式投予。

根據本發明免疫方法之一特定實施例，該疫苗用登革熱病毒血清型1係選自由VDV1株與Chimerivax™ DEN-1組成之群。

根據本發明方法之另一特定實施例，該疫苗用登革熱病毒血清型2係選自由VDV2株與Chimerivax™ DEN-2組成之群。

根據本發明方法之另一特定實施例，該疫苗用登革熱病毒血清型1係VDV1株，且該疫苗用登革熱病毒血清型2係VDV2株。

根據本發明方法之另一特定實施例，該疫苗用登革熱病毒血清型1係Chimerivax™ DEN-1，且該疫苗用登革熱病毒血清型2係Chimerivax™ DEN-2。

根據本發明方法之另一特定實施例，該疫苗用登革熱病毒血清型3係Chimerivax™ DEN-3。

根據本發明方法之另一特定實施例，該疫苗用登革熱病毒血清型4係Chimerivax™ DEN-4。

根據本發明方法之另一特定實施例，第一及第二種血清型分別係CYD DEN-1及CYD DEN-2，且第三及第四種血清型分別係CYD DEN-3及CYD DEN-4。

根據本發明方法之另一特定實施例，第一及第二種血清型分別係CYD DEN-1及CYD DEN-3，且第三及第四種血清型分別係CYD DEN-2及CYD DEN-4。

根據本發明方法之另一特定實施例，疫苗用登革熱病毒血清型1、2、3及4之量為 10^3 至 10^6 CCID₅₀之範圍。

根據本發明方法之另一特定實施例，用於第二系列投予之疫苗用病毒與用於第一系列投予之彼等相同。

根據本發明方法之另一特定實施例，第二系列投予係在第一系列投予之後30至60天實施。

本發明之標的亦係用於對抗登革熱病毒之免疫套組，其包括一盒，該盒至少包含疫苗用登革熱病毒血清型1、2、3及4，該盒係：

- (a) 呈包含單價組合物之4個分離容器之形式，或
- (b) 呈包含兩種二價組合物之2個分離容器之形式。

根據一實施例，本發明之套組至少包括：

(a) 包含二價疫苗(包括Chimerivax™ DEN-1及Chimerivax™ DEN-2)之第一容器，及

(b) 包含二價疫苗(包括Chimerivax™ DEN-3及Chimerivax™ DEN-4)之第二容器。

根據另一實施例，本發明之套組包括至少：

(a) 包含二價疫苗(包括 Chimerivax™ DEN-1 及 Chimerivax™ DEN-3)之第一容器，及

(b) 包含二價疫苗(包括 Chimerivax™ DEN-2 及 Chimerivax™ DEN-4)之第二容器。

本發明之一標的亦係用於對抗登革熱病毒之免疫套組，其包括一盒，該盒至少包含第一種血清型及第二種血清型之疫苗用登革熱病毒，其係：

(a) 呈包含於2個分離容器中之2種單價組合物之形式，或

(b) 呈包含於1個單一容器中之二價組合物形式。

根據另一實施例，該套組包括至少：

(a) 包含二價疫苗(包括 Chimerivax™ DEN-1 及 Chimerivax™ DEN-3)之容器，或

(b) 包含二價疫苗(包括 Chimerivax™ DEN-2 及 Chimerivax™ DEN-4)之容器，或

(c) 包含二價疫苗(包括 Chimerivax™ DEN-1 及 Chimerivax™ DEN-2)之容器，或

(d) 包含二價疫苗(包括 Chimerivax™ DEN-3 及 Chimerivax™ DEN-4)之容器。

本發明亦提供包括免疫有效量之第一種血清型與第二種血清型之登革熱疫苗用病毒及醫藥上可接受之賦形劑的二價組合物或二價疫苗。

根據一具體實施例，該二價組合物或疫苗包含選自由以下組成之群的疫苗用病毒：Chimerivax™ DEN-1與Chimerivax™ DEN-3；或Chimerivax™ DEN-2與Chimerivax™ DEN-4；或Chimerivax™ DEN-1與Chimerivax™ DEN-2；或Chimerivax™ DEN-3與Chimerivax™ DEN-4。

隨後敘述將對本發明進行更詳細地闡述。

定義

在本發明上下文中，若兩個解剖部位之液體流向不同的淋巴結，則其係"不同的"。舉例而言，認為右臂與左臂是不同的部位。以下不同部位亦作為非限制性實例提及：右臂/右大腿；左臂/左大腿；左臂/右大腿。

在本發明上下文中，術語"同時投予"意欲指在同一天內實施投予(亦即最多24小時)。較佳以至多1小時間隔同時實施投予，通常間隔1-5分鐘。

在本發明上下文中，劑量(i)係以兩種單價劑量之形式或以單獨二價劑量之形式在第一解剖部位投予。劑量(ii)(其部分)係以兩種單價劑量之形式或以單獨二價劑量之形式在第二解剖部位同時投予，且第一及第二部位係上文所定義之不同部位。

"登革熱病毒"或"DEN"係屬於黃病毒科黃病毒屬之正鏈、單鏈RNA病毒。基因組RNA在5'端包含I型帽子結構但在3'端缺少多聚A尾。基因組結構由以下組件組成：5'非編碼區(NCR)、結構蛋白(衣殼蛋白(C)、早期膜/膜(prM/M)、包膜(E))及非結構蛋白(NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5)、及3' NCR。基因組病毒RNA與衣殼蛋白相連從而形成核衣殼。如同其他黃病毒，DEN病毒基因組編碼被轉譯成單一聚蛋白之不間斷編碼區。

在本發明上下文中，術語"疫苗用登革熱病毒"意欲指可誘發特定同源免疫反應之任一病毒形式的登革熱病毒，較佳係可用於在人類中對抗登革熱病毒感染之免疫程序之上下文中之任一病毒形式的登革熱病毒。因此，術語"疫苗用登革熱病毒"意欲指滅活病毒、減毒病毒、諸如登革熱病毒包膜蛋白等重組蛋白。

若一疫苗病毒在許可細胞內不再複製，則認為該疫苗病毒係"滅

活的"。

若一疫苗病毒在37°C或39°C下在Huh-7、VERO及/或C6/36肝細胞中生長後，該疫苗病毒之最大滴度較野生型親代株在相同培養條件下及使用滴度測定方法量測所獲得之最大滴度小至少10倍，則認為該疫苗病毒係"減毒的"。因此，在本發明之上下文中，在上文確定的三種細胞類型之至少一種中展示生長減弱之疫苗病毒被認為係"減毒的"。

可用於人類之疫苗病毒具有正的效益/風險比，該比例一般能滿足用於獲得市場許可之監管要求。用於本發明範圍之疫苗用登革熱病毒較佳係減毒病毒，以使其不會在人類中誘發疾病。較佳地，該疫苗病毒在大部分受免疫個體中僅產生至多為中等強度(亦即中等至較弱、或幾乎為零)之副作用，但同時保留其誘發中和抗體反應之能力。

作為在本發明上下文中可用之疫苗用登革熱病毒之非限制性實例可提及：滅活疫苗病毒、減毒疫苗病毒，例如減毒株VDV-1或VDV-2、闡述於(例如)申請案WO 02/66621、WO 0057904、WO 0057908、WO 0057909；WO 0057910、WO 02/0950075及WO 02/102828中之病毒株或嵌合體。嵌合體病毒具有具上文所定義之減毒病毒特徵之特殊性。因此，任一可表現登革熱病毒包膜蛋白並可誘發包括可中和係包膜蛋白來源之血清型的免疫反應之嵌合體病毒均可於本發明上下文中使用。作為非限制性實例，可提及：如闡述於(例如)專利申請案WO 98/37911中之登革熱Chimerivax™產品，及如闡述於(例如)專利申請案WO 9640933及WO 0160847中之登革熱/登革熱嵌合體。疫苗用登革熱病毒血清型1可係(例如)VDV1疫苗株或Chimerivax™ DEN-1，具體而言係YF17D/DEN-1病毒，或16007/PDK13 DEN-1株。疫苗用登革熱病毒血清型2可係(例如)VDV2疫苗株或Chimerivax™ DEN-2，具體而言係YF17D/DEN-2病毒，或

16681/PDK53 DEN-2株。疫苗用登革熱病毒血清型3可係Chimerivax™ DEN-3，具體而言係YF17D/DEN-3病毒。疫苗用登革熱病毒血清型4可係Chimerivax™ DEN-4，具體而言係YF17D/DEN-4病毒。該株以Mahidol大學之名義闡述於專利申請案EP 1159968中且以編號I-2483保存於Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) [國家微生物培養物保存中心]。

"VDV"或"Vero登革熱疫苗"表示在Vero細胞中生長的且能誘發特定體液反應(包括在哺乳動物且尤其在人類中誘發中和抗體)之活減毒登革熱病毒株。

"VDV-1"係獲自野生型株DEN-1 16007的病毒株(DEN-1 16007/PDK11)，其在PDK細胞中經歷11次傳代，然後於32°C下在Vero細胞中對其實施擴增，純化其RNA並轉染入Vero細胞。VDV-1株與疫苗株DEN-1 16007/PDK13(在PDK-原代狗腎(Primary Dog Kidney)-細胞中經13次傳代)相比具有14個額外的突變。DEN-1 16007/PDK13株(亦稱為"LAV1")以Mahidol大學之名義闡述於專利申請案EP 1159968中並以編號I-2480保存於Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM)。VDV-1株之完整序列在序列SEQ ID NO:1中給出。該病毒株可容易地自該序列複製。VDV-1株之製備方法及鑒定已闡述於以Sanofi-Pasteur及以疾病預防與控制中心之名義申請的國際專利申請案(編號PCT/IB 2006/001313)中。

"VDV-2"係獲自野生型株DEN-2 16681之病毒株(DEN-2 16681/PDK50)，其在PDK細胞中經過50次傳代、及噬斑純化、及對其RNA實施提取及純化、隨後轉染入Vero細胞中。隨後在Vero細胞中藉由噬菌斑純化及擴增獲得VDV-2。VDV-2株與疫苗株DEN-2 16681/PDK53(在PDK細胞中經過53次傳代)相比具有10個額外突變，其中4個係沉默突變。DEN-2 16681/PDK53株(亦稱為"LAV2")以

Mahidol大學之名義闡述於專利申請案EP 1159968中並以編號I-2481保存於Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM)。VDV-2株之完整序列展示於序列SEQ ID NO:2中。VDV-2株可容易地自該序列複製。VDV-2株之製備及鑒定方法已闡述於以Sanofi-Pasteur及以疾病預防與控制中心之名義申請的國際專利申請案(編號PCT/IB 2006/001513)中。

VDV 1及2株係藉由在Vero細胞中擴增製備。收穫所產生之病毒並針對細胞碎屑藉由過濾對其實施純化。藉由酵素處理對DNA實施消化。藉由超濾移除雜質。感染滴度可藉由濃縮法提高。添加穩定劑後，在使用前以凍乾或冷凍形式保存該等病毒株，在使用時就地實施再構成。

術語"ChimeriVax™登革熱"或"CYD"表示包含YF病毒主鏈之嵌合體黃熱(YF)病毒，其中YF病毒主鏈中編碼早期膜及包膜蛋白之序列已由DEN病毒之彼等所取代。因此，術語"CYD-1或CYD DEN1"用於闡述包含登革熱血清型1株(DEN-1)之prM及E序列之嵌合體YF病毒。術語"CYD-2或CYD DEN2"用於闡述包含DEN-2株之prM及E序列之嵌合體YF病毒。術語"CYD-3或CYD DEN3"用於闡述包含DEN-3株之prM及E序列之嵌合體YF病毒。術語"CYD-4或CYD DEN4"用於闡述包含DEN-4株之prM及E序列之嵌合體YF病毒。該等ChimeriVax™登革熱病毒之製備已詳細闡述於國際專利申請案WO 98/37911及WO 03/101397中，對其製備方法之明確闡述可參考該等文獻。闡述於該等實例中之嵌合體係使用源自DEN1 PUO359 (TYP1140)、DEN2 PU0218、DEN3 PaH881/88及DEN4 1288 (TVP 980)株之prM及E序列所產生。在本發明上下文中可用登革熱病毒之任一株來構建嵌合體。

較佳地，嵌合YF病毒包括減毒黃熱株YF17D(Theiler M，及Smith HH (1937) J Exp. Med 65, 第767-786頁)(YF17D/DEN-1、

YF17D/DEN-2、YF17D/DEN-3、YF17D/DEN-4病毒)之主鏈。可使用之 YF17D 株之實例包括 YF17D204 (YF-Vax®, Sanofi-Pasteur, Swifwater, PA, USA ; Stamaril®, Sanofi-Pasteur, Marcy l'Etoile, France ; ARILVAX™, Chiron, Speke, Liverpool, UK ; FLAVIMUN®, Berna Biotech, Bern, Switzerland) ; YF17D-204 France (X15067, X15062) ; YF17D-204,234 US(Rice 等人, 1985, Science, 229:726-733), 或其他相關病毒株 YF17DD (Genbank 登錄號 U17066)、YF17D-213(Genbank 登錄號 U17067)及由 Galler 等人闡述之 YF17DD 株(1998, Vaccines 16(9/10):1024-1028)。於本發明上下文中可使用經減毒用於人類中之任一其他黃熱病毒株來構建嵌合體。

因此，本發明之目標亦係一種二價組合物或疫苗，其包含免疫有效量之第一種血清型疫苗用登革熱病毒及第二種血清型疫苗用登革熱病毒及醫藥上可接受之賦形劑。

對於可用於本發明疫苗中之疫苗病毒之闡述，可參考本發明免疫方法之上下文中所給出之闡述。

根據特定實施例，本發明之二價組合物或疫苗包含 CYD DEN-1 及 CYD DEN-2、或 CYD DEN-3 及 CYD DEN-4、或 CYD DEN-1 及 CYD DEN-3 或 CYD DEN-2 及 CYD DEN-4；較佳地，疫苗病毒在疫苗中以 10^5 CCID₅₀ 之量存在。

各 ChimeriVax™ 單價疫苗用登革熱病毒(血清型 1、2、3 及 4)係藉由在 Vero 細胞中擴增各血清型而製備。更具體而言，該等四種病毒係在無血清培養基中於黏附性 Vero 細胞上分別產生。收穫病毒並藉由過濾實施淨化去除細胞碎屑，且隨後藉由超濾與層析法實施濃縮及純化以去除宿主細胞 DNA。添加穩定劑後，在使用前以冷凍或凍乾形式保存該等疫苗株，在使用時就地實施再構成。相同的方法對於四種嵌合體皆適用。

若劑型、組合物或疫苗除醫藥上可接受之賦形劑外包含單一登革熱病毒血清型，則其係"單價的"。若劑型、組合物或疫苗包含兩種不同的登革熱病毒血清型，則其係"二價的"。若劑型、組合物或疫苗包含三種不同的登革熱病毒血清型，則其係"三價的"。若劑型、組合物或疫苗包含四種不同的登革熱病毒血清型，則其係"四價的"。藉由簡單混合單價組合物可獲得多價組合物。

術語"患者"表示可能受登革熱感染之個體(兒童或成年人)，尤其係有感染風險之個體，例如，在登革熱流行地區旅行之個體或該等地區之居民。因此該術語涵蓋初次感染登革熱病毒之個體且亦涵蓋非初次感染登革熱病毒之個體。

在不同的解剖部位之順次免疫

發明者已特別展示，在不同的解剖部位以同時投予兩種二價疫苗之形式投予4種血清型，隨後在第一系列投予之後30天至12個月時加強免疫可獲得對抗4種血清型之有效的同源保護。因此，本發明之方法在對抗登革熱之免疫策略之上下文中極有價值。

根據本發明，該4種登革熱血清型可以任何順序投予，只要其係同時在不同的部位成對投予(亦即，劑量(i)與(ii)，以兩種單價劑量形式或以單獨二價劑量形式分別投予)。

因此，本發明之方法可以下文闡述之實施例實現：

- (i)血清型1與2；(ii)血清型3與4；或
- (i)血清型1與3；(ii)血清型2與4；或
- (i)血清型1與4；(ii)血清型2與3；或
- (i)血清型2與3；(ii)血清型1與4；或
- (i)血清型2與4；(ii)血清型1與3；或
- (i)血清型3與4；(ii)血清型1與2。

較佳地，本發明之方法包括投予以下疫苗用登革熱病毒：(i)血

清型1與2；(ii)血清型3與4或(i)血清型1與3；(ii)血清型2與4。劑量(i)及(ii)較佳係二價劑量形式。

因此，根據特定實施例，本發明涵蓋以下方案：

- (i) CYD DEN-1與CYD DEN-2；(ii) CYD DEN-3與CYD DEN-4
- (i) CYD DEN-1與CYD DEN-3；(ii) CYD DEN-2與CYD DEN-4
- (i) CYD DEN-1與CYD DEN-4；(ii) CYD DEN-2與CYD DEN-3
- (i) CYD DEN-2與CYD DEN-3；(ii) CYD DEN-1與CYD DEN-4
- (i) CYD DEN-2與CYD DEN-4；(ii) CYD DEN-2與CYD DEN-3
- (i) CYD DEN-3與CYD DEN-4；(ii) CYD DEN-1與CYD DEN-2
- (i) VDV-1與CYD DEN-2；(ii) CYD DEN-3與CYD DEN-4
- (i) VDV-1與CYD DEN-3；(ii) CYD DEN-2與CYD DEN-4
- (i) VDV-1與CYD DEN-4；(ii) CYD DEN-2與CYD DEN-3
- (i) CYD DEN-2與CYD DEN-3；(ii) VDV-1與CYD DEN-4
- (i) CYD DEN-2與CYD DEN-4；(ii) VDV-1與CYD DEN-3
- (i) CYD DEN-3與CYD DEN-4；(ii) VDV-1與CYD DEN-2
- (i) CYD DEN-1與VDV-2；(ii) CYD DEN-3與CYD DEN-4
- (i) CYD DEN-1與CYD DEN-3；(ii) VDV-2與CYD DEN-4
- (i) CYD DEN-1與CYD DEN-4；(ii) VDV-2與CYD DEN-3
- (i) VDV-2與CYD DEN-3；(ii) CYD DEN-1與CYD DEN-4
- (i) VDV-2與CYD DEN-4；(ii) CYD DEN-1與CYD DEN-3
- (i) CYD DEN-3與CYD DEN-4；(ii) CYD DEN-1與VDV-2
- (i) VDV-1與VDV-2；(ii) CYD DEN-3與CYD DEN-4
- (i) VDV-1與CYD DEN-3；(ii) VDV-2與CYD DEN-4
- (i) VDV-1與CYD DEN-4；(ii) VDV-2與CYD DEN-3
- (i) VDV-2與CYD DEN-3；(ii) VDV-1與CYD DEN-4
- (i) VDV-2與CYD DEN-4；(ii) VDV-1與CYD DEN-3及

-(i) CYD DEN-3與CYD DEN-4；(ii) VDV-1與VDV-2。

較佳地，本發明之免疫方法包括投予以下疫苗用登革熱病毒：

(i) CYD DEN-1與CYD DEN 2；(ii) CYD DEN-3與CYD DEN-4；或(i) CYD DEN-1與CYD DEN-3；(ii) CYD DEN-2與CYD DEN-4。劑量(i)及(ii)較佳係二價劑量形式。

本發明之免疫方法包括在第一系列投予(i及ii)之後自30天至12個月、較佳地30天至3個月、較佳地30天、45天或60天時實施第二系列投予，且第二系列投予較佳地包括投予與用於第一系列中之彼等相同的組合物，且較佳地在相同條件下投予。

在本發明範圍內，術語"疫苗病毒劑量"意欲指包括"免疫有效量"(亦即足以誘發同源中和抗體反應之登革熱病毒之量，其可(例如)藉由下文闡述於實例1中之血清中和測試加以證明)之疫苗用登革熱病毒之組合物。當以此種方法檢測之中和抗體滴度大於或等於1:10(單位:1/稀釋度)時，則認為血清存在中和抗體為陽性。

疫苗株數量通常以病毒噬菌斑形成單位(PFU)或以50%組織培養物感染劑量，或以50%細胞培養物感染劑量(CCID₅₀)來表述。舉例而言，對於單價或二價組合物，本發明之組合物可包含10至10⁶ CCID₅₀、具體而言10³至10⁵ CCID₅₀之疫苗用登革熱病毒血清型1、2、3或4。因此，在本發明之組合物或用途中，疫苗用登革熱病毒血清型1、2、3及4之劑量較佳各處於10至10⁶ CCID₅₀之範圍內，例如10、10¹、10²、10³、10⁴、10⁵或10⁶ CCID₅₀，尤其處於10³至10⁵ CCID₅₀之範圍內。可用相同或不同劑量使用疫苗病毒，其可根據所用疫苗病毒之性質及欲獲得免疫反應之強度而進行調節。

根據本發明方法之特定實施例，單價或二價劑量之疫苗病毒分別包括10⁵ CCID₅₀之CYD DEN-1、CYD DEN-2、CYD DEN-3及CYD DEN-4。

中和抗體反應較佳係持續反應，亦即在第二系列投予(i)及(ii)之後至少6個月時可在血清中檢測到中和抗體。

第一種血清型疫苗用登革熱病毒劑量及第二種血清型疫苗用登革熱病毒劑量(亦即劑量(i))係以兩種單價組合物之形式、或較佳地以單獨二價組合物之形式或劑量同時投予。

同樣，第三種血清型疫苗用登革熱病毒劑量及第四種血清型疫苗用登革熱病毒劑量(亦即劑量(ii))係以兩種單價組合物之形式、或較佳以單獨二價疫苗組合物之形式同時投予。

該等疫苗病毒係以疫苗組合物或疫苗病毒劑量之形式投予，該形式可根據彼等熟習此項技術者所瞭解之任一方法製備。通常，將一般呈凍乾形式之病毒與醫藥上可接受之賦形劑(例如水或經磷酸鹽緩衝之鹽溶液、濕潤劑或穩定劑)混合。術語"醫藥上可接受之賦形劑"意欲指不會在人類或動物中產生副反應(例如過敏反應)之任一溶劑、分散介質、填料等。根據所選醫藥形式、及投予方法與路徑來選擇賦形劑。關於醫藥調配物之適宜的賦形劑及要求闡述於"Remington: The Science & Practice of Pharmacy"中，其係本領域的參考著作。

較佳地，該疫苗組合物以可注射形式製備，且可對應於液態溶液、懸浮液或乳液。該等組合物具體而言可包括經緩衝之水性溶液以保持介於約6與9之間之pH值(在環境溫度下以pH儀測定)。

雖然不必添加佐劑，但該等組合物仍不能包含此類化合物：即可提高、激發或加強同時投予之疫苗株所誘發之細胞或體液免疫反應的物質。熟習此項技術者能自疫苗領域內之習用佐劑中選擇可適用於本發明上下文中之佐劑。

本發明之疫苗組合物可根據通常用於免疫中之任一途徑投予，例如非經腸(具體而言係皮內、皮下或肌內)投予，較佳經皮下投予。較佳地，疫苗組合物係可在左三角肌及右三角肌區域經皮下投予之可

注射的組合物。

投予組合物之體積端視投予途徑而定。對於經皮下注射，體積一般介於0.1與1.0毫升之間，較佳大約0.5毫升。

投予所有血清型1至4之最佳時期係在暴露於登革熱病毒前大約1至3個月。該等疫苗可在成年人及兒童中作為登革熱病毒感染之預防治療投予。因此目標人群包括對登革熱病毒初次感染(亦即先前未經免疫)或非初次感染之個體。

亦可(例如)在給予根據本發明第二系列投予後介於6個月與10年之間，例如6個月、1年、3年、5年或10年時實施疫苗用登革熱病毒血清型1至4之加強投予。加強投予較佳使用與第1及第2系列投予所用之彼等相同的疫苗組合物(亦即相同疫苗病毒)且較佳地在相同投予條件下(解剖部位及投予途徑)實施。

干擾現象可藉由一種或多種血清型相對於其他血清型之優勢進行解釋，且因此不依賴於用於製造候選疫苗(例如VDV或chimerivax)之技術。因此，本發明之方法一般可施用於任一疫苗用登革熱病毒。

因此，本發明之一目標亦係疫苗用登革熱病毒之劑量於製備用於誘發對抗該4種登革熱血清型之保護作用之疫苗中之用途，其包括：

(a) 第一系列投予(i)一次劑量之第一種血清型之疫苗用登革熱病毒及一次劑量之第二種血清型之疫苗用登革熱病毒；及(ii)一次劑量之第三種血清型之疫苗用登革熱病毒及一次劑量之第四種血清型之疫苗用登革熱病毒，及

(b) 第二系列投予劑量(i)及(ii)，

其中劑量(i)及(ii)係在不同的解剖部位同時投予，且

其中該第二系列係在第一系列之後至少30天至至多12個月時實施。

對於可用於本發明上下文中之疫苗用登革熱病毒之闡述，可參照關於本發明免疫方法所給出之闡述。

本發明之一目標亦係一用於對抗四種登革熱病毒血清型之套組。本發明套組包括上文關於所建議之免疫方法所定義的劑量。因此，本發明之套組包括一盒，其含有各種包含疫苗劑之容器且較佳含有包含用於投予該等疫苗之信息的用法說明頁。

根據一實施例，本發明套組包括一盒，該盒至少包含疫苗用登革熱病毒血清型1、2、3及4：

- (a) 呈包含於4個分離容器中之單價組合物形式，或
- (b) 以包含於2個分離容器中之兩種二價組合物形式。

根據另一實施例，本發明之套組包括一盒，該盒至少包含第一種血清型及第二種血清型之疫苗用登革熱病毒：

- (a) 呈包含於2個分離容器中之2種單價組合物之形式，或
- (b) 呈包含於1個容器中之二價組合物形式。

對可用於本發明套組中之疫苗用登革熱病毒之闡述，可參照上文關於本發明免疫方法所給出之對疫苗病毒的闡述。

因此，根據一特定實施例，本發明之套組至少包括：

- (a) 包含二價疫苗(包括 Chimerivax™ DEN-1 及 Chimerivax™ DEN-2)之第一容器，及
- (b) 包含二價疫苗(包括 Chimerivax™ DEN-3 及 Chimerivax™ DEN-4)之第二容器。

根據另一實施例，本發明之套組包括至少：

- (a) 包含二價疫苗(包括 Chimerivax™ DEN-1 及 Chimerivax™ DEN-3)之第一容器，及
- (b) 包含二價疫苗(包括 Chimerivax™ DEN-2 及 Chimerivax™ DEN-4)之第二容器。

根據另一實施例，本發明之套組包括至少：

- (a) 包含二價疫苗(包括 Chimerivax™ DEN-1 及 Chimerivax™ DEN-3)之容器，或
- (b) 包含二價疫苗(包括 Chimerivax™ DEN-2 及 Chimerivax™ DEN-4)之容器，或
- (c) 包含二價疫苗(包括 Chimerivax™ DEN-1 及 Chimerivax™ DEN-2)之容器，或
- (d) 包含二價疫苗(包括 Chimerivax™ DEN-3 及 Chimerivax™ DEN-4)之容器。

本發明之套組可包含上述容器之單一實例或數個實例。

若所用疫苗係凍乾形式，則該套組較佳包含至少一個含有用於對可注射疫苗劑量進行再構成之稀釋劑的附加容器。可使用任一醫藥上可接受之稀釋劑達此目的，通常係用水或經磷酸鹽緩衝之水性溶液。

【實施方式】

藉由下列實例闡明本發明。

實例

實例1：藉由在不同的解剖部位同時注射兩種二價組合物在猴中免疫

在猴模型中測試病毒血症及免疫原性。尤其認為病毒血症係在人類中與毒力及疾病嚴重程度相關的因素之一，且因此成為擬加以考慮之重要參數。免疫原性(對於其部分)在對所賦予保護作用進行評估之上下文中係主要參數。

1.1 材料及方法：

在猴中之實驗係根據歐洲關於動物實驗導則實施。在來源於毛利塔尼亞之獼猴(食蟹猴(*Macaca fascicularis*))中實施免疫。在免疫前對猴實施六周防疫隔離。

用0.5毫升疫苗組合物在臂上經皮下對猴進行免疫。以氫胺酮(Imalgene, Merial)輕微麻醉後，藉由穿刺自腹股溝靜脈或隱靜脈收集血液。在每次免疫之後第0天及第28天，取樣5毫升血液以評估抗體反應，但在第2天至第10天之間，取樣1毫升血液以評估病毒血症。在冰上收集血液並保存於冰上直至血清分離。為達此目的，將血液在4℃下離心20分鐘並將收集之血清保存於-80℃下直至進行測試。

病毒血症之量測

藉由定量實時RP-PCR (qRT-PCR)監測疫苗接種後病毒血症。使用定位於DEN1與DEN2株之NS5基因中的兩套引物及探針來分別對VDV-1 RNA與VDV-2 RNA進行定量。使用定位於YF病毒之NS5基因中的第三套2引物及1探針來對CYD RNA進行定量。最後，使用定位於E (DEN)/NS1 (YF)基因連接處的對各種CYD血清型特異的4套引物及探針來對YF NS5 RNA呈陽性之樣品中的血清型進行鑒定(參見表I)。對7種在T7啟動子控制下並含有各PCR靶向區域的質粒實施體外轉錄以產生一系列可納入各RT-PCR測定法中作為內標之合成的RNA。藉由分光光度測定法測定該等合成的RNA，並將所獲得RNA量轉換成RNA拷貝數並表示為GEQ(基因組同等物)。

使用Macherey Nagel "Nucleospin 96 virusTM" RNA提取套組根據生產商說明書對0.140毫升猴血清實施提取，並隨後用0.140毫升(先0.090毫升，再0.05毫升)不含RNase的水對經純化的RNA實施洗脫。為避免重複冷凍/融化循環，在提取之後立即對5微升該RNA製備物實施第一次定量。剩餘體積於70℃下實施凍結。

除"Qiagen QauntitectTM探針" RT-PCR定量套組(Qiagen)之組份外，反應混合物亦包含10皮莫耳各引物、4皮莫耳各探針及5微升RNA，總體積為25微升。倘若係待測RNA，則將5微升經純化的製備物不經先前稀釋步驟而直接加入反應混合物中。用不含RNase的水將

合成的RNA稀釋至1/10，並對在5微升中包含大約 10 至 10^6 GEQ的7份稀釋物進行平行定量以產生標準曲線。

在Applied Biosystem ABIPrism 700™裝置中使用以下程序實施定量反應：50°C /30分鐘、95°C /15分鐘，隨後40個95°C /15秒-60°C /60秒循環。

根據PCR之目標(標準偏差： $\pm 0.3 \log_{10}$)，在該測試中病毒RNA之定量限為2.9至3.3 $\log_{10}$ GEQ/毫升(800至2000 GEQ/毫升；4至10 GEQ/反應)。

在測定同時，藉由對添加有已知量用於免疫之病毒感染粒子(CYD或VDV)的0.140毫升陰性猴血清樣品(DO)進行分析建立感染滴度與病毒RNA定量之間的相關性。以在5微升中包含約1 PFU與約100 PFU(分別為2.3與4.3 $\log_{10}$ PFU/毫升)之2種稀釋度製備該等對照血清。

在該等實例所用測試中，GEQ與PFU間之相關性如下：對YF或CYD呈陽性血清之GEQ/PFU比率為2.7 $\log_{10}$ (即：1 PFU=500 GEQ)。對於VDV1或VDV2呈陽性血清之GEQ/PFU比率為2.5 $\log_{10}$ (即：1 PFU=320 GEQ)。

對於qRT-PCR YF及CYD，定量限為 $< 3.3 \log_{10}$ GEQ/毫升(即： < 4 PFU/毫升)且對於qRT-PCR VDV1及VDV2，為 $< 2.9 \log_{10}$ GEQ/毫升(亦即： < 2.5 PFU/毫升)。

所使用之引物及探針於下表1中給出，其中按順序列出用於各測定中之正義與反義引物及探針。

表1

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

中和抗體之量測(血清中和測試)(SN50)

通常，使用PRNT50(50% PFU數量減少中和測試法)建立登革熱抗體量測。由於該測試很費力且使用許多材料，因此吾人研發了SN50測試，其係基於在CCID50測試中所量測之單元數50%減少。

在96孔板中，將0.120毫升各去補體血清添加至每孔0.480毫升稀釋劑(ISCove 4% FCS)中。藉由將0.150毫升血清轉移至0.450毫升稀釋劑中製備6倍系列稀釋物。將450微升2.7 log₁₀ CCID50/毫升之有效稀釋物添加至各孔中以獲得25 CCID50/孔。將板在37℃下培育1小時。隨後將0.1毫升各稀釋物分散至96孔板的6個孔中，在開始實驗之前3天時已將存於包含4% FCS之ISCove培養基中的VERO細胞以密度8000細胞/孔接種於該96孔板中。在37℃下培育6天後，在5% CO₂存在下，將細胞用乙醇/丙酮(70/30)混合物於4℃下固定15分鐘，且隨後以PBS洗滌3次並在0.05毫升1/2000之抗黃病毒單株抗體(mAb 4G2)稀釋物存在下於37℃下培育1小時。然後將板洗滌兩次並在0.05毫升1/1000

之鹼性磷酸鹽結合的抗鼠IgG稀釋物存在下於37℃中培育1小時。藉由添加0.05毫升有色基質BCIP/NBT可顯現溶解斑。使用下面所定義之Karber公式計算中和抗體滴度：

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

其中：

d代表導致100%中和(亦即6個陰性複製品，即顯示無感染跡象之複製品)之稀釋度

f:代表以 $\log_{10}$ 表示的稀釋因子(例如稀釋因子為1:4，則 $f=0.6$)

N:代表複製品數/稀釋度($N=6$)

X:顯示無感染跡象之總孔數，除稀釋度d外

病毒檢測限為10 SN50(亦即 $1.0 \log_{10} \text{SN50}$)。

用於中和的病毒株係DEN1 16007、DEN2 16681、DEN3 16562或DEN4 1036株。

將起始病毒稀釋物重新滴定作為對照。

SN50測試中所量測之中和滴度與在PRNT50測試中通常量測之中和滴度間之相關性為： $\log_{10} \text{PRNT50} = \log_{10} \text{SN50} + 0.2$ 。

藉由計算以線性值表示的該滴度之幾何平均值來建立平均滴度(GMT)；通常為滴度小於檢測閾之樣品指定一個等於該閾值一半之值。

1.2 順序免疫之評估

對2組4只年齡及體重相等之猴實施免疫(參見表2)。

使用23G1針管，在臂上經皮下以一次劑量 10^5 CCID₅₀之CYD DEN 1至4疫苗之各血清型實施免疫。

表2：該等組之組成及免疫方案

猴		
組	免疫	
	D0	D58
1	CYD-1,2在一隻臂中 CYD-3,4在另一隻臂中	CYD-1,2在一隻臂中 CYD-3,4在另一隻臂中
2	CYD-1,2,3,4	CYD-1,2,3,4

一次免疫(D28)及兩次免疫(D86)後所得之免疫原性結果於表3中
給出。

病毒血癥結果於表4中給出。

表3：SN50中和滴度(單位1/稀釋度)

猴											
組	ID	免疫		D+28				D58+28			
		D0	D58	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4
2001	AP545	CYD-1,2在一隻臂中 CYD-3,4在另一隻臂中	CYD-1,2在一隻臂中 CYD-3,4在另一隻臂中	20	25	-	50	40	50	-	319
	AO949			20	-	-	20	319	20	13	100
	AP335			20	-	-	252	100	16	10	200
	AP817			20	16	32	40	319	25	32	402
	幾何平均值			20	10	8	56	142	25	12	225
2402	AP676	CYD-1,2,3,4	CYD-1,2,3,4	63	-	-	126	100	-	-	40
	AQ005			25	-	-	63	50	-	-	63
	AP961			50	-	-	158	80	-	80	400
	AN073AQ163			63	-	-	40	100	-	16	252
	幾何平均值			47	<10	<10	84	80	<10	13	126

-:滴度<10

表4：病毒血症分析(單位：log₁₀ GEQ/毫升)

組	猴	初次免疫								加強免疫							
		D2	D3	D4	D6	D7	D8	D9	D10	D58	D59	D62	D63	D64	D65	D66	
1 CYD-1,2+CYD- 3,4	AP545	3.17	-	-	-	3.12	3.67	4.55	4.59	-	-	-	-	-	-	-	
	AO949	3.93	3.66	3.34	4.57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	AP335	3.36	3.06	3.34	3.83	4.05	4.41	4.24	3.64	-	-	-	-	-	-	-	
	AP817		3.99	3.61	-	-	-	-	2.89	-	-	-	-	-	-	-	
2 CYD-1,2,3,4 1點注射	AP676	-	-	-	-	-	-	3.65	-	-	-	-	-	-	-	-	
	AQ005	3.19	-	3.35	-	-	-	-	3.41	-	-	-	-	-	-	-	
	AP961	-	-	-	-	3.86	3.42	3.29	3.56	-	-	-	-	-	-	-	
	AQ163	3.18	3.16	-	3.30	3.60	2.95	3.00	-	-	-	-	-	-	-	-	

血清型

CYD1
CYD2
CYD3
CYD4




簡言之，該等結果可總結如下：

- 本發明之投予方案能夠定性及定量地增強同源中和抗體反應，該反應以四價免疫獲得。
- 隨CYD-3,4在不同的解剖部位同時實施二價免疫CYD-1,2，經加強免疫後可在所有猴中誘發對抗四種血清型之同源反應，僅在一隻動物中血清型3例外。
- 而且，針對血清型1與4之反應在同時進行二價免疫時往往高於在單一部位進行之四價免疫。
- 病毒血症(表4)主要係由CYD-4所導致，不論其係同時進行二價投予還是四價投予之後。因此，從中可推斷分離血清型不會促進血清型1、2及3病毒血症發生。

因此，實例展示本發明之免疫方法可改進疫苗用登革熱病毒之免疫原性而不會損害後者之安全性。

實例2 在猴中藉由在不同的解剖部位同時注射兩種二價組合物CYD-1,4與CYD-2,3之免疫

如實例1中，在猴模型中測試病毒血症與免疫原性。在本實例中，所測試之二價組合物分別包含最大免疫原性的疫苗病毒(CYD-1,4)及最小免疫原性的疫苗病毒(CYD-2,3)。

2.1 材料及方法：與實例1相同

2.2 同時免疫之評估

對2組4只年齡及體重相等之猴實施免疫(參見表5)。

如實例1所闡述實施免疫。

表5：該等組之組成及免疫方案

猴		
組	免疫	
	D0	D58
1	CYD-1,4在一隻臂中 CYD-2,3在另一隻臂中	CYD-1,4在一隻臂中 CYD-2,3在另一隻臂中
2	CYD 1,2,3,4	CYD 1,2,3,4

一次免疫(D28)及兩次免疫(D86)後所得之免疫原性在表6中給出。

病毒血癥結果與在實例1中所獲得之彼等相似，顯示病毒血症由血清型4誘發且兩組間並無顯著差異。



表6：SN50中和滴度(單位1/稀釋度)

猴												
組	ID	免疫		D0				D58				
		D0	D58	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	
1	AR465	CYD 1,2,3,4	CYD 1,2,3,4	63	10	<	100	200	25	10	126	
	AR558			13	<	<	126	401	<	20	160	
	AR559			<	<	<	100	13	<	<	50	
	AR639			25	<	<	318	201	<	<	201	
	幾何平均值			20	<	<	142	119	<	<	119	
2	AR083	CYD 1,4在一隻臂中 CYD 2,3在另一隻臂中	CYD 1,4在一隻臂中 CYD 2,3在另一隻臂中	63	<	<	201	100	16	10	126	
	AR506			63	25	13	638	126	100	32	201	
	AR610			63	20	<	100	159	50	40	253	
	AR644			40	<	<	40	505	80	40	100	
	幾何平均值			56	<	<	150	178	50	27	159	

<:滴度< 10

結果支持實例1中所獲得之彼等並可總結如下：

- 投予方案能夠定性及定量地增強同源中和抗體反應，該反應以四價免疫獲得。

- 隨CYD-2,3在不同的解剖部位同時實施二價免疫CYD-1,4，在加強免疫後可在所有猴中誘發對抗四種血清型之同源反應，如實例1中所見，在習用之四價組中情況並非如此。

- 與實例1中已接受兩種二價CYD-1,2與CYD-3,4的猴組之彼等相比，隨免疫CYD-2,3同時實施二價免疫CYD-1,4後所觀察之抗體滴度對血清型1、2及3而言更高且對血清型4而言更低，此顯示反應在4種血清型間得到更好的平衡，而血清型4較不佔優勢。

- 在此一免疫方案中，自其他血清型中分離佔優勢之血清型能夠得到4種血清型間之平衡反應。

因此，上述二實例展示本發明之免疫方法可改進疫苗用登革熱病毒之免疫原性而不會損害後者之安全性，如同藉由量測病毒血症所評估的一樣。

序 列 表

<110> 法商賽諾菲巴斯德公司

<120> 對抗 4 種登革熱血清型之免疫方法

<140> TW096135167

<141> 2007-09-20

<150> FR0608660

<151> 2006-10-04

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 10735

<212> DNA

<213> 登革熱病毒

<400> 1

agttgttagt ctacgtggac cgacaagaac agtttcgaat cggaagcttg cttaacgtag	60
ttctaacagt tttttattag agagcagatc tctgatgac aaccaacgaa aaaagacggg	120
tcgaccgtct ttaatatgc tgaacgcgc gaaaaaccgc gtgtcaactg tttcacagtt	180
ggcgaagaga ttctaaaaag gattgtcttc aggccaagga cccatgaaat tggatgagc	240
tttcatagca ttcttaagat ttctagccat accccaaca gcaggaattt tggctagatg	300
gggctcattc aagaagaatg gagcgattaa agtgttacgg ggtttcaaga gagaaatctc	360
aaacatgcta aacataatga acaggaggaa aagatccgtg accatgctcc ttatgtctgt	420
gcccacagcc ctggcgcttc atctgacgac acgaggggga gagccgcata tgatagttag	480
caagcaggaa agaggaaagt cacttttgtt caagacctct gcaggtgtca acatgtgcac	540
cctcattgag atggatttgg gagagtgtg tgaggacacg atgacctaca aatgcccccg	600
gatcactgag gcggaaccag atgacgttga ctgttggtgc aatgccacgg acacatgggt	660
gacctatgga acgtgctctc aaactggcga acaccgacga gacaaacgtt ccgtcgcatt	720
ggccccacac gtggggcttg gcctagaaac aagagccgaa acgtggatgt cctctgaagg	780
tgcttgaaa cagatacaaa aagtagagac ttgggctctg agacatccag gattcaagg	840
gatagccctt tttctagcac atgcatagg aacatccatc acccagaaag ggatcatttt	900
cattttgtct atgctgtgaa caccatctat ggcatgcca tgcgtgggaa taggcaacag	960
agacttcgtg gaaggactgt caggagcaac atgggtggat gtgtactgg agcatggaag	1020
ttgcgtcacc accatggcaa aaaacaaacc aacactggac attgaactct tgaagacgga	1080
ggtcacaaac cctgcagttc tgcgtaaatt gtgcattgaa gctaaaatat caaacaccac	1140
caccgattcg agatgtccaa cacaaggaga agccacactg gtggaagaac aagacgcgaa	1200
ctttgtgtgc cgacgaacgt tctgtggacag aggctggggc aatggctgtg ggctattcgg	1260
aaaaggtagt ctaataacgt gtgccaagtt taagtgtgtg acaaaactag aaggaaagat	1320
agctcaatat gaaaacctaa aatattcagt gatagtcacc gtccacactg gagtcagca	1380
ccaggtggga aatgagacta cagaacatgg aacaactgca accataacac ctcaagctcc	1440
tacgtcggaa atacagctga ccgactacgg aacccttaca ttagattgtt cacctaggac	1500
agggttagat tttaacgaga tgggtgtgct gacaatgaaa aagaaatcat ggctgtcca	1560
caaacagtgg tttctagact taccactgcc ttggacctct ggggctttta catccaaga	1620
gacttggaa agacaagatt tactgttcac atttaagaca gctcatgcaa agaagcagga	1680
agtagctgta ctaggatcac aagaaggagc aatgcacact gcgtgactg gagcgacaga	1740
aatccaaacg tcaggaacga caacaatttt cgaggacac ctaaaatgca gactaaaaat	1800
ggacaaacta actttaaaag ggatgtcata tgtatgtgc acaggctcat tcaagttaga	1860
gaaagaagtg gctgagacct agcatggaac tgttctgtg caggttaaat atgaaggaac	1920
agacgcacca tgcaagattc ctttttcgac ccaagatgag aaaggagcaa cccagaatgg	1980
gagattaata acagccaacc ccatagtcac tgacaaagaa aaaccagtca atattgaggc	2040
agaaccacct tttgtgaga gctacatcgt ggtaggagca ggtgaaaaag ctttgaaact	2100

aagctggttc aagaaaggaa gcagcatagg gaaaatgttt gaagcaactg cccgaggagc	2160
acgaaggatg gccattctgg gagacaccgc atgggacttc ggttctatag gaggagtgtt	2220
cacgtctatg ggaaaactgg tacaccaggt ttttggaaact gcataatggag ttttgtttag	2280
cggagtctct tggaccatga aaataggaat agggattctg ctgacatggc taggattaaa	2340
ttcaaggaac acgtcccttt cggatgatgt catcgcagtt ggcatggcca cactgtacct	2400
aggagtcatg gttcaggcag attcgggatg tgtaatcaac tggaaaggca gagaacttaa	2460
atgtggaagc ggcatttttg tcactaatga agttcacact tggacagagc aatacaaatt	2520
ccaggctgac tcccccaaga gactatcagc agccattggg aaggcatggg aggagggtgt	2580
gtgtggaatc cgtacagcca ctctgtctga gaacatcatg tggaaacaaa tatcaaatga	2640
attgaaccac atcctacttg aaaaatgacat gaaatttaca gtggtcgtgg gagacgttag	2700
tggaatcttg gcccaaggaa aaaaaatgat taggccacaa cccatggaac acaaatactc	2760
gtggaaaagc tggggaaaag ctaaaatcat aggagcggat gtacagaaca ccaccttcat	2820
catcgacggc ccaaacaccc cagaatgccc tgacaatcaa agagcatgga atatttggga	2880
agtagaggac tatggatttg ggattttcac gacaaacata tggttgaaat tgcgtgactc	2940
ctacacccaa gtatgtgacc accggctgat gtcagctgcc attaaggaca gcaaggcagt	3000
ccatgctgac atgggggtact ggatagaaag tgaaaagaac gagacatgga agttggcgag	3060
agcctccttt atagaagtta agacatgcat ctggccaaaa tcccacactc tatggagcaa	3120
tggagtcttg gaaagtgaat tgataattcc aaagatatat ggaggaccaa tatctcagca	3180
caactacaga ccaggatatt tcacacaaac agcagggccg tggcacctag gcaagttgga	3240
actagatttc gatttttgtg aaggtagcac agttgttgtg gatgaacatt gtggaaatcg	3300
aggaccatct ctcaagaacca caacagtcac aggaagata atccatgaat ggtgctgcag	3360
atcttgtacg ctaccccccc tacgtttcaa aggggaagac ggggtgttgt acggcatgga	3420
aatcagacca gtgaaggaca aggaagagaa cctggccaag tcaatggtct ctgcagggtc	3480
aggagaagtg gacagctttt cactaggact gctatgcata tcaataatga ttgaagaagt	3540
gatgagatcc agatggagca aaaaaatgct gatgactgga acactggctg tgttctctct	3600
tcttataatg ggacaattga catggagtga tctgatcagg ttatgtatta tggttggagc	3660
caacgcttca gacaagatgg ggatgggaac aacgtacctg gctttaatgg ccactttcaa	3720
aatgagacca atgttcgccc tcgggctatt atttcgcaga ctaacatcta gagaagtctt	3780
tcttcttaca attggcttga gcctggtggc atccgtggag ctaccaagtt ccctagagga	3840
gctgggggat ggacttgcaa taggcatcat gatgttgaaa ttattgactg attttcagtc	3900
acaccagcta tgggctactc tgctatcctt gacatttatt aaaacaactt tttcattgca	3960
ctatgcatgg aagacaatgg ctatggtact gtcaattgta tctctcttcc ctttatgcct	4020
gtccacgacc tctcaaaaaa caacatggct tccggtgctg ttgggatctc ttggatgcaa	4080
accactacc atgtttctta taacagaaaa caaaatctgg ggaaggaga gttggccct	4140
caatgaagga attatggctg ttggaatagt tagtattcta ctaagttcac ttttaaaaaa	4200
tgatgtgccg ctagccggcc cattaatagc tggaggcatg ctaatagcat gttatgtcat	4260
atccggaagc tcagctgatt tatcactgga gaaagcggct gaggtctcct gggaggaaga	4320
agcagaacac tcaggcgcct cacacaacat actagtagag gttcaagatg atggaaccat	4380
gaagataaaa gatgaagaga gagatgacac gctcaccatt ctcttaaaag caactctgct	4440
ggcagctcga ggggtgtacc caatgtcaat accagcgacc ctttttgtgt ggtatttttg	4500
gcagaaaaag aaacagagat caggagtgtc atgggacaca cccagccccc cagaagtgga	4560
aagagcagtt cttgatgatg gcatactatag aattttgcaa agaggactgt tgggcaggtc	4620
ccaagttaga gtaggagttt tccaagaagg cgtgttcac acaatgtggc acgtcactag	4680
gggagctgtc ctcatgtatc aaggaaaaag gctggaacca agctgggcca gtgtcaaaaa	4740
agacttgatc tcatatggag gaggttggag gtttcaagga tcctggaaca cgggagaaga	4800
agtacaggtg attgctgttg aaccgggaaa aaaccccaaa aatgtacaaa caacgccggg	4860
taccttcaag acccctgaag gcgaagttgg agccatagcc ttagacttta aacctggcac	4920
atctggatct cccatcgtaa acagagaggg aaaaatagta ggtctttatg gaaatggagt	4980
ggtgacaaca agcggaactt acgttagtgc catagctcaa gctaaggcat cacaagaagg	5040
gcctctacca gagattgagg acaaggtgtt taggaaaaga aacttaacaa taatggacct	5100
acatccagga tcgggaaaaa caagaagata ccttcagacc atagtccgtg aggccataaa	5160
aaggaaagctg cgcacgctaa tcctagctcc cacaagagtt gtcgcttctg aaatggcaga	5220
ggcactcaag ggagtgccaa taaggtatca gacaacagca gtgaagagtg aacacacagg	5280

aaaggagata gttgacctta tgtgccacgc cactttcacc atgcgcctcc tgtctcccgt	5340
gagagttccc aattataaca tgattatcat ggatgaagca cacttcaccg atccagccag	5400
catagcagcc agagggtaca tctcaacccg agtgggtatg ggtgaagcag ctgcgatctt	5460
tatgacagcc actccccag gatcggtgga ggcctttcca cagagcaatg caattatcca	5520
agatgaggaa agagacattc ctgagagatc atggaactca ggctatgact ggatcactga	5580
ttttccaggt aaaacagtct ggtttgttcc aagcatcaaa tcaggaaatg acattgccaa	5640
ctgtttaaga aaaaaacggga aacgggtgat ccaattgagc agaaaaacct ttgacactga	5700
gtaccagaaa acaaaaaaca acgactggga ctatgtcgtc acaacagaca tttccgaaat	5760
gggagcaaat ttccgggccg acagggtaat agaccaagc cgggtgtctga aaccggtaat	5820
actaaaagat ggtccagagc gcgtcattct agccggaccg atgccagtga ctgtggccag	5880
tgccgcccag aggagaggaa gaattggaag gaacaaaac aaggaagggtg atcagtatat	5940
ttacatggga cagcctttaa aaaatgatga ggaccacgct cattggacag aagcaaagat	6000
gctccttgac aatataaaca caccagaagg gattatcca gccctctttg agccggagag	6060
agaaaagagt gcagctatag acggggaata cagactgcgg ggtgaagcaa ggaaaacgtt	6120
cgtggagctc atgagaagag gggatctacc agtctggcta tcctacaaag ttgcctcaga	6180
aggcttccag tactccgaca gaaggtgggtg cttcgatggg gaaaggaaca accaggtgtt	6240
ggaggagAAC atggacgtgg agatctggac aaaagaagga gaaagaaaga aactacgacc	6300
tcgttggttg gacgccagaa catactctga cccactggct ctgcgcgagt ttaaagagtt	6360
tgacgcagga agaagaagcg tctcaggtga cctaataatta gaaataggga aacttcaca	6420
acatttgacg caaagggccc agaattgctt ggacaacttg gtcattgtgc acaattccga	6480
acaaggagga aaagcctata gacatgctat ggaagaactg ccagacacaa tagaaacgtt	6540
gatgctccta gccttgatag ctgtgttgac tgggtggagt acgctgttct tcctatcagg	6600
aagaggtcta gaaaaacat ctatcggctt actctgcgtg atggcctcaa gcgcactgtt	6660
atggatggcc agtgtggagc ccatttgat agcggcctcc atcatactgg agttctttct	6720
gatggtactg cttattccag agccagacag acagcgcact ccacaggaca accagctagc	6780
atatgtggtg ataggtctgt tattcgtgat attgacagtg gcagccaatg agatgggatt	6840
attggaacc acaagaaag acctggggat tggccatgta gctgctgaaa accaccacca	6900
tgctacaatg ctggacgtag acctacatcc agcttcagcc tggacctct atgcagtggc	6960
cacaacaatc atcactccta tgatgagaca cacaattgaa aacacaacgg caaatatttc	7020
cctgacagcc atcgcaaacc aagcagctat attgatggga cttgacaagg gatggccaat	7080
atcgaagatg gacataggag ttccacttct cgccttgggg tgctattccc aagtgaatcc	7140
gctgacactg atagcggcag tattgatgct agtagctcat tacgccataa ttggacctgg	7200
actgcaagca aaagctacta gagaagctca aaaaagaaca gcggctggaa taatgaaaaa	7260
tccaactgtc gacgggattg ttgcaataga cttagatccc gtggtttacg atgcaaaatt	7320
tgaaaaacag ctaggccaaa taatgttgtt gatactttgc acatcacaga ttcttttgat	7380
gcggactaca tgggccttgt gtgaatccat cacattggct actggacctc tgaccactct	7440
ttgggagggg tctccaggaa aattctggaa caccacaata gcggtatcca tggcaaacat	7500
tttcaggggg agttatctag caggagcagg tctggccttc tcattaatga aatctctagg	7560
aggaggtagg agaggcacgg gagcccaagg ggaacactg ggagaaaaat ggaaaagaca	7620
actaaacca ctgagcaagt cagaattcaa tacttacaag aggagtggga ttatggaggt	7680
ggatagatcc gaagccaaag agggactgaa aagaggagaa acaaccaaac acgcagtatc	7740
gagaggaacg gccaaactga ggtggttctg ggagaggaac cttgtgaaac cagaaggga	7800
agtcatagac ctgcgttgtg gaagaggtgg ctggtcatat tattgcgctg ggctgaagaa	7860
agtcacagaa gtgaaaggat acacaaaagg aggacctgga catgaggaac caatcccaat	7920
ggcgacctat ggtatggaac tagtaaggct gcaactccga aaagatgtat tttttatacc	7980
acctgagaaa tgtgacaccc ttttgtgtga tattggtgag tcctctccga acccaactat	8040
agaggaagga agaacgttac gtgttctgaa aatggtggaa ccatggctca gaggaacca	8100
attttgcata aaaattctaa atccctatat gccgagcgtg gtagaaactc tggaacaaat	8160
gcaaaagaaa catggaggaa tgctagtgcg aaaccactc tcaagaaatt ccacccatga	8220
aatgtactgg gtttcatgtg gaacaggaaa catttgttca gcagtaaaca tgacatctag	8280
aatgttgcta aatcggttca caatggctca caggaagcca acatatgaaa gagacgtgga	8340
cttaggcgct ggaacaagac atgtggcagt agaaccagag gtagccaacc tagatatcat	8400
tggccagagg atagagaata taaaaaatga acataagtca acatggcatt atgatgagga	8460

caatccatac aaaacatggg cctatcatgg atcatatgag gttaagccat caggatcggc 8520
ctcatccatg gtcaatggcg tggtagatt gctcacaaa ccatgggatg ttatcccat 8580
ggtcacacaa atagccatga ctgataccac accctttgga caacagaggg tgtttaaaga 8640
gaaagttgac acgcgcacac caaaagcaaa acgtggcaca gcacaaatta tggaagtga 8700
agccaggtgg ttatggggtt tcctttctag aaacaaaaaa cccagaattt gcacaagaga 8760
ggagtttaca agaaaagtta ggtcaaacgc agctattgga gcagtgttcg ttgatgaaaa 8820
tcaatggaac tcggcaaaag aagcagtggg agacgaacgg ttctgggaac ttgtccacag 8880
agagagggag cttcataaac aggggaaatg tgccacgtgt gtctacaata tgatggggaa 8940
gagagagaaa aaattaggag agttcggaaa ggcaaaagga agtcgtgcaa tatggtacat 9000
gtggttggga gcacgcttc tagagtttga agcccttggg ttcatgaatg aagatcactg 9060
gttcagtaga gagaattcac tcagtggagt ggaaggagaa ggactccaca aacttgata 9120
catactcaga gacatatcaa ggattccagg gggaacatg tatgcagatg acacagccgg 9180
atgggacaca agaataacag aggatgatct ccagaatgag gctaaaatca ctgacatcat 9240
ggagcccga catgccctgc tggctacgtc aatctttaag ctgacctacc aaaataaggt 9300
ggtaaggggtg cagagaccag caaaaaatgg aaccgtgatg gatgttatat ccagacgtga 9360
ccagagagggc agtggacagg ttggaactta tggcttaaac actttcacca acatggaggc 9420
ccaactgata agacaaatgg agtctgaggg aatcttttta cccagcgaat tggaaccccc 9480
aaatctagcc ggaagagttc tcgactgggt gaaaaaatat ggtgtcgaaa ggctgaaaag 9540
aatggcaatc agcggagatg actgtgtggt gaaaccaatt gatgacaggt tcgcaacagc 9600
cttaacagct ttgaatgaca tgggaaaagt aagaaaagac ataccacaat gggaaccttc 9660
aaaaggatgg aatgattggc aacaagtgcc ttctgttca caccacttcc accagctaata 9720
tatgaaggat gggagggaga tagtggtgcc atgccgcaac caagatgaac ttgtggggag 9780
ggccagagta tcacaaggcg ccggatggag cctgagagaa accgcatgcc taggcaagtc 9840
atatgcacaa atgtggcagc tgatgtatct ccacaggaga gacctgagac tggcggctaa 9900
cgctatttgt tcagccgttc cagttgattg ggtccaacc agccgcacca cctggtcgat 9960
ccatgcccat caccaatgga tgacaacaga agacatgta tcagtatgga atagggtctg 10020
gatagaggaa aaccatgga tggaggataa gactcatgtg tccagtggg aagaagttcc 10080
atacctagga aagaggaag atcagtgtg tggatccctg ataggcttaa cagcaagggc 10140
cacctgggcc actaatatac aagtggccat aaaccaagtg agaaggctca ttgggaatga 10200
gaattatcta gattacatga catcaatgaa gagattcaag aatgagagt atcccgaagg 10260
ggcactctgg taagtcaaca cattcacaaa ataaaggaaa ataaaaaatc aatgaggca 10320
agaagtcagg ccagattaag ccatagtacg gtaagagcta tgctgcctgt gagccccgtc 10380
caaggacgta aatgaagtc aggcggaaag ccacggtttg agcaagccgt gctgcctgtg 10440
gtcccatcgt ggggatgtaa aaaccggga ggctgcaacc catggaagct gtacgcatgg 10500
ggtagcagac tagtggttag aggagacccc tccaagaca caacgcagca gcggggccca 10560
acaccagggg aagctgtacc ctgttggtta ggactagagg ttagaggaga ccccccgct 10620
aacaataaac agcatattga cgctgggaga gaccagagat cctgtgtct ctacagcatc 10680
attccaggca cagaacgcca gaaaatggaa tgggtgtgtt gaatcaacag gttct 10735

<210> 2
<211> 10735
<212> DNA

<213> 登革熱病毒
<400> 2

agttgttagt ctacgtggac cgacaaagac agattctttg agggagctaa gctcaatgta 60
gttctaacag ttttttaatt agagagcaga tctctgatga ataaccaacg gaaaaaggcg 120
aaaaacacgc ctttcaatat gctgaaacgc gagagaaacc gcgtgtcgac tgtgcaacag 180
ctgacaaaga gattctcact tggaatgtg cagggacgag gaccattaaa actgttcattg 240
gccctgggtg cgcttcctcg ttctctaaca atcccaccaa cagcagggat attgaagaga 300
tggggaacaa ttaaaaaatc aaaagctatt aatgttttga gagggttcag gaaagagatt 360
ggaaggatgc tgaacatctt gaataggaga cgcagatctg caggcatgat cattatgctg 420
attccaacag tgatggcggt ccatttaacc acacgtaacg gagaaccaca catgatcgtc 480



agcagacaag	agaaagggaa	aagtcttctg	tttaaaacag	aggttggcgt	gaacatgtgt	540
accctcatgg	ccatggacct	tggatgaattg	tgtgaagaca	caatcacgta	caagtgtccc	600
cttctcaggc	agaatgagcc	agaagacata	gactgttgg	gcaactctac	gtccacgtgg	660
gtaacttatg	ggacgtgtac	caccatggga	gaacatagaa	gagaaaaaag	atcagtggca	720
ctcgttccac	atgtgcgaat	gggactggag	acacgaactg	aaacatggat	gtcatcagaa	780
ggggcctgga	aacatgtcca	gagaattgaa	acttggatct	tgagacatcc	aggcttcacc	840
atgatggcag	caatcctggc	atacaccata	ggaacgacac	atttccaaag	agccctgatt	900
ttcatottac	tgacagctgt	cactccttca	atgacaatgc	gttgcatagg	aatgtcaaat	960
agagactttg	tggaaaggg	ttcaggagga	agctgggttg	acatagtctt	agaacatgga	1020
agctgtgtga	cgacgatggc	aaaaaaca	ccaacattgg	attttgaact	gataaaaaca	1080
gaagccaaac	agcctgccac	cctaaggaag	tactgtatag	aggcaaagct	aaccaacaca	1140
acaacagaat	ctcgtgccc	aacacaaggg	gaaccagcc	taaatgaaga	gcaggacaaa	1200
aggttcgtct	gcaaacactc	catggttagac	agaggatggg	gaaatggatg	tggactat	1260
ggaaagggag	gcattgtgac	ctgtgctatg	ttcagatgca	aaaagaacat	ggaaggaaaa	1320
gttgtgcaac	cagaaaaact	ggaatacacc	attgtgataa	cacctcactc	aggggaagag	1380
catgcagtcg	gaaatgacac	aggaaaacat	ggcaaggaaa	tcaaaaatac	accacagagt	1440
tccatcacag	aagcagaatt	gacaggttat	ggcactgtca	caatggagtg	ctctccaaga	1500
acgggcctcg	acttcaatga	gatggtgttg	ctgcagatgg	aaaataaagc	ttggctgg	1560
cacaggcaat	ggttccctaga	cctgccgtta	ccatggttgc	cgggagcgga	cacacaagag	1620
tcaaattgga	tacagaagga	gacattggtc	actttcaaaa	atccccatgc	gaagaaacag	1680
gatgttgttg	ttttaggatc	ccaagaaggg	gccatgcaca	cagcacttac	aggggccaca	1740
gaaatccaaa	tgtcatcagg	aaacttactc	ttcacaggac	atctcaagtg	caggctgaga	1800
atggacaagc	tacagctcaa	aggaatgtca	tactctatgt	gcacaggaaa	gtttaaagtt	1860
gtgaaggaaa	tagcagaaac	acaacatgga	acaatagtta	tcagagtgc	atatgaagg	1920
gacggctctc	catgcaagat	cccttttgag	ataatggatt	tggaaaaaag	acatgtctta	1980
ggtcgcctga	ttacagtcaa	cccaattgtg	acagaaaaag	atagcccagt	caacatagaa	2040
gcagaacctc	catttggaga	cagctacatc	atcataggag	tagagccggg	acaactgaag	2100
ctcaactgg	ttaagaaagg	aagtctatc	ggccaaatgt	ttgagacaac	aatgagggg	2160
gcgaagagaa	tggccatttt	aggtgacaca	gcctgggatt	ttggatcctt	gggaggagt	2220
tttacatcta	taggaaaggc	tctccaccaa	gtctttggag	caatctatgg	agctgccttc	2280
agtggggttt	catggactat	gaaaatcctc	ataggagtca	ttatcacatg	gataggaatg	2340
aattcacgca	gcacctcact	gtctgtgaca	ctagtattgg	tgggaattgt	gacactgtat	2400
ttgggagtc	tgggtgcagg	cgatagtgg	tgcgttgtga	gctggaaaaa	caaagaactg	2460
aaatgtggca	gtgggatttt	catcacagac	aacgtgcaca	catggacaga	acaatacaaa	2520
ttccaaccag	aatcccttc	aaaactagct	tcagctatcc	agaaagccca	tgaagaggac	2580
atttgtggaa	tccgtcag	aacaagactg	gagaatctga	tgtggaaaca	aataacacca	2640
gaattgaatc	acattctatc	agaaaatgag	gtgaagttaa	ctattatgac	aggagacatc	2700
aaaggaatca	tgcaggcagg	aaaacgatct	ctgcggcctc	agcccactga	gctgaagtat	2760
tcattgaaaa	catggggcaa	agcaaaaatg	ctctctacag	agtctcataa	ccagaccttt	2820
ctcattgatg	gccccgaac	agcagaatgc	ccaacacaaa	atagagcttg	gaattcgttg	2880
gaagttgaag	actatggctt	tggagtattc	accaccaata	tatggctaaa	attgaaagaa	2940
aaacaggatg	tattctgcga	ctcaaaactc	atgtcagcgg	ccataaaaga	caacagagcc	3000
gtccatgccg	atatgggtta	ttggatagaa	agtgcactca	atgacacatg	gaagatagag	3060
aaagcctctt	tcattgaagt	taaaaactgc	cactggccaa	aatcacacac	cctctggagc	3120
aatggagtgc	tagaaagtga	gatgataatt	ccaagaatc	tcgttgacc	agtgctcaa	3180
cacaactata	gaccaggcta	ccatacacia	ataacaggac	catggcatct	aggtaagctt	3240
gagatggact	ttgatttctg	tgatggaaca	acagtggtag	tgactgagga	ctgcggaaat	3300
agaggacctt	ctttgagaac	aaccactgcc	tctggaaaac	tcataacaga	atggtgctgc	3360
cgatcttgca	cattaccacc	gctaagatac	agaggtgagg	atgggtgctg	gtacgggatg	3420
gaaatcagac	cattgaagga	gaaagaagag	aatttgg	actccttgg	cacagctgga	3480
catgggcagg	tcgacaactt	ttcactagga	gtcttgggaa	tggcattgtt	cctggaggaa	3540
atgcttagga	cccagtagg	aacgaaacat	gcaatactac	tagttgcagt	ttcttttgtg	3600
acattgatca	cagggaacat	gtcctttaga	gacctgggaa	gagtgatggt	tatggtaggc	3660

gccactatga cggatgacat aggtatgggc gtgacttato ttgccctact agcagccttc	3720
aaagtcagac caacttttgc agctggacta ctcttgagaa agctgacctc caaggaattg	3780
atgatgacta ctataggaat tgtactcctc tcccagagca ccataccaga gaccattctt	3840
gagttgactg atgcgttagc cttaggcatg atggtcctca aaatgggtgag aaatatggaa	3900
aagtatcaat tggcagtgac tatcatggct atcttgtgcg tcccaaacgc agtgatatta	3960
caaaacgcat ggaaagttag ttgcacaata ttggcagtggtgtccgtttc cccactgttc	4020
ttaacatcct cacagcaaaa aacagattgg ataccattag cattgacgat caaaggcttc	4080
aatccaacag ctatttttct aacaaccctc tcaagaacca gcaagaaaag gagctggcca	4140
ttaaatgagg ctatcatggc agtcgggatg gtgagcattt tagccagttc tctcctaaaa	4200
aatgatattc ccatgacagg accattagtgt gctggagggc tctcactgt gtgctacgtg	4260
ctcactggac gatcggccga ttgtggaactg gagagagcag ccgatgtcaa atgggaagac	4320
caggcagaga tatcaggaag cagtccaatc ctgtcaataa caatatcaga agatggtagc	4380
atgtcgataa aaaatgaaga ggaagaacaa aactgacca tactcattag aacaggattg	4440
ctggtgatct caggactttt tctgttatca ataccaatca cggcagcagc atggtacctg	4500
tgggaagtga agaaacaacg ggccggagta ttgtgggatg ttcttcacc cccacccatg	4560
ggaaaggctg aactggaaga tggagcctat agaattaagc aaaaagggat tcttgatat	4620
tcccagatcg gagccggagt ttacaagaa ggaacattcc atacaatgtg gcatgtcaca	4680
cgtggcgctg ttctaatagca taaaggaaag aggattgaac caacatgggc ggacgtcaag	4740
aaagacctaa tatcatatgg aggaggctgg aagttagaag gagaatggaa ggaaggagaa	4800
gaagtccagg tattggcact ggagcctgga aaaaatccaa gagccgtcca aacgaaacct	4860
ggtcttttca aaaccaacgc cggaacaata ggtgtgttat ctctggactt ttctcctgga	4920
acgtcaggat ctccaattat cgacaaaaaa ggaaaagttg tgggtcttta tggtaatggt	4980
gttgttacaa ggagtggagc atatgtgagt gctatagccc agactgaaaa aagcattgaa	5040
gacaaccag agatcgaaga tcacattttc cgaaagagaa gactgaccat catggacctc	5100
caccaggag cgggaaagac gaagagatac cttccggcca tagtcagaga agctataaaa	5160
cggggtttga gaacattaat cttggccccc actagagttg tggcagctga aatggaggaa	5220
gcccttagag gacttccaat aagataccag accccagcca tcagagctga gcacaccggg	5280
cgggagattg tggacctaat gtgtcatgcc acatttacca tgaggctgct atcaccagtt	5340
agagtgccaa actacaacct gattatcatg gacgaagccc atttcacaga cccagcaagt	5400
atagcagcta gaggatacat ctcaactcga gtggagatgg gtgaggcagc tgggattttt	5460
atgacagcca ctccccggg aagcagagac ccatttctc agagcaatgc accaatcata	5520
gatgaagaaa gagaatccc tgaacgctcg tggaattccg gacatgaatg ggtcacggat	5580
tttaaggga agactgtttg gttcgttcca agtataaaaag caggaaatga tatagcagct	5640
tgctgagga aaaatggaaa gaaagtgata caactcagta ggaagacctt tgattctgag	5700
tatgtcaaga ctagaaccaa tgattgggac ttctgtgtta caactgacat ttcagaaatg	5760
ggtgccaat tcaaggctga gagggttata gacccagac gctgcatgaa accagtcata	5820
ctaacagatg gtgaagagcg ggtgattctg gcaggaccta tgccagtga ccaacttagt	5880
gcagcacaaa gaagaggag aataggaaga aatccaaaaa atgagaatga ccagtacata	5940
tacatggggg aacctctgga aaatgatgaa gactgtgcac actggaaaga agctaaaatg	6000
ctcctagata acatcaacac gccagaagga atcattccta gcatgttoga accagagcgt	6060
gaaaagggtg atgccattga tggcgaatac cgcttgagag gagaagcaag gaaaacctt	6120
gtagacttaa tgagaagagg agacctacca gtctggttgg cctacagagt ggcagctgaa	6180
ggcatcaact acgcagacag aagggtgtgt tttgatggag tcaagaacaa ccaaatccta	6240
gaagaaaacg tggaaagtga aatctggaca aaagaagggg aaaggaagaa attgaaaccc	6300
agatggttgg atgctaggat ctattctgac ccactggcgc taaaagaatt taaggattt	6360
gcagccggaa gaaagtctct gacctgaac ctaatcacag aaatgggtag gctcccaacc	6420
ttcatgactc agaaggcaag agacgcactg gacaacttag cagtgtgca cacggctgag	6480
gcagggtgaa gggcgtaaa ccatgctctc agtgaactgc cggagaccct ggagacattg	6540
cttttactga cacttctggc tacagtcacg ggagggatct ttttattctt gatgagcgca	6600
aggggcatag ggaagatgac cctgggaatg tctgcataa tcacggctag catcctccta	6660
tggtacgcac aaatacagcc aactggata gcagcttcaa taatactgga gtttttctc	6720
atagttttgc ttattccaga acctgaaaaa cagagaacac ccaagacaa ccaactgacc	6780
tacgttgtca tagccatcct cacagtgtg gccgaacca tggcaaacga gatgggttc	6840

ctagaaaaaa	cgaagaaaga	tctcggattg	ggaagcattg	caaccagca	acccgagagc	6900
aacatccttg	acatagatct	acgtcctgca	tcagcatgga	cgctgtatgc	cgtggccaca	6960
acatttgtaa	caccaatggt	gagacatagc	attgaaaatt	cctcagtgaa	tgtgtcccta	7020
acagctatag	ccaaccaagc	cacagtgtta	atgggtctcg	ggaaggatg	gccattgtca	7080
aagatggaca	tcggagtccc	ccttctcgcc	attggatgct	actcacaagt	caaccccata	7140
actctcacag	cagctctttt	cttattggta	gcacattatg	ccatcatagg	gccaggactc	7200
caagcaaaag	caaccagaga	agctcagaaa	agagcagcgg	cgggcatcat	gaaaaacca	7260
actgtcgatg	gaataacagt	gattgaccta	gatccaatac	cttatgatcc	aaagtttgaa	7320
aagcagttgg	gacaagtaat	gctcctagtc	ctctgcgtga	ctcaagtatt	gatgatgagg	7380
actacatggg	ctctgtgtga	ggctttaacc	ttagctaccg	ggccccctc	cacattgttg	7440
gaaggaaatc	cagggaggtt	ttggaacact	accattgcgg	tgtcaatggc	taacattttt	7500
agagggagtt	acttggccgg	agctggactt	ctcttttcta	ttatgaagaa	cacaaccaac	7560
acaagaaggg	gaactggcaa	cataggagag	acgcttggag	agaaatggaa	aagccgattg	7620
aacgcattgg	gaaaaagtga	attccagatc	tacaagaaaa	gtggaatcca	ggaagtggat	7680
agaaccttag	caaaagaagg	cattaaaaga	ggagaaacgg	accatcacgc	tgtgtcgcga	7740
ggctcagcaa	aactgagatg	gttcgttgag	agaaacatgg	tcacaccaga	agggaaagta	7800
gtggacctcg	gttgtggcag	aggaggctgg	tcatactatt	gtggaggact	aaagaatgta	7860
agagaagtca	aaggcctaac	aaaaggagga	ccaggacacg	aagaacccat	ccccatgtca	7920
acatatgggt	ggaatctagt	gcgtcttcaa	agtggagttg	acgttttctt	catcccgcca	7980
gaaaagtgtg	acacattatt	gtgtgacata	ggggagtcac	caccaaacc	cacagtggaa	8040
gcaggacgaa	cactcagagt	ccttaactta	gtagaaaatt	ggttgaacaa	caacactcaa	8100
ttttgcataa	agtttctcaa	cccatatatg	ccctcagtc	tagaaaaaat	ggaagcacta	8160
caaaggaaat	atggaggagc	cttagtgagg	aatccactct	cacgaaactc	cacacatgag	8220
atgtactggg	tatccaatgc	ttccgggaac	atagtgtcat	cagtgaacat	gatttcaagg	8280
atgttgatca	acagatttac	aatgagatac	aagaaagcca	cttacgagcc	ggatgttgac	8340
ctcgggaagc	gaaccogtaa	catcgggatt	gaaagtgaga	taccaaacct	agatataatt	8400
gggaaaagaa	tagaaaaaat	aaagcaagag	catgaaacat	catggcacta	tgaccaagac	8460
caccataca	aaactgggc	ataccatggt	agctatgaaa	caaaacagac	tggatcagca	8520
tcacccatgg	tcaacggagt	ggtcaggctg	ctgacaaaac	cttgggacgt	tgtccccatg	8580
gtgacacaga	tggcaatgac	agacacgact	ccatttggac	aacagcgct	ttttaagag	8640
aaagtggaca	cgagaaccca	agaaccgaaa	gaaggcacga	agaaactaat	gaaaaataaca	8700
gcagagtggc	tttggaagaa	attagggaag	aaaaagacac	ccaggatgtg	caccagagaa	8760
gaattcacaa	gaaaggtgag	aagcaatgca	gccttggggg	ccatattcac	tgatgagaac	8820
aagtggaaat	cggcacgtga	ggctgttgaa	gatagtaggt	tttgggagct	ggttgacaag	8880
gaaaggaatc	tccatcttga	aggaaagtgt	gaaacatgtg	tgtacaacat	gatgggaaaa	8940
agagagaaga	agctagggga	attcggcaag	gcaaaaggca	gcagagccat	atggtacatg	9000
tggcttggag	cacgcttctt	agagtttgaa	gccctaggat	tcttaaatga	agatcactgg	9060
ttctccagag	agaactccct	gagtggagtg	gaaggagaag	ggctgcacaa	gctaggttac	9120
attctaagag	acgtgagcaa	gaaagaggga	ggagcaatgt	atgccgatga	caccgcagga	9180
tgggatacaa	aaatcacact	agaagaccta	aaaaatgaag	agatggtaac	aaaccacatg	9240
gaaggagaac	acaagaaact	agccgaggcc	attttcaaac	taacgtacca	aaacaaggtg	9300
gtgcgtgtgc	aaagaccaac	accaagaggc	acagtaatgg	acatcatatc	gagaagagac	9360
caaagaggta	gtggacaagt	tggcacctat	ggactcaata	ctttcaccaa	tatggaagcc	9420
caactaatca	gacagatgga	gggagaagga	gtctttaaaa	gcattcagca	cctaacaatc	9480
acagaagaaa	tcgctgtgca	aaactggtta	gcaagagtgg	ggcgogaaag	gttatcaaga	9540
atggccatca	gtggagatga	ttgtgttg	aaacctttag	atgacagggt	cgcaagcgct	9600
ttaacagctc	taaatgacat	gggaaagatt	aggaaagaca	tacaacaatg	ggaaccttca	9660
agaggatgga	atgattggac	acaagtggcc	ttctgttcac	accatttcca	tgagttaatc	9720
atgaaagacg	gtcgcgtact	cgttgtttcca	tgtagaaacc	aagatgaact	gattggcaga	9780
gcccgaatct	ccaaggagc	aggggtggtc	ttcggggaga	cggcctgttt	ggggaaagtct	9840
tacgccccaa	tgtggagctt	gatgtacttc	cacagacgcg	acctcaggct	ggcggcaaat	9900
gctatttgct	cggcagtacc	atcacattgg	gttccaacaa	gtcgaacaac	ctggtccata	9960
catgctaaac	atgaatggat	gacaacggaa	gacatgctga	cagtctggaa	caggggtgtg	10020

attcaagaaa	acccatggat	ggaagacaaa	actccagtgg	aaacatggga	gaaatccca	10080
tacttgggga	aaagagaaga	ccaatggtgc	ggctcattga	ttgggttaac	aagcagggcc	10140
acctgggcaa	agaacatcca	agcagcaata	aatcaagtta	gatcccttat	aggcaatgaa	10200
gaatacacag	attacatgcc	atccatgaaa	agattcagaa	gagaagagga	agaagcagga	10260
gttctgtggt	agaaagcaaa	actaacatga	aacaaggcta	gaagtcaggt	cggattaagc	10320
catagtacgg	aaaaaactat	gctacctgtg	agccccgtcc	aaggacgta	aaagaagtca	10380
ggccatcata	aatgccatag	cttgagttaa	ctatgcagcc	tgtagctcca	cctgagaagg	10440
tgtaaaaaat	ccgggaggcc	acaaaccatg	gaagctgtac	gcatggcgta	gtggactagc	10500
ggttagggga	gacctctccc	ttacaaatcg	cagcaacaat	gggggcccaa	ggcgagatga	10560
agctgtagtc	tcgctggaag	gactagaggt	tagaggagac	ccccccgaaa	caaaaaacag	10620
catattgacg	ctgggaaaga	ccagagatcc	tgctgtctcc	tcagcatcat	tccaggcaca	10680
gaacgccaga	aaatggaatg	gtgctgttga	atcaacaggt	tct		10723



申請專利範圍

1. 一種用於對抗登革熱病毒之免疫套組，其包括一盒，該盒至少包含疫苗用登革熱病毒血清型1、2、3及4，該盒係：
 - (a) 以單價組合物形式包含於4個分離容器，或
 - (b) 以兩種二價組合物形式包含於2個分離容器中。
2. 如請求項1之套組，其中該疫苗用登革熱病毒血清型1係選自由VDV1株及CYD DEN-1所組成之群。
3. 如請求項1或2之套組，其中該疫苗用登革熱病毒血清型2係選自由VDV2株及CYD DEN-2所組成之群。
4. 如請求項1之套組，其中該疫苗用登革熱病毒血清型1係VDV1株及該疫苗用登革熱病毒血清型2係CYD DEN-2。
5. 如請求項1之套組，其中該疫苗用登革熱病毒血清型1係CYD DEN-1及該疫苗用登革熱病毒血清型2係VDV2。
6. 如請求項1至5中任一項之套組，其中該疫苗用登革熱病毒血清型3係CYD DEN-3。
7. 如請求項1至6中任一項之套組，其中該疫苗用登革熱病毒血清型4係CYD DEN-4。
8. 如請求項1之套組，其至少包括：
 - (a) 第一容器，其包含包括Chimerivax™ DEN-1及Chimerivax™ DEN-2之二價疫苗；及
 - (b) 第二容器，其包含包括Chimerivax™ DEN-3及Chimerivax™ DEN-4之二價疫苗。
9. 如請求項1之套組，其至少包括：
 - (a) 第一容器，其包含包括Chimerivax™ DEN-1及Chimerivax™ DEN-3之二價疫苗；及

- (b) 第二容器，其包含包括Chimerivax™ DEN-2及Chimerivax™ DEN-4之二價疫苗。
10. 一種用於對抗登革熱病毒之免疫套組，其包括一盒，該盒至少包含第一種血清型及第二種血清型之疫苗用登革熱病毒，其中該等疫苗用登革熱病毒係：
- (a) 呈包含於2個分離容器中之兩種單價組合物形式，或
- (b) 呈包含於1個單一容器中一種二價組合物形式。
11. 如請求項4之套組，其至少包括：
- (a) 一容器，其包含包括Chimerivax™ DEN-1及Chimerivax™ DEN-3之二價疫苗，或
- (b) 一容器，其包含包括Chimerivax™ DEN-2及Chimerivax™ DEN-4之二價疫苗，或
- (c) 一容器，其包含包括Chimerivax™ DEN-1及Chimerivax™ DEN-2之二價疫苗，或
- (d) 一容器，其包含包括Chimerivax™ DEN-3及Chimerivax™ DEN-4之二價疫苗。
12. 如前述任一項之套組，其中該套組進一步包含指示該單價組合物或該二價組合物用於在患者誘導對抗4種登革熱血清型1至4之中和抗體的方法之用法說明頁，其包含：
- 第一系列投予(i)一次劑量之第一種血清型之疫苗用登革熱病毒及一次劑量之第二種血清型之疫苗用登革熱病毒；及(ii)一次劑量之第三種血清型疫苗用登革熱病毒及一次劑量之第四種血清型疫苗用登革熱病毒，及
- 第二系列投予(i)及(ii)劑，其中該(i)及(ii)劑係在不同解剖部位同時投予，及其中該第二系列係在第一系列之後至少30天至最多12個月實施。

13. 一種二價疫苗，其包括免疫有效量之第一種血清型及第二種血清型之疫苗用登革熱病毒及醫藥上可接受之賦形劑。
14. 如請求項13之二價疫苗，其包括選自由以下組成之群的疫苗用病毒：Chimerivax™ DEN-1 與 Chimerivax™ DEN-3；或 Chimerivax™ DEN-2 與 Chimerivax™ DEN-4；或 Chimerivax™ DEN-1 與 Chimerivax™ DEN-2；或 Chimerivax™ DEN-3 與 Chimerivax™ DEN-4。