



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0087890  
(43) 공개일자 2009년08월18일

(51) Int. Cl.

*A61K 39/12* (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7010676

(22) 출원일자 2007년11월30일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2009년05월25일

(86) 국제출원번호 PCT/FR2007/052431

(87) 국제공개번호 WO 2008/065315

국제공개일자 2008년06월05일

(30) 우선권주장

0655255 2006년12월01일 프랑스(FR)

(71) 출원인

사노피 파스퇴르

프랑스, 리옹 세텍스 07 애프-69367, 애비뉴 풍  
파스퇴르 2

(72) 발명자

가이, 브루노

프랑스 리옹 애프-69005, 루에 데스 노이에르스  
15비

바반, 베로니크

프랑스 크레퐁네 애프-69290, 테르 루에 장-클라  
우드 마틴 7

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

백남훈

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 4 가지 뎅기열 혈청형에 대한 면역화 프로토콜

### (57) 요 약

본 발명은 (a) 제 1 뎅기 혈청형 백신 바이러스를 포함하는 1가 백신의 투여, 및 (b) 뎅기의 4 가지 혈청형 백신 바이러스를 포함하는 4가 백신의 투여를 포함하는, 환자에서 상기 4 가지 뎅기 혈청형에 대한 보호를 유도하는 방법에 관한 것으로서, 상기 투여(b)를 상기 첫 번째 투여(a) 후 30일 이상 12 개월 이내에 실행한다.

(72) 발명자

포렛, 레미

프랑스 세레진 두 로네 에프-69780, 루에 피에르  
데복스 2

랑, 장

프랑스 미온스 에프-69780, 루트 데 새인-프리에스  
트 118

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

뎅기열 바이러스에 대한 면역화를 위한 1가 백신 및 4가 백신의 제조를 위한 뎅기열 백신 바이러스의 용도로서,

(a) 뎅기열의 첫 번째 혈청형에 대한 백신 바이러스를 포함하는 1가 백신의 첫 번째 투여,

(b) 뎅기열의 4 가지 혈청형에 대한 백신 바이러스를 포함하는 4가 백신의 두 번째 투여

를 포함하고, 상기 4가 백신을 상기 1가 백신 투여 후 30일 이상 12 개월 이하로 투여하는 용도.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 첫 번째 투여(a)에 사용되는 백신 바이러스를 혈청형 1 또는 2의 뎅기열에 대한 백신 바이러스를 포함하는 그룹 중에서 선택하는 용도.

### 청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 첫 번째 투여(a)에 사용되는 백신 바이러스를 균주 VDV1 및 VDV2를 포함하는 그룹 중에서 선택하는 용도.

### 청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 4가 백신에 사용되는 백신 바이러스가 키메리백스(Chimerivax)<sup>TM</sup> DEN-1,2,3 및 4인 용도.

### 청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 혈청형 1, 2, 3 및 4의 뎅기열 백신 바이러스의 양이  $10^3$  내지  $10^6$  CCID<sub>50</sub>의 범위 내에 있는 용도.

### 청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 1가 백신이  $10^4$  CCID<sub>50</sub>의 VDV1 또는 VDV2를 포함하고, 상기 4가 백신이  $10^5$  CCID<sub>50</sub>의 키메리백스<sup>TM</sup> DEN-1,2,3 및 4를 포함하는 용도.

### 청구항 7

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 1가 백신이  $10^4$  CCID<sub>50</sub>의 VDV1 또는 VDV2를 포함하고, 상기 4가 백신이  $10^5$  CCID<sub>50</sub>의 키메리백스<sup>TM</sup> DEN-1,2,3 및  $10^3$  CCID<sub>50</sub>의 키메리백스<sup>TM</sup> DEN-4를 포함하는 용도.

### 청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 두 번째 투여(b)를 상기 첫 번째 투여(a) 후 30 내지 60일째에 수행하는 용도.

### 청구항 9

(a) 뎅기열의 첫 번째 혈청형의 백신 바이러스를 포함하는 1가 백신을 보유하는 제 1 용기,

(b) 4 가지 뎅기열 혈청형에 대한 백신 바이러스를 포함하는 4가 백신을 보유하는 제 2 용기 중 하나 이상을 함유하는 상자를 포함하는 뎅기열 바이러스에 대한 면역화 키트.

### 청구항 10

제 9 항에 있어서,

(a) VDV1 또는 VDV2 백신 바이러스를 포함하는 1가 백신을 보유하는 제 1 용기,

(b) 4 개의 키메리백스<sup>TM</sup> DEN-1,2,3 및 4를 포함하는 4가 백신을 보유하는 제 2 용기

중 하나 이상을 포함하는 면역화 키트.

### 청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 1가 백신이  $10^4$  CCID<sub>50</sub>의 VDV1 또는 VDV2를 포함하고, 상기 4가 백신이  $10^5$  CCID<sub>50</sub>의 키메리백스<sup>TM</sup> DEN-1,2,3 및 4를 포함하는 면역화 키트.

### 청구항 12

제 10 항에 있어서,

상기 1가 백신이  $10^4$  CCID<sub>50</sub>의 VDV1 또는 VDV2를 포함하고, 상기 4가 백신이  $10^5$  CCID<sub>50</sub>의 키메리백스<sup>TM</sup> DEN-1,2,3 및  $10^3$  CCID<sub>50</sub>의 키메리백스<sup>TM</sup> DEN-4를 포함하는 면역화 키트.

## 명세서

### 기술 분야

<1> 4 가지 뎅기열 혈청형에 대한 면역화 방법

<2> 본 발명은

<3> (a) 뎅기열의 첫 번째 혈청형의 백신 바이러스를 포함하는 1가 백신의 첫 번째 투여,

<4> (b) 뎅기열의 4 가지 혈청형의 백신 바이러스를 포함하는 4가 백신의 두 번째 투여

<5> 를 포함하는, 환자에서 상기 4 가지 뎅기열 혈청형에 대한 보호를 유도하는 방법에 관한 것으로서, 상기 두 번째 투여(b)를 상기 첫 번째 투여(a) 후 30일 이상 12 개월 이내에 실행한다.

### 배경 기술

<6> 뎅기열 질병은, 유사하지만 항원의 관점에서는 상이한 혈청 유형을 갖는, 플라비바이러스 속의 4 가지 바이러스에 의해 유발된다(Gubler et al., 1988 In: 절지동물 매개 바이러스 질병의 역학. Monath TPM, editor, Boca Raton(FL): CRC Press: 223-60; Kautner et al., 1997, J. of Pediatrics, 131:516-524; Rigau-Perez et al., 1998, Lancet; 352:971-977; Vaughn et al., 1997, J Infect Dis; 176:322-30). 뎅기열 혈청형에 의한 감염은 비특이적 바이러스 중후군에서부터 치명적인 중증 출혈성 질병에 이르는 임상 질병 범위를 발생시킬 수 있다. 모기에 물린 후 뎅기열의 배양 기간은 대략 4일(3 내지 14일의 범위)이다. 뎅기열은 2상성 발열, 두통, 신체의 다양한 부분의 통증, 쇠약, 발진 및 림프절 장애를 특징으로 한다(Kautner et al., 1997, J. of Pediatrics, 131:516-524; Rigau-Perez et al., 1998, Lancet; 352:971-977). 바이러스혈 기간은 열병의 경우와 동일하다(Vaughn et al., 1997, J. Infect. Dis.; 176:322-30). 뎅기열의 치유는 7 내지 10일 후에 완료되지만, 대개는 무력증이 연장된다. 백혈구 및 혈소판 수의 감소가 빈번히 발생한다.

<7> 출혈성 뎅기열은 항상성의 이상 및 혈관 투과성의 증가[종종 중증 내부 출혈로 악화되는 혈량저하증 및 저혈압(쇼크 중후군을 갖는 뎅기열)을 발생시킬 수 있다]를 특징으로 하는 중증 열병이다. 출혈성 뎅기열의 사망률은 치료 부재 하에서 10%에 달할 수 있으나, 치료 경험이 있는 대부분의 센터에서는 1% 이하이다(WHO technical

Guide, 1986. 뎅기열 출혈성 발열: 진단, 치료 및 억제, p1-2. World Health Organization, Geneva, Switzerland).

- <8> 뎅기열의 통상적인 실험실 진단은 상기 바이러스의 단리 및/또는 상기 뎅기열 바이러스에 특이적인 항체의 검출을 근거로 한다.
- <9> 뎅기열은 말라리아 이후 두 번째로 가장 흔한 열대성 감염성 질병으로, 세계 인구의 절반 이상이 유행성 전염의 위험이 존재하는 지역에 살고 있다. 매년, 뎅기열의 사례는 5천만 내지 1억 건으로 추정되며, 출혈성 뎅기열로 입원하는 환자의 사례는 500,000 건, 사망자수는 25,000 건으로 추정된다. 뎅기열은 아시아, 태평양 지역, 아프리카, 라틴 아메리카, 및 카리브해 지역의 풍토병이다. 100 개가 넘는 열대 국가들에서 뎅기열 바이러스 감염은 풍토병이며 출혈성 뎅기열은 이들 국가 중 60 개 국에서 보도되었다(Gubler, 2002, TRENDS in Microbiology. 10:100-103; Monath, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci.; 91:2395-2400). 다수의 잘 묘사된 인자들, 즉 인구 성장, 계획되지 않고 통제되지 않은 도시화, 특히 빈곤이 병행된 경우; 비행기 여행의 증가; 모기의 유효한 통제의 결여 및 위생적인 기간 시설 및 공중 보건의 저하가 뎅기열에 영향을 끼치는 것으로 보인다 (Gubler, 2002, TRENDS in Microbiology. 10:100-103). 여행자 및 국외이주자들은 뎅기열에 대해 점점 더 많은 경고를 받고 있다(Shirtcliffe et al., 1998, J. Roy. Coll. Phys. Lond.; 32:235-237). 뎅기열은 뎅기열이 풍토병인 열대 지역에 배치 중에 있는 미군 군대에서 열병의 주요 원인 중 하나를 구성하여 왔다(DeFraites et al., 1994, MMWR 1994;43:845-848).
- <10> 상기 바이러스는 인간, 및 낮 동안 물고 인간을 먹이로 하는 것을 좋아하는 가축 모기인 아에데스 아에지프티 (*Aedes aegypti*)를 수반하는 주기로 유지된다. 인간의 감염은 감염된 아에데스 아에지프티가 인간의 피를 먹고 있는 동안 상기 바이러스의 주입에 의해 개시된다. 침속의 바이러스는 주로 혈관 외 조직에 부착한다. 접종 후 감염된 세포의 첫 번째 범주는 수지상 세포이며, 이어서 상기 세포는 림프절로 이동한다(Wu et al., 2000, Nature Med.; 7:816-820). 피부 및 림프절에서의 초기 복제 후, 상기 바이러스는 급성 열성 기 동안, 일반적으로 3 내지 5일간 혈액 중에 존재한다.
- <11> 단핵구 및 대식세포는 수지상 세포와 함께 상기 뎅기열 바이러스의 첫 번째 표적들이다. 동형 재감염에 대한 보호는 완벽하며 추정 상 일생동안 지속되지만, 다양한 뎅기열 유형들 간의 교차보호는 수주 내지 수 개월 미만으로 지속된다(Sabin, 1952, Am. J. Trop. Med. Hyg.; 1:30-50). 결과적으로, 개개인은 상이한 혈청형에 의한 감염을 경험할 수 있다. 뎅기열에 의한 2차 감염은 이론상 종종 뎅기열 발병에 위험 인자이다. 그러나, 출혈성 뎅기열은 다인성이다, 즉 상기 인자는 관련된 바이러스의 균주, 및 또한 환자의 연령, 면역 상태 및 유전적 소인을 포함한다. 2 가지 인자, 즉 고 바이러스혈증에 의한 빠른 바이러스 복제(상기 질병의 중증도는 바이러스혈증의 수준과 관련된다; Vaughn et al., 2000, J. Inf. Dis.; 181:2-9) 및 높은 수준의 염증성 매개 인자의 방출에 대한 실질적인 염증 반응(Rothman and Ennis, 1999, Virology; 257:1-6)은 출혈성 뎅기열의 발생에 중요한 역할을 한다. 뎅기열에 특이적인 치료는 없다. 뎅기열의 치료는 침상에 눕기, 해열 진통제에 의한 발열 및 통증 조절, 및 적절한 수액 흡입에 의한 정후적인 것이다. 출혈성 뎅기열의 치료는 체액 손실의 평형, 응고 인자의 보충 및 혜파린 주입을 요한다.
- <12> 예방 수단은 현재 상기 매개 동물의 억제 및 개인적인 보호 단계의 수행을 기본으로 하나, 이는 실행이 어렵고 비용이 비싸다. 이 당시 뎅기열에 대한 백신은 승인되지 않았다. 상기 4 가지 뎅기열 혈청형이 세계에 유포되고 상기 혈청형들이 출혈성 뎅기열의 사례에서 관련이 있는 것으로 보고되었다면, 면역화는 이상적으로는 상기 뎅기열 바이러스의 4 가지 혈청형에 대해 보호를 부여해야 한다.
- <13> 4가 백신에 의한 면역화 시, 상기 반응은 단지 하나 또는 기껏해야 3 개의 혈청형에 대해서는 우세하게 유도되는 일이 일어날 수도 있다. 따라서 다양한 혈청형들간의 간섭을 감소시키고 상기 4 가지 뎅기열 혈청형에 대한 항체의 중화를 유도하는 방법이 필요하다.

### 발명의 상세한 설명

- <14> 본 발명자들은 상기 4 가지 혈청형에 대한 반응을 유도하도록 되어 있는 백신 제형을 단지 하나의 혈청형의 감독된 생백신으로 예비 면역화한 후에 투여하고, 두 번째 면역화를 상기 첫 번째 면역화 후 30일 내지 12 개월째에 수행할 때 상기 4 가지 혈청형의 항체 중화를 포함한 면역 반응이 발생할 수 있음을 발견하였다.
- <15> 본 발명자들은 특히 1가 DEN-2 면역화 후 4가 DEN-1,2,3,4 면역화가 모든 면역된 원숭이에서 상기 4 가지 혈청형에 대한 반응을 유도함을 입증하였다. 환연하면, 4가 면역화는 단독으로는 추가 접종 후에 조차도, 4 가지 혈

청형 중 단지 2 개에 대해서만 만족할만한 반응을 유도하였다.

<16> 따라서 본 발명에 따른 방법에 의해 생성된 면역 반응은 정량적으로 및 정성적으로 보다 크다(모든 혈청형을 망라하여).

<17> 따라서 첫 번째 목적에 따라, 본 발명은

<18> (a) 뎅기열의 첫 번째 혈청형의 백신 바이러스를 포함하는 1가 백신의 첫 번째 투여,

<19> (b) 뎅기열의 4 가지 혈청형 백신 바이러스를 포함하는 4가 백신의 두 번째 투여

<20> 를 포함하는, 환자에서 상기 4 가지 뎅기열 혈청형에 대한 중화 항체 반응을 유도하게 할 수 있는 방법에 관한 것으로서, 상기 두 번째 투여(b)를 상기 첫 번째 투여(a) 후 30일 이상 12 개월 이내에 실행한다.

<21> 본 발명에 따른 면역화 방법의 특정 실시태양에 따라, 상기 첫 번째 투여(a)에 사용되는 백신 바이러스를 혈청형 1 또는 2의 뎅기열 백신 바이러스를 포함하는 그룹 중에서 선택한다.

<22> 본 발명에 따른 면역화 방법의 또 다른 특정 실시태양에 따라, 상기 첫 번째 투여(a)에 사용되는 백신 바이러스를 균주 VDV1 및 VDV2를 포함하는 그룹 중에서 선택한다.

<23> 본 발명에 따른 방법의 또 다른 특정 실시태양에 따라, 상기 4가 백신에 사용되는 백신 바이러스를 키메리백스<sup>TM</sup> (Chimerivax) DEN-1,2,3 및 4를 포함하는 그룹 중에서 선택한다.

<24> 본 발명에 따른 방법의 또 다른 특정 실시태양에 따라, 상기 혈청형 1, 2, 3 및 4의 뎅기열 백신 바이러스의 양은  $10^3$  내지  $10^6$  CCID<sub>50</sub>의 범위 내에 있다.

<25> 본 발명에 따른 방법의 또 다른 특정 실시태양에 따라, 상기 1가 백신은  $10^4$  CCID<sub>50</sub>의 VDV1 또는 VDV2를 포함하고, 상기 4가 백신은  $10^5$  CCID<sub>50</sub>의 키메리백스<sup>TM</sup> DEN-1,2,3 및  $10^3$  CCID<sub>50</sub>의 키메리백스<sup>TM</sup> DEN-4를 포함한다.

<26> 본 발명에 따른 방법의 또 다른 실시태양에 따라, 상기 두 번째 투여(b)를 상기 첫 번째 투여(a) 후 30 내지 60 일째에 실행한다.

<27> 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 뎅기열의 첫 번째 혈청형의 백신 바이러스를 포함하는 1가 조성물 또는 백신을 보유하는 제 1 용기, (b) 상기 4 가지 뎅기열 혈청형에 대한 백신 바이러스를 포함하는 4가 조성물 또는 백신을 보유하는 제 2 용기 중 하나 이상을 함유하는 상자를 포함하는 뎅기열 바이러스에 대한 면역화 키트이다.

<28> 하나의 실시태양에 따라, 본 발명에 따른 키트는

<29> (a) VDV1 또는 VDV2 백신 바이러스를 포함하는 1가 백신을 보유하는 제 1 용기,

<30> (b) 4 개의 키메리백스<sup>TM</sup> DEN-1,2,3 및 4를 포함하는 4가 백신을 보유하는 제 2 용기

<31> 중 하나 이상을 포함한다.

<32> 특정 실시태양에 따라, 본 발명에 따른 키트는  $10^4$  CCID<sub>50</sub>의 VDV1 또는 VDV2를 포함하는 1가 백신 및  $10^5$  CCID<sub>50</sub>의 키메리백스<sup>TM</sup> DEN-1,2,3 및  $10^3$  CCID<sub>50</sub>의 키메리백스<sup>TM</sup> DEN-4를 포함하는 4가 백신을 포함한다.

<33> 따라서 본 발명은 또한 뎅기열 바이러스에 대한 면역화를 위한 1가 백신 및 4가 백신의 제조를 위한 뎅기열 백신 바이러스의 용도에 관한 것으로서, 이때 상기 1가 백신은 뎅기열의 첫 번째 혈청형의 백신 바이러스를 포함하고, 상기 4가 백신은 상기 4 가지 뎅기열 혈청형의 백신 바이러스를 포함하며 상기 4가 백신을 상기 1가 백신의 투여 후 30일 이상 12 개월 이내에 투여한다.

<34> 이제 본 발명을 하기의 설명에서 더욱 상세히 개시할 것이다.

<35> 정의

<36> "뎅기열 바이러스" 또는 "DEN"은 플라비비리다에 과의 플라비바이러스 속에 속하는 양성의 단일 가닥 RNA 바이러스이다. 게놈 RNA는 5'에 I형 단부 일원을 함유하지만 3' 단부에는 폴리-A 꼬리가 없다. 상기 게놈 유기체는 하기의 요소들, 즉 5' 비 암호화 부위(NCR), 구조 단백질(캡시드(C), 전막/막(prM/M), 외막(E)) 및 비구조

단백질(NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5), 및 3' NCR을 포함한다. 상기 계놈 바이러스 RNA는 캡시드 단백질과 회합하여 뉴클레오팝시드를 형성한다. 다른 플라비바이러스들의 경우에서와 같이, 상기 DEN 바이러스 계놈은 중단되지 않은 암호화 부위를 암호화하며 상기 부위는 단일 폴리단백질로 변역된다.

- <37> 본 발명과 관련하여, "백신 뎅기열 바이러스"란 용어는 항체 중화를 포함한 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 뎅기열 바이러스의 임의의 바이러스 형태, 바람직하게는 뎅기열 바이러스에 의한 감염에 대한 인간의 면역학 프로그램과 관련하여 사용될 수 있는 뎅기열 바이러스의 모든 바이러스 형태를 의미한다. 따라서, 백신 뎅기열 바이러스는 불활성화된 바이러스, 감독된 바이러스, 또는 재조합 단백질, 예를 들어 상기 뎅기열 바이러스의 외막 단백질을 의미한다.
- <38> 백신 바이러스는 상기 바이러스가 허용 세포 상에서 더 이상 복제할 수 없는 경우 "불활성화된" 것으로 간주한다.
- <39> 백신 바이러스는 Huh-7, VERO 및/또는 C6/C36 세포 상에서 37 °C 또는 39 °C에서 생육 후 동일한 배양 조건 하에 동일한 역가 측정 방법을 사용하여 측정 시 상기와 같은 바이러스가 야생형 모 균주에 의해 획득된 최대 역가보다 10 배 이상 낮은 역가를 갖는 경우 "감독된" 것으로 간주한다. 따라서 상기 나타낸 이들 3 가지 세포 유형 중 하나 이상에서 감소된 생육을 나타내는 백신 바이러스를 본 발명과 관련하여 "감독된" 것으로 간주한다.
- <40> 인간에 사용될 수 있는 백신 바이러스는 양의 이익/위험 비를 가지며, 상기 비는 일반적으로 시장에 나와있는 조절 요건들을 만족한다. 본 발명과 관련하여 사용되는 백신 뎅기열 바이러스는 바람직하게는 상기 바이러스가 인간에서 상기 질병을 유도하지 않도록 감독된 바이러스이다. 상기 백신 바이러스는 유리하게는 대다수의 백신 접종한 개인에서 중화 항체 반응을 유도하는 그의 능력을 유지하는 동시에, 기껏해야 온화한 강도(즉 중간 내지 낮거나, 혹은 0)의 부작용만을 생성시킨다.
- <41> 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 뎅기열 백신 바이러스의 비 제한적인 예로서, 불활성화된 백신 바이러스, 감독된 백신 바이러스, 예를 들어 감독된 균주 VDV-1 및 VDV-2, 예를 들어 출원 WO 02/66621, WO 00/57904, WO 00/57908, WO 00/507909, WO 00/57910, WO 02/0950075 및 WO 02/102828에 개시된 균주들, 또는 키메라를 언급 할 수 있다. 키메릭 바이러스는 상기 정의한 바와 같은 감독된 바이러스의 특징들을 나타낸다. 뎅기열 바이러스의 외막 단백질을 발현하고 상기 단백질이 유도되는 혈청형을 중화하는 항체를 포함하는 면역 반응을 유도하는 임의의 키메릭 바이러스를 본 발명과 관련하여 사용할 수 있다. 비 제한적인 예로서, 예를 들어 WO 98/37911에 개시된 바와 같은 키메리백스™ 뎅기열, 및 또한 예를 들어 특허 출원 WO 96/40933 및 WO 01/60847에 개시된 바와 같은 뎅기열/텅기열 키메라를 언급할 수 있다. 상기 백신 뎅기열 바이러스 혈청형 1은 예를 들어 백신 균주 VDV1 또는 키메리백스™ DEN-1, 특히 YF17D/DEN-1 바이러스, 또는 그 밖의 DEN-1 16007/PDK13 균주일 수 있다. 상기 백신 뎅기열 바이러스 혈청형 2는 예를 들어 백신 균주 VDV2 또는 키메리백스™ DEN-2, 특히 YF17D/DEN-2 바이러스, 또는 그 밖의 DEN-2 16681/PDK53 균주일 수 있다. 상기 백신 뎅기열 바이러스 혈청형 3은 키메리백스™ DEN-3, 특히 YF17D/DEN-3 바이러스일 수 있다. 상기 백신 뎅기열 바이러스 혈청형 4는 키메리백스™ DEN-4, 특히 YF17D/DEN-4 바이러스일 수 있다. 상기 언급된 균주들 및 이들을 획득하는 방법에 대한 정확한 설명에 대해서 본 원에 나타낸 출원들을 참조할 수 있다.
- <42> "VDV" 또는 "베로 뎅기열 백신"은 베로 세포에 순응되고(즉 베로 세포 상에서 유의수준으로 재현가능하게 복제 할 수 있다) 영장류 및 특히 인간에서 중화 항체의 유도를 포함한 특이적인 체액 반응을 유도할 수 있는 감독된 생 뎅기열 바이러스 균주를 나타낸다.
- <43> "VDV-1"은, PDK 세포 상에서 11 회 계대배양시키고(DEN-1 16007/PDK 11) 이어서 32 °C에서 베로 세포 상에서 증폭시키고 그의 RNA를 정제하여 베로 세포에 형질감염시킨 야생형 균주 DEN-1 16007로부터 획득한 균주이다. 상기 VDV-1 균주는 백신 균주 DEN-1 16007/PDK13(PDK-1차 개 신장-세포 상에서 13 회 계대배양한 것)에 비해 14 개의 추가적인 돌연변이를 갖는다. 상기 DEN-1 16007/PDK13 균주(또한 "LAV1"이라 칭함)는 마히돌(Mahidol) 대학 이름의 특허 출원 EP1159968에 개시되어 있으며 국립 미생물 배양 콜렉션(CNCM)에 I-2480 번으로 기탁되어 있다. 상기 VDV-1 균주의 완전한 서열을 서열식별번호: 1로 제공한다. 상기 균주를 상기 서열로부터 쉽게 재현할 수 있다. 상기 VDV-1 균주의 제조 방법 및 특성화는 사노피 파스퇴르 및 질병 관리 예방 센터의 이름으로 출원된 국제 특허 출원 WO2006/134433에 개시되어 있다.
- <44> "VDV-2"는, PDK 세포를 통해 50 회 계대배양시키고(DEN-2 16681/PDK50), 플레이트-정제하고, 그의 RNA를 추출

하고 정제시켜 베로 세포에 형질감염시킨 야생형 균주 DEN-2 16681로부터 획득한 균주이다. 이어서 상기 VDV-2 균주를 플레이트 정제 및 베로 세포 상에서의 증폭에 의해 획득하였다. 상기 VDV-2 균주는 백신 균주 DEN-2 16681/PDK53(PDK 세포를 통해 53 회 계대배양한 것)에 비해 10 개의 추가적인 돌연변이를 가지며, 이중 4 개의 돌연변이는 침묵 돌연변이이다. 상기 DEN-2 16681/PDK53 균주(또한 "LAV2"라 칭함)는 마히돌 대학 이름의 특허 출원 EP1159968에 개시되어 있으며 국립 미생물 배양 콜렉션(CNCM)에 I-2481 번으로 기탁되어 있다. 상기 VDV-2 균주의 완전한 서열을 서열식별번호: 2로 제공한다. 상기 VDV-2 균주를 상기 서열로부터 쉽게 재현할 수 있다. 상기 VDV-2 균주의 제조 방법 및 특성화는 사노피 파스퇴르 및 질병 관리 예방 센터의 이름으로 출원된 국제 특허 출원 WO2006/134433에 개시되어 있다.

<45> 상기 VDV1 및 2 균주를 베로 세포 상에서의 증폭에 의해 제조한다. 상기 생성된 바이러스를 수확하고 여과에 의해 세포 찌꺼기로부터 정제한다. DNA를 효소 처리에 의해 절단한다. 불순물을 한외여과에 의해 제거한다. 농축 방법에 의해 감염 역가를 증가시킬 수 있다. 안정제를 첨가한 후에, 상기 균주들을 사용 전에 동결 또는 동결건조된 형태로 보관하고, 이어서 필요 시 재조성한다.

<46> "키메리백스™ 템기열" 또는 "CYD"란 용어는 전막 및 외막 단백질을 암호화하는 서열이 DEN 바이러스의 서열로 치환된 YF 바이러스의 주쇄를 포함하는 키메릭 황색열(YF) 바이러스를 나타낸다. 따라서 "CYD-1 또는 CYD DEN1"이란 용어를 사용하여 템기열 혈청형 1 균주(DEN-1)의 prM 및 E 서열을 함유하는 키메릭 YF 바이러스를 개시한다. "CYD-2 또는 CYD DEN2"란 용어는 DEN-2 균주의 prM 및 E 서열을 함유하는 키메릭 YF 바이러스를 개시하는데 사용된다. "CYD-3 또는 CYD DEN3"이란 용어는 DEN-3 균주의 prM 및 E 서열을 함유하는 키메릭 YF 바이러스를 개시하는데 사용된다. "CYD-4 또는 CYD DEN4"란 용어는 DEN-4 균주의 prM 및 E 서열을 함유하는 키메릭 YF 바이러스를 개시하는데 사용된다. 이들 키메리백스™ 템기열의 제조는 국제 특허 출원 WO 98/37911 및 WO 03/101397에 상세히 개시되어 있으며, 상기의 제조 방법에 대한 정확한 설명에 대해 상기 출원을 참조할 수 있다. 실시예에 개시된 키메라들을 DEN1 PU0359(TYP1140), DEN2 PU0218, DEN3 PaH881/88 및 DEN4 1288(TVP 980) 균주로부터 유래한 prM 및 E 서열을 사용하여 생성시켰다. 상기 템기열 바이러스의 임의의 균주를 상기 키메라들의 제작을 위해 본 발명과 관련하여 사용할 수 있었다.

<47> 바람직하게는, 상기 키메릭 YF 바이러스는 감독된 황색열 균주 YF17D의 주쇄(Theiler M, and Smith HH (1937) J Exp. Med 65, p767-786.) (YF17D/DEN-1, YF17D/DEN-2, YF17D/DEN-3, YF17D/DEN-4 바이러스)를 포함한다. 사용될 수 있는 YF17D 균주의 예로는 YF17D204 (YF-Vax(등록상표), Sanofi Pasteur, Swifwater, PA, USA; Stamaril(등록상표) Sanofi Pasteur, Marcy l'Etoile, France; ARILVAX™ Chiron, Speke, Liverpool, UK; FLAVIMUN(등록상표) Berna Biotech, Bern, Switzerland); YF17D-204 France (X15067, X15062); YF17D-204, 234 US (Rice et al., 1985, Science, 229:726-733), 또는 그 밖의 관련 균주 YF17DD (Genbank 수탁 번호 U17066), YF17D-213 (Genbank 수탁 번호 U17067) 및 문헌[Galler et al., 1998, Vaccines 16(9/10):1024-1028]에 개시된 YF17DD 균주가 있다. 인간에 사용하기 위해 충분히 감독시킨 임의의 다른 황색열 바이러스 균주를 본 발명과 관련하여 상기 키메라의 제작을 위해 사용할 수 있다.

<48> 특정 실시태양에 따라, 다양한 투여에 사용되는 각각의 혈청형에 대해서, 상기 백신 바이러스들은 상기 백신 중에  $10^3$  내지  $10^5$  CCID<sub>50</sub>의 양으로 존재한다.

<49> 특정 실시태양에 따라, 백신 바이러스 VDV1 또는 VDV2는 상기 1가 백신 중에  $10^4$  CCID<sub>50</sub>의 수준으로 존재한다.

<50> 특정 실시태양에 따라, 키메리백스™ DEN-1,2,3은 상기 4가 백신 중에  $10^5$  CCID<sub>50</sub>의 수준으로 존재하고, 키메리백스™ DEN-4는 상기 4가 백신 중에  $10^3$  CCID<sub>50</sub>의 수준으로 존재한다.

<51> 각각의 1가 키메리백스™ 템기열 백신 바이러스(혈청형 1, 2, 3 및 4)를 베로 세포 상에서 각각의 혈청형을 증폭 시켜 제조하였다. 보다 구체적으로, 상기 4 개의 바이러스를 무 혈청 배지에서 부착 베로 세포 상에 별도로 생성시킨다. 이어서, 여과에 의해 세포 찌꺼기를 제거하여 정제한, 상기 바이러스 수확물을 농축시키고 상기 숙주 세포의 DNA를 제거하기 위해서 한외여과 및 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 안정제를 첨가한 후에, 상기 백신 균주를 사용 전에 동결 또는 동결건조된 형태로 보관하고, 이어서 필요에 따라 재조성한다. 동일한 방법을 상기 4 개의 키메라들에 적용한다.

- <52> 용량, 조성물 또는 백신은 상기가 약학적으로 허용 가능한 부형제 이외에, 단일 뎅기열 혈청형의 백신 바이러스를 함유하는 경우 "1가"이다. 용량, 조성물 또는 백신은 상기가 뎅기열의 4 가지 혈청형의 백신 바이러스를 함유하는 경우 "4가"이다. 다가 조성물은 1가 조성물들을 단순히 혼합하여 수득된다.
- <53> "환자"란 용어는 뎅기열로 감염될 수 있는 개인(아동 또는 성인), 특히 감염 위험이 있는 개인, 예를 들어 뎅기열이 존재하는 지역을 여행하는 개인 또는 상기 지역의 거주자를 나타낸다. 따라서, 상기 용어는 특정 투약을 받은 적이 없는 개인 및 또한 뎅기열 바이러스에 대해 경험이 없지 않은 개인을 포함한다.
- <54> 초기 1가 면역화에 따른 4가 면역화
- <55> 따라서, 첫 번째 태양에서, 본 발명은 뎅기열 바이러스에 대한 면역화 방법에 관한 것이다.
- <56> 본 발명자들은 실제로 특히 1가 백신의 첫 번째 투여 후 30일 내지 12 개월째의 4 가지 혈청형의 투여가 상기 4 가지 혈청형에 대한 유효 보호를 획득하게 할 수 있음을 입증하였다. 따라서 본 발명에 따른 방법은 뎅기열에 대한 면역화 전략과 관련하여 매우 특히 중요하다.
- <57> 본 발명에 따라서, 상기 첫 번째 면역화를 상기 4 가지 뎅기열 혈청형 중 어느 하나의 백신 바이러스를 포함하는 1가 조성물 또는 백신을 사용하여 수행할 수 있으며, 상기 두 번째 투여는 4 가지 백신 혈청형 모두에 의해 수행될 수 있다. 특정한 실시태양에 따라, 혈청형 1 또는 2 뎅기열 백신 바이러스, 바람직하게는 혈청형 2를 상기 첫 번째 투여에 사용한다. 바람직하게는, 상기 첫 번째 투여에 사용되는 뎅기열 백신 바이러스는 감독된 뎅기열 바이러스이며 키메리 바이러스로 구성되지 않는다. 특정한 실시태양에 따라, 균주 VDV1 또는 VDV2, 바람직하게는 균주 VDV2를 상기 첫 번째 투여에서 백신 바이러스로서 사용한다.
- <58> 감독된 생백신 바이러스, 바람직하게는 상기 뎅기열 바이러스의 4 가지 혈청형에 대한 항원을 발현하는 키메리 바이러스, 특히 키메리백스<sup>TM</sup> DEN1, 2, 3 및 4를 상기 두 번째 투여에 사용한다.
- <59> 따라서 특정 실시태양에 따라, 본 발명은 하기의 시스템들을 포함한다:
- <60> -(a) VDV1 (b) CYD DEN-1, 2, 3 및 4
- <61> -(b) VDV2 (b) CYD DEN-1, 2, 3 및 4.
- <62> 본 발명과 관련하여, "백신 조성물"은 상기 백신 뎅기열 바이러스의 "면역유효량", 즉 중화 항체를 포함하는 특이적인 면역 반응을 유도하기에 충분한 뎅기열 백신 바이러스의 양(이는 예를 들어 하기 실시예 1에 개시하는 바와 같은 혈청중화 시험에 의해 입증될 수 있다)을 포함하는 조성물을 의미한다. 혈청은 상기와 같이 측정된 중화 항체 역가가 1:10(단위: 1/희석) 이상인 경우 중화 항체의 존재에 대해 양성인 것으로 간주된다.
- <63> 백신 균주량을 통상적으로는 바이러스 플라크-형성 단위(PFU) 또는 50% 조직 배양물 감염 용량, 또는 그 밖의 50% 세포 배양물 감염 용량(CCID<sub>50</sub>)의 항으로 나타낸다. 예를 들어, 본 발명에 따른 조성물은 1가 또는 2가 조성물의 경우 10 내지 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub>, 특히 10<sup>3</sup> 내지 10<sup>5</sup> CCID<sub>50</sub>의 백신 뎅기열 바이러스 혈청형 1, 2, 3 또는 4를 함유할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 조성물 또는 용도에서, 상기 백신 뎅기열 바이러스 혈청형 1, 2, 3 및 4의 용량은 각각 바람직하게는 10 내지 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub>, 예를 들어 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> 또는 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub>의 범위, 특히 10<sup>3</sup> 내지 10<sup>5</sup> CCID<sub>50</sub>의 범위 내에 있다. 백신 바이러스를 동일하거나 상이한 용량으로 사용할 수 있으며, 상기 용량을 사용되는 백신 바이러스의 성질 및 획득된 면역 반응의 강도에 따라 조절할 수 있다.
- <64> 본 발명에 따른 방법의 특정 실시태양에 따라, 1가 및 4가 조성물 또는 백신 중의 감독된 생백신 바이러스의 양은 10<sup>3</sup> 내지 10<sup>5</sup> CCID<sub>50</sub>이다. 특정 실시태양에 따라, 상기 1가 백신은 10<sup>4</sup> CCID<sub>50</sub>의 VDV1 또는 VDV2, 바람직하게는 VDV2를 포함한다. 특정 실시태양에 따라, 상기 4가 백신은 10<sup>5</sup> CCID<sub>50</sub>의 키메리백스<sup>TM</sup> DEN-1, 2, 3 및 4를 포함한다. 하나의 유리한 실시태양에 따라, 상기 4가 백신은 10<sup>5</sup> CCID<sub>50</sub>의 키메리백스<sup>TM</sup> DEN-1, 2 및 3 및 10<sup>3</sup> CCID<sub>50</sub>의 키메리백스<sup>TM</sup> DEN-4를 포함한다.
- <65> 본 발명과 관련하여, 상기 두 번째 투여(b)를 투여(a) 후 30일 내지 12 개월 이내에 수행한다. 유리한 실시태양에 따라, 상기 두 번째 투여를 상기 첫 번째 투여(a) 후 30일 내지 60일째에 수행한다.

- <66> 유리하게는, 상기 중화 항체 반응은 지속되는 반응이다, 즉 상기 반응을 상기 두 번째 투여 후 적어도 6개월까지 혈청 중에서 검출할 수 있다.
- <67> 백신 바이러스들을 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 임의의 방법에 따라 제조할 수 있는 조성물 또는 백신의 형태로 투여한다. 대개, 일반적으로는 동결건조된 형태의 바이러스를 약학적으로 허용 가능한 부형제, 예를 들어 물 또는 인산염 완충 염수 용액, 습윤제 또는 안정제와 혼합한다. "약학적으로 허용 가능한 부형제"란 용어는 인간 또는 동물에서 임의의 부 반응, 예를 들어 알러지 반응을 생성시키지 않는 임의의 용매, 분산 매질, 충전제 등을 의미한다. 상기 부형제를 선택되는 약제 형태, 투여 방법 및 경로에 따라 선택한다. 적합한 부형제 및 약학 제형에 관한 요건들은 당해 분야의 참고 논문을 대표하는 문헌[Remington: The Science & Practice of Pharmacy]에 개시되어 있다.
- <68> 바람직하게는, 상기 백신 조성물을 주사가능한 형태로 제조하며 상기 조성물은 액체 용액, 혼탁액 또는 유화액의 형태를 취할 수 있다. 상기 조성물은 특히 대략 6 내지 9의 pH(주변 온도에서 pH 계기로 측정 시)를 유지하도록 완충된 수성 용액을 포함할 수 있다.
- <69> 항원 보강제를 첨가할 필요는 없지만, 그럼에도 불구하고 상기 조성물은 상기와 같은 화합물, 즉 상기 동시에 투여된 백신 균주에 의해 유도되는 세포 또는 체액 면역 반응을 증가, 자극 또는 강화하는 물질을 포함할 수 있다. 당해 분야의 숙련가들은 백신 분야에 통상적으로 사용되는 항원보강제들로부터 본 발명과 관련하여 적합할 수 있는 항원보강제를 선택할 수 있다.
- <70> 본 발명에 따른 조성물 또는 백신을 백신화에 통상적으로 사용되는 임의의 수단에 의해, 예를 들어 비 경구로(특히 피 내, 피하 또는 근육 내에 의해), 유리하게는 피하로 투여할 수 있다. 바람직하게는, 상기 백신 또는 조성물은 유리하게는, 왼쪽 삼각근과 오른쪽 삼각근 부위에 피하로 투여되는 주사가능한 조성물이다.
- <71> 상기 투여되는 백신 조성물의 부피는 투여 방법에 따라 변한다. 피하 주사의 경우, 상기 부피는 일반적으로는 0.1 내지 1.0 ml, 바람직하게는 대략적으로 0.5 ml이다.
- <72> 상기 혈청형 1 내지 4 모두의 투여에 최적인 기간은 상기 뎅기열 바이러스에 노출되기 대략 1 내지 3개월 전이다. 상기 백신을 성인 및 아동에서 뎅기열 바이러스에 의한 감염의 예방 치료로서 투여할 수 있다. 따라서 표적 집단은 뎅기열 바이러스에 대해 경험이 없거나(즉 앞서 면역화되지 않았거나) 또는 경험이 있을 수도 있는 개인을 포함한다.
- <73> 백신 뎅기열 바이러스 혈청형 1 내지 4의 추가접종 투여를 또한 예를 들어 상기 본 발명에 따른 두 번째 투여 후(b) 6개월 내지 10년, 예를 들어 6개월, 1년, 3년, 5년 또는 10년째에 사용할 수 있다. 상기 추가접종 투여를 유리하게는 상기 두 번째 투여(b)에 사용되는 바와 동일한 백신 또는 조성물(즉 동일한 백신 바이러스)을 사용하여 바람직하게는 동일한 투여 조건(해부학적 투여 부위 및 투여 방법) 하에서 실행할 것이다.
- <74> 간접 현상을 다른 혈청형들에 대한 하나 이상의 혈청형의 우세에 의해 설명할 수 있으며, 따라서 상기 현상은 백신 후보(예를 들어 VDV 또는 키메리백스™)의 제조에 사용되는 기술과 무관하다. 따라서 본 발명에 따른 방법을 일반적으로 모든 뎅기열 백신 바이러스에 적용할 수 있다.
- <75> 따라서 본 발명은 또한 뎅기열 바이러스에 대한 면역화를 위한 1가 백신 및 4가 백신의 제조를 위한 뎅기열 백신 바이러스의 용도를 포함하고자 하며, 이때 상기 1가 백신은 뎅기열의 첫 번째 혈청형의 백신 바이러스를 포함하고, 상기 4가 백신은 상기 4 가지 뎅기열 혈청형의 백신 바이러스를 포함하며 상기 4가 백신을 상기 1가 백신의 투여 후 30일 이상 12 개월 이내에 투여한다.
- <76> 본 발명에 따른 용도와 관련하여 상기 백신 및 사용 조건에 대한 설명에 대해서, 본 발명에 따른 면역화 방법과 관련하여 제공된 설명을 참고로 할 수 있다.
- <77> 또 다른 태양에 따라, 본 발명은 그의 목적으로서 4 가지 뎅기열 바이러스 혈청형에 대한 면역화 키트를 갖는다. 본 발명에 따른 키트는 제안된 면역화 방법과 관련하여 상기 정의한 바와 같은 조성물 또는 백신을 포함한다. 따라서 본 발명에 따른 키트는 상기 조성물 또는 백신을 보유하는 다양한 용기를 함유하는 상자 및 유리하게는 상기 조성물 또는 백신의 투여에 유용한 정보를 포함하는 설명서를 포함한다.
- <78> 따라서 하나의 실시태양에 따라, 본 발명은 (a) 뎅기열의 첫 번째 혈청형의 백신 바이러스를 포함하는 1가 백신을 보유하는 제 1 용기, 및 (b) 상기 4 가지 뎅기열 혈청형에 대한 백신 바이러스를 포함하는 4가 백신을 보유하는 제 2 용기 중 하나 이상을 함유하는 상자를 포함하는, 뎅기열 바이러스에 대한 면역화 키트에 관한

것이다.

<79> 본 발명에 따른 키트에 사용될 수 있는 백신, 조성물 또는 뎅기열 백신 바이러스에 대한 설명에 대해서, 본 발명에 따른 면역화 방법과 관련하여 상기 제공된 설명을 참고로 할 수 있다.

<80> 특정 실시태양에 따라, 본 발명에 따른 키트는

<81> (a) VDV1 또는 VDV2 백신 바이러스를 포함하는 1가 백신을 보유하는 제 1 용기,

<82> (b) 4 개의 키메리백스<sup>TM</sup> DEN-1,2,3 및 4를 포함하는 4가 백신을 보유하는 제 2 용기

<83> 중 하나 이상을 포함한다.

<84> 특정 실시태양에 따라, 본 발명에 따른 키트는  $10^4$  CCID<sub>50</sub>의 VDV1 또는 VDV2를 포함하는 하나 이상의 1가 백신 및  $10^5$  CCID<sub>50</sub>의 키메리백스<sup>TM</sup> DEN-1,2,3 및  $10^3$  CCID<sub>50</sub>의 키메리백스<sup>TM</sup> DEN-4를 포함하는 4가 백신을 포함한다.

<85> 본 발명에 따른 키트는 상술한 바와 같은 단일의 예 또는 여러 예의 용기들을 함유할 수 있다.

<86> 상기 사용되는 백신들이 동결 건조된 형태인 경우, 상기 키트는 유리하게는 주사 가능한 백신 용량을 재조성하기 위해 사용될 수 있는 희석제를 함유하는 하나 이상의 추가적인 용기를 포함할 것이다. 임의의 약학적으로 허용 가능한 희석제, 통상적으로 물 또는 인산염 완충 수용액을 상기 목적에 사용할 수 있다.

<87> 본 발명을 하기의 실시예들에 의해 예시한다.

### 실시예

<88> **실시예 1:** 원숭이에서 1가 조성물에 이은 4가 조성물의 연속 주사에 의한 4 가지 뎅기열 바이러스 혈청형에 대한 면역화

<89> 바이러스혈증 및 면역원성을 원숭이 모델에서 시험하였다. 특히 상기 바이러스혈증은 인간에서 상기 질병의 독성 및 중증도와 관련된 인자들 중 하나로서 인지되었으며 따라서 고려되는 중요한 매개변수를 구성한다. 상기 면역원성은 그 자체로서, 부여된 보호의 평가와 관련하여 중요 매개변수이다.

<90> 1.1 물질 및 방법:

<91> 상기 원숭이에서의 실험을 동물 실험에 관한 유럽의 지령에 따라 수행하였다. 상기 면역화를 모리타니 기원의 키노몰구스 원숭이(*Macaca fascicularis*)에서 수행하였다. 상기 원숭이를 면역화 전에 6 주간 격리시켜 두었다.

<92> 상기 원숭이의 팔(들)에 백신 조성물 0.5 ml을 피하로 주입하여 상기 원숭이를 면역화하였다. 케타민(Imalgene, Merial)으로 가볍게 마취시킨 후에, 서혜부 또는 복제 정맥으로부터 천자에 의해 채혈하였다. 각각의 면역화 후 0 및 28일째에 항체 반응을 평가하기 위해 혈액 5 ml를 샘플링한 반면, 2 내지 10일째에는 바이러스혈증을 평가하기 위해서 혈액 1 ml를 샘플링하였다. 상기 혈액을 얼음 상에 모으고 혈청이 분리될 때까지 얼음 상에서 보관하였다. 이렇게 하기 위해서, 상기 혈액을 4 °C에서 20 분간 원심분리하고 수거된 혈청을 시험 시까지 -80 °C에서 보관하였다.

<93> 바이러스혈증의 측정

<94> 백신화 후 바이러스혈증을 정량적인 실시간 RT-PCR(qRT-PCR)에 의해 모니터하였다. 상기 DEN1 및 DEN2 균주의 NS5 유전자에 위치한 2 세트의 개시제 및 센서를 사용하여 각각 VDV-1 RNA 및 VDV-2 RNA를 정량분석하였다. 상기 YF 바이러스의 NS5 유전자에 위치한 2 개시제 및 1 센서의 세 번째 세트를 사용하여 상기 CYD RNA를 정량분석하였다. 최종적으로, E(DEN)/NS1 (YF) 유전자의 연접부에 위치한, 상기 다양한 CYD 혈청형들에 특이적인 4 세트의 개시제 및 센서를 사용하여 상기 YF NS5 RNA에 대해 양성인 샘플에서 상기 혈청형을 동정하였다(또한 표 I 참조). T7 프로모터의 조절 하에서 각각의 PCR에 의해 표적화된 부위를 함유하는 7 개의 플라스미드를 시험관 내에서 전사하여 일련의 합성 RNA를 생성시키고, 이를 각각의 RT-PCT 시험에 내부 기준으로서 포함시켰다. 상기 합성 RNA를 분광광도측정에 의해 분석하였으며, 수득된 RNA의 양을 RNA 사본 수로 전환하고 GEQ(게놈 당량)로서 나타낸다.

<95> 0.140 ml의 원숭이 혈청을 제조사의 지시에 따라, 마체레이 나겔(Macherey Nagel) "뉴클레오스핀(Nucleospin)

96 바이러스™ RNA 추출 키트를 사용하여 추출하고, 이어서 상기 정제된 RNA를 RNase가 없는 물 0.140 mL (0.090 mL, 이어서 0.05 mL)로 용출시켰다. 반복된 동결/해동 주기를 피하기 위해서, 상기 추출 후 바로 상기 RNA 제제 5  $\mu$ L 상에서 첫 번째 정량분석을 수행하였다. 나머지 분량은 70 °C에서 동결시켰다.

<96> 상기 반응 혼합물을 "퀴아젠 콘티펙트(Qiagen Qauntitect)™ 팀침" RT-PCR 정량분석 키트(Qiagen)의 성분 이외에, 10 피코몰의 각 개시제, 4 피코몰의 각 센서 및 5  $\mu$ L의 RNA를 총 25  $\mu$ L의 부피로 함유하였다. 시험하려는 상기 RNA의 경우에, 상기 정제된 제제 5  $\mu$ L를 선행 희석 단계 없이 반응 혼합물에 직접 도입시켰다. 합성 RNA를 RNase가 없는 물에서 1/10으로 희석하고, 대략 10 내지  $10^6$  GEQ를 5  $\mu$ L 중에 함유하는 7 개의 희석물을 표준 곡선의 생성을 위해 나란히 정량분석하였다.

<97> 상기 정량분석 반응을 하기의 프로그램을 사용하여 어플라이드 바이오시스템(Applied Biosystem) ABI Prism 700™ 장치상에서 수행하였다: 50 °C/30 분, 95 °C/15 분, 이어서 40 주기의 95 °C/15 초-60 °C/60 초.

<98> 상기 시험에서 바이러스 RNA의 정량분석 한계는 PCR 표적에 따라, 2.9 내지 3.3  $\log_{10}$ GEG/mL(800 내지 2000 GEQ/mL; 4 내지 10 GEQ/반응)(표준 편차:  $\pm 0.3 \log_{10}$ )이다.

<99> 상기 감염 역가와 바이러스 RNA 정량화 간의 상관성을, 상기 면역화에 사용된 바이러스(CYD 또는 VDV)의 기지량의 감염성 입자가 첨가된 음성 원숭이 혈청 샘플(DO) 0.140 mL의 분석에 의해, 상기 시험과 나란히 확립시켰다. 상기 대조용 혈청을 5  $\mu$ L 중에 대략 1 PFU 및 대략 100 PFU(각각 2.3 및 4.3  $\log_{10}$ PFU/mL)를 함유하는 2 개의 희석물로 제조하였다.

<100> 실시예들에 사용된 시험에서, GEQ와 PFU 간의 상관성을 하기와 같다: YF 또는 CYD에 대해 혈청 양성인 경우 2.7  $\log_{10}$ 의 GEQ/PFU 비(즉 1 PFU = 500 GEQ). VDV1 또는 VDV2에 대해 혈청 양성인 경우 2.5  $\log_{10}$ 의 GEQ/PFU 비(즉 1 PFU = 320 GEQ).

<101> 상기 정량 분석 한계는 qRT-PCR YF 및 CYD의 경우  $<3.3 \log_{10}$ GEQ/mL(즉:  $<4$  PFU/mL) 및 qRT-PCR VDV1 및 VDV2의 경우  $<2.9 \log_{10}$ GEQ/mL(즉:  $<2.5$  PFU/mL)이다.

<102> 사용된 개시제 및 센서를 하기 표 1에 제공하며, 표에서 각각의 분석에 대해 센스 및 안티센스 개시제 및 센서를 순서대로 나타낸다.

### 표 1

#### 서 열

> <u>sp</u>	YF-N85	센스	5' GCACGGATGTAACAGACTGAAGA (23 염 기)
	YF NS5	안티센스	5' CCAGGCCGAAACCTGTCAT (18 염 기)
	YF-NS5		5' Fam-TGACTGTGTGGCCGGCCCATC-Tamra (22 염 기)
CYD1 spe	CYD1-	센스	5' CATTGCACTGGCCTGGTAA (20 b)
	CYD1-	안티센스	5' CTTTGGCAAGAGAGCTCAA GT (23 b)
	CYD1-		5' Fam-CCGATCAGGATGCGCCA TCA-Tamra (21 b)
CYD2 spe	CYD2-	센스	5' GTG GGA GTC GTG ACG CTG TA (20 b)
	CYD2-	안티센스	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-	센스	5' AAA ACA CTT CCA TGT CAT TTT CAT G (25b)
	CYD3-	안티센스	5' GTT GAT GGC GCA TCC TTG ATC (21 b)
	CYD3-		5' Fam-TGCGATAGGAAATTATCACACTCTATCTGGAGC-Tamra (33b)
CYD4 spe	CYD4-	센스	5' CTTAGTATTGTG GAT TGG CAC GAA (24 b)
	CYD4-	안티센스	5' GCG CCA ACT GTG AAA CCT AGA (21 b)
	CYD4-		5' Fam-AGAAAACACTTCAATGGCAATGACGTGCAT-Tamra (23 b)
VDV1 spe	VDV1-N85	센스	5' TCG CAA CAG CCT TAA CAG C (19 b)
	VDV1-N85	안티센스	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 spe	VDV2-N85	센스	5' AAT GAC AGA CAC GAC TCC (18 b)
	VDV2-N85	안티센스	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)

<103>

<104> 중화 항체의 측정(혈청중화 시험)(SN50)

<105> 통상적으로, 뎅기열 항체를 PRNT50(PFU 수를 50%까지 감소시키는 중화 시험) 시험을 사용하여 측정한다. 상기 시험은 고되며 다량의 물질을 다 써버리므로, 우리는 CCID<sub>50</sub> 시험에서 측정된 단위수의 50% 감소를 기본으로 하는 SN50 시험을 개발하였다.

<106> 96-웰 플레이트에서, 0.120 ml의 각각의 상보성 해제된 혈청을 웰당 0.480 ml의 희석제(ISCOVE 4% SVF)에 가한다. 6 배의 일련의 희석물을 희석제 0.450 ml에 혈청 0.150 ml을 전달하여 제조한다. 2.7 log<sub>10</sub> CCID<sub>50</sub>/ml의 바이러스 희석물 450 μl를 25 CCID<sub>50</sub>/웰이 수득되도록 각 웰에 가한다. 상기 플레이트를 37 °C에서 1 시간 동안 배양한다. 이어서 각 희석물 0.1 ml를 96-웰 플레이트의 6 개의 웰에 분배하며, 상기 플레이트에는 실험 시작 3일 전에 4% SVF 배지를 함유하는 ISCOVE 0.1 ml 중에 8000 세포/웰의 밀도로 VERO 세포가 시딩되었다. 5% CO<sub>2</sub>의 존재 하에 37 °C에서 6일간 배양 후에, 상기 세포를 4 °C에서 15 분간 에탄올/아세톤(70/30) 혼합물로 고정시키고, 이어서 PBS로 3 회 세척하고 항-플라비바이러스 단클론 항체(ATCC H-B112 하이브리도마로부터 수득한 mAb 4G2)의 1/2000 희석액 0.05 ml의 존재 하에 37 °C에서 1 시간 동안 배양한다. 이어서 상기 플레이트를 2 회 세척하고 알칼리성 포스파타제-접합된 항-마우스 IgG의 1/1000 희석액 0.05 ml의 존재 하에 37 °C에서 1 시간 동안 배양한다. 상기 용해 플라크를 착색된 기질: BCIP/NBT 0.05 ml의 첨가에 의해 가시화한다. 상기 중화 항체 역가를 하기 정의된 바와 같은 카버(Karber) 공식을 사용하여 계산한다:

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

<108> 상기 식에서,

<109> d는 100% 중화를 제공하는 희석물(즉 6 개의 음성 복제물, 즉 감염 징후를 나타내지 않는 복제물)을 나타내고

<110> f는 로그 10의 희석인자(예를 들어 1:4의 희석인자, f=0.6)를 나타내고,

<111> N은 복제물/희석물의 수(N=6)를 나타내고,

<112> X는 희석물 d를 제외하고, 감염의 징후를 나타내지 않는 웰의 총수를 나타낸다.

<113> 바이러스 검출의 한계는 10 SN50(즉 1.0 log<sub>10</sub>SN50)이다.

<114> 중화에 사용된 바이러스 균주는 DEN1 16007, DEN2 16681, DEN3 16562 또는 DEN4 1036 균주이다.

<115> 대조용을 위해서, 초기 바이러스 희석물을 제 적정하였다.

<116> 상기 SN50 시험에서 측정된 중화 역가와 PRNT50 시험에서 통상적으로 측정된 중화 역가 간의 상관성은 log<sub>10</sub>PRNT50 = log<sub>10</sub>SN50 + 0.2이다.

## 1.2 동시 면역화의 평가

<118> 같은 연령 및 중량의 4 마리 원숭이 2 그룹을 면역화하였다(표 2 참조).

<119> 상기 면역화를 CYD DEN 1 내지 4 혈청형 각각에 대해 상기 4가 백신의 경우 10<sup>5</sup> CCID<sub>50</sub>의 양으로, 상기 1가 VDV-2의 경우 10<sup>4</sup> CCID<sub>50</sub>의 양으로 23G1 바늘을 사용하여, 팔에 피하로 수행하였다.

## 표 2

<120> 그룹의 조성 및 면역화 프로토콜

그룹	원숭이	
	면역화	
	D0	D56
그룹 1	1가 VDV 2	4가 뎅기열 1234 키메리백스
그룹 2	4가 뎅기열 1234 키메리백스	4가 뎅기열 1234 키메리백스

<121> 1 회 면역화(D0+28) 및 2 회 면역화(D56+28) 후에 획득된 면역원성 결과를 표 3에 제공한다.

<122> 바이러스 혈증 결과를 표 4에 제공한다.

표 3

SN50 중화 역가(단위 1/희석)

ID	원숭이		J0+28				J56+28			
	J0	J56	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4
AM762	VDV 2	CYD 1234	10	501	-	10	63	1005	63	200
AM839			-	802	-	-	80	1271	63	504
AM905			20	158	-	-	318	1010	252	506
AN011			13	1005	-	-	252	1271	319	1010
기하 평균			11	503	<10	<10	142	1131	134	477
AM496	CYD 1234	CYD 1234	50	-	16	32	100	40	80	252
AM645			-	-	13	31	16	-	-	63
AM766			-	-	-	32	20	-	-	80
AM813			25	-	-	13	63	13	20	63
기하 평균			13	<10	<10	25	38	11	14	95

&lt;123&gt;

/-: 역가&lt;10

표 4

바이러스 혈증 분석(단위:log10geq/ml)

		1차 면역화										추가 접종									
		J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J58	J59	J60	J61	J62	J63	J64	J65	J66		
1 초기 VDV2 추가 접종 CYD 1,2,3,4	AM762	<2.7	<2.7	<2.7	<2.7	4.77	4.89	4.84	4.47	<2.7	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2		
	AM839	5.11	4.51	4.19	4.19	4.56	3.69	<2.7	<2.7	<2.7	4.98	4.98	4.43	3.79	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2		
	AM905	<2.7	<2.7	<2.7	<2.7	4.16	4.31	4.16	3.50	4.14	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2		
	AN011	<2.7	<2.7	3.75	4.29	4.35	4.22	3.51	<2.7	3.28	3.99	3.99	3.22	3.39	<3.2	<3.2	<3.2	4.08	4.32		
										3.49	3.49	<3.2	<3.2	3.42	3.42	3.51	3.51	3.69	3.69		
2 초기 CYD 1,2,3,4 추가 접종 CYD 1,2,3,4	AM496	4.21	3.36	3.71	4.15	3.74	<3.1	3.58	<3.1	<3.1	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2		
	AM645	4.21	3.61	2.92	3.57	3.65	3.24	<3.1	3.47	3.47	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2		
	AM766	3.97	3.06	3.38	4.13	3.80	3.73	<3.1	<3.1	<3.1	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2		
	AM813	4.81	4.60	3.77	<3.1	<3.1	<3.1	<3.1	<3.1	<3.1	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2		

CYD1
CYD4
VDV2

&lt;125&gt;

간단히, 상기 결과를 하기와 같이 요약할 수 있다:

<126> -본 발명에 따른 투여 방법은 4가 백신에 의한 2 개의 동일한 면역화를 포함하는 시스템에 의해 획득되는 중화 항체 반응의 정성적 및 정량적 증가를 일으킨다.

<127> -초기 1가 VDV2 면역화 후에 수행된 하나의 CYD-1,2,3,4 면역화는 4가 백신의 2 개의 면역화를 포함하는 시스템과 달리, 모든 원숭이에서 상기 4 가지 혈청형에 대해 높은 수준의 반응을 유도한다.

<128> -예상한 바와 같이, VDV2를 사용하여 수행된 초기 면역화는 일부 동물에서 혈청형 1 및 4에 대한 낮은 교차 반응성과 함께, 혈청형 2에 대해 거의 독점적으로 지향되는 반응을 유도한다.

<129> -바이러스혈증은 초기 면역화 후 VDV2에 의해 관찰되며, 두 번째 투여(b) 후 CYD-4에 의해 우세하게 야기된다(그림 1). 경험이 없는 동물에서 4가 백신에 의한 1차 면역화 후에 유도된 바이러스혈증에서 현저한 차이는 관찰되지 않았다(그림 2). 따라서 본 발명에 의해 제안된 시스템은 상기 두 번째 투여 후에 혈청형 1, 3 및 4의 바이러스혈증의 출현을 조장하지 않는다는 결론을 내릴 수 있다.

<130> 따라서 본 실시예는 본 발명에 따른 면역화 방법이 템기열 백신 바이러스의 안전성을 불리하게 해치지 않으면서 그의 면역원성을 개선함을 나타낸다.

<131> 본 원에 인용된 모든 공보들은 그 내용 전체가 참고로 인용된다.

## 서 열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> Sanofi Pasteur

<120> Method of Immunization against the 4 serotypes of Dengue fever

<130> PM 0608

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 10735

<212> DNA

<213> Dengue virus

<400> 1

agtgttagt ctacgtggac cgacaagaac agtttcaaat cggaagcttg cttaacgtag 60

ttcttaacagt tttttattag agagcagatc tctgtatgtc aaccaacgaa aaaagacggg 120

tcgaccgtct ttcaatatgc tgaaacgcgc gagaaaccgc gtgtcaactg tttcacagtt 180

ggcgaagaga ttctcaaaag gattgctctc aggccaagga cccatgaaat tggtgatggc 240

tttcatagca ttcttaagat ttcttagccat acccccaaca gcaggaattt tggcttagatg 300

gggctcattc aagaagaatg gagcgattaa agtgttacgg ggttcaaga gagaaatctc 360

aaacatgcta aacataatga acaggaggaa aagatccgtg accatgtcc ttatgtcgct 420

gccccacagcc ctggcgttcc atctgacgac acgaggggga gagccgcata tggatgttag 480

caagcagggaa agaggaaagt cactttgtt caagacctct gcaggtgtca acatgtgcac 540

cctcattgcg atggatttg gtagatgtg tgaggacacg atgaccata aatgcccccg 600

gatcactgag gcgaaaccag atgacgttga ctgttgtgc aatgccacgg acacatgggt 660

gacctatgga acgtgctctc aaactggcga acaccgacga gacaaacgtt ccgtcgatt 720

ggccccacac gtggggcttg gcctagaaac aagagccaa acgtggatgt cctctgaagg 780  
 tgcttggaaa cagatacaaa aagttagagac ttgggctctg agacatccag gattcacgg 840  
 gatagccctt ttcttagcac atgccatagg aacatccatc acccagaaag ggatcattt 900  
 catttgctg atgctggtaa caccatctat ggccatgcga tgcgtggaa taggcaacag 960  
 agacttcgtg gaaggactgt caggagcaac atgggtggat gtggtactgg agcatggaag 1020  
 ttgcgtcacc accatggcaa aaaacaaacc aacactggac attgaactct tgaagacgga 1080  
 ggtcacaaac cctgcagttc tgcgtaaatt gtgcattgaa gctaaaatataaaacaccac 1140  
 caccgattcg agatgtccaa cacaaggaga agccacactg gtgaaagaac aagacgcgaa 1200  
 ctttgtgtgc cgacgaacgt tcgtggacag aggctggggc aatggctgtg ggctattcgg 1260  
 aaaaggtagt ctaataacgt gtgc当地tt taagtgtgtg acaaaactag aaggaaagat 1320  
 agctcaatat gaaaacctaa aatattcagt gatagtcacc gtccacactg gagatcagca 1380  
 ccaggtggaa aatgagacta cagaacatgg aacaactgca accataacac ctcaagctcc 1440  
 tacgtcgaa atacagctga ccgactacgg aacccttaca tttagatgtt cacctaggac 1500  
 agggcttagat tttaacgaga tgggtttgt gacaatgaaa aagaatcat ggcttgc当地 1560  
 caaacagtgg ttcttagact taccactgcc ttggacctct gggctttaa catccaaaga 1620  
 gacttggAAC agacaagatt tactggtcac atttaagaca gctcatgcaa agaagcagga 1680  
 agtagtcgtt ctaggatcac aagaaggagc aatgcacact ggcgtactg gagcgacaga 1740  
 aatccaaacg tcaggaacga caacaattt cgcaggacac ctaaaatgca gactaaaaat 1800  
 ggacaaacta actttaaaag ggtatgtcata tgtgtatgtc acaggctcat tcaagttt 1860  
 gaaagaagtg gctgagaccc agcatggAAC tggctgggtc caggttaat atgaagggAAC 1920

agacgcacca tgcaagattc cctttcgac ccaagatgag aaaggagcaa cccagaatgg 1980  
 gagattaata acagccaacc ccatagtcac tgacaagaa aaaccagtca atattgagc 2040  
 agaaccaccc ttgggtgaga gctacatcg ggttaggagca ggtgaaaaag cttgaaact 2100  
 aagctggttc aagaaaggaa gcagcatagg gaaaatgtt gaagcaactg cccgaggagc 2160  
 acgaaggatg gccattctgg gagacaccgc atggacttc gttctatag gaggagtgtt 2220  
 cacgtctatg gaaaaactgg tacaccaggt ttttggact gcatatggag ttttggtag 2280  
 cggagttct tggaccatga aaataggaat agggattctg ctgacatggc taggattaaa 2340  
 ttcaaggaac acgtccctt cggtgatgtg catgcagtt ggcattgtca cactgtacct 2400  
 aggagtcatg gtcaggcag attcggatg tgtaatcaac tggaaaggca gagaacttaa 2460  
 atgtggaagc ggcatttttgcactaatga agttcacact tggacagagc aatacaaatt 2520  
 ccaggctgac tcccccaaga gactatcgc agccattggg aaggcatggg aggagggtgt 2580  
 gtgtggaatc cgatcagcca ctcgtctcgaa acatcatg tggaaacaaa tatcaaatga 2640  
 attgaaccac atcctacttg aaaatgacat gaaattaca gtggcgtgg gagacgttag 2700  
 tggaatctt gccaaggaa aaaaaatgtat taggcacaa cccatggaac acaaatactc 2760  
 gtggaaaagc tggggaaaag ctaaatcat aggagcggat gtacagaaca ccacccat 2820  
 catcgacggc ccaaacaccc cagaatgcc tgcacatcaa agacatggaa atattggaa 2880  
 agtagaggac tatggatttg ggatttcac gacaaacata tggtgaaat tgcgtgactc 2940  
 ctacacccaa gtatgtgacc accggctgat gtcagctgcc attaaggaca gcaaggcgt 3000  
 ccatgctgac atgggtact ggatagaaag tgaaaagaac gagacatggaa agttggcgt 3060

agcctcctt atagaagtta agacatgcat ctggccaaa tcccacactc tatggagcaa 3120  
 tggagttctg gaaagtgaaa tgataattcc aaagatataat ggaggaccaa tatctcagca 3180  
 caactacaga ccagcatatt tcacacaaac agcagggccg tggcacctag gcaagttgga 3240  
 actagatttc gatTTTGTG aaggtaccac agttgttgat gatgaacatt gtggaaatcg 3300  
 aggaccatct ctcagaacca caacagtac aggaaagata atccatgaat ggtgctgcag 3360  
 atcttgtacg ctacccccc tacgttcaa agggaaagac gggtgttggt acggcatgga 3420  
 aatcagacca gtgaaggaca aggaagagaa cctggtaag tcaatggtct ctgcagggtc 3480  
 aggagaagtg gacagtttt cactaggact gctatgcata tcaataatga ttgaagaagt 3540  
 gatgagatcc agatggagca aaaaaatgct gatgactgga acactggctg tttccctct 3600  
 tcttataatg ggacaattga catggagtga tctgatcagg ttatgttata tggttggagc 3660  
 caacgcttca gacaagatgg ggtggaaac aacgtaccta gcttaatgg ccacttcaa 3720  
 aatgagacca atgttcgccc tcggctatt attcgcaga ctaacatcta gagaagttct 3780  
 tcttcitaca atggcttga gcctggggc atccgtggag ctaccaagtt ccctagagga 3840  
 gctggggat ggacttgcaa taggcatcat gatgttgaaa ttattgactg attttcagtc 3900  
 acaccagcta tggctactc tgctatcctt gacatttatt aaaacaactt tttcattgca 3960  
 ctatgcatgg aagacaatgg ctatggact gtcaattgta tctctttcc ctatgcct 4020  
 gtccacgacc tctaaaaaa caacatggct tcgggtgctg ttggatctc ttggatgcaa 4080  
 accactaccc attttctta taacagaaaa caaaatctgg ggaaggaaga gttggccct 4140  
 caatgaagga attatggctg ttggaatagt tagtattcta ctaagttcac tttaaaaaa 4200  
 tgatgtgccc ctagccggcc cattaatgc tggaggcatg ctaatagcat gttatgtcat 4260

atccggaagc tcagctgatt tatcactgga gaaagcggct gaggtctcct gggaggaaga 4320  
 agcagaacac tcagggcct cacacaacat actagtagag gttcaagatg atgaaaccat 4380  
 gaagataaaa gatgaagaga gagatgacac gtcaccatt ctccctaaag caactctgct 4440  
 ggcagtctca ggggtgtacc caatgtcaat accagegacc cttttgtgt ggtattttg 4500  
 gcagaaaaag aaacagagat caggagtgt atgggacaca cccagccccc cagaagtgg 4560  
 aagagcagtt ctgtatgtat gcatctatag aatttgcaa agaggactgt tggcaggtc 4620  
 ccaagtagga gtaggagttt tccaagaagg cgtgttccac acaatgtggc acgtcactag 4680  
 gggagctgtc ctcatgtatc aaggaaaaag gctggaacca agctggcca gtgtcaaaaa 4740  
 agacttgate tcataatggag gaggttggag gttcaagga tcctggaaaca cgggagaaga 4800  
 agtacaggtg attgctgttg aaccggaaa aaacccaaa aatgtacaaa caacgcccgg 4860  
 taccttcaag acccctgaag gctaagttgg agccatagcc ttagacttta aacctggcac 4920  
 atctggatct cccatcgtaa acagagaggg aaaaatagta ggtctttatg gaaatggagt 4980  
 ggtgacaaca agcggactt acgttagtgc catagctaa gctaaggcat cacaagaagg 5040  
 gcctctacca gagattgagg acaaggtgtt taggaaaaga aacttaacaa taatggacct 5100  
 acatccagga tcggaaaaaa caagaagata cttccagcc atagtcgtg aggcataaaa 5160  
 aaggaagctg cgcacgctaa tcctagctcc cacaagagtt gtgcgttctg aaatggcaga 5220  
 ggcactcaag ggagtgc当地 taaggtatca gacaacagca gtgaagagtg aacacacagg 5280  
 aaaggagata gttgacctta tgtgccacgc cacttcacc atgcgcctcc tgtctcccg 5340  
 gagagttccc aattataaca tgattatcat ggtatgaagca cacttcaccg atccagccag 5400

catagcagcc agagggtaca tctcaacccg agtgggtatg ggtgaagcag ctgcgatctt 5460  
  
tatgacagcc actccccag gatcggtgga ggccttcca cagagcaatg caattatcca 5520  
  
agatgaggaa agagacattc ctgagagatc atggaactca ggctatgact ggatcactga 5580  
  
ttttccaggt aaaacagtct gggttgtcc aagcatcaa tcagggaaatg acattgcaa 5640  
  
ctgtttaaga aaaaacggga aacgggtat ccaattgagc agaaaaacct ttgacactga 5700  
  
gtaccagaaa acaaaaaaca acgactggga ctatgtcgac acaacagaca tttccgaaat 5760  
  
gggagcaaat ttccggcccg acaggtaat agacccaagg cggtgtctga aaccggtaat 5820  
  
actaaaagat ggtccagagc gcgtcattct agccggaccg atgccagtga ctgtggccag 5880  
  
tgccgcccag aggagaggaa gaatttggaa gAACCAAAAC aaggaaggtg atcagtatat 5940  
  
ttacatggga cagccttaa aaaatgatga ggaccacgct cattggacag aagcaaagat 6000  
  
gctccttgac aatataaaca caccagaagg gattatccca gcccttttgc agccggagag 6060  
  
agaaaaagagt gcagctatag acggggataa cagactgcgg ggtgaagcaa ggaaaacgtt 6120  
  
cgtggagctc atgagaagag gggatctacc agtctggcta tcctacaaag ttgcctcaga 6180  
  
aggcttccag tactccgaca gaaggtgggg cttcgatggg gaaaggaaaca accaggttt 6240  
  
ggaggagaac atggacgtgg agatctggac aaaagaagga gaaagaaaga aactacgacc 6300  
  
tcgctggttt gacgccagaa catactctga cccactggct ctgcgcgagt ttaaagagtt 6360  
  
tgcagcagga agaagaagcg tctcaggtga cctaataatgaa aacttccaca 6420  
  
acatttgacg caaaggcccc agaatgctt ggacaacttg gtcatgttgc acaattccga 6480  
  
acaaggagga aaagcctata gacatgctat ggaagaactg ccagacacaa tagaaacgtt 6540  
  
gatgctccta gccttgatag ctgtgttgac tggggagtg acgctttct tcctatcagg 6600

aagaggctca gaaaaacat ctatcggtt actctgcgtg atggctcaa gcgcactgtt 6660  
 atggatggcc agtgtggagc cccattggat agcggctcc atcatactgg agttctttct 6720  
 gatggtaactg ctatattccag agccagacag acagcgcact ccacaggaca accagctagc 6780  
 atatgtggtg ataggtctgt tattcgtat attgacagtgc agatggatt 6840  
 attggaaacc acaaagaaag acctggggat tggccatgtt gctgctgaaa accaccacca 6900  
 tgctacaatg ctggacgtag acctacatcc agcttcagcc tggaccctct atgcagtggc 6960  
 cacaacaatc atcaatccta tcatgagaca cacaattgaa aacacaacgg caaatatttc 7020  
 cctgacagcc atcgaaacc aagcagctat attgatggat cttgacaagg gatggccat 7080  
 atcgaagatg gacataggag ttccacttct cgccttgggg tgctattccc aagtgaatcc 7140  
 gctgacaactg atagcggcag tattgatgtc agtagctcat tacgccataa ttggacctgg 7200  
 actgcaagca aaagctacta gagaagctca aaaaagaaca gggctggaa taatgaaaaa 7260  
 tccaaactgtc gacgggattt tgcaataga ctttagatccc gtggttacg atgcaaaatt 7320  
 tgaaaaacag ctaggcaaa taatgttgc gatacttgc acatcacaga ttctttgtat 7380  
 gcggactaca tggccttgt gtgaatccat cacattggct actggacctc tgaccactct 7440  
 ttgggaggga tctccaggaa aattctggaa caccacaata gcggtatcca tggcaacat 7500  
 tttcaggggg agttatctag caggagcagg tctggccttc tcattatgtt aatctctagg 7560  
 aggaggtagg agaggcacgg gagcccaagg ggaaacactg ggagaaaaat ggaaaagaca 7620  
 actaaaccaa ctgagcaagt cagaattcaa tacttacaag aggagtggtt ttatggaggt 7680  
 ggatagatcc gaagccaaag agggactgaa aagaggagaac acaaccaac acgcagtatc 7740

gagaggaacg gccaaactga ggtggtcgt ggagaggaac cttgtgaaac cagaaggaa 7800  
 agtcatacgtc ctcgggtgtg gaagaggtgg ctggcatat tattgcgtg ggctgaagaa 7860  
 agtcacagaa gtgaaaggat acacaaaagg aggacctgga catgaggaac caatccaaat 7920  
 ggcgacccat ggttggacc tagtaaggct gcactccgga aaagatgtat ttttataacc 7980  
 acctgagaaa tgtgacaccc ttttgtgtga tattggtag tcctctccga acccaactat 8040  
 agaggaagga agaacgttac gtgttctgaa aatggtgaa ccatggctca gagggaaacca 8100  
 atttgcata aaaattctaa atccctatat gccgagcgtg gtagaaactc tggaacaat 8160  
 gcaaagaaaa catggaggaa tgcttagtgcg aaacccactc tcaagaattt ccacccatga 8220  
 aatgtactgg gttcatgtg gaacagggaa cattgtgtca gcagtaaaca tgacatctag 8280  
 aatgttgcta aatcggttca caatggctca caggaagcca acatatgaaa gagacgtgga 8340  
 cttaggcgtt ggaacaagac atgtggcagt agaaccagag gtagccaacc tagatatcat 8400  
 tggccagagg atagagaata taaaaatga acataagtca acatggcatt atgatgagga 8460  
 caatccatac aaaacatggg cctatcatgg atcatatgag gttaaaggcat caggatcgcc 8520  
 ctcatccatg gtcaatggcg tggtagatt gctcacaaa ccatggatg ttatccccat 8580  
 ggtcacacaa atagccatga ctgataccac acccttgga caacagaggg tggtaaaga 8640  
 gaaagttgac acgcccacac caaaagcaaa acgtggcaca gcacaattt tggaagtgac 8700  
 agccagggtgg ttatgggtt tccttctag aaacaaaaaa cccagaattt gcacaagaga 8760  
 ggagtttaca agaaaagtta ggtcaaacgc agctattgga gcagtgtcg ttgtatgaaaa 8820  
 tcaatggaac tcggcaaaag aagcagtggaa agacgaacgg ttctggaaac ttgtccacag 8880  
 agagagggag cttcataaac agggaaatg tgccacgtgt gtctacaata tgatggggaa 8940

gagagagaaaa aaatttaggag agttcgaaaa ggcaaaagga agtcgtgcaa tatggtacat 9000  
 gtggttggaa gcacgcttcc tagagtttga agcccttgggt ttcatgaatg aagatcactg 9060  
 gttcagtaga gagaattcac tcagtggagt ggaaggagaa ggactccaca aacttggata 9120  
 catactcaga gacatatcaa ggattccagg ggggaacatg tatgcagatg acacagccgg 9180  
 atgggacaca agaataacag aggatgatct ccagaatgag gctaaaatca ctgacatcat 9240  
 ggagcccgaa catgccctgc tggctacgtc aatcttaag ctgacctacc aaaataaggt 9300  
 ggttaagggtg cagagaccag caaaaaatgg aaccgtgatg gatgttatat ccagacgtga 9360  
 ccagagaggc agtggacagg ttggaactta tggcttaaac acttcacca acatggaggc 9420  
 ccaactgata agacaaatgg agtctgaggg aatctttta cccagcgaat tggaaacccc 9480  
 aaatctagcc ggaagagttc tcgactggtt ggaaaaatat ggtgtcgaaa ggctgaaaag 9540  
 aatggcaatc agcggagatg actgtgtggt gaaaccaatt gatgacaggt tcgcaacagc 9600  
 cttaacagct ttgaatgaca tggaaaagt aagaaaagac ataccacaat ggaaaccttc 9660  
 aaaaggatgg aatgattggc aacaagtgcc tttctgttca caccacttcc accagctaat 9720  
 tatgaaggat gggagggaga tagtggtgcc atgccgcaac caagatgaac ttgtggggag 9780  
 ggccagagta tcacaaggcg cggatggag cctgagagaa accgcatgcc taggcaagtc 9840  
 atatgcacaa atgtggcagc tcatgttattt ccacaggaga gacctgagac tggcggctaa 9900  
 cgctatttgt tcagccgttc cagttgattt ggtcccaacc agccgcacca cctggtcgat 9960  
 ccatgccccat caccaatgga tgacaacaga agacatgtt a ctagtatgga atagggtctg 10020  
 gatagaggaa aacccatgga tggaggataa gactcatgtg tccagttggg aagaagtcc 10080

atacctagga aagagggaag atcagtgggt gggatccctg ataggcttaa cagcaaggc 10140

cacctggcc actaatatac aagtggccat aaaccaagtg agaaggctca ttgggaatga 10200

gaattatcta gattacatga catcaatgaa gagattcaag aatgagagtg atcccgagg 10260

ggcactctgg taagtcaaca cattcacaaa ataaaggaaa ataaaaaatc aaatgaggca 10320

agaagtctagg ccagattaag ccatagtagc gtaagagcta tgctgcgt gggccgtc 10380

caaggacgta aatgaagtc aggccgaaag ccacggttg agcaagccgt gctgcgtg 10440

gctccatcgt gggatgtaa aaacccggga ggctgcaacc catggaagct gtacgcatgg 10500

ggtagcagac tagtggttag aggagacccc tcccaagaca caacgcagca gcggggccca 10560

acaccagggg aagctgtacc ctgggtgtaa ggactagagg ttagaggaga ccccccgcgt 10620

aacaataaac agcatattga cgctggaga gaccagagat cctgctgtct ctacagcatc 10680

attccaggca cagaacgcca gaaaatggaa tggtgctttt gaatcaacag gttct 10735

<210> 2

<211> 10723

<212> DNA

<213> Dengue virus

<400> 2

agtgttttgtt ctacgtggac cgacaaagac agatttttg agggagctaa gctcaatgt 60

gttctaacag ttttttaatt agagagcaga tctctgtatgtataaccaacg gaaaaaggcg 120

aaaaaacacgc cttcaatat gctgaaacgc gagagaaacc gctgtcgac tgtgcaacag 180

ctgacaaaga gattctcact tggaaatgtcg cagggacgag gaccataaa actgttcatg 240

gccctggtgg ctttccttcg tttcctaaca atcccaccaa cagcaggat attgaagaga 300

tgggaaacaa ttaaaaaatc aaaagctatt aatgtttga gagggttcag gaaagagatt 360

ggaaggatgc tgaacatctt gaataggaga cgcagatctg caggcatgtat cattatgctg 420  
 attccaacag tgaatggcggtt ccatttaacc acacgtaacg gagaaccaca catgatcgctc 480  
 agcagacaag agaaaggaa aagtcttctg tttaaaacag aggttggcgt gaacatgtgt 540  
 accctcatgg ccatggacct tggtaatttgc tgtgaagaca caatcacgtt caagtgtccc 600  
 ctttcaggc agaatgagcc agaagacata gactgttggt gcaactctac gtccacgtgg 660  
 gtaacttatg ggacgtgtac caccatggaa gaacatagaa gaaaaaaag atcagtggca 720  
 ctcgttccac atgtgcgaat gggactggag acacgaactg aaacatggat gtcatacgaa 780  
 ggggcctgga aacatgtcca gagaattgaa acttggatct tgagacatcc aggcttcacc 840  
 atgatggcag caatcctggc atacaccata ggaacgacac atttccaaag agccctgatt 900  
 ttcatcttac tgacagctgt cactccttca atgacaatgc gttgcataagg aatgtcaaat 960  
 agagactttg tggaaagggtt ttcaggagga agctgggttg acatagttt agaacatggaa 1020  
 agctgtgtga cgacgatggc aaaaaacaaa ccaacattgg attttgaact gataaaaaca 1080  
 gaagccaaac agcctgccac cctaaggaag tactgtatag aggcaaagct aaccaacaca 1140  
 acaacagaat ctgcgtgccc aacacaaggg gaacccagcc taaatgaaga gcaggacaaa 1200  
 aggttcgtct gcaaacactc catggtagac agaggatgg gaaatggatg tggactat 1260  
 ggaaaggag gcattgtgac ctgtgctatg ttcagatgca aaaagaacat ggaaggaaaa 1320  
 gttgtgcaac cagaaaactt ggaatacacc attgtgataa cacctcactc agggaaagag 1380  
 catgcagtgcg gaaatgacac agggaaacat ggcaaggaaa tcaaaataac accacagagt 1440  
 tccatcacag aagcagaatt gacaggttat ggcactgtca caatggagtg ctctccaaga 1500

acggccctcg acttcaatga gatgggttg ctgcagatgg aaaataaagc ttggctggtg	1560
cacaggcaat gttccataga cctgcgtta ccatggtgc ccggagcgga cacacaagag	1620
tcaaattgga tacagaagga gacattggtc actttcaaaa atccccatgc gaagaaacag	1680
gatgttgttg ttttaggatc ccaagaaggg gccatgcaca cagcaattac aggggccaca	1740
gaaatccaaa tgtcatcagg aaacttactc ttcacaggac atctcaagtgcaggctgaga	1800
atggacaagc tacagctaa aggaatgtca tactctatgt gcacaggaaa gttaaagt	1860
gtgaaggaaa tagcagaaac acaacatgga acaatagttc tagagtgca atatgaaggg	1920
gacggctctc catgcaagat cccttttagt ataatggatt tggaaaaaag acatgtctt	1980
ggtcgcctga ttacagtcaa cccattgtg acagaaaaaag atagccagt caacatagaa	2040
gcagaacctc catttggaga cagctacatc atcataggag tagagccggg acaactgaag	2100
ctcaacttgtt ttaagaaagg aagtctatc gccaatgtt tgagacaac aatgaggggg	2160
gcgaagagaa tggccatccc aggtgacaca gcctggatt ttggatcctt gggaggagt	2220
tttacatcta taggaaaggc tctccaccaa gtcattggag caatctatgg agctgcctc	2280
agtgggttt catggactat gaaaatcctc ataggagtca ttatcacatg gataggaatg	2340
aattcacgca gcacccact gtctgtgaca ctagtattgg tggaaattgt gacactgtat	2400
ttggaggtca tggcgcaggc cgatagtggc tgcgttgta gctggaaaaa caaagaactg	2460
aatgtggca gtggatccc catcacagac aacgtgcaca catggacaga acaatacaaa	2520
ttccaaccag aatccccatc aaaacttagct tcagctatcc agaaagccca tgaagaggac	2580
atttgtggaa tccgctcagt aacaagactg gagaatctga tgtggaaaca aataaacacca	2640
gaattgaatc acattctatc agaaaatgag gtgaagttaa ctattatgac aggagacatc	2700

aaaggaatca tgccaggcagg aaaacgatct ctgcggccctc agcccaactga gctgaagtat 2760  
  
tcatggaaaa catggggcaa agcaaaaaatg ctctctacag agtctcataa ccagaccttt 2820  
  
ctcattgatg gccccgaaac agcagaatgc cccaaacacaa atagagcttg gaattcgtt 2880  
  
gaagttgaag actatggctt tggagtattc accaccaata tatggctaaa attgaaagaa 2940  
  
aacaggatg tattctgcga ctcaaaactc atgtcagcgg ccataaaaga caacagagcc 3000  
  
gtccatgccg atatgggta ttggatagaa agtgcactca atgacacatg gaagatagag 3060  
  
aaaggcttt tcattgaagt taaaaactgc cactggccaa aatcacacac cctctggacc 3120  
  
aatggagtgc tagaaagtga gatgataatt ccaaagaatc tcgctggacc agtgtctcaa 3180  
  
cacaactata gaccaggcta ccatacacaa ataacaggac catggcatct aggttaagctt 3240  
  
gagatggact ttgatttctg tcatggaca acagtggtag tgactgagga ctgccaat 3300  
  
agaggaccct ctttggaaac aaccactgcc tctggaaaac tcataacaga atggtgctgc 3360  
  
cgatcttgca cattaccacc gctaagatac agaggtgagg atgggtgctg gtacggatg 3420  
  
gaaatcagac cattgaagga gaaagaagag aatttggta actccttggt cacagctgga 3480  
  
catggcagg tcgacaactt ttcaacttagga gtcttggaa tggcattgtt cctggaggaa 3540  
  
atgcttagga cccgagtagg aacgaaacat gcaatactac tagttgcagt ttctttgtg 3600  
  
acattgatca caggaaacat gtcctttaga gacctggaa gagtgatggt tatggtaggc 3660  
  
gccactatga cggatgacat aggtatggc gtgacttac ttgcctact agcagccttc 3720  
  
aaagttagac caactttgc agctggacta ctcttgagaa agctgacctc caaggaattg 3780  
  
atgatgacta ctataggaat tgtactcctc tcccagagca ccataccaga gaccatttt 3840

gagttgactg atgcgttagc ctaggcattt atggcctca aaatggtagt aaatatggaa 3900  
 aagtatcaat tggcagtgc tatcatggct atcttgctcg tcccaaaccgc agtgatatta 3960  
 caaaacgcattt gaaagttagt ttgcacaata ttggcagtgg tgccgttcccccactgttc 4020  
 ttaacatcct cacagcaaaa aacagattgg ataccattttt cattgacgttcaaaggctc 4080  
 aatccaaacag ctatccctt aacaaccctc tcaagaacca gcaagaaaag gagctggcca 4140  
 ttaaatgagg ctatcatggc agtcgggatg gtgagcattt tagccagttc tctctaaaaa 4200  
 aatgatatttccatgacagg accatttttg gctggaggc tcctcactgt gtgctacgt 4260  
 ctcactggac gatcgccga ttggaaactg gagagagcag ccgatgtcaa atggaaagac 4320  
 caggcagaga tatcaggaag cagtccatc ctgtcaataa caatatcaga agatggtagc 4380  
 atgtcgataa aaaatgaaga ggaagaacaa acactgacca tactcattttt aacaggattt 4440  
 ctgggtatct caggactttt tcctgtatca ataccaatca cggcagcagc atggcacgt 4500  
 tggaaagtga agaaacaacg ggccggagta ttgtggatg ttccttcacc cccacccatg 4560  
 gaaaggctg aacttggaga tggagccat agaattaaacg aaaaaggat tcttggat 4620  
 tcccaatcg gagccggagt ttacaaagaa ggaacattcc atacaatgtt gcatgtcaca 4680  
 cgtggcgctg ttctaatgca taaaggaaag aggatttttttcaacatggc ggacgtcaag 4740  
 aaagacctaa tatcatatgg aggaggctgg aagttagaaag gagaatggaa ggaaggagaa 4800  
 gaagtccagg tattggact ggagcctgaa aaaaatccaa gagccgttca aacgaaacct 4860  
 ggtctttca aaaccaacgc cgaaacaata ggtgttgtat ctctggactt ttctccgttga 4920  
 acgtcaggat ctccaaattt cgacaaaaaa ggaaaaggatg tgggtcttta tgtaatggt 4980  
 gttgttacaa ggagtggagc atatgtgagt gctatagccc agactgaaaa aagcattgaa 5040

gacaaccagg agatcgaaga tcacat ttc cgaaagagaa gactgaccat catggaccc 5100  
 cacccaggag cggaaagac gaagagatc cttccggca tagtcagaga agctataaaa 5160  
 cgggttga gaacattaat cttggcccc actagagttg tggcagctga aatggaggaa 5220  
 gcccttagag gactccaat aagataccag accccagccca tcagagctga gcacaccggg 5280  
 cggagattt tggaccta atgtcatgcc acatttacca tgaggctgt atcaccagg 5340  
 agagtgc当地 actacaacct gattatcatg gacgaagccc atttcacaga cccagcaagt 5400  
 atagcagcta gaggatacat ctcaactcga gtggagatgg gtgaggcagc tgggat tttt 5460  
 atgacagcca ctccccggg aagcagagac ccatttcctc agagcaatgc accaatcata 5520  
 gatgaagaaa gagaatccc tgaacgctcg tggattccg gacatgaatg ggtcacggat 5580  
 tttaaggaa agactgttgc ttgcgttcca agtataaaag cagaaatga tatagcagct 5640  
 tgctgagga aaaatggaaa gaaagtgata caactcagta ggaagaccc ttgattctgag 5700  
 tatgtcaaga ctagaaccaa tgattggac ttctgttca caactgacat ttcaaaaatg 5760  
 ggtgccaatt tcaaggctga gagggtata gacccagac gctgcatgaa accagtata 5820  
 ctaacagatg gtgaagagcg ggtgattctg gcaggacca tggcagtgac ccactctg 5880  
 gcagcacaaa gaagagggag aataggaaga aatccaaaaa atgagaatga ccagtacata 5940  
 tacatggggg aacctctgga aatgatgaa gactgtgcac actggaaaga agctaaaatg 6000  
 ctcttagata acatcaacac gccagaagga atcatttca gcatgtcga accagagcgt 6060  
 gaaaagggtgg atgccattga tggcgaatac cgcttgagag gagaagcaag gaaaacctt 6120  
 gttagacttaa tgagaagagg agacctacca gtctggttgg cctacagagt ggcagctgaa 6180

ggcataact acgcagacag aaggtgggt tttgatggag tcaagaacaa ccaaatccta 6240  
 gaagaaaacg tggaaaggta aatctggaca aaagaagggg aaaggaagaa attgaaaccc 6300  
 agatggttgg atgctaggat ctattctgac ccactggcgc taaaagaatt taaggaattt 6360  
 gcagccggaa gaaagtctct gaccctgaac ctaatcacag aaatggtag gctcccaacc 6420  
 ttcatgactc agaaggcaag agacgcactg gacaacttag cagtgcgtca cacggctgag 6480  
 gcaggtggaa gggcgtacaa ccatgctctc agtgaactgc cgagacccct ggagacattg 6540  
 cttttactga cacttctggc tacagtcacg ggagggatct ttttattctt gatgagcga 6600  
 aggggcatag ggaagatgac cctggaaatg tgctgcataa tcacggctag catcctctta 6660  
 tggtacgcac aaatacagcc acactggata gcagctcaa taatactgga gtttttctc 6720  
 atagtttgc ttattccaga acctgaaaaa cagagaacac cccaagacaa ccaactgacc 6780  
 tacgttgtca tagccatcct cacagtggtg gccgcaacca tggcaacga gatgggttcc 6840  
 ctagaaaaaa cgaagaaaga tctcgattt ggaagcatgt caacccagca acccgagagc 6900  
 aacatccctgg acatagatct acgtccctgca tcagcatgga cgctgtatgc cgtggccaca 6960  
 acattttgtta caccaatgtt gagacatagc attgaaaatt cctcagtgaa tgtgtcccta 7020  
 acagctatag ccaaccaagc cacagtgtt atgggtctcg ggaaaggatg gccatgtca 7080  
 aagatggaca tcggagttcc ctttctcgcc attggatgct actcacaagt caacccata 7140  
 actctcacag cagctttt cttattggta gcacattatg ccatcatagg gccaggactc 7200  
 caagcaaaag caaccagaga agctcagaaa agagcagcgg cgggcatcat gaaaaaccca 7260  
 actgtcgatg gaataacagt gattgaccta gatccaatac cttatgatcc aaagttgaa 7320  
 aagcagttgg gacaagtaat gtccttagtc ctctgcgtga ctcaagtatt gatgatgagg 7380

actacatggg ctctgtgtga ggcttaacc ttagctaccg ggcccatctc cacattgtgg 7440  
 gaagggaaatc cagggaggtt ttggaacact accatigcgg tgtcaatggc taacatttt 7500  
 agagggagtt acttggccgg agctggactt ctctttcta ttatgaagaa cacaaccaac 7560  
 acaagaaggg gaactggcaa cataggagag acgctggag agaaatggaa aagccgattg 7620  
 aacgcattgg gaaaaagtga attccagatc tacaagaaaa gtggaatcca ggaagtggat 7680  
 agaaccttag caaaagaagg cattaaaaga ggagaaacgg accatcacgc tgtgtcgca 7740  
 ggctcagcaa aactgagatg gttcggttag agaaacatgg tcacaccaga agggaaagta 7800  
 gtggacctcg gttgtggcag aggaggctgg tcatactatt gtggaggact aaagaatgt 7860  
 agagaagtca aaggcctaac aaaaggagga ccaggacacg aagaacccat cccatgtca 7920  
 acataatgggt ggaatctagt gcgtctcaa agtggagtg acgtttctt catccgcca 7980  
 gaaaagtgtg acacattatt gtgtgacata ggggagtcac cacaaatcc cacagtggaa 8040  
 gcaggacgaa cactcagagt ccttaactta gtagaaaatt ggttgaacaa caacactcaa 8100  
 ttttgcataa agttctcaa cccatatatg ccctcagtc tagaaaaat ggaagcacta 8160  
 caaaggaaat atggaggagc ctttgtgagg aatccactct cacgaaactc cacacatgag 8220  
 atgtactggg tatccaatgc ttccggaaac atagtgtcat cagtgaacat gattcaagg 8280  
 atgttgatca acagattac aatgagatac aagaaagcca cttacgagcc ggatgttgac 8340  
 ctgcggacgc gaacccgtaa catcggtt gaaagtggaa taccaaacct agatataatt 8400  
 gggaaaagaa tagaaaaat aaagcaagag catgaaacat catggcacta tgaccaagac 8460  
 caccataca aaacgtggc ataccatgtt agctatgaaa caaaacagac tggatcagca 8520

tcatccatgg tcaacggagt ggtcaggctg ctgacaaaac cttggacgt tgtccccatg 8580  
 gtgacacaga tggcaatgac agacacgact ccattggac aacagcgcgt tttaaagag 8640  
 aaagtggaca cgagaaccca agaaccgaaa gaaggcacga agaaaactaat gaaaataaca 8700  
 gcagagtggc tttggaaaga attagggaag aaaaagacac ccaggatgtg caccagagaa 8760  
 gaattcacaa gaaagggtgag aagcaatgca gcctggggg ccatattcac tcatgagaac 8820  
 aagtggaaatc cggcacgtga ggctgttcaa gatagtaggt tttggagct ggttgacaag 8880  
 gaaaggaatc tccatcttga aggaaagtgt gaaacatgtg tgtacaacat gatggaaaa 8940  
 agagagaaga agctaggga attcggcaag gcaaaaggca gcagagccat atggtacatg 9000  
 tggcttggag cacgcttctt agagttgaa gccctaggat tcttaatga agatcactgg 9060  
 ttctccagag agaactccct gagtgagtg gaaggagaag ggctgcacaa gctagttac 9120  
 attctaagag acgtgagcaa gaaagaggga ggagcaatgt atgccatgca caccgcagga 9180  
 tgggatacaa aaatcacact agaagaccta aaaaatgaag agatggtaac aaaccacatg 9240  
 gaaggagaac acaagaaact agccgaggcc atttcaaac taacgtacca aaacaagggt 9300  
 gtgcgtgtc aaagaccaac accaagaggc acagtaatgg acatcatatc gagaagagac 9360  
 caaagaggtt gtggacaagt tggcacctat ggactcaata cttcaccaa tatggaagcc 9420  
 caactaatca gacagatgga gggagaagga gtcttaaaa gcattcagca cctaacaatc 9480  
 acagaagaaa tcgctgtgca aaactggta gcaagagtgg ggccgaaag gttatcaaga 9540  
 atggccatca gtggagatga ttgtgttgaa acaccttagt atgacaggtt cgcaagcgt 9600  
 ttaacagctc taaatgacat gggaaagatt aggaaagaca tacaacaatg ggaacctca 9660  
 agaggatgga atgattggac acaagtggcc ttctgttac accatttcca tgagttatc 9720

atgaaagacg gtgcgtact cggtgttcca tgtagaaacc aagatgaact gattggcaga 9780  
 gcccgaaatct cccaaggagc agggtggtct ttgcgggaga cggcctgttt ggggaagtct 9840  
 tacgccccaa tgtggagctt gatgtacttc cacagacgac acctcaggct ggcggcaaat 9900  
 gctatttgct cggcagtacc atcacattgg gttccaacaa gtcaacaac ctggccata 9960  
 catgctaaac atgaatggat gacaacggaa gacatgctga cagtctggaa cagggtgtgg 10020  
 attcaagaaa acccatggat ggaagacaaa actccagttgg aaacatggaa ggaaatccca 10080  
 tacttgggaa aaagagaaga ccaatggtgc ggctcattga ttgggtaac aagcaggccc 10140  
 acctggcaa agaacatcca agcagcaata aatcaagttt gatcccttat aggcaatgaa 10200  
 gaatacacag attacatgcc atccatgaaa agattcagaa gagaagagga agaagcagga 10260  
 gttctgtggt agaaagcaaa actaacatga aacaaggcta gaagtcaggt cggatttaagc 10320  
 catagtagcg aaaaaactat gttacctgtg agccccgtcc aaggacgtt aaagaagtca 10380  
 ggccatcata aatgccatag cttgagtaaa ctatgcagcc ttagctcca cctgagaagg 10440  
 tgtaaaaaat ccgggaggcc acaaaccatg gaagctgtac gcatggcgta gtggactagc 10500  
 ggtaggggaa gaccctccc ttacaaatcg cagcaacaat gggggcccaa ggcgagatga 10560  
 agctgttagtc tcgctggaag gactagaggt tagaggagac ccccccggaaa caaaaaacag 10620  
 catattgacg ctggaaaga ccagagatcc tgctgtctcc tcagcatcat tccaggcaca 10680  
 gaacgccaga aaatggaatg gtgctgttga atcaacaggt tct 10723