

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0087890 (43) 공개일자 2009년08월18일
(51) Int. Cl. <i>A61K 39/12</i> (2006.01) <i>A61P 31/14</i> (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 에프-69367, 에비뉴 폰 파스퇴르 2 (72) 발명자 가이, 브루노 프랑스 리옹 에프-69005, 루에 데스 노이에르스 15비 바반, 베로니크 프랑스 크레폰네 에프-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) 요약

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

량, 장

프랑스 미온스 에프-69780, 루트 데 새인-프리에스
트 118

특허청구의 범위

청구항 1

덴기열 바이러스에 대한 면역화를 위한 1가 백신 및 4가 백신의 제조를 위한 덴기열 백신 바이러스의 용도로서,
 (a) 덴기열의 첫 번째 혈청형에 대한 백신 바이러스를 포함하는 1가 백신의 첫 번째 투여,
 (b) 덴기열의 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 덴기열에 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)TM 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 덴기열 백신 바이러스의 양이 10^3 내지 10^6 CCID₅₀의 범위 내에 있는 용도.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 1가 백신이 10^4 CCID₅₀의 VDV1 또는 VDV2를 포함하고, 상기 4가 백신이 10^5 CCID₅₀의 키메리백스TM 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 CCID₅₀의 VDV1 또는 VDV2를 포함하고, 상기 4가 백신이 10^5 CCID₅₀의 키메리백스TM DEN-1,2,3 및 10^3 CCID₅₀의 키메리백스TM 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) 덴기열의 첫 번째 혈청형의 백신 바이러스를 포함하는 1가 백신을 보유하는 제 1 용기,

(b) 4 가지 Dengue 혈청형에 대한 백신 바이러스를 포함하는 4가 백신을 보유하는 제 2 용기
중 하나 이상을 함유하는 상자를 포함하는 Dengue 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™ 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 CCID₅₀의 VDV1 또는 VDV2를 포함하고, 상기 4가 백신이 10^5 CCID₅₀의 키메리백스™ DEN-1,2,3 및 4를 포함하는 면역화 키트.

청구항 12

제 10 항에 있어서,

상기 1가 백신이 10^4 CCID₅₀의 VDV1 또는 VDV2를 포함하고, 상기 4가 백신이 10^5 CCID₅₀의 키메리백스™ DEN-1,2,3 및 10^3 CCID₅₀의 키메리백스™ DEN-4를 포함하는 면역화 키트.

명세서

기술분야

<1> 4 가지 Dengue 혈청형에 대한 면역화 방법

<2> 본 발명은

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

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

<5> 를 포함하는, 환자에서 상기 4 가지 Dengue 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.

배경기술

<6> Dengue 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). Dengue 혈청형에 의한 감염은 비특이적 바이러스 증후군에서부터 치명적인 중증 출혈성 질병에 이르는 임상 질병 범위를 발생시킬 수 있다. 모기에 물린 후 Dengue의 배양 기간은 대략 4일(3 내지 14일의 범위)이다. Dengue는 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). Dengue의 치유는 7 내지 10일 후에 완료되지만, 대개는 무력증이 연장된다. 백혈구 및 혈소판 수의 감소가 빈번히 발생한다.

<7> 출혈성 Dengue는 항상성의 이상 및 혈관 투과성의 증가[중증 중증 내부 출혈로 악화되는 혈량저하증 및 저혈압(쇼크 증후군을 갖는 Dengue)]을 발생시킬 수 있다를 특징으로 하는 중증 열병이다. 출혈성 Dengue의 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 보고되었다(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 보건에의 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 아에테스 아에지프티(*Aedes aegypti*)를 수반하는 주기로 유지된다. 인간의 감염은 감염된 아에테스 아에지프티가 인간의 피를 먹고 있는 동안 상기 바이러스의 주입에 의해 개시된다. 침묵의 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 중증 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 징후적인 것이다. 출혈성 뎅기열의 치료는 체액 손실의 평형, 응고 인자의 보충 및 해파린 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. 환언하면, 4가 면역화는 단독으로는 추가 접종 후에조차도, 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) Dengue열의 첫 번째 혈청형의 백신 바이러스를 포함하는 1가 백신의 첫 번째 투여,
- <19> (b) Dengue열의 4 가지 혈청형 백신 바이러스를 포함하는 4가 백신의 두 번째 투여
- <20> 를 포함하는, 환자에서 상기 4 가지 Dengue열 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 Dengue열 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 (Chimerivax)TM 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 Dengue열 백신 바이러스의 양은 10^3 내지 10^6 CCID₅₀의 범위 내에 있다.
- <25> 본 발명에 따른 방법의 또 다른 특정 실시태양에 따라, 상기 1가 백신은 10^4 CCID₅₀의 VDV1 또는 VDV2를 포함하고, 상기 4가 백신은 10^5 CCID₅₀의 키메리백스TM DEN-1,2,3 및 10^3 CCID₅₀의 키메리백스TM 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) Dengue열의 첫 번째 혈청형의 백신 바이러스를 포함하는 1가 조성물 또는 백신을 보유하는 제 1 용기, (b) 상기 4 가지 Dengue열 혈청형에 대한 백신 바이러스를 포함하는 4가 조성물 또는 백신을 보유하는 제 2 용기 중 하나 이상을 함유하는 상자를 포함하는 Dengue열 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 키메리백스TM 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 CCID₅₀의 VDV1 또는 VDV2를 포함하는 1가 백신 및 10^5 CCID₅₀의 키메리백스TM DEN-1,2,3 및 10^3 CCID₅₀의 키메리백스TM DEN-4를 포함하는 4가 백신을 포함한다.
- <33> 따라서 본 발명은 또한 Dengue열 바이러스에 대한 면역화를 위한 1가 백신 및 4가 백신의 제조를 위한 Dengue열 백신 바이러스의 용도에 관한 것으로서, 이때 상기 1가 백신은 Dengue열의 첫 번째 혈청형의 백신 바이러스를 포함하고, 상기 4가 백신은 상기 4 가지 Dengue열 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> "Dengue열 바이러스" 또는 "DEN"은 플라비비리다에과의 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 게놈 바이러스 RNA는 캡시드 단백질과 회합하여 뉴클레오캡시드를 형성한다. 다른 플라비바이러스들의 경우에서와 같이, 상기 DEN 바이러스 게놈은 중단되지 않은 암호화 부위를 암호화하며 상기 부위는 단일 폴리단백질로 번역된다.

<37> 본 발명과 관련하여, "백신 Dengue 바이러스"란 용어는 항체 중화를 포함한 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 Dengue 바이러스의 임의의 바이러스 형태, 바람직하게는 Dengue 바이러스에 의한 감염에 대한 인간의 면역화 프로그램과 관련하여 사용될 수 있는 Dengue 바이러스의 모든 바이러스 형태를 의미한다. 따라서, 백신 Dengue 바이러스는 불활성화된 바이러스, 감독된 바이러스, 또는 재조합 단백질, 예를 들어 상기 Dengue 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 C6/36 세포 상에서 37 °C 또는 39 °C에서 생육 후 동일한 배양 조건 하에 동일한 역가 측정 방법을 사용하여 측정 시 상기과 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 Dengue 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 Dengue 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 00/57909, WO 00/57910, WO 02/0950075 및 WO 02/102828에 개시된 균주들, 또는 키메라를 언급할 수 있다. 키메라 바이러스는 상기 정의한 바와 같은 감독된 바이러스의 특징들을 나타낸다. Dengue 바이러스의 외막 단백질을 발현하고 상기 단백질이 유도되는 혈청형을 중화하는 항체를 포함하는 면역 반응을 유도하는 임의의 키메라 바이러스를 본 발명과 관련하여 사용할 수 있다. 비 제한적인 예로서, 예를 들어 WO 98/37911에 개시된 바와 같은 키메라백스™ Dengue, 및 또한 예를 들어 특허 출원 WO 96/40933 및 WO 01/60847에 개시된 바와 같은 Dengue/Dengue 키메라를 언급할 수 있다. 상기 백신 Dengue 바이러스 혈청형 1은 예를 들어 백신 균주 VDV1 또는 키메라백스™ DEN-1, 특히 YF17D/DEN-1 바이러스, 또는 그 밖의 DEN-1 16007/PDK13 균주일 수 있다. 상기 백신 Dengue 바이러스 혈청형 2는 예를 들어 백신 균주 VDV2 또는 키메라백스™ DEN-2, 특히 YF17D/DEN-2 바이러스, 또는 그 밖의 DEN-2 16681/PDK53 균주일 수 있다. 상기 백신 Dengue 바이러스 혈청형 3은 키메라백스™ DEN-3, 특히 YF17D/DEN-3 바이러스일 수 있다. 상기 백신 Dengue 바이러스 혈청형 4는 키메라백스™ DEN-4, 특히 YF17D/DEN-4 바이러스일 수 있다. 상기 언급된 균주들 및 이들을 획득하는 방법에 대한 정확한 설명에 대해서 본원에 나타낸 출원들을 참조할 수 있다.

<42> "VDV" 또는 "베로 Dengue 백신"은 베로 세포에 순응되고(즉 베로 세포 상에서 유의수준으로 재현가능하게 복제할 수 있다) 영양류 및 특히 인간에서 중화 항체의 유도를 포함한 특이적인 체액 반응을 유도할 수 있는 감독된 Dengue 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 베토 세포에 형질감염시킨 야생형 균주 DEN-2 16681로부터 획득한 균주이다. 이어서 상기 VDV-2 균주를 플레이트 정제 및 베토 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 파스티르 및 질병 관리 예방 센터의 이름으로 출원된 국제 특허 출원 WO2006/134433에 개시되어 있다.

<45> 상기 VDV1 및 2 균주를 베토 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 제조성한다.

<46> "키메리백스™ 덴기열" 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 덴기열 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™ 덴기열의 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 덴기열 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; Stamaryl(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 CCID₅₀의 양으로 존재한다.

<49> 특정 실시태양에 따라, 백신 바이러스 VDV1 또는 VDV2는 상기 1가 백신 중에 10^4 CCID₅₀의 수준으로 존재한다.

<50> 특정 실시태양에 따라, 키메리백스™ DEN-1,2,3은 상기 4가 백신 중에 10^5 CCID₅₀의 수준으로 존재하고, 키메리백스™ DEN-4는 상기 4가 백신 중에 10^3 CCID₅₀의 수준으로 존재한다.

<51> 각각의 1가 키메리백스™ 덴기열 백신 바이러스(혈청형 1, 2, 3 및 4)를 베토 세포 상에서 각각의 혈청형을 증폭시켜 제조하였다. 보다 구체적으로, 상기 4 개의 바이러스를 무 혈청 배지에서 부착 베토 세포 상에 별도로 생성시킨다. 이어서, 여과에 의해 세포 찌꺼기를 제거하여 정제한다, 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 제조성한다. 동일한 방법을 상기 4 개의 키메라들에 적용한다.

- <52> 용량, 조성물 또는 백신은 상기가 약학적으로 허용 가능한 부형제 이외에, 단일 댕기열 혈청형의 백신 바이러스를 함유하는 경우 "1가"이다. 용량, 조성물 또는 백신은 상기가 댕기열의 4 가지 혈청형의 백신 바이러스를 함유하는 경우 "4가"이다. 다가 조성물은 1가 조성물들을 단순히 혼합하여 수득된다.
- <53> "환자"란 용어는 댕기열로 감염될 수 있는 개인(아동 또는 성인), 특히 감염 위험이 있는 개인, 예를 들어 댕기열이 존재하는 지역을 여행하는 개인 또는 상기 지역의 거주자를 나타낸다. 따라서, 상기 용어는 특정 투약을 받은 적이 없는 개인 및 또한 댕기열 바이러스에 대해 경험이 없지않은 개인을 포함한다.
- <54> 초기 1가 면역화에 따른 4가 면역화
- <55> 따라서, 첫 번째 태양에서, 본 발명은 댕기열 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 댕기열에 대한 면역화 전략과 관련하여 매우 특히 중요하다.
- <57> 본 발명에 따라서, 상기 첫 번째 면역화를 상기 4 가지 댕기열 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 댕기열 백신 바이러스, 바람직하게는 혈청형 2를 상기 첫 번째 투여에 사용한다. 바람직하게는, 상기 첫 번째 투여에 사용되는 댕기열 백신 바이러스는 감독된 댕기열 바이러스이며 키메릭 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 댕기열 바이러스의 4 가지 혈청형에 대한 항원을 발현하는 키메릭 바이러스, 특히 키메릭백스™ 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 댕기열 바이러스의 "면역유효량", 즉 중화 항체를 포함하는 특이적인 면역 반응을 유도하기에 충분한 댕기열 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/회석) 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(CCID₅₀)의 항으로 나타낸다. 예를 들어, 본 발명에 따른 조성물은 1가 또는 2가 조성물의 경우 10 내지 10⁶ CCID₅₀, 특히 10³ 내지 10⁵ CCID₅₀의 백신 댕기열 바이러스 혈청형 1, 2, 3 또는 4를 함유할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 조성물 또는 용도에서, 상기 백신 댕기열 바이러스 혈청형 1, 2, 3 및 4의 용량은 각각 바람직하게는 10 내지 10⁶ CCID₅₀, 예를 들어 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ 또는 10⁶ CCID₅₀의 범위, 특히 10³ 내지 10⁵ CCID₅₀의 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 10³ 내지 10⁵ CCID₅₀이다. 특정 실시태양에 따라, 상기 1가 백신은 10⁴ CCID₅₀의 VDV1 또는 VDV2, 바람직하게는 VDV2를 포함한다. 특정 실시태양에 따라, 상기 4가 백신은 10⁵ CCID₅₀의 키메릭백스™ DEN-1, 2, 3 및 4를 포함한다. 하나의 유리한 실시태양에 따라, 상기 4가 백신은 10⁵ CCID₅₀의 키메릭백스™ DEN-1, 2 및 3 및 10³ CCID₅₀의 키메릭백스™ 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 주사가 가능한 형태로 제조하며 상기 조성물은 액체 용액, 현탁액 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 주사가 가능한 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™ 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 CCID₅₀의 VDV1 또는 VDV2를 포함하는 하나 이상의 1가 백신 및 10^5 CCID₅₀의 키메리백스™ DEN-1,2,3 및 10^3 CCID₅₀의 키메리백스™ 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 복재 정맥으로부터 천자에 의해 채혈하였다. 각각의 면역화 후 0 및 28일째에 항체 반응을 평가하기 위해 혈액 5 ml을 샘플링한 반면, 2 내지 10일째에는 바이러스혈증을 평가하기 위해서 혈액 1 ml을 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 모니터링하였다. 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 연결부에 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(개념당량)로서 나타낸다.
- <95> 0.140 ml의 원숭이 혈청을 제조사의 지시에 따라, 마체레이 나젤(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 µl 상에서 첫 번째 정량분석을 수행하였다. 나머지 분량은 70 °C에서 동결시켰다.

<96> 상기 반응 혼합물은 "퀴아젠 콰네틱트(Qiagen Qantitect)™ 탐침" RT-PCR 정량분석 키트(Qiagen)의 성분 이외에, 10 피코몰의 각 개시제, 4 피코몰의 각 센서 및 5 µl의 RNA를 총 25 µl의 부피로 함유하였다. 시험하려는 상기 RNA의 경우에, 상기 정제된 제제 5 µl를 선행 희석 단계 없이 반응 혼합물에 직접 도입시켰다. 합성 RNA를 RNase가 없는 물에서 1/10으로 희석하고, 대략 10 내지 10⁶ GEQ를 5 µl 중에 함유하는 7 개의 희석물을 표준 곡선의 생성을 위해 나란히 정량분석하였다.

<97> 상기 정량분석 반응을 하기의 프로그램을 사용하여 어플라이드 바이오시스템(Applied Biosystem) ABIPrism 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 log₁₀GEQ/ml(800 내지 2000 GEQ/ml; 4 내지 10 GEQ/반응)(표준 편차: +/-0.3 log₁₀)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 µl 중에 대략 1 PFU 및 대략 100 PFU(각각 2.3 및 4.3 log₁₀PFU/ml)를 함유하는 2 개의 희석물로 제조하였다.

<100> 실시예들에 사용된 시험에서, GEQ와 PFU 간의 상관성은 하기와 같다: YF 또는 CYD에 대해 혈청 양성인 경우 2.7 log₁₀의 GEQ/PFU 비(즉 1 PFU = 500 GEQ). VDV1 또는 VDV2에 대해 혈청 양성인 경우 2.5 log₁₀의 GEQ/PFU 비(즉 1 PFU = 320 GEQ).

<101> 상기 정량 분석 한계는 qRT-PCR YF 및 CYD의 경우 <3.3 log₁₀GEQ/ml(즉: <4 PFU/ml) 및 qRT-PCR VDV1 및 VDV2의 경우 <2.9 log₁₀GEQ/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			
Y F	YF-N85	센스	5' GCACGGATGTAACAGACTGAAGA (23 염기)
	YF N85	안티센스	5' CCAGGCCGAACCTGTCAT (18 염기)
	YF-N85		5' Fam- CGACTGTGTGGTCCGGCCCATC -Tamra (22 염기)
CYD1 spe	CYD1-	센스	5' CAT TGC AGT TGG CCT GGT AA (20 b)
	CYD1-	안티센스	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-	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-TGCGATAGGAATTATCACACTCTATCTGGGAGC-Tamra (33b)
CYD4 spe	CYD4-	센스	5' CTT AGT ATT GTG GAT TGG CAC GAA (24 b)
	CYD4-	안티센스	5' GCG CCA ACT GTG AAA CCT AGA (21 b)
	CYD4-		5'-Fam-AGAAACACTTCAATGGCAATGACGTGCAT-Tamra (29 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-N85		5' Fam-TTC ACA CCA CTT CCA C-M GB/NFQ (16 b)
VDV2 spec	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-N85		5' Fam-TGG AAG TCG GCA CGT GA-MGB/NFQ (17 b)

<103>

- <104> 중화 항체의 측정(혈청중화 시험)(SN50)
- <105> 통상적으로, 덩기열 항체를 PRNT50(PFU 수를 50%까지 감소시키는 중화 시험) 시험을 사용하여 측정한다. 상기 시험은 고되며 다량의 물질을 다 써버리므로, 우리는 CCID₅₀ 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 회석제(ISCove 4% SVF)에 가한다. 6 배의 일련의 회석물을 회석제 0.450 ml에 혈청 0.150 ml을 전달하여 제조한다. $2.7 \log_{10}$ CCID₅₀/ml의 바이러스 회석물 450 μ l를 25 CCID₅₀/웰이 수득되도록 각 웰에 가한다. 상기 플레이트를 37 °C에서 1 시간 동안 배양한다. 이어서 각 회석물 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% CO₂의 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 단백질 항체(ATCC H-B112 하이브리도마로부터 수득한 mAb 4G2)의 1/2000 회석액 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 회석액 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:
- <107> $\log_{10}SN50 = d + f/N (X + N/2)$
- <108> 상기 식에서,
- <109> d는 100% 중화를 제공하는 회석물(즉 6 개의 음성 복제물, 즉 감염 징후를 나타내지 않는 복제물)을 나타내고
- <110> f는 로그 10의 회석인자(예를 들어 1:4의 회석인자, f=0.6)를 나타내고,
- <111> N은 복제물/회석물의 수(N=6)를 나타내고,
- <112> X는 회석물 d를 제외하고, 감염의 징후를 나타내지 않는 웰의 총수를 나타낸다.
- <113> 바이러스 검출의 한계는 10 SN50(즉 $1.0 \log_{10}SN50$)이다.
- <114> 중화에 사용된 바이러스 균주는 DEN1 16007, DEN2 16681, DEN3 16562 또는 DEN4 1036 균주이다.
- <115> 대조용을 위해서, 초기 바이러스 회석물을 재 적정하였다.
- <116> 상기 SN50 시험에서 측정된 중화 역가와 PRNT50 시험에서 통상적으로 측정된 중화 역가 간의 상관성은 $\log_{10}PRNT50 = \log_{10}SN50 + 0.2$ 이다.
- <117> 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 10^5 CCID₅₀의 양으로, 상기 1가 VDV-2의 경우 10^4 CCID₅₀의 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 덩기열 1234 키메리백스
그룹 2	4가 덩기열 1234 키메리백스	4가 덩기열 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/회석)

원숭이		J0+28				J56+28			
ID	면역화	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4
	J0 J56								
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

- <123>
- <124> /-: 역가<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 추가접종 CYD 1,2,3,4	AM762	<2,7	<2,7	<2,7	<2,7	4,77	4,89	4,84	4,47	<2,7		<3,2	<3,2	<3,2	3,11	<3,2	<3,2	3,63	3,59	<3,2	
	AM839	5,11	4,51	4,19	4,19	4,56	3,69	<2,7	<2,7	<2,7		3,98	4,86	4,43	3,79	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	
	AM905	<2,7	<2,7	<2,7	<2,7	4,16	4,31	4,16	3,50	4,14		<3,2	<3,2	3,09	3,42	3,39	<3,2	<3,2	4,08	4,22	
	AN011	<2,7	<2,7	3,75	4,29	4,35	4,22	3,51	<2,7	3,28		3,53	3,42	<3,2	<3,2	3,42	3,37	4,61	3,09	4,97	
2 초기 CYD 1,2,3,4 추가접종 CYD 1,2,3,4	AM496	4,22	3,36	3,71	4,15	3,14	<3,1	3,58	<3,1	<3,1		<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	
	AM645	4,21	3,61	2,82	3,51	3,65	3,24	<3,1	3,47	3,44		<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	
	AM766	3,91	3,06	3,38	4,19	3,80	3,73	<3,1	<3,1	<3,1		<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	
	AM813	4,61	4,60	3,17	<3,1	<3,1	<3,1	<3,1	<3,1	<3,1		<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	

CYD1
CYD4
VDV2

- <125>
- <126> 간단히, 상기 결과를 하기와 같이 요약할 수 있다:
- <127> -본 발명에 따른 투여 방법은 4가 백신에 의한 2 개의 동일한 면역화를 포함하는 시스템에 의해 획득되는 중화 항체 반응의 정성적 및 정량적 증가를 일으킨다.
- <128> -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.
- <129> -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.
- <130> -바이러스혈증은 초기 면역화 후 VDV2에 의해 관찰되며, 두 번째 투여(b) 후CYD-4에 의해 우세하게 야기된다(그룹 1). 경험이 없는 동물에서 4가 백신에 의한 1차 면역화 후에 유도된 바이러스혈증에서 현저한 차이는 관찰되지 않았다(그룹 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.
- <131> 따라서 본 실시예는 본 발명에 따른 면역화 방법이 탱기열 백신 바이러스의 안전성을 불리하게 해치지 않으면서 그의 면역원성을 개선함을 나타낸다.
- <132> 본 원에 인용된 모든 공보들은 그 내용 전체가 참고로 인용된다.

서열 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

```

agttgttagt ctacgtggac cgacaagaac agtttcgaat cggaagcttg cttaacgtag      60

ttctaacagt tttttattag agagcagatc tctgatgac aaccaacgaa aaaagacggg      120

tcgaccgtct ttcaatatgc tgaaacgcgc gagaaaccgc gtgtcaactg tttcacagtt      180

ggcgaagaga ttctcaaaag gattgctctc aggccaagga cccatgaaat tggatgatggc      240

tttcatagca ttcttaagat ttctagccat accccaaca gcaggaattt tggctagatg      300

gggctcattc aagaagaatg gagcgattaa agtgttacgg gggttcaaga gagaaatctc      360

aaacatgcta aacataatga acaggaggaa aagatccgtg accatgctcc ttatgctgct      420

gcccacagcc ctggcggtcc atctgacgac acgaggggga gagccgcata tgatagttag      480

caagcaggaa agaggaaagt cacttttggt caagacctct gcaggtgtca acatgtgcac      540

cttcattgcg 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

tgcttggaac cagatacaaa aagtagagac ttgggtcttg agacatccag gattcacggt 840

gatagccctt ttcttagcac atgcatagg aacatccatc acccagaaag ggatcatctt 900

cattttgctg atgctggtaa caccatctat ggccatgcga tgcgtgggaa taggcaacag 960

agacttcgtg gaaggactgt caggagcaac atgggtggat gtggtactgg agcatggaag 1020

ttgctgcacc accatggcaa aaaacaaacc aacactggac attgaactct tgaagacgga 1080

ggtcacaac cctgcagttc tgcgtaaatt gtgattgaa gctaaaatat caaacaccac 1140

caccgattcg agatgtccaa cacaaggaga agccacactg gtggaagaac aagacgcgaa 1200

ctttgtgtgc cgacgaacgt tctgtggacag aggttggggc aatggctgtg ggctattcgg 1260

aaaaggtagt ctaataacgt gtgccaagtt taagtgtgtg aaaaaactag aaggaaagat 1320

agctcaatat gaaaacctaa aatattcagt gatagtcacc gtccacactg gagatcagca 1380

ccagggtggga aatgagacta cagaacatgg aacaactgca accataacac ctcaagctcc 1440

tacgtcggaa atacagctga ccgactacgg aacccttaca ttagattgtt cacctaggac 1500

agggtctgat tttaacgaga tgggtttgct gacaatgaaa aagaaatcat ggcttgcctc 1560

caaacagtgg ttcttagact taccactgcc ttggacctct ggggctttta catccaaga 1620

gacttgaac agacaagatt tactggtcac atttaagaca gctcatgcaa agaagcagga 1680

agtagtcgta ctaggatcac aagaaggagc aatgcacact gcgctgactg gagcgacaga 1740

aatccaaacg tcaggaacga caacaatttt cgcaggacac ctaaaatgca gactaaaaat 1800

ggacaaacta actttaaaag ggatgtcata tgtgatgtgc acaggctcat tcaagttaga 1860

gaaagaagtg gctgagaccc agcatggaac tgttctggtg caggttaaat atgaaggaac 1920

agacgcacca tgcaagattc ccttttcgac ccaagatgag aaaggagcaa cccagaatgg 1980

gagattaata acagccaacc ccatagtcac tgacaaagaa aaaccagtca atattgaggc 2040

agaaccaccc ttiggtgaga gctacatcgt ggtaggagca ggtgaaaaag ctttgaaact 2100

aagctggttc aagaaaggaa gcagcatagg gaaaatgttt gaagcaactg cccgaggagc 2160

acgaaggatg gccattctgg gagacaccgc atgggacttc ggttctatag gaggagtgtt 2220

cacgtctatg ggaaaactgg tacaccaggt ttttggaact gcatatggag tttgttttag 2280

cggagtttct tggaccatga aaataggaat agggattctg ctgacatggc taggattaaa 2340

ttcaaggaac acgtcccttt cggatgatgtg catcgcagtt ggcatggtca cactgtacct 2400

aggagtcatg gttcaggcag attcgggatg tgtaatcaac tggaaaggca gagaacttaa 2460

atgtggaagc ggcatTTTTG tcactaatga agttcacact tggacagagc aatacaaatt 2520

ccaggctgac tcccccaaga gactatcagc agccattggg aaggcatggg aggagggtgt 2580

gtgtggaatc cgatcagcca ctgctctcga gaacatcatg tggaaacaaa tatcaaatga 2640

attgaaccac atcctacttg aaaatgacat gaaatttaca gtggctcgtg gagacgttag 2700

tggaatcttg gcccaaggaa aaaaaatgat taggccacaa cccatggaac acaaatactc 2760

gtggaaaagc tggggaaaag ctaaaatcat aggagcggat gtacagaaca ccaccttcat 2820

catcgacggc ccaaacaccc cagaatgcc tgacaatcaa agagcatgga atatttggga 2880

agtagaggac tatggatttg ggattttcac gacaaacata tggttgaaat tgcgtgactc 2940

ctacacccaa gtatgtgacc accggtgat gtcagctgcc attaaggaca gcaaggcagt 3000

ccatgctgac atgggttact 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 aaggtaccac agttgtgtg gatgaacatt gtggaaatcg 3300

aggaccatct ctgagaacca caacagtcac aggaaagata atccatgaat ggtgctgcag 3360

atcttgtacg ctaccccccc tacgtttcaa aggggaagac ggggtgttgt acggcatgga 3420

aatcagacca gtgaaggaca aggaagagaa cctggtcaag 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 aacgtaccta gctttaatgg ccactttcaa 3720

aatgagacca atgttcgccg tcgggctatt atttcgcaga ctaacatcta gagaagttct 3780

tcttcttaca attggttga gcctggtggc atccgtggag ctaccaagtt ccctagagga 3840

gctgggggat ggacttgcaa taggcatcat gatgttgaat ttattgactg attttcagtc 3900

acaccagcta tgggctactc tgctatcctt gacatttatt aaaacaactt tttcattgca 3960

ctatgcatgg aagacaatgg ctatgttact gtcaattgta tctctcttcc ctttatgcct 4020

gtccacgacc tctcaaaaaa caacatggct tccggtgctg ttgggatctc ttggatgcaa 4080

accactaccc atgtttctta taacagaaaa caaatctgg ggaaggaaga gttggcccct 4140

caatgaagga attatggctg ttggaatagt tagtattcta ctaagttcac ttttaaaaaa 4200

tgatgtgccg ctacccggcc cattaatagc tggagcatg ctaatagcat gttatgtcat 4260

atccggaagc tcagctgatt tatcactgga gaaagcggct gaggtctcct gggaggaaga 4320

agcagaacac tcaggcgctt cacacaacat actagtagag gttcaagatg atggaacat 4380

gaagataaaa gatgaagaga gagatgacac gtcaccatt ctccttaaag caactctgct 4440

ggcagctctca ggggtgtacc caatgtcaat accagcgacc ctttttgtgt ggtatttttg 4500

gcagaaaaag aaacagagat caggagtgtc atgggacaca cccagcccc cagaagtgga 4560

aagagcagtt ctgatgatg gcatctatag aattttgcaa agaggactgt tgggcaggtc 4620

ccaagtagga gtaggagttt tccaagaagg cgtgttccac acaatgtggc acgtcactag 4680

gggagctgtc ctcatgtatc aaggaaaaag gctggaacca agctgggcca gtgtcaaaaa 4740

agacttgatc tcatatggag gaggttggag gtttcaagga tcttgaaca cgggagaaga 4800

agtacaggtg attgctgttg aaccgggaaa aaaccccaaa aatgtacaaa caacgccggg 4860

taccttcaag acccctgaag gcgaagttag agccatagcc ttagacttta aacctggcac 4920

atctggatct cccatcgtaa acagagaggg aaaaatagta ggtctttatg gaaatggagt 4980

ggtgacaaca agcggaactt acgttagtgc catagctcaa gctaaggcat cacaagaagg 5040

gcctctacca gagattgagg acaaggtgtt taggaaaaga aacttaaca taatggacct 5100

acatccagga tcgggaaaaa caagaagata cttccagcc atagtccgtg aggccataaa 5160

aaggaagctg cgcacgctaa tcttagctcc cacaagagtt gtcgcttctg aaatggcaga 5220

ggcactcaag ggagtgccaa taaggtatca gacaacagca gtgaagagtg aacacacagg 5280

aaaggagata gttgacctta tgtgccacgc cactttcacc atgcgctcc tgtctccgt 5340

gagagttccc aattataaca tgattatcat ggatgaagca cacttcaccg atccagccag 5400

catagcagcc agagggtaca tctcaacccg agtgggtatg ggtgaagcag ctgcgatctt 5460

tatgacagcc actccccag gatcgggtga ggcctttcca cagagcaatg caattatcca 5520

agatgaggaa agagacattc ctgagagatc atggaactca ggctatgact ggatcactga 5580

ttttccaggt aaaacagtct ggtttgttcc aagcatcaaa tcaggaaatg acattgcca 5640

ctgtttaaga aaaaacggga aacgggtgat ccaattgagc agaaaaacct ttgacactga 5700

gtaccagaaa acaaaaaaca acgactggga ctatgtcgtc acaacagaca tttccgaaat 5760

gggagcaaat ttccgggccg acagggtaat agaccaagg cggtgtctga aaccggtaat 5820

actaaaagat ggtccagagc gcgtcattct agccggaccg atgccagtga ctgtggccag 5880

tgccgccag aggagaggaa gaattggaag gaacaaaaac aaggaagtg atcagtatat 5940

ttacatggga cagcctttaa aaaatgatga ggaccacgct cattggacag aagcaaagat 6000

gtccttgac aatataaaca caccagaagg gattatcca gccctctttg agccggagag 6060

agaaaagagt gcagctatag acggggaata cagactgcgg ggtgaagcaa ggaaaacgtt 6120

cgtggagctc atgagaagag gggatctacc agtctggcta tcctacaaag ttgcctcaga 6180

aggcttcag tactccgaca gaagtggtg cttcgatggg gaaaggaaca accagtggtt 6240

ggaggagaac atggacgtgg agatctggac aaaagaagga gaaagaaaga aactacgacc 6300

tcgctggttg gacgccagaa catactctga cccactggct ctgcgcgagt ttaaagagtt 6360

tgcagcagga agaagaagcg tctcaggtga cctaataatta gaaataggga aacttcaca 6420

acatttgacg caaagggcc agaatgcttt ggacaacttg gtcatgttgc acaattccga 6480

acaaggagga aaagcctata gacatgctat ggaagaactg ccagacacaa tagaaacgtt 6540

gatgctccta gccttgatag ctgtgttgac tggtaggtg acgtgtttct tcctatcagg 6600

aagaggtcta ggaaaaacat ctatcggtt actctgcgtg atggcctcaa gcgcactgtt 6660

atggatggcc agtgtggagc cccattggat agcggcctcc atcatactgg agttctttct 6720

gatggctactg cttattccag agccagacag acagcgact ccacaggaca accagctagc 6780

atatgtgggtg ataggtctgt tattcgtgat attgacagtg gcagccaatg agatgggatt 6840

attggaacc acaaagaaag 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

gtgacactg 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

ttgggaggga tctccaggaa aattctggaa caccacaata gcggtatcca tggcaaacat 7500

tttcaggggg agttatctag caggagcagg tctggccttc tcattaatga aatctctagg 7560

aggagtagg agaggcacgg gagcccaagg ggaacactg ggagaaaaat ggaaaagaca 7620

actaaacca ctgagcaagt cagaattcaa tacttacaag aggagtggga ttatggaggt 7680

ggatagatcc gaagccaaag agggactgaa aagaggagaa acaaccaaac acgcagtatc 7740

gagaggaacg gccaaactga ggtggttcgt ggagaggaac cttgtgaaac cagaaggga 7800

agtcatagac ctcggttggt gaagagggtg ctggtcatat tattgcgctg ggctgaagaa 7860

agtcacagaa gtgaaaggat acacaaaagg aggacctgga catgaggaac caatcccaat 7920

ggcgacctat ggatggaacc tagtaaggct gcactccgga aaagatgtat tttttatacc 7980

acctgagaaa tgtgacaccc ttttgtgtga tattggtgag tcctctccga acccaactat 8040

agaggaagga agaacgttac gtgttctgaa aatggtgga ccatggctca gaggaacca 8100

at ttgtcata aaaattctaa atccctatat gccgagcgtg gtagaaactc tggaacaaat 8160

gcaaagaaaa catggaggaa tgctagtgcg aaaccactc tcaagaaatt ccacccatga 8220

aatgtactgg gtttcatgtg gaacaggaaa catgtgtca 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 tggaagtgac 8700

agccaggtgg ttatggggtt tcctttctag aaacaaaaaa cccagaattt gcacaagaga 8760

ggagtttaca agaaaagtta ggtcaaacgc agctattgga gcagtgttcg ttgatgaaaa 8820

tcaatggaac tcggcaaaag aagcagtgga agacgaacgg ttctgggaac ttgtccacag 8880

agagaggag cttcataaac aggggaaatg tgccacgtgt gtctacaata tgatggggaa 8940

gagagagaaa aaattaggag agttcggaaa ggcaaaaagga agtcgtgcaa tatggtacat 9000

gtggttggga gcacgcttcc tagagtttga agcccttggg ttcattgaatg aagatcactg 9060

gttcagtaga gagaattcac tcagtggagt ggaaggagaa ggactccaca aacttggata 9120

catactcaga gacatatcaa ggattccagg ggggaacatg tatgcagatg acacagccgg 9180

atgggacaca agaataacag aggatgatct ccagaatgag gctaaaatca ctgacatcat 9240

ggagcccgaa catgccctgc tggctacgtc aatctttaag ctgacctacc aaaataaggt 9300

ggtaagggtg cagagaccag caaaaaatgg aaccgtgatg gatgttatat ccagacgtga 9360

ccagagaggc agtggacagg ttggaactta tggcttaaac actttcacca acatggaggc 9420

ccaactgata agacaaatgg agtctgaggg aatcttttta ccagcgaat tggaaacccc 9480

aaatctagcc ggaagagttc tcgactggtt ggaaaaatat ggtgtcgaaa ggctgaaaag 9540

aatggcaatc agcggagatg actgtgtggt gaaaccaatt gatgacaggt tcgcaacagc 9600

cttaacagct ttgaatgaca tgggaaaagt aagaaaagac ataccacaat gggaaccttc 9660

aaaaggatgg aatgattggc aacaagtgc tttctgttca caccacttcc accagctaat 9720

tatgaaggat gggagggaga tagtggtgcc atgccgaac caagatgaac ttgtggggag 9780

ggccagagta tcacaaggcg ccggtaggag cctgagagaa accgcatgcc taggcaagtc 9840

atatgcacaa atgtggcagc tgatgtatit ccacaggaga gacctgagac tggcggctaa 9900

cgctatttgt tcagccgttc cagttgattg ggtcccaacc agccgcacca cctggtcgat 9960

ccatgcccac caccaatgga tgacaacaga agacatgtta tcagtatgga atagggtctg 10020

gatagaggaa aacccatgga tggaggataa gactcatgtg tccagttggg aagaagttcc 10080

atacctagga aagagggaag atcagtgggtg tggatccctg ataggcttaa cagcaagggc 10140
 cacctgggcc actaataaac aagtggccat aaaccaagtg agaaggctca ttgggaatga 10200
 gaattatcta gattacatga catcaatgaa gagattcaag aatgagagt atcccgaagg 10260
 ggcactctgg taagtcaaca cattcacaaa ataaaggaaa ataaaaaatc aaatgaggca 10320
 agaagtcagg ccagattaag ccatagtacg gtaagagcta tgctgcctgt gagccccgtc 10380
 caaggacgta aaatgaagtc aggccgaaag ccacggtttg agcaagccgt gctgcctgtg 10440
 gctccatcgt ggggatgtaa aaaccggga ggctgcaacc catggaagct gtacgcatgg 10500
 ggtagcagac tagtggttag aggagacccc tccaagaca caacgcagca gcggggccca 10560
 acaccagggg aagctgtacc ctgggtgtaa ggactagagg ttagaggaga ccccccgct 10620
 aacaataaac agcatattga cgctgggaga gaccagagat cctgctgtct ctacagcatc 10680
 attccaggca cagaacgcca gaaaatggaa tgggtgctgtt gaatcaacag gtctt 10735

<210> 2
 <211> 10723
 <212> DNA
 <213> Dengue virus

<400> 2
 agttgttagt ctacgtggac cgacaaagac agattctttg agggagctaa gctcaatgta 60
 gttctaacag tttttaatt agagagcaga tctctgatga ataaccaacg gaaaaaggcg 120
 aaaaacacgc ctttcaatat gctgaaacgc gagagaaacc gcgtgtcgac tgtgcaacag 180
 ctgacaaaga gattctcact tggaatgctg caggacgag gaccattaaa actgttcattg 240
 gccctgggtg cgctccttcg tttcctaaca atcccacaa cagcagggat attgaagaga 300
 tggggaacaa ttaaaaaatc aaaagctatt aatgttttga gaggttcag 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 agaattgagcc agaagacata gactgttggg gcaactctac gtccacgtgg 660

glaacttatg ggacgtgtac caccatggga gaacatagaa gagaaaaaag atcagtggca 720

ctcgttccac atgtgcgaat gggactggag acacgaactg aaacatggat gtcacagaa 780

ggggcctgga aacatgtcca gagaattgaa acttggatct tgagacatcc aggettccacc 840

atgatggcag caatcctggc atacaccata ggaacgacac atttcaaag agccctgatt 900

ttcatcttac tgacagctgt cactccttca atgacaatgc gttgcatagg aatgtcaaat 960

agagactttg tggaaggggt ttcaggagga agctgggttg acatagtctt agaacatgga 1020

agctgtgtga cgacgatggc aaaaaacaaa ccaacattgg attttgaact gataaaaaca 1080

gaagccaaac agcctgccac cctaaggaag tactgtatag aggcaaagct aaccaacaca 1140

acaacagaat ctgctgccc aacacaaggg gaaccagcc taaatgaaga gcaggacaaa 1200

aggttcgtct gcaaacactc catggtagac agaggatggg gaaatggatg tggactatct 1260

ggaaagggag gcattgtgac ctgtgctatg ttcagatgca aaaagaacat ggaaggaaaa 1320

gttgtgcaac cagaaaactt ggaatacacc attgtgataa cacctcactc aggggaagag 1380

catgcagtgc gaaatgacac agggaaacat ggcaaggaaa tcaaaataac accacagagt 1440

tccatcacag aagcagaatt gacaggttat ggcaactgtc caatggagtg ctctccaaga 1500

acgggcctcg acttcaatga gatggtgttg ctgcagatgg aaaataaagc ttggctggtg 1560

cacaggcaat ggttcctaga cctgccgtta ccatggttgc ccggagcgga cacacaagag 1620

tcaaattgga tacagaagga gacattggtc actttcaaaa atcccatgc gaagaaacag 1680

gatgttgttg ttttaggatc ccaagaaggg gccatgcaca cagcacttac aggggccaca 1740

gaaatccaaa tgcatacagg aaacttactc ttacaggac atctcaagtg caggctgaga 1800

atggacaagc tacagctcaa aggaatgtca tactctatgt gcacaggaaa gtttaaagtt 1860

gtgaagggaa tagcagaaac acaacatgga acaatagtta tcagagtgc atatgaaggg 1920

gacggctctc catgcaagat cccctttgag ataatggatt tggaaaaaag acatgtctta 1980

ggtcgcctga ttacagtcaa cccaattgtg acagaaaaag atagcccagt caacatagaa 2040

gcagaacctc catttgaga cagctacatc atcataggag tagagccggg acaactgaag 2100

ctcaactggt ttaagaaagg aagtctatc ggccaaatgt ttgagacaac aatgaggggg 2160

gcgaagagaa tggccatfff aggtgacaca gcctgggatt ttggatcctt gggaggagtg 2220

tttacatcta taggaaaggc tctccacaa gtctttggag caatctatgg agctgccttc 2280

agtgggggtt catggactat gaaaatctc ataggagtca ttatcacatg gataggaatg 2340

aattcacgca gcacctcact gtctgtgaca ctagtattgg tgggaattgt gacactgtat 2400

ttgggagtca tgggtcaggc cgatagtgtt tgcgttgtga gctggaaaaa caaagaactg 2460

aaatgtggca gtgggatttt catcacagac aacgtgcaca catggacaga acaatacaaa 2520

ttccaaccag aatccccttc aaaactagct tcagctatcc agaaagccca tgaagaggac 2580

atttgtggaa tccgctcagt aacaagactg gagaatctga tgtggaaaca aataacacca 2640

gaattgaatc acattctatc agaaaatgag gtgaagttaa ctattatgac aggagacatc 2700

aaaggaatca tgcaggcagg aaaacgatct ctgcggcctc agccactga gctgaagtat 2760
 tcatggaaaa catggggcaa agcaaaaatg ctctctacag agtctcataa ccagaccttt 2820
 ctcatatgatg gccccgaaac agcagaatgc cccaacacaa atagagcttg gaattcgttg 2880
 gaagttgaag actatggctt tggagtattc accaccaata tatggctaaa attgaaagaa 2940
 aaacaggatg tattctgcga ctcaaaactc atgtcagcgg ccataaaaga caacagagcc 3000
 gtccatgccg atatgggita ttggatagaa agtgcactca atgacacatg gaagatagag 3060
 aaagcctctt tcattgaagt taaaaactgc cactggccaa aatcacacac cctctggagc 3120
 aatggagtgc tagaaagtga gatgataatt ccaaagaatc tcgctggacc agtgtctcaa 3180
 cacaactata gaccaggeta ccatacacia ataacaggac catggcatct aggttaagctt 3240
 gagatggact ttgatttctg tgatggaaca acagtggtag tgactgagga ctgcggaaat 3300
 agaggaccct ctttgagaac aaccactgcc tctggaaaac tcataacaga atggtgctgc 3360
 cgatcttgca cattaccacc gctaagatac agaggtgagg atgggtgctg gtacgggatg 3420
 gaaatcagac cattgaagga gaaagaagag aatttggtca actccttggt cacagctgga 3480
 catgggcagg tcgacaactt ttcactagga gtcttgggaa tggcattgtt cctggaggaa 3540
 atgcttagga cccgagtagg aacgaaacat gcaatactac tagttgcagt ttcttttgtg 3600
 acattgatca cagggaacat gtcctttaga gacctgggaa gagtgatggt tatggtaggc 3660
 gccactatga cggatgacat aggtatgggc gtgacttata ttgccctact agcagccttc 3720
 aaagtcagac caacttttgc agctggacta ctcttgagaa agctgacctc caaggaattg 3780
 atgatgacta ctataggaat tgtactcttc tcccagagca ccataccaga gaccattctt 3840

gagttgactg atgcgttagc cttaggcatg atggtcctca aaatggtgag aaatatggaa 3900

aagtalcaat tggcagtgac tatcatggct atcttgtgcg tcccaaacgc agtgatatta 3960

caaaacgcat ggaaagttag ttgcacaata ttggcagtgg tgtccgtttc cccactgttc 4020

ttaacatcct cacagcaaaa aacagattgg ataccattag cattgacgat caaaggtctc 4080

aatccaacag ctatTTTTCT aacaaccctc tcaagaacca gcaagaaaag gagctggcca 4140

ttaaagtagg ctatcatggc agtcgggatg gtgagcattt tagccagttc tctcctaaaa 4200

aatgatattc ccatgacagg accattagtg gctggagggc tcctcactgt gtgctacgtg 4260

ctcactggac gatcggccga tttggaactg gagagagcag ccgatgtcaa atgggaagac 4320

caggcagaga tatcaggaag cagtccaatc ctgtcaataa caatatcaga agatggtagc 4380

atgtcgataa aaaaagaaga ggaagaacaa aactgacca tactcattag aacaggattg 4440

ctggtgatct caggactttt tcctgtatca ataccaatca cggcagcagc atggtacctg 4500

tgggaagtga agaacaacg ggccggagta ttgtgggatg ttcttcacc cccacccatg 4560

ggaaaggctg aactggaaga tggagcctat agaattaagc aaaaagggat tcttgatat 4620

tcccagatcg gagccggagt ttacaaagaa ggaacattcc atacaatgtg gcatgtcaca 4680

cgtggcgctg ttctaataca taaaggaaag aggattgaac caacatgggc ggacgtcaag 4740

aaagacctaa tatcataatg aggaggctgg aagttagaag gagaatggaa ggaaggagaa 4800

gaagtccagg tattggcact ggagcctgga aaaaatccaa gagccgtcca aacgaaacct 4860

ggtcttttca aaaccaacgc cggaacaata ggtgctgtat ctctggactt ttctcctgga 4920

acgtcaggat ctccaattat cgacaaaaaa ggaagaattg tgggtcttta tggtaatggt 4980

gttgttaca ggaatggagc atatgtgagt gctatagccc agactgaaaa aagcattgaa 5040

gacaaccag agatcgaaga tcacattttc cgaagagaa gactgacat catggacctc 5100

caccagagg cggaagac gaagagatac cttccggcca tagtcagaga agctataaaa 5160

cggggtttga gaacattaat cttggcccc actagagttg tggcagctga aatggaggaa 5220

gcccttagag gacttcaat aagataccag acccagcca tcagagctga gcacaccggg 5280

cgggagattg tggacctaat gtgtcatgcc acatttacca tgaggctgct atcaccagtt 5340

agagtgcaa actacaacct gattatcatg gacgaagccc atttcacaga cccagcaagt 5400

atagcagcta gaggatacat ctcaactcga gtggagatgg gtgaggcagc tgggattttt 5460

atgacagcca ctccccggg aagcagagac ccatttcctc agagcaatgc accaatcata 5520

gatgaagaaa gagaaatccc tgaacgctcg tggaattccg gacatgaatg ggtcacggat 5580

tttaaaggga agactgtttg gticgttcca agtataaaag caggaaatga tatagcagct 5640

tgctgagga aaaatggaaa gaaagtgata caactcagta ggaagacctt tgattctgag 5700

tatgtcaaga ctagaaccaa tgattgggac ttcgtggtta caactgacat ttcagaaatg 5760

ggtgccaatt tcaaggctga gagggttata gacccagac gctgcatgaa accagtcata 5820

ctaacagatg gtgaagagcg ggtgattctg gcaggaccta tgccagtgc cactctagt 5880

gcagcacaaa gaagaggag aataggaaga aatccaaaa atgagaatga ccagtacata 5940

tacatggggg aacctctgga aaatgatgaa gactgtgcac actggaaaga agctaaaatg 6000

ctcctagata acatcaacac gccagaagga atcattccta gcatgttcga accagagcgt 6060

gaaaagggtg atgccattga tggcgaatac cgcttgagag gagaagcaag gaaaaccttt 6120

gtagacttaa tgagaagagg agacctacca gtctggttgg cctacagagt ggcagctgaa 6180

ggcatcaact acgcagacag aagggtgtgt ttgatggag tcaagaacaa ccaaatccta 6240

gaagaaaacg tggaagtga aatctggaca aaagaagggg aaaggaagaa attgaaaccc 6300

agatggttgg atgctaggat ctattctgac ccactggcgc taaaagaatt taaggatttt 6360

gcagccggaa gaaagtctct gacctgaac ctaatcacag aaatgggtag gctccaacc 6420

ttcatgactc agaaggcaag agacgcactg gacaacttag cagtgtgca cacggctgag 6480

gcaggtggaa gggcgtacaa ccatgtcttc agtgaactgc cggagaccct ggagacattg 6540

cttttactga cacttctggc tacagtcacg ggagggatct ttttattctt gatgagcgca 6600

aggggcatag ggaagatgac cctgggaatg tgctgcataa tcacggctag catcctccta 6660

tggtacgcac aaatacagcc aactggata gcagcttcaa taatactgga gttttttctc 6720

atagttttgc ttattccaga acctgaaaaa cagagaacac cccaagacaa ccaactgacc 6780

tacgttgta tagccatcct cacagtgtg gccgcaacca tggcaaacga gatgggtttc 6840

ctagaaaaaa cgaagaaaga tctcgattg ggaagcattg caaccagca acccgagagc 6900

aacatcctgg acatagatct acgtcctgca tcagcatgga cgctgtatgc cgtggccaca 6960

acatttgta caccaatgtt gagacatagc attgaaaatt cctcagtga tgtgtcccta 7020

acagctatag ccaaccaagc cacagtgtta atgggtctcg ggaaaggatg gccattgtca 7080

aagatggaca tcggagtcc cttctcgcc attggatgct actcacaagt caacccata 7140

actctcacag cagctctttt cttattggtg gcacattatg ccatcatagg gccaggactc 7200

caagcaaaag caaccagaga agctcagaaa agagcagcgg cgggcatcat gaaaaacca 7260

actgtcgatg gaataacagt gattgaccta gatccaatac cttatgatcc aaagtttgaa 7320

aagcattgg gacaagtaat gctcctagtc ctctgcgtga ctcaagtatt gatgatgagg 7380

actacatggg ctctgtgtga ggctttaacc ttagctaccg ggcccatctc cacattgtgg 7440

gaaggaaatc caggagagtt ttggaacact accattgcgg tgtcaatggc taacattttt 7500

agaggagatt 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 aggaggttgg tcatactatt gtggaggact aaagaatgta 7860

agagaagtca aaggcctaac aaaaggagga ccaggacacg aagaacccat ccccatgtca 7920

acatatgggt ggaatctagt gcgtcttcaa agtggagtig acgttttctt catcccgcca 7980

gaaaagtgtg acacattatt gtgtgacata ggggagtcac caccaaattc cacagtggaa 8040

gcaggacgaa cactcagagt ccttaactta gtagaaaatt ggttgaacaa caaacactca 8100

ttttgcataa aggttctcaa cccatataatg ccctcagtca tagaaaaaat ggaagcacta 8160

caaaggaaat atggaggagc cttagtgagg aatccactct cacgaaactc cacacatgag 8220

atgtactggg tatccaatgc ttccgggaac atagtgtcat cagtgaacat gatttcaagg 8280

atgttgatca acagatttac aatgagatac aagaaagcca cttacgagcc ggatgttgac 8340

ctcggaaagc gaacccgtaa catcgggatt gaaagtgaga taccaaacct agatataatt 8400

gggaaaagaa tagaaaaaat aaagcaagag catgaaacat catggcacta tgaccaagac 8460

caccataca aaacgtgggc ataccatggt agctatgaaa caaaacagac tggatcagca 8520

tcatccatgg tcaacggagt ggtaggctg ctgacaaaac cttgggacgt tgtcccatg 8580
 gtgacacaga tggcaatgac agacacgact ccatttggac aacagcgcgt ttttaagag 8640
 aaagtggaca cgagaaccca agaaccgaaa gaaggcacga agaaactaat gaaaataaca 8700
 gcagagtggc ttiggaaaga attaggggaag aaaaagacac ccaggatgtg caccagagaa 8760
 gaattcaca gaaaggtgag aagcaatgca gccttggggg ccatattcac tgatgagaac 8820
 aagtggaagt cggcacgtga ggctgttgaa gatagtaggt tttgggagct ggttgacaag 8880
 gaaaggaatc tccatcttga aggaaagtgt gaaacatgtg tgtacaacat gatgggaaaa 8940
 agagagaaga agctagggga attcggcaag gcaaaaggca gcagagccat atggtacatg 9000
 tggttggag cagcttctt agagtittga gccctaggat tcttaaatga agatcactgg 9060
 ttctccagag agaactccct gagtggagtg gaaggagaag ggctgcacaa gctaggttac 9120
 attctaagag acgtgagcaa gaaagaggga ggagcaatgt atgccgatga caccgcagga 9180
 tgggatacaa aaatcacact agaagacct aaaaatgaag agatggtaac aaaccacatg 9240
 gaaggagaac acaagaaact agccgaggcc attttcaaac taacgtacca aaacaaggtg 9300
 gtgcgtgtgc aaagaccaac accaagaggc acagtaatgg acatcatatc gagaagagac 9360
 caaagaggta gtggacaagt tggcacctat ggactcaata ctttcacaa tatggaagcc 9420
 caactaatca gacagatgga gggagaagga gtctttaaaa gcattcagca cctaacaatc 9480
 acagaagaaa tcgctgtgca aaactgggta gcaagagtgg ggcgcgaaag gttatcaaga 9540
 atggccatca gtggagatga ttgtgttg aaacctttag atgacaggtt cgcaagcgt 9600
 ttaacagctc taaatgacat gggaaagatt aggaaagaca tacaacaatg ggaaccttca 9660
 agaggatgga atgattggac acaagtgcc ttcgtttcac accatttcca tgagttaatc 9720

atgaaagacg gtcgcgtact cgttgttcca ttagaaaacc aagatgaact gattggcaga 9780

gcccgaatct cccaaggagc aggggtgtct ttgcgggaga cggcctgttt ggggaagtct 9840

tacgccc aaa tgggagctt gatgtacttc cacagacgcg acctcaggct ggcggaat 9900

gctatttgc tggcagtacc atcacattgg gtccaacaa gtcgaacaac ctggtccata 9960

catgctaaac atgaatggat gacaacggaa gacatgctga cagtctggaa cagggtgtgg 10020

attcaagaaa acctatggat ggaagacaaa actccagtgg aaacatggga ggaaatccca 10080

tacttgggga aaagagaaga ccaatggtgc ggctcattga ttgggttaac aagcagggcc 10140

acctgggcaa agaacatcca agcagcaata aatcaagtta gatcccttat aggcaatgaa 10200

gaatacacag attacatgcc atccatgaaa agattcagaa gagaagagga agaagcagga 10260

gttctgtggt agaaagcaaa actaacatga aacaaggcta gaagtcaggt cggattaagc 10320

catagtacgg aaaaaactat gctacctgtg agccccgtcc aaggacgtta aaagaagtca 10380

ggccatcata aatgcatag cttgagttaa ctatgcagcc ttagctcca cctgagaagg 10440

tgtaaaaaat ccgggaggcc acaaacatg gaagctgtac gcatggcgta gtggactagc 10500

ggttagggga gaccctccc ttacaatcg cagcaacaat gggggcccaa ggcgagatga 10560

agctgtagtc tcgtggaag gactagaggt tagaggagac ccccccga aaacacag 10620

catattgacg ctgggaaaga ccagagatcc tgctgtctcc tcagcatcat tccaggcaca 10680

gaacgccaga aaatggaatg gtgctgttga atcaacaggt tct 10723