



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I336626B1

(45) 公告日：中華民國 100 (2011) 年 02 月 01 日

(21) 申請案號：098133581

(22) 申請日：中華民國 90 (2001) 年 12 月 04 日

(51) Int. Cl. : *A61K39/12 (2006.01)* *C12N15/40 (2006.01)*
 C12N15/86 (2006.01) *A61P31/14 (2006.01)*

(71) 申請人：北歐巴伐利亞公司 (丹麥) BAVARIAN NORDIC A/S (DK)

丹麥

冒險科技中心 (馬來西亞) VENTURE TECHNOLOGIES SDNBHD (MY)

馬來西亞

(72) 發明人：保羅 霍理 HOWLEY, PAUL (GB)；萊理爾 薩傑 LAYRER, SONJA (DE)；卡度
 莎 瑪莉 J CORDOSA, MARY JANE (MY)；山姆 馬德林 S H SUM,
 MAGDELINE SIA HENRY (MY)

(74) 代理人：惲軼群；陳文郎

申請專利範圍項數：24 項 圖式數：12 共 83 頁

(54) 名稱

黃病毒 NS1 次單元疫苗 (二)

FLAVIVIRUS NS1 SUBUNIT VACCINE

(57) 摘要

本發明係有關黃病毒之 NS1 蛋白或其部分，特別是登革熱病毒。一黃病毒之 NS1 蛋白或部分可用於預防接種以對抗該黃病毒和許多其它黃病毒。本發明特別有關一種登革熱病毒亞型之 NS1 蛋白或其部分 (特別是亞型 2)，可用於預防接種以對抗來自所有亞型之登革熱病毒。本發明更有關包含一種編碼一黃病毒 NS1 或其部分之表現卡匣的 DNA、包含該 DNA 之載體以及含有或表現一黃病毒 NS1 之疫苗。

The present invention relates to NS1 proteins or parts thereof of Flaviviruses, in particular of Dengue viruses. The NS1 protein or parts thereof of one Flavivirus is useful for vaccination against said Flavivirus and against several other Flaviviruses. The invention concerns in particular the NS1 protein or parts thereof of one Dengue virus subtype, in particular subtype 2, useful for vaccination against Dengue viruses from all subtypes. The invention further concerns DNA comprising an expression cassette coding for a Flavivirus NS1 or parts thereof, vectors comprising said DNA and vaccines containing or expressing a Flavivirus NS1.

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

發明領域

本發明係有關黃病毒之NS1蛋白或其部分，特別是登革熱病毒。一黃病毒之NS1蛋白或部分可用於預防接種以對抗該黃病毒和許多其它黃病毒。本發明特別有關一種登革熱病毒亞型之NS1蛋白或其部分(特別是亞型2)，可用於預防接種以對抗來自所有亞型之登革熱病毒。本發明更有關包含一種編碼一黃病毒NS1或其部分之表現卡匣的DNA、包含該DNA之載體以及含有或表現一黃病毒NS1之疫苗。

【先前技術】

發明背景

登革熱之病原體是登革熱病毒，其屬於黃病毒屬黃病毒科(Burke 和 Monath, 2001)。一特別重要之黃病毒的亞群係稱之為由蚊子攜帶的黃病毒，即經蚊子傳播的黃病毒。除上所提及之登革熱病毒之外，此群還包含諸如西尼羅河病毒、日本腦炎病毒和黃熱病毒之其它重要的病毒(病毒領域，由 Fields B.N. 編輯，Lippincott-Raven 出版社，第 3 版 1996，ISBN: 0-7817-0253-4 第 931-1034 頁)。由這些病毒傳播之典型的疾病係由西尼羅河病毒、日本腦炎病毒引起之西尼羅河熱和西尼羅河腦炎、由黃熱病毒引起之黃熱病以及由登革熱病毒引起之登革熱、登革出血熱(DHF; 見下文)和登革熱休克綜合症狀。

登革熱病毒由三種結構性蛋白質形成之包封的、單股、正股 RNA 病毒：外殼蛋白(C)，其形成一種結合病毒基因組之核

殼體，其被其中附有 M(膜)和 E(封套)蛋白之脂肪雙層圍繞。該基因組將近 11kb 長且包含一個編碼約 3400 胺基酸殘基之多蛋白前體的單一開放讀碼架構。個體的病毒蛋白係藉細胞和病毒的蛋白酶之作用，產生自此前趨物。該三種結構性蛋白(C、M和E)係由該多蛋白之 N-端部分衍生而來且接著七個非結構性蛋白：NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5 (Lindenbach 和 Rice, 2001)。

存在於所有黃病毒中之糖蛋白 NS1 似乎是病毒生存能力所不可或缺的。登革熱病毒 NS1 係由受感染之哺乳動物細胞分泌而來，其呈可溶之六聚體型式(Flamand 等人, 1999)。此非共價鍵結的六聚體錯合物係由 3 個二聚體次單元形成且具 310kDa 之分子量。如其仍是被感染的細胞表面唯一的病毒固有蛋白時，對於 NS1 蛋白輸出至細胞膜而言，二聚化係不可或缺的。

哺乳動物細胞中，而非昆蟲細胞株中可支持登革熱感染，部分的傳遞 NS1 被釋放於細胞外周圍。細胞外之 NS1 不是以可溶性蛋白形式分泌(呈一較高六聚的寡聚體型式存在)，就是呈與微粒子而非病毒粒子聯結形式分泌。此外，已發現 NS1 於受登革熱病毒感染之病人之血清中循環，此暗示了 NS1 的分泌在黃病毒感染人類宿主上可能是一重要因素。在黃病毒的感染期間，NS1 蛋白誘發一強烈抗體反應來幫助清除宿主中之感染病毒，其可能係透過補體調節路徑(Schlesinger, J. J. 等人, 1987)和抗體依賴性細胞之細胞毒性(ADCC) (Schlesinger, J. J. 等人, 1993)。

登革熱與其四種血清類型，登革熱病毒血清類型 1 (Den-1) 至登革熱血清類型 4 (Den-4)，對於黃病毒屬感染人類方面係非常重要的，其產生之疾病的範圍從似流行性感冒症狀至嚴重的或致命的疾病，伴隨休克之登革熱出血熱。登革熱之爆發一直是人口密集、具有大量蚊子傳染媒介之熱帶與亞熱帶區域之重要的公共衛生問題。

因為經蚊子傳播之黃病毒引起之登革熱感染與其它疾病之散布的關係，已經導致世界上許多地方更致力於研發可預防登革熱 (DF) 與登革出血熱 (DHF) 之登革熱疫苗以及可用於保護已接種疫苗之個體免於因某些或全部經蚊子傳播之黃病毒引起之感染的疫苗。

雖然大部分之 DF 病例在第一次感染四種血清類型中之任何一種後出現徵兆，但是大部分之 DHF 病例是發生在患者受到第二次感染與第一次感染不同血清類型之登革熱病毒時。此觀察報告產生了此假說，即於一適當的間隔，以不同病毒血清類型依序感染具有對抗一種登革熱血清類型之抗體之個體，可能會導致特定數量的 DHF 病例。抗體依賴性增高 (ADE) 在登革熱以及其它具有封套之病毒方面已在活體外獲得證明，且在 DHF 之疾病發展上被視為一重要的機制。

亦可注意到，DHF 通常出現在地理位置上具有多種 (三或四) 病毒血清類型一起傳播之區域。在諸如東南亞國家具有地方性 DHF 之區域中，特定年記的發病率在兒童中較高，而許多 DHF 病例在較年長的族群中較少。此大致上符合針對登革熱之血清廣泛的增加，顯示出自然的感染可引起保護性免疫。此現

象與由諸如 A 型肝炎病毒之病毒感染中所觀察到的不同。臨床軼事之觀察顯示出，病人有可能會遭受二次的 DHF(Nimmannitya 等人，1990)，然而這是極罕見的，且難於精確的鑑定導致第二次與後來感染的血清類型。目前為止，還未有報告指出在相同個體中有四種感染，儘管事實上全部四種登革熱病毒血清類型於同一地區傳播。此暗示著，在本質上，於同一個體中，遭受二或三種登革熱病毒血清類型感染可能會產生交叉反應之抗體或甚至一種交叉反應之細胞毒性淋巴反應。此可能藉由本質上剩餘之登革熱病毒血清類型來調控或保護預防感染。

目前還不存有經認可之登革熱疫苗。現今，登革熱病毒感染的預防係依賴控制主要的蚊子宿主埃及黑斑蚊。殺蟲劑耐受性、科技和經濟支持的缺少會使得當地衛生部門維持有效的蚊子控制計劃，且宿主蚊子和登革熱病毒兩者之持續地理上的傳播使其特別無法以目前之蚊子控制計劃來預防。所以，發展安全又有效之疫苗來對抗登革熱病毒之全部四種血清類型，已被 WHO 指定為優先考慮用於預防登革熱感染最有成本效益的方式。WHO 建議，對抗登革熱和 DHF 之理想的疫苗應是可預防由所有血清類型所產生之感染，藉此連續地感染就不會發生。

為這目的，WO 98/13500 計劃使用一種會表現所有登革熱病毒亞型之抗原的重組經修飾的牛痘病毒 Ankara(MVA)，或使用四種重組 MVA，其中每一重組 MVA 表現至少一種登革熱病毒亞型之抗原。兩者方式均提供非常好的疫苗來對抗所有的登革熱病毒亞型。然而，希望提供一種單一次單元疫苗，其在施用之

後可產生一種可對抗多於一種黃病毒或多於一種登革熱病毒血清類型，較佳是對抗所有登革熱病毒血清類型之免疫反應。

【發明內容】

發明概要

因此，本發明之標的係提供一種衍生自黃病毒或黃病毒亞型之疫苗，其係安定的、易於生產，且誘導一種免疫反應，其可保護經施打疫苗之個體不僅免於衍生成該疫苗之該黃病毒或黃病毒亞型之感染，且免於其它黃病毒或黃病毒的感染。本發明之一特定的標的係提供一種衍生自蚊子所傳播之黃病毒之疫苗，其保護經施打疫苗之個體不僅免於衍生成該疫苗之蚊子所傳播之黃病毒或黃病毒亞型之感染，且免於其它蚊子所傳播之黃病毒或黃病毒亞型之感染。本發明之進一步標的係提供一種衍生自一種登革熱病毒亞型之疫苗，且保護一個體免於所有登革熱亞型之感染。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

這些目的已藉由提供黃病毒之 NS1 蛋白或其部分以及提供各別包含編碼有黃病毒 NS1 蛋白或其一部分之表現卡匣之 DNA 序列得到解決。明確地，對於提供一種衍生自經蚊子傳播之黃病毒的疫苗之目的，可藉由提供經蚊子傳播之黃病毒之 NS1 蛋白或其部分得到解決，該疫苗保護一個體不僅免於衍生成該疫苗之經蚊子傳播之黃病毒的感染，且亦免於其它經蚊子傳播之黃病毒之感染，特別是登革熱病毒，較佳是登革熱血清類型 2 以及各別相對之 DNA 序列。更明確地，對於提供一種衍

生自經登革熱病毒亞型的疫苗之目的，可藉由提供登革熱病毒（特別是登革熱血清類型 2 和各別之 DNA 序列）之 NS1 蛋白或其部分得到解決，該疫苗保護一個體至少免於所有登革熱亞型之感染，且較佳係免於其它黃病毒之感染（特別是諸如日本腦炎病毒、黃熱病毒和西尼羅河病毒之經蚊子傳播之黃病毒）。

於實驗部分中被更詳細地顯示地，來自一登革熱病毒血清類型之被重新合成(*de novo*)表現的 NS1 蛋白在疫苗接種後會誘導一會與登革熱病毒血清類型 1、2、3 和 4 之 NS1 蛋白加上來自黃病毒屬之其它成員（諸如日本腦炎病毒、黃熱病毒和西尼羅河病毒）的 NS1 產生交叉反應的抗體反應。因此，來自一種登革熱病毒血清類型之 NS1 蛋白質係一通用的 DHF 次單元來供用於同時保護對抗登革熱病毒之所有血清類型以及進一步對抗黃病毒屬之其他病毒。因為於此次單元疫苗策略中沒有涉及 E 蛋白，不會有在隨後暴露於登革熱病毒的任一血清類型時之抗體依賴性增高(ADE)的風險，而因此疫苗相關之 DHF 在登革熱傳染的自然爆發感染期間應不會被誘發。

根據較佳實施例，本發明係有關一種包含一編碼至少一種黃病毒 NS1 蛋白或其部分之表現卡匣的 DNA。此文中之術語“至少”意指該表現卡匣可進一步編碼額外的蛋白/胜肽，其可為分離的蛋白/胜肽或接至該 NS1 蛋白或其部分，如於下所詳細定義者。於本文中術語“DNA”指意任何類型之 DNA，諸如單股 DNA、雙股 DNA、線性或環狀 DNA 或呈質體之 DNA 或為一病毒基因組。因為黃病毒係 RNA 病毒，所以編碼黃病毒 NS1 蛋白之 DNA 係諸如 cDNA 或合成之 DNA 之非自然發生之 DNA。

術語,,編碼黃病毒 NS1 蛋白或其部分之表現卡匣“意指位於黃病毒 NS1 蛋白或其部分之編碼序列之前加上可控制轉錄(特別是轉錄之起始)的要素。有關此轉錄調節要素之例子為原核生物起動子/增強子。較佳之真核起動子/增強子係人類巨大細胞病毒立即早期起動子/增強子以及如於實例部分中所揭露, 諸如 7.5 起動子、痘病毒最小起動子之痘病毒起動子。該痘病毒最小起動子之序列示於第 2 圖中且為序列編號: 9。必要的話, 該表現卡匣可進一步包含控制轉錄之終止的要素, 諸如原核終止要素或真核多 A 訊號序列。

該表現卡匣可僅表現黃病毒之 NS1 蛋白或其部分或可表現連同一或多種另外的黃病毒蛋白/胜肽之 NS1 蛋白或其部分, 其中該 NS1 蛋白或其部分和該另外的蛋白/胜肽被生成分離蛋白/胜肽或融合蛋白/胜肽形式。於此說明書若沒有定義, 則於本發明內文中之術語,,胜肽“意指至少 10 個胺基酸, 較佳 20 個胺基酸, 更佳 25 個胺基酸之連續的胺基酸序列長列。

該另外的黃病毒蛋白並不是完整的 E-蛋白, 因為此蛋白似乎涉及了 DHF 的發展。因此, 假如該另外的黃病毒胜肽係衍生自 E-蛋白, 其應該要包含少於 40 個胺基酸, 較佳係少於 35 胺基酸。假如衍生自 E-蛋白之胺基酸序列長列與 NS1 蛋白或其部分一起表現, 則應可證實此胺基酸長列沒有包含涉及 ADE 和 DHF 生成之抗原決定位。

除了 NS1 蛋白或其部分外, 假如該表現卡匣亦表現呈分離蛋白/胜肽形式之另外的黃病毒蛋白/胜肽, 則該表現卡匣在介於該編碼 NS1 蛋白或其部分之序列與編碼另外的黃病毒蛋白之

序列間，可能包含一核糖體內入位(IRES)。IRES 要素係習知此技藝者所知悉者。IRES 要素之例子為小 RNA 病毒 IRES 要素或 C 型肝炎病毒之 5' 未編碼區域。

任擇地，編碼該 NS1 蛋白或其部分之核苷酸序列可被融合至一編碼另外的黃病毒蛋白/胜肽之 DNA 序列，藉此，介在該 NS1 蛋白或其部分與該另外的黃病毒蛋白/胜肽之間形成一融合蛋白。設若該 NS1 蛋白或其部分與該另外的黃病毒蛋白/胜肽欲被形成融合蛋白/胜肽之形式，則該各別之編碼序列被以對準架構的融合(fused in frame)。

於較佳具體例中，在編碼該 NS1 蛋白或其部分之 DNA 序列之前加上編碼 E-蛋白之糖化訊號序列之序列。據此具體例，產生了一融合蛋白，其包含融合至該 NS1 蛋白或其部分之 E-蛋白糖化訊號序列。如上所示，該 E-蛋白衍生之胺基酸長列應是儘可能的短，且其應該將此胺基酸長列會包含涉及 ADE 與 DHF 生成之抗原決定位的可能排除在外。該 E-蛋白之糖化訊號序列符合此要求。

於一任擇之較佳具體例中，本發明之表現卡匣僅包含編碼該 NS1 蛋白或其部分之黃病毒序列。因此，於較佳具體例中，本發明之表現卡匣不會表現任何來自其它黃病毒基因組部分之其它胜肽/蛋白質，特別是 NS2A 或 E 蛋白。

於另一任擇的具體例中，本發明之 DNA 表現一 NS1 蛋白或其部分，其呈具有非衍生自黃病毒之蛋白/胜肽之融合蛋白形式。該蛋白/胜肽包含非-黃病毒訊號序列或用於偵測或純化諸如 tag 之經表現之融合蛋白的序列。

如本發明之較佳具體例中，於表現卡匣中之黃病毒序列的一般結構簡介如下：在天然黃病毒感染期間，該病毒產生一種單一的多蛋白，其之後先被宿主細胞之蛋白酶打斷，然後被病毒編碼的蛋白酶打斷成下列蛋白：C、PrM 和 M、E、NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5(蛋白質次序依多蛋白質前體蛋白質排列)。所以，DNA 序列，特別是編碼 NS1 蛋白或其部分之 cDNA 序列必須額外加上"ATG"起始密碼子。於一較佳具體例中，該起始 ATG 之後被加上一糖化訊號序列，藉此新合成之 NS1 蛋白在內質網時被糖化。此訊號序列係習知此技藝者所知悉者。最後，該編碼蛋白質之卡匣需要一個終止密碼子，其可以是一個加在該編碼 cDNA 序列之蛋白質的 3' 終端之 TAG。例如，本發明所使用之"ATG+訊號序列"要素係衍生自 E 蛋白之疏水性 C-終端(最後 28 個胺基酸，其為登革熱病毒新天竺鼠品種(„NGC 品種“，基因資料庫登錄號 AF038403)以胺基酸 M(ATG)為起始)。本發明之一典型的表現卡匣示於第 2 圖且以序列編號 9 和序列編號 10 表示。

因此簡言之，此具體例有關一種包含一表現之卡匣之 DNA，該表現卡匣包含編碼一黃病毒 NS1 蛋白或其部分之序列，其中該編碼序列之前加上一起始密碼子(“ATG”)與一編碼用於糖化之訊號序列的序列，較佳係衍生自如上所定義之 E-蛋白以及其中該編碼序列最後以一轉譯之終止密碼子(第 1A、1C 和 2 圖、序列編號 5-10)。

本發明之 DNA 序列編碼一黃病毒 NS1 病毒或其部分。術語“黃病毒”意指任何之黃病毒。更佳地，術語“黃病毒”意指諸如

西尼羅河病毒、日本腦炎病毒、黃熱病毒和登革熱病毒之經蚊子傳播之黃病毒。衍生自一種以如本發明之 DNA 編碼之經蚊子傳播的 NS1 蛋白或其部分應可保護經接種疫苗之個體不僅免於衍生成該疫苗之病毒或病毒亞型之感染，且免於衍生成該疫苗之其它經蚊子傳播之病毒或其它病毒亞型的感染。該 NS1 蛋白可較佳係任何登革熱病毒亞型。更佳地，該 NS1 蛋白編碼序列係衍生自一種諸如登革熱病毒新天竺鼠品種 („NGC 品種“，基因資料庫登錄號 AF038403) 之登革熱亞型 2。術語“亞型”和“血清類型”在此發明書中可交換使用。術語 „NS1 蛋白或其部分“中之術語 „其部分“意指該 NS1 蛋白之胺基酸長列，其夠長以誘導一特定免疫反應來對抗衍生成該 „其部分“之 NS1 蛋白。假如該黃病毒是一登革熱病毒，該胺基酸長列應是可在一經接種疫苗之動物 (包括人類) 身上誘導產生對抗所有登革熱病毒亞型之 NS1 蛋白之免疫反應的胺基酸長列。於實例部分中顯示熟悉此技藝人士如何能決定是否 NS1 蛋白或其部分誘導產生特定對所有登革熱亞型之免疫反應。根據一較佳具體例，該黃病毒序列編碼整個 NS1 蛋白。

簡言之，本發明最佳具體例之一係一種包含編碼有一經蚊子傳播之黃病毒 NS1 或其部分之表現卡匣之 DNA，其中該黃病毒較佳係登革熱，更別是登革熱病毒亞型 2，且其中該 NS1 蛋白或其部分之表現係由真核生物轉錄調節要素控制。更佳地是，本發明之 DNA 編碼一呈具有一糖化訊號序列之融合蛋白形式之 NS1 蛋白或其部分。

本發明進一步提及包含有如本發明之 DNA 之載體。術語 „

載體“意指任習知此藝人士知悉者。載體可以是諸如 pBR322 之質體載體或 pUC 系列之載體。更佳地，該載體是一病毒載體。於本發明之內文中，術語“病毒的載體”或“病毒載體”意指包含病毒基因組之感染性病毒。於此情況下，本發明之 DNA 是要被選殖入該各別病毒載體之病毒基因組中。之後該重組的病毒基因組被包裝起來，因此所獲得之重組載體可被用於感染細胞和細胞株，特別是感染包括人類之動物的活體。如本發明之典型的病毒載體是腺病毒載體、腸病毒載體或以腺相關之病毒 2(AAV2) 為基礎之載體。最佳是痘病毒的載體。該痘病毒較佳應是金絲雀痘病毒、家禽痘病毒或牛痘病毒。更佳的是經修飾的牛痘病毒 Ankara(MVA) (Sutter, G 等人, [1994], Vaccine 12: 1032-40)。典型之 MVA 品種是 MVA 575，其已寄存在歐洲動物細胞培養收集中心，寄存號碼為 ECACC V00120707。更佳的是 MVA-BN 或其衍生物，其已述於在 2001 年 11 月 22 日，由申請人巴代利亞日耳曼民族研究院 GmbH(Bavarian Nordic Research Institute GmbH)，以“經修飾之牛痘 Ankara 病毒變異體”為標題，於歐洲專利局提申之 PCT 申請案中。MVA-BN 已寄存於歐洲動物細胞培養收集中心中，寄存號碼為 ECACC V00083008。藉由使用 MVA-BN 或其衍生物，額外的技術問題已經解決，俾提供一可對抗黃病毒之特別安全的病毒疫苗，因為已顯示出 MVA-BN 病毒載體是一完全減毒病毒，其衍生自經修飾之牛痘 Ankara 病毒且其特徵在於失去其於人類細胞株中有效複製的能力。由於缺少在人類中之複製能力，所以 MVA-BN 比任何其它已知之牛痘病毒品種還安全。於較佳具體例中，本

發明有關一種含有如本發明之 DNA 的 MVA-BN 和 MVA-BN 衍生物載體。MVA-BN 之特徵、允許評詁是否 MVA 是 MVA-BN 或 MVA-BN 之衍生物的生物分析的說明以及允許獲得 MVA-BN 或其衍生物之方法顯示於以下說明部分與實施例 3 中。

術語病毒之"衍生物"，如寄存號碼 ECACC V00083008 之病毒的"衍生物"(即 MVA-BN 之衍生物)，意指顯示至少一種該經寄存品種之特徵，但在其基因組之一或多部分顯示差異之牛痘病毒。較佳地，衍生物具有至少二個、更佳地衍生物具有至少三個、更佳地具有下列四個 MVA-BN 之所有特徵。特別是，MVA-BN 之衍生物基本上具有與 MVA-BN 相同之複製特徵。與該寄存病毒具相同"複製特徵"之病毒意指，在 CEF 細胞與細胞株 BHK、HeLa、HaCat 和 143B 中，具有與已寄存之品種相似擴增比率之病毒，且當以 AGR129 基因轉殖老鼠模型偵測時，其在活體內顯示相似之複製。MVA-BN 之特徵如下：

- 能在雞胚胎纖維母細胞(CEF)與幼倉鼠腎細胞株 BHK (ECACC 85011433)中有效複製，但在人類細胞株 HaCat 中無複製能力(Boukamp 等人，1988, J Cell Biol. 106(3): 761-71)，
- 無法在活體內複製，
- 相較於習知之 MVA575(ECACC V00120707)，在互刺激模型中誘導較高之致免疫性和/或
- 當相較於 DNA-初次/牛痘病毒推升療法，在牛痘病毒初次/牛痘病毒推升療法中誘導至少實質上相同位準之免疫力。

術語"無有效複製之能力"意指如本發明之病毒，在人類細胞株 HaCat 中顯示少於 1 之複製率(Boukamp 等人，1988, J Cell

Biol. 106(3): 761-71。較佳地，用作為本發明之載體之病毒在人類細胞株 HaCat 中之擴增比率係 0.8 或更少。一病毒之“擴增比率”係產生自一感染的細胞(輸出)的病毒相對於原來用於在第一位置感染該細胞之數目(輸入)的比率(“擴增比率”)。介於輸出與輸入間之比率為“1”定義為一擴增狀態，其中產生自該感染的細胞之病毒的數目是相同於原來用於感染該細胞之數目。此狀態暗示一個事實，即經感染的細胞容許病毒感染與病毒複製。最佳的 MVA 載體，特別是 MVA-BN 和其衍生物，在 HaCat 細胞中不會有效複製。詳言之，MVA-BN 在人類胚胎腎細胞株 293 (ECACC No. 85120602)中所顯示之擴增比率為 0.05 至 0.2。於人類骨肉瘤細胞株 143B (ECACC No. 91112502)中，比率係在 0.0 至 0.6 之範圍內。至於人類子宮頸腺瘤細胞株 HeLa (ATCC No. CCL-2)和人類角質細胞細胞株 HaCat (Boukamp 等人，1988，J Cell Biol. 106(3): 761-71)，其等之擴增比率各別在 0.04 至 0.8 和 0.02 至 0.8 之範圍內。MVA-BN 在非洲綠猴腎細胞(CV1: ATCC No. CCL-70)中之擴增比率為 0.01 至 0.06。因此，MVA-BN 於任何測試的人類細胞株中均不會有效的複製。

MVA-BN 在雞胚胎纖維母細胞(CEF:初代培養)或幼倉鼠腎細胞株 BHK(ATCC No. CRL-1632)中之擴增比率明確地大於 1。如上之概述，大於“1”之比率意指有效地複製，因為相較於用於感染細胞之病毒數目，從受感染的細胞產生之病毒數目增加了。因此，病毒可很容易地以大於 500 之比率在 CEF 初代培養中，且以大於 50 的比率在 BHK 細胞中繁殖與擴增。

在定義 MVA-BN 的上下文中，術語“在活體內無法複製”意指病毒無法在如下所述之人類與老鼠模型中複製。該“在活體內無法複製”較佳地可在不能產生成熟 B 和 T 細胞之老鼠中決定。此種老鼠之例子為基因轉殖老鼠模型 AGR129（獲自 Mark Sutter，瑞士蘇黎世大學病毒研究所）。此老鼠品種在 IFN 受體類型 I (IFN- α/β) 和類型 II (IFN- γ) 基因與 RAG 中具有基因標的之干擾。由於此等干擾，該老鼠沒有 IFN 系統且無法產生成熟的 B 和 T 細胞且就其本身而言係嚴重的免疫放棄以及高度易受複製病毒的影響。除了 AGR129 老鼠，任何其它無法產生 B 和 T 細胞且就其本身而言係嚴重的免疫放棄以及高度易受複製病毒的影響之老鼠品種均可使用。特別是，如本發明之病毒，其在以腹內注射 10^7 pfu 之病毒而感染 AGR129 老鼠後之至少 45 天，更佳係 60 天，最佳是 90 天的期間內不會毒殺該老鼠。較佳地，該等顯示“在活體內無法複製”之病毒的進一步特徵為，在以腹內注射 10^7 pfu 之病毒而感染 AGR129 老鼠後之 45 天，更佳係 60 天，最佳是 90 天，沒有病毒可在該老鼠之器官或組織中恢復。

根據致死刺激老鼠模型測得之結果，MVA-BN 和其衍生物較佳之特徵在於比已知之 MVA 575 品種具較高的致免疫性。於此模型中，沒有接種疫苗之老鼠在以諸如西方儲備 (Western Reserve) 品種 L929 TK+ 或 IHD-J 之能充分複製之牛痘品種感染後死亡。以能充分複製之牛痘病毒感染即為於致死刺激模型之說明中所稱之“刺激”。在刺激四天後，老鼠通常會被毒殺且在藉由使用 VERO 細胞來做標準斑分析時，可在卵巢中測得病

毒效價。測定在沒有接種疫苗之老鼠和以如本發明之痘病毒接種疫苗之老鼠中之病毒效價。更明確地說，如本發明之病毒之特徵為，於此測試中，在以 10^2 TCID₅₀/ml 如本發明之病毒接種後，於卵巢中之病毒效價相較於沒有接種之老鼠減少了至少 70%，較佳至少 80%，更佳至少 90%。

MVA-BN 或其衍生物較佳特徵為，相較於以 DNA-初次/牛痘病毒推升療法，其於以牛痘病毒初次/牛痘病毒推升療法中可誘導至少實質上相同之免疫位準。相較於以 DNA-初次/牛痘病毒推升療法，設若以牛痘病毒初次/牛痘病毒推升療法，在下列兩種分析法(„分析法 1“和„分析法 2“)之任一個，較佳係兩者並行，中所測得之 CTL 反應係至少實質上相同時，則一牛痘病毒被視為在相較於以 DNA-初次/牛痘病毒推升療法，以牛痘病毒初次/牛痘病毒推升療法可誘導至少實質上相同之免疫位準。更佳的是，相較於 DNA-初次/牛痘病毒推升療法，在施用牛痘病毒初次/牛痘病毒推升後，以至少一種分析法測得之 CTL 反應係較高的。最佳的是，CTL 反應在下列兩種分析法中均較高。分析法 1:關於牛痘病毒初次/牛痘病毒推升投與法，藉由腹內注射 10^7 TCID₅₀ 如本發明中會表現鼠類多面體之牛痘病毒(述於 Thomson 等人，1988, J. Immunol. 160, 1717)來初次-免疫 8 週大之 BALB/c (H-2d) 老鼠，且在三週之後施用相同方式，相同數目之病毒來推升-免疫該老鼠。為此目的，去建構一個會表現該多面體之重組牛痘病毒係必要的。建構此重組牛痘病毒之方法係習於此技藝人士所知悉者，且於下文中詳細說明之。進行 DNA 初次/牛痘病毒推升療法時，初次之接種係以

肌肉內注射該老鼠 50 μg 會表現與牛痘病毒相同抗原之 DNA 的方式來進行；以與牛痘病毒初次/牛痘病毒推升投與完全相同之方法，來進行牛痘病毒的推升投與。於上文中所引述 Thomson 等人之公開案中，對表現多面體之 DNA 質體亦有說明。於兩個療法中，對抗抗原決定位 SYIPSAEKI、RPQASGVYM 和 / 或 YPHFMPTNL 的 CTL 反應之發展係在推升投與後的兩個星期進行測定。CTL 反應之測定較佳係使用 ELISPOT 分析(述於 Schneider 等人，1998, Nat. Med. 4, 397-402 中)來進行，且在下列實例部分中概述一種如本發明之特定病毒。如本發明之病毒的特徵在於此實驗中，當以產生 IFN- γ 之細胞數目/ 10^6 脾細胞來評估時，由牛痘病毒初次/牛痘病毒推升投與所引起，對抗於上所提及之抗原決定位的 CTL 免疫反應實質上，較佳至少與由 DNA 初次/牛痘病毒推升投與所引起的相同(亦可見實驗部分)。分析法 2: 此分析法基本上對應於分析法 1。然而，代替如分析法 1 中靜脈內投與 10^7 TCID₅₀ 牛痘病毒，於此分析法中係以皮下投與 10^8 TCID₅₀ 如本發明之牛痘病毒來供用於初次免疫和推升免疫。如本發明之病毒的特徵在於此實驗中，當以產生 IFN- γ 之細胞數目/ 10^6 脾細胞來評估時，對抗於上所提及由牛痘病毒初次/牛痘病毒推升投與所引起之抗原決定位的 CTL 免疫反應實質上，較佳至少與由 DNA 初次/牛痘病毒推升投與所引起的相同(亦可見實驗部分)。

對於如何獲得具有如上所示之 MVA-BN 和其衍生物之特性係習於此技藝人士所熟知者：欲獲得此一病毒之方法可包含下列步驟：

- 引入一個已知之牛痘病毒品種，較佳是 MVA 574 或 MVA 575 (ECACC V00120707) 至於其中該病毒能夠有效的複製之非人類細胞中，其中該非人類細胞較佳係選自於 CEF 細胞和細胞株 BHK，
- 分離/豐富來自該等細胞之病毒粒子，以及
- 分析所獲得之病毒是否具有至少一種如上所所欲之生物特性，

其中上述之步驟可任擇地重覆，直至獲得一具有所欲複製特徵之病毒。

有關將如本發明之 DNA 插入痘病毒 DNA 中之方法以及獲得重組痘病毒之方法是習於此技藝人士所熟知者。在一重組牛痘病毒中，如本發明之 DNA 的表現較佳是在痘病毒起動子，更佳是牛痘病毒起動子之轉錄控制下，但並不是絕對的。如本發明之 DNA 較佳是插入病毒基因組之非-必要區域。於本發明之另一個較佳具體例中，異源的核酸序列被插置在 MVA 基因組中自然發生缺失的位置(揭示於 PCT/EP96/02926 中)。

簡言之，本發明之最佳具體例係提供一種包含有如本發明之 DNA 的載體，其中該載體是 MVA-BN 或其衍生物且其中如本發明之 DNA 包含一編碼登革熱病毒，特別是登革熱病毒血清類型 2 之 NS1 蛋白或其部分之表現卡匣。

於一較佳具體例中，本發明係有關由如本發明之 DNA 或如本發明之載體所編碼之 NS1 蛋白或其部分。對於本發明之 NS1 或其部分之定義，參照此說明書上文部分，其中本發明之 DNA 已藉由該 DNA 表現的產物來定義。因此，下列有關如本發明之蛋

白質的簡要說明並不會被視為本發明之限制。簡言之，如本發明之蛋白質可以是一個由任何黃病毒所編碼之經分離的 NS1 蛋白或其部分。該 NS1 蛋白或其部分較佳係衍生自一登革熱病毒、更佳是衍生自登革熱病毒亞型 2。本發明之蛋白質可能僅包含一病毒 NS1 蛋白之胺基酸序列。於一較佳具體例中，該 NS1 蛋白可能包含額外的胺基酸，其於該蛋白質之有效的表現上是必要的。該胺基酸/胺基酸序列之例子已示於上文中，且在蛋白質的 N 端包括一個由被加入之 ATG 密碼子所編碼之甲硫氨酸，以及一個自該 E-蛋白之 C-終端衍生之胺基酸序列，其作用為一用於糖化本發明之蛋白質的訊號序列。其它訊號序列亦包含於本發明之範圍內。於一任擇的具體例中，該 NS1 胺基酸序列或其部分可被融合至其它蛋白/胜肽。融合的夥伴之例子係允許蛋白的鑑定之序列，諸如 tag 或其它黃病毒蛋白質或其部分。

於一較佳具體例中，本發明係有關作為疫苗之本發明的 DNA、載體或 NS1 蛋白或其部分。„疫苗“是一種化合物，即會誘導特定反應之 DNA、蛋白質、載體或病毒。

根據一任擇的具體例，本發明之„疫苗“係根據一登革熱病毒 NS1 蛋白或其一部分，其誘導對抗所有登革熱病毒亞型之 NS1 蛋白之免疫反應。特別是已顯示出，登革熱病毒亞型之 NS1 蛋白，特別是亞型 2，會誘導產生一種對抗所有登革熱病毒亞型之 NS1 蛋白之免疫反應，較佳亦可對抗其它經蚊子傳播之黃病毒。

如上所述，本發明之發明人發現，本發明之黃病毒之 NS1

蛋白或其部分會誘導產生對抗其它黃病毒之 NS1 蛋白之免疫反應。如上所指，“黃病毒”較佳係經蚊子傳播之黃病毒。換言之，本發明之發明人發現，於本案一任擇的具體例中，如本發明之經蚊子傳播之黃病毒的 NS1 蛋白或其部分，會誘導產生一種對抗衍生成疫苗之經蚊子傳播之黃病毒的 NS1 蛋白以及對抗其它經蚊子傳播之黃病毒的免疫反應。因此，衍生自經蚊子傳播之黃病毒之疫苗可用作為對抗一或多種經蚊子傳播之黃病毒的疫苗。術語“衍生自黃病毒之載體”或於本文中相似之術語意指如上所指包含本發明之 DNA 之載體(如痘病毒載體或質體)。因此，此術語意指載體鑲嵌物而不是載體骨架。“衍生自黃病毒之載體”之例子為諸如 MVA 之痘病毒載體，其包含一表現卡匣，該表現卡匣包含一痘病毒起動子、一編碼黃病毒 NS1 蛋白或其部分之序列，其中該編碼有黃病毒 NS1 蛋白或其部分之序列之前加上一 ATG 密碼子和一編碼糖化訊號序列之序列以及其中該編碼序例之終端為一轉譯之終止密碼子。

因此，具本發明之 DNA，載體或 NS1 蛋白之疫苗可用作為可對抗廣泛黃病毒或至少黃病毒亞型之單一次單元疫苗。因此，編碼來自黃病毒或黃病毒亞型之 NS1 蛋白或其部分的 DNA 或載體，或者是來自該黃病毒或亞型之 NS 1 蛋白或其部分可分別作為對抗其它黃病毒和黃病毒亞型之疫苗。例如，衍生自登革熱病毒亞型 2 之疫苗可作為對抗亞型 1、3 和 4 以及對抗亞型 2 之疫苗。其更可用於保護一個體來對抗諸如西尼羅河病毒之其它黃病毒。

於一較佳具體例中，本發明之 DNA 被作成疫苗。投與含有

本發明之真核生物表現卡匣之裸露的 DNA，特別是肌肉內注射 DNA，可導致由該表現卡匣所編碼之蛋白質的表現，此為熟悉此技藝人士所知悉者。該蛋白曝露於免疫系統，且產生一特定之免疫反應。

於一任擇的具體例中，疫苗之接種係藉由投與本發明之載體，特別是病毒載體，更佳是痘病毒載體，最佳是牛痘病毒載體如 MVA 載體來進行。

在以牛痘病毒為基礎之疫苗的製備方面，本發明之病毒被轉換成生理可接受之型式。此製備係根據在製備用於對抗天花之痘病毒疫苗之經驗來進行。(述於 Stickl, H. enriching, [1974] Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392)。例如，將經純化之病毒儲存在 -80°C ，以 $5 \times 10^8 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 之效價配方於約 10mM 三羥甲基氨基甲烷(Tris)、140 mM NaCl pH 7.4 中。在製備疫苗劑方面，如 $10^2 - 10^8$ 個病毒粒子在 100 ml，存在有 2% 蛋白胍和 1% 人類白蛋白之磷酸鹽緩衝的食鹽水(PBS)中被凍乾於安瓿中，較佳是玻璃安瓿。任擇地，該疫苗劑可以逐步冷凍乾燥配方中之病毒來產生。此配方可包含諸如甘露醇、葡萄聚糖、糖、甘氨酸、乳糖或聚乙烯吡咯烷酮之額外的添加物或諸如抗氧化劑或惰性氣體、安定劑或適合活體內投與之蛋白質(如人類血清蛋白)之其它添加物。之後將玻璃安瓿密封且其可儲存於 4°C 和室溫之下數個月。然而，只要無必要存在時，安瓿較佳係儲放於低於 -20°C 之溫度下。接種時，將可該凍乾物溶於 0.1 至 0.5 毫升之液態溶液中，較佳是生理食鹽水或 Tris 緩衝液，以全身性或局部投與，即藉由非口服、肌肉內或其它從業

人士已知之投與方式投與。投與模式、劑量和投與之數目可由熟悉此技藝人士予以最佳化。痘病毒載體之最佳投與方式是皮下或肌肉內投與。

設若該疫苗是包含本發明之 DNA 的 MVA-BN 載體或其衍生物，則本發明之一特定具體例係有關一種疫苗套組，該套組包含本發明之 MVA-DN 病毒載體，其供用於第一小玻璃瓶/容器中之第一接種疫苗(„初次“)以及於第二小玻璃瓶/容器中之第二接種疫苗(„推升“)。

設若該疫苗是包含本發明之 DNA 的 MVA-BN 載體或其衍生物，則本發明之一特定具體例係有關在第一次接種時(“初次接種”)與第二次接種時(“推升接種”)投與一治療有效量之疫苗

因此在疫苗具體例中，本發明係有關一種包含本發明之 DNA、載體或 NS1 蛋白或其部分之疫苗，以及該 DNA、疫苗或蛋白質用於製備疫苗之用途。根據較佳具體例，本發明係有關該 DNA、疫苗或蛋白質用於製備疫苗之用途，其中該 NS1 蛋白或其部分、由該 DNA 或該載體編碼之 NS1 蛋白質或其部分係來自一種登革熱亞型，以及其中該 DNA、該載體或該 NS1 蛋白或其部分被用作為對抗所有登革熱病毒亞型之疫苗。最佳之登革熱病毒亞型係亞型 2。

本發明更有關一種用於治療或預防黃病毒感染之方法，其包含於包括人類之需要治療或預防黃病毒感染的動物身上接種如上述之 DNA、如上述之載體或如上述之 NS1 蛋白或其部分。特別地，本發明係有關一種如上述之方法，其中該 NS1 蛋白或其部分或由該 DNA 或該載體編碼之 NS1 蛋白質或其部分係來自一

種登革熱病毒亞型，且其中該 DNA、該載體或該 NS1 蛋白或其部分被用作為對抗所有登革熱亞型之疫苗。

本發明之簡要說明

一種 DNA，其包含一編碼有至少一種黃病毒 NS1 蛋白或其部分之表現卡匣。

如上述之 DNA，其中該表現卡匣包含真核生物轉錄調節要素和編碼一種黃病毒 NS1 蛋白或其部分之序列。

如上述之 DNA，其中該編碼黃病毒之 NS1 蛋白或其部分之序列之前面加上一 ATG 密碼子和一編碼糖化訊號序列之序列，以及其中該編碼序列係以一轉譯之終止密碼子結束。

如上述之 DNA，其中該真核生物之轉錄調節要素係痘病毒起動子。

如上述之 DNA，其中該黃病毒係一種經蚊子傳播之黃病毒。

如上述之 DNA，其中該黃病毒係登革熱病毒。

如上述之 DNA，其中該登革熱病毒係登革熱病毒亞型 2。

一種載體，其包含如上述之 DNA。

如上述之載體，其中該載體係一痘病毒載體。

如上述之載體，其中該痘病毒係一牛痘病毒，特別是經修飾的牛痘病毒 Ancara (MVA)。

MVA-BN 或其衍生物，特別是 MVA 575 (ECACC V00120707)，最佳是 MVA-BN (V00083008)。

一種 NS1 蛋白或其部分，其由如上述 DNA 或如上述載體所編碼。

如上述之 DNA，如上述之載體或如上述之 NS1 蛋白係作為疫

苗。

如上述之 DNA、載體或 NS1 蛋白，其中該 NS1 蛋白或其部分或由該 DNA 或該載體所編碼之 NS1 蛋白或其部分係來自一種經蚊子傳播之黃病毒，其中該 DNA、該載體、該 NS1 蛋白或其部分被用作為一種對抗衍生成疫苗(即該 DNA、該載體或該 NS1 或其部分)之經蚊子傳播之黃病毒或對抗其它經蚊子傳播的黃病毒之疫苗。

如上述之 DNA、載體或 NS1 蛋白，其中該 NS1 蛋白或其部分或由該 DNA 或該載體所編碼之 NS1 蛋白或其部分係來自一種登革熱病毒亞型，其中該 DNA、該載體、該 NS1 蛋白或其部分被用作為一種對抗所有登革熱病毒亞型之疫苗。較佳地衍生成該疫苗之登革熱病毒係登革熱病毒亞型 2。

一種疫苗，其包含如上述之 DNA，如上述之載體、如上述之 NS1 蛋白。

一種如上述之 DNA，如上述之載體、如上述之 NS1 蛋白之用途，供用於製備疫苗。

如上述之用途，其中該 NS1 蛋白或其部分或由該 DNA 或該載體所編碼之 NS1 蛋白或其部分係來自一種登革熱病毒亞型，其中該 DNA、該載體、該 NS1 蛋白或其部分被用作為一種對抗所有登革熱病毒亞型之疫苗。

如上述之用途，其中該 NS1 蛋白或其部分或由該 DNA 或該載體所編碼之 NS1 蛋白或其部分係來自一種經蚊子傳播之黃病毒，其中該 DNA、該載體或該 NS1 蛋白或其部分被用作為一種對抗衍生成疫苗(即該 DNA、該載體或該 NS1 或其部分)之經蚊

子傳播的黃病毒以及對抗其它經蚊子傳播的黃病毒之疫苗。

一種用於治療或預防一黃病毒感染之方法，其包含接種如上述之 DNA，如上述之載體、如上述之 NS1 蛋白或其部分至一需要治療或預防該黃病毒感染之動物，包括人類。

如上述之方法，其中該 NS1 蛋白或其部分或由該 DNA 或該載體所編碼之 NS1 蛋白或其部分係來自一種登革熱病毒亞型，其中該 DNA、該載體、該 NS1 蛋白或其部分被用作為一種對抗所有登革熱病毒亞型之疫苗。

如上述之用途，其中該 NS1 蛋白或其部分或由該 DNA 或該載體所編碼之 NS1 蛋白或其部分係來自一種經蚊子傳播之黃病毒，其中該 DNA、該載體或該 NS1 蛋白或其部分被用作為一種對抗衍生成疫苗(即該 DNA、該載體或該 NS1 或其部分)之經蚊子傳播的黃病毒以及對抗其它經蚊子傳播的黃病毒之疫苗。

實施例

下列之實施例將可進一步例示本發明。其等由熟悉該項技藝者充分了解。所提供之實施例不可被解釋成，本發明所提供之技術的實施限於此等實施例。

實施例 1: mBN07 之構成

1. NS1 抗原之詳細說明(第 1 圖)

此實施例關於來自新天竺老鼠 C 品種-NGC 品種(例如:基因庫序列 AF038403)之血清類型 2 的 NS1。因為黃病毒之 NS1 蛋白係被產生成多蛋白前體的部分，因此在對應 DNA 方面，該 NS1 基因之前面不是 „ATG“ 起始密碼子。

因此，編碼該 NS1 蛋白之 cDNA 序列必須加上一 "ATG" 起始

密碼子。之後接著加上一訊號序列，藉此新合成的 NS1 蛋白在內質網中會被糖化。最後，該蛋白質-編碼卡匣需要一個終止密碼子且在此實施例中，TAG 係加在該蛋白質編碼 cDNA 序列的 3' 終端。用於本發明之實施例中之"ATG+訊號序列"要素係來自 E 蛋白質的疏水性 C-終端(至少 28 個胺基酸，對 NGC 品種而言係胺基酸 M(ATG)起始)。

第 1A 圖顯示作為本發明之實施例之精確的訊號序列+NS1 序列(亦可參見序列編號 5 和 6)。該“訊號序列+NS1”核苷酸編碼序列係藉由使用下列之引子，以 RT-PCR 擴增來自登革熱 NGC RNA 基因組而得：

D2NS1-1 上面：

5' -ACAAGATCTGGAATGAATTCACGTAGCACCTCA-3' (序列編號 4)

斜體字部分：Bgl II 內切限制酶辨識位置。

在下面劃線的是起始密碼子。

D2NS1-2 下面：

5' -AATAGATCTCTACTAGGCTGTGACCAAGGAGTT-3' (序列編號 3)

斜體字部分：Bgl II 內切限制酶辨識位置。

在下面劃線的是終止密碼子。

依製造業者所建議之儀器，該 RT-PCR 擴增可使用來自 Roche Molecular Biochemical 之 Titan One Tube RT-PCR 套組(目錄號碼 1-939-823)來進行。然而，基本上任何商業化或未商業化之 RT-PCR 套組均可代替使用。

之後，該 RT-PCR 產物可被選殖進入出現於許多商業上可得之細菌選殖質體中之任何多數選殖位置的 BamHI 位置，然而於此實施例中，其係被選殖進入 pAF7 中，以選殖成 pAF7D2NS1—見第 1B 和 1C 圖關於 pAF7D2NS1 之詳細序列。第 1D 圖顯示 NS1 胺基酸序列和含有加上來自 E 蛋白之 C-端胺基酸編碼序列之訊號序列的 NS1 之疏水性墨點。短的 N-端疏水性區域指的是訊號序列。

2. NS1 表現卡匣之細節 (第 2 圖)

為表現來自諸如金絲雀痘、家禽痘、牛痘或 MVA 之痘病毒病毒載體的"訊號序列+NS1"，在其 cDNA 的 5' 端上需要加上痘病毒起動子。當所有痘病毒合成的 RNA 係以病毒編碼的酵素(其不需 polyA 額外訊序列來進行此功能)來多腺嘌呤化時，則多腺嘌呤化訊號序列非為必須的。任何痘病毒起動子均可用於表現此卡匣。第 2 圖與序列編號 9 與 10 顯示作為本發明之實施例的"痘病毒起動子+訊號序列+NS1"卡匣之核苷酸序列。

關於本發明所使用之例子，該"訊號序列+NS1"進一步係使用引子 oBN338 和 oBN345，藉由 PCR 從 NS1 質體選株擴增而來。oBN345 引子包含痘病毒最小的起動子要素 5' 至在選殖質體內之標的序列的核苷酸序列。供 oBN345 引子結合之質體標的序列係在該訊號序列起始密碼子的上流將近 40 個核苷酸處。此係用於確定 RNA 的轉錄在該訊號序列 ATG 起始密碼子之前包含一長列非蛋白質編碼序列。

具有 Ps 起動子之 PCR 引子：

oBN338: 5'-TTGTTAGCAGCCGGATCGTAGACTTAATTA (30) (序列編

號 1)

oBN345:

5' -CAAAAAATTGAAATTTTATTTTTTTTTTTTGGGAATATAAATAAAA
ACACGATAATACCATGG -3' (序列編號 2)

下面劃線的核苷酸代表該痘病毒最小的起動子序列。

用於該 PCR 擴增反應的首五個循環的黏合溫度係以 oBN345 結合至選殖載體中相同序列的核苷酸序列來計算。

3. 整合 NS1 表現卡匣至 MVA 中(第 3 圖)

該 PCR 擴增的產物以平口鈍端選擇進入質體 pBNX07 的平切口為終端的 Xho I 位置(參見第 3a 圖)以形成質體 pBN41(參見第 3a 圖)。pBN41 係用於以同源重組，將"痘起動子+訊號序列+NS1"卡匣整合至 MVA 的缺失位置 2 之載體。

pBN41(參見第 3a 圖)的基本特徵如下:

- 質體骨架係來自 Stratagene 之 pBluescript SK-plus(Genbank VB0078)。
- D2F1: 缺失 2 側面 1 同源重組臂。此代表從 MVA 基因資料庫序列 U94848 之 20117 至 20717 之核苷酸序列。
- PPr: 痘病毒起動子。
- NPT II: 新黴素磷轉換酶蛋白質編碼序列(基因資料庫 V00618 之蛋白質編碼序列)。
- IRES: 來自腦心肌炎病毒之核糖體內入序列(Jang 等人, 1989, 基因資料庫 M16802)。
- EGFP: 經提升的綠螢光蛋白質編碼序列(基因資料庫序列 U57609 之蛋白質編碼序列-核苷酸 675 至核苷酸 1394)。

- NS1: 來自登革熱 NGC 品種之“訊號序列+NS1”蛋白質編碼序列。

- D2F2: 缺失 2 側面 2 同源重組臂。此代表從 MVA 基因資料庫序列 U94848 之 20719 至 21343 核苷酸序列。

AmpR: pBluescript 之氨比西林抗性基因。

3.1 藉由同源重組將登革熱“痘起動子+訊號序列+NS1”插入 MVA 之缺失位置

3.1.1 藉由同源重組整至 MVA 基因組

上述整合載體 pBN41 係用於以於 pBN41 的側面 1 和側面 2 臂以及該 MVA 基因組內相同的標的序列間之同源重組，將該登革熱 NS1 表現卡匣且加上報告卡匣（痘起動子+NPT II-IRES-EGFP）整合至該 MVA 基因組。此係藉由轉染該線性的整合載體至之前已受低量重覆的 MVA 感染(MOI，例如，每細胞 0.01 感染單位)之雞胚胎纖維母細胞(CEF)內來達成。在感染 48 小時後或當該感染已到達融合時，製備病毒萃取液且將其儲存於 -20°C 中以備所欲之重組 MVA(rMVA)的選擇與選殖純化時用。

3.1.2 rMVA 的選擇以及選株的純化

非-重組 MVA 的排除(空的載體病毒)以及 rMVA 的擴增係藉由在 G418 的存在下(G418 的數量必須最佳化至決定不會殺死 CEF 細胞之最高劑量)以低 MOI 感染融合雞胚胎纖維母(CEF)細胞來達成。任何不含與經整合的 NPT II 基因的病毒在被加入細胞維持培養液之 G418 的存在下將不會複製。G418 會抑制 DNA 複製，但因為 CEF 細胞將呈不動的非複製的狀態，所以其等將

不受 G418 的影響。由於該提升的螢光綠蛋白質的表現，所以被 rMVAs 感染之 CEF 細胞可在螢光顯微鏡下觀察到。

得自該同源重組步驟之病毒萃取物必須依序地稀釋且用於在 G418 的存在下感染未經處理的 CEF 細胞，並覆蓋以低熔點之洋菜膠。感染 2 天之後，將該被感染之洋菜膠板置於螢光顯微鏡下觀察經感染細胞之單一綠色清晰成像。將該等標示起來且取出含該被感染成清晰成像之細胞的洋菜膠栓，並置於含無菌細胞維持培養液之 1.5 ml 微離心管中。藉由在 -20°C 冷凍-融解該管 3 次而讓病毒從該洋菜膠栓中釋出。

該最好的選殖株或該等選殖株進一步於洋菜膠下以 PCR 分析來選殖純化直至無空白的載體污染的跡象(3 到 30 回的選殖純化)。之後該等選殖株被擴增以供進一步進行嚴苛測式來校正插入的配置、外來起動子基因卡匣的序列證明以及以 RT-PCR 的表現分析。在此等分析之後，僅有一個選殖株會在 G418 選擇下被進一步擴增，俾便製備一主要的儲備液供進一步的特徵與致免疫性的研究。

具有於本發明中所述之被插入登革熱表現卡匣之重組 MVA 稱為 mBN07。第 3b 圖顯示在 mBN07 中插入的外來序列之配置。

4. 以 MVA 來表現真正的 NS1

來自該重組 MVA(mBN07)之 NS1 蛋白的表現係藉由標準的西方點墨法分析，在沒有變性的情況下確認。第 4 圖顯示在經純化的 mBN07 被用於感染哺乳動物組織培養細胞(例如 BHK-21 細胞，MOI 每細胞 1.0 感染單元)之後，NS1 表現的結果。粗糙

的蛋白質萃取物係在感染 24-30 小時之後從該等經感染的細胞製備而來，此時將部分萃取物與含有 2-巰基乙醇(2-ME)或不合 2-ME 的 SDS-PAGE 凝膠裝載緩衝液混合。作為正控制組之該等樣本加上來自以登革熱 NGC 品種(蚊子細胞株)感染之細胞的蛋白質萃取物係於 SDS-PAGE 凝膠中以電泳來分離，且之後被墨點於硝基纖維素膜上。以一抗登革熱 NS1 單株抗體來探測該膜。

第 4 圖顯示，由 mBN07 表現之 NS1 係以抗-登革熱 NS1 單株抗體來辨識，且形成與來自經登革熱感染之細胞之 NS1 相似的正確的二聚型式(比較沒有煮沸的、不含 2-ME 之 mBN07 巷與沒有煮沸的、不合 2-ME 之 DEN2 巷)。第 4 圖顯示，該二聚型式於變性的情況下分開成單體型式(參見經煮沸的、含 2-ME 之 mBN07 巷)。

於被 mBN07 感染之細胞中表現之 NS1 亦可以在西方點墨分析法中，由經合併復原中之病人的血清，以及具有可與登革熱之全部四種血清類型產生交互反應之單株抗體來辨識。此證明了由 mBN07 表現的 NS1 係產生致免疫性。

實施例 2: 由 mBN07 所表現之 NS1 對於非血清類型 2 的登革熱病毒與日本腦炎之 NS1 的交叉免疫原性

1. 由 mBN07 表現之 NS1 對復原中之病人的血清致反應性

測試的結果具有下列可能性，mBN07 表現的 NS1 可被證實之前受過登革熱病毒感染之個體於復原中的血清辨識出來。來自 68 個具有對抗登革熱病毒封套蛋白質之抗體之個體的血清(藉由免疫墨點圖對照由登革熱血清類型 1 至 4 製成之真正的抗原)被選擇用於測試對照由 mBN07 感染的細胞萃取液製備成

與作為控制組之 MVA-GFP 感染的細胞萃取液之免疫墨點條帶。令該含抗原之細胞以不含 2 巰基乙醇之樣本緩衝液處理且不加熱。關於 68 位個體之測試的血清，在免疫墨點圖中有 (91.2%) 與由 mBN07 表現之 BN07 NS1 反應。該等血清進一步被分析對全部四種登革熱病毒血清類型以及日本腦炎病毒之 NS1 的反應 (JEV)。結果示於表 1 中。54 個血清與全部的登革熱病毒血清類型和日本腦炎病毒 (JEV) 之 NS1 反應，而該等 54 個血清中之 53 個 (98.2%) 亦與由 mBN07 表現之 NS1 反應。七 (7) 個血清對至少一種登革熱病毒血清類型之 NS1 具專一性，且不會與 JEV 之 NS1 反應。該 7 個血清亦與由 mBN07 表現之 NS1 反應。另外 7 個血清僅與 JEV 的 NS1 反應，而不與任何登革熱病毒血清類型之 NS1 反應，然而該等 JEV 專一的血清中之 2 個 (28.6%) 亦會與由 mBN07 表現的 NS1 反應。

表 1:

	BN07 NS1 陰性	BN07 NS1 陽性
真正 DEN NS1 陽性	0% (0/7)	100% (7/7)
真正 DEN & JEV NS1 陽性	1.85% (1/54)	98.15% (53/54)
真正 JEV NS1 陽性	71.43% (5/7)	28.57% (2/7)

抗血清對真正的 NS1 與由 mBN07 表現的 NS1 之反應的比較。括弧中：測試為陽性之樣本數目/測試樣本之總數。DEN = 登革熱，JEV = 日本腦炎病毒。

亦對相同的 68 個血清分析其對前膜 (premembrane) 之蛋白質的反應性。依發明人之經驗，抗體對前膜比抗體對 NS1 或 E 具較高的專一性。因此，已受登革熱感染過之病人將會產生會辨識登革熱病毒前膜，而不是 JEV 前膜之抗體，反之亦然。

順著該等方式之分析將提供個體之感染歷史之較佳預報。表 2 顯示，來自 22 個人之血清單獨與真正的登革熱前膜蛋白質反應，因此推測該 22 個病人僅曾遭受登革熱病毒，而不是 JEV 的感染。該等 22 個血清全部與由 mBN07 表現之 NS1 反應。其它 22 個病人已證實之前曾有被登革熱與 JEV 兩者感染，再者所有 22 個血清亦與由 mBN07 表現之 NS1 反應。於此系列中，亦存在有 21 個已證實之前只被 JEV 感染之病人(即使該等血清已具有對抗登革熱 E 之交叉反應的抗體)。任擇地，該 21 個 JEV 反應者中的 17 個(82%)與由 mBN07 表現之 NS1 反應。在整組中只有 3 個血清不與登革熱或 JEV 任一者反應，而該等當中僅有 1 個與 mBN07 表現的 NS1 反應。對此，最有可能的理由係抗體的效價太低以致於無法藉由免疫墨點法測得。

表 2:

	BN07 NS1 陰性	BN07 NS1 陽性
真正 DEN prM 陽性	0% (0/22)	100% (22/22)
真正 DEN & JEV prM 陽性	0% (0/22)	100% (22/22)
真正 JEV prM 陽性	19.0% (5/7)	81.0% (17/21)
PrM 陰性	66.7%(2/3)	33.3%(1/3)

抗血清對真正的前膜與 mBN07 NS1 之反應的比較。括弧中：測試為陽性之樣本數目/測試樣本之總數。DEN = 登革熱，JEV = 日本腦炎病毒。

於表 2 中之資料亦清楚地顯示，對於 6 個不會與 mBN07 表現之 NS1 反應之血清，4 個係來自之前曾受 JEV，而不是登革熱的感染之個體。剩下的 2 個測不到對登革熱或 JEV 任一者

之前膜蛋白的抗體，可能是效價太低。

2. mBN07 接種之兔子且測試免疫後血清對登革熱病毒與日本腦炎病毒之免疫墨點圖與 ELISA 分析

根據如下所示本發明之接種程序，以皮下途徑免疫三隻無特定病原體之兔子。於第 0 天，以一瓶用無菌水配製成 1 毫升之冷凍-乾燥的疫苗 (1×10^8 TCID₅₀ BN07 冷凍-乾燥的疫苗) 來接種每一隻兔子，之後於第 28 天再次接種。取在第一次接種前(預先採血)之血液樣本，且在第二次接種 10 天後再取一次。

第 0 天 = 預先採血，接著第 1 次接種

第 28 天 = 第 2 次接種

第 38 天 = 血液取樣

2.1 測試預先採血與免疫後之血清對登革熱血清類型 2 之免疫墨點圖

第 5 圖顯示 1:200 稀釋之血清被測試於在無-變性情況下，藉由 SDS PAGE 所分離之登革熱 2 病毒抗原的免疫墨點圖條帶與未受感染之 C6/36 細胞的控制條帶。結果清楚地顯示出，在以 mBN07 接種時，全部的兔子均產生相對高效價之抗-NS1 抗體，其與由登革熱血清類型 2 感染之組織培養蚊子細胞所產生之真正的 NS1 產生交叉反應。

在接種之前取得之血清不會與免疫墨點圖上任何登革熱蛋白質反應。

免疫後之血清被滴定成 1:1000、1:2000、1:4000、 $1:10^{-4}$ 、 $1:10^{-5}$ 、 $1:10^{-6}$ ，且被測試於無-變性情況下，藉由 SDS PAGE

所分離之登革熱 2 病毒抗原的免疫墨點條帶以及未受 C6/36 之細胞的控制條帶。參見第 6 圖三隻兔子之滴定終定被計算成 1:10000。

免疫前與免疫後之血清被滴定成 $1:10^{-2}$ 、 $1:10^{-3}$ 、 $1:10^{-4}$ 、 $1:10^{-5}$ 、 $1:10^{-6}$ 、 $1:10^{-7}$ ，且被測試於間接 IgG ELISA。井係以 1:250 稀釋之登革熱 2 與未受感染之 C6/36 的細胞溶解物塗覆。

表 3:

		$1:10^{-2}$	$1:10^{-3}$	$1:10^{-4}$	$1:10^{-5}$	$1:10^{-6}$	$1:10^{-7}$
兔子#1	Pre	-0.012	0.006	0.007	0.003	-0.002	0.001
	Post	0.623	0.127	0.02	0.004	0.001	-0.003
兔子#2	Pre	-0.012	0	-0.001	-0.003	0	-0.001
	Post	0.402	0.06	-0.007	0.008	-0.003	0.002
兔子#3	Pre	-0.008	0.03	-0.002	0.005	-0.002	-0.002
	Post	0.907	0.224	0.038	0.011	-0.001	-0.003

在不同稀釋下，每一隻兔子在免疫前與免疫後之血清的 ELISA 吸光讀數 (Pre = 免疫前的血清，Post = 免疫後的血清)。

關於每一隻兔子免疫後之滴定結果示於第 7 圖中。針對每一隻兔子免疫後之血清所評估之終點效價係 1:1000。

2.2 預先採血與免疫後血清對登革熱病毒血清類型 1、3 和 4 以及日本腦炎病毒免疫墨點圖測試

每一隻兔子血清在 1:1000 之稀釋濃度下被測試於在非變性情況下，藉由 SDS PAGE 所分離之登革熱 1、2、3、4 的免疫墨點條帶上與 JE 病毒抗原+未受 C6/36 之細胞的控制條帶上。第 8 圖顯示，每一隻兔子免疫後血清與來自登革熱血清類型 1、3 和 4 之 NS1 反應且與日本腦炎免疫墨點反應。

3. 結論

- 由 mBN07 疫苗免疫之兔子誘出辨識真正的登革熱病毒

血清類型 2 NS1 之抗體。

- 當於免疫墨點法分析與 ELISA 中之終點為 $1:10^{-4}$ 和 $1:10^{-3}$ 時，可觀察到很高的免疫反應。
- 於該兔子中被誘出之抗體與所有其它登革熱血清類型 (1、3 & 4) 交叉反應。
- 該抗體亦與來自諸如 JEV 之異源病毒的 NS1 交叉反應。

實施例 3: 於選定之細胞株中之 MVA-BN 載體病毒之成長動力學、於活體內之複製以及免疫學的資料

如於說明書章節中所指出，本發明之 DNA 較佳係被插入 MVA-BN 痘病毒的載體或其衍生物中。下列實施例更詳細的描述 MVA-BN。所揭示之實施例允許熟習此技藝者識別 MVA-BN 和其衍生物。

1. 細胞株之成長動力學:

為描繪 MVA-BN 之特性，將此品種的成長動力學與其它特性已被描繪出之 MVA 作比較。

此實驗之進行係藉由比較於隨後所列出之原始細胞與細胞株中之下列病毒的成長動力學:

MVA-BN (病毒儲備 #23, 18. 02. 99 未經處理的，滴定成 2.0×10^7 TCID₅₀/ml);

由 Altenburger 描繪特性之 MVA(美國專利第 5,185,146 號) 且另外稱為 MVA-HLR;

由 Anton Mayr 描繪特性之 MVA(passage 575)(Mayr 等人, [1975] Infection 3; 6-14) 且另外稱為 MVA-575 (ECACC V00120707); 以及

於國際專利申請案 PCT/EP01/02703(WO 01/68820)中描繪特性之 MVA-Vero(病毒儲備, passage 49, #20, 22.03.99 未經處理的, 滴定成 $4, 2 \times 10^7$ TCID₅₀/ml)。

所使用之原始的細胞以及細胞株為:

CEF 雞胚胎纖維母細胞(從 SPF 卵中新鮮配置);

HeLa 人類子宮頸腺瘤(表皮), ATCC No. CCL-2;

143B 人類骨肉瘤 TK-, ECACC No. 91112502;

HaCaT 人類角質細胞細胞株, Boukamp 等人, 1988, J Cell Biol 106(3): 761-771;

BHK 幼倉鼠腎, ECACC 85011433;

Vero 非洲綠猴腎纖維素母細胞, ECACC 85020299;

CV1 非洲綠猴腎纖維母細胞, ECACC 87032605。

在感染方面, 以 5×10^5 細胞/井之濃度將不同細胞種入 6-井-盤中, 且於 37°C, 5% CO₂ 下, 於 DMEM (Gibco, Cat. No. 61965-026) 加上 2% FCS 中培育至隔夜。將細胞培養液移除且令細胞在將近 moi 0.05 下, 於 37°C、5% CO₂ 中感染 1 個小時(在感染方面, 假定細胞數目在隔夜後加倍)。對於不同細胞類型之每一感染所用之細胞數目為 5×10^4 TCID₅₀ 以及此稱為輸入。之後以 DMEM 清洗細胞三個, 最後加入 1 毫升 DMEM、2% FCS 且將該盤留在 37°C, 5% CO₂ 下培育 96 個小時(4 天)。藉由將該盤置於 -80°C 下冷凍, 來終止感染以供滴定分析用。

2. 滴定分析(與疫苗病毒專一的抗體免疫染色)

為滴定病毒之數目, 以 1×10^4 細胞/井之濃度, 將測試細胞(CEF)種在 96-井-盤上, RPMI(Gibco, Cat. No. 61870-010)、

7% FCS、1% 抗生素/抗黴菌素(Gibco, Cat. No. 15240-062)中，且於 37°C，5% CO₂ 下培育至隔夜。將包含感染實驗之 6-井-盤冷凍/融化 3 次，且使用 RPMI 成長培養液稀釋 10⁻¹ 至 10⁻¹²。將病毒稀釋液分散至測試細胞上且在 37°C，5% CO₂ 下培育 5 天，以允許 CPE (細胞病態作用) 發展。將測試細胞固定(丙酮/甲醇 1:1)10 分鐘，以 PBS 清洗並以 1:1000 配置於培育緩衝液中，與多株的牛痘病毒專一性抗體在室溫下一起培育(Quartett Berlin, Cat. No. 9503-2057)1 個小時。在以 PBS(Gibco, Cat. No. 20012-019)清洗 2 次之後，加入以 1:1000 配置於培育緩衝液中之 HRP 偶合的-抗-兔子抗體(Promega Mannheim, Cat. No. W4011)，在室溫下歷時 1 個小時。再次以 PBS 清洗兩次，且與染色溶液(10 ml PBS + 200 µl 配置於 100%乙醇中之 o-二甲氧基聯苯胺飽合溶液 + 15 µl 新鮮配置的 H₂O₂)一起培育至可觀察到棕色斑點(2 個小時)。將染色溶液移除，加入 PBS 以終止染色反應。每個顯示棕色斑點的井表示對 CPE 陽性，以及使用 Kaerber 之方程式來計算效價(TCID₅₀ 為基礎之分析)(Kaerber, G. 1931. Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. 162, 480)。

該病毒一方面被用於以低重覆性感染，即 0.05 感染單元/每細胞(5 x 10⁴ TCID₅₀)來感染 CEF 與 BHK 之複製組，其被預期對 MVA 寬容的，而另一方面，感染 CV-1、Vero、Hela、143B 與 HaCat 之複製，其被預期對 MVA 非寬容的。之後，將該病毒接種體除移，且清洗該細胞三次，以移除任何殘留未被吸收的病毒。當病毒萃取物被製備好時，使感染持續 4 天，且之後於

CEF 細胞上滴定。表 1 和第 1 圖顯示滴定分析的結果，此處所給之值係感染 4 天後所產生之病毒的總量。

其顯示，所有的病毒均如預期般於 CEF(雞胚胎纖維母細胞)細胞中適當的被擴增，因為此係對所有 MVA 均寬容的的細胞株。此外，其顯示，所有的病毒均於 BHK (幼倉鼠腎細胞株)細胞中適當的被擴增。MVA-Vero 表現最佳，因為 BHK 係一寬容的細胞株。

有關於 Vero 細胞(猴子之腎細胞株)中的複製，MVA-Vero 如預期般適當的擴增，即高於輸入 1000 倍。MVA-HLR 和 MVA-575 分別適當的擴增以高於 33 倍和 10 倍輸入的增加。相較於其它，僅 MVA-BN 被發現沒有在該等細胞中適當地被擴增，即僅高於輸入 2-倍的增加。

又關於於 CV1 細胞(猴子之腎細胞株)中之複製，其發現，MVA-BN 於此細胞株中大量的減少。其顯示低於輸入之 200-倍的減少。MVA-575 亦沒有擴增至高於輸入之位準，亦顯示稍微負的擴增，即低於輸入之 16-倍的減少。MVA-HLR 最佳，擴增高於輸入之 30-倍的增加，接著是 MVA-Vero，具有高於輸入之 5-倍的增加。

最重要的是比較各種病毒於人類細胞株之成長動力學。有關於 143B 細胞(人類骨癌細胞株)中之有效的複製，其顯示，MVA-Vero 是唯一一個顯示擴增高於輸入(3-倍的增加)。所有其它病毒沒有擴增高於輸入，但在 MVA-HLR 以及 MVA-BN 和 MVA-575 兩者間具有很大的差異。MVA-HLR 係"廣範圍的" (低於輸入 1 倍的減少)，如 MVA-BN 顯示最小的減少(低於輸入之

300 倍的減少)，接著是 MVA-575（低於輸入 59 倍的減少）。簡言之，就於人類 143B 細胞中之減少而言，MVA-BN 是較優的。

再者，有關在 HeLa 細胞(人類子宮頸癌細胞)中的複製，其顯示 MVA-HLR 於此細胞株中擴增良好，甚至比於寬容的 BHK 細胞中來的好(Hela = 高於輸入之 125 倍的增加；BHK = 高於輸入之 88 倍的增加)，MVA-Vero 亦於此細胞株中擴增(高於輸入 27 倍的增加)。然而，MVA-BN 以及較小範圍的 MVA-575 於該等細胞中係減少的(MVA-BN = 低於輸入 29 倍的減少，而 MVA-575 = 低於輸入 6 倍的減少)。

有關在 HaCat 細胞(人類角質細胞細胞株)中之複製，其顯示，MVA-HLR 於此細胞中擴增良好(高於輸入 55-倍的增加)。MVA-Vero 適當的和 MVA-575 兩者顯示於此細胞株中擴增(分別為高於輸入之 1.2 和 1.1 倍的增加)。然而，MVA-BN 是唯一一個呈現減少(低於輸入之 5-倍的減少)。

結論說明了，於此群病毒中，MVA-BN 是最減少的病毒品種：藉由於人類胚胎腎細胞(293: ECACC No. 85120602)中顯示 0.05 至 0.2 的擴增比率(資料沒有併入表 1 中)，MVA-BN 於人類細胞株中顯示出極端的減少。其進一步顯示，於 143B 細胞中約 0.0 之擴增比率；於 HeLa 細胞中約 0.04 之擴增比率；於 HaCat 細胞中約 0.22 之擴增比率。此外，MVA-BN 於 CV1 中顯示約 0.0 之擴增比率。僅於 Vero 細胞中，擴增可被觀察到(比率為 2.33)，然而當其於諸如 BHK 和 CEF 之寬容的細胞株中，不一定是相同的延伸(比較表 1)。因此，僅知道 MVA-BN 於所有的人類細胞株(143B、Hela、HaCat 和 293)中顯示小於 1 之擴增比

率。

MVA-575 顯示與 MVA-BN 相似的量變曲線，但不是如同 MVA-BN 般的減少。

MVA-HLR 於所有測試細胞(143B 細胞除外)中均擴增良好。因此，其於所有測試細胞株中(143B 細胞除外)可被視為複製充足的。於某一情況下，其在人類細胞株(HeLa)中之擴增甚至比於寬容的細胞株(BHK)中還好。

“MVA-Vero 於所有細胞株中確實顯示出擴增，然而比 MVA-HLR 所顯示的範圍小(忽略 143B 的結果)。不過，就減少而言，其不可以被視為與 MVA-BN 或 MVA-575 相同“種類”者。

3. 於活體內之複製

假如，一些 MVA 品種於活體內明確地複製，對於不同 MVA 品種在活體內的複製可藉由使用遺傳工程老鼠模型 AGR129 來檢測。此老鼠品種在 IFN 受體類型 I (IFN- α/β) 與類型 II (IFN- γ) 基因以及 RAG 中具有標的被破壞之基因。由於該等破壞，此老鼠沒有 IFN 系充，且無法產生成熟之 B 與 T 細胞，因此嚴重免疫放棄的以及非常容許複製病毒。以 10^7 pfu 之 MVA-BN、MVA-HLR 或 MVA572 來免疫(i.p.)六個老鼠群組(在德國被用於 120,000 個人上)且每天監控臨床現象。以 MVA HLR 或 MVA 572 接種之全部老鼠分別在 28 至 60 天內死亡。屍體檢驗時，在主要器官中存在一個嚴重病毒感染之普遍現象，且藉由標準斑分析時，從卵巢中可重新找到 MVA(10^8 pfu)。相反的，以相同劑量之 MVA-BN(對應於被寄存之品種 ECACC V00083008)接種後之老鼠存活 90 天以上，且無 MVA 可從器官或組織中重新找到。

當一起取得活體外與活體內之數據時，研究明顯顯示，MVA-BN 比母體和商業的 MVA-HLR 品種較嚴重的減少。

4. 不同品種之 MVA 在刺激免疫反應上亦不同。

複製充足的品種之牛痘於老鼠中會誘導免疫反應，而高劑量下係致命的。雖然 MVA 係高度減少的，且在哺乳動細胞上的複製方面具有一降低的能力，然而不同品種之 MVA 間在減低上有差異存在。的確，MVA BN 比其它 MVA 品種出現較多的減少，甚至是母體品種 MVA 575。為決定在降低方面的差異是否會影響 MVA 誘導保護性免疫反應的效力，於是在致死牛痘刺激模型中比較不同劑量的 MVA BN 與 MVA 575。保護的位準的量測係藉由在刺激 4 天後，於卵巢牛痘中所決定之效價的降低，同時此允許量化評估不同劑量與不同品種之 MVA。

致死刺激模型

以不同劑量(10^2 、 10^4 或 10^6 TCID₅₀/ml)的 MVA BN 或 MVA 575 免疫(i. p.)特定無病原體之 6-8-週大的雌性 BALB/c(H-2^d)鼠(n=5)。MVA-BN 和 MVA-575 已於 CEF 細胞上繁殖，且已經蔗糖純化並於 Tris 中配方成 7.4。三週後，該鼠接受一增加之相同劑量的 MVA 與 MVA 品種，兩週之後接著以牛痘之複製充足的品種進行致死刺激(i. p.)。WR-L929 TK+ 品種或 IHD-J 品種均可作為複製充足的牛痘病毒(縮寫“rVV”)。控制組之老鼠接受一安慰劑。保護作用可藉由在刺激 4 天後，以標準斑分析所決定於卵巢中之效價的減少量來量測。於此，在刺激後第 4 天犧牲該老鼠，且將卵巢移除，於 PBS(1ml)中均質化且使用 VERO 細胞，以標準斑分析來決定病毒效價(Thomson 等人，1998, J.

Immunol. 160: 1717)。

在刺激 4 天後，藉由在卵巢 rVV 效價上 100% 的減少的評斷，以 10^4 或 10^6 TCID₅₀/ml 之 MVA-BN 或 MVA-575 二種免疫接種的老鼠係完全被保護的(第 2 圖)。該刺激病毒被清除了。然而，在低劑量下可觀察到，MVA-BN 或 MVA-575 所提供之保護的層度不同。接受 10^2 TCID₅₀/ml 之 MVA 575 二種免疫之老鼠無法受到保護，其以高卵巢 rVV 效價來評價(平均 3.7×10^7 pfu \pm 2.11×10^7)。相反的，以相同劑量之 MVA-BN 接種之老鼠，在高卵巢 rVV 效價方面(平均 0.21×10^7 pfu \pm 0.287×10^7)會誘導產生明顯的減少(96%)。接受安慰劑之控制組老鼠具平均病毒效價 5.11×10^7 pfu (\pm 3.59×10^7) (第 2 圖)。

兩種 MVA 菌種在老鼠中均誘導產生對抗致死 rVV 刺激之保護性免疫反應。雖然兩種 MVA 菌種在較高劑量下的效力均相當，但低於最佳劑量時其等之效力明顯的不同。在誘導對抗致死 rVV 刺激之保護性免疫反應上，MVA-BN 之強度大於其親本品種 MVA-575，此可由比較 MVA-575 與 MVA-BN 之增加的減少而明白關係。

4. MVA-BN 於初次-推升接種療法

5.1.: 以不同天花疫苗接種老鼠後，對 MVA 產生抗體

將 MVA-BN 的效力與其它 MVA 以及之前在根除天花時所用的痘菌株比較。這些包括使用於 CEF 所產生和透過尾部割痕所給的之 Elstree 和 Wyeth vaccinia 品種以及使用之前德國在根除天花時所用 MVA 572 來單一免疫。此外，比較 MVA-BN 和 MVA 572 兩者之疫苗前，接著以 Elstree 進行割痕。每一群使

用 8 隻 BALB/c 老鼠，且全部的 MVA(1×10^7 TCID₅₀) 在第 0 週與第 3 週時以皮下接種給予。推升免疫 2 週後，以牛痘 (IHD-J) 刺激該老鼠且於刺激 4 天後測定卵巢中之效價。所有疫苗和療法引起 100% 保護。

使用該等不同疫苗或療法所誘導出之免疫反應，於動物中刺激之前量測。使用量測中和抗體、T 細胞增生、細胞激素產物 (IFN- γ 與 IL-4) 和由 T 細胞產生之 IFN- γ 分析法。由 MVA-BN 誘導之 T 細胞反應的位準，以 ELIspot 量測時一般係相等於其它 MVA 和牛痘病毒，顯示生物-等效。在不同接種療法之後，每週分析針對 MVA 之抗體的效價展現出，相較於其它接種療法，以 MVA-BN 接種明顯地提高抗體的速度與大小 (第 11 圖)。的確，相較於以 MVA 572 接種之老鼠，當以 MVA-BN 接種時，對 MVA 之抗體效價在第 2、4 與 5 週 (在第 4 週推升後 1 週) 時明顯較高 ($p > 0.05$)。在第 4 週推升接種之後，相較於接受痘菌株 Elstree 或 Wyeth 之單一接種，於 MVA-BN 群中之抗體效量亦明顯較高。此等結果清楚地顯示出，相較於以傳統的牛痘菌株 (Elstree 和 Wyeth) 所作之典型單一接種，2 個以 MVA-BN 接種者誘導較高的抗體反應，以及從區域 1.5 證實此發現，MVA-BN 比其它 MVA 菌株更具致免疫性。

5.2.: 在流行性感冒刺激模型中，MVA-初次和推升療法產生與 DNA-初次 MVA-推升療法相同位準的保護

將用以產生高活動性 CTL 反應之 MVA 初次-推升療法與已被報導為最好的 DNA 初次/MVA 推升療法相比較。使用以由 DNA 載體或 MVA-BN 編碼之鼠類多面體結構來評估不同療法且以

ELISPOT 來比較 CTL 誘導的位準，同時將所量測得之反應活動性作為以流行性感冒刺激之後所提供保護的程度。

結果

編碼鼠類多面體(10 CTL 抗原決定位，包括流行性感冒、卵白蛋白)之 DNA 質體已於前面說明(Thomson 等人，1998, *J. Immunol.* 160: 1717)。此鼠類多面體被插入 MVA-BN 的缺失位置 II，於 CEF 細胞中增長，以蔗糖存化且於 Tris 中配方成 pH 7.4。

疫苗接種步驟

於目前的研究中，使用無特定病毒之 6-8 週大的雌性 BALB/c (H-2d) 老鼠。5 隻老鼠群被用於 ELISPOT 分析，而每群 6 隻老鼠被用於供流行性感冒刺激實驗。以不同的初次-推升療法，使用 MVA 或如於結果中詳述之編碼鼠類多面體之 DNA 來接種該老鼠。在以 DNA 接種方面，先麻醉老鼠，再於麻醉下，於四頭肌中注射 50 μ g 之無內毒素的質體 DNA (配於 50 μ l 之 PBS 中)。使用之初次免疫的進行係以靜脈內投與每隻老鼠 10^7 pfu 之 MVA-BN 或以皮下投與每隻老鼠 10^7 pfu 或 10^8 pfu 之 MVA-BN。推升免疫是於初次免疫 3 週後給予。質體 DNA 之推升係用與使用 DNA 之初次免疫相同的方式來進行(參見上述內容)。為了要建立 CTL 反應，於在使用流行性感冒 CTL 抗原決定位胜肽 (TYQRTRALV)、P. Berghei 抗原決定位胜肽 (SYIPSAEKI)、巨大細胞病毒胜肽抗原決定位 (YPHFMPNTL) 和/或 LCV 胜肽抗原決定位 (RPQASGVYM) 做最後的推升免疫之 2 週後，於脾細胞上進行標準的 ELISPOT 分析(Schneider 等人，1998, *Nat. Med.* 4;

397-402)。在刺激實驗方面，將老鼠麻醉，以次-致死劑量之常用的流行性感冒病毒，Mem71 (配置於 50 ml 之 PBS 中 4.5×10^5 pfu) i. n. 感染老鼠。感染後第 5 天，將肺移除且使用標準流行性感冒斑分析法，於 Madin-Darby 氏狗腎小管細胞株中決定一式二份之病毒效價。

結果：

單獨使用 DNA 疫苗，以老鼠多面體編碼的 4H-2^d 抗原決定位所誘導之 CTL 係不足的，且對於 P. Berghei (SYIPSAEKI) 之抗原決定位以及淋巴脈絡叢腦膜病毒 (RPQASGVYM) 兩者僅可偵測到微量的反應。相反的，使用 DNA 初次 MVA 推升療法 (皮下給予 10^7 pfu MVA-BN)，所誘導 CTL 明顯較高，對於 SLY (8-倍的增加) 而對 RPQ (3-倍的增加)，以及亦可觀察到對於鼠類巨大細胞病毒 (YPHFMPNTL) 之第 3 抗原決定位的反應 (第 3A 圖)。然而，於一同型初次推升療法中皮下給予 10^7 pfu MVA-BN 會誘導與採用 MVA-BN 之 DNA 相同的反應 (第 3A 圖)。令人驚訝地，當使用一種 MVA-BN (10^7 TCID₅₀) 免疫時，對於三個抗原決定位所誘導之 CTL 的數目沒有明顯地不同，顯示出以 MVA-BN 之第二次免疫不會明顯地增加 CTL 反應。

之前已顯示，對於使用其它菌株之 MVA 來接種時，特別若與靜脈內免疫相較時，皮下投與 10^7 pfu MVA 是最無效率之途徑與病毒濃度 (Schneider 等人 1998)。為了界定最佳免疫療法，上述實驗以改變病毒數量或改變投與模式來重覆進行。於一實驗中， 10^7 pfu 之 MVA-BN 疫苗係以靜脈內投與 (第 3B 圖)。於另一實驗中， 10^8 pfu 之 MVA-BN 係以皮下投與 (第 3C 圖)。

於該等實驗中，相較於 DNA 初次 MVA 推升療法，MVA-BN 初次-推升免疫對全部三種 CTL 抗原決定位誘導較高的平均 CTL 數目。且，不像皮下投與 10^7 pfu 之 MVA-BN，以靜脈內投與 10^7 pfu 之 MVA-BN 的免疫以及皮下投與 10^8 pfu 明顯地提高 CTL 反應。此清楚地指出，在事先對該載體具有免疫力的存在下，MVA-BN 可被用於提高 CTL 反應。

參考文獻

Nimmannitya S、Kalayanaroo S、Nisalak A 和 Innes B. 1990。登革熱出血熱之第二次發作。Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 21:699

Burke DS 和 Monath TP. 2001，黃病毒。病毒領域，第四版，由 David M Knipe 和 Peter M Howley 編輯。由 Lippincott Williams 和 Wilkins 發表，費城。第 1043-1125 頁

Flamand M、Megret F、Mathieu M、LePault、Rey FA 和 Deubel V.，1999。登革熱病毒類型 1 非結構性的糖蛋白 NS1 係由哺乳細胞所分泌，於糖化-依賴的形態中為可溶性的六聚體。J. Virol., 73:6104-6110

Jang SK、Davies MV、Kaufman RJ 和 Wimmer E.，1989。藉由於活體內，核糖體內入腦心肌炎病毒 RNA 之 5'非轉譯區域來起始蛋白質合成。J. Virol., 63:1651-60

Lindenbach BD 和 Rice CM. , 2001, 黃病毒與其複製。於病毒領域, 第四版。由 David M Knipe 與 Peter M Howley 編輯。Lippincott Williams 與 Wilkins 發行, 費城。第 991-1041 頁

Schlesinger JJ、Brandriss MW 和 Walsh EE. , 1987。藉由以登革熱 2 病毒非-結構性的蛋白 NS1 免疫來保護老鼠免於罹患登革熱 2 病毒腦炎。J. Gen. Virol., 68:853-7

Schesinger JJ、Foltzer M 和 Chapman S. , 1993。對於黃熱病毒 NS1, 抗體之 Fc 部分係保護老鼠免於罹患黃熱腦炎之決定部位。Virology. 192: 132-41

本發明所述之技術與程序係熟悉分子生物與病毒, 特別是有關黃病毒病毒學與痘病毒之基因操作方面之從業人員所熟悉者。所述之技術與程序之詳細內容可於下列文獻來源中找到:

分子選殖, 實驗室手冊。第二版。由 J. Sambrook, E. F. Fritsch 與 T. Maniatis 出版。Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989

病毒學方法手冊。由 Brian WJ Mahy 與 Hillar O Kangro 編輯。Academic Press. 1996

分子病毒學: 實用入門。由 AJ Davison 和 RM Elliott 編輯。

實用入門系列。IRL Press at Oxford University Press.
Oxford 1993. Chapter 9 : 牛痘病毒載體之基因表現

分子生物目前的規則。發行人: John Wiley 和 Son Inc. 1998。
第 16 章, 第 IV 節: 於哺乳動物中使用牛痘病毒載體之蛋白質
的表現。抗體, 實驗室手冊。由 Harlow 和 David Lane 編輯。
Cold Spring Harbor Laboratory 出版, 1988。

【圖式簡單說明】

第 1A 圖: 作為本發明之一實施例之登革熱 NGC 品種 "訊
號序列+NS1" cDNA 蛋白質編碼序列。在自然內文中之 NS1 基因
的開頭以一箭頭指示。重要之特徵係添加一 ATG 起始密碼子和
一終止密碼子(於此實施例中為 "TAG")。核苷酸序列數目參照
NGC 品種基因組之位置(基因資料庫登錄號 AF038403)。在第
1A 圖中之核苷酸與胺基酸對應於序列編號 5。該胺基酸分開示
於序列編號 6。

第 1B 圖: 含該登革熱 NGC 品種 "訊號序列+NS1" 蛋白質
編碼序列之質體 pAF7NS1 的圖表。

第 1C 圖: 在質體 pAF7 內之 NS1 卡匣的核苷酸序列顯示
出, 以 oBN345 和 oBN338 來 PCR 擴增此卡匣的起動子鍵結位置。
於第 1C 圖中之核苷酸與胺基酸序列對應於序列編號 7。該胺基
酸分開示為序列編號 8。

第 1D 圖: 上面: 登革熱 NGC 品種 NS1 胺基酸序列之
Kyte-Doolittle 親水性墨點圖(登革熱 NCG 多蛋白基因資料庫
登錄號 AF038403 之胺基酸 776 至 1127)。值高於零 = 疏水性。

下面：含有衍生自 E 蛋白質之 C-端的最後 28 個胺基酸之訊號序列之登革熱 NCG 品種 NS1 胺基酸序列的 Kyte-Doolittle 親水性墨點圖(胺基酸 748 至 775)。全部之胺基酸序列代表登革熱 NCG 多蛋白之胺基酸 748 至 1127(基因資料庫登錄號 AF038403)，此品種以“ATG”起始密碼子作為起始，但缺少終止密碼子。Sig = 訊號序列。值高於零 = 疏水性。

第 2 圖：“痘病毒起動子+訊號序列+NS1”表現卡匣之核苷酸序列。於第 2 圖中之核苷酸和胺基酸序列對應於序列編號 9。胺基酸分開示於序列編號 10。簡言之，最小痘病毒早期/晚期起動子要素控制登革熱病毒血清類型 2 之 NS1 蛋白的表現，其中該 NS1 蛋白之 N-端融合至 E-蛋白質之 28 個 C-端胺基酸。轉譯終止於已插入核酸序列中之 TAG 終止密碼子。

第 3A 圖：將 NS1 表現卡匣選殖進入 pBNX07 之平口終止的 Xho I 位置(平口的鈍端選殖)，以產生選殖株 pBN41。PPr = 痘病毒起動子，D2F1 = 缺失 2 之側面 1，NPT II = 新黴素抗性基因，IRES = 核糖體內結合位置，EGFP = 提升的綠螢光蛋白，NS1(於 pBN41 中)=訊號序列+NS1，D2F2= 缺失 2 之側面 2，Sig = 訊號序列。AmpR = 氨比西林抗性基因。

第 3B 圖：MVA (基因資料庫 U94848)之 Hind III 圖，顯示 MVA 的六個缺失的位址(-J- = 缺失的接合點)。“PPr+NPT II+IRES+EGFP+PPr+NS1”卡匣被插入 MVA 之缺失 2 位置。PPr = 痘病毒起動子，NPT II = 新黴素抗性基因(蛋白質編碼序列)，IRES = 核糖體內結合位置以及 NS1= 訊號序列+登革熱 2 NGC 品種之 NS1 蛋白編碼序列。

第 4 圖：顯示具未感染細胞控制組之 mBN07 和真正登革熱病毒血清類型 2 之免疫墨點圖，其以對抗登革熱病毒 NS1 蛋白之單株抗體來探察。左邊之箭頭指天然 NS1 二聚物，而右邊之箭頭指 NS1 單體，其於樣品沸騰後觀看。2ME = 2 巯基乙醇。

第 5 圖：稀釋成 1:200 之血清被測試於，在無還原且無加熱之情況下，以 SDS PAGE 所分離之登革熱病毒血清類型 2 抗原之免疫墨點條帶上以及未受感染之 C6/36 細胞之控制條帶上。

條帶 1 = 登革熱病毒血清類型 2 抗原條帶；

條帶 2 = 控制條帶；a = 免疫前的血清，而 b = 免疫後的血清。

第 6 圖：免疫後之血清被滴定至 1:1000、1:2000、1:4000、 $1:10^{-4}$ 、 $1:10^{-5}$ 、 $1:10^{-6}$ ，且被測試於在無還原與無加熱情況下，以 SDS PAGE 分離之後登革熱 2 病毒抗原之免疫墨點條帶上以及未被感染之 C6/36 細胞的控制條帶上。注意：對於兔子 #1 和 #2，稀釋 10^{-4} 之 NS1 帶雖然無法在掃描的照片上觀察到，然而實際的條帶可由肉眼觀察到。1 = 登革熱病毒血清類型 2 抗原條帶，2 = 控制條帶，A = 兔子 #1，B = 兔子 #2，且 C = 兔子 #3。

第 7 圖：對於全部三隻兔子之免疫後的血清滴定量測之 ELISA 吸收讀數的點。

第 8 圖：每隻被稀釋成 1:1000 之兔子血清被測試於，在無還原與無加熱情況下，以 SDS PAGE 分離之登革熱 1、2、3、4+JE 病毒抗原之免疫墨點條帶上以及未受感染之 C6/36 細胞的

控制條帶上。注意：對於具兔子#2 血清之登革熱 3 與 4 之 NS1 帶雖然無法在掃描的照片上觀察到，然而實際的條帶可由肉眼觀察到。1=登革熱病毒血清類型 1 抗原條帶，2=登革熱病毒血清類型 3 抗原條帶，3=登革熱病毒血清類型 4 抗原，4=JE 病毒抗原條帶，而 5=控制組。

【主要元件符號說明】

(無)

序列表

<110> Bavarian Nordic A/S
Venture Technologies Sdn Bhd

<120> 黃病毒 NS1 次單元疫苗

<130> NS1 登革熱

<140> 0000

<141> 2001-12-04

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 1

ttgtagcag ccggatcgta gacttaatta

30

<210> 2

<211> 62

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 2

caaaaaattg aaatatttatt tttttttttt ggaatataaa taaaaacacg ataataccat 60
gg 62

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 3

aatagatctc tactaggctg tgaccaagga gtt

33

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工合成序列 Sequence

<220>

<223> 人工合成序列之說明: 引子

<400> 4

acaagatctg gaatgaattc acgtagcacc tca

33

<210> 5

<211> 1143

<212> DNA

<213> 登革熱病毒類型 2

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1140)

<223> E 蛋白之訊號序列+NS1 編碼序列

<400> 5

atg aat tca cgc agc acc tca ctg tct gtg tca cta gta ttg gtg gga 48
Met Asn Ser Arg Ser Thr Ser Leu Ser Val Ser Leu Val Leu Val Gly
1 5 10 15

gtc gtg acg ctg tat ttg gga gtt atg gtg cag gcc gat agt ggt tgc 96
Val Val Thr Leu Tyr Leu Gly Val Met Val Gln Ala Asp Ser Gly Cys
20 25 30

gtt gtg agc tgg aaa aac aaa gaa ctg aag tgt ggc agt ggg att ttc 144
Val Val Ser Trp Lys Asn Lys Glu Leu Lys Cys Gly Ser Gly Ile Phe
35 40 45

atc aca gac aac gtg cac aca tgg aca gaa caa tac aag ttc caa cca 192
Ile Thr Asp Asn Val His Thr Trp Thr Glu Gln Tyr Lys Phe Gln Pro
50 55 60

gaa tcc cct tca aag cta gct tca gct atc cag aaa gct cat gaa gag 240
Glu Ser Pro Ser Lys Leu Ala Ser Ala Ile Gln Lys Ala His Glu Glu
65 70 75 80

ggc att tgt gga atc cgc tca gta aca aga ctg gaa aat ctg atg tgg 288
 Gly Ile Cys Gly Ile Arg Ser Val Thr Arg Leu Glu Asn Leu Met Trp
 85 90 95

aaa caa ata aca cca gaa ttg aat cac att cta tca gaa aat gag gtg 336
 Lys Gln Ile Thr Pro Glu Leu Asn His Ile Leu Ser Glu Asn Glu Val
 100 105 110

aag ttg act att atg aca gga gac atc aaa gga atc atg cag gca gga 384
 Lys Leu Thr Ile Met Thr Gly Asp Ile Lys Gly Ile Met Gln Ala Gly
 115 120 125

aaa cga tct ctg cag ccc cag ccc act gag ctg aag tat tca tgg aaa 432
 Lys Arg Ser Leu Gln Pro Gln Pro Thr Glu Leu Lys Tyr Ser Trp Lys
 130 135 140

aca tgg ggc aaa gcg aaa atg ctc tct aca gag tct cat aac cag acc 480
 Thr Trp Gly Lys Ala Lys Met Leu Ser Thr Glu Ser His Asn Gln Thr
 145 150 155 160

ttt ctc att gat ggc ccc gaa aca gca gaa tgc ccc aac aca aac aga 528
 Phe Leu Ile Asp Gly Pro Glu Thr Ala Glu Cys Pro Asn Thr Asn Arg
 165 170 175

gct tgg aat tcg ctg gaa gtt gaa gac tat ggc ttt gga gta ttc acc 576
 Ala Trp Asn Ser Leu Glu Val Glu Asp Tyr Gly Phe Gly Val Phe Thr
 180 185 190

acc aat ata tgg cta aag ttg aga gaa aag cag gat gta ttc tgc gac 624
 Thr Asn Ile Trp Leu Lys Leu Arg Glu Lys Gln Asp Val Phe Cys Asp
 195 200 205

tca aaa ctc atg tca gcg gcc ata aaa gac aac aga gcc gtc cat gcc 672
 Ser Lys Leu Met Ser Ala Ala Ile Lys Asp Asn Arg Ala Val His Ala
 210 215 220

gat atg ggt tat tgg ata gaa agt gca ctc aat gac aca tgg aag ata 720
 Asp Met Gly Tyr Trp Ile Glu Ser Ala Leu Asn Asp Thr Trp Lys Ile
 225 230 235 240

gag aaa gcc tct ttc atc gaa gtt aaa agc tgc cac tgg cca aag tca 768
 Glu Lys Ala Ser Phe Ile Glu Val Lys Ser Cys His Trp Pro Lys Ser
 245 250 255

cac acc ctc tgg agt aat gga gtg tta gaa agt gag atg ata att cca 816
 His Thr Leu Trp Ser Asn Gly Val Leu Glu Ser Glu Met Ile Ile Pro
 260 265 270

aag aat ttc gct gga cca gtg tca caa cac aac tac aga cca ggc tac 864
 Lys Asn Phe Ala Gly Pro Val Ser Gln His Asn Tyr Arg Pro Gly Tyr
 275 280 285

cat aca caa aca gca gga cca tgg cat cta ggt aag ctt gag atg gac 912
 His Thr Gln Thr Ala Gly Pro Trp His Leu Gly Lys Leu Glu Met Asp
 290 295 300

ttt gat ttc tgc gaa gga acc aca gtg gtg gtg act gag gac tgt gga 960
 Phe Asp Phe Cys Glu Gly Thr Thr Val Val Val Thr Glu Asp Cys Gly
 305 310 315 320

aat aga gga ccc tct tta aga aca act act gcc tct gga aaa ctc ata 1008
 Asn Arg Gly Pro Ser Leu Arg Thr Thr Thr Ala Ser Gly Lys Leu Ile
 325 330 335

aca gaa tgg tgc tgc cga tct tgc aca tta cca ccg cta aga tac aga 1056
 Thr Glu Trp Cys Cys Arg Ser Cys Thr Leu Pro Pro Leu Arg Tyr Arg
 340 345 350

ggt gag gac gga tgc tgg tac ggg atg gaa atc aga cca ttg aaa gag 1104
 Gly Glu Asp Gly Cys Trp Tyr Gly Met Glu Ile Arg Pro Leu Lys Glu
 355 360 365

aaa gaa gag aat ttg gtc aac tcc ttg gtc aca gcc tag 1143
 Lys Glu Glu Asn Leu Val Asn Ser Leu Val Thr Ala
 370 375 380

<210> 6
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> 登革熱病毒類型 2

<400> 6
 Met Asn Ser Arg Ser Thr Ser Leu Ser Val Ser Leu Val Leu Val Gly
 1 5 10 15
 Val Val Thr Leu Tyr Leu Gly Val Met Val Gln Ala Asp Ser Gly Cys
 20 25 30
 Val Val Ser Trp Lys Asn Lys Glu Leu Lys Cys Gly Ser Gly Ile Phe
 35 40 45
 Ile Thr Asp Asn Val His Thr Trp Thr Glu Gln Tyr Lys Phe Gln Pro
 50 55 60
 Glu Ser Pro Ser Lys Leu Ala Ser Ala Ile Gln Lys Ala His Glu Glu

325

330

335

Thr Glu Trp Cys Cys Arg Ser Cys Thr Leu Pro Pro Leu Arg Tyr Arg
 340 345 350

Gly Glu Asp Gly Cys Trp Tyr Gly Met Glu Ile Arg Pro Leu Lys Glu
 355 360 365

Lys Glu Glu Asn Leu Val Asn Ser Leu Val Thr Ala
 370 375 380

<210> 7

<211> 1296

<212> DNA

<213> 登革熱病毒類型 2

<220>

<221> CDS

<222> (50)..(1189)

<220>

<221> 引子_結合

<222> (12)..(32)

<220>

<221> 引子_結合

<222> (1243)..(1273)

<400> 7

ttttcctttg aaaaacacga taataccatg ggaattcccc cgatctgga atg aat tca 58
 Met Asn Ser
 1

cgc agc acc tca ctg tct gtg tca cta gta ttg gtg gga gtc gtg acg 106
 Arg Ser Thr Ser Leu Ser Val Ser Leu Val Leu Val Gly Val Val Thr
 5 10 15

ctg tat ttg gga gtt atg gtg cag gcc gat agt ggt tgc gtt gtg agc 154
 Leu Tyr Leu Gly Val Met Val Gln Ala Asp Ser Gly Cys Val Val Ser
 20 25 30 35

tgg aaa aac aaa gaa ctg aag tgt ggc agt ggg att ttc atc aca gac 202
 Trp Lys Asn Lys Glu Leu Lys Cys Gly Ser Gly Ile Phe Ile Thr Asp
 40 45 50

aac gtg cac aca tgg aca gaa caa tac aag ttc caa cca gaa tcc cct 250

Asn Val His Thr Trp Thr Glu Gln Tyr Lys Phe Gln Pro Glu Ser Pro	
55	60
65	
tca aag cta gct tca gct atc cag aaa gct cat gaa gag ggc att tgt	298
Ser Lys Leu Ala Ser Ala Ile Gln Lys Ala His Glu Glu Gly Ile Cys	
70	75
80	
gga atc cgc tca gta aca aga ctg gaa aat ctg atg tgg aaa caa ata	346
Gly Ile Arg Ser Val Thr Arg Leu Glu Asn Leu Met Trp Lys Gln Ile	
85	90
95	
aca cca gaa ttg aat cac att cta tca gaa aat gag gtg aag ttg act	394
Thr Pro Glu Leu Asn His Ile Leu Ser Glu Asn Glu Val Lys Leu Thr	
100	105
110	115
att atg aca gga gac atc aaa gga atc atg cag gca gga aaa cga tct	442
Ile Met Thr Gly Asp Ile Lys Gly Ile Met Gln Ala Gly Lys Arg Ser	
120	125
130	
ctg cag ccc cag ccc act gag ctg aag tat tca tgg aaa aca tgg ggc	490
Leu Gln Pro Gln Pro Thr Glu Leu Lys Tyr Ser Trp Lys Thr Trp Gly	
135	140
145	
aaa gcg aaa atg ctc tct aca gag tct cat aac cag acc ttt ctc att	538
Lys Ala Lys Met Leu Ser Thr Glu Ser His Asn Gln Thr Phe Leu Ile	
150	155
160	
gat ggc ccc gaa aca gca gaa tgc ccc aac aca aac aga gct tgg aat	586
Asp Gly Pro Glu Thr Ala Glu Cys Pro Asn Thr Asn Arg Ala Trp Asn	
165	170
175	
tcg ctg gaa gtt gaa gac tat ggc ttt gga gta ttc acc acc aat ata	634
Ser Leu Glu Val Glu Asp Tyr Gly Phe Gly Val Phe Thr Thr Asn Ile	
180	185
190	195
tgg cta aag ttg aga gaa aag cag gat gta ttc tgc gac tca aaa ctc	682
Trp Leu Lys Leu Arg Glu Lys Gln Asp Val Phe Cys Asp Ser Lys Leu	
200	205
210	
atg tca gcg gcc ata aaa gac aac aga gcc gtc cat gcc gat atg ggt	730
Met Ser Ala Ala Ile Lys Asp Asn Arg Ala Val His Ala Asp Met Gly	
215	220
225	
tat tgg ata gaa agt gca ctc aat gac aca tgg aag ata gag aaa gcc	778
Tyr Trp Ile Glu Ser Ala Leu Asn Asp Thr Trp Lys Ile Glu Lys Ala	
230	235
240	
tct ttc atc gaa gtt aaa agc tgc cac tgg cca aag tca cac acc ctc	826

Ser Phe Ile Glu Val Lys Ser Cys His Trp Pro Lys Ser His Thr Leu
 245 250 255

tgg agt aat gga gtg tta gaa agt gag atg ata att cca aag aat ttc 874
 Trp Ser Asn Gly Val Leu Glu Ser Glu Met Ile Ile Pro Lys Asn Phe
 260 265 270 275

gct gga cca gtg tca caa cac aac tac aga cca ggc tac cat aca caa 922
 Ala Gly Pro Val Ser Gln His Asn Tyr Arg Pro Gly Tyr His Thr Gln
 280 285 290

aca gca gga cca tgg cat cta ggt aag ctt gag atg gac ttt gat ttc 970
 Thr Ala Gly Pro Trp His Leu Gly Lys Leu Glu Met Asp Phe Asp Phe
 295 300 305

tgc gaa gga acc aca gtg gtg gtg act gag gac tgt gga aat aga gga 1018
 Cys Glu Gly Thr Thr Val Val Val Thr Glu Asp Cys Gly Asn Arg Gly
 310 315 320

ccc tct tta aga aca act act gcc tct gga aaa ctc ata aca gaa tgg 1066
 Pro Ser Leu Arg Thr Thr Thr Ala Ser Gly Lys Leu Ile Thr Glu Trp
 325 330 335

tgc tgc cga tct tgc aca tta cca ccg cta aga tac aga ggt gag gac 1114
 Cys Cys Arg Ser Cys Thr Leu Pro Pro Leu Arg Tyr Arg Gly Glu Asp
 340 345 350 355

gga tgc tgg tac ggg atg gaa atc aga cca ttg aaa gag aaa gaa gag 1162
 Gly Cys Trp Tyr Gly Met Glu Ile Arg Pro Leu Lys Glu Lys Glu Glu
 360 365 370

aat ttg gtc aac tcc ttg gtc aca gcc tagtagggat cgggggagct 1209
 Asn Leu Val Asn Ser Leu Val Thr Ala
 375 380

cactagtgga tccctccagc tcgagaggnc taattaatta agtctacgat cgggctgcta 1269

acaaagccccg aaaggaagct gagttgg 1296

<210> 8
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> 登革熱病毒類型 2

<400> 8
 Met Asn Ser Arg Ser Thr Ser Leu Ser Val Ser Leu Val Leu Val Gly
 1 5 10 15

Val Val Thr Leu Tyr Leu Gly Val Met Val Gln Ala Asp Ser Gly Cys
 20 25 30

Val Val Ser Trp Lys Asn Lys Glu Leu Lys Cys Gly Ser Gly Ile Phe
 35 40 45

Ile Thr Asp Asn Val His Thr Trp Thr Glu Gln Tyr Lys Phe Gln Pro
 50 55 60

Glu Ser Pro Ser Lys Leu Ala Ser Ala Ile Gln Lys Ala His Glu Glu
 65 70 75 80

Gly Ile Cys Gly Ile Arg Ser Val Thr Arg Leu Glu Asn Leu Met Trp
 85 90 95

Lys Gln Ile Thr Pro Glu Leu Asn His Ile Leu Ser Glu Asn Glu Val
 100 105 110

Lys Leu Thr Ile Met Thr Gly Asp Ile Lys Gly Ile Met Gln Ala Gly
 115 120 125

Lys Arg Ser Leu Gln Pro Gln Pro Thr Glu Leu Lys Tyr Ser Trp Lys
 130 135 140

Thr Trp Gly Lys Ala Lys Met Leu Ser Thr Glu Ser His Asn Gln Thr
 145 150 155 160

Phe Leu Ile Asp Gly Pro Glu Thr Ala Glu Cys Pro Asn Thr Asn Arg
 165 170 175

Ala Trp Asn Ser Leu Glu Val Glu Asp Tyr Gly Phe Gly Val Phe Thr
 180 185 190

Thr Asn Ile Trp Leu Lys Leu Arg Glu Lys Gln Asp Val Phe Cys Asp
 195 200 205

Ser Lys Leu Met Ser Ala Ala Ile Lys Asp Asn Arg Ala Val His Ala
 210 215 220

Asp Met Gly Tyr Trp Ile Glu Ser Ala Leu Asn Asp Thr Trp Lys Ile
 225 230 235 240

Glu Lys Ala Ser Phe Ile Glu Val Lys Ser Cys His Trp Pro Lys Ser
 245 250 255

His Thr Leu Trp Ser Asn Gly Val Leu Glu Ser Glu Met Ile Ile Pro
 260 265 270

Lys Asn Phe Ala Gly Pro Val Ser Gln His Asn Tyr Arg Pro Gly Tyr
 275 280 285

His Thr Gln Thr Ala Gly Pro Trp His Leu Gly Lys Leu Glu Met Asp
 290 295 300

Phe Asp Phe Cys Glu Gly Thr Thr Val Val Val Thr Glu Asp Cys Gly
 305 310 315 320

Asn Arg Gly Pro Ser Leu Arg Thr Thr Thr Ala Ser Gly Lys Leu Ile
 325 330 335

Thr Glu Trp Cys Cys Arg Ser Cys Thr Leu Pro Pro Leu Arg Tyr Arg
 340 345 350

Gly Glu Asp Gly Cys Trp Tyr Gly Met Glu Ile Arg Pro Leu Lys Glu
 355 360 365

Lys Glu Glu Asn Leu Val Asn Ser Leu Val Thr Ala
 370 375 380

<210> 9
 <211> 1227
 <212> DNA
 <213> 登革熱病毒類型 2

<220>
 <221> 起動子
 <222> (5)..(48)
 <223> 最小痘病毒起動子要素

<220>
 <221> CDS
 <222> (85)..(1224)
 <223> NS1

<400> 9
 ctcgacaaaa aattgaaatt ttatTTTTTT tttttggaat ataaataaaa acacgataat 60

accatgggaa ttccccgatc tgga atg aat tca cgc agc acc tca ctg tct 111
 Met Asn Ser Arg Ser Thr Ser Leu Ser
 1 5

gtg tca cta gta ttg gtg gga gtc gtg acg ctg tat ttg gga gtt atg 159
 Val Ser Leu Val Leu Val Gly Val Val Thr Leu Tyr Leu Gly Val Met

10	15	20	25	
gtg cag gcc gat agt ggt tgc gtt gtg agc tgg aaa aac aaa gaa ctg				207
Val Gln Ala Asp Ser Gly Cys Val Val Ser Trp Lys Asn Lys Glu Leu				
	30	35	40	
aag tgt ggc agt ggg att ttc atc aca gac aac gtg cac aca tgg aca				255
Lys Cys Gly Ser Gly Ile Phe Ile Thr Asp Asn Val His Thr Trp Thr				
	45	50	55	
gaa caa tac aag ttc caa cca gaa tcc cct tca aag cta gct tca gct				303
Glu Gln Tyr Lys Phe Gln Pro Glu Ser Pro Ser Lys Leu Ala Ser Ala				
	60	65	70	
atc cag aaa gct cat gaa gag ggc att tgt gga atc cgc tca gta aca				351
Ile Gln Lys Ala His Glu Glu Gly Ile Cys Gly Ile Arg Ser Val Thr				
	75	80	85	
aga ctg gaa aat ctg atg tgg aaa caa ata aca cca gaa ttg aat cac				399
Arg Leu Glu Asn Leu Met Trp Lys Gln Ile Thr Pro Glu Leu Asn His				
	90	95	100	105
att cta tca gaa aat gag gtg aag ttg act att atg aca gga gac atc				447
Ile Leu Ser Glu Asn Glu Val Lys Leu Thr Ile Met Thr Gly Asp Ile				
	110	115	120	
aaa gga atc atg cag gca gga aaa cga tct ctg cag ccc cag ccc act				495
Lys Gly Ile Met Gln Ala Gly Lys Arg Ser Leu Gln Pro Gln Pro Thr				
	125	130	135	
gag ctg aag tat tca tgg aaa aca tgg ggc aaa gcg aaa atg ctc tct				543
Glu Leu Lys Tyr Ser Trp Lys Thr Trp Gly Lys Ala Lys Met Leu Ser				
	140	145	150	
aca gag tct cat aac cag acc ttt ctc att gat ggc ccc gaa aca gca				591
Thr Glu Ser His Asn Gln Thr Phe Leu Ile Asp Gly Pro Glu Thr Ala				
	155	160	165	
gaa tgc ccc aac aca aac aga gct tgg aat tcg ctg gaa gtt gaa gac				639
Glu Cys Pro Asn Thr Asn Arg Ala Trp Asn Ser Leu Glu Val Glu Asp				
	170	175	180	185
tat ggc ttt gga gta ttc acc acc aat ata tgg cta aag ttg aga gaa				687
Tyr Gly Phe Gly Val Phe Thr Thr Asn Ile Trp Leu Lys Leu Arg Glu				
	190	195	200	
aag cag gat gta ttc tgc gac tca aaa ctc atg tca gcg gcc ata aaa				735
Lys Gln Asp Val Phe Cys Asp Ser Lys Leu Met Ser Ala Ala Ile Lys				

	205	210	215	
gac aac aga gcc gtc cat gcc gat atg ggt tat tgg ata gaa agt gca				783
Asp Asn Arg Ala Val His Ala Asp Met Gly Tyr Trp Ile Glu Ser Ala				
	220	225	230	
ctc aat gac aca tgg aag ata gag aaa gcc tct ttc atc gaa gtt aaa				831
Leu Asn Asp Thr Trp Lys Ile Glu Lys Ala Ser Phe Ile Glu Val Lys				
	235	240	245	
agc tgc cac tgg cca aag tca cac acc ctc tgg agt aat gga gtg tta				879
Ser Cys His Trp Pro Lys Ser His Thr Leu Trp Ser Asn Gly Val Leu				
	250	255	260	265
gaa agt gag atg ata att cca aag aat ttc gct gga cca gtg tca caa				927
Glu Ser Glu Met Ile Ile Pro Lys Asn Phe Ala Gly Pro Val Ser Gln				
	270	275	280	
cac aac tac aga cca ggc tac cat aca caa aca gca gga cca tgg cat				975
His Asn Tyr Arg Pro Gly Tyr His Thr Gln Thr Ala Gly Pro Trp His				
	285	290	295	
cta ggt aag ctt gag atg gac ttt gat ttc tgc gaa gga acc aca gtg				1023
Leu Gly Lys Leu Glu Met Asp Phe Asp Phe Cys Glu Gly Thr Thr Val				
	300	305	310	
gtg gtg act gag gac tgt gga aat aga gga ccc tct tta aga aca act				1071
Val Val Thr Glu Asp Cys Gly Asn Arg Gly Pro Ser Leu Arg Thr Thr				
	315	320	325	
act gcc tct gga aaa ctc ata aca gaa tgg tgc tgc cga tct tgc aca				1119
Thr Ala Ser Gly Lys Leu Ile Thr Glu Trp Cys Cys Arg Ser Cys Thr				
	330	335	340	345
tta cca ccg cta aga tac aga ggt gag gac gga tgc tgg tac ggg atg				1167
Leu Pro Pro Leu Arg Tyr Arg Gly Glu Asp Gly Cys Trp Tyr Gly Met				
	350	355	360	
gaa atc aga cca ttg aaa gag aaa gaa gag aat ttg gtc aac tcc ttg				1215
Glu Ile Arg Pro Leu Lys Glu Lys Glu Glu Asn Leu Val Asn Ser Leu				
	365	370	375	
gtc aca gcc tag				1227
Val Thr Ala				
	380			

<210> 10

225					230						235					240
Glu	Lys	Ala	Ser	Phe	Ile	Glu	Val	Lys	Ser	Cys	His	Trp	Pro	Lys	Ser	
				245					250					255		
His	Thr	Leu	Trp	Ser	Asn	Gly	Val	Leu	Glu	Ser	Glu	Met	Ile	Ile	Pro	
		260						265					270			
Lys	Asn	Phe	Ala	Gly	Pro	Val	Ser	Gln	His	Asn	Tyr	Arg	Pro	Gly	Tyr	
	275						280					285				
His	Thr	Gln	Thr	Ala	Gly	Pro	Trp	His	Leu	Gly	Lys	Leu	Glu	Met	Asp	
290						295					300					
Phe	Asp	Phe	Cys	Glu	Gly	Thr	Thr	Val	Val	Val	Thr	Glu	Asp	Cys	Gly	
305					310						315				320	
Asn	Arg	Gly	Pro	Ser	Leu	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Ser	Gly	Lys	Leu	Ile	
				325						330				335		
Thr	Glu	Trp	Cys	Cys	Arg	Ser	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Leu	Arg	Tyr	Arg	
			340					345					350			
Gly	Glu	Asp	Gly	Cys	Trp	Tyr	Gly	Met	Glu	Ile	Arg	Pro	Leu	Lys	Glu	
		355					360					365				
Lys	Glu	Glu	Asn	Leu	Val	Asn	Ser	Leu	Val	Thr	Ala					
370						375					380					

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動。※記號部分請勿填寫；惟已有申請案號者請填寫)

※申請案號：98133581

A61K 39/12 (2006.01)

※申請日：90-12-4

※IPC 分類：C12N 15/40 (2006.01)

原申請案號：由第 90129964 號申請案分割。

C12N 15/86 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

黃病毒NS1次單元疫苗 (二) / Flavivirus NS1 Subunit Vaccine

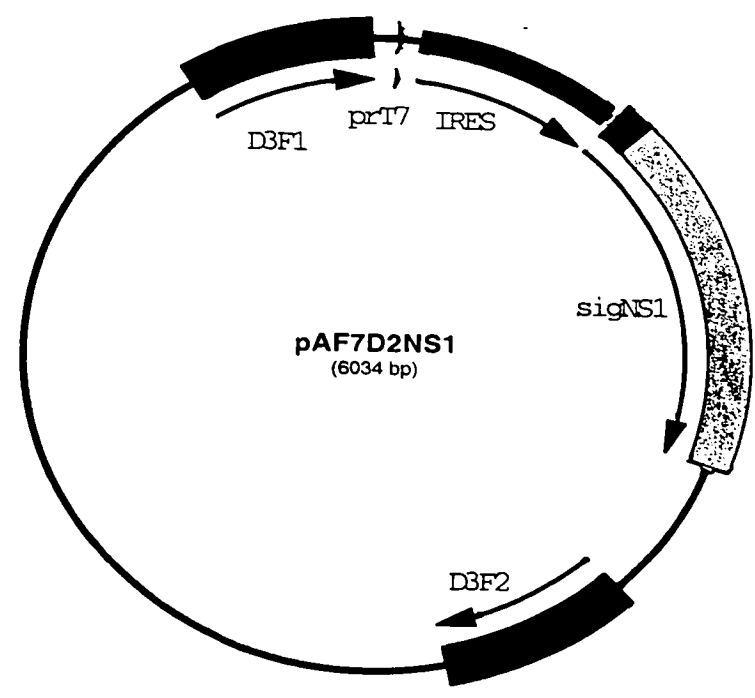
二、中文發明摘要：

本發明係有關黃病毒之NS1蛋白或其部分，特別是登革熱病毒。一黃病毒之NS1蛋白或部分可用於預防接種以對抗該黃病毒和許多其它黃病毒。本發明特別有關一種登革熱病毒亞型之NS1蛋白或其部分(特別是亞型2)，可用於預防接種以對抗來自所有亞型之登革熱病毒。本發明更有關包含一種編碼一黃病毒NS1或其部分之表現卡匣的DNA、包含該DNA之載體以及含有或表現一黃病毒NS1之疫苗。

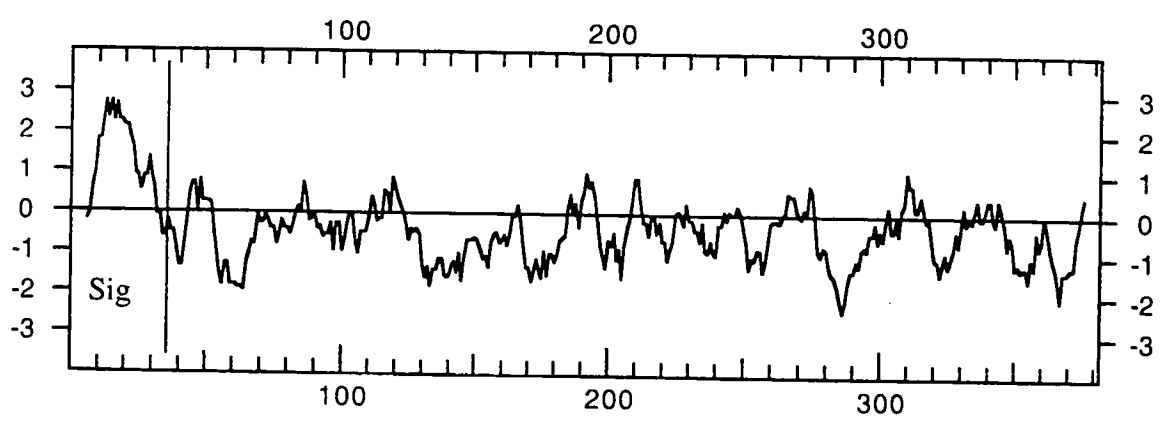
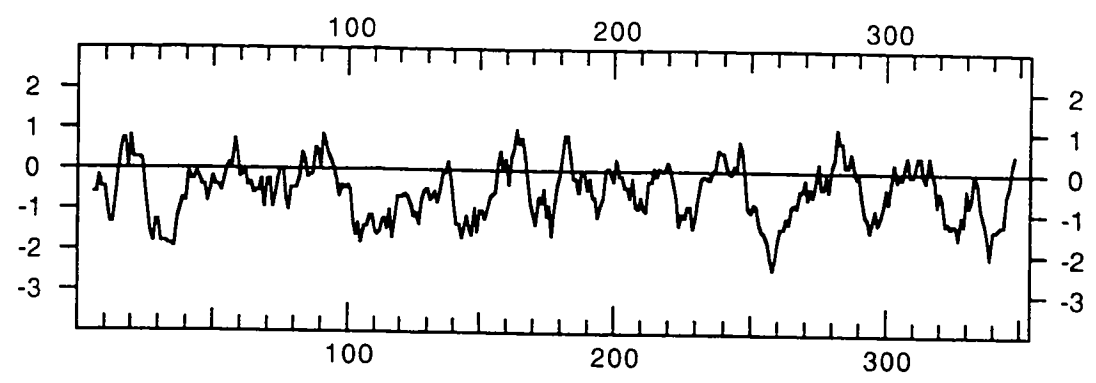
三、英文發明摘要：

The present invention relates to NS1 proteins or parts thereof of Flaviviruses, in particular of Dengue viruses. The NS1 protein or parts thereof of one Flavivirus is useful for vaccination against said Flavivirus and against several other Flaviviruses. The invention concerns in particular the NS1 protein or parts thereof of one Dengue virus subtype, in particular subtype 2, useful for vaccination against Dengue viruses from all subtypes. The invention further concerns DNA comprising an expression cassette coding for a Flavivirus NS1 or parts thereof, vectors comprising said DNA and vaccines containing or expressing a Flavivirus NS1.

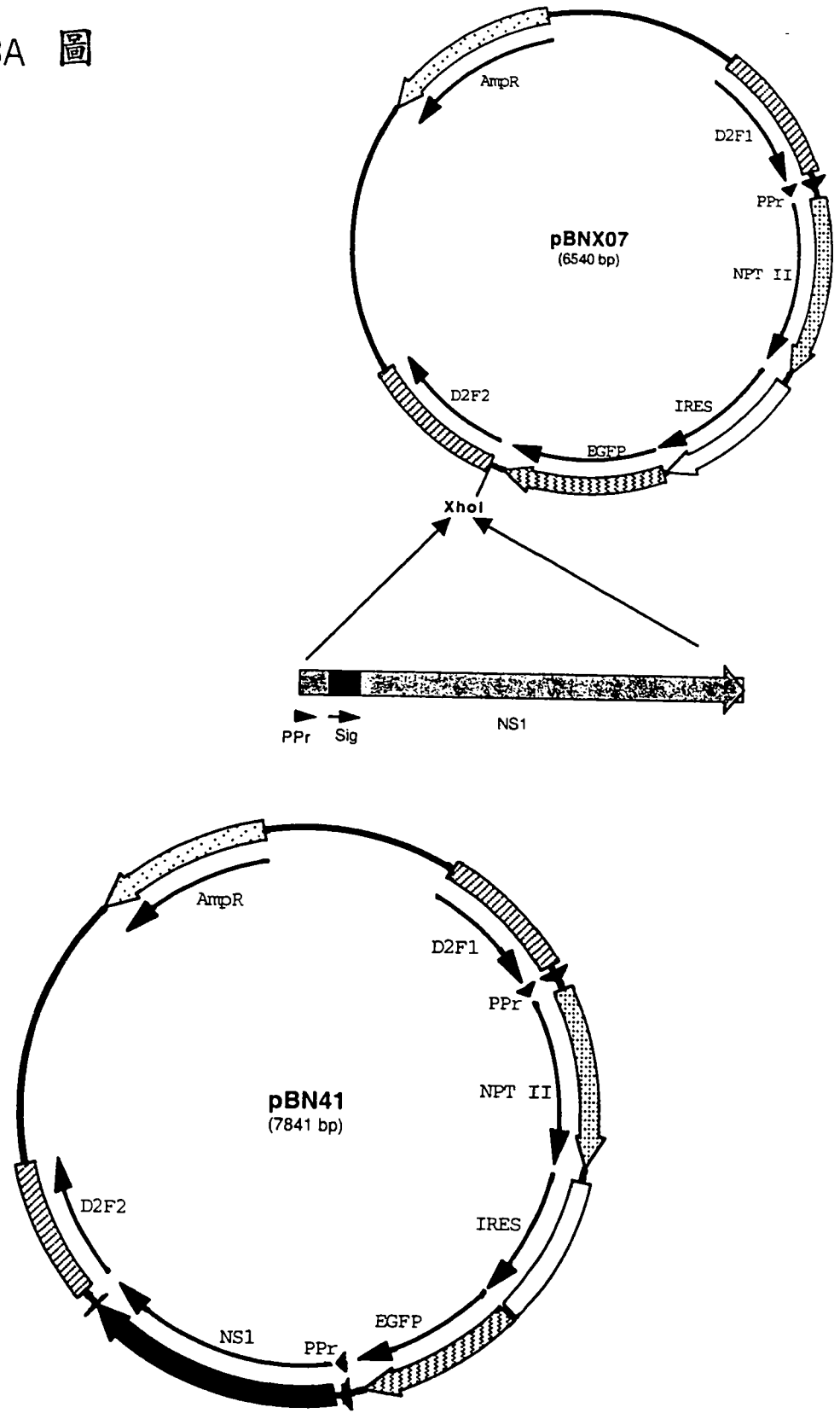
第 1B 圖



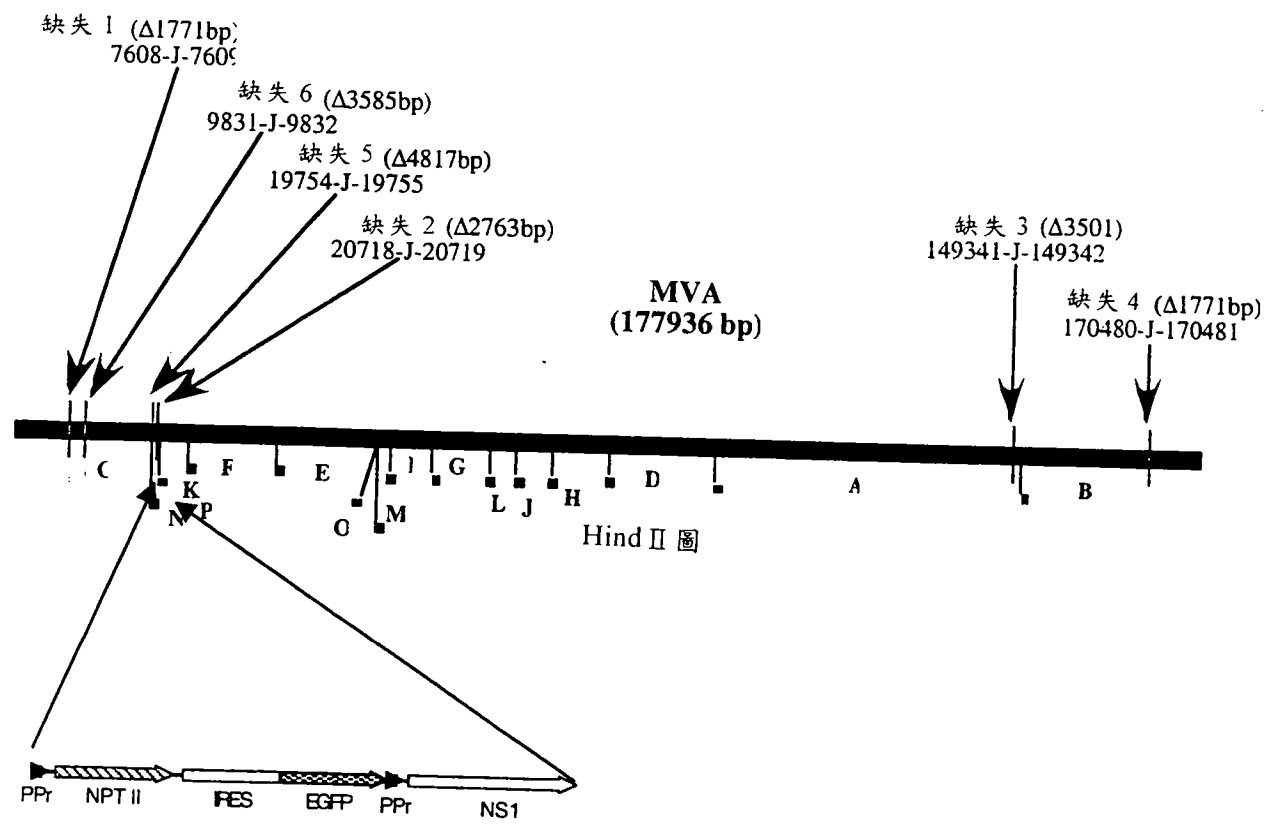
第 1D 圖



第 3A 圖



第 3B 圖



第 4 圖

未經煮沸的

經煮沸的

未經煮沸的

不含 2-ME 之 mBN07

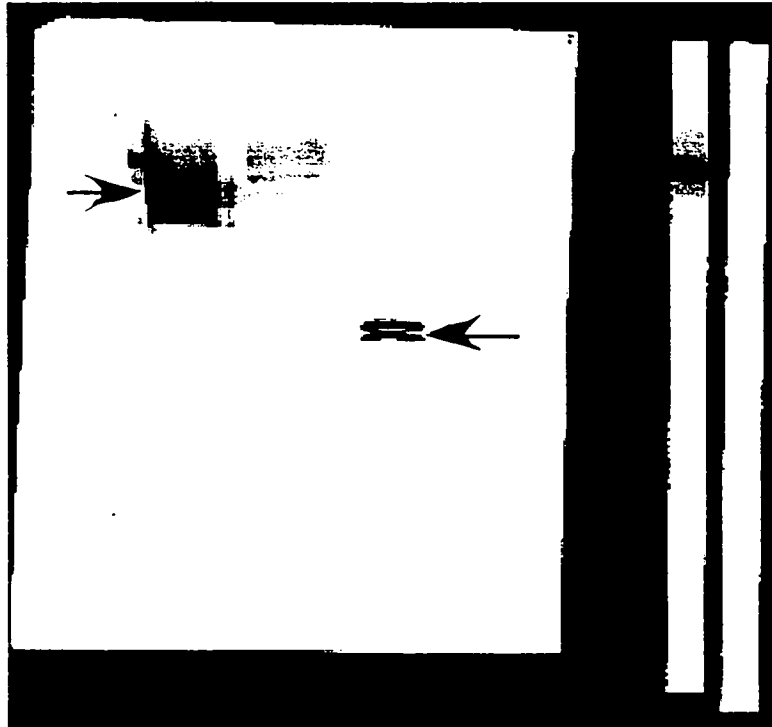
mBN07+2ME

不含 2-ME 之 mBN07

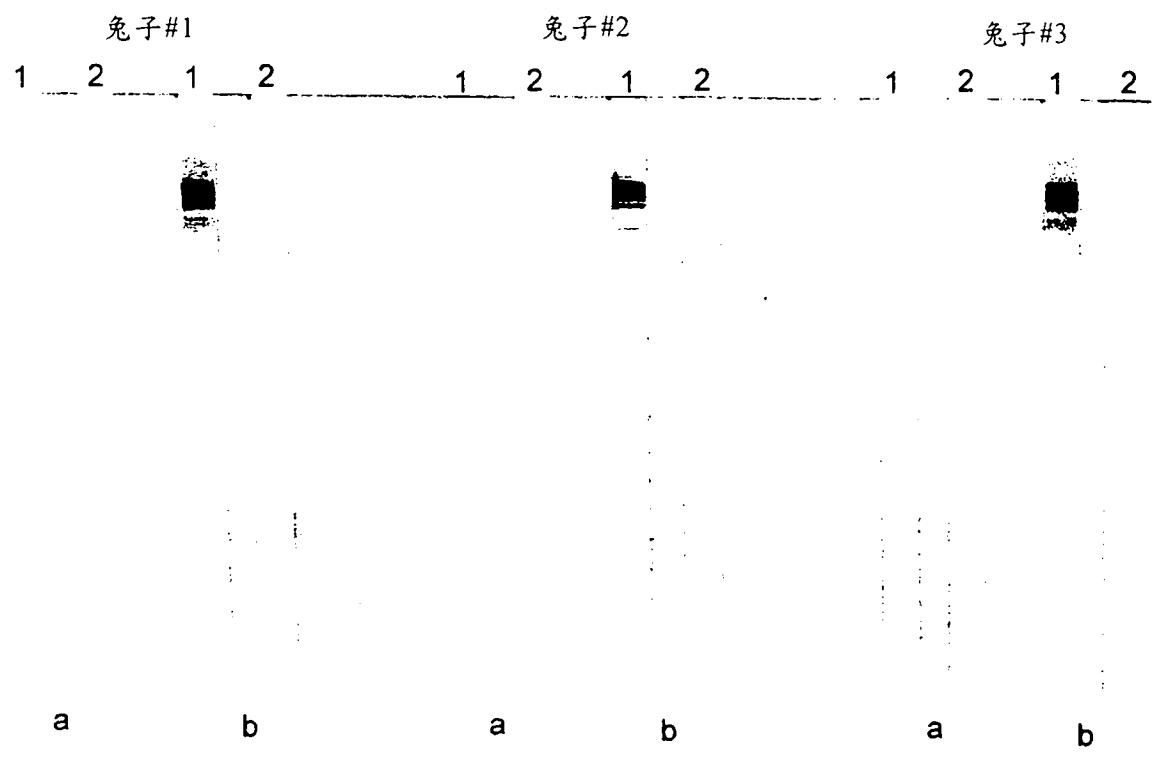
mBN07+2-ME

不含 2-ME 之 DEN2

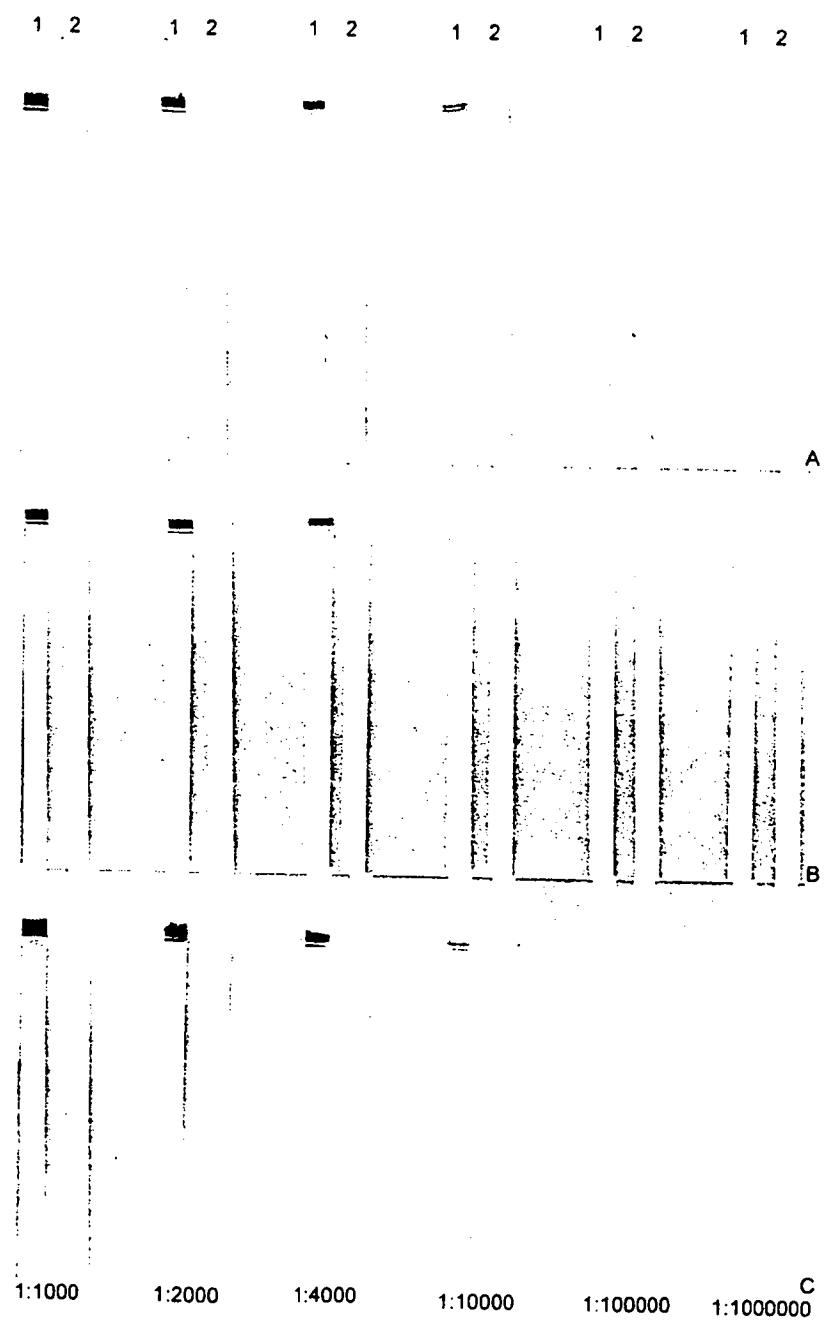
不含 2-ME 之控制組



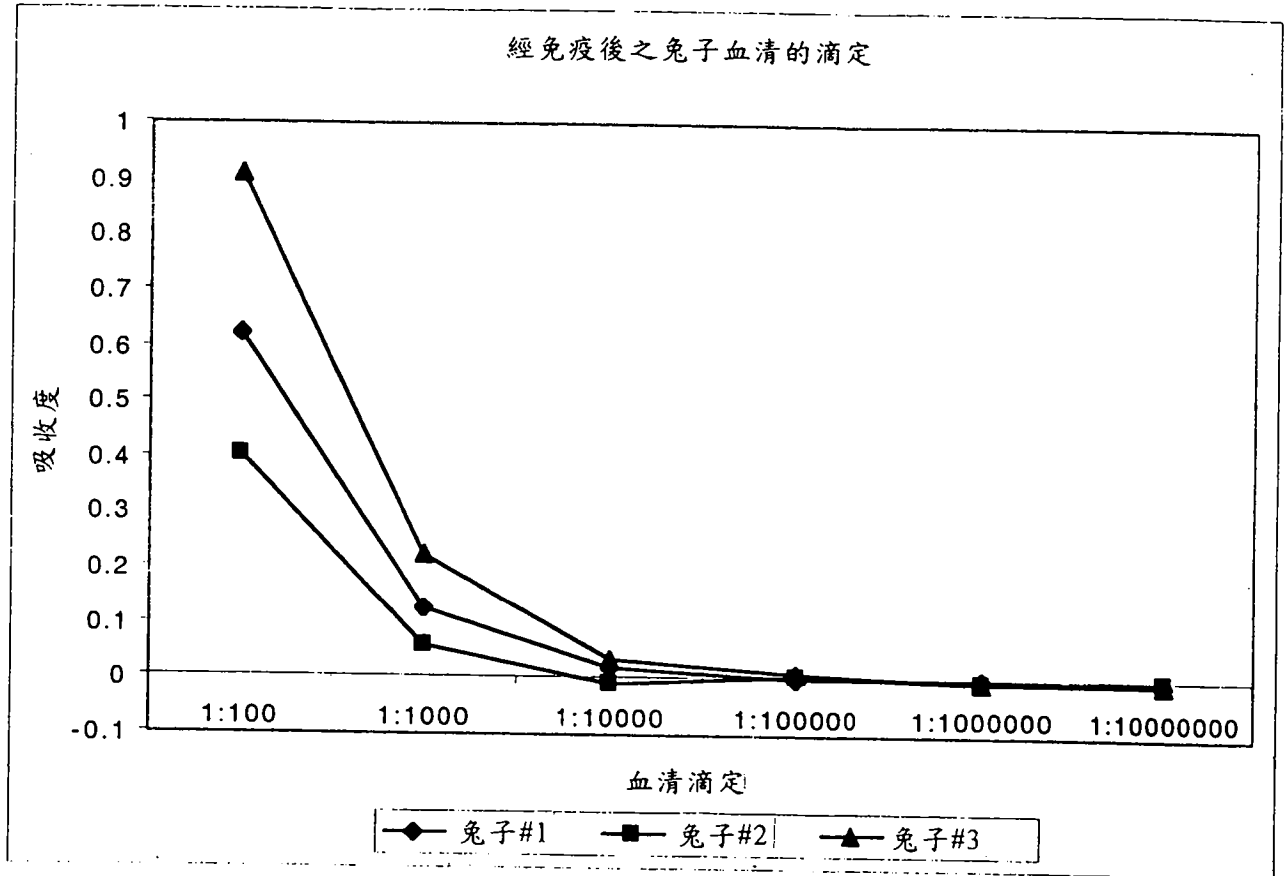
第 5 圖



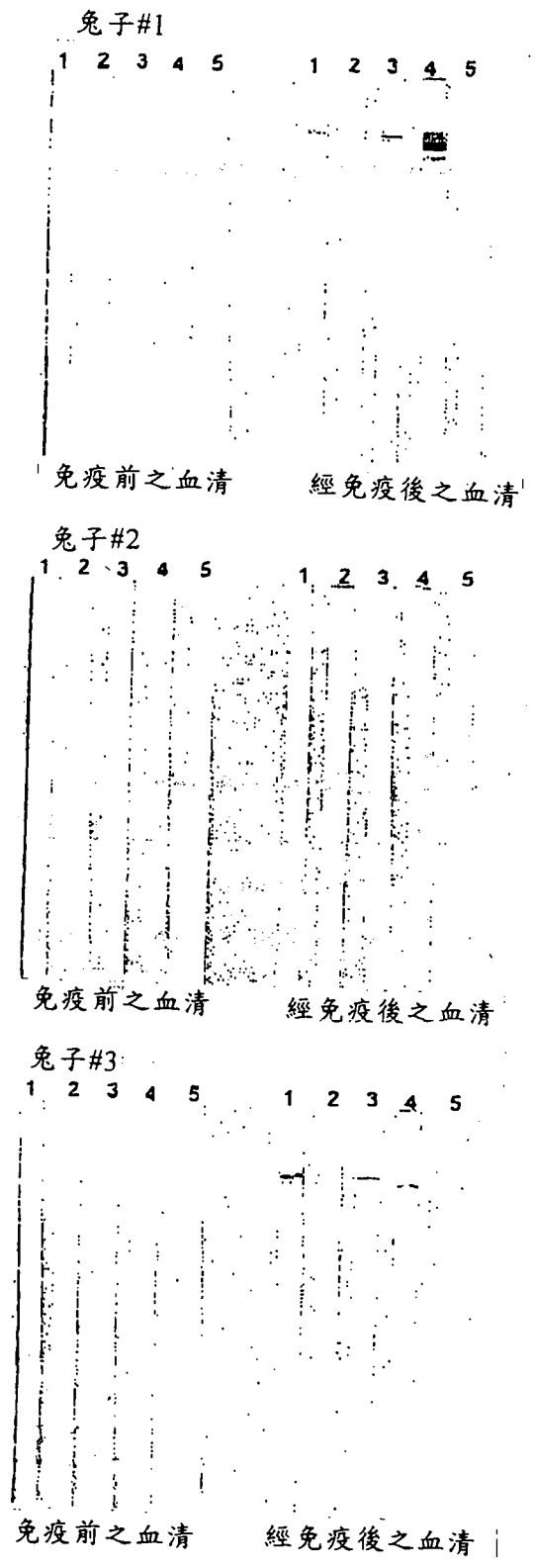
第 6 圖



第 7 圖



第 8 圖



四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：(無)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

第 098133581 號專利申請案 ~~申請專利範圍~~修正本 99 年 11 月

公告本

七、申請專利範圍

修正
99 年 11 月 05 日 補充

1. 一種用以於一動物治療或預防黃病毒感染之藥學組成物，該藥學組成物包含一經修飾的牛痘病毒安柯拉株 (MVA) 病毒載體，該 MVA 病毒載體帶有一表現卡匣，

5 其中該表現卡匣包含一轉錄調節要素和一核酸序列，該核酸序列編碼一登革病毒血清型 2 之完整的黃病毒 NS1 蛋白質或其一抗原性抗原決定位並且選擇性地編碼另一胜肽/蛋白質，且其中該另一胜肽/蛋白質不是一完整的黃病毒 E-蛋白質，且

10 其中該黃病毒感染係由選自於登革病毒血清型 1、登革病毒血清型 3、登革病毒血清型 4、日本腦炎病毒，以及西尼羅河病毒之黃病毒所致之感染。

15 2. 如申請專利範圍第 1 項之藥學組成物，其中該組成物係用於治療或預防該動物以額外地對抗一種由衍生出該核酸序列、該 NS1 蛋白質或其抗原性抗原決定位的登革病毒血清型 2 所致之黃病毒感染。

3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之藥學組成物，其中該黃病毒感染係由一種經蚊子傳播之黃病毒所致。

20 4. 如申請專利範圍第 3 項之藥學組成物，其中該經蚊子傳播之黃病毒係為一登革病毒。

5. 如申請專利範圍第 4 項之藥學組成物，其中該經蚊子傳播之黃病毒係為登革病毒血清型 2。

6. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之藥學組成物，其中該編碼黃病毒之 NS1 蛋白質或其抗原性抗原決定位之核酸序列的

前面係有一個ATG密碼子和一編碼糖化訊號序列之序列，以及其中該編碼序列係由一轉譯終止密碼子所終止。

- 5 7. 如申請專利範圍第1或2項之藥學組成物，其中該轉錄調節要素係為一痘病毒啟動子。
8. 如申請專利範圍第1或2項之藥學組成物，其中該MVA病毒載體被冷凍-乾燥。
9. 如申請專利範圍第1或2項之藥學組成物，其中該組成物係供應用於初次接種或追加接種，或者初次接種及追加
10 接種兩者。
10. 如申請專利範圍第1或2項之藥學組成物，其中該組成物係被配製作為一套組，該套組包含該MVA病毒載體，其位在一供用於第一次接種(初次接種)的第一小瓶/容器中且位在一供用於第二次接種(追加接種)的第二小瓶/
15 容器中。
11. 如申請專利範圍第1或2項之藥學組成物，其中該表現卡匣編碼一蛋白質，該蛋白質包含有如序列編號：10之胺
20 基酸序列。
12. 如申請專利範圍第1或2項之藥學組成物，其中該MVA病毒載體特徵在於能在雞胚胎纖維母細胞(CEF)與幼倉鼠腎細胞株BHK中複製，但在人類角質細胞細胞株HaCaT中無複製能力。
13. 一種包含一表現卡匣之MVA病毒載體於製備一用以於一動物治療或預防黃病毒感染之藥劑或疫苗的用途，

其中該表現卡匣包含有一轉錄調節要素和一核酸序列，該核酸序列編碼一登革病毒血清型2之完整的黃病毒NS1蛋白質或其一抗原性抗原決定位，並且選擇性地編碼另一胜肽/蛋白質，且其中該另一胜肽/蛋白質不是一完整的黃病毒E-蛋白質，

其中該黃病毒感染係由選自於登革病毒血清型1、登革病毒血清型3、登革病毒血清型4、日本腦炎病毒，以及西尼羅河病毒之黃病毒所致之感染。

14. 如申請專利範圍第13項之用途，其中該藥劑或疫苗係用於治療或預防該動物以額外地對抗一種由衍生出該核酸序列、該NS1蛋白質或其抗原性抗原決定位的登革病毒血清型2所致之黃病毒感染。
15. 如申請專利範圍第13或14項之用途，其中該黃病毒感染係由一種經蚊子傳播之黃病毒所致。
16. 如申請專利範圍第15項之用途，其中該經蚊子傳播之黃病毒係為一登革病毒。
17. 如申請專利範圍第16項之用途，其中該經蚊子傳播之黃病毒係為登革病毒血清型2。
18. 如申請專利範圍第13或14項之用途，其中該編碼黃病毒之NS1蛋白質或其抗原性抗原決定位之序列的前面有一個ATG密碼子和一編碼糖化訊號序列之序列，以及其中該編碼序列係由一轉譯終止密碼子所終止。
19. 如申請專利範圍第13或14項之用途，其中該轉錄調節要素係為一痘病毒啟動子。

20. 如申請專利範圍第13或14項之用途，其中該MVA病毒載體被冷凍-乾燥。
21. 如申請專利範圍第13或14項之用途，其中該藥劑或疫苗係供用於初次接種或追加接種，或者初次接種及追加接種兩者。
- 5
22. 如申請專利範圍第13或14項之用途，其中該藥劑或疫苗係被配製作為一套組，該套組包含該MVA病毒載體，其係位在一供應用於第一次接種(初次接種)的第一小瓶/容器中且位在一供應用於第二次接種(追加接種)的第二小瓶/容器。
- 10
23. 如申請專利範圍第13或14項之用途，其中該表現卡匣編碼一蛋白質，該蛋白質包含有如序列編號：10之胺基酸序列。
24. 如申請專利範圍第13或14項之用途，其中該MVA病毒載體特徵在於能在雞胚胎纖維母細胞(CEF)與幼倉鼠腎細胞株BHK中複製，但在人類角質細胞細胞株HaCaT中無複製能力。
- 15