

登革熱疫苗研發進展

鍾瑋*、陳奕安、江正榮

摘要

隨著地球村時代的來臨，登革病毒正藉由進入疫區的旅客往返迅速地擴展，使登革熱疫情不再只侷限部分地區，而演變為受全球重視的公衛議題。這情況使得人們更容易被不同血清型的登革病毒交叉感染，大大提升出血性登革熱的發生，導致受感染者死亡率提升或者出現嚴重後遺症。可惜的是，目前並無針對登革病毒之特效藥，這使得疫情更受到國際關注。加上登革病毒可藉由病媒蚊保毒，讓消除病毒更顯得不易，在這樣的情況下登革熱疫苗的開發更顯得迫切與重要。本文簡介目前已進入臨床階段之登革熱疫苗其研發方向與阻礙，並就其發展問題供大家討論。

關鍵字：登革熱；四價疫苗；疫苗介紹

前言

登革熱 (Dengue fever, DF) 是經由登革病毒 (Dengue virus, DENV) 所引起的一種急性傳染病。最早於 1779 年埃及開羅、印尼雅加達和美國費城發現，當時根據病毒所引起的臨床特徵命名，患者普遍會出現高熱，肌肉、骨髓及關節疼痛等症狀，所以臺灣俗稱斷骨熱或天狗熱；最後於 1869 年由英國倫敦皇家內科學會正式命名為登革熱；1943 年由日本科學家首先分離出登革病毒 [1]。

登革病毒屬於黃病毒科 (Flaviviridae)，黃病毒屬 (flavivirus)。病毒顆粒形狀為球形，直徑約 50nm。遺傳物質為單股正鏈 RNA((+)ssRNA)，長約 11kb，可轉譯出 3 個結構蛋白 (capsid protein C, membrane protein M, envelope protein E) 和 7 個非結構蛋白 (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5)。根據抗原性的不同，登革病毒又可以

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心 投稿日期：2014 年 4 月 8 日

通訊作者：鍾瑋*

接受日期：2014 年 5 月 9 日

E-mail：chung-wei@cdc.gov.tw

DOI：10.6524/EB.20150428.31(8).001

分為四種血清型，分別是 1、2、3、4 等四型 [2]；2013 年美國德克薩斯大學醫學分校的 Nikos Vasilakis 博士依據所採集之病患檢體提出有第 5 型的存在 [3]。一般來說如果患者感染到其中一型的登革病毒，就會對其終生免疫，但是對其他型別的登革病毒僅有 2-9 個月的短暫保護作用，過了這段期間之後仍然可能會感染其他的型別 [2]。

登革熱主要流行於熱帶及亞熱帶地區，特別是在東南亞地區容易出現地方性的流行，但自 1960 年代開始，交通運輸工具的進步，加上人口越來越稠密，使得病毒的傳播更為快速，直到 1990 年登革熱迅速擴散成為全球公衛議題，由 1991 年及 2013 年各國回報世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 資料(圖一)，登革熱在北半球 1 月均溫 10°C 及南半球 7 月均溫 10°C 範圍內的區域急速擴增，而染病人數在這 20 年內也激增 10 倍 (圖二)，這讓 WHO 將之列為重點傳染病之一。臺灣處於亞熱帶地區，夏季氣候濕熱，正是適合病媒蚊孳生的溫床，如果環境衛生稍不注意就容易造成地方性的流行。在臺灣光復前曾發生 3 次(1915-1916、1931 和 1942-1943 年)全島性登革熱大流行，臺灣光復後數十年內未再有登革熱流行。直到 1981 年在屏東縣琉球鄉爆發第 2 型登革熱流行；1987 年 10 月高屏區發生登革熱第 1 型流行，當時有 4,916 個確定病例；2002 年亦有 5,388 確診病例，顯示南部地區皆有不定期流行；而 1995 年開始於臺中、臺北等地出現病例 [4]。

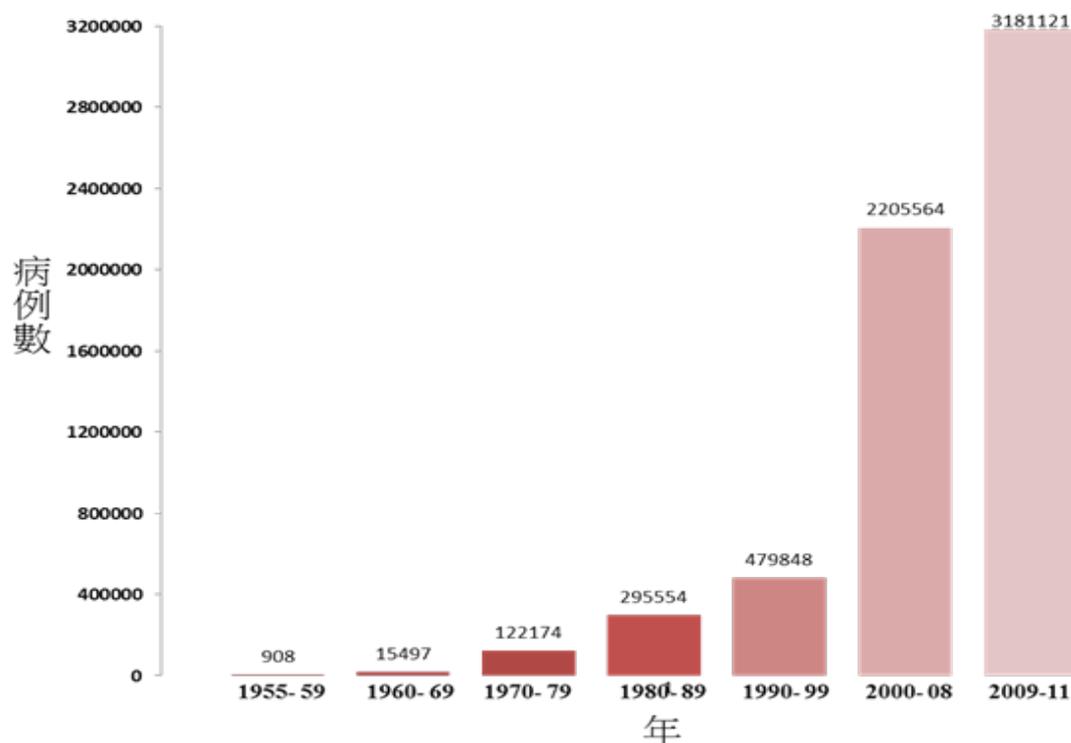
全球登革熱分布區域-1991年



全球登革熱分布區域-2013年



圖一、資料來源 WHO：於 1991 及 2013 年調查全球登革熱發生區域



圖二、資料來源 WHO：統計 1955 到 2011 年全球登革熱病例發生數

登革熱流行病學

登革熱主要的傳播媒介是埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 與白線斑蚊 (*Aedes albopictus*)。科學家可由捕獲的白線斑蚊與埃及斑蚊身上分離出登革病毒顆粒，因而推測此二種斑蚊應該是病毒的儲存宿主。當病媒蚊與具有傳染性的病患體液接觸後病毒會進入蚊體。自然宿主除人外，還包括部分靈長類動物（黑猩猩、長臂猿、獼猴） [2]。

依據 WHO 於 1980 年所發表之定義，典型登革熱的潛伏期一般為 5 到 8 天左右，發病的初期症狀可能會有高燒、畏寒、嚴重頭痛、肌肉酸痛、眼球後方疼痛、關節疼痛及皮膚出紅疹等。出血性登革熱(dengue hemorrhagic fever, DHF)是骨、關節痛不明顯反而出血傾向嚴重，包含嘔血、咯血、血尿、便血等，並經常伴隨兩個以上器官大量出血，出血量大於 100ml，血小板數小於 $100 \times 10^9/L$ ，若無及時搶救則會惡化成登革休克症候群(dengue shock syndrome, DSS)，血壓會快速下降、昏睡、昏迷等現象出現，死亡率可達 10~50% [2]。

登革熱疫苗自 1940 年代便展開研究，第一個成功的疫苗為單價(DENV-1)不活化鼠腦疫苗。1970 年開始以組織培養方式馴化病毒 [5]，但在多價疫苗發展上一直無法有所突破，直到近幾年運用重組 DNA 技術 (Recombinant DNA approaches) 進行病毒的改造或基因置換才讓登革熱疫苗研製有了突破性進展。

登革熱疫苗臨床進展

儘管目前尚未有登革熱疫苗上市，多種候選疫苗已經在開發中，包含了活性減毒疫苗(live attenuated vaccine)、嵌合活性減毒疫苗(chimeric live attenuated vaccine)、不活化疫苗(Inactivated purified vaccine)、重組蛋白疫苗(Recombinant protein vaccine)、DNA 疫苗(DNA vaccine)及次單位疫苗(subunit vaccine)等。無論如何，最主要的考量還是在於疫苗是否可以引起足夠的抗體同時平衡對抗四種不同血清型的登革病毒。活毒疫苗首先進入臨床試驗，但遭遇到困難，例如對四種血清型病毒產生的免疫反應不相等或互相干擾，接著基於較高安全性的基因工程疫苗也逐步加入研發行列。由於疫苗開發技術日新月異，許多較新穎的登革熱疫苗發表，若無法順利進入到臨床實驗階段，則表示其可行性較低，因此本文將只針對已進入臨床實驗階段的疫苗進行介紹與說明(表一) [6、7]，並補充其他較新穎之技術。

表一、已進入臨床試驗之登革熱疫苗名稱、開發單位、臨床試驗階段與疫苗型式[6、7]。

Dengue Vaccine candidate	Organization	Stage of development	Production platform
TetraVax-DV	Johns Hopkins University/NIH/Instituto Butantan	Phase 2 clinical testing	Live attenuated
TDEN	WRAIR/GSK	Phase 2 clinical testing	Live attenuated
DENVax	CDC/Inviragen	Phase 2 clinical testing	Chimeric live attenuated
CYD-TDV	Sanofi Pasteur	Phase 3 clinical testing	Chimeric live attenuated
TDEN-PIV	WRAIR/GSK	Phase 2 clinical testing	Inactivated purified vaccine
DENV-1 PIV	WRAIR	Phase 1 clinical testing	Inactivated purified vaccine
HBV-001 D1	Merck & Co.	Phase 1 clinical testing	Recombinant protein
TVDV	NMRC/Vical	Phase 1 clinical testing	DNA

一、活性減毒疫苗 (Live attenuated vaccine)

活性減毒疫苗為對細胞毒性較弱的活病毒，可以成功地對病毒的結構或非結構性蛋白質引發主動免疫反應，但病毒複製的能力必須要被嚴格限制以避免引發病理反應，不幸的是，利用類似技術的登革熱活性減毒疫苗遇到的困難相對更多[8]。

臨床前試驗研究初期，主要是使用來自狗的腎臟初代培養細胞，經由一系列繼代培養產製之DENV活性減毒疫苗，接種於恆河猴並測試病毒血症與免疫反應。曼谷Mahidol大學及美國Walter Reed Army研究院(WRAIR)的研究團隊[4]，分別藉由馴化初代細胞培養出不同血清型的DENV，並發展活性減毒DENV候選疫苗。Mahidol團隊使用四價登革熱疫苗在美國及泰國進行臨床一、二期實驗，受試者為成人與小孩(phase 1:6 - 9歲, N = 7 和 12 - 15個月, N = 34, phase 2:12個月到50歲, N = 300)。但非所有的受試者對於四種DENV血清型都有效且免疫反應都不近相等(對於DENV-2反應較低、其次為DENV-4、DENV-1和3反應較高)。此外部分受試者無法產生足夠的血清免疫反應(Immunogenicity)，故無法進入第三期臨床試驗。雖然此類活性減毒疫苗在臨床二期亦顯示可以提高安全及免疫原性，但保護效價仍需要更進一步的評估[8-9]。

目前新的趨勢為使用點突變技術，針對病毒基因修改導致病毒毒性減弱，第一個被證實有效減弱登革病毒的疫苗為DEN4 Δ 30，主要是刪除DENV-4基因組中3' 未轉錄區域的30個核苷酸(Δ 30)。美國衛生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 與約翰霍普金斯大學 (Johns Hopkins University)合作研究出之四價活性減毒疫苗 (TetraVax-DV)，即為DENV1~4的四株減毒突變病毒株混合製成，便是屬於此型。然而當DENV-1及DENV-4使用此方式策略奏效時，DENV-2及DENV-3卻無法達到相同的效果。因此另一種替代DENV-2與DENV-3的嵌合疫苗策略因應而生，主要以DEN4 Δ 30為骨架建構DENV-2及DENV-3(稱為DEN2/4 Δ 30及DEN3/4 Δ 30)，這些單價的DENV活性減毒疫苗株分別為DEN1 Δ 30、DEN2/4 Δ 30、DEN3/4 Δ 30、DEN3 Δ 30/31和DEN4 Δ 30。四價疫苗在臨床試驗一期中也已證實不會引發受試者產生病毒血症(viremic)，在1,000 PFU的劑量下可對DENV-1、2、3產生均衡的免疫反應，現正於巴西進行第二期臨床試驗[8、10]。

二、嵌合活性減毒疫苗 (Chimeric live attenuated vaccine)

目前最先進的產品為法國Sanofi Pasteur公司製造的ChimeriVax四價登革熱疫苗(CYD-TDV)，主要是使用已經取得藥證的黃熱病17D (YFV-17D)疫苗為骨幹，使YFV-17D分別帶有四種DENV的prM及E基因。臨床前試驗已證實基因型和表現型穩定，不會干擾DENV抗原呈現，且神經毒性比YFV 17D疫苗更少。另外在猴子實驗中成功產生免疫原性，並能夠引起TH1細胞發生細胞免疫反應[11]。四價CVD疫苗的一期臨床試驗顯示高安全及相對較低的病毒血症，而在二期臨床試驗(phase II b, 7-14歲, vaccine group:2452, placebo group:1221)中，經接種疫苗後受試者血清中的抗體效價皆有上升。整體而言對DENV-1、3和4可提供61.2%、81.9%和90%的保護效果，然而對DENV-2只有3.5%；其中有134位受試孩童在試驗期間感染登革病毒，以此來分析得到疫苗保護效果有30%[12]。

2013年已進入第三期臨床試驗，於泰國、馬來西亞及中南美洲等登革熱流行疫區共招募31,000名兒童與成人試驗者[11]，其中在馬來西亞250名2-11歲的受試孩童的結果顯示，注射CYD-TDV後可以對四種型別的DENV產生中和效價，最低的為4.8倍 (DENV-1)、最高為8.1倍 (DENV-3) [13]。

美國疾病管制與預防中心也將其所開發之嵌合活性減毒疫苗 (DENVax) 授權Inviragen公司，此疫苗株以減毒的DENV-2型作為骨幹 (DEN-2 PDK-53)，分別把其他3種DENV之套膜(prM)及封套(E)基因置換於該病毒中，獲得DENVax疫苗株，然後利用狗的腎臟初代培養細胞進行繼代。美國、哥倫比亞、新加坡及泰國等地已完成臨床一期與二期 [14]。此外中國北京Li等科學家開發之ChinDENV嵌合疫苗，以日本腦炎病毒 (Japanese Encephalitis Virus, JEV) 活毒疫苗SA14-14-2為骨架嵌合DEVN2封套(E)基因發展而來，於小鼠及非人靈長類動物之臨床前試驗上均獲得抵抗DENV的效果，另外也能抵抗JEV之侵襲 [15]。

三、不活化疫苗 (Inactivated purified vaccine)

不活化疫苗的優點，第一是安全，病毒沒有機會活化重新複製；第二是較簡單，對於四價疫苗來說可以較容易引起四種血清型的免疫反應，然而仍有技術性問題待克服，例如缺乏NS蛋白的免疫原性以及需要佐劑強化免疫反應等。經純化的DENV-2不活化疫苗混和佐劑，接種於小鼠及恆河猴動物實驗中，證實能引起免疫原性及保護效用，其產生大量的中和抗體也可以保護並對抗病毒血症[14]。

目前葛蘭素史克(GlaxoSmith-Kline, GSK)開發的不活化疫苗(TDEN-PIV)最受到重視，其疫苗株以VERO細胞作為宿主進行增殖，不活化後加入GSK開發之AS03B或AS01E佐劑，在美國及波多黎各兩地已完成臨床一期試驗，此刻正進行臨床二期[14]。

四、重組蛋白疫苗及 DNA 疫苗 (Recombinant protein and DNA vaccine)

近年來由於分子生物學的蓬勃發展，重組蛋白、DNA及次單位疫苗紛紛加入登革熱疫苗的研發。經由酵母菌或昆蟲細胞表現之重組E蛋白，經動物實驗評估也具有一定的免疫效果及保護效價[15]。默克公司(Merck & Co)從Hawaii Biotech承接HBV-001 D1疫苗之技術，該抗原的生成是利用果蠅細胞作為宿主，以重組方式得到經過短截的四種DENV封套E蛋白，此部分刪減的E蛋白 (Truncated E proteins, DEN-8E)添加鋁鹽為佐劑，於美國Missouri進行小型的一期臨床試驗[7、16]。

DENV的E蛋白中第三區塊(EDIII)為受器結合位，可以引起中和抗體產生。在小鼠及非人類靈長類的動物實驗中，重組E蛋白EDIII被證實可以引起中和抗體產生抵抗DENV的侵襲。為了發展四價疫苗，因而開發了cEDIII重組蛋白，替換四種DENV的E蛋白胺基酸同源序列(包含DENV-1~DENV-4 EDIII的序列)，小鼠實驗顯示cEDIII可以有效的引起抗體產生，並能交叉中和DENV-1~4，

在非人靈長類動物上也可以抵抗DENV-2 [7]。脂蛋白接合EDIII(recombinant lipo-EDIII)為重組蛋白EDIII接上一個脂蛋白訊號分子，此重組蛋白也可以有效引起抗體產生，甚至比單純的EDIII加上鋁鹽佐劑效果更好。混合此四價疫苗與鋁鹽佐劑所產生出來的登革熱疫苗lipocEDIII，也被證實可以中和四種血清型的DENV及引發免疫反應的記憶性，然而最近的研究指出，由EDIII所引發的抗體無法在人體內持續且大量表現，*in vitro*實驗也顯示此抗體只具有部分中和病毒的功能，因此以EDIII為基礎的疫苗還需進一步探索與測試[17]。

另外在美國海軍醫學研究院(Naval Medical Research Institute, NMRI)也開發出DENV的DNA疫苗，該疫苗的抗原設計是以套膜prM及封套E基因的DNA序列為主體的環狀DNA抗原，該DNA疫苗也已完成臨床一期試驗，試驗中分為低劑量(1 mg, n=10)與高劑量(5 mg, n=12)兩個組別，受試人員除局部紅腫、疼痛外無過敏反應。在注射完三劑後四成的受試者能夠產生對DENV的專一性IgM與IgG，其中又有一半的人可以引起T-Cell產生IFN- γ 。然而，可惜的是與活性減毒疫苗相比，DNA疫苗幾何平均抗體效價(GMT, geometric mean titer)偏低，最高測得的中和效價為1:135 (DENV-1, 高劑量組) [18-19]。現已轉由與懷科公司(Vical)合作，使用該公司專為DNA抗原所設計的佐劑(Vaxfectin®)，依據非人靈長類動物臨床前試驗結果所示，含有佐劑之疫苗其保護能力較高，因此重新以含佐劑DNA疫苗進行臨床一期試驗[7]。

臺灣同樣也是登革熱流行的地區，也有許多單位投入登革熱疫苗的研究行列，其中較為有成果的屬國家衛生研究院疫苗研發中心團隊所研發之重組次單位蛋白疫苗[20]；國光生技也向美國疾病管制與預防中心取得登革熱DNA疫苗開發技術授權。可惜的是，均尚未進行臨床試驗。

五、其他

除了上述已經進入臨床試驗的疫苗種類外，各國研究學者仍繼續尋找新式登革熱疫苗發展的可行性，如 Jaiswal S.等人利用腺病毒為載體表現登革病毒的套膜prM及封套E基因；White L.J.的研究團隊則是以Non-propagating Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles當作套膜prM及封套E的表現平臺。運用此兩種病毒載體之目的，均是希望該病毒能引起較高體液免疫與細胞免疫的特性，可用來提升登革病毒抗原的免疫原性 (immunogenicity)並兼具佐劑用途，雖然在動物實驗上有不錯效果，但目前只局限於單價的登革熱疫苗[16-21]。

未來展望

隨著氣候變遷與因為人口擴增造成棲地擴大，病媒蚊的分布也越來越廣，加上國際交流與交通的便利性，使得人類成為登革病毒的重要傳播宿主。根據WHO統計2012年全球因登革病毒感染死亡的人數達2萬1千人，若此狀況不變，未來全球

每年受感染人數將可達5千萬人~5億人[1]。目前對於登革病毒感染患者在治療上並無特效藥，仍以支持性療法為主，依據WHO資料，亞洲國家平均在每一個登革熱病患所花費成本為US\$ 357，在美洲則為US\$ 793[21]。如果疫情無法趨緩，於登革熱流行區域包括亞洲、中南美洲、非洲及澳洲北部，以及部分太平洋地區島嶼等國，會使得社會成本大量增加及造成經濟與國民健康上的負擔。

依據Mahoney R.T.等人以生產活性減毒登革熱疫苗所耗費之成本為例，在生產6,000萬劑情況下可使每劑成本壓低到0.19~0.69美元（表二）。而2012年巴西因登革熱疫情支出成本高達4億7千萬美金，以總人口數8成2接種，再依最新臨床數據施打後約略有3成的人有效，如此可省下1億3千萬美金的醫療支出成本[21]。因此，登革熱疫苗的研發上市是一個相當迫切的議題，除了具有龐大的商機外，也能減少因登革熱帶來的醫療資源與社會成本耗損。

雖然法國Sanofi Pasteur公司製造的ChimeriVax (CYD-TDV)四價登革熱疫苗是近年來最有可能通過臨床三期而上市、且最令人期待的首支登革熱疫苗，但依據WHO專家會議對於該疫苗臨床二期(phase II b)結果之評估，認為仍未有足夠的數據顯示能夠完全抵禦四型DENV的感染，應慎重解釋該疫苗之防護效力[22]。不管是正進行臨床試驗的疫苗或是還在臨床前試驗的疫苗，其發展仍需克服下列幾點障礙：

(1) 須對四種登革病毒血清型都能具有保護效力，否則仍可能發生施打疫苗後仍感染其他型別的登革病毒，甚至造成誘發出血性登革熱症狀的疑慮；(2) 疫苗提供的防護力要能持久；(3) 需完整了解人類對於登革病毒免疫及發病機制，進一步優化疫苗研發。現在大家正期待即將上市的登革熱疫苗具有良好的安全性和免疫原性，並能於臺灣5~12月登革熱流行期時保護國人健康。但是，在尚未有登革熱疫苗問世前，仍須不斷呼籲民眾應盡量避免被蚊蟲叮咬，積極清除積水容器，減少病媒蚊孳生方為遠離登革熱之根本。

表二、以活性減毒登革熱疫苗為例：每年生產6,000萬劑時，1人份劑量與10人份劑量之成本估算表[21]。

生產成本	劑型	
	1 人份劑量	10 人份劑量
材 料 費 用	20.786	2.91
人 事 費 用	5.092	2.55
廠 房 管 理 費 用	11.28	2.34
總 成 本	37.158	7.79
折 舊	4.07	4.07
總 支 出	41.67	11.86
每劑價格(US\$)	0.69	0.19

參考文獻

1. Kimura R and Hotta S 1944. Studies on dengue fever (VI). On the inoculation of dengue virus to mice (in Japanese). *Nippon Igaku* 3380, 629-33.
2. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. World Health Organization, Avenue Appia 20, 1211 Geneva 27, Switzerland, 2009: 3-17.
3. Hanley KA, Monath TP, Weaver SC, et al. Fever versus fever: the role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. *Infect Genet Evol.* 2013;19:292-311.
4. 洪敏南、王昱竺、黃樹樺、林立人。2012。2011 年台灣登革死亡病例報告。衛生署疾病管制局。疫情報導 28(20); 327-334。
5. Robert E. Dengue vaccines approach the finish line. *Clin Infect Dis.* 2007 ;15:56-60.
6. Thomas SJ, Eckels KH, Carletti I, et al. A phase II, randomized, safety and immunogenicity study of a re-derived, live-attenuated dengue virus vaccine in healthy adults. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;88(1):73-88.
7. Li XF, Deng YQ, Yang HQ, et al. chimeric dengue virus vaccine using Japanese encephalitis virus vaccine strain SA14-14-2 as backbone is immunogenic and protective against either parental virus in mice and nonhuman primates. *J Virol.* 2013;87(24): 13694-705.
8. Rothman A L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat. Rev. Immunol.* 2011;11: 532-43.
9. Lindow JC, Durbin AP, Whitehead SS, et al. Vaccination of volunteers with low-dose, live-attenuated, dengue viruses leads to serotype-specific immunologic and virologic profiles. *Vaccine.* 2013 ; 31(33):3347-52.
10. Beaumier C M., Gillespie P M., Hotez P J., et al . New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. *Transl. Res.* 2013;162(3): 144-55.
11. Hss AS, Koh MT, Tan KK. Safety and immunogenicity of a tetravalent dengue vaccine in healthy children aged 2-11 years in Malaysia: a randomized, placebo-controlled, Phase III study. *Vaccine.* 2013;31(49):5814-21.
12. Sabchareon A1, Wallace D, Sirivichayakul C, et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. 2012: *Lancet.* 2012 ;380:1559-67.
13. Ratnam I, Leder K, Black J, et al. Dengue fever and international travel. *J Travel Med.* 2013;20(6):384-93.
14. Yauch LE, Shresta S.. Dengue virus vaccine development. *Adv Virus Res.* 2014; 88:315-72.

15. Thomas SJ, Endy TP. Vaccines for the prevention of dengue: development update. *Hum Vaccin* 2011;7:674 – 84.
16. Beckett CG, Tjaden J, Burgess T. Tetravalent Evaluation of a prototype dengue-1 DNA vaccine in a Phase 1 clinical trial. *Vaccine*. 2011 29(5):960-8.
17. Stahl HC1, Butenschoen VM, Tran HT, et al. Cost of dengue outbreaks: literature review and country case studies. *BMC Public Health*. 2013 6;13:1048-57.
18. Ishikawa T, Yamanaka A, Konishi E . A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. *Vaccine*. 2014;32(12):1326-37.
19. Durbin A. P., Whitehead S. S. Next-Generation Dengue Vaccines: Novel Strategies Currently Under Development. *Viruses* 2011;3:1800-14.
20. 國家衛生研究院全球資訊網。國家衛生研究院研究成果行銷摘要表。
http://www.nhri.org.tw/NHRI_WEB/nhriw001Action.do?status=Show_Dtl&nid=20110706724261260000&uid=20110706724261260000
21. Mahoneya R.T., Francisb D.P., Frazatti-Gallina N.M, et al. Cost of production of live attenuated dengue vaccines: A case study of the Instituto Butantan, Sao Paulo, Brazil. *Vaccine*. 2012;30:4892-96.
22. World Health Organization (2012). Questions and Answers on Dengue Vaccines:Phase IIb study of CYD-TDV http://www.who.int/immunization/research/committees/WHO_dengue_vaccine_QA_september2012.pdf.
23. Coller BA, Clements DE, Bett AJ, et al. The development of recombinant subunit envelope-based vaccines to protect against dengue virus induced disease. *Vaccine*. 2011;29(42):7267-75.