(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. Oktober 2017 (12.10.2017)

WIPO | PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2017/174193 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 33/569 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2017/000428

(22) Internationales Anmeldedatum:
5. April 2017 (05.04.2017)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
16164573.4 8. April 2016 (08.04.2016) EP

(71) Anmelder: **VIRAMED BIOTECH AG** [DE/DE]; Behringstrasse 11, 82152 Planegg/Steinkirchen (DE).

(72) Erfinder: **KRONSTEINER, Lilly**; Behringstrasse 11, 82152 Planegg/Steinkirchen (DE). **KINTRUP, Martin**; Tassilostrasse 5, 82131 Gauting (DE). **SCHEIDE, Dierk**; Buchenweg 16a, 82100 Germering (DE).

(74) Anwalt: **GRÜNECKER PATENT- UND RECHTSANWÄLTE PARTG MBB**; Leopoldstraße 4, 80802 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,

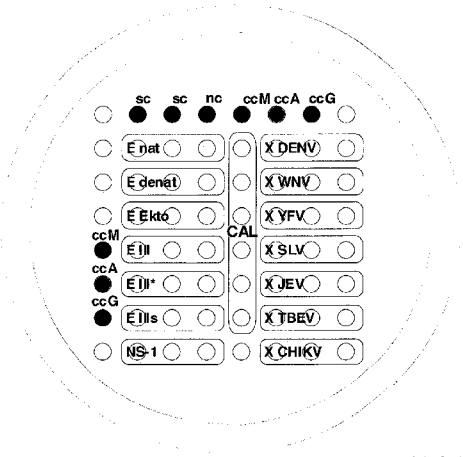
[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title**: ZIKA VIRUS DIAGNOSIS

(54) **Bezeichnung** : ZIKA VIRUS DIAGNOSTIK

AA
Abbildung 3b:

BB
Zika Virus ViraChip® IgG/IgM



Kontrollpunkte: Serumkontrolle (sc), Negativkontrolle (nc), Konjugatkontrollen IgG (ccG), IgA (ccA), IgM (ccM)
Kalibrator (CAL)
CC ZIKV-Antigene: E nat (Envelope nativ), E denat (Envelope denaturiert), E Ekto (Envelope Ektodomäne ohne Transmembranhelices), EIII (Envelope C-terminale Domäne), EIII*(Fusionsprotein mit Envelope C-terminaler Domäne), EIIIs (Envelope C-terminale Domäne, einschließlich Anker-Region „stem"), NS-1 (Nicht-Strukturprotein 1)
Ausschluss-Antigene: eines oder mehrere Antigene abgeleitet aus Nicht-ZIKV Pathogenen DENV, WNV, YFV, SLV,JEV, TBEV, CHIKV

AA Figure 3b:
BB IgG/IgM ViraChip® of the Zika virus
CC Control points: serum control (sc) negative control (nc), conjugate controls IgG (ccG), IgA (ccA), IgM (ccM)
Calibrator (CAL)
ZIKV antigens: E nat (envelope native), E denat (envelope denatured), E Ekto (envelope ectodomain without transmembrane helices), EIII (envelope C-terminal domain), EIII* (fusion protein with envelope C-terminal domain), EIIIs (envelope C-terminal domain, including anchor region "stem"), NS-1 (non-structural protein 1)
Exclusion antigens: one or more antigens derived from non-ZIKV pathogens DENV, WNV, YFV, SLV, JEV, TBEV, CHIKV

(57) **Abstract**: The present invention relates to devices and methods for carrying out experiments for detecting specific interactions between probe and target molecules, which allow to draw conclusions to a Zika virus infection.

(57) **Zusammenfassung**: Die vorliegende Erfindung betrifft Vorrichtungen und Methoden zur Durchführung von Experimenten zum Nachweis von spezifischen Wechselwirkungen zwischen Sonden- und Zielmolekülen, die auf eine Zika Virus Infektion rückschliessen lassen.

WO 2017/174193 A1

SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

— *mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)*

ZIKA VIRUS DIAGNOSTIK

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Vorrichtungen und Methoden zur Durchführung von Experimenten zum Nachweis von spezifischen Wechselwirkungen zwischen Sonden- und Zielmolekülen, die auf eine Zika Virus Infektion rückschliessen lassen.

Das Zika Virus (ZIKV) gehört zur Familie der Flaviviridae, zu der auch andere Pathogene wie Dengue Virus (DENV), West Nil Virus (WNV), Gelbfieber Virus (YFV), Frühsommermeningoenzephalitis Virus/ tick-borne encephalitic virus (TBEV), St. Louis Enzephalitis Virus (SLV) und Japanisches Enzephalitis Virus (JEV) gehören.

Das ZIKV wurde zuerst 1947 aus einem Rhesus Affen im Zika-Forest in Uganda isoliert (Dick et al., 1952). Ab 2007 wurde über etwas über 100 Infektionen im westlichen Pazifik in Mikronesien berichtet. 2013 wurde etwa ein Zehntel der Bevölkerung von Französisch-Polynesien mit dem Zika Virus infiziert. Seit 2015 treten millionenfach Zika Virus Infektionen in Süd- und Mittelamerika auf, insbesondere in Brasilien und Kolumbien. In geringem, jedoch zunehmendem Maße treten auch in den USA und in Europa Fälle von ZIKV Infektion auf, vor allem bei Reiserückkehrern.

Flaviviren sind umhüllte Viren, die ein RNA-Genom von etwa 11.000 bp in einem Kapsid enthalten. Das Kapsid besteht aus identischen Kapsid-(C-)Proteinen und ist umhüllt von 180 Kopien zweier Hüllproteine, nämlich des Envelope (E) Glykoproteins (etwa 500 Aminosäuren) bzw. des Membran (M) Proteins (etwa 75 Aminosäuren) oder dessen Vorläufer Precursor Membran (prM) Proteins (Sirohi et al., Science 2016). Hierbei macht das E Protein den Großteil der Gesamtproteinmenge aus.

Neben diesen Strukturproteinen kodiert das Genom sieben weitere, sog. Nichtstruktur-Proteine (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5), die an der Replikation und Assemblierung des Virus beteiligt sind und eine Rolle bei der Wechselwirkung mit dem Immunsystem des Wirts spielen.

Die Proteine werden in Form eines Polyproteins gebildet, dass anschließend proteolytisch gespalten wird (Li et al., 2008).

Durch Sequenzanalysen sind zahlreiche verschiedene ZIKV Stämme und deren phylogenetischer Zusammenhang bekannt. Im Wesentlichen gibt es eine afrikanische und eine asiati-

sche Linie (Haddow et al. 2012, Faye et al., 2014), wobei die aktuellen ZIKV Isolate aus Süd- und Mittelamerika der asiatischen Linie zuzuordnen sind (Musso et al., 2015, Enfissi et al., 2016). **Abbildung 1** zeigt einen Sequenzvergleich der Polyproteine aus den folgenden, exemplarischen ZIKV Stämmen: Stamm MR766, Uganda 1947 (BAP47441), Stamm ArD7117, Senegal 1968 (AHL43501), Stamm CPC-0740, Philippinen 2012 (AMD61711), Stamm PRVABC59, Puerto Rico 2015 (AMC13911), Stamm BeH818995, Brasilien 2015 (AMA12084).

In den etwa ersten 7 Tagen einer Zika Virus Infektion kann virale RNA im Serum nachgewiesen werden, in einzelnen Fällen in Sperma sogar länger. Mittels RT-PCR kann das Virus in diesem Zeitfenster eindeutig nachgewiesen und beispielsweise von Dengue (DENV) oder Chikungunya (CHIKV) unterschieden werden. Ein negatives RT-PCR Ergebnis schließt eine Infektion jedoch bereits 5-7 Tage nach Auftreten der ersten Symptome nicht mehr aus, weil Virämie und damit RNA-Menge schnell abnehmen (Bulletin of the World Health Organization, BLT.16.171207).

Durch Nachweis des Virus über die Anwesenheit von NS1-Antigen im Serum vergrößert sich das Zeitfenster nicht wesentlich gegenüber der RT-PCR während der NS1-Antigennachweis gleichzeitig nicht die Spezifität der RT-PCR erreicht und die Gefahr von Verwechslungen mit DENV Infektionen mit sich bringt (Gyurech et al., 2016).

Nachteilig ist somit das kurze Zeitfenster für den spezifischen Nachweis des ZIKV, insbesondere weil die vergleichsweise milden klinischen Symptome, dazu führen können, dass Patienten erst spät einen Arzt aufsuchen. Nur eine von 5 Personen entwickelt überhaupt Symptome, die insbesondere als Hautausschlag und Fieber wenig spezifisch sind und meist nach wenigen Tagen abklingen. Dennoch ist die Diagnostik auch ohne klinische Symptome von allergrößter Bedeutung, weil es sowohl Hinweise auf die sexuelle Übertragbarkeit von ZIKV (Foy et al., 2011; Musso et al., 2015; McCarthy, 2016, Mansuy et al., 2016) als auch die vorallem in Südamerika auffällige Häufung von Mikrozephalie bei Neugeborenen gibt, die in Zusammenhang mit ZIKV Infektionen gebracht wird (Cauchemez et al 2015, Calvet et al 2016, Mlakar et al. 2016).

Das größte Zeitfenster kann durch serologische Teste abgedeckt werden, die insbesondere anti-Zika Virus IgM- und IgG-Antikörper im Blut (Serum oder Plasma) nachweisen.

Im Stand der Technik bekannt sind Immunfluoreszenzteste, wie beispielsweise Arboviren-Fieber-Mosaik 2 (IgG/IgM (Euroimmun AG, Deutschland) sowie IgM-Fänger-ELISA

Testeallen voran MAC-ELISA (CDC, USA) mit ganzen Viruspartikeln aus infizierten Vero-Zellen. Die Hauptmenge des Zika Virus Antigens stellt in diesen Fällen das E-Protein dar, das jedoch nicht hoch-spezifisch ist und insbesondere mit Antikörpern gegen andere Flaviviren bzw. Arboviren kreuzreagiert. Besonders zu beachten sind hierbei auch Impftiter, beispielsweise gegen FSME/TBEV oder Gelbfieber.

ELISA-Teste wie beispielsweise Anti-Zika-Virus-ELISA (IgG/IgM) (Euroimmun AG, Deutschland), ZV-IgG Elisa kit Human Zika Virus IgG (ZV-IgG) (MyBioSource, USA) zum Nachweis von anti-ZIKV Antikörpern verwenden daher bevorzugt (sofern angegeben) das NS-1 Antigen, das als hochspezifisch beschrieben ist.

Zunehmend werden auch Schnellteste angeboten wie beispielsweise Zika Virus Rapid Test (Biocan Diagnostics Inc., Kanada), Zika Virus IgG/IgM RapiCard™ InstaTest (Cortez Diagnostics Inc., USA).

In allen Fällen handelt es sich um Suchteste, auf die in der serologischen Diagnostik bevorzugt ein Bestätigungstest folgt. Bestätigungsteste überprüfen zum einen die Spezifität des Suchtestergebnisses und differenzieren zum anderen das Antikörperspektrum genauer, um Rückschlüsse auf den Status der Infektion zu ermöglichen. Letzteres ist mit einzelnen ELISA-Testen in der Regel schwer oder überhaupt nicht möglich, da diese nur einen einzigen Messwert pro Probe liefern.

Aus diesem Grund handelt es sich bei Bestätigungstesten oft um Multiplex-Teste. Unter erfindungsgemäßen Multiplex Testen werden solche Einrichtungen und Verfahren verstanden, die gleichzeitig mehr als einen Messwert pro Probe liefern. ZIKV Bestätigungsteste sind jedoch weder kommerziell verfügbar, noch beschrieben.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von Mitteln und Verfahren zur Diagnostik von ZIKV Infektionen, insbesondere – aber nicht beschränkt auf – serologische Bestätigungsteste zum Nachweis von anti-ZIKV Antikörpern.

Ein erfindungsgemäßer ZIKV Bestätigungstest kann beispielsweise als Träger oder Testkit realisiert werden, enthaltend (jedoch nicht beschränkt auf): verschiedene ZIKV Antigene, verschiedene Konzentrationen desselben ZIKV Antigens zur Titerbestimmung bzw. Reaktivitäts- oder Aktivitätsbestimmung, zusätzliche Immunglobulinklassen-spezifische Fängerantikörper z.B. für sogenannte „MAC"- bzw. „μ-capture" Teste, die nur IgM Antikörper aus dem Serum binden, zusätzliche Fängerantikörper zum parallelen ZIKV-Antigen-

Nachweis (Combo-Assay), Antigene potentiell kreuzreaktiver Pathogene/ entsprechender Impfstoffe (DENV, WNV, YFV, TBEC, SLV, JEV, CHIKV) zur Differentialdiagnostik.

Bei der Entwicklung eines erfindungsgemäßen Trägers oder Testkits ist neben der Auswahl der Antigene, die eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen, insbesondere die geeignete Kombinatorik von Bedeutung. Im Fall von bekannten Kreuzreaktionen soll der erfindungsgemäße Bewertungsalgorithmus für einen Multiplextest bevorzugt die Sensitivität verschiedener Antigene ausschöpfen und gleichzeitig einzelne Kreuzreaktivitäten bzw. Unspezifitäten eines Antigens durch mindestens ein anderes Antigen ausschliessen.

Im einfachsten Fall wird ein 2-Antigen-Kriterium verwendet, beispielsweise mit den Antigenen E und NS1. Sind zum Beispiel Kreuzreaktivitäten bei anderen Infektionen bekannt, können diese explizit durch ein oder mehrere für diese andere Infektion spezifische(s) Antigen(e) ausgeschlossen werden. Zu solchen Antigenen zur Ausschluss-Diagnostik zählen – jedoch nicht darauf begrenzt – Struktur- und Nicht-Strukturproteine anderer Flaviviren wie DENV, WNV, YFV, TBEC, SLV, JEV, aber auch entsprechende Proteine anderer differentialdiagnostisch relevanter Infektionen mit Arboviren wie CHIKV bis hin zum Epstein-Barr Virus (EBV).

In einer Ausführungsform kann der erfindungsgemäße Diagnostik Test zusätzlich mindestens ein Antigen aufweisen, das in Suchtesten (Screening) verwendet wird. Beispiele für ein solches Such-(Screening-) Antigen sind gereinigte ZIKV Viruspartikel aus infizierten Vero-Zellen oder anderer Zelllinien bzw. entsprechendes Lysat solcher Viruspartikel. Auf diese Weise kann das Suchergebnis überprüft werden. Es ist aber ebenso möglich, Such- und Bestätigungstest in einem Schritt durchzuführen und den Multiplextest bereits als Eingangstest einzusetzen.

Gegenstand der Erfindung sind Träger zum Nachweis von anti-ZIKV Antikörpern, umfassend mindestens zwei von dem Zika Virus abgeleitete Antigene, welche an anti-ZIKV Antikörper binden können und getrennt voneinander detektierbar sind, wobei die Proteine unabhängig voneinander auf den Träger beladen werden.

Prinzipiell sind alle Materialien zum Aufbau des erfindungsgemäßen Trägers geeignet, die dem Fachmann zur Immobilisierung von Antigenen bekannt sind. Hierzu zählen Platten, Streifen, Membranen, Filter, Papier, Film oder Perlen. Als Platten kommen insbesondere

Mikrotiterplatten in Frage. Die Perlen können auch Kügelchen aus verschiedenem Material sein, an welchem die Antigene aufgetragen oder immobilisiert sind.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform besteht der Träger jedoch aus Material ausgewählt aus der Gruppe von Nitrocellulose, Polyvinylidendifluorid (PVDF), Polyamid, Celluloseacetat und Polystyrol. Für den Fall, dass Polyamid als Material verwendet wird, ist Nylon die bevorzugte Wahl. Nitrocellulose ist jedoch aufgrund ihrer physikalischen Oberflächeneigenschaften das zur Immobilisierung der Antigene vor allen zu bevorzugende Material. Insbesondere hat sich gezeigt, dass beim Einsatz von Nitrocellulose ein besonders gutes Signal-Rauschverhältnis für alle diagnostisch relevanten Antigensignale erreicht werden kann.

Der Träger kann weiterhin ein beschichteter Träger sein. Dann besteht der beschichtete Teil des Trägers vorzugsweise aus einem festen Material mit solchen Eigenschaften, die für eine Beschichtung geeignet ist. Diese sind dem Fachmann bekannt. Die Beschichtung des Trägers umfasst dabei vorzugsweise ein Material ausgewählt aus der obigen Gruppe von erwähnten Materialien. In einer alternativen Ausführungsform umfasst die Beschichtung des Trägers ein Material, dass zur spezifischen Bindung definierter Bindungspartner geeignet und dem Fachmann ebenfalls bekannt ist, beispielsweise Streptavidin. Vorzugsweise sind der beschichtete Teil und die Beschichtung so miteinander verbunden, dass ein unbeabsichtigtes Lösen beider Teile nicht möglich ist.

In einer alternativen Ausführungsform kann jedoch auch ein beschichteter Träger verwendet werden, dessen Beschichtung gerade ablösbar mit dem beschichteten Teil verbunden ist, wenn die Beschichtung beispielsweise in einem standardisierten Verfahren weiter zur Analyse dienen soll.

Die Antigene E, EIII, EIII* und NS-1 sind in Tabelle 1 gezeigt.

Die verwendeten Antigene können erfindungsgemäß unmittelbar auf den beschichteten Träger aufgetragen werden oder zusammen mit dem Beschichtungsmaterial auf den zu beschichtenden Teil aufgetragen werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Träger mit Hilfe einer Technik hergestellt, welche die aufgereinigten Antigene auf bestimmte Positionen aufträgt. Die Position kodiert somit

das Antigen und gewährleistet damit die genaue Zuordnung aller Antigene (Positionsmultiplexing). Bevorzugt wird die Positionszuordnung durch geeignete Computerprogramme/ Software unterstützt.

In einer alternativen Ausführungsform des Multiplexing ist der Träger eine Mischung verschiedener Perlen oder Kügelchen, mit denen die verwendeten Antigene verbunden sind, beispielsweise durch kovalente Kopplung oder passive Adsorption. Hierbei gibt es verschiedene Arten von Kügelchen, die voneinander unterscheidbar sind. Jeweils eine Art von Kügelchen wird mit einem Antigen gekoppelt, sodass die Art des Kügelchens das Antigen kodiert. Unterscheidungsmerkmale der Kügelchen sind dem Fachmann bekannt, beispielsweise Größe, magnetische Eigenschaften oder Fluoreszenz-Signal, letzteres insbesondere als Verhältnis mehrerer unterschiedlicher Fluoreszenz-Farben nebeneinander.

Beispielhafte, in keiner Weise limitierende Ausführungsformen sind in Abbildung 3 dargestellt. Abbildung 3a zeigt einen Nitrocellulose-Teststreifen, beladen mit 4 ZIKV-Antigenen E, EIII, EIII*, NS-1 (Zika Virus ViraStripe®). Abbildung 3b zeigt ein Protein-Microarray im Mikrotiterplatten (MTP) Format (ViraChip®), das neben denselben 4 ZIKV-Antigenen E, EIII, EIII*, NS1 sowohl weitere ZIKV-Antigene einschließlich Viruslysat, als auch differentialdiagnostisch relevante Antigene anderer Pathogene wie DENV, WNV, YFV, CHIKV enthält.

Tabelle 1: Aminosäuresequenzen der erfindungsgemäßen ZIKV-Antigene E, EIII, EIII*, NS-1

SEQ_ID_NR	Protein	Sequenz
SEQ_ID_NR1	E	IRCIGVSNRDFVEGMSGGTWVDVVLEHGGCVTVMAQDKPTVDIELVTTTVSNMAEVRSYC YEASISDMASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVDRGWGNGCGLFGKGSLVTCAKFT CSKKMTGKSIQPENLEYRIMLSVHGSQHSGMTVNDIGYETDENRAKVEVTPNSPRAEATL GGFGSLGLDCEPRTGLDFSDLYYLTMNNKHWLVHKEWFHDIPLPWHAGADTGTPHWNNKE ALVEFKDAHAKRQTVVVLGSQEGAVHTALAGALEAEMDGAKGKLFSGHLKCRLKMDKLRL KGVSYSLCTAAFTFTKVPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCKIPVQMAVDMQTLTPVGRLIT ANPVITESTENSKMMLELDPPFGDSYIVIGVGDKKITHHWHRSGSTIGKAFEATVRGAKR MAVLGDTAWDFGSVGGVFNSLGKGIHQIFGAAFKSLFGGMSWFSQILIGTLLVWLGLNTK NGSISLTCLALGGVMIFLSTAVSA
SEQ_ID_NR2	EIII	SLCTAAFTFTKVPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCKIPVQMAVDMQTLTPVGRLITANPVI TESTENSKMMLELDPPFGDSYIVIGVGDKKITHHWHRSGST
SEQ_ID_NR3	EIII*	SYSLCTAAFTFTKVPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCKIPVQMAVDMQTLTPVGRLITANP VITESTENSKMMLELDPPFGDSYIVIGVGDKKITHHWHRSGSTIGKAFEATVRGAKRMAV LG
SEQ_ID_NR4	NS-1	VGCSVDFSKKETRCGTGVFIYNDVEAWRDRYKYHPDSPRRLAAAVKQAWEEGICGISSVS RMENIMWKSVEGELNAILEENGVQLTVVVGSVKNPMWRGPQRLPVPVNELPHGWKAWGKS YFVRAAKTNNSFVVDGDTLKECPLEHRAWNSFLVEDHGFGVFHTSVWLKVREDYSLECDP AVIGTAVKGREAAHSDLGYWIESEKNDTWRLKRAHLIEMKTCEWPKSHTLWTDGVEESDL IIPKSLAGPLSHHNTREGYRTQVKGPWHSEELEIRFEECPGTKVYVEETCGTRGPSLRST TASGRVIEEWCCRECTMPPLSFRAKDGCWYGMEIRPRKEPESNLVRSMVTAGS

Unter *von dem Zika Virus abgeleiteten Antigenen* werden erfindungsgemäß Präparationen verstanden, die diagnostisch relevante Antigene des Zika Virus enthalten. Dabei handelt es sich vorzugsweise um Antigene mit hoher Spezifität für ZIKV und hoher Reaktivität in verschiedenen Stadien einer ZIKV-Infektion.

Besonders bevorzugt sind ZIKV-Antigene, die sowohl Antikörper gegen die im Anwendungsgebiet des Testes vorkommenden ZIKV-Stämme mit hoher Sensitivität erfassen als auch geringe Kreuzreaktivitäten mit Antikörpern gegen andere Pathogene im selben Anwendungsgebiet aufweisen, wobei diese Antikörper anderer Pathogene entweder aus natürlicher Infektion oder aus Impfung resultieren können.

Ganz besonders bevorzugt sind Teile von ZIKV-Antigenen, die die genannte hohe Sensitivität des vollständigen ZIKV-Antigens besitzen, jedoch kreuzreaktive oder gar unspezifische Anteile nicht mehr aufweisen. Solche Teile von ZIKV-Antigenen können beispielsweise durch verkürzte Fragmente von Struktur- oder Nichtstruktur-Proteinen aus dem ZIKV erhalten werden, die mit gentechnischen Methoden rekombinant hergestellt werden.

Proteine oder Teile davon können erfindungsgemäß in unterschiedlicher Form als ZIKV-Antigen eingesetzt werden. Hierzu zählen: gefaltetes Protein in nativer Konformation, denaturiertes Protein mit linearen Epitopen, rekombinantes Fusionsprotein aus einem oder mehreren verschiedenen ZIKV-Proteinen und/oder Nicht-ZIKV-Proteinen bzw. –peptiden.

Die Verwendung von erfindungsgemäßen Nicht-ZIKV-Proteinen oder –peptiden, die mit ZIKV-Proteinen oder Teilen davon fusioniert sind beinhaltet die folgenden exemplarischen Proteine bzw. Peptide, ist jedoch nicht auf diese begrenzt: Bovines Serum Albumin (BSA), Casein, Intimin, Luciferase, PelB, OmpT, poly-Glutamat-Tag, Glutathion-S-Transferase-(GST)-Tag, Green fluorescent protein-Tag (GFP-Tag), poly-Histidin-Tag, Intein-Tag, Maltose binding protein-Tag (MBP-Tag), MHC-Tag, Profinity eXact-Tag, Streptavidin-Tag (Strep-Tag), Tandem Affinity Purification-Tag (TAP-Tag), S-Tag, Nus-Tag, Myc-Tag, Small Ubiquitin-related Modifier (SUMO), H, Fh8, Dihydrofolat-Reduktase (DHFR-Tag).

Die Fusionierung mit diesen sowie weiteren Proteinen durch gentechnische Methoden sind dem Fachmann bekannt, um kleine und/oder unlösliche und/oder strukturell unzureichend exponierte Proteinfragmente in unterschiedlichen prokaryontischen bzw. eukaryontischen Expressionssystemen, beispielsweise *E.coli,* SF9, *S. cerevisiae* oder CHO-Zellen mit guter Ausbeute exprimieren zu können. Ebenso kennt der Fachmann die Fusion mit den genannten sowie weiteren Proteinen bzw. Peptiden als Hilfsmittel zur Affinitätsreinigung (Affinitäts-Tag) und/oder Detektionsmarkierung. Weiterhin bekannt sind Möglichkeiten, diese Fusion zu einem späteren Zeitpunkt auf Proteinebene wieder zu lösen, beispielsweise durch proteolytische Spaltung, bevorzugt durch hochspezifische Proteasen wie TEV, HRV3C, Enterokinase, Thrombin, Proteinkinase A, MMP9 (Matrix Metalloprotease 9), wobei deren Erkennungssequenz zuvor gentechnisch in das Protein eingeführt wurde. Schließlich kennt der Fachmann auch zellfreie Methoden der Proteinherstellung (in-vitro Translation). Bevorzugtes ist in allen Fällen ein ZIKV-Antigen mit optimaler Präsentation der diagnostisch relevanten Epitope.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Träger so gefertigt, dass die *mindestens zwei von dem Zika Virus abgeleiteten Antigene* ausgewählt sind aus: E-Protein Voll-Länge einschließlich Transmembranhelices (SEQ ID NR 1, Aminosäuren ~ Nr. 291...794), Ektodomäne des E-Proteins ohne Transmembranhelices (entsprechende Deletionen), EIII-Protein (SEQ ID NR 2, EIII-Domäne/ C-Terminus des E-Proteins, Aminosäuren ~ Nr. ab 601), EIIIs-Protein (SEQ ID NR 3, EIII-Domäne/ C-Terminus des E-Proteins einschließlich des gesamten Anker/ „stem" Bereiches oder Teilen des Ankers, Aminosäuren ~ Nr. ab 601 sowie ab 698).

Die Angaben der Aminosäuren Nr. beziehen sich hierbei auf Abbildung 1. Der Fachmann versteht diese Aminosäure-Bereiche in der Primärstruktur/ linearen Sequenz des Proteins als Anhaltspunkt zum Verständnis der dreidimensionalen Tertiär- bzw. Quartärstruktur (letztere im Fall des gesamten Virus). Die exakte Anfangs- und Endaminosäure hängt hierbei vom

betrachteten Zusammenhang ab. Beispielsweise werden bei Vergleich zweier Sequenzen quantitative Regeln verwendet, die entscheiden, ob eine Aminosäure als identisch betrachtet wird oder ob diese Sequenzposition relativ verschoben wird („gap"), um insgesamt eine bessere Übereinstimmung zu erreichen. Ebenso beispielsweise werden bei Modellierung des ZIKV-E Proteins an eine atomar aufgelöste Struktur des E-Proteins anderer Flaviviren bestimmte Annahmen für eine „beste Modellierung" gemacht, die letztlich Anfang- und End-Aminosäure Nr. einer Protein-Domäne beeinflussen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist mindestens eines *von dem Zika Virus abgeleiteten Antigene* glykosyliert. Beispiel für eine Glykosylierungsstelle des E-Proteins ist Asn154. Dem Fachmann sind Methoden zur Glykosylierung im Rahmen der Proteinexpression bekannt, beispielsweise durch eukaryontische Expressionssysteme wie SF9-Insektenzellen. Ebenso ist dem Fachmann bekannt, dass das Glykosylierungsmuster vom Expressionssystem abhängt.

In einer weiteren Ausführungsform sind die *von dem Zika Virus abgeleiteten Antigene* mit einem Affinitäts-Tag versehen und/oder mit einem Nicht-ZIKV Protein fusioniert.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform liegt mindestens ein *von dem Zika Virus abgeleitetes Antigen* nativ gefaltet neben mindestens einem denaturierten *von dem Zika Virus abgeleiteten Antigen* vor, sodass alle Antikörper erfasst werden die gegen native, konformative Epitope gerichtet sind und ebenso alle Antikörper gegen lineare Epitope (die im nativen Zustand unter Umständen nicht zugänglich sind).

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform liegt mindestens ein *von dem Zika Virus abgeleitetes Antigen* in verschiedenen Konzentrationen bzw. Mengen auf dem erfindungsgemäßen Träger vor und es werden Verfahren angewendet, um auf diese Weise quantitative Aussagen zur Menge bzw. Konzentration der Antikörper in der Probe zu machen.

In einer anderen Ausführungsform liegen mindestens zwei *von dem Zika Virus abgeleitete Antigene* aus verschiedenen Stämmen des ZIKV vor.

In einer alternativen Ausführungsform sind die *von dem Zika Virus abgeleiteten Antigene* Teil eines Testsystems, z.B. eines Trägers oder Kits, das Antikörper gegen eine Vielzahl von

Pathogenen nachweist, von denen einer ZIKV ist. Beispielsweise ist das Protein-Microarray im MTP Format (ViraChip®) nicht nur wie oben beschrieben auf einzelne DENV, WNV, YFV, CHIKV Antigene als Ausschlusskriterium begrenzt. Vielmehr können für jeden einzelnen Erreger so viele spezifische Antigene verwendet werden, dass jeweils ein erregerspezifischer Bestätigungstest resultiert. Beispielsweise können die ZIKV-Antigene zusammen mit Antigenen, die spezifisch Antikörper gegen DENV, WNV, YFV, SLV, JEV, TBEV und andere Flaviviren nachweisen können zu einem „Flavivirus ViraChip" kombiniert werden oder zusammen mit CHIKV-Antigenen zu einem „Arbovirus ViraChip". Besonders bevorzugt werden hierbei Antigene aus verschiedenen Stämmen/ Serotypen eines Pathogens verwendet, beispielsweise DENV1, DENV2, DENV3 und DENV4.

Bereitsgestellt wird auch die Verwendung der Antigene, die auf Träger auf- oder in Kits der Erfindung eingebracht werden, zum Nachweis von ZIKV. Bevorzugt unterscheidet die Verwendung zwischen ZIKV und DENV, WNV, YFV, SLV, JEV, TBEV, CHIKV.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zum Nachweis von Anti-ZIKV Antikörpern. Dieses Verfahren umfasst erfindungsgemäss folgende Schritte: 1) Bereitstellen eines Trägers wie oben beschrieben, 2) Inkubieren einer biologischen Probe, die möglicherweise Anti-ZIKV-Antikörper enthält, mit dem Träger unter Bedingungen, die eine Ausbildung mindestens eines Antigen-Antikörper-Komplexes erlauben; und 3) Bestimmen der Anwesenheit von Anti-ZIKV-Antikörpern in der Probe durch Nachweis mindestens eines Antigen-Antikörper-Komplexes.

Das Verfahren ist dabei ebenfalls geeignet, ein Mittel zur Diagnostik und/oder Verlaufskontrolle einer ZIKV-Infektion darzustellen. Dazu ist die biologische Probe eine Patientenprobe, das heißt eine Probe die einem menschlichen oder tierischen Körper entnommen wurde oder aber eine aus einem menschlichen oder tierischen Körper entnommene, weiterverarbeitete Probe.

Sind Kontrollsubstanzen auf dem Träger enthalten, so kann mit diesen die sachgemäße Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens angezeigt werden. Beispielsweise zeigt eine Kontaktkontrolle an, ob der Träger lange genug mit der biologischen Probe in Kontakt getreten ist. Eine Serumkontrolle zeigt entsprechend an, ob während des Verfahrens der Träger mit einem Serum in Kontakt getreten ist. Erfindungsgemäss lassen die Kontrollsubstanzen auch Aussagen darüber zu, ob die Inkubation der biologischen Probe mit dem Trä-

ger für eine Ausbildung mindestens einen Antikörper-Antigen-Komplexes hinreichend lange war. In diesem Falle handelt es sich bei der Kontrollsubstanz um eine Inkubationszeitkontrolle bzw. Cutoff-Kontrolle bzw. Kalibrator-Kontrolle.

Vorzugsweise ist das Nachweisverfahren für Anti-ZIKV-Antikörper so gestaltet, dass es alle Vorgaben hinsichtlich interner und externer Qualitätssicherung sowie internationaler und nationaler Normen erfüllt.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Verfahren so gestaltet, dass mindestens ein Antigen spezifisch mit einem Anti-ZIKV-Antikörper reagiert.

Die biologische Probe zur Verwendung in dem Verfahren oder auf dem Träger bzw. mit dem Kit der Erfindung kann von einem Tier oder Menschen abgeleitet sein. Besonders bevorzugt ist, dass es sich um eine Probe von einem Menschen handelt.

Vorzugsweise handelt es sich bei der biologischen Probe um eine flüssige Probe. In diesem Fall kommen insbesondere Blut-, Plasma-, Serum-, Urin-, Speichel- oder Samenflüssigkeit in Frage. Besonders vorzugsweise ist die biologische Probe humanes Blut oder Serum. Die biologische Probe kann auch eine weiterverarbeitete biologische Probe sein. Vorzugsweise ist dann die Weiterverarbeitung so gestaltet, dass die diagnostisch relevanten Antikörper im Vergleich zur ursprünglichen Probe aufkonzentriert werden, oder in höherer Reinheit vorliegen. Verfahren zur Weiterverarbeitung der biologischen Probe sind dem auf diesem Gebiet tätigen Fachmann bekannt.

Erfindungsgemäss kann die biologische Probe ebenfalls eine verflüssigte Probe sein, welche aus einer Gewebeprobe oder einem Bioptat, vorzugsweise Hautbioptat, Gelenkbioptat, Synovialbioptat durch ein Weiterverarbeitungsverfahren gewonnen wurde.

Zur Detektion eines Antigen-Antikörper-Komplexes wird in der Diagnostik von ZIKV-Infektionen der erfindungsgemässe Testkit verwendet. Ein solcher Testkit enthält neben dem Träger auch mindestens eine Substanz zum Nachweis eines Antigen-Antikörper-Komplexes und/oder mindestens eine Vorrichtung zum Nachweis eines Antigen-Antikörper-Komplexes.
Im Rahmen einer Stufendiagnostik ist es möglich, nach einem vorgeschalteten Suchtest (z. B. ELISA, Immunfluoreszenztest) mit dem erfindungsgemässen Träger, Verfahren und Testkit sowohl die serologische Bestätigungsreaktion, als auch die serologische Verlaufskon-

trolle durchzuführen. Die Testdaten liefern einen Teilaspekt für die Entscheidung der Behandlungsbedürftigkeit durch den behandelnden Arzt.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird zum erfindungsgemäßen Träger oder Kit weiterhin eine Anweisung zur Auswertung der Testergebnisse bereitgestellt, welche mit dem Träger bzw. Kit gewonnen werden. Diese Anweisung soll es dem Anwender ermöglichen, Aussagen über die Anwesenheit von Anti-ZIKV-Antikörpern bzw. kreuzreagierenden Antikörpern in der biologischen Probe zu treffen. Die Anweisung ist vorzugsweise so gestaltet, dass Regeln oder Kriterien vorgegeben sind, die eine Aussage darüber ermöglichen, ob die Anwesenheit von Anti-ZIKV-Antikörpern 1) positiv ist, falls Anti-ZIKV-Antikörpern anwesend sind, oder 2) negativ ist, falls Anti-ZIKV-Antikörper im Wesentlichen nicht anwesend sind, oder 3) das Ergebnis fraglich ist, falls keine Aussage über die Anwesenheit von Anti-ZIKV-Antikörpern getroffen werden kann, oder 4) das Ergebnis fraglich ist, falls die Anwesenheit von kreuzreaktiven Antikörpern wahrscheinlich ist .

In einer anderen Ausführungsform enthält die Anweisung entsprechend Regeln und Kriterien, wie Aussagen über Konzentrationen von Anti-ZIKV-Antikörpern in der biologischen Probe gewonnen werden können.

In wieder einer anderen Ausführungsform ermöglichen Träger bzw. Kit zusammen mit der Anweisung zusätzliche Aussagen zu treffen, welche Art von Antikörpern, vorzugsweise klassifiziert nach IgG-, IgM- oder IgA-Antikörpern in der biologischen Probe vorliegen. Besonders bevorzugt lässt die Anweisung auch Aussagen darüber zu, in welchen Konzentrationen die verschiedenen Antikörper vorliegen.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Anweisung Informationen darüber, wie der Träger bzw. das Testkit zur Ermittlung von Aussagen verwendet werden kann, ob eine Testperson, von der die zu untersuchende biologische Probe entnommen wurde, mit ZIKV infiziert ist.

In noch einer alternativen Ausführungsform enthält die Anweisung Informationen, wie der Träger bzw. das Testkit zur Verlaufskontrolle einer ZIKV-Infektion eingesetzt werden kann. Insbesondere enthält die Anweisung dann Regeln oder Kriterien darüber, wie die Daten zu dem Krankheitsbild korreliert werden können. Die Aussage basiert dann erfindungsgemäss darauf, über das Vorhandensein von jeweils IgG-, IgM- und/oder IgA-Antikörpem und falls

vorhanden, vorzugsweise auch die Konzentrationen der jeweiligen Antikörper, Rückschlüsse auf das Stadium zu treffen, in welchem sich eine Testperson mit ZIKV-Infektion befindet.

Ebenfalls kann die Anweisung Informationen darüber enthalten, wie der Testkit über einen längeren Zeitraum zur Verfolgung einer ZIKV-Infektion angewendet werden kann.

Die nachfolgenden Ausführungsbeispiele sollen die vorliegende Erfindung näher erläutern, ohne jedoch limitierend zu wirken.

Erfindungsgemäß umfasst sind nicht nur die jeweiligen Antigene, sondern auch Varianten davon.

Varianten sind solche Antigene, die bei Homologievergleich mit einer der erfindungsgemäßen Sequenzen SEQ ID NR 1 bis SEQ ID NR 4 eine Sequenzidentität mindestens 80%, bevorzugt 85%, besonders bevorzugt 90%, am meisten bevorzugt 95% aufweisen und/oder bei Verwendung unter den in Beispiel 2 angegebenen Bedingungen die gleiche Reaktivität mit einem ZIKV-Serumkollektiv von mindestens 10 verschiedenen Proben zeigen wie die erfindungsgemäßen ZIKV Antigene.

Ein ZIKV-Serumkollektiv umfasst Seren unterschiedlicher Reaktivität, beispielsweise wie in Abbildung 4 dargestellt.

Die Interpretationskriterien eines bevorzugten Trägers bzw. Testkits der Erfindung sind in Beispiel 4 dargestellt.

Beispiele

Beispiel 1:
Herstellung von ZIKV-Antigenen

Die Herstellung der verschiedenen ZIKV-Antigen-Konstrukte erfolgt abgeleitet von den entsprechenden Genabschnitten des viralen RNA-Genoms. Diese werden in entsprechende Expressionsplasmide eingefügt. Es werden Techniken verwendet, die dem auf diesem Gebiet tätigen Fachmann bekannt sind.

Die Expression des Antigens EDIII erfolgt beispielsweise aus dem Vektor pET14b in E.coli BL21. Zunächst wird eine Übernachtkultur in LB-Medium angeimpft und das Antibiotikum Ampicillin zugeben. Die Inkubation erfolgt bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator. Als Übertagkultur wird LB-Medium mit Ampicillin mit einer oD600 von 0,04 angeimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Ist eine oD600 von ca. 0,6 erreicht, wird die Proteinexpression durch IPTG-Zugabe induziert. Die Proteinexpression erfolgt für ca. 4h bei 37°C im Schüttelinkubator.

Die E.coli Zellen werden abzentrifugiert und mittels eines Lysozym, DTT, Triton X-100 und Proteaseinhibitor enthaltenden Lysispuffers resuspendiert. Die Zellen werden mittels Ultraschall auf Eis aufgeschlossen und anschließend erfolgt ein DNase-Verdau. Das Lysats wird abzentrifugiert und das Pellet mit den unlöslichen Proteinbestandteilen noch zweimal mit einem DTT und Proteaseinhibitor enthaltendem Waschpuffer gewaschen. Anschließend wird das Pellet in einem 6M Guanidiumhydrochlorid enthaltendem Puffer aufgelöst und die unlöslichen Bestandteile mittels Zentrifugation abgetrennt.

Die Aufreinigung des Antigens EDIII erfolgt dann beispielsweise mittels Affinitätschomatographie über His-Tag unter Verwendung einer Nickel-NTA-Säule. Die Aufreinigung erfolgt denaturierend unter Verwendung von 6M Guanidiumhydrochlorid enthaltenden Puffern. Die Elution erfolgt unter Anwendung eines Immidazolgradienten und die Gipfelfraktionen werden vereinigt. Zur Umpufferung des Antigens wird beispielsweise die Zentrikon-Technologie angewendet, die dem auf diesem Gebiet tätigen Fachmann bekannt ist. Nun kann eine Abspaltung des His-Tags mittels Protease erfolgen. Als zweiten Reinigungsschritt kann zum Beispiel eine Gelfiltration durchgeführt werden mittels derer eine Auf-

trennung nach Größe erfolgt und weitere unspezifische E.coli Proteine sowie die Protease und der His-Tag abgereinigt werden.

Beispiel 2:

Beladung eines Nitrocellulose Trägers mit ZIKV-Antigenen in Linienform / Zika Virus ViraStripe®

Die ZIKV-Antigen-Lösungen enthalten Konzentrationen zwischen 5 µg/ml und 50 µg/ml der erfindungsgemäßen ZIKV-Antigene und werden über einen Stripe-Prozess, der für die ViraStripe® Produktlinie seit langer Zeit etabliert ist mit einem Volumen von 1 µl pro cm auf den Träger Nitrozellulose (GE Whatman, Dassel, Deutschland) aufgebracht. Hierfür wurden Dispensierapparate der Firma Biodot Ltd. (Chichester, Großbritannien) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Bedingungen wurden so gewählt, dass die Antigen-Lösungen als homogene Linie an definierter Position auf den Träger aufgebracht wurden (siehe Abbildung 3a). Während des Stripe-Prozesses betrug die relative Luftfeuchtigkeit 40 - 60 % und die Temperatur 19-23 deg. C. Anschließend wurden die Membranen standardmässig nach Angaben des Herstellers geblockt. Zu Bedingungen und weiterer Verwendung des Trägers siehe auch EP1726960B1, EP1556697B1.

Beispiel 3:

Beladung eines Trägers mit ZIKV-Antigenen sowie weiteren Antigenen in Punktform / Zika Virus ViraChip®

Analog Beispiel 2 können die ZIKV-Antigen-Lösungen über einen Spotting-Prozess, der für die ViraChip® Produktlinie etabliert ist auf den Träger Nitrozellulose (GE Whatman, Dassel, Deutschland) aufgebracht werden, der sich auf dem Boden eines Mikrotiterplatten (MTP) Napfes befindet. In diesem Fall werden die Antigen-Lösungen als homogene Punkte an definierter Position auf den Träger aufgebracht (siehe Abbildung 3b). Im Gegensatz zum ViraStripe® Format werden Antigene im ViraChip® Format typischerweise mehrfach, in Form identischer Replikate aufgetragen, um die Messwertgenauigkeit statistisch zu verbessern. Auch Kontrollpunkte liegen meist als Replikate vor. Der wichtige Kalibrator (CAL) wird sogar sechsfach aufgetragen.

Beispiel 4:
Interpretationskriterien für ein Testergebnis mit den ZIKV-Antigenen E, EIII, EIII* und NS1

IgG Interpretationskriterien

Allgemein gilt: Die Bandenintensitäten werden anhand der Cut off Kontrolle bestimmt. Diese befindet sich im Kontrollabschnitt auf jedem Teststreifen. Deutliche Banden haben eine Intensität ≥ der Cut off Kontrolle. Schwache Banden haben eine Intensität < der Cut off Kontrolle.

Auftretende Banden	Bewertung / Ergebnis	Beurteilung
Eine **deutliche NS1** Bande und mindestens eine **schwache** Bande aus **E, EIII, EIII***. Eine **schwache NS1** Bande und eine **deutliche E** Bande.	**Positiv**	Spezifische IgG Antikörper gegen **Zika Virus** nachweisbar. Eine Infektion mit dem **Zika Virus** ist wahrscheinlich.
Eine **deutliche NS1** Bande singulär oder eine **deutliche E** Bande und eine **deutliche EIII oder EIII*** Bande	**Grenzwertig**	Spezifische IgG Antikörper gegen **Zika Virus** nachweisbar. Eine Infektion mit dem **Zika Virus** ist möglich. Bei Verdacht auf IgM spezifische Antikörper prüfen und mit einer zweiten Serumprobe für IgG and IgM nach 2-3 Wochen überprüfen.
Keine Banden oder alle anderen Kombinationen	**Negativ**	Keine spezifische IgG Antikörper gegen **Zika Virus** nachweisbar. Bei Verdacht auf IgM spezifische Antikörper prüfen und mit einer zweiten Serumprobe für IgG and IgM nach 2-3 Wochen überprüfen.

IgM Interpretationskriterien

Allgemein gilt: Die Bandenintensitäten werden anhand der Cut off Kontrolle bestimmt. Diese befindet sich im Kontrollabschnitt auf jedem Teststreifen. Deutliche Banden haben eine Intensität ≥ der Cut off Kontrolle. Schwache Banden haben eine Intensität < der Cut off Kontrolle.

Auftretende Banden	Bewertung / Ergebnis	Beurteilung
Eine **deutliche NS1** Bande	**Positiv**	Spezifische IgM Antikörper gegen **Zika Virus** nachweisbar. Eine Infektion mit dem **Zika Virus** ist wahrscheinlich.
Eine **schwache NS1** Bande oder zwei **schwache Banden** aus **E, EIII, EIII***	**Grenzwertig**	Spezifische IgM Antikörper gegen **Zika Virus** nachweisbar. Eine Infektion mit dem **Zika Virus** ist möglich.
Keine Banden oder alle anderen Kombinationen	**Negativ**	Keine spezifischen IgM Antikörper gegen **Zika Virus** nachweisbar. Bei Verdacht auf IgM spezifische Antikörper prüfen und mit einer zweiten Serumprobe für IgG and IgM nach 2-3 Wochen überprüfen.

Beispiel 5:

Reaktivität des erfindungsgemäßen Nitrocellulose-Trägers mit den ZIKV-Antigenen E, EIII, EIII* und NS1 in Linienform (Zika Virus ViraStripe® IgG/ IgM) mit ZIKV-Seren bzw. DENV, WNV und TBEC Seren

In einem Test mit 10 ZIKV Seren, die durch Immunfloureszenztests gesichert IgG und IgM Antikörper gegen ZIKV aufweisen sowie im entsprechenden Virusneutralistionstest positiv reagierten, wurden Reaktivitäten mit dem Zika Virus ViraStirpe® IgG und IgM bestimmt (siehe Abbildung 4).

Überraschenderweise zeigen Fragmente des Envelope (E) - Proteins bei Verwendung als ZIKV-Antigene in geeigneter Konzentration auf dem erfindungsgemäßen Träger in manchen Fällen eine höhere Reaktivität mit ZIKV positiven Seren als das gesamte E-Protein, möglicherweise aufgrund von besserer Exposition relevanter Epitope auf dem Träger. Besonders in einem Fall konnten nur Antikörper gegen die Fragmente des Envelope (E) – Proteins gefunden werden, hingegen keine Antikörper gegen das vollständige E Protein oder NS1. Ein positives Ergebnis konnte somit nur durch den Nachweis von Antikörpern gegen die Fragmente des Envelope (E) – Proteins erhalten werden. Bei dieser Probe zeigte sich weiterhin, dass die zugehörigen Titerbestimmungen aus der Immunfluoreszenz niedrig waren und somit auf eine möglicherweise noch frühe Phase der Erkrankung hinweisen.

Insbesondere das E-Antigen zeigt eine hohe Kreuzreaktivität mit DENV und TBEV positiven Seren (siehe Abbildung 5). Durch Kombination mit dem NS-1 Antigen und mit geeigneten Interpretationskriterien bleibt die Testspezifität jedoch erhalten.

Die Analyse von Seren von einem Patienten mit klinisch und diagnostisch gesicherter ZIKV Infektion zeigt, dass IgM Antikörper gegen NS1 gebildet werden können und im Verlauf der Infektion bezüglich der Reaktivität ansteigen und anschließend wieder absinken (siehe Abbildung 6). Überraschenderweise ergibt sich aus der Analyse der IgG Antikörper, dass zunächst vornehmlich IgG Antikörper gegen die Proteine E und NS1 nachgewiesen werden können und später im Verlaufe der Infektion bzw. Erkrankung erst gegen die Fragmente des Envelope (E) – Proteins.

Referenzen/ Literaturangaben

Calvet G et al. Lancet Infect Dis. 2016 Feb 17. S1473-3099(16)00095-5.
Charrel RN et al. 2016 Feb 10. Bulletin of the World Health Organization, Article ID: BLT.16.171207
Cauchemez S et al. Lancet. 2016 Mar 15. S0140-6736(16)00651-6.
Dick et al. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1952 Sep;46(5):509-20.
Enfissi A et al., Lancet. 2016 Jan 16;387(10015):227-8.
Faye O et al. 2014. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Jan 9;8(1):e2636.
Foy BD et al. Emerg Infect Dis. 2011 May;17(5):880-2.
Gyurech D et al., 2016., Swiss Med Wkly. 2016 Feb 9;146:w14296.
Haddow AD et al. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(2):e1477.
Li L et al., Science. 2008 Mar 28;319(5871):1830-4.
Mansuy JM et al. Lancet Infect Dis. 2016 Apr;16(4):405.
McCarthy M. BMJ. 2016 Feb 4;352.
Mlakar J et al. N Engl J Med. 2016 Mar 10;374(10):951-8.
Musso D et al. Emerg Infect Dis. 2015 Feb;21(2):359-61.
Musso D. Emerg Infect Dis. 2015 Oct;21(10):1887.
Sirohi D et al. Science. 2016 Mar 31. 10.1126/scienceaaf5316.

Patentansprüche

1. Träger zum Nachweis von Zika Virus,
   wobei der Träger mindestens zwei Antigene umfasst,
   wobei die Antigene ausgewählt sind aus
   a) einem Antigen umfassend SEQ ID NR 1,
   b) einem Antigen umfassend SEQ ID NR 2,
   c) einem Antigen umfassend SEQ ID NR 3 und
   d) einem Antigen umfassend SEQ ID NR 4,

   wobei jedes dieser mindestens zwei Antigene als Variante vorliegen kann.
2. Träger nach Anspruch 1, der mindestens drei Antigene wie in Anspruch 1 a bis d definiert umfasst, wobei jedes dieser mindestens drei Antigene als Variante vorliegen kann.

3. Träger nach Anspruch 1 oder 2, der mindestens vier Antigene wie in Anspruch 1 a bis d definiert umfasst, wobei jedes dieser mindestens vier Antigene als Variante vorliegen kann.

4. Träger nach Anspruch 1, umfassend zwei Antigene umfassend SEQ ID NR 1 bzw. SEQ ID NR 4, wobei jedes dieser mindestens zwei Antigene als Variante vorliegen kann.

5. Träger nach Anspruch 1, umfassend zwei Antigene umfassend SEQ ID NR 2 bzw. SEQ ID NR 3, wobei jedes dieser mindestens zwei Antigene als Variante vorliegen kann.

6. Träger nach Anspruch 2, umfassend drei Antigene umfassend SEQ ID NR 1, SEQ ID NR 2 bzw. SEQ ID NR 4, wobei jedes dieser mindestens drei Antigene als Variante vorliegen kann.

7. Träger nach Anspruch 2, umfassend drei Antigene umfassend SEQ ID NR 1, SEQ ID NR 3 bzw. SEQ ID NR 4, wobei jedes dieser mindestens drei Antigene als Variante vorliegen kann.

8. Träger nach Anspruch 2, umfassend drei Antigene umfassend SEQ ID NR 2, SEQ ID NR 3 bzw. SEQ ID NR 4, wobei jedes dieser mindestens drei Antigene als Variante vorliegen kann.

9. Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 8 , der mindestens ein weiteres aus dem Zika Virus abgeleitetes Antigen umfasst.

10. Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 8, der mindestens ein weiteres aus einem vom Zika Virus verschiedenen Pathogen abgeleitetes Antigen umfasst.

11. Träger nach Anspruch 10, wobei das mindestens eine vom Zika Virus verschiedene Pathogen ausgewählt ist aus einer Gruppe, die DENV, WNV, YFV, TBEC, SLV, JEV, CHIKV, EBV umfasst.

12. Verfahren zum Nachweis einer Zika Virus Infektion umfassend
    - das Bereitstellen eines Trägers gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11;
    - Inkubieren einer biologischen Probe, die möglicherweise Anti-ZIKV-Antikörper enthält, mit dem Träger unter Bedingungen, die eine Ausbildung mindestens eines Antigen-Antikörper-Komplexes erlauben;
    - Bestimmen der Anwesenheit von Anti-ZIKV-Antikörpern in der Probe durch Nachweis mindestens eines Antigen-Antikörper-Komplexes.

13. Verwendung von mindestens zwei Antigenen oder Varianten dieser Antigene gemäß Anspruch 1 zum Nachweis von anti-Zika Virus Antikörpern.

14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei der Nachweis eine Abgrenzung gegen von Zika Virus verschiedene Pathogene ermöglicht.

15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei die vom Zika Virus verschiedenen Pathogene ausgewählt sind aus DENV, WNV, YFV, TBEC, SLV, JEV, CHIKV, EBV.

16. Verwendung nach Anspruch 13, 14 oder 15, umfassend die Bestimmung des Infektionsstatus.

17. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 16, umfassend die Bestimmung der Immunglobulinklasse der nachgewiesenen Antikörper.

18. Testkit umfassend Antigene oder Varianten dieser Antigene wie in einem der Ansprüche 1 bis 11 definiert.

19. Testkit nach Anspruch 18 umfassend eine Anweisung zur Auswertung der Testergebnisse, welche mit dem Testkit gewonnen werden .

20. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die biologische Probe ausgewählt ist aus Serum, Plasma, **Liquor.**

21. Verfahren nach Anspruch 12 oder 20, wobei neben Anti-ZIKV-Antikörpern auch Antikörper gegen mindestens ein weiteres Antigen nachgewiesen werden und wobei dieses weitere Antigen abgeleitet ist von einem Pathogen, ausgewählt aus einer Gruppe, die DENV, WNV, YFV, TBEC, SLV, JEV, CHIKV, EBV umfasst.

22. Verfahren nach Anspruch 12, 20 oder 21, wobei parallel in zwei Experimenten jeweils mindestens ein Antigen-Antikörper-Komplex mit einer anderen Lösung inkubiert wird als im Parallelexperiment, wobei die Lösungen in den beiden Parallelexperimenten Reagenzien enthalten, die die Bindungsstärke des Antigen-Antikörper-Komplexes in unterschiedlicher Weise beeinflussen.

23. Verfahren nach Anspruch 12, 20 oder 21, worin das Ausmass der Bindung des Antikörpers mit dem Antigen dadurch bestimmt wird, dass der Reaktionsansatz mit dem mindestens einen Antigen-Antikörper-Komplex mit einem proteindenaturierenden Agens in Kontakt gebracht wird, welches Antigen-Antikörper-Komplexe destabilisiert, die Antikörper mit niedriger Avidität enthalten, während Antigen-Antikörper-Komplexe weitgehend erhalten bleiben, wenn sie Antikörper mit höherer Avidität enthalten.

24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, wobei das proteindenaturierende Agens ausgewählt ist aus einer Gruppe, die Harnstoff (Urea), Harnstoff/Wasserstoffperoxid, Diethylamine, Guanidine, Thiocyanate umfasst.

25. Verfahren nach Anspruch 24, wobei Harnstoff oder Harnstoff/Wasserstoffperoxid in einer Endkonzentration zwischen 1 mol/l und 8 mol/l verwendet wird.

26. Verfahren nach Anspruch 12, 20 oder 21, wobei die Avidität der Anti-ZIKV-Antikörper Inkubation der biologischen Probe unter stringenteren Bedingungen erfolgt.

27. Träger nach Anspruch 11, wobei die Antigene in einem Raster von räumlich voneinander getrennten Testflächen angeordnet sind, die gleichzeitig mit derselben biologischen Probe inkubiert werden können.

28. Träger nach Anspruch 27, wobei die Testflächen punktförmig sind.

Abbildungen

Abbildung 1:
Sequenzvergleich der gesamten Polyproteine aus den exemplarischen ZIKV Stämmen MR766, Uganda 1947 (BAP47441), ArD7117, Senegal 1968 (AHL43501), CPC-0740, Philippinen 2012 (AMD61711), PRVABC59, Puerto Rico 2015 (AMC13911), BeH818995, Brasilien 2015 (AMA12084).

```
                |C-Protein/Kapsid 6...122 >>>>
BAP47441     1 mknpkkksggfrivnmlkrgvarvnplgglkrlpagllghgpirmvlailaflrftaik
AHL43501     1 mknpkkrsggfrivnmlkrgvarvnplgglkrlpagllghgpirmvlailaflrftaik
AMD61711     1 mknpkkksggfrivnmlkrgvarvspfgglkrlpagllghgpirmvlailaflrftaik
AMC13911     1 mknpkkksggfrivnmlkrgvarvspfgglkrlpagllghgpirmvlailaflrftaik
AMA12084     1 mknpkkksggfrivnmlkrgvarvspfgglkrlpagllghgpirmvlailaflrftaik

BAP47441    61 pslglinrwgsvgkkeameiikkfkkdlaamlriinarkerkrrgadtsigiigllltta
AHL43501    61 pslglinrwgsvgkkeameiikkfkkdlaamlriinarkerkrrgadtsigivgllltta
AMD61711    61 pslglinrwgsvgkkeameiikkfkkdlaamlriinarkekkrrgadtsvgivgllltta
AMC13911    61 pslglinrwgsvgkkeametikkfkkdlaamlriinarkekkrrgadtsvgivgllltta
AMA12084    61 pslglinrwgsvgkkeameiikkfkkdlaamlriinarkekkrrgadtsvgivgllltta
                |prM-Protein/M-Propeptid 126...214 >>>>
BAP47441   121 maaeitrrgsayymyldrsdagkaisfattlgvnkchvqimdlghmcdatmsyecpmlde
AHL43501   121 maaeitrrgsayymyldrsdagkaisfattlgvnkchvqimdlghmcdatmsyecpmlde
AMD61711   121 mavevtrrgsayymyldrsdageaisfpttlgmnkcyiqimdlghmcdatmsyecpmlde
AMC13911   121 maaevtrrgsayymyldrndageaisfpttlgmnkcyiqimdlghmcdatmsyecpmlde
AMA12084   121 maaevtrrgsayymyldrndageaisfpttlgmnkcyiqimdlghmcdatmsyecpmlde
                                          |M-Protein 216...290 >>>>
BAP47441   181 gvepddvdcwcnttstwvvygtchhkkgearrsrravtlpshstrklqtrsqtwlesrey
AHL43501   181 gvepddvdcwcnttstwvvygtcqhkkgearrsrravtlpshstrklqtrsqtwlesrey
AMD61711   181 gvepddvdcwcnttstwvvygtchhkkgearrsrravtlpshstrklqtrsqtwlesrey
AMC13911   181 gvepddvdcwcnttstwvvygtchhkkgearrsrravtlpshstrklqtrsqtwlesrey
AMA12084   181 gvepddvdcwcnttstwvvygtchhkkgearrsrravtlpshstrklqtrsqtwlesrey
                                                    |E-Protein   291...794
>>>>
BAP47441   241 tkhlikvenwifrnpgfalvavaiawllgsstsqkviylvmilliapaysircigvsnrd
AHL43501   241 tkhlikvenwifrnpgfalvavaiawllgsstsqkviylvmilliapaysircigvsnrd
AMD61711   241 tkhlirvenwifrnpgfalaaaviawllgsstsqkviylvmilliapaysircigvsnrd
AMC13911   241 tkhlirvenwifrnpgfalaaaaiawllgsstsqkviylvmilliapaysircigvsnrd
AMA12084   241 tkhlirvenwifrnpgfalaaaaiawllgsstsqkviylvmilliapaysircigvsnrd

BAP47441   301 fvegmsggtwvdvvlehggcvtvmaqdkptvdielvtttvsnmaevrsycyeasisdmas
AHL43501   301 fvegmsggtwvdvvlehggcvtvmaqdkptvdielvtttvsnmaevrsycyeasisdmas
AMD61711   301 fvegmsggtwvdvvlehggcvtvmaqdkptvdielvtttvsnmaevrsycyeasisdmas
AMC13911   301 fvegmsggtwvdvvlehggcvtvmaqdkptvdielvtttvsnmaevrsycyeasisdmas
AMA12084   301 fvegmsggtwvdvvlehggcvtvmaqdkptvdielvtttvsnmaevrsycyeasisdmas

BAP47441   361 dsrcptqgeayldkqsdtqyvckrtlvdrgwgngcglfgkgslvtcakftcskkmtgksi
AHL43501   361 dsrcptqgeayldkqsdtqyvckrtlvdrgwgngcglfgkgslvtcakftcskkmtgksi
AMD61711   361 dsrcptqgeayldkqsdtqyvckrtlvdrgwgngcglfgkgslvtcakfacskkmtgksi
AMC13911   361 dsrcptqgeayldkqsdtqyvckrtlvdrgwgngcglfgkgslvtcakfacskkmtgksi
AMA12084   361 dsrcptqgeayldkqsdtqyvckrtlvdrgwgngcglfgkgslvtcakfacskkmtgksi

BAP47441   421 qpenleyrimlsvhgsqhsgmtvndigyetdenrakvevtpnspraeatlggfgslgldc
AHL43501   421 qpenleyrimlsvhgsqhsgmivndighetdenrakvevtpnspraeatlggfgslgldc
AMD61711   421 qpenleyrimlsvhgsqhsgmivndtghetdenrakveitpnspraeatlggfgslgldc
AMC13911   421 qpenleyrimlsvhgsqhsgmivndtghetdenrakveitpnspraeatlggfgslgldc
AMA12084   421 qpenleyrimlsvhgsqhsgmivndtghetdenrakveitpnspraeatlggfgslgldc

BAP47441   481 eprtgldfsdlyyltmnnkhwlvhkewfhdiplpwhagadtgtphwnnkealvefkdaha
AHL43501   481 eprtgldfsdlyyltmnnkhwlvhkewfhdiplpwhagadtgtphwnnkealvefkdaha
AMD61711   481 eprtgldfsdlyyltmnnkhwlvhkewfhdiplpwhagadtgtphwnnkealvefkdaha
AMC13911   481 eprtgldfsdlyyltmnnkhwlvhkewfhdiplpwhagadtgtphwnnkealvefkdaha
AMA12084   481 eprtgldfsdlyyltmnnkhwlvhkewfhdiplpwhagadtgtphwnnkealvefkdaha
```

```
BAP47441  541 krqtvvvlgsqegavhtalagaleaemdgakgklfsghlkcrlkmdklrlkgvsyslcta
AHL43501  541 krqtvvvlgsqegavhtalagaleaemdgakgrlfsghlkcrlkmdklrlkgvsyslcta
AMD61711  541 krqtvvvlgsqegavhtalagaleaemdgakgrlssghlkcrlkmdklrlkgvsyslcta
AMC13911  541 krqtvvvlgsqegavhtalagaleaemdgakgrlssghlkcrlkmdklrlkgvsyslcta
AMA12084  541 krqtvvvlgsqegavhtalagaleaemdgakgrlssghlkcrlkmdklrlkgvsyslcta
                  |EIII-Domäne/ C-Terminus des E-Proteins 601…693 >>>>
BAP47441  601 aftftkvpaetlhgtvtvevqyagtdgpckipvqmavdmqtltpvgrlitanpviteste
AHL43501  601 vctaakvpaetlhgtvtvevqyagtdgpckvpaqmavdmqtltpvgrlitanpviteste
AMD61711  601 aftftkipaetlhgtvtvevqyagtdgpckvpaqmavdmqtltpvgrlitanpviteste
AMC13911  601 aftftkipaetlhgtvtvevqyagtdgpckvpaqmavdmqtltpvgrlitanpviteste
AMA12084  601 aftftkipaetlhgtvtvevqyagtdgpckvpaqmavdmqtltpvgrlitanpviteste
                                                    |Anker/ „stem" des E-Proteins
698…794> BAP47441  661 nskmmleldppfgdsyivigvgdkkithhwhrsgstigkafeatvrgakrmavlgdtawd
AHL43501  661 nskmmleldppfgdsyivigvgdkkithhwhrsgstigkafeatvrgakrmavlgdtawd
AMD61711  661 nskmmleldppfgdsyivigvgekkithhwhrsgstigkafeatvrgakrmavlgdtawd
AMC13911  661 nskmmleldppfgdsyivigvgekkithhwhrsgstigkafeatvrgakrmavlgdtawd
AMA12084  661 nskmmleldppfgdsyivigvgekkithhwhrsgstigkafeatvrgakrmavlgdtawd

BAP47441  721 fgsvggvfnslgkgihqifgaafkslfggmswfsqiligtllvwlglntkngsisltcla
AHL43501  721 fgsvggvfnslgkgihqifgaafkslfggmswfsqiligtllvwlglntkngsisltcla
AMD61711  721 fgsvggalnslgkgihqifgaafkslfggmswfsqiligtllvwlglntkngsisltcla
AMC13911  721 fgsvggalnslgkgihqifgaafkslfggmswfsqiligtllmwlglntkngsislmcla
AMA12084  721 fgsvggalnslgkgihqifgaafkslfggmswfsqiligtllmwlglntkngsislmcla
                          |NS1 796…1148 >>>>
BAP47441  781 lggvmiflstavsadvgcsvdfskketrcgtgvfiyndveawrdrykyhpdsprrlaaav
AHL43501  781 lggvmiflstavsadvgcsvdfskketrcgtgvfvyndveawrdrykyhpdsprrlaaav
AMD61711  781 lggvliflstavsadvgcsvdfskketrcgtgvfvyndveawrdrykyhpdsprrlaaav
AMC13911  781 lggvliflstavsadvgcsvdfskketrcgtgvfvyndveawrdrykyhpdsprrlaaav
AMA12084  781 lggvliflstavsadvgcsvdfskketrcgtgvfvyndveawrdrykyhpdsprrlaaav

BAP47441  841 kqaweegicgissvsrmenimwksvegelnaileengvqltvvvgsvknpmwrgpqrlpv
AHL43501  841 kqaweegicgissvsrmenimwksvegelnaileengvqltvvvgsvknpmwrgpqrlpv
AMD61711  841 kqawedgicgissvsrmenimwrsvegelnaileengvqltvvvgsvknpmwrgpqrlpv
AMC13911  841 kqawedgicgissvsrmenimwrsvegelnaileengvqltvvvgsvknpmwrgpqrlpv
AMA12084  841 kqawedgicgissvsrmenimwrsvegelnaileengvqltvvvgsvknpmwrgpqrlpv

BAP47441  901 pvnelphgwkawgksyfvraaktnnsfvvdgdtlkecplehrawnsflvedhgfgvfhts
AHL43501  901 pvnelphgwkawgksyfvraaktnnsfvvdgdtlkecplkhrawnsflvedhgfgifhts
AMD61711  901 pvnelphgwkawgksyfvraaktnnsfvvdgdtlkecplkhrawnsflvedhgfgvfhts
AMC13911  901 pvnelphgwkawgksyfvraaktnnsfvvdgdtlkecplkhrawnsflvedhgfgvfhts
AMA12084  901 pvnelphgwkawgksyfvraaktnnsfvvdgdtlkecplkhrawnsflvedhgfgvfhts

BAP47441  961 vwlkvredyslecdpavigtavkgreaahsdlgywieseknd twrlkrahliemktcewp
AHL43501  961 vwlkvredyslecdpavigtavkgkeaahsdlgywieseknd twrlrrahliemktcewp
AMD61711  961 vwlkvredyslecdpavigtaakgkeavhsdlgywieseknd twrlkrahliemktcewp
AMC13911  961 vwlkvredyslecdpavigtavkgkeavhsdlgywieseknd twrlkrahliemktcewp
AMA12084  961 vwlkvredyslecdpavigtavkgkeavhsdlgywieseknd twrlkrahliemktcewp

BAP47441  1021 kshtlwtdgveesdliipkslagplshhntregyrtqvkgpwhseeleirfeecpgtkvy
AHL43501  1021 kshtlwtdgveesdliipkslagplshhntregyrtqvkgpwhseeleirfeecpgtkvh
AMD61711  1021 kshtlwtdgveesdliipkslagplshhntregyrtqmkgpwhseeleirfeecpgtkvh
AMC13911  1021 kshtlwtdgieesdliipkslagplshhntregyrtqmkgpwhseeleirfeecpgtkvh
AMA12084  1021 kshtlwtdgieesdliipkslagplshhntregyrtqmkgpwhseeleirfeecpgtkvh

BAP47441  1081 veetcgtrgpslrsttasgrvieewccrectmpplsfrakdgcwygmeirprkepesnlv
AHL43501  1081 veetcgtrgpslrsttasgrvieewccrectmpplsfrakdgcwygmeirprkepesnlv
AMD61711  1081 veetcgtrgpslrsttasgrvieewccrectmpplsfrakdgcwygmeirprkepesnlv
AMC13911  1081 veetcgtrgpslrsttasgrvieewccrectmpplsfrakdgcwygmeirprkepesnlv
AMA12084  1081 veetcgtrgpslrsttasgrvieewccrectmpplsfrakdgcwygmeirprkepesnlv

BAP47441  1141 rsmvtagstdhmdhfslgvlvillmvqeglkkrmttkiimstsmavlvvmilggfsmsdl
AHL43501  1141 rsmvtagstdhmdhfslgvlvillmvqeglkkrmttkiimstsmavlvamvlggfsmsdl
AMD61711  1141 rsmvtagstdhmdhfslgvlvillmvqeglkkrmttkiiistsmavlvamilggfsmsdl
AMC13911  1141 rsmvtagstdhmdhfslgvlvillmvqeglkkrmttkiiistsmavlvamilggfsmsdl
```

```
AMA12084  1141 rsmvtagstdhmdhfslgvlvillmvqeglkkrmttkiiistsmavlvamilggfsmsdl

BAP47441  1201 aklvilmgatfaemntggdvahlalvaafkvrpallvsfifranwtpresmllalascll
AHL43501  1201 aklvilmgatfaemntggdvahlalvaafkvrpallvsfifranwtpresmllalascll
AMD61711  1201 aklailmgatfaemntggdvahlaliaafkvrpallvsfifranwtpresmllalascll
AMC13911  1201 aklailmgatfaemntggdvahlaliaafkvrpallvsfifranwtpresmllalascll
AMA12084  1201 aklailmgatfaemntggdvahlaliaafkvrpallvsfifranwtpresmllalascll
BAP47441  1261 qtaisalegdlmvlingfalawlairamavprtdnialpilaaltplargtllvawragl
AHL43501  1261 qtaisalegelmvlvngfalawlairamavprtdnialailaaltplargtllvawragl
AMD61711  1261 qtaisalegdlmvlingfalawlairamvvprtdnitlailaaltplargtllvawragl
AMC13911  1261 qtaisalegdlmvlingfalawlairamvvprtdnitlailaaltplargtllvawragl
AMA12084  1261 qtaisalegdlmvlingfalawlairamvvprtdnitlailaaltplargtllvawragl

BAP47441  1321 atcggimllslkgkgsvkknlpfvmalgltavrvvdpinvvgllllltrsgkrswppsevl
AHL43501  1321 atcggfmllslkgkgsvkknlpfvmalgltavrivdpinvvgllllltrsgkrswppsevl
AMD61711  1321 atcggfmllslkgkgsvkknlpfvmalgltavrlvdpinvvgllllltrsgkrswppsevl
AMC13911  1321 atcggfmllslkgkgsvkknlpfvmalgltavrlvdpinvvgllllltrsgkrswppsevl
AMA12084  1321 atcggfmllslkgkgsvkknlpfvmalgltavrlvdpinvvgllllltrsgkrswppsevl

BAP47441  1381 tavglicalaggfakadiemagpmaavgllivsyvvsgksvdmyieragditwekdaevt
AHL43501  1381 tavglicalaggfakadiemagpmaavgllivsyvvsgksvdmyieragditwekdxevt
AMD61711  1381 tavglicalaggfakadiemagpmaavgllivsyvvsgksvdmyieragditwekdaeit
AMC13911  1381 tavglicalaggfakadiemagpmaavgllivsyvvsgksvdmyieragditwekdaevt
AMA12084  1381 tavglicalaggfakadiemagpmaavgllivsyvvsgksvdmyieragditwekdaevt

BAP47441  1441 gnsprldvaldesgdfslveedgppmreiilkvvlmaicgmnpiaipfaagawyvyvktg
AHL43501  1441 gnsprldvaldesgdfslveedgppmreiilkvvlmaicgmnpiaipfaagawyvyvktg
AMD61711  1441 gnsprldvaldesgdfslveddgppmreiilkvvlmticgmnpiaipfaagawyvyvktg
AMC13911  1441 gnsprldvaldesgdfslveddgppmreiilkvvlmticgmnpiaipfaagawyvyvktg
AMA12084  1441 gnsprldvaldesgdfslveddgppmreiilkvvlmticgmnpiaipfaagawyvyvktg

BAP47441  1501 krsgalwdvpapkevkkgettdgvyrvmtrrllgstqvgvgvmqegvfhtmwhvtkgaal
AHL43501  1501 krsgalwdvpapkevkkgettdgvyrvmtrrllgstqvgvgvmqegvfhtmwhvtkgaal
AMD61711  1501 krsgalwdvpapkevkkgettdgvyrvmtrrllgstqvgvgvmqegvfhtmwhvtkgsal
AMC13911  1501 krsgalwdvpapkevkkgettdgvyrvmtrrllgstqvgvgvmqegvfhtmwhvtkgsal
AMA12084  1501 krsgalwdvpapkevkkgettdgvyrvmtrrllgstqvgvgvmqegvfhtmwhvtkgsal

BAP47441  1561 rsgegrldpywgdvkqdlvsycgpwkldaawdglsevqllavppgerarniqtlpgifkt
AHL43501  1561 rsgegrldpywgdvkqdlvsycgpwkldaawdglsevqllavppgerarniqtlpgifkt
AMD61711  1561 rsgegrldpywgdvkqdlvsycgpwkldaawdghsevqllavppgerarniqtlpgtfkt
AMC13911  1561 rsgegrldpywgdvkqdlvsycgpwkldaawdghsevqllavppgerarniqtlpgifkt
AMA12084  1561 rsgegrldpywgdvkqdlvsycgpwkldaawdghsevqllavppgerarniqtlpgifkt

BAP47441  1621 kdgdigavaldypagtsgspildkcgrviglygngvvikngsyvsaitqgkreeetpvec
AHL43501  1621 kdgdigavaldypagtsgspildkcgrviglygngvvikngsyvsaitqgkreeeapvec
AMD61711  1621 kdgdigavaldypagtsgspildkcgrviglygngvvikngsyvsaitqgrreeetpvec
AMC13911  1621 kdgdigavaldypagtsgspildkcgrviglygngvvikngsyvsaitqgrreeetpvec
AMA12084  1621 kdgdigavaldypagtsgspildkcgrviglygngvvikngsyvsaitqgrreeetpvec

BAP47441  1681 fepsmlkkkqltvldlhpgagktrrvlpeivreaikkrlrtvilaptrvvaaemeealrg
AHL43501  1681 fepsmlrkkqltvldlhpgagktrrvlpeivreaikkrlrtlilaptrvvaaemeealrg
AMD61711  1681 fepsmlkkkqltvldlhpgagktrrvlpeivreaiktrlrtvilaptrvvaaemeealrg
AMC13911  1681 fepsmlkkkqltvldlhpgagktrrvlpeivreaiktrlrtvilaptrvvaaemeealrg
AMA12084  1681 fepsmlkkkqltvldlhpgagktrrvlpeivreaiktrlrtvilaptrvvaaemeealrg

BAP47441  1741 lpvrymttavnvthsgteivdlmchatftsrllqpirvpnynlyimdeahftdpssiaar
AHL43501  1741 lxvrymttavnvthsgteivdlmchatftsrllqpirvpnynlnimdeahftdpssiaar
AMD61711  1741 lpvrymttavnvthsgteivdlmchatftsrllqpirvpnynlyimdeahftdpssiaar
AMC13911  1741 lpvrymttavnvthsgteivdlmchatftsrllqpirvpnynlyimdeahftdpssiaar
AMA12084  1741 lpvrymttavnvthsgteivdlmchatftsrllqpirvpnynlyimdeahftdpssiaar

BAP47441  1801 gyistrvemgeaaaifmtatppgtrdafpdsnspimdtevevperawssgfdwvtdhsgk
AHL43501  1801 gyistrvemgeaaaifmtatppgtrdafpdsnspimdtevevperawssgfdwvtdhsgk
AMD61711  1801 gyistrvemgeaaaifmtatppgtrdafpdsnspimdtevevperawstgfdwvtdhsgk
AMC13911  1801 gyistrvemgeaaaifmtatppgtrdafpdsnspimdtevevperawssgfdwvtdhsgk
```

```
AMA12084  1801 gyistrvemgeaaaifmtatppgtrdafpdsnspimdtevevperawssgfdwvtdhsgk

BAP47441  1861 tvwfvpsvrngneiaacltkagkrviqlsrktfetefqktknqewdfvittdisemganf
AHL43501  1861 tiwfvpsvrsgeesaacltkagkrviqlsrktfetefqktknqewdfvittdisemganf
AMD61711  1861 tvwfvpsvrngneiaacltkagkrviqlsrktfetefqktknqewdfvvttdisemganf
AMC13911  1861 tvwfvpsvrngneiaacltkagkrviqlsrktfetefqktkhqewdfvvttdisemganf
AMA12084  1861 tvwfvpsvrngneiaacltkagkrviqlsrktfetefqktkhqewdfvvttdisemganf


BAP47441  1921 kadrvidsrrclkpvildgervilagpmpvthasaaqrrgrigrnpnkpgdeymygggca
AHL43501  1921 kadrvidsrrclkpvildgervilagpmpvthasaaqrrgrigrnpnkpgdeymygggca
AMD61711  1921 kadrvidsrrclkpvildgervilagpmpvthasaaqrrgrigrnpnkpgdeylygggca
AMC13911  1921 kadrvidsrrclkpvildgervilagpmpvthasaaqrrgrigrnpnkpgdeylygggca
AMA12084  1921 kadrvidsrrclkpvildgervilagpmpvthasaaqrrgrigrnpnkpgdeylygggca

BAP47441  1981 etdeghahwlearmlldniylqdgliaslyrpeadkvaaiegefklrteqrktfvelmkr
AHL43501  1981 etdedhahwlearmlldniylqdgliaslyrpeadkvaaiegefklrteqrktfvelmkr
AMD61711  1981 etdedhahwlearmlldniylqdgliaslyrpeadkvaaiegefklrteqrktfvelmkr
AMC13911  1981 etdedhahwlearmlldniylqdgliaslyrpeadkvaaiegefklrteqrktfvelmkr
AMA12084  1981 etdedhahwlearmlldniylqdgliaslyrpeadkvaaiegefklrteqrktfvelmkr

BAP47441  2041 gdlpvwlayqvasagitytdrrwcfdgttnntimedsvpaevwtkygekrvlkprwmdar
AHL43501  2041 gdlpvwlayqvasagitytdrrwcfdgttnntimedsvpaevwtkygekrvlkprwmdar
AMD61711  2041 gdlpvwlayqvasagitytdrrwcfdgmtnntimedsvpaevwtrygekrvlkprwmdar
AMC13911  2041 gdlpvwlayqvasagitytdrrwcfdgttnntimedsvpaevwtrhgekrvlkprwmdar
AMA12084  2041 gdlpvwlayqvasagitytdrrwcfdgttnntimedsvpaevwtrhgekrvlkprwmdar

BAP47441  2101 vcsdhaalksfkefaagkrgaalgvmealgtlpghmterfqeaidnlavlmraetgsrpy
AHL43501  2101 vcsdhaalksfkefaagkrgaalgvmdalgtlpghmterfqeaidnlavlmraetgsrpy
AMD61711  2101 vcsdhaalksfkefaagkrgaafgviealgtlpghmterfqeaidnlavlmraetgsrpy
AMC13911  2101 vcsdhaalksfkefaagkrgaafgvmealgtlpghmterfqeaidnlavlmraetgsrpy
AMA12084  2101 vcsdhaalksfkefaagkrgaafgvmealgtlpghmterfqeaidnlavlmraetgsrpy

BAP47441  2161 kaaaaqlpetletimllgllgtvslgiffvlmrnkgigkmgfgmvtlgasawlmwlseie
AHL43501  2161 kaaaaqlpetletimllgllgtvslgiffvlmrnkgigkmgfgmvtlgasawlmwlseie
AMD61711  2161 kaaaaqlpetletimllgllgtvslgiffvlmrnkgmgkmgfgmvtlgasawlmwlseie
AMC13911  2161 kaaaaqlpetletimllgllgtvslgiffvlmrnkgigkmgfgmvtlgasawlmwlseie
AMA12084  2161 kaaaaqlpetletimllgllgtvslgiffvlmrnkgigkmgfgmvtlgasawlmwlseie

BAP47441  2221 pariacvlivvflllvvlipepekqrspqdnqmaiiimvavgllglitanelgwlertkn
AHL43501  2221 pariacvlivvflllvvlipepekqrspqdnqmaiiimvavgllglitanelgwlertks
AMD61711  2221 pariacvlivvflllvvlipepekqrspqdnqmaiiimvavgllglitanelgwlertks
AMC13911  2221 pariacvlivvflllvvlipepekqrspqdnqmaiiimvavgllglitanelgwlertks
AMA12084  2221 pariacvlivvflllvvlipepekqrspqdnqmaiiimvavgllglitanelgwlertks

BAP47441  2281 diahlmgrreegatmgfsmdidlrpasawaiyaalttlitpavqhavttsynnyslmama
AHL43501  2281 diahlmgrkeegttigfsmdidlrpasawaiyaalttlitpavqhavttsynnyslmama
AMD61711  2281 dlshlmgrreegattgfsmdidlrpasawaiyaalttfitpavqhavttsynnyslmama
AMC13911  2281 dlshlmgrreegatigfsmdidlrpasawaiyaalttfitpavqhavttsynnyslmama
AMA12084  2281 dlshlmgrreegatigfsmdidlrpasawaiyaalttfitpavqhavttsynnyslmama

BAP47441  2341 tqagvlfgmgkgmpfyawdlgvpllmmgcysqltpltlivaiillvahymylipglqaaa
AHL43501  2341 tqagvlfgmgkgmpfyawdfgvpllmmgcysqltpltlivaiillvahymylipglqaaa
AMD61711  2341 tqagvlfgmgkgmpfyawdfgvpllmmgcysqltpltlivaiillvahymylipglqaaa
AMC13911  2341 tqagvlfgmgkgmpfyawdfgvpllmigcysqltpltlivaiillvahymylipglqaaa
AMA12084  2341 tqagvlfgmgkgmpfyawdfgvpllmigcysqltpltlivaiillvahymylipglqaaa

BAP47441  2401 araaqkrtaagimknpvvdgivvtdidtmtidpqvekkmgqvlliavaissavllrtawg
AHL43501  2401 araaqkrtaagimknpvvdgivvtdidtmtidpqvekkmgqvlliavavssavllrtawg
AMD61711  2401 araaqkrtaagimknpvvdgivvtdidtmtidpqvekkmgqvlliavavssailsrtawg
AMC13911  2401 araaqkrtaagimknpvvdgivvtdidtmtidpqvekkmgqvlliavavssailsrtawg
AMA12084  2401 araaqkrtaagimknpvvdgivvtdidtmtidpqvekkmgqvlliavavssailsrtawg

BAP47441  2461 wgeagalitaatstlwegspnkywnsstatslcnifrgsylagasliytvtrnaglvkrr
AHL43501  2461 wgeagalitaatstlwegspnkywnsstatslcnifrgsylagasliytvtrnaglvkrr
```

```
AMD61711  2461 wgeagalitaatstlwegspnkywnsstatslcnifrgsylagasliytvtrnaglvkrr
AMC13911  2461 wgeagalitaatstlwegspnkywnsstatslcnifrgsylagasliytvtrnaglvkrr
AMA12084  2461 wgeagalitaatstlwegspnkywnsstatslcnifrgsylagasliytvtrnaglvkrr

BAP47441  2521 gggtgetlgekwkarlnqmsalefysykksgitevcreearralkdgvatgghavsrgsa
AHL43501  2521 gggtgetlgekwkarlnqmsalefysykksgitevcreearralkdgvatgghavsrgsa
AMD61711  2521 gggtgetlgekwkarlnqmsalefysykksgitevcreearralkdgvatgghavsrgsa
AMC13911  2521 gggtgetlgekwkarlnqmsalefysykksgitevcreearralkdgvatgghavsrgsa
AMA12084  2521 gggtgetlgekwkarlnqmsalefysykksgitevcreearralkdgvatgghavsrgsa


BAP47441  2581 klrwlvergylqpygkvvdlgcgrggwsyyaatirkvqevrgytkggpgheepmlvqsyg
AHL43501  2581 klrwlvergylqphgkvvdlgcgrggwsyyaatirkvqevrgytkggpgheepmlvqsyg
AMD61711  2581 klrwlvergylqpygkvidlgcgrggwsyyaatirkvqevkgytkggpgheepmlvqsyg
AMC13911  2581 klrwlvergylqpygkvidlgcgrggwsyyvatirkvqevkgytkggpgheepvlvqsyg
AMA12084  2581 klrwlvergylqpygkvidlgcgrggwsyyaatirkvqevkgytkggpgheepvlvqsyg

BAP47441  2641 wnivrlksgvdvfhmaaepcdtllcdigesssspeveetrtlrvlsmvgdwlekrpgafc
AHL43501  2641 wnivrlksgvdvfhmaaepcdtllcdigesssspeveetrtlrvlsmvgdwlekrpgafc
AMD61711  2641 wnivrlksgvdvfhmaaepcdtllcdigesssspeveeartlrvlsmvgdwlekrpgafc
AMC13911  2641 wnivrlksgvdvfhmaaepcdtllcdigesssspeveeartlrvlsmvgdwlekrpgafc
AMA12084  2641 wnivrlksgvdvfhmaaepcdtllcdigesssspeveeartlrvlsmvgdwlekrpgafc

BAP47441  2701 ikvlcpytstmmetmerlqrrhggglvrvplsrnsthemywvsgaksniiksvsttsqll
AHL43501  2701 ikvlcpytstmmetmerlqrrhggglvrvplsrnsthemywvsgaksniiksvsttsqll
AMD61711  2701 ikvlcpytstmmetlerlqrryggglvrvplsrnsthemywvsgaksntiksvsttsqll
AMC13911  2701 ikvlcpytstmmetlerlqrryggglvrvplsrnsthemywvsgaksntiksvsttsqll
AMA12084  2701 ikvlcpytstmmetlerlqrryggglvrvplsrnsthemywvsgaksntiksvsttsqll

BAP47441  2761 lgrmdgprrpvkyeedvnlgsgtravascaeapnmkiigrrierirnehaetwfldenhp
AHL43501  2761 lgrmdgprrpvkyeedvnlgsgtravascaeapnmkiigrrierirnehaetwffdenhp
AMD61711  2761 lgrmdgprrpvkyeedvnlgsgtravvscaeapnmkiignrierirsehaetwffdenhp
AMC13911  2761 lgrmdgprrpvkyeedvnlgsgtravvscaeapnmkiignrierirsehaetwffdenhp
AMA12084  2761 lgrmdgprrpvkyeedvdlgsgtravvscaeapnmkiignrierirsehaetwffdenhp

BAP47441  2821 yrtwayhgsyeaptqgsasslvngvvrllskpwdvvtgvtgiamtdttpygqqrvfkekv
AHL43501  2821 yrtwayhgsyeaptqgsasslvngvvrllskpwdvvtgvtgiamtdttpygqqrvfkekv
AMD61711  2821 yrtwayhgsyeaptqgsasslingvvrllskpwdvvtgvtgiamtdttpygqqrvfkekv
AMC13911  2821 yrtwayhgsyeaptqgsasslingvvrllskpwdvvtgvtgiamtdttpygqqrvfkekv
AMA12084  2821 yrtwayhgsyeaptqgsasslingvvrllskpwdvvtgvtgiamtdttpygqqrvfkekv

BAP47441  2881 dtrvpdpqegtrqvmnivsswlwkelgkrkrprvctkeefinkvrsnaalgaifeeekew
AHL43501  2881 dtrvpdpqegtrqvmnmvsswlwkelgkrkrprvctkeefinkvrsnaalgaifeeekew
AMD61711  2881 dtrvpdpqegtrqvmsmvsswlwkelgkhkrprvctkeefinkvrsnaalgaifeeekew
AMC13911  2881 dtrvpdpqegtrqvmsmvsswlwkelgkhkrprvctkeefinkvrsnaalgaifeeekew
AMA12084  2881 dtrvpdpqegtrqvmsmvsswlwkelgkhkrprvctkeefinkvrsnaalgaifeeekew

BAP47441  2941 ktaveavndprfwalvdrerehhlrgechscvynmmgkrekkqgefgkakgsraiwymwl
AHL43501  2941 ktaveavndprfwalvdkerehhlrgechscvynmmgkrekkqgefgkakgsraiwymwl
AMD61711  2941 ktaveavndprfwalvdkerehhlrgecqscvynmmgkrekkqgefgkakgsraiwymwl
AMC13911  2941 ktaveavndprfwalvdkerehhlrgecqscvynmmgkrekkqgefgkakgsraiwymwl
AMA12084  2941 ktaveavndprfwalvdkerehhlrgecqscvynmmgkrekkqgefgkakgsraiwymwl

BAP47441  3001 garflefealgflnedhwmgrensgggveglglqrlgyileemnrapggkmyaddtagwd
AHL43501  3001 garflefealgflnedhwmgrensgggveglglqrlgyileemnrapggkmyaddtagwd
AMD61711  3001 garflefealgflnedhwmgrensgggveglglqrlgyvleemsripggrmyaddtagwd
AMC13911  3001 garflefealgflnedhwmgrensgggveglglqrlgyvleemsripggrmyaddtagwd
AMA12084  3001 garflefealgflnedhwmgrensgggveglglqrlgyvleemsripggrmyaddtagwd

BAP47441  3061 triskfdlenealitnqmeeghrtlalavikytyqnkvvkvlrpaeggktvmdiisrqdq
AHL43501  3061 triskfdlenealitnqmeeghralalavikytyqnkvvkvlrpaeggktvmdiisrqdq
AMD61711  3061 trisrfdlenealitnqmekghralalaiikytyqnkvvkvlrpaekgktvmdiisrqdq
AMC13911  3061 trisrfdlenealitnqmekghralalaiikytyqnkvvkvlrpaekgktvmdiisrqdq
AMA12084  3061 trisrfdlenealitnqmekghralalaiikytyqnkvvkvlrpaekgktvmdiisrqdq
```

```
BAP47441  3121 rgsgqvvtyalntftnlvvqlirnmeaeevlemqdlwllrkpekvtrwlqsngwdrlkrm
AHL43501  3121 rgsgqvvtyalntftnlvvqlirnmeaeevlemhdlwllrkpekvtrwlqsngwdrlkrm
AMD61711  3121 rgsgqvvtyalntftnlvvqlirnmeaeevlemqdlwllrrpekvtnwlqsngwdrlkrm
AMC13911  3121 rgsgqvvtyalntftnlvvqlirnmeaeevlemqdlwllrrsekvtnwlqsngwdrlkrm
AMA12084  3121 rgsgqvvtyalntftnlvvqlirnmeaeevlemqdlwllrrsekvtnwlqsngwdrlkrm

BAP47441  3181 avsgddcvvkpiddrfahalrflndmgkvrkdtqewkpstgwsnweevpfcshhfnklyl
AHL43501  3181 avsgddcvvkpiddrfahalrflndmgkvrkdtqewkpstgwsnweevpfcshhfnklhl
AMD61711  3181 avsgddcvvkpiddrfahalrflndmgkvrkdtqewkpstgwdnweevpfcshhfnklhl
AMC13911  3181 avsgddcvvkpiddrfahalrflndmgkvrkdtqewkpstgwdnweevpfcshhfnklhl
AMA12084  3181 avsgddcvvkpiddrfahalrflndmgkvrkdtqewkpstgwdnweevpfcshhfnklhl


BAP47441  3241 kdgrsivvpcrhqdeligrarvspgagwsiretaclaksyaqmwqllyfhrrdlrlmana
AHL43501  3241 kdgrsivvpcrhqdeligrarvspgagwsiretaclaksyaqmwqllyfhkrdlrlmana
AMD61711  3241 kdgrsivvpcrhqdeligrarvspgagwsiretaclaksyaqmwqllyfhrrdlrlmana
AMC13911  3241 kdgrsivvpcrhqdeligrarvspgagwsiretaclaksyaqmwqllyfhrrdlrlmana
AMA12084  3241 kdgrsivvpcrhqdeligrarvspgagwsiretaclaksyaqmwqllyfhrrdlrlmana

BAP47441  3301 icsavpvdwvptgrttwsihgkgewmttedmlmvwnrvwieendhmedktpvtkwtdipy
AHL43501  3301 icsavpvdwvptgrttwsihgkgewmttedmlmvwnrvwieendhmedktpvtkwtdipy
AMD61711  3301 icssvpvdwvptgrttwsihgkgewmttedmlvvwnrvwieendhmedktpvtkwtdipy
AMC13911  3301 icssvpvdwvptgrttwsihgkgewmttedmlvvwnrvwieendhmedktpvtkwtdipy
AMA12084  3301 icssvpvdwvptgrttwsihgkgewmttedmlvvwnrvwieendhmedktpvtkwtdipy

BAP47441  3361 lgkredlwcgslighrprttwaenikdtvnmvrriigdeekymdylstqvrylgeegstp
AHL43501  3361 lgkredlwcgslighrprttwaenikdtvnmvrriigdeekymdylstqvrylgeegstp
AMD61711  3361 lgkredlwcgslighrprttwaenikntvnmmrriigdeekymdylstqvrylgeegstp
AMC13911  3361 lgkredlwcgslighrprttwaenikntvnmvrriigdeekymdylstqvrylgeegstp
AMA12084  3361 lgkredlwcgslighrprttwaenikntvnmvrriigdeekymdylstqvrylgeegstp

BAP47441  3421 gvl
AHL43501  3421 gvl
AMD61711  3421 gvl
AMC13911  3421 gvl
AMA12084  3421 gvl
```

Abbildung 2:
Sequenzvergleich der gesamten Polyproteine aus ZIKV (BAP47441) und DENV1-4, YFV, WNV, HCV, TBEV, JEV.

```
ZIKV     1 --mknpkkksgg---friv----nmlkrgvarvn-plggl-krlpag--lllghgpirmv
DENV1    1 --mnnqrkktar----psf----nmlkrarnrvs-tvsqlakrfskg--llsgqgpmklv
DENV2    1 --mnnqrkkarn---tpf-----nmlkrernrvs-tvqqltkrfslg--mlqgrgplklf
DENV3    1 --mnnqrkktgk----psi----nmlkrvrnrvs-tgsqlakrfskg--llngqgpmklv
DENV4    1 ---mnqrkk--------vvrppfnmlkrernrvstpqglv-krfstg--lfsgkgplrmv
YFV      1 ---msgrkaqgk---tlgv----nmvrrgvrsls---nki-kqktkq--ignrpgpsrgv
WNV      1 -----mskkpggpgknrav----nmlkrgmprgl-sligl-kramls--lidgkgpirfv
HCV      1 m-stnpkpqrkt---krnt----nrrpqdvk--f-pggg---qivggvyllprrgp-rl-
TBEC     1 mvkkailkgkgg---gppr----rvsketatktr-q--pr-vqmpng--lvl----mrmm
JEV      1 -----mtkkpggpgknrai----nmlkrglprvf-plvgv-krvvms-lldgrgpvrfv

ZIKV    48 lailaflrf---taikpslglinrwgsvgkkeameiikkfkkdlaamlriin--ark-er
DENV1   48 mafiaflrf---laipptagilarwgsfkkngaikvlrgfkkevsnmlnimn--rrk-r-
DENV2   48 malvaflrf---ltipptagilkrwgtikkskainvlrgfrkeigrmlniln-------r
DENV3   48 mafiaflrf---laipptagvlarwgtfkksgaikvlkgfkkeisnmlsiin--krk-k-
DENV4   47 lafitflrv---lsipptagilkrwgqlkknkaikiltgfrkeigrmlniln--grk-r-
YFV     45 qgfiffflfniltgkkitahlkrlwkmldprqglavlrkvkrvvaslmrgls--srk-rr
WNV     48 lallaffrf---taiaptravldrwrgvnkqtamkhllsfkkelgtltsain--rrstkq
HCV     45 ------------gvratrktsersqprgrrqp----------------ipk--arr-pe
TBEC    44 gilwhavag---tarnpvlkaf--wnsvplkqataalrkikrtvsalm--vg--lqk-rg
JEV     48 lalitffkf---talaptkallgrwkaveksvamkhltsfkrelgtlidavnkrgrk-qn

ZIKV   102 krrga----------dtsi---g---iigllltamaaeitrrgsayymyldrsdagkai
DENV1  101 ----------------sv---t---mllmlmptalafhlttrggephmivskqergksl
DENV2   98 rrrta----------------g---miimliptvmafhlttrngephmivsrqekgksl
DENV3  101 ----------------tsl---c---lm-milpaalafhltsrdgeprmivgknergksl
DENV4  100 ----------------sti---t---ll-cliptvmafhlstrdgeplmivakhergrpl
YFV    102 shdvl----------tvqf---l---ilgmllmtg-gvtlvrknrwlllnvtsedlgktf
WNV    103 kkrgg----------tagf---t---illgliacagavtlsnfqgkvmmtvnatdvtdvi
HCV     73 grtwaqpgypwplygnegc---g---wagwllsp--------rgs---------------
TBEC    94 krrsa----------tdwm---swllvitllgmtlaatvrkerdgstviraegkda----
JEV    104 krggn----------egsimwlt---slavviacagamklsnfqgkllmtinntdiadvi

ZIKV   146 sfattlgvnk--chvqimdlghmcdatmsyecpmld-egvepddvdcwc-nttstwvvyg
DENV1  138 lfktsagvnm--ctliamdlgelcedtmtykcprit-ea-epddvdcwc-natdtwvtyg
DENV2  138 lfktedgvnm--ctlmamdlgelcedtitykcpflr-qn-epedidcwc-nststwvtyg
DENV3  138 lfktasginm--ctliamdlgemcddtvtykcphit-e-vepedidcwc-nltstwvtyg
DENV4  137 lfkttegink--ctliamdlgemcedtvtykcpll--vntepedidcwc-nltsawvmyg
YFV    145 s----vgtgn--cttnileakywcpdsmeyncpnls-preepddidcwcygvenvrvayg
WNV    147 tiptaagknl--civramdvgylcedtityecpvla-agndpedidcwc-tkssvyvryg
HCV    104 --rpswgptd--prrrsrnlgkvid---tltcgfadlmgyip---------------lvg
TBEC   137 --atqvrvengtcvilatdmgswcddslsyecvtid-qgeepvdvdcfcrnvdgvyleyg
JEV    151 viptskgenr--cwvraidvgymcedtityecpklt-agndpedvdcwc-dnqevyvqyg

ZIKV   202 tchhkkgearrsrravtlpshstrklqtrsqtwlesreytkhlikvenwifrnpgfalva
DENV1  193 tc-sqtgehrrdkrsvalaphvglgletrtetwmssegawkqiqrvetwalrhpgftvia
DENV2  193 tc-tttgehrrekrsvalvphvgmgletrtetwmssegawkhaqrietwilrhpgftima
DENV3  193 tc-nqagehrrdkrsvalaphvgmgldtrtqtwmsaegawrqvekvetwalrhpgftila
DENV4  192 tc-tqsgerrrekrsvaltphsgmgletrtetwmssegawkhaqrveswilrkpgfalsa
YFV    198 kc-dsagrsrrsrraidlpthenhglktrqekwmtgrmgerqlqkierwfvrnpffavta
WNV    203 rc-tktrhsrrsrrsltvqthgestlankkgawldstkatrylvkteswilrnpgyalva
HCV    142 a---plggaaral------ahgvrvledg----------------------------vn
TBEC   194 rc--gkqegsrtrrsvlipshaqgeltgrghkwlegdslrthltrvegwvwknkllalam
JEV    207 rctrtr-hskrsrrsvsvqthgesslvnkkeawldstkatryltktenwiirnpgyafla
```

```
                                                |E-Protein 291…794 >>>>
ZIKV  262 vaiawllgsstsqkviylvmilli-apaysir----cigvsnrdfvegmsggtwvdvvle
DENV1 252 lflahaigtsitqkgiifillmlv-tpsmamr----cvgigsrdfveglsgatwvdvvle
DENV2 252 ailaytigtthfqralifilltav-apsmtmr----cigisnrdfvegvsggswvdivle
DENV3 252 lflahyigtsltqkavifillmlv-tpsmtmr----cvgvgnrdfveglsgatwvdvvle
DENV4 251 gfmaymigqtgiqrtvffilmmlv-apsygmr----cvgvgnrdfvegvsggawvdlvle
YFV   257 ltiaylvgsnmtqrvviallvlav-gpaysah----cigitdrdfiegvhggtwvsatle
WNV   262 avigwmlgsntmqrvvfaillllv-apaysfn----clgmsnrdflegvsgatwvdlvle
HCV   164 yatgnlpgcsfsifllallscltvpasayqvrnssglyhvtn-dcpnssivyeaadailh
TBEC  252 vtvvwltlesvvtrvavlvvllcl-apvyasr----cthlenrdfvtgtqgttrvtlvle
JEV   266 avlgwmlgsnngqrvvftillllv-apaysfn----clgmgnrdfiegasgatwvdlvle

ZIKV  317 hggcvtvmaqdkptvdielvtttvsnmaevrsycyeasisdmasdsrcpt-qgeayldkq
DENV1 307 hgscvttmakdkptldiellktevtnpavlrklcieakisntttdsrcpt-qgeatlvee
DENV2 307 hgscvttmaknkptldfelikteakqpatlrkycieakltntttdsrcpt-qgepslnee
DENV3 307 hggcvttmaknkptldielqkteatqlatlrklciegkitnittdsrcpt-qgeavlpee
DENV4 306 hggcvttmaqgkptldfelikttakevallrtycieasisnittatrcpt-qgepylkee
YFV   312 qdkcvtvmapdkpsldisletvaidrpaevrkvcynavlthvkindkcps-tgeahlaee
WNV   317 gdscvtimskdkptidvkmmnmeaanladvrsycylasvsdlstraacpt-mgeahnekr
HCV   223 tpgcvpcvregnasrcwvavtptva----------------trdgklpttqlrrhidll
TBEC  307 lggcvtitaegkpsmdvwldaiyqenpaktreyclhaklsdtkvaarcpt-mgpatlaee
JEV   321 gdscltimandkptldvrminieasqlaevrsycyhasvtdistvarcpt-tgeahnekr

ZIKV  376 sdtqyvckrtlvdrgwgngcg-lfgkgslvtcakftcs--kkmtgksiqpenleyrimls
DENV1 366 qdanfvcrrtfvdrgwgngcg-lfgkgslltcakfkcv--tklegkivqyenlkysvivt
DENV2 366 qdkrfvckhsmvdrgwgngcg-lfgkggivtcamftck--knmkgkvvqpenleytivit
DENV3 366 qdqnyvckhtyvdrgwgngcg-lfgkgslvtcakfqcl--epiegkvvqyenlkytviit
DENV4 365 qdqqyicrrdmvdrgwgngcg-lfgkggvvtcakfscs--gkitgnlvqienleytvvvt
YFV   371 negdnackrtysdrgwgngcg-lfgkgsivacakftca--ksmslfevdqtkiqyviraq
WNV   376 adpafvckqgvvdrgwgngcg-lfgkgsidtcakfact--tkatgwiiqkenikyevaif
HCV   266 vgsatlcsalyv----gdlcgsvflvgqlftf--------------------------
TBEC  366 hgggtvckrdqsdrgwgnhcg-lfgkgsivacvkaaceakkkatghvydankivytvkve
JEV   380 adssyvckqgftdrgwgngcg-lfgkgsidtcakfsct--skaigrtiqpenikyevgif

ZIKV  433 vh-gsqhsgmtvndigyetdenrakvevtpnspraeatlggfgslgldceprtgldfsdl
DENV1 423 vhtgdqh------qvgnestehgttatitpqaptteiqltdygaltldcsprtgldfnem
DENV2 423 phsgeeha------vgndtgkhgkeikitpqssiteaeltgygtvtmecsprtgldfnem
DENV3 423 vhtgdqh------qvgnetqgvta--eitpqastteailpeygtlglecsprtgldfnem
DENV4 422 vhngdtha------vgndtsnhgetatitprspsvevrlpdygeltldceprsgidfnem
YFV   428 lh-------vgakqenwntdiktlkfdalsgsqevefi--gygkatlecqvqtavdfgns
WNV   433 vh-gp----ttveshgkigatqagrfsitpsapsytlklgeygevtvdceprsgidtsay
HCV   294 ------------------------------sprrhwt-----tqdcncsiypg------
TBEC  425 ph-tgdy--vaan----ethsgrktasftissektiltmgeygdvsllcrvasgvdlaqt
JEV   437 vh-gtttsenhgnysaqvgtsqaakftvtpnapsitlklgdygevtldceprsglnteaf

ZIKV  492 yyltmnn--kh----wlvhkewfhdiplpw-hagadtgtphwnnkealvefkdahakrqt
DENV1 477 vlltmke--ks----wlvhkqwfldlplpw-tsgastsqetwnrqdllvtfktahakkqe
DENV2 477 vllqmen--ka----wlvhrqwfldlplpw-lpgadtqgsnwiqketlvtfknphakkqd
DENV3 475 illtmkn--ka----wmvhrqwffdlplpw-tsgattetptwnrkellvtfknahakkqe
DENV4 476 ilmkmkt--kt----wlvhkqwfldlplpw-tagadtsevhwnhkermvtfkvphakrqd
YFV   479 yiaemet--es----wivdrqwaqdltlpw-qsgsg-gv--wremhhlvefepphaatir
WNV   488 yvmsvge--ks----flvhrewfmdlnlpw----ssagsttwrnretlmefeephatkqs
HCV   312 -hitghr--ma----w--------dmmm-----------nwsptaalvv---aqllrip
TBEC  478 vileldktvehlptawqvhrdwfndlalpwkhegaq----nwnnaerlvefgaphavkmd
JEV   496 yvmtvgs--ks----flvhrewfhdlalpw-tspssta---wrnrellmefeeahatkqs

ZIKV  545 vvvlgsqegavhtalagaleaemdgakg---klfsghlkcrlkmdklrlkgvsyslctaa
DENV1 530 vvvlgsqegamhtaltgateiqtsgtt----tifaghlkcrlkmdkltlkgmsyvmctgs
DENV2 530 vvvlgsqegamhtaltgateiqmssg-n---llftghlkcrlrmdklqlkgmsysmctgk
DENV3 528 vvvlgsqegamhtaltgateiqnsggts----ifaghlkcrlkmdklelkgmsyamctnt
DENV4 529 vtvlgsqegamhsalagatevd-sgdgn---hmfaghlkckvrmeklrikgmsytmcsgk
YFV   529 vlalgnqegslktaltgamrvtkdtndnnlyklhgghvscrvklsaltlkgtsykictdk
WNV   538 vvalgsqegalhqalagaipvefssntv---kltsghlkcrvkmeklqlkgttygvcska
HCV   342 qaimdmiagahwgvlagiayfsmvgnwa---kvl----------------------vvl
```

```
TBEC  534 vynlgdqtgvllkalagvpvahiegtky---hlksghvtcevgleklkmkgltytmcdkt
JEV   546 vvalgsqegglhqalagaivveysssv----kltsghlkcrlkmdklalkgttygmctek
```

```
                |EIII-Domäne/ C-Terminus des E-Proteins 601…693 >>>>
ZIKV  602 -ftftkvpaetlhgtvtvevqyagtdgpckipvqmavdmqtltpvgrlitanpviteste
DENV1 586 -fklekevaetqhgtvlvqikyegtdapckipfs-tqdekgvtqngrlitanpivtd--k
DENV2 586 -fkvvkeiaetqhgtivirvqyegdgspckipfei-mdlekrhvlgrlitvnpivte--k
DENV3 584 -fvlkkevsetqhgtilikveykgedvpckipfs-tedgqgkahngrlitanpvvtkkee
DENV4 585 -fsidkemaetqhgttvvkvkyegtgapckvpieir-dvnkekvvgriisstp-faent-
YFV   589 -mffvknptdtghgtvvmqvk-vskgapcripvivaddltaainkgilvtvnpia--stn
WNV   595 -fkfartpadtghgtvvlelqytgtdgpckvpissvaslndltpvgrlvtvnpfvsvata
HCV   376 -llfagvdaet-hvt-------ggsag----------rttaglvgll----------tp
TBEC  591 kftwkraptdsghdtvvmevtfsgtk-pcripvravahgspdvnvamlitpnpti---en
JEV   602 -fsfaknpadtghgtvvielsysgsdgpckipivsvaslndmtpvgrlvtvnpfvaassa
                                    |Anker/ „stem" des E-Proteins 698…794>
ZIKV  661 nskmmleldppfgdsyivigvgdkkithhwhrsgstigkafeatvrgakrmavlgdtawd
DENV1 642 ekpvnieaeppfgesyivigagekalklswfkkgssigkmfeatargarrmailgdtawd
DENV2 642 dspvnieaeppfgdsyiiigvepgqlklnwfkkgssigqmiettmrgakrmailgdtawd
DENV3 642 --pvnieaeppfgesnivigigdnalkinwykkgssigkmfeatargarrmailgdtawd
DENV4 641 nsvtnieleppfgdsyivigagdsaltlhwfrkgssigkmfestyrgakrmailgetawd
YFV   645 ddevlievnppfgdsyiivgrgdsrltyqwhkegssigklftqtmkgverlavmgdtawd
WNV   654 nskvlieleppfgdsyivvgrgeqqinhhwhksgssigkaftttlrgaqrlaalgdtawd
HCV   406 gakqniqlintngs--------------wh-instalncnesl----------ntgw-
TBEC  647 ngggfiemqlppgdniiyvg----elshqwfqkgssigrvfqktkkgierltvigehawd
JEV   661 nskvlvemeppfgdsyivvgrgdkqinhhwhragstlgkafsttlkgaqrlaalgdtawd

ZIKV  721 fgsvggvfnslgkgihqifgaafkslfggmswfsqiligtllvwlglntkngsisltcla
DENV1 702 fgsiggvftsvgklvhqifgtaygvlfsgvswtmkigigvlltwlglnsrstslsmtcia
DENV2 702 fgslggvftsigkalhqvfgaiygaafsgvswtmkiligviitwigmnsrstslsvslvl
DENV3 700 fgsvggvlnslgkmvhqifgsaytalfsgvswvmkigigvlltwiglnskntsmsfscia
DENV4 701 fgsvgglltslgkavhqvfgsvyttmfggvswmvriligllvlwigtnsrntsmamsciv
YFV   705 fssaggfftsvgkgihtvfgsafqglfgglnwitkvimgavliwvgintrnmtmsmsmil
WNV   714 fgsvggvftsvgkaihqvfggafrslfggmswitqgllgalllwmginardrsiamtfla
HCV   438 ---laglf-------------yqhkfnssgcperl------------------ascrr
TBEC  703 fgsaggflssigkavhtvlggafnsifggvgflpklllgvalawlglnmrnptmsmsfll
JEV   721 fgsiggvfnsigkavhqvfggafrtlfggmswitqglmgalllwmgvnardrsialafla
                          |NS1 796…1148 >>>>
ZIKV  781 lggvmiflstavsadvgcsvdfskketrcgtgvfiyndveawrdr-ykyh-pdsprrlaa
DENV1 762 vglvtlylgvmvqadsgcvinwkgrelkcgsgifvtnevhtwteq-ykfq-adspkrlsa
DENV2 762 vgvvtlylgvmvqadsgcvvswknkelkcgsgifitdnvhtwteq-ykfq-pespsklas
DENV3 760 igiitlylgavvqadmgcvinwkgkelkcgsgifvtnevhtwteq-ykfq-adspkrlat
DENV4 761 vggitlflgftvhadmgcvvswsgkelkcgsgifvidnvhtwteq-ykfq-pesparlas
YFV   765 vgvimmflslgvgadqgcainfgkrelkcgdgififrdsddwlnk-ysyy-pedpvklas
WNV   774 vggvllflsvnvhadtgcaidigrqelrcgsgvfihndveawmdr-ykfy-petpqglak
HCV   462 l------------------tdfaq-----gwgpisyangsglderpycwhyppрp-----
TBEC  763 agglvlamtlgvgadvgcavdtermelrcgeglvvwrevsewydn-yayy-petpgalas
JEV   781 tggvlvflatnvhadtgcaiditrkemrcgsgifvhndveawvdr-ykyl-petprslak

ZIKV  839 avkqaweegicgissvsrmenimwksvegelnaileengvqltvvvgsvknpmwrg-p-q
DENV1 820 aigkaweegvcgirsatrlenimwkqisnelnhillendmkftvvvgdvagilaqg-k-k
DENV2 820 aiqkaheegicgirsvtrlenlmwkqitpelnhilsenevkltimtgdikgimqag-k-r
DENV3 818 aiagawengvcgirsttrmenllwkqianelnyilwennikltvvvgdiigvleqg-k-r
DENV4 819 ailnahkdgvcgirsttrlenvmwkqitnelnyvlwegghdltvvagdvkgvlskg-k-r
YFV   823 ivkasfeegkcglnsvdslehemwrsradeinaifeenevdisvvvqdpknvyqrg-t-h
WNV   832 iiqkahaegvcglrsvsrlehqmweaikdelntllkengvdlsvvv-ekqngmykaap-k
HCV   494 ----------cgi--------vpaksvcgpvycftps-----pvvvgtt----------d
TBEC  821 aiketfeegscgvvpqnrlemamwrssvtelnlalaegeanltvvvdkfdptdyrg-gvp
JEV   839 ivhkahkegvcgvrsvtrlehqmweavrdelnvllkenavdlsvvvnkpvgryrsa-p-k

ZIKV  897 rlpvpvnelphgwkawgksyfvraaktnnsfvvdgdtlkecplehrawnsflvedhgfgv
DENV1 878 mirpqpmeykyswkswgkakiigadvqnstfiidgpntpecpddqrawniwevedygfgi
DENV2 878 slqpqptelkyswktwgkakmlsteshnqtflidgpetaecpntnrawnslevedygfgv
DENV3 876 tltpqpmelkyswktwgkakivtaetqnssfiidgpntpecpsasrawnvwevedygfgv
DENV4 877 alappvndlkyswktwgkakiftpetrnstflvdgpdtsecpnerrawnflevedygfgm
YFV   881 pfsrirdglqygwktwgknlvfspgrkngsfiidgksrkecpfsnrvwnsfqieefgtgv
WNV   890 rlaatteklemgwkawgksiifapelanntfvidgpeteecptanrawnsmevedfgfgl
HCV   521 rsgapt----yswgandtdvfv----lnnt----------rpplgnw----------fg-
```

```
TBEC   880 gllkkgkdikvswkswghsmiwsipeaprrfmvgtegqsecplerrktgvftvaefgvgl
JEV    897 rlsmtqekfemgwkawgksilfapelanstfvvdgpetkecpdehrawnsmqiedfgfgi

ZIKV   957 fhtsvwlkvredyslecd--pavigtav----------kgreaahsdlgywies-ekn
DENV1  938 fttniwlklrdsytqvcd--hrlmsaai----------kdskavhadmgywies-ekn
DENV2  938 fttniwlklrekqdvfcd--sklmsaai----------kdnravhadmgywies-aln
DENV3  936 fttniwlklrevytqlcd--hrlmsaav----------kderavhadmgywies-qkn
DENV4  937 fttniwmkfregssevcd--hrlmsaai----------kdqkavhadmgywies-skn
YFV    941 fttrvymdavfeytidcd--gsilgaav----------ngkksahgsptfwmgshevn
WNV    950 tstrmflriretnttecd--skiigtav----------knnmavhsdlsywies-gln
HCV    552 ---ctwmn-stgftkvcgappcviggvgnntllcptdcfrkhpeatysrcg-------s
TBEC   940 -rtkvfldfrqepthecd--tgvmgaav----------kngmaihtdqslwmrs-mkn
JEV    957 tstrvwlkireestdecd--gaiigtav----------kghvavhsdlsywies-ryn

ZIKV  1002 dtwrlkrahli-emktcewpkshtlwtdgveesdliipkslagplshhntregyrtqvkg
DENV1  983 etwklagasfi-evktciwpkshtlwsngvlesemiipkiyggpisqhnyrpgyftqtag
DENV2  983 dtwkiekasfi-evkschwpkshtlwsngvlesemiipknfagpvsqhnyrpgyhtqtag
DENV3  981 gswklekasli-evktctwpkshtlwsnavlesdmiipkslagpisqhnyrpgyhtqtag
DENV4  982 qtwqiekasli-evktclwpkthtlwsngvlesqmlipkayagpisqhnyrqgyatqtvg
YFV    987 gtwmihtleal-dykecewplthtigt-sveesemfmprsiggpvsshnhipgykvqtng
WNV    995 dtwkleravlg-evksctwpethtlwgdgvlesdliipitlagprsnhnrrpgyktqnqg
HCV    600 gpwitpr---------cmvdypyrlw--------------hypctinytifkvrmyvgg
TBEC   984 dtgtyivellvtdlrncswpashtidnadvvdselflpaslagprswynripgyseqvkg
JEV   1002 dtwkleravfg-evksctwpethslwgdgveeseliiphtlagpkskhnrregyktqnqg

ZIKV  1061 pwhseeleirfeecpgtkvyveetcgtrgpslrsttasgrvieewccrectmpplsfrak
DENV1 1042 pwhlgkleldfdlcegttvvvdehcgnrgpslrtttvtgkiihewccrsctlpplrfrge
DENV2 1042 pwhlgklemdfdfcegttvvvtedcgnrgpslrtttasgklitewccrsctlpplryrge
DENV3 1040 pwhlgkleldfnycegttvvitencgtrgpslrtttvsgklihewccrsctlpplrymge
DENV4 1041 pwhlgkleidfgecpgttvtiqedcdhrgpslrtttasgklvtqwccrsctmpplrflge
YFV   1045 pwmqvplevkreacpgtsviidgncdgrgkstrsttdsgkvipewccrsctmppvsfhgs
WNV   1054 pwdegrveidfdycpgttvtisdscehrgpaartttesgklitdwccrsctlpplrfqte
HCV    636 veh--rleaacnwtrgercdledrdrselspllsttqwqvlp---csfttlpals----
TBEC  1044 pwkytpirvireecpgttvtinakcdkrgasvrsttesgkvipewccractmppvtfrtg
JEV   1061 pwdengivldfdycpgtkvtitedcgkrgpsvrtttdsgklitdwccrscslpplrfrte

ZIKV  1121 dgcwygmeirprkepesnlvrsmvtagstdhmdhfslg----vlvillmvqeglkkrm--
DENV1 1102 dgcwygmeirpvkekeenlvksmvsagsge-vdsfslg----llcisimieevmrsrw--
DENV2 1102 dgcwygmeirplkekeenlvnslvtagh-gqidnfslg----vlgmalfleemlrtrv--
DENV3 1100 dgcwygmeirpisekeenmvkslvsagsge-vdnftmg----vlclailfeevmrgkf--
DENV4 1101 dgcwygmeirplnekeenmvksqvsagq-gtsetfsmg----llcltlfveeclrrrv--
YFV   1105 dgcwypmeirprktheshlvrswvtagei-havpf--g----lvsmmiamevvlrkrq--
WNV   1114 ngcwygmeirptrhdektlvqsrvnaynadmidpfqlg----lmvvflatqevlrkrw--
HCV    687 ----tgl-----ihlhqnivdvqylygvgssiaswaikweyvvllflllad---------
TBEC  1104 tdcwyameirpvhd-qgglvrsmvvadngellseggvp----givalfvvleyiirrrps
JEV   1121 ngcwygmeirplrhdettlvrsqvdafngemvdpfqlg----llvmflatqevlrkrw--

ZIKV  1175 ttkiimstsmavlvvmilggfsmsdlaklvilmgatfaemntggdvahlalv-aafkvrp
DENV1 1155 srkmlmtgtlavffllimgqltwndlirlcimvgan-asdrmgmgttylalm-atfkmrp
DENV2 1155 gtkhaillvavsfvtlitgnmsfrdlgrvmvmvgatmtd-digmgvtylall-aafkvrp
DENV3 1153 gkkhmiagvfftfvlllsgqitwrdmahtlimigsn-asdrmgmgvtylali-atfkiqp
DENV4 1154 trkhmilvvvttlcaiilggltwmdllralimlgdtmsg-rmggqi-hlaim-amfkmsp
YFV   1156 gpkqmlvggvvllgamlvgqvtlldllkltvavglhfhemnnggdamymali-aafsirp
WNV   1168 takisipaimlallvlvfggitytdvlryvilvgaafaeansggdvvhlalm-atfkiqp
HCV    729 ------arvcsclwmmllisqaeaalenlvilnaasla--gthglvsflvf---------
TBEC  1159 tgttvvwggivvlallvtgmvrieslvryvvavgitf-hlelgpeivalmllqavfelrv
JEV   1175 tarltipavlgallvlmlggitytdlaryvvlvaaafaeansggdvlhlali-avfkiqp

ZIKV  1234 allvsfifranwtpresm-------llalascllqtai----salegdlmvlingfalaw
DENV1 1213 mfavgllfr-rltsrevl-------lltiglslv--as----velpnsleelgdglamgi
DENV2 1213 tfaaglllr-kltskelm-------mttigivllsq------stipetileltdalalgm
DENV3 1211 flalgfflr-kltsrenl-------llgvglamattl------qlpedieqmangialgl
DENV4 1211 gyvlg-iflrkltsreta-------lmvig--mamttv----lsiphdlmefidgislgl
YFV   1215 glligfglrtlwsprerl-------vltlgaamveial----ggvmgglwkylnavslci
WNV   1227 vflvasflkarwtnqesi-------llmlaaaffqmayydaknvlswevpdvlnslsvaw
```

```
HCV     772 -fcfawylkgrwvpgavyafygmwplllllllalpqray-----aldtevaascggvvlvg
TBEC   1218 gllsafalrrsltvremv-------ttyflllvlelglpg--asle-efwkwgdalamga
JEV    1234 aflvmnmlstrwtnqenv-------vlvlgaaffqlas----vdlqigvhgilnaaaiaw

ZIKV   1283 lairamavprtdnialpilaaltplar-gt--l---lvawraglatcg----g----iml
DENV1  1259 milkllтdfqshqlwatllsltfiktt-fs--l---hyawktmamvls----i----vsl
DENV2  1259 mvlkmvrkmekyqlavtimailcvpna-vi--l---qnawkvsctila----v----vsv
DENV3  1257 malklitqfetyqlwtalisltcsnti-ft--l---tvawrtatlila----g----vsl
DENV4  1257 illkm--vthfdntqvgtlalsltfik-stmpl---vmawrtimavlf----v----vtl
YFV    1264 ltinavasrkasntilplmalltpv----t--m---aevrlaamffcavviig----vlh
WNV    1280 milraisftntsnvvvpllalltpglk-cl--n---ldvyrilllmvg----v----gsl
HCV     826 lmaltlspyykryiswcmwwlqyfltrvea--q---lhvwvpplnvrg----grdavill
TBEC   1268 lifractaegktgaglllmalmtqqdv-vt--vhhglvcflsvasacs----v----wrl
JEV    1283 mivraitfptassvtmpvlalltpgmr-al--y---ldtyriillvig----i----csl

ZIKV   1329 lslkgkgsvkkn--lpf-vma-------lglta-vrvvdp-invv-gllllt-rs-gkrs
DENV1  1305 fplclsttsqkt--twl-pvl-------lgslg-ck---p-ltmf-liaenk-iw-grks
DENV2  1305 splfltssqqka--dwi-pla-------l---t-ikglnp-taif-lttlsr-tn-kkrs
DENV3  1303 lpvcqsssmrktdwlpmtvaa-------mg-------vpp-lplf-ifslkd-tl-krrs
DENV4  1303 iplcrtsclqkq--shw-vei-------talil-gaqalp-vyl---mtlmk-ga-skrs
YFV    1311 qnfkdt-smqkt--ipl-v-a-------ltltsylgltqp-flgl-caflat-rifgrrs
WNV    1326 ikekrssaakkk--gac-lic-------lalas-tgvfnpmilaa-glmacd-pn-rkrg
HCV     877 mcvvhptlvfdi--tkl-llaifgplwilqasl-lkvpyf-vrvq-gllric-al-arki
TBEC   1317 --lkghre-qkg--ltw-vvp-------lagll-ggegsg-irll-afwelsahr-grrs
JEV    1329 lqerkktmakkk--gav-llg-------lalts-tgwfsp-ttiaaglmvcn-pn-kkrg

ZIKV   1374 wppsevltavglicalaggfak-adie-magpmaavgllivsyvvsgksvdmyieragdi
DENV1  1347 wplnegimavgivsillssllk-ndvp-lagpliaggmliacyvisgssadlslekaaev
DENV2  1347 wplneaimavgmvsilassllk-ndip-mtgplvagglltvcyvltgrsadleleraadv
DENV3  1345 wplnegvmavglvsilassllr-ndvp-magplvagglliacyvitgtsadltvekaadv
DENV4  1346 wplnegimavglvsllgsallk-ndvp-lagpmvagglllaayvmsgssadlslekaanv
YFV    1356 ipvnealaaaglvgvla-glaf-qemenflgpiavggllmmlvsvagrvdglelkklgev
WNV    1372 wpatevmtavglmfaivgglae-ldidsmaipmtiaglmfaafvisgkstdmwiertadi
HCV     929 agghyvqmaiiklgaltgtyvy-nhlt-plrdwahnglrdlavav--epvvfsrmetkli
TBEC   1360 f--sepltvvgvmltlasgmmrhtsqe-alcalavasflllmlvlgtrkmqlvaewsgcv
JEV    1375 wpateflsavglmfaivgglae-ldiesmsipfmlaglmavsyvvsgkatdmwleraadi

ZIKV   1432 twekdaevtgnspr-ldvaldesgdfslveedgppmreiilkvvlmaicgmnpiai-pfa
DENV1  1405 sweeeaehsgashn-ilvevqddgtmkikdeerddtltillkatllavsgvyplsi-pat
DENV2  1405 kwedqaeisgsspi-lsitisedgsmsikneeeeqtltilirtgllvisglfpvsi-pit
DENV3  1403 tweeeaeqtgvshn-lmitvdddgtmrikddeteniltvllktallivsgifpysi-pat
DENV4  1404 qwdemaditgsspi-ievkqdedgsfsirdveetnmitllvklalitvsglyplai-pvt
YFV    1414 sweeeaeisgssar-ydvalseqgefkllseekvpwdqvvmtslalvgaalhpfal-llv
WNV    1431 twesdaeitgsser-vdvrlddgnfqlmndpgapwkiwmlrmaclaisaytpwailpsv
HCV     985 twgadtaacgdiinglpvsarrgqeillgpadg-----------mvskgwrlla--pit
TBEC   1417 ewypelvneggevs-lrvrqdamgnfhltelekeermmafwliaglaasaihwsgi-lgv
JEV    1434 swemdaaitgssrr-ldvkldddgdfhliddpgvpwkvwvlrmsciglaaltpwai-vpa

ZIKV   1490 agawyv--yvktgkrsg-alwdvpapkev--kkge-ttdgvyrvmtrrll-gstqvgvgv
DENV1  1463 lfvwyf--wqkkkqrsg-vlwdtpsppev--erav-lddgiyrimqrgll-grsqvgvgv
DENV2  1463 aaawyl--wevkkqrag-vlwdvpspppv--gkae-ledgayrikqkgil-gysqigagv
DENV3  1461 llvwht--wqkqtqrsg-vlwdvpsppet--qkae-leegvyrikqqgif-gktqvgvgv
DENV4  1462 mtlwym--wqvktqrsg-alwdvpspaaa--qkat-ltegayrimqrglf-gktqvgvgi
YFV    1472 lagwlf--hvrgarrsgdvlwdiptpkii--eecehledgiygifqstfl-gasqrgvgv
WNV    1490 igfw-i--tlqytkrgg-vlwdtpspkey--kkgd-tttgvyrimtrgll-gsyqagagv
HCV    1031 aya---------qqtrg-llgciitsltg--rdkn-qvegevqivst-----atqtflat
TBEC   1475 mglwtltemlrssrrsd-lvfsgqggrergdrpfe-vkdgvyrifspglfwgqnqvgvgy
JEV    1492 afgywl--tlkttkrgg-vfwdtpspkpc--skgd-tttgvyrimargil-gtyqagvgv

ZIKV   1543 mqegvfhtmwhvtkgaalrsgegrldpywgdvkqdlvsycgpw---kldaawdglsevql
DENV1  1516 fqenvfhtmwhvtrgavlmyqgkrlepswasvkkdlisygggw---rlqgswntgeevqv
DENV2  1516 ykegtfhtmwhvtrgavlmhkgkriepswadvkkdlisygggw---klegewkegeevqv
DENV3  1514 qkegvfhtmwhvtrgavltyngkrlepnwasvkkdlisygggw---rlsaqwqkgeevqv
DENV4  1515 hmegvfhtmwhvtrgsvichesgrlepswadvrndmisygggw---rlgdkwdkeedvqv
YFV    1527 aqggvfhtmwhvtrgaflvrngkklipswasvkedlvayggsw---klegrwdgeeevql
```

```
WNV    1542 mvegvfhtlwhttkgaalmsgegrldpywgsvkedrlcyggpw---klqhkwnghdevqm
HCV    1073 cingvcwtvyhgagtrtiaspkgpviqmytnvdqdlvgwpapqgsrsltpctcgssdlyl
TBEC   1533 gskgvlhtmwhvtrgaalsiddavagpywadvredvvcyggaw---sleekwkg-etvqv
JEV    1545 myenvfhtlwhttrgaaimsgegkltpywgsvkedriayggpw---rfdrkwngtddvqv

ZIKV   1600 lavppgerarniqtlpgifktkdg-d-----igavaldypagtsgspildkcgrviglyg
DENV1  1573 iavepgknpknvqtapgtfktpeg-e-----vgaialdfkpgtsgspivnregkivglyg
DENV2  1573 lalepgknpravqtkpglfktnag-t-----igavsldfspgtsgspiidkkgkvvglyg
DENV3  1571 iavepgknpknfqtmpgtfqtttg-e-----igaialdfkpgtsgspiinregkvvglyg
DENV4  1572 laiepgknpkhvqtkpglfktltg-e-----igavtldfkpgtsgspiinrkgkviglyg
YFV    1584 iaavpgknvvnvqtkpslfkvrngge-----igavaldypsgtsgspivnrngeviglyg
WNV    1599 ivvepgknvknvqtkpgvfktpeg-e-----igavtldyptgtsgspivdkngdviglyg
HCV    1133 v-------trhadvip---vrrrg-dsrgsllsprpisylkgssggpllcpaghavglfr
TBEC   1589 hafppgrahevhqcqpgelildtgrk-----lgaipidlvkgtsgspilnaqgvvvglyg
JEV    1602 ivvepgkaavniqtkpgvfrtpfg-e-----vgavsldyprgtsgspildsngdiiglyg

ZIKV   1654 ngvvikngsyvsaitqgkreeet---p---v---ecfe-psmlkkkqltvldlhpgagkt
DENV1  1627 ngvvttsgtyvsaiaqakasqeg---p---l---peie-devfrkrnltimdlhpgsgkt
DENV2  1627 ngvvtrsgayvsaiaqteksied---n---p---e-ie-ddifrkrkltimdlhpgagkt
DENV3  1625 ngvvtknggyvsgiaqtnaepdg---p---t---pele-eemfkkrnltimdlhpgsgkt
DENV4  1626 ngvvtksgdyvsaitqaerigep---d---y---evde--difrkkrltimdlhpgagkt
YFV    1639 ngilvgdnsfvsaisqtevkeeg---k---e---elqeiptmlkkgmttvldfhpgagkt
WNV    1653 ngvimpngsyisaivqqgermeep---a---p---agfe-pemlrkkqitvldlhpgagkt
HCV    1182 aavctrgvakavdfipvenlettmrsp---vftdnssp-pavpqsfqvahlhaptgsgks
TBEC   1644 nglk-tnetyvssiaqgeaeksr---pnlpq---avvg-tgwtskgqitvldmhpgsgkt
JEV    1656 ngvelgdgsyvsaivqgerqeep---v---p---eayt-pnmlrkrqltvldlhpgsgkt

ZIKV   1704 rrvlpeivreaikkrlrtvilaptrvvaaemeealrglp-----vrymttavnvths--g
DENV1  1677 rrylpaivreaikrklrtlilaptrvvasemaealkgmp-----iryqttavkseht--g
DENV2  1676 krylpaivreaikrglrtlilaptrvvaaemeealrglp-----iryqtpairaeht--g
DENV3  1675 rkylpaivreaikrrlrtlilaptrvvaaemeealkglp-----iryqttatkseht--g
DENV4  1675 krilpsivrealkrrlrtlilaptrvvaaemeealrglp-----iryqtpavkseht--g
YFV    1690 rrflpqilaecarrrlrtlvlaptrvvlsemkeafhgld-----vkfhtqafsahgs--g
WNV    1703 rkilpqiikeainkrlrtavlaptrvvaaemsealrglp-----iryqtsavhrehs--g
HCV    1238 tkvpaayaaqgykvlvlnpsvaatlgfgaymskahgvdpnirtgvrtittgspitystyg
TBEC   1696 hrvlpelirqcidrrlrtlvlaptrvvlkemeralngkr-----vrfhspavsdqqa--g
JEV    1706 rkilpqiikdaiqqrlrtavlaptrvvaaemaealrglp-----vryqtsavqrehq--g

ZIKV   1757 teivdlmchatftsrllqpirvpnynlyimdeahftdpssiaargyistrvem-geaaai
DENV1  1730 keivdlmchatftmrllspvrvpnynmiimdeahftdpssiaargyistrvgm-geaaai
DENV2  1729 reivdlmchatftmrllspvrvpnynliimdeahftdpasiaargyistrvem-geaagi
DENV3  1728 reivdlmchatftmrllspvrvpnynliimdeahftdpasiaargyistrvgm-geaaai
DENV4  1728 reivdlmchatfttrllsstrvpnynlivmdeahftdpssvaargyistrvem-geaaai
YFV    1743 revidamchatltyrmleptrvvnweviimdeahfldpasiaargwaahrara-nesati
WNV    1756 neivdvmchatlthrlmsphrvpnynlfimdeahftdpasiaargyiatkvel-geaaai
HCV    1298 kfladggcsg------------gaydiiicdechstdatsilgigtvldqaetagarlvv
TBEC   1749 gaivdvmchatyvnrrllpqgrqnwevaimdeahwtdphsiaarghlytlake-nkcalv
JEV    1759 neivdvmchatlthrlmspnrvpnynlfvmdeahftdpasiaargyiatkvel-geaaai

ZIKV   1816 fmtatppgtrd-afpdsnspimdtevevperawssgfdwvtdhsgktvwfvpsvrngnei
DENV1  1789 fmtatppgsve-afpqsnaviqdeerdiperswnsgyewitdfpgktvwfvpsikagndi
DENV2  1788 fmtatppgsrd-pfpqsnapimdeereiperswssghewvtdfkgktvwfvpsikagndi
DENV3  1787 fmtatppgtad-afpqsnapiqdeerdiperswnsgnewitdfagktvwfvpsikagndi
DENV4  1787 fmtatppgttd-pfpqsnspiediereiperswntgfdwitdyqgktvwfvpsikagndi
YFV    1802 lmtatppgtsd-efphsngeiedvqtdipsepwntghdwiladkrptawflpsiraanvm
WNV    1815 fmtatppgtsd-pfpesnapisdmqteipdrawntgyewiteyvgktvwfvpsvkmgnei
HCV    1346 latatppgsvtvshpnieevalsttgeip--fygkaiplevikggrhlifchskkkcdel
TBEC   1808 lmtatppgkse-pfpesngaitseerqipdgewrdgfdwiteyegrtawfvpsiakggai
JEV    1818 fmtatppgttd-pfpdsnapihdlqdeipdrawssgygwiteyagktvwfvasvkmgnei

ZIKV   1875 aacltkagkrviqlsrktfetefqktknqewdfvittdisemganfkadrvidsrrclkp
DENV1  1848 anclrkngkrviqlsrktfdteyqktknndwdyvvttdisemganfradrvidprrclkp
DENV2  1847 aaclrkngkkviqlsrktfdseyvktrtndwdfvvttdisemganfkaervidprrcmkp
DENV3  1846 anclrkngkkviqlsrktfdteyqktklndwdfvvttdisemganfkadrvidprrclkp
DENV4  1846 anclrksgkkviqlsrktfdteypktkltdwdfvvttdisemganfragrvidprrclkp
```

```
YFV    1861 aaslrkagksvvvlnrktfereyptikqkkpdfilatdiaemganlcvervldcrtafkp
WNV    1874 alclqragkkviqlnrksyeteypkcknddwdfvittdisemganfkasrvidsrksvkp
HCV    1404 aaklvalginavayyr-gldvsviptsgdv--vvvstdalmtgftgdfdsvidcntcvtq
TBEC   1867 artlrqkgksviclnsktfekdysrvrdekpdfvvttdisemganldvsrvidgrtnikp
JEV    1877 amclqragkkviqlnrksydteypkckngdwdfvittdisemganfgasrvidcrksvkp

ZIKV   1935 vi---l-d-g-e-rvilagpmpvthasaaqrrgrigrnpnkpgdeymyggg---------
DENV1  1908 vi---lkd-gpe-rvilagpmpvtvasaaqrrgrignhnkegdqyiymgq---------
DENV2  1907 vi---ltd-g-eervilagpmpvthssaaqrrgrignpknendqyiymge---------
DENV3  1906 vi---ltd-gpe-rvilagpmpvtaasaaqrrgrvgrnpqkendqyiftgq---------
DENV4  1906 vi---ltd-gpe-rvilagpipvtpasaaqrrgrignpaqeddqyvfsgd---------
YFV    1921 vl---v-deg-r-kvaikgplrisassaaqrrgrignpnrdgdsyyysep---------
WNV    1934 ti---i-eeg-dgrvilgepsaitaasaaqrrgrignpsqvgdeycyggh---------
HCV    1461 tvdfsl-d-p-t-ftietttlpqdavsrtqrrgrtgrg--kpgiyrfvapgerpsgmfds
TBEC   1927 ee---v-d-g---kveltgtrrvttasaaqrrgrvgrqdgrt-deyiysgq---------
JEV    1937 ti---l-eeg-egrvilgnpspitsasaaqrrgrvgrnpnqvgdeyhygga---------

ZIKV   1979 ---caetdeghahwlearmlldniylqdgliaslyrpeadkvaaiegefklrteqrktfv
DENV1  1954 ---plnndedhahwteakmlldnintpegiipalfepereksaaidgeyrlrgearktfv
DENV2  1953 ---plendedcahwkeakmlldnintpegiipsmfeperekvdaidgeyrlrgearktfv
DENV3  1952 ---plnndedhahwteakmlldnintpegiipalfepereksaaidgeyrlkgesrktfv
DENV4  1952 ---plrndedhahwteakmlldniytpegiiptlfgperektqaidgefrlrgeqrktfv
YFV    1966 ---tsennahhvcwleasmlldnmevrggmvaplygvegtktpvspgemrlrddqrkvfr
WNV    1980 ---tneddsnfahwtearimldninmpnglvaqlyqperekvytmdgeyrlrgeerknfl
HCV    1515 svlcecydagca-wyeltpaettvrlraymntpglpvcqdhlefwegvftglthidahfl
TBEC   1969 ---cddddsglvqwkeaqilldnittlrgpvatfygpeqdkmpevaghfrlteekrkhfr
JEV    1983 ---tseddsnlahwteakimldnihmpnglvaqlygperekaftmdgeyrlrgeekknfl

ZIKV   2036 elmkrg--dlpvwlayqv-----asagitytdrrw-cf-------dgttnntimeds-vp
DENV1  2011 elmrrg--dlpvwlsykv-----asegfqysdrrw-cf-------dgernnqvleen-md
DENV2  2010 dlmrrg--dlpvwlayrv-----aaeginyadrrw-cf-------dgiknnqileen-ve
DENV3  2009 elmrrg--dlpvwlahkv-----asegikytdrkw-cf-------dgqrnnqileen-md
DENV4  2009 elmrrg--dlpvwlsykv-----asagisykdrew-cf-------tgernnqileen-me
YFV    2023 elvrnc--dlpvwlswqv-----akaglktndrkw-cf-------egpeeheilndsget
WNV    2037 eflrta--dlpvwlaykv-----aaagisyhdrkw-cf-------dgprtntiledn-ne
HCV    1574 sqtkqsgenfpylvayqatvcaraqapppswdqmwkclirlkptlhgptpllyrlga-vq
TBEC   2026 hllthc--dftpwlawhv-----aanvssvtdrsw-tw-------egpeanavdeas-gd
JEV    2040 ellrta--dlpvwlaykv-----asngiqytdrkw-cf-------dgprtnailedn-te

ZIKV   2080 aevw-tkyg-ekrvlkprwmdarvcsdhaalksfkefaagkrgaalgvmealgtl-----
DENV1  2055 veiw-tkeg-erkklrprwldartysdplalrefkefaagrrsvsgdlileigkl-----
DENV2  2054 veiw-tkeg-erkklkprwldariysdpltlkefkefaagrksltlnlitemgrl-----
DENV3  2053 veiw-tkeg-ekkklrprwldartysdplalkefkdfaagrksialdlvteigrv-----
DENV4  2053 veiw-treg-ekkklrpkwldarvyadpmalkdfkefasgrksitldilteiasl-----
YFV    2068 vkcr-apgg-akkplrprwcdervssdqsalsefikfaegrrgaa-evlvvlsel-----
WNV    2081 vevi-tklg-erkilrprwadarvysdhqalksfkdfasgkr-sqiglvevlgrm-----
HCV    1633 nevt-lthpitkyimtcmsadlevvtstwvlvggvlaalaayclstgcvvivgrivlsgk
TBEC   2070 lvtfrspng-aertlrpvwkdarmfkegrdikefvayasgrrsfg-dvltgmsgv-----
JEV    2084 veiv-trmg-erkilkprwldarvyadhqalkwfkdfaagkr-savsfievlgrm-----

ZIKV   2133 pghmter---fqeaidnlavlmraetgsrpykaaaaqlpetletimllgllgtvslgiff
DENV1  2108 pqhltqr---aqnaldnlvmlhnseqggrayrhameelpdtietlmllaliavltggvtl
DENV2  2107 ptfmtqk---ardaldnlavlhtaeaggraynhalselpetletlllltllatvtggifl
DENV3  2106 pthlahr---trnaldnlvmlhtsehggkayrhaveelpetmetllllglmilltggaml
DENV4  2106 ptylssr---aklaldnivmlhtterggkayqhalnelpesletlmlvallgamtagifl
YFV    2120 pdflakk---ggeamdtisvflhseegsrayrnalsmmpeamtivmlfilaglltsgmvi
WNV    2133 pehfmvk---twealdtmyvvataekggrahrmaleelpdalqtivliallsvmslgvff
HCV    1692 paiipdrevlyqefde-----meecsqhlpyieqgmmlaeqfkq-kalgllqtasrqaev
TBEC   2123 pellrhr---cvsaldvfytlmheepgsramrmaerdapeafltmvemmvlglatlgviw
JEV    2136 pehfmgk---trealdtmylvataekggkahrmaleelpdaletitlivaitvmtggffl
Page 8

ZIKV   2190 v---lmrnkgigkmgfgmvtlgasawlmwlseie--pariacvlivvfllvvlipepek
DENV1  2165 f---flsgkglgktsigllcvmassvllwmasve--phwiaasiilefflmvllipepdr
DENV2  2164 f---lmsgrgigkmtlgmcciitasillwyaqiq--phwiaasiilefflivllipepek
```

```
DENV3 2163 f---lisgkgigktsiglicviassgmlwmaeip--lqwiasaivleffmmvllipepek
DENV4 2163 f---fmqgkgmgklsmgliaiavasgllwvaeiq--pqwiaasiilefflmvllvpepek
YFV   2177 f---fmspkgisrmsmamgtmagcgylmflggvk--pthisyvmliffvlmvvvipepgq
WNV   2190 l---lmqrkgigkiglggvilgaatffcwmaevp--gtkiagmlllslllmivlipepek
HCV   1746 itpavqtnwqklevfwakhmwnfisgiqylaglstlpgnpaiaslmaftaavt-------
TBEC  2180 c---fvvrtsisrmmlgtlvllaslllwaggvg--ygnmagvalifytlltvlqpeagk
JEV   2193 l---mmqrkgigkmglgalvltlatfflwaaevp--gtkiagtlialllmvvlipepek

ZIKV  2245 qrspqdnqmaiiimvavgllglitanelgwlertknd--iah-lmgrree--g--atmgf
DENV1 2220 qrtpqdnqlayvvigllfmiltvaanemgllettkkdlgigh-vavenhh--h--aam--
DENV2 2219 qrtpqdnqltyvviailtvvaatmanemgflektkkd--lg---lgsitt--q--qpesn
DENV3 2218 qrtpqdnqlayvvigiltlaaiiaanemgllettkrd--lgm----skep--g--vvspt
DENV4 2218 qrtpqdnqliyviltiltiialvaanemgliektktd--fgf-yqakte------tti--
YFV   2232 qrsiqdnqvayliigiltlvsavaanelgmlektked--lfg-kknlips--s--aspws
WNV   2245 qrsqtdnqlavflicvltlvgavaanemgwldktknd--igs-llghrpe--arettlgv
HCV   1799 --splttgqtllf----nilg-------gwv--------aaq-laa---p--g--aataf
TBEC  2235 qrssddnklayflltlcslaglvaanemgflektkad--lstalwseree--p--rpwse
JEV   2248 qrsqtdnqlavflicvltvvgvvaaneygmlektkad--lks-mfggktqasg--ltglp

ZIKV  2298 -s-mdidlrpasawaiyaalttlitpavqhavttsynnyslmamatqagvlfgmgkgmpf
DENV1 2273 ---ldvdlhpasawtlyavattiitpmmrhtienttanisltaianqaailmgldkgwpi
DENV2 2270 -i-ldidlrpasawtlyavattfvtpmlrhsienssvnvsltaianqatvlmglgkgwpl
DENV3 2268 -syldvdlhpasawtlyavattvitpmlrhtienstanvslaaianqavvlmgldkgwpi
DENV4 2267 ---ldvdlrpasawtlyavattiltpmlrhtientsanlslaaianqaavlmglgkgwpl
YFV   2285 -w-pdldlkpgaawtvyvgivtmlspmlhhwikveygnlslsgiaqsasvlsfmdkgipf
WNV   2300 es-flldlrpatawslyavttavltpllkhlitsdyintsltsinvqasalftlargfpf
HCV   1830 ----------vgaglagaaigsvglgkvlvdilagyg-----agvagalvafkimsgevp
TBEC  2289 -w-tnvdiqparswgtyvlvvslftpyiihqlqtkiqqlvnsavasgaqamrdlgggapf
JEV   2303 -s-maldlrpatawalyggstvvltpllkhlitseyvttslasinsqagslfvlprgvpf

ZIKV  2356 yawdlgvp--llmmgcysql--tpltlivaiillvahymylipglqaaaaraaqkrtaag
DENV1 2330 skmdigvp--llalgcysqv--npltltaavlmlvahyaiigpglqakatreaqkrtaag
DENV2 2328 skmdigvp--llaigcysqv--npitltaalfllvahyaiigpglqakatreaqkraaag
DENV3 2327 skmdlgvp--llalgcysqv--npltltaavlllithyaiigpglqakatreaqkrtaag
DENV4 2324 hrmdlgvp--llamgcysqv--npttltaslvmllvhyaiigpglqakatreaqkrtaag
YFV   2343 mkmnisvi--mllvsgwnsi--tvmpllcgigcamlhwslilpgikaqqsklaqrrvfhg
WNV   2359 v--dvgvsalllavgcwgqv--tltvtvtaaallfchyaymvpgwqaeamrsaqrrtaag
HCV   1875 stedl-vn--llp----ail--spgalvvgvvcaailrrhvgpg--egavqwmnrliafa
TBEC  2347 fg--vagh--vmtlgvvsligatptslmvgvglaalhlaivvsgleaeltqrahkvffsa
JEV   2361 tdldltvg--lvflgcwgqi--tlttsltamvlvtlhygymlpgwqaealraaqrrtaag

ZIKV  2412 imknpvvdgivvtdidtmt-idpqv-ekkmgqvlliavaissavllrtawgwgeagalit
DENV1 2386 imknptidgivaidldpvv-ydakf-ekqlgqimlllctsqillmrttwalcesitlat
DENV2 2384 imknptvdgitvidldpip-ydpkf-ekqlgqvmllvlcvtqvlmmrttwalcealtlat
DENV3 2383 imknptvdgimtidldpvi-ydskf-ekqlgqvmllvlcavqlllmrtswalcealtlat
DENV4 2380 imknptvdgitvidlepis-ydpkf-ekqlgqvmllvlcagqlllmrttwafcevltlat
YFV   2399 vaenpvvdgnptvdieeap-empalyekklalylllalslasvamcrtpfslaegivlas
WNV   2415 imknvvvdgivatdvpelerttpvm-qkkvgqiililvsmaavvvnpsvrtvreagiltt
HCV   1924 srgnhvspthyvpesda-----------aarvtailssltvtqllrrlhqw------is
TBEC  2403 mvrnpmvdgdvinpfgege-akpalyerkmslvlatvlclmsvvmnrtvasiteasavgl
JEV   2417 imknavvdgmvatdvpelerttplm-qkkvgqvlligvsvaaflvnpnvttvreagvlvt

ZIKV  2470 aatstlwegspnkywnsstatslcnifrgsylagasliytvtrna---glvk-rrgggtg
DENV1 2444 gplttlwegspgkfwnttiavsmanifrgsylagaglafslmksl---gggr-rgtgaqg
DENV2 2442 gpistlwegnpgrfwnttiavsmanifrgsylagagllfsimknt---tntr-rgtgnig
DENV3 2441 gpittlwegspgkfwnttiavsmanifrgsylagaglafsimksv---gtgk-rgtgsqg
DENV4 2438 gpiltlwegnpgrfwnttiavstanifrgsylagaglafslikna---qtpr-rgtgttg
YFV   2458 aalgpliegntsllwngpmavsmtgvmrgnhyafvgvmynlwkmk-----tg-rrgsang
WNV   2474 aaavtlwengassvwnattaiglchimrggwlsclsimwtliknmekpgl---krggakg
HCV   1966 secttpcsgs----wlrdiwdwicevlsdfktwlkaklmpqlpgi---pfvs-cqrgyrg
TBEC  2462 aaagqllrpeadtlwtmpvacgmsgvvrgslwgflplghrlwlra---s-gg-rrggseg
JEV   2476 aatltlwdngasavwnsttatglchvmrgsylaggsiawtlikna---dkpslkrgrsgg

ZIKV  2526 etlgekwkarlnqmsalefysykksgitev-----creearralkdgvatgghavsrgsa
DENV1 2500 etlgekwkrqlnqlsksefntykrsgimev-----drseakeglkrgett-khavsrgta
```

```
DENV2 2498 etlgekwksrlnalgksefqiykksgiqev-----drtlakegikrg-etdhhavsrgsa
DENV3 2497 etlgekwkklnqlsrkefdlykksgitev-----drteakeglkrgeit-hhavsrgsa
DENV4 2494 etlgekwkrqlnsldrkgfeeykrsgilev-----drteaksalkdg-skikyavsrgts
YFV   2512 ktlgevwkrelnlldkrqfelykrtdivev-----drdtarrhlaegkvdtgvavsrgta
WNV   2531 rtlgevwkerlnhmtkeeftryrkeaitev-----drsaakharregnitgghpvsrgta
HCV   2018 vwrgdgimhtrchcga-eitghvkngtmrivgprtcrnmwsgtfpinayttgpctplpap
TBEC  2517 dtlgdlwkrrlnnctreeffvyrrtgilet-----erdkarellrrgetnvglavsrgta
JEV   2533 rtlgeqwkeklnamsreeffkyrreaiiev-----drtearrarrennvvgghpvsrgsa

ZIKV  2581 klrwlvergylqpygkvvdlgcgrggwsyyaatirkvqevrgytkggpgheepmlvqsyg
DENV1 2554 klrwfvernlvkpegkvidlgcgrggwsyycaglkkvtevkgytkggpgheepipmatyg
DENV2 2552 klrwfvernmvtpegkvvdlgcgrggwsyycgglknvrevkgltkggpgheepipmstyg
DENV3 2551 klqwfvernmvipegrvidlgcgrggwsyycaglkkvtevrgytkggpgheepvpmstyg
DENV4 2548 kirwivergmvkpkgkvvdlgcgrggwsyymatlknvtevkgytkggpgheepipmatyg
YFV   2567 klrwfhergyvklegrvidlgcgrggwcyyaaaqkevsgvkgftlgrdghekpmnvqslg
WNV   2586 klrwlverrflepvgkvvdlgcgrggwcyymatqkrvqevkgytkggpgheepqlvqsyg
HCV   2077 nykfalwrvsaeey----------------veirrvgdfh-yvsgmttdnlkcpcqips
TBEC  2572 klawleergyatlkgevvdlgcgrggwsyyaasrpavmsvraytiggkgheapkmvtslg
JEV   2588 klrwlvekgfvspigkvidlgcgrggwsyyaatlkkvqevrgytkggagheepmlmqsyg

ZIKV  2641 wnivrlksgvdvfhmaaepcdtllcdigesssspeveetrtlrvlsmvgdwlekrpgafc
DENV1 2614 wnlvklhsgkdvffippekcdtllcdigesspnptieegrtlrvlkmvepwl--rgnqfc
DENV2 2612 wnlvrlqsgvdvfftppekcdtllcdigesspnptveagrtlrvlnlvenwlnnnt-qfc
DENV3 2611 wnivklmsgkdvfylppekcdtllcdigesspsptveesrtirvlkmvepwlkn--nqfc
DENV4 2608 wnlvklhsgvdvfykpteqvdtllcdigesssnptieegrtlrvlkmvepwlsskp-efc
YFV   2627 wniitfkdktdihrlepvkcdtllcdigesssssvtegertvrvldtvekwlacgvdnfc
WNV   2646 wnivtmksgvdvfyrpseasdtllcdigessssaeveehrtvrvlemvedwlhrgpkefc
HCV   2119 peffteldgvrl-hrfappckpllre--evsfrvglhe-------ypvgsqlpcepepdv
TBEC  2632 wnlikfrsgmdvfsmqphradtvmcdigesspdaavegertrkvillmeqwknrnptaac
JEV   2648 wnlvslksgvdvfykpsepsdtlfcdigesspspeveeqrtlrvlemtsdwlhrgprefc

ZIKV  2701 i-kvlcpytstmmetmerlqrrhggglvrvplsrnsth----------------------
DENV1 2672 i-kilnpympsvvetleqmqrkhggmlvrnplsrnsth----------------------
DENV2 2671 i-kvlnpympsviekmealqrkyggalvrnplsrnsth----------------------
DENV3 2669 i-kvlnpymptviehlerlqrkhggmlvrnplsrnsth----------------------
DENV4 2667 i-kvlnpymptvieeleklqrkhggslvrcplsrnsth----------------------
YFV   2687 v-kvlapympdvleklellqrrfggtvirnplsrnsth----------------------
WNV   2706 i-kvlcpympkviekmetlqrryggglirnplsrnsth----------------------
HCV   2169 a-vltsmltdpshitaeaagrrlargsppsmasssasqlsapslkatctanhdspdaeli
TBEC  2692 vfkvlapyrpeviealhrfqlqwggglvrtpfsrnsth----------------------
JEV   2708 i-kvlcpympkviekmevlqrrfggglvrlplsrnsnh----------------------

ZIKV  2738 --emywvsgaksniiksvsttsqlllgrmd-----gpr-rpvkyeedvnlgsgtravasc
DENV1 2709 --emywvscgtgnivsavnmtsrmllnrft-----mah-rkptyerdvdlgagtrhvave
DENV2 2708 --emywvsnasgnivssvnmisrmlinrft-----mrh-kkatyepdvdlgsgtrnigie
DENV3 2706 --emywisngtgnivasvnmvsrlllnrft-----mth-rrptiekdvdlgagtrhvnae
DENV4 2704 --emywvsgvsgnivssvnttskmllnrft-----trh-rkptyekdadlgagtrsvste
YFV   2724 --emyyvsgarsnvtftvnqtsrllmrrmr-----rpt-gkvtleadvilpigtrsvetd
WNV   2743 --emywvshasgnivhsvnmtsqvllgrmekktwkgp-----qfeedvnlgsgtravgkp
HCV   2228 eanllwrqemggnitrvesenkvvildsfd----------plvaeed------erevsvp
TBEC  2730 --emyystavtgnivnsvnvqsrkllarfg-----dqr-gptkvpe-ldlgvgtrcvvla
JEV   2745 --emywvsgaagnvvhavnmtsqvllgrmd-----rtvwrgpkyeedvnlgsgtravgkg

ZIKV  2790 aeapnmkiigrrieri-----rneh----aetwfldenhpyrtwayhgsyeaptqg----
DENV1 2761 pevanldiigqrieni-----kheh----kstwhydednpyktwayhgsyevkpsg----
DENV2 2760 seipnldiigkrieki-----kqeh----etswhydqdhpyktwayhgsyetkqtg----
DENV3 2758 petpnmdvigerikri-----keeh----nstwhyddenpyktwayhgsyevkatg----
DENV4 2756 tekpdmtiigrrlqrl-----qeeh----ketwhydhenpyrtwayhgsyeapstg----
YFV   2776 kgpldkeaieerveri-----ksey----mtswfydndnpyrtwhycgsyvtktsg----
WNV   2796 llnsdtskiknrierl-----kkey----sstwhqdanhpyrtwnyhgsyevkptg----
HCV   2272 aeilrk---srrfaralpvwarpdynpplvetw---kkpdyeppvvhgcplppprsppvp
TBEC  2781 edkvkeqdvqeriral-----reqy----setwhmdeehpyrtwqywgsyrtaptg----
JEV   2798 eihsnqekikkriqkl-----keef----attwhkdpehpyrtwtyhgsyevkatg----

ZIKV  2837 ----------sasslvngvvrllskpwdvvtgvtgiamtdttpygqqrvfkekvdtrv--
```

```
DENV1 2808 ----------sassmvngvvkllkpwdvipmvtqiamtdttpfgqqrvfkekvdtrt--
DENV2 2807 ----------sassmvngvvrlltkpwdvvpmvtqmamtdttpfgqqrvfkekvdtrt--
DENV3 2805 ----------sassmingvvkllkpwdvvpmvtqmamtdttpfgqqrvfkekvdtrt--
DENV4 2803 ----------sassmvngvvkllkpwdvvpmvtqlamtdttpfgqqrvfkekvdtrt--
YFV   2823 ----------saasmvngvikiltypwdrieevtrmamtdttpfgqqrvfkekvdtra--
WNV   2843 ----------sasslvngvvrllskpwdtitnvttmamtdttpfgqqrvfkekvdtka--
HCV   2326 pprkkrtvvltestlstalaelatksfg-ssstsgitgdntttssepapsgcppdsdves
TBEC  2828 ----------saaslingvvkllswpwnaredvvrmamtdttafgqqrvfkdkvdtka--
JEV   2845 ----------sasslvngvvklmskpwdaianvttmamtdttpfgqqrvfkekvdtka-

ZIKV  2885 ------------pdpqeg----------trqvmnivsswlwkelgkrkrprvctkeefi
DENV1 2856 ------------pkakrg----------taqimevtarwlwgflsrnkkprictreeft
DENV2 2855 ------------qepkeg----------tkklmkitaewlwkelgkkktprmctreeft
DENV3 2853 ------------prsmpg----------trrvmeitaewlwrtlgrnkkprlctreeft
DENV4 2851 ------------pqpkpg----------trvvmtttanwlwallgrkknprlctreefi
YFV   2871 ------------kdppag----------trkimkvvnrwlfrhlareknprlctkeefi
WNV   2891 ------------peppeg----------vkyvlnettnwlwaflardkkprmcsreefi
HCV   2385 yssmpplegepgdpdlsdgswstvssgadtedvvccsmsysw--tgalvtp--caaee--
TBEC  2876 ------------qepqpg----------trvimravndwilerlaqkskprmcsreefi
JEV   2893 ------------peppag----------akevlnettnwlwahlsrekrprlctkeefi

ZIKV  2922 nkvrsnaalgaifeee---------------------------------kewktaveav
DENV1 2893 rkvrsnaaigavfvde---------------------------------nqwnsakeav
DENV2 2892 rkvrsnaalgaiftde---------------------------------nkwksareav
DENV3 2890 kkvrtnaamgavftee---------------------------------nqwdsakaav
DENV4 2888 skvrsnaaigavfqee---------------------------------qgwtsaseav
YFV   2908 akvrshaaigayleeq---------------------------------eqwktaneav
WNV   2928 gkvnsnaalgamfeeq---------------------------------nqwknareav
HCV   2439 qklpinalsnsllrhhnlvysttsrsacqrqkkvtfdrlqvldshyqdvlkevkaaaskv
TBEC  2913 akvksnaalgawsdeq---------------------------------nrwasareav
JEV   2930 kkvnsnaalgavfaeq---------------------------------nqwstareav

ZIKV  2948 n-----------------dprfwalvdrerehhlrgech-scvyn------------m
DENV1 2919 e-----------------ddrfwdlvhrerelhkqgkca-tcvyn------------m
DENV2 2918 e-----------------dsrfwelvdkernlhlegkce-tcvyn------------m
DENV3 2916 e-----------------dedfwklvdrerelhklgkcg-scvyn------------m
DENV4 2914 n-----------------dsrfwelvdkeralhqegkce-scvyn------------m
YFV   2934 q-----------------dpkfwelvdeerklhqqgrcr-tcvyn------------m
WNV   2954 e-----------------dpkfwemvdeereahlrgecn-tciyn------------m
HCV   2499 kanllsveeacsltpphsakskfgygakdvrcharkavahinsvwkdlledsvtpidtti
TBEC  2939 e-----------------dpafwrlvdeererhlmgrca-hcvyn------------m
JEV   2956 d-----------------dprfwemvdeerenhlrgech-tciyn------------m

ZIKV  2976 mgkrek--kqgefgkakgsraiwymwlgarflefealgflnedhwmgrensgggveglgl
DENV1 2947 mgkrek--klgefgkakgsraiwymwlgarflefealgfmnedhwfsrenslsgvegegl
DENV2 2946 mgkrek--klgefgkakgsraiwymwlgarflefealgflnedhwfsrenslsgvegegl
DENV3 2944 mgkrek--klgefgkakgsraiwymwlgarylefealgflnedhwfsrensysgvegegl
DENV4 2942 mgkrek--klgefgrakgsraiwymwlgarflefealgflnedhwfgrenswsgvegegl
YFV   2962 mgkrek--klsefgkakgsraiwymwlgarylefealgflnedhwasrensgggvegigl
WNV   2982 mgkrek--kpgefgkakgsraiwfmwlgarflefealgflnedhwlgrknsgggveglgl
HCV   2559 maknevfcvqpekggrkparlivfpdlgvrvcekmalydvvsklplavmgssygfqyspg
TBEC  2967 mgkrek--klgefgvakgsraiwymwlgsrflefealgflnedhwasressgagvegisl
JEV   2984 mgkrek--kpgefgkakgsraiwfmwlgarylefealgflnedhwlsrensgggvegsgv

ZIKV  3034 qrlgyile--emnrapggkmyaddtagwdtriskfdlenealitnqmeeghrtlalavik
DENV1 3005 hklgyilr--diskipggnmyaddtagwdtriteddlqneakitdimepehallaksifk
DENV2 3004 hklgyilr--dvskkeggamyaddtagwdtritledlkneemvtnhmegehkklaeaifk
DENV3 3002 hklgyilr--diskipggamyaddtagwdtriteddlhneekitqqmdpehrllanaifk
DENV4 3000 hrlgyile--didkkdgdliyaddtagwdtriteddllneeliteqmaphhkilakaifk
YFV   3020 qylgyvir--dlaamdgggfyaddtagwdtriteadlddeqeilnymsphhkklaqavme
WNV   3040 qklgyilk--evgtkpggkvyaddtagwdtritkadleneakvlelldgehrrlarsiie
HCV   2619 qrveflvqawkskktpmgfsy--dtrcfdstvtesdirteeai-yqccdldpqarvaiks
TBEC  3025 nylgwhlk--klstlngglfyaddtagwdtkvtnadledeeqilrymegehkqlattimq
JEV   3042 qklgyilr--diagkqggkmyaddtagwdtritrtdleneakvlelldgehrmlaraiie
```

```
ZIKV  3092 ytyqnkvvkvlrpaeggktvmdiisrqdqrgsgqvvtyalntftnlvvqlirnmeaeevl
DENV1 3063 ltyqnkvvrvqrpakng-tvmdvisrrdqrgsgqvgtyglntftnmeaqlirqmesegif
DENV2 3062 ltyqnkvvrvqrptprg-tvmdiisrrdqrgsgqvgtyglntftnmeaqlirqmegegvf
DENV3 3060 ltyqnkvvkvqrptptg-tvmdiisrkdqrgsgqvgtyglntftnmeaqlirqmegegvl
DENV4 3058 ltyqnkvvkvlrptpkg-avmdiisrkdqrgsgqvgtyglntftnmevqlirqmeaegvi
YFV   3078 mtyknkvvkvlrpapggkaymdvisrrdqrgsgqvvtyalntitnlkvqlirmaeaemvi
WNV   3098 ltyrhkvvkvmrpaadgktvmdvisredqrgsgqvvtyalntftnlavqlvrmmegegvi
HCV   2676 lterlyvggpltnsrg-----encgyrrcrasgvlttscgntlt----cyikaraacraa
TBEC  3083 kayhakvvkvarpsrdggcimdvitrrdqrgsgqvvtyalntltnikvqlirmmegegvi
JEV   3100 ltyrhkvvkvmrpaaegktvmdvisredqrgsgqvvtyalntftniavqlvrlmeaegvi

ZIKV  3152 emqdlwllrkp----e--k-vt--rwlqsngwdrlkrmavsgddcvv----kpiddrfah
DENV1 3122 spneletpnla----e--r-vl--dwlekygverlkrmaisgddcvv----kpiddrfat
DENV2 3121 ksiqhltvtee----i--a-vq--nwlarvgrerlsrmaisgddcvv----kplddrfas
DENV3 3119 skadlenphls----e--kkvt--qwletkgverlkrmaisgddcvv----kpiddrfan
DENV4 3117 trdd---mhnpkglke--r-ve--kwlkecgvdrlkrmaisgddcvv----kplderfst
YFV   3138 hhqhvqdcdesvl--t--r-le--awltehgcdrlkrmavsgddcvv----rpiddrfgl
WNV   3158 gpddveklgkg----kgpk-vr--twlfengeerlsrmavsgddcvv----kplddrfat
HCV   2727 glqdctml-------------------------------vcgddlvvicesagvqedaas
TBEC  3143 eaad---ahnp----rllr-ve--rwlkehgeerlgrmlvsgddcvv----rplddrfgk
JEV   3160 gpqhleqlprk----n--k-iavrtwlfengeervtrmaisgddcvv----kplddrfat

ZIKV  3199 alrflndmgkvrkdtqewkpstgwsnweevpfcshhfnklylkdgrsivvpcrhqdelig
DENV1 3169 altalndmgkvrkdipqwepskgwndwqqvpfcshhfhqlimkdgreivvpcrnqdelvg
DENV2 3168 altalndmgkvrkdiqqwepsrgwndwtqvpfcshhfhelimkdgrvlvvpcrnqdelig
DENV3 3167 allalndmgkvrkdipqwqpskgwhdwqqvpfcshhfhelimkdgrklvvpcrpqdelig
DENV4 3165 sllflndmgkvrkdipqwepskgwknwqevpfcshhfhkifmkdgrslvvpcrnqdelig
YFV   3187 alshlnamskvrkdisewqpskgwndwenvpfcshhfhelqlkdgrrivvpcreqdelig
WNV   3207 slhflnamskvrkdiqewkpstgwydwqqvpfcsnhftelimkdgrtlvvpcrgqdelig
HCV   2756 lrafteam--trysappgdppqpeydlelitscssnvsvahdgagkrvyyltrdpttpla
TBEC  3189 alyflndmaktrkdigewehsagfssweevpfcshhfhelvmkdgrtlvvpcrdqdelvg
JEV   3209 alhflnamskvrkdiqewkpshgwhdwqqvpfcsnhfqeivmkdgrsivvpcrgqdelig

ZIKV  3259 ra-----rvspgagwsiretaclaksyaqmwqllyfh-----rrdlrlman-----aics
DENV1 3229 ra-----rvsqgagwslretaclgksyaqmwqlmyfh-----rrdlrlaan-----aics
DENV2 3228 ra-----risqgagwslretaclgksyaqmwslmyfh-----rrdlrlaan-----aics
DENV3 3227 ra-----risqgagwslretaclgkayaqmwslmyfh-----rrdlrlasn-----aics
DENV4 3225 ra-----risqgagwslretaclgkayaqmwslmyfh-----rrdlrlasm-----aics
YFV   3247 rg-----rvspgngwmiketaclskayanmwslmyfh-----krdmrllsl-----avss
WNV   3267 ra-----rispgagwnvrdtaclaksyaqmwlllyfh-----rrdlrlman-----aics
HCV   2814 raawetarhtpvnswlgniimfaptlwarmilmthffsvliardqleqalnceiygacys
TBEC  3249 ra-----rispgcgwsvretaclskaygqmwllsyfh-----rrdlrtlgl-----ains
JEV   3269 ra-----rispgagwnvkdtaclakayaqmwlllyfh-----rrdlrlman-----aics

ZIKV  3304 avpvdwvpt-----grttwsihg--kgewmttedmlmvwn----rvwieendhmedktpv
DENV1 3274 avpvdwvpt-----srttwsiha--hhqwmttedmlsvwn----rvwieenpwmedktri
DENV2 3273 avpshwvpt-----srttwsiha--khewmttedmltvwn----rvwiqenpwmedktpv
DENV3 3272 avpvhwvpt-----srttwsiha--hhqwmttedmltvwn----rvwiednpwmedktpv
DENV4 3270 avptewfpt-----srttwsiha--hhqwmttedmlkvwn----rvwiednpnmidktpv
YFV   3292 avptswvpq-----grttwsihg--kgewmttedmlevwn----rvwitnnphmqdktmv
WNV   3312 avpanwvpt-----grttwsiha--kgewmttedmlavwn----rvwieenewmedktpv
HCV   2874 iepldlppiiqrlhglsafslhsyspgeinrvaaclrklgvpplrawrhrarsvrar---
TBEC  3294 avpadwvpt-----grttwsiha--sgawmttedmldvwn----rvwildnpfmqnkerv
JEV   3314 avpvdwvpt-----grtswskhs--kgewmttedmlqvwn----rvwieenewmmdktpi

ZIKV  3353 tkwtdipylgkredlwcgslighrprttwaenik-----------dtvnmvrriigdee
DENV1 3323 sswedvpylgkredqwcgsligltaratwatniq-----------vainqvrrlign-e
DENV2 3322 esweeipylgkredqwcgsligltsratwakniq-----------tainqvrslignee
DENV3 3321 ttwenvpylgkredqwcgsligltsratwaqnip-----------taiqqvrslignee
DENV4 3319 hswedipylgkredlwcgsliglssratwaknih-----------taitqvrnligkee
YFV   3341 kkwrdvpyltkrqdklcgsligmtnratwashih-----------lvihrirtlig-qe
WNV   3361 erwsdvpysgkrediwcgsligtrtratwaenih-----------vainqvrsvig-ee
HCV   2931 -----llsrggraai-cgkyl-----fnwavrtklkltpiaaagrldlsgwftagysggd
TBEC  3343 mewrdvpylpkaqdmlcsslvgrreraewakniw-----------gavekvrkmigp-e
```

```
JEV    3363 tswtdvpyvgkrediwcgsligtrsratwaeniy-----------aainqvravig-ke

ZIKV   3401 kymdylstqvry-----lgeegstpgvl-----
DENV1  3370 nysdymtsmkrf-----k-nesepegalw----
DENV2  3370 -ytdympsmkrf-----rree-eeagvlw----
DENV3  3369 -fldympsmkrf-----rkeeesegaiw-----
DENV4  3367 -yvdympvmkry------sahfesegvl-----
YFV    3388 kytdyltvmdry-----svdadlqlgeli----
WNV    3408 kyvdymsslrry-----edtivvedtvl-----
HCV    2980 iyhsvsharprwfwfc-llllaagvgiyllpnr
TBEC   3390 kfkdylscmdrhdlhwelrlessii--------
JEV    3410 nyvdymtslrry-----edvlvqedrvi-----
```

Abbildung 3a:

Zika Virus ViraStripe® IgG

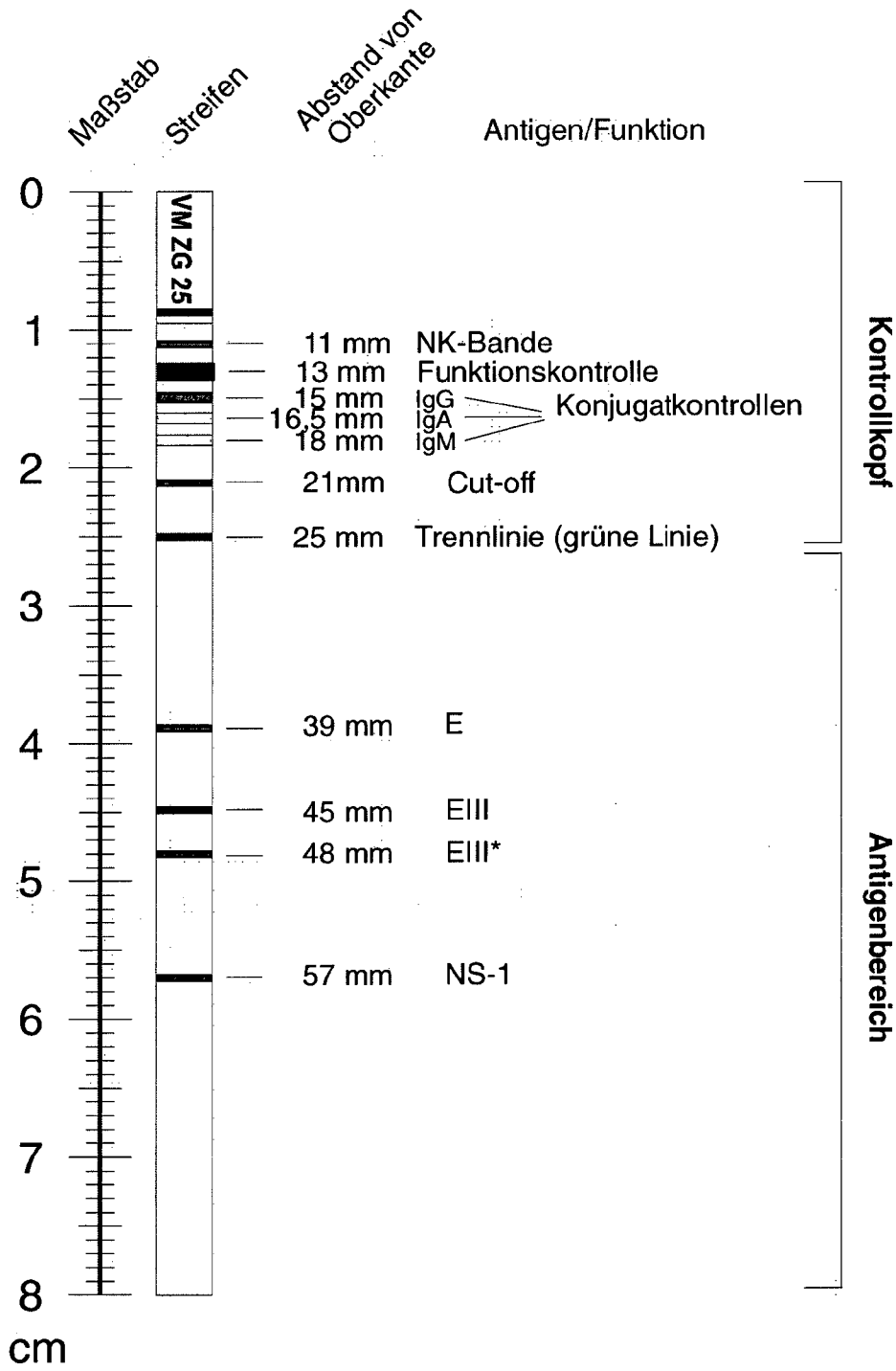
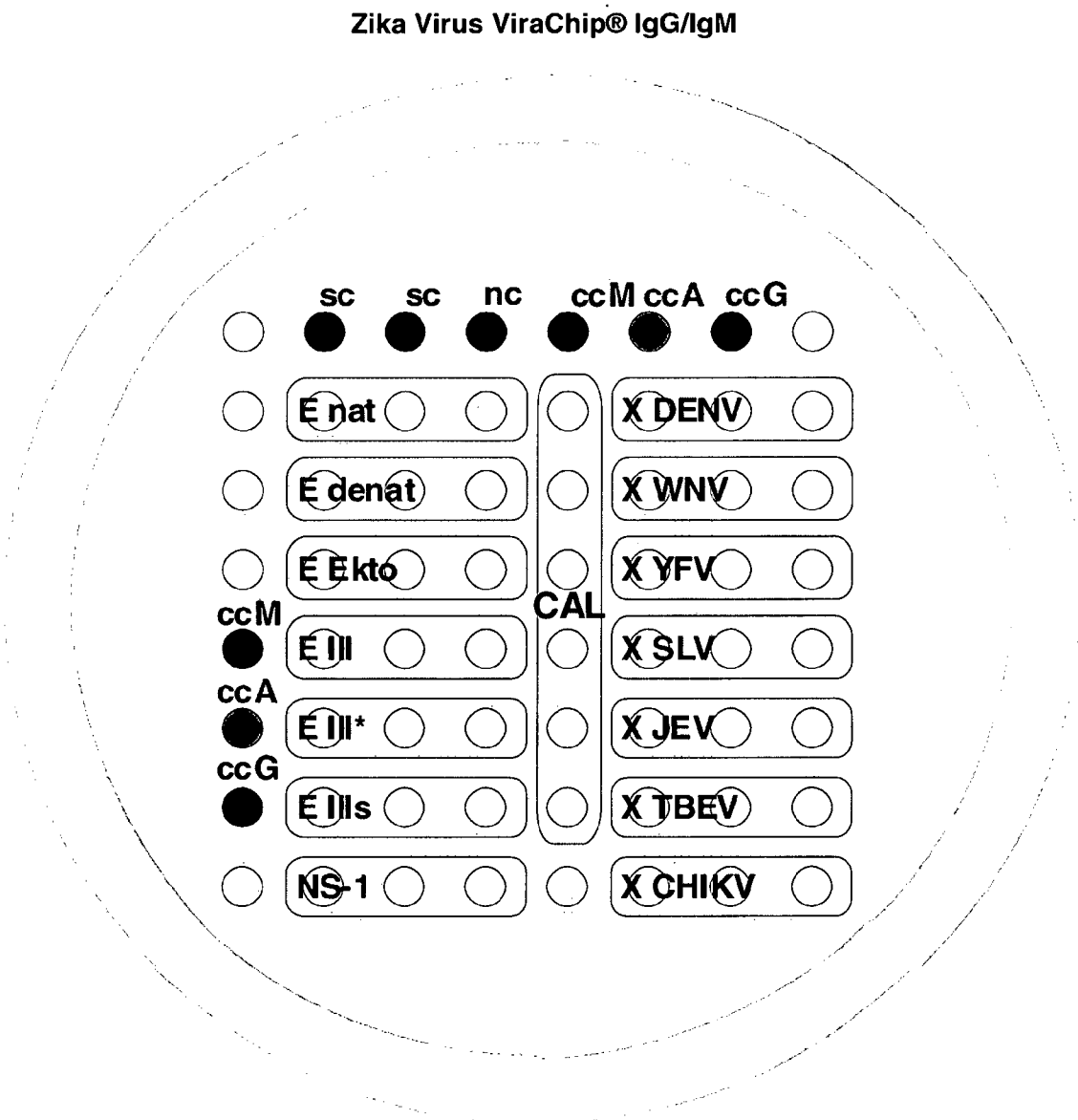
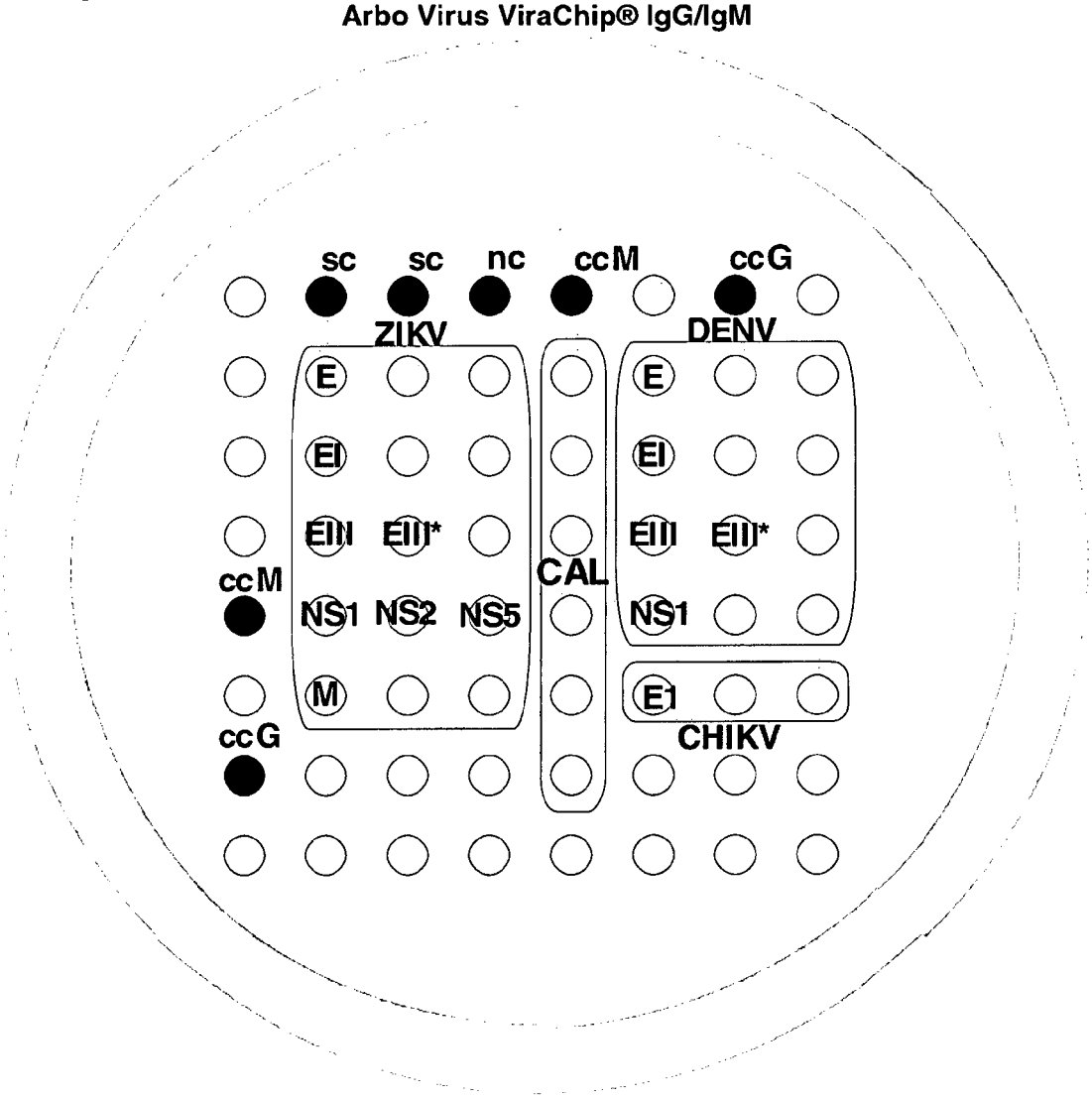


Abbildung 3b:



Kontrollpunkte: Serumkontrolle (sc), Negativkontrolle (nc), Konjugatkontrollen IgG (ccG), IgA (ccA), IgM (ccM)
Kalibrator (CAL)
ZIKV-Antigene: E nat (Envelope nativ), E denat (Envelope denaturiert), E Ekto (Envelope Ektodomäne ohne Transmembranhelices), EIII (Envelope C-terminale Domäne), EIII*(Fusionsprotein mit Envelope C-terminaler Domäne), EIIIs (Envelope C-terminale Domäne, einschließlich Anker-Region „stem"), NS-1 (Nicht-Strukturprotein 1)
Ausschluss-Antigene: eines oder mehrere Antigene abgeleitet aus Nicht-ZIKV Pathogenen DENV, WNV, YFV, SLV,JEV, TBEV, CHIKV

Abbildung 3c:



Kontrollpunkte: Serumkontrolle (sc), Negativkontrolle (nc), Konjugatkontrollen IgG (ccG), IgA (ccA), IgM (ccM)
Kalibrator (CAL)
ZIKV-Antigene: E (Envelope), Ei (Envelope internes Fragment), EIII (Envelope C-terminale Domäne), EIII*(Fusionsprotein mit Envelope C-terminaler Domäne), EIIIs (Envelope C-terminale Domäne, einschließlich Anker-Region „stem"), NS-1 (Nicht-Strukturprotein 1), NS-2 (Nicht-Strukturprotein 2), NS-1 (Nicht-Strukturprotein 5), M (Membranprotein)
DENV-Antigene: E (Envelope), Ei (Envelope internes Fragment), EIII (Envelope C-terminale Domäne), EIII*(Fusionsprotein mit Envelope C-terminaler Domäne), EIIIs (Envelope C-terminale Domäne, einschließlich Anker-Region „stem"), NS-1 (Nicht-Strukturprotein 1)
CHIKV-Antigen: E1 (Envelope)

Abbildung 4a : Zika Virus ViraStripe IgG Teststreifen mit Zika Virus positiven Seren

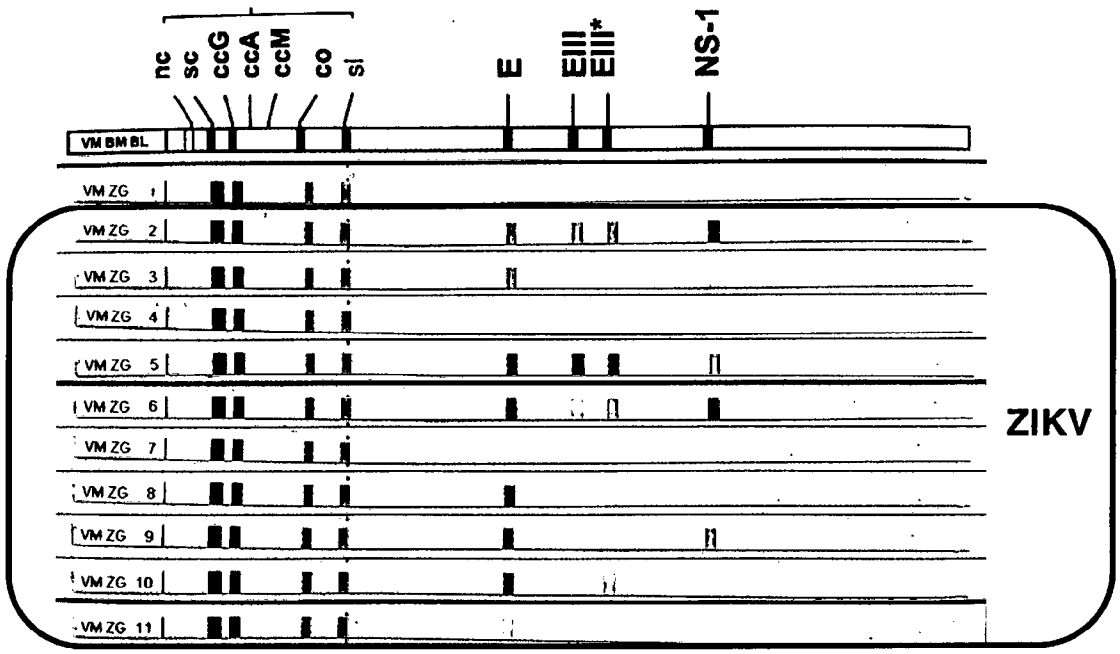


Abbildung 4b: Zika Virus ViraStripe IgM Teststreifen mit Zika Virus positiven Seren

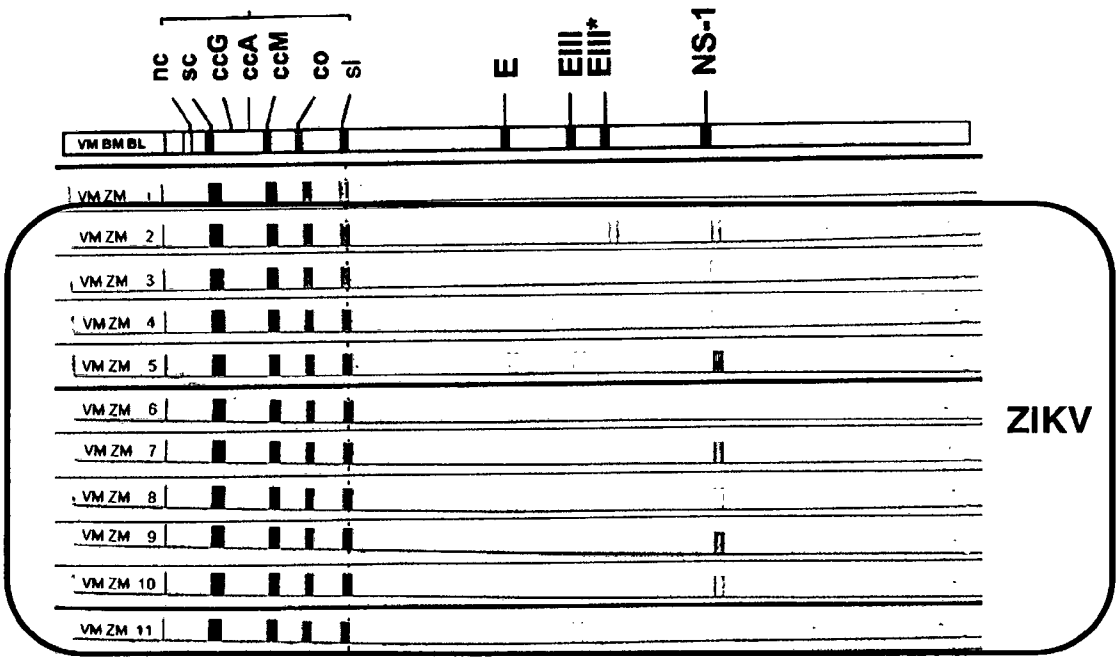


Abbildung 5: Zika Virus ViraStripe IgG Teststreifen mit DENV, WNV und TBEV positiven Seren

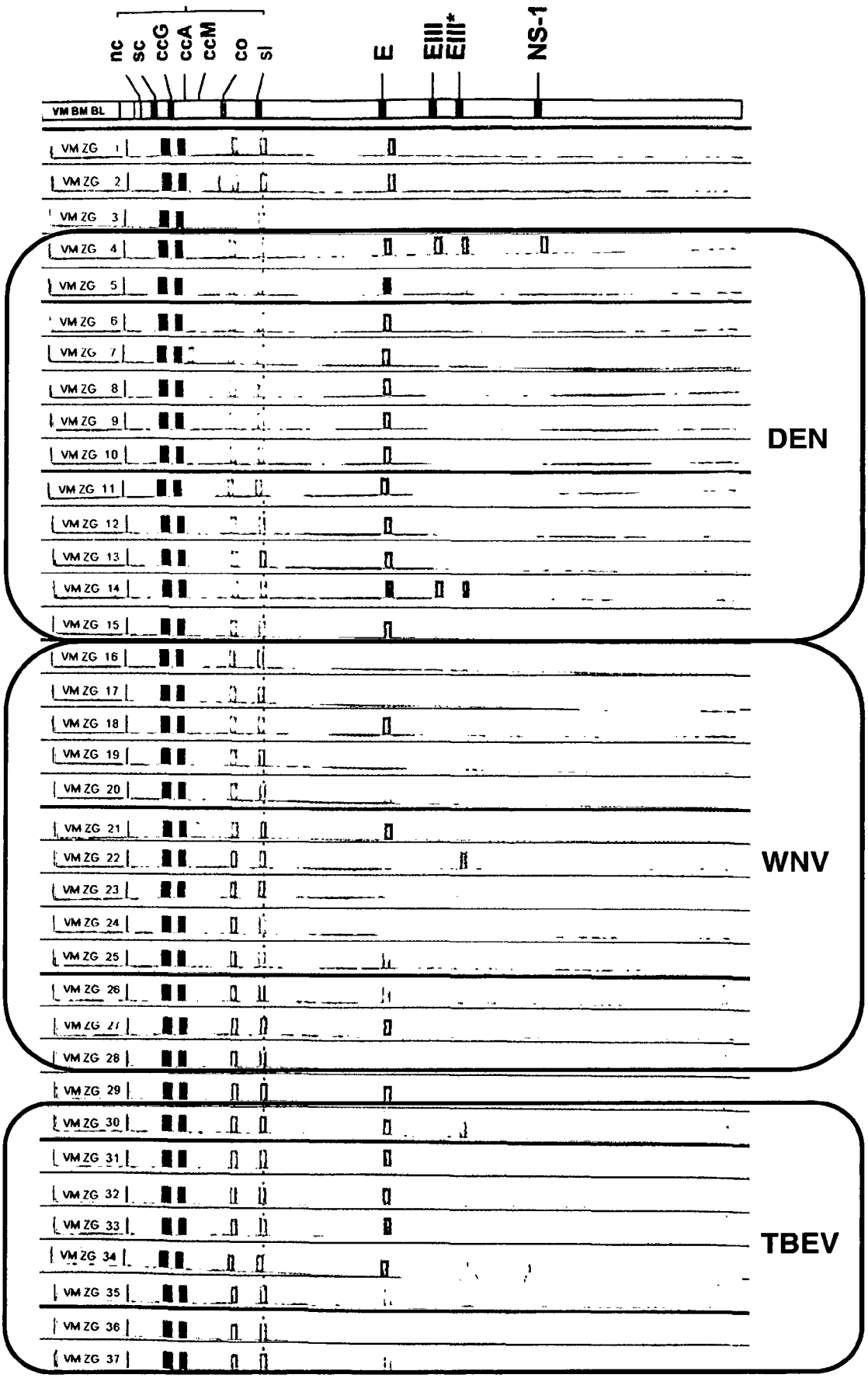

nc
sc
ccG
ccA
ccM
co
sl
E
EIII
EIII*
NS-1
VM BM BL
VM ZG 1
VM ZG 2
VM ZG 3
VM ZG 4
VM ZG 5
VM ZG 6
VM ZG 7
VM ZG 8
VM ZG 9
VM ZG 10
VM ZG 11
VM ZG 12
VM ZG 13
VM ZG 14
VM ZG 15
VM ZG 16
VM ZG 17
VM ZG 18
VM ZG 19
VM ZG 20
VM ZG 21
VM ZG 22
VM ZG 23
VM ZG 24
VM ZG 25
VM ZG 26
VM ZG 27
VM ZG 28
VM ZG 29
VM ZG 30
VM ZG 31
VM ZG 32
VM ZG 33
VM ZG 34
VM ZG 35
VM ZG 36
VM ZG 37
DEN
WNV
TBEV

Abbildung 6a: Zika Virus ViraStripe IgG Teststreifen mit einer Initialprobe eines ZIKV-positiven Serums mit positivem ZIKV-PCR-Ergebnis sowie Folgeproben desselben Patienten.

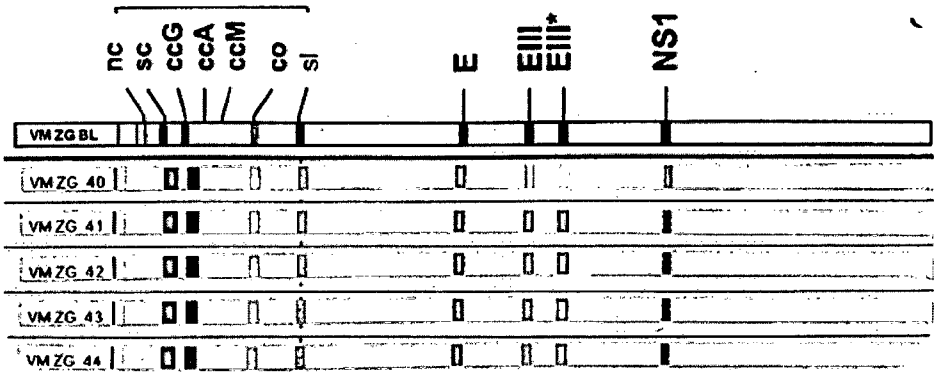


Abbildung 6b: Zika Virus ViraStripe IgM Teststreifen mit einer Initialprobe eines ZIKV-positiven Serums mit positivem ZIKV-PCR-Ergebnis sowie Folgeproben desselben Patienten.

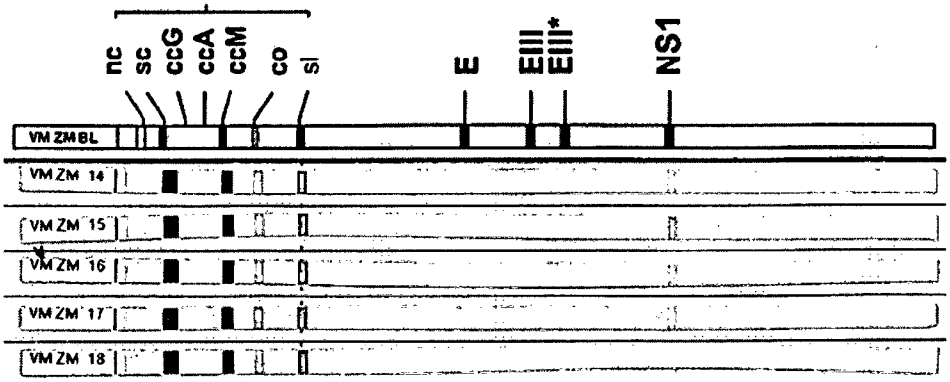
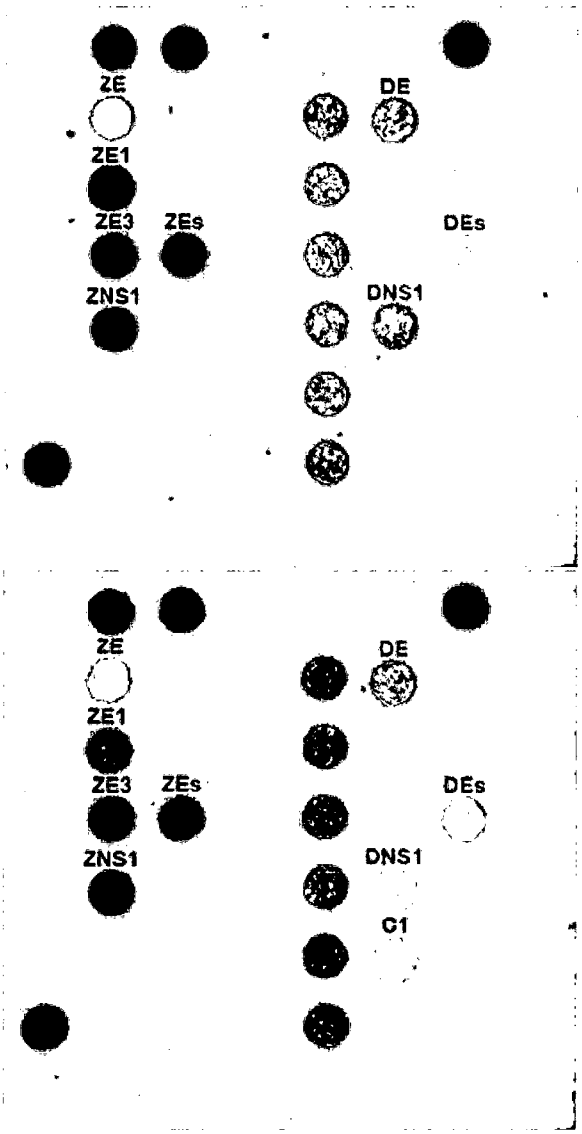
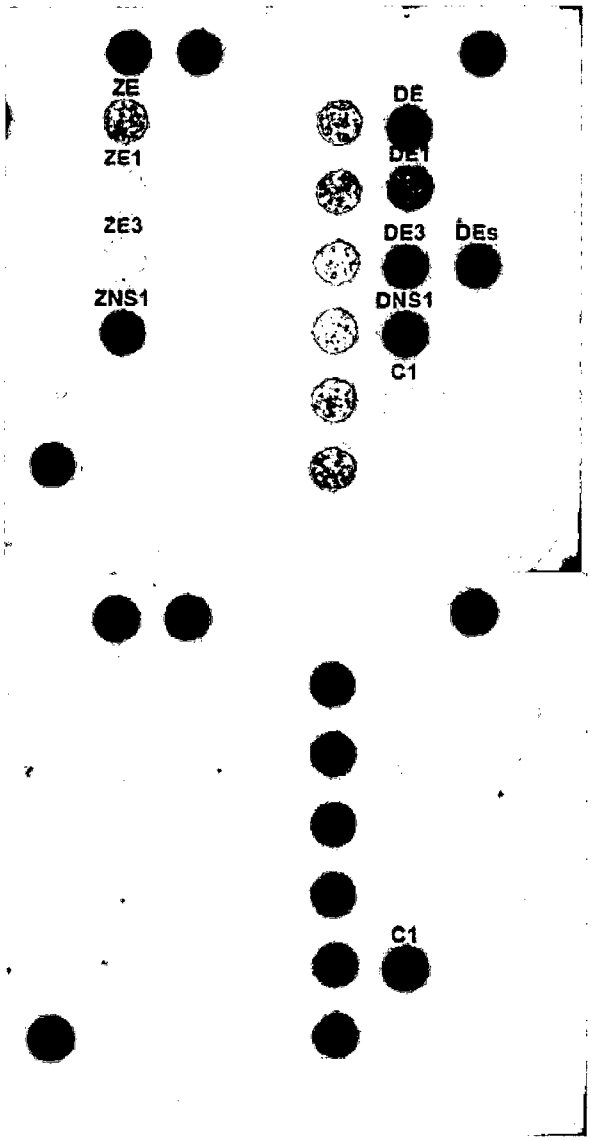


Abbildung 7: Arbo Virus ViraChip® IgG mit Proben von Patienten mit Verdacht auf ZIKV/DENV/CHIKV Infektion. Zuordnung der einzelnen Testflächen gemäß Abb. 3c.


ZE
ZE1
ZE3
ZEs
ZNS1
DE
DEs
DNS1
ZE
ZE1
ZE3
ZEs
ZNS1
DE
DEs
DNS1
C1


ZE
ZE1
ZE3
ZNS1
DE
DE1
DE3
DEs
DNS1
C1
C1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/000428

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/569 G01N33/543
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 272 860 A1 (PASTEUR INSTITUT [FR]) 12 January 2011 (2011-01-12) claims 6,11; sequence 8	1,18,19, 27
X	WIKAN NITWARA ET AL: "Immunological evidence of Zika virus transmission in Thailand", ASIAN PACIFIC JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE, vol. 9, no. 2, 13 January 2016 (2016-01-13), pages 141-144, XP029440424, ISSN: 1995-7645, DOI: 10.1016/J.APJTM.2016.01.017	1,2,5, 9-21,27
Y	page 142, left-hand column, paragraph 4 - right-hand column, paragraph 2; figure 1	22-26

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 June 2017	26/07/2017

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Fleitmann, J

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CAO-LORMEAU VAN-MAI ET AL: "Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study", THE LANCET, vol. 387, no. 10027, 2 March 2016 (2016-03-02), pages 1531-1539, XP029496412, THE LANCET PUBLISHING GROUP, GB ISSN: 0140-6736, DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00562-6 page 1533, left-hand column, paragraph 3 - page 1534, right-hand column, paragraph 3	1-13, 16-20
X	-& Cao-Lormeau: "Supplementary appendix to Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study", THE LANCET , 29 February 2016 (2016-02-29), pages 1-12, XP055302942, Retrieved from the Internet: URL:http://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/1-s2.0-S0140673616005626/1-s2.0-S0140673616005626-mmc1.pdf/271074/html/S0140673616005626/3059d11337f747eaf30d870d5d795580/mmc1.pdf [retrieved on 2016-09-15] page 1, line 1 - page 2, line 2	1-13, 16-20

T	MARTINES ROOSECELIS BRASIL ET AL: "Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series", THE LANCET, vol. 388, no. 10047, 26 June 2016 (2016-06-26), pages 898-904, XP029706724, ISSN: 0140-6736, DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30883-2 page 900, right-hand column, paragraph 3	

X	WO 2013/164476 A1 (PASTEUR INSTITUT [FR]) 7 November 2013 (2013-11-07) claims 12,26; figures 6-7; sequence 10	1-21,27

	-/--	

2

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	SUMITA LAURA MASAMI ET AL: "DETECTION OF HUMAN ANTI-ZIKA VIRUS IgG BY ELISA USING AN ANTIGEN FROM in vitro INFECTED VERO CELLS: PRELIMINARY RESULTS.", REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SAO PAULO, vol. 58, 89, 8 December 2016 (2016-12-08), pages 1-8, XP002771642, ISSN: 1678-9946, DOI: 10.1590/S1678-9946201658089 abstract page 3, left-hand column, paragraph 2 figure 1 -----	1-9, 12-20, 22-28
Y	DE SOUZA VANDA AKICO UEDA FICK ET AL: "Use of an immunoglobulin G avidity test to discriminate between primary and secondary dengue virus infections.", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 42, no. 4, April 2004 (2004-04), pages 1782-1784, XP002771643, ISSN: 0095-1137 page 1782, left-hand column, paragraph s - right-hand column, paragraph 2 -----	22-26

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2017/000428

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2272860 A1	12-01-2011	EP 2272860 A1	12-01-2011
		EP 2451828 A1	16-05-2012
		US 2012208176 A1	16-08-2012
		WO 2011004324 A1	13-01-2011
WO 2013164476 A1	07-11-2013	AU 2013255744 A1	13-11-2014
		CA 2872127 A1	07-11-2013
		CN 104704117 A	10-06-2015
		JP 2015517649 A	22-06-2015
		KR 20150016941 A	13-02-2015
		NZ 701380 A	31-03-2016
		SG 11201407167R A	27-11-2014
		US 2015099656 A1	09-04-2015
		WO 2013164476 A1	07-11-2013

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2017/000428

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. G01N33/569 G01N33/543
ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 2 272 860 A1 (PASTEUR INSTITUT [FR]) 12. Januar 2011 (2011-01-12) Ansprüche 6,11; Sequenz 8 -----	1,18,19, 27
X	WIKAN NITWARA ET AL: "Immunological evidence of Zika virus transmission in Thailand", ASIAN PACIFIC JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE, Bd. 9, Nr. 2, 13. Januar 2016 (2016-01-13) , Seiten 141-144, XP029440424, ISSN: 1995-7645, DOI: 10.1016/J.APJTM.2016.01.017	1,2,5, 9-21,27
Y	Seite 142, linke Spalte, Absatz 4 - rechte Spalte, Absatz 2; Abbildung 1 -----	22-26

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen [X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
30. Juni 2017	26/07/2017

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Fleitmann, J

2

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (April 2005)

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CAO-LORMEAU VAN-MAI ET AL: "Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study", THE LANCET, Bd. 387, Nr. 10027, 2. März 2016 (2016-03-02), Seiten 1531-1539, XP029496412, THE LANCET PUBLISHING GROUP, GB ISSN: 0140-6736, DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00562-6 Seite 1533, linke Spalte, Absatz 3 - Seite 1534, rechte Spalte, Absatz 3	1-13, 16-20
X	-& Cao-Lormeau: "Supplementary appendix to Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study", THE LANCET , 29. Februar 2016 (2016-02-29), Seiten 1-12, XP055302942, Gefunden im Internet: URL:http://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/1-s2.0-S0140673616005626/1-s2.0-S0140673616005626-mmc1.pdf/271074/html/S0140673616005626/3059d11337f747eaf30d870d5d795580/mmc1.pdf [gefunden am 2016-09-15] Seite 1, Zeile 1 - Seite 2, Zeile 2	1-13, 16-20

T	MARTINES ROOSECELIS BRASIL ET AL: "Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series", THE LANCET, Bd. 388, Nr. 10047, 26. Juni 2016 (2016-06-26), Seiten 898-904, XP029706724, ISSN: 0140-6736, DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30883-2 Seite 900, rechte Spalte, Absatz 3	

X	WO 2013/164476 A1 (PASTEUR INSTITUT [FR]) 7. November 2013 (2013-11-07) Ansprüche 12,26; Abbildungen 6-7; Sequenz 10	1-21,27

	-/--	

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X,P	SUMITA LAURA MASAMI ET AL: "DETECTION OF HUMAN ANTI-ZIKA VIRUS IgG BY ELISA USING AN ANTIGEN FROM in vitro INFECTED VERO CELLS: PRELIMINARY RESULTS.", REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SAO PAULO, Bd. 58, 89, 8. Dezember 2016 (2016-12-08), Seiten 1-8, XP002771642, ISSN: 1678-9946, DOI: 10.1590/S1678-9946201658089 Zusammenfassung Seite 3, linke Spalte, Absatz 2 Abbildung 1 -----	1-9, 12-20, 22-28
Y	DE SOUZA VANDA AKICO UEDA FICK ET AL: "Use of an immunoglobulin G avidity test to discriminate between primary and secondary dengue virus infections.", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Bd. 42, Nr. 4, April 2004 (2004-04), Seiten 1782-1784, XP002771643, ISSN: 0095-1137 Seite 1782, linke Spalte, Absatz s - rechte Spalte, Absatz 2 -----	22-26

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2017/000428

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 2272860 A1	12-01-2011	EP 2272860 A1	12-01-2011
		EP 2451828 A1	16-05-2012
		US 2012208176 A1	16-08-2012
		WO 2011004324 A1	13-01-2011
WO 2013164476 A1	07-11-2013	AU 2013255744 A1	13-11-2014
		CA 2872127 A1	07-11-2013
		CN 104704117 A	10-06-2015
		JP 2015517649 A	22-06-2015
		KR 20150016941 A	13-02-2015
		NZ 701380 A	31-03-2016
		SG 11201407167R A	27-11-2014
		US 2015099656 A1	09-04-2015
		WO 2013164476 A1	07-11-2013