

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 871/95

(51) Int.Cl.⁶ : **A61K 39/12**
C12N 15/40

(22) Anmeldetag: 23. 5.1995

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 2.1999

(45) Ausgabetag: 25.10.1999

(56) Entgegenhaltungen:

WO 93/17706A1

(73) Patentinhaber:

IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT
A-1221 WIEN (AT).

(72) Erfinder:

HEINZ FRANZ XAVER DR.
WIEN (AT).
ALLISON STEVEN DR.
WIEN (AT).
MANDL CHRISTIAN DR.
WIEN (AT).
KUNZ CHRISTIAN DR.
WIEN (AT).

(54) **VERBESSERTE VAKZINE ZUR IMMUNISIERUNG GEGEN TBE-VIRUSINFESTIONEN SOWIE EIN VERFAHREN ZU DESSEN HERSTELLUNG**

(57) Die Erfindung beschreibt Vakzinen zur Immunisierung gegen TBE-Virusinfektionen, umfassend eine Nukleinsäure, welche für Protein E und Protein prM/M, abgeleitet aus dem TBE-Virus, in zumindest im wesentlichen vollständiger, nativer Form kodiert.

AT 405 607 B

Die Erfindung betrifft eine Vakzine zur Immunisierung gegen Tick-Borne-Enzephalitis-Virus (TBE-Virus)-Infektionen.

Das TBE-Virus ist ein wichtiger Krankheitserreger beim Menschen und gehört zur Gattung Flavi-Virus innerhalb der Familie Flaviviridae. Es ist endemisch in Zentral- und Osteuropa, Skandinavien und Teilen von Asien und stellt in diesen Gebieten ein signifikantes Problem für die öffentliche Gesundheit dar (Kunz, *Acta Leidensia* 60 (1992), 1-14).

Das Flavi-Virus-Virion besteht aus einem Nukleocapsid, welches das Positivstrang-RNA-Genom in Verbindung mit dem viralen Capsid (C)-Protein enthält. Das Nukleocapsid ist von einer Lipidhülle umgeben, die die Membran-assoziierten Proteine E (50 bis 60 kD) und M (7 bis 8 kD) enthält (Heinz und Roehrig in: van Regenmortel und Neurath (Hrsgb.) "Immunochemistry of Viruses II. The Basis for Serodiagnosis and Vaccines. Elsevier Sciences, Amsterdam (1990), 289-305).

Das Haupthüllprotein E spielt eine zentrale Rolle in der Biologie von Flavi-Viren, indem es bedeutende virale Eintrittsfunktionen vermittelt und eine protektive Immunantwort im Wirt auslöst. Es gibt bereits eine beträchtliche Menge an Informationen betreffend die Struktur des Hüllproteins E des TBE-Virus und es wurde ein Strukturmodell auf Basis einer Vielzahl von biochemischen und immunologischen Daten vorgeschlagen (Mandl et al., *J. Virol.* 63 (1989), 564-571).

In der AT 402897 B sind Vakzinen gegen TBE-Infektionen beschrieben, umfassend nicht-infektiöse subvirale Partikel, welche im wesentlichen das Protein E in seiner vollständigen nativen Form und gegebenenfalls das Protein prM/M enthalten, welche Proteine aus dem TBE-Virus abgeleitet sind.

Bei einem Verfahren zur Herstellung dieser subviralen Partikel wurden in einem ersten Schritt die Kodierungssequenzen für die aus dem TBE-Virus abgeleiteten Proteine prM/M und E in ein Zellkultursystem eingeführt, worauf dann das Protein E in seiner vollständigen, nativen Form exprimiert wird und subvirale nicht-infektiöse Partikel gebildet werden. Mittels dieser subviralen Partikel kann das immunogene Protein E in nativer Form dem Immunsystem präsentiert werden, so daß eine effiziente Vakzinierung gegen TBEV-Infektion möglich ist.

Es wurde nunmehr im Zuge weitergehender Forschungsarbeiten überraschenderweise gefunden, daß die Nukleinsäure, welche die erwähnten Kodierungssequenzen umfaßt, als solche zur Immunisierung gegen TBE-Virusinfektionen verwendet werden kann.

Es ist im Stand der Technik bekannt, daß das Einbringen von "nackter" DNA in Mäusen eine Immunantwort auslösen kann. Beispielsweise können Mäuse, denen ein Plasmid, enthaltend eine genomische Kopie des menschlichen Wachstumshormons (hGH) injiziert wurde, Antikörper gegen menschliches hGH entwickeln (*Nature*, 356 (1992), 152-154).

Weiters sind einige erfolgreiche "genetische Immunisierungen" durch nackte DNA beschrieben worden. Bei dieser genetischen Immunisierung wurde DNA, welche für ein oder mehrere Antigene eines Virus kodiert, verabreicht, worauf in vivo die entsprechenden viralen Antigene synthetisiert worden sind, welche separat jedes für sich eine Immunantwort auslösen und damit in weiterer Folge einen Schutz vor Virusinfektionen bewirken kann. Erfolgreiche protektive Immunität in Mäusen durch intramuskuläre Injektion von Influenza-Virus-DNA wurde in *PNAS* 91 (1994), Seiten 9519-9523 (Raz et al.) beschrieben. Eine ebenfalls erfolgreiche Immunisierung von Ratten und Mäusen gegen das Hepatitis B-Virus (HBV)-Oberflächenantigen durch intramuskuläre Injektion von Plasmid-DNA, welche für das HBV-Oberflächenantigen kodierende Sequenzen enthält, wurde in *Vaccine* 12 (16), (1994), Seiten 1503-1509 (Davis et al.) beschrieben. Viele Versuche zur Immunisierung mit nackter DNA kodierend für Pathogen-Antigene blieben aber erfolglos. Beispielsweise wurden Versuche zur Immunisierung gegen HIV mittels direktem DNA-Transfer in Körperzellen zwar beschrieben (WO 93/17706), eine erfolgreiche Vakzine konnte bisher mit dieser Methodik jedoch nicht erhalten werden. Insbesondere scheint es, daß es für eine erfolgreiche immunisierende Wirkung der reinen DNA-Vakzine - neben dem Einbringen der DNA in die Zelle - besonders vorteilhaft ist, daß die die Immunantwort auslösende Antigen in der nativen Form dem Immunsystem präsentiert wird. Die exakte Struktur der nativen Form bzw. die biosynthetischen Vorgänge, die zur Bildung der nativen Form und Struktur erforderlich sind, sind nur für wenige Pathogene gesichert, so daß eine effektive Immunisierung mit nackter Nukleinsäure sich in vielen Fällen äußerst schwierig gestaltet, wenn nicht - aufgrund von mangelnden genauen Kenntnissen der Antigenstruktur - gar unrealisierbar ist mit dem gegenwärtigen Wissensstand.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung hat sich herausgestellt, daß eine Immunisierung mit einer Nukleinsäuresequenz, welche ausschließlich für das die wesentliche Immunantwort bei TBE-Infektionen auslösende Protein E kodiert, nicht ausreicht, um eine Immunantwort zu erhalten, die vor einer Erkrankung schützt.

Überraschenderweise konnte eine erfolgreiche Immunantwort nur durch Verabreichung von Nukleinsäuresequenzen erhalten werden, welche neben der Kodierungssequenz für das Protein E in seiner vollständi-

gen, nativen Form noch Kodierungssequenzen für das Protein prM/M umfaßt. Es zeigte sich weiters, daß mit einer Nukleinsäure, enthaltend eine Protein E-Kodierungssequenz, welche eine Deletion des Ankerbereiches des Protein E aufweist, ebenfalls keine erfolgreiche Immunisierung erhalten werden konnte.

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist demgemäß eine Vakzine zur Immunisierung gegen Tick-Borne-Enzephalitis-Virus (TBE-Virus)-Infektionen, umfassend eine Nukleinsäure, welche für Protein E und Protein prM/M, abgeleitet aus dem TBE-Virus, in deren zumindest im wesentlichen vollständiger, nativen Form kodiert.

10 Mit der vorliegenden Erfindung konnte erstmals eine Nukleinsäureimmunisierung für Flavi-Viren im allgemeinen gezeigt werden. Das erfindungsgemäße Immunisierungssystem ist daher prinzipiell nicht nur auf TBE-Virusimmunisierungen, sondern - wegen der großen Homologie aller Flavi-Viren in Bezug auf das Protein E und prM/M (s. Chambers et al., Annual Review of Microbiology, Vol. 44, 1990, S. 649-688: Flavivirus Genome Organization, Expression and Replication) - allgemein auf Immunisierungen gegen Flavi-Virusinfektionen anwendbar.

15 Wesentlich für eine Nukleinsäure-Vakzine zur Immunisierung gegen TBE-Virus ist, daß Protein E in seiner im wesentlichen vollständigen nativen Form von der Nukleinsäure kodiert wird. Selbstverständlich fallen Vakzine mit Nukleinsäuren, welche sich aus der Degeneration des genetischen Kodes aus dem Austausch von nichtstrukturwesentlichen Aminosäurekodons oder aus natürlichen oder im Labor erzeugten Mutationen ergeben, ebenfalls unter die vorliegende Erfindung, solange mit diesen Nukleinsäuremodifikationen der Kodierungssequenz des Proteins E eine erfolgreiche Immunantwort hervorgerufen werden kann.

20 Vakzinen enthaltend Nukleinsäuren mit Deletionen oder Insertionen in der Kodierungssequenz des Proteins E, welche die für die Immunisierung erforderliche Struktur des Proteins E im antigenen Epitopbereich im wesentlichen unverändert lassen, sind ebenfalls als in den Rahmen der Erfindung fallend anzusehen, da sie als von der TBE-Virussequenz abgeleitet gelten. Entsprechendes gilt selbstverständlich auch für die Kodierungssequenz des Proteins prM/M. Da das Protein prM/M bedeutend ist für eine zuverlässige Bildung

25 und Sekretion der subviralen Partikel, sind Sequenzabweichungen bezüglich des Proteins prM/M von nicht so entscheidender Bedeutung wie bei Protein E, solange das erfolgreiche Assembling des Partikels gewährleistet ist. Die Natur der Nukleinsäure ist nicht erfindungswesentlich. RNA und DNA können gleichermaßen verwendet werden, wobei DNA wegen der erhöhten Stabilität gegenüber RNA in manchen Anwendungsbereichen Vorteile bietet. Die Nukleinsäure kann gleichermaßen biologisch oder durch chemische Synthese hergestellt werden.

30 Vorzugsweise ist die für Protein E kodierende Nukleinsäure aus dem europäischen oder fernöstlichen Subtyp des TBE-Virus abgeleitet, da dies besonders verbreitete Subtypen sind.

Besonders bevorzugte Vakzinen sind solche, bei denen die Nukleinsäure ein Plasmidvektor ist. Als besonders geeignete Plasmidvektoren haben sich solche herausgestellt, welche starke Promotoren, wie z.B. den HSV-, RSV-, EBV-, β -Actin-, Adeno-, MMTV-, hsp- und hGH-Promotor enthalten. Starke Promotoren ermöglichen eine effiziente Genexpression.

Zu den geeignetsten Vektoren bzw. Promotoren zählen die vom Plasmid pCMV β (Mac Gregor et al.) abgeleiteten Plasmide, welche den CMV-"Immediate Early"-Promotor enthalten.

40 Selbstverständlich können die Nukleinsäuren der erfindungsgemäßen Vakzine noch weitere kodierende oder nicht-kodierende Sequenzen umfassen, insbesondere wenn die Nukleinsäure als Nukleinsäurevektor zur Verfügung gestellt wird.

Beispiele für solche weiteren Sequenzen sind - neben den Promotoren - noch Markergene, weitere Regulatoren betreffend Transkription, Translation oder Posttranslations-Modifikationen, etc. Bei diesen komplexeren Nukleinsäure-Konstrukten ist jedoch stets darauf zu achten, daß nach der Einbringung der

45 Nukleinsäure in die Zielzelle durch Translation der Nukleinsäure kein infektiöses Virus gebildet werden kann, die Vakzine also ein "Totimpfstoff" ist bzw. bleibt.

Die erfindungsgemäße Vakzine kann in der einfachsten Form die "nackte" Nukleinsäure, gegebenenfalls in einem geeigneten Puffersystem, enthalten. Weitere Bestandteile, wie arzneimitteltechnische Zusatzstoffe, Trägersubstanzen oder spezielle verabreichungsspezifische Substanzen können selbstverständlich ebenfalls vorhanden sein.

Die Applikation der erfindungsgemäßen Vakzine erfolgt bevorzugterweise durch Injektion, insbesondere durch intramuskuläre, intradermale oder subkutane Injektion, kann aber gleichwohl auch oral erfolgen.

Die verabreichte Menge der erfindungsgemäßen Vakzine richtet sich nach der Art der Verabreichung und dem verwendeten Adjuvans. Im Fall einer intramuskulären Administration ist die verabreichte Menge in

55 der Regel höher als bei einer intradermalen Administration, um die gleiche protektive Immunantwort zu erhalten. Die bevorzugt verwendete Menge liegt im allgemeinen im Bereich von 0,01 ng bis 10 mg/Dosis, am meisten bevorzugt im Bereich von 1 ng bis 1 mg/Dosis.

Die erfindungsgemäße Vakzine hat den wesentlichen Vorteil, daß keine Zellkultursysteme zur Herstellung der subviralen Partikel eingesetzt werden müssen, sondern daß die Partikel in vivo gebildet werden und so direkt eine Immunantwort auslösen können.

Die erfindungsgemäße Vakzine hat weiterhin im Gegensatz zu Vakzinen, welche auf der Grundlage von Proteinen beruhen, den Vorteil, daß sie eine große Stabilität aufweist, insbesondere, wenn die Nukleinsäure eine DNA ist. Damit ist es möglich, Vakzinen auch ohne großen Kühlaufwand für sehr lange Zeit zu lagern, wobei durch diese Lagerung keine wesentlichen Aktivitätsverluste zu erwarten sind. Insbesondere in lyophilisierter Form kann die Nukleinsäure für eine praktisch unbegrenzte Zeitdauer unbeschadet sogar bei Raumtemperatur gelagert werden. Auch die Rekonstitution einer lyophilisierten erfindungsgemäßen Vakzine kann viel einfacher erfolgen als die Rekonstitution einer lyophilisierten Proteinlösung, welche erfahrungsgemäß oft auf Grund der Natur des Proteins Probleme aufwerfen kann.

Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Vakzine ist, daß im Gegensatz zu konventionellen Totimpfstoffsystemen, das immunisierende Antigen in vivo synthetisiert wird und zur Ausbildung einer effizienten zellulären Immunantwort führt (Science, Vol. 259, 19. März 1993, S. 1691-1692, Research News: Naked DNA Points Way to Vaccines).

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung Nukleinsäuresequenzen, insbesondere Nukleinsäurevektoren, umfassend die gesamte Kodierungssequenz der vom TBE-Virus abgeleiteten Proteine E und prM/M als Arzneimittel. Bisher konnte im Stand der Technik noch über keine einzige erfolgreiche Nukleinsäureimmunisierung mit Flavi-Virus-DNA berichtet werden. Die medizinische Verwendung dieser Nukleinsäure(-vektoren) stellt daher eine überraschende neue Verwendungsmöglichkeit dar. Unter Vektor wird erfindungsgemäß jegliches Nukleinsäurevehikel verstanden, also insbesondere Plasmide, Viren oder Transposons.

Bisher wurde lediglich ein von SV40 abgeleiteter Plasmidvektor, welcher die Proteinsequenz der von TBE-Virus abgeleiteten Proteine prM/M und E enthält, beschrieben (Allison et al., Virus-Genes 8 (3), (1994), Seiten 187-198). Für diese SV40-Plasmide wurde jedoch die Möglichkeit einer Immunisierungswirkung nicht diskutiert.

Die erfindungsgemäßen Plasmidvektoren unterscheiden sich vor allem von den bisher beschriebenen Plasmidvektoren durch ihre Eignung zur Immunisierung. Daher liegen die erfindungsgemäßen Plasmidvektoren insbesondere als verabreichungsfertige Lösungen oder Lyophilisate in einer zur Verabreichung geeigneten Spritze bzw. Ampulle vor.

Bei Plasmidvektoren haben sich erfindungsgemäß Promotoren als wirksam herausgestellt, welche aus der Gruppe CMV-, HSV-, RSV-, EBV-, β -Actin-, Adeno-, MMTV-, hsp- und hGH-Promotor ausgewählt sind, wobei sich insbesondere der CMV-"Immediate Early"-Promotor als besonders effizient erwiesen hat.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung einer Nukleinsäure, umfassend die gesamte Kodierungssequenz der vom TBE-Virus abgeleiteten Proteine prM/M und E zur Herstellung einer Vakzine.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und der dazugehörigen Zeichnungsfür, auf die sie jedoch nicht beschränkt sein soll, noch weiter erläutert.

Es zeigen:

Fig. 1 die verwendeten Inserts; Fig. 2a, b, c eine vollständige Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Proteins prM/M und E des Inserts des Plasmids CMV-PEwt.

Beispiel:

Zur Immunisierung mit nackter DNA wurden Plasmide verwendet, welche die in Fig. 1 dargestellten Inserts unter der Kontrolle des CMV-"Immediate Early"-Promotors enthielten. Diese Plasmide (CMV-PE wt, CMV-PEst, CMV-Ewt, CMV-Est) wurden durch Umklonierung der Inserts aus den in Allison et al. beschriebenen Plasmiden SV-PEwt, SV-PEst, SV-Ewt und SV-Est in das Plasmid pCMV β (Clontech) gewonnen (Mac Gregor et al., Nucleic Acids Research, IRL Press, Vol. 17, Nr. 6, 1989, S. 2365: "Construction of plasmids that express E. coli β -galactosidase in mammalian cells") und durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982)

CMV-PEwt enthält die Sequenzen für die Wild-Typ-Proteine prM und E.

CMV-PEst enthält die Sequenzen für das Wild-Typ-Protein prM und eine deletierte Sequenz des Proteins E, wobei die Codons für 61 carboxyterminale Aminosäuren, welche den Membrananker des Proteins E bilden, fehlen.

In CMV-Ewt ist der Großteil der prM-Sequenz nicht vorhanden, jedoch die vollständige Sequenz des Wild-Typ-Proteins E.

CMV-Est enthält keine prM-Sequenz und die deletierte Protein E-Sequenz aus CMV-PEst.

Jedes dieser vier Plasmide wurde in zwei Konzentrationen (60 µg/ml und 300 µg/ml in PBS) zur Immunisierung von Mäusen (Swiss albino) eingesetzt, wobei für jede Plasmidpräparation 10 Mäuse (5 Weibchen und 5 Männchen) verwendet wurden. Jeder Maus wurden 2 mal 100 µl der jeweiligen DNA-Präparation im Abstand von 2 Wochen intradermal injiziert. Als Kontrollen wurden das Plasmid pCMVβ in einer Konzentration von 300 µg/ml sowie PBS in gleicher Weise verwendet. Zum Vergleich mit der konventionellen Immunisierung wurden Gruppen von je 10 Mäusen mit dem Formalin-inaktivierten Virus in Konzentrationen von 1 µg/ml und 5 µg/ml ebenfalls 2 mal im Abstand von 2 Wochen immunisiert, wobei 0,2 ml pro Maus subkutan injiziert und 0,2 % Al(OH)₃ als Adjuvans verwendet wurden. Eine Woche nach der zweiten Immunisierung wurde den Mäusen zum Nachweis spezifischer Antikörper im ELISA Blut abgenommen, und gleichzeitig erfolgte eine intraperitoneale Challenge-Infektion mit 500 LD₅₀ des TBE-Virus. Die Beobachtungszeit betrug 3 Wochen. Die Ergebnisse des Antikörperrnachweises und des Schutzversuchs sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt. Wie daraus hervorgeht, konnte bei der DNA-Immunisierung ein Schutz gegen eine tödliche Infektion mit dem TBE-Virus nur mit jenem Plasmid erreicht werden, das die Gene für die vollständigen prM- und E-Proteine enthält. Dies ist wahrscheinlich dahingehend zu interpretieren, daß die Anwesenheit des prM/M-Proteins für den Zusammenbau von subviralen Partikeln, in welchen Protein E in immunogener Form vorliegt, notwendig ist.

Tabelle 1

Ergebnisse des Mäuseschutzversuches		
Immunogen	Schutz	Antikörper-positiv
Plasmide		
PE-wt 60 µg/ml	6 ^a /10 ^b	1 ^c /10 ^d
PE-wt 300 µg/ml	9/10	5/10
E-wt 60 µg/ml	0/10	0/10
E-wt 300 µg/ml	0/10	0/10
PE-st 60 µg/ml	0/10	0/10
PE-st 300 µg/ml	0/10	0/10
E-st 60 µg/ml	0/10	0/10
E-st 300 µg/ml	0/10	0/10
CMV-β 300 µg/ml	0/10	0/10
Kontrollen		
HCOH Virus 1 µg/ml	4/10	4/10
HCOH Virus 5 µg/ml	10/10	10/10
PBS	0/10	0/10

^a Anzahl der geschützten Mäuse

^b Anzahl der untersuchten Mäuse

^c Anzahl der ELISA-positiven Mäuse

^d Anzahl der untersuchten Mäuse

Patentansprüche

1. Vakzine zur Immunisierung gegen Tick-Borne-Enzephalitis-Virus (TBE-Virus)-Infektionen, umfassend eine Nukleinsäure, welche für Protein E und Protein prM/M, abgeleitet aus dem TBE-Virus, in deren zumindest im wesentlichen vollständiger, nativer Form kodiert.
2. Vakzine nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die für Protein E und prM/M kodierende Sequenz aus dem europäischen oder fernöstlichen Subtyp des TBE-Virus abgeleitet ist.
3. Vakzine nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Nukleinsäure ein Plasmidvektor ist.

AT 405 607 B

4. Vakzine nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Plasmidvektor ein von CMV β abgeleiteter Plasmidvektor ist.
5. Nukleinsäurevektor, umfassend die gesamte Kodierungssequenz der vom TBE-Virus abgeleiteten Proteine E und prM/M, als Arzneimittel.
6. Nukleinsäurevektor, umfassend die gesamte Kodierungssequenz der vom TBE-Virus abgeleiteten Proteine prM/M und E, ausgenommen ein von SV 40 abgeleiteter Plasmidvektor.
7. Nukleinsäurevektor nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß er ein Plasmidvektor ist.
8. Plasmidvektor nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Promotor des Plasmidvektors ausgewählt ist aus der Gruppe CMV-, HSV-, RSV-, EBV-, β -Actin-, Adeno-, MMTV-, hsp- und hGH-Promotor.
9. Plasmidvektor nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Promotor des Plasmidvektors ein CMV-Promotor ist.
10. Verwendung einer Nukleinsäure, umfassend die gesamte Kodierungssequenz der vom TBE-Virus abgeleiteten Proteine prM/M und E, zur Herstellung einer Vakzine.

Hiezu 4 Blatt Zeichnungen

25

30

35

40

45

50

55

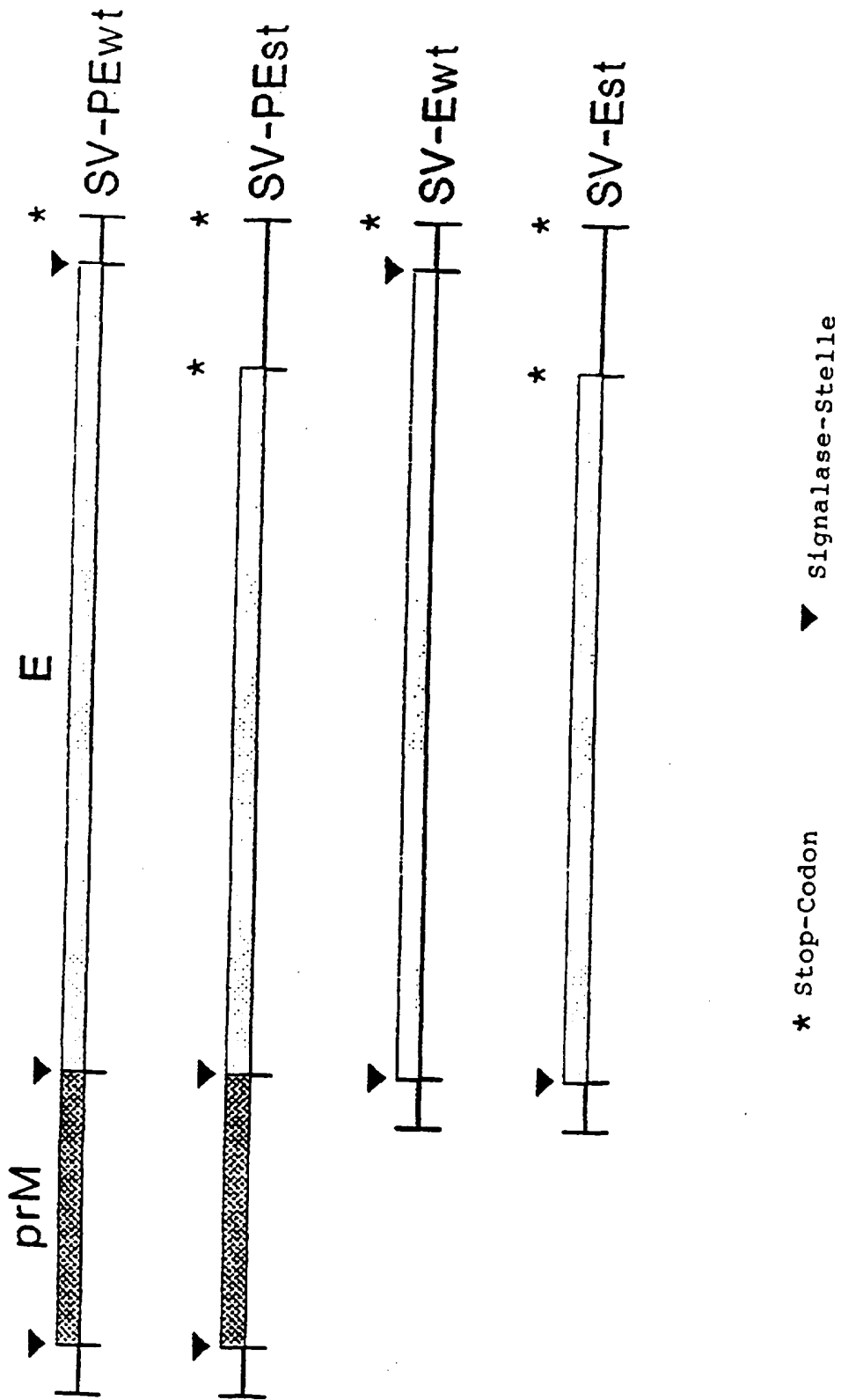


Fig. 1

Fig. 2a

ATG GTT GGC TTG CAA AAA CGT GGG AAA AGG AGG TCA GCG ACG GAC 432
MET Val Gly Leu Gln Lys Arg Gly Lys Arg Arg Ser Ala Thr Asp C100

433 TGG ATG AGC TGG TTG CTG GTC ATC ACT CTG TTG GGG ATG ACG CTT GCT 480
C101 Trp Met Ser Trp Leu Leu Val Ile Thr Leu Leu Gly Met Thr Leu Ala__C116

481 $\left\{ \begin{array}{l} \text{GCA ACG GTG AGG AAA GAA AGG GAT GGC TCA ACT GTG ATC AGA GCT GAA} \\ \text{p1 Ala Thr Val Arg Lys Glu Arg Asp Gly Ser Thr Val Ile Arg Ala Glu} \end{array} \right. \begin{array}{l} \text{528} \\ \text{p16} \end{array}$

529 GGA AAG GAT GCA GCA ACT CAG GTG CGT GTG GAG AAT GGC ACC TGT GTG 576
p17 Gly Lys Asp Ala Ala Thr Gln Val Arg Val Glu Asn_Gly_Thr Cys Val p32

577 ATC CTG GCT ACT GAC ATG GGG TCA TGG TGT GAT GAT TCA CTG TCC TAT 624
p33 Ile Leu Ala Thr Asp Met Gly Ser Trp Cys Asp Asp Ser Leu Ser Tyr p48

625 GAG TGT GTG ACC ATA GAT CAA GGA GAA GAG CCT GTT GAC GTG GAT TGT 672
p49 Glu Cys Val Thr Ile Asp Gln Gly Glu Glu Pro Val Asp Val Asp Cys p64

673 TTT TGC CGG AAC GTT GAT GGA GTC TAT CTG GAG TAC GGA CGC TGT GGG 720
p65 Phe Cys Arg Asn Val Asp Gly Val Tyr Leu Glu Tyr Gly Arg Cys Gly p80

721 AAA CAG GAA GGC TCA CGG ACA AGG CGC $\left\{ \begin{array}{l} \text{TCA GTG CTG ATC CCA TCC CAT} \\ \text{p81 Lys Gln Glu Gly Ser Arg Thr Arg Arg Ser Val Leu Ile Pro Ser His} \end{array} \right. \begin{array}{l} \text{768} \\ \text{p96} \end{array}$

769 GCT CAG GGA GAG CTG ACG GGA AGG GGA CAC AAA TGG CTA GAA GGA GAC 816
p97 Ala Gln Gly Glu Leu Thr Gly Arg Gly His Lys Trp Leu Glu Gly Asp p112

817 TCG CTG CGA ACA CAC CTT ACT AGA GTT GAG GGA TGG GTC TGG AAG AAC 864
p113 Ser Leu Arg Thr His Leu Thr Arg Val Glu Gly Trp Val Trp Lys Asn p128

865 AAG CTA CTT GCC TTG GCA ATG GTT ACC GTT GTG TGG TTG ACC CTG GAG 912
p129 Lys Leu Leu Ala Leu Ala Met Val Thr Val Val Trp Leu Thr Leu Glu p144

913 AGT GTG GTG ACC AGG GTC GCC GTT CTT GTT GTG CTC CTG TGT TTG GCA 960
p145 Ser Val Val Thr Arg Val Ala Val Leu Val Val Leu Leu Cys Leu Ala p160

961 CCG GTT TAC GCT $\left\{ \begin{array}{l} \text{TCG CGT TGC ACA CAC TTG GAA AAC AGG GAC TTT GTG} \\ \text{p161 Pro Val Tyr Ala Ser Arg Cys Thr His Leu Glu Asn Arg Asp Phe Val} \end{array} \right. \begin{array}{l} \text{1008} \\ \text{E12} \end{array}$

1009 ACT GGT ACT CAG GGG ACT ACG AGG GTC ACC TTG GTG CTG GAA CTG GGT 1056
E13 Thr Gly Thr Gln Gly Thr Thr Arg Val Thr Leu Val Leu Glu Leu Gly E28

1057 GGA TGT GTT ACT ATA ACA GCT GAG GGG AAG CCT TCA ATG GAT GTG TGG 1104
E29 Gly Cys Val Thr Ile Thr Ala Glu Gly Lys Pro Ser Met Asp Val Trp E44

1105 CTT GAC GCC ATT TAC CAG GAG AAC CCT GCT AAG ACA CGT GAG TAC TGT 1152
E45 Leu Asp Ala Ile Tyr Gln Glu Asn Pro Ala Lys Thr Arg Glu Tyr Cys E60

1153 TTA CAC GCC AAG TTG TCG GAC ACT AAG GTT GCA GCC AGA TGC CCA ACA 1200
E61 Leu His Ala Lys Leu Ser Asp Thr Lys Val Ala Ala Arg Cys Pro Thr E76

1201 ATG GGA CCA GCC ACT TTG GCT GAA GAA CAC CAG GGT GGT ACA GTG TGT 1248
E77 Met Gly Pro Ala Thr Leu Ala Glu Glu His Gln Gly Gly Thr Val Cys E92

1249 AAG AGA GAT CAG AGT GAT CGA GGC TGG GGC AAC CAC TGT GGA CTG TTT 1296
E93 Lys Arg Asp Gln Ser Asp Arg Gly Trp Gly Asn His Cys Gly Leu Phe E108

(Fortsetzung in Fig. 2b)

Fig. 2b

1297 GGA AAG GGT AGC ATT GTG GCC TGT GTC AAG GCG GCT TGT GAG GCA AAA 1344
E109 Gly Lys Gly Ser Ile Val Ala Cys Val Lys Ala Ala Cys Glu Ala Lys E124

1345 AAG AAA GCC ACA GGA CAT GTG TAC GAC GCC AAC AAA ATA GTG TAC ACG 1392
E125 Lys Lys Ala Thr Gly His Val Tyr Asp Ala Asn Lys Ile Val Tyr Thr E140

1393 GTC AAA GTC GAA CCA CAC ACG GGA GAC TAT GTT GCC GCA AAC GAG ACA 1440
E141 Val Lys Val Glu Pro His Thr Gly Asp Tyr Val Ala Ala Asn_Glu_Thr E156

1441 CAT AGT GGG AGG AAG ACG GCA TCC TTC ACA ATT TCT TCA GAG AAA ACC 1488
E157 His Ser Gly Arg Lys Thr Ala Ser Phe Thr Ile Ser Ser Glu Lys Thr E172

1489 ATT TTG ACT ATG GGT GAG TAT GGA GAT GTG TCT TTG TTG TGC AGG GTC 1536
E173 Ile Leu Thr Met Gly Glu Tyr Gly Asp Val Ser Leu Leu Cys Arg Val E188

1537 GCT AGT GGC GTT GAC TTG GCC CAG ACC GTC ATC CTT GAG CTT GAC AAG 1584
E189 Ala Ser Gly Val Asp Leu Ala Gln Thr Val Ile Leu Glu Leu Asp Lys E204

1585 ACA GTG GAA CAC CTT CCA ACG GCT TGG CAG GTC CAT AGG GAC TGG TTC 1632
E205 Thr Val Glu His Leu Pro Thr Ala Trp Gln Val His Arg Asp Trp Phe E220

1633 AAT GAT CTG GCT CTG CCA TGG AAA CAT GAG GGA GCG CAA AAC TGG AAC 1680
E221 Asn Asp Leu Ala Leu Pro Trp Lys His Glu Gly Ala Gln Asn Trp Asn E236

1681 AAC GCA GAA AGA CTG GTT GAA TTT GGG GCT CCT CAC GCT GTC AAG ATG 1728
E237 Asn Ala Glu Arg Leu Val Glu Phe Gly Ala Pro His Ala Val Lys Met E252

1729 GAC GTG TAC AAC CTC GGA GAC CAG ACT GGA GTG TTA CTG AAG GCT CTC 1776
E253 Asp Val Tyr Asn Leu Gly Asp Gln Thr Gly Val Leu Leu Lys Ala Leu E268

1777 GCT GGG GTT CCT GTG GCA CAC ATT GAG GGA ACC AAG TAC CAC CTG AAG 1824
E269 Ala Gly Val Pro Val Ala His Ile Glu Gly Thr Lys Tyr His Leu Lys E284

1825 AGT GGC CAC GTG ACC TGC GAA GTG GGA CTG GAA AAA CTG AAG ATG AAA 1872
E285 Ser Gly His Val Thr Cys Glu Val Gly Leu Glu Lys Leu Lys Met Lys E300

1873 GGT CTT ACG TAC ACA ATG TGT GAC AAA ACA AAG TTC ACA TGG AAG AGA 1920
E301 Gly Leu Thr Tyr Thr Met Cys Asp Lys Thr Lys Phe Thr Trp Lys Arg E316

1921 GCT CCA ACA GAC AGT GGG CAT GAT ACA GTG GTC ATG GAA GTC ACA TTC 1968
E317 Ala Pro Thr Asp Ser Gly His Asp Thr Val Val Met Glu Val Thr Phe E332

1969 TCT GGA ACA AAG CCC TGT AGG ATC CCA GTC AGG GCA GTG GCA CAT GGA 2016
E333 Ser Gly Thr Lys Pro Cys Arg Ile Pro Val Arg Ala Val Ala His Gly E348

2017 TCT CCA GAT GTG AAC GTG GCC ATG CTG ATA ACG CCA AAC CCA ACA ATT 2064
E349 Ser Pro Asp Val Asn Val Ala Met Leu Ile Thr Pro Asn Pro Thr Ile E364

2065 GAA AAC AAT GGA GGT GGC TTC ATA GAG ATG CAG CTG CCC CCA GGG GAT 2112
E365 Glu Asn Asn Gly Gly Gly Phe Ile Glu Met Gln Leu Pro Pro Gly Asp E380

2113 AAC ATC ATC TAT GTT GGG GAA CTG AGT CAT CAA TGG TTC CAA AAA GGG 2160
E381 Asn Ile Ile Tyr Val Gly Glu Leu Ser His Gln Trp Phe Gln Lys Gly E396

2161 AGC AGC ATC GGA AGG GTT TTC CAA AAG ACC AAG AAA GGC ATA GAA AGA 2208
E397 Ser Ser Ile Gly Arg Val Phe Gln Lys Thr Lys Lys Gly Ile Glu Arg E412

(Fortsetzung in Fig. 2c)

2209 CTG ACA GTG ATA GGA GAG CAC GCC TGG GAC TTC GGT TCT GCT GGA GGC 2256
E413 Leu Thr Val Ile Gly Glu His Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ala Gly Gly E428

2257 TTT CTG AGT TCA ATT GGG AAG GCG GTA CAT ACG GTC CTT GGT GGC GCT 2304
E429 Phe Leu Ser Ser Ile Gly Lys Ala Val His Thr Val Leu Gly Gly Ala E444

2305 TTC AAC AGC ATC TTC GGG GGA GTG GGG TTT CTA CCA AAA CTT TTA TTA 2352
E445 Phe Asn Ser Ile Phe Gly Gly Val Gly Phe Leu Pro Lys Leu Leu Leu E460

2353 GGA GTG GCA TTG GCT TGG TTG GGC CTG AAC ATG AGA AAC CCT ACA ATG 2400
E461 Gly Val Ala Leu Ala Trp Leu Gly Leu Asn Met Arg Asn Pro Thr Met E476

2401 TCC ATG AGC TTT CTC TTG GCT GGA GGT CTG GTC TTG GCC ATG ACC CTT 2448
E477 Ser Met Ser Phe Leu Leu Ala Gly Gly Leu Val Leu Ala Met Thr Leu E492

2449 GGA GTG GGG GCG $\left[\begin{array}{l} \text{GAT} \\ \text{GTT} \end{array} \right] \xrightarrow{\text{NS1}} \text{GGT TGC GCT GTG GAC ACG GAA CGA ATG GAG 2496}$
E493 Gly Val Gly Ala Asp Val Gly Cys Ala Val Asp Thr Glu Arg Met Glu N12

2497 CTC CGC TGT GGC GAG GGC CTG GTC GTG TGG AGA GAG GTC TCA GAA TGG 2544
N13 Leu Arg Cys Gly Glu Gly Leu Val Val Trp Arg Glu Val Ser Glu Trp N28

2545 TAT GAC TAG CGGCCGCGGGGATCC
N29 Tyr Asp *

Fig. 2c