

## ÖZET

**DANG TİPİ 4 GENOMUNUN 3' TRANSLATE EDİLMEMİŞ**  
**BÖLGESİNİN BİR KESİTİNDE BİR 30 NUKLEOTİT**  
5 **DELESYONUNU (DELTA30) İÇEREN BİR RDEN3/4DELTA**  
**30(ME), RDEN2/4DELTA30(ME) YA DA**  
**RDEN1/4DELTA30(ME) REKOMBİNANT KİMERİK**  
**DANG VİRUSU OLUP, BURADA ADI GEÇEN 30 NUKLEOTİT**  
**DELESYONU TL2 STEM-LOOP YAPISINA KARŞILIK**  
10 **GELİR**

Bir rDEN3/4D30(ME), rDEN2/4D30(ME) ya da rDEN1/4D30(ME) rekombinant kimerik dang virüsü olup, dang tip 4 genomunun 3'translate edilmemiş bölgesinin bir kesitinde bir 30 nükleotit  
15 delesyonunu (D30) içerir, burada adı geçen 30 nükleotit delesyonu ( $\Delta 30$ ), TL2 stem-loop yapısına karşılık gelir.

20

25

## İSTEMLER

1. Bir nükleik asit kimerayı ihtiva eden bir rekombinant kimerik dang virüsü olup, M ve E yapısal proteinlerini kodlayan dang tip 4 virüsünün bölgesinin, dang virüsü tip 1, dang virüsü tip 2 ya da dang virüsü tip 3 arasından seçilen adı geçen M ve E yapısal proteinlerini kodlayan bölge ile değiştirildiği, dang virüsü tip 4'ten alınan C yapısal proteinini ve dang virüsü tip 1, dang virüsü tip 2 ya da dang virüsü tip 3'ten alınan M ve E yapısal proteinlerini kodlayan bir birinci nükleotit sekansını ve dangi tip 4 virüsünden ve dang tip 4 genomunun nükleotitleri 10478-10507 arasındaki TL2 stem-loop yapısına karşılık gelen bir 30 nükleotit delesyonunu ihtiva eden dang tip 4 genomunun 3' translate edilmemiş bölgesinden alınan yapısal olmayan proteinleri kodlayan bir ikinci nükleotit sekansını ihtiva eder.
2. İstem 1'e göre rekombinant kimerik dang virüsü olup, ayrıca bir fenotipi veren bir mutasyonu içerir, burada fenotip Vero hücrelerinde ya da insan karaciğer hücre çizgisi HuH-7'de sıcaklık hassasiyetidir, sivrisinek hücrelerinde ya da insan karaciğer hücre çizgisi HuH-7'de konak-hücre kısıtlamasıdır, Vero hücrelerinde iyileştirilmiş replikasyon için konak-hücre adaptasyonudur ya da farelerde ya da maymunlarda atenüasyondur.
3. İstem 1 ya da 2'ye göre rekombinant kimerik dang virüsü olup, bir koruyucu immün yanıtın indüksiyonunda kullanım amaçlıdır.

4. İstem 3'e göre bir koruyucu immün yanıtın indüklenmesi için kullanım için rekombinant kimerik dang virüsü olup, burada adı geçen rekombinant kimerik dang virüsü, bir süjeye tatbik edilecek bir aşıda etkili bir miktarda bulunur.

5

5. İstem 1 ya da 2'ye göre rekombinant kimerik dang virüsü olup, dang virüsünün sebep olduğu bir hastalığın önlenmesine kullanım amaçlıdır.

10

6. İstem 5'e göre dang virüsünün sebep olduğu bir hastalığın önlenmesinde kullanım için rekombinant kimerik dang virüsü olup, burada adı geçen rekombinant kimerik dang virüsü, bir süjeye tatbik edilecek bir aşıda etkili bir miktarda bulunur.

15

7. İstem 1'e ya da 2'ye göre en az bir rekombinant kimerik dang virüsü ihtiva eden bir aşı ya da immünojenik bileşimdir.

8. İstem 7'ye göre aşı ya da immünojenik bileşim olup, bir dang virüsü aşısıdır ya da bir dang virüsü immünojenik bileşimidir.

20

9. İstem 7 ya da 8'e göre aşı ya da immünojenik bileşim olup, bir tetravalent aşı ya da bir tetravalent immünojenik bileşimdir.

25

10. 7 ila 9 arasındaki istemlerden herhangi birine göre aşı ya da immünojenik bileşim olup, rDEN1/4Δ30 (ME), rDEN2/4Δ30 (ME) ve rDEN3/4Δ30 (ME)'yi içerir, burada:

- 5 rDEN1/4Δ30 (ME), istem 1'e göre bir kimerik dang virüsü olup, M ve E yapısal proteinlerini kodlayan dang tip 4 virüsünün bölgesinin, dang virüsü tip 1'den seçilen adı geçen M ve E yapısal proteinlerini kodlayan bölge ile değiştirildiği, dang virüsü tip 4'ten alınan C yapısal proteinini ve dang virüsü tip 1'den alınan M ve E yapısal proteinlerini kodlayan bir birinci nükleotit sekansını ve dangi tip 4 virüsünden ve adı geçen 30 nükleotit delesyonunu ihtiva eden dang tip 4 genomunun 3' translate edilmemiş bölgesinden alınan yapısal olmayan proteinleri kodlayan bir ikinci nükleotit sekansını ihtiva eder,
- 10 rDEN2/4Δ30 (ME), istem 1'e göre bir kimerik dang virüsü olup, M ve E yapısal proteinlerini kodlayan dang tip 4 virüsünün bölgesinin, dang virüsü tip 2'den seçilen adı geçen M ve E yapısal proteinlerini kodlayan bölge ile değiştirildiği, dang virüsü tip 4'ten alınan C yapısal proteinini ve dang virüsü tip 1'den alınan M ve E yapısal proteinlerini kodlayan bir birinci nükleotit sekansını ve dangi tip 4 virüsünden ve adı geçen 30 nükleotit delesyonunu ihtiva eden dang tip 4 genomunun 3' translate edilmemiş bölgesinden alınan yapısal olmayan proteinleri kodlayan bir ikinci nükleotit sekansını ihtiva eder; ve
- 15 rDEN3/4Δ30 (ME), istem 1'e göre bir kimerik dang virüsü olup, M ve E yapısal proteinlerini kodlayan dang tip 4 virüsünün bölgesinin, dang virüsü tip 3'ten seçilen adı geçen M ve E yapısal proteinlerini kodlayan bölge ile
- 20
- 25



değiştirildiği, dang virüsü tip 4'ten alınan C yapısal proteinini ve dang virüsü tip 1'den alınan M ve E yapısal proteinlerini kodlayan bir birinci nükleotit sekansını ve dangi tip 4 virüsünden ve adı geçen 30 nükleotit delesyonunu ihtiva eden dang tip 4 genomunun 3' translate edilmemiş bölgesinden alınan yapısal olmayan proteinleri kodlayan bir ikinci nükleotit sekansını ihtiva eder.

10 **11.** İstem 3 ya da 4'e göre bir koruyucu immün yanıtın indüklenmesinde kullanılmak üzere rekombinant kimerik dang virüsü olup, bir insan süjeye tatbik edilecektir.

15 **12.** İstem 5 ya da 6'ya göre dang virüsünün sebep olduğu bir hastalığın önlenmesinde kullanılmak üzere rekombinant kimerik dang virüsü olup, bir insan süjeye tatbik edilecektir.

20

25

24419

## TARİFNAME

**DANG TİPİ 4 GENOMUNUN 3' TRANSLATE EDİLMEMİŞ**  
 5 **BÖLGESİNİN BİR KESİTİNDE BİR 30 NUKLEOTİT**  
**DELESYONUNU (DELTA30) İÇEREN BİR RDEN3/4DELTA**  
**30(ME), RDEN2/4DELTA30(ME) YA DA**  
**RDEN1/4DELTA30(ME) REKOMBİNANT KİMERİK**  
**DANG VİRUSU OLUP, BURADA ADI GEÇEN 30 NUKLEOTİT**  
 10 **DELESYONU TL2 STEM-LOOP YAPISINA KARŞILIK**  
**GELİR**

Buluşun Sahası

Tarifname, dang virüsü serotipleri 1, 2, 3 ve 4'ün genomundaki 3'-  
 15 translate edilmemiş bölgede ortak 30 nükleotitlik bir delesyon ( $\Delta 30$ )  
 içeren serotiple 1, 2, 3 ve 4'ün kimerik dang virüslerini ihtiva eden bir  
 dang virüsü aşısı ile ilgilidir.

Buluşun Geçmişi

Dang virüsü, Flaviviridae familyasının Flavivirüs türüne ait pozitif  
 20 sens bir RNA virüsüdür. Dang virüsü, dünyanın tropikal ve yarı  
 tropikal bölgelerinde çok yaygındır ve sivrisinek vektörleri tarafından  
 insanlara geçirilir. Dang virüsü, en az sekiz tropikal Asya ülkesinde  
 çocuklarda temel bir hastaneye yatma ve ölüm nedenidir (WHO 1997  
 Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention, and  
 25 Control 2nci Baskı Edition, Geneva). Dang virüsünün, yılda tahminen  
 50-100 milyon dang ateşi vakasına ve dang virüsü enfeksiyonunun,  
 dang hemorajik ateş/dang şok sendromu (DHF/DSS) olarak bilinen

500,000 daha ciddi formuna neden olan dört serotipi (DEN1, DEN2, DEN3 ve DEN4) vardır (Gubler, D.J. ve Meltzer, M. 1999 Adv Virus Res 53: 35-70). Adı geçen bu son hastalık, serotipi, ilk dang virüsü enfeksiyonlarından farklı ikinci bir dang virüsü enfeksiyonu yaşayan çocuk ve yetişkinlerde ve hala dolaşımlarında danga özel anneden geçen antikor bulunan bebeklerin ilk enfeksiyonunda baskın şekilde görülür (Burke, D.S. ve arkadaşları 1988 Am J Trop Med Hyg 38:172-180; Halstead, S.B. ve arkadaşları 1969 Am J Trop Med Hyg 18:997-1021; Thein, S. ve arkadaşları 1997 Am J Trop Med Hyg 56:566-575).

Bir dang aşısının, dang virüsünün neden olduğu hastalık yükünü azaltması gerekir ancak hiçbiri lisanslı değildir. Daha ciddi hastalığın ikincil dang virüsü enfeksiyonu ile bağlantısından dolayı başarılı bir aşı, dört serotipin tamamı için aynı anda immünite indüklemelidir. İmmüniteye birincil olarak bir virion yapısal proteini olan zarf (E) glikoproteinine karşı yönlendirilen nötralize edici antikor aracılık eder. Bir serotiple enfeksiyon, uzun süreli homotipik immüniteyi ve kısa süreli heterotipik bir immüniteyi indükler (Sabin, A. 1955 Am J Trop Med Hyg 4:198-207). Bu yüzden bağışıklılaştırmanın amacı, DEN1, DEN2, DEN3, VE DEN4'e karşı uzun süreli nötralize edici bir antikor tepkisi indüklemektir; buna en iyi ekonomik olarak canlılığı hafifletilmiş virüs aşıları ile ulaşılabilir. Bu, makul bir amaçtır çünkü dünyanın tropikal ve yarı tropikal bölgelerinde mevcut başka bir sivrisinek kaynaklı flavivirüs olan ilgili sarı humma virüsü için zaten canlılığı hafifletilmiş bir aşı geliştirilmiştir (Monath, T.P. ve Heinz, F.X. 1996: Fields Virology, Fields, D.M ve arkadaşları eds. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, sayfa 961-1034).

Birkaç canlılığı hafifletilmiş dang aşısı adayları geliştirilmiş ve insanlarda ve insan dışı primatlarda değerlendirilmiştir. İlk canlılığı

hafifletilmiş dang aşısı adayları, doğal tipte dang virüslerinin seri olarak farelerin beyinlerine geçmesi ve insanlar için hafifletilmiş mutantların seçilmesiyle geliştirilen konakçı menziline mutantlardı (Kimura, R. ve Hotta, S. 1944 JpnJ Bacteriol 1:96-99; Sabin, A.B. ve Schlesinger, R.W. 1945 Science 101:640; Wisserman, C.L. ve arkadaşları 1963 Am J Trop Med Hyg 12:620-623). Bu aday aşı virüslerinin, insanlarda immünojenik olmasına rağmen bunların hücre kültüründe zayıf şekilde büyümesi, daha fazla gelişmeyi köreltti. İlave canlılığı hafifletilmiş DEN1, DEN2, DEN3 ve DEN4 aşı adayları, insan dışı doku kültüründe seriş geçişle (Angsubhakom, S. ve arkadaşları 1994 Southeast Asian J Trop Med Public Health 25:554-559; Bancroft, W.H. et al. 1981 Infect Immun 31:698-703; Bhamarapravati, N. ve arkadaşları 1987 Bull World Health Organ 65:189-195; Eckels, K.H. ve arkadaşları 1984 Am J Trop Med Hyg 33: 684-698; Hoke, C.H. Jr. Ve arkadaşları 1990 Am J Trop Med Hyg 43:40219-226; Kanesa-Thasan, N. ve arkadaşları 2001 Vaccine 19: 3179-3188) veya kimyasal mutajenez yoluyla (McKee, K.T. ve arkadaşları 1987 Am J Trop Med Hyg 36:435-442) geliştirilmiştir. Bu yaklaşımlar kullanılarak dang virüsünün her biri için hafifletme ve immünojenisite arasında tatminkar bir dengeye ulaşmanın ve dört dang virüsünden her birine karşı güvenli ve tatminkar şekilde immünojenik tetravalent bir aşı formüle etmenin son derece zor olduğu kanıtlanmıştır (Kanesa-Thasan, N. ve arkadaşları 2001 Vaccine 19:3179-3188; Bhamarapravati, N. ve Sutee, Y. 2000 Vaccine 18:44-47).

Son zamanlarda rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak iki temel ilerleme gerçekleşmesi, umut vaat eden canlılığı hafifletilmiş ilave dang virüsü aşı adayları geliştirilmesini mümkün kıldı. İlk olarak dang

virüsü genomunu tam boyda bir cDNA klonundan türetilmiş RNA transkriptleri ile transfekte edilen enfeksiyöz dang virüsünü geri kazanmak, böylelikle sahaya yönelik mutajenez yoluyla cDNA klonuna dahil edilmiş olan hafifletilmiş mutasyonlar taşıyan enfeksiyöz virüsler üretmek için yöntemler geliştirilmiştir (Lai, C.J. ve arkadaşları 1991 PNAS USA 88:5139-5143). İkinci olarak içerisindeki dang virüsünün tam boyda cDNA klonunun yapısal protein kodlama bölgesinin, farklı bir dang virüsü serotipinin veya daha farklı bir flavivirüsünki ile değiştirildiği antijenik kimerik virüsler üretmek mümkündür (Bray, M. ve Lai, C.J. 1991 PNAS USA 88:10342-10346; Chen, W. ve arkadaşları 1995 J Virol 69:5186-5190; Huang, C.Y. ve arkadaşları 2000 J Virol 74: 3020-3028; Pletnev, A.G. ve Men, R 1998 PNAS USA 95:1746-1751). Bu teknikler, homolog dang virüsü saldırısına karşı maymunların korunmasında etkili olduğu gösterilmiş intertipik kimerik dang virüslerini yapılandırmak için kullanılmıştır (Bray, M. ve arkadaşları 1996 J Virol 70:4162-4166). Sarı humma aşısı virüsünün hafifletilmesi veya hücre kültüründen geçen dang virüslerinin hafifletilmesi baz alınarak hafifletilmiş antijenik kimerik dang virüsü aşılı geliştirilmek için de benzer bir strateji kullanılmaktadır (Monath, T.P. ve arkadaşları 1999 Vaccine 17:1869-1882; Huang, C.Y. ve arkadaşları 2000 J. Virol 74:3020-3028).

Başka bir çalışmada, insanlar için sahaya yönelik mutajenez yoluyla 3'-translate edilmemiş bölgesine dahil edilen 30 nükleotitlik bir delesyon ( $\Delta 30$ ) taşıyan bir DEN4 mutantının hafifleme seviyesi araştırıldı ve bunun, daha önceden rhesus maymunları için hafifletilmiş olduğu bulundu (Men, R. ve arkadaşları 1996 J Virol 70:3930-3937). DEN4 aşısı adayında mevcut bu  $\Delta 30$  mutasyonunun,

maymunlar için hafiflemesinin temel belirleyicisi olup olmadığını araştırmak için ek çalışmalar yapıldı.  $\Delta 30$  mutasyonunun gerçekten de maymunlar için hafifletmenin temel belirleyicisi olduğu ve insanlar için hafifletme ile immünogenisite arasında tatminkar bir dengeyi  
 5 özelleştirdiği bulundu (Durbin, A.P. ve arkadaşları 2001 Am J TropMed Hyg 65:405-13).

Lai et al. (Clinical and Diagnostic Virology 10 (1998) 173-179) canlı bir dang aşısını geliştirmek için belirli moleküler stratejilerin bir  
 10 değerlendirmesini tarif eder. İçinde DEN4 cDNA tam uzunluğundaki C-PreM-E ya da sadece PreM-E yapısal protein genlerinin DEN1, DEN2 ya da DEN3'ün karşılık gelen genleri ile yer değiştirildiği intertipik kimerik cDNA'yı yapılandırıdılar. Bunun sonucunda, DEN4 yapısal olmayan proteinlerin bir arka planına karşı DEN1, DEN2 ya  
 15 da DEN3 yapısal proteinlerini eksprese eden canlı kimerik virüsler elde edildi. Kimeralarını, tahmin edilen dang tip 1, 2 ya da 3 antijenisitesini sergilediği ve maymunlar için bulaşıcı olduğu ve koruyucu bağışıklığı indükleyebildiği tespit edildi.

#### 20 Buluşun Özeti

3'-UTR'den 30 nükleotidin çıkarılmasıyla dang virüsü tip 4 (DEN4) içerisinde yaratılan daha önceden tanımlanmış  $\Delta 30$  hafifletici mutasyonu, dang virüsü tip 1'in (DEN1) doğal tipte bir suşunu da hafifletebilir.  $\Delta 30$  mutasyonunu kapsayan DEN4 bölgesine homolog  
 25 yüksek düzeyde konserve bir bölgede DEN1 3'-ZTTR'den 30 nükleotit çıkarılması, rhesus maymunlarında rekombinant virüs DEN4 $\Delta 30$ 'a benzer bir seviyeye kadar hafiflemiş bir rekombinant

virüs sağladı. Bu,  $\Delta 30$  mutasyonunun ve DEN4'ten başka bir dang virüs tipine hafifletme fenotipinin aşınabilirliğini kanıtlar. Bu çalışmayla tarif edilen  $\Delta 30$  mutasyonunun etkin taşınabilirliği,  $\Delta 30$  mutasyonunun, herhangi bir serotipe ait ticarileştirilebilir dang virüsü aşılarının hafifletilmesi ve güvenliğinin geliştirilmesindeki faydasını kanıtlar. Biz, her biri  $\Delta 30$  mutasyonu ile hafifletilen dang virüsü tipleri 1, 2, 3 ve 4'ü içeren tetravalent bir dang virüsü aşısı tasarlıyoruz. Ayrıca içerisindeki dang virüsü tipleri 1, 2 ve 3'ün yapısal genlerinin, DEN4 $\Delta 30$ 'unkilerin yerini aldığı; 1, 2 ve 4'ün, DEN3 $\Delta 30$ 'unkilerin yerini aldığı; 1, 3 ve 4'ün, DEN2 $\Delta 30$ 'unkilerin yerini aldığı ve 2, 3 ve 4'ün, DEN1 $\Delta 30$ 'unkilerin yerini aldığı rekombinant antijenik kimerik virüsler içeren tetravalent bir dang virüsü aşısı da tasarlıyoruz. Bazı durumlarda bu gibi kimerik dang virüsleri, sadece  $\Delta 30$  mutasyonu ile değil aynı zamanda bunların kimerik doğasıyla da hafifletilir. Her bir virüs bileşeni içerisinde  $\Delta 30$  hafifletici mutasyonunun varlığı, intertipik rekombinasyon yoluyla doğal tipte bir virüse geri dönüşümü engeller. Ek olarak, delesyon mutasyonlarının yerleşik genetik stabilitesi sebebiyle,  $\Delta 30$  mutasyonu, bir tetravalent aşının her bir bileşeninin arasında paylaşılan bir ortak mutasyon olarak kullanım için mükemmel bir alternatifi temsil eder.

#### Çizimlerin Kısa Tarifi

**Şekil 1.** Canlılığı hafifletilmiş tetravalent dang virüsü aşısı, 4 serotipten her birini temsil eden dang virüsleri içerir; bu serotiplerin her biri, değişmemiş doğal tipte yapısal ve yapısal olmayan proteinlerin tam takımını ve paylaşılan bir  $\Delta 30$  hafifletici mutasyonu içerir.  $\Delta 30$  mutasyonunun, her bir bileşenin 3' translate edilmemiş

bölgesindeki (UTR) nispi konumu, bir okla gösterilir.

**Şekil 2.** A.  $\Delta 30$  mutasyonu, DEN4'ün 3' UTR'sinden 30 bitişik nükleotidi (gölgeli) çıkarır. Nükleotitler, 3' terminalinden itibaren numaralandırılır. B. DEN1, DEN2, DEN3 ve DEN4'üm ve bunların  $\Delta 30$  türevlerinin TL2 bölgesinin nükleotit sekans dizilimi. Ayrıca dört DEN serotipinin her biri için ilgili bölge de gösterilmiştir. Yukarıdaki durumda harfler, 4 serotipin tamamı arasındaki sekans homolojisini gösterir; alt taraf, kök yapısı oluşturmak üzere nükleotit çiftleşmesini gösterir. C. Her bir DEN serotipinin TL2 bölgesinin öngörülen ikincil yapısı.  $\Delta 30$  mutasyonu ile giderilen nükleotitler kutulanır (DEN1 - nts 10562 – 10591 arasında; DEN2 Tonga/74, nts 10541 – 10570 arasında; DEN3 Sleman/78 - nts 10535 – 10565 arasında ve DEN4, nts 10478 – 10507 arasında).

**Şekil 3.** 5-FU türevli mutasyonlar taşıyan rDEN4 aşı adayları ile aşılanmış rhesus maymunlarındaki viremi seviyeleri. Dört veya iki (rDEN4 ve rDEN4 $\Delta 30$ ) maymunlarından oluşan gruplara, subkütan yolla  $5.0 \log_{10}$ PFU virüsü aşılandı. Günlük olarak serum toplandı ve virüs titerleri, Vero hücrelerinde plak deneyleriyle belirlendi. Virüs saptama limiti,  $0.7 \log_{10}$ PFU/ml idi. Ortalama virüs titerleri, her bir grup için gösterilmiştir.

**Şekil 4.** NS5'te yük-alanın mutasyon çiftleri taşıyan rDEN4 aşı adayları ile aşılanmış rhesus maymunlarındaki viremi seviyeleri. Dört veya iki (rDEN4 ve rDEN4 $\Delta 30$ ) maymunlarından oluşan gruplara, subkütan yolla  $5.0 \log_{10}$ PFU virüsü aşılandı. Günlük olarak serum toplandı ve virüs titerleri, Vero hücrelerinde plak deneyleriyle belirlendi. Virüs saptama limiti,  $1,0 \log_{10}$ PFU/ml idi. Ortalama virüs titerleri, her bir grup için gösterilmiştir. 4üncü günden sonra hiçbir



maymunda viremi saptanmadı.

**Şekil 5.**  $\Delta 30$  mutasyonu, rhesus maymunları için hem DEN1 hem de DEN4'ü hafifletir. 4 maymundan oluşan gruplar,  $5.0 \log_{10}$ PFU belirtilen virüs ile subkütan yoldan bağışıklılaştırıldı.

5 Bağışıklılaştırmadan sonraki her gün serum toplandı ve virüs titerleri belirlendi ve ortalama  $\log_{10}$ PFU/ml olarak gösterildi.

**Şekil 6.** A. Alt klonlanmış p2 (Tonga/74) tam boyda cDNA plazmid Bölgelerinin, plazmidin üzerinde gösterildiği diyagram. Numaralandırma, viral sekansın 5' ucunda başlar. B.  $\Delta 30$  mutasyonu,

10 p2 $\Delta 30$  yaratmak için 3' UTR'den adı geçen 30 nükleotidi çıkarır.

**Şekil 7.** DEN2 (Tonga/74), rDEN2 ve rDEN2 $\Delta 30$  aşı adayı ile aşılanmış rhesus maymunlardaki viremi seviyeleri. Dört maymundan oluşan gruplara, subkütan yolla  $5.0 \log_{10}$ PFU virüsü aşılandı. Günlük olarak serum toplandı ve virüs titerleri, Vero hücrelerinde plak deneyiyle belirlendi. Virüs saptama limiti,  $0,7 \log_{10}$ PFU/ml idi. Ortalama virüs titerleri, her bir grup için gösterilmiştir. 8inci günden sonra hiçbir maymunda viremi saptanmadı.

**Şekil 8.** A. p3 (Sleman/78) tam boyda cDNA plazmidinin diyagramı. Alt klonlanmış bölgeler, plazmidin üzerinde gösterilmiştir. Numaralandırma, viral sekansın 5' ucunda başlar. SpeI bağlayıcının sekansı ve sokma yeri gösterilmiştir. B.  $\Delta 30$  mutasyonu, p3 $\Delta 30$  yaratmak için 3'UTR sekansından adı geçen 31 nükleotidi çıkarır.

**Şekil 9.** A. Rekombinant kimerik dang virüsleri, DEN2'nin CME ya da ME bölgelerinin (Tonga/74) DEN4 genetik artalanına dahil edilmesiyle yapılandırıldı.  $\Delta 30$  mutasyonunun 3' UTR içerisindeki nispi konumu, bir okla gösterilmiştir ve intertipik bağlantılar 1, 2 ve 3 gösterilmiştir. B. İntertipik bağlantı bölgelerindeki nükleotit ve amino

asit sekansı. Her bir kimerik cDNA düzeneğinde kullanılan restriksiyon enzimi algılama sahaları gösterilmiştir.

**Şekil 10.** Tek veya birleşik Vero hücresi adaptasyon mutasyonlarını şifreleyen kimerik rDEN2/4Δ30 virüslerinin Vero hücrelerindeki büyüme kinetikleri. Vero hücreleri, 0.01'lik bir MOI'da belirtilen virüsler ile enfekte edildi. Enfeksiyon sonrası belirtilen zaman noktalarında doku kültür ortamının 1 ml'lik örnekleri çıkarıldı, santrifüjleme yoluyla arıtıldı ve -80°C'de donduruldu. Virüs replikasyonunun seviyesi, C6/36 hücrelerinde plak titrasyonu yoluyla deneye tabi tutuldu. Alt saptama limiti, 0,7 log<sub>10</sub>PFU/ml idi. Enfeksiyondan sonraki 4üncü gün replikasyon seviyeleri, noktalı çizgiyle gösterilmiştir.

**Şekil 11.** A. Rekombinant kimerik dang virüsleri, DEN3'ün CME ya da ME bölgelerinin (Sleman/78) DEN4 genetik artalanına dahil edilmesiyle yapılandırıldı. Δ30 mutasyonunun 3'UTR içerisindeki nispi konumu, bir okla gösterilmiştir ve intertipik bağlantılar 1, 2 ve 3 gösterilmiştir. Her bir kimerik cDNA düzeneğinde kullanılan restriksiyon enzimi algılama sahaları gösterilmiştir. B. İntertipik bağlantı bölgelerinin nükleotit ve amino asit sekansı. Her bir kimerik cDNA düzeneğinde kullanılan restriksiyon enzimi algılama sahaları gösterilmiştir.

**Şekil 12.** A. Rekombinant kimerik dang virüsleri, DEN1'in CME ya da ME bölgelerinin (Puerto Rico/94) DEN4 genetik artalanına dahil edilmesiyle yapılandırıldı. Δ30 mutasyonunun 3'UTR içerisindeki nispi konumu, bir okla gösterilmiştir ve intertipik bağlantılar 1, 2 ve 3 gösterilmiştir. Her bir kimerik cDNA düzeneğinde kullanılan restriksiyon enzimi algılama sahaları gösterilmiştir. B. İntertipik

bağlantı bölgelerinin nükleotit ve amino asit sekansı. Her bir kimerik cDNA düzeneğinde kullanılan restriksiyon enzimi algılama sahaları gösterilmiştir.

##### 5 Sekansların Kısa Tarifi

| Serotip | GenBank Erişim No. Veya açıklama |
|---------|----------------------------------|
| DEN1    | U88535                           |
| DEN2    | Tonga/74                         |
| DEN3    | Sleman/78                        |
| DEN4    | AF326825                         |

##### SEK.KİM.NO.'ların Kısa Açıklaması

| Tanım                           | Şekil, Tablo veya Ek | SEK.KİM.NO.  |
|---------------------------------|----------------------|--------------|
| DEN1'in TL2 bölgesi             | Şekil 2              | 1            |
| DEN2'nin TL2 bölgesi            | Şekil 2              | 2            |
| DEN3'ün TL2 bölgesi             | Şekil 2              | 3            |
| DEN4'ün TL2 bölgesi             | Şekil 2              | 4            |
| DEN1 $\Delta$ 30'un TL2 bölgesi | Şekil 2              | 5            |
| DEN2 $\Delta$ 30'un TL2 bölgesi | Şekil 2              | 6            |
| DEN3 $\Delta$ 30'un TL2 bölgesi | Şekil 2              | 7            |
| DEN4 $\Delta$ 30'un TL2 bölgesi | Şekil 2              | 8            |
| p2'nin TL2 bölgesi              | Şekil 6              | 9            |
| P2 $\Delta$ 30'un TL2 bölgesi   | Şekil 6              | 10           |
| p3'ün TL2 bölgesi               | Şekil 8              | 11           |
| p3 $\Delta$ 30'un TL2 bölgesi   | Şekil 8              | 12           |
| p3 içerisinde SpeI bağlayıcı    | Şekil 8              | 13           |
| rDEN2/4 bağlantısı 1            | Şekil 9              | 14-nt, 15-aa |
| rDEN2/4 bağlantısı 2            | Şekil 9              | 16-nt, 17-aa |

|                                             |          |              |
|---------------------------------------------|----------|--------------|
| rDEN2/4 bağlantısı 3                        | Şekil 9  | 18-nt, 19-aa |
| rDEN3/4 bağlantısı 1                        | Şekil 11 | 20-nt, 21-aa |
| DEN3/4 bağlantısı 2                         | Şekil 11 | 22-nt, 23-aa |
| rDEN3/4 bağlantısı 3                        | Şekil 11 | 24-nt, 25-aa |
| rDEN1/4 bağlantısı 1                        | Şekil 12 | 26-nt, 27-aa |
| rDEN1/4 bağlantısı 2                        | Şekil 12 | 28-nt, 29-aa |
| rDEN1/4 bağlantısı 3                        | Şekil 12 | 30-nt, 31-aa |
| D4 seçilmiş NS4B bölgesi                    | Tablo 15 | 32-nt, 33-aa |
| D1 seçilmiş NS4B bölgesi                    | Tablo 15 | 34-nt, 35-aa |
| D2 seçilmiş NS4B bölgesi                    | Tablo 15 | 36-nt, 37-aa |
| D3 seçilmiş NS4B bölgesi                    | Tablo 15 | 38-nt, 39-aa |
| CCACGGGCGCCGT                               | Tablo 26 | 40           |
| AAGGCCTGGA                                  | Tablo 26 | 41           |
| TATCCCCGGGAC                                | Tablo 26 | 42           |
| AGAGCTCTCTC                                 | Tablo 26 | 43           |
| GAATCTCCACCCGGA                             | Tablo 26 | 44           |
| CTGTCTGAATC                                 | Tablo 26 | 45           |
| DEN2 (Tonga/74) cDNA plazmidi p2            | Ek 1     | 46-nt, 47-aa |
| DEN3 (Sleman/78) cDNA plazmidi p3           | Ek 2     | 48-nt, 49-aa |
| DEN1 (Puerto Rico/4094) CME kimerik bölgesi | Ek 3     | 50-nt, 51-aa |
| DEN1 (Puerto Rico/94) ME kimerik bölgesi    | Ek 4     | 52-nt, 53-aa |

### Tercih Edilen Düzenegın Ayrıntılı Tarifi

#### **Giriş**

Genetik açıdan stabil canlılığı hafifletilmiş bir tetravalent dang virüsü aşısı geliştirmek için bu suretle moleküler bir yaklaşım kullanılır.

5 Tetravalent aşının her bir bileşeni, yani DEN1, DEN2, DEN3 ve DEN4, hafifletilmeli, genetik açıdan stabil ve immünojenik olmalıdır. Bir tetravalent aşının, dört dang virüsünden her birine karşı aynı anda

koruma sağlması, böylelikle heterotipik doğal tipte bir dang virüsü ile ikincil enfeksiyon sırasında insanlarda ortaya çıkan dang hemorajik ateş/dang şok sendromu (DHF/DSS) gibi daha ciddi hastalıkların gelişme ihtimalini engellemesi gerekir. Dang virüsleri, doğası gereği genetik rekombinasyona girebileceğinden (Worobey, M. ve arkadaşları 1999 PNAS USA 96:7352-7) tetravalent aşı, kendisinin dört virüs bileşeni arasında, hafifletme mutasyonlarından yoksun virüslerin oluşmasına yol açabilen bir rekombinasyon olayına genetik olarak girememelidir. Bir tetravalent dang virüsü aşısı geliştirmeye yönelik önceki yaklaşımlar, bağımsız bir şekilde dört virüs bileşeninden her birinin ayrı ayrı mutajenik prosedürler yoluyla türetilmesine, örn., bir heterolog hücreden türetilmiş doku kültür hücrelerindeki geçişe dayanmaktaydı. Bu strateji, hafifletilmiş aşı adayları getirdi (Bhamarapravati, N. ve Sutee, Y. 2000 Vaccine 18:44-7). Bununla birlikte bu bağımsız şekilde türetilmiş tetravalent aşılarda dört bileşeni arasındaki gen alışverişlerinin aşılarda içerisinde gerçekleşmesiyle ölümcül rekombinant bir virüs yaratılması mümkündür. Trivalent bir poliovirüs aşısı uygulandıktan sonra aşılarda içerisinde rekombinasyondan türetilen ölümcül poliovirüsler oluşmuştur (Guillot, S. ve arkadaşları 2000 J Virol 74:8434-43).

Tarifname, şunları açıklar: (1) daha önceden tarif edilen rDEN4 $\Delta$ 30 aşı adayına yönelik gelişmeler, 2) 3'-translate edilmemiş bölgeden (UTR) oluşan bir bölümde, rDEN4 $\Delta$ 30 rekombinant virüsündekine homolog 30 nükleotitlik bir delesyon ( $\Delta$ 30) içeren hafifletilmiş rDEN3 $\Delta$ 30 rekombinant virüsleri, (3) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3A30 ve rDEN4 $\Delta$ 30'dan müteşekkil bir tetravalent dang virüsü aşısı oluşturmaya yönelik bir yöntem, 4) rDEN4 $\Delta$ 30'un CME, ME ya

da E gen bölgelerinin, DEN1, DEN2 veya DEN3'ten türetilmiş olanlarla değiştirilmiş olduğu hafifletilmiş antijenik kimerik virüsler, rDEN1/4 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30 ve rDEN3/4 $\Delta$ 30; alternatif olarak rDEN3 $\Delta$ 30'un CME, ME ya da E gen bölgelerinin, DEN1, 2 veya

5 4'ten türetilenlerle değiştirilmiş olduğu rDEN1/3 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30 ve rDEN4/3 $\Delta$ 30; alternatif olarak rDEN2 $\Delta$ 30'un CME, ME ya da E gen bölgelerinin, DEN1, 3 veya 4'ten türetilenler ile değiştirilmiş olduğu rDEN2/2 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30 ve rDEN4/2 $\Delta$ 30 ve alternatif olarak rDEN1 $\Delta$ 30'un CME, ME ya da E gen bölgelerinin, DEN2, 3 veya

10 4'ten türetilenlerle değiştirilmiş olduğu eden2/1  $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30 ve rDEN4/1 $\Delta$ 30 ve 5) rDEN1/4 $\Delta$ 30, eden2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/4A30 ve rDEN4 $\Delta$ 30'dan müteşekkil bir tetravalent dang virüsü aşısı oluşturmaya yönelik bir yöntem, alternatif olarak rDEN1/3 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30 ve rDEN3 $\Delta$ 30, alternatif olarak

15 rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30 ve rDEN2 $\Delta$ 30 ve alternatif olarak rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30 ve rDEN1 $\Delta$ 30. Bu tetravalent aşılar eşsizdir çünkü bunlar, bir aşıda ölümcül doğal tipte bir virüs oluşma ihtimalini ortadan kaldıran ortak paylaşımlı bir hafifletme mutasyonu içerirler, çünkü aşının her bir bileşeni, aynı  $\Delta$ 30

20 hafifletici delesyon mutasyonuna sahiptir. Ek olarak rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30 tetravalent aşısı,  $\Delta$ 30 mutasyonunun stabilitesini geniş antijenisite ile birleştiren ilk aşıdır.  $\Delta$ 30 delesyon mutasyonu, her bir virüsün 3' UTR'sinde olduğundan dört bileşenli virüslerin bütün proteinleri, koruyucu bir immün tepkisi

25 indüklemek üzere elde edilebilir. Bu nedenle yöntem, DEN1, DEN2, DEN3 ve DEN4 virüslerinin proteinlerinden her birini, dört virüsün proteinlerinden her birinin, her bir dang virüsü serotipinde mevcut

yapısal ve yapısal olmayan bütün proteinlere karşı hümmoral ve hüccresel immün tepkileri indüklemekle ilgili tam kapasitesini muhafaza eden bir halde tutan bir hafifletme mekanizması sağlar.

Daha önceden tarif e3dildiği gibi DEN4 rekombinant virüsü  
 5 rDEN4 $\Delta$ 30 (daha önceden 2A $\Delta$ 30 olarak ifade edilirdi), viral genomun 3' UTR'sinde 30 nükleotitlik bir delesyon içerecek şekilde mühendisliğe tabi tutuldu (Durbin, A.P. ve arkadaşları 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13; Men, R. ve arkadaşları 1996 J Virol 70:3930-7). Rhesus maymunlarındaki değerlendirme, virüsün, doğal  
 10 tipte ana virüse göre önemli ölçüde hafiflemişken hala yüksek düzeyde immünojenik ve tamamen koruyucu olduğunu gösterdi. Ayrıca yetişkin insan gönüllüleri ile yapılan bir faz I klinik deney, rDEN4 $\Delta$ 30 rekombinant virüsünün güvenli ve tatminkar şekilde immünojenik olduğunu gösterdi (Durbin, A.P. ve arkadaşları 2001 Am  
 15 J Trop Med Hyg 65:405-13). Translate edilmemiş bir bölgede paylaşımli bir hafifletici mutasyon taşıyan bir tetravalent aşı geliştirmek için biz, serotip 1, 2 ve 3'ten doğal tipte dang virüslerini hafifletmek amacıyla  $\Delta$ 30 mutasyonunu seçtik çünkü bu, rhesus maymunları için doğal tipte DEN4 virüsünü hafifletti ve insanlarda  
 20 güvenliydi (Şekil 1).

$\Delta$ 30 mutasyonu ilk olarak DEN4 virüsünde tarif edildi ve karakterize edildi (Men, R. ve arkadaşları 1996 J Virol 70: 3930-7). DEN4'te mutasyon, 3' UTR'deki 10478-10507 nükleotitlerini kapsayan (Şekil 2A), TL2 olarak anılan farazi bir stem-loop yapısı oluşturan bitişik 30  
 25 nükleotidin çıkarılmasından oluşur (Proutski, V. ve arkadaşları 1997 Nucleic Acids Res 25:1194-202). Flavivirüsler arasında UTR'nin büyük kısımları, yüksek düzeyde konzerve ikincil yapılar oluşturur

(Hahn, C.S. ve arkadaşları 1987 J Mol Biol 198:33-41; Proutski, V. ve arkadaşları 1997- Nucleic Acids Res 25:1194-202). Aynı ayrı nükleotitlerin bu bölgelerde konserve olması şart olmamakla birlikte uygun baz çiftleşmesi, sadece birincil sekans göz önünde  
5 bulundurulduğunda kolayca görülmeyen bir gerçek olan her bir serotip içerisindeki stem-loop yapısını muhafaza eder (Şekil 2B, C).

### **İmmünojenik Dang Kimeraları ve Bunların Preparasyonuna yönelik Yöntemler**

İmmünojenik dang kimeraları ve dang kimeralarını hazırlamaya  
10 yönelik yöntemler, burada sağlanmıştır. İmmünojenik dang kimeraları, tek başına veya immünojenik kompozisyonlar olarak farmasötik açıdan kabul gören bir taşıyıcı ile kombinasyon halinde, kişileri ve hayvanları, dang virüsü enfeksiyonuna karşı bağışıklılaştırma, minimize veya inhibe etmede faydalıdır.

15 Tarifnamenin kimeraları, bir serotipten bir dang virüsünün immünojenisitesini şifreleyen nükleotit sekanslarını ve farklı bir serotipten bir dang virüsü omurgasından seçilen başka nükleotit sekanslarını kapsar. Bu kimeralar, dang virüsüne karşı immünojenik bir tepki indüklemek için kullanılabilir.

20 Başka bir yönde tercih edilen bir kimera, birinci bir serotipten bir dang virüsünün en az bir yapısal proteinini şifreleyen birinci bir nükleotit sekansı ve birinciden farklı ikinci bir serotipten bir dang virüsünün yapısal olmayan proteinlerini şifreleyen ikinci bir nükleotit sekansı içeren bir nükleik asit kimerasıdır. Buluş bağlamında, ikinci serotipten  
25 dang virüsü, DEN4'tür. Başka bir yönde, yapısal protein, birinci serotipten bir dang virüsünün C proteini, birinci serotipten bir dang virüsünün prM proteini, birinci serotipten bir dang virüsünün E proteini veya bunların herhangi bir kombinasyonu olabilir.



"Tortu" terimi burada bir amid bağı yoluyla bir peptit içerisine dahil edilen bir amino asit (D veya L) bir amino asit taklidine karşılık gelir. Bu şekilde amino asit, doğal yollarla oluşan bir amino asit olabilir veya başka türlü sınırlanmadığı sürece doğal yollarla ortaya çıkan amino asitlere benzer bir şekilde fonksiyon gösteren doğal amino asitlerin bilinen analoglarını (yani amino asit taklitleri) kapsayabilir. Ayrıca bir amid bağı taklidi, teknolojiye uzman kişilerce iyi bilinen peptit omurgası modifikasyonlarını da kapsar.

Ayrıca teknolojiye uzman bir kişi, amino asit sekansında veya amino asitleri şifreleyen nükleotit sekansında, şifrelenmiş bir sekanstaki tek bir amino asidi ya da amino asitlerin küçük bir yüzdesini (tipik olarak %5'in altında, daha tipik olarak %1'in altında) değiştiren, ekleyen veya delete eden ayrı ayrı ikameler, delesyonlar veya ilavelerin, konzervatif olarak modifiye edilmiş varyasyonlar olduğunu, buradaki değişikliklerin, bir amino asidin, kimyasal olarak benzer bir amino asit ile ikameye neden olacağını da fark edecektir. Fonksiyonel açıdan benzer amino asitler sağlayan konzervatif ikame tabloları, teknolojiye iyi bilinir. Aşağıdaki altı gruptan her biri, birbiri için konzervatif ikameler olan amino asitler içerir:

- 1) Alanin (A), Serin (S), Treonin (T);
- 2) Aspartik asit (D), Glutamik asit (E);
- 3) Asparagin (N), Glutamin (Q);
- 4) Arginin (R), Lisin (K);
- 5) İzolösin (I), Lösin (L), Metiyonin (M), Valin (V); ve
- 6) Fenilalanin (F), Tirozin (Y), Triptofan (W).

Burada kullanılan şekliyle "virüs kimerası", "kimerik virüs", "dang kimerası" ve "kimerik dang virüsü" terimleri, bir serotipten bir dang virüsünün immünogenisitesini şifreleyen nükleotit sekansları ve farklı

bir serotipten bir dang virüsü omurgasından türetilmiş başka nükleotit sekansları içeren buluşa ait enfeksiyöz bir yapı anlamına gelir.

Burada kullanılan şekliyle "enfeksiyöz yapı", bir hücreyi enfekte etmek için kullanılabilen, bir virüs veya bunun herhangi bir kısmından türetilmiş bir virüs, viral bir yapı, viral bir kimera, bir nükleik asidi işaret eder.

Burada kullanılan şekliyle "nükleik asit kimerası", bir serotipten bir dang virüsünün immünogenisitesini şifreleyen nükleotit sekanslarını ve farklı bir serotipten bir dang virüsü omurgasından türetilmiş başka nükleotit sekanslarını içeren buluşa ait bir yapı anlamına gelir. Buna karşılık olarak, buluşa ait herhangi bir kimerik virüs veya virüs kimerası, bir nükleik asit kimerası örneği olarak algılanacaktır.

Yapısal ve yapısal olmayan proteinlerin, tam proteinin, bir protein epitopunun veya örneğin bunların üç veya daha fazla amino asit tortusunu kapsayan herhangi bir fragmanın sekansını içeren herhangi bir proteini veya şifreleyen herhangi bir geni kapsadığı anlaşılabacaktır.

### **Dang Kimeraları**

Dang virüsü, sivrisinek kaynaklı bir flavivirüs patojendir. Dang virüsü genomu, bir 5' translate edilmemiş bölgesinin (5' UTR) ardından bir kapsid proteini (C) şifreleme bölgesi, sonra bir premembran/membran protein (prM) şifreleme bölgesi, sonra bir zarf protein (E) şifreleme bölgesi, sonra yapısal olmayan proteinleri (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) şifreleyen bölge ve son olarak bir 3' translate edilmemiş bölge (3' UTR) içerir. Viral yapısal proteinler, C, prM ve E'dir ve yapısal olmayan proteinler, NS1-NS5'tir. Yapısal ve yapısal olmayan proteinler, tek bir poliprotein şeklinde translate edilir ve hücresel ve viral proteazlarla işlenir.

Burada tarif edilen dang kimeraları, bir serotipten bir dang virüsünün, örn., DEN1, DEN2, DEN3 veya DEN4'ün yapısal protein genlerinin, farklı bir serotipten bir dang virüsünün, örn., DEN1, DEN2, DEN3 veya DEN4'ün yapısal olmayan protein genleri ile kaynaştırılması suretiyle oluşturulan yapılardır.

Burada tedarik edilen hafifletilmiş, immünojenik dang kimeraları, buna karşı immünogenisite verilecek olan bir serotipten dang virüsünün bir veya daha fazla yapısal protein genini veya bunların antijenik kısımlarını ve farklı bir serotipten bir dang virüsünün yapısal olmayan proteinini içerir.

Tarifnameye göre kimera, omurga olarak bir serotipten bir dang virüsü genomu içerir; burada dang genomunun C, prM veya E protein(ler)ini şifreleyen yapısal protein gen(ler)i veya bunların kombinasyonları, buna karşı koruma yapılacak farklı bir serotipten bir dang virüsünün ilgili yapısal protein gen(ler)i ile değiştirilir. Nihai viral kimera, başka bir serotipten bir dang virüsü ile kimerize olmasından dolayı hafifleme özelliklerine sahiptir ve bu nedenle öldürücülüğü azalmıştır ancak yapısal gen ürünlerinin antijenik epitoplarını eksprese eder ve bu nedenle immünojeniktir.

Herhangi bir dang virüsünün genomu, burada tarif edilen hafiflemiş kimeralarda omurga olarak kullanılabilir. Omurga, dang virüsünün hafifleme fenotipine katkıda bulunan veya üretim için kullanılan hücre substratında, örn., Vero hücrelerinde replikasyonu kolaylaştıran mutasyonlar içerebilir. Mutasyonlar, yapısal olmayan proteinleri, 5' translate edilmemiş bölgeyi veya 3' translate edilmemiş bölgeyi şifreleyen nükleotit sekansında olabilir. Omurga ayrıca hafifletme fenotipinin stabilitesini muhafaza etmek ve hafiflemiş virüs veya kimeranın, ölümcül doğal tipte virüse geri dönme ihtimalini azaltmak

için başka mutasyonlar da içerebilir. Örneğin 3' translate edilmemiş bölgedeki birinci bir mutasyon ve 5' translate edilmemiş bölgedeki ikinci bir mutasyon, arzu edilirse ilave hafifletme fenotipi stabilitesi sağlayacaktır. Özellikle DEN4 genomunun 3' translate edilmemiş bölgesinden nt 10478-10507 arasındaki 30 nt'nin bir delesyonu olan bir mutasyon, DEN4 virüsünde hafiflemeye neden olur (Men ve arkadaşları 1996 J. Virology 70:3930-3933; Durbin ve arkadaşları 2001 Am J Trop Med 65:405-413, 2001). Bu nedenle bu bölgede böyle bir mutasyon içeren herhangi bir dang tip 4 virüsünün genomu, burada tarif edilen hafiflemiş kimeralarda omurga olarak kullanılabilir. Daha da ötesi diğer dang virüsü serotiplerinin genomlarındaki 3' translate edilmemiş bölgede analog bir delesyon mutasyonu içeren diğer dang virüsü genomları da omurga yapısı olarak kullanılabilir. Bu gibi mutasyonlar, teknolojiye uzman kişilerce bilinen teknikler kullanılarak sahaya yönelik mutajenez yoluyla gerçekleştirilebilir. Teknolojiye uzman kişiler, burada tarif edilen ve teknolojiye iyi bilinen virülans tarama deneylerinin, virulan ile hafiflemiş omurga yapılarını birbirinden ayırt etmek için kullanılabilir.

### **Dang Kimeralarının Yapılandırılması**

Burada tarif edilen dang virüsü kimeraları, buna karşı immünite arzu edilen bir serotipten dang virüsünün yapısal protein genlerinden en az birinin, teknolojiye uzman kişilerce iyi bilinen rekombinant mühendislik teknikleri kullanılarak farklı bir serotipten bir dang virüsü genomu omurgası ile ikame edilmesi, yani bir serotipten tayin edilen bir dang virüsü geninin çıkarılması ve bunun yerine, farklı bir serotipten dang virüsünün arzu edilen ilgili geninin konulması suretiyle üretilir. Alternatif olarak GenBank'ta verilen sekanslar kullanılarak dang proteinlerini şifreleyen nükleik asit molekülleri,

bilinen nükleik asit sentez teknikleri kullanılarak sentezlenebilir ve uygun bir vektör içerisine sokulabilir. Böylelikle teknolojiye uzman kişilerce bilinen rekombinant mühendislik teknikleri kullanılarak hafiflemiş immünojenik virüs üretilir.

- 5 Yukarıda belirtildiği gibi omurga içerisine sokulacak gen, bir serotipten bir dang yapısal proteinini şifreler. Tercihen yerleştirilecek farklı bir serotipten dang geni, bir C proteini, bir prM proteini ve/veya bir E proteinini şifreleyen bir gendir. Dang virüsü omurgasına sokulan sekans, başka bir serotipten hem prM hem de E yapısal proteinlerini
- 10 şifreleyebilir. Dang virüsü omurgasına sokulan sekans, başka bir serotipten C, prM ve E yapısal proteinlerini şifreleyebilir. Dang virüsü omurgası, DEN1, DEN2, DEN3 veya DEN4 virüs genomu veya bu serotiplerin herhangi birinden hafiflemiş bir dang virüsü genomudur ve farklı bir serotipten bir dang virüsünün C, prM ve/veya E yapısal
- 15 protein(ler)ini şifreleyen ikame edilmiş gen(ler)i veya farklı bir serotipten bir dang virüsünün prM ve/veya E yapısal protein(ler)ini şifreleyen ikame edilmiş gen(ler)i kapsar.

Serotiplerin herhangi birinden dang virüsünün yapısal proteinlerini şifreleyen nükleotit sekansları içeren uygun kimerik virüsler veya

- 20 nükleik asit kimeraları, immünojenite tutularak virülansta azalma gösteren fenotipik hafifleme markerleri bakımından taranarak aşılar şeklinde faydalı olarak değerlendirilebilir. Antijenisite ve immünogenisite, teknolojiye uzman kişilerce bilinen rutin tarama prosedürleri kullanılarak dang antikorları veya immünoreaktif serum
- 25 ile in vitro veya in vivo reaktiviteyle değerlendirilebilir.

### **Dang Aşıları**

Tercih edilen kimerik virüsler ve nükleik asit kimeraları, immünojenler veya aşılar olarak faydalı canlılığı hafifletilmiş virüsler

sağlar. Tercih edilen bir düzeneğe kimeralar, yüksek immünogenisite sergilerken aynı zamanda tehlikeli patojenik veya ölümcül etkiler üretmez.

Tarifnameye göre kimerik virüsler veya nükleik asit kimeraları, doğal  
5 tipte bir serotipten bir dang virüsünün veya farklı bir serotipten hafiflemiş bir dang virüsü omurgasının yapısal genlerini içerebilir. Örneğin kimera, bir dang virüsü veya farklı bir serotipten hafiflemiş bir dang virüsü art alanında bir serotipten bir dang virüsünün yapısal protein genlerini eksprese edebilir.

10 Bir serotipten bir dang virüsü genomunun yapısal olmayan bölgelerini içeren genetik bir artalanın ve farklı bir serotipten bir dang virüsünün yapısal protein genlerini eksprese etmek için kimerizasyon yoluyla hafifleme özelliklerinin kullanıldığı burada tarif edilen strateji, arzu edilen immünogenisitede yapısal protein genlerini eksprese eden  
15 canlılığı hafifletilmiş dang aşı adaylarının gelişmesine yol açmıştır. Bu nedenle dang patojenlerinin kontrolüne yönelik aşı adayları tasarlanabilir.

Burada tarif edilen kimeralarda kullanılan virüsler tipik olarak teknolojiye bilinen teknikler kullanılarak büyütülür. Daha sonra virüs  
20 plakası veya oda oluşturuvcu ünite (FFU) titrasyonları gerçekleştirilir ve plaklar veya FFU, hücre kültürü içerisinde büyütülen virüsün canlılığını, titerini ve fenotipik karakteristiklerini değerlendirmek için sayılır. Doğal tipte virüsler, hafiflemiş aday başlangıç materyallerini çıkarmak için mutajenize edilir.

25 Kimerik enfeksiyöz klonlar, çeşitli dang serotiplerinden yapılandırılır. Virüse özel cDNA fragmanları da arzu edilirse klonlanabilir. Yapısal protein veya yapısal olmayan protein genleri içeren cDNA fragmanları, ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)

yoluyla çeşitli primerlerle dang RNA'sından amplifiye edilir. Amplifiye edilen fragmanlar, başka ara klonların klivaj sahalarına klonlanır. Daha sonra sokulan danga özel cDNA'nın sekansını doğrulamak için ara, kimerik dang klonları sekanslanır.

- 5 Dang virüslerinin yapısal veya yapısal olmayan protein geni bölgesinin, vektörler içerisine sokulmasıyla yapılandırılan tam genom boyunda kimerik plazmidler, teknolojiye uzman kişilerce iyi bilinen rekombinant teknikler kullanılarak elde edilebilir.

### **Uygulama Yöntemleri**

- 10 Burada tarif edilen viral kimeralar, ayrı ayrı veya birlikte insanlara veya hayvanlara uygulanmak üzere farmasötik açıdan kabul gören bir taşıyıcı veya araç ile birleştirilir. "Farmasötik açıdan kabul gören taşıyıcı" veya "farmasötik açıdan kabul gören araç" terimleri burada, bunlarla sınırlı olmamak üzere, su veya tuz, bir jel, pomat, solvent,
- 15 seyreltici, sıvı merhem bazı, lipozom, misel ve benzeri gibi ters fizyolojik tepkilere neden olmadan ve kompozisyon içerisindeki diğer bileşenler ile zararlı olacak şekilde etkileşmeden canlı hayvan veya insan dokusu ile temas halinde kullanıma uygun herhangi bir kompozisyon veya bileşik anlamında kullanılır.
- 20 İmmünojenik veya aşı formülasyonları uygun şekilde viral plak oluşturunca ünite (PFU) veya oda oluşturunca ünite (FFU) dozaj formunda verilebilir ve bilindik farmasötik teknikler kullanılarak hazırlanır. Bu teknikler, aktif muhteviyatın farmasötik taşıyıcı(lar) veya ekspiyant(lar) ile bir araya getirilmesi aşamasını içerir. Genel
- 25 olarak formülasyonlar, aktif muhteviyat ile sıvı taşıyıcıların tek biçimli ve sıkı bir şekilde bir araya getirilmesi suretiyle hazırlanır. Parenteral yoldan uygulamaya uygun formülasyonlar arasında anti-oksidanlar, tamponlar, bakteriyostatlar ve formülasyonu amaçlanan

alıcının kanı ile izotonik hale getiren solütler ihtiva edebilen, sulu ve sulu olmayan steril enjeksiyon çözeltileri ve süspanse edici ajanlar ve koyulaştırıcı ajanlar içerebilen sulu ve sulu olmayan steril süspansiyonlar yer alır. Formülasyonlar, birim dozlu veya çok dozlu kaplar, örneğin sızdırmaz ampuller ve şişeler içinde sunulabilir ve sadece steril sıvı taşıyıcının örneğin enjeksiyonluk suyun kullanımdan hemen önce ilave edilmesini gerektiren, dondurularak kurutulmuş (liyofilize edilmiş) durumda saklanabilir. Hazırlıksız enjeksiyon çözeltileri ve süspansiyonları, teknolojiye sırada uzmanlığa sahip bir kişi tarafından genel olarak kullanılan steril tozlar, granüller ve tabletlerden hazırlanabilir.

Tercih edilen birim dozaj formülasyonları, uygulanan muhteviyatın bir doz veya ünitesini veya bunun uygun bir fraksiyonunu içerenlerdir. Özellikle yukarıda adı geçen muhteviyatlara ek olarak mevcut buluşa ait formülasyonların, teknolojiye sıradan uzmanlığa sahip kişilerin genel olarak kullandığı başka ajanlar da içerebileceği anlaşılmalıdır. İmmünojenik veya aşı kompozisyonu, oral veya parenteral gibi farklı yollarla, bunlarla sınırlı olmamak üzere, bukkal ve dilaltı, rektal, aerosol, nazal, intramüsküler, subkütan, intradermal ve topikal yolla uygulanabilir. Kompozisyon, bunlarla sınırlı olmamak üzere, çözeltiler, emülsiyonlar ve süspansiyonlar, mikrosferler, partiküller, mikropartiküller, nanopartiküller ve lipozomlar gibi farklı formlarda uygulanabilir. Her bağışıklılaştırma programı başına yaklaşık 1 ila yaklaşık 5 doz gerekmesi beklenir. Başlangıç dozları, yaklaşık 100 ila yaklaşık 100,000 PFU veya FFU aralığında olabilir, tercih edilen bir dozaj aralığı, yaklaşık 500 ila yaklaşık 20,000 PFU veya FFU, daha fazla tercih edilen bir dozaj aralığı, yaklaşık 1000 ila yaklaşık 12,000



PFU veya FFU ve en fazla tercih edilen dozaj aralığı da, yaklaşık 1000 ila yaklaşık 4000 PFU veya FFU'dur. Artış enjeksiyonları, yaklaşık 100 ila yaklaşık 20,000 PFU veya FFU aralığında olabilir, tercih edilen bir dozaj aralığı, yaklaşık 500 ila yaklaşık 15,000, daha fazla tercih edilen bir dozaj aralığı, yaklaşık 500 ila yaklaşık 10.000 PFU veya FFU ve en fazla tercih edilen dozaj aralığı da, yaklaşık 1000 ila yaklaşık 5000 PFU veya FFU'dur. Örneğin uygulama hacmi, uygulama yoluna bağlı olarak değişecektir. İntramüsküler enjeksiyonlar, hacim olarak yaklaşık 0.1 ml ila 1.0 ml aralığında olabilir.

Kompozisyon, yaklaşık  $-100^{\circ}\text{C}$  ila yaklaşık  $4^{\circ}\text{C}$  arasındaki sıcaklıklarda saklanabilir. Kompozisyon, oda sıcaklığı dahil farklı sıcaklıklarda liyofilize bir halde de saklanabilir. Kompozisyon, teknolojiye sıradan uzmanlığa sahip kişilerce bilinen bilindik yöntemlerle sterilize edilebilir. Bu gibi yöntemler arasında, bununla sınırlı olmamak üzere, filtrasyon yer alır. Kompozisyon, bakteriyel büyümeyi inhibe etmek için bakteriyostatik ajanlar ile de birleştirilebilir.

### **Uygulama Programı**

Burada tarif edilen immünojenik veya aşı kompozisyonu, insanlara, özellikle de dang virüsü enfeksiyonunun mevcut olduğu bölgelere seyahat eden kişilere ve aynı zamanda bu bölgelerde yaşayanlara uygulanabilir. Kompozisyonun uygulanması için optimal süre, dang virüsüne ilk maruz kalmadan önceki yaklaşık bir ila üç aydır. Bununla birlikte kompozisyon, hastalığın ilerleyişini hafifletmek için ilk enfeksiyondan sonra veya hastalığı tedavi etmek için ilk enfeksiyondan sonra da uygulanabilir.

### **Adjuvanlar**

Teknolojide sıradan uzmanlığa sahip kişilerce bilinen çeşitli adjuvanlar, bu buluşa ait immünojen veya aşı kompozisyonu içerisinde kimerik virüs ile birlikte uygulanabilir. Bu gibi adjuvanlar arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, aşağıdakiler yer alır: Polimerler, kopolimerler, örn., polioksietilen-polioksipropilen kopolimerleri, örn., blok kopolimerler, polimer p 1005, Freund'un tam adjuvanı (hayvanlar için), Freund'un tam olmayan adjuvanı; sorbitan monooleat, skualen, CRL-8300 adjuvanı, alum, QS21, muramil dipeptid, CpG oligonükleotit motifleri ve CpG oligonükleotit motifleri, trehaloz, bakteri özleri, örn., mikobakteriyel özler, detoksifiye edilmiş endotoksinler, membran lipidlerinden oluşan kombinasyonlar veya bunların kombinasyonları.

### **Nükleik Asit Sekansları**

Bir serotipten dang virüsünün ve farklı bir serotipten dang virüsünün nükleik asit sekansları, bir örnek veya numunedeki dang virüsü kimeleralarının, yüksek hassasiyet ve spesifite ile saptanmasına yönelik nükleik asit sondaları ve primerlerinin tasarlanmasında faydalıdır. Dang virüsüne karşılık gelen sondalar veya primerler, bir aşı virüsünün varlığının saptanması için kullanılabilir. Nükleik asit ve ilgili amino asit sekansları, organizmalar ve hastalıklar üzerinde çalışmaya ve hastalıklar için terapiler ve tedaviler geliştirmeye yarayan laboratuvar gereçleri olarak faydalıdır.

Nükleik asit sondaları ve primerleri, dang virüsünü şifreleyen nükleik asit molekülleri veya bunların komplementer sekansları ile seçici bir şekilde hibridize olur. "Seçici" veya "seçici bir şekilde", dang virüsü sekansının yeterince saptanmasını engelleyecek başka nükleik asitler ile hibridize olmayan bir sekans anlamına gelir. Bu yüzden hibridize

olan nükleik asitlerin tasarımında seçicilik, örnek içerisinde mevcut diğer bileşenlere bağlı olacaktır. Hibridize olan nükleik asit, hibridize olduğu nükleik asit segmenti ile en az %70 komplementerliğe sahip olmalıdır. Nükleik asitleri tarif etmek için burada kullanılan şekliyle

5 "seçici bir şekilde hibridize olur" terimi, ara sıra rasgele hibridize olan nükleik asitleri dışarıda bırakır ve bu nedenle de "spesifik olarak hibridize olan" ile aynı anlama gelir. Seçici bir şekilde hibridize olan nükleik asit sondaları ve primerleri, hibridize olduğu sekans segmenti ile en az %70, %80, %85, %90, %95, %97, %98 ve %99, tercihen

10 %85 veya üzeri komplementerliğe sahip olabilir. Burada aynı zamanda şifreleyici nükleik asit veya nükleik asidin komplementer veya karşı iplikçğine seçici bir şekilde hibridize olan sekanslar, sondalar ve primerleri de konu edilmiştir. Nükleik asitle spesifik hibridizasyon, fonksiyonel tür-tür hibridizasyon kabiliyeti muhafaza

15 edildiği sürece nükleik asit içerisinde az sayıda modifikasyon veya ikame ile gerçekleştirilebilir. "Sonda" veya "primer", saptanmaları veya amplifiye edilmeleri için komplementer nükleik asit sekansları ile seçici hibridizasyona yönelik sondalar veya primerler olarak kullanılabilen nükleik asit sekansları anlamına gelir; bu sonda veya

20 primerlerin uzunlukları, yaklaşık 5 ila 100 nükleotit veya tercihen yaklaşık 10 ila 50 nükleotit veya en fazla tercihen de yaklaşık 18-24 nükleotit arasında değişebilir. İzole edilmiş nükleik asitler burada sert koşullar altında türe özel nükleik asitler ile seçici bir şekilde hibridize olacak şekilde sağlanır ve bunlar, Molecular Cloning: A Laboratory

25 Manual, 2nci baskı, Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989'da tarif edildiği gibi söz konusu sekans için en az beş nükleotit komplementerliğine sahip olmalıdır.

Primerler olarak kullanılması durumunda kompozisyon, arzu edilen bir bölgenin amplifiye olması için hedef molekülün farklı bölgelerine hibridize olan en az iki nükleik asit molekülü tercihen içerir. Sonda veya primerin uzunluğuna bağlı olarak hedef bölge, %70  
 5 komplementer bazlar ile tam komplementerlik arasında olabilir ve hala sert koşullar altında hibridize olabilir. Örneğin dang virüsü varlığının saptanması amacıyla hibridize olan nükleik asit (sonda veya primer) ile bunun hibridize olduğu sekans arasındaki komplementerlik derecesi, en azından bir nükleik asit ile hibridizasyonu diğer  
 10 organizmalardan ayırt etmek için yeterlidir.

Dang virüsünü şifreleyen nükleik asit sekansları, bir plazmid gibi bir vektör içerisine sokulabilir ve canlı bir organizma içerisinde rekombinant bir şekilde eksprese edilerek rekombinant dang virüsü peptidi ve/veya polipeptidleri üretilebilir.

15 Burada açıklanan nükleik asit sekansları, bir ters transkripsiyon/polimeraz zincir reaksiyonu (RT/PCR) kullanarak viral genomik RNA şablonundan amplifiye olmuş bir cDNA amplikonu saptandığını rapor etme görevi gören bir teşhis sondasını ve aynı zamanda cDNA amplikonunu amplifiye etmek için tasarlanan ileri ve  
 20 geri amplimerleri kapsar. Belirli durumlarda amplimerlerden biri, amplimerin 3' terminal ucunda aşı virüsüne özel bir mutasyon içerecek şekilde tasarlanır; bu etkin şekilde testin aşı suşu için iki kat fazla spesifik olmasını sağlar, çünkü hedef sahadaki primer uzantısı ve sonuçta amplifikasyon, sadece viral RNA şablonunun o spesifik  
 25 mutasyonu içermesi durumunda gerçekleşir.

Son zamanlarda otomatik PCR bazlı nükleik asit sekansı saptama sistemleri geliştirilmiştir. TaqMan deneyi (Applied Biosystems) yaygın şekilde kullanılmaktadır. Diagnostik genetik testler için daha

yakın zamanlarda geliştirilmiş bir strateji, moleküler farların kullanılmasını sağlar (Tyagi ve Kramer, 1996 Nature Biotechnology 14:303-308). Moleküler far deneylerinde, TaqMan deneyinde kullanılanlardan farklı söndürücü ve raportör boyalar kullanılır.

5 Bunlar ve diğer saptama sistemleri, teknolojiye uzman kişilerce kullanılabilir.

#### Karşılaştırmalı ÖRNEK 1

##### **Dang Virüsü Aşı Adayı rDEN4Δ30'un Geliştirilmesi**

Rekombinant canlılığı hafifletilmiş dang-4 aşı adayı rDEN4Δ30'un

10 güvenliği, bir doz 5.0 log<sub>10</sub> plak oluşturuu ünite (PFU) alan yirmi insan gönüllüde değerlendirildi (Durbin A.P. ve arkadaşları, 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-413). Aşı adayının, bütün aşilar içerisinde güvenli, ile tolere edilen ve immünojenik olduğu bulundu. Bununla birlikte aşılananlardan beşinde, alanin Aminotransferaz seviyelerinde

15 geçici bir yükselme oldu; üçü, nötrapeeni yaşadı ve on aşılı, asemptomatik bir maküler döküntü yaşadı; bu, bu aşı adayının daha da hafifletilmesi gerekebileceğinin işaretidir.

Hali hazırda randomize, çift kör, plasebo kontrollü, doz azaltma çalışması, rDEN4Δ30'un insan enfeksiyöz dozu 50 (HID<sub>50</sub>)'yi

20 belirlemek için gerçekleştirilir. Her bir doz grubu, yaklaşık olarak yirmi aşı ve dört plasebo alıcısından oluşur. Bugüne kadar 3.0 log<sub>10</sub> PFU ve 2.0 log<sub>10</sub> PFU'dan oluşan dozlar için tam veriler toplandı. rDEN4Δ30, 3.0 log<sub>10</sub> PFU uygulanması durumunda aşılananların %100'üne enfekte oldu ve 2.0 log<sub>10</sub> PFU uygulanması durumunda

25 aşılananların %95'ine enfekte oldu (Tablo 1). Aşı adayı, herhangi bir dozda hiçbir semptomatik hastalığa neden olmadı (Tablo 1). 3.0 log<sub>10</sub> PFU alan bir aşılı, alanin Aminotransferaz seviyelerinde geçici bir

| Suje adedi | Doz <sup>a</sup> | Enfekte olan adedi | Viremili adet | Ortalama zirve titeri <sup>b</sup> | Aşağıdakilere sahip gönüllü adedi |         |                        |                |
|------------|------------------|--------------------|---------------|------------------------------------|-----------------------------------|---------|------------------------|----------------|
|            |                  |                    |               |                                    | Ateş                              | Döküntü | Nötropeni <sup>c</sup> | ↑ ALT          |
| 20         | 5.0              | 20                 | 14            | 1.2(0.2)                           | 1 <sup>d</sup>                    | 10      | 3                      | 5              |
| 20         | 3.0              | 20                 | 7             | 0.4(0.0)                           | 0                                 | 11      | 5                      | 1 <sup>e</sup> |
| 20         | 2.0              | 19                 | 11            | 0.6(0.1)                           | 1 <sup>d</sup>                    | 16      | 4                      | 0              |
| 8          | 0                | 0                  | 0             | 0                                  | 0                                 | 0       | 0                      | 0              |

<sup>a</sup> Log<sub>10</sub> pfu

<sup>b</sup> Log<sub>10</sub> pfu/mL

<sup>c</sup> ANC < 1500/dl olarak tanımlanan nötropeni

<sup>d</sup> gönüllüde T Maks= 100.4°F

<sup>e</sup> ALT gün 0= 78, ALT maks= 91 (gün 14)

Tablo 2. Aşılananlarda döküntü şablonu

| Doz <sup>a</sup>                                                                                               | Viremili adet | Döküntülü adet | Viremi ve döküntü | Viremi, döküntü yok | Ortalama başlama günü $\pm$ SD | Ortalama süre (günler $\pm$ SD) |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|----------------|-------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| 5                                                                                                              | 14/20         | 10/20          | 9/20              | 5/20                | 8.1 $\pm$ 1.3 [A] <sup>a</sup> | 3.6 $\pm$ 2.0[A]                |
| 3                                                                                                              | 7/20          | 11/20          | 6/20              | 1/20                | 12.2 $\pm$ 1.4[B]              | 5.0 $\pm$ 2.1[A]                |
| 2                                                                                                              | 11/20         | 16/20          | 9/20              | 2/20                | 11.2 $\pm$ 1.4[B]              | 6.9 $\pm$ 1.7 [B]               |
| <sup>a</sup> log <sub>10</sub> pfu                                                                             |               |                |                   |                     |                                |                                 |
| <sup>b</sup> Harflerin farklı olduğu her bir kolondaki ortalamalar önemli ölçüde farklıdır ( $\alpha = 0.05$ ) |               |                |                   |                     |                                |                                 |

Tablo 3. rDEN4 $\Delta$ 30 viremi özeti

| Doz <sup>a</sup>                                                                                      | Viremili adet | Ortalama zirve titeri (log <sub>10</sub> pfu/mL) | Ortalama viremi başlangıcı (gün $\pm$ SD) | Ortalama viremi süresi (gün $\pm$ SD) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------|
| 5                                                                                                     | 14            | 1.2 $\pm$ 0.2 [A]                                | 5.8 $\pm$ 2.4 [A] <sup>b</sup>            | 4.4 $\pm$ 2.4 [A]                     |
| 3                                                                                                     | 7             | 0.4 $\pm$ 0.0 [B]                                | 9.1 $\pm$ 2.5[B]                          | 1.6 $\pm$ 1.0 [B]                     |
| 2                                                                                                     | 10            | 0.6 $\pm$ 0.1 [B]                                | 8.7 $\pm$ 2.4 [B]                         | 2.6 $\pm$ 2.0 [A]                     |
| <sup>a</sup> log <sub>10</sub> pfu                                                                    |               |                                                  |                                           |                                       |
| <sup>b</sup> Harfleri farklı her bir kolondaki ortalamalar, önemli ölçüde farklıdır ( $\alpha=0.05$ ) |               |                                                  |                                           |                                       |

5

Tablo 4. rDEN4 $\Delta$ 30'un İmmünogenisitesi

| Suje adedi | Doz (log <sub>10</sub> ) | Enfekte olan adedi | Geometrik ortalama serum nötralize edici antikor titeri (aralık) |              | % serodönüşüm |
|------------|--------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------------|--------------|---------------|
|            |                          |                    | Gün 28                                                           | Gün 42       |               |
| 20         | 5.0                      | 20                 | 567(72-2455)                                                     | 399(45-1230) | 100           |
| 20         | 3.0                      | 20                 | 156(5-2365)                                                      | 158(25-1222) | 95            |
| 20         | 2.0                      | 19                 | 163(5-943)                                                       | 165(5-764)   | 95            |
| 8          | 0                        | 0                  | 0                                                                | 0            | 0             |

rDEN4 $\Delta$ 30'u daha da hafifletmek için iki yaklaşım alınmıştır. Birincisi, 5' florourasil mutajenezi kullanılarak rDEN4'te hafifletici nokta mutasyonlarının oluşturulması ve karakterize edilmesidir (Blaney, J.E. Jr. Ve arkadaşları 2002 Virology 300:125-139; Blaney, J.E. Jr. Ve arkadaşları 2001 J. Virol. 75: 9731-9740). Bu yaklaşım, Vero ve HuH-7 hücrelerine sıcaklık hassasiyeti (ts) ve küçük plak (sp) fenotipleri ve emzirtme döneminde fare beynine ve HuH-7 hücreleri aşılanmış SCID farelerine (SCID-HuH-7 fareleri) hafifletme (att) fenotipleri kazandıran bir nokta mutasyonları panelini tanımlanmıştır. Bu örnekte bu mutasyonların bir alt grubu, rDEN4 $\Delta$ 30'a dahil edilmiş ve nihai virüslerin fenotipleri değerlendirilmiştir.

İkinci bir yaklaşım, rDEN4NS5 geninde yüklü amino asit tortularının bitişik çiftlerinde bir dizi çift yük-alanin mutasyonu yaratmaktır. Daha önceden gösterildiği gibi rDEN4NS5 içerisindeki yüklü amino asit tortularından oluşan 32 ayrı bitişik çiftin mutasyonu, Vero ve HuH-7 hücrelerine bir ts fenotipleri aralığı ve emzirme döneminde olan fare beynine bir att fenotipleri aralığı kazandırdı (Hanley, K.H. ve arkadaşları 2002 J. Virol. 76 525-531). Aşağıda gösterildiği gibi bu mutasyonlar aynı zamanda SCID-HuH-7 farelerine bir att fenotipi de kazandırır. Bu mutasyonlar, tekli çiftler halinde ya da iki çiftten oluşan gruplar halinde rDEN4 $\Delta$ 30'a dahil edilerek bunların,  $\Delta$ 30 mutasyonu ile uyumlu olup olmadıkları ve rDEN4 $\Delta$ 30'un att fenotiplerini arttırıp arttırmadıkları belirlenmiştir.

Ayrı ayrı nokta mutasyonları taşıyan rDEN4 virüslerinden oluşan bir panel, doku kültüründe sıcaklığa duyarlı ve/veya küçük plak fenotiplerine ve doğal tipte rDEN4 virüsüyle kıyaslandığında emzirme



döneminde olan fare beyninde değişken seviyelerde hafiflemiş replikasyona sahip olmasıyla karakterize edilmiştir (Blaney, J. E. ve arkadaşları 2002 Virology 300:125-139; Blaney, J. E. et al. 2001 J Virol. 75:409731-9740). Bu mutasyonlar, bunların, rhesus maymunlarında rDEN4 $\Delta$ 30'un replikasyonunu daha da kısıtlama kabiliyetlerini değerlendirmek için  $\Delta$ 30 delesyon mutasyonu ile birleşecek şekilde seçilmiştir. İlk olarak Vero ve HuH-7 hücrelerine sıcaklık hassasiyeti ve emzirme döneminde olan fare beynine kısıtlı replikasyon veren nükleotit 4995'te (Ser>Pro) NS3 içerisindeki missens mutasyonu, daha önceden  $\Delta$ 30 mutasyonu ile birleştirilmişti (Blaney, J. E. ve arkadaşları 2001 J Virol. 75:9731-9740). Nihai virüs, rDEN4 $\Delta$ 30-4995'in, fare beyni replikasyonu bakımından doğal tipte rDEN4 virüsüne kıyasla rDEN4 $\Delta$ 30 virüsünden (<5 kat) daha kısıtlı (1000 kat) olduğu bulundu. İkinci olarak Vero ve HuH-7 hücrelerine sıcaklık duyarlılığı ve emzirme döneminde olan fare beynine 10,000 kat kısıtlı replikasyon kazandıran nükleotit 8092'deki (Glu>Gly) bir missens mutasyonu, burada  $\Delta$ 30 mutasyonu ile birleştirildi. Üçüncü olarak Vero ve HuH-7 hücrelerine sıcaklık duyarlılığı, HuH-7 hücrelerine küçük plak ebadı ve emzirme döneminde olan fare beynine ve HuH-7 hücreleri transplante edilmiş SCID farelerine yaklaşık olarak 1000 kat kısıtlı replikasyon kazandıran nükleotit 10634'te 3' UTR'deki bir ikame, burada  $\Delta$ 30 mutasyonu ile birleştirildi (Blaney, J. E. ve arkadaşları 2002 Virology 300:125-139). Mevcut araştırma için yukarıdaki mutasyonları içeren p4'ün altı klonlanmış fragmanları (Durbin, A.P. ve arkadaşları 2001 Am J Trop Med Hyg 65: 405-13), p4 $\Delta$ 30 cDNA klonuna dahil edildi. Virüsün transkripsiyonu ve geri kazanılması için cDNA, Acc65I (sadece tek bir

3' nükleotidini bırakarak klivaj olan Kpln izosşizomeri) ile linearize edildi ve daha önceden tarif edildiği gibi SP6 RNA polimerazı yoluyla transkripsiyonda şablon olarak kullanıldı (Blaney, J. E. ve arkadaşları 2002 Virology 300:125-139). C6/36 sivrisinek hücreleri, lipozom

5 aracılı transfeksiyon kullanılarak transfekte edildi ve hücre kültür süpernatantları, beş ile yedinci günle arasında toplandı. Geri kazanılan virüs terminal olarak iki kez Vero hücrelerinde seyreltildi ve iki (rDEN4 $\Delta$ 30-4995) veya üç (rDEN4 $\Delta$ 30-8092 ve rDEN4 $\Delta$ 30-10634) kez Vero hücrelerine geçirildi.

10 rDEN4 $\Delta$ 30-4995, rDEN4 $\Delta$ 30-8092 ve rDEN4 $\Delta$ 30-10634 virüslerinin tam genomik sekansları, daha önceden tarif edildiği gibi belirlendi (Durbin ve arkadaşları 2001 Am. J. Trop. Med. Hyg. 65:405-413). Beklendiği gibi her bir rDEN4 $\Delta$ 30 virüsü türevi,  $\Delta$ 30 mutasyonu içeriyordu. Beklenmedik şekilde rDEN4 $\Delta$ 30-4995 virüsünde, nükleotit

15 4995'i içeren kodondaki nükleotit değişiklikleri, bir Ser>Pro değişikliğinden çok bir Ser>Leu amino asit değişikliğine neden oldu; çünkü p4 $\Delta$ 30-4995 cDNA, Ser>Pro değişikliği dahil edilecek şekilde tasarlandı (Tablo 5). p4 $\Delta$ 30-4995 cDNA klonunun gerçekten nükleotit 4995'te bir Ser>Pro değişikliğini şifrelediği bulundu, bu yüzden virüs

20 popülasyonunun nasıl Ser>Leu mutasyonu edindiği net değildir. Bununla birlikte bu virüs, bu missens mutasyonla özelleşen fenotipi değerlendirmek için değerlendirildi. rDEN4 $\Delta$ 30-4995 virüsünün, 4725-6 nükleotitlerinde tesadüfi bir mutasyon içerdiği de bulundu; bu, tek bir amino asit değişikliğine (Ser>Asp) neden oldu. rDEN4 $\Delta$ 30-

25 8092 ve rDEN4 $\Delta$ 30-10634 virüsleri, uygun nükleotit ikamelerinin yanı sıra sırasıyla E, NS4B ve NS4B'de ilave tesadüfi mutasyonlar da içeriyordu (Tablo 5).

Tablo 5. Nokta mutasyonları dahil edilmiş rDEN4 $\Delta$ 30 virüsünde mevcut missens ve UTR mutasyonları

| Virüs                   | Gen   | Nükleotit pozisyonu | Nükleotit ikamesi | Amino asit pozisyonu <sup>a</sup> | Amino asit değişikliği |
|-------------------------|-------|---------------------|-------------------|-----------------------------------|------------------------|
| rDEN4 $\Delta$ 30-4995  | NS3   | 4725                | U>G               | 1542                              | Ser > Asp              |
|                         | NS3   | 4726                | C>A               | 1542                              | Ser > Asp              |
|                         | NS3   | 4995 <sup>b</sup>   | U>C               | 1632                              | Ser> Leu               |
| rDEN4 $\Delta$ 30-8092  | E     | 1612                | A>C               | 504                               | Asp > Ala              |
|                         | NS4B  | 7131                | A>G               | 2344                              | Thr>Ala                |
|                         | NS5   | 8092 <sup>b</sup>   | A>G               | 2664                              | Glu > Gly              |
| rDEN4 $\Delta$ 30-10634 | NS4B  | 6969                | A>U               | 2290                              | Met > Leu              |
|                         | NS4B  | 7182                | G>C               | 2361                              | Gly > Arg              |
|                         | 3'UTR | 10634 <sup>b</sup>  | U>C               | Yok                               | Yok                    |

<sup>a</sup> Pozisyon 1 olarak C proteininin metiyonin tortusu (nükleotit 102-104) ile başlayan DEN4 poliproteininde amino asit pozisyonu.

<sup>b</sup> Mutasyon, Kunkeş mutajenezi yoluyla dahil edilmiş DEN4 enfeksiyonlu fare modellerinde replikasyonu kısıtlar.

Modifiye edilmiş üç rDEN4 $\Delta$ 30 virüsünün replikasyonu, emzirme döneminde olan fare beyni modelinde ve HuH-7 hücreleri transplante edilmiş SCID farelerinde (SCID-HuH-7 fareleri) rDEN4 $\Delta$ 30 ve doğal tipte rDEN4 virüsü ile kıyaslandı. Deneyler, daha önce tarif edildiği gibi gerçekleştirildi (Blaney, J. E. ve arkadaşları 2002 Virology

300:125-139; Blaney, J. E. ve arkadaşları 2001 J Virol. 75: 9731-9740). Kısacası emzirme döneminde olan fare beyni enfeksiyonunda, altı-yedi günlük farelerden oluşan gruplara, intraserebral yolla 4.0  $\log_{10}$  PFU virüs aşılandı ve her bir farenin beyni, beş gün sonra çıkarıldı. Daha sonra %10 beyin süspansiyonları içeren arıtılmış süpernatantlar,  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de donduruldu ve virüs titeri, Vero hücrelerinde plak deneyi ile belirlendi. SCID-HuH-7 farelerinde DEN4 virüs replikasyonunun analizi için dört ila altı haftalık SCID farelerine, intraperitoneal yolla  $10^7$  HuH-7 hücresi enjekte edildi.

Transplantasyondan beş ila altı hafta sonra fareler, tümör içerisinde doğrudan 4.0  $\log_{10}$  PFU virüs aşılanarak enfekte edildi ve virüs titrasyonu için serum, 7nci gün kuyruk kırpma yoluyla elde edildi. Virüs titeri, Vero hücrelerinde plak deneyi ile belirlendi.

Emzirme döneminde olan fare beyninde 6.0  $\log_{10}$ PFU/g'ye kadar replike olan doğal tipte rDEN4 ve virüsü ve rDEN4 $\Delta$ 30, önceki gözlemlere benzer şekilde 0.7  $\log_{10}$ PFU/g ile replikasyon bakımından kısıtlandı (Tablo 6) (Blaney, J. E. ve arkadaşları 2001 J Virol. 75: 9731-9740). rDEN4 $\Delta$ 30-4995, rDEN4 $\Delta$ 30-8092 ve rDEN4 $\Delta$ 30-10634 virüslerinin, ayrı ayrı 3.3, 2.8 ve 2.4  $\log_{10}$ PFU/g'lik rDEN4 virüsüne kıyasla emzirme döneminde olan fare beyninde kısıtlı replikasyona sahip olduğu bulundu. Bu sonuçlar, ilave hafifletici mutasyonların, fare beyninde rDEN4 $\Delta$ 30 virüsünün replikasyonunu 50 kat (rDEN4 $\Delta$ 30-10634) ila 400 kat (rDEN4 $\Delta$ 30-4995) arasında daha da kısıtlama görevi gördüğünü gösterir. SCID-HuH-7 farelerinde, rDEN4 $\Delta$ 30 virüsünün virüs titeri, yine önceki çalışmalara benzer bir şekilde rDEN4 virüsünden 0.4  $\log_{10}$ PFU/ml daha düşüktü (Blaney, J. E. ve arkadaşları 2002 Virology 300:125-139). Modifiye edilmiş her

bir rDEN4 $\Delta$ 30 virüsünün, SCID-HuH-7 farelerinde replikasyon bakımından daha da kısıtlı olduğu bulundu (Tablo 6). rDEN4 $\Delta$ 30-4995, rDEN4 $\Delta$ 30-8092 ve rDEN4 $\Delta$ 30-10634 virüsleri, SCID-HuH-7 farelerinde, rDEN4 virüsüne kıyasla, ayrı ayrı doğal tipte rDEN4 virüsü seviyesinin 2.9, 1.1 ve 2.3 log<sub>10</sub>PFU/g altında kısıtlı replikasyona sahipti. İki önemli gözlem yapıldı: (1) 4995, 8092 ve 10634 mutasyonları, canlılık bakımından  $\Delta$ 30 mutasyonu ile uyumlu idi ve (2) Bu üç modifiye edilmiş rDEN4 $\Delta$ 30 virüsü, rDEN4 doğal tipte virüsüne kıyasla replikasyon bakımından 10 ile 1000 kat azalma gösterdi; bu, bu modelde geniş bir hafifleme aralığına sahip virüslerin, maymun veya insanlarda daha da fazla değerlendirilmesini sağladı.

Tablo 6. NS3, NS5 veya 3' UTR'deki nokta mutasyonlarının rDEN4 $\Delta$ 30 virüsüne ilavesi, emzirme döneminde olan fare beyni ve SCID-HuH-7 fareleri için virüsü daha da hafifletir.

| Virüs                   | Emzirme döneminde olan fare beyninde replikasyon <sup>a</sup> |                                                          |                                                                                  | SCID-HuH-7 farelerinde replikasyon <sup>c</sup> |                                                           |                                                                                  |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
|                         | Fare adedi                                                    | Virüs titeri<br>± SE<br>log <sub>10</sub> PFU/g<br>beyin | Wt'den<br>ortalama<br>log <sub>10</sub> -birimi<br>olarak<br>azalma <sup>b</sup> | Fare adedi                                      | Virüs titeri<br>± SE<br>log <sub>10</sub> PFU/ml<br>serum | Wt'den<br>ortalama<br>log <sub>10</sub> -birimi<br>olarak<br>azalma <sup>b</sup> |
| rDEN4                   | 12                                                            | 6.0 ± 0.1                                                | -                                                                                | 13                                              | 6.4 ± 0.2                                                 | -                                                                                |
| rDEN4 $\Delta$ 30       | 12                                                            | 5.3 ± 0.1                                                | 0.7                                                                              | 20                                              | 6.0 ± 0.2                                                 | 0.4                                                                              |
| rDEN4 $\Delta$ 30-4995  | 6                                                             | 2.7 ± 0.4                                                | 3.3                                                                              | 5                                               | 3.5 ± 0.3                                                 | 2.9                                                                              |
| rDEN4 $\Delta$ 30-8092  | 6                                                             | 3.2 ± 0.2                                                | 2.8                                                                              | 7                                               | 5.0 ± 0.4                                                 | 1.1                                                                              |
| rDEN4 $\Delta$ 30-10634 | 12                                                            | 3.6 ± 0.1                                                | 2.4                                                                              | 5                                               | 4.4 ± 0.3                                                 | 2.3                                                                              |

- <sup>a</sup> emzirme döneminde olan 6 fareden oluşan gruplara, i.c. yoluyla  $10^4$  PFU virüs aşılandı. 5 gün sonra beyinler çıkarıldı, homojenize edildi ve Vero hücreleri içerisinde titerlendi.
- <sup>b</sup> Mutant virüs ver aynı anda rDEN4 wt kontrol aşılanmış farelerin ortalama virüs titerlerinin karşılaştırması.
- <sup>c</sup> HuH-7-SCID farelerinden oluşan gruplara, direkt olarak tümör içerisine olmak üzere  $10^4$ PFU virüs aşılandı. 6 ve 7nci gün serum toplandı ve Vero hücrelerinde titerlendi.

DEN4 virüs enfeksiyonlu iki fare modelindeki bulgulara dayanarak rDEN4 $\Delta$ 30-4995, rDEN4 $\Delta$ 30-8092 ve rDEN4 $\Delta$ 30-10634 virüslerinin her biri, daha önceden tarif edilen DEN4 enfeksiyonlu rhesus

5 maymunu modelinde değerlendirildi (Durbin ve arkadaşları 2001 Am. J. Trop. Med. Hyg. 65:405-413). Kısacası dört (rDEN4 $\Delta$ 30-4995, rDEN4 $\Delta$ 30-8092 ve rDEN4 $\Delta$ 30-10634) veya iki (rDEN4, rDEN4 $\Delta$ 30, yapay) maymundan oluşan gruplara, subkütan yolla  $5.0 \log_{10}$ PFU virüs aşılandı. Maymunlar, günlük olarak gözlemlendi ve serum, 0 ila 6,

10 8, 10 ve 12nci günlerde toplandı ve virüs titerleri, viremi ölçümü için Vero hücrelerinde plak deneyi ile belirlendi. 28inci gün serum çekildi ve nötralize edici antikor seviyesi, daha önce tarif edildiği gibi Vero hücrelerinde plak azaltma deneyi ile test edildi (Durbin ve arkadaşları 2001 Am. J. Trop. Med. Hyg. 65:405-413).

15 Bütün maymunlarda enfeksiyondan 1 gün sonra başlayan ve 4üncü gün itibariyle biten viremi saptandı (Tablo 7, Şekil 3). Viremi, rDEN4, rDEN4 $\Delta$ 30 veya rDEN4 $\Delta$ 30-10634 virüsü enfekte olmuş her bir maymunda mevcuttu ancak 4 maymundan rDEN4 $\Delta$ 30-4995 veya rDEN4 $\Delta$ 30-8092 virüsü ile enfekte olmuş sadece 2'sinde saptanabilir

20 viremi vardı. Beklendiği gibi rDEN4 virüsü ile enfeksiyon, maymun başına en yüksek ortalama viremik gün adedine (3.0 gün) ve aynı zamanda ortalama zirve virüs titerine ( $2.2 \log_{10}$ PFU/ml) neden oldu.

rDEN4 $\Delta$ 30 virüsü ile enfekte olmuş maymunlar, rDEN4 virüsüne kıyasla hem maymun başına daha düşük ortalama viremik gün adedine (2.0 gün) hem de ortalama zirve virüs titerine ( $1.1 \log_{10}$ PFU/ml) sahipti. Modifiye edilmiş rDEN4 $\Delta$ 30 virüslerinin her biri ile enfekte olmuş maymunların grupları, rDEN4 $\Delta$ 30 virüsüne kıyasla en düşük değere, 0.5 güne, 4 kat azalmaya sahip rDEN4 $\Delta$ 30-8092 virüsü ile aşılananlarla daha kısıtlı bir ortalama viremik gün adedine sahipti. rDEN4 $\Delta$ 30-4995 ( $0.9 \log_{10}$ PFU/ml) veya rDEN4 $\Delta$ 30-8092 ( $0.7 \log_{10}$ PFU/ml) ile enfekte olmuş maymunların ortalama zirve virüs titeri de rDEN4 $\Delta$ 30 virüsü ile enfekte olmuş olanlardan düşüktü. Bununla birlikte rDEN4 $\Delta$ 30-10634 ( $1.3 \log_{10}$ PFU/ml) ile enfekte olmuş maymunların ortalama zirve virüs titeri, özellikle 2nci gün rDEN4 $\Delta$ 30 ile enfekte olmuş olanlardan biraz daha yüksekti (Şekil 3).

Tablo 7. rDEN4 $\Delta$ 30'a nokta mutasyonları ilavesi, rhesus maymunları için virüsü daha da hafifletir

| Virüs <sup>a</sup>      | Maymun adedi | Viremili maymun adedi | Maymun başına ortalama viremik gün adedi <sup>b</sup> | Ortalama zirve virüs titeri ( $\log_{10}$ PFU/ml $\pm$ SE) | Geometrik ortalama serum nötralize edici antikor titeri (karşılıklı seyreltme) |        |
|-------------------------|--------------|-----------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|--------|
|                         |              |                       |                                                       |                                                            | Gün 0                                                                          | Gün 28 |
| Yapay                   | 2            | 0                     | 0                                                     | <0.7                                                       | <10                                                                            | <10    |
| rDEN4                   | 2            | 2                     | 3.0                                                   | $2.2 \pm 0.6$                                              | <10                                                                            | 398    |
| rDEN4 $\Delta$ 30       | 2            | 2                     | 2.0                                                   | $1.1 \pm 0.4$                                              | <10                                                                            | 181    |
| rDEN4 $\Delta$ 30-4995  | 4            | 2                     | 0.8                                                   | $0.9 \pm 0.2$                                              | <10                                                                            | 78     |
| rDEN4 $\Delta$ 30-8092  | 4            | 2                     | 0.5                                                   | $0.7 \pm 0.1$                                              | <10                                                                            | 61     |
| rDEN4 $\Delta$ 30-10634 | 4            | 4                     | 1.3                                                   | $1.3 \pm 0.2$                                              | <10                                                                            | 107    |

<sup>a</sup> Rhesus maymunlarının gruplarına, subkütan yolla 1 ml'lik bir dozda belirtilen virüsten  $10^5$  PFU aşılandı. Serum, 0 ila 6, 8, 10, 12 ve 28inci günlerde toplandı. Virüs titeri, Vero hücrelerinde plak deneyiyle belirlendi. <sup>b</sup> Viremi, 4üncü günden sonra hiçbir maymunda saptanmadı.

0 ve 28inci günde toplanan serum, rDEN4'e karşı nötralize edici antikor seviyesi bakımından test edildi. Beklendiği gibi 0ıncı gün DEN4'e karşı saptanabilir hiçbir nötralize edici antikor bulunmadı

5 çünkü maymunlar ön taramaya tabi tutularak flavivirüslere karşı nötralize edici antikorlar bakımından negatif oldukları bulundu (Tablo 7). 28inci gün rDEN4 ile enfekte olmuş maymunların ortalama serum nötralize edici antikor titeri (karşılıklı seyreltme), rDEN4 $\Delta$ 30 virüsü (1:181) ile enfekte olmuş maymunlardan yaklaşık iki kat yüksek olan

10 398 idi. Bu sonuç ve rDEN4 virüsüyle enfekte olmuş maymunlarda iki kat daha yüksek viremi seviyesi, daha önceden elde edilen sonuçlara benzerdir (Durbin ve arkadaşları 2001 Am. J. Trop. Med. Hyg. 65:405-413). rDEN4 $\Delta$ 30-4995(1:78), rDEN4 $\Delta$ 30-8092 (1:61) ve rDEN4 $\Delta$ 30-10634 (1:107) virüslerinin her biri ile enfekte olmuş

15 maymunlar, rDEN4 $\Delta$ 30 virüsü ile enfekte olmuş maymunlara kıyasla düşmüş ortalama serum nötralize edici antikor titerine sahipti. Saptanabilir viremi olmayan dört maymun, serum nötralize edici antikor titerlerine sahipti; bu, bunların gerçekten enfekte olduğunu gösterir. rDEN4 $\Delta$ 30 virüsüne kıyasla rDEN4 $\Delta$ 30-10634 virüsünün

20 ortalama zirve virüs titerinde hafif bir artış olmasına rağmen rDEN4 $\Delta$ 30-10634 virüsü, rDEN4 $\Delta$ 30 virüsü ile enfekte olmuş maymunlara kıyasla daha düşük bir ortalama serum nötralize edici antikor titerine sahipti. Maymun başına bu ve daha düşük ortalama viremik gün adedi, 10634 mutasyonunun, maymunlarda rDEN4 $\Delta$ 30



virüsünün replikasyonunu hafifletebileceğini gösterir.

Aşılamadan sonraki 28inci gün bütün maymunlar, subkütan yolla  $5.0 \log_{10}$ PFU doğal tipte rDEN4 virüsü ile savaştırıldı. Maymunlar, günlük olarak gözlendi ve serum, 28 ila 34, 36 ve 38inci günlerde toplandı ve virüs titerleri, savaş sonrası viremi ölçümü için Vero hücrelerinde plak deneyi ile belirlendi. rDEN4 virüs savaşından yirmi sekiz gün sonra serum çekildi ve nötralize edici antikor seviyesi, Vero hücrelerinde plak azaltma deneyi ile test edildi. Yapay aşılانmış maymunlar, savaş sonrasında 3.5 ortalama viremik gün adediyle  $2.3 \log_{10}$ PFU/ml'lik bir ortalama zirve virüs titerine sahipti (Tablo 8). Bununla birlikte rDEN4, rDEN4 $\Delta$ 30 veya modifiye edilmiş rDEN4 $\Delta$ 30 virüslerinin her biri aşılانmış maymunlar, saptanabilir viremi göstermedi; bu da, rDEN4 $\Delta$ 30-4995, rDEN4 $\Delta$ 30-8092 ve rDEN4 $\Delta$ 30-10634 virüslerinin replikasyonunun ve immünogenisitesinin azalmasına rağmen her birinin, doğal tipte rDEN4'e karşı koruma indüklemeye yeterince immünojenik olduğunu işaret eder. Ortalama nötralize edici antikor titerindeki artışlar, yapay enfekte edilmiş olanlar hariç bütün aşılama gruplarında savaş sonrasında minimumdu (<3 kat) (maymunların, savaştan korunduğuna daha fazla kanıt sağlar).

Tablo 8. İlave nokta mutasyonları içeren rDEN4 $\Delta$ 30, rhesus maymunlarını wt DEN4 virüs savaşından korur

| Virüs <sup>a</sup> | Maymun<br>adedi | rDEN4<br>savaşından sonra<br>maymun başına<br>ortalama viremik<br>gün adedi | Ortalama zirve<br>virüs titeri<br>(log <sub>10</sub> PFU/ml<br>±SE) | Geometrik ortalama<br>serum nötralize edici<br>antikor titeri (karşılıklı<br>seyreltme) |        |
|--------------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------|
|                    |                 |                                                                             |                                                                     | Gün 28                                                                                  | Gün 56 |
| Yapay              | 2               | 3.5                                                                         | 2.3 ± 0.1                                                           | <10                                                                                     | 358    |
| rDEN4              | 2               | 0.0                                                                         | <0.7                                                                | 398                                                                                     | 753    |
| rDEN4Δ30           | 2               | 0.0                                                                         | <0.7                                                                | 181                                                                                     | 202    |
| rDEN4Δ30-4995      | 4               | 0.0                                                                         | <0.7                                                                | 78                                                                                      | 170    |
| rDEN4Δ30-8092      | 4               | 0.0                                                                         | <0.7                                                                | 61                                                                                      | 131    |
| rDEN4Δ30-10634     | 4               | 0.0                                                                         | <0.7                                                                | 107                                                                                     | 177    |

<sup>a</sup> belirtilen virüslerle birincil aşılama 28 gün sonra rhesus maymunları, subkütan yolla 1 ml'lik bir dozda 10<sup>5</sup> PFU rDEN4 virüsü ile savaştırıldı. Serum, 28 ila 34, 36, 38 ve 56ncı günlerde toplandı. Virüs titeri, Vero hücrelerinde plak deneyi ile belirlendi.

Birlikte alındığında bu sonuçlar, yukarıda tarif edilen üç nokta mutasyonunun (4995, 8092 ve 10634), emzirme döneminde olan fare beyninde, SCID-HuH-7 farelerinde ve rhesus maymunlarında

5 rDEN4Δ30 aşı adayını daha da hafiflettiğini gösterir. Modifiye edilmiş her bir rDEN4Δ30 virüsünde mevcut ilave tesadüfi mutasyonlardan (Tablo 4) dolayı fenotipler, direkt olarak ayrı ayrı 4995, 8092 ve 10634 nokta mutasyonlarına atfedilemez. Bununla birlikte bu üç mutasyondan birini taşıyan diğer rDEN4 virüslerinde benzer fare

10 hafifletme fenotiplerinin varlığı, 4995, 8092 ve 10634 nokta mutasyonlarının, modifiye edilmiş rDEN4Δ30 virüslerinin att fenotiplerinden sorumlu olduğu görüşünü destekler. rDEN4Δ30-4995,

rDEN4 $\Delta$ 30-8092 ve rDEN4 $\Delta$ 30-10634 virüsü, rhesus maymunlarında düşük replikasyon gösterirken koruyucu immünite kazandırmaya yeterli immünogenisiteyi muhafaza ettiğinden bu virüsler, insanlar için dang aşılı olarak tasarlanır.

- 5 Daha sonra hem  $\Delta$ 30 hem de yük-alanin mutasyonları taşıyan DEN4 virüsleri oluşturuldu. Yukarıda tarif edilen yük-alanin mutasyonlarının yedi grubunun bir alt grubu, SCID-HuH-7 farelerinde replikasyonda 10 kat ila 1000 kat arasında azalma sağlayan ve mutasyon geçirmemiş sekansı, dört dang serotipi boyunca iyi konserve olan grup olarak
- 10 tanımlandı. Bu mutasyonlar, bilindik klonlama teknikleri kullanılarak tekli çiftler ve çiftlerden oluşan ikili takımlar halinde rDEN4 $\Delta$ 30'a dahil edildi. Virüsün transkripsiyonu ve geri kazanılması ve virüslerin terminal seyreltmesi, yukarıda tarif edildiği gibi gerçekleştirildi. Vero ve HuH-7 hücrelerinde yüklü küme-alanin mutant virüslerinin sıcaklık
- 15 hassasiyet seviyesi, emzirme döneminde olan farelerin beynindeki replikasyon seviyesi ve SCID-HuH-7 farelerindeki replikasyon seviyesine yönelik deney, yukarıda tarif edildiği gibi gerçekleştirildi.
- Bir çift yük-alanin mutasyonunun rDEN4'e dahil edilmesi sonucu, her durumda geri kazanılabilir virüs oluştu (Tablo 9). İki çift yük-alanin
- 20 mutasyonunun dahil edilmesi sonucu, üç vakadan ikisinde geri kazanılabilir virüs oluştu (rDEN4 $\Delta$ 30-436-437-808-809 geri kazanılamadı).

rDEN4 $\Delta$ 30, Vero ve HuH-7 hücrelerinde ts değildir. Buna karşılık bu örnekte kullanılan yük-alanin mutasyonlarının yedi grubundan yedisi,

- 25 HuH-7 hücrelerine bir ts fenotipi kazandırdı ve beşi de, Vero hücrelerine bir ts fenotipi kazandırdı. Hem  $\Delta$ 30 hem de yük-alanin mutasyonları taşıyan altı virüsün tamamı, hem Vero hem de HuH-7

hücrelerinde bir ts fenotipi gösterdi (Tablo 9). rDEN4 $\Delta$ 30, emzirme dönemindeki fare beyninde hafiflemezken yük-alanin mutasyonlarının yedi grubundan beşi, emzirme dönemindeki fare beynine bir att fenotipi kazandırdı (Tablo 10). Hem  $\Delta$ 30 hem de yük-alanin mutasyonları taşıyan virüslerin dördü, emzirme dönemindeki fare beyninde hafifledi (Tablo 10). Bir vakada (rDEN4 $\Delta$ 30-23-24-396-397), tek başına hafifletmeyen iki mutasyondan oluşan kombinasyon, hafifletilmiş bir virüs oluşturdu. Genellikle hem  $\Delta$ 30 hem de yük-alanin mutasyonları taşıyan virüsler, emzirme dönemindeki fare beyninde, yük-alanin mutantlı ana virüslerine, rDEN4 $\Delta$ 30'dan daha benzer replikasyon seviyeleri gösterdi.

Bu örnekte kullanılan yedi yük-alanin mutant virüslerinin altısında olduğu gibi SCID-HuH-7 farelerinde de rDEN4 $\Delta$ 30 hafifletilir. Hem  $\Delta$ 30 hem de yük-alanin mutasyonları taşıyan virüsler, SCID-HuH-7 farelerinde, yük-alanin mutantlı ana virüslerine kıyasla benzer veya biraz daha düşük replikasyon seviyeleri gösterme eğilimindeydi (Tablo 10). Uç vakada, hem  $\Delta$ 30 hem de yük-alanin mutasyonları taşıyan virüsler, SCID-HuH-7 farelerinde, rDEN4 $\Delta$ 30'dan en az beş kat daha fazla bir azalma gösterdi.

Vero hücrelerinde 35°C'de  $>10^5$ PFU/ml'ye kadar replike olan ve SCID-HuH-7 farelerinde replikasyonda yüz kat veya daha fazla bir azalma gösteren beş virüsün (rDEN4-200-201, rDEN4 $\Delta$ 30-200-201, rDEN4-436-437 [klon 1 ], rDEN4 $\Delta$ 30-436-437 ve rDEN4-23-24-200-201) tam genomik sekansı belirlendi (Tablo 11). Beşin her biri, bir veya daha fazla tesadüfi mutasyon içeriyordu. rDEN4 $\Delta$ 30-436-437 gibi bir virüste, ilave bir mutasyon daha önceden Vero hücre adaptasyonu ile ilişkilendirilmişti (Blaney, J.E. Jr. Ve arkadaşları 2002

Virology 300:125-139). Geriye kalan virüslerin her biri, fenotipik etkisi bilinmeyen en az bir tesadüfi mutasyon içeriyordu. Sonuç olarak tarif edilen fenotipler, direkt olarak yük-alanın mutasyonlarına atfedilemez. Bununla birlikte aynı yük-alanın mutasyonlarını taşıyan

5 rDEN4 ve rDEN4 $\Delta$ 30 virüslerinin, benzer fenotipleri paylaştığı gerçeği, yük-alanın mutasyonlarının, rDEN4 $\Delta$ 30'un hafiflemesini arttırma kabiliyetine kuvvetli destek sağlar. rDEN4-436-437 [klon 1], 4 tesadüfi mutasyon içerdiğinden bu virüsün ikinci bir klonu hazırlandı. rDEN4-436-437 [klon2], sadece bir tesadüfi mutasyon

10 içeriyordu (Tablo 11) ve hücre kültüründe ve SCID-HuH-7 farelerinde rDEN4-436-437 ile aynı fenotipleri gösterdi.

rDEN4-436-437 [klon 2], aşağıda tarif edilen rhesus maymunu çalışmasında kullanıldı.

Tablo 9. rDEN4 $\Delta$ 30'a yük-alanın mutasyonlarının katılması, hem Vero hem de HuH-7 hücrelerine bir ts fenotipi kazandırır

| Virüs                     | b'ye dönüşen AA | Değişmiş nt adedi | Belirtilen sıcaklıkta (°C) ortalama virüs titeri (log <sub>10</sub> PFU/ml) <sup>a</sup> |     |     |      |            |       |     |     |      |          |
|---------------------------|-----------------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|------|------------|-------|-----|-----|------|----------|
|                           |                 |                   | Vero                                                                                     |     |     |      |            | HuH-7 |     |     |      |          |
|                           |                 |                   | 35                                                                                       | 37  | 38  | 39   | $\Delta^c$ | 35    | 37  | 38  | 39   | $\Delta$ |
| rDEN4                     | Yok             | 0                 | 7.4                                                                                      | 7.1 | 7.7 | 7.2  | 0.2        | 7.7   | 7.5 | 7.5 | 7.4  | 0.3      |
| rDEN4 $\Delta$ 30         | Yok             | 30                | 6.6                                                                                      | 6.6 | 6.5 | 6.5  | 0.1        | 7.4   | 6.9 | 7.0 | 6.4  | 1.0      |
| rDEN4-23-24               | KE              | 3                 | 6.7                                                                                      | 6.6 | 6.0 | 6.5  | 0.2        | 7.1   | 7.3 | 5.6 | <1.7 | >5.4     |
| rDEN4 $\Delta$ 30-23-24   |                 |                   | 6.1                                                                                      | 5.5 | 4.9 | <1.7 | 4.4        | 6.5   | 5.9 | 4.7 | <1.7 | >4.2     |
| rDEN4-200-201             | KH              | 4                 | 5.3                                                                                      | 4.8 | 4.8 | 4.3  | 1.0        | 5.7   | 5.4 | 2.7 | <1.7 | >4.0     |
| rDEN4 $\Delta$ 30-200-201 |                 |                   | 6.0                                                                                      | 5.3 | 5.6 | <1.7 | >4.3       | 5.8   | 5.0 | 5.9 | <1.7 | >4.1     |

|                         |        |   |     |     |      |      |      |  |     |      |      |      |      |
|-------------------------|--------|---|-----|-----|------|------|------|--|-----|------|------|------|------|
| rDEN4-436-437           | DK     | 4 | 5.2 | 4.2 | 3.4  | 1.9  | 3.3  |  | 5.9 | 4.9  | 3.2  | <1.7 | >4.2 |
| rDEN4Δ30-436-437 [klon] |        |   | 6.3 | 5.7 | 5.5  | <1.7 | >4.6 |  | 6.5 | 5.7  | 5.1  | <1.7 | >4.8 |
| rDEN4-808-809           | ED     | 3 | 4.6 | 4.1 | <1.7 | <1.7 | >2.9 |  | 5.2 | <1.7 | <1.7 | <1.7 | >3.5 |
| rDEN4Δ30-808-809        |        |   | 5.6 | 4.9 | 4.9  | <1.7 | >3.9 |  | 5.9 | 4.8  | 5.1  | <1.7 | >4.2 |
| rDEN4-23-24-200-201     | KE, KH | 7 | 6.0 | 5.2 | 4.2  | <1.7 | >4.3 |  | 6.9 | 6.3  | <1.7 | <1.7 | >5.2 |
| rDEN4Δ30-23-24-200-201  |        |   | 4.5 | 4.2 | 4.8  | <1.7 | >2.8 |  | 4.9 | 4.5  | 2.9  | <1.7 | >3.2 |
| rDEN4-23-24-396-397     | KE, RE | 7 | 6.5 | 5.8 | 5.5  | <1.7 | >4.8 |  | 7.1 | 5.9  | 5.4  | <1.7 | >5.4 |
| rDEN4Δ30-23-24-396-397  |        |   | 6.1 | 5.2 | 4.8  | <1.7 | >4.4 |  | 6.9 | 5.4  | 4.9  | <1.7 | >5.2 |
| rDEN-436-437-808-809    | DK, ED | 7 | 4.9 | 4.9 | 5.1  | <1.7 | >3.2 |  | 5.5 | 3.2  | <1.7 | <1.7 | >3.8 |

<sup>a</sup> Altı çizili değerler, serbest sıcaklık (35°C) ile kıyaslandığında belirtilen sıcaklıkta ayrı ayrı Vero veya HuH-7 hücrelerinde titer bakımından 2.5 veya 3.5 log<sub>10</sub>PFU/ml'lik bir azalmayı gösterir.

<sup>b</sup> Ala tortularından oluşan çifte dönüşen Amino asit çift(ler)i.

<sup>c</sup> Serbest sıcaklığa (35°C) kıyasla titerde (log<sub>10</sub>pfu/ml) azalma.

Tablo 10. Yük-alanın mutasyonlarının katılması, emzirme döneminde olan farelerde rDEN4Δ30'u hafifletir ve SCID-HuH-7 farelerinde hafiflemeyi arttırır

| Virüs                        | Emzirme dönemindeki farelerde replikasyon <sup>a</sup> |                                                         |                                           | SCID-HuH-7 farelerinde replikasyon <sup>c</sup> |                                                           |                                           |
|------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
|                              | n                                                      | Ortalama virüs titeri±SE (log <sub>10</sub> PFU/g beyin | Wt'den ortalama log azalması <sup>b</sup> | n                                               | Ortalama virüs titeri±SE (log <sub>10</sub> PFU/ml serum) | Wt'den ortalama log azalması <sup>d</sup> |
| rDEN4                        | 18                                                     | 6.2 ± 0.4                                               | --                                        | 33                                              | 5.4 ± 0.3                                                 | --                                        |
| rDEN4Δ30                     | 12                                                     | 5.9±0.8                                                 | 0.2                                       | 8                                               | 3.4 ± 0.3                                                 | 2.3                                       |
| rDEN4-23-24                  | 18                                                     | 4.7 ±0.1                                                | 1.6                                       | 19                                              | 4.7 ± 0.5                                                 | 1.3                                       |
| rDEN4Δ30-23-24               | 6                                                      | 5.6 ±0.3                                                | 0.7                                       | 7                                               | 4.6 ± 0.4                                                 | 1.5                                       |
| rDEN4-200-201                | 12                                                     | 5.5 ± 0.5                                               | 0.6                                       | 12                                              | 3.7 ± 0.2                                                 | 2.6                                       |
| rDEN4Δ30-200-201             | 6                                                      | 5.5 ±0.6                                                | 0.1                                       | 4                                               | 3.3 ± 0.6                                                 | 1.8                                       |
| rDEN4-436-437                | 18                                                     | 2.7 ± 0.4                                               | 3.5                                       | 10                                              | 2.9 ± 0.7                                                 | 2.5                                       |
| rDEN4Δ30-436-437<br>[klon 1] | 6                                                      | 2.9 ±0.3                                                | 3.4                                       | 4                                               | 2.3 ± 0.4                                                 | 2.8                                       |
| rDEN4-808-809                | 6                                                      | 1.8 ±0.1                                                | 3.1                                       | 8                                               | 3.2 ± 0.4                                                 | 3.0                                       |
| rDEN4Δ30-808-809             | 12                                                     | 3.9 ±0.7                                                | 2.1                                       | 4                                               | 3.7 ± 0.6                                                 | 2.4                                       |
| rDEN4-23-24-200-201          | 12                                                     | 5.3 ± 0.5                                               | 0.7                                       | 13                                              | 3.4 ± 0.1                                                 | 2.9                                       |
| rDEN4Δ30-23-24-200-201       | 6                                                      | 3.0 ±0.2                                                | 2.6                                       | 5                                               | 1.8 ± 0.1                                                 | 3.3                                       |
| rDEN4-23-24-396-397          | 12                                                     | 4.6 ±0.9                                                | 1.5                                       | 8                                               | 3.6 ± 0.3                                                 | 2.3                                       |
| rDEN4Δ30-23-24-396-397       | 6                                                      | 3.0 ±0.2                                                | 2.6                                       | 5                                               | 2.2 ± 0.3                                                 | 2.9                                       |
| rDEN4-436-437-808-809        | 6                                                      | < 1.7 ± 0.0                                             | 3.6                                       | 8                                               | 2.1 ± 0.3                                                 | 2.4                                       |



- <sup>a</sup> Emzirme dönemindeki altı fareden oluşan gruplara, i.c. yoluyla 30 µl'lik bir aşı içerisinde 10<sup>4</sup> PFU virüsü aşılandı. 5 gün sonra beyin çıkarıldı, homojenize edildi ve virüs, Vero hücrelerinde titrasyon yoluyla nicelendi.
- <sup>b</sup> Örnek virüs aşılanmış farelerdeki ortalama viral titerlerin ve eş zamanlı wt kontrollerinin (n=6) karşılaştırılması suretiyle belirlendi. Hafifletme (att) fenotipi, wt virüsüne kıyasla  $\geq 1.5 \log_{10}$  PFU/g'lik bir azalma olarak tanımlanır;  $\geq 1.5$ 'luk azalmalar, koyutulmuş olarak sıralanır.
- <sup>c</sup> SCID-HuH-7 farelerinden oluşan gruplara, direkt olarak tümöre 10<sup>4</sup> PFU virüsü aşılandı.
- <sup>d</sup> Örnek virüs ile aşılanmış farelerdeki ortalama viral titerler ve eş zamanlı wt kontrollerinin karşılaştırılması suretiyle belirlendi. Hafifletme fenotipi, wt virüsüne kıyasla  $\geq 1.5 \log_{10}$  PFU/g'lik bir azalma olarak tanımlanır;  $\geq 1.5$ 'lik azalmalar, koyutulmuş olarak sıralanır.

Tablo 11. Yük-alanın ve  $\Delta 30$  mutasyonu taşıyan rDEN4 virüsü türevlerinde mevcut missens ve UTR mutasyonları

| Virüs                      | Gen <sup>a, b</sup>            | Nükleotit pozisyonu                       | Nükleotit ikamesi                                      | Amino asit pozisyonu <sup>c</sup>   | Amino asit değişikliği <sup>b</sup>                          |
|----------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| rDEN4-200-201              | prM<br>NS4A<br>NS5             | 626<br>6659<br>8160-8165                  | A>T<br>C>T<br>AAACA>GCAGC                              | 61<br>93<br>200-201                 | Glu > Asp<br>Leu > Phe<br>LysHis>AlaAla                      |
| rDEN4 $\Delta 30$ -200-201 | NS3<br>NS5<br>NS5<br>3'UTR     | 4830<br>8106<br>8160-8165<br>10478-10507  | G>A<br>G>A<br>AAACA>GC<br>AGC<br>$\Delta 30$ delesyonu | 102<br>181<br>200-201<br>Yok        | Gly > Arg<br>Val > Ile<br>LysHis>AlaAla<br>Yok               |
| rDEN4-436-437<br>[klon 1]  | E<br>NS1<br>NS3*<br>NS5<br>NS5 | 2331<br>2845<br>4891<br>8869-8873<br>9659 | T>G<br>C>T<br>T>C<br>GACAA>GC<br>AGC<br>A>G            | 464<br>140<br>122<br>436-437<br>699 | Trp > Gly<br>Ser>Phe<br>Ile>Thr<br>AspLys>AlaAla<br>Lys> Arg |
| rDEN4-436-437              | NS4B                           | 7153                                      | T>C                                                    | 108                                 | Val>Ala                                                      |

|                     |                                     |                                    |                                            |                             |                                           |
|---------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------|
| [klon 2]            | NS5                                 | 8869-8873                          | GACAA>GC<br>AGC                            | 436-437                     | AspLys>AlaAla                             |
| rDEN4Δ30-436-437    | NS4B* NS5<br>3' UTR                 | 7163<br>8869-73<br>10478-10507     | A>C<br>GACAA>GC<br>AGC<br>Δ30<br>delesyonu | 111<br>436-437<br>Yok       | Leu>Phe<br>AspLys>AlaAla<br>Yok           |
| rDEN4-23-24-200-201 | NS3<br><b>NS5</b><br><br><b>NS5</b> | 6751<br>7629-7633<br><br>8160-8165 | A>C<br>AAAGA>GC<br>AGC<br>AAACA>GC<br>AGC  | 124<br>23-24<br><br>200-201 | Lys>Thr<br>LysGlu>AlaAla<br>LysHis>AlaAla |

<sup>a</sup> Asterisk, önceden tanımlanmış Vero hücre adaptasyonunu gösterir.

<sup>b</sup> Koyu değerler, adı geçen virüs içerisinde ortaya çıkması tasarlanan mutasyonları işaret eder.

<sup>c</sup> Adı geçen DEN4 geninin protein ürünü içerisindeki amino asit pozisyonu; numaralandırma, proteinin amino asit terminali ile başlar.

SCID-HuH7 fare modelindeki hafiflemeye dayanarak yük-alanın mutant virüslerinin dördü (rDEN4-200-201, rDEN4Δ30-200-201, rDEN4-436-437 [klon 2], rDEN4Δ30-436-437), yukarıda tarif edildiği gibi rhesus maymunlarında değerlendirildi. Hafifletici nokta mutasyonları taşıyan virüslerle ilgili çalışmaya uygun olarak enfeksiyondan sonraki 1inci gün viremi saptandı ve bütün maymunlarda 4üncü gün son buldu (Şekil 4, Tablo 12). Enfekte olmuş maymunların çoğunda viremi saptandı; rDEN4Δ30-200-201 ile enfekte olmuş dört maymunun sadece biri ve rDEN4Δ30-436-437 ile enfekte olmuş dört maymunun biri, saptanabilir viremi göstermedi. rDEN4 ile enfekte olmuş maymunlar, en yüksek ortalama virüs tüterini gösteri; ve her bir vakada Δ30 mutasyonu taşıyan virüsler,

maymun başına ana virüslerine göre ortalama zirve virüs titerinde yaklaşık olarak 0.5 log'luk bir azalma ve ortalama viremik gün adedinde 0.5 ila 2 günlük bir azalma gösterdi. Hem  $\Delta 30$  hem de yük-alanın mutasyonları taşıyan virüslerin enfekte olduğu maymunlar, rDEN4 $\Delta 30$  ile enfekte olmuş olanlara göre ortalama zirve viremide iki katlık bir azalma gösterdi. Bu, yük-alanın mutasyonları ilavesinin, rhesus maymunlarında rDEN4 $\Delta 30$ 'u daha da hafiflettiğini gösterir.

Beklendiği gibi, bu çalışmadaki maymunların hiçbiri, 0ıncı günde saptanabilir seviyelerde nötralize edici antikor göstermedi. 28inci günde, bir virüs ile enfekte olmuş her maymun, saptanabilir seviyelerde nötralize edici antikor gösterdi; bu da, maymunların tamamının, hatta saptanabilir viremi göstermeyenlerin bile gerçekten enfekte olmuş olduğunun işaretidir. Hafifletici nokta mutasyonları çalışmasında olduğu gibi, rDEN4 ile enfekte olmuş maymunlar, rDEN4 $\Delta 30$  ile enfekte olmuş olan maymunlarınkinin yaklaşık olarak iki katı olan bir ortalama serum nötralize edici antikor titerine (karşılıklı seyreltme) sahipti. rDEN4-200-201 ve rDEN4-436-437 [klon 2] ile enfekte olmuş maymunlar, rDEN4'e benzer ortalama nötralize edici antikor titerlerine sahipti ve rDEN4 $\Delta 30$ -200-201 ve rDEN4 $\Delta 30$ -436-437 ile enfekte olmuş olanlar, rDEN4'e benzer ortalama nötralize edici antikor titerlerine sahipti. Her bir vakada, bir virüse  $\Delta 30$  mutasyonu ilave edilmesi, nötralize edici antikorda iki katlık bir azalmaya neden oldu. Bu nedenle rDEN4 $\Delta 30$ 'a yük-alanın mutasyonlarının ilave edilmesinin, ortalama zirve viremiyi, tek başına rDEN4 $\Delta 30$ 'ünün altına düşürmesine rağmen bu, nötralize edici antikor seviyelerini etkilemedi.

Tablo 12. Çift halde yük-alanın mutasyonlarının rDEN4Δ30'a ilave edilmesi, rhesus maymunlarında virüsü daha da hafifletir

| Virüs <sup>a</sup>                                                                                                                                                                                                                                     | Maymun adedi | Viremili maymun adedi | Maymun başına ortalama viremik gün adedi <sup>b</sup> | Ortalama zirve virüs titeri (log <sub>10</sub> PFU/ml ± SE) | Geometrik ortalama serum nötralize edici antikor titeri (karşılıklı seyreltme) |        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|--------|
|                                                                                                                                                                                                                                                        |              |                       |                                                       |                                                             | Gün 0                                                                          | Gün 28 |
| Yapay                                                                                                                                                                                                                                                  | 2            | 0                     | 0                                                     | <0.7                                                        | <5                                                                             | <5     |
| rDEN4                                                                                                                                                                                                                                                  | 2            | 2                     | 2.5                                                   | 2.6 ± 0.3                                                   | <5                                                                             | 276    |
| rDEN4Δ30                                                                                                                                                                                                                                               | 2            | 2                     | 2.0                                                   | 2.1 ± 0.1                                                   | <5                                                                             | 131    |
| rDEN4-200,201                                                                                                                                                                                                                                          | 4            | 4                     | 2.3                                                   | 1.8 ± 0.3                                                   | <5                                                                             | 212    |
| rDEN4Δ30-200,201                                                                                                                                                                                                                                       | 4            | 3                     | 1.5                                                   | 1.3 ± 0.2                                                   | <5                                                                             | 139    |
| rDEN4-436,437[cl2)                                                                                                                                                                                                                                     | 4            | 4                     | 3.3                                                   | 1.8 ± 0.2                                                   | <5                                                                             | 273    |
| rDEN4Δ30-436,437                                                                                                                                                                                                                                       | 4            | 3                     | 1.3                                                   | 1.0 ± 0.0                                                   | <5                                                                             | 143    |
| <sup>a</sup> Rhesus maymunlarından oluşan gruplara, 1 ml'lik bir dozda belirtilen virüsten 10 <sup>5</sup> PFU subkütan yolla aşılandı. Serum, 0 ila 6, 8, 10 ve 28inci günlerde toplandı. Virüs titeri, Vero hücrelerinde plak deneyi ile belirlendi. |              |                       |                                                       |                                                             |                                                                                |        |
| <sup>b</sup> Viremi, 4üncü günden sonra hiçbir maymunda saptanmadı.                                                                                                                                                                                    |              |                       |                                                       |                                                             |                                                                                |        |

28inci gün rDEN4 ile savaş sonrasında yapay enfekte edilmiş maymunların ortalama zirve virüs titeri 1.5 log<sub>10</sub>PFU/ml ve ortalama viremik gün adedi 3.0 idi (Tablo 13). Bununla birlikte daha önceden rDEN4, rDEN4Δ30 veya yük-alanın mutantlı virüsler ile aşılanmış maymunlar, saptanabilir viremi gösterdi. Ek olarak maymunların hiçbirisi, serum nötralize edici antikor titerinde dört kattan daha fazla

bir artış göstermedi. Bu veriler birlikte, hem  $\Delta 30$  hem de yük-alanın mutasyonları taşıyanlar dahil olmak üzere virüslerin herhangi biriyle enfeksiyonun, rhesus maymunlarını, rDEN4 başkaldırısından koruduğunu gösterir.

Tablo 13. Yük-alanın mutasyonları içeren rDEN4 $\Delta 30$ , rhesus maymunlarını, wt DEN4 virüsü başkaldırısından korur

| Virüs <sup>a</sup>             | Maymun<br>adedi | rDEN4<br>başkaldırısın<br>dan sonra<br>maymun<br>başına<br>ortalama<br>viremik gün<br>adedi | Ortalama zirve<br>virüs titeri<br>(log <sub>10</sub> PFU/ml<br>± SE) | Geometrik ortalama serum<br>nötralize edici antikor titeri<br>(karşılıklı seyreltme) |        |
|--------------------------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------|
|                                |                 |                                                                                             |                                                                      | Gün 28                                                                               | Gün 56 |
| Yapay                          | 2               | 3.0                                                                                         | 1.5 ± 0.7                                                            | <5                                                                                   | 284    |
| rDEN4                          | 2               | 0.0                                                                                         | <0.7                                                                 | 276                                                                                  | 316    |
| rDEN4 $\Delta 30$              | 2               | 0.0                                                                                         | <0.7                                                                 | 131                                                                                  | 96     |
| rDEN4-200,201                  | 4               | 0.0                                                                                         | <0.7                                                                 | 212                                                                                  | 356    |
| rDEN4 $\Delta 30$ -<br>200,201 | 4               | 0.0                                                                                         | <0.7                                                                 | 139                                                                                  | 132    |
| rDEN4-436,437<br>[cl 2]        | 4               | 0.0                                                                                         | <0.7                                                                 | 273                                                                                  | 401    |
| rDEN4 $\Delta 30$ -<br>436,437 | 4               | 0.0                                                                                         | <0.7                                                                 | 143                                                                                  | 182    |

<sup>a</sup> Belirtilen virüsler ile ilk aşılama 28 gün sonra rhesus maymunları, 1 ml'lik bir dozda subkütan yolla 10<sup>5</sup> PFU rDEN4 virüsü başkaldırısına maruz kaldı. Serum, 28 ila 34, 36, 10 ve 56ncı günlerde toplandı. Virüs titeri, Vero hücrelerinde plak deneyi ile belirlendi.

Yük-alanın mutasyonlarının rDEN4 $\Delta$ 30'a ilavesi, hem Vero hem de HuH-7 hücrelerine bir ts fenotip aralığı ve emzirme döneminde olan fare beynine att fenotipleri kazandırabilir ve SCID-HuH-7 farelerinde hafiflemeyi arttırabilir veya aynı seviyede bırakabilir. En önemlisi bu mutasyonların katılması, nötralize edici antikor titerini veya koruyucu etkinliği azaltmadan rhesus maymunlarında rDEN4 $\Delta$ 30'un ürettiği viremiyi azaltabilir. Bu nedenle bu mutasyonların rDEN4 $\Delta$ 30'a ilave edilmesinin, insanlarda hafiflemeyi arttırması tasarlanır. Aynı zamanda mutasyonların, genel hafifleme seviyesini değiştirmeyecek ancak hafifletme fenotipini stabilize edecek şekilde ilave edilmesi de tasarlanır çünkü bunlar,  $\Delta$ 30 mutasyonu olmadan bile kendi başlarına bağımsız bir şekilde hafifleticidirler. Yük-alanın mutasyonları özellikle faydalıdır çünkü bunlar, yapısal gen bölgelerinin dışında gerçekleşir ve bu nedenle de yapısal gen kimerik virüslerini hafifletmek için kullanılabilir. Ayrıca bunlar, doğal tipte sekansa geri dönme ihtimallerini azaltan en az üç nükleotit değişikliği de içerirler.

Vero hücreleri doku kültüründe rDEN4 replikasyonunu arttıran bir dizi nokta mutasyonu tanımlanmıştır; bunlar birincil olarak NS4B geni içerisinde konumlanır (Blaney, J. E. ve arkadaşları 2002 Virology 300:125-139; Blaney, J. E. ve arkadaşları 2001 J Virol 75:9731-9740).

Vero hücre adaptasyon mutasyonları, bir aşı adayına arzu edilebilir ili özellik kazandırır. İlk olarak bunlar, aşı üretimi için amaçlanan substrat olan Vero hücrelerinde virüs verimini arttırırlar ve böylelikle aşı üretimini maliyet bakımından daha tasarruflu hale getirirler. İkinci olarak bu Vero adaptasyon mutasyonlarının her birinin nokta mutasyonları olmasına rağmen bunlar muhtemelen aşı üretimi sırasında son derece stabildir, çünkü bunlar, Vero hücrelerine bir

seçim avantajı verirler. 7129 pozisyonunda en az bir Vero hücresi adaptasyonunun, rDEN4'ün sivrisinek enfektivitesini azalttığı da gösterildi; zayıf sivrisinek enfektivitesi, bir dang aşı adayının başka bir arzu edilebilir karakteristiğidir. Bu bulgunun genelliğini araştırmak için biz, geriye kalan Vero hücre adaptasyon mutasyonlarının, rDEN4'ün, enfeksiyöz bir kan unu üzerinde beslenen *Aedes aegypti* sivrisineklerini enfekte etme kabiliyeti üzerindeki etkisini test ettik. Tablo 14, tek bir Vero hücre adaptasyon mutasyonu taşıyan her bir virüsün yüksek titerde enfektivitesini gösterir. Bunlardan, 7182 pozisyonundaki sadece bir mutasyon, sivrisinek enfektivitesindeki büyük bir azalma ile ilişkilendirildi. Bu nedenle 7182, Vero hücrelerinde ve sivrisineklerde replikasyon üzerinde karşı etkilere sahip olduğundan bir rDEN4 aşı adayında yer almak için özellikle değerli bir mutasyon olabilir.

Tablo 14. Vero hücre adaptasyon mutasyonlarının rDEN4 sivrisinek enfektivitesi üzerindeki etkisi

| Virüs                                                                                                                                       | Aedes aegypti (oral enfeksiyon)          |                   |                              |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------|------------------------------|------|
|                                                                                                                                             | Doz <sup>a</sup> (log <sub>10</sub> pfu) | Test edilen adedi | % enfekte olmuş <sup>b</sup> |      |
|                                                                                                                                             |                                          |                   | Orta barsak                  | Kafa |
| rDEN4                                                                                                                                       | 4.3                                      | 27                | 70                           | 25   |
| rDEN4-4891                                                                                                                                  | 4.4                                      | 23                | 74                           | 13   |
| rDEN4-4995                                                                                                                                  | 4.8                                      | 20                | 80                           | 50   |
| rDEN4-7153                                                                                                                                  | 4.8                                      | 20                | 80                           | 30   |
| rDEN4-7546                                                                                                                                  | 4.6                                      | 20                | 55                           | 10   |
| rDEN4-7162                                                                                                                                  | 5.0                                      | 20                | 55                           | 25   |
| rDEN4-7163                                                                                                                                  | 4.9                                      | 15                | 73                           | 72   |
| rDEN4-7182                                                                                                                                  | 5.0                                      | 20                | 20                           | 0    |
| rDEN4-7630                                                                                                                                  | 4.3                                      | 10                | 70                           | 10   |
| <sup>a</sup> Virüs titeri, 2µl'lik bir kan unu varsayılarak alındı.                                                                         |                                          |                   |                              |      |
| <sup>b</sup> Oral enfeksiyondan 21 gün sonra hazırlanan orta barsak veya kafa dokusunda IFA saptanabilir antijenli sivrisineklerin yüzdesi. |                                          |                   |                              |      |

## KARŞILAŞTIRMALI ÖRNEK 2

### **$\Delta 30$ Mutasyonunu İhtiva Eden bir Rekombinant DEN1 Virüsünün Oluşturulması ve Karakterizasyonu**

Bir ilk olarak  $\Delta 30$  mutasyonunun, DEN4 serotipi dışında doğal tipte bir DEN virüsünü tatminkar bir şekilde hafifletebilip hafifletemediğini belirlemeye çalıştık. Bunu yapmak için  $\Delta 30$  mutasyonu, DEN1'in cDNA'sına dahil edildi (Western Pacific). pRS424DEN1WPcDNA klonu (Puri, B. ve arkadaşları 2000 Virus Genes 20:4557-63), BamHI ile dijest edildi ve ileri doğru primer 30 (DEN1 nt 10515-10561 ve 10592-10607) ve M13 geriye doğru sekanslama primeri (DEN1 genom sekansının 3' ucunun 101 nt ötesinde) ile Pfu polimerazı kullanılan bir PCR'de şablon olarak kullanıldı. Nihai PCR ürünü, 292 bp idi ve  $\Delta 30$  mutasyonunu içeriyordu. pRS424DEN1WP cDNA'sı, Apa I ile kısmen dijest edildikten sonra Sac II ile tamamlanana kadar dijest edildi ve vektör, jelle izole edildi, PCR ürünü ile karıştırıldı ve maya suşu YPH857'yi, triptofansız plakalar üzerinde büyüme sağlamak üzere transforme etmek için kullanıldı (Polo, S. ve arkadaşları 1997 J Virol 71:505366-74). Pozitif maya kolonileri, PCR ve restriksiyon enzim analizi ile doğrulandı. İki bağımsız maya kolonisinden izole edilen DNA, E. coli suşu STBL2'yi transforme etmek için kullanıldı. RNA transkriptlerinin oluşturulması için uygun plazmid DNA hazırlandı ve  $\Delta 30$  mutasyonunun varlığı, sekans analizi ile doğrulandı.

Virüsün transkripsiyonu ve oluşturulması için SacII ile linearize edilen cDNA (pRS424DEN1 $\Delta 30$  olarak adlandırılır), tarif edildiği gibi (Polo, S. ve arkadaşları 1997 J Virol 71:5366-74) SP6 RNA polimerazı kullanılan bir transkripsiyon reaksiyonunda şablon olarak kullanıldı.



Transkripsiyon reaksiyonları, LLC-MK2 hücrelerine elektroporate edildi ve enfeksiyon, CPE ve immünoflöresan gözlemi ile doğrulandı ve 14üncü gün toplandı. Virüs stokları, C6/36 sivrisinek hücreleri üzerinde amplifiye edildi ve LLC-MK2 hücrelerinde titerlendi. Nihai virüs, rDEN1 $\Delta$ 30'un genomu,  $\Delta$ 30 mutasyonunun varlığını doğrulayacak şekilde sekanslandı.  $\Delta$ 30 mutasyonu, DEN1'in (Şekil 2B,C), DEN1'in TLS'sine karşılık gelen 10562-10591 nükleotitlerini giderir. Virüs, Vero hücre kültüründe 6.5 log<sub>10</sub> PFU/ml'lik tüterlere kadar etkin bir şekilde replike olur; bu,  $\Delta$ 30 mutasyonunun, aşı üretimi için elzem bir özellik olan, DEN1'in hücre kültürü içerisinde etkin şekilde büyümesi ile uyumlu olduğunu işaret eder. Benzer teknikler kullanılarak ana virüs rDEN1 oluşturuldu. Doku kültüründeki virüs geçişinden kaynaklanan tesadüfi mutasyonlar, sekans analizi kullanılarak hem rDEN1 hem de rDEN1 $\Delta$ 30'da tanımlandı ve Tablo 15'te sıralandı. İlave bir rDEN1 $\Delta$ 30 virüsü, Vero hücrelerinde transfeksiyon ve amplifikasyon yoluyla türetildi. Bu virüsün, aşağıda tarif edilen çalışmalarda değerlendirilmemesine rağmen bunun sekans analizi, Tablo 15'te yare almaktadır. rDEN1 $\Delta$ 30'un in vivo bir aşı olarak özellikleri daha sonra incelendi.

Tablo 15. Rekombinant DEN1 virüsleri arasında mevcut missens mutasyonlar ve NSB4 bölge mutasyonlarının DEN4 içerisinde bulunanlarla ilişkisi



şekilde yapıldı. Dang virüsü bakımından seronegatif maymunlara, üst omuz bölgesinin her bir tarafında iki enjeksiyon arasında bölünmüş 1 ml'lik bir dozda  $5.0 \log_{10}$  PFU virüs subkütan yolla enjekte edildi. Maymunlar, günlük olarak gözlemlendi ve kan, 0-10 ve 28inci günlerde toplandı ve serum,  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de depolandı. Virüsün serum örnekleri içerisindeki titeri, daha önceden tarif edildiği gibi (Durbin, A.P. ve arkadaşları 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13) Vero hücrelerinde plak deneyi ile belirlendi. Plakla azaltmalı nötralizasyon titerleri, daha önceden tarif edildiği gibi 28 günlük serum örnekleri için belirlendi (Durbin, A.P. ve arkadaşları 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13). Bütün maymunlar, 28inci gün tek bir doz  $5.0 \log_{10}$  PFU doğal tipte rDEN1 başkaldırısına maruz bırakıldı ve 10 gün süreyle kan toplandı. Başkaldırı sonrası serumlardaki virüs titeri, Vero hücrelerinde plak deneyi ile belirlendi. Tam boyda doğal tipte rDEN1 ile aşılanmış maymunlar, ortalama zirve titerinin  $2.1 \log_{10}$  PFU/ml (Tablo 16) olmasıyla 2-3 gün süreyle viremikti ve rDEN1 $\Delta$ 30 ile aşılanan bütün maymunlar, ortalama zirve titerinin  $0.8 \log_{10}$  PFU/ml olmasıyla 1 günden daha az bir süre viremikti; bu da,  $\Delta$ 30 mutasyonunun, DEN1'i hafifletebildiğinin işaretidir. Hafiflemiş bir virüs için beklendiği gibi, immün tepkisi, nötralize edici antikor titeriyle ölçülen şekilde, doğal tipte rDEN1 ile aşılama ya kıyasla rDEN1 $\Delta$ 30 ile aşılandıktan sonra daha düşüktü (Tablo 16), bununla birlikte hayvanları, doğal tipte DEN1 virüsü başkaldırısına karşı korumak için hala yeterince yüksekti. Doğal tipte rDEN1 virüsü, virüs başkaldırısını takiben toplanan hiçbir serum örneğinde saptanmadı; bu da, maymunların, tam boyda doğal tipte rDEN1 ya da rekombinant virüs rDEN1 $\Delta$ 30 ile bağışıklılaştırma sonrasında tamamen korunduğunun işaretidir.  $\Delta$ 30

mutasyonu ile belirtilen hafifleme seviyesi, hem DEN1 hem de DEN4 genetik artalanlarında kıyaslanabilirdi (Şekil 5).

Tablo 16.  $\Delta 30$  mutasyonu, rhesus maymunlarında rDEN1'i hafifletir

| Virüs*            | n | Viremili ortalama gün adedi | Ortalama zirve titeri ( $\log_{10}$ pfu/ml) | Ortalama nötralizasyon titeri | Başkaldırı virüsünün ortalama zirve titeri |
|-------------------|---|-----------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------|
| rDEN1             | 4 | 2.8                         | 2.1                                         | 1230                          | <0.7                                       |
| rDEN1 $\Delta 30$ | 4 | 0.5                         | 0.8                                         | 780                           | <0.7                                       |

\* Rhesus maymunlarına, subkütan yolla  $5.0 \log_{10}$  PFU virüs aşılandı. Serum örnekleri, 10 gün süreyle her gün toplandı. Nötralizasyon deneyi için serum, 28inci gün toplandı. Bütün maymunlar, 28inci gün  $5.0 \log_{10}$  PFU rDEN1 başkaldırısına maruz kaldı.

Daha önce rapor edildiği gibi rDEN4 virüsü, SCID-HuH-7 farelerinde  $6.0 \log_{10}$  PFU/ml serumdan daha fazlasına replike olurken  $\Delta 30$  mutasyonu taşıyan rDEN4 virüsünün replikasyonu, yaklaşık 10 kat düştü (Blaney, J.E. Jr. Ve arkadaşları 2002 Virology 300:125-139). rDEN1 $\Delta 30$ 'un replikasyonu, SCID-HuH-7 farelerinde wt rDEN1'inkile karşılaştırıldı (Tablo 17). rDEN1 $\Delta 30$ , ana wt rDEN1'inden yaklaşık olarak 100 kat daha düşük bir seviyeye kadar replike oldu. Bu sonuç, DEN virüsünün hafiflemiş suşlarının değerlendirilmesinde SCID-HuH-7 fare modelinin kullanılmasını daha da geçerli kılar; bu arada sonuçlar, rhesus maymunlarında gözlenenlerle yakından alakalıdır.

Tablo 17.  $\Delta 30$  mutasyonu, HUH-7-SCID farelerinde rDEN1'i hafifletir

| Virüs             | Fare adedi <sup>5</sup> | Ortalama zirve virüs titeri <sup>6</sup><br>(log <sub>10</sub> pfu/ml $\pm$ SE) |
|-------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Wt rDEN1          | 9                       | 7.3 $\pm$ 0.2                                                                   |
| rDEN1 $\Delta$ 30 | 8                       | 5.0 $\pm$ 0.3                                                                   |

<sup>5</sup> HuH-7-SCID farelerinden oluşan gruplara, direkt olarak tümöre olmak üzere 4.0 log<sub>10</sub>pfu virüs aşılandı. Serum, 6 ve 7nci gün toplandı ve virüs titeri, Vero hücrelerinde plak deneyi ile belirlendi.

<sup>6</sup> rDEN1 ile rDEN1 $\Delta$ 30 virüsleri arasında önemli bir farklılık bulundu, Tukey-Kramer testi (P< 0.005).

Son olarak sivrisinekler için rDEN1 ve rDEN1 $\Delta$ 30'un enfektivitesi, Örnek 5'te detaylı olarak tarif edilen yöntemler kullanılarak değerlendirildi. Daha önceden  $\Delta 30$  mutasyonunun, rDEN4'ün, sivrisineğin orta barsak bariyerinden geçme ve bir tükürük bezi enfeksiyonu oluşturma kabiliyetini azalttığı gösterilmişti (Troyer, J.M. ve arkadaşları, 2001 Am J Trop Med Hyg 65:414-419). Bununla birlikte ne rDEN1 ne de rDEN1 $\Delta$ 30, Aedes aegypti sivrisineklerinin orta bağırsagını, suni bir kan unu yoluyla etkin bir şekilde enfekte edemedi (Tablo 18), bu yüzden  $\Delta 30$ 'un tükürük bezi enfeksiyonunu daha fazla bloke edebilip edemediğini belirlemek imkansızdı. Önceki bir çalışma aynı zamanda  $\Delta 30$ 'un, intratorasik aşılama yoluyla enfekte olan Toxorhynchites splendens sivrisinekleri için rDEN4 enfektivitesi üzerinde hiçbir etkiye sahip olmadığını (Troyer, J.M. ve arkadaşları 2001 Am J Trop Med Hyg 65:414-419) da gösterdi ve benzer bir şablon, rDEN1 ve rDEN1 $\Delta$ 30 için de görüldü (Tablo 18). rDEN1'in sivrisineği enfekte edememesinin genetik tabanı, bu sırada

tanımlanmamıştı. Bununla birlikte sivrisineğin orta bağırsağı için bu önemli kısıtlı enfektivite özelliği, bir aşı adayında yüksek düzeyde arzu edilebilir çünkü bu, aşı virüsünün, bir aşılardan bir sivrisinek vektörüne geçişini büyük ölçüde kısıtlamaya hizmet eder.

Tablo 18. DEN1 ve DEN1Δ30 virüslerinin her ikisi de Toxorhynchites splendens için yüksek düzeyde enfeksiyözdür ancak Aedes aegypti'yi etkin bir şekilde enfekte etmez

| Virüs     | Toxorhynchites splendens<br>(intratorasik aşılama) |                         |                                | Aedes aegypti (oral enfeksiyon)             |                      |                             |      |
|-----------|----------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------|----------------------|-----------------------------|------|
|           | Doz <sup>a</sup><br>(log <sub>10</sub> pfu)        | Test<br>edilen<br>adedi | % enfekte<br>olan <sup>b</sup> | Doz <sup>c</sup><br>(log <sub>10</sub> pfu) | Test edilen<br>adedi | % enfekte olan <sup>d</sup> |      |
|           |                                                    |                         |                                |                                             |                      | Orta barsak                 | Kafa |
| rDEN1     | 3.5                                                | 7                       | 100                            | 4.0                                         | 26                   | 11                          | 0    |
|           | 2.5                                                | 8                       | 75                             |                                             |                      |                             |      |
|           | 1.5                                                | 7                       | 71                             |                                             |                      |                             |      |
|           | 0.5                                                | 5                       | 60                             |                                             |                      |                             |      |
|           |                                                    |                         | MID <sub>50</sub> <0.5         |                                             |                      |                             |      |
| rDEN1 Δ30 | 2.7                                                | 8                       | 100                            | 3.2                                         | 20                   | 10                          | 0    |
|           | 1.7                                                | 7                       | 100                            |                                             |                      |                             |      |
|           | 0.7                                                | 6                       | 83                             |                                             |                      |                             |      |
|           |                                                    |                         | MID <sub>50</sub> <0.7         |                                             |                      | MID <sub>50</sub> >3.6      |      |

<sup>a</sup> 0.22 µl aşı içerisinde mevcut virüs miktarı.

<sup>b</sup> Aşılamadan 14 gün sonra hazırlanmış kafa dokusunda IFA saptanabilir antijenine sahip sivrisinek yüzdesi.

<sup>c</sup> 2 µl'lik bir kan unu varsayılarak alınan virüs titeri.

<sup>d</sup> Oral enfeksiyondan 21 gün sonra hazırlanmış orta barsak veya kafa dokusunda IFA ile saptanabilir antijene sahip sivrisinek yüzdesi. Virüs enfeksiyonu saptandığında ancak alınan en yüksek virüs dozunda %50'yi aşmayan bir sıklıkta olduğunda MID<sub>50</sub>, 10 kat fazla konsantre virüs dozunun, sivrisineklerin %100'ünü enfekte edeceği varsayılarak tahmin edildi.

Bu nedenle ilk olarak DEN4 içerisinde tarif edilen  $\Delta 30$  mutasyonu, başarılı bir şekilde rDEN1'e aktarıldı. Nihai virüs, rDEN1 $\Delta 30$ 'un, maymunlarda ve SCID-HuH-7 farelerinde, rekombinant virüs rDEN4 $\Delta 30$ 'a benzer seviyelere kadar hafifletildiği, böylelikle  $\Delta 30$  mutasyonu ile özelleştirilen hafifletme fenotipinin farklı bir DEN virüsü art alanında konzervasyonunun sağlandığı gösterildi. Son klinik deneylerde rDEN4 $\Delta 30$ 'a ilişkin uygun sonuçlara dayanarak (Durbin, A.P. ve arkadaşları 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13), rDEN1 $\Delta 30$ 'un, insanlarda uygun şekilde hafifleyeceği öngörülür. Tetravalent aşıyı tamamlamak için  $\Delta 30$  mutasyonu taşıyan hafiflemiş rDEN2 ve rDEN3 rekombinant virüslerinin hazırlanması tasarlanır (Bakınız aşağıdaki Örnek 3 ve 4).  $\Delta 30$  mutasyonunun, başka bir DEN serotipine taşınabilir bir fenotipi özelleştirdiğine ilişkin sunum, tetravalent aşının geliştirilmesinde önemli anlatımlara sahiptir. Bu,  $\Delta 30$  mutasyonunun, DEN2 ve DEN3 doğal tipte virüsleri üzerinde ilgili bir etkiye sahip olması beklenir.

### Karşılaştırmalı ÖRNEK 3

#### **$\Delta 30$ Mutasyonunu İhtiva Eden bir Rekombinant DEN2 Virüsünün Oluşturulması ve Karakterizasyonu**

rDEN1 $\Delta 30$ 'un değerlendirmesi, bunun tatminkar şekilde hafiflediğini gösterdi. Bu sonuca dayanarak biz, teknolojimizi, bir DEN2 aşı adayı yaratmaya kadar uzatmaya çalıştık. Bunu yapmak için  $\Delta 30$  mutasyonu, DEN2'nin cDNA'sına dahil edildi. Tonga Krallığında (Tonga/74) yaşanan 1974 dang salgınından alınan bir DEN2 virüs izolatu (Gubler, D. J. ve arkadaşları, 1978 Am J Trop Med Hyg 27:581-589), wt DEN2'yi temsil etmek üzere seçildi. DEN2'nin

genomu (Tonga/74), kendi bütünlüğü içerisinde sekanslandı ve tam boyda bir cDNA klonunun yapılandırılması için konsensus sekans görevi gördü (Ek 1). DEN2'nin cDNA fragmanları, Şekil 6A'da gösterildiği gibi genomun ters transkripsiyonuyla oluşturuldu. Her fragman, bir plazmid vektörü içine alt-klonlandı ve virüs için belirlenen konsensus sekansı ile uyuşup uyuşmadığını teyit etmek üzere sekanslandı. Bu, genom boyunca uzanan klonlanmış yedi cDNA fragmanı verdi. Klonlanmış fragmanlar, şu şekilde modifiye edildi: Genomun 5' ucunu temsil eden fragman X, SP6 promoterine dayanıyordu; Fragman L, genomik nükleotit 2353'te translasyon açısından sessiz bir SpeI kısıtlama sahası ihtiva edecek şekilde modifiye edildi; Fragman R, genomik nükleotit 2353'te translasyon açısından sessiz bir SpeI kısıtlama sahası ihtiva edecek ve nihai tam boyda klonu stabilize edecek şekilde modifiye edildi; 2362-2364 ve 2397 nükleotitlerinde iki ilave translasyon açısından sessiz mutasyon yaratılarak translasyon durdurma kodonlarının, virüs poliproteinini sentezlemede kullanılan dışındaki tüm okuma çerçevelerinde bulunması sağlandı; Fragman A, doğal yoldan meydana gelen bir SpeI kısıtlama sahasını kesip çıkartmak amacıyla nükleotit 3582'de ve doğal yollarla oluşan bir KpnI kısıtlama sahasını kesip çıkartmak amacıyla nükleotit 4497'de modifiye edildi; Fragman C, doğal yollarla oluşan bir KpnI kısıtlama sahasını kesip çıkartmak amacıyla nükleotit 9374'te modifiye edildi ve genomun 3' ucunu temsil eden Fragman Y, bir KpnI kısıtlama sahasına dayandı. Her fragman, DEN4 cDNA klonu p4'ün AscI ve KpnI kısıtlama sahaları arasına artan şekilde ilave edilerek (Durbin, A.P. ve arkadaşları, 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13) rDEN4 ve rDEN4 $\Delta$ 30'u oluşturmada başarıyla kullanılan aynı vektör arka planı ile tam boyda bir DEN2 cDNA klonu (p2)



oluşturuldu. cDNA klonu p2, virüs genomu bölgesinin, yukarıda kaydedilen translasyonel açıdan sessiz modifikasyonlar dışında DEN2 (Tonga/74) konsensüs sekans ile eşleştiğini doğrulamak üzere sekanslandı.  $\Delta 30$  mutasyonu, Fragman Y içine sokularak Fragman Y $\Delta 30$  oluşturuldu. P2 $\Delta 30$ 'u yaratmak için p2'nin Fragman Y bölgesi, Fragman Y $\Delta 30$  ile değiştirildi (Şekil 6A, B).

Enfeksiyöz virüsün transkripsiyonu ve oluşturulması için cDNA (p2 ve p2 $\Delta 30$ ), Acc65I (sadece tek bir 3' nükleotidini bırakarak klivaj olan Kpln izosşizomeri) ile linearize edildi ve daha önceden tarif edildiği gibi SP6 RNA polimerazı kullanılan bir transkripsiyon reaksiyonunda şablon olarak kullanıldı (Blaney, J. E. ve arkadaşları 2002 Virology 300:125-139). Transkriptler, Vero hücreleri veya C6/36 sivrisinek hücreleri içine, lipozom aracılı transfeksiyon kullanılarak sokuldu ve hücre kültür süpernatantları, 7. günde toplandı.

rDEN2 virüsü, Vero ve C6/36 hücrelerinin her ikisinde p2 cDNA'dan geri alınırken rDEN2 $\Delta 30$ , sadece C6/36 hücrelerinde p2 $\Delta 30$  cDNA klonundan geri alındı (Tablo 19). C6/36 hücrelerinde geri kazanılan enfeksiyöz virüs düzeyi, Vero veya C3/36 hücrelerinde plak titrasyonu ve immüno-lekeleme ile deneye tabi tutulduğunda, p2 ve p2 $\Delta 30$  cDNA klonlarında kıyaslanabilirdi. Daha önce gözlemlendiği gibi C6/36 hücreleri içinde transfeksiyon verimliliği, Vero hücrelerinden daha yüksekti. İki rDEN2 $\Delta 30$  virüsü, bağımsız cDNA klonları, #2 ve #10'dan geri kazanıldı.

Tablo 19. rDEN2 virüsü, Vero ve C6/36 hücrelerinden geri kazanılır ancak rDEN2 $\Delta$ 30 virüsü, sadece C6/36 hücrelerinde geri kazanılır

| Transfeksiyon hücre tipi | cDNA yapısı    | Klon | Virüs             | Belirtilen hücre tipinde belirlenen transfeksiyon toplamının (gün 7) virüs titeri (log <sub>10</sub> PFU/ml) |                 |
|--------------------------|----------------|------|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
|                          |                |      |                   | Vero hücreleri                                                                                               | C6/36 hücreleri |
| Vero hücreleri           | p2             | #8A  | rDEN2             | 3.1                                                                                                          | 4.3             |
|                          | p2 $\Delta$ 30 | #2   | rDEN2 $\Delta$ 30 | <0.7                                                                                                         | <0.7            |
|                          | p2 $\Delta$ 30 | #10  | rDEN2 $\Delta$ 30 | <0.7                                                                                                         | <0.7            |
| C6/36 hücreleri          | p2             | #8A  | rDEN2             | 5.5                                                                                                          | 7.5             |
|                          | p2 $\Delta$ 30 | #2   | rDEN2 $\Delta$ 30 | 4.8                                                                                                          | 7.6             |
|                          | p2 $\Delta$ 30 | #10  | rDEN2 $\Delta$ 30 | 4.6                                                                                                          | 7.5             |

rDEN2 ve rDEN2 $\Delta$ 30 virüslerinin çalışma stoklarını üretmek amacıyla transfeksiyon hasatları geçirildi ve son olarak Vero hücreleri içinde seyreltildi ve virüslerin genomik sekansları saptandı. rDEN2 virüsünün Vero hücresi transfeksiyon hasatı, son olarak Vero hücrelerinde bir kez seyreltildi ve ayrı ayrı virüs klonları, Vero hücrelerinde bir kez geçirildi. rDEN4 NS4B 7100-7200 bölgesinde tanımlanan her homolog Vero hücre adaptasyon mutasyonunun, bu virüs klonları içerisinde mevcut olup olmadığını değerlendirmek için yedi bağımsız son olarak seyreltilmiş klon, bu bölge üzerinden sekanslandı. Yedi rDEN2 virüsünün her biri, bu bölgede 7169 nükleotidinde tek bir nükleotit ikamesi içeriyordu (U>C) ve böylelikle bir Val>Ala amino asit değişikliğine neden oldu. Bu nükleotit, bilinen bir Vero hücre adaptasyon fenotipine sahip rDEN4 içerisinde tanımlanmış 7162 mutasyonuna karşılık gelir (Blaney, J. E. ve

arkadaşları 2002 Virology 300:125-139); bu da, bu mutasyonun, rDEN2 virüsünde bir replikasyon arttırma fenotipi kazandırabildiğini işaret eder. Bir rDEN2 virüsü klonu tamamen sekanslandı ve 7169 mutasyonuna ek olarak 3051 tortusunda NS5'te bir missens mutasyon (Glu>Ala) bulundu (Tablo 20).

Tablo 20. Transfeksiyon ve Vero hücrelerindeki geçişten sonra rDEN2 ve rDEN2Δ30 virüslerinde biriken missens mutasyonlar

| Virüs                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Gen  | Nükleotit pozisyonu | Nükleotit ikamesi | Amino asit pozisyonu <sup>a</sup> | Amino asit değişikliği |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|---------------------|-------------------|-----------------------------------|------------------------|
| rDEN2 <sup>b</sup> (Vero)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | NS4B | 7169 <sup>c</sup>   | U>C               | 2358                              | Val > Ala              |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | NS5  | 9248                | A>C               | 3051                              | Glu > Ala              |
| rDEN2Δ30 <sup>d</sup> (Vero)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | NS3  | 4946                | A>G               | 1617                              | Lys > Arg              |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | NS4B | 7169 <sup>c</sup>   | U>C               | 2358                              | Val > Ala              |
| <sup>a</sup> DEN2 poliproteini içerisinde, pozisyon 1 olarak C proteininin metiyonin tortusunda (nükleotit 9799) başlayan amino asit pozisyonu.<br><sup>b</sup> Virüs, Vero hücrelerinde geri kazanıldı ve son olarak Vero hücrelerinde bir kez seyreltili. Virüs stoku, Vero hücrelerinde hazırlandı.<br><sup>c</sup> rDEN4'te 7162 ile aynı nükleotit pozisyonu.<br><sup>d</sup> Virüs, C6/36 hücrelerinde geri kazanıldı ve Vero hücrelerinde üç kez geçirildi. Virüs daha sonra son olarak seyreltili ve Vero hücrelerinde bir stok hazırlandı. |      |                     |                   |                                   |                        |

Vero hücrelerinde büyütülen hem rDEN2 hem de rDEN2Δ30 virüsleri, 7169 nükleotidinde, daha önce rDEN4'te 7162 nükleotidinde tanımlanmış Vero hücre adaptasyon mutasyonuna karşılık gelenle aynı mutasyonu elde ettiğinden bu mutasyonun, Vero hücrelerinde rDEN2

ve rDEN2 $\Delta$ 30'un büyüme adaptasyonu ile ilişkili olduğu sonucuna varıldı. 7169 mutasyonunun, rDEN2 $\Delta$ 30'un Vero hücrelerinde direkt olarak geri kazanılmasını sağlayabilmesi beklentisiyle mutasyon, rDEN2 $\Delta$ 30 cDNA plazmidine dahil edilerek p2 $\Delta$ 30-7169 yaratıldı. P2 $\Delta$ 30-7169 ve aynı zamanda p2 ve p2 $\Delta$ 30'dan sentezlenen transkriptler, yukarıda tarif edildiği gibi lipozom aracılı transfeksiyon kullanılarak Vero hücrelerine veya C6/36 sivrisinek hücrelerine dahil edildi. rDEN2 $\Delta$ 30-7169 virüsü, hem Vero hem de C6/36 hücrelerinde p2 $\Delta$ 30-7169 cDNA'sından geri kazanılırken rDEN2 $\beta$ 30, sadece C6/36 hücrelerinde p2 $\Delta$ 30 cDNA klonundan geri kazanıldı (Tablo 21). 7169 mutasyonu, rDEN2 $\Delta$ 30'un Vero hücrelerinde geri kazanılması için hem gerekli hem de yeterlidir.

Tablo 21. 7169 Vero hücre adaptasyon mutasyonu içeren rDEN2 $\Delta$ 30-7169 virüsü, hem Vero hem de C6/36 hücrelerinde geri kazanılır

| Transfeksiyon hücre tipi                                                                                                                                      | cDNA yapısı                                              | Klon             | Virüs                                                | C6/36 hücrelerinde belirlenen transfeksiyon hasatının (gün 14) virüs titeri (log <sub>10</sub> PFU/ml) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Vero hücreleri                                                                                                                                                | p2<br>p2 $\Delta$ 30<br>p2 $\Delta$ 30-7169 <sup>a</sup> | #8A<br>#2<br>#37 | rDEN2<br>rDEN2 $\Delta$ 30<br>rDEN2 $\Delta$ 30-7169 | 6.8<br><0.7<br>5.1                                                                                     |
| C6/36 hücreleri                                                                                                                                               | p2<br>p2 $\Delta$ 30<br>p2 $\Delta$ 30-7169              | #8A<br>#2<br>#37 | rDEN2<br>rDEN2 $\Delta$ 30<br>rDEN2 $\Delta$ 30-7169 | 6.9<br>7.1<br>7.2                                                                                      |
| a rDEN2 içerisindeki nükleotit 7169, Vero hücrelerinde büyüme adaptasyonu ile bağlantılı olduğu gösterilmiş olan rDEN4'teki 7162 nükleotidine karşılık gelir. |                                                          |                  |                                                      |                                                                                                        |

$\Delta 30$  mutasyonunun, bir hayvan modelinde rDEN2 virüsünü hafifletme kabiliyetini başlangıçta değerlendirmek için DEN2 (Tonga/74), rDEN2 ve rDEN2 $\Delta 30$  virüslerinin replikasyonu, SCID-HuH-7 farelerinde değerlendirildi. Daha önceden aşı adaylarının SCID-HuH-7 farelerinde hafifletilmesinin, rhesus maymunu enfeksiyon modelinde hafiflemenin kestirimi olacağı gösterilmiştir (Örnekler 1 ve Örnek 2). Bu deneyde test edilen rekombinant virüsler, C6/36 hücrelerinde geri kazanıldı. Bağımsız p2 $\Delta 30$  cDNA klonlarından türetilen DEN2 Tonga/74 virüs izolatu, rDEN2 ve iki bağımsız rDEN2 $\Delta 30$  virüsü (klon 20A ve 21A), C6/36 hücrelerinde bir çalışma stoku üretilmeden önce son olarak C6/36 hücrelerinde iki kez seyreltildi. Bu virüsler, hiçbir Vero hücre adaptasyon mutasyonu içermemelidir. DEN2 Tonga/74 virüsü, SCID-HuH-7 farelerinin serumunda  $6.2 \log_{10}$ PFU/ml’lik bir ortalama virüs titerine kadar replike oldu ve rDEN2 virüsü, benzer bir seviye olan  $5.6 \log_{10}$ PFU/ml’ye kadar replike oldu (Tablo 22). Her iki rDEN2 $\Delta 30$  virüsü de, rDEN2 virüsüne kıyasla replikasyon bakımından 100 kattan fazla kısıtlıydı. Bu sonuçlar,  $\Delta 30$  mutasyonunun, rDEN2 virüsünün replikasyonu üzerinde, rDEN4 ve rDEN1 virüsleri için gözlenene benzer bir hafifletme etkisine sahip olduğunu gösterir.

Tablo 22.  $\Delta 30$  mutasyonu, SCID-HuH-7 farelerinde rDEN2 virüs replikasyonunu kısıtlar

| Virüs                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Fare adedi | Ortalama virüs titeri $\pm$ SE<br>(log <sub>10</sub> PFU/ml serum) <sup>a</sup> | Wt için olan değerden<br>ortalama log <sub>10</sub> birimi<br>azalma <sup>b</sup> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| DEN2 (Tonga/74)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 8          | 6.2 $\pm$ 0.3                                                                   | -                                                                                 |
| rDEN2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 9          | 5.6 $\pm$ 0.2                                                                   | -                                                                                 |
| rDEN2 $\Delta$ 30 (klon 20A)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 9          | 3.1 $\pm$ 0.2                                                                   | 2.5                                                                               |
| rDEN2 $\Delta$ 30 (klon 21A)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 9          | 2.9 $\pm$ 0.3                                                                   | 2.7                                                                               |
| <sup>a</sup> SCID-HuH-7 farelerinden oluşan gruplara, direkt olarak tümöre olmak üzere C6/36 hücrelerinde büyütülmüş 10 <sup>4</sup> PFU virüs aşılandı. Serum, 7nci gün toplandı ve C6/36 hücrelerinde titerlendi. <sup>b</sup> Mutant virüs aşılannmış farelerin ortalama virüs titerleri ve eş zamanlı rDEN2 kontrolünün karşılaştırılması. |            |                                                                                 |                                                                                   |

SCID-HuH-7 farelerindeki DEN2 virüs replikasyonu da Vero hücrelerinde geçirilen DEN2 (Tonga/74), rDEN2 ve rDEN2 $\Delta$ 30 kullanılarak belirlendi (bakınız Tablo 20, dip not b ve d). Hem rDEN2 hem de rDEN2 $\Delta$ 30, NS4B, nükleotit 7169'da, rDEN4'te Vero hücre adaptasyon mutasyonu olarak tanımlanan 7162 mutasyonuna karşılık gelen bir mutasyon edinmişti. 7169 mutasyonu varlığında  $\Delta$ 30 mutasyonu, rDEN2 $\Delta$ 30 replikasyonunu, 1.0 log<sub>10</sub>PFU/ml kadar düşürdü (Tablo 23). Daha önceden C6/36 hücrelerinde büyütülmüş virüs kullanılarak ve 7169 mutasyonu olmadan  $\Delta$ 30 mutasyonu, 0 replikasyonunu yaklaşık 2.5 log<sub>10</sub>PFU/ml kadar düşürmüştü (Tablo 22). Bu sonuçlar, DEN2'de Vero hücre büyümesi adaptasyonunun, HuH-7 karaciğer hücrelerine hafif bir büyüme avantajı sağlayabileceğini de gösterir. Bununla birlikte  $\Delta$ 30 mutasyonunun kazandırdığı hafifleme hala bu Vero hücre büyümesine adapteli virüslerde fark edilebilirdir.

Tablo 23.  $\Delta 30$  mutasyonu, SCID-HuH-7 farelerinde Vero hücresi adapteli rDEN2 virüsünün replikasyonunu kısıtlar

| Virüs             | Fare adedi | Ortalama virüs titeri<br>$\pm$ SE ( $\log_{10}$ PFU/ml<br>serum) <sup>a</sup> | Wt için olan değerden<br>ortalama $\log_{10}$ birimi<br>azalması <sup>b</sup> |
|-------------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| DEN2 (Tonga/74)   | 6          | $5.9 \pm 0.3$                                                                 | -                                                                             |
| rDEN2             | 7          | $5.9 \pm 0.2$                                                                 | -                                                                             |
| rDEN2 $\Delta 30$ | 9          | $4.9 \pm 0.3$                                                                 | 1.0                                                                           |

<sup>a</sup> SCID-HuH-7 farelerinden oluşan gruplara, direkt olarak tümöre olmak üzere  $10^4$  PFU virüs aşılandı. Serum, 7nci gün toplandı ve C6/36 hücrelerinde titerlendi.

<sup>b</sup> rDEN2 $\Delta 30$  ve rDEN2 kontrol aşılanmış farelerin ortalama virüs titerlerinin karşılaştırması.

Genç rhesus maymunlarında rDEN2 $\Delta 30$  ve doğal tipte ana rDEN2 virüsünün replikasyon, immünogenisite ve koruyucu etkinliğinin değerlendirilmesi, aşağıdaki şekilde yapıldı. Dang virüsü bakımından seronegatif maymunlara, üst omuz bölgesinin her bir tarafında iki enjeksiyon arasında bölünmüş 1 ml'lik bir dozda  $5.0 \log_{10}$  PFU virüs subkütan yolla enjekte edildi. Maymunlar, günlük olarak gözlemlendi ve kan, 0-10 ve 28inci günlerde toplandı ve serum,  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de depolandı. Bu deneyde kullanılan virüsler, Vero hücrelerinde geçirildi ve rekombinant virüsler, Tablo 20'de gösterilen mutasyonları içeriyordu (Bakınız dip not b ve d). Virüsün, serum örneklerindeki titeri, daha önceden tarif edildiği gibi (Durbin, A.P. ve arkadaşları 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13) Vero hücrelerinde plak deneyi ile belirlendi. Plakla azaltmalı nötralizasyon titerleri, daha önceden tarif edildiği gibi 28 günlük serum örnekleri için belirlendi (Durbin, A.P. ve arkadaşları 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13). Bütün

maymunlar, 28inci gün tek bir doz  $5.0 \log_{10}$  PFU wt DEN2 (Tonga/74) başkaldırısına maruz bırakıldı ve 10 gün süreyle kan toplandı. Başkaldırı sonrası serumlardaki virüs titeri, Vero hücrelerinde plak deneyi ile belirlendi. wt DEN2 (Tonga/74) veya rDEN2 ile aşılanmış maymunlar, ayrı ayrı ortalama zirve titerinin 2.1 veya  $1.9 \log_{10}$  PFU/ml olmasıyla 4-5 gün süreyle viremikti.

rDEN2 $\Delta$ 30 ile aşılanmış maymunlar,  $1.7 \log_{10}$  PFU/ml'lik bir ortalama zirve titeriyle 2-3 gün süreyle viremikti (Tablo 24, Şekil 7); bu da,  $\Delta$ 30 mutasyonunun, DEN2'yi hafifletebilmesine rağmen rDEN1 $\Delta$ 30'da gözlenenle aynı düşük seviyeye kadar hafifletemediğini gösterir (Tablo 16). Hafiflemiş bir virüs için beklendiği gibi, immün tepkisi, nötralize edici antikor titeriyle ölçülen şekilde, rDEN2 $\Delta$ 30 ile aşılandıktan sonra wt DEN2 (Tonga/74) veya rDEN2 ile aşılamaaya kıyasla daha düşüktü (Tablo 24), bununla birlikte hayvanları, wt DEN2 virüsü başkaldırısına karşı korumak için hala yeterince yüksekti (Tablo 25). Bu nedenle rDEN2 $\Delta$ 30 için azalmış viremi günleri, azalmış ortalama zirve titeri ve azalmış serum antikor tepkisi,  $\Delta$ 30 mutasyonunun, rhesus maymunlarında rDEN2'yi hafiflettiğini gösterir.

Tablo 24. rDEN2 $\Delta$ 30, Rhesus maymunları için rDEN2'den biraz daha fazla hafifletilir



| Virüs <sup>a</sup> | Maymun<br>adedi | Viremili<br>maymun<br>adedi | Maymun<br>başına<br>ortalama<br>viremik gün<br>adedi <sup>b</sup> | Ortalama zirve<br>virüs titeri<br>(log <sub>10</sub> PFU/ml<br>± SE) | Geometrik ortalama<br>serum nötrale<br>edici antikor titeri<br>(karşılıklı seyreltme) |        |
|--------------------|-----------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------|
|                    |                 |                             |                                                                   |                                                                      | Gün 0                                                                                 | Gün 28 |
| Yapay              | 2               | 0                           | 0                                                                 | <0.7                                                                 | <10                                                                                   | <10    |
| DEN2<br>(Tonga/74) | 4               | 4                           | 4.5                                                               | 2.1 ±0.3                                                             | <10                                                                                   | 311    |
| rDEN2<br>(Vero)    | 4               | 4                           | 4.0                                                               | 1.9 ±0.1                                                             | <10                                                                                   | 173    |
| rDEN2Δ30<br>(Vero) | 4               | 4                           | 2.8                                                               | 1.7 ±0.2                                                             | <10                                                                                   | 91     |

<sup>a</sup> Rhesus maymunlarından oluşan gruplara, 1 ml'lik bir dozda belirtilen virüsten 10<sup>5</sup> PFU subkütan yolla aşılandı. Serum, 0 ila 6, 8, 10, 12 ve 28inci günlerde toplandı. Virüs titeri, Vero hücrelerinde plak deneyi ile belirlendi

<sup>b</sup> Viremi, 8inci günden sonra hiçbir maymunda saptanmadı.

Tablo 25. rDEN2Δ30, rhesus maymunlarını wt DEN2 virüs başkaldırısından korur

| Virüs <sup>a</sup> | Maymun<br>adedi | DEN2<br>başkaldırısından<br>sonra maymun<br>başına ortalama<br>viremik gün<br>adedi | Ortalama zirve<br>virüs titeri<br>(log <sub>10</sub> PFU/ml<br>± SE) | Geometrik ortalama<br>serum nötrale edici<br>antikor titeri<br>(karşılıklı seyreltme) |        |
|--------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------|
|                    |                 |                                                                                     |                                                                      | Gün 28                                                                                | Gün 56 |
| Yapay              | 2               | 4.0                                                                                 | 2.1 ± 0.1                                                            | <10                                                                                   | 338    |
| DEN2<br>(Tonga/74) | 4               | 0                                                                                   | <0.7                                                                 | 311                                                                                   | 334    |
| rDEN2 (Vero)       | 4               | 0                                                                                   | <0.7                                                                 | 173                                                                                   | 318    |
| rDEN2Δ30<br>(Vero) | 4               | 0                                                                                   | <0.7                                                                 | 91                                                                                    | 267    |

<sup>a</sup> Belirtilen virüslerle aşılamaadan 28 gün sonra maymunlar, 1 ml'lik bir dozda subkütan yolla  $10^5$  PFU DEN2 (Tonga/74) başkaldırısına maruz kaldı. Serum, 28 ila 34, 36, 38 ve 56ncı günlerde toplandı. Virüs titeri, Vero hücrelerinde plak deneyi ile belirlendi.

Bir suni kan unu yoluyla DEN2 (Tonga/74), rDEN2 ve rDEN2 $\Delta$ 30'un *Aedes aegypti* sivrisinekleri için enfektivitesi, Örnek 5'te detaylı bir şekilde tarif edilen yöntemler kullanılarak değerlendirildi. Bununla birlikte alınan 3.3 ila 3.5 log<sub>10</sub> pfu'luk dozlarda bu üç virüsten hiçbiri, herhangi bir sivrisineği enfekte etmedi; bu da, DEN2'nin (Tonga/74), *Aedes aegypti* için zayıf düzeyde enfeksiyöz olduğunu gösterir. rDEN1 ile birlikte olduğu gibi bu enfektivite noksanlığının genetik tabanı hala tanımlanmamıştır. Sivrisinek orta bağırsağı için önemli kısıtlı enfektivite özelliği, bir aşı adayında yüksek düzeyde arzu edilebilir çünkü bu, virüsün, bir aşılardan bir sivrisinek vektörüne geçişini büyük ölçüde kısıtlama görevi görür.

rDEN4'te tanımlanan birkaç missens mutasyonun, emzirme döneminde olan fare beyninde ve/veya SCID-HuH-7 farelerinde replikasyonu hafiflettiği ortaya konulmuştur (Blaney, J. E. ve arkadaşları 2002 Virology 300:125-139; Blaney, J. E. ve arkadaşları 2001 J. Virol 75:9731-9740). Ek olarak Vero hücrelerinde rDEN4 virüsünün replikasyonunu arttıran missens mutasyonlar da karakterize edilmiştir. DEN virüs serotipleri arasındaki önemli sekans konzervasyonu, rDEN4 virüslerinde tanımlanan mutasyonların, rDEN2 virüsüne benzer fenotipler kazandırmak için kullanılmak üzere tasarlanmasını sağlayan bir strateji sağlar. rDEN4 içerisinde tanımlanan, rDEN2 virüsü içerisinde konserve bir sahada bulunan altı mutasyon, p2 ve p2 $\Delta$ 30 cDNA klonlarına dahil edilmektedir (Tablo

26). Spesifik olarak fare beyininde Vero hücresi adaptasyon fenotipleri ve azalmış replikasyon sağlayan NS34891 ve 4995 olmak üzere iki rDEN4 mutasyonu, bir Vero hücresi adaptasyon fenotipi sağlayan bir mutasyon, NS4B 7182 ve fare beyininde ve SCID-HuH-7 farelerinde azalmış replikasyon sağlayan üç mutasyon, NS1 2650, NS3 5097 ve 3' UTR 10634 değerlendirilmektedir. Bu mutasyonlar, p2 ve p2 $\Delta$ 30 cDNA klonlarının alt klonlanmış fragmanlarına dahil edilmiştir ve C6/36 hücrelerinde virüsün geri kazanıldığı (Tablo 27) tam boyda mutant cDNA klonları oluşturmak (Tablo 26) için kullanılmaktadır. Bu mutant rDEN2 virüslerinin değerlendirmesi, bu gibi nokta mutasyonlarının farklı bir DEN virüsü serotipi içine taşınabileceğinin ve  $\Delta$ 30 delesyon mutasyonu için gösterildiği gibi benzer bir faydalı fenotip verebileceğinin saptanması olarak tasarlanır.

Tablo 26. rDBN4 virüslerinde karakterize edilen konserve nokta mutasyonlarının, rDEN2 Tonga/74 virüsüne dahil edilmesi

| rDEN4 virüsünde fenotip       |                                |                             | Gen/bölge | rDEN4 virüsünde mutasyon |                                   |                        | DEN2 virüsüne dahil edilen mutasyon |                                   |                        |                                        |
|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------|--------------------------|-----------------------------------|------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|----------------------------------------|
| Vero Adaptasyonu <sup>a</sup> | Fare beyninde att <sup>b</sup> | SCID-HuH-7 att <sup>c</sup> |           | Nükleotit pozisyonu      | Amino asit pozisyonu <sup>d</sup> | Amino asit değişikliği | Nükleotit pozisyonu                 | Amino asit pozisyonu <sup>d</sup> | Amino asit değişikliği | RE sahası/mutajenik bölge <sup>a</sup> |
| +                             | +                              | -                           | NS3       | 4891                     | 1597                              | Ile > Thr              | 4889                                | 1598                              | Ile > Thr              | NarI<br>CCAcgGGcGCCGT                  |
| +                             | +                              | -                           | NS3       | 4995                     | 1632                              | Ser > Pro              | 4993                                | 1633                              | Ser> Pro               | Stu I<br>AAGGccTGGA                    |
| +                             | -                              | -                           | NS4b      | 7182                     | 2361                              | Gly > Ser              | 7189                                | 2365                              | Gly > Ser              | Xma I<br>TAtccCCGGGAC                  |
| -                             | +                              | +                           | NS1       | 2650                     | 850                               | Asn > Ser              | 2648                                | 851                               | Asn > Ser              | Sac I<br>AGAgcTctcTC                   |
| -                             | +                              | +                           | NS3       | 5097                     | 1666                              | Asp>Asn                | 5095                                | 1667                              | Asp > Asn              | Xma I<br>GaATCTCCACCCg<br>GA           |
| -                             | +                              | +                           | 3'UTR     | 10634                    | n/a <sup>f</sup>                  | n/a                    | 10698                               | n/a                               | n/a                    | yok CTGTcGAATC                         |

<sup>a</sup> Belirtilen mutasyonun varlığı, Vero hücrelerindeki plak büyüklüğünü, rDEN4 virüsünden iki kat veya daha fazlasına çıkarır.

<sup>b</sup> Belirtilen mutasyonun varlığı, 7 günlük fare beyinde replikasyonu, rDEN4 virüsüne kıyasla 100 kattan fazla kısıtlar.

<sup>c</sup> Belirtilen mutasyonun varlığı, SCID-HuH-7 farelerinde replikasyonu, rDEN4 virüsüne kıyasla 100 kattan fazla kısıtlar.

<sup>d</sup> DEN4 veya DEN2 poliproteininde, pozisyon 1 olarak C proteininin metiyonin tortusu (ayrı ayrı nükleotit 102-104 veya 97-99) başlayan amino asit pozisyonu.

<sup>e</sup> Primerler, translasyonel olarak sessiz kısıtlama enzimi (RE) sahaları dahil eden (altı çizili) mühendisliğe tabi tutuldu. Alt simgeler, nt değişikliklerini; koyu harfler, 5-FU mutasyonunun sahasını işaret eder; bazı oligonükleotitlerde bu, benzersiz bir RE sahası yaratmak için orijinal nükleotit ikame değişikliğinden farklıdır. Değişiklik, amino asit ikamesi kodonunu muhafaza eder.

<sup>f</sup> 3' UTR'deki nükleotit ikamesi, DEN4 ve DEN2 virüsünde U>C'dir.

Tablo 27. Konserve 5-FU mutasyonları içeren rDEN2 virüsleri, C6/36 hücrelerinde geri kazanılır

| Virüs (rDEN2 içerisinde nükleotit pozisyonu)      | rDEN4 içerisindeki nükleotit pozisyonu | C6/36 hücrelerinde belirlenen transfeksiyon hasatının (gün 7) virüs titeri (log <sub>10</sub> FU/ml) |
|---------------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| rDEN2-4889                                        | 4891                                   | 7.6                                                                                                  |
| rDEN2-4993                                        | 4995                                   | 7.2                                                                                                  |
| rDEN2-7189                                        | 7182                                   | 3.5                                                                                                  |
| rDEN2-2648                                        | 2650                                   | -- <sup>a</sup>                                                                                      |
| rDEN2-5095                                        | 5097                                   | -- <sup>a</sup>                                                                                      |
| rDEN2-10698                                       | 10634                                  | 7.7                                                                                                  |
| <sup>a</sup> Transfeksiyona henüz başlanmamıştır. |                                        |                                                                                                      |

#### Karşılaştırmalı ÖRNEK 4

##### 5 Δ30 Mutasyonunu İhtiva Eden bir Rekombinant DEN3 Virüsünün Oluşturulması ve Karakterizasyonu

rDEN1Δ30, tatmin edici şekilde attenüe edildiğinden teknolojimizi, bir DEN3 aşı adayının yaratılmasına kadar genişletmeye çalıştık. Bunu yapmak için Δ30 mutasyonu, DEN3'ün cDNA'sı içine, 10 rDEN2Δ30'u yaratmak için kullanılan yöntemle benzer şekilde sokuldu. Kırsal Sleman, orta Endonezya'da (Sleman/2578) yaşanan 1978 dang salgınından alınan bir DEN3 virüs izolatu (Gubler, D. J. ve arkadaşları, 1981 Am J Trop Med Hyg 30:1094-1099), wt DEN3'ü temsil etmek üzere seçildi. DEN3 genomu (Sleman/78), bütün halinde 15 sekanslandı ve tam uzunluktaki bir cDNA klonunun yapılandırılması için konsensus sekansı olarak görev yaptı (Ek 2). DEN3'ün cDNA fragmanları (Sleman/78), Şekil 8A'da gösterildiği gibi genomun ters transkripsiyonu ile oluşturuldu. Her fragman, bir plazmid vektörü

içine alt-klonlandı ve virüs için belirlenen konsensus sekansı ile  
 uyuşup uyuşmadığını teyit etmek üzere sekanslandı. Bu, genom  
 boyunca uzanan klonlanmış alt cDNA fragmanı verdi. Klonlanmış  
 fragmanlar, şu şekilde modifiye edildi: Genomun 5' ucunu temsil eden  
 5 fragman 5, önünde bir AscI kısıtlama sahasının bulunduğu SP6  
 promoterine dayanıyordu; Fragman 1L, genomik nükleotit 2345'te  
 translasyon açısından sessiz bir SpeI kısıtlama sahası ihtiva edecek  
 şekilde modifiye edildi; Fragman 1R de genomik nükleotit 2345'te  
 translasyon açısından sessiz bir SpeI kısıtlama sahası ihtiva edecek  
 10 şekilde modifiye edildi ve ortaya çıkan tam uzunluktaki klonu  
 stabilize etmek amacıyla nükleotitler 2354 - 2356, 2360 - 2362 ve  
 2399'da üç ilave translasyon açısından sessiz mutasyon yaratılarak  
 translasyon durdurma kodonlarının, virüs poliproteinini sentezlemede  
 kullanılan dışındaki tüm okuma çerçevelerinde bulunması sağlandı;  
 15 Fragman 3, doğal yoldan meydana gelen bir KpnI kısıtlama sahasını  
 kesip çıkartmak amacıyla nükleotit 9007'de modifiye edildi ve  
 genomun 3' ucunu temsil eden Fragman 4, bir KpnI kısıtlama sahasına  
 dayandı. Her fragman, DEN4 cDNA klonu p4'ün AscI ve KpnI  
 kısıtlama sahaları arasına artan şekilde ilave edilerek (Durbin, A.P. ve  
 20 arkadaşları, 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13) rDEN4 ve  
 rDEN2'yi oluşturmada başarıyla kullanılan aynı vektör arka planı ile  
 tam uzunlukta bir DEN3 cDNA klonu oluşturuldu. Bununla birlikte  
 stabil tam uzunlukta bir klon, 1L ve 1R fragmanları aynı cDNA  
 molekülü içine birleştirildiğinde E. coli içinde elde edilemedi. Bu  
 25 stabil olmama durumunun üstesinden gelmek için ileri ve geri açık  
 okuma çerçevelerinin her birinde gereğinden fazla sonlandırma  
 kodonu ihtiva eden sentetik bir DNA linkeri (Şekil 8A), 1L  
 fragmanının tam uzunluktaki cDNA yapısını tamamlamak üzere ilave

edildiği anda SpeI kısıtlama sahası içine sokuldu. Linker sekansını ihtiva eden, elde edilen p3 klonu, E. coli içinde stabildi, bu da linker sekansının, bu bölgede bulunan her türlü zararlı elemanı kesintiye uğratmak için yeterli olduğunu gösterir. cDNA klonu p3 sekanslandı ve virüs genomunun, linker sekansı ve yukarıda belirtilen translasyon açısından sessiz modifikasyonlar haricinde DEN3 (Sleman/78) konsensus sekansı ile uyduğu keşfedildi (Ek 2 - linker sekansı çıkartılarak gösterilmiştir).  $\Delta 30$  mutasyonu, Fragman 4 içine sokularak Fragman 4 $\Delta 30$  oluşturuldu. p3 $\Delta 30$ 'u yaratmak için p3'ün Fragman 4 bölgesi, Fragman 4 $\Delta 30$  ile değiştirildi (Şekil 8A, B).

Enfeksiyöz virüsün transkripsiyonu ve oluşturulması için cDNA plazmidleri p3 ve p3 $\Delta 30$ , SpeI ile sindirildi ve linker sekansını çıkartmak amacıyla yeniden ligasyon yapıldı, Acc65I (sadece tek bir 3' nükleotidini bırakarak klivaj olan Kpln izoşizomeri) ile lineerize edildi ve daha önceden tarif edildiği gibi SP6 RNA polimerazının kullanıldığı bir transkripsiyon reaksiyonunda şablon olarak kullanıldı (Blaney, J. E. ve arkadaşları 2002 Virology 300:125-139). Transkriptler, Vero hücreleri veya C6/36 sivrisinek hücreleri içine, lipozom aracılı transfeksiyon kullanılarak sokuldu ve hücre kültür süpernatantları, 14. günde toplandı.

rDEN3 virüsü, Vero ve C6/36 hücrelerinin her ikisinde p3 cDNA'dan geri alınırken rDEN3 $\Delta 30$ , sadece C6/36 hücrelerinde p3 $\Delta 30$  cDNA klonundan geri alındı (Tablo 28). C6/36 hücrelerinde geri kazanılan enfeksiyöz virüs düzeyi, Vero veya C3/36 hücrelerinde plak titrasyonu ile deneye tabi tutulduğunda, p3 ve p3 $\Delta 30$  cDNA klonları ile denkti. Daha önce gözlemlendiği gibi C6/36 hücreleri içinde transfeksiyon verimliliği, Vero hücrelerinden daha yüksekti. İki rDEN3 $\Delta 30$  virüsü,



bağımsız cDNA klonları, #22 ve #41'den geri kazanıldı.

Tablo 28. rDEN3 virüsü, Vero ve C3/36 hücrelerinde geri kazanılır, ancak rDEN3Δ30 virüsü, sadece C6/36 hücrelerinde geri kazanılır.

| Transfeksiyon hücre tipi | cDNA yapısı | Klon | Virüs    | Gösterilen hücre tipinde belirlenen transfeksiyon hasadının (14. gün) virüs titeri (log <sub>10</sub> PFU/ml) |                 |
|--------------------------|-------------|------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
|                          |             |      |          | Vero hücreleri                                                                                                | C6/36 hücreleri |
| Vero hücreleri           | p3          | #50  | rDEN3    | 5.2                                                                                                           | 6.3             |
|                          | p3Δ30       | #22  | rDEN3Δ30 | <0.7                                                                                                          | <0.7            |
|                          | p3Δ30       | #41  | rDEN3Δ30 | <0.7                                                                                                          | <0.7            |
| C6/36 hücreleri          | p3          | #50  | rDEN3    | 5.2                                                                                                           | 6.0             |
|                          | p3Δ30       | #22  | rDEN3Δ30 | 5.9                                                                                                           | 6.9             |
|                          | p3Δ30       | #41  | rDEN3Δ30 | 5.1                                                                                                           | 7.2             |

5

Virüslerin çalışma stoklarını üretmek amacıyla transfeksiyon hasatları geçirilecek ve son olarak Vero hücreleri içinde seyreltilecek ve virüslerin genomik sekansları saptanacaktır. Vero hücrelerinde virüs verimini arttırmak için daha önce rDEN4'te 7162. nükleotitte tanımlanan Vero hücresi adaptasyon mutasyonu, p3 ve p3Δ30'un homolog NS4B bölgesine sokularak p3-7164 ve p3Δ30-7164 yaratıldı. Bu mutasyon, 2357. amino asit pozisyonunda Val'dan Ala'ya bir ikame yaratır. rDEN2Δ30 için gösterildiği gibi bu mutasyon, virüsün Vero hücrelerinde direkt olarak geri kazanılmasına izin verdi (Tablo 27) ve rDEN3Δ30 için aynı etkiye sahip olması beklenir.

15

Δ30 mutasyonunun, bir hayvan modelinde rDEN3 virüsünü hafifletme yeterliliğini başlangıçta değerlendirmek amacıyla DEN3 (Sleman/78), rDEN3 ve rDEN3Δ30 virüslerinin replikasyonu, SCID-HuH-7 fareleri

ve rhesus maymunlarında değerlendirilecektir. Daha önceden aşı adaylarının SCID-HuH-7 farelerinde hafifletilmesinin, rhesus maymunu enfeksiyon modelinde hafiflemenin kestirimi olacağı gösterilmiştir (Örnekler 1 ve 2).  $\Delta 30$  delesyon mutasyonlarının DEN3 virüsü serotipi içine taşınabileceğinin ve DEN1, DEN2 ve DEN4 için gösterildiği gibi benzer bir faydalı fenotip verebileceğinin saptanması gibi bu mutant rDEN3 virüslerinin değerlendirilmesi öngörülür.

Özet olarak  $\Delta 30$  mutasyonunun her serotipte vahşi tip DEN virüsleri içine sokularak uygun şekilde hafifletilmiş bir tetravalent aşı formülasyonunun üretilmesi stratejisi, birçok nedenden benzersiz ve çekici bir yaklaşımdır. İlk olarak hafifletmeden sorumlu mutasyon, 3' UTR'deki 30 nükleotitlik bir delesyondur, böylelikle tetravalent aşının dört bileşeninden her biri tarafından eksprese edilen, yapısal ve yapısal olmayan proteinlerin, hakiki vahşi tip proteinler olması sağlanır. Bu tür vahşi tip proteinler, kimerik dang virüsü aşı adaylarında bulunan sadece M ve E proteinlerine dayalı olmak yerine geniş dayanaklı bir antikor tepkisi uyandırmalıdır (Guirakhoo, F. ve arkadaşları, 2001 J Virol 75: 7290-304; Huang, C.Y. ve arkadaşları, 2000 J Virol 74:3020-8). Bu yaklaşımın benzersizliği, diğer canlı, hafifletilmiş dang virüsü aşılarının, yapısal veya yapısal olmayan proteinleri içinde mutasyonlara sahip olmaları gerçeğinden kaynaklanır (Butrapet, S. ve arkadaşları, 2000 J Vitro/74:3011-9; Puri, B. ve arkadaşları, 1997 J Gen Virol 78:2287-91), bu nedenle bu virüsler tarafından indüklenen immün tepkisi, bir vahşi tip proteinden çok bir mutant proteine yönelik olacaktır. İkinci olarak delesyon mutasyonları, nokta mutasyonlarından genetik olarak daha stabildir ve hafifletme fenotipinin tersine dönmesi olası değildir. İnsanlarda aşılananların serumunda bulunan DEN4 $\Delta 30$ , kendi  $\Delta 30$  mutasyonunu

muhafaza etti, bu da bunun in vivo genetik stabilitesini teyit etti  
 (Durbin, A.P. ve arkadaşları, 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13).  
 Diğer var olan dang canlı hafifletilmiş aşı adaylarındaki hafifletici  
 mutasyonlar, daha az stabil nokta mutasyonlarına dayanır (Butrapet, S.  
 5 ve arkadaşları, 2000 J Virol 74:3011-9; Puri, B. ve arkadaşları, 1997 J  
 Gen Virol 78:2287-91). Üçüncü olarak  $\Delta 30$  mutasyonu, tetravalent  
 aşının dört virüsünün her biri için ortak olduğundan dört aşı  
 serotipinin her biri arasındaki rekombinasyon, hafifletici mutasyonun  
 kaybolmasına veya bir vahşi tip fenotipe geri dönüşe yol  
 10 açmayacaktır. Trivalent polio aşısının bileşenleri arasında  
 rekombinasyon gözlenmiştir (Guillot, S. ve arkadaşları, 2000 J Virol  
 74: 8434-43) ve doğal yoldan meydana gelen rekombinant dang  
 virüsleri tarif edilmiştir (Worobey, M. ve arkadaşları, 1999 PNAS  
 USA 96:7352-7) bu da bu flavivirüsün iki farklı virüs arasında genetik  
 15 elemanları değiştirebilme yeterliliğini gösterir. Net bir şekilde gen  
 değiş-tokuşu farklı DEN virüsü serotipleri arasında rekombinant  
 cDNA teknikleri kullanılarak kolayca gerçekleştirilir (Bray, M. ve Lai,  
 C.J. 1991 PNAS USA 88:10342-6). Dördüncü olarak vahşi tip yapısal  
 proteinlere sahip virüsler, değiştirilmiş yapısal proteinlere sahip  
 20 virüslerden daha enfeksiyöz görünür (Huang, C.Y. ve arkadaşları,  
 2000 J Virol 74:3020-80). BU, dört virüs bileşeninden her birinin  
 nihai aşı içinde düşük miktarda kullanılmasına izin verir, bu da üretim  
 maliyetinin düşmesine katkıda bulunur. Düşük maliyetli üretim, bir  
 dang virüsü aşısının nihai faydasının tanımlanmasında elzem bir  
 25 öğedir.

## ÖRNEK 5

### Δ30 Mutasyonunu İhtiva Eden İntertipik Kimerik DEN2 Virüslerinin Oluşturulması ve Karakterizasyonu

Dang virüsünün dört serotipi, virüsün yapısal proteinleri tarafından indüklenen antikor tepkileri ile öncelikle zarf (E) proteinine verilen nötralize edici bir antikor tepkisi ile tanımlanır. Bu yapısal proteinler arasında E glikoprotein, bir membran proteini (M) ve bir kapsid (C) proteini bulunur. Olgun virüs partikülü, bir lipit iki tabakalı membranı çevreleyen, iyi organize olmuş bir protein kabuğundan ve daha az tanımlanmış bir iç nükleokapsid göbekten oluşur (Kuhn, R.J. ve arkadaşları, 2002 Cell 108:717-25). E glikoproteini, başlıca koruyucu antijendir ve dang virüsü enfeksiyonuna karşı koruma sağlayan, virüsü nötralize edici antikorları kolayca indükler. Etkili bir dang aşısının bu nedenle en azından dört serotipin tamamının, yani DEN1, DEN2, DEN3 ve DEN4'ün E proteinini ihtiva etmesi, böylelikle bir heterotipik vahşi tipte dang virüsü ile ikincil enfeksiyon sırasında insanlarda ortaya çıkan daha ciddi hastalıklar DHF/DSS'yi geliştirme ihtimalini engellemesi ve geniş bir immüniteyi indüklemesi gerekir. Daha önce bildirilen bir stratejiye dayanarak (Bray, M. ve Lai, C.J. 1991 PNAS USA 88:10342-6) bir rekombinant cDNA teknolojisi şu anda her bir serotipte yapısal proteinler taşıyan bir dizi intertipik kimerik dang virüsünden oluşan, canlı, hafifletilmiş, tetravalent bir dang virüsü aşısının geliştirilmesinde kullanılmaktadır.

Uygun şekilde hafifletilmiş ve immünojenik bir DEN4 rekombinant virüsünün, yani DEN4Δ30'un tanımlanmasından sonra (Durbin, A.P ve arkadaşları, 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13) DEN4 cDNA'ya dayalı kimerik virüsler geliştirilmiştir, burada C-M-E (CME) veya M-E (ME) genleri, prototipik DEN2 Yeni Gine C (NGC) suşundan

türetilmiş uygun genler ile değiştirilmiştir (Şekil 9A). CME kimerik virüsleri yaratmak için rDEN4 veya rDEN4Δ30 için cDNA'nın BglII/XhoI bölgesi, DEN2'den türetilmiş benzer bir bölge ile değiştirildi. Benzer şekilde ME kimerik virüsleri yaratmak için rDEN4 veya  
 5 rDEN4Δ30 için cDNA'nın PstI / XhoI bölgesi, DEN2'den türetilmiş homolog bir bölge ile değiştirildi. Elde edilen bağlantıların nükleotit ve amino asit sekansları, Şekil 9B'de gösterilmiştir. rDEN4Δ30'un nükleotit sekansının GenBank erişim numarası, AF326837'dir. DEN2 NGC için GenBank erişim numarası, M29095 olup bu, DEN2  
 10 NGC'nin fare nörovirulan suşunu temsil eder ve daha önce belgelendiği gibi burada kullanılan protipik suştan farklılık gösterir (Bray, M. ve arkadaşları, 1998 J Virol 72:1647-51).

Virüsün transkripsiyonu ve oluşturulması için kimerik cDNA klonları lineerize edildi ve tarif edildiği gibi SP6 RNA polimerazı kullanılarak  
 15 bir transkripsiyon reaksiyonunda şablon olarak kullanıldı (Durbin, A.P ve arkadaşları, 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13). Transkriptler, Vero hücreleri içine, lipozom aracılı transfeksiyon kullanılarak sokuldu ve rekombinant dang virüsü 7. günde toplandı. Elde edilen virüslerin genomları, daha önce tarif edildiği gibi geri kazanılmış  
 20 virüsten izole edilmiş viral RNA'nın sekans analizi ile teyit edildi (Durbin, A.P ve arkadaşları, 2001 Am J Trop Med Hyg 65:30405-13). Doku kültüründe virüs geçişinden kaynaklanan istem dışı mutasyonlar, tüm virüslerde tanımlandı ve Tablo 29'da sıralandı. Çarpıcı şekilde her virüs, NS4B'de bir yanlış sens mutasyonu ihtiva  
 25 ediyordu, bu da rDEN4'ten daha önce tanımlanmış bir mutasyona karşılık gelir ve Vero hücrelerinde replikasyona adaptasyon ile bağlantılandırıldı (rDEN4 ve kimerik virüsler arasındaki nükleotit pozisyonlarının korelasyonu için bakınız Tablo 30). Tüm virüsler,

Vero hücreleri içinde 6.0 log<sub>10</sub> PFU/ml'nin üzerinde titerlere kadar replike oldu, bu da kimerik virüslerin ve hatta Δ30 mutasyonunu ihtiva edenlerin, hücre kültürü içinde verimli şekilde replike olduklarını gösterir; bu özellik, aşı üretimi için elzemdir.

- 5 Tablo 29. Verü hücresinde büyütülen kimerik DEN2/4 virüsleri arasında gözlemlenen yanlış sens mutasyonları

| Virüs                                                    | Gen  | Nükleotit pozisyonu | Nükleotid değişimi | Amino asit pozisyonu | Amino asit değişimi |
|----------------------------------------------------------|------|---------------------|--------------------|----------------------|---------------------|
| rDEN2/4(CME)                                             | NS4B | 7161 <sup>a</sup>   | A>U                | 2355                 | Leu > Phe           |
| rDEN2/4Δ30 (CME)                                         | M    | 743                 | G>A                | 216                  | Gly > Glu           |
|                                                          | E    | 1493                | C>U                | 466                  | Ser> Phe            |
|                                                          | NS4B | 7544 <sup>b</sup>   | C>T                | 2483                 | Ala > Val           |
| rDEN2/4(ME)                                              | E    | 1065                | U>C                | 322                  | Phe > Leu           |
|                                                          | NS4B | 7163 <sup>a</sup>   | A>U                | 2354                 | Leu > Phe           |
| rDEN2/4Δ30(ME)                                           | NS4B | 7163 <sup>a</sup>   | A>C                | 2354                 | Leu > Phe           |
| <sup>a</sup> rDEN4'te 7163 ile aynı nükleotit pozisyonu. |      |                     |                    |                      |                     |
| <sup>b</sup> rDEN4'te 7546 ile aynı nükleotit pozisyonu. |      |                     |                    |                      |                     |

Tablo 30. rDEN4 ile karşılaştırıldığında DEN kimerik virüsleri için nükleotit (nt) uzunluğu farklılıkları

| rDEN kimerik virüsü | rDEN4'ten nt farkı (CME bölgesini takiben) | ORF başlangıcı (nt pozisyonu) | Amino asit uzunluğu |     |     |
|---------------------|--------------------------------------------|-------------------------------|---------------------|-----|-----|
|                     |                                            |                               | C                   | M   | E   |
| 1/4 ME              | 0                                          | 102                           | 113                 | 166 | 495 |
| 1/4 CME             | +3                                         | 102                           | 114                 | 166 | 495 |
| 2/4 ME              | 0                                          | 102                           | 113                 | 166 | 495 |
| 2/4 CME             | -2                                         | 97                            | 114                 | 166 | 495 |
| 3/4 ME              | -6                                         | 102                           | 113                 | 166 | 493 |
| 3/4 CME             | -3                                         | 102                           | 114                 | 166 | 493 |
| rDEN4               | -                                          | 102                           | 113                 | 166 | 495 |

Maymunlarda bir güvenlik, immünojeniklik ve verimlilik çalışmasının sonuçları, Tablo 31’de sunulmuştur. Vahşi tip DEN2 ile inoküle edilen maymunlar, yaklaşık 5 gün süreyle  $2.1 \log_{10}$  PFU/ml’lik bir ortalama pik titeri ile viremikti, buna karşılık kimerik DEN2 virüslerinden biri ile inoküle edilen maymunlar, 1.2 gün veya daha kısa süreyle viremikti ve ortalama pik titerleri,  $1.0 \log_{10}$  PFU/ml’nin altındaydı. Viremi büyüklüğünde ve süresinde görülen bu azalma açıkça DEN2’nin CME veya ME proteinlerini ihtiva eden kimerik virüslerin, parental DEN2 NGC virüsünden daha fazla hafifletildiğini gösterir.

Vahşi tip DEN2’yi veya DEN2/4 kimerik virüslerini alan hayvanların hiçbiri hasta olmadı. Maymunlarda hafifletilmiş virüslerin azalan replikasyonu, inoküle edilen maymunların immün tepkilerinde bir azalma ile birlikte meydana gelir. Bu, Tablo 31’de vahşi tip virüs ile inoküle edilmiş hayvanlarda sağlanan titerler ile karşılaştırıldığında kimerik virüsler ile inokülasyonun ardından nötralize edici antikor düzeyinde yaklaşık 5 katlık bir azalma ile gösterilir.  $\Delta 30$  mutasyonunun CME kimerik virüsüne ilavesi virüsü tekrar hafifletmiştir, böylelikle rDEN2/4 $\Delta 30$ (CME), maymunlarda saptanabilir bir düzeye kadar replike olmamış ve saptanabilir bir immün tepkisi indüklememiştir. Bu virüs, aşırı hafifletilmiş görünmektedir ve insanlarda benzer sonuçlar görünürse bu virüs, bir aşı olarak kullanılmaya uygun olmayacaktır. Bununla birlikte  $\Delta 30$  mutasyonunun ME kimerik virüsüne ilavesi, bu kimerik virüsü daha da hafifletmemiştir ve ortaya çıkan rDEN2/4 $\Delta 30$ (ME) virüsü, tatmin edici miktarda hafifletilmiş ve bir aşı olarak kullanılmak üzere immünojenik görünmüştür.

Tablo 31. Dang virüsü tipleri 2 ile 4 arasında kimerizasyon, rhesus maymunları için hafifletilmiş rekombinant virüsler ile sonuçlanır.

| Grup* | Virüs               | n | Viremili<br>ortalama gün<br>sayısı | ortalama pik<br>virüs titeri<br>(log <sub>10</sub> pfu/ml) | Nötralize edici<br>antikor titeri<br>geometrik<br>ortalaması<br>(karşılıklı) |
|-------|---------------------|---|------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 1     | rDEN2/4<br>(CME)    | 6 | 1.2                                | 0.9                                                        | 50                                                                           |
| 2     | rDEN2/4Δ30<br>(CME) | 8 | 0                                  | <0.7                                                       | <5                                                                           |
| 3     | rDEN2/4 (ME)        | 4 | 1.0                                | 0.8                                                        | 76                                                                           |
| 4     | rDEN2/4Δ30<br>(ME)  | 4 | 0.3                                | 0.7                                                        | 62                                                                           |
| 5     | DEN2 NGC            | 6 | 5.5                                | 2.1                                                        | 312                                                                          |

\* Rhesus maymunları, 5.0 log<sub>10</sub> PFU virüs ile subkütan yoldan inoküle edildi. Serum örnekleri, 10 gün süreyle günlük bazda toplandı. Nötralizasyon deneyi için serum, 28. günde toplandı. Virüs inokülasyonundan önce elde edilen serum örneklerinin nötralize edici antikor titeri, <5 idi.

Önceki örneklerde tarif edildiği gibi HuH-7 hücrelerinin transplante edildiği SCID fareleri, dang virüsü hafiflemesinin değerlendirilmesi için hassas bir modeldir. Her kimerik DEN2/4 virüsü, SCID-HuH-7 farelerinden oluşan gruplara inoküle edildi ve serum içindeki virüs düzeyleri belirlendi (Tablo 32). Kimerik virüsler, parental virüslerden (rDEN4 ve DEN2-NGC) 20 ile 15 kat arasında daha düşük düzeylerde replike oldu. CME kimerik virüsleri, Δ30 mutasyonuna sahip denk ME kimerik virüslerinden bir miktar daha fazla hafifletilirken replikasyonda 0.5 log<sub>10</sub>'luk bir azalma sağladı. Δ30 mutasyonu ile verilen bu hafifletme düzeyi, daha önce rDEN4Δ30 için gözlemlenene benzerdi.



Tablo 32. Dang virüsü tipleri 2 ile 4 arasında kimerizasyon, HuH-7-SCID fareleri için hafifletilmiş rekombinant virüsler ile sonuçlanır.

| Virüs <sup>a</sup>                                                                                                                                                                                      | Fare sayısı | Ortalama pik virüs titeri (log <sub>10</sub> pfu/ml±SE) | İstatistik grubu <sup>b</sup> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------|
| rDEN4                                                                                                                                                                                                   | 32          | 6.3 ± 0.2                                               | A                             |
| DEN2-NGC                                                                                                                                                                                                | 9           | 6.1 ± 0.2                                               | A                             |
| rDEN2/4 (CME)                                                                                                                                                                                           | 7           | 4.4 ± 0.3                                               | B                             |
| rDEN2/4Δ30 (CME)                                                                                                                                                                                        | 7           | 3.9 ± 0.3                                               | B                             |
| rDEN2/4 (ME)                                                                                                                                                                                            | 6           | 4.8 ± 0.5                                               | B                             |
| rDEN2/4Δ30(ME)                                                                                                                                                                                          | 9           | 4.3 ± 0.2                                               | B                             |
| <sup>a</sup> HuH-7-SCID farelerinden oluşan gruplar, 4.0 log <sub>10</sub> PFU gösterilen virüs ile tümör içine inoküle edildi. Serum, 7. günde toplandı ve virüs titeri, Vero hücrelerinde belirlendi. |             |                                                         |                               |
| <sup>b</sup> Ortalama pik titerler, Tukey post-hoc testi (P < 0.05) kullanılarak istatistik gruplarına atandı. Aynı harfli tanımlamaya sahip gruplar, anlamdı düzeyde farklı değildir.                  |             |                                                         |                               |

Her DEN2/4 kimerik virüsünün sivrisineklerde replikasyon düzeylerini değerlendirmek için sivrisineklerin iki farklı cinsi deneysel olarak enfekte edildi. Aedes aegypti, virüs ihtiva eden bir kan yemeğinin sindirilmesi suretiyle enfekte edildi. Virüs antijeninin hem midgut hem de kafa dokusu içinde varlığının değerlendirilmesi suretiyle enfektivite, lokal dokular (midgut) için belirlenebildi ve virüsün, midgut bariyerinin ötesindeki dokulara (kafa) yayılma ve burada replike olma yeterliliği de ölçülebildi. Virüsün kafada bulunması, sindirilen virüsün midgut içinde replike olma ve sonra kafadaki tükürük bezlerine yayılma yeterliliği ve ayrıca virüsün tükürük bezleri içinde replike olmasına yönelik içsel yeterliliği ile sınırlıdır. Virüsün Toxorhynchites splendens içine intratorasik

inokülasyonu, sivrisineğin midgut bariyerini baypas eder. Parental virüsler rDEN4 ve DEN2-NGC, *Ae. aegypti* ve *T. splendens*'i kolayca enfekte ederken (Tablo 33) DEN2-NGC, *T. splendens*'te çok daha enfeksiyöz görüldü. rDEN2/4 kimerik virüslerinin her biri de

5 sivrisinek tiplerinin her ikisinde test edildi. Birçok durumda virüslerin birkaçının çok düşük enfektivitesine bağlı olarak saptanabilir bir enfeksiyon elde etmek için *Ae. aegypti*'yi yeterli titerde seyreltilmemiş bir virüs stoku ile inoküle etmek mümkün olmadı. Yine de rDEN2/4 kimerik virüslerinin, midgut ve kafa için daha az

10 enfeksiyöz oldukları açıldı. Parental virüsler rDEN4 ve DEN2-NGC, yaklaşık 4.0 log<sub>10</sub>PFU'luk maksimum dozda uygulandıklarında, midgut preparasyonlarında sırasıyla %74 ve %94 ve kafa preparasyonlarında %32 ve %71 oranlarında saptandı. Kimerik virüsler arasında rDBM2/4Δ30(CME) için gözlenen en yüksek

15 enfektivite düzeyi, sadece %26 enfekte olmuş midgut örneği ve %6 kafa örneği ile sonuçlandı. Daha fazla izin verici olan *T. splendens*'te rDEN2/4 kimerik virüsleri genel olarak parental virüsten daha az enfeksiyözdü ve CME kimerik virüsleri, ME virüslerinden daha az enfeksiyözdü. Daha önce DEN4 için Δ30 mutasyonunun, *T.*

20 *splendens*'teki virüs enfektivitesi üzerinde, burada rDEN2/4 kimerik virüsler için gözlemlenene benzeyen, ayırt edici bir etkiye sahip olmadığı bildirilmişti (Troyer, J.M. ve arkadaşları, 2001 Am J Trop Med Hyg 65:414-419).

Tablo 33. Dang 2/4 kimerik virüsleri, sivrisineklerde herhangi bir parental virüs suşu ile karşılaştırıldığında daha az enfeksiyözdür

| Virüs               | Toxorhynchites splendens<br>(intratorasik inokülasyon) |        |                        | Aedes aegypti (oral enfeksiyon) |        |                                |                        |
|---------------------|--------------------------------------------------------|--------|------------------------|---------------------------------|--------|--------------------------------|------------------------|
|                     | Doz <sup>a</sup>                                       | Test   | Enfekte                | Doz <sup>c</sup>                | Test   | Enfekte olma %'si <sup>d</sup> |                        |
|                     | log <sub>10</sub> pfu                                  | edilen | olma %'si <sup>b</sup> | log <sub>10</sub> pfu           | edilen | Midgut                         | Kafa                   |
| rDEN4               | 3.3                                                    | 6      | 83                     | 3.8                             | 38     | 74                             | 32                     |
|                     | 2.3                                                    | 7      | 57                     | 2.8                             | 15     | 26                             | 6                      |
|                     | 1.3                                                    | 6      | 0                      | 1.8                             | 20     | 10                             | 5                      |
|                     |                                                        |        | MID <sub>50</sub> =2.2 |                                 |        | MID <sub>50</sub> =3.4         | MID <sub>50</sub> ≥4.1 |
| DEN2-NGC            | 2.5                                                    | 5      | 100                    | 4.0                             | 17     | 94                             | 71                     |
|                     | 1.2                                                    | 15     | 93                     | 3.0                             | 25     | 36                             | 16                     |
|                     | 0.2                                                    | 4      | 75                     | 2.0                             | 30     | 0                              | 0                      |
|                     | 0.02                                                   | 8      | 38                     |                                 |        | MID <sub>50</sub> = 3.2        | MID <sub>50</sub> =3.6 |
| rDEN2/4<br>(CME)    | 3.9                                                    | 9      | 11                     | 4.4                             | 11     | 9                              | 0                      |
|                     | 2.9                                                    | 5      | 0                      | 3.4                             | 10     | 0                              | 0                      |
|                     |                                                        |        | MID <sub>50</sub> ≥43  |                                 |        | MID <sub>50</sub> ≥4.9         | Nc <sup>e</sup>        |
| rDEN2/4Δ30<br>(CME) | 3.5                                                    | 6      | 17                     | 4.0                             | 15     | 26                             | 6                      |
|                     | 2.5                                                    | 6      | 17                     | 3.0                             | 10     | 0                              | 0                      |
|                     |                                                        |        | MID <sub>50</sub> ≥3.9 |                                 |        | MID <sub>50</sub> ≥4.3         | MID <sub>50</sub> ≥4.5 |
| rDEN2/4<br>(ME)     | 3.4                                                    | 6      | 100                    | 3.9                             | 23     | 4                              | 0                      |
|                     | 2.4                                                    | 5      | 20                     |                                 |        | MID <sub>50</sub> ≥4.4         | Nc                     |
|                     | 1.4                                                    | 5      | 0                      |                                 |        |                                |                        |
|                     |                                                        |        | MID <sub>50</sub> =2.8 |                                 |        |                                |                        |
| rDEN2/4Δ30<br>(ME)  | 2.6                                                    | 11     | 9                      | 3.1                             | 30     | 0                              | 0                      |
|                     |                                                        |        | MID <sub>50</sub> ≥3.0 |                                 |        | nc                             | Nc                     |

<sup>a</sup> 0.22 µl inokülüm içinde bulunan virüs miktarı.

<sup>b</sup> İnokülasyondan 14 gün sonra hazırlanan kafa dokusu içinde IFA saptanabilir antijene sahip sivrisineklerin yüzdesi.

<sup>c</sup> 2 µl kan yemeği varsayılarak sindirilen virüs titeri.

<sup>d</sup> Oral enfeksiyondan 21 gün sonra hazırlanan midgut veya kafa dokusu içinde IFA saptanabilir antijene sahip sivrisineklerin yüzdesi. Virüs enfeksiyonu saptandığında ancak sindirilen en yüksek virüs dozunda %50 frekansı aşmadığında 10 kat fazla konsantre virüs dozunun, sivrisineklerin %100'ünü enfekte edeceği varsayılarak MID<sub>50</sub> tahmin edildi.

<sup>e</sup>nc = virüs antijeni saptanmadığından hesaplanmadı.

DEN2 yapısal genlerinin rDEN4Δ30 virüsü ile kimerizasyonu, herhangi bir parental virüs ile karşılaştırıldığında Vero hücrelerinde daha düşük replikasyona sahip bir virüs olan rDEN2/4Δ30(CME) ile sonuçlandı. Vero hücresi adaptasyon mutasyonlarını değerlendirmek için (Blaney, J. E. ve arkadaşları, 2002 Virology 300:125-139) bir DEN aşı adayının Vero hücrelerindeki virüs verimini artırma vasıtası olarak seçilen mutasyonlar, bu kimerik virüs içine sokuldu. Buna göre adaptasyon mutasyonlarını taşıyan rDEN2/4Δ30(CME) virüsleri geri kazanıldı, terminal şekilde seyreltildi ve C6/36 hücreleri içinde çoğaltılarak Vero hücreleri içindeki virüs veriminin artırılıp arttırılamadığı belirlendi.

Vero hücresi adaptasyon mutasyonlarını taşıyan rDBN2/4Δ30(CME) virüsleri, şu şekilde üretildi. DNA fragmanları, tekli veya ikili DEN4 Vero hücresi adaptasyon mutasyonlarını kapsayan rDEN4 cDNA yapılarından kesildi ve rDEN2/4Δ30(CME)'nin cDNA klonu içine sokuldu. Vero hücresi adaptasyon mutasyonunun varlığı, sekans analizi ile teyit edildi ve mutant cDNA klonlarından türetilen RNA transkriptleri transfekte edildi, terminal şekilde seyreltildi ve C6/36 hücreleri içinde çoğaltıldı.

Büyüme kinetiklerinin değerlendirilmesi için Vero hücreleri, 0.01'lik bir enfeksiyon katında (MOI) belirtilen virüsler ile enfekte edildi. İkili 25cm<sup>2</sup>'lik doku kültürü şişeleri içinde ortak akışlı hücre mono-tabakaları yıkandı ve üzerlerine belirtilen virüsü ihtiva eden 1 ml'lik inokülüm kaplandı. 37°C'de iki saat süreyle inkübe edildikten sonra hücreler üç kez MEM içinde yıkandı ve %2 FBS ile desteklenmiş 5 ml MEM ilave edildi. 1 ml'lik bir doku kültürü ortamı parçası çıkarıldı, taze ortam ile değiştirildi ve 0. gün zaman noktası olarak tanımlandı. Enfeksiyon sonrası belirtilen zaman noktalarında doku kültür

ortamının 1 ml'lik örnekleri çıkarıldı, santrifüjleme yoluyla arıtıldı ve -80°C'de donduruldu. Virüs replikasyonunun seviyesi, C6/36 hücrelerinde plak titrasyonu yoluyla deneye tabi tutuldu ve immüno-peroksidazlı boyama ile görselleştirildi. Saptama limiti,  $< 0,7 \log_{10}$ PFU/ml idi.

NS4B -7153, -7162, -7163, -7182, NS5 -7630'da tekli Vero hücresi adaptasyon mutasyonları veya mutasyonların üç kombinasyonunu taşıyan rDEN2/4Δ30(CME) virüslerinin büyüme özellikleri, Vero hücrelerinde rDEN2/4Δ30 (CME) virüsü ile karşılaştırıldı (Şekil 10).

Sokulmuş bir Vero hücresi adaptasyon mutasyonu olmadan rDEN2/4Δ30(CME) virüsü verimi,  $4.4 \log_{10}$ PFU/ml'de pik verdi. Her tekli adaptasyon mutasyonu ve kombine mutasyonlar, replikasyonda önemli bir artış verdi. Spesifik olarak rDEN2/4Δ30(CME)-7182,  $7.1 \log_{10}$ PFU/ml'lik en yüksek titere kadar büyüdü, bu da verimde 500 katlık bir artışı. rDEN2/4Δ30(CME)-7162, en düşük verime sahipti, ancak yine rDEN2/4Δ30(CME) virüsünün replikasyon düzeyine göre 125 kat arttı. İki adaptasyon mutasyonunun rDEN2/4Δ30(CME) virüsü içine sokulması, tekli Vero hücresi adaptasyon mutasyonları taşıyan virüslere göre virüs verimini anlamlı düzeyde arttırmadı. Bir Vero hücresi adaptasyon mutasyonunun bu kimerik aşı adayını içine sokulması yoluyla virüs veriminde 500 kata kadar gözlemlenen artış, DEN virüslerinde spesifik replikasyonu teşvik eden sekansların tanımlanmasının ve karakterize edilmesinin değerini ortaya koyar.

Bu sonuçlar, canlı, hafifletilmiş bir dang virüsü aşısının geliştirilmesi için belirli bir anlama sahiptir. İlk olarak kimerizasyonun, rhesus maymunları, HuH7-SCID fareleri ve sivrisineklerde yapılan çalışmalar ile gösterildiği gibi ortaya çıkan virüsün hafifletilmesine yol açtığı açıktır. Bu sonuç, daha önce DEN2/DEN4 veya

DEN1/DEN4 kimerik virüsleri ile yapılan çalışmada (Bray, M. ve arkadaşları, 1996 J Virol 70:4162-6) yapılmamış olmakla birlikte verilerin dikkatli incelenmesi, kimerik virüslerin, vahşi tip ana virüsler ile karşılaştırıldığında maymunlarda daha hafifletilmiş olduklarını ileri  
 5 sürecektir. İkinci olarak  $\Delta 30$  mutasyonu, bu hafifletmeyi kimerik-bağımlı bir tarzda daha da büyütebilir. Spesifik olarak bu örnekte DEN2'nin CME bölgesini taşıyan kimerik virüsler,  $\Delta 30$  ilave edilerek aşırı hafifletilmişken DEN2'nin sadece ME bölgesini taşıyan kimerik virüslerin hafifletme fenotipi,  $\Delta 30$  mutasyonunun ilavesi ile  
 10 değiştirilmedi. Bu beklenmedik bulgu,  $\Delta 30$  mutasyonu gibi paylaşımlı bir hafifletici mutasyon taşıyan, tekli bileşenli virüslerden oluşan bir tetravalent aşıda sadece ME kimerik virüslerin kullanılabileceğini çünkü  $\Delta 30$  mutasyonunu taşıyan CME kimerik virüslerin, rhesus maymunlarında aşırı hafifletilmiş olabileceğini ve insanlarda ancak  
 15 sınırlı immünojeniklik sağlayabileceğini gösterir.

#### ÖRNEK 6

$\Delta 30$  Mutasyonunu İhtiva Eden İntertipik Kimerik DEN3 Virüslerinin Oluşturulması ve Karakterizasyonu

20 DEN4 cDNA'sına dayalı kimerik virüsler üretildi, burada CME veya ME genleri, Endonezya'nın Sleman bölgesinde yaşanan 1978 dang salgınından alınan bir virüs izolatu olan DEN3'ten (Sleman/78) türetilmiş ilgili genler ile değiştirildi (Gubler, D.J. ve arkadaşları, 1981 Am J Trop Med Hyg 30:1094-1099) (Ek 2). DEN2 kimerik virüsleri  
 25 için Örnek 5'te tarif edildiği gibi DEN3'e ait CME kimerik virüsleri, rDEN4 veya rDEN4 $\Delta 30$ 'a ait cDNA'nın BglII / XhoI bölgesinin, DEN3'ten (Sleman/78) türetilen benzer bir bölge ile değiştirilmesi suretiyle üretildi (Şekil 11A). Benzer şekilde ME kimerik virüsleri

yaratmak için rDEN4 veya rDEN4 $\Delta$ 30 için cDNA'nın PstI / XhoI bölgesi, DEN3'ten (Sleman/78) türetilmiş benzer bir bölge ile değiştirildi. Elde edilen bağlantıların nükleotit ve amino asit sekansları, Şekil 11B'de gösterilmiştir. Elde edilen virüslerin genomları, daha önce tarif edildiği gibi geri kazanılmış virüsten izole edilmiş viral RNA'nın sekans analizi ile teyit edildi (Durbin, A.P ve arkadaşları, 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13). Doku kültüründe virüs geçişinden kaynaklanan istem dışı mutasyonlar, tüm virüslerde tanımlandı ve Tablo 34'te sıralandı. Çarpıcı şekilde her virüs, NS4B'de bir yanlış sens mutasyonu ihtiva ediyordu, bu da rDEN4'ten daha önce tanımlanmış bir mutasyona karşılık gelir ve Vero hücrelerinde büyümeye adaptasyon ile bağlantılandırıldı (rDEN4 ve kimerik virüsler arasındaki nükleotit pozisyonlarının korelasyonu için bakınız Tablo 30). Tüm virüsler, Vero hücreleri içinde 5.7 log<sub>10</sub> PFU/ml'nin üzerinde titerlere kadar replike oldu, bu da kimerik virüslerin ve hatta  $\Delta$ 30 mutasyonunu ihtiva edenlerin, hücre kültürü içinde verimli şekilde replike olduklarını gösterir; bu özellik, aşı üretimi için elzemdir.

Tablo 34. Vero hücresinde büyütülen kimerik DEN3/4 virüsleri arasında gözlenen yanlış sens mutasyonları

| Virüs                     | Gen  | Nükleotit pozisyonu | Nükleotid değişimi | Amino asit pozisyonu | Amino asit değişimi |
|---------------------------|------|---------------------|--------------------|----------------------|---------------------|
| rDEN3/4 $\Delta$ 30 (CME) | M    | 825                 | T>C                | 242                  | Phe > Leu           |
|                           | E    | 1641                | C>T                | 514                  | Leu > Phe           |
|                           | E    | 2113                | A>G                | 671                  | Lys > Arg           |
|                           | NS4B | 7159 <sup>a</sup>   | T>C                | 2353                 | Leu > Ser           |

|                                                          |      |                   |     |      |           |
|----------------------------------------------------------|------|-------------------|-----|------|-----------|
| rDEN3/4(ME)                                              | M    | 460               | A>G | 120  | Asp > Gly |
|                                                          | NS4B | 7177 <sup>b</sup> | G>U | 2359 | Gly > Val |
|                                                          | NS5  | 7702              | C>U | 2534 | Ser> Phe  |
| rDEN3/4Δ30<br>(ME)                                       | E    | 1432              | A>U | 444  | Gln > Leu |
|                                                          | NS4B | 7156 <sup>a</sup> | U>C | 2352 | Leu > Ser |
|                                                          | NS5  | 8692              | A>C | 2864 | Asn > His |
| <sup>a</sup> rDEN4'te 7162 ile aynı nükleotit pozisyonu. |      |                   |     |      |           |
| <sup>b</sup> rDEN4'te 7183 ile aynı nükleotit pozisyonu. |      |                   |     |      |           |

Önceki örneklerde tarif edildiği gibi HuH-7 hücrelerinin transplante edildiği SCID fareleri, dang virüsü hafiflemesinin değerlendirilmesi için hassas bir modeldir. Her kimerik DEN3/4 virüsü, SCID-HuH-7 farelerinden oluşan gruplara inoküle edildi ve serum içindeki virüs düzeyleri belirlendi (Tablo 35). Kimerik virüs rDEN3/4 (CME) hafifletilmediğinden geri kalan virüsler, parental virüslerden (rDEN4 ve DEN3-Sleman/78) 40 ile 400 kat arasında daha düşük düzeylerde replike oldu. CME kimerik virüsünde Δ30 mutasyonu, replikasyonda çarpıcı 2.7 log<sub>10</sub>'luk bir azalma sağlar. CME kimerik virüste Δ30 mutasyonu ile verilen bu hafifletme düzeyi, daha önce rDEN4Δ30 için gözlemlenenden çok daha yüksekti. rDEN3/4 (ME) virüsü, herhangi bir ana virüs ile karşılaştırıldığında 100 kat azalmış replikasyona sahipti, bu da ME kimerizasyonunun kendi başına hafifletici olduğunu gösterir. Δ30 mutasyonunun rDEN3/4 (ME)'ye ilavesi, ilave hafifletme ile sonuçlanmadı.

Tablo 35. Dang virüsü tipleri 3 ve 4 arasında kimerizasyon, HuH-7-SCID fareleri için hafifletilmiş rekombinant virüsler ile sonuçlanır



| Virüs <sup>a</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Fare sayısı | Ortalama pik virüs titeri (log <sub>10</sub> pfu/ml±SE) | İstatistik grubu <sup>b</sup> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------|
| rDEN4                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 32          | 6.3 ±0.2                                                | A                             |
| DEN3-Sleman/78                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 23          | 6.4 ± 0.2                                               | A                             |
| rDEN3/4 (CME)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 7           | 6.4 ± 0.6                                               | A                             |
| rDEN3/4Δ30 (CME)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 5           | 3.7 ± 0.4                                               | B                             |
| rDEN3/4 (ME)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 6           | 4.2 ±0.7                                                | B                             |
| rDEN3/4Δ30 (ME)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 7           | 4.7 ± 0.4                                               | A,B                           |
| <sup>a</sup> HuH-7-SCID farelerinden oluşan gruplar, 4.0 log <sub>10</sub> PFU gösterilen virüs ile tümör içine inoküle edildi. Serum, 7. günde toplandı ve virüs titeri, Vero hücrelerinde belirlendi.<br><sup>b</sup> Ortalama pik titerler, Tukey post-hoc testi (P < 0.05) kullanılarak istatistik gruplarına atandı. Aynı harfli tanımlamaya sahip gruplar, anlamdı düzeyde farklı değildir. |             |                                                         |                               |

DEN3 kimerik rekombinant virüslerin ve vahşi tip DEN3 virüsünün maymunlarda replikasyonunun ve immünojenikliğinin değerlendirilmesi, Örnek 5'te tarif edildiği gibi yapıldı. Maymunlarda bu güvenlik ve immünojeniklik çalışmasının sonuçları, Tablo 36'da sunulmuştur. rDEN3/4(CME) ve vahşi tip DEN (Sleman/78) ile inoküle edilen maymunlar, yaklaşık 2 gün süreyle 1.6 ile 1.8 log<sub>10</sub> PFU/ml arasında ortalama pik titeri ile viremikti, bu da DEN3'ün CME yapısal genlerinin kimerizasyonunun, DEN2 kimerizasyonu için gözlemlenen farklı bir şablon olarak virüs replikasyonunun hafifletilmesine yol açmadığını gösterir (Tablo 31). Bununla birlikte ME yapısal genlerinin kimerizasyonu maymunlarda saptanamayan viremi ile hafifletilmiş virüslere yol açmasına rağmen tüm maymunlar, serum antikor düzeylerinde 10 katın üzerinde bir artış ile sero-dönüştürüldü. Hafifletilmiş bir virüs için beklendiği gibi, immün

tepikisi, nötraliie edici antikor titeriyle ölçülen şekilde, wt rDEN3 (Sleman/78) ile inokülasyona kıyasla kimerik virüslerin herhangi biri ile inokülasyondan sonra daha düşüktü, bununla birlikte hayvanları, wt DEN3 virüsü tehdidine karşı korumak için hala yeterince yüksekti (Tablo 37). Δ30 mutasyonunun rDEN3/435(CME)'ye ilavesinin, elde edilen virüs rDEN3/4Δ30 (CME)'yi daha da hafifletebildiği açıktır.

Tablo 36. Δ30 mutasyonu, rhesus maymunları için rDEN3/4(CME)'yi daha da hafifletir

| Virüs <sup>a</sup> | Maymun sayısı | Maymun başına ortalama viremik gün sayısı <sup>b</sup> | Ortalama pik virüs titeri (log <sub>10</sub> pfu/ml ±SE) | Serum nötraliie edici antikor titeri geometrik ortalaması (karşılıklı seyrelti) |         |
|--------------------|---------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|---------|
|                    |               |                                                        |                                                          | 0. Gün                                                                          | 28. Gün |
| DEN3 (Sleman/ 78)  | 4             | 2.3                                                    | 1.8                                                      | <5                                                                              | 707     |
| rDEN3/4 (CME)      | 4             | 2.0                                                    | 1.6                                                      | <5                                                                              | 211     |
| rDEN3/4Δ30 (CME)   | 4             | 0                                                      | <1.0                                                     | <5                                                                              | 53      |
| rDEN3/4 (ME)       | 4             | 0                                                      | <1.0                                                     | <5                                                                              | 70      |
| rDEN3/4Δ30 (ME)    | 4             | 0                                                      | <1.0                                                     | <5                                                                              | 58      |

<sup>a</sup> Rhesus maymunlarından oluşan gruplar, 10<sup>5</sup> log<sub>10</sub>PFU belirtilen virüs ile 1 ml dozda subkütan yoldan inoküle edildi. Serum, 0 ila 6, 8, 10, 12 ve 28. günlerde toplandı. Virüs titeri, Vero hücrelerinde plak deneyi ile belirlendi.

<sup>b</sup> 4. günden sonra hiçbir maymunda viremi saptanmadı.

Tablo 37. rDEN3/4 kimerik virüsler, rhesus maymunlarını wt DEN3 virüs tehdidine karşı korur

| Virüs <sup>a</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Maymun sayısı | rDEN3 tehdidinden sonra maymun başına ortalama viremik gün sayısı | Ortalama pik virüs titeri (log <sub>10</sub> pfu/ml±SE) | Serum nötralize edici antikor titeri geometrik ortalaması (karşılıklı seyrelti) |         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|---------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |               |                                                                   |                                                         | 28. Gün                                                                         | 56. Gün |
| Yapay                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 2             | 5.0                                                               | 2.5 ± 0.4                                               | <5                                                                              | 372     |
| DEN3 (Sleman/ 78)                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 4             | 0                                                                 | <1.0                                                    | 707                                                                             | 779     |
| rDEN3/4 (CME)                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 4             | 0                                                                 | <1.0                                                    | 211                                                                             | 695     |
| rDEN3/4Δ30 (CME)                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 4             | 0.8                                                               | 1.1 ± 0.2                                               | 53                                                                              | 364     |
| rDEN3/4 (ME)                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 4             | 0                                                                 | <1.0                                                    | 70                                                                              | 678     |
| rDEN3/4Δ30 (ME)                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 4             | 0                                                                 | <1.0                                                    | 58                                                                              | 694     |
| <sup>a</sup> Gösterilen virüsler ile birincil inokülasyondan 28 gün sonra rhesus maymunları, 10 <sup>5</sup> log <sub>10</sub> PFU DEN3 (Sleman/78) virüsü ile 1 ml dozda subkütan yoldan tehdit edildi. Serum, 28 ila 34, 36, 38 ve 56. günlerde toplandı. Virüs titeri, Vero hücrelerinde plak deneyi ile belirlendi. |               |                                                                   |                                                         |                                                                                 |         |

Her DEN3/4 kimerik virüsünün sivrisineklerde replikasyon düzeylerini değerlendirmek için Aedes aegypti, virüs ihtiva eden bir kan yemeğinin sindirilmesi suretiyle enfekte edildi (Tablo 38). Ana virüsler rDEN4 ve DEN3 (Sleman/78), Ae. aegypti'yi kolayca enfekte eder. rDEN3/4 kimerik virüslerinin her biri de test edildi. Birçok

durumda virüslerin birkaçının çok düşük enfektivitesine bağlı olarak saptanabilir bir enfeksiyon elde etmek için *Ae. aegypti*'yi yeterli titerde seyreltilmemiş bir virüs stoku ile enfekte etmek mümkün olmadı. Yaklaşık 2.8 - 2.9 log<sub>10</sub>PFU dozunda rDEN4, DEN3  
5 (Sleman/78) ve rDEN3/4(CME), yeterince enfeksiyözdü ve eşit verimlilikle kafaya yayıldı. Geri kalan kimerik virüsler için enfeksiyon, 3.4 log<sub>10</sub>PFU dozunda bile saptanabilir değildi, bu da rDEN3/4(ME) ve rDEN3/4Δ30(CME)'nin replikasyonunun *Ae. aegypti*'de kısıtlı olduğunu gösterir. rDEN3/4(CME) ve  
10 rDEN3/4Δ30(CME)'nin enfektivitesi karşılaştırıldığında Δ30 mutasyonunun sivrisinekler için kimerik virüsü daha da hafifletebildiği açıktır.

Tablo 38. DEN3/4 kimerik virüslerinin, enfeksiyöz bir kan yemeği ile  
15 beslenmiş *Aedes aegypti*'yi enfekte etme yeterliliği

| Test edilen virüs | Sindirilen doz (log <sub>10</sub> pfu) <sup>a</sup> | Test edilen sivrisinek sayısı | Midgut enfeksiyonu sayısı (%) <sup>b, c, d</sup>        | Yayılan enfeksiyon sayısı (%) <sup>e</sup>         |
|-------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| rDEN4             | 3.8<br>2.8<br>1.8                                   | 18<br>20<br>18                | 14 (%77)<br>7 (%34)<br>0<br>MID <sub>50</sub> = 3.4     | 2 (%14)<br>2 (%10)<br>0<br>MID <sub>50</sub> ≥ 4.4 |
| DEN3 (Sleman)     | 2.9<br>1.9                                          | 16<br>10                      | 3 (%18)<br>1 (%10)<br>MID <sub>50</sub> ≥ 3.5           | 2 (%12)<br>0<br>MID <sub>50</sub> ≥ 3.5            |
| rDEN3/4 (CME)     | 3.9<br>2.9<br>1.9                                   | 20<br>18<br>13                | 6 (%30)<br>4 (%22)<br>1 (%7)<br>MID <sub>50</sub> ≥ 4.2 | 2 (%10)<br>0<br>0<br>MID <sub>50</sub> ≥ 4.5       |
| DEN3/4Δ30 (CME)   | 3.3                                                 | 20                            | 0<br>MID <sub>50</sub> ≥ 4.3                            | 0<br>MID <sub>50</sub> ≥ 4.3                       |
| DEN3/4 (ME)       | 3.4                                                 | 15                            | 0                                                       | 0                                                  |
|                   |                                                     |                               | MID <sub>50</sub> ≥ 4.4                                 | MID <sub>50</sub> ≥ 4.4                            |

<sup>a</sup> 2 µ kan yemeği varsayılarak sindirilen virüs miktarı.

<sup>b</sup> Midgut dokusunda saptanabilir dang virüsüne sahip sivrisinek sayısı (yüzdesi); sivrisinekler, beslenmeden 21 gün sonra deneye tabi tutuldu ve dang virüsü antijeni, IFA ile tanımlandı.

<sup>c</sup> Virüs enfeksiyonu saptandığında ancak sindirilen en yüksek virüs dozunda %50 frekansı aşmadığında 10 kat fazla konsantre virüs dozunun, sivrisineklerin %100'ünü enfekte edeceği varsayılarak MID<sub>50</sub> tahmin edildi.

<sup>d</sup> Enfeksiyon saptanmadığında MID<sub>50</sub>'nin, kullanılandan 10 katın üzerinde daha yüksek bir doz olacağı varsayıldı.

<sup>e</sup> Midgut ve kafa dokusunun her ikisinde saptanabilir dang virüsü antijene sahip sivrisineklerin sayısı (yüzdesi).

## ÖRNEK 7

### Δ30 Mutasyonunu İhtiva Eden İntertipik Kimerik DEN1 Virüslerinin Oluşturulması ve Karakterizasyonu

- 5 DEN4 cDNA'sına dayalı kimerik virüsler üretildi, burada CME veya ME genleri, Puerto Rico'da yaşanan 1994 dang salgınından alınan bir virüs izolatu olan DEN1'den (Puerto Rico/94) türetilmiş ilgili genler ile değiştirildi (Ek 3 ve 4). DEN2 kimerik virüsleri için Örnek 4'te
- 10 tarif edildiği gibi DEN1'e ait CME kimerik virüsleri, rDEN4 veya rDEK4Δ30'a ait cDNA'nın BglII / XhoI bölgesinin, DEN1'den (Puerto Rico/94) türetilen benzer bir bölge ile değiştirilmesi suretiyle üretildi (Şekil 12A). Benzer şekilde ME kimerik virüsleri yaratmak için rDEN4 veya rDEN4Δ30 için cDNA'nın PstI / XhoI bölgesi, DEN1'den (Puerto Rico/94) türetilmiş benzer bir bölge ile değiştirildi.
- 15 Elde edilen bağlantıların nükleotit ve amino asit sekansları, Şekil 12B'de gösterilmiştir.

Virüsün transkripsiyonu ve oluşturulması için kimerik cDNA klonları lineerize edildi ve tarif edildiği gibi SP6 RNA polimerazı kullanılarak

bir transkripsiyon reaksiyonunda şablon olarak kullanıldı. Transkriptler, C6/36 hücreleri içine, lipozom aracılı transfeksiyon kullanılarak sokuldu ve rekombinant dang virüsü 7. ile 14. günler arasında toplandı. Virüsler daha sonra Vero hücreleri içinde büyütüldü ve Vero hücrelerinde terminal seyreltme yoluyla biyolojik olarak klonlandı. Tüm virüsler, Vero hücreleri içinde  $6.0 \log_{10}$  PFU/ml'nin üzerinde titerlere kadar replike oldu, bu da kimerik virüslerin ve hatta  $\Delta 30$  mutasyonunu ihtiva edenlerin, hücre kültürü içinde verimli şekilde replike olduklarını gösterir. Doku kültürü içinde virüs geçişinden kaynaklanan istem dışı mutasyonları tanımlamak için genomik sekans analizi şu anda yapılmaktadır.

DEN1/4(CME) ve rDEN1/4 $\Delta 30$ (CME) kimerik virüsünün sivrisineklerde replikasyon düzeylerini değerlendirmek için *Aedes aegypti*, virüs ihtiva eden bir kan yemeğinin sindirilmesi suretiyle enfekte edildi (Tablo 39). Ana virüs rDEN4, *Ae. aegypti*'yi  $4.0 \log_{10}$ PFU'luk bir MID50 ile enfekte eder. Bununla birlikte ana virüs DEN1(Puerto Rico/94), *Ae. aegyptiata*'yı  $3.4 \log_{10}$ PFU'ya kadar olan dozda enfekte edemez. Bu nedenle CME kimerik virüsleri DEN1/4 ve rDEN1/4 $\Delta 30$ , *Ae. aegypti*'yi enfekte edememe özeliğini paylaşır. Bu nedenle *Ae. aegypti*'de  $\Delta 30$  mutasyonunun DEN1/4 kimerik virüslerinin enfektivitesi üzerindeki etkisinin, DEN2/4 ve DEN3/4 kimerik virüsleri için kullanılabilecek benzer şekilde değerlendirilmesine gerek yoktur.

Tablo 39. DEN1/4 kimerik virüslerinin, enfeksiyöz bir kan yemeği ile beslenmiş *Aedes aegypti*'yi enfekte edememesi

| Test edilen virüs     | Sindirilen doz (log <sub>10</sub> pfu) <sup>a</sup> | Test edilen sivrisinek sayısı | Midgut enfeksiyonu sayısı (%) <sup>b, c, d</sup>    | Yayılan enfeksiyon sayısı (%) <sup>e</sup>   |
|-----------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| rDEN4                 | 4.3<br>3.3<br>2.3                                   | 21<br>15<br>20                | 18 (%85)<br>3 (%20)<br>0<br>MID <sub>50</sub> = 4.0 | 8 (%44)<br>0<br>0<br>MID <sub>50</sub> ≥ 4.3 |
| DEN1 (Puerto Rico/94) | 3.4                                                 | 21                            | 0<br>MID <sub>50</sub> ≥ 4.4                        | 0<br>MID <sub>50</sub> ≥ 4.4                 |
| rDEN 1/4 (CME)        | 3.8                                                 | 20                            | 0<br>MID <sub>50</sub> ≥ 4.8                        | 0<br>MID <sub>50</sub> ≥ 4.8                 |
| rDEN1/4Δ30(CME)       | 2.8                                                 | 20                            | 0                                                   | 0                                            |
|                       |                                                     |                               | MID <sub>50</sub> ≥ 3.8                             | MID <sub>50</sub> ≥ 3.8                      |

<sup>a</sup> 2 µl kan yemeği varsayılarak sindirilen virüs miktarı.

<sup>b</sup> Midgut dokusunda saptanabilir dang virüsüne sahip sivrisinek sayısı (yüzdesi); sivrisinekler, beslenmeden 21 gün sonra deneye tabi tutuldu ve dang virüsü antijeni, IFA ile tanımlandı.

<sup>c</sup> Virüs enfeksiyonu saptandığında ancak sindirilen en yüksek virüs dozunda %50 frekansı aşmadığında 10 kat fazla konsantre virüs dozunun, sivrisineklerin %100'ünü enfekte edeceği varsayılarak MID<sub>50</sub> tahmin edildi.

<sup>d</sup> Enfeksiyon saptanmadığında MID<sub>50</sub>'nin, kullanılan 10 katın üzerinde daha yüksek bir doz olacağı varsayıldı.

<sup>e</sup> Midgut ve kafa dokusunun her ikisinde saptanabilir dang virüsü antijene sahip sivrisineklerin sayısı (yüzdesi).

Önceki örneklerde tarif edildiği gibi HuH-7 hücrelerinin transplante edildiği SCID fareleri, dang virüsü hafiflemesinin değerlendirilmesi için hassas bir modeldir. Her kimerik DEN1/4 virüsü, SCID-HuH-7 farelerinden oluşan gruplara inoküle edildi ve serum içindeki virüs düzeyleri belirlendi (Tablo 40). Kimerik virüsler, ana virüsler rDEN4 ve DEN1'den (Puerto Rico/94) 15 ile 250 kat arasında daha düşük düzeylerde replike oldu. CME kimerik virüsleri,  $\Delta 30$  mutasyonuna sahip denk ME kimerik virüslerinden daha fazla hafifletilirken replikasyonda  $0.8 \log_{10}$ 'luk bir azalma sağladı. CME kimerik virüslerinde  $\Delta 30$  mutasyonu ile verilen bu hafifletme düzeyi, daha önce rDEN4 $\Delta 30$  için gözlemlenene benzerdi. Bununla birlikte ME kimerik virüslerinde  $\Delta 30$  mutasyonunun hafifletici etkisi ayırt edilebilir değildir.

Tablo 40. Dang virüsü tipleri 1 ve 4 arasında kimerizasyon, HuH-7-SCID fareleri için hafifletilmiş rekombinant virüsler ile sonuçlanır

| Virüs <sup>a</sup>        | Fare sayısı | Ortalama pik virüs titeri ( $\log_{10}$ pfu/ml $\pm$ SE) | İstatistik grubu <sup>b</sup> |
|---------------------------|-------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------|
| rDEN4                     | 32          | 6.3 $\pm$ 0.2                                            | A                             |
| DEN1 (Puerto Rico/94)     | 4           | 6.4 $\pm$ 0.2                                            | A                             |
| rDEN1/4 (CME)             | 8           | 4.7 $\pm$ 0.2                                            | B,C                           |
| rDEN1/4 $\Delta 30$ (CME) | 6           | 3.9 $\pm$ 0.4                                            | C                             |
| rDEN1/4 (ME)              | 6           | 5.0 $\pm$ 0.2                                            | B                             |
| rDEN1/4 $\Delta 30$ (ME)  | 6           | 5.1 $\pm$ 0.3                                            | B                             |

<sup>a</sup> HuH-7-SCID farelerinden oluşan gruplar,  $4.0 \log_{10}$  PFU gösterilen virüs ile tümör içine inoküle edildi. Serum, 7. günde toplandı ve virüs titeri, Vero hücrelerinde belirlendi.

<sup>b</sup> Ortalama pik titerler, Tukey post-hoc testi ( $P < 0.05$ ) kullanılarak istatistik gruplarına atandı. Aynı harfli tanımlamaya sahip gruplar, anlamlı düzeyde farklı değildir.



## EK 1

DEN2 (Tonga/74) cDNA plazmidi p2'nin nükleotid ve amino asit sekansı

Bazlar 1 ila 10713: DEN2 virüs genomu cDNA'sı

5 Bazlar 97 ila 10269: DEN2 poliprotein ORF'si

Bazlar 97 ila 438: C protein ORF'si

Bazlar 439 ila 936: prM protein ORF'si

Bazlar 937 ila 2421: B protein ORF'si

Bazlar 2422 ila 3477: NS1 protein ORF'si

10 Bazlar 3478 ila 4131: NS2A protein ORF'si

Bazlar 4132 ila 4521: NS2B protein ORF'si

Bazlar 4522 ila 6375: NS3 protein ORF'si

Bazlar 6376 ila 6756: NS4A protein ORF'si

Bazlar 6757 ila 6825: 2K protein ORF'si

15 Bazlar 6826 ila 7569: NS4B protein ORF'si

Bazlar 7570 ila 10269: NS5 protein ORF'si

20

25

[illegible]

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300  
AGTTTGTGTCGACAACTTCTATGATGACAGAAAGATATGSSAAATGGATGTGATATGTTTGTGAAAAGTGAAGCATGTTGACCTGTCCTATGTTTCACATGTA  
AcqPheValCysLysHisSerMetValAspArgGlyTrpGlyAsnGlyCysGlyLeuSerGlyLysGlyGlyIleValThrCysAlaMetPheThrCys>  
1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400  
AAAGAAATATGTAARAAAAATTTGTCTGAGCTGAGAAACCTTGGAAATACACTGTCTGTATAAACACTGATTTCAAGGTAAGAAAGATGCAATGCGAAATGACAC  
LysLysAsnMetGluGlyCysIleValGlnProGlnAsnLeuGluTyrThrValValIleThrProHisSerGlyGluGluHisAlaValGlyAsnAspThr>  
1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500  
AAGAAAGACATGTTAAAGAAATTCAGAGATAACACACACAGAGCTCCACATCACAGAGCGGCAACTTACACAGCTATATGCACTGTTATGATGAGTGGAGTCCCTCCAAAG  
GlyLysHisGlyGlyGlyValValLysIleThrProGlnSerSerIleThrGlnAlaGluGluLeuThrGlyTyrGlyThrValThrMetGluCysSerProArg>  
1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600  
ACGCGCTCCGACTTCAATGAGATATGTTGTCTGCAATATGGAAGACAAAGATTTGGCTGGTGGACAGACCAATGGCTCTAGAGCTACCGTTCCGATGGCTGG  
ThrGlyLeuAspPheAsnGluMetValIleLeuGluIleValLeuGluAspGlyAlaTyrLeuValHisArgGlnTrpPheLeuAspLeuProLeuProTrpLeu>  
1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700  
CCGAGACAGACAGACAAAGATATCAATTTGCAATGAGGAAGAAACACTGGTTCACCTTCAAAATATCTTCATGCTAAAAACAGCATTTTGTGTTTCTATGATATC  
ProGlyAlaAspThrGlnGlySerAsnTrpIleGlnLysGluThrLeuValThrPheLysAsnProHisAlaAlaLysGlyGlnAspValValIleLeuGlySer>  
1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800  
CCAAAGAGGCGGCGATGCTATACAGCACTTCATATGCGGCTATGCGAAATCGATATGATATGAGAAAGCTTTCCTTTACAGGACATCTTCAATTCGAGGCTATGAG  
GlnGluLysAlaMetHisThrAlaLeuThrGlyAlaThrGluIleGluIleValMetSerSerGlyHisLeuLeuPheThrLysIleLeuGlyCysArgCysArg>  
1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900  
ATGCAACAAATTACAAATTAAAGGAGATGCTATACTCTATGTTGCAATGGAAGTTTAAATTTGTGTAAGGAAATAGCAGAAACACACATCGGAACCAATAGTCA  
MetAspLysLeuGluLeuLysGlyMetSerTyrSerMetCysThrGlyLysThrLeuValLeuValLysGluIleHisGluThrLysHisGlyThrIleVal>  
1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000  
TTAGATACACATATGAAAGAGACGGCTCTCCATGCAAGATACCGCTTTTACAGATAATGATATGCGAAAAACACATGCTTTTGGCGCGCGCTGATCAGAGTCAA  
IleArgValGlnTyrGluGlyAspGlySerPheCysLysIleProPheIleLeuPheAspLeuGluLysArgHisValIleLeuGlyArgLeuIleThrValAsn>  
2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100  
CCCAATTTGTAATAGAAAAAGACAGTCTGAGTCAACATACAGACAGCAACACTTCCTGGACAGAGTACATCATCATAGTAAATGAAAGCTGGACCAATTCAGAG  
ProIleValThrGluLysAspSerProValAsnIleGluAlaGluProPheGlyAspSerTyrIleIleIleIleValGluProGlyGlnLeuLys>  
2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200  
CTGACATGTTTCAAGAAAGAAATTTCCATCGCGCAATATTTTGAAGAAACAAATAGAGGAGAGTAAAAAGATGCGCATTTTCTGGTGAACAGAGCTGGCAAT  
LeuAspTrpPheLysLysGlySerSerIleGlyGlnMetPheGluThrThrMetArgGlyAlaLysArgMetAlaIleLeuGlyAspThrAlaTrpAsp>  
2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300  
TTGCACTTTTGGAGAGCTTTTTCATATCAATAGAAAGAGCTCTCCACACAGTTTCTTGGAAAGAAATACAGGCGCTCTTTCAATGAGGCTTTTCAAGTAACTAT  
PheGlySerLeuGlyGlyValPheThrSerIleGlyLysAlaLeuHisGlnValPheGlyAlaGlnTyrGlyAlaAlaPheSerGlyValSerTrpThrMet>  
2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400  
GAAGATCTTCATAGAGATTTATATCATATCAATCAAGAAAGATTAAGTAAGTAAGTAAGTAAGTAAGTAAGTAAGTAAGTAAGTAAGTAAGTAAGTAAGTAAG  
LysIleLeuIleGlyValIleIleThrTrpIleGlyMetAsnSerArgSerThrSerLysSerValSerLeuValLeuValIleValIleValThrLeuTyr>  
2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500  
TTGCAATTTATGCTGCAAGCGGATATGTTGCTGGCTTTGTGAGCTGCAAGAAACAAAGAACTAAAAATGCGGAGTGAATATCTTGCACAGATACAGTCCATTA  
LeuGlyValMetValGlnAlaAspSerGlyCysValValSerTrpLysAsnLysGluLeuLysLysGlySerGlyIlePheValThrAspHisValHis>  
2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600  
CATGACAGACAAATACAAATTCACACAGCAATCTCTTCAAAATGCGCTCAAGTCATCGAAGAGTCAAGAGAGTCAATGAGAGAGTCAATGAGAGAGTCAAT  
ThrTrpThrGluGlnTyrLysPheGlnProGlnSerPheSerGlyLeuHisSerAlaIleGlnLysAlaXleGluGluGlyIleCysGlyIleArgSerVal>  
2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700  
AACAAAGATGAAAAATTTATGTGGAAGACATACATCAAGTAATGGAATATATTTATGAAAGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAA  
ThrArgLeuGluAsnLeuMetTrpLysGluIleIleThrSerGluLeuAsnHisIleLeuSerGluAsnGluValLysLeuThrIleMetThrGlyAspIle>  
2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800  
AAAGAAATCATGCAAGTATGAAAAACATCTTTTGGCGCTCAAGCGCTAGTGAAGTATTCATGCGAAAAACATGGCTAAAGCGAAAAATGCTCTCCACAG  
LysGlyIleMetGlnValGlyLysArgSerLeuArgProGlnProThrGluLeuArgTyrSerTrpLysThrTrpGlyLysAlaLysMetLeuSerThr>  
2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900  
AACTCCACAAATCAGATCTTCTTCAATATGTCCTGCAAGAAAGAAATGCAATGCGGCAATGCAAGAAACAGAGCTGCAATGCAAGAAAGTGGAGTCAAGCTCT  
GluLeuHisGlnGlnThrPheLeuLysAspGlyProGluThrAlaGluCysProAsnThrAsnAlaLeuTrpAsnSerIleGluValGluAspTyrGlyPhe>



[illegible]



[illegible]





[illegible]

DEN3 (Sleman/78) cDNA plazmidi p3'ün nükleotid ve amino asit sekansı

- 5 Bazlar 1 ila 10707: DEN3 virüs genomu cDNA'si  
Bazlar 95 ila 10264: DEN3 poliprotein ORF'si  
Bazlar 95 ila 436: C protein ORF'si  
Bazlar 437 ila 934: prM protein ORF'si  
Bazlar 935 ila 2413: E protein ORF'si  
10 Bazlar 2414 ila 3469: NS1 protein ORF'si  
Bazlar 3470 ila 4123: NS2A protein ORF'si  
Bazlar 4124 ila 4513: NS2B protein ORF'si  
Bazlar 4514 ila 6370: NS3 protein ORF'si  
Bazlar 6371 ila 6751: NS4A protein ORF'si  
15 Bazlar 6752 ila 6820: 2K protein ORF'si  
Bazlar 6821 ila 7564: NS4B protein ORF'si  
Bazlar 7575 ila 10264: NS5 protein ORF'si



[illegible]

[illegible]













[illegible]

DEN1 (Puerto Rico/94) ME kimerik bölgesinin nükleotid ve amino

Bazlar 1 ila 404 (PstI): DEN4

Bazlar 405 (PstI) ila 2345 (XhoI): DEN1

Bazlar 2346 (XhoI) ila 2423: DEN4

Bazlar 102 ila 440: C protein ORF'si

Bazlar 441 ila 938: prM protein ORF'si

Bazlar 939 ila 2423: E protein ORF'si

**CDS**

1610 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500  
GAGATTACGAACAATGGACAACTGTATCAACTTCAAAGTTCTTAAGTTTTAAAATACAGCTCAGCGAATACAGAAGTTTCACATTGQAATGCCTGCC  
RLLThrThrGlutLeuLysIleHisAlaThrPheIleThrProGlnAsnProThrSerArgValIleGluLeuThrAspTyrGlyAlaIleuThrLeuAspCysSer.

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600  
LTAAAGAACGGGGTGCCCATTTAATGAGATGCTGTCTATTGCAACTAAATAAAAAATCATGGCTTTGTCGACAAAATATGTTCTTAGACCTTAACTACTGCTGTG  
ProArgThrGlyLeuAspPheAsnGlnMetValIleuLeuThrMetLysGlnIlysSerTrpLeuValHisiLysGlnTrpPheLeuAspLeuProLeuProTrp.

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700  
GACTTCAGAGAGCTTCACAACTGTARGAGAACTTGTAAATAGACAAAGATTTGGCTGSHICACATTCGAATCACGTTUATDUCAGAGAAATAGAAAGTAAGTACTACTG  
ThiserGlyAlaSerThrSerGlnGluThrTrpAlanGlnAspLeuLeuValThrPheLysIthrAlaHisAlaLysGlyGlnIleuValValValLeu.

1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800  
GGATTACAGGAAAGAGCAATGCACAGCTGTGTTGCTGCGGALAGAAATGAGAGCTTCAGGAAGAGCAAAATCTTTTCAGGAACACTUAATGCAAGAG  
GlySerGlnGLyAlaMetHisThrAlaLeuTerGlyAlaThrGluIleuIleHisSerGlyThrThrThrIlePheAlaGlyXenLeuLysCysArg.

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900  
TAAAAATGGATAAAATGNACITTTAAAGGGAATGTGCATATGTAAATTTGCACAGGCTTCATTTAAGCTAGAGAAAGAAAGTGGCTGTAGAGATAGACCAATTAAGCTGT  
LeuLysMetAspLysLeuThrLeuLysGlyMetSerTyvalMetCynThrGlySerPheLysLeuGlyLysIleuValAlaGluTerGlnIleHisGlyThrVal.

1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000  
TTAGTGTGAGGTTHAAATACGRAGCGAAGACATGGCTATGCAGAAGATCCCCTTTTTCGGGGCAATATGAGAAAGGATGACCACAGAATGCGAATTTGATAACA  
LeuValGlnValLysTyrGluGlyThrAspAlaProtylLysAlaProPheSerAlaGluAspGlnLysGlyValThrGlnAsuGlyArgLeuIleThr.

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100  
GCCAAGCCCCAATGTCATGACAAAATAAAAAGCACTGCACATTCAGACAAATATCCCTCTCTGCAAGAGATATATTTGGTTAGCGGGAGSTGAAAAGAGCTT  
AlaAsnProIleValIleHisAspyeGlnLysProValAsnIleGluThrGlsProProPheGlyGlnSerTyrIleValValGlyAlaGlyGlyLysAla.

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200  
TGAAACTGAGCTGTGTTTCAACAAAAGAGAGSCATAGCAAAATTTCTTCGAAGCAAGCTGSEESAGAGNNDGDARAGATGGCTATCTCTGTGAGACAAAGATG  
LeuTyLeuSerTrpPheLysLysGlyserBerileGlyLysMetPheGluAlaThrAlaAsuGlyAlaArghrgMetAlaIleLeuLysAspThrAlaIsrp.

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300  
GGACTTTTGCTCTATAGAGAGAGGTGTTCACATCAAGTGAGAAAATTGCTACACAGGTTTTCGGAGCCGCATATGGKTTTCCTTCAGGGTGTCTTCCTCO  
AmpPheGlySerIleGlyValPseThrSerValGlyLysLeuValRisGlnValPheGlyAlaAlaCysulyValLeuPheSerullyValSerTrp.

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400  
ACGATGAAAATAGGAATAGGJATTTCGTACATATGCTTAGCAATTAAACTTAGAGAAACATTAAGTGGCTATGACGGDCATACGCTGTGGAGGAAATCACTG  
ThrMetLysIleGlyIleGlyIleLeuLeuThrTrpLeuLysLeuAsnSerArgAsnThrSerMetAlaNatThrCystieAlaValilyG.ylleThr.

2410 2420  
TUTTTTCTGGCTTCACAGCTCAAGCA  
LeuPheLeuGlyPseThrValGlnAla.



1. Tetravalent olan ve dang tipleri 1, 2, 3 ve 4'ün 3' translate edilmemiş bölgesinde bir ortak 30 nükleotit delesyonunu içeren bir immünojenik bileşim olup, bir birinci dang virüsünden en az bir yapısal proteini kodlayan bir birinci nükleotit sekansını ve bir ikinci dang virüsünden alınan yapısal olmayan proteinleri kodlayan bir ikinci nükleotit sekansını ihtiva eden bir nükleik

asidi içerir, burada ikinci dang virüsü, TL2 stem-loop yapısına karşılık gelen dang genomunun 3' translate edilmemiş bölgesinden yaklaşık 30 nükleotitin bir delesyonu ile hafifletirmiştir.

- 5 2. Madde 1'e göre bileşim olup, burada nükleik asit ayrıca, bir fenotipe sahip olan bir mutanti üreten bir mutasyonu içerir, burada fenotip, Vero hücrelerinde ya da insan karaciğer hücre çizgisi HuH-7'de sıcaklık hassasiyetine, sivrisinek hücrelerinde ya da insan karaciğer hücre çizgisi HuH-7'de konak-hücre kısıtlamasına, Vero hücrelerinde iyileştirilmiş replikasyon için konak-hücre adaptasyonuna sahiptir.
3. Madde 1 ya da 2'ye göre bileşim olup, burada birinci dang virüsünün serotipi, ikinci dang virüsünün serotipi ile aynıdır.
4. Madde 3'e göre bileşim olup, burada serotip, tip 1'dir.
- 15 5. Madde 4'e göre bileşim olup, burada delesyon, yaklaşık olarak nükleotitler 10562-10591 arasındaki TL2 stem-loop yapısına karşılık gelen dang tip 1 genomunun 3' translate edilmemiş bölgesinden yaklaşık 30 nükleotitin bir delesyonudur.
6. Madde 3'e göre bileşim olup, burada serotip, tip 2'dir.
- 20 7. Madde 6'ya göre bileşim olup, burada delesyon yaklaşık olarak nükleotitler 10541-10570 arasındaki TL2 stem-loop yapısına karşılık gelen dang tip 2 genomunun 3' translate edilmemiş bölgesinden yaklaşık 30 nükleotitin bir delesyonudur.
8. Madde 3'e göre bileşim olup, burada serotip, tip 3'tür.
- 25 9. Madde 8'e göre bileşim olup, burada delesyon, yaklaşık olarak nükleotitler 10535-10565 arasındaki TL2 stem-loop yapısına karşılık gelen dang tip 3 genomunun 3' translate edilmemiş bölgesinden yaklaşık 30 nükleotitin bir delesyonudur.

10. Madde 3'e göre bileşim olup, burada serotip, tip 4'tür.
11. Madde 10'a göre bileşim olup, burada delesyon, yaklaşık olarak nükleotitler 10478-10507 arasındaki TL2 stem-loop yapısına karşılık gelen dang tip 4 genomunun 3' translate edilmemiş bölgesinden yaklaşık 30 nükleotitin bir delesyonudur.
12. Madde 1 ya da 2'ye göre bileşim olup, burada birinci dang virüsünün serotipi, ikinci dang virüsünün serotipinden farklıdır ve burada nükleik asit, bir nükleik asit kimerasıdır.
13. Madde 12'ye göre bileşim olup, burada delesyona sahip ikinci dang virüsünün serotipi tip 1'dir.
14. Madde 13'e göre bileşim olup, burada birinci dang virüsünün serotipi tip 2'dir.
15. Madde 13'e göre bileşim olup, burada birinci dang virüsünün serotipi tip 3'tür.
16. Madde 13'e göre bileşim olup, burada birinci dang virüsünün serotipi tip 4'tür.
17. 13 ila 16 arasındaki maddelerden herhangi birine göre bileşim olup, burada birinci nükleotit sekansı, birinci dang virüsünün en az iki yapısal proteinini kodlar.
18. Madde 17'ye göre bileşim olup, burada yapısal proteinler, prM ve B proteinleridir.
19. 13 ila 18 arasındaki maddelerden herhangi birine göre bileşim olup, burada delesyon, yaklaşık olarak nükleotitler 10562-10591 arasındaki TL2 stem-loop yapısına karşılık gelen dang tip 1 genomunun 3' translate edilmemiş bölgesinden yaklaşık 30 nükleotitin bir delesyonudur.



20. Madde 12'ye göre bileşim olup, burada delesyona sahip ikinci dang virüsünün serotipi tip 2'dir.
21. Madde 20'ye göre bileşim olup, burada delesyona sahip ikinci dang virüsünün serotipi tip 1'dir.
- 5 22. Madde 20'ye göre bileşim olup, burada delesyona sahip ikinci dang virüsünün serotipi tip 3'tür.
23. Madde 20'ye göre bileşim olup, burada delesyona sahip ikinci dang virüsünün serotipi tip 4'tür.
24. 20 ila 23 arasındaki maddelerden herhangi birine göre bileşim olup, burada birinci nükleotit sekansı, birinci dang virüsünün en az iki yapısal proteinini kodlar.
- 10 25. Madde 24'e göre bileşim olup, burada yapısal proteinler, prM ve E proteinleridir.
26. 20 ila 25 arasındaki maddelerden herhangi birine göre bileşim olup, burada delesyon, yaklaşık olarak nükleotitler 10541-10570 arasındaki TL2 stem-loop yapısına karşılık gelen dang tip 2 genomunun 3' translate edilmemiş bölgesinden yaklaşık 30 nükleotitin bir delesyonudur.
- 15 27. Madde 12'ye göre bileşim olup, burada delesyona sahip ikinci dang virüsünün serotipi tip 3'tür.
- 20 28. Madde 27'ye göre bileşim olup, burada delesyona sahip ikinci dang virüsünün serotipi tip 1'dir.
29. Madde 27'ye göre bileşim olup, burada delesyona sahip ikinci dang virüsünün serotipi tip 2'dir.
- 25 30. Madde 27'ye göre bileşim olup, burada delesyona sahip ikinci dang virüsünün serotipi tip 4'tür.
31. 27 ila 30 arasındaki maddelerden herhangi birine göre bileşim olup, burada birinci nükleotit sekansı, birinci dang virüsünün en

az iki yapısal proteinini kodlar.

32. Madde 31'e göre bileşim olup, burada yapısal proteinler, prM ve B proteinleridir.

5 33. 27 ila 32 arasındaki maddelerden herhangi birine göre bileşim olup, burada delesyon, yaklaşık olarak nükleotitler 10535-10565 arasındaki TL2 stem-loop yapısına karşılık gelen dang tip 3 genomunun 3' translate edilmemiş bölgesinden yaklaşık 30 nükleotitin bir delesyonudur.

10 34. Madde 12'ye göre bileşim olup, burada delesyona sahip ikinci dang virüsünün serotipi tip 4'tür.

35. Madde 34'e göre bileşim olup, burada delesyona sahip ikinci dang virüsünün serotipi tip 1'dir.

36. Madde 34'e göre bileşim olup, burada delesyona sahip ikinci dang virüsünün serotipi tip 2'dir.

15 37. Madde 34'e göre bileşim olup, burada delesyona sahip ikinci dang virüsünün serotipi tip 3'tür.

38. 34 ila 37 arasındaki maddelerden herhangi birine göre bileşim olup, burada birinci nükleotit sekansı, birinci dang virüsünün en az iki yapısal proteinini kodlar.

20 39. Madde 38'e göre bileşim olup, burada yapısal proteinler, prM ve E proteinleridir.

40. 34 ila 39 arasındaki maddelerden herhangi birine göre bileşim olup, burada delesyon, yaklaşık olarak nükleotitler 10478-10507 arasındaki TL2 stem-loop yapısına karşılık gelen dang  
25 tip 4 genomunun 3' translate edilmemiş bölgesinden yaklaşık 30 nükleotitin bir delesyonudur.

41. 1 ila 40 arasındaki maddelerden herhangi birine göre bileşim olup, burada bir ya da daha fazla nükleik asit ya da nükleik asit

kimerası, bir virüsü ya da virüs kimerasını içerir.

42. 1 ila 41 arasındaki maddelerden herhangi birine göre bileşim olup, bir immün yanıtın indüksiyonunda kullanım amaçlıdır.

43. 1 ila 41 arasındaki maddelerden herhangi birine göre bileşimin etkili bir miktarının tatbik edilmesini içeren bir süjdeki bir immün yanıtı indüklemek için bir yöntemdir.

44. Madde 43'e göre yöntem olup, burada süje, bir insandır.

45. 1 ila 41 arasındaki maddelerden herhangi birine göre bileşimi içeren bir tetravalent aşıdır.

46. Dang virüsünün sebep olduğu hastalığın önlenmesinde kullanılmak üzere madde 45'e göre aşıdır.

47. Madde 45'e göre aşının etkili bir miktarının süjeye tatbik edilmesini içeren, bir süjedeki dang virüsünün sebep olduğu hastalığı önlemek için bir yöntemdir.

48. Madde 47'ye göre yöntem olup, burada süje bir insandır.

49. Madde 18, 25, 32 ya da 39'un bileşimini içeren nükleik asit kimerasının kapsit proteinini ve premembran proteinini ayıran klevaj sitesini kodlayan nükleik asidi tamamlayan en az beş nükleotit ya da nükleik asidin tamamlayıcı dizisi ile seçici olarak hibridize olan ya da bunlara sahip olan bir izole edilmiş nükleik asit probu ya da primeridir.

50. Vero hücrelerinde ya da insan karaciğer hücre çizgisi HuH-7'de sıcaklık hassasiyetinden, sivrisinek hücrelerinde ya da insan karaciğer hücre çizgisi HuH-7'de konak-hücre kısıtlamasından, Vero hücrelerinde iyileştirilmiş replikasyon için konak-hücre adaptasyonundan ya da farelerde ya da maymunlarda atenüasyondan meydana gelen gruptan seçilen bir mutasyonu opsiyonel olarak içeren bir bileşim olup, burada

bileşim aşağıdakilerden meydana gelen gruptan seçilen bir elemanı ihtiva eder:

- (1) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,
- 5 (2) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,
- (3) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,
- (4) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,
- (5) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,
- (6) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,
- 10 (7) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,
- (8) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,
- (9) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,
- (10) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,
- (11) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,
- 15 (12) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,
- (13) rDBN1 $\Delta$ 30, rDBN2 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,
- (14) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,
- (15) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,
- (16) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,
- 20 (17) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,
- (18) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3A30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,
- (19) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3A30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,
- (20) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,
- (21) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,
- 25 (22) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,
- (23) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,
- (24) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,
- (25) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,

- (26) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (27) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (28) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (29) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 5 (30) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (31) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (32) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (33) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 (34) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 10 (35) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (36) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (37) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 (38) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (39) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 15 (40) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (41) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 (42) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (43) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (44) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 20 (45) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 (46) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (47) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (48) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (49) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 25 (50) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (51) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (52) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (53) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,

- (54) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (55) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (56) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (57) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 5 (58) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (59) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (60) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (61) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 (62) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 10 (63) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (64) rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (65) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 (66) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (67) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 15 (68) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (69) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 (70) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (71) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (72) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 20 (73) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 (74) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (75) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (76) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (77) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 25 (78) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (79) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (80) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (81) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,

- (82) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (83) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (84) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (85) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 5 (86) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (87) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (88) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (89) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 (90) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 10 (91) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (92) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (93) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 (94) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (95) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 15 (96) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/1 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (97) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 (98) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (99) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (100) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 20 (101) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 (102) rDBN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (103) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (104) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (105) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 25 (106) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (107) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (108) rDEM1/2 $\Delta$ , rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$   
 (109) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,

- (110) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (111) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/4A30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (112) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/3 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (113) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3A30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 5 (114) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (115) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/4A30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (116) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (117) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 (118) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 10 (119) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (120) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (121) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 (122) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/4A30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (123) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 15 (124) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$  rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (125) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 (126) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (127) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (128) rDEN1/2 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3/4 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 20 (129) rDEN1/3 $\Delta$ 30, rDEN2A30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 (130) rDEN1/3A30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (131) rDEN1/3 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (132) rDEN1/3 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (133) rDEN1/3 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,  
 25 (134) rDEN1/3 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/1 $\Delta$ 30,  
 (135) rDEN1/3 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/2 $\Delta$ 30,  
 (136) rDEN1/3 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/1 $\Delta$ 30, rDEN4/3 $\Delta$ 30,  
 (137) rDEN1/3 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30, rDEN3/2 $\Delta$ 30, rDEN4 $\Delta$ 30,



- (138) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (139) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (140) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (141) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,  
 5 (142) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4A30, rDEN4/1Δ30,  
 (143) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (144) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (145) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,  
 (146) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3A30, rDEN4/1Δ30,  
 10 (147) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (148) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3A30, rDEN4/3Δ30,  
 (149) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,  
 (150) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (151) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 15 (152) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (153) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,  
 (154) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (155) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (156) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3A30,  
 20 (157) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,  
 (158) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4A30, rDEN4/1Δ30,  
 (159) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (160) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (161) rDEN1/3Δ30, rDEN4/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,  
 25 (162) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (163) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (164) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (165) rDEN1/3Δ30, rDEN4/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,

- (166) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (167) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (168) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (169) rDEN1/3Δ30, rDEN4/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,  
 5 (170) rDEN4/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (171) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (172) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (173) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,  
 (174) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 10 (175) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (176) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (177) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,  
 (178) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (179) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 15 (180) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (181) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,  
 (182) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (183) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (184) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 20 (185) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,  
 (186) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (187) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (188) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (189) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,  
 25 (190) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (191) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (192) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (193) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,

- (194) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (195) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (196) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (197) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,  
 5 (198) rDEN/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (199) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (200) rDEN/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (201) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,  
 (202) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 10 (203) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (204) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (205) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,  
 (206) rDEN1/4Δ30, rDEN2A30, rDEN3/4A30, rDEN4/1Δ30,  
 (207) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 15 (208) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (209) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,  
 (210) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (211) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (212) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 20 (213) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,  
 (214) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (215) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (216) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30; rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (217) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,  
 25 (218) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (219) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (220) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (221) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,

- (222) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (223) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4A30, rDEN4/2Δ30,  
 (224) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (225) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,  
 5 (226) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (227) rDEN1/4Δ30, rDEN4/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (228) rDEN1/4Δ30, rDEN4/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (229) rDEN1/4Δ30, rDEN4/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,  
 (230) rDEN1/4Δ30, rDEN4/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 10 (231) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (232) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (233) rDEN1/4Δ30, rDEN4/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,  
 (234) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (235) rDEN1/4Δ30, rDEN4/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 15 (236) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (237) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4A30, rDEN4Δ30,  
 (238) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (239) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (240) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 20 (241) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4A30,  
 (242) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (243) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (244) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3A30, rDEN4/3Δ30,  
 (245) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,  
 25 (246) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,  
 (247) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,  
 (248) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,  
 (249) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,

(250) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,

(251) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,

(252) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,

(253) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,

5 (254) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,

(255) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,

ve

(256) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30.

10

15

20

25

## SEKANS LİSTESİ

- 5 <110> The Government of the United States of America, as represented by the Secretary, Health and Human Services
- 10 <120> DANG TİPLERİ 1, 2, 3 VE 4'ÜN 3'-UTR'SİNDE ORTAK 30 NÜKLEOTİDLİK BİR DELESYON İHTİVA EDEN DANG TETRAVALENT AŞISI VEYA ANTİJENİK KİMERİK DANG VİRUSLERİ 1, 2, 3 VE 4
- <130> K2825 EP/1 S3
- <150> US 60/377,860
- <151> 2002-05-03
- 15 <150> US 60/436,500
- <151> 2002-12-23
- <160> 53
- 20 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
- <211> 82
- 25 <212> RNA
- <213> Dang 1 virüsü
- <400> 1
- ```

gcagcagcgg ggcccaacac caggggaagc uguaccucgg ugguaaggac uagagguuag 60
aggagacccc ccgcaacaac aa                                     82

```
- 30 <210> 2
- <211> 84
- <212> RNA
- 35 <213> Dang 2 virüsü
- <400> 2
- ```

agcaacaau gggggccaag gugagaugaa gcuguagucu cacuggaagg acuagagguu 60
agaggagacc ccccaaaaac aaa                                     84

```
- 40 <210> 3
- <211> 83
- <212> RNA
- <213> Dang 3 virüsü
- 45 <400> 3
- ```

gcagcagcgg ggcccagcgc cugaggggaag cuquaccucc uugcaaagga cuagagguua 60
gaggagaccc cccgcaaua aaa                                     83

```
- <210> 4
- <211> 83

<212> RNA  
 <213> Dang 4 virüsü  
 <400> 4

5      **agcaaaaggg ggcccgaagc caggaggaag cuguacuccu gguggaagga cuagagguua 60**  
          **gaggagaccc ccccaacaca aaa 83**

10      <210> 5  
          <211> 16  
          <212> RNA  
          <213> Suni Sekans

15      <220>  
          <223> Dang 1 delta 30

<400> 5  
 ggggcccaag acuaga      16

20      <210> 6  
          <211> 16  
          <212> RNA  
          <213> Suni Sekans

25      <220>  
          <223> Dang 2 delta 30

<400> 6  
 ggggcccaag acuaga      16

30      <210> 7  
          <211> 16  
          <212> RNA  
          <213> Suni Sekans

35      <220>  
          <223> Dang 3 delta 30

<400> 7  
 ggggcccaag acuaga      16

40      <210> 8  
          <211> 16  
          <212> RNA  
          <213> Suni Sekans

45      <220>  
          <223> Dang 4 delta 30

50      <400> 8 16  
          ggggcccaag acuaga      16

55      <210> 9  
          <211> 51  
          <212> DNA  
          <213> Suni Sekans

<220>  
 <223> P2 plazmidinin TL2 bölgesi

60      <400> 9  
          tgggggccca aggtgagatg aagctgtagt ctactggaa ggactagagg t      51

<210> 10  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Suni Sekans  
 5  
 <220>  
 <223> P2 delta 30'un TL2 bölgesi  
 <400> 10  
 10 tgggggcccc agactagagg t 21  
 <210> 11  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 15 <213> Suni Sekans  
 <220>  
 <223> P3 plazmidinin TL2 bölgesi  
 20 <400> 11  
 cgggggcccc gctctgaggg aagctgtacc tcctgcaaa ggactagagg t 51  
 <210> 12  
 <211> 20  
 25 <212> DNA  
 <213> Suni Sekans  
 <220>  
 <223> P3 delta 30'un TL2 bölgesi  
 30 <400> 12  
 ggggggccccaa gactagaggt 20  
 <210> 13  
 35 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Suni Sekans  
 <220>  
 40 <223> P3'te SpeI linker  
 <400> 13  
 actagttaga ctaacttaag tcaactagt 29  
 45 <210> 14  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Suni Sekans  
 50 <220>  
 <223> rDEN2/4 bağlantısı 1  
 <400> 14  
 55 cagtttgttt gaatagagag cagatctctg atgaataacc aacgaaaaa g 51  
 <210> 15  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 60 <213> Suni Sekans



<220>  
 <223> rDEN2/4 bağlantısı 1  
 <400> 15

Met Asn Asn Gln Arg Lys Lys  
 1 5

5 <210> 16  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Suni Sekans

10 <220>  
 <223> rDEN2/4 bağlantısı 2

<400> 16  
 attatcacat ggataggaat gaactcgagg aacactcaa tggctatgac g 51

15 <210> 17  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Suni Sekans

20 <220>  
 <223> rDEN2/4 bağlantısı 2

25 <400> 17

Ile Ile Thr Trp Ile Gly Met Asn Ser Arg Asn Thr Ser Met Ala Met  
 1 5 10 15  
 Thr

<210> 18  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Suni Sekans

<220>  
 <223> rDEN2/4 bağlantısı 3

35 <400> 18  
 atcttgaacg ggagaaaaag gtctgcaggc atgataccta tgctgattcc a 51

40 <210> 19  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Suni Sekans

<220>  
 <223> rDEN2/4 bağlantısı 3

<400> 19

Ile Leu Asn Gly Arg Lys Arg Ser Ala Gly Met Ile Ile Met Leu Ile  
 1 5 10 15  
 Pro

50 <210> 20  
 <211> 50

<212> DNA  
 <213> Suni Sekans  
 <220>  
 <223> rDEN3/4 bağlantısı 1  
 5  
 <400> 20  
 cagtttggtt gaatagagag cagatctctg gaaaaatgaa caaccaacgg 50  
 <210> 21  
 10 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Suni Sekans  
 <220>  
 15 <223> rDEN3/4 bağlantısı 1  
 <400> 21  
 Met Asn Asn Gln Arg  
 1 5  
 20 <210> 22  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Suni Sekans  
 25 <220>  
 <223> rDEN3/4 bağlantısı 2  
 <400> 22  
 cttttaacct ggataggggtt gaactcgagg aacacttcaa tggctatgac g 51  
 30 <210> 23  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Suni Sekans  
 35 <220>  
 <223> rDEN3/4 bağlantısı 2  
 <400> 23  
 40  
 Leu Leu Thr Trp Ile Gly Leu Asn Ser Arg Asn Thr Ser Met Ala Met  
 1 5 10 15  
 Thr  
 <210> 24  
 <211> 51  
 45 <212> DNA  
 <213> Suni Sekans  
 <220>  
 <223> rDEN3/4 bağlantısı 3  
 50 <400> 24  
 atcttgaacg ggagaaaaag gtctgcagtc tgtctcatga tgatgttacc a 51  
 <210> 25

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Suni Sekans

5 <220>  
 <223> rDEN3/4 bağlantısı 3

<400> 25

Ile Leu Asn Gly Arg Lys Arg Ser Ala Val Cys Leu Met Met Met Leu  
 1 5 10 15  
 Pro

10

<210> 26  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Suni Sekans

15 <220>  
 <223> rDEN1/4 bağlantısı 1

20 <400> 26  
 cagttgttt gaatagagag cagatctctg gaaaaatgaa caaccaacgg 50

<210> 27  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Suni Sekans

25 <220>  
 <223> rDEN1/4 bağlantısı 1

30 <400> 27

Met Asn Asn Gln Arg  
 1 5

<210> 28  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Suni Sekans

35 <220>  
 <223> rDEN1/4 bağlantısı 2

<400> 28  
 ctgctgacat ggctaggatt aaactcgagg aacactcaa tggctatgac g 51

45 <210> 29  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Suni Sekans

50 <220>  
 <223> rDEN1/4 bağlantısı 2

<400> 29

Leu Leu Thr Trp Leu Gly Leu Asn Ser Arg Asn Thr Ser Met Ala Met  
1 5 10 15  
Thr

5

<210> 30  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> Suni Sekans

10

<220>  
<223> rDEN1/4 bağlantısı 3

<400> 30  
15 atcttgaacg ggagaaaaag gtctgcagcc atgtctctca tgctgtgcc c 51

<210> 31  
<211> 17  
<212> PRT  
20 <213> Suni Sekans

<220>  
<223> rDEN1/4 bağlantısı 3

25 <400> 31

Ile Leu Asn Gly Arg Lys Arg Ser Ala Ala Met Leu Leu Met Leu Leu  
1 5 10 15  
Pro

<210> 32  
<211> 60  
30 <212> RNA  
<213> Dang 4 virüsü

<400> 32  
35 ccaacaaccu ugacagcauc cuuagucaug cuuuuagucc auuagcaau aaaggccca 60

<210> 33  
<211> 20  
<212> PRT  
40 <213> Dang 4 virüsü

<400> 33

Pro Thr Thr Leu Thr Ala Ser Leu Val Met Leu Leu Val His Thr Ala  
1 5 10 15  
Ile Ile Gly Pro  
20

<210> 34  
45 <211> 60  
<212> RNA  
<213> Dang 1 virüsü

<400> 34  
 5 ccgcugacgc ugacagcggc gguauuuuug cuaguggcuc auuauGCCAU aaugggaccc 60  
 <210> 35  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 10 <213> Dang 1 virüsü  
 <400> 35  
  
 Pro Leu Thr Leu Thr Ala Ala Val Pro Met Leu Val Ala His Thr Ala  
 1 5 10 15  
 Ile Ile Gly Pro  
 20  
 <210> 36  
 15 <211> 60  
 <212> RNA  
 <213> Dang 2 virüsü  
 <400> 36  
 20 ccuaaaaccc ucacagcggc ucuucuuuuu uugguagcac auuauGCCAU cauaggaccg 60  
 <210> 37  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 25 <213> Dang 2 virüsü  
 <400> 37  
  
 Pro Ile Thr Leu Thr Ala Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala His Thr Ala  
 1 5 10 15  
 Ile Ile Gly Pro  
 20  
 <210> 38  
 30 <211> 60  
 <212> RNA  
 <213> Dang 3 virüsü  
 <400> 38  
 35 ccacuaacuc ucacagcggc aguucuccug cuagucacgc auuauGCCAU uauaggucca 60  
 <210> 39  
 <211> 20  
 40 <212> PRT  
 <213> Dang 3 virüsü  
 <400> 39  
  
 Pro Leu Thr Leu Thr Ala Ala Val Leu Leu Leu Val Thr His Thr Ala  
 1 5 10 15  
 Ile Ile Gly Pro  
 20  
 45

```

    <210> 40
    <211> 13
    <212> DNA
5    <213> Suni Sekans

    <220>
    <223> primer

    <400> 40
10    ccaacgggcgc cgt      13

    <210> 41
    <211> 10
    <212> DNA
15    <213> Suni Sekans

    <220>
    <223> primer

20    <400> 41
    aaggcctgga      10

    <210> 42
    <211> 12
    <212> DNA
25    <213> Suni Sekans

    <220>
    <223> primer

30    <400> 42
    tatccccggg ac      12

    <210> 43
    <211> 11
    <212> DNA
35    <213> Suni Sekans

    <220>
    <223> primer

    <400> 43
    agagctctct c      11

45    <210> 44
    <211> 15
    <212> DNA
    <213> Suni Sekans

50    <220>
    <223> primer

    <400> 44
55    gaatctccac ccgga      15

    <210> 45
    <211> 10
    <212> DNA
    <213> Suni Sekans

60    <220>
    <223> primer

    <400> 45

```

ctgtcgaatc 10

5 <210> 46  
<211> 15159  
<212> DNA  
<213> Suni Sekans  
  
10 <220>  
<223> Dang 2 plazmid p2  
  
<400> 46

15

20

25

```

agttgttagt ctacgtggac cgacaaagac agattctttg agggagctaa gctcaacgta 60
gttctaactg ttttttgatt agagagcaga tctctgatga ataaccaacg gaaaaaggcg 120
agaaacacgc ctttcaatat gctgaaacgc gagagaaacc gcgtgtcaac tgtacaacag 180
ttgacaaaga gattctcact tggnaatgctg cagggaacgag gaccactaaa attgttcatg 240
gccctggtgg cattcctctg tttcctaaca atcccaccna caggcagggaL attaaaaaga 300
tggggaacaa ttaaaaaatc aaaggctatt aatgttctga gaggcttcag gaaagagatt 360
ggaaggatgc tgaatatctt aaacaggaga cgtagaactg taggcatgat catcatgctg 420
actccaacag tgatggcgtt tcatctgacc acacgcaacg gagaaccaca catgattgtc 480
agtagacaaag aaaaaaggaa aagccttctg ttcaagacaa aggatggcac gaacatgtgt 540
acctcatggt ccatggacct tggtgagttg tgtgaagaca caatcacgta tauatgtcct 600
tttctcaagc agaacgaacc agaagacata gattgttggg gcaactccac gtccacatgg 660
gtaacttatg ggacatgtac caccacagga gagcacagaa gagaaaaaag atcagtggcg 720
cttgttccac acgtgggaat gggattggag acacgaactg aaacatggat gtcacagaa 780
ggggcctgga aacatgccca gagaattgaa acttggattc tqagatcc aggtcttacc 840
ataatggccg caatcctggc atacaccata gggacgacgc atttccaaag agtcttgata 900
ttcatcctac tgacagccat cgtccttca atgacaatgc gctgcatagg aatatcaaat 960
agggactttg tggaggagt gtcaggaggg agttgggttg acatagtttt agaacatgga 1020
agttgtgtga cgucgatggc aaaaaacaaa ccaacactgg actttgaact gataaaaaa 1080
gaagccaaac aacctgccac cttaagggaag tactgtatag aggccaaact gaccaaacag 1140
acaacagact cgcgtgccc aacacaaggg gaacccacc tgaatganga gcaggacaaa 1200
aggtttgtct gcaaacatlc catggttagac agaggatggg gaaatgcatg tggattttt 1260
ggaaaaggag gcatcgtgac ctgtgctatg ttcacatgca aaaagaacat ggaaggaaaa 1320
attgtgcagc cagaaaacct ggaatacact gtcgtgataa cactcattc aggggaagaa 1380
catgcagtgg gaaatgacac aggaaaacat ggtaaagaag tcaagataac accacagagc 1440
tccatcacag agggggaact gacaggctat ggcactgtta cgatggagtg ctctccaaga 1500
acgggctctg acttcaatga gatgggtgtg ctgcaaatgg aagacaaagc ctggctgggtg 1560
cacagacaat ggttcctaga cctaccgttg ccatggctgc ccggagcaga cacacaagga 1620
tcaaatggga tacagaaaga aacactggtc acctcaaaa atcccatgc gaaaaaacag 1680
gatgttgttg tcttaggac ccaagagggg gccatgcata cagcactcac aggggctacg 1740
gaaatccaga tgtcatcagg aaacctgtctg ttcacaggac atctcaagtg caggctgaga 1800
atggacaaat tacaacttaa agggatgtca tactccatgt gcacaggaaa gtttaaaatt 1860
gtgaaggaaa tagcagaac acaaacatgga acaatagtc ttagagtlaca atatgaagga 1920
gacggctctc catgcaagat cccctttgag ataattggatc tggaaaaaag acatgttttg 1980
ggccgcctga tcacagtcaa ccaattgtta acagaaaagg acagtccagt caacatagaa 2040
gcagaacctc cattcggaga cagctacatc atcataggag tggaaaccag acaattgaag 2100
ctggactggt tcaagaaagg aayttccatc ggccaaatgt ttgagacaac aatgagggga 2160
gcgaaaagaa tggccatttt gggtgacaca gcctgggatt ttggatctct gggaggagtg 2220
ttcacatcaa taggaaaggc tctccaccag gtttttggag caatctacgg ggctgctttc 2280
agtgggtct catggactat gaagatcctc ataggagtta tcatcacatg gntaggaatg 2340
aactcacgta gcaactgtct gagcgtgtca ctggtgttag tgggaatcgt gacactttac 2400
ttgggagtta tgggtgcaggc cgatagtggg lycgttgtga gclggaaaga caaagaacta 2460
aatgtggca gtggaatatt cgtcacagat aacgtgcata catggacaga acaatacaag 2520
ttccaaccag aatccccctc aaaactggcc tcaqccatcc agaaagcgca tgaagagggc 2580
atctgtgaa tccgctcagt aacaagactg gaaaatctta tgtggaaca gataacatca 2640
gaattgaatc atattctatc agaaaatgaa gtgaaactga ccatcatgac agggacatc 2700
aaaggaatca tgcaggtagg aaacgatct ttgcggctc aaccactga gttgaggat 2760
tcatgaaaa catggggtaa agcgaatag ctctccacag aactccaca tcagacctc 2820
ctcattgatg gtcccgaac agcagaatgc cccaacacaa acagagcttg gaattcactg 2880
gaagttgagg actacggctt tggagtattc actaccaata tatggctaag attgagagaa 2940
aagcaggatg tattttgtga ctcaaaactc atgtcagcgg ccataaagga caacagagcc 3000
gtccatgctg atatgggtta ttggatagaa agcgcactca atgatacatg gaagatagag 3060
aaagcttctt cattgaagt caaaagtgc cactggccaa agtcacacac cctatggagt 3120
aatggagtgc tagaaagcga gatggtcatt ccaagaat tccgtggacc agtgtcacaa 3180
cataataaca gaccaggcta ttacacacaa acagcaggac cttggcatct aggcaagctt 3240

```



|             |             |             |             |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| gagatggact  | ttgatattctg | cgaaggggact | acagtggtgg  | tcaatcgagaa | ctgtgggaac  | 3300 |
| agagggccct  | ctttaagaac  | aaccactgcc  | tcaggaaaac  | tcataacgga  | atgggtgtgt  | 3360 |
| cgatcttgca  | cactaccacc  | actaagatac  | agaggtgagg  | atggatgttg  | gtacgggatg  | 3420 |
| gaaatcagac  | cattgaaaga  | gaaagaagaa  | aatctggtea  | gttctctgg   | tacagccgga  | 3480 |
| catgggcaga  | ttgacaattt  | ctcattagga  | atcttgggaa  | tggcactgtt  | ccttgaagaa  | 3540 |
| atgctcagga  | ctcgagtagg  | aacaaaacat  | gcaatattac  | tcgtcgcagt  | ttctttctgt  | 3600 |
| acgctaatac  | cagggaaacat | gtctttttaga | gacctgggaa  | gagtgatgg   | tatgggtggg  | 3660 |
| gccaccatga  | cagatgacat  | aggcatgggt  | gtgacttata  | tcgtctact   | agcagctttt  | 3720 |
| agagtacagc  | caacctttgc  | agctggactg  | ctcttgagaa  | aactgacctc  | caagggaatta | 3780 |
| atgatgacta  | ccataggaat  | cgttctttctc | tcccagagta  | gcataccaga  | gaccattctt  | 3840 |
| gaactgaccg  | acgcgttagc  | tctaggcatg  | atggctctca  | agatggtyag  | aaacatggau  | 3900 |
| aaatatcagc  | tggcagtgac  | catcatggct  | atthtctg    | tcccaaatgc  | tgtgatatta  | 3960 |
| cagaacgcac  | ggaaagttag  | ttgcacaata  | ttggcagtg   | tgctgtttc   | ccccgtctc   | 4020 |
| ttaacatcct  | cacaacagaa  | agcggactgg  | ataccattag  | cgttgacgat  | caaaggtctt  | 4080 |
| aatccaacag  | ccatttttct  | aacaacctc   | tcaagaacca  | acaagaaaag  | gagctggcct  | 4140 |
| ttaaatgagg  | ccatcatggc  | ggttgggatg  | gtgagtatct  | tggccagctc  | tctcttaaa   | 4200 |
| aatgacatcc  | ccatgacagg  | accatttagt  | gctggagggc  | tccttactgt  | gtgctacgtg  | 4260 |
| ctaactgggc  | ggtcagccga  | tctggaatta  | gagagagcta  | ccgatgtcaa  | atgggatgac  | 4320 |
| caggcagaga  | tatcaggtag  | cagtcacatc  | ctgtcaataa  | caatatcaga  | agatggcagc  | 4380 |
| atgtcaataa  | agaaatgaaga | ggaaagagcaa | acactgacta  | tactcattag  | aacaggattg  | 4440 |
| cttgtgatct  | caggactctt  | tccggtatca  | ataccaatta  | cagcagcagc  | atgggtatctg | 4500 |
| tgggaagtta  | agaaacaacg  | ggctggagt   | ctgtgggatg  | tccctcacc   | accaccctg   | 4560 |
| ggaaaagctg  | aatttgaaga  | tggagcctac  | agaatcaagc  | aaaaagggaat | ccttggatat  | 4620 |
| tcccagatcg  | gagctggagt  | ttacaaagaa  | ggaacatttc  | acacaatgtg  | gcacgtcaca  | 4680 |
| cgtggcgctg  | tcctaattgca | taaggggaa   | aggattgaac  | catcatgggc  | ggacgtcaag  | 4740 |
| aaagacttaa  | tatcatatgg  | aggaggttgg  | aagctagaag  | gagaatggaa  | agaaggagaa  | 4800 |
| gaagtccagg  | tcttggcatt  | ggagccagg   | aaaaatccaa  | gagccgtcca  | aacaaagcct  | 4860 |
| ggccttttct  | gaacccaac   | tggaaacata  | gggtgcctat  | ctctggaact  | ttcccttggg  | 4920 |
| acgtcaggat  | ctccaatcgt  | cgacaaaaaa  | ggaaaagtgt  | taggtctcta  | tggcaatgg   | 4980 |
| gtcgttacaa  | ggagtggagc  | atatgtgagt  | gccatagctc  | agactgaaaa  | aagcattgaa  | 5040 |
| gcacattccg  | agattgaaga  | tgacatcttt  | tcgaaagagaa | gattgactat  | catggattctc | 5100 |
| caccacaggag | caggaaagac  | aaagagatac  | ctcccgccca  | tagtcagaga  | ggccataaaa  | 5160 |
| agaggtctga  | gaacactaat  | cctagccccc  | actagagctg  | tggcagctga  | aatggaggaa  | 5220 |
| gcctcttagag | gacttccaat  | aagataccaa  | actccagcta  | tcagggtctga | gcacaccggg  | 5280 |
| cgggagattg  | tagacttaat  | gtgtcatgcc  | acatttacca  | tgaggttgct  | atcaccaatc  | 5340 |
| aggggtgcct  | attacaacct  | gatcatcatg  | gcgaagccc   | atthttacaga | tccagcgaag  | 5400 |
| atagcagcta  | ggggatcacat | ctcaactcga  | gtggagatgg  | gggaggcagc  | tggaaattttt | 5460 |
| atgacagcca  | ctctccggg   | tagtagagat  | ccatttctct  | agagcaatgc  | accaattatg  | 5520 |
| gacgaagaaa  | gagaaattcc  | ggaacgttca  | tggaaactct  | ggcacgagtg  | ggtcacggat  | 5580 |
| tttaaaggaa  | agactgtctg  | gtttgttcca  | agcataaaaa  | ccggaaatga  | catagcagcc  | 5640 |
| tgcctgagaa  | agaatggaaa  | gagggtgata  | cuactcagta  | ggaagacctt  | tgattctgaa  | 5700 |
| tatgtcaaga  | ctagaaccaa  | tgactgggat  | tcgtgggtta  | caactgacat  | ctcggaaatg  | 5760 |
| ggcgccaact  | ttaaagctga  | gagggtcata  | gaacccagac  | gctgcatgaa  | accagttata  | 5820 |
| ttgacagacg  | gcgaagagcg  | ggtgattctg  | gcaggaccca  | tgccagtqac  | ccactctagt  | 5880 |
| gcagcacaaa  | gaagaggag   | aatagggaag  | aatccaagga  | atgaaaatga  | tcaatatata  | 5940 |
| tatatggggg  | aaccactgga  | aatgatgaa   | gactgtgcgc  | actggaagga  | agctaagatg  | 6000 |
| ctcctagata  | atatcaaac   | acctgaagga  | atcattccca  | qcttgttcga  | gccagagcgt  | 6060 |
| gaaaagggtg  | atgccattga  | cgggtgaatat | cgcttgagag  | gagaagcacg  | gaaaactttt  | 6120 |
| gtggacctaa  | tgagaagagg  | agacctacca  | gtctgggttg  | cttataaagt  | ggcagctgaa  | 6180 |
| ggatcaact   | acgcagacag  | aagatgggtg  | tttgacggaa  | ccagaaacaa  | tcaaactctg  | 6240 |
| gaagaaaatg  | tggaaagtga  | aatctggaca  | aagggaagg   | aaaaggaaaa  | attgaaacct  | 6300 |
| agatgggttag | atgctaggat  | ctactccgac  | ccactggcgc  | taaaagagtt  | caagggaattt | 6360 |
| gcagccggaa  | gaaagtccct  | aacctgaac   | ctaattacag  | agatgggcag  | actcccaact  | 6420 |
| tttatgactc  | agaaggccag  | agatgcacta  | gacaacttgg  | cggtgctgca  | cacggctgaa  | 6480 |
| gcgggtggaa  | aggcatacaa  | tcatgctctc  | agtgaattac  | cggagaccct  | ggagacattg  | 6540 |

```

cttttgcgtga cactgttggc cacagtcacg ggaggaatct tcttattcct gatgagcggg 6600
aggggtatgg ggaagatgac cctgggaatg tgctgcataa tcacggccag catcctctta 6660
tggtatgcac aaatacagcc acattggata gcagcctcaa taatattgga gttctttctc 6720
atagtcttgc tcattccaga accagaaaag cagaggacac ctcaggataa tcaattgact 6780
tatgtcatca tagccatcct cacagtgggtg gccgcaacca tggcaaacga aatgggtttt 6840
ctggaaaaaa caaagaaaga cctcggactg ggaaacattg caactcagca acctgagagc 6900
aacattcttg acatngatct acgtcctgca tcagcatgga cgttgtatgc cgtggctaca 6960
acatttatca caccaatggt gagacatagc attgaaaatt cctcagttaa tgtgtcccta 7020
acagccatag ctaaccaagc cacagtgcta atgggtctcg gaaaaggatg gccattgtca 7080
aagatggaca ttggagtccc cctccttgct attgggtggt actcacaagt caaccctata 7140
acctcacag cggctcttct tttattggta gcacattatg ccacatagg accgggacct 7200
caagccaaag caactagaga agctcagaaa agagcagcaq cgggcacat gaaaaaccca 7260
actgtggatg gaataacagt gtagatcta gatccaatc cctatgatcc aaagtttgaa 7320
aagcagttgg gacaagtaat gctcctagtc ctctgcgtga cccaagtgtc gatgatgagg 7380
actacgtggg ctttgtgtga agccttaact ctagcaactg gacccgtgtc cacattgtgg 7440
gaaggaaatc caggagatt ctggaaacaca accattgcag tgtcaatggc aaacatcttt 7500
agagggagtt acctggctgg agctggactt ctcttttcta tcatgaaga cacaaccagc 7560
acgagaagag gaaactggca tataggagaa acgttaggag agaatggaa agcagactg 7620
acgtcattly yaaaaagtga attccagatc tcaaaaaaaa gtggaattca agaatggac 7680
agaaccttag caaaagaagg cattaaaaga ggagaaacgg atcatcacgc tgtgtcgcga 7740
ggctcagcaa aactgagatg gttcgttgaa aggaatttgg tcacaccaga agggaaagta 7800
gtggaccttg gtlgtggcag agggggctgg tcatactatt gtggaggatt aaagaattga 7860
agagaagtta aaggctaac aaaaggagga ccaggacacg aagaacctat cctatgtca 7920
acatatgggt ggaatctagt acgcttacag agcggagtgt atgttttttt tgtccacca 7980
agagaagtgt acacattgtt gtgtgacata ggggaatcat caccaatcc cccggtagaa 8040
gcgggacgaa cactcagagt cctcaacctg gtggaaaatt ggctgaacaa taacacccaa 8100
ttttgcgtaa aggtttctaa cccgtacatg cctcagtcga ttgaaagaat ggaacctta 8160
caagggaaat aaggaggagc cttggtgaga aatccactct caccgaattc cacacatgag 8220
atgtactggg tgtccaatgc ttccgggaac atagtgtcat cagtgaacat gatttcaaga 8280
aagatgtgtg ccgattcac tatgagacac aagaaggcca cctatgagcc agatgtcgac 8340
ctcggaaagc gaacccgcaa tattggaatt gaagtgaga caccgaacct agacataatt 8400
gggaaaagaa tagaaaaaat aaaacaagag catgaaacgt catggcacta tgatcaagac 8460
caccatatac aaacatgggc ttaccatggc agctatgaaa caaaacagac tggatcagca 8520
tcattccatg tgaacggagt agtcagattg ctgacaaaac cctgggacgt tgttccaatg 8580
gtgacacaga tggcaatgac agacacaaat ccttttggaac aacagcgcgt cttcaaaag 8640
aaggtggata ccgaaaccca agaaccaaaa gaaggcacaa aaaaactaat gtaaatcacg 8700
gcagagtggc tctggaaaaga actaggaaa gaaaagacac ctagaatgtg taccagagaa 8760
gaattcacaa aaaggtgag aagcaatgca gccttggggg ccatattcac cgatgagaa 8820
aagtggaaat cggcgcgtga agcgttgaa gatagtaggt tttgggagct ggttgacaag 8880
gaaaggaaac tccatcttga agggaaatgt gaaacatgt tatacaacat gatggggaaa 8940
agagagaaaa aactaggaga gtttggtaaa gcaaaaagca gcagagccat atggtacatg 9000
tggctcggag cagcttctt ayagtgtgaa gccctaggat tttgaaatga agaccattgg 9060
ttctccagag agaactccct gagtggagtg gaaggagaag ggctgcataa gctaggttac 9120
atcttaagag aggtgagcaa gaaagaaagg gaggcaatgt atgccgatga caccgcaggc 9180
tgggacacaa gaatcacaat agaggatttg aaaaatgaag aatgataac gaaccacatg 9240
gcaggagaac acaagaaact tgccgaggcc atttttaaat tgacgtacca aaacaagggt 9300
gtcgtgtgac aaagaccac accaaggggc acagtaalyg acalcatalc gaaayayac 9360
caaggggta gtggacaagt tggcacctat ggcctcaaca ctttcacca catggaagca 9420
caactaattu ggcaatgga gggggaagga atcttcaaaa gcatccagca cttgacagcc 9480
tcagaagaaa tcgctgtgca agattggcta gtaagagtag ggcgtgaaag gttgtcaaga 9540
atggccatca gtggagatga ttgtgtgtg aaacstttag atgatagatt tgcaagagct 9600
ctaacagctc taaatgacat gggaaagggt aggaaggaca tacagcaatg ggaagccctc 9660
agaggatgga acgactggac gcaggtgccc ttctgttcac accattttca cgagttaatt 9720
atgaaagatg gtcgcacact cgtagtcca tgcagaaacc aagatgaatt gatcggcaga 9780
gcccgaattt cccaggagac tgggtgtctc ttacgggaga cggcctgttt ggggaagtct 9840

```

```

tacgccccaa tgtggagctt gatgtacttc cacagacgtg atctccaggct agcgggtaaat 9900
gccatctgct cggcagtcct atcacactgg attccaacaa gccggacaac ctgggtccata 9960
cacgccagcc atgaatggat gacgacggaa gacatgttga cagtttggaa cagagtggtg 10020
atcctagaaa atccatggat ggaagacaaa actccagtg gaaatcatgga ggaaatccca 10080
tacctgggaa aaagagaaga ccaatgggtg ggctcgctga ttgggtgac aagcagagcc 10140
acctgggcga agaattatcca gacagcaata aaccaagtca gatccctcat tggcaatgag 10200
gaatacacag attacatgcc atccatgaaa agattcagaa gagaagagga agaggcagga 10260
gttttgtggt agaaaaacat gaaacaaaac agaagttagg tcggattaag ccatagtacg 10320
ggaaaaacta tgctacctgt gagccccgtc caaggacgtt aaaaagaagtc aggccatttt 10380
gatgccatag cttgagcaaa ctgtgcagcc tgtagctcca cctgagaagg tgtaaaaaat 10440
ccgggaggcc acaaaccatg gaagctgtac gcatggcgta gtggactagc ggttagagga 10500
gacccctccc ttacagatcg cagcaacaat gggggcccaa ggtgagatga agctgtagtc 10560
tcactgggaag gactagaggt tagaggagac cccccaaaa caaaaaacag catattgacg 10620
ctgggaaga ccagagatcc tgtgtctcc tcagcatcat tccaggcaca ggacgccaga 10680
aaatggaatg gtgtgttga atcaacaggt tctggtaccg gtaggcatcg tgggtgtcacg 10740
ctcgtcgttt ggtatggctt catcagctc cgttcccaa cgatcaaggc gagttacatg 10800
atcccccatg ttgtgcaaaa aagcgggttag ctcttcgggt cctccgatcg ttgtcagaag 10860
taagtggcga gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt 10920
catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtagtagc tcaaccaagt cattctgaga 10980
atagtgtatg cggcgaccga gttgtctctg cccggcgta acacgggata ataccgcgcc 11040
acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc 11100
aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgatc 11160
ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaaaggaa ggcaaatgct 11220
cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tctttttca 11280
atattattga agcatttate agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat 11340
ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacttgacgt 11400
ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaa ataggctttaa tgccggtagt 11460
tcgtcttcaa gaattctcat gtttgacagc ttatcatcga taagctttaa tgccggtagt 11520
tatcacagtt aaattgctaa ccagtcagc caccgtgtat gaaatctaac aatgcgctca 11580
tcgtcatcct cggcacgctc accctggatg ctgtaggcat aggcctgggt atqccggtac 11640
tgccgggctt cttgcccggat atcgtccatt ccgacagcat cggcagtcac tatggcgtgc 11700
tgctggcgct atatgcgttg atgcaatttc tatgcgcacc cgtctcggga gcaactgtcc 11760
accgctttgg ccgcccgcga gtcttgctcg ctctcgctact tggagccact atcgactacg 11820
cgatcatggc gaccacaccc gtctgttggg tctctacgc cggacgcac gtggccggca 11880
tcaccggcgc cacaggtgcg gttgtctggc cctatatcgc cgacatcacc gatggggaag 11940
atcgggctcg ccaacttcggg ctcatgagcg cttgtttcgg cgtgggtatg gtggcaggcc 12000
ccgtggcccg gggactgttg ggcgccatct ccttgcatgc accattcctt gcggcggcgg 12060
tgctcaacgg cctcaacctt ctactgggct gcttctaat gcaggagtcg cataagggaag 12120
agcgtcgacc gatgcccttg agagccttca acccagtcag ctcttccgg tgggcgcggg 12180
gcatgactat cgtcgccgca cttatgactg tcttctttat catgcaactc gtaggacagg 12240
tgccggcagc gctctgggtc attttcggcg aggaaccgtt tcgctggagc gcgacgatga 12300
tcggcctgtc gcttgcggtg ttccggaatct tgcaacgccc cgctcaagcc ttcgtcactg 12360
gtcccgccac caaacgtttc ggcgagaagc aggccattat cgcggcgatg gcggccgacg 12420
cgctgggcta cgtcttgctg gcgttcgcga cgcgaggctg gatggccttc cccattatga 12480
ttcttctcgc ttccggcggc atcgggatgc ccgcttgca ggcatgctg tccaggcagg 12540
tagatgacga ccatcaggga cagcttcaag gatcgctcgc ggctcttacc agcctaactt 12600
cyatcactgg accgctgatc gtcacggcga ttatgtccgc ctccgcyayc acatyyaay 12660
gggtggcatg gattgtaggc gccgcctat acctgtctg cctccccgag ttgcgtcgcg 12720
gtgcatggag ccgggccacc tcgacctgaa tggaaagcgg cggcacctcg ctaacggatt 12780
caccactcca agaattggag ccaatcaatt cttgcggaga actgtgaatg cgcaaaccaa 12840
cccttggcag aacatatcca tcgcgtccgc catctccagc agccgcacgc ggcgcacttc 12900
gggcagcgct gggtcctggc caggggtgag catgatcgtg ctctgtcgt tagggacccg 12960
gctaggctgg cggggttggc ttactgggta gcagaatgaa tcaccgatac gcgagcgaac 13020
gtgaagcgac tgctgttgca aaacgtctgc gacctgagca acaacatgaa tggctctcgg 13080
tttccgtgtt tcgtaaaagtc tggaaacgcg gaagtcagcg ccctgcacca ttatgttccg 13140

```

```

gatctgcac gcaggatgct gctggctacc ctgtggaaca cctācātctg cātācācāā 13200
gcgctggcat tgacctgag tgatttttct ctggctccgc cgcātccata ccgccagtgt 13260
tttaccctca caacgttcca gtaaccgggc atgttcatca tcagtaaccc gtatcgtgag 13320
catcctctct cgtttcatcg gtatcattac ccccatgaac agaaatcccc cttacacgga 13380
ggcatcagtg accaaacagg aaaaaaccgc cottaacatg gcccgcttta tcagaagcca 13440
gacattaacg cttctggaga aactcaacga gctggacgcg gatgaacagg cagacatctg 13500
tgaatcgctt caccgaccag ctgatgagct ttaccgcagc tgctcgcgc gtctcggtga 13560
tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc 13620
ggatgccggg agcagacaag cccylcaggg cgcgtcagcg ggtgttggtg ggtgtcgggg 13680
cgcagccatg acccagtcac gtacgcgatag cggagtgtat actggcttaa ctatgccgca 13740
tcagagcaga ttgtactgag agtgcaccat atgctgtgtg aaataccgca cagatgcgta 13800
aggagaaaa acgcacacag gcgctcttcc gcttctctgc tcaactgactc gctgcgctcg 13860
gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaaag cgttaatacg gttatccaca 13920
gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaaac 13980
cgtaaaaagg ccgctgtgtt ggcgttttct cataggctcc gccccctga cgagcatcac 14040
aaaaatcgac gctcaagtca gagggtggcg aaccgcacag gactataaaag ataccaggcg 14100
tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga cctgcccgtt taccggatac 14160
ctgtccgctt ttctcccttc gggaaagcgt gcgctttctc atagctcacg ctgtagggtat 14220
ctcagttcgg tgtaggctgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgcttca 14280
cccgaccgct gcgccttalc cgtlaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac 14340
ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt 14400
gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg 14460
atctgcgctc tctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc 14520
aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga 14580
aaaaaggat ctcaaagaaga tcttttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac 14640
gaaaactcac gttaaaggat tttggtcagt agattatcaa aaaggatctt cacctagatc 14700
cttttaaat taaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatyagta aacttgytcl 14760
gacagttacc aatgcttaat cagtgaaggca cctatctcag cgtctgtctt atttcgttca 14820
tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga lacgggaggg cttaccatct 14880
ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga ttatcagca 14940
ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgctctc 15000
atccagttca ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gttcggcagt taatagtttg 15060
cgcaacgttg ttgccattgc tgcaagatct ggctagcgat gaccctgctg attggttcgc 15120
tgaccatttc cgggcgcgcg gatlttaggtg acactatag 15159

```

<210> 47

<211> 3391

<212> PRT

5 <213> Dang 2 virüsü (Tonga/74)

<400> 47

```

Met Asn Asn Gln Arg Lys Lys Ala Arg Asn Thr Pro Phe Asn Met Leu
1          5          10          15
Lys Arg Glu Arg Asn Arg Val Ser Thr Val Gln Gln Leu Thr Lys Arg
          20          25          30
Phe Ser Leu Gly Met Leu Gln Gly Arg Gly Pro Leu Lys Leu Phe Met
          35          40          45
Ala Leu Val Ala Phe Leu Arg Phe Leu Thr Ile Pro Pro Thr Ala Gly
          50          55          60
Ile Leu Lys Arg Trp Gly Thr Ile Lys Lys Ser Lys Ala Ile Asn Val
65          70          75          80
Leu Arg Gly Phe Arg Lys Glu Ile Gly Arg Met Leu Asn Ile Leu Asn
          85          90          95

```

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Arg | Arg | 100 | Thr | Val | Gly | Met | Ile | Ile | Met | Leu | Thr | Pro | Thr | Val |
| Met | Ala | Phe | His | Leu | Thr | Thr | Arg | Asn | Gly | Glu | Pro | His | Met | Ile | Val |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Ser | Arg | Gln | Glu | Lys | Gly | Lys | Ser | Leu | Leu | Phe | Lys | Thr | Lys | Asp | Gly |
|     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Thr | Asn | Met | Cys | Thr | Leu | Met | Ala | Met | Asp | Leu | Gly | Glu | Leu | Cys | Glu |
| 145 |     |     |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Asp | Thr | Ile | Thr | Tyr | Lys | Cys | Pro | Phe | Leu | Lys | Gln | Asn | Glu | Pro | Glu |
|     |     |     |     |     | 165 |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |
| Asp | Ile | Asp | Cys | Trp | Cys | Asn | Ser | Thr | Ser | Thr | Trp | Val | Thr | Tyr | Gly |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Thr | Cys | Thr | Thr | Thr | Gly | Glu | His | Arg | Arg | Glu | Lys | Arg | Ser | Val | Ala |
|     |     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Leu | Val | Pro | His | Val | Gly | Met | Gly | Leu | Glu | Thr | Arg | Thr | Glu | Thr | Trp |
|     |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Met | Ser | Ser | Glu | Gly | Ala | Trp | Lys | His | Ala | Gln | Arg | Ile | Glu | Thr | Trp |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Ile | Leu | Arg | His | Pro | Gly | Phe | Thr | Ile | Met | Ala | Ala | Ile | Leu | Ala | Tyr |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Thr | Ile | Gly | Thr | Thr | His | Phe | Gln | Arg | Val | Leu | Ile | Phe | Ile | Leu | Leu |
|     |     |     | 260 |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Thr | Ala | Ile | Ala | Pro | Ser | Met | Thr | Met | Arg | Cys | Ile | Gly | Ile | Ser | Asn |
|     |     |     | 275 |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Arg | Asp | Phe | Val | Glu | Gly | Val | Ser | Gly | Gly | Ser | Trp | Val | Asp | Ile | Val |
|     |     |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Leu | Glu | His | Gly | Ser | Cys | Val | Thr | Thr | Met | Ala | Lys | Asn | Lys | Pro | Thr |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Leu | Asp | Phe | Glu | Leu | Ile | Lys | Thr | Glu | Ala | Lys | Gln | Pro | Ala | Thr | Leu |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Arg | Lys | Tyr | Cys | Ile | Glu | Ala | Lys | Leu | Thr | Asn | Thr | Thr | Thr | Asp | Ser |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Arg | Cys | Pro | Thr | Gln | Gly | Glu | Pro | Thr | Leu | Asn | Glu | Glu | Gln | Asp | Lys |
|     |     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Arg | Phe | Val | Cys | Lys | His | Ser | Met | Val | Asp | Arg | Gly | Trp | Gly | Asn | Gly |
|     |     |     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Cys | Gly | Leu | Phe | Gly | Lys | Gly | Gly | Ile | Val | Thr | Cys | Ala | Met | Phe | Thr |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Cys | Lys | Lys | Asn | Met | Glu | Gly | Lys | Ile | Val | Gln | Pro | Glu | Asn | Leu | Glu |
|     |     |     | 405 |     |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Tyr | Thr | Val | Val | Ile | Thr | Pro | His | Ser | Gly | Glu | Glu | His | Ala | Val | Gly |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Asn | Asp | Thr | Gly | Lys | His | Gly | Lys | Glu | Val | Lys | Ile | Thr | Pro | Gln | Ser |
|     |     |     | 435 |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Ser | Ile | Thr | Glu | Ala | Glu | Leu | Thr | Gly | Tyr | Gly | Thr | Val | Thr | Met | Glu |
|     |     |     | 450 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

|                                                                 |     |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 530                                                             |     | 535 |     | 540 |     |
| Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Met Ser Ser Gly Asn Leu Leu Phe Thr |     |     |     |     |     |
| 545                                                             |     | 550 |     | 555 | 560 |
| Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Arg Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 565 |     | 570 |     | 575 |
| Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly Lys Phe Lys Ile Val Lys Glu Ile |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 580 |     | 585 |     | 590 |
| Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 595 |     | 600 |     | 605 |
| Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 610 |     | 615 |     | 620 |
| Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu |     |     |     |     |     |
| 625                                                             |     | 630 |     | 635 | 640 |
| Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 645 |     | 650 |     | 655 |
| Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro Gly Gln Leu Lys Leu Asp Trp Phe |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 660 |     | 665 |     | 670 |
| Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Gln Met Phe Glu Thr Thr Met Arg Gly |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 675 |     | 680 |     | 685 |
| Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 690 |     | 695 |     | 700 |
| Leu Gly Gly Val Phe Thr Ser Ile Gly Lys Ala Leu His Gln Val Phe |     |     |     |     |     |
| 705                                                             |     | 710 |     | 715 | 720 |
| Gly Ala Ile Tyr Gly Ala Ala Phe Ser Gly Val Ser Trp Thr Met Lys |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 725 |     | 730 |     | 735 |
| Ile Leu Ile Gly Val Ile Ile Thr Trp Ile Gly Met Asn Ser Arg Ser |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 740 |     | 745 |     | 750 |
| Thr Ser Leu Ser Val Ser Leu Val Leu Val Gly Ile Val Thr Leu Tyr |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 755 |     | 760 |     | 765 |
| Leu Gly Val Met Val Gln Ala Asp Ser Gly Cys Val Val Ser Trp Lys |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 770 |     | 775 |     | 780 |
| Asn Lys Glu Leu Lys Cys Gly Ser Gly Ile Phe Val Thr Asp Asn Val |     |     |     |     |     |
| 785                                                             |     | 790 |     | 795 | 800 |
| His Thr Trp Thr Glu Gln Tyr Lys Phe Gln Pro Glu Ser Pro Ser Lys |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 805 |     | 810 |     | 815 |
| Leu Ala Ser Ala Ile Gln Lys Ala His Glu Glu Gly Ile Cys Gly Ile |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 820 |     | 825 |     | 830 |
| Arg Ser Val Thr Arg Leu Glu Asn Leu Met Trp Lys Gln Ile Thr Ser |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 835 |     | 840 |     | 845 |
| Glu Leu Asn His Ile Leu Ser Glu Asn Glu Val Lys Leu Thr Ile Met |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 850 |     | 855 |     | 860 |
| Thr Gly Asp Ile Lys Gly Ile Met Gln Val Gly Lys Arg Ser Leu Arg |     |     |     |     |     |
| 865                                                             |     | 870 |     | 875 | 880 |
| Pro Gln Pro Thr Glu Leu Arg Tyr Ser Trp Lys Thr Trp Gly Lys Ala |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 885 |     | 890 |     | 895 |
| Lys Met Leu Ser Thr Glu Leu His Asn Gln Thr Phe Leu Ile Asp Gly |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 900 |     | 905 |     | 910 |
| Pro Glu Thr Ala Glu Cys Pro Asn Thr Asn Arg Ala Trp Asn Ser Leu |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 915 |     | 920 |     | 925 |
| Glu Val Glu Asp Tyr Gly Phe Gly Val Phe Thr Thr Asn Ile Trp Leu |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 930 |     | 935 |     | 940 |
| Arg Leu Arg Glu Lys Gln Asp Val Phe Cys Asp Ser Lys Leu Met Ser |     |     |     |     |     |
| 945                                                             |     | 950 |     | 955 | 960 |
| Ala Ala Ile Lys Asp Asn Arg Ala Val His Ala Asp Met Gly Tyr Trp |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 965 |     | 970 |     | 975 |

Ile Glu Ser Ala Leu Asn Asp Thr Trp Lys Ile Glu Lys Ala Ser Phe  
 980 985 990  
 Ile Glu Val Lys Ser Cys His Trp Pro Lys Ser His Thr Leu Trp Ser  
 995 1000 1005  
 Asn Gly Val Leu Glu Ser Glu Met Val Ile Pro Lys Asn Phe Ala Gly  
 1010 1015 1020  
 Pro Val Ser Gln His Asn Asn Arg Pro Gly Tyr Tyr Thr Gln Thr Ala  
 1025 1030 1035 1040  
 Gly Pro Trp His Leu Gly Lys Leu Glu Met Asp Phe Asp Phe Cys Glu  
 1045 1050 1055  
 Gly Thr Thr Val Val Val Thr Glu Asn Cys Gly Asn Arg Gly Pro Ser  
 1060 1065 1070  
 Leu Arg Thr Thr Thr Ala Ser Gly Lys Leu Ile Thr Glu Trp Cys Cys  
 1075 1080 1085  
 Arg Ser Cys Thr Leu Pro Pro Leu Arg Tyr Arg Gly Glu Asp Gly Cys  
 1090 1095 1100  
 Trp Tyr Gly Met Glu Ile Arg Pro Leu Lys Glu Lys Glu Glu Asn Leu  
 1105 1110 1115 1120  
 Val Ser Ser Leu Val Thr Ala Gly His Gly Gln Ile Asp Asn Phe Ser  
 1125 1130 1135  
 Leu Gly Ile Leu Gly Met Ala Leu Phe Leu Glu Glu Met Leu Arg Thr  
 1140 1145 1150  
 Arg Val Gly Thr Lys His Ala Ile Leu Leu Val Ala Val Ser Phe Val  
 1155 1160 1165  
 Thr Leu Ile Thr Gly Asn Met Ser Phe Arg Asp Leu Gly Arg Val Met  
 1170 1175 1180  
 Val Met Val Gly Ala Thr Met Thr Asp Asp Ile Gly Met Gly Val Thr  
 1185 1190 1195 1200  
 Tyr Leu Ala Leu Leu Ala Ala Phe Arg Val Arg Pro Thr Phe Ala Ala  
 1205 1210 1215  
 Gly Leu Leu Leu Arg Lys Leu Thr Ser Lys Glu Leu Met Met Thr Thr  
 1220 1225 1230  
 Ile Gly Ile Val Leu Leu Ser Gln Ser Ser Ile Pro Glu Thr Ile Leu  
 1235 1240 1245  
 Glu Leu Thr Asp Ala Leu Ala Leu Gly Met Met Val Leu Lys Met Val  
 1250 1255 1260  
 Arg Asn Met Glu Lys Tyr Gln Leu Ala Val Thr Ile Met Ala Ile Leu  
 1265 1270 1275 1280  
 Cys Val Pro Asn Ala Val Ile Leu Gln Asn Ala Trp Lys Val Ser Cys  
 1285 1290 1295  
 Thr Ile Leu Ala Val Val Ser Val Ser Pro Leu Leu Leu Thr Ser Ser  
 1300 1305 1310  
 Gln Gln Lys Ala Asp Trp Ile Pro Leu Ala Leu Thr Ile Lys Gly Leu  
 1315 1320 1325  
 Asn Pro Thr Ala Ile Phe Leu Thr Thr Leu Ser Arg Thr Asn Lys Lys  
 1330 1335 1340  
 Arg Ser Trp Pro Leu Asn Glu Ala Ile Met Ala Val Gly Met Val Ser  
 1345 1350 1355 1360  
 Ile Leu Ala Ser Ser Leu Leu Lys Asn Asp Ile Pro Met Thr Gly Pro  
 1365 1370 1375  
 Leu Val Ala Gly Gly Leu Leu Thr Val Cys Tyr Val Leu Thr Gly Arg  
 1380 1385 1390  
 Ser Ala Asp Leu Glu Leu Glu Arg Ala Thr Asp Val Lys Trp Asp Asp  
 1395 1400 1405  
 Gln Ala Glu Ile Ser Gly Ser Ser Pro Ile Leu Ser Ile Thr Ile Ser

|                                                                 |      |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|
| 1410                                                            | 1415 | 1420 |
| Glu Asp Gly Ser Met Ser Ile Lys Asn Glu Glu Glu Gln Thr Leu     |      |      |
| 1425                                                            | 1430 | 1435 |
| Thr Ile Leu Ile Arg Thr Gly Leu Leu Val Ile Ser Gly Leu Phe Pro |      | 1440 |
|                                                                 | 1445 | 1450 |
| Val Ser Ile Pro Ile Thr Ala Ala Ala Trp Tyr Leu Trp Glu Val Lys |      | 1455 |
|                                                                 | 1460 | 1465 |
| Lys Gln Arg Ala Gly Val Leu Trp Asp Val Pro Ser Pro Pro Pro Val |      | 1470 |
|                                                                 | 1475 | 1480 |
| Gly Lys Ala Glu Leu Glu Asp Gly Ala Tyr Arg Ile Lys Gln Lys Gly |      | 1485 |
| 1490                                                            | 1495 | 1500 |
| Ile Leu Gly Tyr Ser Gln Ile Gly Ala Gly Val Tyr Lys Glu Gly Thr |      |      |
| 1505                                                            | 1510 | 1515 |
| Phe His Thr Met Trp His Val Thr Arg Gly Ala Val Leu Met His Lys |      | 1520 |
|                                                                 | 1525 | 1530 |
| Gly Lys Arg Ile Glu Pro Ser Trp Ala Asp Val Lys Lys Asp Leu Ile |      | 1535 |
|                                                                 | 1540 | 1545 |
| Ser Tyr Gly Gly Gly Trp Lys Leu Glu Gly Glu Trp Lys Glu Gly Glu |      | 1550 |
|                                                                 | 1555 | 1560 |
| Glu Val Gln Val Leu Ala Leu Glu Pro Gly Lys Asn Pro Arg Ala Val |      | 1565 |
| 1570                                                            | 1575 | 1580 |
| Gln Thr Lys Pro Gly Leu Phe Arg Thr Asn Thr Gly Thr Ile Gly Ala |      |      |
| 1585                                                            | 1590 | 1595 |
| Val Ser Leu Asp Phe Ser Pro Gly Thr Ser Gly Ser Pro Ile Val Asp |      | 1600 |
|                                                                 | 1605 | 1610 |
| Lys Lys Gly Lys Val Val Gly Leu Tyr Gly Asn Gly Val Val Thr Arg |      | 1615 |
|                                                                 | 1620 | 1625 |
| Ser Gly Ala Tyr Val Ser Ala Ile Ala Gln Thr Glu Lys Ser Ile Glu |      | 1630 |
|                                                                 | 1635 | 1640 |
| Asp Asn Pro Glu Ile Glu Asp Asp Ile Phe Arg Lys Arg Arg Leu Thr |      | 1645 |
| 1650                                                            | 1655 | 1660 |
| Ile Met Asp Leu His Pro Gly Ala Gly Lys Thr Lys Arg Tyr Leu Pro |      |      |
| 1665                                                            | 1670 | 1675 |
| Ala Ile Val Arg Glu Ala Ile Lys Arg Gly Leu Arg Thr Leu Ile Leu |      | 1680 |
|                                                                 | 1685 | 1690 |
| Ala Pro Thr Arg Val Val Ala Ala Glu Met Glu Glu Ala Leu Arg Gly |      | 1695 |
|                                                                 | 1700 | 1705 |
| Leu Pro Ile Arg Tyr Gln Thr Pro Ala Ile Arg Ala Glu His Thr Gly |      | 1710 |
|                                                                 | 1715 | 1720 |
| Arg Glu Ile Val Asp Leu Met Cys His Ala Thr Phe Thr Met Arg Leu |      | 1725 |
| 1730                                                            | 1735 | 1740 |
| Leu Ser Pro Ile Arg Val Pro Asn Tyr Asn Leu Ile Ile Met Asp Glu |      |      |
| 1745                                                            | 1750 | 1755 |
| Ala His Phe Thr Asp Pro Ala Ser Ile Ala Ala Arg Gly Tyr Ile Ser |      | 1760 |
|                                                                 | 1765 | 1770 |
| Thr Arg Val Glu Met Gly Glu Ala Ala Gly Ile Phe Met Thr Ala Thr |      | 1775 |
|                                                                 | 1780 | 1785 |
| Pro Pro Gly Ser Arg Asp Pro Phe Pro Gln Ser Asn Ala Pro Ile Met |      | 1790 |
|                                                                 | 1795 | 1800 |
| Asp Glu Glu Arg Glu Ile Pro Glu Arg Ser Trp Asn Ser Gly His Glu |      | 1805 |
|                                                                 | 1810 | 1815 |
| Trp Val Thr Asp Phe Lys Gly Lys Thr Val Trp Phe Val Pro Ser Ile |      | 1820 |
| 1825                                                            | 1830 | 1835 |
| Lys Thr Gly Asn Asp Ile Ala Ala Cys Leu Arg Lys Asn Gly Lys Arg |      | 1840 |
|                                                                 | 1845 | 1850 |
|                                                                 |      | 1855 |



Val Ile Gln Leu Ser Arg Lys Thr Phe Asp Ser Glu Tyr Val Lys Thr  
 1860 1865 1870  
 Arg Thr Asn Asp Trp Asp Phe Val Val Thr Thr Asp Ile Ser Glu Met  
 1875 1880 1885  
 Gly Ala Asn Phe Lys Ala Glu Arg Val Ile Asp Pro Arg Arg Cys Met  
 1890 1895 1900  
 Lys Pro Val Ile Leu Thr Asp Gly Glu Glu Arg Val Ile Leu Ala Gly  
 1905 1910 1915 1920  
 Pro Met Pro Val Thr His Ser Ser Ala Ala Gln Arg Arg Gly Arg Ile  
 1925 1930 1935  
 Gly Arg Asn Pro Arg Asn Glu Asn Asp Gln Tyr Ile Tyr Met Gly Glu  
 1940 1945 1950  
 Pro Leu Glu Asn Asp Glu Asp Cys Ala His Trp Lys Glu Ala Lys Met  
 1955 1960 1965  
 Leu Leu Asp Asn Ile Asn Thr Pro Glu Gly Ile Ile Pro Ser Leu Phe  
 1970 1975 1980  
 Glu Pro Glu Arg Glu Lys Val Asp Ala Ile Asp Gly Glu Tyr Arg Leu  
 1985 1990 1995 2000  
 Arg Gly Glu Ala Arg Lys Thr Phe Val Asp Leu Met Arg Arg Gly Asp  
 2005 2010 2015  
 Leu Pro Val Trp Leu Ala Tyr Lys Val Ala Ala Glu Gly Ile Asn Tyr  
 2020 2025 2030  
 Ala Asp Arg Arg Trp Cys Phe Asp Gly Thr Arg Asn Asn Gln Ile Leu  
 2035 2040 2045  
 Glu Glu Asn Val Glu Val Glu Ile Trp Thr Lys Glu Gly Glu Arg Lys  
 2050 2055 2060  
 Lys Leu Lys Pro Arg Trp Leu Asp Ala Arg Ile Tyr Ser Asp Pro Leu  
 2065 2070 2075 2080  
 Ala Leu Lys Glu Phe Lys Glu Phe Ala Ala Gly Arg Lys Ser Leu Thr  
 2085 2090 2095  
 Leu Asn Leu Ile Thr Glu Met Gly Arg Leu Pro Thr Phe Met Thr Gln  
 2100 2105 2110  
 Lys Ala Arg Asp Ala Leu Asp Asn Leu Ala Val Leu His Thr Ala Glu  
 2115 2120 2125  
 Ala Gly Gly Lys Ala Tyr Asn His Ala Leu Ser Glu Leu Pro Glu Thr  
 2130 2135 2140  
 Leu Glu Thr Leu Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala Thr Val Thr Gly Gly  
 2145 2150 2155 2160  
 Ile Phe Leu Phe Leu Met Ser Gly Arg Gly Met Gly Lys Met Thr Leu  
 2165 2170 2175  
 Gly Met Cys Cys Ile Ile Thr Ala Ser Ile Leu Leu Trp Tyr Ala Gln  
 2180 2185 2190  
 Ile Gln Pro His Trp Ile Ala Ala Ser Ile Ile Leu Glu Phe Phe Leu  
 2195 2200 2205  
 Ile Val Leu Leu Ile Pro Glu Pro Glu Lys Gln Arg Thr Pro Gln Asp  
 2210 2215 2220  
 Asn Gln Leu Thr Tyr Val Ile Ile Ala Ile Leu Thr Val Val Ala Ala  
 2225 2230 2235 2240  
 Thr Met Ala Asn Glu Met Gly Phe Leu Glu Lys Thr Lys Lys Asp Leu  
 2245 2250 2255  
 Gly Leu Gly Asn Ile Ala Thr Gln Gln Pro Glu Ser Asn Ile Leu Asp  
 2260 2265 2270  
 Ile Asp Leu Arg Pro Ala Ser Ala Trp Thr Leu Tyr Ala Val Ala Thr  
 2275 2280 2285  
 Thr Phe Ile Thr Pro Met Leu Arg His Ser Ile Glu Asn Ser Ser Val

|                                                                 |      |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|
| 2290                                                            | 2295 | 2300 |
| Asn Val Ser Leu Thr Ala Ile Ala Asn Gln Ala Thr Val Leu Met Gly |      |      |
| 2305                                                            | 2310 | 2315 |
| Leu Gly Lys Gly Trp Pro Leu Ser Lys Met Asp Ile Gly Val Pro Leu |      | 2320 |
|                                                                 | 2325 | 2330 |
| Leu Ala Ile Gly Cys Tyr Ser Gln Val Asn Pro Ile Thr Leu Thr Ala |      | 2335 |
|                                                                 | 2340 | 2345 |
| Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala His Tyr Ala Ile Ile Gly Pro Gly Leu |      | 2350 |
|                                                                 | 2355 | 2360 |
| Gln Ala Lys Ala Thr Arg Glu Ala Gln Lys Arg Ala Ala Ala Gly Ile |      | 2365 |
|                                                                 | 2370 | 2375 |
| Met Lys Asn Pro Thr Val Asp Gly Ile Thr Val Ile Asp Leu Asp Pro |      | 2380 |
| 2385                                                            | 2390 | 2395 |
| Ile Pro Tyr Asp Pro Lys Phe Glu Lys Gln Leu Gly Gln Val Met Leu |      | 2400 |
|                                                                 | 2405 | 2410 |
| Leu Val Leu Cys Val Thr Gln Val Leu Met Met Arg Thr Thr Trp Ala |      | 2415 |
|                                                                 | 2420 | 2425 |
| Leu Cys Glu Ala Leu Thr Leu Ala Thr Gly Pro Val Ser Thr Leu Trp |      | 2430 |
|                                                                 | 2435 | 2440 |
| Glu Gly Asn Pro Gly Arg Phe Trp Asn Thr Thr Ile Ala Val Ser Met |      | 2445 |
|                                                                 | 2450 | 2455 |
| Ala Asn Ile Phe Arg Gly Ser Tyr Leu Ala Gly Ala Gly Leu Leu Phe |      | 2460 |
| 2465                                                            | 2470 | 2475 |
| Ser Ile Met Lys Asn Thr Thr Ser Thr Arg Arg Gly Thr Gly Asn Ile |      | 2480 |
|                                                                 | 2485 | 2490 |
| Gly Glu Thr Leu Gly Glu Lys Trp Lys Ser Arg Leu Asn Ala Leu Gly |      | 2495 |
|                                                                 | 2500 | 2505 |
| Lys Ser Glu Phe Gln Ile Tyr Lys Lys Ser Gly Ile Gln Glu Val Asp |      | 2510 |
|                                                                 | 2515 | 2520 |
| Arg Thr Leu Ala Lys Glu Gly Ile Lys Arg Gly Glu Thr Asp His His |      | 2525 |
|                                                                 | 2530 | 2535 |
| Ala Val Ser Arg Gly Ser Ala Lys Leu Arg Trp Phe Val Glu Arg Asn |      | 2540 |
| 2545                                                            | 2550 | 2555 |
| Leu Val Thr Pro Glu Gly Lys Val Val Asp Leu Gly Cys Gly Arg Gly |      | 2560 |
|                                                                 | 2565 | 2570 |
| Gly Trp Ser Tyr Tyr Cys Gly Gly Leu Lys Asn Val Arg Glu Val Lys |      | 2575 |
|                                                                 | 2580 | 2585 |
| Gly Leu Thr Lys Gly Gly Pro Gly His Glu Glu Pro Ile Pro Met Ser |      | 2590 |
|                                                                 | 2595 | 2600 |
| Thr Tyr Gly Trp Asn Leu Val Arg Leu Gln Ser Gly Val Asp Val Phe |      | 2605 |
|                                                                 | 2610 | 2615 |
| Phe Val Pro Pro Glu Lys Cys Asp Thr Leu Leu Cys Asp Ile Gly Glu |      | 2620 |
| 2625                                                            | 2630 | 2635 |
| Ser Ser Pro Asn Pro Thr Val Glu Ala Gly Arg Thr Leu Arg Val Leu |      | 2640 |
|                                                                 | 2645 | 2650 |
| Asn Leu Val Glu Asn Trp Leu Asn Asn Asn Thr Gln Phe Cys Val Lys |      | 2655 |
|                                                                 | 2660 | 2665 |
| Val Leu Asn Pro Tyr Met Pro Ser Val Ile Glu Arg Met Glu Thr Leu |      | 2670 |
|                                                                 | 2675 | 2680 |
| Gln Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Leu Val Arg Asn Pro Leu Ser Arg Asn |      | 2685 |
|                                                                 | 2690 | 2695 |
| Ser Thr His Glu Met Tyr Trp Val Ser Asn Ala Ser Gly Asn Ile Val |      | 2700 |
| 2705                                                            | 2710 | 2715 |
| Ser Ser Val Asn Met Ile Ser Arg Met Leu Ile Asn Arg Phe Thr Met |      | 2720 |
|                                                                 | 2725 | 2730 |
|                                                                 |      | 2735 |

Arg His Lys Lys Ala Thr Tyr Glu Pro Asp Val Asp Leu Gly Ser Gly 2740 2745 2750  
 Thr Arg Asn Ile Gly Ile Glu Ser Glu Thr Pro Asn Leu Asp Ile Ile 2755 2760 2765  
 Gly Lys Arg Ile Glu Lys Ile Lys Gln Glu His Glu Thr Ser Trp His 2770 2775 2780  
 Tyr Asp Gln Asp His Pro Tyr Lys Thr Trp Ala Tyr His Gly Ser Tyr 2785 2790 2795 2800  
 Glu Thr Lys Gln Thr Gly Ser Ala Ser Ser Met Val Asn Gly Val Val 2805 2810 2815  
 Arg Leu Leu Thr Lys Pro Trp Asp Val Val Pro Met Val Thr Gln Met 2820 2825 2830  
 Ala Met Thr Asp Thr Thr Pro Phe Gly Gln Gln Arg Val Phe Lys Glu 2835 2840 2845  
 Lys Val Asp Thr Arg Thr Gln Glu Pro Lys Glu Gly Thr Lys Lys Leu 2850 2855 2860  
 Met Lys Ile Thr Ala Glu Trp Leu Trp Lys Glu Leu Gly Lys Lys Lys 2865 2870 2875 2880  
 Thr Pro Arg Met Cys Thr Arg Glu Glu Phe Thr Lys Lys Val Arg Ser 2885 2890 2895  
 Asn Ala Ala Leu Gly Ala Ile Phe Thr Asp Glu Asn Lys Trp Lys Ser 2900 2905 2910  
 Ala Arg Glu Ala Val Glu Asp Ser Arg Phe Trp Glu Leu Val Asp Lys 2915 2920 2925  
 Glu Arg Asn Leu His Leu Glu Gly Lys Cys Glu Thr Cys Val Tyr Asn 2930 2935 2940  
 Met Met Gly Lys Arg Glu Lys Lys Leu Gly Glu Phe Gly Lys Ala Lys 2945 2950 2955 2960  
 Gly Ser Arg Ala Ile Trp Tyr Met Trp Leu Gly Ala Arg Phe Leu Glu 2965 2970 2975  
 Phe Glu Ala Leu Gly Phe Leu Asn Glu Asp His Trp Phe Ser Arg Glu 2980 2985 2990  
 Asn Ser Leu Ser Gly Val Glu Gly Glu Gly Leu His Lys Leu Gly Tyr 2995 3000 3005  
 Ile Leu Arg Glu Val Ser Lys Lys Glu Gly Gly Ala Met Tyr Ala Asp 3010 3015 3020  
 Asp Thr Ala Gly Trp Asp Thr Arg Ile Thr Ile Glu Asp Leu Lys Asn 3025 3030 3035 3040  
 Glu Glu Met Ile Thr Asn His Met Ala Gly Glu His Lys Lys Leu Ala 3045 3050 3055  
 Glu Ala Ile Phe Lys Leu Thr Tyr Gln Asn Lys Val Val Arg Val Gln 3060 3065 3070  
 Arg Pro Thr Pro Arg Gly Thr Val Met Asp Ile Ile Ser Arg Arg Asp 3075 3080 3085  
 Gln Arg Gly Ser Gly Gln Val Gly Thr Tyr Gly Leu Asn Thr Phe Thr 3090 3095 3100  
 Asn Met Glu Ala Gln Leu Ile Arg Gln Met Glu Gly Glu Gly Ile Phe 3105 3110 3115 3120  
 Lys Ser Ile Gln His Leu Thr Ala Ser Glu Glu Ile Ala Val Gln Asp 3125 3130 3135  
 Trp Leu Val Arg Val Gly Arg Glu Arg Leu Ser Arg Met Ala Ile Ser 3140 3145 3150  
 Gly Asp Asp Cys Val Val Lys Pro Leu Asp Asp Arg Phe Ala Arg Ala 3155 3160 3165  
 Leu Thr Ala Leu Asn Asp Met Gly Lys Val Arg Lys Asp Ile Gln Gln

|                                                                 |      |      |      |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|------|------|
| 3170                                                            |      | 3175 |      | 3180 |
| Trp Glu Pro Ser Arg Gly Trp Asn Asp Trp Thr Gln Val Pro Phe Cys |      |      |      |      |
| 3185                                                            |      | 3190 |      | 3195 |
| Ser His His Phe His Glu Leu Ile Met Lys Asp Gly Arg Thr Leu Val |      |      |      |      |
|                                                                 | 3205 |      | 3210 | 3215 |
| Val Pro Cys Arg Asn Gln Asp Glu Leu Ile Gly Arg Ala Arg Ile Ser |      |      |      |      |
|                                                                 | 3220 |      | 3225 | 3230 |
| Gln Gly Ala Gly Trp Ser Leu Arg Glu Thr Ala Cys Leu Gly Lys Ser |      |      |      |      |
|                                                                 | 3235 |      | 3240 | 3245 |
| Tyr Ala Gln Met Trp Ser Leu Met Tyr Phe His Arg Arg Asp Leu Arg |      |      |      |      |
|                                                                 | 3250 |      | 3255 | 3260 |
| Leu Ala Ala Asn Ala Ile Cys Ser Ala Val Pro Ser His Trp Ile Pro |      |      |      |      |
| 3265                                                            |      | 3270 |      | 3275 |
| Thr Ser Arg Thr Thr Trp Ser Ile His Ala Ser His Glu Trp Met Thr |      |      |      |      |
|                                                                 | 3285 |      | 3290 | 3295 |
| Thr Glu Asp Met Leu Thr Val Trp Asn Arg Val Trp Ile Leu Glu Asn |      |      |      |      |
|                                                                 | 3300 |      | 3305 | 3310 |
| Pro Trp Met Glu Asp Lys Thr Pro Val Glu Ser Trp Glu Glu Ile Pro |      |      |      |      |
|                                                                 | 3315 |      | 3320 | 3325 |
| Tyr Leu Gly Lys Arg Glu Asp Gln Trp Cys Gly Ser Leu Ile Gly Leu |      |      |      |      |
|                                                                 | 3330 |      | 3335 | 3340 |
| Thr Ser Arg Ala Thr Trp Ala Lys Asn Ile Gln Thr Ala Ile Asn Gln |      |      |      |      |
| 3345                                                            |      | 3350 |      | 3355 |
| Val Arg Ser Leu Ile Gly Asn Glu Glu Tyr Thr Asp Tyr Met Pro Ser |      |      |      |      |
|                                                                 | 3365 |      | 3370 | 3375 |
| Met Lys Arg Phe Arg Arg Glu Glu Glu Glu Ala Gly Val Leu Trp     |      |      |      |      |
|                                                                 | 3380 |      | 3385 | 3390 |

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 15153

5 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Suni Sekans

&lt;220&gt;

10 &lt;223&gt; Dang 3 plazmid p3

&lt;400&gt; 48

```

agtgttagt ctaugtggac cgacaagaac agtttcgact cggaagcttg cttaacgtag 60
tactgacagt tttttattag agagcagatc tctgatgaac aaccaacgga aaaagacggg 120
aaaaccgtct atcaatatgc tgaaacgcgt gagaaaccgt gtgtcaactg gatcacagtt 180
ggcgaagaga ttctcaagag gactgctgaa cggccaagga ccaatqaaat tggttatggc 240
gttcatagct ttcttcagat ttctagccat tccaccgaca gcaggagtct tggctagatg 300
gggaaccttt aagaagtcgg gggctattaa qgtcctgaga ggcttcaaga aggagatctc 360
aaacatgctg agcattatca acagacggaa aaagacatcg ctctgtctca tgatgatgtt 420
accagcaaca cttgctttcc acttgacttc acgagatgga gagccgcgca tgattgtggg 480
gaagaatgaa agaggaaaat cctactttt taagacagcc tctggaatca acatgtgcac 540
actcatagcc atggatttgg gagagatgtg tgatgacacg gtcacctaca aatgccccct 600
cattactgaa gtggagcctg aagacattga ctgctggtgc aaccttacat cgacatgggt 660
gacctacgga acgtgcaatc aagctggaga gcacagacgc gacaaaagat cgggtggcgt 720
agctcccat gtcggcatgg gactggacac acgcacccaa acctggatgt cggctgaagg 780
agcttggaga caggtcgaga aggttagagac atgggccttt aggcacccag ggttcacaa 840
actagcccta tttcttggcc attacatagg cacttccttg acccagaaag tggttatatt 900
catactacta atgctgggtca ccccatccat gacaatgaga tgcgtgggag taggaaacag 960
agattttgtg gaaggcctat caggagctac gtgggttgac gtggtgctcg agcacgggtg 1020

```

|             |            |             |            |             |             |      |
|-------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| gtgtgtgact  | accatggcta | agaacaagcc  | cacgctggat | atagagctcc  | agaagaccga  | 1080 |
| ggccacccaa  | ctggcgaccc | taaggaaact  | atgtattgag | ggaaaaatta  | ccaacgtaac  | 1140 |
| aaccgactca  | aggtgcccc  | cccaagggga  | agcgatttta | cctgaggagc  | aggaccagaa  | 1200 |
| ccacgtgtgc  | aagcacacat | acgtggacag  | aggctgggga | aacggttgtg  | gtttgtttgg  | 1260 |
| caagggaagc  | ctggtaacat | gcgcgaaatt  | tcaatgtttg | gaatcaatag  | agggaaaagt  | 1320 |
| ggtgcagcat  | gagaacctca | aatacacctg  | catcatcaca | gtgcacacag  | gagatcaaca  | 1380 |
| ccaggtggga  | aatgaaacgc | agggagtcac  | ggctgagata | acaccccgag  | catcaaccgt  | 1440 |
| tgaagccatc  | ttacctgaat | atggaaccct  | tgggctagaa | tgctcaccac  | ggacaggttt  | 1500 |
| agatttcaat  | gaaatgattt | tggtgacaat  | gaagaacaaa | gcatggatgg  | tacatagaca  | 1560 |
| atggtttttt  | gacctacctt | taccatggac  | atcaggagct | acaacagaaa  | caccaacctg  | 1620 |
| gaataagaaa  | gagcttcttg | tgacattcaa  | aaacgcacat | gcaaaaaagc  | aagaagttagt | 1680 |
| agtcttggga  | tcgcaagagg | gagcaatgca  | cacagcactg | acaggagcta  | cagagatcca  | 1740 |
| aacctcagga  | ggcacaagta | tttttgcggg  | gcacttaaaa | tgtagactca  | agatggacaa  | 1800 |
| attggaactc  | aaggggatga | gctatgcaat  | gtgcttgaat | gcctttgtgt  | tgaagaaaga  | 1860 |
| agtctccgaa  | acgcaacatg | ggacaatact  | catcaagggt | gagtaaaaag  | gggaagatgc  | 1920 |
| accttgcaag  | attcctttct | ccacggagga  | tggacaaggg | aaagcccaca  | atggcagact  | 1980 |
| gatcacagct  | aacctcagtg | tgaccaagaa  | ggaggagcct | gtcaataattg | aggcagaacc  | 2040 |
| tccttttggg  | gaaagcaata | tagtaattgg  | aattggagac | aaagccttga  | aaatcaactg  | 2100 |
| gtacaagaag  | ggaagctcga | ttgggaagat  | gttcgagggc | actgccagag  | gtgcaaggcg  | 2160 |
| catggccatc  | ttgggagaca | cagcctggga  | ctttggatca | gtaggltggtg | ttttuaattc  | 2220 |
| attaggaaaa  | atggtgcacc | aaatatttgg  | aagtgcctac | acagccctat  | ttagtggagt  | 2280 |
| ctcttgata   | atgaaaattg | gaataggtgt  | ccttttaacc | tggatagggt  | tgaattcaaa  | 2340 |
| aaacactagt  | atgagcttta | gctgcattgt  | gataggaatc | attacactct  | atctgggagc  | 2400 |
| cgtggtgcaa  | gctgacatgg | ggtgtgtcat  | aaactggaaa | ggcaaaagac  | tcaaatgttg  | 2460 |
| aagtggaaat  | ttcgtcacta | atgaggtcca  | cacctggaca | gagcaataca  | aatttcaagc  | 2520 |
| agactccccc  | aaaagactgg | cgacagccat  | tgcaggcgct | tgggagaatg  | gagtgtgcgg  | 2580 |
| atcagggtcg  | acaaccagaa | tggagaacct  | cttgtggaag | caaatagcca  | atgaactgaa  | 2640 |
| ctacatatata | tgggaaacaa | acatcaaat   | aacgtagtt  | gtgggtgata  | taattggggg  | 2700 |
| cttagagcna  | gggnaaaaga | cactaacacc  | acaacccatg | gauctaaaa   | attcatggaa  | 2760 |
| aacatgggga  | aaggcgaaga | tagtgacagc  | tgnaaacana | aattcctctt  | tcataataga  | 2820 |
| tgggccaaac  | acaccagagt | gtccaaagtgc | ctcaagagca | tggaaatgtg  | gggaggtgga  | 2880 |
| agattacggg  | ttcggagctc | tcacaactaa  | catatggctg | aaactccgag  | agatgtacac  | 2940 |
| ccaactatgt  | gaccacaggc | taatgtcggc  | agcgtttaag | gatgagaggg  | cgtacacgc   | 3000 |
| cgcactgggc  | tattggatag | aaagccaaaa  | gaatggaaat | tggaaagctag | aaaaggcatc  | 3060 |
| cctcatagag  | gtaaaaacct | gcacatggcc  | aaaatcacac | actctttgga  | gcaatgggtg  | 3120 |
| gctagagagt  | gacatgatca | tcccaaagag  | tctggctggt | cccatttcgc  | aacacaaacta | 3180 |
| caggcccgga  | taccacaccc | aaacggcagg  | acctggcac  | ttaggaaaat  | tggagctgga  | 3240 |
| cttcaactat  | tgtgaaggaa | caacagttgt  | catcacagaa | aattgtggga  | caagaggccc  | 3300 |
| atcactgaga  | acaacaacag | tgtcagggaa  | gttgatacac | gaatggtgtt  | gccgctcgtg  | 3360 |
| tacacttctt  | cccctgcgat | acatgggaga  | agacggctgc | tggatatggca | tggaaattag  | 3420 |
| accatttaat  | gagaaagaag | agaacatggt  | aaagtcttta | gtctcagcag  | ggagtggaaa  | 3480 |
| ggtggataac  | ttcacaatgg | gtgtcttgtg  | tttggcaatc | ctttttgaag  | aggtgatgag  | 3540 |
| agggaaaattt | gggaaaaagc | acatgattgc  | aggggttctc | ttcacgtttg  | tactccttct  | 3600 |
| ctcagggcaa  | ataacatgga | gagacatggc  | gcacacactc | ataatgattg  | ggtccaacgc  | 3660 |
| ctctgacaga  | atgggaatgg | gcgtcactta  | cctagcattg | attqcaacat  | ttaaaattca  | 3720 |
| gccatttttt  | gctttgggat | tcttctctgag | gaaactgaca | tctagagaaa  | atttattggt  | 3780 |
| gggagtggg   | ttggccatgg | caacaacgtt  | acaactgcca | gaggacattg  | aacaaatggc  | 3840 |
| gaatggaata  | gctttagggc | tcattggctct | taaatata   | acacaatttg  | aaacatacca  | 3900 |
| actatggacg  | gcattagtct | ccctaattgtg | ttcaaataca | attttcacgt  | tgactggtgc  | 3960 |
| ctggagaaca  | gccacctga  | ttttggccgg  | aatttctctt | ttgccagtgt  | gccagtcttc  | 4020 |
| gagcatgagg  | aaaacagatt | ggctcccaat  | ggctgtggca | gctatgggag  | ttccacctct  | 4080 |
| accacttttt  | attttcagtt | tgaagatata  | gctcaaaagg | agaagctggc  | cactgaatga  | 4140 |
| gggggtgagt  | gctgttgac  | ttgtgagtat  | tctagctagt | tctctctta   | ggaaatgacgt | 4200 |
| gcccattgct  | ggaccattag | tggctggggg  | cttgctgata | gcgtgctacg  | tcataactgg  | 4260 |
| cacgtcagca  | gacctcactg | tagaaaaagc  | agcagatgtg | acatgggagg  | aagaggctga  | 4320 |

|             |            |             |            |             |             |      |
|-------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| gcaaacagga  | gtgtccca   | atttaaatgat | cacagttgat | gacgatggaa  | caatgagaat  | 4380 |
| aaaagatgat  | gagactgaga | acatcttaac  | agtgttttg  | aaaacagcat  | tactaatagt  | 4440 |
| gtcaggcatt  | tttccatact | ccatacccgc  | aacactgttg | gtctggcaca  | cttggcaaaa  | 4500 |
| gcaaacccaa  | agatccggtg | tcctatggga  | cgttcccagc | ccccagaga   | cacagaaagc  | 4560 |
| agaactggaa  | gaaggggttt | ataggatcaa  | gcagcaagga | atttttggga  | aaacccaagt  | 4620 |
| gggggttggg  | gtacaaaaag | aaggagtttt  | ccacaccatg | tggcagctca  | caagaggagc  | 4680 |
| agtgttgaca  | cacaatggga | aaagactgga  | accaaactgg | gctagcgtga  | aaaaagatct  | 4740 |
| gatttcatac  | ggaggaggat | ggaaattgag  | tgcacaatgg | caaaaaaggag | aggagggtgca | 4800 |
| ggttattgcc  | gtagagcctg | ggaagaacct  | aaagaacttc | caaaccatgc  | caggcattttt | 4860 |
| ccagacaaca  | acaggggaga | taggagcgat  | tgcactggac | ttcaagcctg  | gaacttcagg  | 4920 |
| atctcccatc  | ataaacagag | aggguaaggt  | actgggattg | tatggcaatg  | gagtggtcac  | 4980 |
| aaagaatggt  | ggctatgtca | gtggaatagc  | acaaacaaat | gcagaaccag  | acggaccgac  | 5040 |
| accagagttg  | gaagaagaga | tgttcaaaaa  | gcgaatctta | accataatgg  | atctccatcc  | 5100 |
| cgggtcagga  | aagacgcgga | aatatcttcc  | agctattgtt | agagaggcaa  | tcaagagacg  | 5160 |
| cttaaggact  | ctaatttttg | caccaacaag  | ggtagtgcga | gctgagatgg  | aagaagcatt  | 5220 |
| gaaagggttc  | ccaataaggt | atcaaacac   | tgcaacaaaa | tctgaacaca  | cagggagaga  | 5280 |
| gattgttgat  | ctaattgtcc | acgcaacgtt  | cacaatgcgt | ttgctgtcac  | cagtcagggt  | 5340 |
| tccaaactac  | aacttgataa | taatggatga  | ggctcatttc | acagaccag   | ccagtatagc  | 5400 |
| ggctagaggg  | tacatatcaa | ctcgtgtagg  | aatgggagag | gcagccgcaa  | ttttcatgac  | 5460 |
| agccacaccc  | cctggaacag | ctgatgcctt  | tcctcagayc | aacgctccaa  | ttcaagatga  | 5520 |
| agaaagagac  | ataccagaac | gtcatggaa   | ttcaggcaat | gaatggatta  | ccgactttgc  | 5580 |
| cgggaagacg  | gtgtgggttt | tccctagcat  | caaagctgga | aatgacatag  | caaactgtct  | 5640 |
| gcggaaaaat  | ggaaaaaagg | tcattcaact  | tagtaggaag | acttttgaca  | cagaatatca  | 5700 |
| aaagactaaa  | ctaaatgatt | gggactttgt  | ggtgacaaca | gacatttcag  | aaatgggagc  | 5760 |
| caatttcaaa  | gcagacagag | tgatcgaccc  | aagaagatgt | ctcaagccag  | tgattttlgac | 5820 |
| ayacggaccc  | gagcgcggtg | tcctggcggg  | accaatgcc  | gtcaccgtag  | cgagcgctgc  | 5880 |
| gcaaaggaga  | gggagagttg | gcaggaaacc  | acaaaaagaa | aatgaccaat  | acataattcat | 5940 |
| gggcccagccc | ctcaataatg | atgaagacca  | tgctcactgg | acagaagcaa  | aaatgctgct  | 6000 |
| agacaacatc  | aacacaccag | aagggatcat  | accagctctc | tttgaaccag  | aaagggagaa  | 6060 |
| gtcagccgcc  | atagacggcg | aataccgcct  | gaagggtgag | tccaggaaga  | ccttcgtgga  | 6120 |
| actcatgagg  | aggggtgacc | tcccagtttg  | gctagcccat | aaagtagcat  | cagaagggat  | 6180 |
| caaatatata  | gatagaaagt | ggtgttttga  | tggagaacgc | aacaatcaaa  | tttttagagga | 6240 |
| gaatatggat  | gtggaaatct | ggacaaaagg  | aggagaaaag | aaaaaattga  | gacctagggt  | 6300 |
| gcttgatgcc  | cgcacttatt | cagatccctt  | agcgctcaag | gaattcaagg  | actttgcggc  | 6360 |
| tggtagaaag  | tcaattgccc | ttgatcttgt  | gacagaaata | ggaagagtgc  | cttcacactt  | 6420 |
| agctcacaga  | acgagaaacg | ccctggacaa  | tctgggtgat | ttgcacacgt  | cagaacatgg  | 6480 |
| cgggagggcc  | tacaggcatg | cagtggagga  | actaccagaa | ucaatggaaa  | cactcttact  | 6540 |
| cctgggactc  | atgatcctgt | taacagggtg  | agcaatgctt | ttcttqatat  | caggtaaaag  | 6600 |
| gattggaaa   | acttcaatag | gactcatttg  | tgtagctgct | tccagcggta  | tgttatggat  | 6660 |
| ggctgatgtc  | ccactccaat | ggtatcgctc  | tgccatagtc | ctggagtttt  | ttatgatggc  | 6720 |
| gttacttata  | ccagaaccag | aaaagcagag  | aactcccaa  | gacaaatcaac | tgcgatatgt  | 6780 |
| cgtgataggc  | atactcacac | tggttgcaat  | aytagcagcc | aatgaaatgg  | gactgttggg  | 6840 |
| aaccacaaa   | agagatttag | gaatgtccaa  | agaaccaggt | gttgtttctc  | caaccagcta  | 6900 |
| tttggatgtg  | gacttgcacc | cagcatcagc  | ctggacattg | tacgctgttg  | ccacaacagt  | 6960 |
| aataacacca  | atgttgagac | ataccataga  | gaattccaca | gcaaatgtgt  | ccctggcagc  | 7020 |
| tatagccaac  | caggcagtgg | tcctgatggg  | tttagacaaa | ggatggccga  | tatcgaaaat  | 7080 |
| ggacttaggc  | gtgccactat | tggcactggg  | ttgttattca | caagtgaacc  | cactaactct  | 7140 |
| cacagcggca  | gttctcctgc | tagtcacgca  | ttatgctatt | ataggtccag  | gatttcagggc | 7200 |
| aaaaagccact | cgtgaagctc | aaaaaaggac  | agctgctgga | ataatgaaga  | atccaacggt  | 7260 |
| ggtatgggata | atgacaatag | acctagatcc  | tgtaatatac | gattcaaaaat | ttgaaaagca  | 7320 |
| actaggacag  | gttatgctcc | tgggtctgtg  | tgcagttcaa | cttttggtta  | tgagaacatc  | 7380 |
| atgggctttt  | tgtgaagctc | taaccctagc  | cacaggacca | ataacaacac  | tctgggaagg  | 7440 |
| atcacctggg  | aagttctgga | acaccacgat  | agctgtttcc | atggcgaaca  | tcttttagagg | 7500 |
| gagctatttta | gcaggagctg | ggcttgcctt  | ttctatcatg | aaatcagttg  | gaacaggaaa  | 7560 |
| gagagggaca  | gggtcacagg | gtgaaacctt  | gggagaaaag | tggaaaaaga  | aattgaatca  | 7620 |

```

attaccccgga aaagagtttg acctttacaa gaaatccgga atcactgaag tggatagaac 7680
agaagccaaa gaagggttga aaagaggaga aataacacac catgccgtgt ccagaggcag 7740
cgcaaaactt caatggttcg tggagagaaa catggtcatc cccgaaggaa gagtcataga 7800
cttaggctgt ggaagaggag gctggtcata ttattgtgca ggactgaaaa aagttacaga 7860
agtgcgagga tacacaaaag gcggcccagg acatgaagaa ccagtaccta tgtctacata 7920
cggatgggaa atagtcaagt taatgagtg aaaggatgtg ttttatcttc cacctgaaa 7980
gtgtgatact ctattgtgtg acattggaga atcttcacca agcccaacag tggagaaaag 8040
cagaaccata agagtcttga agatggttga accatggcta aaaaataacc agttttgcat 8100
taaagtattg aacctttaca tgccaactgt gattgagcac ctagaagac tacaaaaggaa 8160
acatggaggga atgcttgtga gaaatccact ctacgaaac tccacgcacg aaatgtactg 8220
gatatctaata ggcacaggca atatcgtttc tcagtcacac atggtatcca gattgctact 8280
taacagattc acaatgacac ataggagacc caccatagag aagatgttg atttaggagc 8340
gggggcccga catgtcaatg cgaaccaga aacacccaac atggatgtca ttggggaaa 8400
aataagaagg atcaaggagg agcatagttc aacatggcac tatgatgatg aaaaacttta 8460
taaaacgtgg gcttaccatg gatcctatga agttaaggcc acaggctcag cctcctcat 8520
gataaatgga gtcgtgaaac tcttcacgaa accatgggat gtggtgccc tggtgacaca 8580
gatggcaatg acggatacaa cccatttcg ccagcaagg gtttttaaag agaaagtga 8640
caccaggaca cccagaccta tgccaggaaac aagaaaggtt atggagatca cagcggaatg 8700
gctttggaga accctgggaa ggaacaaaag acccagatta tgtacgagag aggagttcac 8760
aaaaaaggte agaaccaacg cagctatggg cgccgttttt acagaggaga accaatggga 8820
cagtgcctaga cctgctgttg aggatgaaga attctggaaa ctcgtagaca gagaacgtga 8880
actccacaaa ttgggcaagt gtggaagctg cgtttacac atgatgggca agagagaga 8940
gaaacttgga gagtttgga aagcaaaagg cagtagagcc atatggtaca tgtggttggg 9000
agccagatac cttgagttcg aagcactcgg attcttaaat gaagaccatt ggttctcgcg 9060
tgaaaactct tacagtggag tagaaggaga aggactgcac aagctgggat acatcttaag 9120
agacatttcc aagatacccg gaggagctat gtatgctgat gacacagctg gttgggacac 9180
aagaataaca gaagatgacc tgcacaatga ggaaaaaatc acacagcaaa tggacctga 9240
acacaggcag tttagcaaac ctatatccaa gctcacatac caaaacaaag tggtaaaagt 9300
tcaacgacca actccaaagg gcacggtaat ggacatcata tctaggaaag accaaaggag 9360
cagtggacag gtgggaactt atggtctgaa tacattcacc aacatggaa cccagttaat 9420
cagacaaaty gaaggagaag gtgtgtgtgc gaaggcagac ctcgagaacc ctcatctgct 9480
agagaagaaa gttacacaaat ggttggaaac aaaaggagtg gagaggttaa aaagaatggc 9540
catcagcggt gatgatggc tggtagaacc aattgatgac aggttcgcca atgccttgc 9600
tgccctgaat gacatgggaa aagttaggaa ggacatacct caatggcagc catcaaaagg 9660
atggcatgat tgycaacagg tccctttctg ctcccaccac ttcatgaat tgatcatgaa 9720
agatggagaa aagttggtag ttccctgcag acctcaggat gaattaatcg ggagagcgag 9780
aatctctcaa ggagcaggat ggagccttaq agaaactgca tgcctaggga aagcctacgc 9840
ccaaatgttg actctcatgt actttcacag aagagatctt agactagcat ccaacgccat 9900
atgttcagca gtaccagtcc attgggtccc cacaagcaga acgacgtggc ctattcatgc 9960
tcaccatcag tggatgacta cagaagacat gcltactgt tggaaacaggg tgtgqataga 10020
ggataatcca tggatggag acaaaactcc agtcaaaacc tgggaagatg ttccatatct 10080
agggaaagga gaagaccaat ggtgcggatc actcattggt ctacttcca gagcaacctg 10140
ggccacagaa atacttacgg caatccaaca ggtgagaagc cttataggca atgaagagt 10200
tctggactac atgccttcga tgaagagatt caggaaggag gaggagttag agggagccat 10260
ttggtaaaac taggaagtga aaagagggca aactgtcagg ccaccttaag ccacagtacg 10320
gaagaagctg tgcagcctgt gagccccgtc caaggacgtt aaaagaagaa gtcaggccca 10380
aaagccacgg tttagcaaaa ccgtgctgcc tgtggctccg tctgagggac gtaaaacctg 10440
ggaggtgca aactgtggaa gctgtacgca cgggttagca gactagcggg tagaggagac 10500
ccctcccatg acacaacgca gcagcggggc ccgagctctg agggaaagctg tacctccttg 10560
caaaggacta gaggttagag gagaccccc gcaaataaaa acagcatatt gacgctggga 10620
gagaccagag atcctgctgt ctctcagca tcatccagg cacagaacgc cagaaaatgg 10680
aatggtgctg ttgaatcaac aggttctggt accggtaggc atcgtggtgt cagcctcgtc 10740
gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc 10800
catgtttgtc aaaaaagcgg tttagctcctt cggctcctcg atcgttgtca gaagtaagtt 10860
ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 10920

```

|             |             |             |             |             |            |       |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------|
| atccgtaaga  | tgcttttctg  | tgactggtga  | gtactcaacc  | aagtcattct  | gagaatagtg | 10980 |
| tatgcggcga  | ccgagttgct  | cttgcctggc  | gtcaacacgg  | gataataccg  | cgccacatag | 11040 |
| cagaacttta  | aaagtgtctc  | tcattggaaa  | acgttctctc  | gggcgaaaac  | tctcaaggat | 11100 |
| cttaccgctg  | ttgagatcca  | gttcgatgta  | accactcgt   | gcacccaact  | gatcttcagc | 11160 |
| atcttttact  | ttcaccagcg  | tttctgggtg  | agcaaaaaaca | ygaaggcaaa  | atgccgcaaa | 11220 |
| aaagggtaata | agggcgacac  | ggaaatgttg  | aatactcata  | ctcttctctt  | ttcaatatta | 11280 |
| ttgaagcatt  | tatcagggtt  | attgtctcat  | gagcggatc   | atatttgaat  | gtattttaga | 11340 |
| aaataaaaca  | ataggggttc  | cgcgcacatt  | tccccgaaaa  | gtgccacctg  | acgtctaaag | 11400 |
| aaccattatt  | atcatgacat  | taacctataa  | aaataggcgt  | atcacgaggc  | cctttctgtc | 11460 |
| tcaagaattc  | tcattgttga  | cagcttatca  | tcgataagct  | ttaatgcggt  | agtttatcac | 11520 |
| agttaaattg  | ctaacgcagt  | caggcaccgt  | gtatgaaatc  | taacaatgcg  | ctcatctgca | 11580 |
| tcctcggcac  | cgtcacctct  | gatgctgtag  | gcataaggct  | ggttatgcgg  | gtactgcggg | 11640 |
| gcctcttgcg  | ggatatcgct  | cattccgaca  | gcatacgccg  | tcactatggc  | gtgctgctgg | 11700 |
| cgtatatatg  | gttgatgcaa  | ttcttatgcg  | caccggtctc  | cggagcactg  | tcggaccgct | 11760 |
| ttggccgccc  | cccagtcctg  | ctcgtctcgc  | tacttgagac  | cactatcgac  | tacgcgatca | 11820 |
| tgggcaccac  | acctgtcctg  | tgatctctct  | acgcgggacg  | catcgtggcc  | ggcatcaccg | 11880 |
| ggccacacag  | tgcggttgct  | ggcgcttata  | tcgcgcacat  | caccgatggg  | gaagatcggg | 11940 |
| ctcgccactt  | cgggctcatg  | agcgttggtt  | tcggcgtggg  | tatggtggca  | ggccccgtgg | 12000 |
| ccgggggact  | gttgggcggc  | atctccttgc  | atgcaccatt  | ccttgccggc  | gcggtgctca | 12060 |
| acggcctcaa  | cctactactg  | ggctgcttcc  | taatgcagga  | gtcgcataag  | ggagagcgtc | 12120 |
| gaccgatgac  | cttgagagcc  | ttcaaacccg  | tcagctcctt  | ccggtggggc  | cggggcatga | 12180 |
| ctatcgtcgc  | cgcacttatg  | actgtcttct  | ttatcatgca  | actcgtagga  | cagggtgccg | 12240 |
| cagcgtctct  | ggtcattttc  | ggcgaggacc  | gctttcgtct  | gagcgcgacg  | atgatcggcc | 12300 |
| tgctcgtctg  | ggatattcga  | atcttgccac  | ccctcgtctc  | agccttctgt  | actggtcccg | 12360 |
| ccaccnaacg  | tlcggcgag   | aagcaggcca  | ttatcgccgg  | catggcggcc  | gacgcgctgg | 12420 |
| gctacgtctt  | gctggcggtt  | gcgacgcgag  | gctggatggc  | cttccccatt  | atgattcttc | 12480 |
| tcgcttccgg  | cggcatcggg  | atgcccgctg  | tgccagccat  | gctgtccagg  | caggtagatg | 12540 |
| acyaccatca  | gggacagctt  | caaggatcgc  | tcgcggctct  | taccagccta  | acttcgatca | 12600 |
| ctggaccgct  | gatcgtcacg  | gcgatttatg  | ccgcctcggc  | gagcacatgg  | aacgggttgg | 12660 |
| catggattgt  | agggcccgcc  | ctataccttg  | tctgcctccc  | cgcgttgctg  | cgcgggtgat | 12720 |
| ggagccgggc  | cacctcgacc  | tgaatggaag  | ccgctggcac  | ctcgctaacc  | gattcaccac | 12780 |
| tccaagaatt  | qgagccaatc  | aattcttgcg  | gagaactgtg  | aatgcgcaaa  | ccaacccttg | 12840 |
| gcagaacata  | tccatcgctg  | ccgccatctc  | cagcagccgc  | acgcggcgca  | ctcggggcag | 12900 |
| cgttgggtcc  | tgcccaaggg  | tgcccatgat  | cgtgctctct  | tcggttgagg  | cccggctagg | 12960 |
| ctggcggggg  | tgcccttactg | gttagcagaa  | tgaatcaccg  | atacgcgagc  | gaacgtgaag | 13020 |
| cgaactgctg  | tgcaaaacgt  | ctgcgacctg  | agcaacaaca  | tgaatgggtc  | tcgggttccg | 13080 |
| tggttctgta  | agtctggaaa  | cgcgggaagt  | agcgccttgc  | accatttatgt | tccggatctg | 13140 |
| catcgagga   | tgctgctggc  | tacctgtggg  | aacacctaca  | tctgtattta  | cgaagcgtg  | 13200 |
| gcattgaccu  | tgagtgattt  | ttctctgggt  | ccgcgcgctc  | cataccgcca  | gttgtttacc | 13260 |
| ctcaccaagt  | tccagtaacc  | gggcatgttc  | atcatcagta  | acccgtatcg  | tgagcatcct | 13320 |
| ctctcgtttc  | atcggtatca  | ttacccctcat | gaacagaaat  | cccccttaca  | cggaggcatc | 13380 |
| agtgaccaa   | caggaaaaaa  | ccgcctttaa  | catggccggc  | tttatcagaa  | gccagacatt | 13440 |
| aacgcttctg  | gagaaactca  | acgagctgga  | cgcggatgaa  | caggcagaca  | tctgtgaatc | 13500 |
| gcttcacgac  | cacgctgatg  | agctttaccg  | cagctgcctc  | gcgcgtttcg  | gtgatgacgg | 13560 |
| tgaaaacctc  | tgacacatgc  | agctcccgga  | gacggtcaca  | gcttgtctgt  | aagcggatgc | 13620 |
| cgggagcaga  | caagcccgtc  | agggcgcgct  | agcgggtgtt  | ggcgggtgtc  | ggggtcgagc | 13680 |
| catgacccag  | tcacgtagcg  | atagcggagt  | gtatactggc  | ttactatgac  | ggcatcagag | 13740 |
| cagattgtac  | tgagagtgca  | ccatattcgg  | tgtgaaatac  | cgcacagatg  | cgtaaggaga | 13800 |
| aaataccgca  | tcaggcgctc  | ttccgcttcc  | tcgctcactg  | actcgtctgc  | ctcgggtcgt | 13860 |
| cggctgcggc  | gagcggtatc  | agctcactca  | aaggcggtaa  | tacggttatc  | cacagaatca | 13920 |
| ggggataacg  | caggaaagaa  | catgtgagca  | aaaggccagc  | aaaaggccag  | gaaccgtaaa | 13980 |
| aaggccgcgt  | tgctggcggt  | tttccatagg  | ctccgcccc   | ctgacgagca  | tcacaaaaat | 14040 |
| cgacgctcaa  | gtcagagggt  | gcgaaaccgg  | acaggactat  | aaagatacca  | ggcgtttccc | 14100 |
| cctgggaagc  | ccctcgtgcg  | ctctcctgtt  | ccgacctgct  | cgtttaccgg  | atacctgtcc | 14160 |
| gcctttctcc  | cttcgggaag  | cgtggcgctt  | tctcatagct  | cacgctgtag  | gtatctcagt | 14220 |



```

tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccctcgt ttagcccgac 14280
cgctcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cgglaagaca cgacttatcg 14340
ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtgctaca 14400
gagttcttga agtggggccc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc 14460
gctctgctga agccagttac ctccggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaaaa 14520
accaccgctg gtacgggtgg tttttttggt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa 14580
ggatctcaag aagatccctt gatcttttct acgggggtctg acgctcagtg gaacgaaac 14640
tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta 14700
aattaaaaat gaagttttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt 14760
taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcattcata 14820
gttgcccgac tccccgctgt gtagataact acgatacggg aggggttacc atctggcccc 14880
agtgtcgcaa tgataccgcg agacccacgc tcaccggctc cagattttatc agcaataaac 14940
cagccagcgg gaagggcgga gcgcagaagt ggctcctgcaa ctttatccgc ctccatccag 15000
tctattaatt gttccgggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttcgcaaac 15060
gttggtgcca ttgctgcaag atctggctag cgatgacctt gctgattggt tcgctgacca 15120
tctccgggcg cgcgatttta ggtgacacta tag 15153

```

<210> 49

<211> 3390

<212> PRT

5 <213> Dengue 3 (Sleman/78) virusü

<400> 49

```

Met Asn Asn Gln Arg Lys Lys Thr Gly Lys Pro Ser Ile Asn Met Leu
 1           5           10           15
Lys Arg Val Arg Asn Arg Val Ser Thr Gly Ser Gln Leu Ala Lys Arg
          20           25           30
Phe Ser Arg Gly Leu Leu Asn Gly Gln Gly Pro Met Lys Leu Val Met
          35           40           45
Ala Phe Ile Ala Phe Leu Arg Phe Leu Ala Ile Pro Pro Thr Ala Gly
          50           55           60
Val Leu Ala Arg Trp Gly Thr Phe Lys Lys Ser Gly Ala Ile Lys Val
          65           70           75           80
Leu Arg Gly Phe Lys Lys Glu Ile Ser Asn Met Leu Ser Ile Ile Asn
          85           90           95
Arg Arg Lys Lys Thr Ser Leu Cys Leu Met Met Met Leu Pro Ala Thr
          100          105          110
Leu Ala Phe His Leu Thr Ser Arg Asp Gly Glu Pro Arg Met Ile Val
          115          120          125
Gly Lys Asn Glu Arg Gly Lys Ser Leu Leu Phe Lys Thr Ala Ser Gly
          130          135          140
Ile Asn Met Cys Thr Leu Ile Ala Met Asp Leu Gly Glu Met Cys Asp
          145          150          155          160
Asp Thr Val Thr Tyr Lys Cys Pro Leu Ile Thr Glu Val Glu Pro Glu
          165          170          175
Asp Ile Asp Cys Trp Cys Asn Leu Thr Ser Thr Trp Val Thr Tyr Gly
          180          185          190
Thr Cys Asn Gln Ala Gly Glu His Arg Arg Asp Lys Arg Ser Val Ala
          195          200          205
Leu Ala Pro His Val Gly Met Gly Leu Asp Thr Arg Thr Gln Thr Trp
          210          215          220
Met Ser Ala Glu Gly Ala Trp Arg Gln Val Glu Lys Val Glu Thr Trp
          225          230          235          240

```

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Phe | Arg | His | Pro | Gly | Phe | Thr | Ile | Leu | Ala | Leu | Phe | Leu | Ala | His | 245 | 250 | 255 |
| Tyr | Ile | Gly | Thr | Ser | Leu | Thr | Gln | Lys | Val | Val | Ile | Phe | Ile | Leu | Leu | 260 | 265 | 270 |
| Met | Leu | Val | Thr | Pro | Ser | Met | Thr | Met | Arg | Cys | Val | Gly | Val | Gly | Asn | 275 | 280 | 285 |
| Arg | Asp | Phe | Val | Glu | Gly | Leu | Ser | Gly | Ala | Thr | Trp | Val | Asp | Val | Val | 290 | 295 | 300 |
| Leu | Glu | His | Gly | Gly | Cys | Val | Thr | Thr | Met | Ala | Lys | Asn | Lys | Pro | Thr | 305 | 310 | 315 |
| Leu | Asp | Ile | Glu | Leu | Gln | Lys | Thr | Glu | Ala | Thr | Gln | Leu | Ala | Thr | Leu | 325 | 330 | 335 |
| Arg | Lys | Leu | Cys | Ile | Glu | Gly | Lys | Ile | Thr | Asn | Val | Thr | Thr | Asp | Ser | 340 | 345 | 350 |
| Arg | Cys | Pro | Thr | Gln | Gly | Glu | Ala | Ile | Leu | Pro | Glu | Glu | Gln | Asp | Gln | 355 | 360 | 365 |
| Asn | His | Val | Cys | Lys | His | Thr | Tyr | Val | Asp | Arg | Gly | Trp | Gly | Asn | Gly | 370 | 375 | 380 |
| Cys | Gly | Leu | Phe | Gly | Lys | Gly | Ser | Leu | Val | Thr | Cys | Ala | Lys | Phe | Gln | 385 | 390 | 395 |
| Cys | Leu | Glu | Ser | Ile | Glu | Gly | Lys | Val | Val | Gln | His | Glu | Asn | Leu | Lys | 405 | 410 | 415 |
| Tyr | Thr | Val | Ile | Ile | Thr | Val | His | Thr | Gly | Asp | Gln | His | Gln | Val | Gly | 420 | 425 | 430 |
| Asn | Glu | Thr | Gln | Gly | Val | Thr | Ala | Glu | Ile | Thr | Pro | Gln | Ala | Ser | Thr | 435 | 440 | 445 |
| Val | Glu | Ala | Ile | Leu | Pro | Glu | Tyr | Gly | Thr | Leu | Gly | Leu | Glu | Cys | Ser | 450 | 455 | 460 |
| Pro | Arg | Thr | Gly | Leu | Asp | Phe | Asn | Glu | Met | Ile | Leu | Leu | Thr | Met | Lys | 465 | 470 | 475 |
| Asn | Lys | Ala | Trp | Met | Val | His | Arg | Gln | Trp | Phe | Phe | Asp | Leu | Pro | Leu | 485 | 490 | 495 |
| Pro | Trp | Thr | Ser | Gly | Ala | Thr | Thr | Glu | Thr | Pro | Thr | Trp | Asn | Lys | Lys | 500 | 505 | 510 |
| Glu | Leu | Leu | Val | Thr | Phe | Lys | Asn | Ala | His | Ala | Lys | Lys | Gln | Glu | Val | 515 | 520 | 525 |
| Val | Val | Leu | Gly | Ser | Gln | Glu | Gly | Ala | Met | His | Thr | Ala | Leu | Thr | Gly | 530 | 535 | 540 |
| Ala | Thr | Glu | Ile | Gln | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ser | Ile | Phe | Ala | Gly | His | 545 | 550 | 555 |
| Leu | Lys | Cys | Arg | Leu | Lys | Met | Asp | Lys | Leu | Glu | Leu | Lys | Gly | Met | Ser | 565 | 570 | 575 |
| Tyr | Ala | Met | Cys | Leu | Asn | Ala | Phe | Val | Leu | Lys | Lys | Glu | Val | Ser | Glu | 580 | 585 | 590 |
| Thr | Gln | His | Gly | Thr | Ile | Leu | Ile | Lys | Val | Glu | Tyr | Lys | Gly | Glu | Asp | 595 | 600 | 605 |
| Ala | Pro | Cys | Lys | Ile | Pro | Phe | Ser | Thr | Glu | Asp | Gly | Gln | Gly | Lys | Ala | 610 | 615 | 620 |
| His | Asn | Gly | Arg | Leu | Ile | Thr | Ala | Asn | Pro | Val | Val | Thr | Lys | Lys | Glu | 625 | 630 | 635 |
| Glu | Pro | Val | Asn | Ile | Glu | Ala | Glu | Pro | Pro | Phe | Gly | Glu | Ser | Asn | Ile | 645 | 650 | 655 |
| Val | Ile | Gly | Ile | Gly | Asp | Lys | Ala | Leu | Lys | Ile | Asn | Trp | Tyr | Lys | Lys | 660 | 665 | 670 |
| Gly | Ser | Ser | Ile | Gly | Lys | Met | Phe | Glu | Ala | Thr | Ala | Arg | Gly | Ala | Arg |     |     |     |

|                             |                                         |      |
|-----------------------------|-----------------------------------------|------|
| 675                         | 680                                     | 685  |
| Arg Met Ala Ile Leu Gly     | Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly |      |
| 690                         | 695                                     | 700  |
| Gly Val Leu Asn Ser Leu Gly | Lys Met Val His Gln Ile Phe Gly Ser     |      |
| 705                         | 710                                     | 715  |
| Ala Tyr Thr Ala Leu Phe Ser | Gly Val Ser Trp Ile Met Lys Ile Gly     |      |
|                             | 725                                     | 730  |
| Ile Gly Val Leu Leu Thr Trp | Ile Gly Leu Asn Ser Lys Asn Thr Ser     |      |
|                             | 740                                     | 745  |
| Met Ser Phe Ser Cys Ile Val | Ile Gly Ile Ile Thr Leu Tyr Leu Gly     |      |
|                             | 755                                     | 760  |
| Ala Val Val Gln Ala Asp Met | Gly Cys Val Ile Asn Trp Lys Gly Lys     |      |
|                             | 770                                     | 775  |
| Glu Leu Lys Cys Gly Ser Gly | Ile Phe Val Thr Asn Glu Val His Thr     |      |
| 785                         | 790                                     | 795  |
| Trp Thr Glu Gln Tyr Lys Phe | Gln Ala Asp Ser Pro Lys Arg Leu Ala     |      |
|                             | 805                                     | 810  |
| Thr Ala Ile Ala Gly Ala Trp | Glu Asn Gly Val Cys Gly Ile Arg Ser     |      |
|                             | 820                                     | 825  |
| Thr Thr Arg Met Glu Asn Leu | Leu Trp Lys Gln Ile Ala Asn Glu Leu     |      |
|                             | 835                                     | 840  |
| Asn Tyr Ile Leu Trp Glu Asn | Asn Ile Lys Leu Thr Val Val Val Gly     |      |
|                             | 850                                     | 855  |
| Asp Ile Ile Gly Val Leu Glu | Gln Gly Lys Arg Thr Leu Thr Pro Gln     |      |
| 865                         | 870                                     | 875  |
| Pro Met Glu Leu Lys Tyr Ser | Trp Lys Thr Trp Gly Lys Ala Lys Ile     |      |
|                             | 885                                     | 890  |
| Val Thr Ala Glu Thr Gln Asn | Ser Ser Phe Ile Ile Asp Gly Pro Asn     |      |
|                             | 900                                     | 905  |
| Thr Pro Glu Cys Pro Ser Ala | Ser Arg Ala Trp Asn Val Trp Glu Val     |      |
|                             | 915                                     | 920  |
| Glu Asp Tyr Gly Phe Gly Val | Phe Thr Thr Asn Ile Trp Leu Lys Leu     |      |
|                             | 930                                     | 935  |
| Arg Glu Met Tyr Thr Gln Leu | Cys Asp His Arg Leu Met Ser Ala Ala     |      |
| 945                         | 950                                     | 955  |
| Val Lys Asp Glu Arg Ala Val | His Ala Asp Met Gly Tyr Trp Ile Glu     |      |
|                             | 965                                     | 970  |
| Ser Gln Lys Asn Gly Ser Trp | Lys Leu Glu Lys Ala Ser Leu Ile Glu     |      |
|                             | 980                                     | 985  |
| Val Lys Thr Cys Thr Trp Pro | Lys Ser His Thr Leu Trp Ser Asn Gly     |      |
|                             | 995                                     | 1000 |
| Val Leu Glu Ser Asp Met Ile | Ile Ile Pro Lys Ser Leu Ala Gly Pro Ile |      |
|                             | 1010                                    | 1015 |
| Ser Gln His Asn Tyr Arg Pro | Gly Tyr His Thr Gln Thr Ala Gly Pro     |      |
| 1025                        | 1030                                    | 1035 |
| Trp His Leu Gly Lys Leu Glu | Leu Asp Phe Asn Tyr Cys Glu Gly Thr     |      |
|                             | 1045                                    | 1050 |
| Thr Val Val Ile Thr Glu Asn | Cys Gly Thr Arg Gly Pro Ser Leu Arg     |      |
|                             | 1060                                    | 1065 |
| Thr Thr Thr Val Ser Gly Lys | Leu Ile His Glu Trp Cys Cys Arg Ser     |      |
|                             | 1075                                    | 1080 |
| Cys Thr Leu Pro Pro Leu Arg | Tyr Met Gly Glu Asp Gly Cys Trp Tyr     |      |
|                             | 1090                                    | 1095 |
| Gly Met Glu Ile Arg Pro Ile | Asn Glu Lys Glu Glu Asn Met Val Lys     |      |
| 1105                        | 1110                                    | 1115 |
|                             |                                         | 1120 |

Ser Leu Val Ser Ala Gly Ser Gly Lys Val Asp Asn Phe Thr Met Gly  
 1125 1130 1135  
 Val Leu Cys Leu Ala Ile Leu Phe Glu Glu Val Met Arg Gly Lys Phe  
 1140 1145 1150  
 Gly Lys Lys His Met Ile Ala Gly Val Leu Phe Thr Phe Val Leu Leu  
 1155 1160 1165  
 Leu Ser Gly Gln Ile Thr Trp Arg Asp Met Ala His Thr Leu Ile Met  
 1170 1175 1180  
 Ile Gly Ser Asn Ala Ser Asp Arg Met Gly Met Gly Val Thr Tyr Leu  
 1185 1190 1195 1200  
 Ala Leu Ile Ala Thr Phe Lys Ile Gln Pro Phe Leu Ala Leu Gly Phe  
 1205 1210 1215  
 Phe Leu Arg Lys Leu Thr Ser Arg Glu Asn Leu Leu Leu Gly Val Gly  
 1220 1225 1230  
 Leu Ala Met Ala Thr Thr Leu Gln Leu Pro Glu Asp Ile Glu Gln Met  
 1235 1240 1245  
 Ala Asn Gly Ile Ala Leu Gly Leu Met Ala Leu Lys Leu Ile Thr Gln  
 1250 1255 1260  
 Phe Glu Thr Tyr Gln Leu Trp Thr Ala Leu Val Ser Leu Met Cys Ser  
 1265 1270 1275 1280  
 Asn Thr Ile Phe Thr Leu Thr Val Ala Trp Arg Thr Ala Thr Leu Ile  
 1285 1290 1295  
 Leu Ala Gly Ile Ser Leu Leu Pro Val Cys Gln Ser Ser Ser Met Arg  
 1300 1305 1310  
 Lys Thr Asp Trp Leu Pro Met Ala Val Ala Ala Met Gly Val Pro Pro  
 1315 1320 1325  
 Leu Pro Leu Phe Ile Phe Ser Leu Lys Asp Thr Leu Lys Arg Arg Ser  
 1330 1335 1340  
 Trp Pro Leu Asn Glu Gly Val Met Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Leu  
 1345 1350 1355 1360  
 Ala Ser Ser Leu Leu Arg Asn Asp Val Pro Met Ala Gly Pro Leu Val  
 1365 1370 1375  
 Ala Gly Gly Leu Leu Ile Ala Cys Tyr Val Ile Thr Gly Thr Ser Ala  
 1380 1385 1390  
 Asp Leu Thr Val Glu Lys Ala Ala Asp Val Thr Trp Glu Glu Glu Ala  
 1395 1400 1405  
 Glu Gln Thr Gly Val Ser His Asn Leu Met Ile Thr Val Asp Asp Asp  
 1410 1415 1420  
 Gly Thr Met Arg Ile Lys Asp Asp Glu Thr Glu Asn Ile Leu Thr Val  
 1425 1430 1435 1440  
 Leu Leu Lys Thr Ala Leu Leu Ile Val Ser Gly Ile Phe Pro Tyr Ser  
 1445 1450 1455  
 Ile Pro Ala Thr Leu Leu Val Trp His Thr Trp Gln Lys Gln Thr Gln  
 1460 1465 1470  
 Arg Ser Gly Val Leu Trp Asp Val Pro Ser Pro Pro Glu Thr Gln Lys  
 1475 1480 1485  
 Ala Glu Leu Glu Glu Gly Val Tyr Arg Ile Lys Gln Gln Gly Ile Phe  
 1490 1495 1500  
 Gly Lys Thr Gln Val Gly Val Gly Val Gln Lys Glu Gly Val Phe His  
 1505 1510 1515 1520  
 Thr Met Trp His Val Thr Arg Gly Ala Val Leu Thr His Asn Gly Lys  
 1525 1530 1535  
 Arg Leu Glu Pro Asn Trp Ala Ser Val Lys Lys Asp Leu Ile Ser Tyr  
 1540 1545 1550  
 Gly Gly Gly Trp Lys Leu Ser Ala Gln Trp Gln Lys Gly Glu Glu Val

|                                                                 |      |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|
| 1555                                                            | 1560 | 1565 |
| Gln Val Ile Ala Val Glu Pro Gly Lys Asn Pro Lys Asn Phe Gln Thr |      |      |
| 1570                                                            | 1575 | 1580 |
| Met Pro Gly Ile Phe Gln Thr Thr Thr Gly Glu Ile Gly Ala Ile Ala |      |      |
| 1585                                                            | 1590 | 1595 |
| Leu Asp Phe Lys Pro Gly Thr Ser Gly Ser Pro Ile Ile Asn Arg Glu |      | 1600 |
| 1605                                                            | 1610 | 1615 |
| Gly Lys Val Leu Gly Leu Tyr Gly Asn Gly Val Val Thr Lys Asn Gly |      |      |
| 1620                                                            | 1625 | 1630 |
| Gly Tyr Val Ser Gly Ile Ala Gln Thr Asn Ala Glu Pro Asp Gly Pro |      |      |
| 1635                                                            | 1640 | 1645 |
| Thr Pro Glu Leu Glu Glu Glu Met Phe Lys Lys Arg Asn Leu Thr Ile |      |      |
| 1650                                                            | 1655 | 1660 |
| Met Asp Leu His Pro Gly Ser Gly Lys Thr Arg Lys Tyr Leu Pro Ala |      |      |
| 1665                                                            | 1670 | 1675 |
| Ile Val Arg Glu Ala Ile Lys Arg Arg Leu Arg Thr Leu Ile Leu Ala |      | 1680 |
| 1685                                                            | 1690 | 1695 |
| Pro Thr Arg Val Val Ala Ala Glu Met Glu Glu Ala Leu Lys Gly Leu |      |      |
| 1700                                                            | 1705 | 1710 |
| Pro Ile Arg Tyr Gln Thr Thr Ala Thr Lys Ser Glu His Thr Gly Arg |      |      |
| 1715                                                            | 1720 | 1725 |
| Glu Ile Val Asp Leu Met Cys His Ala Thr Phe Thr Met Arg Leu Leu |      |      |
| 1730                                                            | 1735 | 1740 |
| Ser Pro Val Arg Val Pro Asn Tyr Asn Leu Ile Ile Met Asp Glu Ala |      |      |
| 1745                                                            | 1750 | 1755 |
| His Phe Thr Asp Pro Ala Ser Ile Ala Ala Arg Gly Tyr Ile Ser Thr |      |      |
| 1765                                                            | 1770 | 1775 |
| Arg Val Gly Met Gly Glu Ala Ala Ala Ile Phe Met Thr Ala Thr Pro |      |      |
| 1780                                                            | 1785 | 1790 |
| Pro Gly Thr Ala Asp Ala Phe Pro Gln Ser Asn Ala Pro Ile Gln Asp |      |      |
| 1795                                                            | 1800 | 1805 |
| Glu Glu Arg Asp Ile Pro Glu Arg Ser Trp Asn Ser Gly Asn Glu Trp |      |      |
| 1810                                                            | 1815 | 1820 |
| Ile Thr Asp Phe Ala Gly Lys Thr Val Trp Phe Val Pro Ser Ile Lys |      |      |
| 1825                                                            | 1830 | 1835 |
| Ala Gly Asn Asp Ile Ala Asn Cys Leu Arg Lys Asn Gly Lys Lys Val |      |      |
| 1845                                                            | 1850 | 1855 |
| Ile Gln Leu Ser Arg Lys Thr Phe Asp Thr Glu Tyr Gln Lys Thr Lys |      |      |
| 1860                                                            | 1865 | 1870 |
| Leu Asn Asp Trp Asp Phe Val Val Thr Thr Asp Ile Ser Glu Met Gly |      |      |
| 1875                                                            | 1880 | 1885 |
| Ala Asn Phe Lys Ala Asp Arg Val Ile Asp Pro Arg Arg Cys Leu Lys |      |      |
| 1890                                                            | 1895 | 1900 |
| Pro Val Ile Leu Thr Asp Gly Pro Glu Arg Val Ile Leu Ala Gly Pro |      |      |
| 1905                                                            | 1910 | 1915 |
| Met Pro Val Thr Val Ala Ser Ala Ala Gln Arg Arg Gly Arg Val Gly |      |      |
| 1925                                                            | 1930 | 1935 |
| Arg Asn Pro Gln Lys Glu Asn Asp Gln Tyr Ile Phe Met Gly Gln Pro |      |      |
| 1940                                                            | 1945 | 1950 |
| Leu Asn Asn Asp Glu Asp His Ala His Trp Thr Glu Ala Lys Met Leu |      |      |
| 1955                                                            | 1960 | 1965 |
| Leu Asp Asn Ile Asn Thr Pro Glu Gly Ile Ile Pro Ala Leu Phe Glu |      |      |
| 1970                                                            | 1975 | 1980 |
| Pro Glu Arg Glu Lys Ser Ala Ala Ile Asp Gly Glu Tyr Arg Leu Lys |      |      |
| 1985                                                            | 1990 | 1995 |
|                                                                 |      | 2000 |

Gly Glu Ser Arg Lys Thr Phe Val Glu Leu Met Arg Arg Gly Asp Leu  
 2005 2010 2015  
 Pro Val Trp Leu Ala His Lys Val Ala Ser Glu Gly Ile Lys Tyr Thr  
 2020 2025 2030  
 Asp Arg Lys Trp Cys Phe Asp Gly Glu Arg Asn Asn Gln Ile Leu Glu  
 2035 2040 2045  
 Glu Asn Met Asp Val Glu Ile Trp Thr Lys Glu Gly Glu Lys Lys Lys  
 2050 2055 2060  
 Leu Arg Pro Arg Trp Leu Asp Ala Arg Thr Tyr Ser Asp Pro Leu Ala  
 2065 2070 2075 2080  
 Leu Lys Glu Phe Lys Asp Phe Ala Ala Gly Arg Lys Ser Ile Ala Leu  
 2085 2090 2095  
 Asp Leu Val Thr Glu Ile Gly Arg Val Pro Ser His Leu Ala His Arg  
 2100 2105 2110  
 Thr Arg Asn Ala Leu Asp Asn Leu Val Met Leu His Thr Ser Glu His  
 2115 2120 2125  
 Gly Gly Arg Ala Tyr Arg His Ala Val Glu Glu Leu Pro Glu Thr Met  
 2130 2135 2140  
 Glu Thr Leu Leu Leu Leu Gly Leu Met Ile Leu Leu Thr Gly Gly Ala  
 2145 2150 2155 2160  
 Met Leu Phe Leu Ile Ser Gly Lys Gly Ile Gly Lys Thr Ser Ile Gly  
 2165 2170 2175  
 Leu Ile Cys Val Ala Ala Ser Ser Gly Met Leu Trp Met Ala Asp Val  
 2180 2185 2190  
 Pro Leu Gln Trp Ile Ala Ser Ala Ile Val Leu Glu Phe Phe Met Met  
 2195 2200 2205  
 Val Leu Leu Ile Pro Glu Pro Glu Lys Gln Arg Thr Pro Gln Asp Asn  
 2210 2215 2220  
 Gln Leu Ala Tyr Val Val Ile Gly Ile Leu Thr Leu Ala Ala Ile Val  
 2225 2230 2235 2240  
 Ala Ala Asn Glu Met Gly Leu Leu Glu Thr Thr Lys Arg Asp Leu Gly  
 2245 2250 2255  
 Met Ser Lys Glu Pro Gly Val Val Ser Pro Thr Ser Tyr Leu Asp Val  
 2260 2265 2270  
 Asp Leu His Pro Ala Ser Ala Trp Thr Leu Tyr Ala Val Ala Thr Thr  
 2275 2280 2285  
 Val Ile Thr Pro Met Leu Arg His Thr Ile Glu Asn Ser Thr Ala Asn  
 2290 2295 2300  
 Val Ser Leu Ala Ala Ile Ala Asn Gln Ala Val Val Leu Met Gly Leu  
 2305 2310 2315 2320  
 Asp Lys Gly Trp Pro Ile Ser Lys Met Asp Leu Gly Val Pro Leu Leu  
 2325 2330 2335  
 Ala Leu Gly Cys Tyr Ser Gln Val Asn Pro Leu Thr Leu Thr Ala Ala  
 2340 2345 2350  
 Val Leu Leu Leu Val Thr His Tyr Ala Ile Ile Gly Pro Gly Leu Gln  
 2355 2360 2365  
 Ala Lys Ala Thr Arg Glu Ala Gln Lys Arg Thr Ala Ala Gly Ile Met  
 2370 2375 2380  
 Lys Asn Pro Thr Val Asp Gly Ile Met Thr Ile Asp Leu Asp Pro Val  
 2385 2390 2395 2400  
 Ile Tyr Asp Ser Lys Phe Glu Lys Gln Leu Gly Gln Val Met Leu Leu  
 2405 2410 2415  
 Val Leu Cys Ala Val Gln Leu Leu Leu Met Arg Thr Ser Trp Ala Phe  
 2420 2425 2430  
 Cys Glu Ala Leu Thr Leu Ala Thr Gly Pro Ile Thr Thr Leu Trp Glu

|                                                                 |      |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|
| 2435                                                            | 2440 | 2445 |
| Gly Ser Pro Gly Lys Phe Trp Asn Thr Thr Ile Ala Val Ser Met Ala |      |      |
| 2450                                                            | 2455 | 2460 |
| Asn Ile Phe Arg Gly Ser Tyr Leu Ala Gly Ala Gly Leu Ala Phe Ser |      |      |
| 2465                                                            | 2470 | 2475 |
| Ile Met Lys Ser Val Gly Thr Gly Lys Arg Gly Thr Gly Ser Gln Gly |      |      |
| 2485                                                            | 2490 | 2495 |
| Glu Thr Leu Gly Glu Lys Trp Lys Lys Lys Leu Asn Gln Leu Pro Arg |      |      |
| 2500                                                            | 2505 | 2510 |
| Lys Glu Phe Asp Leu Tyr Lys Lys Ser Gly Ile Thr Glu Val Asp Arg |      |      |
| 2515                                                            | 2520 | 2525 |
| Thr Glu Ala Lys Glu Gly Leu Lys Arg Gly Glu Ile Thr His His Ala |      |      |
| 2530                                                            | 2535 | 2540 |
| Val Ser Arg Gly Ser Ala Lys Leu Gln Trp Phe Val Glu Arg Asn Met |      |      |
| 2545                                                            | 2550 | 2555 |
| Val Ile Pro Glu Gly Arg Val Ile Asp Leu Gly Cys Gly Arg Gly Gly |      |      |
| 2565                                                            | 2570 | 2575 |
| Trp Ser Tyr Tyr Cys Ala Gly Leu Lys Lys Val Thr Glu Val Arg Gly |      |      |
| 2580                                                            | 2585 | 2590 |
| Tyr Thr Lys Gly Gly Pro Gly His Glu Glu Pro Val Pro Met Ser Thr |      |      |
| 2595                                                            | 2600 | 2605 |
| Tyr Gly Trp Asn Ile Val Lys Leu Met Ser Gly Lys Asp Val Phe Tyr |      |      |
| 2610                                                            | 2615 | 2620 |
| Leu Pro Pro Glu Lys Cys Asp Thr Leu Leu Cys Asp Ile Gly Glu Ser |      |      |
| 2625                                                            | 2630 | 2635 |
| Ser Pro Ser Pro Thr Val Glu Glu Ser Arg Thr Ile Arg Val Leu Lys |      |      |
| 2645                                                            | 2650 | 2655 |
| Met Val Glu Pro Trp Leu Lys Asn Asn Gln Phe Cys Ile Lys Val Leu |      |      |
| 2660                                                            | 2665 | 2670 |
| Asn Pro Tyr Met Pro Thr Val Ile Glu His Leu Glu Arg Leu Gln Arg |      |      |
| 2675                                                            | 2680 | 2685 |
| Lys His Gly Gly Met Leu Val Arg Asn Pro Leu Ser Arg Asn Ser Thr |      |      |
| 2690                                                            | 2695 | 2700 |
| His Glu Met Tyr Trp Ile Ser Asn Gly Thr Gly Asn Ile Val Ser Ser |      |      |
| 2705                                                            | 2710 | 2715 |
| Val Asn Met Val Ser Arg Leu Leu Leu Asn Arg Phe Thr Met Thr His |      |      |
| 2725                                                            | 2730 | 2735 |
| Arg Arg Pro Thr Ile Glu Lys Asp Val Asp Leu Gly Ala Gly Thr Arg |      |      |
| 2740                                                            | 2745 | 2750 |
| His Val Asn Ala Glu Pro Glu Thr Pro Asn Met Asp Val Ile Gly Glu |      |      |
| 2755                                                            | 2760 | 2765 |
| Arg Ile Arg Arg Ile Lys Glu Glu His Ser Ser Thr Trp His Tyr Asp |      |      |
| 2770                                                            | 2775 | 2780 |
| Asp Glu Asn Pro Tyr Lys Thr Trp Ala Tyr His Gly Ser Tyr Glu Val |      |      |
| 2785                                                            | 2790 | 2795 |
| Lys Ala Thr Gly Ser Ala Ser Ser Met Ile Asn Gly Val Val Lys Leu |      |      |
| 2805                                                            | 2810 | 2815 |
| Leu Thr Lys Pro Trp Asp Val Val Pro Met Val Thr Gln Met Ala Met |      |      |
| 2820                                                            | 2825 | 2830 |
| Thr Asp Thr Thr Pro Phe Gly Gln Gln Arg Val Phe Lys Glu Lys Val |      |      |
| 2835                                                            | 2840 | 2845 |
| Asp Thr Arg Thr Pro Arg Pro Met Pro Gly Thr Arg Lys Val Met Glu |      |      |
| 2850                                                            | 2855 | 2860 |
| Ile Thr Ala Glu Trp Leu Trp Arg Thr Leu Gly Arg Asn Lys Arg Pro |      |      |
| 2865                                                            | 2870 | 2875 |
|                                                                 |      | 2880 |

Arg Leu Cys Thr Arg Glu Glu Phe Thr Lys Lys Val Arg Thr Asn Ala  
 2885 2890 2895  
 Ala Met Gly Ala Val Phe Thr Glu Glu Asn Gln Trp Asp Ser Ala Arg  
 2900 2905 2910  
 Ala Ala Val Glu Asp Glu Glu Phe Trp Lys Leu Val Asp Arg Glu Arg  
 2915 2920 2925  
 Glu Leu His Lys Leu Gly Lys Cys Gly Ser Cys Val Tyr Asn Met Met  
 2930 2935 2940  
 Gly Lys Arg Glu Lys Lys Leu Gly Glu Phe Gly Lys Ala Lys Gly Ser  
 2945 2950 2955 2960  
 Arg Ala Ile Trp Tyr Met Trp Leu Gly Ala Arg Tyr Leu Glu Phe Glu  
 2965 2970 2975  
 Ala Leu Gly Phe Leu Asn Glu Asp His Trp Phe Ser Arg Glu Asn Ser  
 2980 2985 2990  
 Tyr Ser Gly Val Glu Gly Glu Gly Leu His Lys Leu Gly Tyr Ile Leu  
 2995 3000 3005  
 Arg Asp Ile Ser Lys Ile Pro Gly Gly Ala Met Tyr Ala Asp Asp Thr  
 3010 3015 3020  
 Ala Gly Trp Asp Thr Arg Ile Thr Glu Asp Asp Leu His Asn Glu Glu  
 3025 3030 3035 3040  
 Lys Ile Thr Gln Gln Met Asp Pro Glu His Arg Gln Leu Ala Asn Ala  
 3045 3050 3055  
 Ile Phe Lys Leu Thr Tyr Gln Asn Lys Val Val Lys Val Gln Arg Pro  
 3060 3065 3070  
 Thr Pro Lys Gly Thr Val Met Asp Ile Ile Ser Arg Lys Asp Gln Arg  
 3075 3080 3085  
 Gly Ser Gly Gln Val Gly Thr Tyr Gly Leu Asn Thr Phe Thr Asn Met  
 3090 3095 3100  
 Glu Ala Gln Leu Ile Arg Gln Met Glu Gly Glu Gly Val Leu Ser Lys  
 3105 3110 3115 3120  
 Ala Asp Leu Glu Asn Pro His Leu Leu Glu Lys Lys Val Thr Gln Trp  
 3125 3130 3135  
 Leu Glu Thr Lys Gly Val Glu Arg Leu Lys Arg Met Ala Ile Ser Gly  
 3140 3145 3150  
 Asp Asp Cys Val Val Lys Pro Ile Asp Asp Arg Phe Ala Asn Ala Leu  
 3155 3160 3165  
 Leu Ala Leu Asn Asp Met Gly Lys Val Arg Lys Asp Ile Pro Gln Trp  
 3170 3175 3180  
 Gln Pro Ser Lys Gly Trp His Asp Trp Gln Gln Val Pro Phe Cys Ser  
 3185 3190 3195 3200  
 His His Phe His Glu Leu Ile Met Lys Asp Gly Arg Lys Leu Val Val  
 3205 3210 3215  
 Pro Cys Arg Pro Gln Asp Glu Leu Ile Gly Arg Ala Arg Ile Ser Gln  
 3220 3225 3230  
 Gly Ala Gly Trp Ser Leu Arg Glu Thr Ala Cys Leu Gly Lys Ala Tyr  
 3235 3240 3245  
 Ala Gln Met Trp Thr Leu Met Tyr Phe His Arg Arg Asp Leu Arg Leu  
 3250 3255 3260  
 Ala Ser Asn Ala Ile Cys Ser Ala Val Pro Val His Trp Val Pro Thr  
 3265 3270 3275 3280  
 Ser Arg Thr Thr Trp Ser Ile His Ala His His Gln Trp Met Thr Thr  
 3285 3290 3295  
 Glu Asp Met Leu Thr Val Trp Asn Arg Val Trp Ile Glu Asp Asn Pro  
 3300 3305 3310  
 Trp Met Glu Asp Lys Thr Pro Val Lys Thr Trp Glu Asp Val Pro Tyr



3315                      3320                      3325  
 Leu Gly Lys Arg Glu Asp Gln Trp Cys Gly Ser Leu Ile Gly Leu Thr  
 3330                      3335                      3340  
 Ser Arg Ala Thr Trp Ala Gln Asn Ile Leu Thr Ala Ile Gln Gln Val  
 3345                      3350                      3355                      3360  
 Arg Ser Leu Ile Gly Asn Glu Glu Phe Leu Asp Tyr Met Pro Ser Met  
 3365                      3370                      3375  
 Lys Arg Phe Arg Lys Glu Glu Glu Ser Glu Gly Ala Ile Trp  
 3380                      3385                      3390

- <210> 50  
 <211> 2426  
 5 <212> DNA  
 <213> Suni Sekans  
  
 <220>  
 <223> Dang 1 CME kimerik bölgesi  
 10  
 <400> 50

```

agttgttagt ctgtgtggac cgacaaggac agttccaaat cggaagcttg cttaacacag 60
ttctaacagt ttgtttgaat agagagcaga tctctggaaa aatgaacaac caacggaaaa 120
agacgggtcg accgtctttc aatatgctga aacgcgcgag aaaccgcgtg tcaactggtt 180
cacagttagc gaagagattc tcaaaaggat tgcttttcagg ccaaggaccc atgaaattgg 240
tgatggcttt catagcattt ctaagatttc tagccatacc cccaacagca ggaatttttg 300
ctagatggag ctcatccaag aagaatggag cgatcaaat gttacggggt ttcaaaaaag 360
agatctcaag catgttgaac attatgaaca ggaggaaaaa atctgtgacc atgctctcca 420
tgctgctgcc cacagccctg gcgttccatt tgaccacacg agggggagag ccacacatga 480
tagttagtaa gcaggaaaga ggaagtcac tgttgtttna gacctctgca ggcacataa 540
tgtgcactct cattgcgatg gatttgggag agttatgca ggacacaatg acctacaaat 600
gcccccgat cactgaggcg gaaccagatg acgttgactg ctggtgcaat gccacagaca 660
catgggtgac ctatgggacg tgttctcaaa cggcgcaaca cgcacgagac aaacgttccg 720
tggaactggc cccacacgtg ggacttggtc tagaacaag aaccgaaaca tggatgtcct 780
ctgaaggtgc ctggaaacaa gtacaaaaag tggagacttg ggctttgaga caccagggat 840
tcacgggtgac agcccttttt ttagcacatg ccataggaac atccattact cagaaaggga 900
tcattttcat tctgctgatg ctagtacac catcaatggc catgcgatgt gtgggaatag 960
gcaacagaga cttcgttgaa ggactgtcag gagcaacgtg ggtggacgtg gtattggagc 1020
atggaagctg cgtcaccacc atggcaaaaag ataaaccaac attggacatt gaactcttga 1080
agacggaggt cacaaacctt gccgtcttgc gcaaaactgt cattgaagct aaaatatcaa 1140
acaccaccac cgattcaagg tgtccaacac aaggagaggc tacactggtg gaagaacagg 1200
actcgaactt tgtgtgtcga cgaacgtttg tggacagagg ctggggtaat ggctgcggac 1260
tatttggaaa aggaagccta ctgacgtgtg ctaagttcaa gtgtgtgaca aaactagaag 1320
gaaagatagt tcaatatgaa aacttaaaat attcagtgat agtcactgtc cacactgggg 1380
accagacca ggtgggaaac gagactacag aacatggaac aattgcaacc ataacccttc 1440
aagctcctac gtcggaaata cagctgactg actacggagc cctcacattg gactgctcgc 1500
ctagaacagg gctggacttt aatgagatgg ttctattgac aatgaaagaa aaatcatggc 1560
ttgtccacaa acaatgggtt ctgactttac cactgccttg gacttcagga gcttcaacat 1620
ctcaagagac ttggaaacaga caagatttgc tggtcacatt caagacagct catgcaaa 1680
aacaggaaat agtcgtactg ggatcacagg aaggagcaat gcacactgcg ttgactgggg 1740
cgacagaaat ccagacgtca ggaacgacaa caatctttgc aggaacacctg aaatgcagac 1800
taaaaaatgga taaactgact ttaaaaggga tgtcatatgt aatgtgcaca ggctcattta 1860
agctagagaa ggaagtggct gagacccagc atggaactgt tttagtgcag gttaaatacg 1920
aaggaaacaga tgcgccatgc aagatccctt ttccggccca agatgagaaa ggagtgcacc 1980
agaatgggag attgataaca gccaaaccca tagtcaactg caaagaaaaa ccagtcaaca 2040
ttgagacaga accacctttt ggtgagagct acatcgtggt aggggcaggt gaaaaagctt 2100

```

```

tgaaactgag ctggttcaag aaagggagca gcatagggaa aatgttcgaā gcaactgccc 2160
gaggagcgcg aaggatggct atcctgggag acaccgcatg ggactttggc tctataggag 2220
gagtgttcac atcagtggga aaattggtac accaggtttt tggagccgca tatgggggtc 2280
tggtcagcgg tgtttcttgg accatgaaaa taggaatagg gattctgctg acatggctag 2340
gattaaactc gaggaacact tcaatggcta tgacgtgcat agctgttgga ggaatcactc 2400
tgtttctggg cttcacagtt caugca 2426

```

<210> 51

<211> 775

5 <212> PRT

<213> Suni Sekans

<220>

<223> Dang 1 CME kimerik bölgesi

10

<400> 51

15

20

25

30

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Asn | Asn | Gln | Arg | Lys | Lys | Thr | Gly | Arg | Pro | Ser | Phe | Asn | Met | Leu | 1   | 5   | 10  | 15  |
| Lys | Arg | Ala | Arg | Asn | Arg | Val | Ser | Thr | Gly | Ser | Gln | Leu | Ala | Lys | Arg | 20  | 25  | 30  |     |
| Phe | Ser | Lys | Gly | Leu | Leu | Ser | Gly | Gln | Gly | Pro | Met | Lys | Leu | Val | Met | 35  | 40  | 45  |     |
| Ala | Phe | Ile | Ala | Phe | Leu | Arg | Phe | Leu | Ala | Ile | Pro | Pro | Thr | Ala | Gly | 50  | 55  | 60  |     |
| Ile | Leu | Ala | Arg | Trp | Ser | Ser | Phe | Lys | Lys | Asn | Gly | Ala | Ile | Lys | Val | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Leu | Arg | Gly | Phe | Lys | Lys | Glu | Ile | Ser | Ser | Met | Leu | Asn | Ile | Met | Asn | 85  | 90  | 95  |     |
| Arg | Arg | Lys | Lys | Ser | Val | Thr | Met | Leu | Leu | Met | Leu | Leu | Pro | Thr | Ala | 100 | 105 | 110 |     |
| Leu | Ala | Phe | His | Leu | Thr | Thr | Arg | Gly | Gly | Glu | Pro | His | Met | Ile | Val | 115 | 120 | 125 |     |
| Ser | Lys | Gln | Glu | Arg | Gly | Lys | Ser | Leu | Leu | Phe | Lys | Thr | Ser | Ala | Gly | 130 | 135 | 140 |     |
| Ile | Asn | Met | Cys | Thr | Leu | Ile | Ala | Met | Asp | Leu | Gly | Glu | Leu | Cys | Glu | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Asp | Thr | Met | Thr | Tyr | Lys | Cys | Pro | Arg | Ile | Thr | Glu | Ala | Glu | Pro | Asp | 165 | 170 | 175 |     |
| Asp | Val | Asp | Cys | Trp | Cys | Asn | Ala | Thr | Asp | Thr | Trp | Val | Thr | Tyr | Gly | 180 | 185 | 190 |     |
| Thr | Cys | Ser | Gln | Thr | Gly | Glu | His | Arg | Arg | Asp | Lys | Arg | Ser | Val | Ala | 195 | 200 | 205 |     |
| Leu | Ala | Pro | His | Val | Gly | Leu | Gly | Leu | Glu | Thr | Arg | Thr | Glu | Thr | Trp | 210 | 215 | 220 |     |
| Met | Ser | Ser | Glu | Gly | Ala | Trp | Lys | Gln | Val | Gln | Lys | Val | Glu | Thr | Trp | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Ala | Leu | Arg | His | Pro | Gly | Phe | Thr | Val | Thr | Ala | Leu | Phe | Leu | Ala | His | 245 | 250 | 255 |     |
| Ala | Ile | Gly | Thr | Ser | Ile | Thr | Gln | Lys | Gly | Ile | Ile | Phe | Ile | Leu | Leu | 260 | 265 | 270 |     |
| Met | Leu | Val | Thr | Pro | Ser | Met | Ala | Met | Arg | Cys | Val | Gly | Ile | Gly | Asn | 275 | 280 | 285 |     |
| Arg | Asp | Phe | Val | Glu | Gly | Leu | Ser | Gly | Ala | Thr | Trp | Val | Asp | Val | Val | 290 | 295 | 300 |     |
| Leu | Glu | His | Gly | Ser | Cys | Val | Thr | Thr | Met | Ala | Lys | Asp | Lys | Pro | Thr |     |     |     |     |

```

305          310          315          320
Leu Asp Ile Glu Leu Leu Lys Thr Glu Val Thr Asn Pro Ala Val Leu
          325          330          335
Arg Lys Leu Cys Ile Glu Ala Lys Ile Ser Asn Thr Thr Thr Asp Ser
          340          345          350
Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala Thr Leu Val Glu Glu Gln Asp Ser
          355          360          365
Asn Phe Val Cys Arg Arg Thr Phe Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly
          370          375          380
Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Leu Leu Thr Cys Ala Lys Phe Lys
385          390          395          400
Cys Val Thr Lys Leu Glu Gly Lys Ile Val Gln Tyr Glu Asn Leu Lys
          405          410          415
Tyr Ser Val Ile Val Thr Val His Thr Gly Asp Gln His Gln Val Gly
          420          425          430
Asn Glu Thr Thr Glu His Gly Thr Thr Ile Ala Thr Ile Thr Pro Gln Ala
          435          440          445
Pro Thr Ser Glu Ile Gln Leu Thr Asp Tyr Gly Ala Leu Thr Leu Asp
          450          455          460
Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Thr
465          470          475          480
Met Lys Glu Lys Ser Trp Leu Val His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu
          485          490          495
Pro Leu Pro Trp Thr Ser Gly Ala Ser Thr Ser Gln Glu Thr Trp Asn
          500          505          510
Arg Gln Asp Leu Leu Val Thr Phe Lys Thr Ala His Ala Lys Lys Gln
          515          520          525
Glu Val Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu
530          535          540
Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Thr Ser Gly Thr Thr Thr Ile Phe Ala
545          550          555          560
Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly
          565          570          575
Met Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val
          580          585          590
Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly
          595          600          605
Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser Ala Gln Asp Glu Lys Gly
610          615          620
Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp
625          630          635          640
Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu Thr Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser
          645          650          655
Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Glu Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe
          660          665          670
Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Met Phe Glu Ala Thr Ala Arg Gly
          675          680          685
Ala Arg Arg Met Ala Ile Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser
690          695          700
Ile Gly Gly Val Phe Thr Ser Val Gly Lys Leu Val His Gln Val Phe
705          710          715          720
Gly Ala Ala Tyr Gly Val Leu Phe Ser Gly Val Ser Trp Thr Met Lys
          725          730          735
Ile Gly Ile Gly Ile Leu Leu Thr Trp Leu Gly Leu Asn Ser Arg Asn
          740          745          750

```

Thr Ser Met Ala Met Thr Cys Ile Ala Val Gly Gly Ile Thr Leu Phe  
 755 760 765  
 Leu Gly Phe Thr Val Gln Ala  
 770 775

- <210> 52  
 <211> 2423  
 <212> DNA  
 5 <213> Suni Sekans  
  
 <220>  
 <223> Dang 1 ME kimerik bölgesi  
  
 10 <400> 52

```

agtgtttagt ctgtgtggac cgacaagAAC agttccaaat cggagagcttq cttaacacacg 60
ttctaacagt ttgtttgaat agagagcagAAC tctctggaaa atgaaaccaa cgaacaaagg 120
tggtttagac acccttcaat atgctgaaac ycgagagaaa cggcgtatca acccctcaag 180
ggttgggtgaa gagattctca accggacttt ttctctggaa aggacccctta cggatgggtgc 240
tagaattcat caagttttctg cgaatccctt ccatccccacc aacagcaggg attctgaaga 300
gatggggaca gttgaagaaa aataaaggcca tcaagatact gattggattc aggaaggaga 360
taqcccgcat gctgaacatc ttgaacggga gaaaaaggtc tgcagccatq ctctccatgc 420
tgctgcccac agccctggcg ttccatttga ccaacaggag gggagagcca cccatgatat 480
tlaylaagaa gyaagagayA aagtcaatgt tgttlaagac ctctgcaggc atcaatatgt 540
gcactctcat tgcgatggat ttgggagagt tatgcgagga cacaatgacc taacaatgcc 600
cccggaacac tgaagcggaa ccagatgacg ttgactgctg gtgcaatgcc acagacacat 660
gggtgaacca tgggaagctgt tctcaaaccc gcaaacaccg ccgagacaaa cgttccgtgg 720
cactggcccc aacagtgayA ctgggtctag aaacaagacc cgaacacatg atgtccctcg 780
aaggtgcctg gaacaaagta caaaaagtgg aagcttgggc tttyagAAC ccaaggattca 840
aggtgacagc ccttttttta gcacatgcca taggaacatc cattaactag aaagggaaca 900
ttttcattct cctgatgcta gtaaacccat caatggccat gcatgtgtg ggaataggca 960
acagagactt cgttgaagga ctgtcaggag caactgtggg ggaactgtgt ttggagcatq 1020
gaaactgctg ccccaacatg gcaaaagata aacccacatt ggcattgaa ctcttgaaga 1080
cggaygtcac aaacccctgc gtcttggcca aactgtgcat tgaagctaaa atatcaaaa 1140
cccccaccca ttcaaggtgt caaacacaa gaggagctac actggttgaa gaacaggact 1200
cgaaccttct gctctgacga acgtctctct ggaataggc gggtaactgg tgcggactat 1260
ttggaaaagg aagcctactg acgtgtgcta agttcaagt tgtgacaaa ctagaaggaa 1320
agatagttca atatgaaac ttcaaatatt cagtgtatgt cactgtccac actggggacc 1380
agcaacaggt gggaaaagay actacagaac atggaaacat tgaacacata acacctcaag 1440
ctctacgtc ggaataacag ctgactgact aaggagccct cacttggaa tgetcgcta 1500
gaacagggtt ggaactttaat gcatgtgttc tattgacaaat gaagaaaaa tcatggcttg 1560
tcacaaaaca atggtttcta gacttaccac tgccttggac ttcaggagct tcaacatctc 1620
aayagacttg gaaacagaca gatttgcctg tcaacttcaa gacagctcat gcaaaagaaa 1680
aggaagtatg cgtactggga tcaaggaag gaycaatgca cactgcgttg actggggga 1740
caqaaatcca gacgtcagga acgacaacaa tctttgcagg acacctgaaa tgcagactaa 1800
aatggataa actgaactta aaagggtctt catatgtaac gtgcacaggc tcaatttaag 1860
tagaqaagya agtggctgaq acccagcatg gaactgtttt agtgcaggtt aaatacgaag 1920
gaacagatgc gccatgcaag atcccttttt cggcccaaga tgagaangga gtgacccaq 1980
atgggagatt gataaagac aaacccatag tcactgacaa agaaaaaca gtcaacattg 2040
agacagaacc acccttttgt gagagctaca tctgtgtagg ggcaggtgaa aaagctttga 2100
aactgagctg gttcaagaaa gggagcaqca taaggaaaaat gttcgaagca actgcacag 2160
gagcgcaag gatgctatc ctgggagaca ccgcattgga ctttggctct ataggaagg 2220
tgttccatca agtgggaaaa ttggtacacc aggttttttg agcccatat ggggtctctg 2280
tcagcgtgtt ttcttggacc atgaanaag gaatagggat cctgctgaca tggctaggat 2340
taaacctcag gaacacttca atggctatga cgtgcatagc tgttggagga atcactctgt 2400

```

ttctgggctt cacagttcaa gca

2423

<210> 53

<211> 774

<212> PRT

5 <213> Suni Sekans

<220>

<223> Dang 1 ME kimerik bölgesi

10 <400> 53

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Asn | Gln | Arg | Lys | Lys | Val | Val | Arg | Pro | Pro | Phe | Asn | Met | Leu | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Arg | Glu | Arg | Asn | Arg | Val | Ser | Thr | Pro | Gln | Gly | Leu | Val | Lys | Arg | Phe |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Ser | Thr | Gly | Leu | Phe | Ser | Gly | Lys | Gly | Pro | Leu | Arg | Met | Val | Leu | Ala |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Phe | Ile | Thr | Phe | Leu | Arg | Val | Leu | Ser | Ile | Pro | Pro | Thr | Ala | Gly | Ile |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Leu | Lys | Arg | Trp | Gly | Gln | Leu | Lys | Lys | Asn | Lys | Ala | Ile | Lys | Ile | Leu |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Ile | Gly | Phe | Arg | Lys | Glu | Ile | Gly | Arg | Met | Leu | Asn | Ile | Leu | Asn | Gly |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Arg | Lys | Arg | Ser | Ala | Ala | Met | Leu | Leu | Met | Leu | Leu | Pro | Thr | Ala | Leu |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Ala | Phe | His | Leu | Thr | Thr | Arg | Gly | Glu | Pro | His | Met | Ile | Val | Ser |     |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |     |
| Lys | Gln | Glu | Arg | Gly | Lys | Ser | Leu | Leu | Phe | Lys | Thr | Ser | Ala | Gly | Ile |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Asn | Met | Cys | Thr | Leu | Ile | Ala | Met | Asp | Leu | Gly | Glu | Leu | Cys | Glu | Asp |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Thr | Met | Thr | Tyr | Lys | Cys | Pro | Arg | Ile | Thr | Glu | Ala | Glu | Pro | Asp | Asp |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Val | Asp | Cys | Trp | Cys | Asn | Ala | Thr | Asp | Thr | Trp | Val | Thr | Tyr | Gly | Thr |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Cys | Ser | Gln | Thr | Gly | Glu | His | Arg | Arg | Asp | Lys | Arg | Ser | Val | Ala | Leu |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Ala | Pro | His | Val | Gly | Leu | Gly | Leu | Glu | Thr | Arg | Thr | Glu | Thr | Trp | Met |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Ser | Ser | Glu | Gly | Ala | Trp | Lys | Gln | Val | Gln | Lys | Val | Glu | Thr | Trp | Ala |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Leu | Arg | His | Pro | Gly | Phe | Thr | Val | Thr | Ala | Leu | Phe | Leu | Ala | His | Ala |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Ile | Gly | Thr | Ser | Ile | Thr | Gln | Lys | Gly | Ile | Ile | Phe | Ile | Leu | Leu | Met |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Leu | Val | Thr | Pro | Ser | Met | Ala | Met | Arg | Cys | Val | Gly | Ile | Gly | Asn | Arg |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Asp | Phe | Val | Glu | Gly | Leu | Ser | Gly | Ala | Thr | Trp | Val | Asp | Val | Val | Leu |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Glu | His | Gly | Ser | Cys | Val | Thr | Thr | Met | Ala | Lys | Asp | Lys | Pro | Thr | Leu |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Asp | Ile | Glu | Leu | Leu | Lys | Thr | Glu | Val | Thr | Asn | Pro | Ala | Val | Leu | Arg |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Lys | Leu | Cys | Ile | Glu | Ala | Lys | Ile | Ser | Asn | Thr | Thr | Thr | Asp | Ser | Arg |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Pro | Thr | Gln | Gly | Glu | Ala | Thr | Leu | Val | Glu | Glu | Gln | Asp | Ser | Asn |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Phe | Val | Cys | Arg | Arg | Thr | Phe | Val | Asp | Arg | Gly | Trp | Gly | Asn | Gly | Cys |
|     |     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Gly | Leu | Phe | Gly | Lys | Gly | Ser | Leu | Leu | Thr | Cys | Ala | Lys | Phe | Lys | Cys |
| 385 |     |     |     |     |     | 390 |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Val | Thr | Lys | Leu | Glu | Gly | Lys | Ile | Val | Gln | Tyr | Glu | Asn | Leu | Lys | Tyr |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Ser | Val | Ile | Val | Thr | Val | His | Thr | Gly | Asp | Gln | His | Gln | Val | Gly | Asn |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     |     | 430 |     |
| Glu | Thr | Thr | Glu | His | Gly | Thr | Ile | Ala | Thr | Ile | Thr | Pro | Gln | Ala | Pro |
|     |     |     | 435 |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Thr | Ser | Glu | Ile | Gln | Leu | Thr | Asp | Tyr | Gly | Ala | Leu | Thr | Leu | Asp | Cys |
|     |     |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Ser | Pro | Arg | Thr | Gly | Leu | Asp | Phe | Asn | Glu | Met | Val | Leu | Leu | Thr | Met |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Lys | Glu | Lys | Ser | Trp | Leu | Val | His | Lys | Gln | Trp | Phe | Leu | Asp | Leu | Pro |
|     |     |     |     |     | 485 |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Leu | Pro | Trp | Thr | Ser | Gly | Ala | Ser | Thr | Ser | Gln | Glu | Thr | Trp | Asn | Arg |
|     |     |     |     | 500 |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Gln | Asp | Leu | Leu | Val | Thr | Phe | Lys | Thr | Ala | His | Ala | Lys | Lys | Gln | Glu |
|     |     |     |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Val | Val | Val | Leu | Gly | Ser | Gln | Glu | Gly | Ala | Met | His | Thr | Ala | Leu | Thr |
|     |     |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Gly | Ala | Thr | Glu | Ile | Gln | Thr | Ser | Gly | Thr | Thr | Thr | Ile | Phe | Ala | Gly |
| 545 |     |     |     |     |     | 550 |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| His | Leu | Lys | Cys | Arg | Leu | Lys | Met | Asp | Lys | Leu | Thr | Leu | Lys | Gly | Met |
|     |     |     |     |     | 565 |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |
| Ser | Tyr | Val | Met | Cys | Thr | Gly | Ser | Phe | Lys | Leu | Glu | Lys | Glu | Val | Ala |
|     |     |     |     | 580 |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |
| Glu | Thr | Gln | His | Gly | Thr | Val | Leu | Val | Gln | Val | Lys | Tyr | Glu | Gly | Thr |
|     |     |     |     | 595 |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Asp | Ala | Pro | Cys | Lys | Ile | Pro | Phe | Ser | Ala | Gln | Asp | Glu | Lys | Gly | Val |
|     |     |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |
| Thr | Gln | Asn | Gly | Arg | Leu | Ile | Thr | Ala | Asn | Pro | Ile | Val | Thr | Asp | Lys |
| 625 |     |     |     |     |     | 630 |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |
| Glu | Lys | Pro | Val | Asn | Ile | Glu | Thr | Glu | Pro | Pro | Phe | Gly | Glu | Ser | Tyr |
|     |     |     |     |     | 645 |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |
| Ile | Val | Val | Gly | Ala | Gly | Glu | Lys | Ala | Leu | Lys | Leu | Ser | Trp | Phe | Lys |
|     |     |     |     | 660 |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |
| Lys | Gly | Ser | Ser | Ile | Gly | Lys | Met | Phe | Glu | Ala | Thr | Ala | Arg | Gly | Ala |
|     |     |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     |     | 685 |     |     |     |
| Arg | Arg | Met | Ala | Ile | Leu | Gly | Asp | Thr | Ala |     |     |     |     |     |     |

## TARİFNAME İÇERİSİNDE ATIF YAPILAN REFERANSLAR

- Başvuru sahibi tarafından atıf yapılan referanslara ilişkin bu liste, yalnızca okuyucunun yardımı içindir ve Avrupa Patent Belgesinin bir kısmını oluşturmaz. Her ne kadar referansların derlenmesine büyük önem verilmiş olsa da, hatalar veya eksiklikler engellenememektedir ve EPO bu bağlamda hiçbir sorumluluk kabul etmemektedir.

### Tarifname içerisinde atıfta bulunulan patent dökümanları:

- US 60377860 B [0122]
- US 60436500 B [0122]

### 10 Tarifnamede belirtilen patentleştirilmemiş literatür:

- GUBLER, D.J. ; MELTZER, M. Adv Virus Res, 1999, vol. 53, 35-70 [0002]
- BURKE, D.S. et al. Am J Trop Med Hyg, 1988, vol. 38, 172-180 [0002]
- HALSTEAD, S.B. et al. Am J Trop Med Hyg, 1969, vol. 18, 997-1021 [0002]
- THEIN, S. et al. Am J Trop Med Hyg, 1997, vol. 56, 566-575 [0002]
- SABIN, A. Am J Trop Med Hyg, 1955, vol. 4, 198-207 [0002]
- MONATH, T.P. ; HEINZ, F.X. et al. Fields Virology. Lippincott-Raven Publishers, 1996, 961-1034 [0002]
- KIMURA, R. ; HOTTA, S. Jpn J Bacteriol, 1944, vol. 1, 96-99 [0003]
- SABIN, A.B. ; SCHLESINGER, R.W. Science, 1945, vol. 101, 640 [0003]
- WISSERMAN, C.L. et al. Am J Trop Med Hyg, 1963, vol. 12, 620-623 [0003]
- ANGSUBHAKORN, S. et al. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1994, vol. 25, 554-559 [0003]
- BANCROFT, W.H. et al. Infect Immun, 1981, vol. 31, 698-703 [0003]
- BHAMARAPRAVATI, N. et al. Bull World Health Organ, 1987, vol. 65, 189-195 [0003]
- ECKELS, K.H. et al. Am J Trop Med Hyg, 1984, vol. 33, 684-698 [0003]
- HOKE, C.H. JR. et al. Am J Trop Med Hyg, 1990, vol. 43, 219-226 [0003]
- BRAY, M. et al. J Virol, 1996, vol. 70, 4162-4166 [0004]
- MONATH, T.P. et al. Vaccine, 1999, vol. 17, 1869-1882 [0004]
- HUANG, C.Y. et al. J. Virol, 2000, vol. 74, 3020-3028 [0004]
- MEN, R. et al. J Virol, 1996, vol. 70, 3930-3937 [0005]
- DURBIN, A.P. et al. Am J Trop Med Hyg, 2001, vol. 65, 405-13 [0005]
- [0013] [0056] [0077] [0080] [0081] [0088] [0092]
- LAI. Clinical and Diagnostic Virology, 1998, vol. 10, 173-179 [0006]
- WOROBEY, M. et al. PNAS USA, 1999, vol. 96, 7352-7 [0011] [0097]
- BHAMARAPRAVATI, N. ; SUTEE, Y. Vaccine, 2000, vol. 18, 44-7 [0011]
- GUILLOT, S. et al. J Virol, 2000, vol. 74, 8434-43 [0011] [0097]
- MEN, R. et al. J Virol, 1996, vol. 70, 3930-7 [0013] [0014]
- PROUTSKI, V. et al. Nucleic Acids Res, 1997, vol. 25, 1194-202 [0014]
- HAHN, C.S. et al. J Mol Biol, 1987, vol. 198, 33-41 [0014]
- MEN et al. J. Virology, 1996, vol. 70, 3930-3933 [0028]
- DURBIN et al. Am J Trop Med, 2001, vol. 65, 405-413 [0028]



- **KANESA-THASAN, N. et al.** Vaccine, 2001, vol. 19, 3179-3188 [0003]
- **MCKEE, K.T. et al.** Am J Trop Med Hyg, 1987, vol. 36, 435-442 [0003]
- **BHAMARAPRAVATI, N. ; SUTEE, Y.** Vaccine, 2000, vol. 18, 44-47 [0003]
- **LAI, C.J. et al.** PNAS USA, 1991, vol. 88, 5139-5143 [0004]
- **BRAY, M. ; LAI, C.J.** PNAS USA, 1991, vol. 88, 10342-10346 [0004]
- **CHEN, W. et al.** J Virol, 1995, vol. 69, 5186-5190 [0004]
- **HUANG, C.Y. et al.** J Virol, 2000, vol. 74, 3020-3028 [0004]
- **PLETNEV, A.G. ; MEN, R.** PNAS USA, 1998, vol. 95, 1746-1751 [0004]
- **BLANEY, J. E. et al.** J Virol., 2001, vol. 75, 9731-9740 [0055] [0058]
- **DURBIN et al.** Am. J. Trop. Med. Hyg., 2001, vol. 65, 405-413 [0057] [0060] [0062]
- **BLANEY, J. E. et al.** J Virol, 2001, vol. 75, 9731-9740 [0059] [0074] [0091]
- **DURBIN et al.** Am. J. Trop. Med Hyg., 2001, vol. 65, 405-413 [0060]
- **BLANEY, J. E.** Virology, 2002, vol. 300, 125-139 [0074] [0082] [0084] [0091]
- **PURI, B. et al.** Virus Genes, 2000, vol. 20, 57-63 [0075]
- **POLO, S. et al.** J Virol, 1997, vol. 71, 5366-74 [0075] [0076]
- **TROYER, J.M. et al.** Am J Trop Med Hyg, 2001, vol. 65, 414-419 [0079] [0103]
- **GUBLER, D. J. et al.** Am J Trop Med Hyg, 1978, vol. 27, 581-589 [0081]
- **GUBLER, D. J. et al.** Am J Trop Med Hyg, 1981, vol. 30, 1094-1099 [0092]
- **SAMBROOK ; FRITSCH ; MANIATIS.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 [0046]
- **TYAGI; KRAMER.** Nature Biotechnology, 1996, vol. 14, 303-308 [0050]
- **DURBIN A.P. et al.** Am J Trop Med Hyg, 2001, vol. 65, 405-413 [0051]
- **BLANEY, J.E. JR. et al.** Virology, 2002, vol. 300, 125-139 [0053] [0069] [0078]
- **BLANEY, J.E. JR. et al.** J. Virol., 2001, vol. 75, 9731-9740 [0053]
- **HANLEY, K.H. et al.** J. Virol., 2002, vol. 76, 525-531 [0054]
- **BLANEY, J. E. et al.** Virology, 2002, vol. 300, 125-139 [0055] [0056] [0058] [0059] [0093] [0104]
- **GUIRAKHOO, F. et al.** J Virol, 2001, vol. 75, 7290-304 [0097]
- **HUANG, C.Y. et al.** J Virol, 2000, vol. 74, 3020-8 [0097]
- **BUTRAPET, S. et al.** J Virol, 2000, vol. 74, 3011-9 [0097]
- **PURI, B. et al.** J Gen Virol, 1997, vol. 78, 2287-91 [0097]
- **DURBIN, A.P. et al.** Am J Trop Med Hyg, 2001, vol. 65, 405-13 [0097]
- **BRAY, M. ; LAI, C.J.** PNAS USA, 1991, vol. 88, 10342-6 [0097] [0098]
- **HUANG, C.Y. et al.** J Virol, 2000, vol. 74, 3020-80 [0097]
- **KUHN, R.J. et al.** Cell, 2002, vol. 108, 717-25 [0098]
- **DURBIN, A.P et al.** Am J Trop Med Hyg, 2001, vol. 65, 405-13 [0099] [0100] [0109]
- **BRAY, M. et al.** J Virol, 1998, vol. 72, 1647-51 [0099]
- **BRAY, M. et al.** J Virol, 1996, vol. 70, 4162-6 [0108]
- **GUBLER, D.J. et al.** Am J Trop Med Hyg, 1981, vol. 30, 1094-1099 [0109]

## **ŞEKİLLERDEKİ YAZILARIN ANLAMLARI**

### **ŞEKİL 1**

A = Yapısal

5 B = Yapısal olmayan

### **ŞEKİL 3**

C = Ortalama virüs titeri ( $\text{Log}_{10}\text{PFU/ml}$ )

D = Enfeksiyon sonrası gün

10

### **ŞEKİL 4**

E = Virüs titeri ( $\text{Log}_{10}\text{PFU/ml}$ )

F = Aşılama sonrası gün

### **ŞEKİL 5**

G = Titeri ( $\text{Log}_{10}\text{PFU/ml}$ )

### **ŞEKİL 6**

H = Alt klonlanmış fragmanlar:

20 I = Genom sekansı = 10713 bp

J = p2 $\Delta$ 30 için: Y fragmanını Y $\Delta$ 30 ile ikame edin

### **ŞEKİL 8**

K = Genom sekansı= 10707 bp

25 L = p3 $\Delta$ 30 için 4 fragmanını Frag4 $\Delta$ 30 ile ikame edin

M = Spel bağlayıcı (transkripsiyon öncesinde çıkarılır)

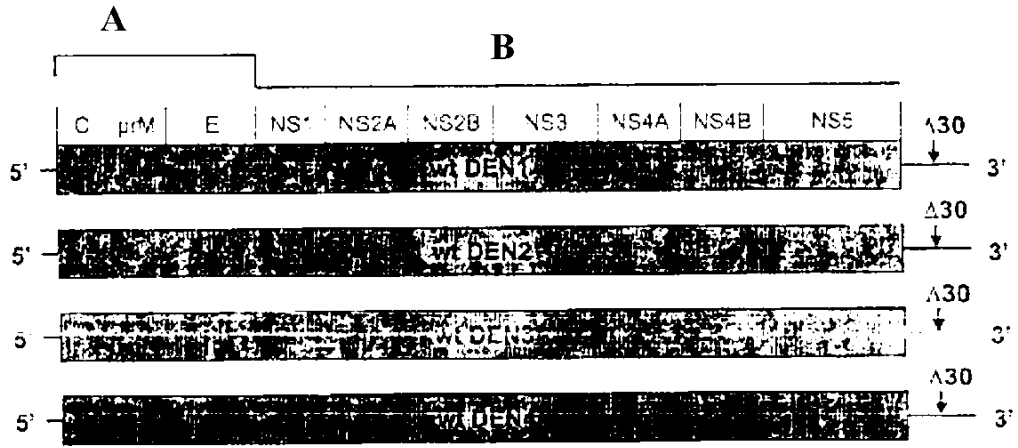
**ŞEKİL 9**

N = Kimerizasyon

O = Bağlantı

5

10

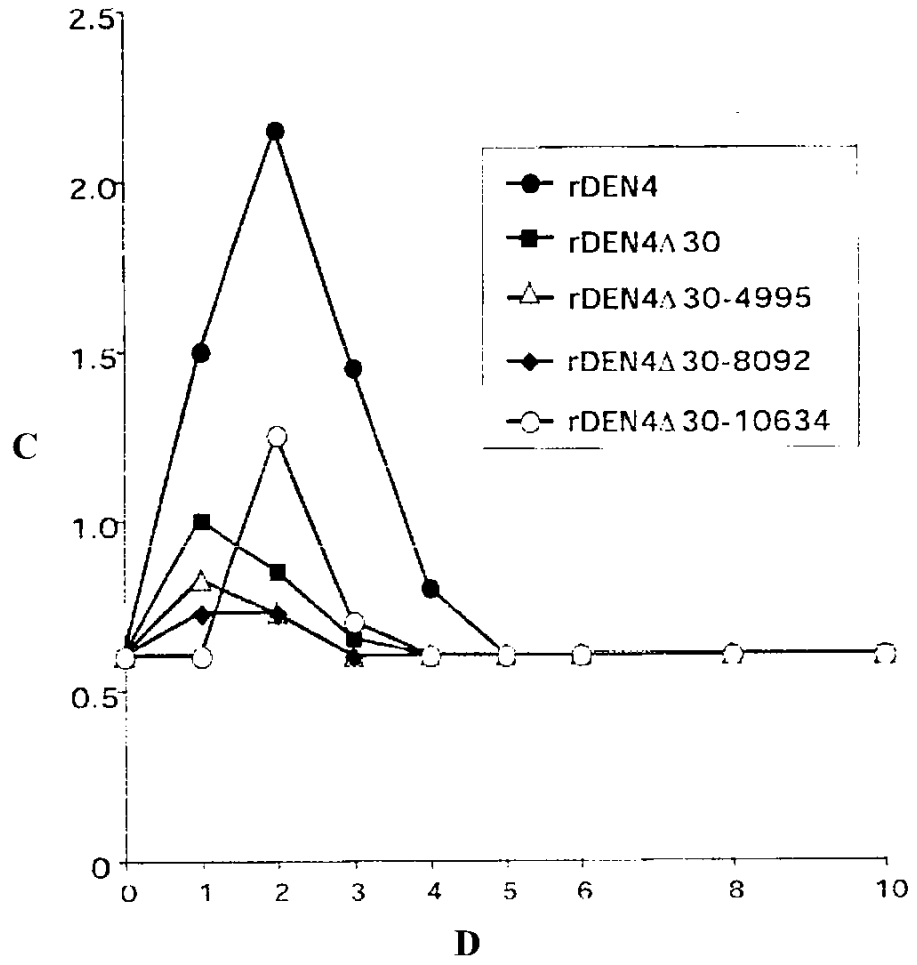


ŞEKİL 1

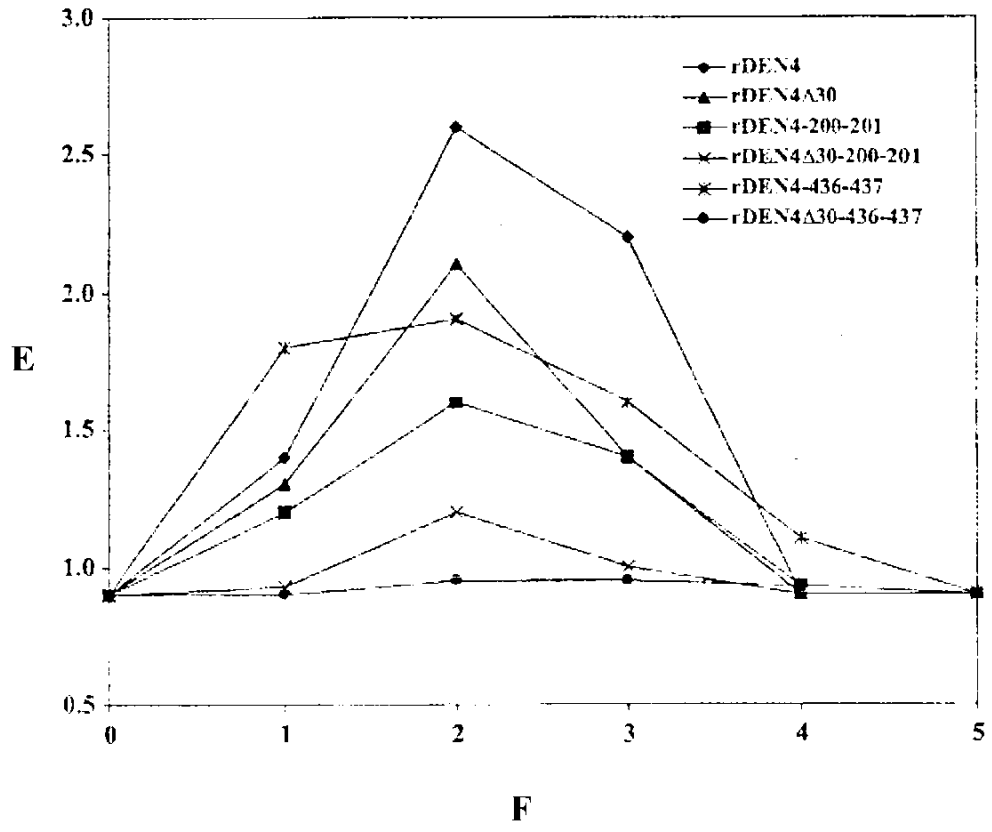
180 172 143 130  
NSG " GGGCCGAA [REDACTED] GACUAGAGGUUAG " 3'  
530  
(172-143)

|         |                                                       |
|---------|-------------------------------------------------------|
| DEN1    | GGGGCCC-AACAACCGGGGAAGCGTACCGGGGGGGAAGGACATAGA        |
| DEN1A35 | GGGGCCC-AA-----GACATAGA                               |
| DEN2    | GGGGCCC-AAGCGAGAGGAAAGCTGTAGGATTCATGGGAAGGACATAGA     |
| DEN2A35 | GGGGCCC-AA-----GACATAGA                               |
| DEN3    | GGGGGCGGAGCGCTTCAGAGGGAAGCGGCGTACCGTCCCTGAAAGGACATAGA |
| DEN3A35 | GGGGGCGCAA-----GACATAGA                               |
| DEN4    | GGGGCCGGAAGCTAGGAGGGAAGCTGTACCTCCCTGGGGAAGGACATAGA    |
| DEN4A35 | GGGGCCC-AA-----GACATAGA                               |
|         |                                                       |
| DEN1    | GGGGCCC-AAGGCGAGGGGGAAGCGTACCGCGGGGGGAAGGACATAGA      |
| DEN2    | GGGGCCC-AAGGCGAGGAGGAGCTGTAGTCTCCGCGGGGAAGGACATAGA    |
| DEN3    | GGGGGCGGAGCGCTTCAGAGGGAAGCGGCGTACCGTCCCTGAAAGGACATAGA |
| DEN4    | GGGGCCGGAAGCTAGGAGGGAAGCTGTACCTCCCTGGGGAAGGACATAGA    |

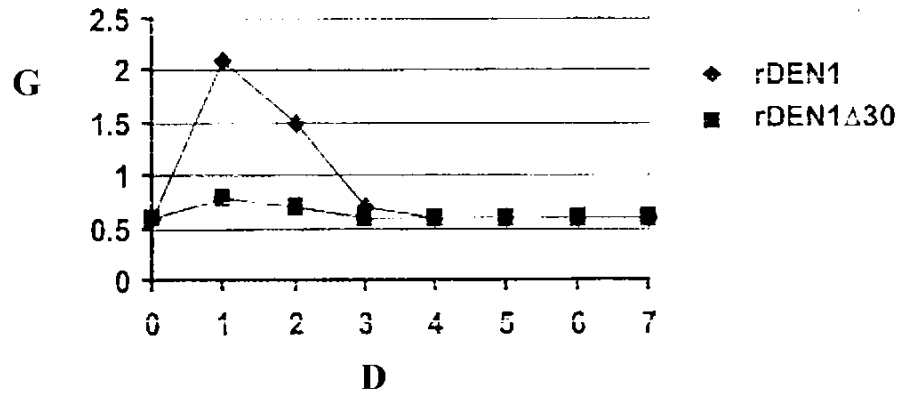
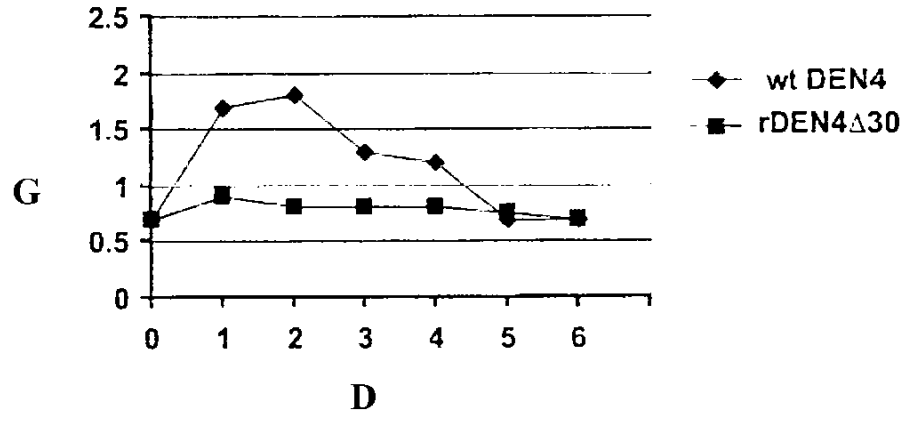
[illegible]



ŞEKİL 3



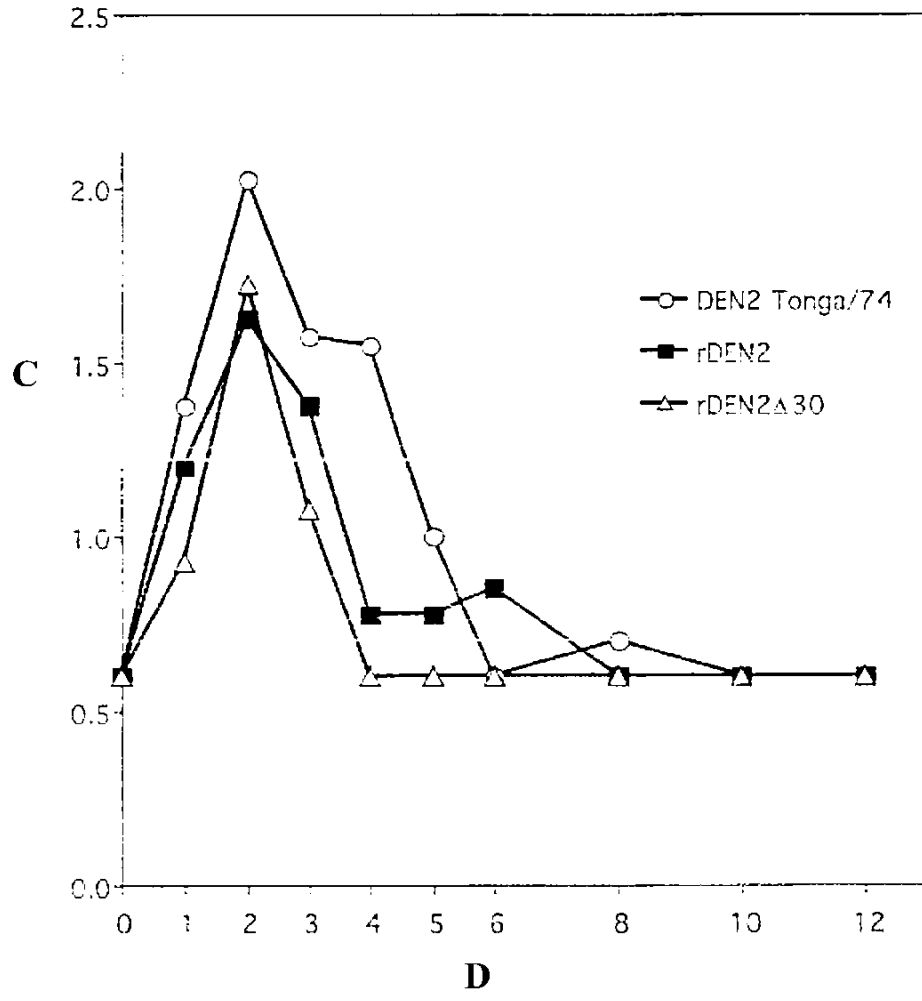
ŞEKİL 4



ŞEKİL 5

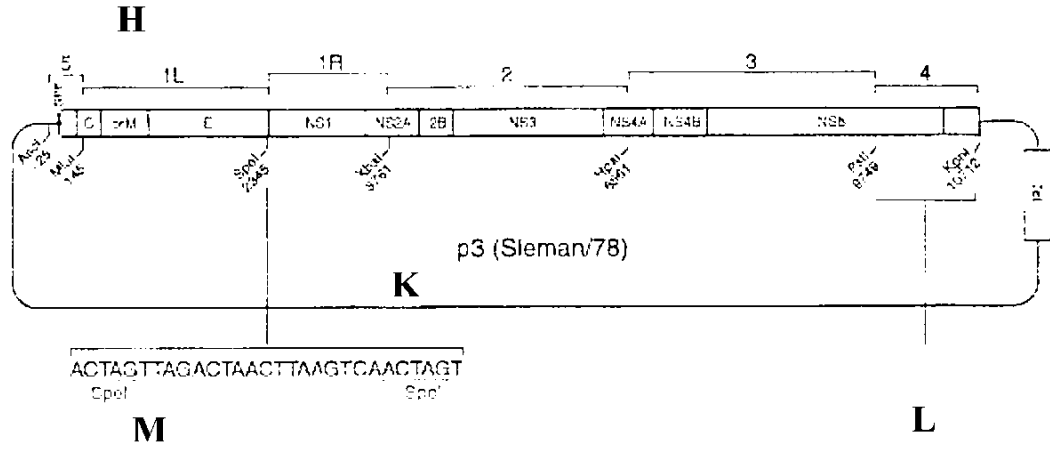




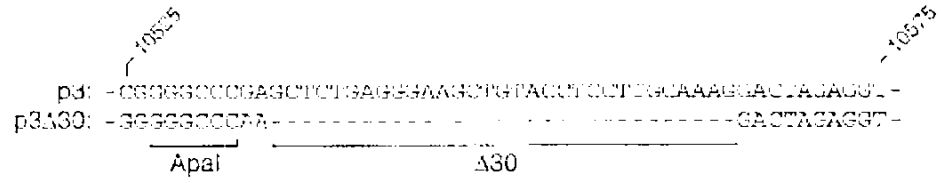


ŞEKİL 7

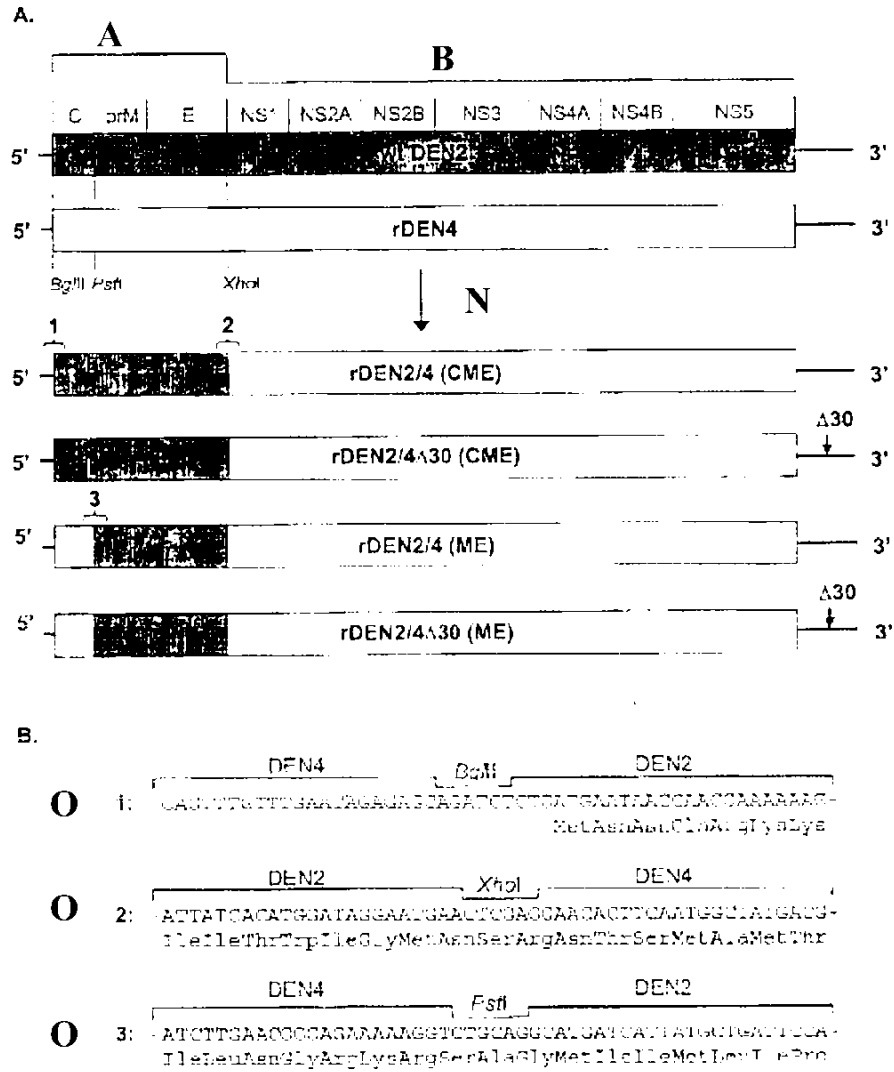
A.



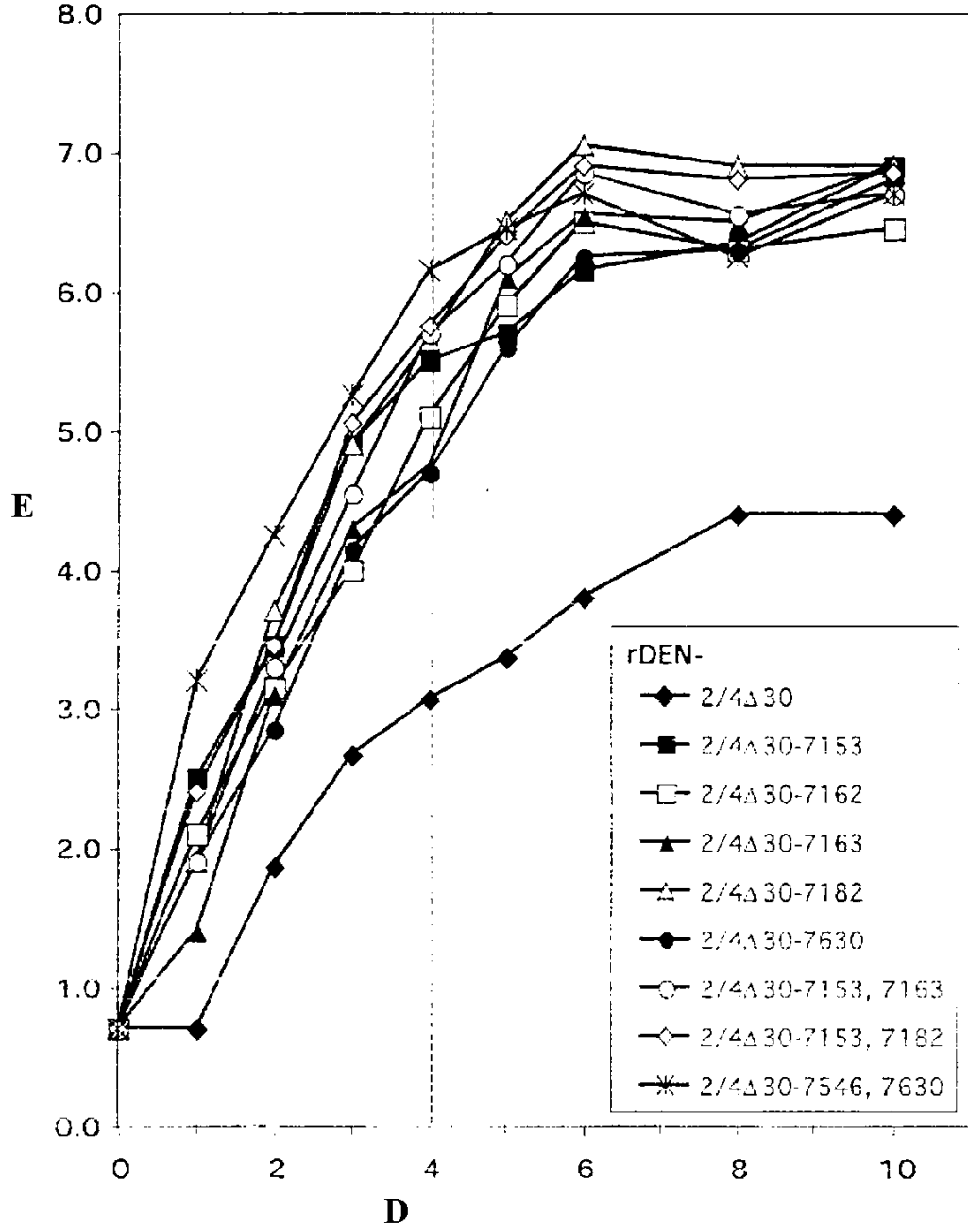
B.



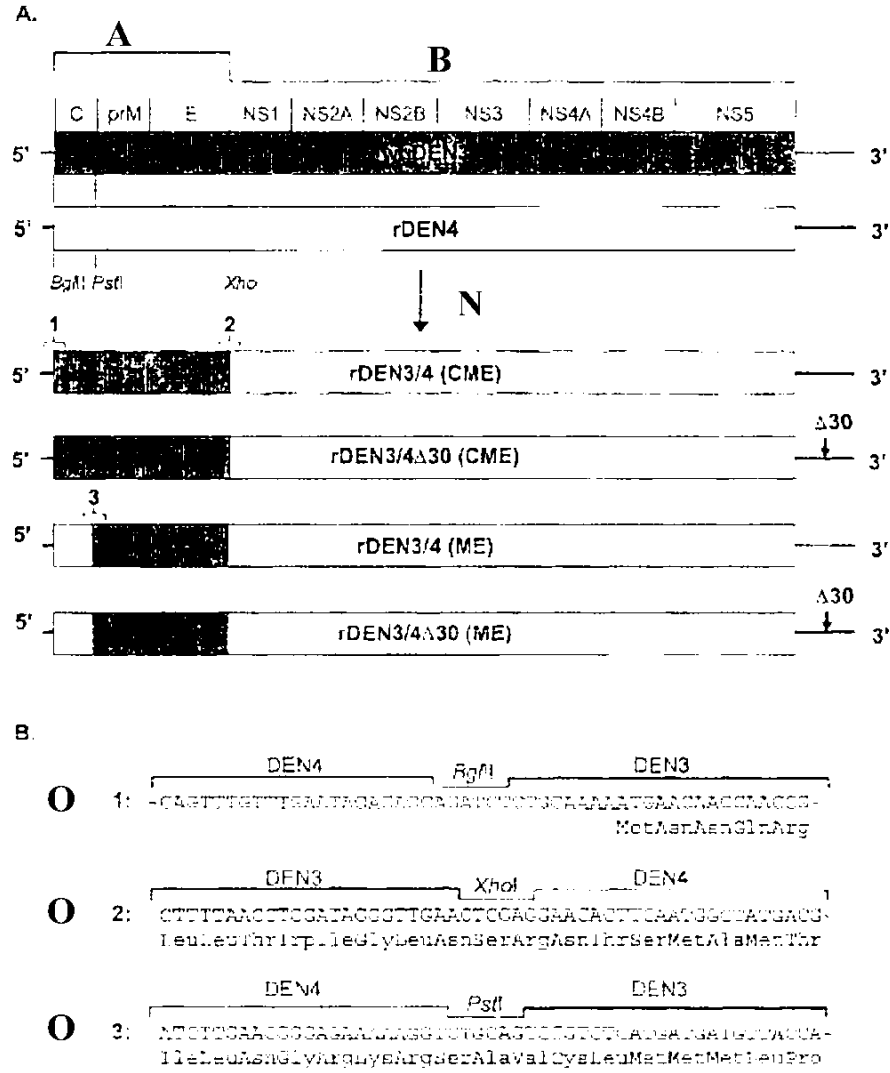
ŞEKİL 8



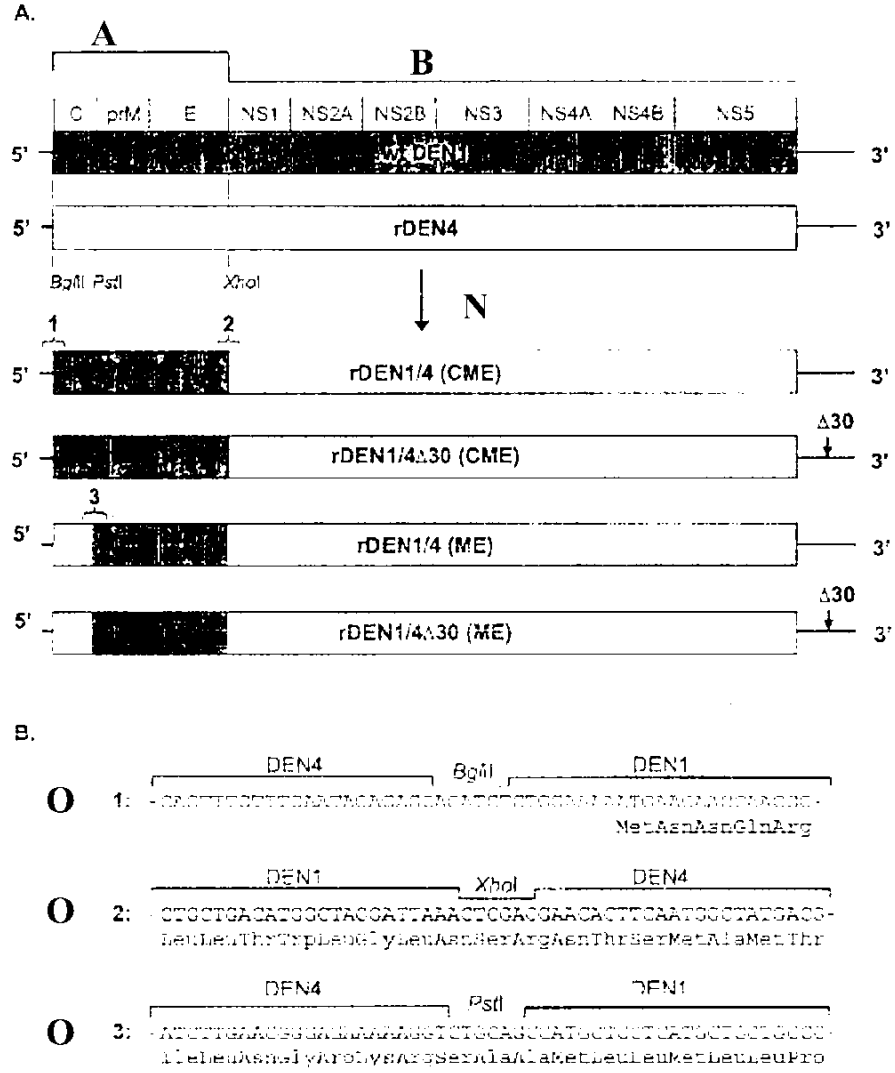
ŞEKİL 9



ŞEKİL 10



ŞEKİL 11



ŞEKİL 12