



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: P 95 01832

(22) A bejelentés napja: 1995. 06. 21.

(30) Elsőbbségi adatok:

1252/94 1994. 07. 08. AT

0871/95 1995. 05. 23. AT

(40) A közzététel napja: 1996. 04. 29.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2001. 04. 28.

(11) Lajstromszám:

219 503 B

(51) Int. Cl.⁷

C 12 N 15/40

C 12 N 15/85

C 07 K 14/18

A 61 K 39/12

(72) Feltalálók:

dr. Allison, Steven, Bécs (AT)

dr. Heinz, Franz Xaver, Bécs (AT)

dr. Kunz, Christian, Bécs (AT)

dr. Mandl, Christian, Bécs (AT)

(73) Szabadalmaz:

BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT,
Bécs (AT)

(74) Képviselő:

Mészáros Enikő, Gödölle, Kékes, Mészáros
& Szabó Szabadalmi és Védjegy Iroda, Budapest

(54)

**Javított vakcina TBE-vírus-fertőzés elleni immunizálásra,
valamint eljárás az előállítására**

KIVONAT

A találmány TBE-vírus-fertőzések elleni immunizálásra
alkalmas vakcinára vonatkozik. A vakcina nem fertőző,

szubvirális partikulákból áll, amelyek E-proteint és
adott esetben prM/M proteint tartalmaznak.

A találmány TBE-vírus-fertőzések elleni immunizálásra alkalmas javított vakcinára vonatkozik, valamint a vakcina előállítására szolgáló eljárásra.

A TBE-vírus (Tick-Borne-Encephalitis vírus) számos európai országban, a volt Szovjetunióban és Kínában okoz endemiás járványokat. Néhány közép-európai országban, így Ausztriában, Németországban, Szlovákiában, Szlovéniában vagy Magyarországon, ahol minden évben több száz – kórházba felvett – esetet regisztrálnak, ez a betegség jelentős problémát jelent a közegészségügy számára [WHO: EURO Reports and Studies, 104, (1983)].

A TBE-vírus, amelynek nyugati, európai és távolkeleti szubtypus formái ismertek, a Flavivírusok családjához tartozik. Ezek a vírusok gömb alakú, lipidburokkal ellátott RNS-vírusok [lásd: T. P. Monath: Flaviviruses, B. N. Fields: Virology, Raven Press, N. Y. (1990) 763–814 oldal].

A Flavivírus virion általánosságban egy olyan nukleokapszidból áll, amelyben az RNS-genom pozitív szála a virális kapszidproteinnek (C-protein) kapcsolódik. A nukleokapszidot egy lipidburok veszi körül, amely az E (50–60 KD) és M (7–8 KD) membránasszociált proteineket tartalmazza [van Regenmortel és Neurath (szerkesztők), „Immunochimistry of Viruses. II. The Basis for Seradiagnosis and Vaccines”, című kiadványban (Elsevier Sciences, Amsterdam, 1990), Heinz és Roehrig, 289–305. oldalak].

Az E-főburokprotein központi szerepet játszik a Flavivírusok biológiájában, mivel jelentős virális beépítési funkciókat közvetít, és a gazdában protektív immunválaszt vált ki. A TBE-vírus E-burokproteinje szerkezetéről már jelentős mennyiségű információ áll rendelkezésre, és a számos biokémiai és immunológiai adat alapján szerkezetének modelljét is bemutatták [Mandl et al., J. Virol., 63, 564–571 (1989)].

A betegség eredményesen gátolható [Kunz, Ch. Acta Leidensia, 60, 1–14 (1990)] egy megfelelően tisztított, formalininaktivált teljes vírust tartalmazó, olyan oltóanyaggal való oltással [Kunz et al., J. Med. Virol., 6, 103–109 (1980)], amely a vírus szerkezeti proteinjeivel szemben immunválaszt indukál. Ez az oltóanyag bizonyult a legjobbnak, azonban az előállításával kapcsolatos eljárások folyamán nagy mennyiségű fertőző és potenciálisan veszélyes víruszuszpenzióval kell foglalkozni, és ezért átfogó és drága biztonsági intézkedések alkalmazására van szükség.

Az antitestek vírusneutralizáló képessége attól függ, hogy milyen eredményesen ismerik fel a vírus felületén a proteinek eredeti szerkezetét. A TBE-vírusok és más Flavivírusok esetében tehát elsősorban az E-proteinről van szó [Heinz és Mandl, APMIS 101, 735–745 (1994)]. Egy immunizálás folyamán a lehető leghatékonyabb ellenanyagok eredményes indukciója érdekében tehát megkívánt, hogy az oltóanyag ezt a proteint ugyanabban a formában tartalmazza, mint ahogyan ez a fertőző vírus felületén előfordul. A teljesvírus-oltóanyagoknak az a hátrányuk, hogy a szükséges inaktiválási eljárások az eredeti proteinszerkezet részleges megváltozásához vezethetnek.

A rekombináns DNS-technológia lehetőséget nyújt arra, hogy a teljesvírus-oltóanyagot olyan rekombináns proteinnel helyettesítsük, amelyek az immunválaszt indukáló proteinek lényeges részét tartalmazzák. Az egyes vírusproteinek géntechnológiai kifejezése kapcsán azonban nincs rögzítve, hogy ezen rekombináns proteinek antigénszerkezete megfelel-e a vírus felületén lévő megfelelő proteinekének.

A TBE-vírusok rekombináns felületi proteinjeinek expressziójáról például Allison és munkatársai [Gemeinsame Jahrestagung ÖBG–ÖGGT (1993) 114. oldal] számoltak be. Megállapították, hogy az E-protein és az M-protein meghatározott feltételek mellett történő rekombináns expressziójuk esetén, különböző formában – beleértve a nem fertőző szubvirális partikulákat – szekretálódnak.

Ilyen szubvirális partikulák a TBE-vírusok távoli rokonainál, így a Japán Encephalitis Vírusnál (JEV), a sárgaláz vírusainál és a Dengue-láz vírusainál [Konishi et al., Virology, 188, 714–720 (1992); WO 92/03545] ismertek.

Konishi és munkatársai ugyan leírták, hogy az ilyen szubvirális partikulák, amelyeket komplett Freund-adjuvánssal emulgeáltak és az egész E-proteint tartalmaztak, egerekben bizonyos immunválaszt váltanak ki, másrészt azonban kimutatták, hogy egy olyan E-proteinnel, amelyet C-terminális részénél részben megrövidítettek, lényegesen hatékonyabb védelmet lehet elérni egy Flavivírus-fertőzés ellen, mint a teljes E-proteinnel (WO 92/03161).

A találmány feladata tehát az, hogy a TBE-fertőzések elleni javított oltóanyagot biztosítson.

Ezt a feladatot a találmány egy, a Tick-Borne-Encephalitis-Vírus- (TBE-vírus-) fertőzések elleni immunizálásra alkalmas olyan vakcinával oldja meg, amely nem fertőző, szubvirális partikulákból áll. Ezek a partikulák lényegében az E-protein teljes eredeti formáját és adott esetben a prM/M proteint tartalmazzák, amely proteineket a TBE-vírusból származtattunk. Lényegesnek tartjuk, hogy az E-protein itt teljes eredeti formájában van jelen, mivel csak ezzel lehet hatékony védelmet biztosítani. A találmány szerinti vakcinában az E-protein natív formáját különböző analízisek segítségével tudtuk bizonyítani, és pedig

- a) antigénszerkezet vizsgálata monoklonális antitestekkel,
- b) savindukált konformáció változásokra való képesség vizsgálata,
- c) hemagglutinációs aktivitás vizsgálata.

Az a tény, hogy a találmány szerinti vakcina összetételénél fogva nem fertőző – tekintettel az ismert vakcinákra –, fontos szempont az oltóanyag biztonsága szempontjából.

Az E-protein és adott esetben a prM/M protein előnyösen rekombináns proteinek.

A vakcina egy különösen előnyös kiviteli formájában az E-proteint a TBE-vírusból származtatjuk, és ebben – a felhasználási területnek megfelelően – mind a nyugati (európai) szubtypust, mind a távolkeleti szubtypust alkalmazzuk. Előnyös, ha a vakcina egy lipid alko-

tórést is tartalmaz, amely előnyösen vezikuláris formában van jelen.

Azt találtuk, hogy – a szakma véleménye (lásd: WO 92/03161) ellenére – a rekombináns E-protein, amelyet a TBE-vírusokból vezetünk le, csak ebben a nem fertőző, szubvirális partikula formában adhat elégséges immunitást fertőzésekkel szemben. Az E-protein egy részlegesen megrövidített formája, amelynél – mint a WO 92/03161 számon közzétett szabadalmi bejelentésben – a C-terminális membránhorgot eltávolítottuk, hatékony vakcina előállítására nem használható. A találmány szerinti vakcina előnyösen olyan nem fertőző partikulát tartalmaz, amely lényegében PCR-rel kimutatható, TBE-vírus eredetű nukleinsavaktól mentes, ez például a Konishi és munkatársai által leírt módszerrel kimutatható.

A találmány egy további eleme TBE-vakcina előállítására vonatkozik, az említett eljárás a következőkkel jellemezhető:

- előállítunk egy olyan sejtenyészet-rendszert, amely a prM- és E-proteineket – ezek a proteinek a TBE-vírusból vezethetők le – kódoló szekvenciákat tartalmazza,

- az E-protein a maga teljes, natív formájában fejlődik ki, amikor is

- szubvirális, nem fertőző partikulák képződnek, amelyek lényegében a rekombináns E-proteint a maga teljes natív formájában és adott esetben a rekombináns prM/M proteint tartalmazza, majd

- a partikulákat összegyűjtjük, és közvetlenül immunizálásra alkalmas összetételben dolgozzuk fel.

A találmány szerinti eljárásnak az a nagy előnye, hogy nem szükséges vírusinaktiváló lépést – például formalinnal – alkalmazni, ami egyrészt a vakcina minőségét jelentősen javítja (az E-proteint natív formában és nem a formalinkezelés által módosított és legalábbis részben denaturált formában tartalmazza), másrészt jelentősen megkönnyíti technikailag a vakcina termelését, mivel a partikulákat közvetlenül (tehát formalinkezelés nélkül) gyógyszerkészítménnyé lehet feldolgozni.

Az eljárás megvalósítása során különösen előnyös, ha olyan sejtenyészet-rendszert alkalmazunk, amely a TBE-vírus rekombináns prM- és E-proteinjeit kódoló szekvenciákat kromoszómába integrált formában tartalmazza.

Vannak azonban olyan sejtenyészet-rendszerek, amelyekben virális vektorokat alkalmazunk, és olyan sejtenyészet-rendszerek, amelyekben vírusmentesen – például egy plazmidvektorral – dolgozunk, szintén a találmány szerinti partikulák előállítására alkalmas módon.

Az eljárás egy előnyös kiviteli alakja szerint mind a protermék expressziója, mind a partikulák képződése folyamatos.

A találmány egy további elemét a nem fertőző, szubvirális partikulák – amelyek a TBE-vírusból származtatott E-proteint, lényegében teljes natív formájában és adott esetben a prM/M proteint tartalmazza – TBE-vírus-fertőzések elleni aktív immunizálásra szolgáló vakcina előállítására való alkalmazása képezi.

Az E-protein és adott esetben a prM/M protein előnyösen rekombináns proteinek.

A találmány tárgyát képezi továbbá a nem fertőző, szubvirális partikuláknak – amelyek a TBE-vírusból származtatott E-protein lényegében teljes natív formáját és adott esetben a prM/M proteint tartalmazzák – a gyógyászati felhasználása, különösen anti-TBE-vírus immunglobulin-készítmények előállítására való alkalmazása. Ez esetben is előnyös, ha az E-protein és adott esetben a prM/M protein rekombináns proteinek.

A találmányt az alábbi példákon részletesebben ismertetjük.

Az ábrák leírása: az 1. ábrán az expressziós plazmidokban alkalmazott inszertumok vázlatos ábrázolása látható, a 2. ábra a pSV β plazmid vázlatát mutatja be, amelyet az 1. ábrán bemutatott szerkezet expressziójához használtunk, a 3a., b. és c. ábrák az 1. ábrán bemutatott SVPE wt szerkezet teljes nukleotid- és aminosavszekvenciáját tartalmazzák: a 4. ábra a Triton X-100 segítségével oldatba vitt sejtlyázatok immunprecipitációját mutatja be az 1. ábrán ábrázolt szerkezetekkel való transzfekció után, valamint TBE-vírussal (COS/TBE) való fertőzés után. Az 5. ábrán bemutatott diagram az E-protein kimutatására vonatkozik, amelyet 4 rétegű ELISA segítségével olyan COS-sejtek tenyészetének felülúszóiból végeztünk, amelyeket az 1. ábrán látható szerkezetekkel transzfektáltunk. A 6. ábra a COS-sejtek SV-PEwt-vel, illetve SV-PEst-vel való transzfekciója után a sejtenyészet felülúszóinak immunprecipitációját ábrázolja; a 7. ábrán a COS-sejtek SV-PEwt-vel, illetve SV-PEst-vel való transzfekciója, valamint TBE-vírussal való fertőzése után a sejtenyészet-felülúszók szedimentációs analízisére készített diagram látható; a szedimentáció iránya: balról jobbra; a 8. ábra az rSP (SV-PEwt) 0,5% Triton X-100-zal való kezelése után, illetve kezelése nélkül végzett szedimentációs analízist ábrázolja; a szedimentáció iránya: balról jobbra; a 9. ábrán a tisztított TBE-vírus és a tisztított rSP-k SDS-PAGE analízisének képe látható; Coomassie-blue-festés; a 10. ábrán a COS-sejtekből és a stabilan transzfektált CHO-sejtvonalból származó rSP-k összehasonlítása látható: a 11. ábra 19 E-protein specifikus monoklonális antitest reaktivitási diagramját mutatja be, amelyet 4 rétegű ELISA segítségével és TBE-vírussal, formalinnal inaktivált TBE-vírussal, rSP-vel és rE*-gal készítettünk: a 12. ábra a TBE-vírus, illetve az rSP B3, i2, IC3 és C6 monoklonális antitestekkel 4 rétegű ELISA-vizsgálatban való reaktivitását ábrázolja pH 6,0 mellett, illetve kezelés után, illetve kezelés nélkül (pH 8,0); a 13. ábra a pE* B3, i2, IC3 és C6 monoklonális antitestekkel – 4 rétegű ELISA-vizsgálatban – való reaktivitását ábrázolja pH 6,0 mellett való kezelés után, illetve kezelés nélkül (pH 8,0).

A találmányt a következő példákkal részletesebben szemléltetjük, anélkül azonban, hogy a példákkal a találmány oltalmi körét korlátoznánk.

1. példa

A partikulák előállítása

Erre a célra 4 expressziós plazmidot szerkesztünk, amelyek az E-proteint, illetve az E-protein egy

membránhorgonymentes formáját, vagy ezt a prM-proteinnel együtt tartalmazták (1. ábra).

E plazmidok előállítására vonatkozó példát írtak le Allison és munkatársai [Virus Genes, 8, 187–198 (1994)].

Az itt leírt pSV β kiindulási plazmidot a 2. ábra mutatja be.

Az expressziós klónok szerkesztéséhez a pSV46 vektort alkalmaztuk. Ez a vektor az SV40-en alapuló eukarióta pSV β expressziós vektor (Clontech) – amelyből NotI-gyel való emésztéssel a β -galaktozidáz-gént tartalmazó inszertumot [G. R. MacGregor, C. T. Caskey, Nucl. Acids Res., 17, 2365 (1989)] eltávolítottuk és ligáltunk – egy származéka. A transzlációs stophelytől 3'-irányban elhelyezkedő polilinker egy részét XbaI-gyel és HindIII-mal való emésztés, Klenow-betöltés és religálás révén szintén eltávolítottuk.

Ebbe a vektorba PCR-termékeket építettünk be, amelyekhez a következőképpen jutottunk.

Szintetikus oligonukleotid primereket használtunk a TBE-vírus prM+E szakaszának vagy csak E szakaszának megfelelő cDNS-részek sokszorozásához. A Mandl és munkatársai [C. W. Mandl, F. X. Heinz, C. Kunz, Virology, 166, 197–205 (1988)] szerinti nukleotidkoordinátákat használtuk, amelyeket később úgy dolgoztak át, hogy a TBE-genom első 20 nukleotidját [C. W. Mandl, F. X. Heinz, E. Stockl, C. Kunz, Virology, 173,] tartalmazza. A prM+E szerkezet és az E szerkezet 5'-primerei a következő 27mer-szekvenciák voltak: AAGCGGCCCGCCATGGTTGGCTTGCAAA, illetve AAGCGGCCCGCCATGGTTACCGTTGTGT. Mindkét szekvencia első 11 nukleotidja mesterséges szekvenciából áll, amely a NotI restrikciós enzim számára egy felismerőhelyet (GCGGCCGC) tartalmaz. Az ezt követő 16 tagú nukleotidszekvenciák a 388–403 (SV–PE sor) vagy a 883–898 (SV–E sor) nukleotidoknak felelnek meg. Mindkét esetben a megfelelő géntől 5'-felé egy természetben előforduló ATB-kodont alkalmaztunk startkodonként, és a primert úgy alakítottuk ki, hogy ez az ATB-t alkalmas összefüggésben tartalmazza (GCCGCCATGG) ahhoz, hogy COS-sejtekben hatékony transzláció induljon meg [M. Kozak, Cell., 44, 283–292 (1986); M. Kozak, 7. Mol. Biol., 196, 947–950 1980]. A hasonló 28 nukleotid hosszú oligonukleotidot (ATGCGGCCCGCTAGTCATACCATCTGAG) mindkét szerkezetnél 3'-primerként alkalmaztuk. Ez a primer 3'-végén a 2535–2550 nukleotidokkal komplementer és 5'-végén egy NotI helyet tartalmaz és egy TAG stopkodon komplementert (CTA) ugyanezen leolvasási keretben.

A PCR-sokszorozást lényegében standard körülmények mellett, a Cetus cég előírata szerint [R. K. Saiki, D. H. Gelfand, J. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich, Science, 239, 487–491 (1988)] végeztük. A reakcióelegyek összetétele 100 μ l esszterfogóban a következő volt: 50 mM kálium-klorid, 10 mM trisz-HCl, pH 8,3, 1,5 mM magnézium-klorid, 200–200 μ M dNTP, az egyes primerek 10 μ g-ja, a cDNS-mátrix 1000-szeres hígításából

10 μ l, 3 E AmpliTaq-Polymerase (Perkin–Elmer Cetus). A mintákra 100 μ l paraffinolajat rétegeztünk. A mintákat hőmérsékletváltást biztosító Perkin–Elmer-készülékben sokszoroztuk.

5 A mintákat 6,5 percig 94 °C-on tartottuk, ezután 40 °C-os hibridizációs hőmérsékletre hűtöttük, mielőtt a Taq-polimerázt hozzáadtuk. Összesen 35 sokszorozóciklust végeztünk. Mindegyik ciklusban 1,5 percig 94 °C-ot, 3 percig 40 °C-ot és 7 percig 68 °C-ot alkalmaztunk. A mintákat fenol-kloroformos extrahálással tisztítottuk, etanollal kicsaptuk, és steril, kétszer desztillált vízben feloldottuk. A PCR-termékek minőségét és mennyiségét agaróz-gélelektroforézissel határoztuk meg, és a mintákat –20 °C-on tároltuk, amíg ezt követően a klónozási lépéshez felhasználtuk.

10 A polimeráz láncreakciót arra használtuk, hogy egy cDNS-plazmid-klónokból álló, olyan inszertumokat tartalmazó minibankot kapjunk, amelyek a TBE-vírus-genom prM+E szakaszának (S4–PE sor), 388–2550 nukleotid, vagy E szakaszainak (SV–E sor), 883–2550 nukleotid, felelnek meg (1. ábra).

Minthogy a TBE-vírus szerkezeti proteinjei egy nagy poliproteinprekursor kotranszlációs feldolgozása révén keletkeznek, a transzlációs start- és stopkodonokat úgy vezettük be, hogy azokat az oligonukleotid primerbe építettük be. Mindegyik szerkezetbe egy természetben ATG-kodont – amely alkalmas kontextusban helyezkedett el ahhoz, hogy indítódkodonként szerepeljen – vezettünk be a belső szignálszekvenciától 5'-irányban annak érdekében, hogy lehetővé tegyük a gazda szignálja által történő természetes feldolgozást és a megfelelő rávitelt a szekréciós útra. Minden szerkezetben hasonló módon helyeztük el a TG-stopkodon a szignál-hasítási helytől – amely az E-protein karboxiterminális végét képezi – 3'-irányban. A NotI restrikciós enzim-felismerő helyeket szintén a végeken építettük be, hogy a PCR-termékek ezután következő klónozását megkönnyítsük.

30 A PCR-DNS-eket NotI-gyel elhasítottuk, és a pSV46 plazmidvektor NotI klónozóhelyére ligáltuk, ez lehetővé teszi, hogy a pontosan beépített gének a korai SVHO promotor szabályozása alatt fejződjenek ki [g. R. MacGregor, C. T. Caskey, Nucl. Acids Res., 17, 2365 (1989)]. A vektorban rendelkezésre áll egy poliadenilező szignál is a hatékony expresszió érdekében és egy SVHO replikációs origo, hogy a transzfektált COS-sejtekben – amelyek konstitutív módon fejezik ki a nagy SVHO-T-antigént [Y. Gluzman, Cell., 23, 175–182 (1981)] – lehetővé tegye a rekombináns plazmidok replikációját.

45 A ligálóelegyeket használtuk fel E. coli HB101-sejtek transzformálására, majd az egyes ampicillinrezisztens telepeket – amelyek egyetlen klónt képviselnek – izoláltuk. A plazmidokban az inszertum irányát restrikciós enzimes emésztésekkel és agaróz-gélelektroforézissel határoztuk meg. A megfelelő irányítottságú inszertumokat tartalmazó klónokat tartottuk meg a további analízisekhez.

60 A helyes irányítottságú inszertumokat tartalmazó plazmidokat restrikciós analízissel azonosítottuk, és

cézium-klorid-gradiensben való centrifugálással tisztítottuk.

Mindegyik plazmidszerkezetnél a DNS-szekvencia meghatározásához készítményből származó, tisztított, kétszálú plazmid-DNS-t használtunk. A szekvenálási reakciókat hőmérsékletváltásra alkalmas Perkin-Elmer-készülékben végeztük TBE-specifikus primerek, AmpliTaq-polimeráz (Perkin-Elmer Cetus) és fluoreszkáló színezékekkel jelzett dideoxiterminátorok használatával, az előállító cég (Applied Biosystems) előírásai szerint. A szekvenálási reakciók termékeit az Applied Biosystems 373A automata DNS-szekvenátorával analizáltuk.

PCR-rel létrehozott mutációk analízise

Annak érdekében, hogy a klónozott inszertumokat részletesen analizáljuk, és hogy a Taq-polimeráz által létrehozott mutagenizálás hatékonyságát megítéljük, ki-

választottunk 13 olyan egyedi E. coli-klónt, amelyek SV-PE sorozatból származó plazmidot tartalmaztak, és 9 olyan klónt, amelyek SV-E sorozatból származó plazmidot tartalmaztak. A klónok plazmid-DNS-ét tisztítottuk, és a klónozott inszertumok mindkét szálát teljes szekvenálással analizáltuk. A CDNS-szekvenciákat ezután a szülői vad típusú TBE-vírus Neudörfl törzs [C. W. Mandl, F. X. Heinz, C. Kunz, Virology, 166, 197-205 (1988)] megfelelő RNS-szekvenciával hasonlítottuk össze.

Mint vártuk, az egyes plazmidklónok több nukleotidban különböztek a vad típusú TBE-vírus szekvenciájától. Néhány kivételtől eltekintve (lásd alább) e változások nagyobb részben olyan egyedi mutációk voltak, amelyeket nyilvánvalóan a PCR-sokszorozás vezetett be és így csak egyetlen klónban voltak megtalálhatók.

1. táblázat

A PCR által okozott mutációk összefoglalása

Klón	Nukleotidváltozások ^{a)}	Aminosavváltozások ^{b)}	
		prM	E
SV–PE			
01	945 G→A 1122 G→C 1395 C→T 2027 T→C 2480 A→G		Gln 50→His Val 352→Ala
02	551 T→A 1080 G→A 1153 T→C 1168 T→C 1690 A→G 2458 G→del	Val 24→Glu	Ser 66→Pro Arg 240→Gly Ala 495→ Leolvasásikeret-eltolódás
03	952 T→C 976 C→T 1163 A→G 1679 A→G 1889 T→A	Cys 158→Arg	Arg 2→Cys Lys 64→Arg Asn 236→Ser Met 306→Lys
04 ^d	1434 C→T 2275 A→T 2364 G→A		Lys 435→stop
05 ^c	701 T→C 1488 C→A 1492 T→C 1893 T→A	Leu 74→Pro	Cys 307→stop
06	782 T→C 865 A→G 1002 C→T 1972 G→A	Leu 101→Pro Lys 129→Glu	Gly 334→Arg
07 ^c	1327 G→del 2248 G→A		Ala 119→ Leolvasásikeret-eltolódás Ala 426→Thr
08	701 T→A 2092 A→G 2124 T→C	Leu 74→Gln	Met 374→Val

1. táblázat (folytatás)

Klón	Nukleotidváltozások ^{a)}	Aminosavváltozások ^{b)}	
		prM	E
09	452 T→C 960 A→T 1746 A→G 2086 A→G 2142 T→C 2290 G→A 2361 A→G		Ile 372→Val Val 440→Ile
SV-PE			
10 ^c	1625 A→G 2475 T→C		Asp 218→Gly
11 ^c	—		
12 ^c	1303 G→A		Met 77→Ile
13 ^c	1366 T→C 1381 A→G 1728 G→A		Tyr 132→His Ile 137→Val Met 252→Ile
SV-E			
01 ^d	1239 C→T		
02	1093 A→T 2301 C→T		Met 41→Leu
03	1321 G→A 1688 A→G 1717 G→A 2053 A→G 2092 A→G		Val 117→Ile Glu 239→Gly Ala 249→Thr Asn 361→Asp Met 374→Val
04	2073 T→C 2438 C→T		Ala 489→Val
05	938 T→C 973 T→C 2401 T→G	(Leu 153→Pro) ^e	Ser 1→Pro Ser 477→Aia
06	891 C→T 1151 G→A 1364 T→C 1567 A→G 2045 T→C		Cys 60→Tyr Val 131→Ala Ile 199→Val Ile 358→Thr
07	1257 T→C 1694 T→C 1794 A→G 2159 G→T		Leu 241→Pro Gly 396→Val
08	1806 A→G 2205 A→G		
09	2491 A→del ^e		

a) A nukleotidkoordináták a teljes TBE-genomra vonatkoznak.

b) Az aminosavkoordináták a prM-re vagy E-re vonatkoznak.

c) Aminosavváltozások az NS1- vagy a C-génben.

d) Az SV-PEOH új neve „SV-Pest” és az SV-EO1 új neve „SV-Ewt”.

e) A PCR okozta mutációkon kívül más mutációkat nem említünk (vesd össze a szöveggel).

f) Ebben a szerkezetben a prM-nek csak a C-terminális része volt jelen.

Amint az 1. táblázat mutatja, a 22 szekvenált inszertum (összesen 43 549 bázispár) 71 olyan egyedi nukleotidváltozást tartalmazott, amelyeket a Taq-polimeráz hibájára vezettünk vissza. Ezek a változások 42 (59%) szubsztitúcióhoz vezettek a várt aminosavszekvenciában, és 3 deléciót okoztak, amelyeknek leolvásikeret-eltolódás volt a következménye (2. táblázat).

2. táblázat
PCR-mutáció gyakoriság

Bázispárváltozások	Az előfordulások száma ^a	Bázisonkénti gyakoriság
G/C→A/T	20 (28%)	$4,59 \times 10^{-4}$
G/C→T/A	2 (2,8%)	$4,59 \times 10^{-5}$
G/C→C/G	1 (1,4%)	$2,30 \times 10^{-5}$
A/T→G/C	37 (52%)	$8,50 \times 10^{-4}$
A/T→C/G	1 (1,4%)	$2,30 \times 10^{-5}$
A/T→T/A	7 (9,9%)	$1,61 \times 10^{-4}$
G/C deléció	2 (2,8%)	$4,59 \times 10^{-5}$
A/T deléció	1 (1,4%)	$2,30 \times 10^{-5}$
Átmenetek	57 (80%)	$1,31 \times 10^{-3}$
Transzverziók	11 (15%)	$2,53 \times 10^{-4}$
Összes mutáció	71 (100%)	$1,63 \times 10^{-3}$
Aminosavszubsztitúciók	42 (59%)	$9,64 \times 10^{-4}$
Csendes mutációk	24 (34%)	$5,51 \times 10^{-4}$
Leolvásikeret-eltolódások	3 (4,2%)	$6,89 \times 10^{-5}$
Terminátorkodonok	2 (2,8%)	$4,59 \times 10^{-5}$

a) 43 549 szekvenált bázispár.

A mutációk eloszlása erősen eltolódott az A/T G/C és G/C A/T átmenetmutációk javára, amit előzőleg már mások is megfigyeltek [A. M. Dunning, P. Talmud, S. E. Humphries, Nucl. Acids Res., 16, 10393 (1988); J. Chen, A. Sahota, P. J. Stambrook, J. A. Tischfield, Mutat. Res., 249, 169–176 (1991); R. C. Cadwell, G. F. Joyce, PCR Methods Applic., 2, 28–33 (1992)]. Egy 35 ciklusú sokszorozásnál az összes mutáció gyakorisága bázispáronként $1,63 \times 10^{-3}$ volt ($4,7 \times 10^{-5}$ per bázispár per ciklus), ami a Taq-Polymerase hibáinak gyakoriságáról közölt értékekkel megegyezik. Az átlagos aminosavszubsztitúciós arány prM-nél (164 aminosav hosszú) génenként 0,46 volt és E-nél (496 aminosav hosszú) 1,59.

A 930. nukleotidnál egy csendes mutáció volt jelen minden klónban, és így feltételezhető, hogy ez természetes mutáció gyanánt keletkezett a vírus szaporodása folyamán. Ezenkívül megállapítottuk, hogy az SV-PE sorozat öt klónjában – SV-PE05, SV-PE07, SV-PE11, SV-PE12 és SV-PE13 – egyformán két azonos mutáció fordult elő a 849., 1285., 1346., 1404., 1909., 2247. és 2255. nukleotidnál. Az SV-PE10-et kivéve, amely e mutációk közül hármát (1909, 2247 és 2255) tartalmazott, ilyeneket nem találtunk a többi

SV-PE-klónban, sem valamely SV-E-klónban. Az egyik ilyen változás – egy nukleotid deléció az 1346. pozícióban – leolvásikeret-eltolódást okozott az E-génben, a 125. kodonnál és azt vártuk volna, hogy ez egy működésre képtelen E-proteint eredményez. Mint-hogy e két, azonos mutációkat tartalmazó klón közül egyet a külön CDNS- és külön PCR-előállításoktól függetlenül kaptunk meg (adatokat nem mutattunk be), úgy tűnik, hogy ez a variáns már a sokszorozás előtt jelen volt a vírus-RNS populációban. Ezeket a sajátos mutációkat ezért nem vontuk be a PCR által okozott mutációk analizisébe.

Vad típusú és deletált E-proteinek kódoló szerkezetek

Az egyes aminosavváltozásokat kódoló klónokon kívül érdekeltek voltunk az olyan prM+E- és csak E-szerkezetek előállításában is, amelyek vad típusú és deletált proteinek kódolnak. Minthogy azonban az SV-PE-sorozatból mindegyik PCR-rel előállított klón olyan mutációkat tartalmazott, amelyek az aminosavszekvenciában változásokhoz vezettek volna, közvetlen szubklónozást alkalmaztunk egy olyan vad típusú szerkezet előállítására, amely a módosítatlan prM- és E-proteint, valamint a csak e szerkezet egy deletált formáját kódolja.

Az SV-PE04 plazmid DNS-szekvenciája két csendes mutáción kívül egy szubsztitúciót mutatott a 2275. nukleotidnál, amikor is az AT-re cserélődött, miáltal az E-protein 435-ös lizinének AAG kodonja TAG-stop kodonná változott (1. táblázat). Ennélfogva előre látható volt, hogy az SV-PE04 egy vad típusú prM-proteint és egy deletált E-proteint kódol, amelyből a karboxiterminális 61 aminosavmaradék hiányzik, amely a valószínű membránt átszelő szakaszt foglalja magában [C. W. Mandl, F. Guirakhoo, H. Holzmann, F. X. Heinz, C. Kunz, J. Virol, 63, 564–571 (1989)]. Azt találtuk, hogy az SV-E01 plazmid, amelyből a prM-gén nagy része hiányzik, a génben csak egy csendes mutációt tartalmaz, miáltal egy vad típusú E-proteint kódol.

Annak érdekében, hogy egy olyan prM+E szerkezethez jussunk, amely egy vad típusú aminosavszekvencia teljes hosszával rendelkezik és egy prM nélküli csak E-szerkezethez, de amely egy stopkodont tartalmaz a 2275. nukleotidnál, az SV-PE04-ből és az SV-E01-ből (elnevezésük a későbbiekben SV-PEst, illetve SV-Ewt) kapott restriktions fragmentumokat kicseréltük. Erre a célra, a Cfr10I restriktions enzim számára két hasítási helyet használtunk, az egyiket a 960. és 961. nukleotid között, a prM- és E-gén határához közel, a másikat a vektor ampicillinrezisztencia-génjében. A kapott plazmidszerkezetek közül egy, az SV-PEwt, tartalmazta az SV-PEst-ből származó vad típusú prM-gént és az SV-Ewt-ből származó vad típusú E-gént, míg a másik plazmidszerkezetből, az SV-Est-ből, a prM-gén hiányzott, tartalmazta azonban a SV-PEst-ből származó, stopkodont tartalmazó E-gént. Ezeket a változásokat a két plazmid inszertumainak a szekvenálásával igazoltuk. Ez a két szerkezet egy készletet tett teljessé négy expressziós plazmidból, a vad típusú szerkezetből (SV-PEwt) kifejeződött E-protei-

nek szerkezetének és feldolgozásának az összehasonlítására olyanokéval, amelyekből a prM (SV-Ewt), az E-horgony-szakasz (SV-PEst) vagy mindkettő hiányzott.

A PEwt-inszertum teljes szekvenciáját a 3a., b. és c. ábrákon mutatjuk be.

A megfelelő plazmidokkal COS-sejteket transzfektáltunk, amelyeket rekombináns proteinek expressziójára vizsgáltunk.

DNS-transzfekció

A COS-1 sejteket [Y. Gluzman, Cell, 23, 175–182 (1991)] „COS-táptalajban” – összetétel: Dulbecco-féle MEM (GIBCO-BRL) 10% fetális marhaszérummal, penicillinnel (100 E/ml) és sztreptomocinnel (100 µg/ml) kiegészítve – tartottuk fenn, 37 °C-on, 5% szén-dioxid mellett.

A klónozott TBE-géneket tartalmazó plazmidokat liposzómaközvetített transzfekcióval – Felgner és munkatársai eljárásának egy módosított változatának alkalmazásával [P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Molm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen, Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 7413–7417 (1987)] – BioRad-féle Gene Pulser-készülék segítségével vittük be a COS-1 sejtekbe. A Lipofectin reagenst (GIBCO-BRL) Opti-MEM-I redukált szérum tápoldattal (GIBCO-BRL) 20 µg/ml-re hígítottuk és 8 µg/ml megfelelő plazmid-DNS-t tartalmazó azonos mennyiségű Opti-MEM-I-gyel kevertük össze. Egy transzfekcióhoz 5 µg Lipofectint és 2 µg plazmid-DNS-t használtunk fel. A keveréket 15 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk a DNS-Lipofectin-komplex képződéséhez, majd ebből a keverékből 0,5 ml-eket mértünk egy 24 tartályos sejtenyészítő lemez (Nunc) minden tartályába. A tartályok olyan sejteket tartalmaztak, amelyeket a tenyésztő táptalajból származó szérum nyomainak eltávolítására kétszer 1 ml Opti-MEM-oldattal mostunk. A sejteket a DNS-Lipofectin keverékkel 5 órán át 37 °C-on 5% szén-dioxid atmoszférában inkubáltuk, ezután hozzáadtunk 1 ml komplett COS-táptalajt, és az inkubálást egy éjszakán át tovább folytattuk. A transzfekció után 24 órával a táptalajt eltávolítottuk, és friss COS-táptalajjal helyettesítettük, majd tovább inkubáltunk a transzfekció utáni körülbelül 46 óráig, amely időpontban a sejteket vagy immunfluoreszcenciás analízishez fixáltuk, vagy feloldottuk ELISA-val végzendő intracelluláris antigénanalízishez.

Az immunfluoreszcenciás kontrollok céljára a COS-sejtek TBE-vírussal való fertőzésénél lényegében ugyanúgy jártunk el, mint a transzfekciós eljárásnál, azaz a kivétellel, hogy a plazmid-DNS és Lipofectin helyett a TBE-vírust Opti-MEM-I-táptalajjal 100-szorosára hígított, szopós egerekből származó agyszuszpenzió formájában alkalmaztuk.

A kifejezett proteinek analízise

a) A sejtlizátumok immunprecipitációja

A transzfektált sejteket ³⁵S-ciszteinnel jeleztük, 1% Triton X-100-zal szolubilizáltuk, és egy, a TBE-vírus E- és prM-proteinjére specifikus, poliklonális nyúlserummal immunprecipitáltuk. Mint a 4. ábrából látható,

az SV-PEwt és SV-Ewt szerkezetek expressziója autentikus nagyságú E-protein szintéziséhez vezetett. Az SV-Pewt és SV-Est által szintetizált proteinek, mint vártuk, – rövidebb C-terminális végük következtében – kisebbek voltak, mint a vad típusú E-protein.

b) A rekombináns protein szekréciójának vizsgálata sejtfelülűszoiban

A transzfektált sejtek felülűszoit a transzfekció után 0-tól 4. napig E-protein jelenlétére vizsgáltuk 4 rétegű ELISA-val – mennyiségileg – Heinz és munkatársai által leírtak szerint [Heinz et al., J. Biol. Stand., 14, 133–141 (1986)]. Az 5. ábrán bemutatott eredmények mutatják, hogy csak azok a szerkezetek szekretálták az E-proteint, amelyek a prM-proteint is kifejezték. A felülűszoók immunprecipitációjával (6. ábra) igazoltuk, hogy a kicsapott proteinek ugyanolyan nagyságúak voltak, mint a megfelelő intracelluláris proteinek (vesd össze a 4. ábrával).

A rekombináns proteinek szekréciója óriási előnyt jelent a termelés szempontjából, ugyanis nem szükséges a sejteket feloldani a kívánt protein kinyerése érdekében, és így a szennyező sejtanyagok eltávolítása kiküszöbölődik. Megfelelő feltételek mellett ez lehetővé teszi a rekombináns proteinek folyamatos aratását a sejtek feltárása nélkül.

c) A kicsapott rekombináns proteinek vizsgálata

Az 5. ábrán bemutatott felülűszoókat szacharóz-sűrűség-gradiensben centrifugáltuk, 5–30% (tömeg/tömeg) szacharózgradiens és Beckman SW-40 rotor használatával. A centrifugálás 38 000 fordulat/perc, 4 °C mellett, 100 percig tartott. A gradienseket elválasztottuk és az E-protein mennyiségét minden frakcióban meghatároztuk 4 rétegű ELISA [lásd Heinz et al., J. Biol. Stand., 14, 133–141 (1986)] segítségével. A vírussal fertőzött sejtek felülűszoját használtuk kontrollként, amely két E-protein-tartalmú csúcsot (7. ábra) adott. Ezek közül az egyik a teljes vírusnak felelt meg, a másik az úgynevezett nem fertőző „lassan ülepedő hemagglutinin”-nek [„slowly sedimenting hemagglutinin” (SHA); lásd Russel et al., Chemical and Antigenic Structure of Flaviviruses című közleményt; R. W. Schlesinger (szerkesztő) „The Togaviruses” című kiadvány 503–529. oldalak (Academic Press, 1980)]. Az SV-PEwt-vel transzfektáló sejtekről származó felülűszo az E-protein egy speciális formáját tartalmazta, amelynek a szedimentációs sebessége hasonló volt a virális SHA-éhoz, míg az SV-PEst-ből származó, C-terminális végén megrövidített E-protein nem képezett stabil részecskéket, és a gradiens tetején maradt.

Az SV-PEwt-ből származó speciális formát „rekombináns szubvirális részecskének” („recombinant subviral particle”, rSP) neveztük és az SV-PEst-ből származó oldható formát „rekombináns E*”-nak (rE*).

Az rSP kezelése 0,5%-os Triton X-100-zal felbontotta a részecskét. Ennek szedimentációs analízise (lásd a 8. ábrát) lipidmembrán jelenlétére utal.

Az rSPL és rL* előállítása

a) Az rSP tisztítása

Az SV-PEwt-vel transzfektált COS-sejtek felülűszoit 30 perces centrifugálással – 10 000 fordulat/perc, 4 °C, Sorvall szupercentrifuga – derítettük, és a részecs-

kéket Beckman Ti45 rotor használatával, 44 000 fordulat/perc, 4 °C mellett, 120 percig tartó centrifugálással arattuk le. Az rSP-tartalmú üledékfrakciót TAN-pufferben (pH 8,0) reszuszpendáltuk és felvittük egy ugyan ezen pufferrel előállított 5–20%-os szacharózgradiensre. Ezután 90 perces centrifugálással, amelyet 38 000 fordulat/perc és 4 °C mellett, Beckman SW40 rotor használatával végeztünk, frakcionáltuk a mintákat, és a csúcsfrakciókat HA aktivitásra teszteléssel (Clarke, Casals, *Aver. J. Trop. Med. Hyg.*, 7, 561–573 (1958)) azonosítottuk. A gradiensekből származó csúcsfrakciókat egyensúlyi centrifugálással (35 000 fordulat/perc, 4 °C, egy éjszakán át) továbbtisztítottuk, és a frakciókat újból azonosítottuk HA teszteléssel. Az E-összprotein mennyiségi meghatározását 4 rétegű ELISA-val végeztük, tisztaságát Coomassie-blue-festéssel, SDS-PAGE-rendszerben határoztuk meg (9. ábra).

b) Az rE* előállítása

Az SV-PEst-vel transzfektált COS-sejtektől származó szérumentes felülűszókat, mint fent leírtuk, de-ritettük, és ultraszűrővel 15-szörösére koncentráltuk.

Kromoszómába integrált prM- és E-gént tartalmazó sejtvonalak előállítása

Stabilan transzfektált, rSP-termelő sejtek előállítására a dihidrofolát-reduktáz (DHFR) szelekciós rendszert alkalmaztuk (*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc.), valamint azt a szerkezetet, amely a prM- és E-proteint meghatározó teljes géneket tartalmazza (1. ábra), és az rSP-k szintézisét és szekrécióját biztosítja. A DHFR-gén átvitelét a pSV2-dhfr-plazmid [S. Subramani et al., *Mol. Cell. Biol.*, 1, 854–865 (1981)] segítségével végeztük, a prM- és E-gén átvitelét a CMV-PEwt plazmid segítségével, amelyet az SV-PEwt plazmából származó inszertumnak a pCMVβ-plazmidba (Clontech) való átklónozásával állítunk elő.

A DHFR-hiányos CHO-DG44 hörcsög-sejtvonalat [*Som. Cell., Mol. Genet.*, 12, 555–666 (1986)] 10% fetális borjúsérummal kiegészített HAM-féle F12 táptalajon tenyésztettük, és 20:1 arányban pCMV-PEwt, valamint pSV2-dhfr-plazmiddal transzfektáltuk elektroporációt alkalmazva, BioRad Gene-Pulser-készülék használatával. A transzfektált sejteket ezután további 2 napon át tenyésztettük 10% fetális borjúsérum-tartalmú HAM-féle F12 táptalajban. A sejteket tripszinnel kezeltük, majd nagy hígításban – annak érdekében, hogy egyedi DHFR és prM+E kifejező sejtklónokat kapjunk a szelektív táptalajban (MEM-α ribo- és dezoxiribonukleotid nélkül +10 fetális borjúsérum) – Petri-csészékre szélesztettük. Tíz nap múlva az egyes, mikroszkóp alatt látható sejtlepeket kis tenyésztőedényekbe vittük át, és továbbszaporítottuk. Az FSME-specifikus antigént termelő sejtklónokat a sejtfelülűszók ELISA-vizsgálatával azonosítottuk (FSME=Frühsommermeningo-encephalitis).

Egy ilyen sejtklont (CHO-37) használtunk az általa termelt rSP-k izolálásához és vizsgálatához. Ennek érdekében a sejteket a fenti szelektív táptalajon tenyésztettük, és az rSP-ket a sejtfelülűszóból ugyanazon tisztítási eljárással nyertük ki, mint amelyet a COS-sejtekből izolált rSP-kre leírtunk. A 10. ábrán a COS-sejtekből

származó rSP-knél és a stabilan transzfektált CHO-37 sejtvonalból származó rSP-knél kapott szacharóz-sűrűséggradiens centrifugálással kapott eredmények összehasonlítása látható. A centrifugálási feltételek a következők voltak: 20–50% szacharóz; Beckman Ti-40 rotor, 35 000 fordulat/perc egy éjszakán át. Centrifugálás után a gradienseket elválasztottuk és az egyes frakciókat hemagglutinációs teszttel és ELISA-val FSME-vírusspecifikus antigénre analizáltuk. Amint ezt az ábra mutatja, a két készítmény szedimentációs tulajdonságaiban, illetve specifikus sűrűségében, valamint hemagglutinációs aktivitásában különbség nem mutatkozott.

2. példa

A natív proteinszerkezetre vonatkozó vizsgálatok

Az ilyen módon előállított készítményeket a következőképpen vizsgáltuk:

a) Antigénszerkezet vizsgálata monoklonális antitestekkel

b) Savval indukálható konformációváltozások

c) Hemagglutinációs aktivitás

Ad a) Antigénszerkezet

A formalinnal inaktívált teljes vírus antigénszerkezetét – az rSP-ből és rE*-ből – 19 E-protein-specifikus monoklonális antitest használatával hasonlítottuk össze a natív fertőző vírus antigénszerkezetével [Mandl et al., *J. Virol.*, 63, 564–571 (1989); saját kísérletek]. Az egyes monoklonális antitestek reaktivitását az egyes, előzőekben említett készítményekkel 4 rétegű ELISA-val analizáltuk Heinz és munkatársai [*J. Biol. Stand.*, 14, 133–141 (1986)] szerint. A vizsgálatban minden antigénkészítményt az E-proteinre előzőleg meghatározott, 1 µg/ml-es állandó koncentrációban és a monoklonális antitesteket olyan hígításban használtuk, amelyek a natív fertőző vírussal 0,5–1,6 tartományban adtak extinkciós értéket. Mint a 11. ábrából kitűnik, a monoklonális antitestek (mAt) reaktivitási görbéje az rSP-nél és a fertőző vírusnál gyakorlatilag azonos, amiből azt következtethetjük, hogy az rSP-kben az E-protein ugyanolyan natív formában létezik, mint a fertőző vírusban.

Ezzel szemben a formalinnal való inaktíválás jelentős változásokat idéz elő az antigénszerkezetben, ahol azokat az epitópokat is érinti, amelyek a neutralizáló antitesteket kötik meg. Ez a megállapítás az i2 mAt-re [Mandl et al., *J. Virol.*, 63, 564–571 (1989)] – amelynek az epitópját a formalinkezelés elbontja – ugyanúgy vonatkozik, mint az A domén és a B domén területén lévő epitópokra [Mandl et al., *J. Virol.*, 63, 564–571 (1989)], amelyek legalábbis korlátozott reaktivitást mutattak. Ez a vizsgálat azt is mutatja, hogy az E* szerkezete egyáltalán nem felel meg a vírus felületén lévő natív E-protein szerkezetének.

Ad b) Savval indukálható konformációváltozások

A TBE-vírus receptorközvetített endocitózis segítségével hatol be a sejtekbe, ahol az endoszómákba kerül, amelyek savanyú pH-ja (<6,4) specifikus konformációváltozást indukál. Ez a konformációváltozás szükséges a vírusmembránnak az endoszómamembránnal való fúziójához, azaz a vírus fertőzőképességéhez. Ezek a szerkezeti változások az egyes mAt-ek reaktivi-

tásának a változásával nyomon követhetők [Heinz et al., *Virology*, 198, 109–117 (1994)] és többek között az i2 és IC3 (a reaktivitás erős csökkenése), illetve C6 (megerősödött reaktivitás) epitópokat érintik, azonban a B3 epitópot nem.

Ezek a változások az E-protein funkciójára nézve lényegesek. Savanyú pH-ra a leírt módon való reagálási képesség azért ugyancsak kritériuma annak, hogy vajon az E-protein natív, a fertőző vírusnak megfelelő formában van-e. Trietanol-amin pufferes (pH 8,0) rSP-, rE*- és fertőzővírus-készítményeket 0,05 M mES, 0,1 M nátrium-klorid és 0,1% marhaszérumalbumin-tartalmú pufferrel kevertünk úgy, hogy a pH-érték 6,0-ra változzon, majd az elegyeket 10 percig 37 °C-on inkubáltuk, és ezután a pH-t újból 8,0-ra állítottuk be trietanol-amin segítségével. A készítmények reaktivitását a savanyú pH-n való inkubálás előtt és után 83, i2, IC3 és C6 mAt-ekkel 4 rétegű ELISA-tesztben analizáltuk az „Antigénszerkezet” fejezetben leírtak szerint. Az eredményeket a 12. és 13. ábrán ábrázoltuk, amelyekből kitűnik, hogy a savanyú pH az rSP-k E-proteinjében ugyanolyan szerkezeti változásokat okoz, mint a fertőző vírusban (lásd a 12. ábrát), azonban ugyanez az analízis az rE*-nál hasonló átrendeződésre nem utal (lásd a 13. ábrát).

Ad c) Specifikus hemagglutinációs aktivitás

Az FSME-vírus egyik jellemző tulajdonsága, hogy meghatározott körülmények között a liba-vörösvérsejteket agglutinálja (hemagglutinációs aktivitás). A vírus ezen tulajdonságát az E-protein közvetíti, és ez további indikátora annak, hogy ez a protein egy natív, működőképes szerkezettel rendelkezik. A hemagglutinációs vizsgálatokat Clarke és Casals [Amer. J. Trop. Med. Hyg., 7, 561–573 (1958)] módszerével végeztük, liba-vörösvérsejtek használatával, pH 6,4 mellett.

Fertőzővírus-, formalin-inaktivált vírus-, rSP- és rE*-készítményeket 5 µg/ml – ELISA-val meghatározott – antigéntartalomra állítottunk be, és elvégeztük a készítmények hemagglutinációs analízisét. Az eredményt a 3. táblázat tartalmazza. Ebből látható, hogy az rSP hemagglutinációs aktivitása azonos a fertőző víruséval, és hogy ezen E-protein által közvetített aktivitás a formalin-inaktiválás következtében majdnem teljesen elvész. Az rE*-készítménynek nincs mérhető HA-aktivitása.

3. táblázat
HA-aktivitás

Készítmény	HA-titer
Fertőző vírus	512
Formalin-inaktivált vírus	4
rSP	512
rE*	<2

3. példa

Immunogenitás egerekben

Az alábbi antigénkészítmények immunogenitását egerek immunizálásával vizsgáltuk:

- formalin-inaktivált tisztított vírus
- rSP
- rE*

Az E-protein-tartalmat enzim immunassay-val állapítottuk meg [Heinz et al, 7. Biol. Stand., 14, 133–141 (1986)], és minden készítményt 5 µg/ml antigén-koncentrációra állítottunk be. Az akkor alkalmazott TBE-vakcinának megfelelően (FSME-Immun^R) 0,1% humán albumint tartalmazó PBS-t (pH 7,4) használtunk hígítópufferként, és 0,2% alumínium-hidroxid-adjuvánst adtunk hozzá.

Az rSP és rE* immunogenitását adjuváns hozzáadása nélkül teszteltük.

Immunizálási művelet

Mindegyik készítménnyel 10-10 15 g-os Swiss albino egerből (5 nőstény és 5 hím) álló csoportot oltottunk kétszer szubkután, 14 nap időközöt hagyva, egerenként és oltásonként 0,2 ml antigén alkalmazásával. A második immunizáló oltás után egy héttel vért vettünk, és minden egeret 500 LD₅₀ egér-patogén TBE-vírus törzzsel (Hypr) felülfertőztünk (challenge teszt). Az egereken ezután 14 napon át figyeltük az elhulláshoz vezető encephalitis fellépését.

Egy tízes csoportból – amelyben ugyanazon immunogénrel immunizáltunk – minden egyes eger szérumból aliquot mennyiségeket pooloztunk, és a TBE-specifikus antitesttartalmat enzim immunassay-val (ELISA) hemagglutináció gátlási tesztben (HGT) és neutralizációs tesztben (NT) analizáltuk.

Az ELISA-vizsgálatban antigénként tisztított TBE-vírust használtunk, és a vizsgálatot Heinz és munkatársai [J. Gen. Virol, 65, 1921–1929 (1984)] leírása szerint végeztük el. A hemagglutináció gátlási vizsgálatot Clarke és Casals [Amer. J. Trop. Med. Hyg, 7, 561–573 (1958)] szerint végeztük, és liba-vörösvérsejteket használtunk 6,4 vég-pH mellett. A neutralizációs vizsgálatban BHK-2 sejteket és 500 fertőzőegység víruskoncentrációt használtunk.

Az immunizálási kísérlet eredményét a 4. táblázatban foglaljuk össze. Ebből kitűnik, hogy rSP akár adjuváns nélkül, akár adjuvánssal minden egeret ugyanúgy megvédett a halálos adagú TBE-vírustól, mint a formalinnal inaktivált teljes vírus. Ezzel szemben az rE*-gal végzett immunizálás után védőhatás egyáltalán nem (adjuváns nélkül) vagy csak minimális (adjuvánssal) volt megfigyelhető.

Ami az antitest-indukciót illeti, az rSP-készítmények még a formalinnal inaktivált vírust is felülmúlták, különösen jelentősen alumínium-hidroxid-adjuváns használatánál. Ez az ELISA-tesztben kimutatott víruskötő antitestre is vonatkozott, valamint a – védő immunválasz szempontjából még jelentősebb – hemagglutináció gátlási és neutralizációs vizsgálatban mért antitestre is, amelyek a vírusspecifikus funkciót (hemagglutináció, illetve fertőzőképesség) is blokkolják.

A nem létező, illetve csekély védőhatással összhangban az rE*-antitest indukciója is nagyon alacsony volt vagy nem volt kimutatható.

Látható tehát, hogy az rSP-k kiemelkedően jó immunogének, amelyek az egyébként halálos kimenetelű encephalitis-től védnek, és a funkcionális, vírusneutralizáló antitestek indukciója vonatkozásában akár a formalin-inaktivált teljes vírust is felülmúlják.

4. táblázat
Egerek immunizálása

	Challenge-teszt Túlélők száma per összes egér (=10)	Antitesttiter		
		ELISA	HGT	NT
Formalininaktivált vírus+adjuváns	10/10	10 000	40	20–40
rSP adjuváns nélkül	10/10	12 000	80–160	40–80
rSP+adjuváns	10/10	30 000	160	160
rE* adjuváns nélkül	0/10	100	<10	<10
rE* adjuváns	10/10	4 000	<10	<10–10
Pufferkontroll	0/10	neg	<10	<10

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Tick–Borne encephalitis vírus- (TBE-vírus-) fertőzések elleni immunizálásra alkalmas, nem fertőző szubvirális partikulákból álló vakcinák, amelyek lényegében az E-proteint teljes, natív formájában és adott esetben a prM/M proteint tartalmazzák, amely proteineket a TBE-vírusból származtattuk.

2. Az 1. igénypont szerinti vakcinák, amelyekben az E-protein és adott esetben a prM/M protein rekombináns proteinek.

3. A 2. igénypont szerinti vakcinák, amelyekben a rekombináns E-proteint az európai vagy távol-keleti TBE-vírus szubtypusokból származtattuk.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti vakcinák, amelyekben a nem fertőző partikulák előnyösen vezikuláris formájú lipidkomponenst is tartalmaznak.

5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti vakcinák, amelyekben a nem fertőző partikulák lényegében mentesek PCR-rel kimutatható, PBE-vírusból levezetett nukleinsavaktól.

6. Eljárás TBE-vakcina előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

– egy olyan sejttenyésztő rendszert állítunk elő, amely a TBE-vírusból levezetett prM- és E-protein kódolószekvenciáit tartalmazza,

– az E-proteint a maga teljes, natív formájában fejezzük ki, amikor is

– szubvirális, nem fertőző partikulákat képezünk, amelyek a rekombináns E-proteint lényegében teljes, natív formában és adott esetben a rekombináns prM/M proteint tartalmazzák, és

– a partikulákat összegyűjtjük, és immunizálásra alkalmas összetétellé feldolgozzuk.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy olyan sejttenyésztő rendszert állítunk elő, amely a TBE-vírusból származtatott prM- és E-protein kódolószekvenciáit kromoszómába integrált formában tartalmazza.

8. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a sejttenyésztő rendszerben virális vektorokat alkalmazunk.

9. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a sejttenyésztő rendszerben vírusmentesen dolgozunk.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy plazmidvektort alkalmazunk.

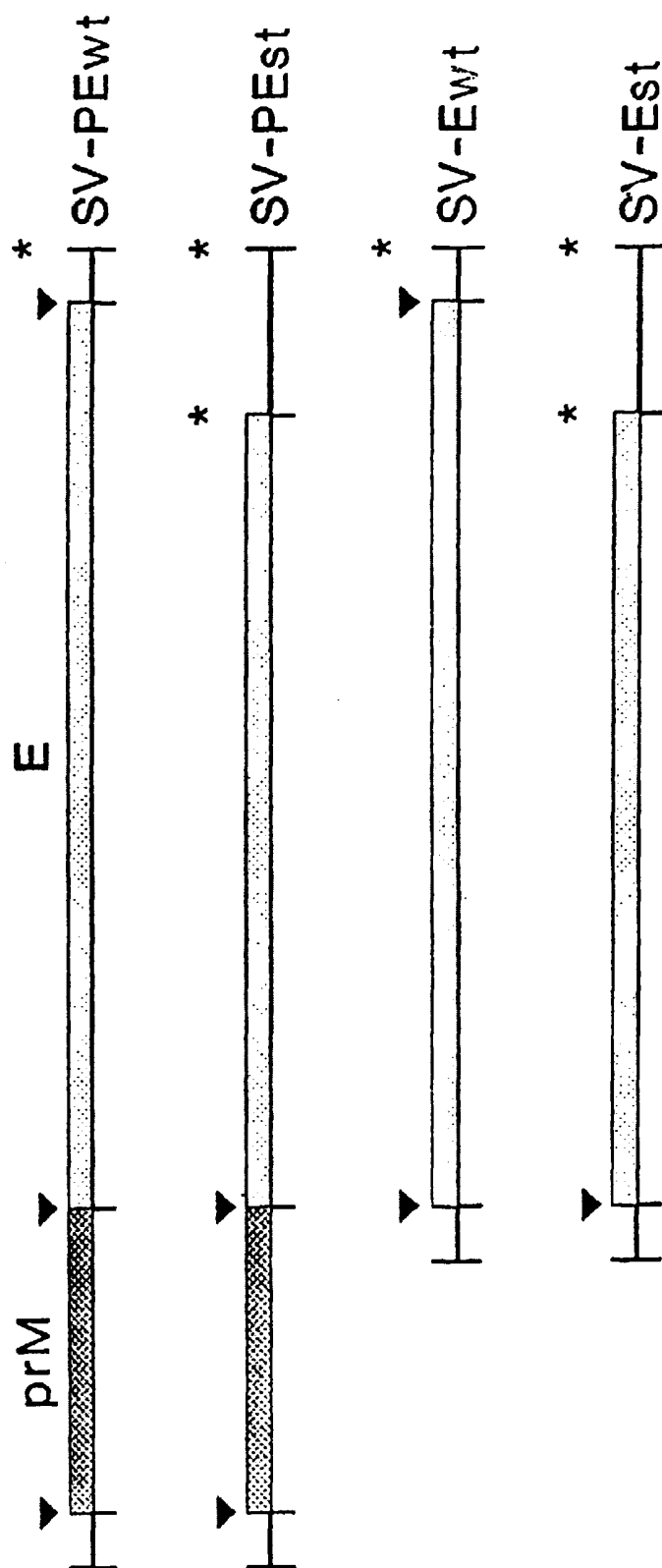
11. A 6–10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a proteinek kifejeződése és a partikulák képződése folyamatosan megy végbe.

12. Nem fertőző szubvirális partikulák – amelyek lényegében az E-protein teljes natív formáját és adott esetben a prM/M proteint tartalmazzák, amely proteineket a TBE-vírusból származtattuk – felhasználása TBE-vírus-fertőzések elleni aktív immunizálásra alkalmas vakcina előállítására.

13. A 12. igénypont szerinti felhasználás, *azzal jellemezve*, hogy az E-protein és adott esetben a prM/M protein rekombináns proteinek.

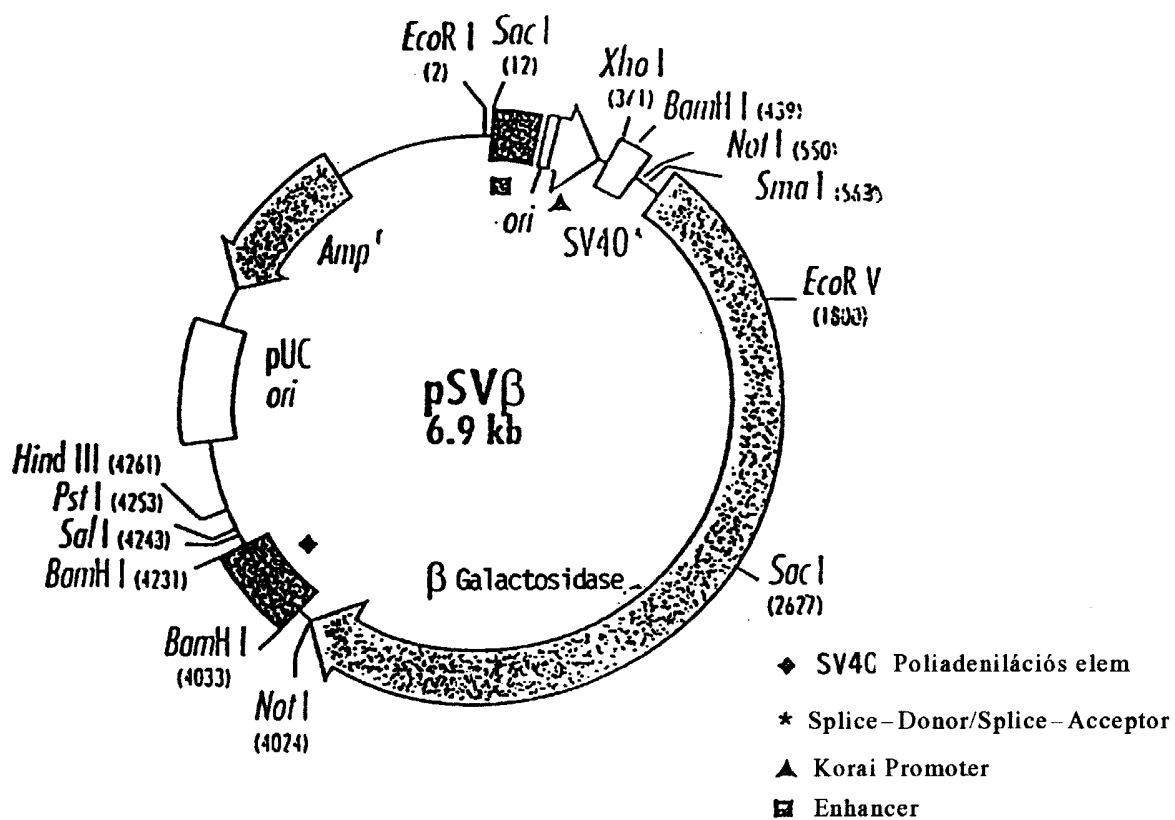
14. Nem fertőző szubvirális partikulák – amelyek lényegében az E-protein teljes natív formáját és adott esetben a prM/M proteint tartalmazzák, amely proteineket a TBE-vírusból származtattuk – felhasználása anti-TBE-vírus immunglobulin készítmény előállítására.

15. A 14. igénypont szerinti felhasználás, *azzal jellemezve*, hogy az E-protein és adott esetben a prM/M protein rekombináns proteinek.



★ Stop-Codon ▼ Signalase-hely

1. ábra



2. ábra

3a. ábra

	ATG	GTT	GGC	TTG	CAA	AAA	CGT	GGG	AAA	AGG	AGG	TCA	GCG	ACG	GAC	432			
	MET	Val	Gly	Leu	Gln	Lys	Arg	Gly	Lys	Arg	Arg	Ser	Ala	Thr	Asp	C100			
433	TGG	ATG	AGC	TGG	TTG	CTG	GTC	ATC	ACT	CTG	TTG	GGG	ATG	ACG	CTT	GCT	480		
C101	Trp	Met	Ser	Trp	Leu	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Leu	Gly	Met	Thr	Leu	Ala	C116		
481	→prM																		
p1	GCA	ACG	GTG	AGG	AAA	GAA	AGG	GAT	GGC	TCA	ACT	GTG	ATC	AGA	GCT	GAA	528		
	Ala	Thr	Val	Arg	Lys	Glu	Arg	Asp	Gly	Ser	Thr	Val	Ile	Arg	Ala	Glu	p16		
529	GGA	AAG	GAT	GCA	GCA	ACT	CAG	GTG	CGT	GTG	GAG	AAT	GGC	ACC	TGT	GTG	576		
p17	Gly	Lys	Asp	Ala	Ala	Thr	Gln	Val	Arg	Val	Glu	Asn	Gly	Thr	Cys	Val	p32		
577	ATC	CTG	GCT	ACT	GAC	ATG	GGG	TCA	TGG	TGT	GAT	GAT	TCA	CTG	TCC	TAT	624		
p33	Ile	Leu	Ala	Thr	Asp	Met	Gly	Ser	Trp	Cys	Asp	Asp	Ser	Leu	Ser	Tyr	p48		
625	GAG	TGT	GTG	ACC	ATA	GAT	CAA	GGA	GAA	GAG	CCT	GTT	GAC	GTG	GAT	TGT	672		
p49	Glu	Cys	Val	Thr	Ile	Asp	Gln	Gly	Glu	Glu	Pro	Val	Asp	Val	Asp	Cys	p64		
673	TTT	TGC	CGG	AAC	GTT	GAT	GGA	GTC	TAT	CTG	GAG	TAC	GGA	CGC	TGT	GGG	720		
p65	Phe	Cys	Arg	Asn	Val	Asp	Gly	Val	Tyr	Leu	Glu	Tyr	Gly	Arg	Cys	Gly	p80		
721	AAA	CAG	GAA	GGC	TCA	CGG	ACA	AGG	CGC	→M		TCA	GTG	CTG	ATC	CCA	TCC	CAT	768
p81	Lys	Gln	Glu	Gly	Ser	Arg	Thr	Arg	Arg	Ser	Val	Leu	Ile	Pro	Ser	His	p96		
769	GCT	CAG	GGA	GAG	CTG	ACG	GGA	AGG	GGA	CAC	AAA	TGG	CTA	GAA	GGA	GAC	816		
p97	Ala	Gln	Gly	Glu	Leu	Thr	Gly	Arg	Gly	His	Lys	Trp	Leu	Glu	Gly	Asp	p112		
817	TCG	CTG	CGA	ACA	CAC	CTT	ACT	AGA	GTT	GAG	GGA	TGG	GTC	TGG	AAG	AAC	864		
p113	Ser	Leu	Arg	Thr	His	Leu	Thr	Arg	Val	Glu	Gly	Trp	Val	Trp	Lys	Asn	p128		
865	AAG	CTA	CTT	GCC	TTG	GCA	ATG	GTT	ACC	GTT	GTG	TGG	TTG	ACC	CTG	GAG	912		
p129	Lys	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Met	Val	Thr	Val	Val	Trp	Leu	Thr	Leu	Glu	p144		
913	AGT	GTG	GTG	ACC	AGG	GTC	GCC	GTT	CTT	GTT	GTG	CTC	CTG	TGT	TTG	GCA	960		
p145	Ser	Val	Val	Thr	Arg	Val	Ala	Val	Leu	Val	Val	Leu	Leu	Cys	Leu	Ala	p160		
961	CCG	GTT	TAC	GCT	→E		TCG	CGT	TGC	ACA	CAC	TTG	GAA	AAC	AGG	GAC	TTT	GTG	1008
p161	Pro	Val	Tyr	Ala	Ser	Arg	Cys	Thr	His	Leu	Glu	Asn	Arg	Asp	Phe	Val	E12		
1009	ACT	GGT	ACT	CAG	GGG	ACT	ACG	AGG	GTC	ACC	TTG	GTG	CTG	GAA	CTG	GGT	1056		
E13	Thr	Gly	Thr	Gln	Gly	Thr	Thr	Arg	Val	Thr	Leu	Val	Leu	Glu	Leu	Gly	E28		
1057	GGA	TGT	GTT	ACT	ATA	ACA	GCT	GAG	GGG	AAG	CCT	TCA	ATG	GAT	GTG	TGG	1104		
E29	Gly	Cys	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Glu	Gly	Lys	Pro	Ser	Met	Asp	Val	Trp	E44		
1105	CTT	GAC	GCC	ATT	TAC	CAG	GAG	AAC	CCT	GCT	AAG	ACA	CGT	GAG	TAC	TGT	1152		
E45	Leu	Asp	Ala	Ile	Tyr	Gln	Glu	Asn	Pro	Ala	Lys	Thr	Arg	Glu	Tyr	Cys	E60		
1153	TTA	CAC	GCC	AAG	TTG	TCG	GAC	ACT	AAG	GTT	GCA	GCC	AGA	TGC	CCA	ACA	1200		
E61	Leu	His	Ala	Lys	Leu	Ser	Asp	Thr	Lys	Val	Ala	Ala	Arg	Cys	Pro	Thr	E76		
1201	ATG	GGA	CCA	GCC	ACT	TTG	GCT	GAA	GAA	CAC	CAG	GGT	GGT	ACA	GTG	TGT	1248		
E77	Met	Gly	Pro	Ala	Thr	Leu	Ala	Glu	Glu	His	Gln	Gly	Gly	Thr	Val	Cys	E92		
1249	AAG	AGA	GAT	CAG	AGT	GAT	CGA	GGC	TGG	GGC	AAC	CAC	TGT	GGA	CTG	TTT	1296		
E93	Lys	Arg	Asp	Gln	Ser	Asp	Arg	Gly	Trp	Gly	Asn	His	Cys	Gly	Leu	Phe	E108		

(folytatás a 3b. ábrán)

3b. ábra

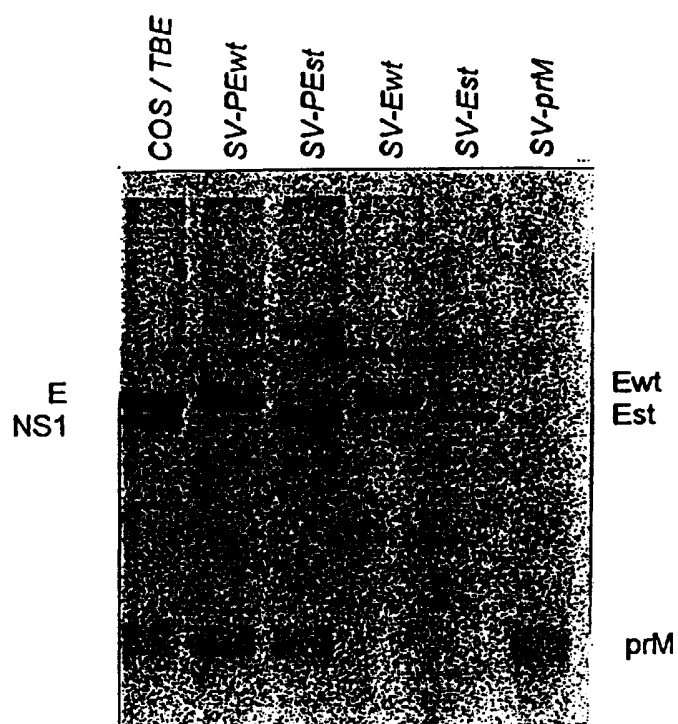
1297	GGA	AAG	GGT	AGC	ATT	GTG	GCC	TGT	GTC	AAG	GCG	GCT	TGT	GAG	GCA	AAA	1344
E109	Gly	Lys	Gly	Ser	Ile	Val	Ala	Cys	Val	Lys	Ala	Ala	Cys	Glu	Ala	Lys	E124
1345	AAG	AAA	GCC	ACA	GGA	CAT	GTG	TAC	GAC	GCC	AAC	AAA	ATA	GTG	TAC	ACG	1392
E125	Lys	Lys	Ala	Thr	Gly	His	Val	Tyr	Asp	Ala	Asn	Lys	Ile	Val	Tyr	Thr	E140
1393	GTC	AAA	GTC	GAA	CCA	CAC	ACG	GGA	GAC	TAT	GTT	GCC	GCA	AAC	GAG	ACA	1440
E141	Val	Lys	Val	Glu	Pro	His	Thr	Gly	Asp	Tyr	Val	Ala	Ala	Asn_Glu_Thr			E156
1441	CAT	AGT	GGG	AGG	AAG	ACG	GCA	TCC	TTC	ACA	ATT	TCT	TCA	GAG	AAA	ACC	1488
E157	His	Ser	Gly	Arg	Lys	Thr	Ala	Ser	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Glu	Lys	Thr	E172
1489	ATT	TTG	ACT	ATG	GGT	GAG	TAT	GGA	GAT	GTG	TCT	TTG	TTG	TGC	AGG	GTC	1536
E173	Ile	Leu	Thr	Met	Gly	Glu	Tyr	Gly	Asp	Val	Ser	Leu	Leu	Cys	Arg	Val	E188
1537	GCT	AGT	GGC	GTT	GAC	TTG	GCC	CAG	ACC	GTC	ATC	CTT	GAG	CTT	GAC	AAG	1584
E189	Ala	Ser	Gly	Val	Asp	Leu	Ala	Gln	Thr	Val	Ile	Leu	Glu	Leu	Asp	Lys	E204
1585	ACA	GTG	GAA	CAC	CTT	CCA	ACG	GCT	TGG	CAG	GTC	CAT	AGG	GAC	TGG	TTC	1632
E205	Thr	Val	Glu	His	Leu	Pro	Thr	Ala	Trp	Gln	Val	His	Arg	Asp	Trp	Phe	E220
1633	AAT	GAT	CTG	GCT	CTG	CCA	TGG	AAA	CAT	GAG	GGA	GCG	CAA	AAC	TGG	AAC	1680
E221	Asn	Asp	Leu	Ala	Leu	Pro	Trp	Lys	His	Glu	Gly	Ala	Gln	Asn	Trp	Asn	E236
1681	AAC	GCA	GAA	AGA	CTG	GTT	GAA	TTT	GGG	GCT	CCT	CAC	GCT	GTC	AAG	ATG	1728
E237	Asn	Ala	Glu	Arg	Leu	Val	Glu	Phe	Gly	Ala	Pro	His	Ala	Val	Lys	Met	E252
1729	GAC	GTG	TAC	AAC	CTC	GGA	GAC	CAG	ACT	GGA	GTG	TTA	CTG	AAG	GCT	CTC	1776
E253	Asp	Val	Tyr	Asn	Leu	Gly	Asp	Gln	Thr	Gly	Val	Leu	Leu	Lys	Ala	Leu	E268
1777	GCT	GGG	GTT	CCT	GTG	GCA	CAC	ATT	GAG	GGA	ACC	AAG	TAC	CAC	CTG	AAG	1824
E269	Ala	Gly	Val	Pro	Val	Ala	His	Ile	Glu	Gly	Thr	Lys	Tyr	His	Leu	Lys	E284
1825	AGT	GGC	CAC	GTG	ACC	TGC	GAA	GTG	GGA	CTG	GAA	AAA	CTG	AAG	ATG	AAA	1872
E285	Ser	Gly	His	Val	Thr	Cys	Glu	Val	Gly	Leu	Glu	Lys	Leu	Lys	Met	Lys	E300
1873	GGT	CTT	ACG	TAC	ACA	ATG	TGT	GAC	AAA	ACA	AAG	TTC	ACA	TGG	AAG	AGA	1920
E301	Gly	Leu	Thr	Tyr	Thr	Met	Cys	Asp	Lys	Thr	Lys	Phe	Thr	Trp	Lys	Arg	E316
1921	GCT	CCA	ACA	GAC	AGT	GGG	CAT	GAT	ACA	GTG	GTC	ATG	GAA	GTC	ACA	TTC	1968
E317	Ala	Pro	Thr	Asp	Ser	Gly	His	Asp	Thr	Val	Val	Met	Glu	Val	Thr	Phe	E332
1969	TCT	GGA	ACA	AAG	CCC	TGT	AGG	ATC	CCA	GTC	AGG	GCA	GTG	GCA	CAT	GGA	2016
E333	Ser	Gly	Thr	Lys	Pro	Cys	Arg	Ile	Pro	Val	Arg	Ala	Val	Ala	His	Gly	E348
2017	TCT	CCA	GAT	GTG	AAC	GTG	GCC	ATG	CTG	ATA	ACG	CCA	AAC	CCA	ACA	ATT	2064
E349	Ser	Pro	Asp	Val	Asn	Val	Ala	Met	Leu	Ile	Thr	Pro	Asn	Pro	Thr	Ile	E364
2065	GAA	AAC	AAT	GGA	GGT	GGC	TTC	ATA	GAG	ATG	CAG	CTG	CCC	CCA	GGG	GAT	2112
E365	Glu	Asn	Asn	Gly	Gly	Gly	Phe	Ile	Glu	Met	Gln	Leu	Pro	Pro	Gly	Asp	E380
2113	AAC	ATC	ATC	TAT	GTT	GGG	GAA	CTG	AGT	CAT	CAA	TGG	TTC	CAA	AAA	GGG	2160
E381	Asn	Ile	Ile	Tyr	Val	Gly	Glu	Leu	Ser	His	Gln	Trp	Phe	Gln	Lys	Gly	E396
2161	AGC	AGC	ATC	GGA	AGG	GTT	TTC	CAA	AAG	ACC	AAG	AAA	GGC	ATA	GAA	AGA	2208
E397	Ser	Ser	Ile	Gly	Arg	Val	Phe	Gln	Lys	Thr	Lys	Lys	Gly	Ile	Glu	Arg	E412

(folytatás a 3c. ábrán)

2209	CTG	ACA	GTG	ATA	GGA	GAG	CAC	GCC	TGG	GAC	TTC	GGT	TCT	GCT	GGA	GGC	2256
E413	Leu	Thr	Val	Ile	Gly	Glu	His	Ala	Trp	Asp	Phe	Gly	Ser	Ala	Gly	Gly	E428
2257	TTT	CTG	AGT	TCA	ATT	GGG	AAG	GCG	GTA	CAT	ACG	GTC	CTT	GGT	GGC	GCT	2304
E429	Phe	Leu	Ser	Ser	Ile	Gly	Lys	Ala	Val	His	Thr	Val	Leu	Gly	Gly	Ala	E444
2305	TTC	AAC	AGC	ATC	TTC	GGG	GGA	GTG	GGG	TTT	CTA	CCA	AAA	CTT	TTA	TTA	2352
E445	Phe	Asn	Ser	Ile	Phe	Gly	Gly	Val	Gly	Phe	Leu	Pro	Lys	Leu	Leu	Leu	E460
2353	GGA	GTG	GCA	TTG	GCT	TGG	TTG	GGC	CTG	AAC	ATG	AGA	AAC	CCT	ACA	ATG	2400
E461	Gly	Val	Ala	Leu	Ala	Trp	Leu	Gly	Leu	Asn	Met	Arg	Asn	Pro	Thr	Met	E476
2401	TCC	ATG	AGC	TTT	CTC	TTG	GCT	GGA	GGT	CTG	GTC	TTG	GCC	ATG	ACC	CTT	2448
E477	Ser	Met	Ser	Phe	Leu	Leu	Ala	Gly	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Met	Thr	Leu	E492
2449	GGA	GTG	GGG	GCG	→NS1 GAT GTT GGT		TGC	GCT	GTG	GAC	ACG	GAA	CGA	ATG	GAG		2496
E493	Gly	Val	Gly	Ala	Asp	Val	Gly	Cys	Ala	Val	Asp	Thr	Glu	Arg	Met	Glu	N12
2497	CTC	CGC	TGT	GGC	GAG	GGC	CTG	GTC	GTG	TGG	AGA	GAG	GTC	TCA	GAA	TGG	2544
N13	Leu	Arg	Cys	Gly	Glu	Gly	Leu	Val	Val	Trp	Arg	Glu	Val	Ser	Glu	Trp	N28
2545	TAT	GAC	TAG	CGGCCGCGGGGATCC													
N29	Tyr	Asp	*														

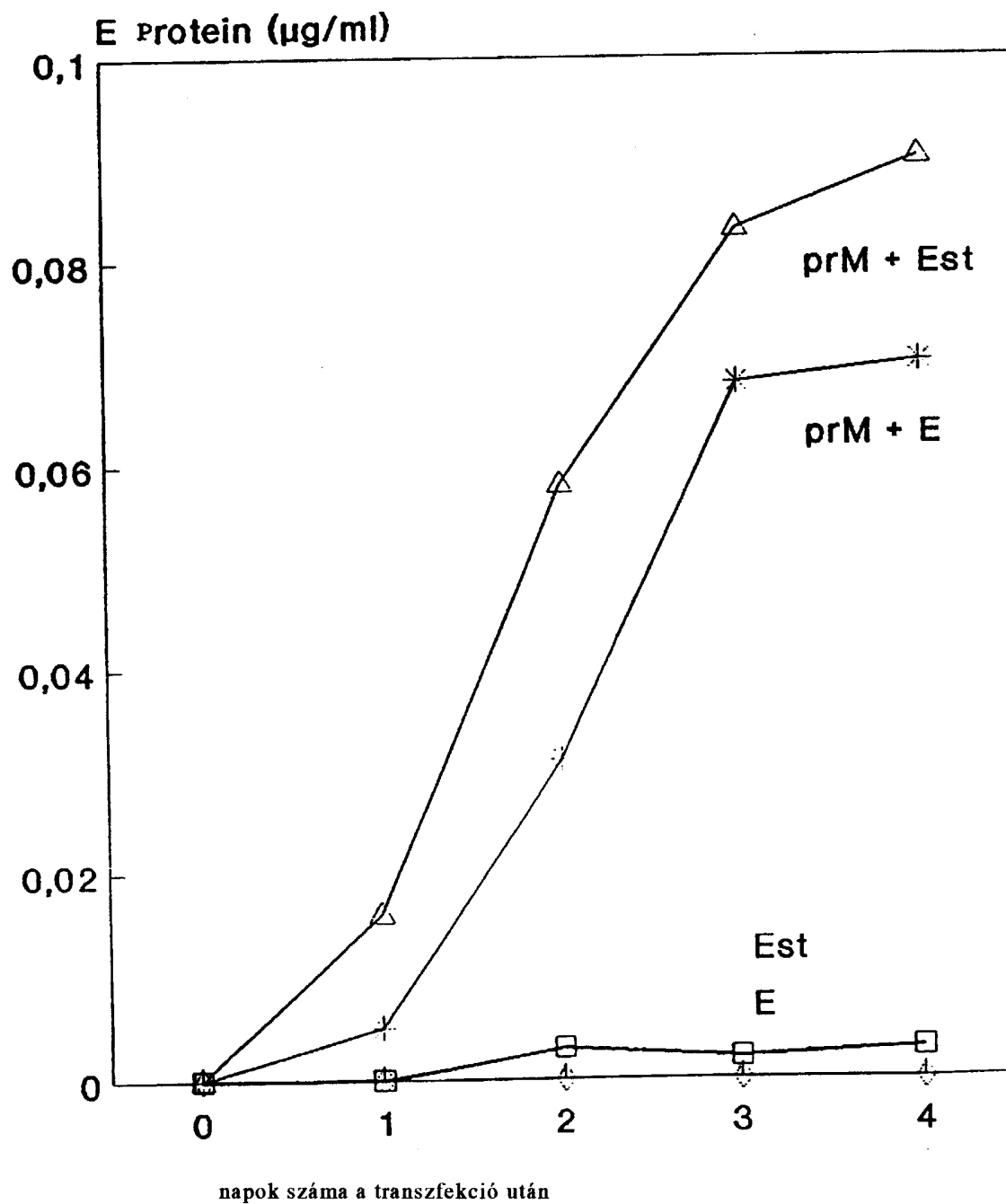
3c. ábra

Immunprecipitáció Triton X-100 szolubilizált sejtizátumokból



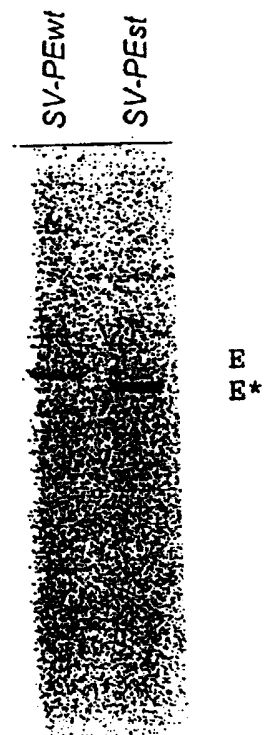
4. ábra

Transzfektált COS-sejtek E-protein szekréciója



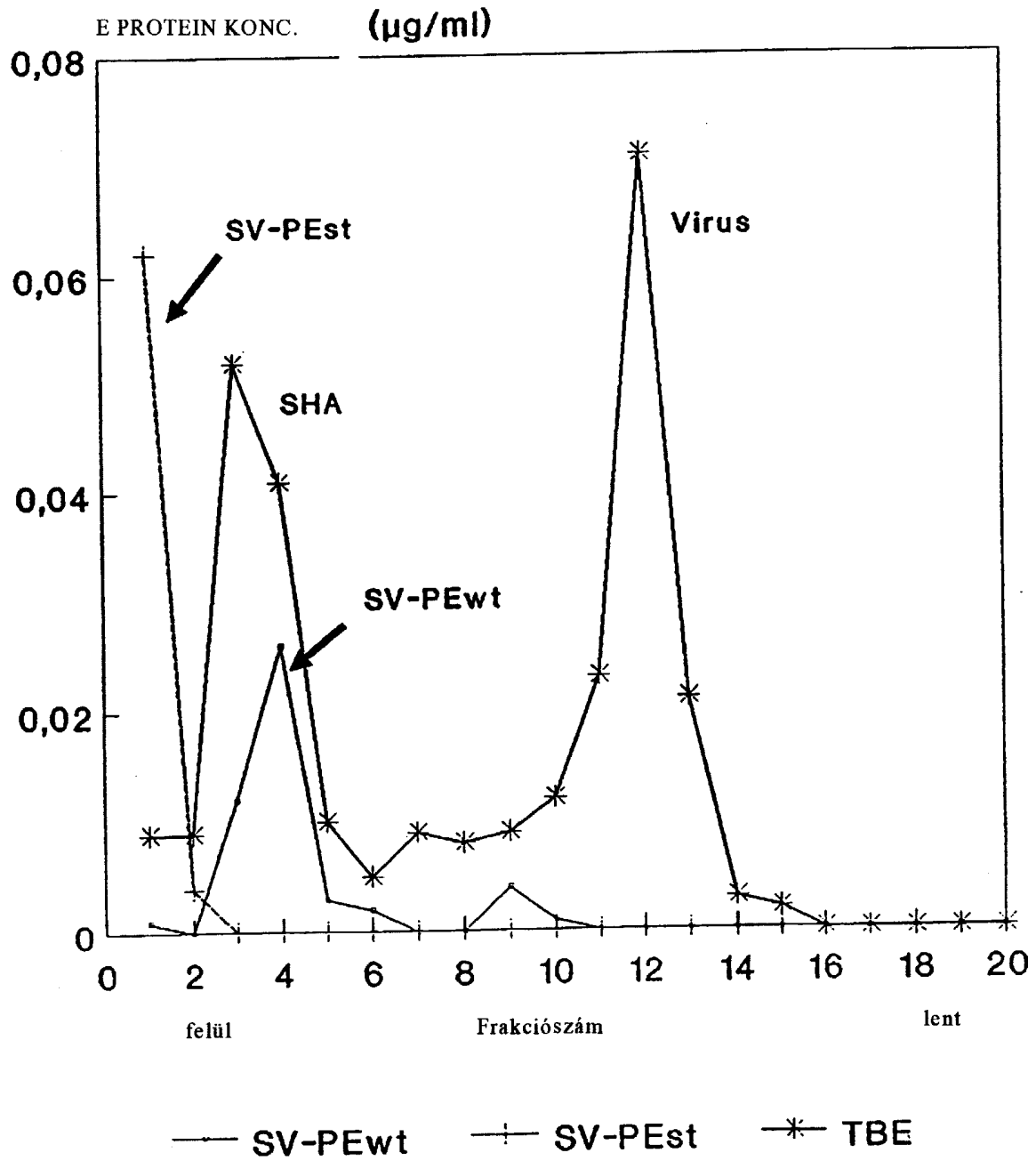
5. ábra

**Sejtkulturák felülszóiából ülepített TBE-vírus fehérjék
immunprecipitációs mintázata**

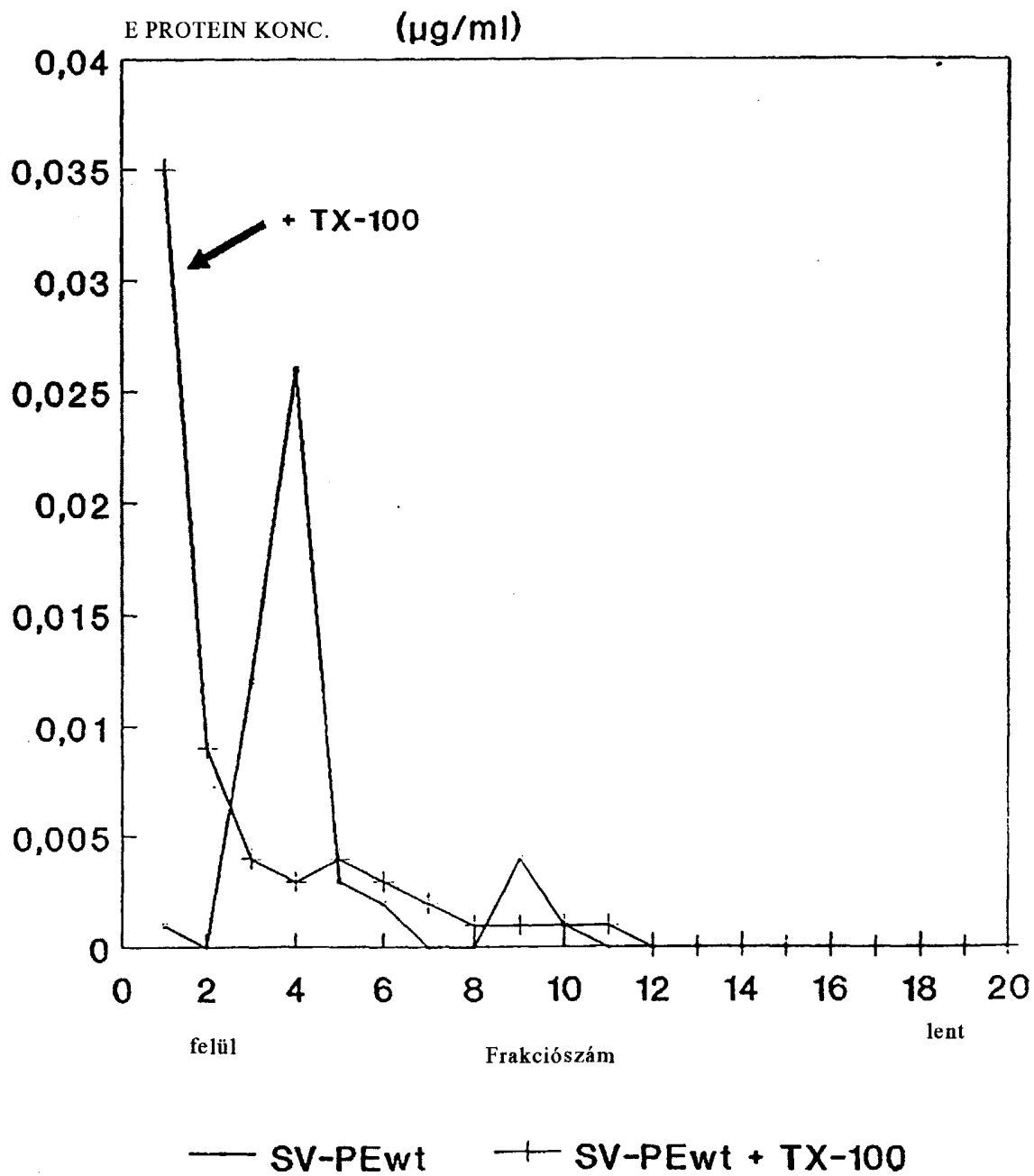


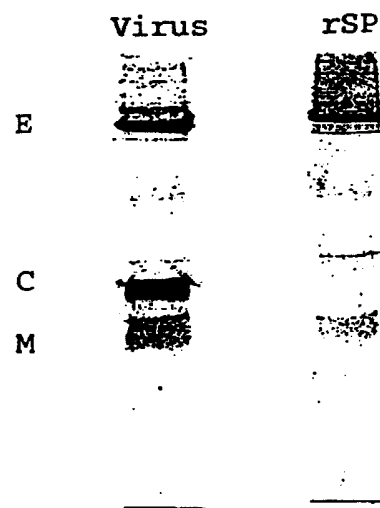
6. ábra

Extracelluláris E-protein szedimentációs analízise

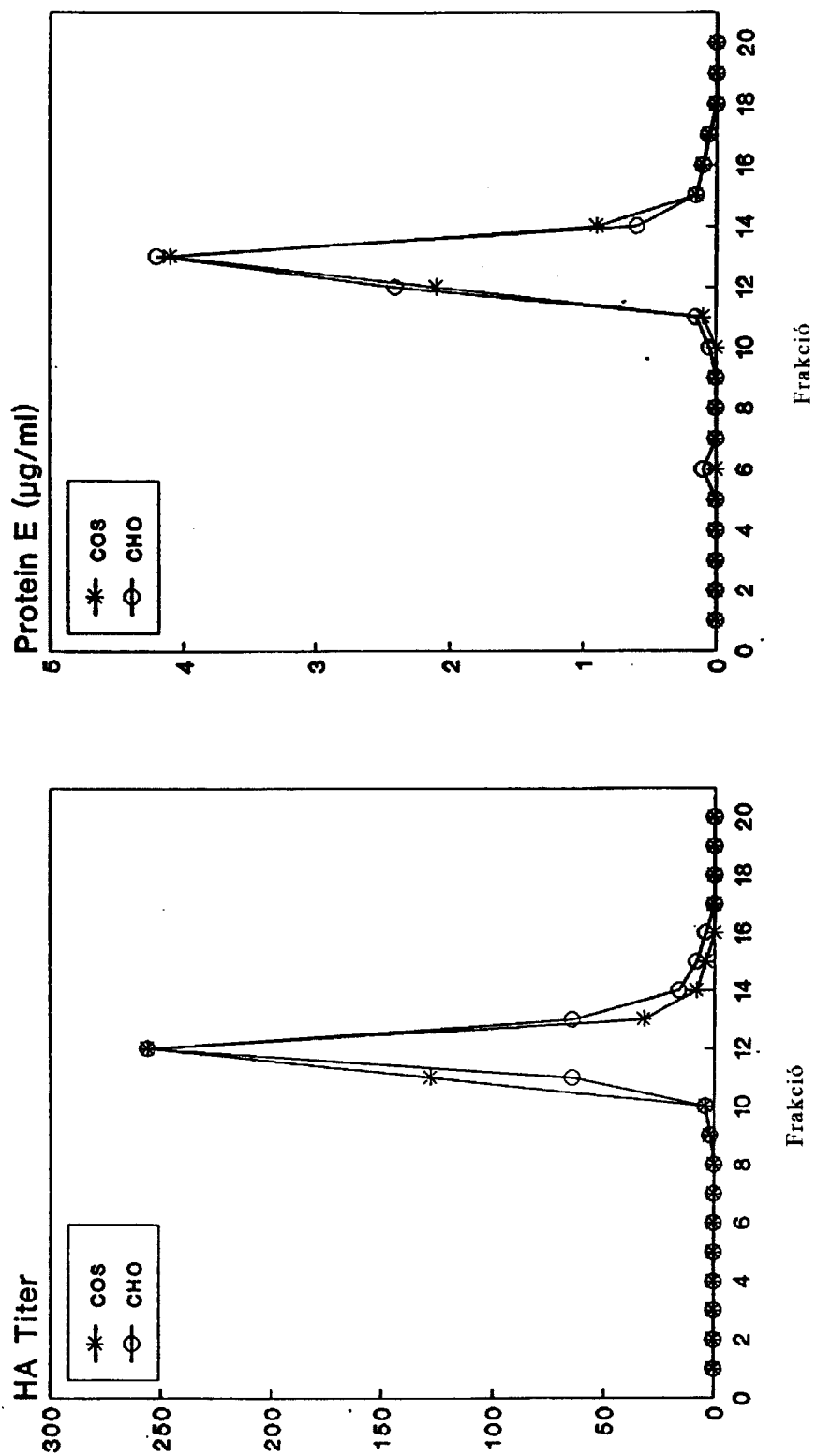


Extracelluláris E-protein szedimentációs analízise

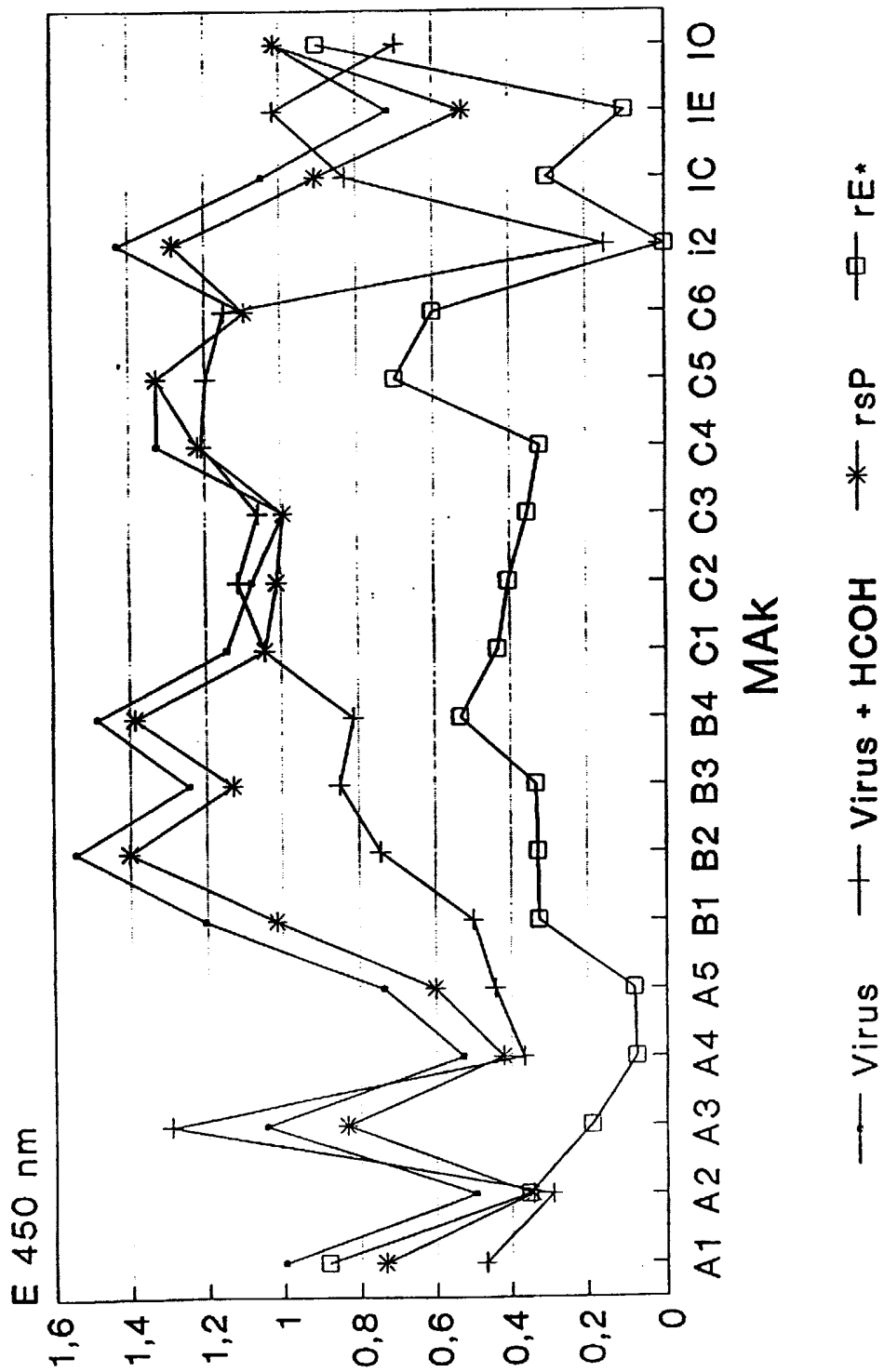




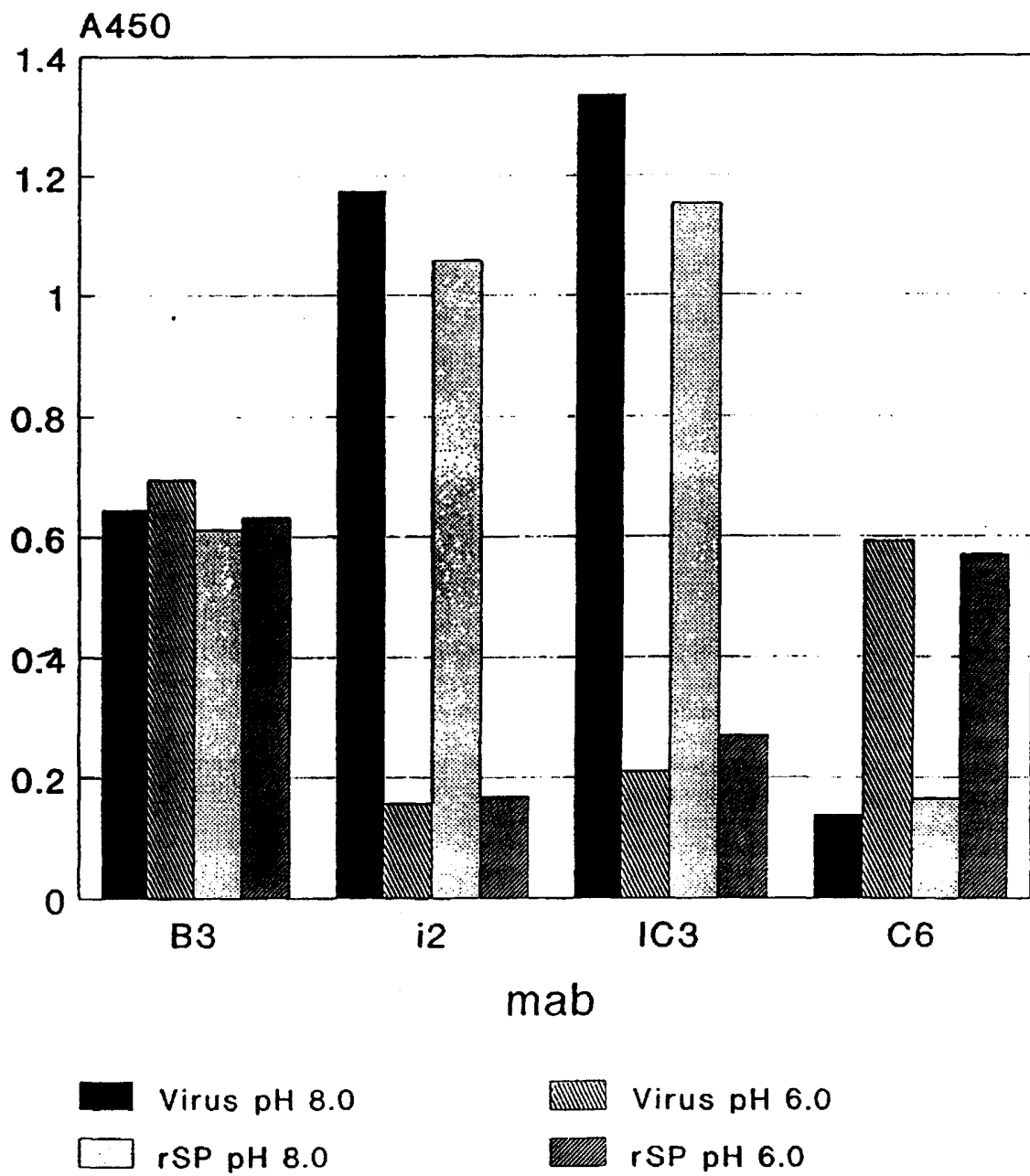
9. ábra



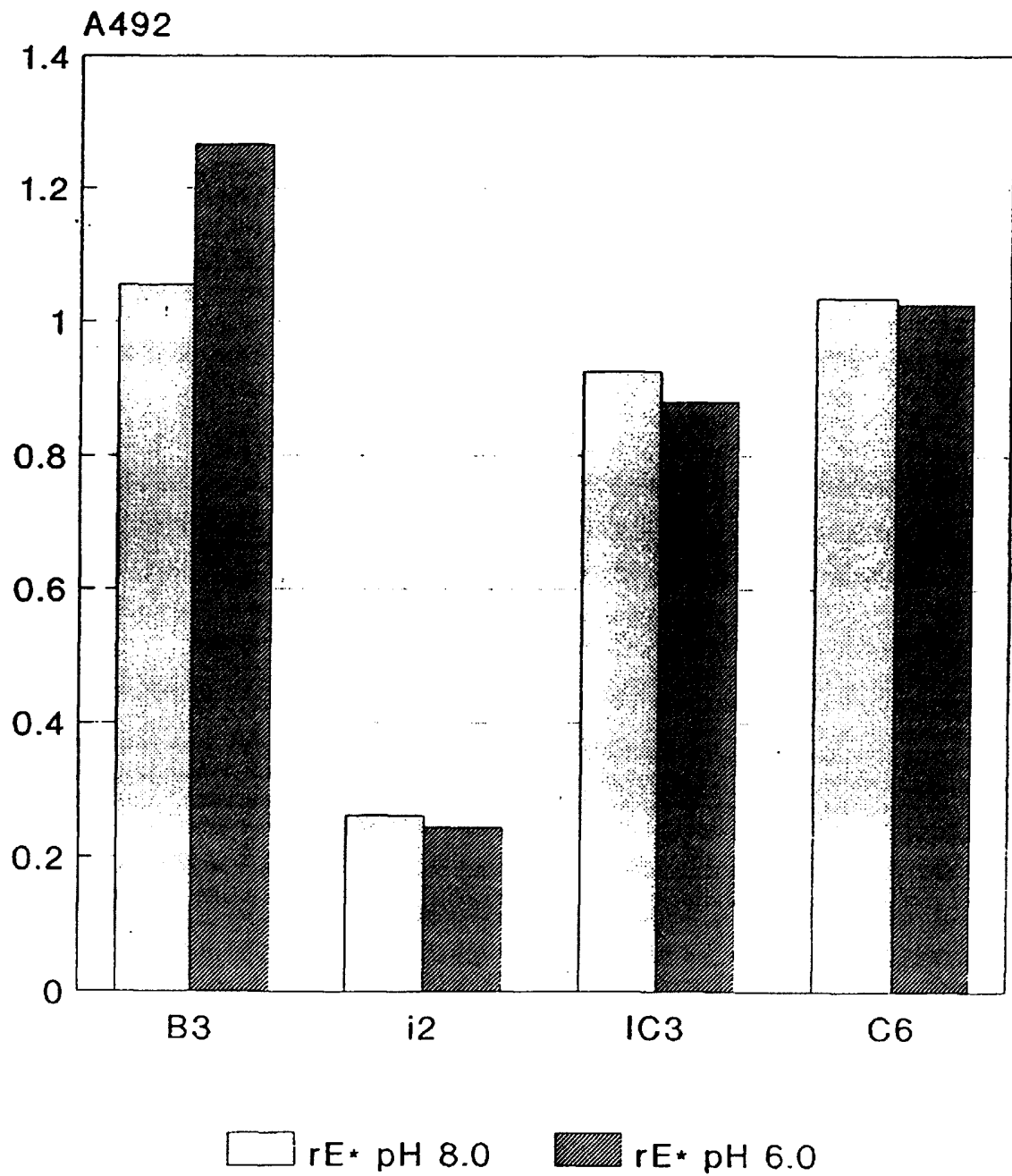
10. ábra



11. ábra



12. ábra



13. ábra