



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 17 129 T2 2007.10.31**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 418 180 B1**
 (21) Deutsches Aktenzeichen: **602 17 129.6**
 (86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CU02/00006**
 (96) Europäisches Aktenzeichen: **02 760 073.3**
 (87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/008571**
 (86) PCT-Anmeldetag: **12.07.2002**
 (87) Veröffentlichungstag
 der PCT-Anmeldung: **30.01.2003**
 (97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.05.2004**
 (97) Veröffentlichungstag
 der Patenterteilung beim EPA: **27.12.2006**
 (47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **31.10.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 14/18 (2006.01)**
C12N 15/40 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
17201 16.07.2001 CU

(73) Patentinhaber:
Centro de Ingenieria Genetica y Biotecnologia (CIGB), Ciudad de la Habana, CU; Instituto de Medicina Tropical "Pedrokouri", Ciudad de la Habana, CU

(74) Vertreter:
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR

(72) Erfinder:
HERMIDA CRUZ, Lisset, 11000 Ciudad de La Habana, CU; RODRIGUEZ DIAZ, Rayner; , 17100 Ciudad de La Habana, CU; LAZO VAZQUEZ, Laura, 10700 Ciudad de La Habana, CU; ZULUETA MORALES, Aida, 17200 Ciudad de La Habana, CU; LOPEZ ABARRATEGUI, Carlos, 11800 Ciudad de La Habana, CU; VALDES PRADO, Iris, 10700 Ciudad de La Habana, CU; SILVA RODRIGUEZ, Ricardo de la C., 10600 Ciudad de La Habana, CU; CHINEA SANTIAGO, Glay, 10600 Ciudad de La Habana, CU; GUILLEN NIETO, Gerardo Enrique, 10600 Ciudad de La Habana, CU; GUZMAN TIRADO, Maria Guadalupe, 11300 Ciudad de La Habana, CU; SIERRA VAZQUEZ, Beatriz de la Caridad, 17100 Ciudad de La Habana, CU; ESPINOSA PEREZ, Raul Rafael, 12500 Ciudad de La Habana, CU

(54) Bezeichnung: **CHIMÄRISCHE NUKLEINSÄUREN KODIEREND FÜR PROTEINE, DIE EFFEKTE GEGEN VIREN INDUZIEREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Fachgebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das Fachgebiet der Biotechnologie und der pharmazeutischen Industrie, insbesondere das Erhalten chimärer Nucleotidketten, die, wenn sie in einen Expressionsvektor eingeführt werden, Proteine hervorbringen, die in der Lage sind, eine Serotyp-spezifische humorale Immunantwort und einen Schutz gegen eine Infektion mit dem Dengue-Virus, von jetzt an als DEN bezeichnet, zu induzieren, wobei die Effekte der Serotyp-spezifischen viralen Immunamplifikation vermieden werden, welche Blutungen und klinische Komplikationen verursachen, die bei dieser Art von pathologischen Befunden beschrieben werden.

Stand der Technik

[0002] Das Dengue-Virus (DEN) ist ein Virus mit Hüllmembran, dessen Lipidmembran zwei seiner drei Strukturproteine enthält: das Hüllprotein (E) und das Membranprotein (M). Das E-Protein bedeckt ein ikosaederförmiges Nucleokapsid, das aus dem dritten seiner Strukturproteine, dem „Core“-Protein, besteht. Das Virus gehört zur Familie Flaviviridae, und es liegen vier unterschiedliche Serotypen vor. Seine Übertragung auf den Menschen erfolgt über die Stechmücke *Aedes aegypti*, die zur Familie Stegomyia gehört. Die im Menschen durch dieses Virus verursachte Krankheit wurde als gutartig angesehen und als Dengue-Fieber oder klassisches Dengue (DF) beschrieben, bis eine ernstere und manchmal tödlich verlaufende Form auftrat, die durch hämorrhagisches Fieber und Schock gekennzeichnet ist und als Dengue-hämorrhagisches Fieber und Dengue-Schock-Syndrom (DHF, DSS) bezeichnet wird (Hammon, W. Mc., New hemorrhagic fever in children in the Philippines and Thailand, *Trans. Assoc. Physicians* 1960, 73: 140–155). Mehrere epidemiologische Studien wurden durchgeführt, die deutlich machten, dass die wiederholte Infektion mit zwei unterschiedlichen Virus-Serotypen einen Risikofaktor darstellt (Kouri, G. P., Guzmán, M. G., Brave, J. R., Why dengue hemorrhagic fever in Cuba, 2, An integral analysis, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1987, 72: 821–823). Dieses Phänomen lässt sich durch die Immunverstärkung erklären, die auf einer Zunahme der Virusinfektion beruht, wobei das Eindringen des Virus-Antikörper-Komplexes in die Zelle über die Fc-Rezeptoren der Zielzelle (Monocyten) gesteigert wird (Halstead, S. B., Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology, *Science* 1988, 239: 476–481).

[0003] Verschiedene Verfahren wurden entwickelt, um lebende abgeschwächte Impfstoffe herzustellen, jedoch gibt es zurzeit zahlreiche ungelöste Probleme bezüglich der möglichen Vorteile dieser Impfstoffe, da sie wieder virulent werden könnten, da eine Virusinterferenz auftreten könnte und da es zu einer intergenomischen Rekombination kommen könnte. Andererseits können rekombinante Antigene hergestellt werden und als mögliche Bestandteile eines Untereinheit-Impfstoffs dienen (Feighny, R., Burrous, J., und Putnak, R., Dengue type-2 virus envelope protein made using recombinant baculovirus protects mice against virus challenge, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994, 50 (3): 322–328; Deubel, V., Staropoli, I., Megret, F., et al., Affinity-purified dengue-2 virus envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice, *Vaccine* 1997, 15: 1946–1954).

[0004] Das Hauptantigen des Virus ist das Hüllprotein DENE. Dieses Protein ist die Hauptkomponente der Virusoberfläche, und es wird angenommen, dass es die Bindung des Virus an den zellulären Rezeptor vermittelt (A. Heinz, F. X., Berge, R., Tuma, W., et al., A topological and functional model of epitopes on the structural glycoprotein of tickborne encephalitis virus defined by monoclonal antibodies, *Virology* 1983, 126: 525). Dieses Protein zeigt eine strukturelle Homologie mit demjenigen des Zeckenenzephalitis-Virus (TBE) (Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., et al., The envelope glycoprotein from tick borne encephalitis virus at 2 Å resolution, *Nature* 1995, 375: 291–298), und außerdem ist es unter den Serotypen strukturell konserviert.

[0005] Insektenzellen stellen eines der Systeme dar, die für die Expression unterschiedlicher heterologer Gene am häufigsten verwendet werden, wenn Vektoren des Baculovirus-Systems eingesetzt werden. Diese Vektoren wurden für die Expression mehrerer Kombinationen von Struktur- und Nicht-Strukturproteinen des Japanischen Enzephalitis-Virus (JEV), DEN-1, DEN-2 und DEN-4 verwendet (Matsuura, Y., Miyamoto, M., Soto, T., et al., Characterization of japanese encephalitis virus envelope protein expressed by recombinant baculoviruses, *Virology* 1989, 173: 677–682; Deubel, V., Bordier, M., Megret, F., et al., Processing, secretion and immunoreactivity of carboxy terminally truncated dengue-2 envelope proteins expressed in insect cells by recombinant baculoviruses, *Virology* 1991, 180: 440–447; Putnak, R., Feighny, R., Burrous, J., et al., Dengue 1 virus envelope glycoprotein gene expressed in recombinant baculovirus elicit virus neutralization antibodies in mice and protects them from virus challenge, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991, 45: 159–167; Feighny, R., Burrous,

J., Putnak, R., Dengue type 2 virus envelope protein made using recombinant baculovirus protects mice against virus challenge, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994, 50: 322–328). Ein anderes System, das verwendet wurde, waren die Zellen von *Drosophila melanogaster*, die verschiedene Varianten des E-Proteins exprimierten (PCT/US96/07627). Zwar wurde bei Verwendung der in diesen Systemen exprimierten Proteine eine geeignete funktionelle Antwort erhalten, jedoch sind hiermit hohe Kosten für die Entwicklung von Produktionsprozessen im großen Maßstab verbunden; deshalb stellte die Expression in Hefe eine Alternative für das Herstellen von rekombinanten Strukturproteinen von Flavivirus dar. Jedoch sind im Fall des DENE-Proteins, das in *Pichia pastoris* exprimiert wird (PCT/US96/07627; Sugrue, R. J., Fu, H., Howe, J., Chan, Y., Expression of the Dengue virus structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles, *J. Virol.* 1997, 78: 1861–1866), die Expressionsraten niedrig, wobei es entweder ausgeschieden wird oder intrazellulär vorliegt, wodurch der Reinigungsprozess behindert wird.

[0006] Parallel dazu wurden mehrere Varianten des DENE-Proteins in Bakterien erhalten. Eine von ihnen war der C-terminale Teil des E-Proteins des JEV, fusioniert an ein Protein des Tryptophan-Stoffwechsels (TrpE) von *E. coli*. Dieses Protein wurde als Einschlusskörper hergestellt und bei Verwendung von immunologischen Nachweisverfahren durch neutralisierende monoclonale Antikörper (mAbs) erkannt. Jedoch waren reine Präparate dieses Proteins nicht in der Lage, neutralisierende Antikörper zu entwickeln und vor einer Infektion durch Viren zu schützen (Mason, P. W., Zogel, M. V., Semproni, A. R., et al., The antigenic structure of dengue type 1 virus envelope and NS1 protein expressed in *E. coli*, *J. Gen. Virol.* 1990, 71: 2107–2114). Außerdem wurde eine weitere Konstruktion hergestellt (Srivastava, A. K., Morita, K., Matsuo, S., et al., Japanese encephalitis virus fusion protein with protein A expressed in *E. coli* confers protection in mice, *Microbiol. Immunol.* 1991, 35: 863–870), die das Protein A von *Staphylococcus aureus* enthält, fusioniert an das C-terminale Fragment des E-Proteins, gefolgt von dem N-terminalen Segment des Nicht-Strukturproteins des JEV, des NS1. In diesem Fall war das fusionierte Protein löslich, wodurch seine Reinigung durch Affinitäts-Chromatographie erleichtert wurde. Beim Immunisieren von Mäusen mit diesem reinen Protein wurden hohe Titer neutralisierender Antikörper erhalten, die auch die Hämagglutination hemmten und vor einer Infektion mit dem JEV schützten. Ähnliche Ergebnisse wurden erhalten, wenn die DENE-Region des DEN-2, fusioniert an das Protein A von *S. aureus*, verwendet wurde (Srivastava, A. K., Putnak, R. J., Warren, R. L., Hoke, C. H., Mice immunized with a dengue type 2 virus E and NS1 fusion protein made in *Escherichia coli* are protected against lethal dengue virus infection, *Vaccine* 1995, 13: 1251–1258); jedoch ist es nicht möglich, diese Präparate bei Menschen einzusetzen, da das Protein A vorliegt, für das gezeigt wurde, dass es eine hohe Affinität für das menschliche Immunglobulin G (IgG) aufweist.

[0007] Schließlich wurde über ein Fusionsprotein berichtet, das die B-Domäne des DENE-Proteins von DEN-2 und das Maltose-bindende Protein (MBP) von *E. coli* enthält (Simmons, M., Nelson, W. M., Wu, S. J., Hayes, C. G., Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998, 58: 655–662) und das mit MBP-DomB bezeichnet wurde. Diese Proteinvariante war in Mäusen immunogen und induzierte neutralisierende Antikörper.

[0008] In unserem Fall betrifft die Aufgabe der vorliegenden Erfindung das Erhalten chimärer Sequenzen, wie z.B. im ersten Fall der Sequenz, die eine Region des DENE-Proteins codiert, gebunden an das N-terminale Fragment eines mutierten Proteins mit Dehydrogenase-Aktivität (MDH) aus *Neisseria meningitidis*; im zweiten Fall der Sequenz, die eine Region des DENE-Proteins codiert, gebunden an das gesamte Gen des MDH-Proteins an zwei unterschiedlichen Positionen; und im dritten Fall werden die chimären Sequenzen durch zwei Fragmente des DENE-Proteins aus zwei unterschiedlichen Virus-Serotypen gebildet, die an dasselbe Gen fusioniert sind, welches das MDH-Protein codiert. Wenn diese chimären Ketten in einen geeigneten Vektor eingefügt werden, bringen sie unlösliche chimäre Proteine innerhalb des Zytoplasmas des Bakteriums hervor. Anschließend können diese Proteine hohe Spiegel neutralisierender Antikörper gegen DEN, Inhibitoren der viralen Hämagglutination, induzieren und immunisierte Mäuse vor einer Infektion durch Viren schützen.

[0009] Aufgrund der Unlöslichkeit der vorstehend erwähnten Proteine konnten sowohl ein einfaches in vitro-Faltungs-Verfahren in einem großen Maßstab als auch die Expressions- und Reinigungsverfahren ausgearbeitet werden, welche denjenigen überlegen waren, die von Simmons et al., 1998, verwendet wurden. Andererseits wird die Serotyp-Spezifität der Antikörper gezeigt, welche durch Immunisierung von Mäusen mit diesen Proteinen erzeugt wurden, und zwar auf der Ebene der Neutralisation, der Hemmung von Hämagglutination und von ELISA, wobei Dosen verwendet wurden, die niedriger waren als diejenigen, die von Simmons et al., 1998, eingesetzt wurden. Durch diese Tatsache kam der erste Bericht über die Expression von unlöslichen DENE-Proteinen in *E. coli* zustande, die in der Lage sind, eine funktionelle Immunantwort zu stimulieren.

[0010] Außerdem ist es möglich, wenn man die mit der dimeren Variante erhaltenen Ergebnisse berücksichtigt, mit ein und demselben Molekül Serotyp-spezifische Antikörper für zwei unterschiedliche virale Serotypen herzustellen, die in der Lage sind, eine Virusinfektion zu neutralisieren und Mäuse vor einer Infektion durch Viren zu schützen.

[0011] Hinsichtlich des MDH-Proteins wurde in der EMBL-Datenbank eine Suche nach Homologie mit anderen Sequenzen durchgeführt, die zeigte, dass die ersten 110 Aminosäuren sehr ähnlich sind zu der Liponsäure-Bindungsdomäne-Region und dem flexiblen Scharnier der Dihydrolipoamid-Acetyltransferase (E2-Enzym des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes und α -Ketoglutarat-Dehydrogenase), und dass der Rest des Proteins sehr ähnlich ist zu der Lipoamid-Dehydrogenase (LPDH), dem Enzym E3 dieses Komplexes (Stephens, P. E., H. M. Darlison und J. R. Guest, The Pyruvate dehydrogenase complex of *E. coli*, Eur. J. Biochem. 1983, 133: 155–162).

[0012] Andererseits wurde auch gefunden, dass Patienten mit primärer biliärer Zirrhose (PBC) anti-mitochondriale Autoantikörper produzierten, die für die Liponsäure-Bindungsstelle spezifisch waren, welche bei diesen Proteinen häufig vorkommt (Gershwin, M. E., Mackay, I. R., Sturgess, A., Coppel, R. L., Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kDa mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis, J. Immunol. 1987, 138: 3525–3531). Deshalb entschieden wir, diese Region innerhalb des Proteins zu mutieren, um bei einer Immunisierung von Menschen damit in Form von chimären Proteinen jegliche Autoimmunantwort zu vermeiden. Das mutierte MDH-Protein unserer Erfindung wurde in einer klinischen Studie der Phase I eingesetzt und zeigte, dass es in Menschen sicher und immunogen ist, und außerdem wurde es nicht durch Seren von Patienten mit PBC erkannt (Perez, A., F. Dickinson, Z. Cinza, A. Ruiz, T. Serrano, J. Sosa, S. González, Y. Gutiérrez, C. Nazábal, O. Gutiérrez, D. Guzmán, M. Diaz, M. Delgado, E. Caballero, G. Sardiñas, A. Alvarez, A. Martin, G. Guillén, R. Sliva, Safety and preliminary immunogenicity of the recombinant outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* in human volunteers, Biotech. Appl. Biochem. 34: 121–125). Jedoch wurde bisher noch keine mögliche Verwendung des MBP in Menschen gezeigt (Simmons, M., Nelson, W. M., Wu, S. J., Hayes, C. G., Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice, Am. J. Trop. Med. Hyg. 1998, 58: 655–662).

Genauere Beschreibung der Erfindung

[0013] In der vorliegenden Erfindung wird das Erhalten chimärer Nucleotidketten beschrieben, die, wenn sie in einen Expressionsvektor eingeführt werden, chimäre Proteine hervorbringen, die in der Lage sind, eine Serotyp-spezifische humorale Immunantwort zu induzieren und gegen die Infektion durch Dengue-Virus zu schützen, wie z.B. der Sequenz, die eine Region des DENE-Proteins aus jedem der viralen Serotypen des Dengue-Virus codiert, gebunden an das N-terminale Fragment eines mutierten Proteins mit Dehydrogenase-Aktivität (MDH) aus *Neisseria meningitidis*; im zweiten Fall, der Sequenz, die eine Region des DENE-Proteins codiert, gebunden an das gesamte Gen des MDH-Proteins an zwei unterschiedlichen Positionen: an einer Stelle innerhalb der Sequenz, die eine Strukturdomäne des MDH-Proteins (Liponsäure-Bindungsdomäne) codiert, und am 3'-Ende des Gens; und im dritten Fall werden die chimären Sequenzen durch zwei Fragmente des DENE-Proteins aus zwei unterschiedlichen viralen Serotypen, DEN-2 und DEN-4, an zwei verschiedenen Positionen des MDH-Gens gebildet: eine innerhalb einer bestimmten Stelle der Sequenz, welche die Liponsäure-Bindungsdomäne codiert (Serotyp 4), und die andere am 3'-Ende des MDH-Gens (Serotyp 2). Dieses Konstrukt wurde als dimeres Konstrukt bezeichnet.

[0014] Diese chimären Proteine wurden in unlöslicher Form im Zytoplasma des Bakteriums erhalten. Ein Reinigungsprozess durch immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) wurde durchgeführt, wodurch es möglich war, reine Proteine für Immunogenitätsstudien zu erhalten.

[0015] Wenn die Antigenitäts-Ergebnisse analysiert wurden, wurde für die Hyperimmun-Aszitesflüssigkeiten-(HMAF)Anti-DEN eine starke Erkennung aller rekombinanten chimären Proteine gezeigt, wobei sie im Fall der Fusion des gesamten MDH-Gens höher war, dies macht offensichtlich, dass durch die MDH eine positive Wirkung auf die Faltung der Region aus dem DENE-Protein erfolgt. In den Fällen, wenn der Serotyp 2 verwendet wurde, wurden alle erhaltenen rekombinanten Proteine durch einen Serotypspezifischen neutralisierenden Antikörper (3H5) erkannt, und dies war im Fall der Fusion mit dem gesamten MDH-Gen auch stärker ausgeprägt, und außerdem beim dimeren Protein. Ferner wurde festgestellt, dass die Erkennung bei den HMAF der homologen Serotypen in jedem Fall signifikant stärker war als die Erkennung bei den HMAF der heterologen Serotypen, dies macht die Exposition Serotyp-spezifischer Epitope deutlich und ermöglicht somit ihre Verwendung als diagnostisches Mittel für Dengue und Serotypisierung.

[0016] Wenn Mäuse mit allen rekombinanten chimären Proteinen immunisiert wurden, wurde eine neutralisierende und schützende Antwort erhalten. Die höchsten neutralisierenden Titer wurden mit den Sequenzen, die mit dem gesamten Gen der MDH fusioniert waren, und mit dem dimeren Protein erhalten, unabhängig von der Position des Fragments aus dem DENE-Protein. Dies zeigte einen mächtigen immunologischen Effekt der durch die MDH vermittelten Immunantwort, der durch den Einfluss auf die Faltung des DENE-Proteins erklärt werden kann, welcher sich in den Antigenitäts-Ergebnissen widerspiegelt. Außerdem wurde erstmals und im Gegensatz zum bisherigen Stand der Technik gezeigt, dass die Unlöslichkeit dieser Proteine nicht die Fähigkeit zum Erzeugen einer geeigneten Immunantwort beeinflusst.

[0017] Die erzeugte Immunantwort war in allen Fällen Serotyp-spezifisch (Antikörper gegen den immunisierten homologen Serotyp) in der Virus-Neutralisation, in der Hämagglutinations-Hemmung und im ELISA. Die Erzeugung von Serotyp-spezifischen Antikörpern bedeutet, dass sie nicht in der Lage sind, antigene Determinanten von einem Virus heterologer Serotypen zu erkennen, durch welche das Phänomen der Immunverstärkung begünstigt wird. Diese Eigenschaft ist von großer Wichtigkeit für die Entwicklung eines Impfstoffkandidats gegen das Dengue-Virus, da die Erkennung von Antikörpern gegen heterologe Serotypen eine der Ursachen für das Dengue-hämorrhagische Fieber (DHF) sein könnte.

[0018] Außerdem wurde die Induktion von Antikörpern gegen zwei Virus-Serotypen nach Immunisierung mit nur einem der chimären Proteine gezeigt, wodurch es möglich wird, einen Impfstoffkandidaten gegen die vier Serotypen zu formulieren, indem nur zwei unserer verfügbaren rekombinanten chimären Proteine verwendet werden.

[0019] Das Erhalten des mutierten MDH-Proteins bestand aus der Eliminierung der Liponsäure-Bindungsstelle in der Sequenz ETDKAT, die auf der kovalenten Bindung dieser Fettsäure mit den Epsilon-Aminogruppen von Lysin (K) basierte (Tuailon, N., Andre, C., Briand, J. P., et al., A lipoyl synthetic octadecapeptide of dihydrolipoamide acetyltransferase specifically recognized by anti-M2 autoantibodies in Primary Biliary Cirrhosis, *J. Immunol.* 1992, 148: 445–450).

[0020] Die Mutagenese erfolgte unter Verwendung einer PCR zusammen mit einem Primerpaar, um die N-terminale Region (vom Start-Codon des *lpdA*-Gens bis zur Liponsäure-Bindungsstelle, 135 bp) und das C-Ende des Proteins (von der Liponsäure-Bindungsstelle bis zum 3'-Ende des Gens) zu amplifizieren; auf diese Weise wird die Möglichkeit ausgeschaltet, dass Autoimmunreaktionen erzeugt werden, wie in den klinischen Studien am Menschen gezeigt wurde.

Hinterlegung des biologischen Materials

[0021] Die Plasmide PLL1, PLL2, PLL3, PLH1, PLH2, PLH3, PAZ1, PAZ2, PAZ3, PID1, PID2 und PID3 wurden nach dem Budapester Vertrag in der Belgian Coordinated Collection of Microorganism, BCCM™, LMBP-Collection, mit dem Datum und unter den Hinterlegungsnummern hinterlegt (schwebend).

Beschreibung der Figuren

[0022] **Fig. 1:** Strategie zur Clonierung des E2-Fragments, um PLL1 zu erhalten.
DENE2: Fragment des Hüllproteins von DEN-2.
N-term: Nucleotidsequenz, welche die ersten 45 Aminosäuren des MDH-Proteins codiert.

[0023] **Fig. 2:** Strategie zur Clonierung des E2-Fragments, um PLL2 zu erhalten.
DENE2: Fragment des Hüllproteins von DEN-2.
MDH: Mutierte Dehydrogenase.

[0024] **Fig. 3:** Strategie zur Clonierung des E2-Fragments, um PLL3 zu erhalten.
DENE2: Fragment des Hüllproteins von DEN-2.
MDH: Mutierte Dehydrogenase.

[0025] **Fig. 4:** Strategie zur Clonierung des E1-Fragments, um PLH1 zu erhalten.
DENE1: Fragment des Hüllproteins von DEN-1.
N-term: Nucleotidsequenz, welche die ersten 45 Aminosäuren des MDH-Proteins codiert.

[0026] **Fig. 5:** Strategie zur Clonierung des E1-Fragments, um PLH2 zu erhalten.
DENE1: Fragment des Hüllproteins von DEN-1.

N-term: Nucleotidsequenz, welche die ersten 45 Aminosäuren des MDH-Proteins codiert.

[0027] [Fig. 6](#): Strategie zur Clonierung des E1-Fragments, um PLH3 zu erhalten.

DENe1: Fragment des Hüllproteins von DEN-1.

MDH: Mutierte Dehydrogenase.

[0028] [Fig. 7](#): Strategie zur Clonierung des E3-Fragments, um PAZ1 zu erhalten.

DENe3: Fragment des Hüllproteins von DEN-3.

N-term: Nucleotidsequenz, welche die ersten 45 Aminosäuren des MDH-Proteins codiert.

[0029] [Fig. 8](#): Strategie zur Clonierung des E3-Fragments, um PAZ2 zu erhalten.

DENe3: Fragment des Hüllproteins von DEN-3.

MDH: Mutierte Dehydrogenase.

[0030] [Fig. 9](#): Strategie zur Clonierung des E3-Fragments, um PAZ3 zu erhalten.

DENe3: Fragment des Hüllproteins von DEN-3.

MDH: Mutierte Dehydrogenase.

[0031] [Fig. 10](#): Strategie zur Clonierung des E4-Fragments, um PID1 zu erhalten.

DENe4: Fragment des Hüllproteins von DEN-4.

N-term: Nucleotidsequenz, welche die ersten 45 Aminosäuren des MDH-Proteins codiert.

[0032] [Fig. 11](#): Strategie zur Clonierung des E4-Fragments, um PID2 zu erhalten.

DENe4: Fragment des Hüllproteins von DEN-4.

MDH: Mutierte Dehydrogenase.

[0033] [Fig. 12](#): Strategie zur Clonierung des E4-Fragments, um PID3 zu erhalten.

DENe4: Fragment des Hüllproteins von DEN-4.

MDH: Mutierte Dehydrogenase.

[0034] [Fig. 13](#): Strategie zur Clonierung, um PD4D2 zu erhalten.

DENe4: Fragment des Hüllproteins von DEN-4.

DENe2: Fragment des Hüllproteins von DEN-2.

MDH: Mutierte Dehydrogenase.

Beispiele

Beispiel 1. Erhalten von PLL1

[0035] Die Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuren von 286 bis 426 des Hüllproteins des DEN-2-Virus codiert (SEQ ID NO: 22), wurde mit den im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 2 bezeichneten Oligonucleotiden aus dem DEN-2-Virusstamm Genotyp Jamaica amplifiziert (Deubel, V, Kinney, R. M., Trent, D. W., Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural proteins of Dengue type 2 virus, Jamaica genotype: Comparative analysis of the full-length genome, *Virology* 1988, 165: 234–244).

[0036] Der Vektor wurde durch Spalten des Plasmids pM108 His mit XbaI/BamHI erzeugt, welches die Nucleotidsequenz enthält, die die N-terminale Region der MDH und eine Sequenz von sechs Histidinresten codiert (SEQ ID NO: 23). Nach dem Ligieren wurden die möglichen Rekombinanten durch Restriktionsenzymsspaltung analysiert und positive Clone sequenziert, um die Übergänge zu überprüfen. Die kompetenten Zellen W3110 (Hill, C. W., Harnish, B. W., 1982, Transposition of a chromosomal segment bounded by redundant rRNA genes in *Escherichia coli*, *J. Bacteriology*, 149: 449–457) wurden mit dem ausgewählten Clon, der mit pLL1 bezeichnet wurde ([Fig. 1](#) und SEQ ID NO: 24), transformiert. Nachdem die Kolonie in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) gezüchtet worden war, wurde eine SDS-PAGE des Zelllysats durchgeführt. Als Ergebnis wurde eine 25-kDa-Bande erhalten, die 10 % der gesamten zellulären Proteine ausmachte. Die Größe des erhaltenen Proteins entsprach der Summe der N-terminalen Region aus dem MDH-Protein und des DENe-Proteinfragments aus dem DEN-2-Virus. Das Protein wurde im Immunblotting durch die in den HMAF enthaltenen polyclonalen Antikörper (PA) Anti-DEN-2 erkannt. Dieses Protein wurde mit PLL1 bezeichnet (SEQ ID NO: 25).

Beispiel 2: Reinigen des Proteins PLL1

[0037] Die Biomasse, die aus dem mit pLL1 transformierten und bei 37°C gezüchteten E. coli-Stamm erhalten wurde, wurde in einer French-Press aufgeschlossen. Das rekombinante Protein wurde hauptsächlich als unlösliche Form erhalten, die mit dem Pellet des Zellaufschlusses assoziiert war. Das Protein wurde aus dem Pellet mit 6 M Harnstoff extrahiert und der Überstand, der das Protein PLL1 enthielt, auf eine G-25-Säule aufgetragen, um das chaotrope Mittel zu entfernen. Die erhaltene Fraktion wurde anschließend in Gegenwart von Cu⁺⁺-Ionen auf die Chelating-Sepharose-FF-Säule (Pharmacia, UK) aufgetragen. Das Protein wurde mit 50 mM Imidazol eluiert und das erhaltene Volumen auf eine G-25-Säule aufgetragen, wodurch schließlich das Protein im Formulierungspuffer 100 mM NaCl, 2 mM KCl₂, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,2, 1 mM KH₂PO₄ (PBS) erhalten wurde. Dieses Präparat wurde für immunologische Studien verwendet.

Beispiel 3: Antigen-Charakterisierung von PLL1

[0038] Die gereinigte Fraktion von PLL1 wurde durch seine Erkennung durch unterschiedliche polyclonale Seren und/oder murine monoclonale Antikörper und auch durch positive menschliche Seren gegen Dengue charakterisiert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Reaktivität des Proteins PLL1 gegen monoclonale und polyclonale Antikörper

Antikörper**	Spezifität***	PLL1*
HMAF	DEN-1	+
HMAF	DEN-2	++
HMAF	DEN-3	-
HMAF	DEN-4	-
HMAF	EEE	-
HMAF	YFV	-
HMAF	SLV	-
mAb 3H5	NT	+

* Insgesamt wurden 10 µg des gereinigten PLL1 angewendet. Die Intensität des erhaltenen Signals wurde mit + bis ++ bewertet.

** HMAF wurden in der Verdünnung 1:100 verwendet, während der mAb 3H5 in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt wurde.

*** EEE: Pferde-Enzephalitis-Virus; YFV: Gelbfieber-Virus; SLV: Saint-Louis-Enzephalitis-Virus; NT: Neutralisiert spezifischen Serotyp.

[0039] Die stärkste Erkennung im Dot-Blotting wurde jeweils mit den HMAF-Anti-DEN-2 erhalten. Dieses Ergebnis stimmt mit der Tatsache überein, dass die clonierte Region zum Serotyp 2 gehört. Die Erkennung durch HMAF gegen die anderen Serotypen war weniger stark ausgeprägt als im Fall von Serotyp 2, und zwar in absteigender Reihenfolge: DEN-1, DEN-3 und DEN-4. Die durch andere Flaviviren, wie Gelbfieber-Virus und Saint-Louis-Enzephalitis-Virus, erzeugten Antikörper zeigten keinerlei Erkennung. Andererseits wies der mAb 3H5 tatsächlich eine Reaktivität auf. Diese Erkennung durch Western-Blotting beruhte auf einer Disulfidbindung, da das Signal verloren ging, wenn die Probe reduziert wurde. Schließlich wurde eine Reaktivität gegen drei menschliche Seren mit hohen Titern und drei mit niedrigen Titern gegen DEN-2 gemessen, wobei in beiden Fällen durch Western-Blotting und Dot-Blotting ein wesentliches Signal erhalten wurde.

Beispiel 4: Charakterisieren der durch PLL1 erzeugten Antikörperantwort

[0040] Insgesamt 25 Balb/c-Mäuse wurden mit 35 µg des gereinigten PLL1 in Freundschem Adjuvans i.p. immunisiert; von zehn Tieren wurde nach vier Dosen Blut abgenommen und die Anti-DEN-Antikörper durch ELISA bestimmt. Hohe Antikörpertiter gegen DEN-2 wurden erhalten, während gegen die restlichen Serotypen keine Reaktivität erhalten wurde (Tabelle 2 und Tabelle 5). Außerdem wurde der Hämagglutinations-Hemmtest (HIA) durchgeführt, wobei nur positive Titer gegen DEN-2 gefunden wurden (Tabelle 3 und Tabelle 5). Schließlich wurde der in vitro-Neutralisationstest durchgeführt, wobei Neutralisationstiter gegen DEN-2 von 1:320 er-

halten wurden. Jedoch wurde keine Neutralisation der Virusinfektion gegen die restlichen Serotypen gefunden (Tabelle 4 und Tabelle 5). Diese Ergebnisse zeigen die hohe Serotyp-Spezifität der durch PLL1 induzierten Antikörper.

Tabelle 2: Antikörpertiter gegen DEN-2 der Seren, die nach Immunisieren von Mäusen mit PLL1 erhalten wurden

Maus	Titer von Anti-DEN-2 PLL1	Titer von Anti-DEN-2 PBS Kontrolle (-)
1	1:128 000	< 1:100
2	1:64 000	< 1:100
3	1:64 000	< 1:100
4	1:128 000	< 1:100
5	1:32 000	< 1:100
6	1:32 000	< 1:100
7	1:64 000	< 1:100
8	1:32 000	< 1:100
9	1:128 000	< 1:100
10	1:512 000	< 1:100

Tabelle 3: HI-Titer der Seren aus den mit PLL1 immunisierten Tieren

Maus	HI*-Titer von Anti-DEN-2 PLL1	HI-Titer von Anti-DEN-2 PBS Kontrolle (-)
1	< 1:5	< 1:5
2	> 1:640	< 1:5
3	1:320	< 1:5
4	1:320	< 1:5
5	> 1:640	< 1:5
6	> 1:640	< 1:5
7	> 1:640	< 1:5
8	1:320	< 1:5
9	> 1:640	< 1:5
10	< 1:5	< 1:5

* Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

Tabelle 4: Virus-Neutralisationstest mit den Seren von mit PLL1 immunisierten Tieren

Maus	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-2 PLL1	Neutralisierende Titer von Anti-DEN-2 PBS Kontrolle (-)
1	1:320	< 1:5
2	1:320	< 1:5
3	1:320	< 1:5
4	1:320	< 1:5
5	1:80	< 1:5
6	1:160	< 1:5
7	1:320	< 1:5
8	1:40	< 1:5
9	1:160	< 1:5
10	1:320	< 1:5

* Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Tabelle 5: Test auf Kreuzreaktivität gegen alle viralen Serotypen durch ELISA, HI und Virus-Neutralisation mit den Seren von mit PLL1 immunisierten Tieren

Gemisch von Seren*	ELISA (Anti-DEN-1)	ELISA (Anti-DEN-2)	ELISA (Anti-DEN-3)	ELISA (Anti-DEN-4)
1 (PLL1)	< 1:100	> 1:128 000	< 1:100	< 1:100
2 (PLL1)	< 1:100	1:128 000	< 1:100	< 1:100

Gemisch von Seren*	HI** Anti-DEN-1	HI Anti-DEN-2	HI Anti-DEN-3	HI Anti-DEN-4
PLL1	< 1:5	> 1:320	< 1:5	< 1:5

Gemisch von Seren*	Neutralisier. Titer*** Anti-DEN-1	Neutralis. Titer Anti-DEN-2	Neutralis. Titer Anti-DEN-3	Neutral. Titer Anti-DEN-4
1 (PLL1)	< 1:5	1:320	< 1:5	< 1:5
2 (PLL1)	< 1:5	1:160	< 1:5	< 1:5

* Jedes Gemisch bestand aus drei Seren.

** Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

*** Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Beispiel 5: Erhalten von PLL2

[0041] Die Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuren 286 bis 426 des Hüllproteins des DEN-2-Virus codiert (SEQ ID NO: 22), wurde mit den im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 3 bezeichneten Oligonucleotiden aus dem DEN-2-Virusstamm Genotyp Jamaica amplifiziert (Deubel, V, Kinney, R. M., Trent, D. W., Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural proteins of Dengue type 2 virus, Jamaica genotype: Comparative analysis of the full-length genome, *Virology* 1988, 165: 234–244).

[0042] Der Vektor wurde durch Spalten des Plasmids pM84 His mit XbaI/EcoRI erzeugt, welches die Nucleotidsequenz enthält, die das MDH-Protein und eine Sequenz von sechs Histidinresten codiert (SEQ ID NO: 26). Diese Spaltung macht die Insertion des durch PCR amplifizierten Fragments innerhalb der codierenden Region für eine Strukturdomäne des MDH-Proteins möglich. Nach dem Ligieren wurden die möglichen Rekombinanten durch Restriktionsenzymspaltung analysiert und positive Clone sequenziert, um die Übergänge zu überprüfen. Die kompetenten Zellen MM294 (Hanahan, D., 1983, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J. Mol. Biol.* 166: 557–580) wurden mit dem ausgewählten Clon, der mit pLL2 bezeichnet wurde ([Fig. 2](#) und SEQ ID NO: 27), transformiert. Nachdem die Kolonie in LB-Medium gezüchtet worden war, wurde eine SDS-PAGE des Zellysats durchgeführt. Als Ergebnis wurde eine 80-kDa-Bande erhalten, die 10 % der gesamten zellulären Proteine ausmachte. Die Größe des erhaltenen Proteins entsprach der Summe der Größe des MDH-Proteins und des DENE-Proteinfragments aus dem DEN-2-Virus. Das Protein wurde im Immunblotting durch HMAF-Anti-DEN-2 erkannt und mit PLL2 bezeichnet (SEQ ID NO: 28).

Beispiel 2: Reinigen des Proteins PLL2

[0043] Die Biomasse, die aus dem mit pLL2 transformierten und bei 37°C gezüchteten *E. coli*-Stamm erhalten wurde, wurde in einer French-Press aufgeschlossen. Das rekombinante Protein wurde in beiden Formen, der löslichen und der unlöslichen Form, erhalten. Mit der löslichen Fraktion wurde eine Metallionen-Affinitäts-Chromatographie durchgeführt, wobei die Chelating-Sepharose-FF-Säule verwendet wurde, die vorher mit Cu⁺⁺-Ionen gekoppelt worden war. Die Säule wurde unter Verwendung von 15 mM Imidazol gewaschen und das Protein mit 100 mM Imidazol eluiert. Andererseits wurde das mit der unlöslichen Fraktion assoziierte Protein unter Verwendung von 8 M Harnstoff extrahiert und der Überstand, der das Protein PLL2 enthielt, auf eine G-25-Säule aufgetragen, um das chaotrope Mittel zu entfernen. Die erhaltene Fraktion wurde anschließend in Gegenwart von Cu⁺⁺-Ionen auf die Chelating-Sepharose-FF-Säule (Pharmacia, UK) aufgetragen. Das Protein wurde mit 100 mM Imidazol eluiert. Schließlich wurde jeweils die reine Fraktion von jeder Form des Proteins auf eine G-25-Säule aufgetragen, wodurch das Protein im Formulierungspuffer 100 mM NaCl, 2 mM KCl₂, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,2, 1 mM KH₂PO₄ (PBS) erhalten wurde. Diese Präparate wurden für immunologische Studien verwendet.

Beispiel 7: Antigen-Charakterisierung von PLL2

[0044] Die gereinigte Fraktion von PLL2 wurde durch seine Erkennung durch unterschiedliche polyclonale Seren und/oder murine monoclonale Antikörper und auch durch positive menschliche Seren gegen Dengue charakterisiert (Tabelle 6).

[0045] Die stärkste Erkennung im Dot-Blotting wurde jeweils mit den HMAF-Anti-DEN-2 erhalten. Die Erkennung durch HMAF gegen die anderen Serotypen war weniger stark ausgeprägt als im Fall von Serotyp 2, und zwar in absteigender Reihenfolge: DEN-1, DEN-3 und DEN-4. Die durch andere Flaviviren, wie Gelbfieber-Virus und Saint-Louis-Enzephalitis-Virus, erzeugten Antikörper zeigten keinerlei Erkennung. Trotzdem wurde, bezogen auf den mAb 3H5, sowohl beim Dot-Blot als auch beim Western-Blot eine hohe Reaktivität festgestellt (sogar noch höher als diejenige, die mit PLL1 erhalten wurde). Entgegengesetzt zu den PLL1-Ergebnissen war die Erkennung mit dem mAb 3H5 die gleiche, wenn in der Probe Reduktionsmittel vorlagen, dies zeigt einen möglichen Unterschied in der Konformation zwischen beiden Proteinen. Schließlich wurde die Reaktivität gegen drei menschliche Seren mit hohen Titern und drei mit niedrigen Titern gegen DEN-2 gemessen, wobei in beiden Fällen durch Western-Blotting und Dot-Blotting ein wesentliches Signal erhalten wurde.

Tabelle 6: Reaktivität des Proteins PLL2 gegen monoclonale und polyclonale Antikörper

Antikörper**	Spezifität***	PLL2 lösl., unlösl.*
HMAF	DEN-1	++
HMAF	DEN-2	+++
HMAF	DEN-3	-
HMAF	DEN-4	-
HMAF	EEE	-
HMAF	YFV	-
HMAF	SLV	-
mAb 3H5	NT	+++

* Insgesamt wurden 10 µg des gereinigten PLL2 angewendet. Die Intensität des erhaltenen Signals wurde mit + bis ++ bewertet.

** HMAF wurden in der Verdünnung 1:100 verwendet, während der mAb 3H5 in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt wurde.

*** EEE: Pferde-Enzephalitis-Virus; YFV: Gelbfieber-Virus; SLV: Saint-Louis-Enzephalitis-Virus; NT: Neutralisiert spezifischen Serotyp.

Beispiel 8: Charakterisieren der durch PLL2 erzeugten Antikörperantwort

[0046] Insgesamt 25 Balb/c-Mäuse wurden mit 35 µg des gereinigten PLL2 in Freundschem Adjuvans i.p. immunisiert; von zehn Tieren wurde nach vier Dosen Blut abgenommen und die Anti-DEN-Antikörper durch ELISA bestimmt. Hohe Antikörpertiter gegen DEN-2 wurden erhalten, während gegen die restlichen Serotypen keine Reaktivität erhalten wurde (Tabelle 7 und Tabelle 10). Außerdem wurde der Hämagglutinations-Hemmtest (HIA) durchgeführt, wobei nur positive Titer gegen DEN-2 gefunden wurden (Tabelle 8 und Tabelle 10). Schließlich wurde der in vitro-Neutralisationstest durchgeführt, wobei Neutralisationstiter gegen DEN-2 von 1:1280 erhalten wurden. Ähnlich zu den mit PLL1 erhaltenen Ergebnissen wurde keine Neutralisation der Virusinfektion gegen die restlichen Serotypen gefunden (Tabelle 9 und Tabelle 10). Andererseits waren die mit den beiden Varianten von PLL2 erhaltenen Ergebnisse ähnlich, dies zeigt, dass der Löslichkeitszustand des Proteins nicht die Fähigkeit zum Hervorbringen funktioneller Antikörper beeinflusst.

Tabelle 7: Antikörpertiter gegen DEN-2 der Seren, die nach Immunisieren von Mäusen mit PLL2, löslich und unlöslich, erhalten wurden

Maus	Titer von Anti-DEN-2 (PLL2)		Titer von Anti-DEN-2 PBS Kontrolle (-)
	PLL2 lösl.	PLL2 unlösl.	
1	> 1:128 000	1:64 000	< 1:100
2	1:128 000	> 1:128 000	< 1:100
3	> 1:128 000	1:128 000	< 1:100
4	> 1:128 000	> 1:128 000	< 1:100
5	1:64 000	> 1:128 000	< 1:100
6	> 1:128 000	1:128 000	< 1:100
7	1:64 000	> 1:128 000	< 1:100
8	> 1:128 000	1:64 000	< 1:100
9	> 1:128 000	1:64 000	< 1:100
10	1:128 000	> 1:128 000	< 1:100

Tabelle 8: HI-Titer der Seren aus den mit PLL2, löslich und unlöslich, immunisierten Tieren

Maus	HI*-Titer von Anti-DEN-2 (PLL2)		HI-Titer von Anti-DEN-2 PBS Kontrolle (-)
	PLL2 löslich	PLL2 unlösl.	
1	> 1:640	> 1:640	< 1:5
2	> 1:640	> 1:640	< 1:5
3	1:320	> 1:640	< 1:5
4	> 1:640	1:320	< 1:5
5	1:320	< 1:5	< 1:5
6	> 1:640	> 1:640	< 1:5
7	> 1:640	1:320	< 1:5
8	< 1:5	1:320	< 1:5
9	1:320	> 1:640	< 1:5
10	> 1:640	> 1:640	< 1:5

* Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

Tabelle 9: Virus-Neutralisationstest mit den Seren von mit PLL2 löslich und unlöslich immunisierten Tieren

Maus	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-2 (PLL2)		Neutralisierende Titer von Anti-DEN-2 PBS Kontrolle (-)
	PLL2 lösl.	PLL2 unlösl.	
1	> 1:1280	> 1:1280	> 1:1280
2	> 1:1280	> 1:1280	< 1:5
3	> 1:1280	1:640	< 1:5
4	1:640	> 1:1280	< 1:5
5	1:640	1:640	< 1:5
6	> 1:1280	> 1:1280	< 1:5
7	> 1:1280	> 1:1280	< 1:5
8	> 1:1280	> 1:1280	< 1:5
9	> 1:1280	> 1:1280	< 1:5
10	> 1:1280	> 1:1280	< 1:5

* Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Tabelle 10: Test auf Kreuzreaktivität gegen alle viralen Serotypen durch ELISA, HI und Virus-Neutralisation mit den Seren von mit PLL2. löslich und unlöslich, immunisierten Tieren

Gemisch von Seren*	ELISA (Anti-DEN-1)	ELISA (Anti-DEN-2)	ELISA (Anti-DEN-3)	ELISA (Anti-DEN-4)
1 (PLL2 lösl.)	< 1:100	> 1:128 000	< 1:100	< 1:100
2 (PLL2 lösl.)	< 1:100	1:64 000	< 1:100	< 1:100
1 (PLL2 unlösl.)	< 1:100	1:64 000	< 1:100	< 1:100
2 (PLL2 unlösl.)	< 1:100	> 1:128 000	< 1:100	< 1:100

Gemisch von Seren*	HI** Anti-DEN-1	HI Anti-DEN-2	HI Anti-DEN-3	HI Anti-DEN-4
PLL2 löslich	< 1:5	> 1:320	< 1:5	< 1:5
PLL2 unlösl.	< 1:5	> 1:320	< 1:5	< 1:5

Gemisch von Seren*	Neutralis. Titer** Anti-DEN-1	Neutralis. Titer Anti-DEN-2	Neutralis. Titer Anti-DEN-3	Neutral. Titer Anti-DEN-4
1 (PLL2)	< 1:5	1:320	< 1:5	< 1:5
2 (PLL2)	< 1:5	1:160	< 1:5	< 1:5

* Jedes Gemisch bestand aus drei Seren.

** Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

*** Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Beispiel 9: Erhalten von pLL3

[0047] Die Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuren von 286 bis 426 des Hüllproteins des DEN-2-Virus codiert (SEQ ID NO: 22), wurde mit den im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 5 bezeichneten Oligonucleotiden aus dem DEN-2-Virusstamm Genotyp Jamaica amplifiziert (Deubel, V, Kinney, R. M., Trent, D. W., Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural proteins of Dengue type 2 virus, Jamaica genotype: Comparative analysis of the full-length genome, *Virology* 1988, 165: 234–244).

[0048] Der Vektor wurde durch Spalten des Plasmids pD4 mit BamHI/BamHI erzeugt, welches die Nucleotidsequenz enthält, die das MDH-Protein und eine Sequenz von sechs Histidinresten, ohne Stopp-Codon, codiert (SEQ ID NO: 29). Diese Spaltung macht die Fusion des durch PCR amplifizierten Fragments hinter der C-terminalen Region des MDH-Proteins möglich. Nach dem Ligieren wurden die möglichen Rekombinanten durch Restriktionsenzymspaltung analysiert und positive Clone sequenziert, um die Übergänge zu überprüfen. Die kompetenten Zellen W3110 wurden mit dem ausgewählten Clon, der mit pLL3 bezeichnet wurde ([Fig. 3](#) und SEQ ID NO: 30), transformiert. Nachdem die Kolonie in LB-Medium gezüchtet worden war, wurde eine SDS-PAGE des Zelllysats durchgeführt. Als Ergebnis wurde eine 80-kDa-Bande erhalten, die 20 % der gesamten zellulären Proteine ausmachte. Die Größe des erhaltenen Proteins entsprach der Summe der Größe des MDH-Proteins und des DENE-Proteinfragments aus dem DEN-2-Virus. Das Protein wurde im Immunblotting durch HMAF-Anti-DEN-2 erkannt und mit PLL3 bezeichnet (SEQ ID NO: 31).

Beispiel 10: Reinigen des Proteins PLL3

[0049] Die Biomasse, die aus dem mit pLL2 transformierten und bei 37°C gezüchteten E. coli-Stamm erhalten wurde, wurde in einer French-Press aufgeschlossen. Das rekombinante Protein wurde in beiden Formen, der löslichen und der unlöslichen Form, erhalten. Aus der unlöslichen Fraktion wurde das Protein unter Verwendung von 6 M Harnstoff extrahiert und der Überstand, der das Protein PLL3 enthielt, auf eine G-25-Säule auf-

getragen, um das chaotrope Mittel zu entfernen. Die erhaltene Fraktion wurde anschließend in Gegenwart von Cu^{++} -Ionen auf die Chelating-Sepharose-FF-Säule (Pharmacia, UK) aufgetragen. Die Säule wurde mit 30 mM Imidazol gewaschen und das Protein mit 100 mM Imidazol eluiert. Schließlich wurde die reine Fraktion des Proteins auf eine G-25-Säule aufgetragen, wodurch das Protein im Formulierungspuffer (PBS) erhalten wurde. Diese Präparate wurden für immunologische Studien verwendet.

Beispiel 11: Antigen-Charakterisierung von PLL3

[0050] Die gereinigte Fraktion von PLL3 wurde durch seine Erkennung durch unterschiedliche polyclonale Seren und/oder murine monoclonale Antikörper und auch durch positive menschliche Seren gegen Dengue charakterisiert (Tabelle 11).

[0051] Die stärkste Erkennung im Dot-Blotting wurde jeweils mit den HMAF-Anti-DEN-2 erhalten. Die Erkennung durch HMAF gegen die anderen Serotypen war weniger stark ausgeprägt als im Fall von Serotyp 2, und zwar in absteigender Reihenfolge: DEN-1, DEN-3 und DEN-4. Die durch andere Flaviviren, wie Gelbfieber-Virus und Saint-Louis-Enzephalitis-Virus, erzeugten Antikörper zeigten keinerlei Erkennung. Trotzdem wurde, bezogen auf den mAb 3H5, sowohl beim Dot-Blot als auch beim Western-Blot eine hohe Reaktivität festgestellt (ähnlich wie diejenigen Ergebnisse, die mit PLL2 erhalten wurden). Entgegengesetzt zu den PLL1-Ergebnissen war die Erkennung mit dem mAb 3H5 die gleiche, wenn in der Probe Reduktionsmittel vorlagen, dies zeigt einen möglichen Unterschied in der Konformation zwischen beiden Proteinen. Schließlich wurde die Reaktivität gegen drei menschliche Seren mit hohen Titern und drei mit niedrigen Titern gegen DEN-2 gemessen, wobei in beiden Fällen durch Western-Blotting und Dot-Blotting ein wesentliches Signal erhalten wurde.

Tabelle 11: Reaktivität des Proteins PLL3 gegen monoclonale und golyclonale Antikörper

Antikörper**	Spezifität***	PLL3*
HMAF	DEN-1	++
HMAF	DEN-2	+++
HMAF	DEN-3	-
HMAF	DEN-4	-
HMAF	EEE	-
HMAF	YFV	-
HMAF	SLV	-
mAb 3H5	NT	+++

* Insgesamt wurden 10 µg des gereinigten PLL3 angewendet. Die Intensität des erhaltenen Signals wurde mit + bis ++ bewertet.

** HMAF wurden in der Verdünnung 1:100 verwendet, während der mAb 3H5 in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt wurde.

*** EEE: Pferde-Enzephalitis-Virus; YFV: Gelbfieber-Virus; SLV: Saint-Louis-Enzephalitis-Virus; NT: Neutralisiert spezifischen Serotyp.

Beispiel 12: Charakterisieren der durch PLL3 erzeugten Antikörperantwort

[0052] Insgesamt 25 Balb/c-Mäuse wurden mit 35 µg des gereinigten PLL3 in Freundschem Adjuvans i.p. immunisiert; von zehn Tieren wurde nach vier Dosen Blut abgenommen und die Anti-DEN-Antikörper durch ELLSA bestimmt. Hohe Antikörpertiter gegen DEN-2 wurden erhalten, während gegen die restlichen Serotypen keine Reaktivität erhalten wurde (Tabelle 12 und Tabelle 15). Außerdem wurde der Hämagglutinations-Hemmtest (HIA) durchgeführt, wobei nur positive Titer gegen DEN-2 gefunden wurden (Tabelle 13 und Tabelle 15). Schließlich wurde der in vitro-Neutralisationstest durchgeführt, wobei Neutralisationstiter gegen DEN-2 von 1:1280 erhalten wurden (Tabelle 14). Keine Neutralisation der Virusinfektion wurde gegen die restlichen Serotypen gefunden (Tabelle 15). Unter Verwendung der drei Tests wurden hohe Spiegel von Serotypspezifischen Antikörpern nachgewiesen, ähnlich wie diejenigen, die nach der Immunisierung mit dem Protein PLL2 erhalten wurden.

Tabelle 12: Antikörgertiter gegen DEN-2 der Seren, die nach Immunisieren von Mäusen mit PLL3 erhalten wurden

Maus	Titer von Anti-DEN-2 (PLL3)	Titer von Anti-DEN-2 PBS Kontrolle (-)
1	1:128 000	< 1:100
2	> 1:128 000	< 1:100
3	> 1:128 000	< 1:100
4	1:64 000	< 1:100
5	> 1:128 000	< 1:100
6	1:64 000	< 1:100
7	> 1:128 000	< 1:100
8	> 1:128 000	< 1:100
9	1:128 000	< 1:100
10	> 1:128 000	< 1:100

Tabelle 13: HI-Titer der Seren aus den mit PLL3 immunisierten Tieren

Maus	HI*-Titer von Anti-DEN-2 (PLL3)	HI-Titer von Anti-DEN-2 PBS Kontrolle (-)
1	> 1:640	< 1:5
2	1:320	< 1:5
3	1:320	< 1:5
4	> 1:640	< 1:5
5	1:320	< 1:5
6	> 1:640	< 1:5
7	> 1:640	< 1:5
8	> 1:640	< 1:5
9	1:320	< 1:5
10	> 1:640	< 1:5

* Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

Tabelle 14: Virus-Neutralisationstest mit den Seren von mit PLL3 immunisierten Tieren

Maus	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-2 PLL3	Neutralisierende Titer von Anti-DEN-2 PBS Kontrolle (-)
1	> 1:1280	< 1:5
2	> 1:1280	< 1:5
3	> 1:1280	< 1:5
4	1:640	< 1:5
5	> 1:1280	< 1:5
6	> 1:1280	< 1:5
7	> 1:1280	< 1:5
8	> 1:1280	< 1:5
9	1:640	< 1:5
10	> 1:1280	< 1:5

* Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Tabelle 15: Test auf Kreuzreaktivität gegen alle viralen Serotypen durch ELISA, HI und Virus-Neutralisation mit den Seren von mit PLL3 immunisierten Tieren

Gemisch von Seren*	ELISA (Anti-DEN-1)	ELISA (Anti-DEN-2)	ELISA (Anti-DEN-3)	ELISA (Anti-DEN-4)
1 (PLL3)	< 1:100	> 1:128 000	< 1:100	< 1:100
2 (PLL3)	< 1:100	> 1:128 000	< 1:100	< 1:100

Gemisch von Seren*	HI** Anti-DEN-1	HI Anti-DEN-2	HI Anti-DEN-3	HI Anti-DEN-4
PLL3	< 1:5	> 1:320	< 1:5	< 1:5

Gemisch von Seren*	Neutralis. Titer*** Anti-DEN-1	Neutralis. Titer*** Anti-DEN-2	Neutralis. Titer*** Anti-DEN-3	Neutralis. Titer*** Anti-DEN-4
1 (PLL3)	< 1:5	> 1:1280	< 1:5	< 1:5
2 (PLL3)	< 1:5	> 1:1280	< 1:5	< 1:5

* Jedes Gemisch bestand aus drei Seren.

** Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

*** Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Beispiel 13: Erhalten von pLH1

[0053] Die Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuren von 286 bis 426 des Hüllproteins des DEN-1-Virus codiert (SEQ ID NO: 32), wurde mit den im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO: 6 und SEQ ID NO: 7 bezeichneten Oligonucleotiden aus dem DEN-1-Virusstamm Genotyp amplifiziert (Chu, M. C., O'Rourke, E. J., Trent, D. W., Genetic relatedness among structural protein genes of dengue 1 virus strains, J. Gen. Virol. 1989, 70: 1701–1712).

[0054] Der Vektor wurde durch Spalten des Plasmids pM108 His mit XbaI/BamHI erzeugt, welches die Nucleotidsequenz enthält, die die N-terminale Region der MDH und eine Sequenz von sechs Histidinresten codiert (SEQ ID NO: 23). Nach dem Ligieren wurden die möglichen Rekombinanten durch Restriktionsenzymspaltung analysiert und positive Clone sequenziert, um die Übergänge zu überprüfen. Die kompetenten Zellen W3110 wurden mit dem ausgewählten Clon, der mit pLH1 bezeichnet wurde (Fig. 4 und SEQ ID NO: 33), transformiert. Nachdem die Kolonie in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) gezüchtet worden war, wurde eine SDS-PAGE des Zellysats durchgeführt. Als Ergebnis wurde eine 25-kDa-Bande erhalten, die 10 % der gesamten zellulären Proteine ausmachte. Die Größe des erhaltenen Proteins entsprach der Summe der N-terminalen Region des MDH-Proteins und des DENE-Proteinfragments aus dem DEN-1-Virus. Das Protein wurde im Immunblotting durch die in den HMAF enthaltenen polyclonalen Antikörper (pA) Anti-DEN-1 erkannt und mit PLH1 bezeichnet (SEQ ID NO: 34).

Beispiel 14: Reinigen des Proteins PLH1

[0055] Die Biomasse, die aus dem mit pLH1 transformierten und bei 37°C gezüchteten E. coli-Stamm erhalten wurde, wurde in einer French-Press aufgeschlossen. Das rekombinante Protein wurde überwiegend als unlösliche Form erhalten, die mit dem Pellet des Zellaufschlusses assoziiert war. Das Protein wurde aus dem Pellet mit 7 M Harnstoff extrahiert und der Überstand, der das Protein PLH1 enthielt, auf eine G-25-Säule aufgetragen, um das chaotrope Mittel zu entfernen. Die erhaltene Fraktion wurde anschließend in Gegenwart von Cu⁺⁺-Ionen auf die Chelating-Sepharose-FF-Säule (Pharmacia, UK) aufgetragen. Das Protein wurde mit 60 mM Imidazol eluiert und das erhaltene Volumen auf eine G-25-Säule aufgetragen, wodurch schließlich das Protein im Formulierungspuffer (PBS) erhalten wurde. Dieses Präparat wurde für immunologische Studien verwendet.

Beispiel 15: Antigen-Charakterisierung von PLH1

[0056] Die gereinigte Fraktion von PLH1 wurde durch seine Erkennung durch unterschiedliche polyclonale Seren und/oder murine monoclonale Antikörper und auch durch positive menschliche Seren gegen Dengue charakterisiert (Tabelle 16).

[0057] Die stärkste Erkennung im Dot-Blotting wurde jeweils mit den HMAF-Anti-DEN-1 erhalten. Die Erkennung durch HMAF gegen die anderen Serotypen war weniger stark ausgeprägt als im Fall von Serotyp 1. Die durch andere Flaviviren, wie Gelbfieber-Virus und Saint-Louis-Enzephalitis-Virus, erzeugten Antikörper zeigten keinerlei Erkennung. Schließlich wurde die Reaktivität gegen drei menschliche Seren mit hohen Titern und drei mit niedrigen Titern gegen DEN-1 gemessen, wobei in beiden Fällen durch Western-Blotting und Dot-Blotting ein wesentliches Signal erhalten wurde.

Tabelle 16: Reaktivität des Proteins PLH1 gegen monoclonale und glyclonale Antikörper

Antikörper**	Spezifität***	PLH1*
HMAF	DEN-1	++
HMAF	DEN-2	+
HMAF	DEN-3	-
HMAF	DEN-4	-
HMAF	EEE	-
HMAF	YFV	-
HMAF	SLV	-
mAb 3H5	NT	-

* Insgesamt wurden 10 µg des gereinigten PLH1 angewendet. Die Intensität des erhaltenen Signals wurde mit + bis ++ bewertet.

** HMAF wurden in der Verdünnung 1:100 verwendet, während der mAb 3H5 in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt wurde.

*** EEE: Pferde-Enzephalitis-Virus; YFV: Gelbfieber-Virus; SLV: Saint-Louis-Enzephalitis-Virus; NT: Neutralisiert spezifischen Serotyp.

Beispiel 16: Charakterisieren der durch PLH1 erzeugten Antikörperantwort

[0058] Insgesamt 25 Balb/c-Mäuse wurden mit 35 µg des gereinigten PLH1 in Freundschem Adjuvans i.p. immunisiert; von zehn Tieren wurde nach vier Dosen Blut abgenommen und die Anti-DEN-Antikörper durch ELISA bestimmt. Hohe Antikörpertiter gegen DEN-1 wurden erhalten, während gegen die restlichen Serotypen keine Reaktivität erhalten wurde (Tabelle 17 und Tabelle 20). Außerdem wurde der Hämagglutinations-Hemmtest (HIA) durchgeführt, wobei nur positive Titer gegen DEN-1 gefunden wurden (Tabelle 18 und Tabelle 20). Schließlich wurde der in vitro-Neutralisationstest durchgeführt, wobei Neutralisationstiter gegen DEN-1 von 1:320 erhalten wurden. Jedoch wurde keine Neutralisation der Virusinfektion gegen die restlichen Serotypen gefunden (Tabelle 19 und Tabelle 20). Diese Ergebnisse zeigen die hohe Serotyp-Spezifität der durch PLH1 hervorgebrachten Antikörper.

Tabelle 17: Antikörpertiter gegen DEN-1 der Seren die nach Immunisieren von Mäusen mit PLH1 erhalten wurden

Maus	Titer von Anti-DEN-1 (PLH1)	Titer von Anti-DEN-1 PBS Kontrolle (-)
1	1:64 000	< 1:100
2	1:128 000	< 1:100
3	1:64 000	< 1:100
4	1:32 000	< 1:100
5	1:32 000	< 1:100
6	1:64 000	< 1:100
7	1:128 000	< 1:100
8	1:64 000	< 1:100
9	1:128 000	< 1:100
10	1:128 000	< 1:100

Tabelle 18: HI-Titer der Seren aus den mit PLH1 immunisierten Tieren

Maus	HI*-Titer von Anti-DEN-1 (PLH1)	HI*-Titer von Anti-DEN-1 PBS Kontrolle (-)
1	> 1:640	< 1:5
2	1:320	< 1:5
3	> 1:640	< 1:5
4	> 1:640	< 1:5
5	> 1:640	< 1:5
6	1:320	< 1:5
7	1:40	< 1:5
8	1:320	< 1:5
9	> 1:640	< 1:5
10	< 1:5	< 1:5

* Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

Tabelle 19: Virus-Neutralisationstest mit den Seren von mit PLH1 immunisierten Tieren

Maus	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-1 (PLH1)	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-1 PBS Kontrolle (-)
1	1:80	< 1:5
2	1:320	< 1:5
3	1:40	< 1:5
4	1:320	< 1:5
5	1:80	< 1:5
6	1:160	< 1:5
7	1:320	< 1:5
8	1:320	< 1:5
9	1:320	< 1:5
10	1:320	< 1:5

* Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Tabelle 20: Test auf Kreuzreaktivität gegen alle viralen Serotypen durch ELISA, HI und Virus-Neutralisation mit den Seren von mit PLH1 immunisierten Tieren

Gemisch von Seren*	ELISA (Anti-DEN-1)	ELISA (Anti-DEN-2)	ELISA (Anti-DEN-3)	ELISA (Anti-DEN-4)
1 (PLH1)	1:128 000	< 1:100	< 1:100	< 1:100
2 (PLH1)	> 1:128 000	< 1:100	< 1:100	< 1:100

Gemisch von Seren*	HI** Anti-DEN-1	HI Anti-DEN-2	HI Anti-DEN-3	HI Anti-DEN-4
PLH1	> 1:320	< 1:5	< 1:5	< 1:5

Gemisch von Seren*	Neutralis. Titer*** Anti-DEN-1	Neutralis. Titer*** Anti-DEN-2	Neutralis. Titer*** Anti-DEN-3	Neutralis. Titer*** Anti-DEN-4
1 (PLH1)	1:160	< 1:5	< 1:5	< 1:5
2 (PLH1)	1:320	< 1:5	< 1:5	< 1:5

* Jedes Gemisch bestand aus drei Seren.

** Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

*** Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Beispiel 17: Erhalten von pLH2

[0059] Die Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuren von 286 bis 426 des Hüllproteins des DEN-1-Virus codiert (SEQ ID NO: 32), wurde mit den im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO: 6 und SEQ ID NO: 8 bezeichneten Oligonucleotiden aus dem DEN-1-Virusstamm amplifiziert (Chu, M. C., O'Rourke, E. J., Trent, D. W., Genetic relatedness among structural protein genes of dengue 1 virus strains, J. Gen. Virol. 1989, 70: 1701–1712).

[0060] Der Vektor wurde durch Spalten des Plasmids pM84 His mit XbaI/EcoRI erzeugt, welches die Nucleotidsequenz enthält, die das MDH-Protein und eine Sequenz von sechs Histidinresten codiert (SEQ ID NO: 26). Diese Spaltung macht die Insertion des durch PCR amplifizierten Fragments innerhalb der codierenden Region für eine Strukturdomäne des MDH-Proteins möglich. Nach dem Ligieren wurden die möglichen Rekombinanten durch Restriktionsenzymspaltung analysiert und positive Clone sequenziert, um die Übergänge zu überprüfen. Die kompetenten Zellen MM294 wurden mit dem ausgewählten Clon, der mit pLH2 bezeichnet wurde (Fig. 5 und SEQ ID NO: 35), transformiert. Nachdem die Kolonie in LB-Medium gezüchtet worden war, wurde eine SDS-PAGE des Zellysats durchgeführt. Als Ergebnis wurde eine 80-kDa-Bande erhalten, die 20 % der gesamten zellulären Proteine ausmachte. Die Größe des erhaltenen Proteins entsprach der Summe der Größe des MDH-Proteins und des DENE-Proteinfragments aus dem DEN-1-Virus. Das Protein wurde im Immunblotting durch HMAF-Anti-DEN-1 erkannt und mit pLH2 bezeichnet (SEQ ID NO: 36).

Beispiel 18: Reinigen des Proteins PLH2

[0061] Die Biomasse, die aus dem mit pLH2 transformierten und bei 37°C gezüchteten E. coli-Stamm erhalten wurde, wurde in einer French-Press aufgeschlossen. Das rekombinante Protein wurde in beiden Formen, der löslichen und der unlöslichen Form, erhalten. Das mit der unlöslichen Fraktion assoziierte Protein wurde unter Verwendung von 7 M Harnstoff extrahiert und der Überstand, der das Protein PLH2 enthielt, auf eine G-25-Säule aufgetragen, um das chaotrope Mittel zu entfernen. Die erhaltene Fraktion wurde anschließend in Gegenwart von Cu⁺⁺-Ionen auf die Chelating-Sepharose-FF-Säule (Pharmacia, UK) aufgetragen. Die Säule wurde mit 40 mM Imidazol gewaschen und das Protein mit 100 mM Imidazol eluiert. Schließlich wurde die reine

Fraktion auf eine G-25-Säule aufgetragen, wodurch das Protein im Formulierungspuffer (PBS) erhalten wurde. Dieses Präparat wurde für immunologische Studien verwendet.

Beispiel 19: Antigen-Charakterisierung von PLH2

[0062] Die gereinigte Fraktion von PLH2 wurde durch seine Erkennung durch unterschiedliche polyclonale Seren und/oder murine monoclonale Antikörper und auch durch positive menschliche Seren gegen Dengue charakterisiert (Tabelle 21).

[0063] Die stärkste Erkennung im Dot-Blotting wurde jeweils mit den HMAF-Anti-DEN-1 erhalten (wobei diese stärker ausgeprägt waren als diejenigen, die mit PLH1 erhalten wurden). Die Erkennung durch HMAF gegen die anderen Serotypen war weniger stark ausgeprägt als im Fall von Serotyp 1. Die durch andere Flaviviren, wie Gelbfieber-Virus und Saint-Louis-Enzephalitis-Virus, erzeugten Antikörper zeigten keinerlei Erkennung. Schließlich wurde die Reaktivität gegen fünf menschliche Seren mit hohen Titern und drei mit niedrigen Titern gegen DEN-1 gemessen, wobei in beiden Fällen durch Western-Blotting und Dot-Blotting ein wesentliches Signal erhalten wurde.

Tabelle 21: Reaktivität des Proteins PLH2 gegen monoclonale und golyclonale Antikörper

Antikörper**	Spezifität***	PLH2*
HMAF	DEN-1	+++
HMAF	DEN-2	+
HMAF	DEN-3	-
HMAF	DEN-4	-
HMAF	EEE	-
HMAF	YFV	-
HMAF	SLV	-
mAb 3H5	NT	-

* Insgesamt wurden 10 µg des gereinigten PLH2 angewendet. Die Intensität des erhaltenen Signals wurde mit + bis ++ bewertet.

** HMAF wurden in der Verdünnung 1:100 verwendet, während der mAb 3H5 in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt wurde.

*** EEE: Pferde-Enzephalitis-Virus; YFV: Gelbfieber-Virus; SLV: Saint-Louis-Enzephalitis-Virus; NT: Neutralisiert spezifischen Serotyp.

Beispiel 20: Charakterisieren der durch PLH2 erzeugten Antikörperantwort

[0064] Insgesamt 25 Balb/c-Mäuse wurden mit 20 µg des gereinigten PLH2 in Freundschem Adjuvans i.p. immunisiert; von zehn Tieren wurde nach vier Dosen Blut abgenommen und die Anti-DEN-Antikörper durch ELISA bestimmt. Hohe Antikörpertiter gegen DEN-1 wurden erhalten, während gegen die restlichen Serotypen keine Reaktivität erhalten wurde (Tabelle 22 und Tabelle 25). Außerdem wurde der Hämagglutinations-Hemmtest (HIA) durchgeführt, wobei nur positive Titer gegen DEN-1 gefunden wurden (Tabelle 23 und Tabelle 25). Schließlich wurde der in vitro-Neutralisationstest durchgeführt, wobei Neutralisationstiter gegen DEN-1 von 1:1280 erhalten wurden (Tabelle 24). Keine Neutralisation der Virusinfektion wurde gegen die restlichen Serotypen gefunden (Tabelle 25).

Tabelle 22: Antikörpertiter gegen DEN-1 der Seren, die nach Immunisieren von Mäusen mit PLH2 erhalten wurden

Maus	Titer von Anti-DEN-1 (PLH2)	Titer von Anti-DEN-1 PBS Kontrolle (-)
1	1:128 000	< 1:100
2	> 1:128 000	< 1:100
3	1:64 000	< 1:100
4	> 1:128 000	< 1:100
5	1:128 000	< 1:100
6	1:64 000	< 1:100
7	> 1:128 000	< 1:100
8	1:128 000	< 1:100
9	> 1:128 000	< 1:100
10	> 1:128 000	< 1:100

Tabelle 23: HI-Titer der Seren aus den mit PLH2 immunisierten Tieren

Maus	HI*-Titer von Anti-DEN-1 (PLH2)	HI-Titer von Anti-DEN-1 PBS Kontrolle (-)
1	< 1:5	< 1:5
2	> 1:640	< 1:5
3	1:320	< 1:5
4	1:320	< 1:5
5	> 1:640	< 1:5
6	> 1:640	< 1:5
7	> 1:640	< 1:5
8	1:320	< 1:5
9	> 1:640	< 1:5
10	< 1:5	< 1:5

* Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

Tabelle 24: Virus-Neutralisationstest mit den Seren von mit PLH2 immunisierten Tieren

Maus	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-1 (PLH2)	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-1 Kontrolle (-)
1	> 1:1280	< 1:5
2	> 1:1280	< 1:5
3	> 1:1280	< 1:5
4	> 1:1280	< 1:5
5	> 1:1280	< 1:5
6	> 1:1280	< 1:5
7	> 1:1280	< 1:5
8	> 1:1280	< 1:5
9	1:640	< 1:5
10	> 1:1280	< 1:5

* Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Tabelle 25: Test auf Kreuzreaktivität gegen alle viralen Serotypen durch ELISA, HI und Virus-Neutralisation mit den Seren von mit PLH2 immunisierten Tieren

Gemisch von Seren*	ELISA (Anti-DEN-1)	ELISA (Anti-DEN-2)	ELISA (Anti-DEN-3)	ELISA (Anti-DEN-4)
1 (PLH2)	1:64 000	< 1:100	< 1:100	< 1:100
2 (PLH2)	> 1:128 000	< 1:100	< 1:100	< 1:100

Gemisch von Seren*	HI** Anti-DEN-1	HI Anti-DEN-2	HI Anti-DEN-3	HI Anti-DEN-4
PLH2	> 1:320	< 1:5	< 1:5	< 1:5

Gemisch von Seren*	Neutralis. Titer*** Anti-DEN-1	Neutralis. Titer Anti-DEN-2	Neutralis. Titer Anti-DEN-3	Neutralis. Titer Anti-DEN-4
1 (PLH2)	> 1:1280	< 1:5	< 1:5	< 1:5
2 (PLH2)	> 1:1280	< 1:5	< 1:5	< 1:5

* Jedes Gemisch bestand aus drei Seren.

** Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

*** Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Beispiel 21: Erhalten von pLH3

[0065] Die Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuren von 286 bis 426 des Hüllproteins des DEN-1-Virus codiert (SEQ ID NO: 32), wurde mit den im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO: 9 und SEQ ID NO: 10 bezeichneten Oligonucleotiden aus dem DEN-1-Virusstamm amplifiziert (Chu, M. C., O'Rourke, E. J., Trent, D. W., Genetic relatedness among structural protein genes of dengue 1 virus strains, J. Gen. Virol. 1989, 70: 1701–1712).

[0066] Der Vektor wurde durch Spalten des Plasmids pD4 mit BamHI/BamHI erzeugt, welches die Nucleotidsequenz enthält, die das MDH-Protein und eine Sequenz von sechs Histidinresten, ohne Stopp-Codon, codiert (SEQ ID NO: 29). Diese Spaltung macht die Fusion des durch PCR amplifizierten Fragments hinter der C-terminalen Region des MDH-Proteins möglich. Nach dem Ligieren wurden die möglichen Rekombinanten durch Restriktionsenzymspaltung analysiert und positive Clone sequenziert, um die Übergänge zu überprüfen. Die kompetenten Zellen W3110 wurden mit dem ausgewählten Clon, der mit pLH3 bezeichnet wurde (Fig. 6 und SEQ ID NO: 37), transformiert. Nachdem die Kolonie in LB-Medium gezüchtet worden war, wurde eine SDS-PAGE des Zellysats durchgeführt. Als Ergebnis wurde eine 80-kDa-Bande erhalten, die 20 % der gesamten zellulären Proteine ausmachte. Die Größe des erhaltenen Proteins entsprach der Summe der Größe des MDH-Proteins und des DENE-Proteinfragments aus dem DEN-1-Virus. Das Protein wurde im Immunblotting durch HMAF-Anti-DEN-1 erkannt und mit PLH3 bezeichnet (SEQ ID NO: 38).

Beispiel 22: Reinigen des Proteins PLH3

[0067] Die Biomasse, die aus dem mit pLH3 transformierten und bei 37°C gezüchteten E. coli-Stamm erhalten wurde, wurde in einer French-Press aufgeschlossen. Das rekombinante Protein wurde in beiden Formen, der löslichen und der unlöslichen Form, erhalten. Das Protein wurde aus der unlöslichen Fraktion unter Verwendung von 6 M Harnstoff extrahiert und der Überstand, der das Protein PLH3 enthielt, auf eine G-25-Säule aufgetragen, um das chaotrope Mittel zu entfernen. Die erhaltene Fraktion wurde anschließend in Gegenwart von Cu⁺⁺-Ionen auf die Chelating-Sepharose-FF-Säule (Pharmacia, UK) aufgetragen. Die Säule wurde mit 30 mM Imidazol gewaschen und das Protein mit 250 mM Imidazol eluiert. Schließlich wurde die reine Fraktion auf eine G-25-Säule aufgetragen, wodurch das Protein im Formulierungspuffer (PBS) erhalten wurde. Dieses Präparat wurde für immunologische Studien verwendet.

Beispiel 23: Antigen-Charakterisierung von PLH3

[0068] Die gereinigte Fraktion von PLH3 wurde durch seine Erkennung durch unterschiedliche polyclonale Seren und/oder murine monoclonale Antikörper und auch durch positive menschliche Seren gegen Dengue charakterisiert (Tabelle 26).

[0069] Die stärkste Erkennung im Dot-Blotting wurde jeweils mit den HMAF-Anti-DEN-1 erhalten. Die Erkennung durch HMAF gegen die anderen Serotypen war weniger stark ausgeprägt als im Fall von Serotyp 1. Die durch andere Flaviviren, wie Gelbfieber-Virus und Saint-Louis-Enzephalitis-Virus, erzeugten Antikörper zeigten keinerlei Erkennung. Schließlich wurde die Reaktivität gegen drei menschliche Seren mit hohen Titern und drei mit niedrigen Titern gegen DEN-1 gemessen, wobei in beiden Fällen durch Western-Blotting und Dot-Blotting ein wesentliches Signal erhalten wurde.

Tabelle 26: Reaktivität des Proteins PLH3 gegen monoclonale und polyclonale Antikörper

Antikörper**	Spezifität***	PLH3*
HMAF	DEN-1	+++
HMAF	DEN-2	+
HMAF	DEN-3	-
HMAF	DEN-4	-
HMAF	EEE	-
HMAF	YFV	-
HMAF	SLV	-
mAb 3H5	NT	-

* Insgesamt wurden 10 µg des gereinigten PLH3 angewendet. Die Intensität des erhaltenen Signals wurde mit + bis ++ bewertet.

** HMAF wurden in der Verdünnung 1:100 verwendet, während der mAb 3H5 in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt wurde.

*** EEE: Pferde-Enzephalitis-Virus; YFV: Gelbfieber-Virus; SLV: Saint-Louis-Enzephalitis-Virus; NT: Neutralisiert spezifischen Serotyp.

Beispiel 24: Charakterisieren der durch PLH3 erzeugten Antikörperantwort

[0070] Insgesamt 25 Balb/c-Mäuse wurden mit 20 µg des gereinigten PLH3 in Freundschem Adjuvans i.p. immunisiert; von zehn Tieren wurde nach vier Dosen Blut abgenommen und die Anti-DEN-Antikörper durch ELISA bestimmt. Hohe Antikörpertiter gegen DEN-1 wurden erhalten, während gegen die restlichen Serotypen keine Reaktivität erhalten wurde (Tabelle 27 und Tabelle 30). Außerdem wurde der Hämagglutinations-Hemmtest (HIA) durchgeführt, wobei nur positive Titer gegen DEN-1 gefunden wurden (Tabelle 28 und Tabelle 30). Schließlich wurde der in vitro-Neutralisationstest durchgeführt, wobei Neutralisationstiter gegen DEN-1 von 1:1280 erhalten wurden (Tabelle 29). Keine Neutralisation der Virusinfektion wurde gegen die restlichen Serotypen gefunden (Tabelle 30).

Tabelle 27: Antikörpertiter gegen DEN-1 der Seren, die nach Immunisieren von Mäusen mit PLH3 erhalten wurden

Maus	Titer von Anti-DEN-1 PLH3	Titer von Anti-DEN-1 PBS Kontrolle (-)
1	1:64 000	< 1:100
2	> 1:128 000	< 1:100
3	1:64 000	< 1:100
4	> 1:128 000	< 1:100
5	1:128 000	< 1:100
6	1:128 000	< 1:100
7	1:128 000	< 1:100
8	> 1:128 000	< 1:100
9	1:64 000	< 1:100
10	> 1:128 000	< 1:100

Tabelle 28: HI-Titer der Seren aus den mit PLH3 immunisierten Tieren

Maus	HI*-Titer von Anti-DEN-1 PLH3	HI-Titer von Anti-DEN-1 PBS Kontrolle (-)
1	1:320	< 1:5
2	> 1:640	< 1:5
3	> 1:640	< 1:5
4	1:320	< 1:5
5	1:320	< 1:5
6	> 1:640	< 1:5
7	1:320	< 1:5
8	< 1:5	< 1:5
9	> 1:640	< 1:5
10	> 1:640	< 1:5

* Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

Tabelle 29: Virus-Neutralisationstest mit den Seren von mit PLH3 immunisierten Tieren

Maus	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-1 PLH3	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-1 PBS Kontrolle (-)
1	> 1:1280	< 1:5
2	> 1:1280	< 1:5
3	> 1:1280	< 1:5
4	1:640	< 1:5
5	1:640	< 1:5
6	> 1:1280	< 1:5
7	> 1:1280	< 1:5
8	> 1:1280	< 1:5
9	> 1:1280	< 1:5
10	> 1:1280	< 1:5

* Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Tabelle 30: Test auf Kreuzreaktivität gegen alle viralen Serotypen durch ELISA, HI und Virus-Neutralisation mit den Seren von mit PLH3 immunisierten Tieren

Gemisch von Seren*	ELISA (Anti-DEN-1)	ELISA (Anti-DEN-2)	ELISA (Anti-DEN-3)	ELISA (Anti-DEN-4)
1 (PLH3)	1:128 000	< 1:100	< 1:100	< 1:100
2 (PLH3)	> 1:128 000	< 1:100	< 1:100	< 1:100

Gemisch von Seren*	HI** Anti-DEN-1	HI Anti-DEN-2	HI Anti-DEN-3	HI Anti-DEN-4
PLH3	> 1:320	< 1:5	< 1:5	< 1:5

Gemisch von Seren*	Neutralis. Titer*** Anti-DEN-1	Neutralis. Titer Anti-DEN-2	Neutralis. Titer Anti-DEN-3	Neutralis. Titer Anti-DEN-4
1 (PLH3)	> 1:1280	< 1:5	< 1:5	< 1:5
2 (PLH3)	> 1:1280	< 1:5	< 1:5	< 1:5

* Jedes Gemisch bestand aus drei Seren.

** Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

*** Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Beispiel 25: Erhalten von pAZ1

[0071] Die Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuren von 286 bis 426 des Hüllproteins des DEN-3-Virus codiert (SEQ ID NO: 39), wurde mit den im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO: 11 und SEQ ID NO: 12 bezeichneten Oligonucleotiden aus dem DEN-3-Virusstamm Genotyp amplifiziert (Osatomi, K., Sumiyoshi, H., Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genome RNA, *Virology* 1990, 176 (2): 643–647).

[0072] Der Vektor wurde durch Spalten des Plasmids pM108 His mit XbaI/BamHI erzeugt, welches die Nucleotidsequenz enthält, die die N-terminale Region der MDH und eine Sequenz von sechs Histidinresten codiert (SEQ ID NO: 23). Nach dem Ligieren wurden die möglichen Rekombinanten durch Restriktionsenzymspaltung analysiert und positive Clon sequenziert, um die Übergänge zu überprüfen. Die kompetenten Zellen W3110 wurden mit dem ausgewählten Clon, der mit pAZ1 bezeichnet wurde ([Fig. 7](#) und SEQ ID NO: 40), transformiert. Nachdem die Kolonie in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) gezüchtet worden war, wurde eine SDS-PAGE des Zelllysats durchgeführt. Als Ergebnis wurde eine 25-kDa-Bande erhalten, die 10 % der gesamten zellulären Proteine ausmachte. Die Größe des erhaltenen Proteins entsprach der Summe der N-terminalen Region des MDH-Proteins und des DENE-Proteinfragments aus dem DEN-3-Virus. Das Protein wurde im Immunblotting durch die in den HMAF enthaltenen polyclonalen Antikörper (pA) Anti-DEN-3 erkannt. Dieses Protein wurde mit PAZ1 bezeichnet (SEQ ID NO: 41).

Beispiel 26: Reinigen des Proteins PAZ1

[0073] Die Biomasse, die aus dem mit pAZ1 transformierten und bei 37°C gezüchteten E. coli-Stamm erhalten wurde, wurde in einer French-Press aufgeschlossen. Das rekombinante Protein wurde größtenteils als unlösliche Form erhalten, die mit dem Pellet des Zellaufschlusses assoziiert war. Das Protein wurde aus dem Pellet mit 7 M Harnstoff extrahiert und der Überstand, der das Protein PLH1 enthielt, auf eine G-25-Säule aufgetragen, um das chaotrope Mittel zu entfernen. Die erhaltene Fraktion wurde anschließend in Gegenwart von Cu⁺⁺-Ionen auf die Chelating-Sepharose-FF-Säule (Pharmacia, UK) aufgetragen. Das Protein wurde mit 60 mM Imidazol eluiert und das erhaltene Volumen auf eine G-25-Säule aufgetragen, wodurch schließlich das Protein im Formulierungspuffer (PBS) erhalten wurde. Dieses Präparat wurde für immunologische Studien ver-

wendet.

Beispiel 27: Antigen-Charakterisierung von PAZ1

[0074] Die gereinigte Fraktion von PAZ1 wurde durch seine Erkennung durch unterschiedliche polyclonale Seren und/oder murine monoclonale Antikörper und auch durch positive menschliche Seren gegen Dengue charakterisiert (Tabelle 31).

[0075] Die stärkste Erkennung im Dot-Blotting wurde jeweils mit den HMAF-Anti-DEN-3 erhalten. Die Erkennung durch HMAF gegen die anderen Serotypen war weniger stark ausgeprägt als im Fall von Serotyp 3. Die durch andere Flaviviren, wie Gelbfieber-Virus und Saint-Louis-Enzephalitis-Virus, erzeugten Antikörper zeigten keinerlei Erkennung. Schließlich wurde die Reaktivität gegen drei menschliche Seren mit hohen Titern und drei mit niedrigen Titern gegen DEN-3 gemessen, wobei in beiden Fällen durch Dot-Blotting und Western-Blotting ein wesentliches Signal erhalten wurde.

Tabelle 31: Reaktivität des Proteins PAZ1 gegen monoclonale und polyclonale Antikörper

Antikörper**	Spezifität***	PAZ1*
HMAF	DEN-1	-
HMAF	DEN-2	+
HMAF	DEN-3	++
HMAF	DEN-4	+
HMAF	EEE	-
HMAF	YFV	-
HMAF	SLV	-
mAb 3H5	NT	-

* Insgesamt wurden 10 µg des gereinigten PAZ1 angewendet. Die Intensität des erhaltenen Signals wurde mit + bis ++ bewertet.

** HMAF wurden in der Verdünnung 1:100 verwendet, während der mAb 3H5 in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt wurde.

*** EEE: Pferde-Enzephalitis-Virus; YFV: Gelbfieber-Virus; SLV: Saint-Louis-Enzephalitis-Virus; NT: Neutralisiert spezifischen Serotyp.

Beispiel 28: Charakterisieren der durch PAZ1 erzeugten Antikörperantwort

[0076] Insgesamt 25 Balb/c-Mäuse wurden mit 35 µg des gereinigten PAZ1 in Freundschem Adjuvans i.p. immunisiert; von zehn Tieren wurde nach vier Dosen Blut abgenommen und die Anti-DEN-Antikörper durch ELISA bestimmt. Hohe Antikörpertiter gegen DEN-1 wurden erhalten, während gegen die restlichen Serotypen keine Reaktivität erhalten wurde (Tabelle 32 und Tabelle 35). Außerdem wurde der Hämagglutinations-Hemmtest (HIA) durchgeführt, wobei nur positive Titer gegen DEN-3 gefunden wurden (Tabelle 33 und Tabelle 35). Schließlich wurde der in vitro-Neutralisationstest durchgeführt, wobei Neutralisationstiter gegen DEN-3 von 1:320 erhalten wurden. Jedoch wurde keine Neutralisation der Virusinfektion gegen die restlichen Serotypen gefunden (Tabelle 34 und Tabelle 35). Diese Ergebnisse zeigen die hohe Serotyp-Spezifität der durch PAZ1 hervorgebrachten Antikörper.

Tabelle 32: Antikörpertiter gegen DEN-3 der Seren, die nach Immunisieren von Mäusen mit PAZ1 erhalten wurden

Maus	Titer von Anti-DEN-3 PAZ1	Titer von Anti-DEN-3 PBS Kontrolle (-)
1	1:64 000	< 1:100
2	1:128 000	< 1:100
3	1:32 000	< 1:100
4	1:64 000	< 1:100
5	1:64 000	< 1:100
6	1:128 000	< 1:100
7	1:64 000	< 1:100
8	1:64 000	< 1:100
9	1:128 000	< 1:100
10	1:128 000	< 1:100

Tabelle 33: HI-Titer der Seren aus den mit PAZ1 immunisierten Tieren

Maus	HI*-Titer von Anti-DEN-3 PAZ1	HI-Titer von Anti-DEN-3 PBS Kontrolle (-)
1	> 1:640	< 1:5
2	1:320	< 1:5
3	1:320	< 1:5
4	1:640	< 1:5
5	< 1:5	< 1:5
6	1:320	< 1:5
7	< 1:5	< 1:5
8	1:320	< 1:5
9	> 1:640	< 1:5
10	> 1:640	< 1:5

* Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

Tabelle 34: Virus-Neutralisationstest mit den Seren von mit PAZ1 immunisierten Tieren

Maus	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-3 PAZ1	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-3 PBS Kontrolle (-)
1	1:160	< 1:5
2	1:320	< 1:5
3	1:320	< 1:5
4	1:320	< 1:5
5	1:40	< 1:5
6	1:40	< 1:5
7	1:320	< 1:5
8	1:320	< 1:5
9	1:160	< 1:5
10	1:320	< 1:5

* Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Tabelle 35: Test auf Kreuzreaktivität gegen alle viralen Serotypen durch ELISA, HI und Virus-Neutralisation mit den Seren von mit PAZ1 immunisierten Tieren

Gemisch von Seren*	ELISA (Anti-DEN-1)	ELISA (Anti-DEN-2)	ELISA (Anti-DEN-3)	ELISA (Anti-DEN-4)
1 (PAZ1)	< 1:100	< 1:100	1:64 000	< 1:100
2 (PAZ1)	< 1:100	< 1:100	> 1:128 000	< 1:100

Gemisch von Seren*	HI** Anti-DEN-1	HI Anti-DEN-2	HI Anti-DEN-3	HI Anti-DEN-4
PAZ1	< 1:5	< 1:5	> 1:320	< 1:5

Gemisch von Seren*	Neutralis. Titer*** Anti-DEN-1	Neutralis. Titer Anti-DEN-2	Neutralis. Titer Anti-DEN-3	Neutralis. Titer Anti-DEN-4
1 (PAZ1)	< 1:5	< 1:5	1:320	< 1:5
2 (PAZ1)	< 1:5	< 1:5	1:320	< 1:5

* Jedes Gemisch bestand aus drei Seren.

** Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

*** Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Beispiel 29: Erhalten von pAZ2

[0077] Die Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuren von 286 bis 426 des Hüllproteins des DEN-3-Virus codiert (SEQ ID NO: 39), wurde mit den im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO: 11 und SEQ ID NO: 13 bezeichneten Oligonucleotiden aus dem DEN-3-Virusstamm amplifiziert (Osatomi, K., Sumiyoshi, H., Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genome RNA, *Virology* 1990, 176 (2): 643–647).

[0078] Der Vektor wurde durch Spalten des Plasmids pM84 His mit XbaI/EcoRI erzeugt, welches die Nucleotidsequenz enthält, die das MDH-Protein und eine Sequenz von sechs Histidinresten codiert (SEQ ID NO: 26). Diese Spaltung macht die Insertion des durch PCR amplifizierten Fragments innerhalb der codierenden Region einer Strukturdomäne des MDH-Proteins möglich. Nach dem Ligieren wurden die möglichen Rekombinanten durch Restriktionsenzymspaltung analysiert und positive Clone sequenziert, um die Übergänge zu überprüfen. Die kompetenten Zellen MM294 wurden mit dem ausgewählten Clon, der mit pAZ2 bezeichnet wurde ([Fig. 8](#) und SEQ ID NO: 42), transformiert. Nachdem die Kolonie in LB-Medium gezüchtet worden war, wurde eine SDS-PAGE des Zelllysats durchgeführt. Als Ergebnis wurde eine 80-kDa-Bande erhalten, die 20 % der gesamten zellulären Proteine ausmachte. Die Größe des erhaltenen Proteins entsprach der Summe der Größe des MDH-Proteins und des DENE-Proteinfragments aus dem DEN-3-Virus. Das Protein wurde im Immunblotting durch HMAF-Anti-DEN-3 erkannt und mit PAZ2 bezeichnet (SEQ ID NO: 43).

Beispiel 30: Reinigen des Proteins PAZ2

[0079] Die Biomasse, die aus dem mit pAZ2 transformierten und bei 37°C gezüchteten E. coli-Stamm erhalten wurde, wurde in einer French-Press aufgeschlossen. Das rekombinante Protein wurde in beiden Formen, der löslichen und der unlöslichen Form, erhalten. Das mit der unlöslichen Fraktion assoziierte Protein wurde unter Verwendung von 7 M Harnstoff extrahiert und der Überstand, der das Protein PAZ2 enthielt, auf eine G-25-Säule aufgetragen, um das chaotrope Mittel zu entfernen. Die erhaltene Fraktion wurde anschließend in Gegenwart von Cu⁺⁺-Ionen auf die Chelating-Sepharose-FF-Säule (Pharmacia, UK) aufgetragen. Die Säule wurde mit 40 mM Imidazol gewaschen und das Protein mit 100 mM Imidazol eluiert. Schließlich wurde die reine Fraktion auf eine G-25-Säule aufgetragen, wodurch das Protein im Formulierungspuffer (PBS) erhalten wurde. Dieses Präparat wurde für immunologische Studien verwendet.

Beispiel 31: Antigen-Charakterisierung von PAZ2

[0080] Die gereinigte Fraktion von PAZ2 wurde durch seine Erkennung durch unterschiedliche polyclonale Seren und/oder murine monoclonale Antikörper und auch durch positive menschliche Seren gegen Dengue charakterisiert (Tabelle 36).

[0081] Die stärkste Erkennung im Dot-Blotting wurde jeweils mit den HMAF-Anti-DEN-3 erhalten (wobei diese stärker ausgeprägt waren als diejenigen, die mit PAZ1 erhalten wurden). Die Erkennung durch HMAF gegen die anderen Serotypen war weniger stark ausgeprägt als im Fall von Serotyp 3. Die durch andere Flaviviren, wie Gelbfieber-Virus und Saint-Louis-Enzephalitis-Virus, erzeugten Antikörper zeigten keinerlei Erkennung. Schließlich wurde die Reaktivität gegen fünf menschliche Seren mit hohen Titern und drei mit niedrigen Titern gegen DEN-3 gemessen, wobei in beiden Fällen durch Western-Blotting und Dot-Blotting ein wesentliches Signal erhalten wurde.

Tabelle 36: Reaktivität des Proteins PAZ2 gegen monoclonale und polyclonale Antikörper

Antikörper**	Spezifität***	PAZ2*
HMAF	DEN-1	-
HMAF	DEN-2	-
HMAF	DEN-3	+++
HMAF	DEN-4	+
HMAF	EEE	-
HMAF	YFV	-
HMAF	SLV	-
mAb 3H5	NT	-

* Insgesamt wurden 10 µg des gereinigten PAZ2 angewendet. Die Intensität des erhaltenen Signals wurde mit + bis ++ bewertet.

** HMAF wurden in der Verdünnung 1:100 verwendet, während der mAb 3H5 in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt wurde.

*** EEE: Pferde-Enzephalitis-Virus; YFV: Gelbfieber-Virus; SLV: Saint-Louis-Enzephalitis-Virus; NT: Neutralisiert spezifischen Serotyp.

Beispiel 32: Charakterisieren der durch PAZ2 erzeugten Antikörperantwort

[0082] Insgesamt 25 Balb/c-Mäuse wurden mit 20 µg des gereinigten PAZ2 in Freundschem Adjuvans i.p. immunisiert; von zehn Tieren wurde nach vier Dosen Blut abgenommen und die Anti-DEN-Antikörper durch ELISA bestimmt. Hohe Antikörpertiter gegen DEN-3 wurden erhalten, während gegen die restlichen Serotypen keine Reaktivität erhalten wurde (Tabelle 37 und Tabelle 40). Außerdem wurde der Hämagglutinations-Hemmtest (HIA) durchgeführt, wobei nur positive Titer gegen DEN-3 gefunden wurden (Tabelle 38 und Tabelle 40). Schließlich wurde der in vitro-Neutralisationstest durchgeführt, wobei Neutralisationstiter gegen DEN-3 von 1:1280 erhalten wurden (Tabelle 39). Keine Neutralisation der Virusinfektion wurde gegen die restlichen Serotypen gefunden (Tabelle 40).

Tabelle 37: Antikörpertiter gegen DEN-3 der Seren, die nach Immunisieren von Mäusen mit PAZ2 erhalten wurden

Maus	Titer von Anti-DEN-3 PAZ2	Titer von Anti-DEN-3 PBS Kontrolle (-)
1	> 1:128 000	< 1:100
2	1:128 000	< 1:100
3	> 1:128 000	< 1:100
4	> 1:128 000	< 1:100
5	1:128 000	< 1:100
6	> 1:128 000	< 1:100
7	1:64 000	< 1:100
8	> 1:128 000	< 1:100
9	1:64 000	< 1:100
10	> 1:128 000	< 1:100

Tabelle 38: HI-Titer der Seren aus den mit PAZ2 immunisierten Tieren

Maus	HI*-Titer von Anti-DEN-3 PAZ2	HI-Titer von Anti-DEN-3 PBS Kontrolle (-)
1	> 1:640	< 1:5
2	1:320	< 1:5
3	> 1:640	< 1:5
4	> 1:640	< 1:5
5	> 1:640	< 1:5
6	1:320	< 1:5
7	< 1:5	< 1:5
8	1:320	< 1:5
9	> 1:640	< 1:5
10	> 1:640	< 1:5

* Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

Tabelle 39: Virus-Neutralisationstest mit den Seren von mit PAZ2 immunisierten Tieren

Maus	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-3 PAZ2	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-3 PBS Kontrolle (-)
1	> 1:1280	< 1:5
2	> 1:1280	< 1:5
3	> 1:1280	< 1:5
4	> 1:1280	< 1:5
5	> 1:1280	< 1:5
6	1:640	< 1:5
7	> 1:1280	< 1:5
8	1:640	< 1:5
9	> 1:1280	< 1:5
10	1:640	< 1:5

* Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Tabelle 40: Test auf Kreuzreaktivität gegen alle viralen Serotypen durch ELISA, HI und Virus-Neutralisation mit den Seren von mit PAZ2 immunisierten Tieren

Gemisch von Seren*	ELISA (Anti-DEN-1)	ELISA (Anti-DEN-2)	ELISA (Anti-DEN-3)	ELISA (Anti-DEN-4)
1 (PAZ2)	< 1:100	< 1:100	> 1:128 000	< 1:100
2 (PAZ2)	< 1:100	< 1:100	> 1:128 000	< 1:100

Gemisch von Seren*	HI** Anti-DEN-1	HI Anti-DEN-2	HI Anti-DEN-3	HI Anti-DEN-4
PAZ2	< 1:5	< 1:5	> 1:320	< 1:5

Gemisch von Seren*	Neutralis. Titer*** Anti-DEN-1	Neutralis. Titer Anti-DEN-2	Neutralis. Titer Anti-DEN-3	Neutralis. Titer Anti-DEN-4
1 (PAZ2)	< 1:5	< 1:5	> 1:1280	< 1:5
2 (PAZ2)	< 1:5	< 1:5	> 1:1280	< 1:5

* Jedes Gemisch bestand aus drei Seren.

** Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

*** Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Beispiel 33: Erhalten von pAZ3

[0083] Die Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuren von 286 bis 426 des Hüllproteins des DEN-3-Virus codiert (SEQ ID NO: 39), wurde mit den im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO: 14 und SEQ ID NO: 15 bezeichneten Oligonucleotiden aus dem DEN-3-Virusstamm amplifiziert (Osatomi, K., Sumiyoshi, H., Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genome RNA, *Virology* 1990, 176 (2): 643–647).

[0084] Der Vektor wurde durch Spalten des Plasmids pD4 mit BamHI/BamHI erzeugt, welches die Nucleotidsequenz enthält, die das MDH-Protein und eine Sequenz von sechs Histidinresten, ohne Stopp-Codon, codiert (SEQ ID NO: 29). Diese Spaltung macht die Fusion des durch PCR amplifizierten Fragments hinter der C-terminalen Region des MDH-Proteins möglich. Nach dem Ligieren wurden die möglichen Rekombinanten durch Restriktionsenzymspaltung analysiert und positive Clone sequenziert, um die Übergänge zu überprüfen. Die kompetenten Zellen W3110 wurden mit dem ausgewählten Clon, der mit pAZ3 bezeichnet wurde ([Fig. 9](#) und SEQ ID NO: 44), transformiert. Nachdem die Kolonie in LB-Medium gezüchtet worden war, wurde eine SDS-PAGE des Zelllysats durchgeführt. Als Ergebnis wurde eine 80-kDa-Bande erhalten, die 20 % der gesamten zellulären Proteine ausmachte. Die Größe des erhaltenen Proteins entsprach der Summe der Größe des MDH-Proteins und des DENE-Proteinfragments aus dem DEN-3-Virus. Das Protein wurde im Immunblotting durch HMAF-Anti-DEN-3 erkannt und mit PAZ3 bezeichnet (SEQ ID NO: 45).

Beispiel 34: Reinigen des Proteins PAZ3

[0085] Die Biomasse, die aus dem mit pAZ3 transformierten und bei 37°C gezüchteten E. coli-Stamm erhalten wurde, wurde in einer French-Press aufgeschlossen. Das rekombinante Protein wurde in beiden Formen, der löslichen und der unlöslichen Form, erhalten. Das Protein wurde aus der unlöslichen Fraktion unter Verwendung von 7 M Harnstoff extrahiert und der Überstand, der das Protein PAZ3 enthielt, auf eine G-25-Säule aufgetragen, um das chaotrope Mittel zu entfernen. Die erhaltene Fraktion wurde anschließend in Gegenwart von Cu⁺⁺-Ionen auf die Chelating-Sepharose-FF-Säule (Pharmacia, UK) aufgetragen. Die Säule wurde mit 45 mM Imidazol gewaschen und das Protein mit 230 mM Imidazol eluiert. Schließlich wurde die reine Frak-

tion des Proteins auf eine G-25-Säule aufgetragen, wodurch das Protein im Formulierungspuffer (PBS) erhalten wurde. Dieses Präparat wurde für immunologische Studien verwendet.

Beispiel 35: Antigen-Charakterisierung von PAZ3

[0086] Die gereinigte Fraktion von PAZ3 wurde durch seine Erkennung durch unterschiedliche polyclonale Seren und/oder murine monoclonale Antikörper und auch durch positive menschliche Seren gegen Dengue charakterisiert (Tabelle 26).

[0087] Die stärkste Erkennung im Dot-Blotting wurde jeweils mit den HMAF-Anti-DEN-3 erhalten. Die Erkennung durch HMAF gegen die anderen Serotypen war weniger stark ausgeprägt als im Fall von Serotyp 3. Die durch andere Flaviviren, wie Gelbfieber-Virus und Saint-Louis-Enzephalitis-Virus, erzeugten Antikörper zeigten keinerlei Erkennung. Schließlich wurde die Reaktivität gegen drei menschliche Seren mit hohen Titern und drei mit niedrigen Titern gegen DEN-3 gemessen, wobei in beiden Fällen durch Dot-Blotting und Western-Blotting ein wesentliches Signal erhalten wurde.

Tabelle 41: Reaktivität des Proteins PAZ3 gegen monoclonale und polyclonale Antikörper

Antikörper**	Spezifität***	PAZ3*
HMAF	DEN-1	-
HMAF	DEN-2	-
HMAF	DEN-3	+++
HMAF	DEN-4	+
HMAF	EEE	-
HMAF	YFV	-
HMAF	SLV	-
mAb 3H5	NT	-

* Insgesamt wurden 10 µg des gereinigten PAZ3 angewendet. Die Intensität des erhaltenen Signals wurde mit + bis ++ bewertet.

** HMAF wurden in der Verdünnung 1:100 verwendet, während der mAb 3H5 in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt wurde.

*** EEE: Pferde-Enzephalitis-Virus; YFV: Gelbfieber-Virus; SLV: Saint-Louis-Enzephalitis-Virus; NT: Neutralisiert spezifischen Serotyp.

Beispiel 36: Charakterisieren der durch PAZ3 erzeugten Antikörperantwort

[0088] Insgesamt 25 Balb/c-Mäuse wurden mit 20 µg des gereinigten PAZ3 in Freundschem Adjuvans i.p. immunisiert; von zehn Tieren wurde nach vier Dosen Blut abgenommen und die Anti-DEN-Antikörper durch ELISA bestimmt. Hohe Antikörpertiter gegen DEN-3 wurden erhalten, während gegen die restlichen Serotypen keine Reaktivität erhalten wurde (Tabelle 42 und Tabelle 45). Außerdem wurde der Hämagglutinations-Hemmtest (HIA) durchgeführt, wobei nur positive Titer gegen DEN-3 gefunden wurden (Tabelle 43 und Tabelle 45). Schließlich wurde der in vitro-Neutralisationstest durchgeführt, wobei Neutralisationstiter gegen DEN-3 von 1:1280 erhalten wurden (Tabelle 44). Keine Neutralisation der Virusinfektion wurde gegen die restlichen Serotypen gefunden (Tabelle 45).

Tabelle 45: Antikörpertiter gegen DEN-3 der Seren, die nach Immunisieren von Mäusen mit PAZ3 erhalten wurden

Maus	Titer von Anti-DEN-3 PAZ3	Titer von Anti-DEN-3 PBS Kontrolle (-)
1	> 1:128 000	< 1:100
2	1:128 000	< 1:100
3	> 1:128 000	< 1:100
4	1:128 000	< 1:100
5	1:128 000	< 1:100
6	> 1:128 000	< 1:100
7	> 1:128 000	< 1:100
8	1:128 000	< 1:100
9	1:128 000	< 1:100
10	> 1:128 000	< 1:100

Tabelle 43: HI-Titer der Seren aus den mit PAZ3 immunisierten Tieren

Maus	HI*-Titer von Anti-DEN-3 PAZ3	HI-Titer von Anti-DEN-3 PBS Kontrolle (-)
1	> 1:640	< 1:5
2	> 1:640	< 1:5
3	1:320	< 1:5
4	< 1:5	< 1:5
5	> 1:640	< 1:5
6	< 1:5	< 1:5
7	1:320	< 1:5
8	> 1:640	< 1:5
9	> 1:640	< 1:5
10	1:320	< 1:5

* Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

Tabelle 44: Virus-Neutralisationstest mit den Seren von mit PAZ3 immunisierten Tieren

Maus	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-3 PAZ3	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-3 PBS Kontrolle (-)
1	> 1:1280	< 1:5
2	1:640	< 1:5
3	> 1:1280	< 1:5
4	> 1:1280	< 1:5
5	> 1:1280	< 1:5
6	> 1:1280	< 1:5
7	> 1:1280	< 1:5
8	> 1:1280	< 1:5
9	> 1:1280	< 1:5
10	> 1:1280	< 1:5

* Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Tabelle 45: Test auf Kreuzreaktivität gegen alle viralen Serotypen durch ELISA, HI und Virus-Neutralisation mit den Seren von mit PAZ3 immunisierten Tieren

Gemisch von Seren*	ELISA (Anti-DEN-1)	ELISA (Anti-DEN-2)	ELISA (Anti-DEN-3)	ELISA (Anti-DEN-4)
1 (PAZ3)	< 1:100	< 1:100	> 1:128 000	< 1:100
2 (PAZ3)	< 1:100	< 1:100	1:128 000	< 1:100

Gemisch von Seren*	HI** Anti-DEN-1	HI Anti-DEN-2	HI Anti-DEN-3	HI Anti-DEN-4
PAZ3	< 1:5	< 1:5	> 1:320	< 1:5

Gemisch von Seren*	Neutralis. Titer*** Anti-DEN-1	Neutralis. Titer Anti-DEN-2	Neutralis. Titer Anti-DEN-3	Neutralis. Titer Anti-DEN-4
1 (PAZ3)	< 1:5	< 1:5	> 1:1280	< 1:5
2 (PAZ3)	< 1:5	< 1:5	> 1:1280	< 1:5

* Jedes Gemisch bestand aus drei Seren.

** Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

*** Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Beispiel 37: Erhalten von pID1

[0089] Die Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuren von 286 bis 426 des Hüllproteins des DEN-4-Virus codiert (SEQ ID NO: 46), wurde mit den im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO: 17 und SEQ ID NO: 18 bezeichneten Oligonucleotiden aus dem DEN-4-Virusstamm Genotyp amplifiziert (Zhao, B., Mackow, E. R., Buckler-White, A. J., Markoff, L., Chancock, R. M., Lai, C.-J., Makino, Y., Cloning full-length Dengue type 4 viral DNA sequences: Analysis of genes coding for structural proteins, *Virology* 1986, 155: 77–88).

[0090] Der Vektor wurde durch Spalten des Plasmids pM108 His mit XbaI/BamHI erzeugt, welches die Nucleotidsequenz enthält, die die N-terminale Region der MDH und eine Sequenz von sechs Histidinresten codiert (SEQ ID NO: 23). Nach dem Ligieren wurden die möglichen Rekombinanten durch Restriktionsenzymspaltung analysiert und positive Clone sequenziert, um die Übergänge zu überprüfen. Die kompetenten Zellen W3110 wurden mit dem ausgewählten Clon, der mit pID1 bezeichnet wurde (Fig. 10 und SEQ ID NO: 47), transformiert. Nachdem die Kolonie in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) gezüchtet worden war, wurde eine SDS-PAGE des Zellysats durchgeführt. Als Ergebnis wurde eine 25-kDa-Bande erhalten, die 10 % der gesamten zellulären Proteine ausmachte. Die Größe des erhaltenen Proteins entsprach der Summe der N-terminalen Region des MDH-Proteins und des DENE-Proteinfragments aus dem DEN-4-Virus. Das Protein wurde im Immunblotting durch die in den HMAF enthaltenen polyclonalen Antikörper (pA) Anti-DEN-4 erkannt. Dieses Protein wurde mit PID1 bezeichnet (SEQ ID NO: 48).

Beispiel 38: Reinigen des Proteins PID1

[0091] Die Biomasse, die aus dem mit pID1 transformierten und bei 37°C gezüchteten E. coli-Stamm erhalten wurde, wurde in einer French-Press aufgeschlossen. Das rekombinante Protein wurde größtenteils als unlösliche Form erhalten, die mit dem Pellet des Zellaufschlusses assoziiert war. Das Protein wurde aus dem Pellet mit 6 M Harnstoff extrahiert und der Überstand, der das Protein PID1 enthielt, auf eine G-25-Säule aufgetragen, um das chaotrope Mittel zu entfernen. Die erhaltene Fraktion wurde anschließend in Gegenwart von Cu⁺⁺-Ionen auf die Chelating-Sepharose-FF-Säule (Pharmacia, UK) aufgetragen. Das Protein wurde mit 60 mM Imidazol eluiert und das erhaltene Volumen auf eine G-25-Säule aufgetragen, wodurch schließlich das Protein im Formulierungspuffer (PBS) erhalten wurde. Dieses Präparat wurde für immunologische Studien verwendet.

Beispiel 39: Antigen-Charakterisierung von PID1

[0092] Die gereinigte Fraktion von PID1 wurde durch seine Erkennung durch unterschiedliche polyclonale Seren und/oder murine monoclonale Antikörper und auch durch positive menschliche Seren gegen Dengue charakterisiert (Tabelle 46).

[0093] Die stärkste Erkennung im Dot-Blotting wurde jeweils mit den HMAF-Anti-DEN-4 erhalten. Die Erkennung durch HMAF gegen die anderen Serotypen war weniger stark ausgeprägt als im Fall von Serotyp 4. Die durch andere Flaviviren, wie Gelbfieber-Virus und Saint-Louis-Enzephalitis-Virus, erzeugten Antikörper zeigten keinerlei Erkennung. Schließlich wurde die Reaktivität gegen drei menschliche Seren mit hohen Titern und drei mit niedrigen Titern gegen DEN-4 gemessen, wobei in beiden Fällen durch Dot-Blotting und Western-Blotting ein wesentliches Signal erhalten wurde.

Tabelle 46: Reaktivität des Proteins PID1 gegen monoclonale und polyclonale Antikörper

Antikörper**	Spezifität***	PID1*
HMAF	DEN-1	-
HMAF	DEN-2	-
HMAF	DEN-3	+
HMAF	DEN-4	++
HMAF	EEE	-
HMAF	YFV	-
HMAF	SLV	-
mAb 3H5	NT	-

* Insgesamt wurden 10 µg des gereinigten PID1 angewendet. Die Intensität des erhaltenen Signals wurde mit + bis ++ bewertet.

** HMAF wurden in der Verdünnung 1:100 verwendet, während der mAb 3H5 in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt wurde.

*** EEE: Pferde-Enzephalitis-Virus; YFV: Gelbfieber-Virus; SLV: Saint-Louis-Enzephalitis-Virus; NT: Neutralisiert spezifischen Serotyp.

Beispiel 40: Charakterisieren der durch PID1 erzeugten Antikörperantwort

[0094] Insgesamt 25 Balb/c-Mäuse wurden mit 35 µg des gereinigten PID1 in Freundschem Adjuvans i.p. immunisiert; von zehn Tieren wurde nach vier Dosen Blut abgenommen und die Anti-DEN-Antikörper durch ELISA bestimmt. Hohe Antikörpertiter gegen DEN-1 wurden erhalten, während gegen die restlichen Serotypen keine Reaktivität erhalten wurde (Tabelle 47 und Tabelle 50). Außerdem wurde der Hämagglutinations-Hemmtest (HIA) durchgeführt, wobei nur positive Titer gegen DEN-4 gefunden wurden (Tabelle 48 und Tabelle 50). Schließlich wurde der in vitro-Neutralisationstest durchgeführt, wobei Neutralisationstiter gegen DEN-4 von 1:320 erhalten wurden. Jedoch wurde keine Neutralisation der Virusinfektion gegen die restlichen Serotypen gefunden (Tabelle 49 und Tabelle 50). Diese Ergebnisse zeigen die hohe Serotyp-Spezifität der durch PID1 hervorgebrachten Antikörper.

Tabelle 47: Antikörpertiter gegen DEN-4 der Seren, die nach Immunisieren von Mäusen mit PID1 erhalten wurden

Maus	Titer von Anti-DEN-4 PID1	Titer von Anti-DEN-4 PBS Kontrolle (-)
1	1:128 000	< 1:100
2	1:128 000	< 1:100
3	1:64 000	< 1:100
4	1:64 000	< 1:100
5	1:128 000	< 1:100
6	1:32 000	< 1:100
7	1:128 000	< 1:100
8	1:32 000	< 1:100
9	1:128 000	< 1:100
10	1:128 000	< 1:100

Tabelle 48: HI-Titer der Seren aus den mit PID1 immunisierten Tieren

Maus	HI*-Titer von Anti-DEN-4 PID1	HI-Titer von Anti-DEN-4 PBS Kontrolle (-)
1	1:320	< 1:5
2	1:320	< 1:5
3	1:640	< 1:5
4	1:40	< 1:5
5	< 1:5	< 1:5
6	1:320	< 1:5
7	1:640	< 1:5
8	1:640	< 1:5
9	1:40	< 1:5
10	1:320	< 1:5

* Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

Tabelle 49: Virus-Neutralisationstest mit den Seren von mit PID1 immunisierten Tieren

Maus	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-4 PID1	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-4 PBS Kontrolle (-)
1	1:320	< 1:5
2	1:80	< 1:5
3	1:320	< 1:5
4	1:320	< 1:5
5	1:160	< 1:5
6	1:320	< 1:5
7	1:320	< 1:5
8	1:320	< 1:5
9	1:160	< 1:5
10	1:40	< 1:5

* Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Tabelle 50: Test auf Kreuzreaktivität gegen alle viralen Serotypen durch ELISA, HI und Virus-Neutralisation mit den Seren von mit PID1 immunisierten Tieren

Gemisch von Seren*	ELISA (Anti-DEN-1)	ELISA (Anti-DEN-2)	ELISA (Anti-DEN-3)	ELISA (Anti-DEN-4)
1 (PID1)	< 1:100	< 1:100	< 1:100	1:64 000
2 (PID1)	< 1:100	< 1:100	< 1:100	> 1:128 000

Gemisch von Seren*	HI** Anti-DEN-1	HI Anti-DEN-2	HI Anti-DEN-3	HI Anti-DEN-4
PID1	< 1:5	< 1:5	< 1:5	> 1:320

Gemisch von Seren*	Neutralis. Titer*** Anti-DEN-1	Neutralis. Titer Anti-DEN-2	Neutralis. Titer Anti-DEN-3	Neutralis. Titer Anti-DEN-4
1 (PID1)	< 1:5	< 1:5	< 1:5	1:160
2 (PID1)	< 1:5	< 1:5	< 1:5	1:320

* Jedes Gemisch bestand aus drei Seren.

** Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

*** Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Beispiel 41: Erhalten von pID2

[0095] Die Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuren von 286 bis 426 des Hüllproteins des DEN-4-Virus codiert (SEQ ID NO: 46), wurde mit den im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO: 16 und SEQ ID NO: 18 bezeichneten Oligonucleotiden aus dem DEN-4-Virusstamm amplifiziert (Zhao, B., Mackow, E. R., Buckler-White, A. J., Markoff, L., Chancock, R. M., Lai, C.-J., Makino, Y., Cloning full-length Dengue type 4 viral DNA sequences: Analysis of genes coding for structural proteins, *Virology* 1986, 155: 77–88).

[0096] Der Vektor wurde durch Spalten des Plasmids pM84 His mit XbaI/EcoRI erzeugt, welches die Nucleotidsequenz enthält, die das MDH-Protein und eine Sequenz von sechs Histidinresten codiert (SEQ ID NO: 26). Diese Spaltung macht die Insertion des durch PCR amplifizierten Fragments innerhalb der codierenden Region einer Strukturdomäne des MDH-Proteins möglich. Nach dem Ligieren wurden die möglichen Rekombinanten durch Restriktionsenzymspaltung analysiert und positive Clone sequenziert, um die Übergänge zu überprüfen. Die kompetenten Zellen MM294 wurden mit dem ausgewählten Clon, der mit pID2 bezeichnet wurde ([Fig. 11](#) und SEQ ID NO: 49), transformiert. Nachdem die Kolonie in LB-Medium gezüchtet worden war, wurde eine SDS-PAGE des Zelllysats durchgeführt. Als Ergebnis wurde eine 80-kDa-Bande erhalten, die 20 % der gesamten zellulären Proteine ausmachte. Die Größe des erhaltenen Proteins entsprach der Summe der Größe des MDH-Proteins und des DENE-Proteinfragments aus dem DEN-4-Virus. Das Protein wurde im Immunblotting durch HMAF-Anti-DEN-4 erkannt und mit PID2 bezeichnet (SEQ ID NO: 50).

Beispiel 42: Reinigen des Proteins PID2

[0097] Die Biomasse, die aus dem mit pID2 transformierten und bei 37°C gezüchteten *E. coli*-Stamm erhalten wurde, wurde in einer French-Press aufgeschlossen. Das rekombinante Protein wurde in beiden Formen, der löslichen und der unlöslichen Form, erhalten. Das mit der unlöslichen Fraktion assoziierte Protein wurde unter Verwendung von 6 M Harnstoff extrahiert und der Überstand, der das Protein PID2 enthielt, auf eine G-25-Säule aufgetragen, um das chaotrope Mittel zu entfernen. Die erhaltene Fraktion wurde anschließend in Gegenwart von Cu⁺⁺-Ionen auf die Chelating-Sepharose-FF-Säule (Pharmacia, UK) aufgetragen. Die Säule wurde

mit 30 mM Imidazol gewaschen und das Protein mit 250 mM Imidazol eluiert. Schließlich wurde die reine Fraktion auf eine G-25-Säule aufgetragen, wodurch das Protein im Formulierungspuffer (PBS) erhalten wurde. Dieses Präparat wurde für immunologische Studien verwendet.

Beispiel 43: Antigen-Charakterisierung von PID2

[0098] Die gereinigte Fraktion von PID2 wurde durch seine Erkennung durch unterschiedliche polyclonale Seren und/oder murine monoclonale Antikörper und auch durch positive menschliche Seren gegen Dengue charakterisiert (Tabelle 51).

[0099] Die stärkste Erkennung im Dot-Blotting wurde jeweils mit den HMAF-Anti-DEN-4 erhalten (wobei diese stärker ausgeprägt waren als diejenigen, die mit PID1 erhalten wurden). Die Erkennung durch HMAF gegen die anderen Serotypen war weniger stark ausgeprägt als im Fall von Serotyp 4. Die durch andere Flaviviren, wie Gelbfieber-Virus und Saint-Louis-Enzephalitis-Virus, erzeugten Antikörper zeigten keinerlei Erkennung. Schließlich wurde die Reaktivität gegen fünf menschliche Seren mit hohen Titern und drei mit niedrigen Titern gegen DEN-3 gemessen, wobei in beiden Fällen durch Western-Blotting und Dot-Blotting ein wesentliches Signal erhalten wurde.

Tabelle 51: Reaktivität des Proteins PID2 gegen monoclonale und polyclonale Antikörper

Antikörper**	Spezifität***	PID2*
HMAF	DEN-1	-
HMAF	DEN-2	-
HMAF	DEN-3	+
HMAF	DEN-4	+++
HMAF	EEE	-
HMAF	YFV	-
HMAF	SLV	-
mAb 3H5	NT	-

* Insgesamt wurden 10 µg des gereinigten PID2 angewendet. Die Intensität des erhaltenen Signals wurde mit + bis ++ bewertet.

** HMAF wurden in der Verdünnung 1:100 verwendet, während der mAb 3H5 in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt wurde.

*** EEE: Pferde-Enzephalitis-Virus; YFV: Gelbfieber-Virus; SLV: Saint-Louis-Enzephalitis-Virus; NT: Neutralisiert spezifischen Serotyp.

Beispiel 44: Charakterisieren der durch PID2 erzeugten Antikörperantwort

[0100] Insgesamt 25 Balb/c-Mäuse wurden mit 20 µg des gereinigten PID2 in Freundschem Adjuvans i.p. immunisiert; von zehn Tieren wurde nach vier Dosen Blut abgenommen und die Anti-DEN-Antikörper durch ELISA bestimmt. Hohe Antikörpertiter gegen DEN-4 wurden erhalten, während gegen die restlichen Serotypen keine Reaktivität erhalten wurde (Tabelle 52 und Tabelle 55). Außerdem wurde der Hämagglutinations-Hemmtest (HIA) durchgeführt, wobei nur positive Titer gegen DEN-4 gefunden wurden (Tabelle 53 und Tabelle 55). Schließlich wurde der in vitro-Neutralisationstest durchgeführt, wobei Neutralisationstiter gegen DEN-4 von 1:1280 erhalten wurden (Tabelle 54). Keine Neutralisation der Virusinfektion wurde gegen die restlichen Serotypen gefunden (Tabelle 55).

Tabelle 52: Antikörpertiter gegen DEN-4 der Seren, die nach Immunisieren von Mäusen mit PID2 erhalten wurden

Maus	Titer von Anti-DEN-4 PID2	Titer von Anti-DEN-4 PBS Kontrolle (-)
1	1:64 000	< 1:100
2	> 1:128 000	< 1:100
3	1:128 000	< 1:100
4	> 1:128 000	< 1:100
5	1:64 000	< 1:100
6	> 1:128 000	< 1:100
7	> 1:128 000	< 1:100
8	> 1:128 000	< 1:100
9	> 1:128 000	< 1:100
10	1:128 000	< 1:100

Tabelle 53: HI-Titer der Seren aus den mit PID2 immunisierten Tieren

Maus	HI*-Titer von Anti-DEN-4 (PID2)	HI-Titer von Anti-DEN-4 PBS Kontrolle (-)
1	1:320	< 1:5
2	1:320	< 1:5
3	1:640	< 1:5
4	1:40	< 1:5
5	< 1:5	< 1:5
6	1:320	< 1:5
7	1:640	< 1:5
8	1:640	< 1:5
9	1:40	< 1:5
10	1:320	< 1:5

* Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

Tabelle 54: Virus-Neutralisationstest mit den Seren von mit PID2 immunisierten Tieren

Maus	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-4 PID2	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-4 PBS Kontrolle (-)
1	> 1:1280	< 1:5
2	> 1:1280	< 1:5
3	> 1:1280	< 1:5
4	> 1:1280	< 1:5
5	1:640	< 1:5
6	> 1:1280	< 1:5
7	> 1:1280	< 1:5
8	> 1:1280	< 1:5
9	1:640	< 1:5
10	> 1:1280	< 1:5

* Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Tabelle 55: Test auf Kreuzreaktivität gegen alle viralen Serotypen durch ELISA, HI und Virus-Neutralisation mit den Seren von mit PID2 immunisierten Tieren

Gemisch von Seren*	ELISA (Anti-DEN-1)	ELISA (Anti-DEN-2)	ELISA (Anti-DEN-3)	ELISA (Anti-DEN-4)
1 (PID2)	< 1:100	< 1:100	< 1:100	> 1:128 000
2 (PID2)	< 1:100	< 1:100	< 1:100	1:64 000

Gemisch von Seren*	HI** Anti-DEN-1	HI Anti-DEN-2	HI Anti-DEN-3	HI Anti-DEN-4
PID2	< 1:5	< 1:5	< 1:5	> 1:320

Gemisch von Seren*	Neutralis. Titer*** Anti-DEN-1	Neutralis. Titer Anti-DEN-2	Neutralis. Titer Anti-DEN-3	Neutralis. Titer Anti-DEN-4
1 (PID2)	< 1:5	< 1:5	< 1:5	> 1:1280
2 (PID2)	< 1:5	< 1:5	< 1:5	> 1:1280

* Jedes Gemisch bestand aus drei Seren.

** Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

*** Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Beispiel 45: Erhalten von pID3

[0101] Die Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuren von 286 bis 426 des Hüllproteins des DEN-4-Virus codiert (SEQ ID NO: 46), wurde mit den im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO: 19 und SEQ ID NO: 20 bezeichneten Oligonucleotiden aus dem DEN-4-Virusstamm amplifiziert (Zhao, B., Mackow, E. R., Buckler-White, A. J., Markoff, L., Chancock, R. M., Lai, C.-J., Makino, Y., Cloning full-length Dengue type 4 viral DNA sequences: Analysis of genes coding for structural proteins, *Virology* 1986, 155: 77–88).

[0102] Der Vektor wurde durch Spalten des Plasmids pD4 mit BamHI/BamHI erzeugt, welches die Nucleotidsequenz enthält, die das MDH-Protein und eine Sequenz von sechs Histidinresten, ohne Stopp-Codon, codiert (SEQ ID NO: 29). Diese Spaltung macht die Fusion des durch PCR amplifizierten Fragments hinter der C-terminalen Region des MDH-Proteins möglich. Nach dem Ligieren wurden die möglichen Rekombinanten durch Restriktionsenzymsspaltung analysiert und positive Clone sequenziert, um die Übergänge zu überprüfen. Die kompetenten Zellen W3110 wurden mit dem ausgewählten Clon, der mit pID3 bezeichnet wurde (Fig. 12 und SEQ ID NO: 51), transformiert. Nachdem die Kolonie in LB-Medium gezüchtet worden war, wurde eine SDS-PAGE des Zelllysats durchgeführt. Als Ergebnis wurde eine 80-kDa-Bande erhalten, die 20 % der gesamten zellulären Proteine ausmachte. Die Größe des erhaltenen Proteins entsprach der Summe der Größe des MDH-Proteins und des DENE-Proteinfragments aus dem DEN-4-Virus. Das Protein wurde im Immunblotting durch HMAF-Anti-DEN-4 erkannt und mit PID3 bezeichnet (SEQ ID NO: 52).

Beispiel 46: Reinigen des Proteins PID3

[0103] Die Biomasse, die aus dem mit pID3 transformierten und bei 37°C gezüchteten E. coli-Stamm erhalten wurde, wurde in einer French-Press aufgeschlossen. Das rekombinante Protein wurde in beiden Formen, der löslichen und der unlöslichen Form, erhalten. Das Protein wurde aus der unlöslichen Fraktion unter Verwendung von 6 M Harnstoff extrahiert und der Überstand, der das Protein PID3 enthielt, auf eine G-25-Säule aufgetragen, um das chaotrope Mittel zu entfernen. Die erhaltene Fraktion wurde anschließend in Gegenwart von Cu⁺⁺-Ionen auf die Chelating-Sepharose-FF-Säule (Pharmacia, UK) aufgetragen. Die Säule wurde mit 45 mM Imidazol gewaschen und das Protein mit 200 mM Imidazol eluiert. Schließlich wurde die reine Fraktion des Proteins auf eine G-25-Säule aufgetragen, wodurch das Protein im Formulierungspuffer (PBS) erhalten wurde. Dieses Präparat wurde für immunologische Studien verwendet.

Beispiel 47: Antigen-Charakterisierung von PID3

[0104] Die gereinigte Fraktion von PID3 wurde durch seine Erkennung durch unterschiedliche polyclonale Seren und/oder murine monoclonale Antikörper und auch durch positive menschliche Seren gegen Dengue charakterisiert (Tabelle 56).

[0105] Die stärkste Erkennung im Dot-Blotting wurde jeweils mit den HMAF-Anti-DEN-4 erhalten. Die Erkennung durch HMAF gegen die anderen Serotypen war weniger stark ausgeprägt als im Fall von Serotyp 4. Die durch andere Flaviviren, wie Gelbfieber-Virus und Saint-Louis-Enzephalitis-Virus, erzeugten Antikörper zeigten keinerlei Erkennung. Schließlich wurde die Reaktivität gegen drei menschliche Seren mit hohen Titern und drei mit niedrigen Titern gegen DEN-4 gemessen, wobei in beiden Fällen durch Dot-Blotting und Western-Blotting ein wesentliches Signal erhalten wurde.

Tabelle 56: Reaktivität des Proteins PID3 gegen monoclonale und polyclonale Antikörper

Antikörper**	Spezifität***	PID3*
HMAF	DEN-1	-
HMAF	DEN-2	-
HMAF	DEN-3	+
HMAF	DEN-4	+++
HMAF	EEE	-
HMAF	YFV	-
HMAF	SLV	-
mAb 3H5	NT	-

* Insgesamt wurden 10 µg des gereinigten PID3 angewendet. Die Intensität des erhaltenen Signals wurde mit + bis ++ bewertet.

** HMAF wurden in der Verdünnung 1:100 verwendet, während der mAb 3H5 in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt wurde.

*** EEE: Pferde-Enzephalitis-Virus; YFV: Gelbfieber-Virus; SLV: Saint-Louis-Enzephalitis-Virus; NT: Neutralisiert spezifischen Serotyp.

Beispiel 48: Charakterisieren der durch PID3 erzeugten Antikörperantwort

[0106] Insgesamt 25 Balb/c-Mäuse wurden mit 20 µg des gereinigten PAZ3 in Freundschem Adjuvans i.p. immunisiert; von zehn Tieren wurde nach vier Dosen Blut abgenommen und die Anti-DEN-Antikörper durch ELISA bestimmt. Hohe Antikörpertiter gegen DEN-4 wurden erhalten, während gegen die restlichen Serotypen keine Reaktivität erhalten wurde (Tabelle 57 und Tabelle 60). Außerdem wurde der Hämagglutinations-Hemmtest (HIA) durchgeführt, wobei nur positive Titer gegen DEN-4 gefunden wurden (Tabelle 58 und Tabelle 60). Schließlich wurde der in vitro-Neutralisationstest durchgeführt, wobei Neutralisationstiter gegen DEN-4 von 1:1280 erhalten wurden (Tabelle 59). Keine Neutralisation der Virusinfektion wurde gegen die restlichen Serotypen gefunden (Tabelle 60).

Tabelle 57: Antikörpertiter gegen DEN-4 der Seren, die nach Immunisieren von Mäusen mit PID3 erhalten wurden

Maus	Titer von Anti-DEN-4 (PID3)	Titer von Anti-DEN-4 PBS Kontrolle (-)
1	> 1:128 000	< 1:100
2	> 1:128 000	< 1:100
3	> 1:128 000	< 1:100
4	1:64 000	< 1:100
5	1:64 000	< 1:100
6	> 1:128 000	< 1:100
7	1:128 000	< 1:100
8	> 1:128 000	< 1:100
9	1:128 000	< 1:100
10	> 1:128 000	< 1:100

Tabelle 58: HI-Titer der Seren aus den mit PID3 immunisierten Tieren

Maus	HI*-Titer von Anti-DEN-4 PID3	HI-Titer von Anti-DEN-4 PBS Kontrolle (-)
1	> 1:640	< 1:5
2	1:320	< 1:5
3	> 1:640	< 1:5
4	> 1:640	< 1:5
5	< 1:5	< 1:5
6	> 1:640	< 1:5
7	1:320	< 1:5
8	> 1:640	< 1:5
9	1:320	< 1:5
10	> 1:640	< 1:5

* Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

Tabelle 59: Virus-Neutralisationstest mit den Seren von mit PID3 immunisierten Tieren

Maus	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-4 PID3	Neutralisierende Titer* von Anti-DEN-4 PBS Kontrolle (-)
1	> 1:1280	< 1:5
2	> 1:1280	< 1:5
3	> 1:1280	< 1:5
4	> 1:1280	< 1:5
5	> 1:1280	< 1:5
6	> 1:1280	< 1:5
7	> 1:1280	< 1:5
8	1:640	< 1:5
9	> 1:1280	< 1:5
10	> 1:1280	< 1:5

* Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Tabelle 60: Test auf Kreuzreaktivität gegen alle viralen Serotypen durch ELISA, HI und Virus-Neutralisation mit den Seren von mit PID3 immunisierten Tieren

Gemisch von Seren*	ELISA (Anti-DEN-1)	ELISA (Anti-DEN-2)	ELISA (Anti-DEN-3)	ELISA (Anti-DEN-4)
1 (PID3)	< 1:100	< 1:100	< 1:100	> 1:128 000
2 (PID3)	< 1:100	< 1:100	< 1:100	1:128 000

Gemisch von Seren*	HI** Anti-DEN-1	HI Anti-DEN-2	HI Anti-DEN-3	HI Anti-DEN-4
PID3	< 1:5	< 1:5	< 1:5	> 1:320

Gemisch von Seren*	Neutralis. Titer*** Anti-DEN-1	Neutralis. Titer Anti-DEN-2	Neutralis. Titer Anti-DEN-3	Neutralis. Titer Anti-DEN-4
1 (PID3)	< 1:5	< 1:5	< 1:5	> 1:1280
2 (PID3)	< 1:5	< 1:5	< 1:5	> 1:1280

* Jedes Gemisch bestand aus drei Seren.

** Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

*** Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Beispiel 49: Erhalten von pD4D2

[0107] Die Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuren von 286 bis 426 des E-Proteins des DEN-4-Virus codiert (SEQ ID NO: 46), wurde mit den im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO: 16 und SEQ ID NO: 21 bezeichneten Oligonucleotiden aus dem DEN-4-Virusstamm amplifiziert (Zhao, B., Mackow, E. R., Buckler-White, A. J., Markoff, L., Chancock, R. M., Lai, C.-J., Makino, Y., Cloning full-length Dengue type 4 viral DNA sequences: Analysis of genes coding for structural proteins, *Virology* 1986, 155: 77–88).

[0108] Der Vektor wurde durch Spalten des Plasmids pLL3 mit XbaI/XbaI erzeugt, welches das MDH-Gen plus eine Sequenz von sechs Histidinresten in der 3'-Region des Gens und die Sequenz des E-Fragments aus DEN-2 im 3'-Ende enthält. Als Ergebnis wurden zwei Regionen des E-Proteins der Serotypen 2 und 4 erhalten, die an dasselbe MDH-Gen fusioniert waren. Nach dem Ligieren wurden die möglichen Rekombinanten durch Restriktionsenzymsspaltung analysiert und positive Clone sequenziert, um die Übergänge zu überprüfen. Die kompetenten Zellen MM294 wurden mit dem ausgewählten Clon, der mit pD4D2 bezeichnet wurde ([Fig. 13](#) und SEQ ID NO: 53), transformiert. Nachdem die Kolonie in LB-Medium gezüchtet worden war, wurde eine SDS-PAGE des Zelllysats durchgeführt. Als Ergebnis wurde eine 110-kDa-Bande erhalten, die 20 % der gesamten zellulären Proteine ausmachte. Die Größe des erhaltenen Proteins entsprach der Summe des MDH-Proteins und der zwei Fragmente des DENE-Proteins des Dengue-Virus. Dieses Protein wurde durch die in den HMAF enthaltenen polyclonalen Anti-DEN-2- und Anti-DEN-4-Antikörper erkannt. Dieses Protein wurde mit PD4D2 bezeichnet (SEQ ID NO: 54).

Beispiel 50: Reinigen des Proteins PD4D2

[0109] Die Biomasse, die aus dem mit pD4D2 transformierten und bei 37°C gezüchteten E. coli-Stamm erhalten wurde, wurde in einer French-Press aufgeschlossen. Das rekombinante Protein wurde löslich oder unlöslich erhalten. Das Protein wurde aus dem Pellet mit 6 M Harnstoff extrahiert und der Überstand, der das Protein PD4D2 enthielt, auf eine G-25-Säule aufgetragen, um das chaotrope Mittel zu entfernen. Die erhaltene Fraktion wurde anschließend in Gegenwart von Cu⁺⁺-Ionen auf die Chelating-Sepharose-FF-Säule (Pharmacia, UK) aufgetragen. Ein Waschschriff mit 30 mM Imidazol wurde durchgeführt und das Protein sodann mit

250 mM Imidazol eluiert. Schließlich wurde das reine Präparat auf eine G-25-Säule aufgetragen, wodurch das Protein im Formulierungspuffer (PBS) erhalten wurde, und dieses wurde sodann für immunologische Studien verwendet.

Beispiel 51: Antigen-Charakterisierung von PD4D2

[0110] Die gereinigte Fraktion von PD4D2 wurde durch seine Erkennung durch unterschiedliche polyclonale Seren und/oder murine monoclonale Antikörper und auch durch positive menschliche Seren gegen Dengue charakterisiert (Tabelle 61).

[0111] Die stärkste Erkennung im Dot-Blotting wurde jeweils mit den HMAF-Anti-DEN-2 und Anti-DEN-4 erhalten. Die Erkennung durch die zwei anderen Serotypen war weniger stark ausgeprägt als im Fall der Serotypen 2 und 4. Die durch andere Flaviviren, wie Gelbfieber-Virus und Saint-Louis-Enzephalitis-Virus, erzeugten Antikörper zeigten keinerlei Erkennung. Andererseits zeigte der mAb 3H5 tatsächlich eine Reaktivität, die ähnlich war wie diejenige, die für PLL2 und PLL3 erhalten wurde. Schließlich wurde die Reaktivität gegen menschliche Seren mit hohen Titern und mit niedrigen Titern gegen DEN-2 und DEN-4 gemessen, wobei in beiden Fällen durch Western-Blotting und Dot-Blotting ein wesentliches Signal erhalten wurde.

Tabelle 61: Reaktivität des Proteins PD4D2 gegen monoclonale und golyclonale Antikörper

Antikörper**	Spezifität***	PD4D2*
HMAF	DEN-1	-
HMAF	DEN-2	+++
HMAF	DEN-3	-
HMAF	DEN-4	+++
HMAF	EEE	-
HMAF	YFV	-
HMAF	SLV	-
mAb 3H5	NT	-

* Insgesamt wurden 10 µg des gereinigten PD4D2 angewendet. Die Intensität des erhaltenen Signals wurde mit + bis ++ bewertet.

** HMAF wurden in der Verdünnung 1:100 verwendet, während der mAb 3H5 in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt wurde.

*** EEE: Pferde-Enzephalitis-Virus; YFV: Gelbfieber-Virus; SLV: Saint-Louis-Enzephalitis-Virus; NT: Neutralisiert spezifischen Serotyp.

Beispiel 52: Charakterisieren der durch PD4D2 erzeugten Antikörperantwort

[0112] Insgesamt 25 Balb/c-Mäuse wurden mit 20 µg des gereinigten PD4D2 in Freundschem Adjuvans i.p. immunisiert; von zehn Tieren wurde nach vier Dosen Blut abgenommen und die Anti-DEN-Antikörper durch ELISA bestimmt. Hohe Antikörpertiter gegen DEN-2 und DEN-4 wurden erhalten, während gegen die restlichen Serotypen keine Reaktivität erhalten wurde (Tabelle 62 und Tabelle 65). Außerdem wurde der Hämagglutinations-Hemmtest (HIA) durchgeführt, wobei nur positive Titer gegen DEN-2 und DEN-4 gefunden wurden (Tabelle 63 und Tabelle 65). Schließlich wurde der in vitro-Neutralisationstest durchgeführt, wobei Neutralisationstiter gegen DEN-2 von > 1:1280 und gegen DEN-4 von > 1:1280 erhalten wurden (Tabelle 64). Keine Neutralisation der Virusinfektion wurde gegen die restlichen Serotypen gefunden (Tabelle 65).

Tabelle 62: Antikörpertiter gegen DEN-2 und DEN-4 der Seren, die nach Immunisieren von Mäusen mit PD4D2 erhalten wurden

Maus	ELISA-Titer (PD4D2)		ELISA-Titer PBS Kontrolle (-)	
	Anti-DEN-4	Anti-DEN-2	Anti-DEN-4	Anti-DEN-2
1	> 1:128 000	> 1:128 000	< 1:100	< 1:100
2	1:128 000	1:128 000	< 1:100	< 1:100
3	> 1:128 000	> 1:128 000	< 1:100	< 1:100
4	> 1:128 000	> 1:128 000	< 1:100	< 1:100
5	1:64 000	> 1:128 000	< 1:100	< 1:100
6	> 1:128 000	1:128 000	< 1:100	< 1:100
7	1:64 000	> 1:128 000	< 1:100	< 1:100
8	> 1:128 000	> 1:128 000	< 1:100	< 1:100
9	> 1:128 000	1:128 000	< 1:100	< 1:100
10	1:128 000	> 1:128 000	< 1:100	< 1:100

Tabelle 63: HI-Titer der Seren aus den mit PD4D2 immunisierten Tieren

Maus	HI*-Titer (PD4D2)		HI-Titer PBS Kontrolle (-)	
	Anti-DEN-4	Anti-DEN-2	Anti-DEN-4	Anti-DEN-2
1	> 1:640	> 1:640	< 1:5	< 1:5
2	> 1:640	> 1:640	< 1:5	< 1:5
3	> 1:640	1:320	< 1:5	< 1:5
4	> 1:640	> 1:640	< 1:5	< 1:5
5	1:320	1:640	< 1:5	< 1:5
6	> 1:640	> 1:640	< 1:5	< 1:5
7	> 1:640	> 1:640	< 1:5	< 1:5
8	1:320	1:320	< 1:5	< 1:5
9	1:320	1:320	< 1:5	< 1:5
10	> 1:640	> 1:640	< 1:5	< 1:5

* Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

Tabelle 64: Virus-Neutralisationstest mit den Seren von mit PD4D2 immunisierten Tieren

Maus	Neutralisierende Titer* (PD4D2)		Neutralisierende Titer* PBS Kontrolle (-)	
	Anti-DEN-4	Anti-DEN-2	Anti-DEN-4	Anti-DEN-2
1	> 1:1280	> 1:1280	< 1:5	< 1:5
2	> 1:1280	> 1:1280	< 1:5	< 1:5
3	1:1280	1:1280	< 1:5	< 1:5
4	> 1:1280	> 1:1280	< 1:5	< 1:5
5	1:640	1:1280	< 1:5	< 1:5
6	> 1:1280	> 1:1280	< 1:5	< 1:5
7	> 1:1280	> 1:1280	< 1:5	< 1:5
8	1:640	> 1:1280	< 1:5	< 1:5
9	> 1:1280	> 1:1280	< 1:5	< 1:5
10	> 1:1280	> 1:1280	< 1:5	< 1:5

* Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Tabelle 65: Test auf Kreuzreaktivität gegen alle viralen Serotypen durch ELISA, HI und Virus-Neutralisation mit den Seren von mit PD4D2 immunisierten Tieren

Gemisch von Seren*	ELISA (Anti-DEN-1)	ELISA (Anti-DEN-2)	ELISA (Anti-DEN-3)	ELISA (Anti-DEN-4)
1 (PD4D2)	< 1:100	> 1:128 000	< 1:100	1:64 000
2 (PD4D2)	< 1:100	> 1:128 000	< 1:100	> 1:128 000

Gemisch von Seren*	HI** Anti-DEN-1	HI Anti-DEN-2	HI Anti-DEN-3	HI Anti-DEN-4
PD4D2	< 1:5	> 1:320	< 1:5	> 1:320

Gemisch von Seren*	Neutralis. Titer*** Anti-DEN-1	Neutralis. Titer Anti-DEN-2	Neutralis. Titer Anti-DEN-3	Neutralis. Titer Anti-DEN-4
1 (PD4D2)	< 1:5	> 1:1280	< 1:5	> 1:1280
2 (PD4D2)	< 1:5	> 1:1280	< 1:5	> 1:1280

* Jedes Gemisch bestand aus drei Seren.

** Die HI-Titer waren als die höchste Verdünnung definiert, die in der Lage war, die Hämagglutination von Gans-Erythrozyten gegen acht Hämagglutinations-Viruseinheiten zu hemmen.

*** Die neutralisierenden Titer waren als die höchste Verdünnung des Serums definiert, die eine Reduktion der Zahl der Virusplaques von 50 % zeigte.

Beispiel 53: Test des Schutzes

[0113] Zum Ermitteln des Schutzes, welchen die Mäuse, die mit allen getesteten Varianten immunisiert worden waren, bei der Infektion mit einem homologen letalen DEN aufwiesen, wurden 15 Mäuse jeder Gruppe verwendet. Jedes Tier erhielt eine Dosis von 100 LD₅₀ des letalen DEN durch intrakraniale Verabreichung, und sodann wurden die Tiere während 21 Tagen beobachtet, um den prozentualen Anteil an Letalität zu ermitteln. Als positive Kontrollen dienten Gruppen von 15 Mäusen, die mit den vier Viruspräparaten (DEN-1, DEN-2, DEN-3 und DEN-4) immunisiert wurden. Alle Mäuse dieser Kontrollgruppen überlebten, während die Mäuse aus der negativen Kontrollgruppe innerhalb von sieben bis elf Tagen nach der Infektion krank wurden; deshalb wurde eine Mortalität von 100 % erreicht. Schließlich hatten die mit den Fusionsproteinen immunisierten Gruppen, die untersucht wurden, einen Schutz zwischen 80 % und 100 %, und in allen Fällen wurden signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden (Tabelle 66).

Tabelle 66: Prozentualer Anteil von überlebenden Mäusen, die mit den Proteinvarianten immunisiert wurden, getestet bei einer Infektion mit dem homologen letalen Dengue-Virus

Immunogen	Prozentualer Anteil von Überlebenden*
PBS	0
DEN-1	100
DEN-2	100
DEN-3	100
DEN-4	100
PLL1	86
PLL2	100
PLL3	100
PLH1	80
PLH2	100
PLH3	100
PAZ1	80
PAZ2	100
PAZ3	100
PID1	86
PID2	100
PID3	100
PD4D2	100 (DEN-4) 100 (DEN-2)

* Berechnet wurde: (Anzahl von überlebenden Mäusen)/(Gesamtzahl von Mäusen). Die Ergebnisse der Überlebenden wurden 21 Tage nach der Infektion genommen. Im Fall von Mäusen, die mit pD4D2 immunisiert worden waren, wurden 15 Tiere mit DEN-4 und 15 mit DEN-2 infiziert.

Beispiel 54: Lymphoproliferative Antwort

[0114] Tiere aus verschiedenen Gruppen, immunisiert mit den chimären Proteinen, welche das E-Fragment von DEN-2 enthielten (PLL1, PLL2 und PLL3), und eine Plazebogruppe wurden 15 Tage nach der letzten Dosis getötet. Danach wurde jeweils die Milz der Tiere entnommen und die lymphoproliferative Antwort gegen die vier Serotypen des Dengue-Virus untersucht. Tabelle 67 zeigt die Ergebnisse der erhaltenen Stimulationsindizes, die deutlich machen, dass eine Serotyp-spezifische Antwort erreicht wurde.

Tabelle 67: Stimulationsindizes gegen die vier Dengue-Virus-Serotypen von Lymphozyten aus Mäusen, die mit PLL1, PLL2 und PLL3 immunisiert wurden

	PLL1	PLL2	PLL3	Kontrolle (-)
DEN-1	1,3*	1,0	0,8	1,2
DEN-2	12,5	10,3	8,9	1,4
DEN-3	1,0	1,6	1,8	1,4
DEN-4	1,7	1,5	1,7	1,1
Kontroll-Antigen	1,1	1,0	1,3	0,9
PHA**	13,3	16,5	11,1	12,0

* Stimulationsindex: Quotient der Zählimpulse pro Minute der spontanen DNA-Synthese der Proben und der Zählimpulse pro Minute der Kontrolle

** Mitogen: Phytohämagglutinin

SEQUENZPROTOKOLL

<110> CENTER FOR GENETIC ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY

<120> CHIMÄRISCHE NUKLEINSÄUREN KODIEREND FÜR PROTEINE, DIE EFFEKTE GEGEN VIREN INDUZIEREN

<130> Dengue

<140>

<141>

<160> 54

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> Primer ("primer_bind")

<222> (1)..(25)

<223> Sequenz des Xba-I-Primers für die Amplifikation eines DENE-2-Fragments

<400> 1

cttctagaca ggetgcgcat ggaca

25

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> Primer ("primer_bind")

<222> (1)..(29)

<223> Sequenz des Bam-HI-Primers für die Amplifikation eines DENE-2-Fragments

<400> 2

gtggatcctt accctcccag gcttccaaa

29

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> Primer ("primer_bind")

<222> (1)..(25)

<223> Sequenz des Eco-RI-Primers für die Amplifikation eines DENE-2-Fragments

<400> 3

atgaattcac gcctcccaga gatcc

25

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Primer ("primer_bind")
 <222> (1)..(21)
 <223> Sequenz des Bam-HI-Primers für die Amplifikation eines DENE-2-Fragments

<400> 4
 cttggatcca ggctgagaat g 21

<210> 5
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Primer ("primer_bind")
 <222> (1)..(31)
 <223> Sequenz des Bam-HI-Primers für die Amplifikation eines DENE-2-Fragments

<400> 5
 gaggatcctt aaccacccag agacccaaaa t 31

<210> 6
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Primer ("primer_bind")
 <222> (1)..(25)
 <223> Sequenz des Xba-I-Primers für die Amplifikation eines DENE-1-Fragments

<400> 6
 cttctagaca ggctcaaaaat ggata 25

<210> 7
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Primer ("primer_bind")
 <222> (1)..(28)
 <223> Sequenz des Bam-HI-Primers für die Amplifikation eines DENE-1-Fragments

<400> 7
 gaggatcctt acccgccaat agaaccga 28

<210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Primer ("primer_bind")
 <222> (1)..(25)
 <223> Sequenz des Eco-RI-Primers für die Amplifikation eines DENE-1-Fragments

<400> 8
 acgaattcac ccctcctata gatcc 25

<210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Primer ("primer_bind")
 <222> (1)..(24)
 <223> Sequenz des Bam-HI-Primers für die Amplifikation eines DENE-1-Fragments

<400> 9
 acaccttggga tccagactaa aaat 24

<210> 10
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Primer ("primer_bind")
 <222> (1)..(26)
 <223> Sequenz des Bam-HI-Primers für die Amplifikation eines DENE-1-Fragments

<400> 10
 ccggatccgt gaattaccca cctata 26

<210> 11
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Primer ("primer_bind")
 <222> (1)..(29)
 <223> Sequenz des Xba-I-Primers für die Amplifikation eines DENE-3-Fragments

<400> 11
 tttctagata gactcaagat ggacaaatt 29

<210> 12

<211> 28
 <212> DNA
 <213> *Escherichia coli*

 <220>
 <221> Primer ("primer_bind")
 <222> (1)..(28)
 <223> Sequenz des Bam-HI-Primers für die Amplifikation eines DENE-3-Fragments

 <400> 12
 gaggatcctt aaccaccac tgaaccaa 28

 <210> 13
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> *Escherichia coli*

 <220>
 <221> Primer ("primer_bind")
 <222> (1)..(25)
 <223> Sequenz des Eco-RI-Primers für die Amplifikation eines DENE-3-Fragments

 <400> 13
 aagaattcac accaccaca gatcc 25

 <210> 14
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> *Escherichia coli*

 <220>
 <221> Primer ("primer_bind")
 <222> (1)..(23)
 <223> Sequenz des Bam-HI-Primers für die Amplifikation eines DENE-3-Fragments

 <400> 14
 acttaggatc cagactcaag atg 23

 <210> 15
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> *Escherichia coli*

 <220>
 <221> Primer ("primer_bind")
 <222> (1)..(26)
 <223> Sequenz des Bam-HI-Primers für die Amplifikation eines DENE-3-Fragments

 <400> 15
 gaggatcctt aaccaccac tgaacc 26

 <210> 16
 <211> 30

<212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Primer ("primer_bind")
 <222> (1)..(30)
 <223> Sequenz des Xba-I-Primers für die Amplifikation eines DENE-4-Fragments

<400> 16
 cttctagaca aagtgcgtat ggagaaattg 30

<210> 17
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Primer ("primer_bind")
 <222> (1)..(28)
 <223> Sequenz des Bam-HI-Primers für die Amplifikation eines DENE-4-Fragments

<400> 17
 gaggatcctt aaccaccaac agaaccaa 28

<210> 18
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Primer ("primer_bind")
 <222> (1)..(25)
 <223> Sequenz des Eco-RI-Primers für die Amplifikation eines DENE-4-Fragments

<400> 18
 atgaattcag tccaccaacg ctacc 25

<210> 19
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Primer ("primer_bind")
 <222> (1)..(27)
 <223> Sequenz des Bam-HI-Primers für die Amplifikation eines DENE-4-Fragments

<400> 19
 ggccatctag gatccaaagt gcgtatg 27

<210> 20
 <211> 28
 <212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> Primer ("primer_bind")

<222> (1)..(28)

<223> Sequenz des Bam-HI-Primers für die Amplifikation eines DENE-4-Fragments

<400> 20

gaggatcctt agccaccaac cgaaccaa

28

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> Primer ("primer_bind")

<222> (1)..(26)

<223> Sequenz des Xba-I-Primers für die Amplifikation eines DENE-4-Fragments

<400> 21

attctagaag accaccaacg gaacca

26

<210> 22

<211> 429

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> Gen

<222> (1)..(426)

<223> Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuren 286 bis 426 des DEN-2-Hüllproteins codiert

<400> 22

gacaggotga gaatggcaa actacagctc aaaggaatgt catactctat gtgtacagga 60
aagtttaaaa ttgtgaagga aatagcagaa acacaacatg gaacaatagt taccagagta 120
caatatgaag gggacggctc tccatgtaag atcccttttg agataatgga tttggaaaaa 180
agacacgtct taggtcgcct gattacagtt aacccgatcg taacagaaaa agatagccca 240
gtcaacatag aagcagaacc tccattcggg gacagctaca tcatcatagg agtagagccg 300
ggacaattga aactcaactg gttaagaaa ggaagttcca tcggccaaat gtttgagaca 360
acaatgagag gagcgaagag aatggccatt ttaggtgaca cagcctggga ttttggatcc 420
ctggggagga 429

<210> 23

<211> 168

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> Gen

<222> (1)..(168)

<223> Nucleotidsequenz, welche die ersten 45 Aminosäuren der MDH codiert

<400> 23
 atgggccacc accaccacca ccacgccatg gtagataaaa gaatggcttt agttgaattg 60
 aaagtgcccg acattggcgg aacagaaaat gtagatatta tcgcggttga agtaaactg 120
 ggcgacacta ttgctgtgga cgataccctg attactttgg atctagac 168

<210> 24
 <211> 603
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Gen
 <222> (1)..(603)
 <223> Nucleotidsequenz, welche das chimäre Protein in dem Plasmid pLL1 codiert

<400> 24
 atgggccacc accaccacca ccacgccatg gtagataaaa gaatggcttt agttgaattg 60
 aaagtgcccg acattggcgg aacagaaaat gtagatatta tcgcggttga agtaaactg 120
 ggcgacacta ttgctgtgga cgataccctg attactttgg atctagacag gctgcgcag 180
 gacaaactac agctcaaagg aatgtcatac tctatgtgta caggaaagt taaaattgtg 240
 aaggaaatag cagaaacaca acatggaaca atagttatca gagtacaata tgaaggggac 300
 ggctctccat gtaagatccc ttttgagata atggatttgg aaaaaagaca cgtcttaggt 360
 cgcttgatta cagttaaccc gatcgtaca gaaaagata gcccggtcaa catagaagca 420
 gaacctccat tcggagacag ctacatcacc ataggagtag agccgggaca attgaaactc 480
 aactggttta agaaaggaag ttccatcggc caaatgtttg agacaacaat gagaggagcg 540
 aagagaatgg ccatttttagg tgacacagcc tgggattttg gaagcctggg agggtaagga 600
 tcc 603

<210> 25
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Kette
 <222> (1)..(195)
 <223> Aminosäuresequenz des Proteins PLL1

<400> 25
 His His His His His His Met Val Asp Lys Arg Met Ala Leu Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Lys Val Pro Asp Ile Gly Gly His Glu Asn Val Asp Ile Ile Ala
 20 25 30
 Val Glu Val Asn Val Gly Asp Thr Ile Ala Val Asp Asp Thr Leu Ile
 35 40 45
 Thr Leu Asp Leu Asp Arg Leu Arg Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly
 50 55 60
 Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly Lys Phe Lys Ile Val Lys Glu Ile
 65 70 75 80
 Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly
 85 90 95
 Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys

100	105	110
Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu 115	120	125
Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser 130	135	140
Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe 145	150	155
Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Gln Met Phe Glu Thr Thr Met Arg Gly 165	170	175
Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser 180	185	190
Leu Gly Gly 195		

<210> 26
 <211> 1851
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Gen
 <222> (1)..(1851)
 <223> Nucleotidsequenz der MDH in dem Plasmid pM84 His

<400> 26
 atgggccacc accaccacca ccacgccatg gtagataaaa gaatggcttt agttgaattg 60
 aaagtgcccg acattggcgg aacagaaaat gtagatatta tcgcggttga agtaaactg 120
 ggcgacacta ttgtctgtga cgataccctg attactttgg atctagattt ggatctagaa 180
 gaactagtgg atccccggg ctgcaggaat tcgatgaatt cgatggacgt acctgctgaa 240
 gttgcaggcg tagtcaaaga agttaaagtt aaagtcggcg acaaaatctc tgaagggtgt 300
 ttgattgtcg tcgttgaagc tgaaggcacg gcagccgctc ctaaagccga agcggctgce 360
 gccccggcgc aagaagcccc taaagctgcc gtcctgctc cgcaagccgc gcaattcggc 420
 ggttctgccg atgccgagta cgacgtggtc gtattgggtg gcggtcccgg cggttactcc 480
 gctgcatttg ccgctgccga tgaaggcttg aaagtcgcca tcgctgaacg ttacaaaact 540
 ttgggcccgg tttgcctgaa cgtcggctgt atcccttcca aagccttgtt gcacaatgcc 600
 gccgttatcg acgaagtgcg ccacttggtc gccaacggta tcaaatacce cgagccggaa 660
 ctcgacatcg atatgcttcg cgcctacaaa gacggcgtag tttcccgcct cacgggagg 720
 ttggcaggta tggcgaaaaag ccgtaaagtg gacgttatcc aaggcgacgg gcaattctta 780
 gatccgcacc acttggaagt gtcgctgact gccggcgacg cgtacgaaca ggcagcccct 840
 accggcgaga aaaaaatcgt tgccttcaaa aactgtatca ttgcagcagg cagccgcgta 900
 accaaaactgc ctttcattcc tgaagatccg cgcacatcgc attccagcgg cgcattggct 960
 ctgaaagaag taccgggcaa actgctgatt atcggcggcg gcattatcgg cctcgagatg 1020
 ggtacggttt acagcacgct gggttcgcgt ttggatgtgg ttgaaatgat ggacggcctg 1080
 atgcaaggcg cagaccgcga tttggtaaaa gtatggcaaa aacaaaacga ataccgtttt 1140
 gacaacatta tggtaaacac caaaaccggt gcagttgagc cgaaagaaga cggcgtttac 1200
 gttacctttg aaggcgcgaa cgcgcctaaa gagccgcaac gctacgatgc cgtattgggt 1260
 gccgcccggc gcgcgcccaa cggcaaacctc atcagcgcgg aaaaagcagg cgttgccgta 1320
 accgatcgcg gcttcacgta agtggacaaa caaatgcgta ccaatgtgcc gcacatctac 1380
 gccatcggcg acatcgtcgg tcagccgatg ttggcgcaaa aagccgttca cgaaggccac 1440
 gttgccgccc aaaactgcgc cggccacaaa gcctacttcg acgcacgctg gattccgggc 1500
 gttgcctaca cttcccccca agtggcgtgg gtgggcgaaa ccgaactgtc cgccaaagcc 1560
 tccggcccga aaatcaccaa agccaacttc ccgtgggcgg cttccggccc tgcgattgce 1620
 aacggttcgc acaagccggt taccaagctg atttttgatg ccgaaaccgg ccgcatcacc 1680
 ggcggcgcca ttgtcggctc gaacggtgcc gatatgatcg gcgaagtctg ccttgccatc 1740

gaaatgggct gcgacgcggc agacatcggc aaaacatcc acccgcaccc gggcgaatcc 1900
 atcggtatgg cggcggaagt ggcattgggt acttgtaccg acaaaaaaaaa a 1851

<210> 27
 <211> 2253
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Gen
 <222> (1)..(2253)
 <223> Nucleotidsequenz des chimären Proteins in dem Plasmid pLL2 2

<400> 27
 atgggccacc accaccacca ccacgccatg gtagataaaa gaatggcttt agttgaattg 60
 aaagtgcccg acattggcgg aacagaaaat gtagatatta tcgcggttga agtaaactgt 120
 ggcgacacta ttgctgtgga cgataccctg attactttgg atctagattt ggatctagac 180
 aggctgcgca tggacaaact acagctcaaa ggaatgtcat actctatgtg tacaggaaag 240
 tttaaaattg tgaaggaaat agcagaaaca caacatggaa caatagttat cagagtacaa 300
 tatgaagggg acggtctctc atgtaagatc ccttttgaga taatggattt ggaaaaaaga 360
 cacgtcttag gtcgcctgat tacagttaac ccgatcgtaa cagaaaaaga tagcccagtc 420
 aacatagaag cagaacctcc attcggagac agctacatca tcataggagt agagccggga 480
 caattgaaac tcaactgggt taagaaagga agttccatcg gccaaatgtt tgagacaaca 540
 atgagaggag gaaagagaat ggccatttta ggtgacacag cctgggattt tggatctctg 600
 ggaggcgtga attcgatgaa ttcgatggac gtacctgctg aagttgcagg cgtagtcaaa 660
 gaagttaaag ttaaagtcgg cgacaaaatc tctgaagggt gtttgattgt cgtcgttgaa 720
 gctgaaggca cggcagccgc tcctaaagcc gaagcggctg ccgcccggc gcaagaagcc 780
 cctaaagctg ccgctcctgc tccgcaagcc gcgcaattcg gcggttctgc cgatgccgag 840
 tacgacgtgg tegtattggg tggcggctcc ggcggttact ccgctgcatt tgccgctgcc 900
 gatgaaggct tgaagtcgc catcgtcgaa cgttacaaaa ctttgggcgg cgtttgctg 960
 aacgtcggct gtatcccttc caaagccttg ttgcacaatg ccgccgttat cgacgaagtg 1020
 cgccacttgg ctgccaacgg tatcaaatc cccgagccgg aactcgacat cgatatgctt 1080
 cgcgcctaca aagacggcgt agtttcccgc ctcacggcgg gtttggcagg tatggcгаа 1140
 agccgtaaag tggacgttat ccaagggcag gggcaattct tagatccgca ccaacttggaa 1200
 gtgtcgtgta ctgccggcga cgcgtacgaa caggcagccc ctaccggcga gaaaaaatc 1260
 gttgccttca aaaactgtat cattgcagca ggcagccggc taaccaaact gcctttcatt 1320
 cctgaagatc cgcgcatcat cgattccagc ggcgcatcgg ctctgaaaga agtaccgggc 1380
 aaactgctga ttatcggcgg cggcattatc ggcctcgaga tgggtacggt ttacagcacg 1440
 ctgggttcgc gtttggatgt ggttgaaatg atggacggcc tgatgcaagg cgcagaccgc 1500
 gatttggtaa aagtatggca aaaacaaaac gaataccgtt ttgacaacat tatggtcaac 1560
 accaaaaccg ttgcagttga gccgaaagaa gacggcgttt acgttacctt tgaaggcggc 1620
 aacgcgccta aagagccgca acgctacgat gccgtattgg ttgccggcgg ccgcgcgccc 1680
 aacggcaaac tcatcagcgc ggaaaaagca ggcggttgcg taaccgatcg cggcttcac 1740
 gaaagtggaca acaaatgcy taccaatgtg ccgcacatct acgcatcgg cgacatcgtc 1800
 ggtcagccga tgttggcgca caaagccgtt cacgaaaggcc acgttgccgc cgaaaactgc 1860
 gccggccaca aagcctactt cgacgcacgc gtgattccgg gcgttgccca cacttcccc 1920
 gaaagtggcgt ggggtggcga aaccgaaactg tccgcaaaag cctccggccg caaaatcacc 1980
 aaagccaact tcccgtgggc ggcttccggc cgtgcgattg ccaacggttg cgacaagccg 2040
 tttaccaagc tgatttttga tgccgaaacc ggccgatca tcggcggcgg cattgtcgg 2100
 ccgaacggtg gcgatatgat cggcgaagtc tgccttgcca tcgaaatggg ctgagcgcgg 2160
 gcagacatcg gcaaaacat ccaccgcac ccgggcgaat ccacgggtat ggcggcggaa 2220
 gtggcattgg gtacttgtac cgacaaaaaa aaa 2253

<210> 28
 <211> 748
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<220>

<221> Kette

<222> (1)..(748)

<223> Aminosäuresequenz von PLL2

<400> 28

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

Tyr Lys Thr Leu Gly Gly Val Cys Leu Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser
 305 310 315 320
 Lys Ala Leu Leu His Asn Ala Ala Val Ile Asp Glu Val Arg His Leu
 325 330 335
 Ala Ala Asn Gly Ile Lys Tyr Pro Glu Pro Glu Leu Asp Ile Asp Met
 340 345 350
 Leu Arg Ala Tyr Lys Asp Gly Val Val Ser Arg Leu Thr Gly Gly Leu
 355 360 365
 Ala Gly Met Ala Lys Ser Arg Lys Val Asp Val Ile Gln Gly Asp Gly
 370 375 380
 Gln Phe Leu Asp Pro His His Leu Glu Val Ser Leu Thr Ala Gly Asp
 385 390 395 400
 Ala Tyr Glu Gln Ala Ala Pro Thr Gly Glu Lys Lys Ile Val Ala Phe
 405 410 415
 Lys Asn Cys Ile Ile Ala Ala Gly Ser Arg Val Thr Lys Leu Pro Phe
 420 425 430
 Ile Pro Glu Asp Pro Arg Ile Ile Asp Ser Ser Gly Ala Leu Ala Leu
 435 440 445
 Lys Glu Val Pro Gly Lys Leu Leu Ile Ile Gly Gly Gly Ile Ile Gly
 450 455 460
 Leu Glu Met Gly Thr Val Tyr Ser Thr Leu Gly Ser Arg Leu Asp Val
 465 470 475 480
 Val Glu Met Met Asp Gly Leu Met Gln Gly Ala Asp Arg Asp Leu Val
 485 490 495
 Lys Val Trp Gln Lys Gln Asn Glu Tyr Arg Phe Asp Asn Ile Met Val
 500 505 510
 Asn Thr Lys Thr Val Ala Val Glu Pro Lys Glu Asp Gly Val Tyr Val
 515 520 525
 Thr Phe Glu Gly Ala Asn Ala Pro Lys Glu Pro Gln Arg Tyr Asp Ala
 530 535 540
 Val Leu Val Ala Ala Gly Arg Ala Pro Asn Gly Lys Leu Ile Ser Ala
 545 550 555 560
 Glu Lys Ala Gly Val Ala Val Thr Asp Arg Gly Phe Ile Glu Val Asp
 565 570 575
 Lys Gln Met Arg Thr Asn Val Pro His Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Ile
 580 585 590
 Val Gly Gln Pro Met Leu Ala His Lys Ala Val His Glu Gly His Val
 595 600 605
 Ala Ala Glu Asn Cys Ala Gly His Lys Ala Tyr Phe Asp Ala Arg Val
 610 615 620

Ile Pro Gly Val Ala Tyr Thr Ser Pro Glu Val Ala Trp Val Gly Glu
625 630 635 640

Thr Glu Leu Ser Ala Lys Ala Ser Gly Arg Lys Ile Thr Lys Ala Asn
645 650 655

Phe Pro Trp Ala Ala Ser Gly Arg Ala Ile Ala Asn Gly Cys Asp Lys
660 665 670

Pro Phe Thr Lys Leu Ile Phe Asp Ala Glu Thr Gly Arg Ile Ile Gly
675 680 685

Gly Gly Ile Val Gly Pro Asn Gly Gly Asp Met Ile Gly Glu Val Cys
690 695 700

Leu Ala Ile Glu Met Gly Cys Asp Ala Ala Asp Ile Gly Lys Thr Ile
705 710 715 720

His Pro His Pro Gly Glu Ser Ile Gly Met Ala Ala Glu Val Ala Leu
725 730 735

Gly Thr Cys Thr Asp Leu Pro Pro Gln Lys Lys Lys
740 745

<210> 29

<211> 1821

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> Gen

<222> (1)..(1821)

<223> Nucleotidsequenz der MDH in dem Plasmid pD4

<400> 29

atgggccacc accaccacca ccacgccatg gtagataaaa gaatggcttt agttgaattg 60
 aaagtgcccg acattggcgg acacgaaaat gtagatatta tcgcggttga agtaaacgtg 120
 ggcgacacta ttgctgtgga cgataccctg attactttgg atctagaaat ggacgtacct 180
 gctgaagttg caggcgtagt caaagaagtt aaagttaaag tcggcgacaa aatctctgaa 240
 ggtggtttga ttgctgctgt tgaagctgaa ggcacggcag ccgctcctaa agccgaagcg 300
 gctgccgccc cggcgcaaga agcccctaaa gctgccgctc ctgctccgca agccgcgcaa 360
 ttcggcgggt ctgccgatgc cgagtacgac gtggtcgtat tgggtggcgg tcccggcggg 420
 tactccgctg catttgccgc tgccgatgaa ggcttgaag tcgccatcgt cgaacggtac 480
 aaaactttgg gcggcgtttg cctgaaactg ggctgtatcc cttccaaagc ctgtgtgca 540
 aatgccgccc ttatcgacga agtgcgccac ttggctgcca acggtatcaa ataccccgag 600
 ccggaactcg acatcgatat gttcgcgcc taaaaagac gcgtagtttc ccgcctcacg 660
 ggcggtttgg caggtatggc gaaaagccgt aaagtggacg ttatccaagg cgacgggcaa 720
 ttcttagatc cgcaccactt ggaagtgtcg ctgactgccg gcgacgcgta cgaacaggca 780
 gccctaccg gcgagaaaaa aatcgttgcc ttcaaaaact gtatcattgc agcaggcagc 840
 cgcgtaacca aactgccttt cattcctgaa gatccgcgca tcatcgatc cagcggcgca 900
 ttggtcttga aagaagtacc gggcaactg ctgattatcg gcggcggcat tatcggcctc 960
 gagatgggta cggtttacag cacgctgggt tcgcgtttgg atgtggttga aatgatggac 1020
 ggcctgatgc aaggcgcaga ccgcgatttg gtaaaagtat ggcaaaaaca aaacgaatac 1080
 cgttttgaca acattatggt caacaccaaa accgttgacg ttgagccgaa agaagacggc 1140
 gtttacgtta ctttgaagg cgcgaacgcg ctaaaagagc cgcaacgcta cgatgccgta 1200
 ttggttgccg ccggccgcgc gcccaacggc aaactcatca gcgcggaaaa agcaggcggt 1260
 gccgtaaccg atcgcggctt catcgaagtg gacaacaaa tgcgtaccaa tgtgccgcac 1320
 atctacgcca tcggcgacat cgtcggtcag ccgatgttgg cgcacaaagc cgttcacgaa 1380
 ggccacgttg ccgccgaaaa ctgcgcgggc cacaaagcct acttcgacgc acgcgtgatt 1440

```

ccgggcggtg cctacacttc ccccggaagtg gcgtgggtgg gcgaaaccga actgtccgcc 1500
aaagcctccg gccgcaaaat caccaaagcc aacttcccgt gggcggttc cggccgtgcg 1560
attgccaacg gttgcgacaa gccggtttacc aagctgattt ttgatgccga aaccggccgc 1620
atcatcgcg gcggcattgt cggtcggaac ggtggcgata tgatcggcga agtctgcctt 1680
gccatcgaaa tgggctgcga cgcggcagac atcggcaaaa ccatccacc gcacccgacc 1740
ttgggcgaat ccatcgggat ggcggcgga gtggcattgg gtacttgta cgcacctgct 1800
ccgcaaaaga aaaaaggatc c

```

<210> 30

<211> 2259

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> Gen

<222> (1)..(2259)

<223> Nucleotidsequenz, welche das chlmäre Protein in dem Plasmid pLL3 codiert

<400> 30

```

atgggcccacc accaccacca ccacgccatg gtagataaaa gaatggcttt agttgaattg 60
aaagtgcctcg acattggcgg acacgaaaat gtagatatta tcgcggttga agtaaacgtg 120
ggcgacacta ttgctgtgga cgataccctg attactttgg atctagaaat ggacgtacct 180
gctgaagttg caggcgtagt caaagaagtt aaagttaaag tcggcgacaa aatctctgaa 240
ggtggtttga ttgctgctgt tgaagctgaa ggcacggcag ccgctcctaa agccgaagcg 300
gctgccgccc cggcgcaaga agcccctaaa getgccgctc ctgctccgca agccgcgcaa 360
ttcggcggtt ctgccgatgc cgaqtacgac gtggtcgtat tgggtggcgg tcccggcggg 420
tactccgctg catttgccgc tgccgatgaa ggettgaaag tcgccatcgt cgaacgttac 480
aaaactttgg gcggcgtttg cctgaacgctc agtgcgccac ttggtgcca acggtatcaa ataccccag 600
aatgcccgcg ccggaactcg acatcgatat gcttcgcgcc tacaagacg gcgtagtttc ccgcctcacg 660
ggcggtttgg caggtatggc gaaagccgt aaagtggacg ttatccaagg cgacgggcaa 720
ttcttagatc cgcaccactt ggaagtgtcg ctgactgccg gcgacgcgta cgaacaggca 780
gccctaccg gcgagaaaaa aatcgttgcc ttcaaaaact gtatcattgc agcaggcagc 840
cgcgtaacca aactgccttt cattcctgaa gatccgcgca tcatcgattc cagcggcgca 900
ttggtcttga aagaagtacc gggcaactg ctgattatcg gcggcggcat tatcggcctc 960
gagatgggta cgttttacag cacgctgggt tcgcttttgg atgtggttga aatgatggac 1020
ggcctgatgc aagcgcgaga ccgcgatttg gtaaaagtat ggcaaaaaca aaacgaatac 1080
cgttttgaca acattatggt caacacaaa accgttgcag ttgagccgaa agaagacggc 1140
gtttacgtta cctttgaagg cgcgaacgcg cctaaagagc cgcaacgcta cgatcccgta 1200
ttggttgccg ccggccgcgc gcccaacggc aaactcatca gcgcggaaaa agcaggcggt 1260
gccgtaaccg atcgcggcct catcgaagtg gacaaacaaa tgcgtaccaa tgtgccgcac 1320
atctacgcca tcggcgacat cgtcggtcag ccgatgttgg cgcacaaagc cgttcacgaa 1380
ggccacgttg ccgccgaaaa ctgcgcgggc cacaagcct acttcgacgc acgcgtgatt 1440
ccgggcggtt cctacacttc cccggaagtg gcgtgggtgg gcgaaaccga actgtccgcc 1500
aaagcctccg gccgcaaaat caccaaagcc aacttcccgt gggcggttc cggccgtgcg 1560
attgccaacg gttgcgacaa gccggtttacc aagctgattt ttgatgccga aaccggccgc 1620
atcatcgcg gcggcattgt cgtccgaac ggtggcgata tgatcggcga agtctgcctt 1680
gccatcgaaa tgggctgcga cgcggcagac atcggcaaaa ccatccacc gcacccgacc 1740
ttgggcgaat ccatcgggat ggcggcgga gtggcattgg gtacttgta cgcacctgct 1800
ccgcaaaaga aaaaaggatc cgacaggctg agaatggaca aactacagct caaaggaatg 1860
tcatactcta tgtgtacagg aaagttaaa attgtgaagg aaatagcaga aacacaacat 1920
ggaacaatag ttatcagagt acaatatgaa ggggacggct ctccatgtaa gatccctttt 1980
gagataatgg atttgaaaa aagacacgct ttaggtcgcc tgattacagt taacccgatc 2040
gtaacagaaa aagatagccc agtcaacata gaagcagaac ctccattcgg agacagctac 2100
atcatcatag gagtagagcc gggacaattg aaactcaact ggtttaagaa aggaagtcc 2160
atcggccaaa tgtttgagac aacaatgaga ggaagcaga gaatggccat tttaggtgac 2220
acagcctggg attttgggtc tctgggtggt taaggatcc 2259

```

<210> 31
 <211> 745
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Kette
 <222> (1)..(745)
 <223> Aminosäuresequenz von PLL3

<400> 31
 His His His His His His Met Val Asp Lys Arg Met Ala Leu Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Lys Val Pro Asp Ile Gly Gly His Glu Asn Val Asp Ile Ile Ala
 20 25 30
 Val Glu Val Asn Val Gly Asp Thr Ile Ala Val Asp Asp Thr Leu Ile
 35 40 45
 Thr Leu Asp Met Asn Ser Met Asp Val Pro Ala Glu Val Ala Gly Val
 50 55 60
 Val Lys Glu Val Lys Val Lys Val Gly Asp Lys Ile Ser Glu Gly Gly
 65 70 75 80
 Leu Ile Val Val Val Glu Ala Glu Gly Thr Ala Ala Ala Pro Lys Ala
 85 90 95
 Glu Ala Ala Ala Ala Pro Ala Gln Glu Ala Pro Lys Ala Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ala Pro Gln Ala Ala Gln Phe Gly Gly Ser Ala Asp Ala Glu Tyr Asp
 115 120 125
 Val Val Val Leu Gly Gly Gly Pro Gly Gly Tyr Ser Ala Ala Phe Ala
 130 135 140
 Ala Ala Asp Glu Gly Leu Lys Val Ala Ile Val Glu Arg Tyr Lys Thr
 145 150 155 160
 Leu Gly Gly Val Cys Leu Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys Ala Leu
 165 170 175
 Leu His Asn Ala Ala Val Ile Asp Glu Val Arg His Leu Ala Ala Asn
 180 185 190
 Gly Ile Lys Tyr Pro Glu Pro Glu Leu Asp Ile Asp Met Leu Arg Ala
 195 200 205
 Tyr Lys Asp Gly Val Val Ser Arg Leu Thr Gly Gly Leu Ala Gly Met
 210 215 220
 Ala Lys Ser Arg Lys Val Asp Val Ile Gln Gly Asp Gly Gln Phe Leu
 225 230 235 240
 Asp Pro His His Leu Glu Val Ser Leu Thr Ala Gly Asp Ala Tyr Glu
 245 250 255
 Gln Ala Ala Pro Thr Gly Glu Lys Lys Ile Val Ala Phe Lys Asn Cys
 260 265 270

Ile Ile Ala Ala Gly Ser Arg Val Thr Lys Leu Pro Phe Ile Pro Glu
 275 280 285
 Asp Pro Arg Ile Ile Asp Ser Ser Gly Ala Leu Ala Leu Lys Glu Val
 290 300
 Pro Gly Lys Leu Leu Ile Ile Gly Gly Gly Ile Ile Gly Leu Glu Met
 305 310 315 320
 Gly Thr Val Tyr Ser Thr Leu Gly Ser Arg Leu Asp Val Val Glu Met
 325 330 335
 Met Asp Gly Leu Met Gln Gly Ala Asp Arg Asp Leu Val Lys Val Trp
 340 345 350
 Gln Lys Gln Asn Glu Tyr Arg Phe Asp Asn Ile Met Val Asn Thr Lys
 355 360 365
 Thr Val Ala Val Glu Pro Lys Glu Asp Gly Val Tyr Val Thr Phe Glu
 370 375 380
 Gly Ala Asn Ala Pro Lys Glu Pro Gln Arg Tyr Asp Ala Val Leu Val
 385 390 395 400
 Ala Ala Gly Arg Ala Pro Asn Gly Lys Leu Ile Ser Ala Glu Lys Ala
 405 410 415
 Gly Val Ala Val Thr Asp Arg Gly Phe Ile Glu Val Asp Lys Gln Met
 420 425 430
 Arg Thr Asn Val Pro His Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Ile Val Gly Gln
 435 440 445
 Pro Met Leu Ala His Lys Ala Val His Glu Gly His Val Ala Ala Glu
 450 455 460
 Asn Cys Ala Gly His Lys Ala Tyr Phe Asp Ala Arg Val Ile Pro Gly
 465 470 475 480
 Val Ala Tyr Thr Ser Pro Glu Val Ala Trp Val Gly Glu Thr Glu Leu
 485 490 495
 Ser Ala Lys Ala Ser Gly Arg Lys Ile Thr Lys Ala Asn Phe Pro Trp
 500 505 510
 Ala Ala Ser Gly Arg Ala Ile Ala Asn Gly Cys Asp Lys Pro Phe Thr
 515 520 525
 Lys Leu Ile Phe Asp Ala Glu Thr Gly Arg Ile Ile Gly Gly Gly Ile
 530 535 540
 Val Gly Pro Asn Gly Gly Asp Met Ile Gly Glu Val Cys Leu Ala Ile
 545 550 555 560
 Glu Met Gly Cys Asp Ala Ala Asp Ile Gly Lys Thr Ile His Pro His
 565 570 575
 Pro Gly Glu Ser Ile Gly Met Ala Ala Glu Val Ala Leu Gly Thr Cys
 580 585 590

Thr Asp Leu Pro Pro Gln Lys Lys Lys Gly Ser Arg Leu Arg Met Asp
 595 600 605
 Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly Lys Phe
 610 615 620
 Lys Ile Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Val Ile
 625 630 635 640
 Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro Phe Glu
 645 650 655
 Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr Val
 660 665 670
 Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu
 675 680 685
 Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro Gly Gln
 690 695 700
 Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Gln Met Phe
 705 710 715 720
 Glu Thr Thr Met Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly Asp Thr
 725 730 735
 Ala Trp Asp Phe Gly Ser Leu Gly Gly
 740 745

<210> 32
 <211> 429
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Gen
 <222> (1)..(429)
 <223> Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuren 286 bis 426 des DEN-1-Hüllproteins codiert

<400> 32
 agactaaaaa tggataaact gactttaaaa ggggtatcat atgtaatgtg cacaggggtca 60
 ttcaagttag agaaggaagt ggctgagacc cagcatggaa ctgttctagt gcagggttaa 120
 tacgaaggaa cagatgcacc atgcaagatc cccttctcgt cccaagatga gaaaggagta 180
 acccagaatg ggagattgat aacagccaac cccatagtca ttgacaaaga aaaaccagtc 240
 aacattgaag cggagccacc ttttggtgag agctatattg tggtagggagc aggtgaaaaa 300
 gctttgaaac taagctgggt caagaaggga agcagtatag ggaaaatggt tgaagcaact 360
 gcccgtaggag cacgaaggat ggccatcctg ggagacaccg catgggactt cggttctata 420
 ggagggtaa 429

<210> 33
 <211> 615
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Gen
 <222> (1)..(615)

<223> Nucleotidsequenz, welche das chimäre Protein in dem Plasmid pLH1 codiert

<400> 33

```

atgggccacc accaccacca ccacgccatg gtagataaaa gaatggcttt agttgaattg 60
aaagtgcccg acattggcgg aacagaaaat gtagatatta tcgcggttga agtaaactg 120
ggcgacacta ttgctgtgga cgataccctg attactttgg atctagattt ggatctagac 180
aggctcaaaa tggataaaact gactttaaaa ggggtatcat atgtaatgtg cacagggtca 240
ttcaagttag agaaggaagt ggctgagacc cagcatggaa ctggttctagt gcagggttaa 300
tacgaaggaa cagatgcacc atgcaagatc cccttctcgt cccaagatga gaaaggagta 360
accagaatg ggagattgat aacagccaac cccatagtca ttgacaaaga aaaaccagtc 420
aacattgaag cggagccacc ttttggtgag agctatattg tggtaggagc aggtgaaaaa 480
gctttgaaac taagctggtt caagaaggga agcagtatag ggaaaatggt tgaagcaact 540
gcccgtagag cacgaaggat ggccatcctg ggagacaccg catgggactt cggttctatt 600
ggcgggtaag gatcc 615

```

<210> 34

<211> 174

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> Kette

<222> (1)..(174)

<223> Aminosäuresequenz von PLH1

<400> 34

```

His His His His His His Met Val Asp Lys Arg Met Ala Leu Val Glu
 1                    5                10                15
Leu Lys Val Pro Asp Ile Gly Gly His Glu Asn Val Asp Ile Ile Ala
 20                25                30
Val Glu Val Asn Val Gly Asp Thr Ile Ala Val Asp Asp Thr Leu Ile
 35                40                45
Thr Leu Asp Leu Asp Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln
 50                55                60
His Gly Thr Val Leu Val Gln Val Lys Tyr Gln Gly Thr Asp Ala Pro
 65                70                75                80
Cys Lys Ile Pro Phe Ser Thr Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn
 85                90                95
Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val
 100               105               110
Asn Ile Glu Thr Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Val Gly
 115               120               125
Ala Gly Glu Lys Ala Leu Lys Gln Cys Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser
 130               135               140
Ile Gly Lys Met Phe Glu Ala Thr Ala Arg Gly Ala Arg Arg Met Ala
 145               150               155               160
Ile Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly
 165               170

```

<210> 35
 <211> 2253
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Gen
 <222> (1)..(2253)
 <223> Nucleotidsequenz, welche das chimäre Protein in dem Plasmid pLH2 codiert

<400> 35
 atggggccacc accaccacca ccacgccatg gtagataaaa gaatggcttt agttgaattg 60
 aaagtgcccg acattggcgg aacagaaaat gtagatatta tcgcggttga agtaaacgtg 120
 ggcgacacta ttgctgtgga cgataccctg attactttgg atctagattt ggatctagac 180
 aggctcaaaa tggataaact gactttaaaa ggggtatcat atgtaatgtg cacaggggtca 240
 ttcaagttag agaaggaagt ggctgagacc cagcatggaa ctgttctagt gcaggttaa 300
 tacgaaggaa cagatgcacc atgcaagatc cccttctcgt cccaagatga gaaaggagta 360
 acccagaatg ggagattgat aacagccaac cccatagtca ttgacaaaaga aaaaccagtc 420
 aacattgaag cggagccacc ttttgggtgag agctatattg tggtagggagc aggtgaaaaa 480
 gctttgaaac taagctgggt caagaaggga agcagtatag ggaaaatgtt tgaagcaact 540
 gcccggtggag cacgaaggat ggccatcctg ggagacaccg catgggactt cggatctata 600
 ggaggggtga attcgatgaa ttcgatggac gtacctgctg aagttgcagg cgtagtcaaa 660
 gaagttaaag ttaaagtcgg cgacaaaatc tctgaagggtg gtttgattgt cgtcgttga 720
 gctgaaggca cggcagccgc tcctaaagcc gaagcggctg ccgccccggc gcaagaagcc 780
 cctaaagctg ccgctcctgc tccgcaagcc gcgcaattcg gcggttctgc cgtatgccgag 840
 tacgacgtgg tcgtattggg tggcgggtccc ggcggttact ccgctgcatt tgcgctgcc 900
 gatgaaggct tgaagtcgc catcgtcgaa cgttacaaa ctttggggcgg cgtttgcctg 960
 aaactcggct ttatcccttc caaagcctg ttgcacaatg ccgccgttat cgacgaagtg 1020
 cgccaactgg gtgccaacgg tatcaaatc cccgagccgg aactcgacat cgtatgctt 1080
 cgcgcctaca aagacggcgt agtttcccgc ctcacgggcg gtttggcagg tatggcgaaa 1140
 agccgtaaag tggacgttat ccaagcgcac gggcaattct tagatccgca ccacttgaa 1200
 gtgtcgtga ctgccggcga cgcgtacgaa caggcagccc ctaccggcga gaaaaaatc 1260
 gttgccttca aaaactgtat cattgcagca ggcagccgcg taaccaaact gcctttcatt 1320
 cctgaagatc cgcgcatcat cgattccagc ggcgcattgg ctctgaaaga agtaccgggc 1380
 aaactgctga ttatcggcgg cggcattatc ggcctcgaga tgggtacggt ttacagcagc 1440
 ctgggttcgc gtttggatgt gttgaaatg atggacggcc tgatgcaagg cgcagaccgc 1500
 gatttggtaa aagtatggca aaaacaaaac gaataccggt ttgacaacat tatggtcaac 1560
 accaaaaccg ttgcagttga gccgaagaa gacggcgttt acgttacctt tgaaggcgcg 1620
 aacgcgccta aagagccgca acgctacgat gccgtattgg ttgccgccgg ccgcccgcgc 1680
 aacggcaaac tcatcagcgc ggaaaaagca ggcgttgccg taaccgatcg cggcttcac 1740
 gaagtggaca acaaatgcyg taccaatgtg ccgcacatct acgccatcgg cgacatcgtc 1800
 ggtcagccga tgttggcgca caaagccggt cacgaaggcc acgttgccgc cgaaaactgc 1860
 gccggccaca aagcctactt cgacgcacgc gtgattccgg gcgttgccta cacttcccc 1920
 gaagtggcgt ggggtggcga aaccgaactg tccgccaaag cctccggccg caaatcacc 1980
 aaagccaact tcccggtggc ggcttccggc cgtgcgattg ccaacggttg cgacaagccg 2040
 ttaccaagc tgatttttga tgccgaaacc ggcgcacatc tcggcggcgg cattgtcgtt 2100
 ccgaacggtg gcgatatgat cggcgaagtc tgcttgcca tcgaaatggg ctgcgacgcg 2160
 gcagacatcg gcaaaacat ccaccgcac ccgggcgaat ccatcggtat ggcggcggaa 2220
 gtggcattgg gtacttgtac cgacaaaaaa aaa 2253

<210> 36
 <211> 727
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Kette
 <222> (1)..(727)

<223> Aminosäuresequenz von PLH2

<400> 36

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

Ser Gly Arg Ala Ile Ala Asn Gly Cys Asp Lys Pro Phe Thr Lys Leu
645 650 655

Ile Phe Asp Ala Glu Thr Gly Arg Ile Ile Gly Gly Gly Ile Val Gly
660 665 670

Pro Asn Gly Gly Asp Met Ile Gly Glu Val Cys Leu Ala Ile Glu Met
675 680 685

Gly Cys Asp Ala Ala Asp Ile Gly Lys Thr Ile His Pro His Pro Gly
690 695 700

Glu Ser Ile Gly Met Ala Ala Glu Val Ala Leu Gly Thr Cys Thr Asp
705 710 715 720

Leu Pro Pro Gln Lys Lys Lys
725

<210> 37

<211> 2250

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> Gen

<222> (1)..(2250)

<223> Nucleotidsequenz, welche das chlmäre Protein in dem Plasmid pLH3 codiert

<400> 37

```

atgggccacc accaccacca ccacgccatg gtagataaaa gaatggcttt agttgaattg 60
aaagtgcccg acattggcgg acacgaaaat gtagatatta tcgcggttga agtaaactg 120
ggcgacacta ttgctgtgga cgataccctg attactttgg atctagaaat ggacgtacct 180
gctgaagtgg caggcgtagt caaagaagtt aaagttaaag tcggcgacaa aatctctgaa 240
ggtggtttga ttgtcgtcgt tgaagctgaa ggcaacggag ccgctcctaa agccgaagcg 300
gctgccgccc cggcgcaaga agcccctaaa gctgccgctc ctgctccgca agcccgcaaa 360
ttcggcgggt ctgccgatgc cgagtacgac gtggtcgtat tgggtggcgg tcccggcgg 420
tactccgctg catttgccgc tgcgatgaa ggctgaaag tcgccatcgt cgaacgttac 480
aaaactttgg gggcgctttg cctgaaactc ggctgtatcc cttccaaagc cttgttgcac 540
aatgccgccc ttatcgacga agtgcgccac ttggctgcca acggtatcaa ataccgccag 600
ccggaactcg acattatggt gcttcgcgcc taaaaagacg gcgtagtttc ccgctcacg 660
ggcggtttgg caggtatggc gaaaagccgt aaagtggacg ttatccaagg cgacgggcaa 720
ttcttagatc cgcaccactt ggaagtgtcg ctgactgccg gcgacgcgta cgaacaggca 780
gcccetaccg gcgagaaaaa aatcgttgcc ttcaaaaact gtatcattgc agcagggcagc 840
cgcgtaacca aactgccttt cattcctgaa gatccgcgca tcatcgattc cagcggcgca 900
ttggctctga aagaagtacc gggcaaaact ctgattatcg gcggcggcat taccggcctc 960
gagatgggta cggtttacag cacgctgggt tcgctgttgg atgtggttga aatgatggac 1020
ggcctgatgc aaggcgcaga ccgcgatttg gtaaaagtat ggcaaaaaca aaacgaatac 1080
cgttttgaca acattatggt caacaccaa accgttgacg ttgagccgaa agaagacggc 1140
gtttacgtta cctttgaagg cgcgaacgcg cctaaagagc cgcaacgcta cgtgccgta 1200
ttggttgccg ccggccgcgc gcccaacggc aaactcatca gcgcggaaaa agcagggcgtt 1260
gccgtaaccg atcgcggctt catcgaagtg gacaaacaaa tgcgtaccaa tgtgccgcac 1320
atctacgcca tcggcgacat cgtcggtcag ccgatggttg cgcacaaagc cgttcacgaa 1380
ggccaacttg ccgccgaaaa ctgcccggc cacaagcct acttcgacgc acgctgatt 1440
ccggcgcttg cctacacttc ccccgaagtg gcgtgggttg gcgaaaccga actgtccgcc 1500
aaagcctccg gccgcaaat caccaaagcc aacttcccgt ggccggcttc cggccgtgcg 1560
attccaacg gttgcgacaa gccgtttacc aagetgatt ttgatgccga aaccggccgc 1620
atcatcgccg gcggcattgt cggcggcaac ggtggcgata tgatcggcga agtctgcctt 1680
gccatcgaaa tgggtcgcga cgcggcagac atcgcaaaa ccatccacce gcacccgacc 1740

```

```

ttgggcgaat ccatcgggat ggcggcggaa gtggcattgg gtacttgtac cgacctgcct 1800
ccgcaaaaaga aaaaaggatc cagactaaaa atggataaac tgactttaaa aggggtatca 1860
tatgtaatgt gcacagggtc attcaagtta gagaaggaag tggctgagac ccagcatgga 1920
actgttctag tgcagggtta ataccgaagga acagatgcac catgcaagat ccccttctcg 1980
tccaagatg agaaggagt aaccagaat gggagattga taacagccaa ccccatagtc 2040
attgacaaag aaaaaccagt caacattgaa gcggagccac cttttggtga gagctatatt 2100
gtggtaggag caggtgaaaa agctttgaaa ctaagctggt tcaagaagg aagcagtata 2160
gggaaaatgt ttgaagcaac tgcccgtgga gcacgaagga tggccatcct gggagacacc 2220
gcatgggact tcggttctat aggtgggtaa 2250

```

```

<210> 38
<211> 724
<212> PRT
<213> Escherichia coli

```

```

<220>
<221> Kette
<222> (1)..(724)
<223> Aminosäuresequenz von PLH3

```

```

<400> 38
His His His His His His Met Val Asp Lys Arg Met Ala Leu Val Glu
  1              5              10              15
Leu Lys Val Pro Asp Ile Gly Gly His Glu Asn Val Asp Ile Ile Ala
  20              25              30
Val Glu Val Asn Val Gly Asp Thr Ile Ala Val Asp Asp Thr Leu Ile
  35              40              45
Thr Leu Asp Met Asn Ser Met Asp Val Pro Ala Glu Val Ala Gly Val
  50              55              60
Val Lys Glu Val Lys Val Lys Val Gly Asp Lys Ile Ser Glu Gly Gly
  65              70              75              80
Leu Ile Val Val Val Glu Ala Glu Gly Thr Ala Ala Ala Pro Lys Ala
  85              90              95
Glu Ala Ala Ala Ala Pro Ala Gln Glu Ala Pro Lys Ala Ala Ala Pro
 100              105              110
Ala Pro Gln Ala Ala Gln Phe Gly Gly Ser Ala Asp Ala Glu Tyr Asp
 115              120              125
Val Val Val Leu Gly Gly Gly Pro Gly Gly Tyr Ser Ala Ala Phe Ala
 130              135              140
Ala Ala Asp Glu Gly Leu Lys Val Ala Ile Val Glu Arg Tyr Lys Thr
 145              150              155              160
Leu Gly Gly Val Cys Leu Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys Ala Leu
 165              170              175
Leu His Asn Ala Ala Val Ile Asp Glu Val Arg His Leu Ala Ala Asn
 180              185              190
Gly Ile Lys Tyr Pro Glu Pro Glu Leu Asp Ile Asp Met Leu Arg Ala
 195              200              205

```

Tyr Lys Asp Gly Val Val Ser Arg Leu Thr Gly Gly Leu Ala Gly Met
 210 215 220
 Ala Lys Ser Arg Lys Val Asp Val Ile Gln Gly Asp Gly Gln Phe Leu
 225 230 235 240
 Asp Pro His His Leu Glu Val Ser Leu Thr Ala Gly Asp Ala Tyr Glu
 245 250 255
 Gln Ala Ala Pro Thr Gly Glu Lys Lys Ile Val Ala Phe Lys Asn Cys
 260 265 270
 Ile Ile Ala Ala Gly Ser Arg Val Thr Lys Leu Pro Phe Ile Pro Glu
 275 280 285
 Asp Pro Arg Ile Ile Asp Ser Ser Gly Ala Leu Ala Leu Lys Glu Val
 290 295 300
 Pro Gly Lys Leu Leu Ile Ile Gly Gly Gly Ile Ile Gly Leu Glu Met
 305 310 315 320
 Gly Thr Val Tyr Ser Thr Leu Gly Ser Arg Leu Asp Val Val Glu Met
 325 330 335
 Met Asp Gly Leu Met Gln Gly Ala Asp Arg Asp Leu Val Lys Val Trp
 340 345 350
 Gln Lys Gln Asn Glu Tyr Arg Phe Asp Asn Ile Met Val Asn Thr Lys
 355 360 365
 Thr Val Ala Val Glu Pro Lys Glu Asp Gly Val Tyr Val Thr Phe Glu
 370 375 380
 Gly Ala Asn Ala Pro Lys Glu Pro Gln Arg Tyr Asp Ala Val Leu Val
 385 390 395 400
 Ala Ala Gly Arg Ala Pro Asn Gly Lys Leu Ile Ser Ala Glu Lys Ala
 405 410 415
 Gly Val Ala Val Thr Asp Arg Gly Phe Ile Glu Val Asp Lys Gln Met
 420 425 430
 Arg Thr Asn Val Pro His Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Ile Val Gly Gln
 435 440 445
 Pro Met Leu Ala His Lys Ala Val His Glu Gly His Val Ala Ala Glu
 450 455 460
 Asn Cys Ala Gly His Lys Ala Tyr Phe Asp Ala Arg Val Ile Pro Gly
 465 470 475 480
 Val Ala Tyr Thr Ser Pro Glu Val Ala Trp Val Gly Glu Thr Glu Leu
 485 490 495
 Ser Ala Lys Ala Ser Gly Arg Lys Ile Thr Lys Ala Asn Phe Pro Trp
 500 505 510
 Ala Ala Ser Gly Arg Ala Ile Ala Asn Gly Cys Asp Lys Pro Phe Thr
 515 520 525
 Lys Leu Ile Phe Asp Ala Glu Thr Gly Arg Ile Ile Gly Gly Gly Ile

530	535	540
Val Gly Pro Asn Gly Gly Asp Met Ile Gly Glu Val Cys Leu Ala Ile 545 550 555 560		
Glu Met Gly Cys Asp Ala Ala Asp Ile Gly Lys Thr Ile His Pro His 565 570 575		
Pro Gly Glu Ser Ile Gly Met Ala Ala Glu Val Ala Leu Gly Thr Cys 580 585 590		
Thr Asp Leu Pro Pro Gln Lys Lys Lys Gly Ser Phe Lys Leu Glu Lys 595 600 605		
Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val Leu Val Gln Val Lys Tyr 610 615 620		
Gln Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser Thr Gln Asp Glu 625 630 635 640		
Lys Gly Val Thr Gln Asn Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr 645 650 655		
Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu Thr Glu Pro Pro Phe Gly Glu 660 665 670		
Ser Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Glu Lys Ala Leu Lys Gln Cys Trp 675 680 685		
Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Met Phe Glu Ala Thr Ala Arg 690 695 700		
Gly Ala Arg Arg Met Ala Ile Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly 705 710 715 720		
Ser Ile Gly Gly		

<210> 39
 <211> 426
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Gen
 <222> (1)..(426)
 <223> Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuren 286 bis 426 des DEN-3-Hüllproteins codiert

<400> 39
 agactcaaga tggacaaatt gaaactcaag gggatgagct atgcaatgtg cttgaatacc 60
 tttgtgttga agaaagaagt ctccgaaacg cagcatggga caataactcat taaggttgag 120
 taaaagggg aagatgcacc ctgcaagatt cctttctcca cggaggatgg acaagggaaa 180
 gctcacaatg gcagactgat cacagccaat ccagtgtgga ccaagaagga ggagcctgtc 240
 aacattgagg ctgaacctcc ttttggggaa agtaatatag taattggaat tggagacaaa 300
 gccctgaaaa tcaactggta caggaaggga agctcgattg ggaagatggt cgaggccact 360
 gccagaggtg caaggcgcac ggccatcttg ggagacacag cctgggactt tggatcagtg 420
 ggtggt 426

<210> 40
 <211> 615
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Gen
 <222> (1)..(615)
 <223> Nucleotidsequenz, welche das chimäre Protein in dem Plasmid pAZ1 codiert

<400> 40
 atgggccacc accaccacca ccacgccatg gtagataaaa gaatggcttt agttgaattg 60
 aaagtgcccg acattggcgg aacagaaaat gtagatatta tcgcggttga agtaaactg 120
 ggcgacacta ttgctgtgga cgataccctg attactttgg atctagattt ggatctagat 180
 agactcaaga tggacaaatt gaaactcaag gggatgagct atgcaatgtg cttgaatacc 240
 tttgtgttga agaaagaagt ctccgaaacg cagcatggga caatactcat taagggtgag 300
 tacaaggggg aagatgcacc ctgcaagatt cctttctcca cggaggatgg acaagggaaa 360
 gctcacaatg gcagactgat cacagccaat ccagtgggta ccaagaagga ggagcctgtc 420
 aacattgagg ctgaacctcc ttttggggaa agtaatatag taattggaat tggagacaaa 480
 gccctgaaaa tcaactggta caggaagggg agctcgattg ggaagatggt cgaggccact 540
 gccagagggt caaggcgcac ggccatcttg ggagacacag cctgggactt tggttcagt 600
 ggtggttaag gatcc 615

<210> 41
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Kette
 <222> (1)..(194)
 <223> Aminosäuresequenz von PAZ1

<400> 41
 His His His His His Met Val Asp Lys Arg Met Ala Leu Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Lys Val Pro Asp Ile Gly Gly His Glu Asn Val Asp Ile Ile Ala
 20 25 30
 Val Glu Val Asn Val Gly Asp Thr Ile Ala Val Asp Asp Thr Leu Ile
 35 40 45
 Thr Leu Asp Leu Asp Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Lys Leu Lys Gly
 50 55 60
 Met Ser Tyr Ala Met Cys Leu Asn Thr Phe Val Leu Lys Lys Glu Val
 65 70 75 80
 Ser Glu Thr His Gly Thr Ile Leu Ile Lys Val Glu Tyr Lys Gly Glu
 85 90 95
 Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser Thr Glu Asp Gly Gln Gly Lys
 100 105 110
 Ala His Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Val Thr Lys Lys
 115 120 125
 Glu Glu Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Asn

130

135

140

Ile Val Ile Gly Ile Gly Asp Lys Ala Leu Lys Ile Asn Trp Tyr Arg
145 150 155 160

Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Met Phe Glu Ala Thr Ala Arg Gly Ala
165 170 175

Arg Arg Met Ala Ile Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val
180 185 190

Gly Gly

<210> 42

<211> 2253

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> Gen

<222> (1)..(2253)

<223> Nucleotidsequenz, welche das chimäre Protein in dem Plasmid pAZ2 codiert

<400> 42

```

atgggccacc accaccacca ccacgccatg gtagataaaa gaatggcttt agttgaattg 60
aaagtgcccg acattggcgg aacagaaaat gtagatatta tcgcggttga agtaaacgtg 120
ggcgacacta ttgctgtgga cgataccctg attactttgg atctagattt ggatctagat 180
agactcaaga tggacaaatt gaaactcaag gggatgagct atgcaatgtg cttgaatacc 240
tttgtgttga agaaagaagt ctccgaaacg cagcatggga caatactcat taaggttgag 300
tacaaggggg aagatgcacc ctgcaagatt cctttctcca cggaggatgg acaagggaaa 360
gctcacaatg gcgactgat cacagccaat ccagtgggta ccaagaagga ggagcctgtc 420
aacattgagg ctgaacctcc ttttggggaa agtaatatag taattggaat tggagacaaa 480
gccctgaaaa tcaactggta caggaagggg agctcgattg ggaagatgtt cgaggccact 540
gccagagggt caaggcgcat ggccatcttg ggagacacag cctgggactt tggatctgtg 600
gggtggttga attcgatgaa ttcgatggac gtacctgctg aagttgcagg cgtagtcaa 660
gaagttaaag ttaaagtcgg cgacaaaatc tctgaaggtg gtttgattgt cgtcgttga 720
gctgaaggca cggcagccgc tcctaaagcc gaagcggctg cgcgcccggc gcaagaagcc 780
cctaaagctg ccgctcctgc tccgcaagcc gcgcaattcg gcggttctgc cgatgccgag 840
tacgacgtgg tcgtattggg tggcgggtccc ggcggttact ccgctgcatt tgcgctgcc 900
gatgaaggct tgaagtcgc catcgtcgaa cgttacaaaa ctttgggagg cgtttgcctg 960
aacgtcggct gtatcccttc caaagccttg ttgcacaatg ccgccgttat cgacgaagtg 1020
cgccacttgg ctgccaacgg tatcaaatc cccgagccgg aactcgacat cgatatgctt 1080
cgcgcctaca aagacggcgt agtttcccgc ctacagggcg gtttggcagg tatggcgaaa 1140
agcgttaaag tggacgttat ccaaggcgac gggcaattct tagatccgca ccacttgga 1200
gtgtcgctga ctgccggcga cgcgtacgaa caggcagccc ctaccggcga gaaaaaatc 1260
gttgccctca aaaactgtat cattgcagca ggcagcccg taaccaact gcctttcatt 1320
cctgaagatc cgcgcatcat cgattccagc ggcgcatagg ctctgaaaga agtaccgggc 1380
aaactgctga ttatcggcgg cggcattatc ggcctcgaga tgggtacggg ttacagcacg 1440
ctgggttcgc gtttggatgt ggttgaatg atggacggcc tgatgcaagg cgcagaccgc 1500
gatttggtaa agtatggca aaaacaaaac gaataccgtt ttgacaacat tatggtcaac 1560
accaaaaccg ttgcagttga gccgaaagaa gacggcgttt acgttacctt tgaaggcgcg 1620
aacgcgecta aagagccgca acgctacgat gccgtattgg ttgccgcccg ccgcgcgccc 1680
aacggcaaac tcatcagcgc ggaaaaagca ggcgttgccg taaccgatcg cggcttcac 1740
gaagtggaca aacaatgcg taccaatgtg ccgcacatct acgccatcgg cgacatcgtc 1800
ggtcagccga tgttggcgca caaagccgtt cacgaaggcc acgttgccgc cgaaaactgc 1860
gccggccaca aagcctactt cgacgcacgc gtgattccgg gcggttccta cacttcccc 1920
gaagtggcgt ggggtggcga aaccgaactg tccgcaaaag cctccggccg caaaatcacc 1980
aaagccaact tcccgtgggc ggcttccggc cgtgcgattg ccaacggttg cgacaagccc 2040

```

```

tttaccaagc tgatttttga tgccgaaacc ggccgcatca tcggcggcgg cattgtcggg 2100
ccgaacggtg gcgatatgat cggcgaagtc tgccttgcca tcgaaatggg ctgcgacgcg 2160
gcagacatcg gcaaaaccat ccacccgcac ccgggcgaat ccatcggtat ggcggcggaa 2220
gtggcattgg gtacttgtac cgacaaaaaa aaa 2253

```

```

<210> 43
<211> 747
<212> PRT
<213> Escherichia coli

```

```

<220>
<221> Kette
<222> (1)..(747)
<223> Aminosäuresequenz von PAZ2

```

```

<400> 43
His His His His His His Met Val Asp Lys Arg Met Ala Leu Val Glu
 1                    5                    10                    15
Leu Lys Val Pro Asp Ile Gly Gly His Glu Asn Val Asp Ile Ile Ala
 20                    25                    30
Val Glu Val Asn Val Gly Asp Thr Ile Ala Val Asp Asp Thr Leu Ile
 35                    40                    45
Thr Leu Asp Leu Asp Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Lys Leu Lys Gly
 50                    55                    60
Met Ser Tyr Ala Met Cys Leu Asn Thr Phe Val Leu Lys Lys Glu Val
 65                    70                    75                    80
Ser Glu Thr His Gly Thr Ile Leu Ile Lys Val Glu Tyr Lys Gly Glu
 85                    90                    95
Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser Thr Glu Asp Gly Gln Gly Lys
100                    105                    110
Ala His Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Val Thr Lys Lys
115                    120                    125
Glu Glu Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Asn
130                    135                    140
Ile Val Ile Gly Ile Gly Asp Lys Ala Leu Lys Ile Asn Trp Tyr Arg
145                    150                    155                    160
Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Met Phe Glu Ala Thr Ala Arg Gly Ala
165                    170                    175
Arg Arg Met Ala Ile Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val
180                    185                    190
Gly Gly Val Asn Ser Met Asn Ser Met Asp Val Pro Ala Glu Val Ala
195                    200                    205
Gly Val Val Lys Glu Val Lys Val Lys Val Gly Asp Lys Ile Ser Glu
210                    215                    220
Gly Gly Leu Ile Val Val Val Glu Ala Glu Gly Thr Ala Ala Ala Pro
225                    230                    235                    240

```

Lys Ala Glu Ala Ala Ala Ala Pro Ala Gln Glu Ala Pro Lys Ala Ala
 245 250 255
 Ala Pro Ala Pro Gln Ala Ala Gln Phe Gly Gly Ser Ala Asp Ala Glu
 260 265 270
 Tyr Asp Val Val Val Leu Gly Gly Gly Pro Gly Gly Tyr Ser Ala Ala
 275 280 285
 Phe Ala Ala Ala Asp Glu Gly Leu Lys Val Ala Ile Val Glu Arg Tyr
 290 295 300
 Lys Thr Leu Gly Gly Val Cys Leu Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys
 305 310 315 320
 Ala Leu Leu His Asn Ala Ala Val Ile Asp Glu Val Arg His Leu Ala
 325 330 335
 Ala Asn Gly Ile Lys Tyr Pro Glu Pro Glu Leu Asp Ile Asp Met Leu
 340 345 350
 Arg Ala Tyr Lys Asp Gly Val Val Ser Arg Leu Thr Gly Gly Leu Ala
 355 360 365
 Gly Met Ala Lys Ser Arg Lys Val Asp Val Ile Gln Gly Asp Gly Gln
 370 375 380
 Phe Leu Asp Pro His His Leu Glu Val Ser Leu Thr Ala Gly Asp Ala
 385 390 395 400
 Tyr Glu Gln Ala Ala Pro Thr Gly Glu Lys Lys Ile Val Ala Phe Lys
 405 410 415
 Asn Cys Ile Ile Ala Ala Gly Ser Arg Val Thr Lys Leu Pro Phe Ile
 420 425 430
 Pro Glu Asp Pro Arg Ile Ile Asp Ser Ser Gly Ala Leu Ala Leu Lys
 435 440 445
 Glu Val Pro Gly Lys Leu Leu Ile Ile Gly Gly Gly Ile Ile Gly Leu
 450 455 460
 Glu Met Gly Thr Val Tyr Ser Thr Leu Gly Ser Arg Leu Asp Val Val
 465 470 475 480
 Glu Met Met Asp Gly Leu Met Gln Gly Ala Asp Arg Asp Leu Val Lys
 485 490 495
 Val Trp Gln Lys Gln Asn Glu Tyr Arg Phe Asp Asn Ile Met Val Asn
 500 505 510
 Thr Lys Thr Val Ala Val Glu Pro Lys Glu Asp Gly Val Tyr Val Thr
 515 520 525
 Phe Glu Gly Ala Asn Ala Pro Lys Glu Pro Gln Arg Tyr Asp Ala Val
 530 535 540
 Leu Val Ala Ala Gly Arg Ala Pro Asn Gly Lys Leu Ile Ser Ala Glu
 545 550 555 560

ttcttagatc cgcaccactt ggaagtgtcg ctgactgccg gcgacgcgta cgaacaggca 780
 gcccctaccg gcgagaaaaa aatcgttgcc ttcaaaaact gtatcattgc agcaggcage 840
 cgcgtaacca aactgccttt cattcctgaa gatccgcgca tcatcgattc cagcggcgca 900
 ttggctctga aagaagtacc gggcaaaactg ctgattatcg gcggcggcat tateggcctc 960
 gagatgggta cggtttacag cacgctgggt tcgctgttgg atgtgggtga aatgatggac 1020
 ggcctgatgc aaggcgcaga ccgcgatttg gtaaaagtat ggcaaaaaca aaacgaatac 1080
 cgttttgaca acattatggt caacaccaaa accgttgca gttgagccgaa agaagacggc 1140
 gtttacgta cctttgaagg cgcgaacgcg cctaaagagc cgcaacgcta cgatgccgta 1200
 ttggttgccg ccggccgcgc gcccaacggc aaactcatca gcgcggaaaa agcaggcggt 1260
 gccgtaaccg atcgcggctt catcgaagt gacaaacaaa tgcgtaccaa tgtgcccgcac 1320
 atctacgcca tcggcgacat cgtcggtcag ccgatgttgg cgcacaaagc cgttcacgaa 1380
 ggccacgttg ccgcccgaata ctgcgccggc cacaaagcct acttcgacgc acgctgatt 1440
 ccggcgcttg cctacacttc ccccgaaagt gcgtgggtgg gcgaaaccga actgtccgcc 1500
 aaagcctccg gccgcaaaat caccaaagcc aactcccgt gggcggcttc cggcctgctg 1560
 attgccaacg gttgcgacaa gccgtttacc aagctgatt ttgatgccga aaccggccgc 1620
 atcatcggcg gcggcattgt cggctcgaac ggtggcgata tgatcggcga agtctgcctt 1680
 gccatcgaaa tgggtcgcga cgcggcagac atcggcaaaa ccatccacc gcacccgacc 1740
 ttgggcgaat ccacgggat ggccggcgaat gtggcattgg gtacttgtac cgacctgcct 1800
 ccgcaaaaga aaaaaggatc cagactcaag atggacaaat tgaaactcaa ggggatgagc 1860
 tatgcaatgt gcttgaatac ctttgtgttg aagaaagaag tctccgaaac gcagcatggg 1920
 acaatactca ttaaggttga gtacaagggg gaagatgcac cctgcaagat tcctttctcc 1980
 acggaggatg gacaagggaa agctcacaat ggcagactga tcacagccaa tccagtgggt 2040
 accaagaagg aggagcctgt caacattgag gctgaacctc cttttgggga aagtaatata 2100
 gtaattggaa ttggagacaa agccctgaaa atcaactggt acaggaaggg aagctcgatt 2160
 gggaagatgt tcgagccac tgccagaggt gcaaggcgca tggccatctt gggagacaca 2220
 gcctgggact ttggttcagt ggttggttaa ggtacc 2256

<210> 45
 <211> 744
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

 <220>
 <221> Kette
 <222> (1)..(744)
 <223> Aminosäuresequenz von PAZ3

<400> 45
 His His His His His His Met Val Asp Lys Arg Met Ala Leu Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Lys Val Pro Asp Ile Gly Gly His Glu Asn Val Asp Ile Ile Ala
 20 25 30
 Val Glu Val Asn Val Gly Asp Thr Ile Ala Val Asp Asp Thr Leu Ile
 35 40 45
 Thr Leu Asp Met Asn Ser Met Asp Val Pro Ala Glu Val Ala Gly Val
 50 55 60
 Val Lys Glu Val Lys Val Lys Val Gly Asp Lys Ile Ser Glu Gly Gly
 65 70 75 80
 Leu Ile Val Val Val Glu Ala Glu Gly Thr Ala Ala Ala Pro Lys Ala
 85 90 95
 Glu Ala Ala Ala Ala Pro Ala Gln Glu Ala Pro Lys Ala Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ala Pro Gln Ala Ala Gln Phe Gly Gly Ser Ala Asp Ala Glu Tyr Asp

Pro Met Leu Ala His Lys Ala Val His Glu Gly His Val Ala Ala Glu
 450 455 460
 Asn Cys Ala Gly His Lys Ala Tyr Phe Asp Ala Arg Val Ile Pro Gly
 465 470 475 480
 Val Ala Tyr Thr Ser Pro Glu Val Ala Trp Val Gly Glu Thr Glu Leu
 485 490 495
 Ser Ala Lys Ala Ser Gly Arg Lys Ile Thr Lys Ala Asn Phe Pro Trp
 500 505 510
 Ala Ala Ser Gly Arg Ala Ile Ala Asn Gly Cys Asp Lys Pro Phe Thr
 515 520 525
 Lys Leu Ile Phe Asp Ala Glu Thr Gly Arg Ile Ile Gly Gly Gly Ile
 530 535 540
 Val Gly Pro Asn Gly Gly Asp Met Ile Gly Glu Val Cys Leu Ala Ile
 545 550 555 560
 Glu Met Gly Cys Asp Ala Ala Asp Ile Gly Lys Thr Ile His Pro His
 565 570 575
 Pro Gly Glu Ser Ile Gly Met Ala Ala Glu Val Ala Leu Gly Thr Cys
 580 585 590
 Thr Asp Leu Pro Pro Gln Lys Lys Lys Gly Ser Arg Leu Lys Met Asp
 595 600 605
 Lys Leu Lys Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ala Met Cys Leu Asn Thr Phe
 610 615 620
 Val Leu Lys Lys Glu Val Ser Glu Thr His Gly Thr Ile Leu Ile Lys
 625 630 635 640
 Val Glu Tyr Lys Gly Glu Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser Thr
 645 650 655
 Glu Asp Gly Gln Gly Lys Ala His Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn
 660 665 670
 Pro Val Val Thr Lys Lys Glu Glu Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro
 675 680 685
 Pro Phe Gly Glu Ser Asn Ile Val Ile Gly Ile Gly Asp Lys Ala Leu
 690 695 700
 Lys Ile Asn Trp Tyr Arg Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Met Phe Glu
 705 710 715 720
 Ala Thr Ala Arg Gly Ala Arg Arg Met Ala Ile Leu Gly Asp Thr Ala
 725 730 735
 Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly
 740

<210> 46
 <211> 426

<212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Gen
 <222> (1)..(426)
 <223> Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuren 286 bis 426 des DEN-4-Hüllproteins e
 codiert

<400> 46
 aaagtccgta tggagaaatt gagaatcaag ggaatgtcat acacgatgtg ttcaggaaag 60
 ttttcaattg acaaagagat ggcagaaaca cagcatggga caacagtggg gaaagtcaag 120
 tatgaagggtg ctggagctcc gtgtaaagtc cccatagaga taagagatgt aaacaaggaa 180
 aaagtgggtg ggcgtatcat ctcatccacc cctttggctg agaataccaa cagtgttaacc 240
 aacatagaat tagaaccccc ctttggggac agctacatag tgataggtgt tggaaacagc 300
 gcattaacac tccattgggt caggaaaggg agttccattg gcaagatggt tgagtccaca 360
 tacagaggtg caaaacgaat ggccattcta ggtgaaacag cttgggattt tggttccggt 420
 ggtgga 426

<210> 47
 <211> 615
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Gen
 <222> (1)..(615)
 <223> Nucleotidsequenz, welche das chimäre Protein in dem Plasmid pID1 codiert

<400> 47
 atgggccacc accaccacca ccacgccatg gtagataaaa gaatggcttt agttgaattg 60
 aaagtqcccc acattggcgg aacagaaaat gtatagatta tcgcggttga agtaaactg 120
 ggcgacacta ttgctgtgga cgataccctg attactttgg atctagattt ggatctagac 180
 aaagtgcgta tggagaaatt gagaatcaag ggaatgtcat acacgatgtg ttcaggaaag 240
 ttttcaattg acaaagagat ggcagaaaca cagcatggga caacagtggg gaaagtcaag 300
 tatgaagggtg ctggagctcc gtgtaaagtc cccatagaga taagagatgt aaacaaggaa 360
 aaagtgggtg ggcgtatcat ctcatccacc cctttggctg agaataccaa cagtgttaacc 420
 aacatagaat tagaaccccc ctttggggac agctacatag tgataggtgt tggaaacagc 480
 gcattaacac tccattgggt caggaaaggg agttccattg gcaagatggt tgagtccaca 540
 tacagaggtg caaaacgaat ggccattcta ggtgaaacag cttgggattt tggttccggt 600
 ggtggataag gatcc 615

<210> 48
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Kette
 <222> (1)..(192)
 <223> Aminosäuresequenz von PID1

<400> 48
 His His His His His His Met Val Asp Lys Arg Met Ala Leu Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Lys Val Pro Asp Ile Gly Gly His Glu Asn Val Asp Ile Ile Ala
 20 25 30


```

gtattgggtg gcggtcccgg cggttactcc gctgcatttg ccgctgccga tgaaggcttg 900
aaagtgcgcca tcgtcgaaacg ttacaaaact ttggggcggc tttgcctgaa cgtcggctgt 960
atcccttcca aagccttggt gcacaatgcc gccggtatcg acgaagtgcg ccacttggct 1020
gccaacggta tcaaataccg cgagccggaa ctcgacatcg atatgcttcg cgcctacaaa 1080
gacggcgtag tttcccgcct cacgggcggt ttggcaggta tggcgaaaag ccgtaaagtg 1140
gacggtatcc aagggcgacgg gcaattctta gatccgcacc acttggaaagt gtcgctgact 1200
gccggcgacg cgtacgaaca ggcagcccct accggcgaga aaaaaatcgt tgccttcaaa 1260
aactgtatca ttgcagcagg cagccgcgta accaaaactgc ctttcattcc tgaagatccg 1320
cgcacatcgc attccagcgg cgcattggct ctgaaagaag taccgggcaa actgctgatt 1380
atcggcgcg cgtattatcg cctcgagatg ggtacggttt acagcacgct gggttcgcgt 1440
ttggatgtgg ttgaaatgat ggacggcctg atgcaaggcg cagaccgca tttggtaaaa 1500
gtatggcaaa aacaaaacga ataccgttt gacaacatta tggtaaacac caaaaccgtt 1560
gcagttgagc cgaangaaga cggcgtttac gttacccttg aaggcgcgaa cgcgcctaaa 1620
gagccgcaac gctacgatgc cgtattggtt gccgcccggc gcgcgcecaa cggcaaactc 1680
atcagcgcgg aaaaagcagg cgttgccgta accgatcgcg gcttcacatga agtggacaaa 1740
caaatgcgta ccaatgtgcc gcacatctac gccatcggcg acatcgtcgg tcagccgatg 1800
ttggcgcaaa aagccgttca cgaaggccac gttgccgccc aaaactgcgc cggccacaaa 1860
gcctacttcg acgcacgcgt gattccgggc gttgcctaca cttccccga agtggcgtgg 1920
gtggcgcaaa ccgaactgtc cgccaaagcc tccggccgca aaatcaccaa agccaacttc 1980
ccgtggcgcg cttccggccg tgcgattgcc aacggttgcg acaagccgtt taccaagctg 2040
atTTTTgatg ccgaaaccgg ccgcatcatc ggcggcggca ttgtcgggcc gaacggtggc 2100
gatatgatcg gcgaagtctg ccttgccatc gaaatgggct gcgacgcggc agacatcggc 2160
aaaaccatcc acccgacccc gggcgaatcc atcggtatgg cggcggaagt ggcattgggt 2220
acttgtaccg aaaaaaaaaa a 2241

```

<210> 50

<211> 747

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<221> Kette

<222> (1)..(747)

<223> Aminosäuresequenz von PID2

<400> 50

```

His His His His His His Met Val Asp Lys Arg Met Ala Leu Val Glu
 1             5             10             15

```

```

Leu Lys Val Pro Asp Ile Gly Gly His Glu Asn Val Asp Ile Ile Ala
 20             25             30

```

```

Val Glu Val Asn Val Gly Asp Thr Ile Ala Val Asp Asp Thr Leu Ile
 35             40             45

```

```

Thr Leu Asp Leu Asp Lys Val Arg Met Glu Lys Leu Arg Ile Lys Gly
 50             55             60

```

```

Met Ser Tyr Thr Met Cys Ser Gly Lys Phe Ser Ile Asp Lys Glu Met
 65             70             75             80

```

```

Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Thr Val Val Lys Val Lys Tyr Glu Gly
 85             90             95

```

```

Ala Gly Ala Pro Cys Lys Val Pro Ile Glu Ile Arg Asp Val Asn Lys
100             105             110

```

```

Glu Lys Val Val Gly Arg Ile Ile Ser Ser Thr Pro Leu Ala Glu Asn
115             120             125

```

Thr Asn Ser Val Thr Asn Ile Glu Leu Glu Arg Pro Leu Asp Ser Tyr
 130 135 140
 Ile Val Ile Gly Val Gly Asn Ser Ala Leu Thr Leu His Trp Phe Arg
 145 150 155 160
 Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Met Phe Glu Ser Thr Tyr Arg Gly Ala
 165 170 175
 Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly Glu Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val
 180 185 190
 Gly Gly Leu Asn Ser Met Asn Ser Met Asp Val Pro Ala Glu Val Ala
 195 200 205
 Gly Val Val Lys Glu Val Lys Val Lys Val Gly Asp Lys Ile Ser Glu
 210 215 220
 Gly Gly Leu Ile Val Val Val Glu Ala Glu Gly Thr Ala Ala Ala Pro
 225 230 235 240
 Lys Ala Glu Ala Ala Ala Ala Pro Ala Gln Glu Ala Pro Lys Ala Ala
 245 250 255
 Ala Pro Ala Pro Gln Ala Ala Gln Phe Gly Gly Ser Ala Asp Ala Glu
 260 265 270
 Tyr Asp Val Val Val Leu Gly Gly Gly Pro Gly Gly Tyr Ser Ala Ala
 275 280 285
 Phe Ala Ala Ala Asp Glu Gly Leu Lys Val Ala Ile Val Glu Arg Tyr
 290 295 300
 Lys Thr Leu Gly Gly Val Cys Leu Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys
 305 310 315 320
 Ala Leu Leu His Asn Ala Ala Val Ile Asp Glu Val Arg His Leu Ala
 325 330 335
 Ala Asn Gly Ile Lys Tyr Pro Glu Pro Glu Leu Asp Ile Asp Met Leu
 340 345 350
 Arg Ala Tyr Lys Asp Gly Val Val Ser Arg Leu Thr Gly Gly Leu Ala
 355 360 365
 Gly Met Ala Lys Ser Arg Lys Val Asp Val Ile Gln Gly Asp Gly Gln
 370 375 380
 Phe Leu Asp Pro His His Leu Glu Val Ser Leu Thr Ala Gly Asp Ala
 385 390 395 400
 Tyr Glu Gln Ala Ala Pro Thr Gly Glu Lys Lys Ile Val Ala Phe Lys
 405 410 415
 Asn Cys Ile Ile Ala Ala Gly Ser Arg Val Thr Lys Leu Pro Phe Ile
 420 425 430
 Pro Glu Asp Pro Arg Ile Ile Asp Ser Ser Gly Ala Leu Ala Leu Lys
 435 440 445
 Glu Val Pro Gly Lys Leu Leu Ile Ile Gly Gly Gly Ile Ile Gly Leu

450 455 460
 Glu Met Gly Thr Val Tyr Ser Thr Leu Gly Ser Arg Leu Asp Val Val
 465 470 475 480
 Glu Met Met Asp Gly Leu Met Gln Gly Ala Asp Arg Asp Leu Val Lys
 485 490 495
 Val Trp Gln Lys Gln Asn Glu Tyr Arg Phe Asp Asn Ile Met Val Asn
 500 505 510
 Thr Lys Thr Val Ala Val Glu Pro Lys Glu Asp Gly Val Tyr Val Thr
 515 520 525
 Phe Glu Gly Ala Asn Ala Pro Lys Glu Pro Gln Arg Tyr Asp Ala Val
 530 535 540
 Leu Val Ala Ala Gly Arg Ala Pro Asn Gly Lys Leu Ile Ser Ala Glu
 545 550 555 560
 Lys Ala Gly Val Ala Val Thr Asp Arg Gly Phe Ile Glu Val Asp Lys
 565 570 575
 Gln Met Arg Thr Asn Val Pro His Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Ile Val
 580 585 590
 Gly Gln Pro Met Leu Ala His Lys Ala Val His Glu Gly His Val Ala
 595 600 605
 Ala Glu Asn Cys Ala Gly His Lys Ala Tyr Phe Asp Ala Arg Val Ile
 610 615 620
 Pro Gly Val Ala Tyr Thr Ser Pro Glu Val Ala Trp Val Gly Glu Thr
 625 630 635 640
 Glu Leu Ser Ala Lys Ala Ser Gly Arg Lys Ile Thr Lys Ala Asn Phe
 645 650 655
 Pro Trp Ala Ala Ser Gly Arg Ala Ile Ala Asn Gly Cys Asp Lys Pro
 660 665 670
 Phe Thr Lys Leu Ile Phe Asp Ala Glu Thr Gly Arg Ile Ile Gly Gly
 675 680 685
 Gly Ile Val Gly Pro Asn Gly Gly Asp Met Ile Gly Glu Val Cys Leu
 690 695 700
 Ala Ile Glu Met Gly Cys Asp Ala Ala Asp Ile Gly Lys Thr Ile His
 705 710 715 720
 Pro His Pro Gly Glu Ser Ile Gly Met Ala Ala Glu Val Ala Leu Gly
 725 730 735
 Thr Cys Thr Asp Leu Pro Pro Gln Lys Lys Lys
 740 745

<210> 51
 <211> 2256
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Gen
 <222> (1) .. (2256)
 <223> Nucleotidsequenz, welche das chimäre Protein in dem Plasmid pID3 codiert

<400> 51
 atggggccacc accaccacca ccacgccatg gtagataaaa gaatggcttt agttgaattg 60
 aaagtgcccg acattggcgg acacgaaaat gtagatatta tcgcggttga agtaaacgtg 120
 ggcgacacta ttgctgtgga cgataccctg attacttttg atctagaaat ggacgtacct 180
 gctgaagttg cagggcgtag caaagaagtt aaagttaaag tcggcgacaa aatctctgaa 240
 ggtggtttga ttgctgcgtg tgaagctgaa ggcacggcag ccgctcctaa agccgaagcg 300
 gctgcccgcc cggcgcaaga agcccctaaa gctgcccgtc ctgctccgca agccgcgcaa 360
 ttccggcgggt ctgcccgatg cgagtacgac gtggctcgtat tgggtggcgg tcccggcggg 420
 tactccgctg catttgccgc tgccgatgaa ggcttgaag tcgccatcgt cgaacgttac 480
 aaaacttttg gggcgtttg cctgaacgtc ggctgtatcc cttccaaagc cttgttgca 540
 aatgccgccc ttatcgacga agtgcgccac ttggctgcca acggtatcaa ataccccag 600
 ccggaactcg acatcgatat gcttcgcgcc tacaagacg gcgtagttc ccgcctcacg 660
 ggcggtttgg caggtatggc gaaaagccgt aaagtggacg ttatccaagg cgacgggcaa 720
 ttcttagatc cgcaccactt ggaagtgtcg ctgactgccg gcgacgcgta cgaacaggca 780
 gcccctaccg gcgagaaaaa aatcgttgcc ttcaaaaaact gtatcattgc agcaggcagc 840
 cgcgtaacca aactgccttt cattcctgaa gatccgcgca tcatcgattc cagcggcgca 900
 ttggctctga aagaagtacc gggcaaaactg ctgattatcg gcggcggcat tatcggcctc 960
 gagatgggta cggtttacag cacgctgggt tcgcgtttgg atgtggttga aatgatggac 1020
 ggcctgatgc aaggcgcaga ccgcgatttg gtaaaagtat ggcaaaaaca aaacgaatac 1080
 cgttttgaca acattatggt caacaccaaa accgttgcag ttgagccgaa agaagacggc 1140
 gtttacgtta cctttgaagg cgcgaaacgc cctaaagagc cgcaacgcta cgatgccgta 1200
 ttggttgccg ccggccgcgc gcccaacggc aaactcatca gcgcgaaaaa agcaggcgtt 1260
 gccgtaaccg atcgcggtt catcgaagtg gacaaacaaa tgcgtaccaa tgtgccgcac 1320
 atctacgcca tcggcgacat cgtcggtcag ccgatgttg gcacaaaagc cgttcacgaa 1380
 ggccacggtt ccgcccgaaaa ctgcgcccgc cacaaagcct acttcgacgc acgcgtgatt 1440
 ccggcgttg cctacacttc ccccgaagtg gcgtgggttg gcgaaaccga actgtccgcc 1500
 aaagcctccg gccgcaaat caccaaagcc aacttcccgt gggcggcttc cggccgtgcg 1560
 attgccaacg gttgcgacaa gccgtttacc aagctgattt ttgatgccga aaccggcccg 1620
 atcatcggcg gcggcattgt cgtccgaac ggtggcgata tgatcggcga agtctgcctt 1680
 gccatcgaaa tgggtgcgga cgcggcagac atcggcaaaa ccatccacc gcacccgacc 1740
 ttgggcgaat ccacggtat ggcggcggaa gtggcattgg gtacttgtac cgacctgcct 1800
 ccgcaaaaga aaaaaggatc caaagtgcgt atggagaaat tgagaatcaa gggaatgtca 1860
 tacacgatgt gttcaggaaa gtttcaatt gacaaagaga tggcagaaac acagcatggg 1920
 acaacagtgg tgaagtcaa gtatgaaggt gctggagctc cgtgtaaagt ccccatagag 1980
 ataagagatg taacaagga aaaagtgtt gggcgtatca tctcatccac ccctttggct 2040
 gagaatacca acagtgaac caacatagaa ttagaacccc cctttgggga cagctacata 2100
 gtgatagggt ttgaaacag cgattaaca ctccattggt tcaggaaagg gagttccatt 2160
 ggcaagatgt ttgagccac atacagaggt gcaaaacgaa tggcattct aggtgaaaca 2220
 gettgggatt ttggttcggt tgggtgctaa ggatcc 2256

<210> 52
 <211> 744
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Kette
 <222> (1) .. (744)
 <223> Aminosäuresequenz von PID3

<400> 52
 His His His His His His Met Val Asp Lys Arg Met Ala Leu Val Glu
 1 5 10 15

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

Met Asp Gly Leu Met Gln Gly Ala Asp Arg Asp Leu Val Lys Val Trp
 340 345 350
 Gln Lys Gln Asn Glu Tyr Arg Phe Asp Asn Ile Met Val Asn Thr Lys
 355 360 365
 Thr Val Ala Val Glu Pro Lys Glu Asp Gly Val Tyr Val Thr Phe Glu
 370 375 380
 Gly Ala Asn Ala Pro Lys Glu Pro Gln Arg Tyr Asp Ala Val Leu Val
 385 390 395 400
 Ala Ala Gly Arg Ala Pro Asn Gly Lys Leu Ile Ser Ala Glu Lys Ala
 405 410 415
 Gly Val Ala Val Thr Asp Arg Gly Phe Ile Glu Val Asp Lys Gln Met
 420 425 430
 Arg Thr Asn Val Pro His Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Ile Val Gly Gln
 435 440 445
 Pro Met Leu Ala His Lys Ala Val His Glu Gly His Val Ala Ala Glu
 450 455 460
 Asn Cys Ala Gly His Lys Ala Tyr Phe Asp Ala Arg Val Ile Pro Gly
 465 470 475 480
 Val Ala Tyr Thr Ser Pro Glu Val Ala Trp Val Gly Glu Thr Glu Leu
 485 490 495
 Ser Ala Lys Ala Ser Gly Arg Lys Ile Thr Lys Ala Asn Phe Pro Trp
 500 505 510
 Ala Ala Ser Gly Arg Ala Ile Ala Asn Gly Cys Asp Lys Pro Phe Thr
 515 520 525
 Lys Leu Ile Phe Asp Ala Glu Thr Gly Arg Ile Ile Gly Gly Gly Ile
 530 535 540
 Val Gly Pro Asn Gly Gly Asp Met Ile Gly Glu Val Cys Leu Ala Ile
 545 550 555 560
 Glu Met Gly Cys Asp Ala Ala Asp Ile Gly Lys Thr Ile His Pro His
 565 570 575
 Pro Gly Glu Ser Ile Gly Met Ala Ala Glu Val Ala Leu Gly Thr Cys
 580 585 590
 Thr Asp Leu Pro Pro Gln Lys Lys Lys Gly Ser Lys Val Arg Met Glu
 595 600 605
 Lys Leu Arg Ile Lys Gly Met Ser Tyr Thr Met Cys Ser Gly Lys Phe
 610 615 620
 Ser Ile Asp Lys Glu Met Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Thr Val Val
 625 630 635 640
 Lys Val Lys Tyr Glu Gly Ala Gly Ala Pro Cys Lys Val Pro Ile Glu
 645 650 655
 Ile Arg Asp Val Asn Lys Glu Lys Val Val Gly Arg Ile Ile Ser Ser

660

665

670

Thr Pro Leu Ala Glu Asn Thr Asn Ser Val Thr Asn Ile Glu Leu Glu
675 680 685

Arg Pro Leu Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Asn Ser Ala Leu
690 695 700

Thr Leu His Trp Phe Arg Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Met Phe Glu
705 710 715 720

Ser Thr Tyr Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly Glu Thr Ala
725 730 735

Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly
740

<210> 53

<211> 2694

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> Gen

<222> (1) .. (2694)

<223> Nucleotidsequenz, welche das chimäre Protein in dem Plasmid pD4D2 codiert

<400> 53

```

atgggcccacc accaccacca ccacgccatg gtagataaaa gaatggcttt agttgaattg 60
aaagtgcccg acattggcgg acacgaaaat gtagatatta tcgcggttga agtaaactgt 120
ggcgacacta ttgctgtgga cgataccctg attactttgg atctagacaa agtccgtatg 180
gagaaattga gaatcaaggg aatgtcatac acgatgtgtt caggaaagt ttcaattgac 240
aaagagatgg cagaaacaca gcatgggaca acagtgggtg aagtcaagta tgaagggtgct 300
ggagctccgt gtaaagtccc catagagata agagatgtaa acaaggaaaa agtgggttggg 360
cgtatcatct catccacccc ttgggctgag aataccaaca gtgtaaccaa catagaatta 420
gaacccccct ttggggacag ctacatagtg ataggtgttg gaaacagcgc ttaacactc 480
cattggttca ggaaagggag ttccattggc aagatgtttg agtccacata cagagggtgca 540
aaacgaatgg ccattctagg tgaacacagc tgggattttg gttccgttgg tggctcttcta 600
gaaatggacg tacctgctga agttgcaggc gtagtcaaag aagttaaagt taaagtcggc 660
gacaaaatct ctgaaggtgg tttgattgtc gtcggttgaag ctgaaggcac ggcagccgct 720
cctaaagccg aagcggctgc cgccccggcg caagaagccc ctaaagctgc cgctcctgct 780
ccgcaagccg cgcaattcgg cggttctgcc gatgccgagt acgacgtggt cgtattgggt 840
ggcgggtccc gcggttactc cgctgcattt gccgctgccg atgaaggctt gaaagtcgcc 900
atcgtcgaac gttacaaaac tttgggcggc gtttgccctga acgtcggctg tatcccttcc 960
aaagccttgt tgcacaatgc cgccgttate gacgaagtgc gccacttggc tgccaacggt 1020
atcaaatacc ccgagccgga actcgacatc gatatgcttc gcgcctacaa agacggcgta 1080
gtttcccgcc tcacggggcg tttggcaggt atggcgaaaa gccgtaaagt ggacgttata 1140
caagggcgac ggcaattctt agatccgcac cacttggaaag tgtcgtgac tgccggcgac 1200
gcgtacgaac aggcagcccc taccggcgag aaaaaaatcg ttgcctcaa aaactgtatc 1260
attgcagcag gcagccgctt aaccaaaactg cctttcatc ctgaagatcc gcgcatcatc 1320
gattccagcg gcgcattggc tctgaaagaa gtaccgggca aactgctgat tatcggcggc 1380
ggcattatcg gcctcgagat gggtagcgtt tacagcacgc tgggttcgcy tttggatgtg 1440
gttgaaatga tggacggcct gatgcaaggc gcagaccgcy atttggtaa agtatggcaa 1500
aaacaaaacg aataccgttt tgacaacatt atggtaaca ccaaaaccgt tgcagttgag 1560
ccgaaagaag acggcgttta cgttacctt gaaggcgcga acgcgcctaa agagccgcaa 1620
cgctacgatg ccgtattggt tgccgccggc cgcgcgccca acggcaaaact catcagcgcg 1680
gaaaaagcag gcgttgccgt aaccgatcgc ggcttcacg aagtggacaa acaaatgctg 1740
accaatgtgc cgcacatcta cgccatcggc gacatcgtcg gtcagccgat gttggcgcac 1800
aaagccgttc acgaaggcca cgttgccgccc gaaaactgcy ccggccacaa agcctacttc 1860

```

```

gacgcacgcg tgattccggg cgttgectac acttcccccg aagtggcgtg ggtgggcgaa 1920
accgaactgt ccgcaaaagc ctccggccgc aaaatcacca aagccaactt cccgtgggcg 1980
gcttccggcc gtgcgattgc caacggttgc gacaagccgt ttaccaagct gattttgat 2040
gccgaaaccg gccgcatcat cggcggcggc attgtcggtc cgaacgggtg cgatatgatc 2100
ggcgaagtct gccttgccat cgaaatgggc tgcgacgcg cagacatcgg caaaaccatc 2160
caccgcacc cgacctggg cgaatccatc ggtatggcgg cggaagtggc attgggtact 2220
tgtaccgacc tgcctccgca aaagaaaaaa ggatccgaca ggctgagaat ggacaaacta 2280
cagctcaaaq gaatgtcata ctctatgtgt acaggaaagt ttaaaattgt gaaggaaata 2340
gcagaaacac aacatggaac aatagttatc agagtacaat atgaagggga cggctctcca 2400
tgtaagatcc cttttgagat aatggatttg gaaaaaagac acgtcttagg tcgectgatt 2460
acagttaacc cgatcgtaac agaaaaagat agcccagtca acatagaagc agaacctcca 2520
ttcggagaca gctacatcat cataggagta gagccgggac aattgaaact caactggttt 2580
aagaaaaggaa gttccatcgg ccaaatgttt gagacaacaa tgagaggagc gaagagaatg 2640
gccattttag gtgacacagc ctgggatttt gggctctctg gtggttaagg atcc 2694

```

<210> 54

<211> 891

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<221> Kette

<222> (1)..(891)

<223> Aminosäuresequenz von PD4D2

<400> 54

```

His His His His His His Met Val Asp Lys Arg Met Ala Leu Val Glu
 1                    5                    10                    15

```

```

Leu Lys Val Pro Asp Ile Gly Gly His Glu Asn Val Asp Ile Ile Ala
 20                    25                    30

```

```

Val Glu Val Asn Val Gly Asp Thr Ile Ala Val Asp Asp Thr Leu Ile
 35                    40                    45

```

```

Thr Leu Asp Leu Asp Lys Val Arg Met Glu Lys Leu Arg Ile Lys Gly
 50                    55                    60

```

```

Met Ser Tyr Thr Met Cys Ser Gly Lys Phe Ser Ile Asp Lys Glu Met
 65                    70                    75                    80

```

```

Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Thr Val Val Lys Val Lys Tyr Glu Gly
 85                    90                    95

```

```

Ala Gly Ala Pro Cys Lys Val Pro Ile Glu Ile Arg Asp Val Asn Lys
100                    105                    110

```

```

Glu Lys Val Val Gly Arg Ile Ile Ser Ser Thr Pro Leu Ala Glu Asn
115                    120                    125

```

```

Thr Asn Ser Val Thr Asn Ile Glu Leu Glu Arg Pro Leu Asp Ser Tyr
130                    135                    140

```

```

Ile Val Ile Gly Val Gly Asn Ser Ala Leu Thr Leu His Trp Phe Arg
145                    150                    155                    160

```

```

Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Met Phe Glu Ser Thr Tyr Arg Gly Ala
165                    170                    175

```

```

Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly Glu Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val

```

180	185	190
Gly Gly Leu Leu Glu Met Asn Ser Met Asp Val Pro Ala Glu Val Ala 195 200 205		
Gly Val Val Lys Glu Val Lys Val Lys Val Gly Asp Lys Ile Ser Glu 210 215 220		
Gly Gly Leu Ile Val Val Val Glu Ala Glu Gly Thr Ala Ala Ala Pro 225 230 235 240		
Lys Ala Glu Ala Ala Ala Pro Ala Gln Glu Ala Pro Lys Ala Ala 245 250 255		
Ala Pro Ala Pro Gln Ala Ala Gln Phe Gly Gly Ser Ala Asp Ala Glu 260 265 270		
Tyr Asp Val Val Val Leu Gly Gly Gly Pro Gly Gly Tyr Ser Ala Ala 275 280 285		
Phe Ala Ala Ala Asp Glu Gly Leu Lys Val Ala Ile Val Glu Arg Tyr 290 295 300		
Lys Thr Leu Gly Gly Val Cys Leu Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys 305 310 315 320		
Ala Leu Leu His Asn Ala Ala Val Ile Asp Glu Val Arg His Leu Ala 325 330 335		
Ala Asn Gly Ile Lys Tyr Pro Glu Pro Glu Leu Asp Ile Asp Met Leu 340 345 350		
Arg Ala Tyr Lys Asp Gly Val Val Ser Arg Leu Thr Gly Gly Leu Ala 355 360 365		
Gly Met Ala Lys Ser Arg Lys Val Asp Val Ile Gln Gly Asp Gly Gln 370 375 380		
Phe Leu Asp Pro His His Leu Glu Val Ser Leu Thr Ala Gly Asp Ala 385 390 395 400		
Tyr Glu Gln Ala Ala Pro Thr Gly Glu Lys Lys Ile Val Ala Phe Lys 405 410 415		
Asn Cys Ile Ile Ala Ala Gly Ser Arg Val Thr Lys Leu Pro Phe Ile 420 425 430		
Pro Glu Asp Pro Arg Ile Ile Asp Ser Ser Gly Ala Leu Ala Leu Lys 435 440 445		
Glu Val Pro Gly Lys Leu Leu Ile Ile Gly Gly Gly Ile Ile Gly Leu 450 455 460		
Glu Met Gly Thr Val Tyr Ser Thr Leu Gly Ser Arg Leu Asp Val Val 465 470 475 480		
Glu Met Met Asp Gly Leu Met Gln Gly Ala Asp Arg Asp Leu Val Lys 485 490 495		
Val Trp Gln Lys Gln Asn Glu Tyr Arg Phe Asp Asn Ile Met Val Asn 500 505 510		

Thr Lys Thr Val Ala Val Glu Pro Lys Glu Asp Gly Val Tyr Val Thr
 515 520 525

Phe Glu Gly Ala Asn Ala Pro Lys Glu Pro Gln Arg Tyr Asp Ala Val
 530 535 540

Leu Val Ala Ala Gly Arg Ala Pro Asn Gly Lys Leu Ile Ser Ala Glu
 545 550 555 560

Lys Ala Gly Val Ala Val Thr Asp Arg Gly Phe Ile Glu Val Asp Lys
 565 570 575

Gln Met Arg Thr Asn Val Pro His Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Ile Val
 580 585 590

Gly Gln Pro Met Leu Ala His Lys Ala Val His Glu Gly His Val Ala
 595 600 605

Ala Glu Asn Cys Ala Gly His Lys Ala Tyr Phe Asp Ala Arg Val Ile
 610 615 620

Pro Gly Val Ala Tyr Thr Ser Pro Glu Val Ala Trp Val Gly Glu Thr
 625 630 635 640

Glu Leu Ser Ala Lys Ala Ser Gly Arg Lys Ile Thr Lys Ala Asn Phe
 645 650 655

Pro Trp Ala Ala Ser Gly Arg Ala Ile Ala Asn Gly Cys Asp Lys Pro
 660 665 670

Phe Thr Lys Leu Ile Phe Asp Ala Glu Thr Gly Arg Ile Ile Gly Gly
 675 680 685

Gly Ile Val Gly Pro Asn Gly Gly Asp Met Ile Gly Glu Val Cys Leu
 690 695 700

Ala Ile Glu Met Gly Cys Asp Ala Ala Asp Ile Gly Lys Thr Ile His
 705 710 715 720

Pro His Pro Gly Glu Ser Ile Gly Met Ala Ala Glu Val Ala Leu Gly
 725 730 735

Thr Cys Thr Asp Leu Pro Pro Gln Lys Lys Lys Gly Ser Arg Leu Arg
 740 745 750

Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly
 755 760 765

Lys Phe Lys Ile Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile
 770 775 780

Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro
 785 790 795 800

Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile
 805 810 815

Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu
 820 825 830

Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro
835 840 845

Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Gln
850 855 860

Met Phe Glu Thr Thr Met Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly
865 870 875 880

Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Leu Gly Gly
885 890

Patentansprüche

1. Chimäre Nucleinsäure, umfassend zumindest eine Nucleotidsequenz, die ein Fragment des E-Proteins eines Flavivirus codiert, und eine Nucleotidsequenz der Sequenzidentifizierungs-Nr. 26 oder Sequenzidentifizierungs-Nr. 29, die ein Protein von Dehydrogenase von mutiertem Neisseria meningitidis (MDH) codiert, oder eine Nucleotidsequenz der Sequenzidentifizierungs-Nr. 23, die ein Fragment dieses MDH-Proteins codiert, wobei die chimäre Nucleinsäure ein chimäres Protein codiert, das bei einem Empfänger eine humorale Immunantwort von neutralisierenden und schützenden Antikörpern gegen das Flavivirus auszulösen vermag.

2. Chimäre Nucleinsäure nach Anspruch 1, wobei die Nucleotidsequenz, die ein Fragment des E-Proteins eines Flavivirus codiert, eine Nucleotidsequenz ist, die die Aminosäuren Nr. 286 bis 426 des E-Proteins des Serotyps 1, 2, 3 und/oder 4 des Denguevirus codiert, und wobei diese chimäre Nucleinsäure ein chimäres Protein codiert, das bei einem Empfänger eine Serotyp-spezifische humorale Immunantwort von neutralisierenden und schützenden Antikörpern gegen diesen Serotyp (diese Serotypen) des Denguevirus auszulösen vermag.

3. Chimäre Nucleinsäure nach den Ansprüchen 1 und 2, umfassend eine Nucleotidsequenz, die die Aminosäuren 286 bis 426 des E-Proteins des Serotyps 1, 2, 3 und/oder 4 des Denguevirus codiert, die mit dem 3'-Ende einer Nucleotidsequenz der Sequenzidentifizierungs-Nr. 23 vereinigt ist, die die ersten 45 Aminosäuren des MDH-Proteins codiert.

4. Chimäre Nucleinsäure nach den Ansprüchen 1 und 2, umfassend eine Nucleotidsequenz, die die Aminosäuren 286 bis 426 des E-Proteins des Serotyps 1, 2, 3 und/oder 4 des Denguevirus codiert, die eingefügt ist in einer Region, die die Aminosäure Nr. 45 codiert, in einer Nucleotidsequenz der Sequenzidentifizierungs-Nr. 26, die das MDH-Protein codiert.

5. Chimäre Nucleinsäure nach den Ansprüchen 1 und 2, umfassend eine Nucleotidsequenz, die die Aminosäuren 286 bis 426 des E-Proteins des Serotyps 1, 2, 3 und/oder 4 des Denguevirus codiert, die vereinigt ist mit dem 3'-Ende einer Nucleotidsequenz der Sequenzidentifizierungs-Nr. 29, die das MDH-Protein codiert.

6. Chimäre Nucleinsäure nach den Ansprüchen 1 und 2, umfassend Nucleotidsequenzen, die die Aminosäuren 286 bis 426 des E-Proteins zweier unterschiedlicher Serotypen des Denguevirus codieren, wobei eine dieser Nucleotidsequenzen in eine Region, die die Aminosäure Nr. 45 codiert, in der Nucleotidsequenz der Sequenzidentifizierungs-Nr. 29 eingefügt ist, die das MDH-Protein codiert, und die andere Nucleotidsequenz mit dem 3'-Ende dieser Nucleotidsequenz der Sequenzidentifizierungs-Nr. 29 vereinigt ist.

7. Rekombinantes chimäres Protein, das das Expressionsprodukt einer chimären Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6 ist und bei einem Empfänger eine Serotyp-spezifische humorale Immunantwort von neutralisierenden und schützenden Antikörpern gegen das Denguevirus auszulösen vermag.

8. Rekombinantes chimäres Protein, das das Expressionsprodukt einer chimären Nucleinsäure nach Anspruch 6 ist und bei einem Empfänger eine humorale Immunantwort von neutralisierenden und schützenden Antikörpern auszulösen vermag, die für zwei Serotypen des Denguevirus spezifisch sind.

9. Chimäre Nucleinsäure, Sequenzidentifizierungs-Nr. 24, nach den Ansprüchen 1, 2 und 3, die die Sequenzen der Sequenzidentifizierungs-Nrn. 22 und 23 umfasst und das chimäre Protein PLL1 codiert.

10. Chimäres Protein PLL1 nach Anspruch 7, das die Aminosäuresequenz der Sequenzidentifizierungs-Nr. 25 aufweist, das das Expressionsprodukt der Sequenzidentifizierungs-Nr. 24 ist und bei einem Empfänger eine humorale Immunantwort von neutralisierenden und schützenden Antikörpern gegen das Denguevirus-2 auszulösen vermag.

11. Chimäre Nucleinsäure der Sequenzidentifizierungs-Nr. 27, nach den Ansprüchen 1, 2 und 4, die die Sequenzen der Sequenzidentifizierungs-Nrn. 22 und 26 umfasst und das chimäre Protein PLL2 codiert.
12. Chimäres Protein PLL2 nach Anspruch 7, das die Aminosäuresequenz der Sequenzidentifizierungs-Nr. 28 aufweist, die das Expressionsprodukt der Sequenzidentifizierungs-Nr. 27 ist und bei einem Empfänger eine humorale Immunantwort von neutralisierenden und schützenden Antikörpern gegen das Denguevirus-2 auszulösen vermag.
13. Chimäre Nucleinsäure, Sequenzidentifizierungs-Nr. 30, nach den Ansprüchen 1, 2 und 5, die die Sequenzen der Sequenzidentifizierungs-Nrn. 22 und 29 umfasst und das chimäre Protein PLL3 codiert.
14. Chimäres Protein PLL3 nach Anspruch 7, das die Aminosäuresequenz der Sequenzidentifizierungs-Nr. 31 aufweist, das das Expressionsprodukt der Sequenzidentifizierungs-Nr. 30 ist und bei einem Empfänger eine humorale Immunantwort von neutralisierenden und schützenden Antikörpern gegen das Denguevirus-2 auszulösen vermag.
15. Chimäre Nucleinsäure der Sequenzidentifizierungs-Nr. 33 nach den Ansprüchen 1, 2 und 3, die die Sequenzen der Sequenzidentifizierungs-Nrn. 32 und 23 umfasst und das chimäre Protein PLH1 codiert.
16. Chimäres Protein PLH1 nach Anspruch 7, das die Aminosäuresequenz der Sequenzidentifizierungs-Nr. 34 aufweist, das das Expressionsprodukt der Sequenzidentifizierungs-Nr. 33 ist und bei einem Empfänger eine humorale Immunantwort von neutralisierenden und schützenden Antikörpern gegen das Denguevirus-1 auszulösen vermag.
17. Chimäre Nucleinsäure der Sequenzidentifizierungs-Nr. 35 nach den Ansprüchen 1, 2 und 4, die die Sequenzen der Sequenzidentifizierungs-Nrn. 32 und 26 umfasst und das chimäre Protein PLH2 codiert.
18. Chimäres Protein PLH2 nach Anspruch 7, das die Aminosäuresequenz der Sequenzidentifizierungs-Nr. 36 aufweist, das das Expressionsprodukt der Sequenzidentifizierungs-Nr. 35 ist und bei einem Empfänger eine humorale Immunantwort von neutralisierenden und schützenden Antikörpern gegen das Denguevirus-1 auszulösen vermag.
19. Chimäre Nucleinsäure der Sequenzidentifizierungs-Nr. 37 nach den Ansprüchen 1, 2 und 5, die die Sequenzen der Sequenzidentifizierungs-Nrn. 32 und 29 umfasst und das chimäre Protein PLH3 codiert.
20. Chimäres Protein PLH3 nach Anspruch 7, das die Aminosäuresequenz der Sequenzidentifizierungs-Nr. 38 aufweist, das das Expressionsprodukt der Sequenzidentifizierungs-Nr. 37 ist und bei einem Empfänger eine humorale Immunantwort von neutralisierenden und schützenden Antikörpern gegen das Denguevirus-1 auszulösen vermag.
21. Chimäre Nucleinsäure der Sequenzidentifizierungs-Nr. 40 nach den Ansprüchen 1, 2 und 3, die die Sequenzen der Sequenzidentifizierungs-Nrn. 39 und 23 umfasst und das chimäre Protein PAZ1 codiert.
22. Chimäres Protein PAZ1 nach Anspruch 7, das die Aminosäuresequenz der Sequenzidentifizierungs-Nr. 41 aufweist, das das Expressionsprodukt der Sequenzidentifizierungs-Nr. 40 ist und bei einem Empfänger eine humorale Immunantwort von neutralisierenden und schützenden Antikörpern gegen das Denguevirus-3 auszulösen vermag.
23. Chimäre Nucleinsäure der Sequenzidentifizierungs-Nr. 42 nach den Ansprüchen 1, 2 und 4, die die Sequenzen der Sequenzidentifizierungs-Nrn. 39 und 26 umfasst und das chimäre Protein PAZ2 codiert.
24. Chimäres Protein PAZ2 nach Anspruch 7, das die Aminosäuresequenz der Sequenzidentifizierungs-Nr. 43 aufweist, das das Expressionsprodukt der Sequenzidentifizierungs-Nr. 42 ist und bei einem Empfänger eine humorale Immunantwort von neutralisierenden und schützenden Antikörpern gegen das Denguevirus-3 auszulösen vermag.
25. Chimäre Nucleinsäure der Sequenzidentifizierungs-Nr. 44 nach den Ansprüchen 1, 2 und 5, die die Sequenzen der Sequenzidentifizierungs-Nrn. 39 und 29 umfasst und das chimäre Protein PAZ3 codiert.
26. Chimäres Protein PAZ3 nach Anspruch 7, das die Aminosäuresequenz der Sequenzidentifizie-

rungs-Nr. 45 aufweist, das das Expressionsprodukt der Sequenzidentifizierungs-Nr. 44 ist und bei einem Empfänger eine humorale Immunantwort von neutralisierenden und schützenden Antikörpern gegen das Denguevirus-3 auszulösen vermag.

27. Chimäre Nucleinsäure der Sequenzidentifizierungs-Nr. 47 nach den Ansprüchen 1, 2 und 3, die die Sequenzen der Sequenzidentifizierungs-Nrn. 46 und 23 umfasst und das chimäre Protein PID1 codiert.

28. Chimäres Protein PID1 nach Anspruch 7, das die Aminosäuresequenz der Sequenzidentifizierungs-Nr. 48 aufweist, das das Expressionsprodukt der Sequenzidentifizierungs-Nr. 47 ist und bei einem Empfänger eine humorale Immunantwort von neutralisierenden und schützenden Antikörpern gegen das Denguevirus-4 auszulösen vermag.

29. Chimäre Nucleinsäure der Sequenzidentifizierungs-Nr. 49 nach den Ansprüchen 1, 2 und 4, die die Sequenzen der Sequenzidentifizierungs-Nrn. 46 und 26 umfasst und das chimäre Protein PID2 codiert.

30. Chimäres Protein PID2 nach Anspruch 7, das die Aminosäuresequenz der Sequenzidentifizierungs-Nr. 50 aufweist, das das Expressionsprodukt der Sequenzidentifizierungs-Nr. 49 ist und bei einem Empfänger eine humorale Immunantwort von neutralisierenden und schützenden Antikörpern gegen das Denguevirus-4 auszulösen vermag.

31. Chimäre Nucleinsäure der Sequenzidentifizierungs-Nr. 51 nach den Ansprüchen 1, 2 und 5, die die Sequenzen der Sequenzidentifizierungs-Nrn. 46 und 29 umfasst und das chimäre Protein PID3 codiert.

32. Chimäres Protein PID3 nach Anspruch 7, das die Aminosäuresequenz der Sequenzidentifizierungs-Nr. 52 aufweist, das das Expressionsprodukt der Sequenzidentifizierungs-Nr. 51 ist und bei einem Empfänger eine humorale Immunantwort von neutralisierenden und schützenden Antikörpern gegen das Denguevirus-4 auszulösen vermag.

33. Pharmazeutische Zusammensetzung, die bei einem Empfänger eine schützende Immunantwort auszulösen vermag, die für das Denguevirus spezifisch ist, und die ein chimäres Protein nach den Ansprüchen 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 und 32 und einen pharmazeutischen Träger umfasst.

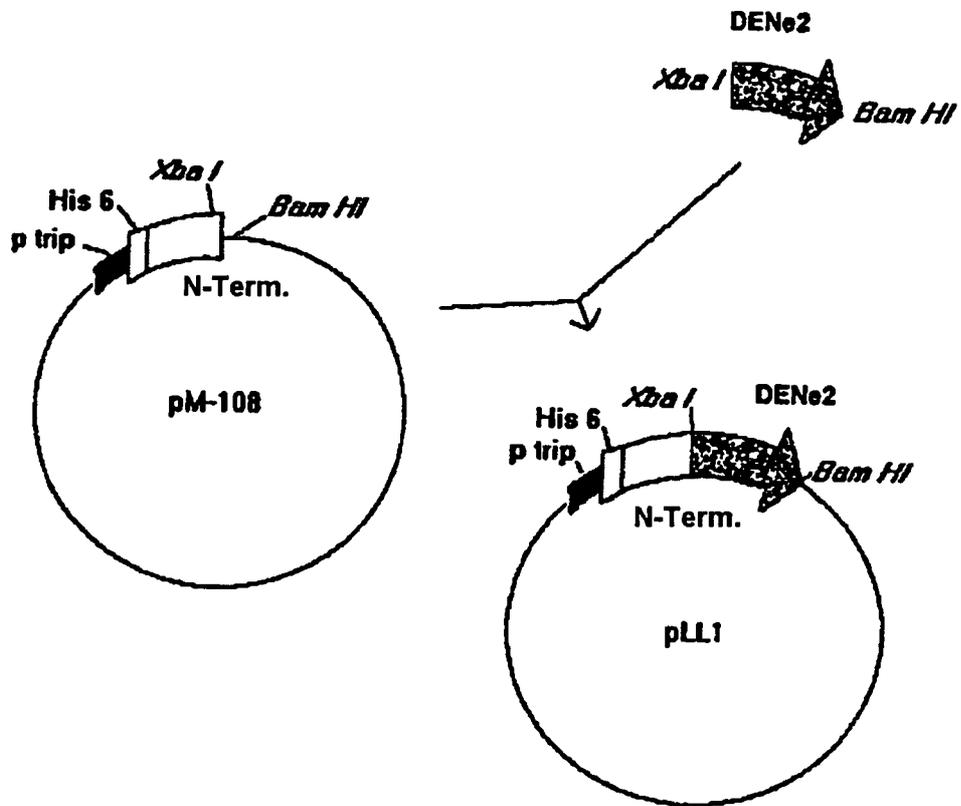
34. Pharmazeutische Zusammensetzung, die bei einem Empfänger eine schützende Immunantwort auszulösen vermag, die für das Denguevirus spezifisch ist, die zwei oder mehr chimäre Proteine nach den Ansprüchen 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 und 32 und einen pharmazeutischen Träger umfasst.

35. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 33, die als verhütendes oder therapeutisches Mittel für Dengueviren wirksam ist, für die orale, intramuskuläre, subkutane, mukosale oder intravenöse Anwendung.

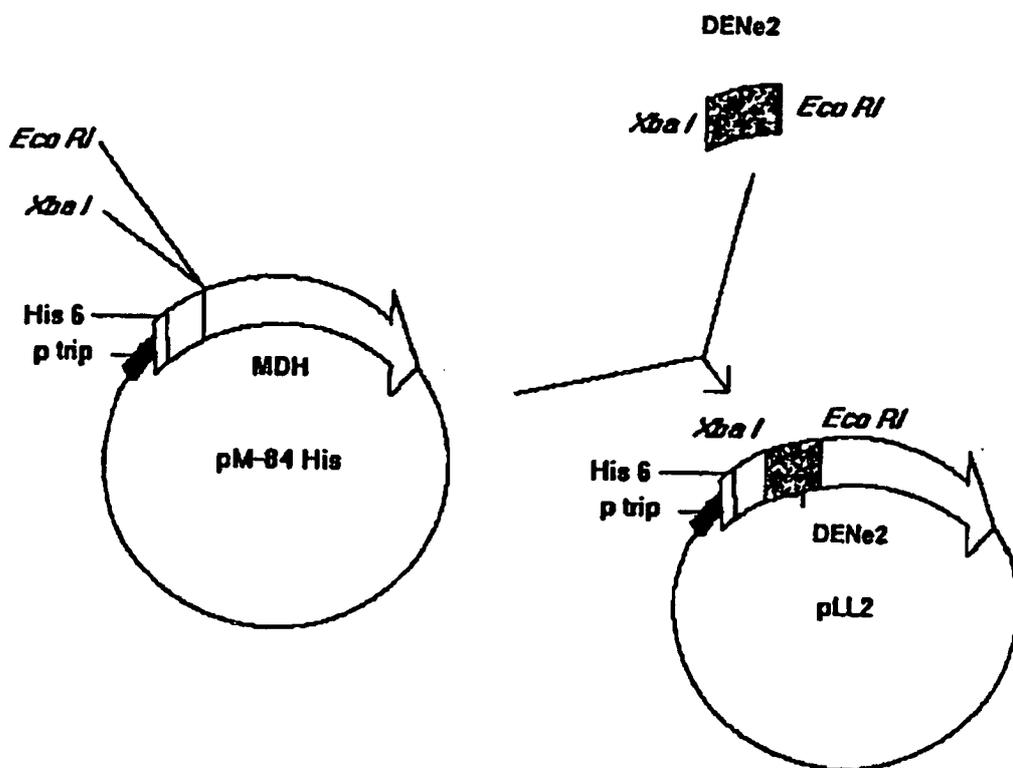
36. Diagnostisches Reagenz, umfassend ein oder mehr Proteine nach den Ansprüchen 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 und 32, das für die Diagnose und Serotypbestimmung des Denguevirus nützlich ist.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

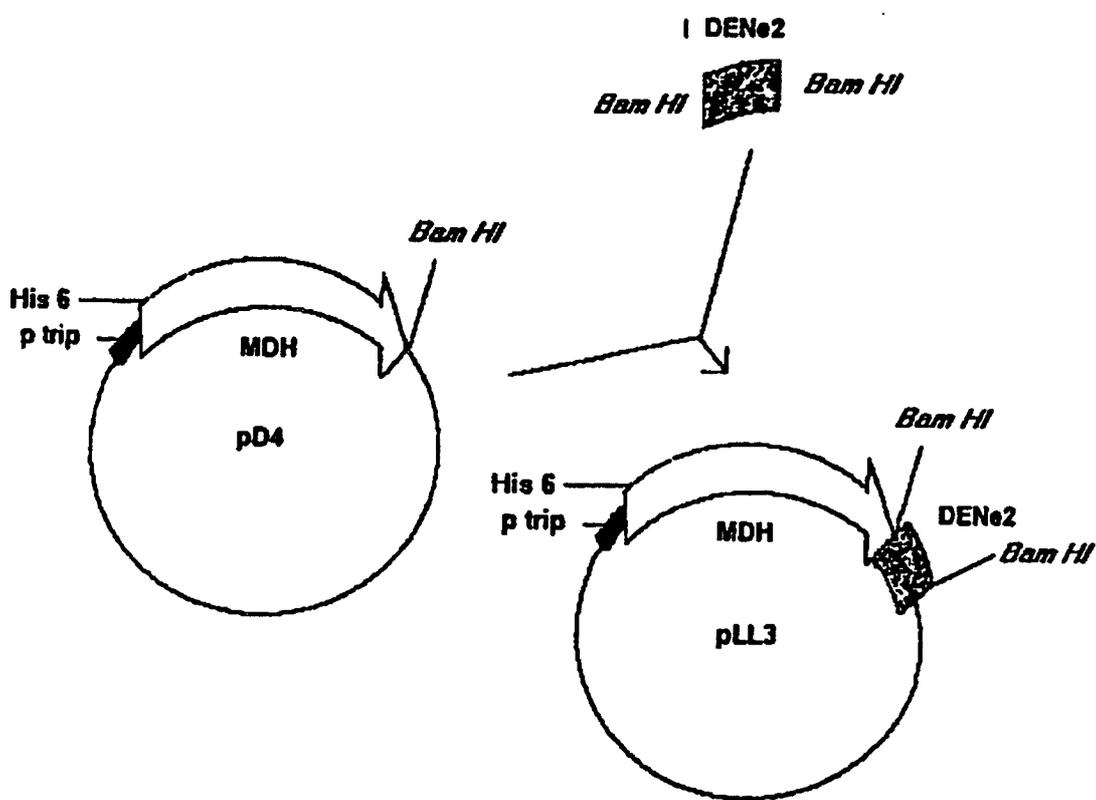
Figur 1



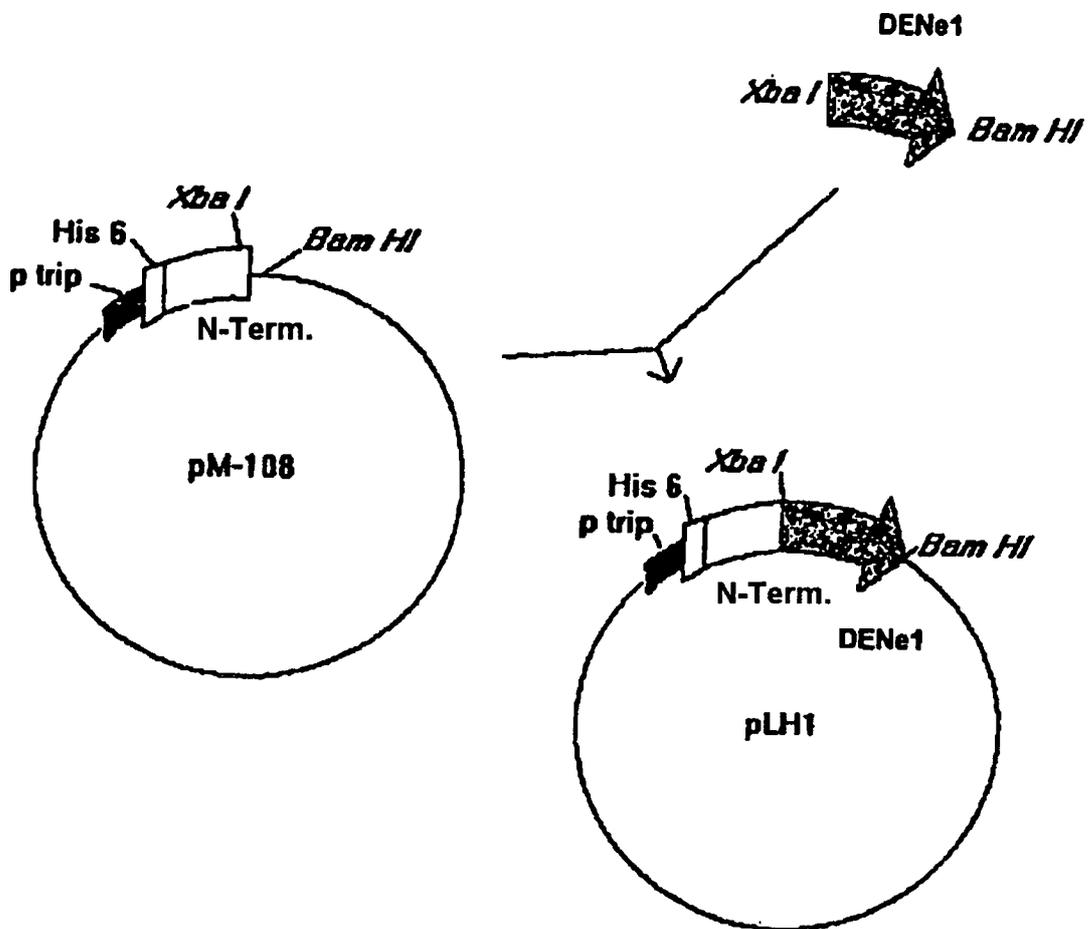
Figur 2



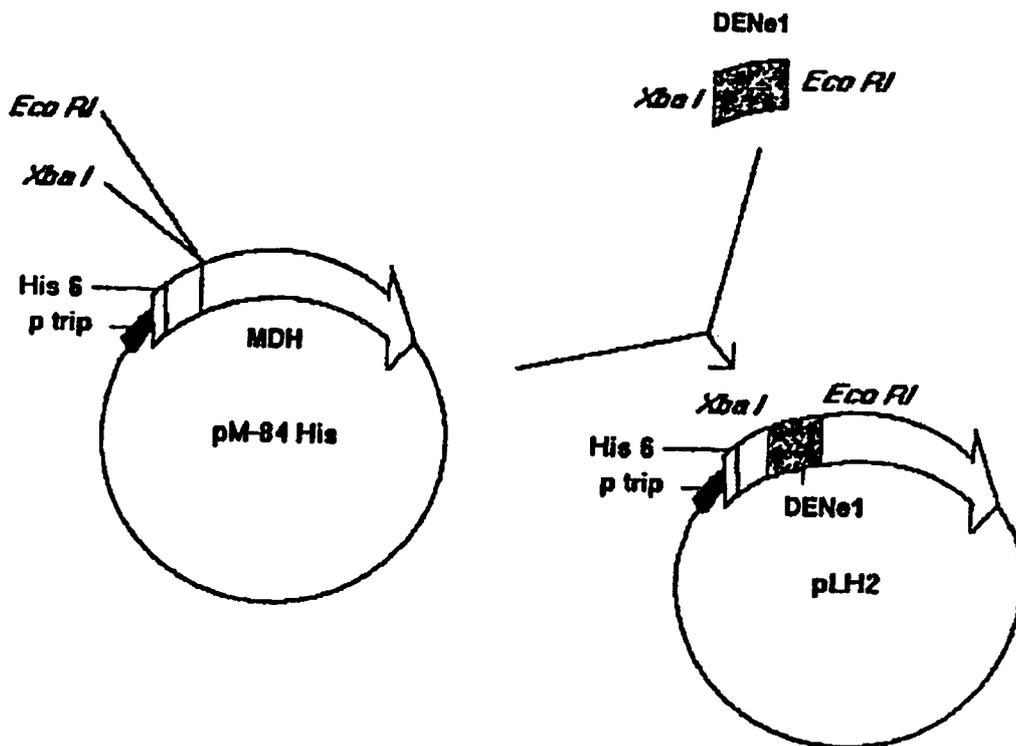
Figur 3



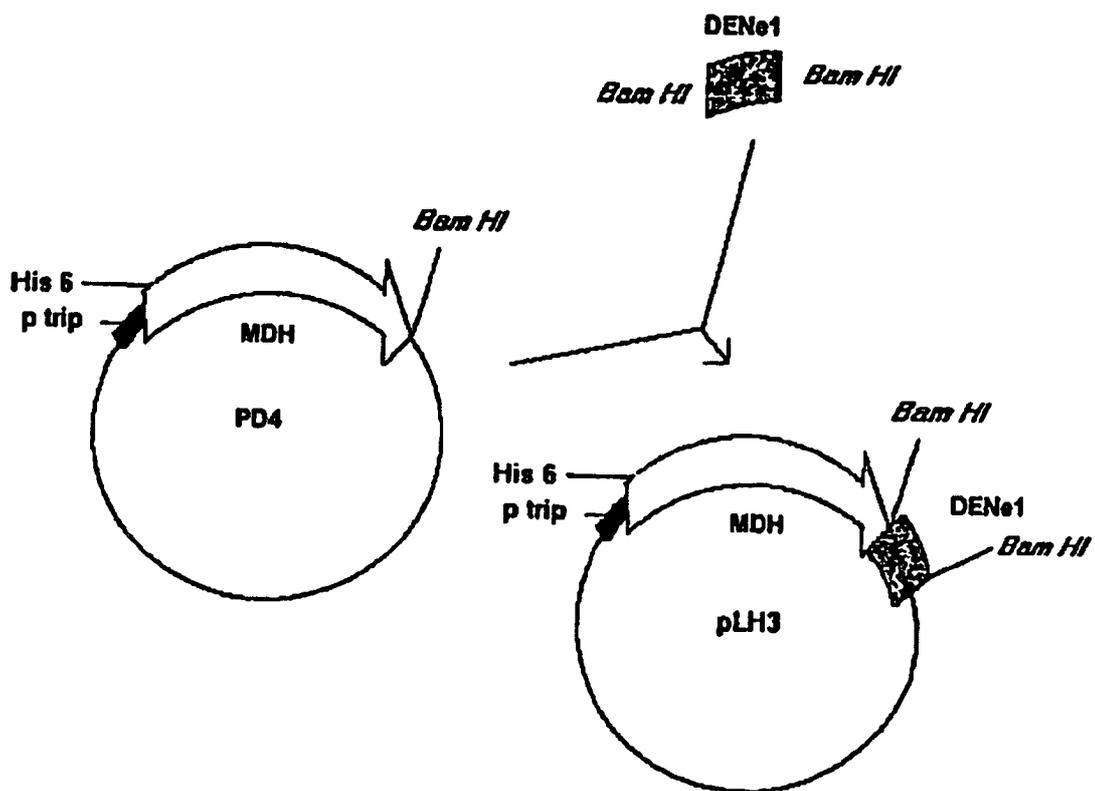
Figur 4



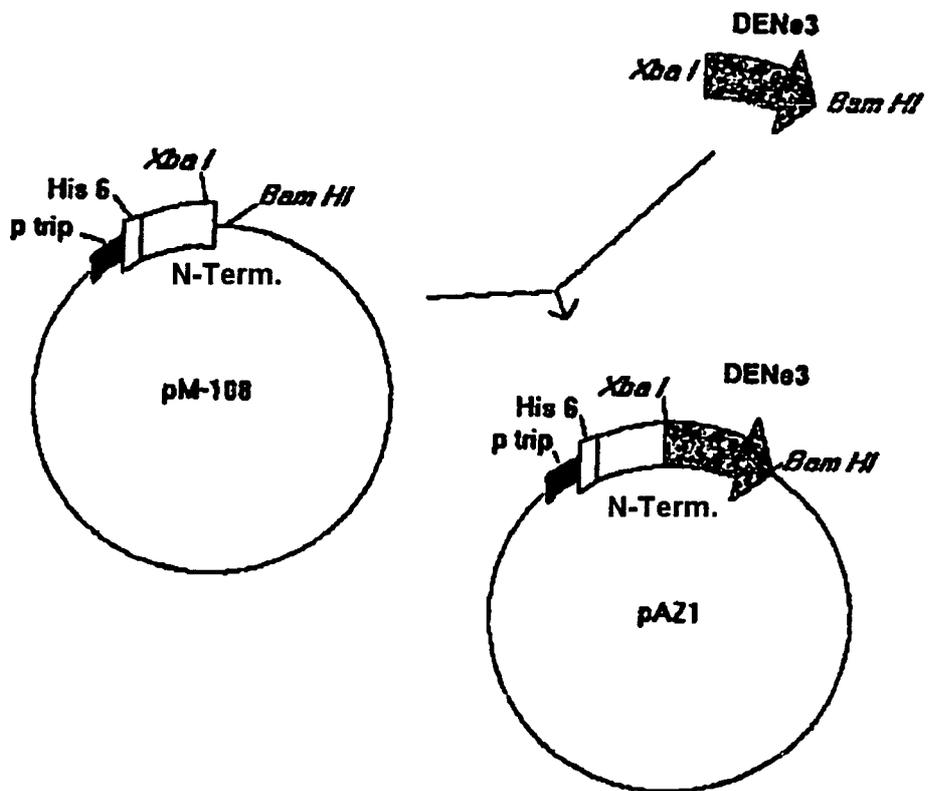
Figur 5



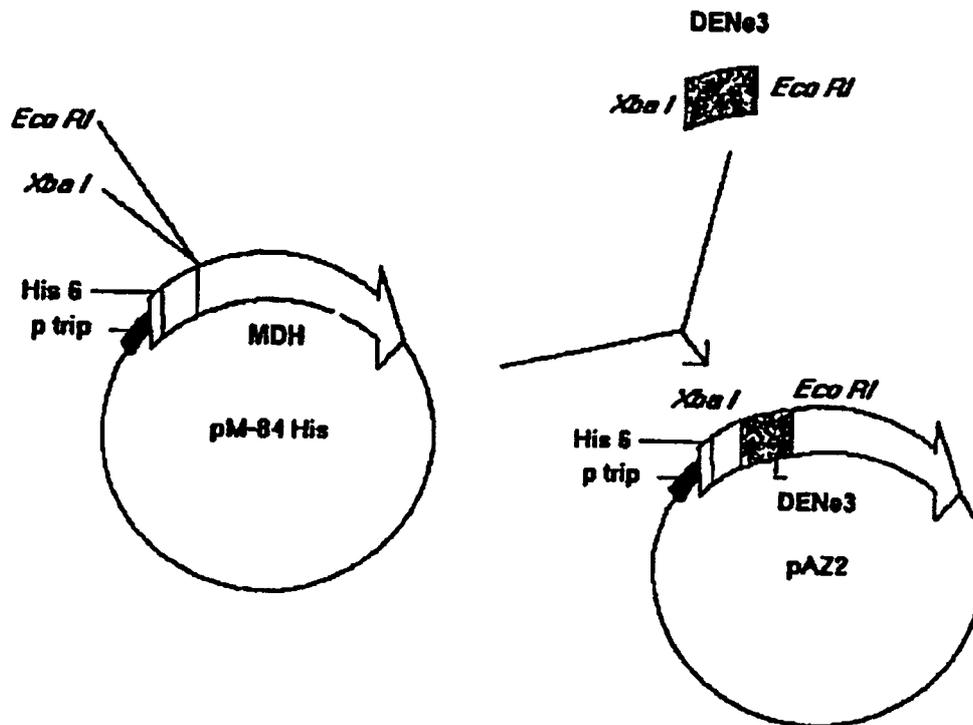
Figur 6



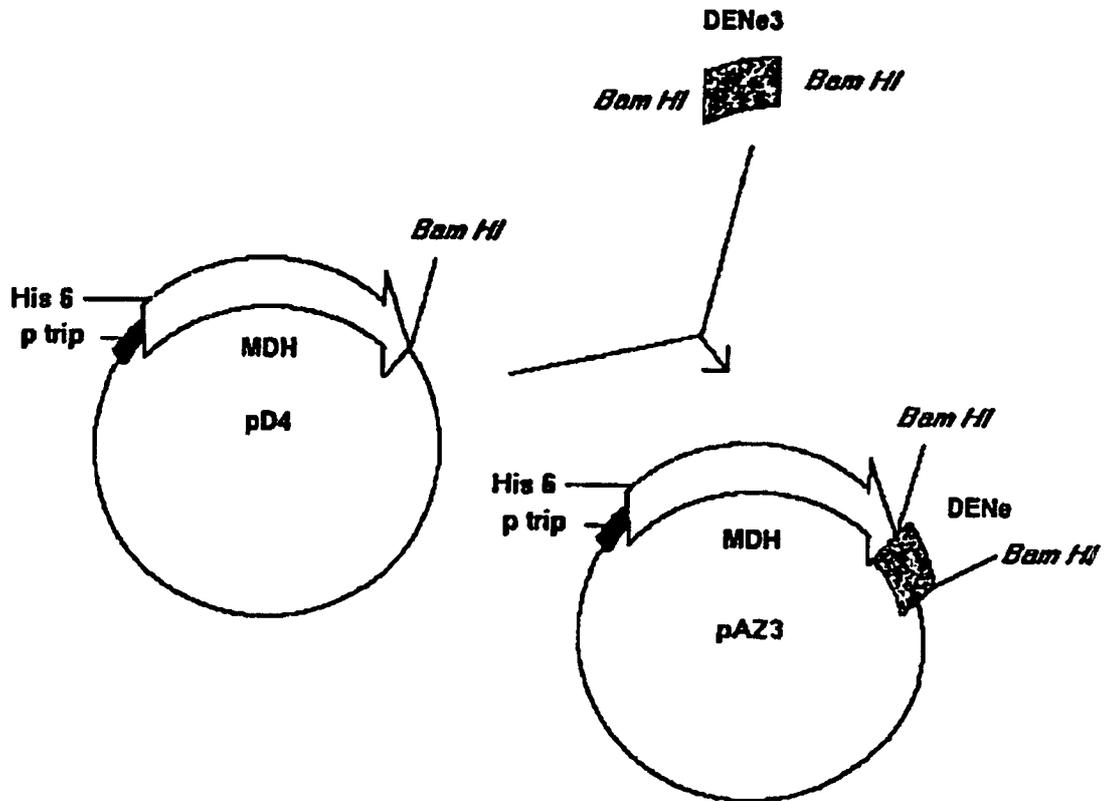
Figur 7



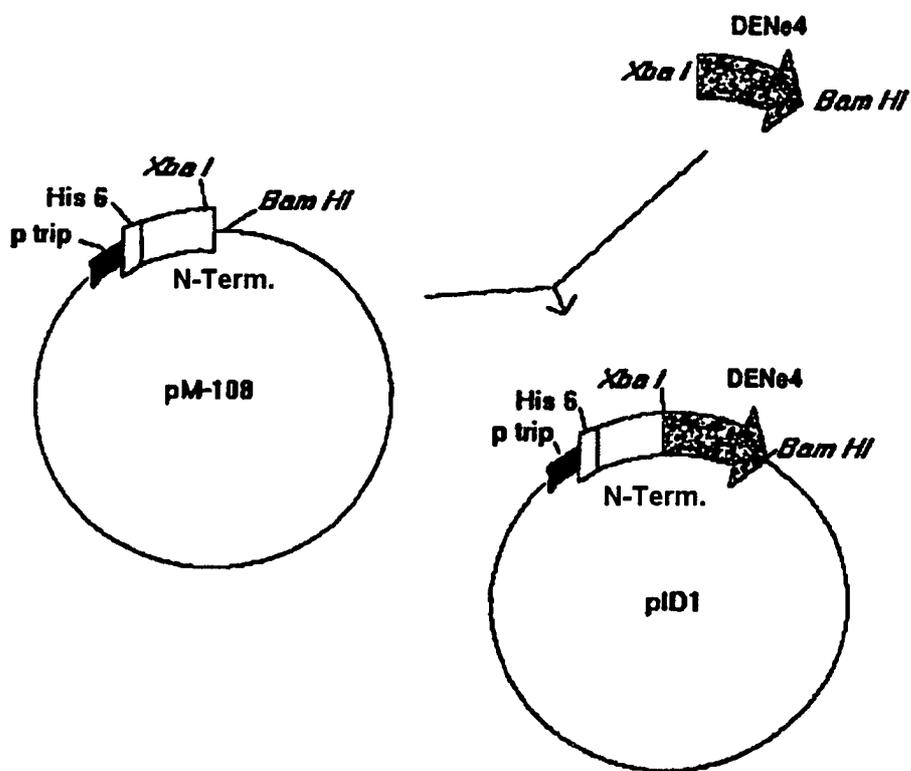
Figur 8



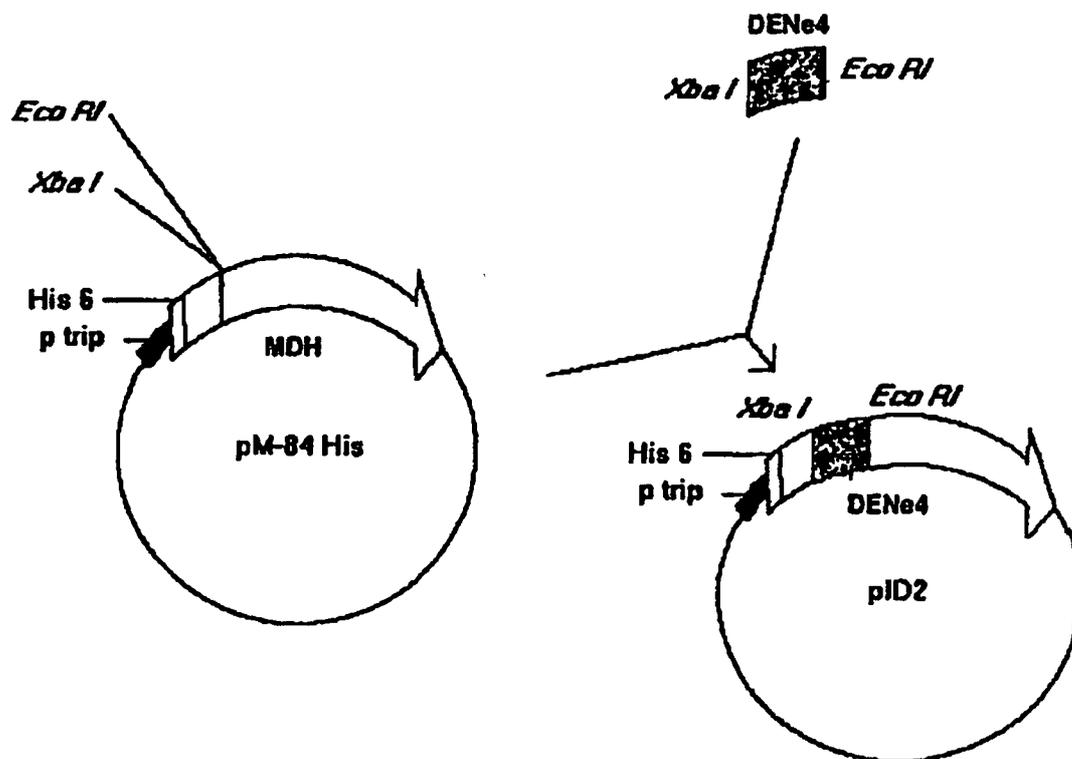
Figur 9



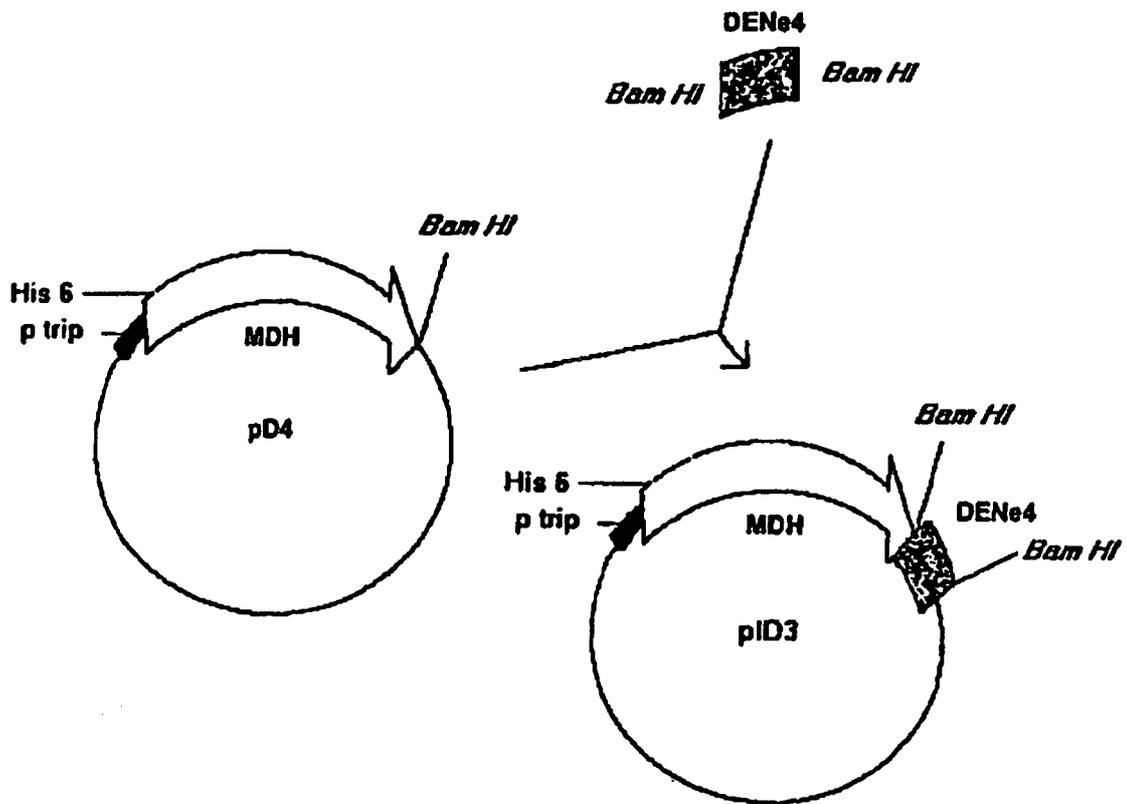
Figur 10



Figur 11



Figur 12



Figur 13

