



(72) AUDONNET, Jean-Christophe Francis, FR

(72) BAUDU, Philippe Guy Nicolas, FR

(72) RIVIERE, Michel Albert Emile, FR

(71) MERIAL, FR

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> C12N 15/38, A61K 39/295, A61K 39/245

(30) 1995/11/30 (95/14450) FR

(54) **RECOMBINANT LIVE VACCINE CONTAINING FELINE  
HERPES VIRUS TYPE 1, PARTICULARLY FOR TREATING  
FELINE INFECTIOUS PERITONITIS**

(54) **VACCIN VIVANT RECOMBINANT A BASE D'HERPESVIRUS  
FELIN DE TYPE 1, NOTAMMENT CONTRE LA PERITONITE  
INFECTIEUSE FELINE**

(57) Le vaccin vivant recombinant comprend, comme vecteur, un herpèsvirus félin comprenant et exprimant au moins une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide, cette séquence étant insérée dans les sites ORF5 et/ou ORF2. Formule de vaccin multivalent et fragments d'ADN de l'herpèsvirus félin.

(57) A recombinant live vaccine including, as the vector, a feline herpes virus that includes and expresses at least one nucleotide sequence coding for a polypeptide, said sequence being inserted in sites ORF5 and/or ORF2, is disclosed. A multivalent vaccine formula and feline herpes virus DNA fragments are also disclosed.

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE  
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/86, C07K 14/165, A61K 39/245, 39/215</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 97/20059</b> <b>(43) Date de publication internationale: 5 juin 1997 (05.06.97)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR96/01830 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 19 novembre 1996 (19.11.96) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 95/14450 30 novembre 1995 (30.11.95) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> RHONE MERIEUX [FR/FR]; 17, rue Bourgelat, F-69002 Lyon (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> AUDONNET, Jean-Christophe, Francis [FR/FR]; 119, rue de Créqui, F-69006 Lyon (FR). BAUDU, Philippe, Guy, Nicolas [FR/FR]; 229, avenue Barthélémy-Buyer, F-69005 Lyon (FR). RIVIERE, Michel, Albert, Emile [FR/FR]; 11, chemin du Chancelier, F-69130 Ecully (FR). <b>(74) Mandataire:</b> COLOMBET, Alain; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne-d'Orves, F-75441 Paris Cédex 09 (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AU, BR, CA, JP, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
<b>(54) Title:</b> RECOMBINANT LIVE VACCINE CONTAINING FELINE HERPES VIRUS TYPE 1, PARTICULARLY FOR TREATING FELINE INFECTIOUS PERITONITIS <b>(54) Titre:</b> VACCIN VIVANT RECOMBINANT A BASE D'HERPESVIRUS FELIN DE TYPE 1, NOTAMMENT CONTRE LA PERITONITE INFECTIEUSE FELINE <b>(57) Abstract</b> <p>A recombinant live vaccine including, as the vector, a feline herpes virus that includes and expresses at least one nucleotide sequence coding for a polypeptide, said sequence being inserted in sites ORF5 and/or ORF2, is disclosed. A multivalent vaccine formula and feline herpes virus DNA fragments are also disclosed.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>Le vaccin vivant recombinant comprend, comme vecteur, un herpèsvirus félin comprenant et exprimant au moins une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide, cette séquence étant insérée dans les sites ORF5 et/ou ORF2. Formule de vaccin multivalent et fragments d'ADN de l'herpèsvirus félin.</p>		

**Vaccin vivant recombinant à base d'herpèsvirus félin de type 1, notamment contre la péritonite infectieuse féline.**

La présente invention a trait à des vaccins, de préférence pour chats, produits à partir d'herpèsvirus félins recombinants, et aux méthodes  
5 d'obtention et de préparation de ces virus recombinants. En particulier, la présente invention a plus particulièrement trait aux recombinants herpèsvirus félins comprenant une cassette d'expression pour un (ou des) gène(s) étranger(s).

La rhinotrachéite infectieuse féline est causée par l'herpèsvirus félin  
10 de type 1 (en anglais Feline HerpesVirus Type 1 ou FHV-1). L'herpèsvirus félin (FHV-1) est classé dans la famille des *Alphaherpesvirinae*. La rhinotrachéite infectieuse féline est une maladie très répandue chez les chats et, en pratique, tous les chats médicalisés sont vaccinés contre cette affection virale. Il existe actuellement plusieurs vaccins pour prévenir la rhinotrachéite infectieuse. Ces  
15 vaccins sont soit de type vivant atténué, soit de type inactivé (virus entier ou sous-unités purifiées). L'atténuation des vaccins vivants actuellement utilisés a été obtenue après passages répétés sur cellules, et la cause de leur atténuation n'est pas connue. De plus, ces vaccins présentent en général une virulence résiduelle et sont pour cette raison administrés par voie parentérale  
20 (sous-cutanée ou intramusculaire) plutôt que par voie intranasale (qui serait cependant la voie de choix compte tenu de la réplication locale de ce virus). Les vaccins inactivés présentent une bonne innocuité, mais leur faible immunogénicité nécessite de multiples injections pour induire une protection satisfaisante.

Par ailleurs, les chats domestiques sont exposés à de nombreuses autres maladies, et la mise au point d'un vecteur vaccinal pouvant exprimer différents antigènes d'agents pathogènes félines permettrait de simplifier et d'améliorer l'efficacité des programmes de vaccination.

5 Enfin, parmi les maladies affectant le chat domestique, certaines résistent toujours aux approches vaccinales classiques. Le cas le plus connu est celui de la péritonite infectieuse féline causée par un coronavirus (virus de la Péritonite Infectieuse Féline (PIF) ou, en anglais, "FIPV" (Feline Infectious Peritonitis Virus)).

10 Un vecteur FHV-1, dont l'atténuation serait telle qu'il puisse être administré par voie oronasale chez le chat sans entraîner de pathologie locale et/ou générale, et qui permettrait l'induction d'une réponse immunitaire protectrice à la fois contre la rhinotrachéite infectieuse féline et contre d'autres agents pathogènes félines, constituerait un progrès significatif en matière de  
15 vaccination de la population féline domestique.

On a déjà proposé un certain nombre de gènes de FHV comme sites d'insertion :

La demande de brevet EP-A-0 447 303 a proposé l'insertion dans le site RR2 des alphaherpèsvirus, y compris FHV. La demande donne les moyens  
20 d'effectuer l'insertion dans le site RR2 de l'herpèsvirus de la dinde (virus HVT). La demande de brevet WO-A-90 01547 propose des vecteurs FHV TK- pour l'expression de gènes hétérologues.

De même, la demande de brevet WO-A-93 09238 propose un vaccin contre la leucémie féline formée d'un vecteur FHV dans lequel un gène de FeLV a été  
25 inséré dans le gène TK du virus FHV. Voir aussi dans le même sens les articles de R.C. WARDLEY *et al.* dans J. Gen. Virol. 1992. 73. 1811-1818 et de G.E. COLE *et al.* dans J. Virol. 1990. 64. 4930-4938.

La demande de brevet WO-A-94 03621 propose l'insertion dans les gènes gI, gE, US9, US10 et US11.

30 La demande de brevet WO-A-95 00172 propose d'insérer un ADN servant de

marqueur dans la région du génome comprenant les gènes gI et gE.

La demande de brevet EP-A-0 576 092 propose le cadre ouvert de lecture ("ORF") situé entre le gène gC et le gène homologue du gène HSV-1 UL46 comme site préférentiel pour l'insertion sur le génome FHV. Voir aussi M.J. WILLEMSE *et al.* dans J. Gen. Virol. 1994. 75. 3107-3116.

Divers promoteurs, y compris ceux généralement disponibles dans le commerce, ont été utilisés dans les différentes constructions décrites dans l'art antérieur, parmi lesquels le promoteur HCMV IE (CMV immediate early humain), la séquence promotrice de la région LTR du virus RSV (Rous Sarcoma Virus), et le promoteur précoce du virus SV40.

La présente invention a pour objectif de fournir un vaccin FHV vivant, atténué mais ayant conservé une bonne capacité de réplication *in vivo*, en vue d'immuniser les chats contre la rhinotrachéite infectieuse.

Un autre objectif de l'invention est de fournir un vaccin vivant recombinant à base de FHV qui soit efficace contre les autres agents pathogènes félines. En particulier, en raison des nombreux échecs observés dans la vaccination contre la péritonite infectieuse féline avec des vaccins inactivés ou vivants atténués, principalement en raison du phénomène de "facilitation" (exacerbation de la maladie), le besoin d'un vaccin réellement efficace contre la PIF existe toujours. Un tel vaccin à base d'un vecteur FHV-1 recombinant qui serait réellement efficace contre la péritonite infectieuse féline, maladie pour laquelle personne n'a encore commercialisé de vaccin satisfaisant, pourrait en outre ouvrir la voie à des vaccins très efficaces contre d'autres maladies du chat, comme, par exemple et entre autres, la leucémie féline, le syndrome d'immunodéficience féline dû à FIV, ou encore la panleucopénie féline.

Un autre objectif encore de l'invention est de permettre une vaccination efficace des chats en utilisant la voie oronasale.

La demanderesse a caractérisé une nouvelle partie du génome de FHV, dans laquelle elle a caractérisé de nouvelles régions du génome du virus FHV, régions dénommées ci-après (voir exemple 3) FHV ORF2 et FHV ORF5, qui se sont avérées utilisables pour l'insertion de gènes étrangers dans des

conditions permettant de remplir les objectifs exposés ci-dessus.

La présente invention a donc pour objet un vaccin vivant recombinant utilisant comme vecteur un herpèsvirus félin comprenant, et exprimant, au moins une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide, 5 cette séquence étant insérée dans le site ORF5 et/ou le site ORF2.

De préférence, la séquence insérée code pour un polypeptide antigénique et, préférentiellement, pour un polypeptide antigénique d'un agent pathogène félin. On peut également insérer des séquences codant pour des protéines immunomodulatrices telles que des cytokines. Selon une modalité 10 avantageuse, on peut associer une séquence codant pour une cytokine, ou analogue, et une séquence codant pour un antigène. Si besoin est, plusieurs séquences de cytokines peuvent être associées entre elles, éventuellement en combinaison avec une ou des séquences codant pour des antigènes.

L'insertion dans les deux sites nouvellement caractérisés est 15 réalisée par insertion simple (sans délétion) ou après délétion partielle ou totale des ORFs utilisées comme sites d'insertion.

Selon une modalité particulièrement préférée de l'invention, on effectue des insertions et/ou des délétions dans les deux sites décrits. Cette modalité est particulièrement adaptée à l'utilisation de souches sauvages 20 virulentes du virus FHV-1 pour l'obtention de recombinants. On peut donc insérer au moins une séquence nucléotidique dans chacun des sites, ou encore n'insérer que dans un site, de préférence ORF5, et déléter tout ou partie de l'autre site.

Selon une autre modalité, qui s'applique plus aux souches 25 vaccinales atténuées, sans y être limitée, l'insertion est effectuée dans un seul des deux sites, de préférence le site ORF5.

Les herpèsvirus félins selon l'invention sont de préférence les virus FHV de type 1.

On peut utiliser en particulier la souche FHV-1 CO dont la séquence 30 de la région génomique (ORF1 à ORF8) est indiquée dans la liste de séquences sous la référence SEQ ID N° 1 (voir aussi tableau 1 exemple 3). Le site ORF2

est situé entre les nucléotides 1655 et 2596. Le site ORF5 est situé entre les nucléotides 5869 et 7113.

Pour l'expression des gènes étrangers insérés sur le génome de FHV-1 selon la présente invention, on utilisera de préférence un promoteur eucaryote fort, tel que, préférentiellement, un promoteur CMV immediate early (IE). Par promoteur CMV IE, on entend notamment un fragment tel que donné dans les exemples ainsi que ses sous-fragments conservant la même activité promotrice. Le promoteur CMV IE peut être le promoteur humain (HCMV IE) ou le promoteur murin (MCMV IE), ou encore un promoteur CMV IE d'une autre origine, par exemple du rat, du cobaye, ou du porc.

On pourra insérer au moins deux séquences nucléotidiques dans l'un des sites ORF2 ou ORF5 sous le contrôle de promoteurs différents. Il pourra notamment s'agir de promoteurs CMV IE d'origines différentes.

Selon un développement avantageux de l'invention, on associe au promoteur CMV IE un autre promoteur selon une disposition tête-bêche, telle que les deux promoteurs ont leurs extrémités 5' adjacentes, si bien que les transcriptions initiées à partir de ces promoteurs se font en sens opposés, ce qui permet d'insérer, dans la région d'insertion, deux séquences nucléotidiques, l'une sous la dépendance du promoteur CMV IE, l'autre sous celle du promoteur associé. Cette construction est remarquable par le fait que la présence du promoteur CMV IE, et notamment de sa partie activatrice (enhancer), peut activer la transcription induite par le promoteur associé. Comme promoteur associé, on peut citer, par exemple, un promoteur CMV d'espèce différente du premier promoteur. On peut également envisager d'autres promoteurs tels que le promoteur RNA1.8 du virus de la maladie de Marek (MDV) (G. Bradley *et al.* J. Virol. 1989. 63.2534-2542).

La séquence nucléotidique insérée dans le vecteur FHV pour être exprimée peut être toute séquence codant pour un polypeptide antigénique d'un agent pathogène félin capable, une fois exprimée dans les conditions favorables procurées par l'invention, d'assurer une immunisation conduisant à une protection efficace de l'animal vacciné contre l'agent pathogène. On pourra

donc insérer, dans les conditions décrites par la présente l'invention, les séquences nucléotidiques codant pour les antigènes d'intérêt pour une maladie donnée.

Le cas typique de l'invention est l'insertion d'au moins une  
5 séquence nucléotidique codant convenablement pour un polypeptide du virus de la péritonite infectieuse féline (PIF ou FIPV) et, de préférence, le polypeptide FIPV M ou le polypeptide FIPV S modifié. On obtient ainsi un vaccin vivant recombinant assurant, en plus d'une protection contre la rhinotrachéite infectieuse féline, une protection contre la péritonite infectieuse féline. Si on le  
10 souhaite, on peut aussi insérer, en sus ou à la place, une séquence codant pour un autre antigène du virus PIF, tel que la protéine N, la protéine 7b, et/ou encore les polypeptides codés par le gène polymérase (polB) du virus de la PIF.

D'autres cas préférés de l'invention sont l'insertion de séquences nucléotidiques codant pour des antigènes ou des fragments d'antigènes du virus  
15 de la leucémie féline (FeLV), en particulier gènes env, gag et pol (Osterhaus A. *et al.* J. Immunol., 1985. 135. 591-596; Lutz H. Vet. Microbiol. 1990. 23. 131-146; Clark N. *et al.* JAVMA, 1991. 199. 1433-1443; Thomsen D. *et al.* J. Gen. Virol., 1992. 73. 1819-1824), du virus de l'immunodéficience féline (FIV) (Jarrett O. *et al.* AIDS, 1990, 4 (suppl. 1): S163-S165; Miyazawa T. *et*  
20 *al.* Arch. Virol; 1994, 134, 221-234; de Rhonde A. *et al.* Virology, 1994. 198. 257-264), en particulier gènes env, gag et pol, du virus de la panleucopénie féline (FPV) (Carlson J. *et al.* J. Virol. 1985. 55. 574-582; Martyn J. *et al.* J. Gen. Virol. 1990. 71, 2747-2753), en particulier le gène de capsid VP2, du calicivirus félin (FCV) (Neill J. *et al.* J. Virol. 1991. 65. 5440-5447; Carter M.  
25 *et al.* Virology. 1992. 190. 443-448), en particulier le gène de capsid.

Un cas typique de l'invention est un vaccin comprenant une séquence nucléotidique codant pour un antigène du virus de la PIF sous le contrôle de CMV IE et une séquence nucléotidique codant pour un antigène d'une autre maladie virale féline, notamment celles citées plus haut, sous le  
30 contrôle de l'autre promoteur.

La présente invention a aussi pour objet une formule de vaccin multivalent, comprenant, en mélange ou à mélanger, au moins deux vaccins

vivants recombinants tels que définis plus haut, ces vaccins comprenant des séquences insérées différentes, notamment de pathogènes différents.

La présente invention a aussi pour objet les virus FHV modifiés dans l'un ou les deux sites ORF2 et ORF5 comme indiqué ci-dessus.

5 Elle a aussi pour objet une méthode de vaccination, en particulier des chats, dans laquelle on administre par toute voie parentérale ou locale, mais de préférence par voie oronasale, une quantité efficace d'un vaccin tel que défini plus haut. La dose vaccinale sera comprise entre  $10^2$  DICC50 et  $10^7$  DICC50. Tel que défini, le vaccin est efficace en général après une seule  
10 administration par voie oronasale. Cependant, des administrations répétées peuvent être nécessaires.

La présente invention a aussi pour objet les fragments d'ADN comprenant tout ou partie de la séquence définie par les positions 1 à 8193 sur SEQ ID N° 1, notamment tout ou partie des sites ORF2 et ORF5 définis et/ou  
15 des séquences flanquantes localisées en amont et en aval de ces sites, fragments qui seront utiles comme bras flanquants pour les techniques de recombinaison homologue avec le génome du virus FHV parental. Bien entendu, l'invention concerne aussi les variantes de ces fragments qui correspondent aux séquences équivalentes des autres souches de FHV. Le spécialiste a toute  
20 latitude pour choisir les régions servant de bras flanquants en liaison avec le type d'insertion (avec ou sans délétion) ou de délétion (partielle ou totale) choisi. D'une manière générale, les bras flanquants pourront ainsi avoir de 100 à 800 paires de bases.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide d'exemples  
25 de réalisation non limitatifs, pris en référence au dessin, dans lequel :

**Figure 1 :** Séquence de la région FHV-1 (10803 paires de bases) et traduction des différents cadres ouverts de lecture (ORF) présents sur cette séquence (ORF1 à ORF8).

**Figure 2 :** Construction du plasmide pPB107 (plasmide donneur pour  
30 l'insertion de cassettes d'expression dans le site FHV-1 ORF2)

**Figure 3 :** Construction du plasmide pPB110 (plasmide donneur pour l'insertion de cassettes d'expression dans le site FHV-1 ORF5)

- Figure 4 :** Construction de la cassette d'expression pour le gène FIPV M (plasmide pPB105)
- Figure 5 :** Construction de la cassette d'expression pour le gène FIPV S (plasmide pPB055)
- 5 **Figure 6 :** Mutagénèse du site A1 du gène FIPV S (plasmide pJCA084)
- Figure 7 :** Mutagénèse du site A2 du gène FIPV S (plasmide pJCA085)
- Figure 8 :** Mutagénèse des sites A1 + A2 du gène FIPV S (= FIPV S\*) (plasmide pJCA087)
- Figure 9 :** Construction de la cassette d'expression pour le gène FIPV S \*  
10 modifié (mutations dans les sites A1 et A2) (plasmide pPB056)
- Figure 10 :** Construction de la cassette d'expression pour le gène FIPV N (plasmide pJCA091)
- Figure 11 :** Construction du plasmide donneur pour l'insertion de la cassette d'expression du gène FIPV M dans le site FHV-1 ORF2 (pPB111)
- 15 **Figure 12 :** Construction du plasmide donneur pour l'insertion de la cassette d'expression du gène FIPV S \* dans le site FHV-1 ORF2 (pPB112)
- Figure 13 :** Construction du plasmide donneur pour l'insertion de la cassette d'expression du gène FIPV N dans le site FHV-1 ORF2 (pPB113)
- Figure 14 :** Construction du plasmide donneur pour l'insertion de la cassette  
20 d'expression du gène FIPV M dans le site FHV-1 ORF5 (pPB114)
- Figure 15 :** Construction du plasmide donneur pour l'insertion de la cassette d'expression du gène FIPV S \* dans le site FHV-1 ORF5 (pPB115)
- Figure 16 :** Construction du plasmide donneur pour l'insertion de la cassette d'expression du gène FIPV N dans le site FHV-1 ORF5 (pPB116)
- 25 **Liste des séquences SEQ ID pour les constructions dans les sites ORF2 et ORF5**
- SEQ ID N° 1** Séquence complète de la région FHV-1 ORF1 --> ORF8 représentée à la figure 1
- SEQ ID N° 2** Séquence acides aminés partielle ORF FHV-1 ORF1 de la figure 1
- 30 **SEQ ID N° 3** Séquence acides aminés ORF FHV-1 ORF2 de la figure 1

	<b>SEQ ID N° 4</b>	Séquence acides aminés ORF FHV-1 ORF3 de la figure 1
	<b>SEQ ID N° 5</b>	Séquence acides aminés ORF FHV-1 ORF4 de la figure 1
	<b>SEQ ID N° 6</b>	Séquence acides aminés ORF FHV-1 ORF5 de la figure 1
	<b>SEQ ID N° 7</b>	Séquence acides aminés ORF FHV-1 ORF6 de la figure 1
5	<b>SEQ ID N° 8</b>	Séquence acides aminés ORF FHV-1 ORF7 de la figure 1
	<b>SEQ ID N° 9</b>	Séquence acides aminés partielle ORF FHV-1 ORF8 de la figure 1
	<b>SEQ ID N° 10</b>	Oligonucléotide JCA054
	<b>SEQ ID N° 11</b>	Oligonucléotide JCA055
10	<b>SEQ ID N° 12</b>	Oligonucléotide PB080
	<b>SEQ ID N° 13</b>	Oligonucléotide PB081
	<b>SEQ ID N° 14</b>	Oligonucléotide PB082
	<b>SEQ ID N° 15</b>	Oligonucléotide PB083
	<b>SEQ ID N° 16</b>	Oligonucléotide PB084
15	<b>SEQ ID N° 17</b>	Oligonucléotide PB085
	<b>SEQ ID N° 18</b>	Oligonucléotide JCA056
	<b>SEQ ID N° 19</b>	Oligonucléotide JCA057
	<b>SEQ ID N° 20</b>	Oligonucléotide PB088
	<b>SEQ ID N° 21</b>	Oligonucléotide PB089
20	<b>SEQ ID N° 22</b>	Oligonucléotide JCA058
	<b>SEQ ID N° 23</b>	Oligonucléotide JCA059
	<b>SEQ ID N° 24</b>	Oligonucléotide JCA060
	<b>SEQ ID N° 25</b>	Oligonucléotide JCA061
	<b>SEQ ID N° 26</b>	Oligonucléotide JCA062
25	<b>SEQ ID N° 27</b>	Oligonucléotide JCA063
	<b>SEQ ID N° 28</b>	Oligonucléotide JCA064
	<b>SEQ ID N° 29</b>	Oligonucléotide JCA065
	<b>SEQ ID N° 30</b>	Oligonucléotide JCA066
	<b>SEQ ID N° 31</b>	Oligonucléotide JCA067
30	<b>SEQ ID N° 32</b>	Oligonucléotide JCA068
	<b>SEQ ID N° 33</b>	Oligonucléotide JCA069

## 2. EXEMPLES

Toutes les constructions de plasmides ont été réalisées en utilisant les techniques standards de biologie moléculaire décrites par Sambrook J. *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989). Tous les fragments de restriction utilisés pour la présente invention ont été isolés en utilisant le kit "GeneClean" (BIO101 Inc. La Jolla, CA).

Le virus utilisé comme virus parental est la souche CO de l'herpèsvirus félin de type 1 (FHV-1). Ce virus a été isolé à partir de cellules rénales d'un chaton nouveau-né dont la mère était atteinte de rhinotrachéite infectieuse (C. Benoit Jeannin, Thèse de Doctorat de 3<sup>ème</sup> cycle, Université de Lyon, 1983). Les conditions de culture de ce virus ont déjà été décrites (Fargeaud D. *et al.* Arch. Virol. 1984. 80. 69-82). Brièvement, des cellules CRFK ("Crandell Rees Feline Kidney cells"), cultivées en milieu minimum essentiel de Eagle (milieu "MEM) sont inoculées avec la souche FHV-1 CO en utilisant une multiplicité d'infection de 1. Les cellules infectées sont alors incubées à 37°C pendant environ 36 heures, jusqu'à apparition d'un effet cytopathique complet.

### Exemple 1: Extraction de l'ADN de l'herpèsvirus félin de type 1:

Après culture, le surnageant et les cellules lysées sont récoltées et la totalité de la suspension virale est centrifugée à 1000 g pendant 10 minutes à + 4°C pour éliminer les débris cellulaires. Les particules virales sont alors récoltées par ultracentrifugation à 400000 g pendant 1 heure à + 4°C. Le culot est repris dans un volume minimum de tampon (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). Cette suspension virale concentrée est traitée par la protéinase K (100 µg/ml final) en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS) (0,5% final) pendant 2 heures à 37°C. L'ADN viral est ensuite extrait avec un mélange de phénol/chloroforme, puis précipité avec 2 volumes d'éthanol absolu. Après une nuit à - 20°C, l'ADN est centrifugé à 10000 g pendant 15 minutes à + 4°C. Le culot d'ADN est séché, puis repris dans un volume minimum d'eau ultrapure stérile.

**Exemple 2: Isolement de l'ARN génomique de la souche FIPV 79-1146 et clonage de l'ADN complémentaire**

La souche FIPV 79-1146 a été cultivée sur cellules CRFK en milieu DMEM (Gibco). L'ARN viral génomique a été isolé en utilisant la technique d'extraction thiocyanate de guanidium/phénol-chloroforme (Chomczynski P. et Sacchi N., Anal. Biochem. 1987. 162. 156-159). Des oligonucléotides spécifiques (comportant à leurs extrémités 5' des sites de restriction pour faciliter le clonage des fragments amplifiés) ont été synthétisés de telle façon qu'ils couvrent entièrement les régions codantes des gènes devant être amplifiés (respectivement M, S et N). La réaction de transcription inverse (RT) et l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont été effectuées selon les techniques standards (Sambrook J. *et al.* 1989). Chaque réaction de RT-PCR a été faite avec un couple d'amplimers spécifiques et en prenant comme matrice l'ARN génomique viral extrait. L'ADN complémentaire amplifié a été extrait au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) avant d'être digéré par les enzymes de restriction.

**Exemple 3: Clonage et caractérisation de la région FHV-1 ORF1 - ORF7 (fragments EcoRI D et EcoRI F)**

L'ADN génomique purifié de la souche CO du virus FHV-1 a été digéré par *EcoRI* et les fragments D (environ 9200 pb) et F (7600 pb) ont été clonés dans le vecteur pBlueScript SKII+ pour donner respectivement les plasmides pFHVEcoRID et pFHVEcoRIF. Le plasmide pFHVEcoRID a été digéré par *EcoRI* et *PstI* et le fragment *EcoRI-PstI* de 979 pb a été isolé et ligaturé avec le vecteur pBS-SKII+, préalablement digéré par *EcoRI* et *PstI* pour donner le plasmide pPB050. Le plasmide pFHVEcoRID a été digéré par *PstI* et le fragment *PstI-PstI* de 2388 pb a été isolé et ligaturé avec le vecteur pBS-SKII+, préalablement digéré par *PstI* pour donner le plasmide pPB051. Les inserts contenus dans les plasmides pFHVEcoRIF, pPB050 et pPB051 ont été entièrement séquencés sur les deux brins pour donner la séquence de la figure 1 (SEQ ID N° 1).

Plusieurs cadres ouverts de lecture de taille supérieure à 65 acides aminés ont été identifiés sur cette séquence (figure 1).

Le premier cadre de lecture (ORF1) (positions 1 - 1587) est incomplet et code pour une protéine tronquée de 529 acides aminés (SEQ ID N° 2).

5 Le deuxième cadre de lecture (ORF2) (positions 1655 - 2596) code pour un polypeptide de 314 acides aminés (SEQ ID N° 3).

Le troisième cadre de lecture (ORF3) (positions 2733 - 4094) est situé sur le brin complémentaire et code pour un polypeptide de 454 acides aminés (SEQ ID N° 4).

10 Le quatrième cadre de lecture (ORF4) (positions 4476 - 5660) code pour un polypeptide de 395 acides aminés (SEQ ID N° 5).

Le cinquième cadre de lecture (ORF5) (positions 5869 - 7113) code pour un polypeptide de 415 acides aminés (SEQ ID N°6).

15 Le sixième cadre de lecture (ORF6) (positions 7449 - 8900) code pour un polypeptide de 484 acides aminés (SEQ ID N°7).

Le septième cadre de lecture identifié sur la séquence de la figure 1 (ORF7) (positions 9153 - 9731) code pour une protéine de 193 acides aminés (SEQ ID N° 8).

20 Le huitième et dernier cadre de lecture identifié sur la séquence de la figure 1 (ORF8) (positions 9908 - 10803) est incomplet. Il est situé sur le brin complémentaire et code pour une protéine tronquée de 298 acides aminés (SEQ ID N° 9).

Les différents cadres ouverts de lecture sont rassemblés dans le tableau ci-dessous : (Tableau 1)

	Cadre ouvert de lecture	Début - Fin (positions sur figure 1)	Taille en acides aminés
5	ORF 1	1 - 1587	529 aa
	ORF 2	1655 - 2596	314 aa
	ORF 3	4094 - 2733	454 aa
	ORF 4	4476 - 5660	395 aa
	ORF 5	5869 - 7113	415 aa
10	ORF 6	7449 - 8900	484 aa
	ORF 7	9153 - 9731	193 aa
	ORF 8	10803 - 9908	298 aa

On pense que le cadre ouvert de lecture FHV ORF2 nouvellement caractérisé est l'homologue du gène HSV-1 UL40 (RR2).

**15 Exemple 4: Construction du plasmide donneur pour le site FHV-1 ORF2 (pPB107) (figure n° 2)**

Le plasmide pFHVEcoRID a été digéré par *EcoRI* et *SacII* pour isoler le fragment *EcoRI-SacII* de 1509 pb. Un adaptateur *KpnI-EcoRI* contenant le site *PmeI* a été obtenu par hybridation des 2 oligonucléotides synthétiques suivants :

20 JCA054 (24 mer) (SEQ ID N° 10):

5' CTTGCCGGGGTTTAAACCGGTTTCG 3'

et JCA055 (32 mer) (SEQ ID N° 11):

5' AATTCGAACCGGTTTAAACCCCGGCAAGGTAC 3'

25 Le fragment *EcoRI-SacII* et l'oligonucléotide double brin ont été ligaturés dans le vecteur pBS-SKII+, préalablement digéré par *KpnI* et *SacII*, pour donner le plasmide pPB106 (4407 pb). Un oligonucléotide synthétique double brin

comportant les sites de clonage HindIII, ClaI et ApaI a été obtenu par hybridation des 2 oligonucléotides suivants:

PB080 (32 mer) (SEQ ID N° 12):

5' TGCAAAGCTTATCGATCCCGGGGCCCCGGTGCA 3'

5 et PB081 (32 mer) (SEQ ID N° 13):

5' CCGGGCCCCGGGATCGATAAGCTTTGCATGCA 3'

L'oligonucléotide ainsi obtenu a été ligaturé avec le plasmide pPB106, préalablement digéré par *Pst*I (site unique sur pPB106) et traité avec la phosphatase alcaline, pour donner le plasmide pPB107 (4439 pb) (figure n° 2).

10 Ce plasmide contient les bras flanquants 5' (*Sac*II-*Pst*I 530 pb) et 3' (*Pst*I-*Eco*RI 979 pb) du site FHV-1 ORF2 ainsi qu'un site multiple de clonage permettant l'insertion d'une cassette d'expression.

**Exemple 5: Construction du plasmide donneur pour le site FHV-1 ORF5 (pPB110) (figure n° 3)**

15 Le plasmide pFHVEcoRIF (voir exemple 3) a été digéré par *Sac*I et *Sma*I pour isoler le fragment *Sac*I-*Sma*I de 1367 pb. Un adaptateur *Sal*I-*Kpn*I contenant le site *Pme*I a été obtenu par hybridation des 2 oligonucléotides suivants:

PB082 (21 mer) (SEQ ID N° 14):

5' GGGGGCCGTTTAAACCGGTAC 3'

20 PB083 (17 mer) (SEQ ID N° 15):

5' CGGTTTAAACGGCCCCC 3'

L'oligonucléotide double brin ainsi obtenu et le fragment *Sac*I-*Sma*I 1367 pb ont été ligaturés avec le vecteur pBS-SKII+, préalablement digéré par *Kpn*I et *Sac*I pour donner le plasmide pPB109 (4247 pb). Un site multiple de clonage a été

25 obtenu par hybridation des 2 oligonucléotides synthétiques suivants:

PB084 (28 mer) (SEQ ID N° 16):

5' TCGAGAAAGCTTATCGATCCCGGGCCCCG 3'

PB085 (28 mer) (SEQ ID N° 17):

5' TCGACGGGCCCCGGGATCGATAAGCTTTC 3'

30 L'oligonucléotide double brin ainsi obtenu a été ligaturé avec le plasmide pPB109; préalablement digéré par *Sal*I et traité avec la phosphatase alcaline,

pour donner le plasmide pPB110 (4275 pb) (figure n° 3).

Ce plasmide contient les bras flanquants 5' (Sacl-Sall 699 pb) et 3' (Sall-SmaI 668 pb) du site FHV-1 ORF5 ainsi qu'un site multiple de clonage permettant l'insertion d'une cassette d'expression.

**5 Exemple 6: Construction de la cassette d'expression pour le gène FIPV M (figure n° 4)**

Une réaction de RT-PCR a été réalisée avec l'ARN génomique de la souche FIPV 79-1146 et avec les oligonucléotides suivants:

JCA056 (40 mer) (SEQ ID N°18)

10 5' TTTGAGCTCGCGGCCGCATGAAGTAATTTTGCTAATACTC 3'

JCA057 (27 mer) (SEQ ID N°19)

5' TTTGGTACCGTTTAGTTACACCATATG 3'

en vue d'isoler précisément le gène codant pour la glycoprotéine de membrane (FIPV M) sous la forme d'une cassette Sacl-KpnI. Après purification, le produit

15 de RT-PCR de 823 pb a été digéré par *KpnI* et *Sacl* pour isoler un fragment *KpnI*-*Sacl* de 813 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pBS-SKII+, préalablement digéré avec *KpnI* et *Sacl*, pour donner le vecteur pJCA080 (3668 pb). La séquence du gène M a été vérifiée par séquençage et a été trouvée  
 20 181. 327-335), séquence qui est incorporée par référence dans la présente demande.

Le plasmide pCMV $\beta$  (CLONTECH) a été digéré par *EcoRI* et *NotI* pour isoler le fragment *EcoRI*-*NotI* de 819 pb contenant la région promotrice du gène immediate-early du cytomégalovirus humain (fragment A). Le plasmide

25 pJCA080 a été digéré par *KpnI* et *NotI* pour isoler le fragment *NotI*-*KpnI* (gène FIPV M) de 804 pb (fragment B). Les fragments A et B ont alors été ligaturés avec le vecteur pGEM-7Zf+ (Promega), préalablement digéré par *EcoRI* et *KpnI*, pour donner le plasmide pPB104 (4614 pb).

Une réaction PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

30 PB088 (30 mer) (SEQ ID N° 20)

5' TTGGGTACCGCCTCGACTCTAGGCGGCCGC 3'

PBO89 (32 mer) (SEQ ID N° 21)

5' TTGGGTACCGGATCCGAAAAAACCTCCCACAC 3'

et la matrice pCMV $\beta$  pour produire un fragment de 252 pb contenant le signal de polyadénylation du gène précoce du virus SV40. Ce fragment a été digéré par *KpnI* pour isoler le fragment *KpnI-KpnI* de 233 pb (fragment B). Ce fragment a alors été ligaturé avec le plasmide pPB104, préalablement digéré par *KpnI* et traité avec la phosphatase alcaline, pour donner le plasmide pPB105 (4847 pb) (figure n° 4). Ce plasmide contient une cassette d'expression promoteur HCMV-IE - gène FIPV M - polyA SV40 mobilisable par digestion *Apal-ClaI* ou *Apal-HindIII*.

**Exemple 7: Construction de la cassette d'expression pour le gène FIPV S (figure n° 5)**

Une réaction de RT-PCR a été réalisée avec l'ARN génomique de la souche FIPV 79-1146 et avec les oligonucléotides suivants:

15 JCA058 (39 mer) (SEQ ID N° 22)

5' TTTGAGCTCGCGGCCGCATGATTGTGCTCGTAACTTGCC 3'

JCA059 (38 mer) (SEQ ID N° 23)

5' TTTGGTACCGTTTAGTGGACATGCACTTTTCAATTGG 3'

en vue d'isoler précisément le gène codant pour la glycoprotéine spicule (ou "spike" ou encore désignée ci-après "S") (FIPV S). Après purification, le produit de RT-PCR de 4387 pb a été digéré par *KpnI* et *SacI* pour isoler un fragment *KpnI-SacI* de 4375 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pBS-SKII+, préalablement digéré avec *KpnI* et *SacI*, pour donner le vecteur pJCA081 (7234 pb). La séquence du gène S a été vérifiée par séquençage et a été trouvée identique à celle précédemment publiée (de Groot R. *et al.* J. Gen. Virol. 1987. 68. 2639-2646), séquence qui est incorporée par référence dans la présente demande.

Le plasmide pCMV $\beta$  a été digéré par *EcoRI* et *NotI* pour isoler le fragment *EcoRI-NotI* de 819 pb contenant la région promotrice du gène immediate-early du cytomégalovirus humain (fragment A). Le plasmide pJCA081 a été digéré par *KpnI* et *NotI* pour isoler le fragment *NotI-KpnI* (gène FIPV S) de 4372 pb

(fragment B). Les fragments A et B ont alors été ligaturés avec le vecteur pGEM-7Zf+, préalablement digéré par *EcoRI* et *KpnI*, pour donner le plasmide pJCA082 (8180 pb).

Une réaction PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

- 5 PB088 (SEQ ID N° 20) et PB089 (SEQ ID N° 21) (voir exemple 6) et la matrice pCMV $\beta$  pour produire un fragment de 252 pb contenant le signal de polyadénylation du gène précoce du virus SV40. Ce fragment a été digéré par *KpnI* pour isoler le fragment *KpnI*-*KpnI* de 233 pb (fragment B).

10 Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pJCA082, préalablement digéré par *KpnI* et traité avec la phosphatase alcaline, pour donner le plasmide pPB055 (8413 pb)(figure n° 5). Ce plasmide contient une cassette d'expression promoteur HCMV-IE - gène FIPV S - polyA SV40 mobilisable par digestion *ApaI*-*Clal*.

#### **Exemple 8: Construction du gène spike modifié (FIPV S\*)**

- 15 La séquence du gène FIPV S a été mutagénisée de manière à modifier les régions responsables de l'induction d'anticorps facilitants, sans changer les fonctions de la glycoprotéine S. Cette modification a déjà été décrite dans la demande de brevet FR-94 10379 (publication N° 2 724 385), incorporée ici par référence, et a été réalisée de la manière suivante:

#### **20 8.1. : Mutagénèse du site A1 (figure n° 6)**

Le fragment central du gène FIPV S *HindIII*-*HindIII* de 1723 pb (nucléotides 1696 à 3418) a été cloné dans le vecteur pBS-SKII+, préalablement digéré par *HindIII* et traité avec la phosphatase alcaline, pour donner le plasmide pJCA083 (4678 pb). Le site A1 est situé sur le sous-fragment *HindIII*-*SspI* (positions 25 1696 à 1845) de ce fragment.

Le site A1 a été mutagénisé par PCR en utilisant la stratégie suivante:

Les oligonucléotides suivants ont été synthétisés:

JCA060 (95 mer) (SEQ ID N° 24)

5'ATGAAGCTTAGTGGTTATGGTCAACCCATAGCCTCGACACTAAGTAACAT  
30 CACACTACCAATGCAGGATAACAATACTGTTGTGTACTGTATTTCG 3'

JCA061 (88 mer) (SEQ ID N° 25)

5'AAAAATATTGTACCATAAAGAACTTTTGCAAGTGGAATGAACATAAACTG  
AGAATTGGTTAGAACGAATACAGTACACAACAGTATTG 3'

JCA062 (20 mer) (SEQ ID N° 26)

5 5' ATGAAGCTTAGTGGTTATGG 3'

JCA063 (20 mer) (SEQ ID N° 27)

5' AAAAATATTGTACCATAAAG 3'

Les oligonucléotides JCA060 et JCA061 ont été hybridés entre eux grâce à leur séquence complémentaire commune de 23 paires de bases. L'hybride ainsi  
10 obtenu a été utilisé, après élongation de ses extrémités 3', comme matrice pour une réaction PCR utilisant les oligonucléotides JCA062 et JCA063. Cette réaction d'amplification par PCR a permis d'obtenir un fragment de 159 pb. Ce fragment a été digéré par *HindIII* et *SspI* pour produire un fragment *HindIII-SspI* de 149 pb (fragment A). Ce fragment contient le site A1 modifié à deux  
15 positions (Val au lieu de Asp à la position 568 et Tyr au lieu de Asp à la position 591). Le plasmide pJCA083 a été digéré par *HindIII* et digéré partiellement par *SspI* pour isoler le fragment *SspI-HindIII* de 1569 pb (fragment B) par GeneClean (BIO101 Inc., La Jolla. Ca.).

Le vecteur pBS-SKII+ a été digéré par *HindIII* et traité avec la phosphatase  
20 alcaline pour produire le fragment C (2960 pb).

Les fragments A, B et C ont été ensuite ligaturés ensemble pour produire le plasmide pJCA084 (4678 pb) (figure n° 6). Ce plasmide contient le fragment *HindIII-HindIII* du gène FIPV S modifié pour deux acides aminés du site A1.

Le gène FIPV S peut être ensuite reconstitué en remplaçant le fragment *HindIII-HindIII*  
25 naturel (positions 1696 à 3418) par le fragment *HindIII-HindIII* contenu dans le plasmide pJCA084. Le gène complet FIPV S modifié au site A1 peut alors être utilisé pour des constructions de plasmides d'expression ou de virus recombinants.

## 8.2. : Mutagénèse du site A2 (figure n° 7)

30 Les oligonucléotides suivants ont été synthétisés :

JCA064 (20 mer) (SEQ ID N° 28)

5' GGACAATATTTTAAATCAAG 3'

JCA065 (36 mer) (SEQ ID N° 29)

5' TTTAACAACCTGCTCATTGGTTCCTGTACGTGCAGC 3'

JCA066 (36 mer) (SEQ ID N° 30)

5 5' AAGTTTTATGTTGCTGCACGTACAGGAACCAATGAG 3'

JCA067 (20 mer) (SEQ ID N° 31)

5' ATCACTAACATTTTAAAGC 3'

Une réaction PCR (PCR A) a été réalisée avec les oligonucléotides JCA064 et JCA065 et avec le plasmide pJCA083 comme matrice pour synthétiser un  
10 fragment PCR de 199 pb (fragment A).

Une réaction PCR (PCR B) a été réalisée avec les oligonucléotides JCA066 et JCA067 et avec le plasmide pJCA083 comme matrice pour donner un fragment PCR de 273 pb (fragment B).

Les fragments PCR A et B ont été hybridés entre eux grâce à leur région  
15 complémentaire de 46 pb et le produit de cette hybridation, après élongation des extrémités 3', a été amplifié par une réaction PCR (PCR C) avec les oligonucléotides JCA064 et JCA067 pour donner un fragment PCR de 424 pb. Ce fragment PCR a été digéré par *SspI* et *DraI* pour donner le fragment de restriction *SspI-DraI* de 402 pb (fragment C).

20 Le plasmide pJCA083 a été digéré par *HindIII* et *SspI* pour isoler le fragment *HindIII-SspI* de 149 pb (fragment D).

Le plasmide pJCA083 a été digéré par *HindIII* et *DraI* pour isoler le fragment de restriction *DraI-HindIII* de 1170 pb (fragment E).

Le vecteur pBS-SKII+ a été digéré par *HindIII* et traité avec la phosphatase  
25 alcaline pour donner le fragment F (2960 pb).

Les fragments C, D, E et F ont été ensuite ligaturés ensemble pour donner le plasmide pJCA085 (4678 pb) (figure n° 7). Le fragment central *HindIII-HindIII* 1723 pb du gène FIPV S contenu dans pJCA085 possède un site A2 modifié au niveau de 3 acides aminés (Tyr au lieu de Asp à la position 643, Gly au lieu  
30 de Arg à la position 649, et Lys au lieu de Arg à la position 656).

Le gène FIPV S peut être ensuite reconstitué en remplaçant le fragment *HindIII-HindIII* naturel (positions 1696 à 3418) par le fragment *HindIII-HindIII* contenu

dans le plasmide pJCA085. Le gène complet FIPV S modifié au site A2 peut alors être utilisé pour des constructions de plasmides d'expression ou de virus recombinants.

### 8.3. : Mutagénèse des sites A1 et A2 (figure n° 8)

5 Les fragments A (exemple 8.1), C et E (exemple 8.2) ont été ligaturés avec le vecteur pBS-SKII+, préalablement digéré par *HindIII* et traité avec la phosphatase alcaline, pour donner le plasmide pJCA085. Le fragment central *HindIII*-*HindIII* de 1723 pb du gène FIPV S contenu dans pJCA085 présente 2 changements d'acides aminés au niveau du site A1 (voir exemple 8.1) et 3  
10 changements d'acides aminés au niveau du site A2 (voir exemple 8.2).

Le plasmide pJCA081 (exemple 7) a été digéré par *HindIII* pour isoler le fragment *HindIII*-*HindIII* de 5511 pb (fragment A). Le plasmide pJCA085 a été digéré par *HindIII* pour isoler le fragment *HindIII*-*HindIII* de 1723 pb (présentant  
15 5 changements d'acides aminés par rapport à la séquence de la souche FIPV 79-1146) (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble pour donner le plasmide pJCA087 (7234 pb) (figure n° 8). Ce plasmide contient le gène FIPV S modifié au niveau des sites A1 et A2 (= gène FIPV S\*).

### 8.4. Construction de la cassette d'expression pour le gène FIPV S\* (figure n°9)

Le plasmide pCMV $\beta$  a été digéré par *EcoRI* et *NotI* pour isoler le fragment *EcoRI*-  
20 *NotI* de 819 pb contenant la région promotrice du gène immediate-early du cytomegalovirus humain (fragment A). Le plasmide pJCA087 (exemple 8.3) a été digéré par *KpnI* et *NotI* pour isoler le fragment *NotI*-*KpnI* (gène FIPV S) de 4372 pb (fragment B). Les fragments A et B ont alors été ligaturés avec le vecteur pGEM-7Zf+, préalablement digéré par *EcoRI* et *KpnI*, pour donner le  
25 plasmide pJCA088 (8180 pb).

Une réaction PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

PB088 (SEQ ID N° 20) et PB089 (SEQ ID N° 21) (voir exemple 6) et la matrice pCMV $\beta$  pour produire un fragment de 252 pb contenant le signal de polyadénylation du gène précoce du virus SV40. Ce fragment a été digéré par  
30 *KpnI* pour isoler le fragment *KpnI*-*KpnI* de 233 pb (fragment B).

Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pJCA088, préalablement digéré par *KpnI* et traité avec la phosphatase alcaline, pour donner le plasmide pPB056 (8413 pb) (figure n° 9). Ce plasmide contient une cassette d'expression promoteur HCMV-IE - gène FIPV S\* - polyA SV40 mobilisable par digestion 5' *ApaI*-*Clal*.

**Exemple 9: Construction de la cassette d'expression pour le gène FIPV N (figure n° 10)**

Une réaction de RT-PCR a été réalisée avec l'ARN génomique de la souche FIPV 79-1146 et avec les oligonucléotides suivants:

10 JCA068 (37 mer) (SEQ ID N° 32)

5' TTTGAGCTCGCGGCCGCATGGCCACACAGGGACAACG 3'

JCA069 (33 mer) (SEQ ID N° 33)

5' TTTGGTACCGTTTAGTTCGTAACCTCATCAATC 3'

pour isoler précisément le gène codant pour la protéine de nucléocapside "N" 15 (FIPV N). Après purification, le produit de RT-PCR de 1161 pb a été digéré par *KpnI* et *SacI* pour isoler un fragment *SacI*-*KpnI* de 1148 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pBS-SKII+, préalablement digéré avec *KpnI* et *SacI*, pour donner le vecteur pJCA089 (4007 pb). La séquence du gène N a été vérifiée par séquençage et a été trouvée identique à celle précédemment publiée 20 (Vennema H. *et al.* Virology. 1991. 181. 327-335), séquence qui est incorporée par référence dans la présente demande.

Le plasmide pCMV $\beta$  (CLONTECH) a été digéré par *EcoRI* et *NotI* pour isoler le fragment *EcoRI*-*NotI* de 819 pb contenant la région promotrice du gène immediate-early du cytomégalovirus humain (fragment A). Le plasmide 25 pJCA089 a été digéré par *KpnI* et *NotI* pour isoler le fragment *NotI*-*KpnI* (gène FIPV N) de 1137 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés avec le vecteur pGEM-7Zf+, préalablement digéré par *EcoRI* et *KpnI*, pour donner le plasmide pJCA090 (4953 pb).

Une réaction PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

30 PB088 (SEQ ID N° 20) et PB089 (SEQ ID N° 21) (exemple 6) et la matrice

pCMV $\beta$  pour produire un fragment de 252 pb contenant le signal de polyadénylation du gène précoce du virus SV40. Ce fragment a été digéré par *KpnI* pour isoler le fragment *KpnI-KpnI* de 233 pb (fragment B). Ce fragment a alors été ligaturé avec le plasmide pJCA090, préalablement digéré par *KpnI* et  
5 traité avec la phosphatase alcaline, pour donner le plasmide pJCA091 (5186 pb) (figure n° 10). Ce plasmide contient une cassette d'expression promoteur HCMV-IE - gène FIPV N - polyA SV40 mobilisable par digestion *Apal-ClaI* ou *Apal-HindIII*.

**Exemple 10: Construction du plasmide donneur pPB111 et isolement de  
10 vFHV01 (figure n°11)**

Le plasmide pPB105 (exemple 6, figure n°4) a été digéré par *Apal* et *HindIII* pour isoler le fragment *Apal-HindIII* de 1925 pb (fragment A). Le plasmide pPB107 (exemple 4, figure n° 2) a été digéré par *Apal* et *HindIII* pour isoler le  
15 fragment *Apal-HindIII* de 4419 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble pour donner le plasmide pPB111 (6332 pb) (figure n° 11). Ce plasmide contient la cassette d'expression HCMV-IE/gène FIPV M/polyA SV40 dans le site FHV ORF2.

Le plasmide pPB111 a été linéarisé par digestion avec *PmeI*, extrait avec un mélange phénol-chloroforme, précipité avec de l'éthanol absolu, puis repris dans  
20 de l'eau stérile.

Des cellules CRFK, formant un tapis cellulaire bien établi en boîte de Petri (Corning 4,5 cm de diamètre) ont ensuite été transfectées avec le mélange suivant:

1  $\mu$ g de plasmide pPB111 linéarisé + 5  $\mu$ g d'ADN viral de FHV-1 dans 300  $\mu$ l  
25 de milieu MEM et 100  $\mu$ g de LipofectAMINE (Gibco-BRL Cat# 18324-012) dilués dans 300  $\mu$ l de milieu (volume final du mélange = 600  $\mu$ l). Ces 600  $\mu$ l ont été ensuite dilués dans 3 ml (volume final) de milieu MEM et étalés sur  $3 \cdot 10^6$  cellules CRFK. Le mélange a été laissé en contact avec les cellules pendant 5 heures, puis éliminé et remplacé par 5 ml de milieu de culture. Les  
30 cellules ont alors été laissées en culture pendant 24 heures à + 37°C. Après 24 heures à 48 heures de culture, 1 ml de surnageant de culture a été récolté

et plusieurs dilutions de ce surnageant ont été utilisées pour infecter de nouvelles cellules CRFK (cultivées en boîte de Petri (Corning 4,5 cm de diamètre) de manière à obtenir des plages isolées, chaque boîte étant infectée avec 1 ml d'une dilution du surnageant initial. Après un contact d'1 heure à 5 37°C, le milieu d'infection a été éliminé et remplacé par 5 ml de milieu MEM à 1 % d'agarose, maintenu en surfusion à 42°C. Lorsque l'agarose a été solidifiée, les boîtes ont été incubées 48 heures à 37°C en étuve CO<sub>2</sub> jusqu'à 10 apparition de plages. La couche d'agarose a alors été éliminée et un transfert des plages virales a été réalisé sur une membrane stérile de nitrocellulose de même diamètre que la boîte de Petri ayant servi à la culture. Cette membrane a été elle-même transférée sur une autre membrane de nitrocellulose de manière à obtenir une "copie" inversée du premier transfert. Les plages transférées sur cette dernière copie ont été alors hybridées, selon les techniques usuelles connues de l'homme de l'art, avec un fragment du gène FIPV M marqué à la 15 digoxigénine (DNA Labelling Kit, Boehringer Mannheim, CAT # 1175033). Après hybridation, lavages et mise en contact avec le substrat de révélation, la membrane de nitrocellulose a été mise en contact avec un film autoradiographique. Les images d'hybridation positive sur cette membrane ont indiqué quelles étaient les plages qui contenaient des virus FHV recombinants 20 ayant inséré la cassette FIPV M. Les plages correspondant à ces plages positives ont été découpées stérilement sur la première membrane de nitrocellulose, placées dans un tube Eppendorf contenant 0,5 ml de milieu MEM et soniquées pour libérer les virions de la membrane. Le milieu contenu dans le tube Eppendorf a été ensuite dilué en milieu MEM et les dilutions ainsi obtenues 25 ont servi à infecter de nouvelles cultures de cellules CRFK. Un virus recombinant, contenant la cassette HCMV-IE/FIPV M/polyA insérée dans le site ORF2, pur à 100 % a été ainsi isolé après 3 cycles de purification et a été appelé vFHV01. L'homologie de la recombinaison a été vérifiée par PCR en utilisant des oligonucléotides situés de part et d'autre du site d'insertion. 30 L'absence de remaniement sur le génome du virus recombinant vFHV01, ailleurs que dans la région de recombinaison, a été vérifiée par la technique du Southern blot.

**Exemple 11: Construction du plasmide donneur pPB112 et isolement de vFHV02 (figure n° 12)**

Le plasmide pPB056 (exemple 8.4, figure n° 9) a été digéré par *Apal* et *Clal* pour isoler le fragment *Apal-Clal* de 5466 pb (fragment A). Le plasmide pPB107  
5 (exemple 4, figure n° 2) a été digéré par *Apal* et *Clal* pour isoler le fragment *Apal-Clal* de 4426 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble pour donner le plasmide pPB112 (9898 pb) (figure n° 12). Ce plasmide contient la cassette d'expression (HCMV-IE/gène FIPV S\*/polyA SV40) dans le site FHV-1 ORF2.

10 Des cellules CRFK ont été transfectées avec un mélange de plasmide pPB112 (linéarisé par *PmeI*) et d'ADN viral de FHV-1 comme décrit dans l'exemple 10. Une plage virale positive pour la cassette HCMV-IE/gène FIPV S\* a été purifiée comme décrit dans l'exemple 10, mais en utilisant une sonde homologue FIPV S\*, et amplifiée pour donner le virus recombinant vFHV02.

**15 Exemple 12: Construction du plasmide donneur pPB113 et isolement de vFHV03 (figure n° 13)**

Le plasmide pJCA091 (exemple 9, figure n° 10) a été digéré par *Apal* et *HindIII* pour isoler le fragment *Apal-HindIII* de 2244 pb (fragment A). Le plasmide pPB107 (exemple 4, figure n° 2) a été digéré par *Apal* et *HindIII* pour isoler le  
20 fragment *Apal-HindIII* de 4419 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble pour donner le plasmide pPB113 (6671 pb) (figure n° 13). Ce plasmide contient la cassette d'expression (HCMV-IE/gène FIPV N/polyA SV40) dans le site FHV-1 ORF2.

Des cellules CRFK ont été transfectées avec un mélange de plasmide pPB113  
25 (linéarisé par *PmeI*) et d'ADN viral de FHV-1 comme décrit dans l'exemple 10. Une plage virale positive pour la cassette HCMV-IE/gène FIPV N a été purifiée comme décrit dans l'exemple 10, mais en utilisant une sonde homologue FIPV N, et amplifiée pour donner le virus recombinant vFHV03.

**Exemple 13: Construction du plasmide donneur pPB114 et isolement de vFHV04 (figure n° 14)**

- Le plasmide pPB105 (exemple 6, figure n° 4) a été digéré par *Apal* et *HindIII* pour isoler le fragment *Apal-HindIII* de 1925 pb (fragment A). Le plasmide
- 5 pPB110 (exemple 5, figure n° 3) a été digéré par *Apal* et *HindIII* pour isoler le fragment *Apal-HindIII* de 4256 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble pour donner le plasmide pPB114 (6169 pb) (figure n° 14). Ce plasmide contient la cassette d'expression (HCMV-IE/gène FIPV M/polyA SV40) dans le site FHV-1 ORF5.
- 10 Des cellules CRFK ont été transfectées avec un mélange de plasmide pPB114 (linéarisé par *PmeI*) et d'ADN viral de FHV-1 comme décrit dans l'exemple 10. Une plaque virale positive pour la cassette HCMV-IE/gène FIPV M a été purifiée comme décrit dans l'exemple 10 et amplifiée pour donner le virus recombinant vFHV04.

**15 Exemple 14: Construction du plasmide donneur pPB115 et isolement de vFHV05 (figure n° 15)**

- Le plasmide pPB056 (exemple 8.4, figure n° 9) a été digéré par *Apal* et *Clal* pour isoler le fragment *Apal-Clal* de 5466 pb (fragment A). Le plasmide pPB110 (exemple 5, figure n° 3) a été digéré par *Apal* et *Clal* pour isoler le fragment
- 20 *Apal-Clal* de 4263 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble pour donner le plasmide pPB115 (9735 pb) (figure n° 5). Ce plasmide contient la cassette d'expression (HCMV-IE/gène FIPV S\*/polyA SV40) dans le site FHV-1 ORF5.

- Des cellules CRFK ont été transfectées avec un mélange de plasmide pPB115
- 25 (linéarisé par *PmeI*) et d'ADN viral de FHV-1 comme décrit dans l'exemple 10. Une plaque virale positive pour la cassette HCMV-IE/gène FIPV S\* a été purifiée comme décrit dans l'exemple 10, mais en utilisant une sonde homologue FIPV S\*, et amplifiée pour donner le virus recombinant vFHV05.

**Exemple 15: Construction du plasmide donneur pPB116 et isolement de vFHV06 (figure n° 16)**

- Le plasmide pJCA091 (exemple 9, figure n° 10) a été digéré par *Apal* et *HindIII* pour isoler le fragment *Apal-HindIII* de 2244 pb (fragment A). Le plasmide
- 5 pPB110 (exemple 5, figure n° 3) a été digéré par *Apal* et *HindIII* pour isoler le fragment *Apal-HindIII* de 4256 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble pour donner le plasmide pPB116 (6508 pb). Ce plasmide contient la cassette d'expression (HCMV-IE/gène FIPV N/polyA SV40) dans le site FHV-1 ORF5.
- 10 Des cellules CRFK ont été transfectées avec un mélange de plasmide pPB116 (linéarisé par *PmeI*) et d'ADN viral de FHV-1 comme décrit dans l'exemple 10. Une plage virale positive pour la cassette HCMV-IE/gène FIPV N a été purifiée comme décrit dans l'exemple 10, mais en utilisant une sonde homologue FIPV N, et amplifiée pour donner le virus recombinant vFHV06.

**15 Exemple 16: Construction de plasmides donneurs pour l'insertion de cassettes d'expression dans le site ORF2 de FHV-1**

- Selon la même stratégie que celle décrite plus haut pour l'insertion de cassettes d'expression (gènes placés sous le contrôle des promoteurs HCMV-IE ou MCMV-IE ou double promoteur MCMV-IE/RNA 1.8 kpb) dans le site ORF2, il est
- 20 possible de construire des herpèsvirus félins recombinants exprimant à un niveau élevé des immunogènes du calicivirus félin (FCV), du virus de la panleucopénie féline (FPV), du virus de la leucémie féline (FeLV), du virus de l'immunodéficience féline (FIV), ou d'autres pathogènes félins, ou encore des cytokines félines.

**25 Exemple 17: Construction de plasmides donneurs pour l'insertion de cassettes d'expression dans le site ORF5 de FHV-1**

- Selon la même stratégie que celle décrite plus haut pour l'insertion de cassettes d'expression (gènes placés sous le contrôle des promoteurs HCMV-IE ou MCMV-IE ou double promoteur MCMV-IE/RNA 1.8 kpb) dans le site ORF5, il est
- 30 possible de construire des herpèsvirus félins recombinants exprimant à un

niveau élevé des immunogènes des virus FCV, FPV, FeLV, FIV, ou d'autres pathogènes félins, ou encore des cytokines félines.

**Exemple 18: Production de vaccins**

Pour produire un vaccin, les virus recombinants obtenus selon l'invention sont  
5 cultivés sur cellules CRFK. La récolte du virus recombinant se fait lorsque l'effet  
cytopathique est complet. Les cellules lysées et le surnageant de culture sont  
récoltés. Après clarification du lysat cellulaire pour éliminer les débris cellulaires,  
la solution virale est titrée. La solution virale est ensuite diluée dans une  
10 solution stabilisatrice pour la lyophilisation, répartie à raison d'une dose  
vaccinale ( $10^2$  DICC50 à  $10^7$  DICC50) par flacon, et enfin lyophilisée.

**REVENDICATIONS**

1 - Vaccin vivant recombinant comprenant, comme vecteur, un herpèsvirus félin comprenant et exprimant au moins une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide, cette séquence étant insérée dans les sites ORF5  
5 et/ou ORF2.

2 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que la ou les séquences nucléotidiques sont insérées dans les sites ORF5 et/ou ORF2 par insertion simple, ou après délétion totale ou partielle de ces  
10 sites.

3 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que la ou les séquences nucléotidiques sont insérées dans l'un des sites ORF5 ou ORF2, et qu'une délétion est réalisée dans l'autre de ces sites.

4 - Vaccin vivant recombinant selon l'une quelconque des revendications  
15 1 à 3, caractérisé en ce que, pour exprimer la séquence insérée, le vecteur comprend un promoteur eucaryote fort.

5 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 4, caractérisé en ce que le promoteur fort est un promoteur CMV immediate-early, de préférence le promoteur CMV immediate-early murin ou humain.

20 6 - Vaccin vivant recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux séquences nucléotidiques insérées dans le site ORF5 ou ORF2 sous le contrôle de promoteurs eucaryotes différents.

25 7 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 6, caractérisé en ce que les promoteurs eucaryotes sont des promoteurs CMV immediate-early d'origines animales différentes.

8 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comprend une première séquence nucléotidique associée au promoteur CMV immediate early et une autre séquence nucléotidique associée à un autre promoteur, les deux promoteurs ayant leurs extrémités 5' adjacentes.

5 9 - Vaccin vivant recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide antigénique, cette séquence étant insérée dans les sites ORF5 et/ou ORF2.

10 10 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide antigénique d'un agent pathogène félin, cette séquence étant insérée dans les sites ORF5 et/ou ORF2.

15 11 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence codant pour un antigène choisi parmi le groupe des antigènes du virus de la péritonite infectieuse féline, du virus de la leucémie féline, du virus de l'immunodéficience féline, du virus de la panleucopénie infectieuse féline et du calicivirus félin, cette séquence étant insérée dans les sites ORF5 et/ou ORF2.

20 12 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique, choisie parmi les séquences nucléotidiques codant pour les polypeptides M, S modifié ou N de FIPV, cette séquence étant insérée dans les sites ORF5 et/ou ORF2.

25 13 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence nucléotidique choisie parmi le groupe des séquences correspondant aux antigènes env, gag, pol du virus de la

leucémie féline, aux antigènes env, gag, pol du virus de l'immunodéficience féline, à l'antigène de capsid VP2 du virus de la panleucopénie infectieuse féline, à l'antigène de capsid du calicivirus félin, aux antigènes M, S modifié, N, 7b, polymérase du virus de la péritonite infectieuse féline.

5           14 - Vaccin vivant recombinant selon l'ensemble des revendications 8 et 12, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique insérée sous le contrôle du promoteur CMV immediate early est une séquence nucléotidique codant pour le polypeptide M, N ou S modifié du virus FIPV et en ce que la séquence  
10 nucléotidique insérée sous le contrôle du promoteur associé est une séquence nucléotidique codant pour un antigène d'une autre maladie féline.

15           15 - Vaccin vivant recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide immunomodulateur, cette séquence étant insérée dans les sites ORF5 et/ou ORF2.

15           16 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 15, caractérisé en ce que cette séquence nucléotidique est choisie parmi le groupe des séquences codant pour des cytokines.

20           17 - Formule de vaccin multivalent comprenant, en mélange ou à mélanger, au moins deux vaccins vivants recombinants tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 16, ces vaccins comprenant des séquences insérées différentes.

18 - Fragment d'ADN comprenant tout ou partie de la séquence définie par les positions 1 à 8193 sur la séquence SEQ ID N° 1.

19. Méthode de vaccination des chats dans laquelle on administre par voie parentérale ou locale une quantité efficace d'un vaccin ou formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 17.

5 20. Méthode selon la revendication 19, caractérisée en ce que l'on administre par voie oronasale.

21. Méthode selon la revendication 19 ou 20, caractérisée en ce que l'on administre une dose vaccinale de  $10^2$  DICC50 à  $10^7$  DICC50.

10 22. Méthode selon l'une quelconque des revendications 19 à 21, caractérisée en ce que l'on administre le vaccin une seule fois.

## PstI

1 CTGCAGAATTTCAACAAAAAACTGTCTAAGGAATGTACAAAGGGTGTGCTTCCCCTTTTGAAG  
 1▶ LeuGlnAsnPheAsnLysLysLeuSerLysGluCysThrLysGlyValLeuProLeuLeuLys  
 64 CTACTCGATCCCATGACAATAGCCATCAACAGCGACACAGACCGTCCCCTGGTGTATGTATA  
 22▶ LeuLeuAspProMetThrIleAlaIleAsnSerAspThrAspArgProThrGlyValCysIle  
 127 TACGTAGAACCCTGGCATGCCGATATCAGATCGATATTAAATATGCGGGGAATGCTCGCATCG  
 43▶ TyrValGluProTrpHisAlaAspIleArgSerIleLeuAsnMetArgGlyMetLeuAlaSer  
 190 GATGAAAACCTCCAGATGTGATAATATATTTAGCTGTTTATGGACCCCGGACCTATTCTTCGAT  
 64▶ AspGluAsnSerArgCysAspAsnIlePheSerCysLeuTrpThrProAspLeuPhePheAsp  
 253 AGGTATCAACGGCACCTAGGCGGAGAGGTAAATGTCATTTGGACTCTATTTGATGATGCCGCA  
 85▶ ArgTyrGlnArgHisLeuGlyGlyGluValAsnValIleTrpThrLeuPheAspAspAlaAla  
 316 TCCCATCTTTTCGAAGCTTTATGGAAAGGAATTTAATGAGGAATATGAACGTCTGGAGGCGGCT  
 106▶ SerHisLeuSerLysLeuTyrGlyLysGluPheAsnGluGluTyrGluArgLeuGluAlaAla  
 379 GGTATGGGTGTTGACAGCCTGCCTATTCAAGAGATGGCCTATCTTATTGTGAGAAGTGCAATA  
 127▶ GlyMetGlyValAspSerLeuProIleGlnGluMetAlaTyrLeuIleValArgSerAlaIle  
 442 ATGACCGGGAGTCCCTTCTTAATGTTCAAGGACGCGTGTAACGTGCACTATCACTTCGATACA  
 148▶ MetThrGlySerProPheLeuMetPheLysAspAlaCysAsnValHisTyrHisPheAspThr  
 505 CGTGGGGATGCGCTCACAAACATCAAACCTATGTACTGAAATCATTGAGAAGGCTACAGACACT  
 169▶ ArgGlyAspAlaLeuThrThrSerAsnLeuCysThrGluIleIleGlnLysAlaThrAspThr  
 568 AAACATGGCGTTTGTAACTTGATAAGTATAAATCTACCGCAATGTTTACGCGCATCGGCTCAT  
 190▶ LysHisGlyValCysAsnLeuIleSerIleAsnLeuProGlnCysLeuArgAlaSerAlaHis  
 631 GATCAGAGCTTGTATTTTCAGTATCCCATTAATCATTTCGCGCAGCATATACCGCTACGATATT  
 211▶ AspGlnSerLeuTyrPheSerIleProLeuLeuIleArgAlaAlaTyrThrAlaThrIlePhe  
 694 GTCAACGCAATGATGCGTGCTGGAAATTTCCCCACAGAAGCGGCCATGCGGGGTGTAGAAGAA  
 232▶ ValAsnAlaMetMetArgAlaGlyAsnPheProThrGluAlaAlaMetArgGlyValGluGlu  
 757 AATCGCTCTCTTGGATTGGGTATACAGGGGCTCCATACCACGTTTTTTGGCCCTAGAGATGGAT  
 253▶ AsnArgSerLeuGlyLeuGlyIleGlnGlyLeuHisThrThrPheLeuAlaLeuGluMetAsp  
 820 ATGGTTTCTTATGAAGCCCGTCGCTTAAACCGCCAAATTTTAGAGAGTCTGCTCCTGGGAGCA  
 274▶ MetValSerTyrGluAlaArgArgLeuAsnArgGlnIleLeuGluSerLeuLeuLeuGlyAla

## HindIII

883 ATCCACGCTAGCACATCCCTATGCAAGCTTGGTATGACACCATTTAAAAACTTCAGAGAGAGT  
 295▶ IleHisAlaSerThrSerLeuCysLysLeuGlyMetThrProPheLysAsnPheArgGluSer  
 946 ATCTATGGACGTGGTTTATTACCCTTTGATGCATACCCAAACACCCCCCTTATACATTTTAAA  
 316▶ IleTyrGlyArgGlyLeuLeuProPheAspAlaTyrProAsnThrProLeuIleHisPheLys  
 1009 AAATGGCAGCAATTGAGAGTAGTTATGATGAAATACGGACTTTACAATTCTCAATTTGTAGCA  
 337▶ LysTrpGlnGlnLeuArgValValMetMetLysTyrGlyLeuTyrAsnSerGlnPheValAla  
 1072 TTAATGCCAACGGTGTCCCTCGTCCCAGGTCACTGAGAGTAGCGAGGGGTTCTCTCCAATTTT  
 358▶ LeuMetProThrValSerSerSerGlnValThrGluSerSerGluGlyPheSerProIlePhe  
 1135 ACTAATCTGTTTAGTAAAGTCACTAGTACCGGGGAGATCTTACGACCAAACCTTACAGTTGATG  
 379▶ ThrAsnLeuPheSerLysValThrSerThrGlyGluIleLeuArgProAsnLeuGlnLeuMet  
 1198 CGGACGATACGACGCCTATTTCCCAGGGAATGCGCGCGTCTCTCTGTTATATCAACCCTGGAA  
 400▶ ArgThrIleArgArgLeuPheProArgGluCysAlaArgLeuSerValIleSerThrLeuGlu  
 1261 GCTGCCCAATGGTCCATACGTGGTGCATTCGGGGATCTCGGGGATTATCACCCCTAGCAAAA  
 421▶ AlaAlaGlnTrpSerIleArgGlyAlaPheGlyAspLeuGlyAspTyrHisProLeuAlaLys  
 1324 TTCAAACCGCATTCGAATATGATCAACGACAGTTGATAGATATGTGTGCGGACAGGGCCCCC  
 442▶ PheLysThrAlaPheGluTyrAspGlnArgGlnLeuIleAspMetCysAlaAspArgAlaPro  
 1387 TTTGTAGATCAAAGCCAGTCCATGTCTCTGTTTATCTCTGAACCGGCTGATGGCAAATTACCC  
 463▶ PheValAspGlnSerGlnSerMetSerLeuPheIleSerGluProAlaAspGlyLysLeuPro  
 1450 GCCTCTAGGATTATGAACCTCCTTGTACATGCATATAAATGTGGACTGAAGACCGGTATGTAT  
 484▶ AlaSerArgIleMetAsnLeuLeuValHisAlaTyrLysCysGlyLeuLysThrGlyMetTyr  
 1513 TATTGTAAGCTCAAAAAGGCTACCAACAGTGGTGTCTTCTCCGGAGGCGAACTCATTTGTACT  
 505▶ TyrCysLysLeuLysLysAlaThrAsnSerGlyValPheSerGlyGlyGluLeuIleCysThr  
 1576 AGTTGCCACCTTTAAACGATTGTATATCATGTCTGCTAACGGATCTACCCCAATACCGGTCTCCACTCAA  
 526▶ SerCysHisLeu...

Figure 1

1648 TACCAAATGCCGGTATCCATAGACTCTGATTGTAGCGCCTCGCGATACTTTTACACCCTGGAA  
 1▶MetProValSerIleAspSerAspCysSerAlaSerArgTyrPheTyrThrLeuGlu

1712 TGTCCAGATATAAACATGTTGCGGTCTCTCAGTATCGCGAATAGGTGGTTAGAAACCGATTTG  
 20▶CysProAspIleAsnMetLeuArgSerLeuSerIleAlaAsnArgTrpLeuGluThrAspLeu

1775 CCAATCGGTGATGATATAAAGGACATTACTACACTATCCGAATCGGAGTTGGACTTTTATCGT  
 41▶ProIleGlyAspAspIleLysAspIleThrThrLeuSerGluSerGluLeuAspPheTyrArg

SacII

1838 TTTCTATTTACATTTCTATCTGCCGCGGACGATCTGGTTAACCTGAATCTCGGCAATCTATCT  
 62▶PheLeuPheThrPheLeuSerAlaAlaAspAspLeuValAsnLeuAsnLeuGlyAsnLeuSer

1901 GAGCTCTTCACCCAAAAAGATATTTTACATTATTACATTGAACAGGAATGTATAGAGGTCGTC  
 83▶GluLeuPheThrGlnLysAspIleLeuHisTyrTyrIleGluGlnGluCysIleGluValVal

1964 CATTCGCGTGAATATAGCGCAATAACAACCTCCTTTTTTAAATGTGATGCGGAGGCGCGTACG  
 104▶HisSerArgGluTyrSerAlaIleGlnLeuLeuLeuPheLysCysAspAlaGluAlaArgThr

2027 GCCTATGTGGATTCTATGATTACAAAGCCGGAGCTTGCGAGGAAGGTTGAATGCGTCCGCACG  
 125▶AlaTyrValAspSerMetIleThrLysProGluLeuAlaArgLysValGluCysValArgThr

2090 CGAATTGGTGAATGTGAATCCATAGCCGAGAAGGATATTCTCATGATCTTAATAGAAGGTATC  
 146▶ArgIleGlyGluCysGluSerIleAlaGluLysAspIleLeuMetIleLeuIleGluGlyIle

2153 TTTTTTGTTCATCCTTCGCTGCTATAGCTTATCTGAGAACCCACAACATATTCATCGTAACT  
 167▶PhePheValAlaSerPheAlaAlaIleAlaTyrLeuArgThrHisAsnIlePheIleValThr

2216 TGTCAAACCAACGATCTTATCAGCCGCGATGAGGCCATACATAACAACGCATCCTGCTGTATC  
 188▶CysGlnThrAsnAspLeuIleSerArgAspGluAlaIleHisThrAsnAlaSerCysCysIle

2279 TACAACAACCTACCTCCCGGCTCAAATTAACCATCCACGGAGAGGATTCACTCGTTATTTCTGA  
 209▶TyrAsnAsnTyrLeuProAlaGlnIleLysProSerThrGluArgIleHisSerLeuPheArg

PstI

2342 GAGGCTGTGGAACCTTGAGTGTGAGTTTATCTCAACATGCGCTCCGCGCTGCAGTAATCTACTC  
 230▶GluAlaValGluLeuGluCysGluPheIleSerThrCysAlaProArgCysSerAsnLeuLeu

2405 AACGTGGCGGATATTTGTAATTATGTTTCGGTATAGTGCGGACCGGTTGCTCGGTATTATCAAA  
 251▶AsnValAlaAspIleCysAsnTyrValArgTyrSerAlaAspArgLeuLeuGlyIleIleLys

2468 GTGGCTCCTATTTTCAACGTCCCGCCTCCTCATCCCGATTTTCCCTTAGCCTTTATGGTAATT  
 272▶ValAlaProIlePheAsnValProProProHisProAspPheProLeuAlaPheMetValIle

2531 GAAAAACATACCAATTTTTTCGAGAGACATAGCACTACATACAGTGGCACTGTTATCAATGAT  
 293▶GluLysHisThrAsnPhePheGluArgHisSerThrThrTyrSerGlyThrValIleAsnAsp

2594 CTATAACAATGTCTTAATAATAAATTTAATTTAAGCTAACGTGTATCTGGATTCTGCCCTTTTTTTCAAAAA  
 314▶Leu...

2667 TAACTACACATGAGTCATTAGTAGCGTTCAACCGGTCTGTTTCCCGATAACATCCACTGGTTCTTTAGTTATA  
 455▶...AsnTyr

2739 ACGCCGTCGCGAATCACAATCATCCCAATAGGTAACCAGAACAACATAATAGTCGGGCGGGGT  
 452▶ArgArgArgSerAspCysAspAspTrpTyrThrValLeuValValTyrTyrAspProProThr

2802 TGAGATATGCTTCCAGAATAAGTTAGTTATATGTTTGGCATTGGCGGCATCCCCTATAAAATG  
 431▶SerIleHisLysTrpPheLeuAsnThrIleHisLysAlaAsnAlaAlaAspGlyIlePheHis

2865 TTTTAGTGTTCGAACACCAGGTTAAAATTAGCCTTCTCTTGGAGGATGGGAACGCGCTTTAA  
 410▶LysLeuThrGluPheValLeuAsnPheAsnAlaLysGluGlnLeuIleProValArgLysLeu

2928 TATTGATAAGCGACCCCTTGTCTCCGGGGTCATTCTAGCGATAAGGTGTTTGATAAATTTCCG  
 389▶IleSerLeuArgGlyArgThrGluProThrMetArgAlaIleLeuHisLysIlePheLysArg

2991 CTCGAGGACCATCATGTTTTGTCTGTGGCGGGGGTAAAAATGAGAGAGTCTGTGACGCGGTTT  
 368▶GluLeuValMetMetAsnGlnArgHisArgProTyrPheHisSerLeuArgHisArgProLys

3054 CATTATCGGTGGGTATCGAGATGTGTATTTTAGAGTCAGACTCTGCTCTTCTATCATGGTCAG  
 347▶MetIleProProTyrArgSerThrTyrLysLeuThrLeuSerGlnGluGluIleMetThrLeu

3117 CTGTTTAGACGATCCACGAATTTGAGATGGGCTGATCCTATATGTGTCTGTGGACATACATTC  
 326▶GlnLysSerSerGlyArgIleGlnSerProSerIleArgTyrThrAspThrSerMetCysGlu

3180 AATATCCCGTTCTTCTGACGATGAAGCATCACTGCTGGTATCCCGGCATATACTAGTAGAGGA  
 305▶IleAspArgGluGluSerSerSerAlaAspSerSerThrAspArgCysIleSerThrSerSer

Figure 1

3243 TTTTAGATTAATTACCTTTTCTTTTACCTTAGTTTTGCTCTGATGTCGTTGATTAGATCGTAG  
 284 **◀**LysLeuAsnIleValLysGluLysValLysThrLysSerGlnHisArgGlnAsnSerArgLeu  
 3306 ATTTTGTACGGATTTTAATATAGGTGTCTGGTGTAGATCTGTATGACAGCGAACAAATCGCGC  
 263 **◀**AsnGlnValSerLysLeuIleProThrGlnHisLeuAspThrHisCysArgValPheArgAla  
 EcoRI  
 3369 CACGAATTCGAGTATGTCAGATTAAGCGACGCAAGGACGTCCCTACATCGTATTGTTGGTGG  
 242 **◀**ValPheGluSerTyrThrLeuAsnLeuSerAlaLeuValAspArgCysArgIleThrProPro  
 3432 GAAAAGTGAATTATATCTAATATAATATCACACCCCATTAATATAAGATCGGTATCGGTTGT  
 221 **◀**PheLeuProIleIleAspLeuIleIleAspCysGlyMetLeuIleLeuAspThrAspThrThr  
 3495 ATAGATCTGCGCGACCGTATTTGTATGATATAGATTAGCACATACATCATCAGCCTCCATATC  
 200 **◀**TyrIleGlnAlaValThrAsnThrHisTyrLeuAsnAlaCysValAspAspAlaGluMetAsp  
 3558 ACTGACATTTACATATGGGTACCCTAGATAGCGGATGAGGTTTACACATAATCTATAACATAA  
 179 **◀**SerValAsnValTyrProTyrGlyLeuTyrArgIleLeuAsnValCysLeuArgTyrCysLeu  
 3621 ACGTGGGGTATAAGCTAATGAACTCCATCTCGCTGATATACGTTCTTGGATATCTACTTTGCA  
 158 **◀**ArgProThrTyrAlaLeuSerSerTrpArgAlaSerIleArgGluGlnIleAspValLysCys  
 3684 ATCTTTCGGGTTTCCACCATCTGGTTCCGAAGTATCTTCACACGGCCCTCCATGTGGAATGGA  
 137 **◀**AspLysProAsnGlyGlyAspProGluSerThrAspGluCysProGlyGlyHisProIleSer  
 3747 AAATTCCCCAAGCGTCCAGATCCACCCTGTAAACACATCGTCTGTGTCACTATAGCCTTGGC  
 116 **◀**PheGluGlyLeuArgGlySerGlyGlyGlnLeuCysMetThrGlnThrValIleAlaLysAla  
 3810 TCCATATTTTACCTGTCCATCACCATAGATACCTCTATCCGAAACGAAGATCGGAAAGTATGA  
 95 **◀**GlyTyrLysValGlnGlyAspGlyTyrIleGlyArgAspSerValPheIleProPheTyrSer  
 3873 TCGCTTCTGTAACAGTTTAAGAAGCGAAAAGAAACACTCGGCAGTCACCGTTGCATTATCACT  
 74 **◀**ArgLysGlnLeuLeuLysLeuLeuSerPhePheCysGluAlaThrValThrAlaAsnAspSer  
 3936 TGTATATCTTTCTCTGGAAAGAATTTCTCCATAAGTGTGTACATAACATTCCATAAATCTAT  
 53 **◀**ThrTyrArgGluArgSerLeuIleGluGlyMetLeuThrTyrMetValAsnTrpLeuAspIle  
 3999 AGCGATGGGTGTATAAATAACCAGGTGGTGTAGTGATGGCATCATGTTTTACCAAACGGTTGCA  
 32 **◀**AlaIleProThrTyrIleGlyProProThrThrIleAlaAspHisLysValLeuArgAsnCys  
 4062 GTAGGCGTATTTTAACATCCCAAATAAGCCATTCTGACACTATTGATTATATCTCGTTTCTAGAGCA  
 11 **◀**TyrAlaTyrLysLeuMetGlyPheLeuGlyMet  
 4131 GAGTCGTATTAATTGGCGAGGTAAACAATCGCTCCGGTGAAGGCAGTTCCCCAACTAGATTAACCCCTAGTTGA  
 4205 TTATGGACATTATAATGCGCTGGGTGGCGGAATCATCGCCGCACCCCAACTCAAAGCACGACCAAATATGAGCGG  
 4279 GTCTGTGGAACCTCAAATCCTATTGGTGTATCATGAACAATAAAAATGAAACCAAATAACATGGTAGATAATTA  
 4353 ATCCTCTCCCCACTCTGGCGTCATAGCGCGGCGGTGAAGCCTATAAAGAATACAGGTGCGAGGAAATTGTCTT  
 4427 ACTTTTCCCTTTGTGAGTTTTAATTTGTGTGTA AAAACTAGCTCTCTACGATGGCATTTCACCGTTCGAGA  
 1 **▶**MetAlaPheProProSerArg  
 4497 TTAGAGGTTGGAATAAATAAAGCTATTAACCATCCGGCACAAGTTGTCCACGCGGGACCTCTT  
 8 **▶**LeuGluValGlyIleAsnLysAlaIleAsnHisProAlaGlnValValHisAlaGlyProLeu  
 4560 CCCGGTGGTGTGCAATCTAACACTATCTTCGGAAACGCTGTCTCTCGAAGAAGACAAGCTACGC  
 29 **▶**ProGlyGlyValGluSerAsnThrIlePheGlyAsnAlaValLeuGluGluAspLysLeuArg  
 4623 GAGGTAATGACCATATTGACACCGATATCGACCAGTCTTAAAAACTCATTTTTGGTTTTTTAGT  
 50 **▶**GluValMetThrIleLeuThrProIleSerThrSerLeuLysAsnSerPheLeuValPheSer  
 4686 GCCGATGGGATGTTGATTCATACGAGTGTATGTCACGAACAGATATATATACCAATATCAAAG  
 71 **▶**AlaAspGlyMetLeuIleHisThrSerValCysHisGluGlnIleTyrIleProIleSerLys  
 4749 AATCAGTTTTTCATCATATAGATGGACATATGGACAGCCTGCGGTATTTTTAGCGAATATGCAC  
 92 **▶**AsnGlnPheSerSerTyrArgTrpThrTyrGlyGlnProAlaValPheLeuAlaAsnMetHis  
 4812 GGACGTCGTAGCTTGTGGACGTATTTAAA ACTACTGGGAGAAAAAGTGCAACCAAGAAGGTA  
 113 **▶**GlyArgArgSerLeuLeuAspValPheLysThrThrGlyArgLysSerAlaThrLysLysVal  
 4875 ATTTTCGAGATAACTAATGTTTCATCCGGGTAGAATGTTAAACCAAGTAGTTTTTAACTTAGAC  
 134 **▶**IlePheGluIleThrAsnValHisProGlyArgMetLeuAsnGlnValValPheAsnLeuAsp  
 4938 CTCGATGGTGGACTATCTTCTTCACTTATAAAAATCAGAATTTAATAATTATTGTGTTATG  
 155 **▶**LeuAspGlyGlyLeuSerSerSerGlnLeuIleLysSerGluPheAsnAsnTyrCysValMet  
 5001 TTACCCACGAGAGTACCCGATTTGACGCTTGAGTTTTCAAACCTCAACTAAACAAAATATTG  
 176 **▶**LeuProThrArgValProAspLeuThrLeuGluPheSerLysProGlnLeuAsnLysIleLeu

Figure 1

## SpeI

5064 GACCTTGGAAAACGCATAAAATCTACACTAGTGTTTGAATCTACGGTGAGAGAAACCATCAAT  
 197▶ AspLeuGlyLysArgIleLysSerThrLeuValPheGluSerThrValArgGluThrIleAsn  
 5127 ATTATATCCGACGTCGGGAGAGTAACATTTACCACGACTCATGAATCGGCTGATGGAAATCAA  
 218▶ IleIleSerAspValGlyArgValThrPheThrThrThrHisGluSerAlaAspGlyAsnGln  
 5190 GATAGCCGCTGTATTTTACGCAGTCTCCCAAGGTCCCACATACTTGGTAATGTATCATCAACC  
 239▶ AspSerArgCysIleLeuArgSerLeuProArgSerHisIleLeuGlyAsnValSerSerThr  
 5253 GTTAATTTCTCTGGGGTTTTGAAACCCTTCCGCCTAGCTTTGGAATCCCCCGTAAACTTTTTT  
 260▶ ValAsnPheSerGlyValLeuLysProPheArgLeuAlaLeuGluSerProValAsnPhePhe  
 5316 CAACTTCTTCGTAAATTGAAACTTACACATACCGACGTCAGCCTCAATTTCTTCTTCACTCCA  
 281▶ GlnLeuLeuArgLysLeuLysLeuThrHisThrAspValSerLeuAsnPhePhePheThrPro  
 5379 AGTACTACACCCATGTTAAGTCTGACTACCAGAAAACCCGTTGGTGTAAATGATGTTTTTCTTC  
 302▶ SerThrThrProMetLeuSerLeuThrThrArgLysProValGlyValMetMetPhePhePhe  
 5442 TGTACCACGGAATGTCTAGGATCATCCGAGTCAATTAAAACCGGGGATATGGATGATCCCTCG  
 323▶ CysThrThrGluCysLeuGlySerSerGluSerIleLysThrGlyAspMetAspAspProSer  
 5505 ACAACCGAGGAGGAAAGTATCCCCAGGTTAAAGCGGCGAGTGTTAGAAGAGTCCGTGATTCT  
 344▶ ThrThrGluGluGluSerIleProArgLeuLysArgArgValLeuGluGluPheArgAspSer  
 5568 GAAGGACCCAGTAAAAAACTTTGTACTTTTGTTTACTCATCTCCACTATGCAACCCGAATCCT  
 365▶ GluGlyProSerLysLysLeuCysThrPheValTyrSerSerProLeuCysAsnProAsnPro  
 5631 GGTACACGGGGAGAAAACCCATCTGATATTTAGATGTAAATAGCCAATACCACAGATCGTTCGCCTGTA  
 386▶ GlyThrArgGlyGluAsnProSerAspIle...  
 5700 TACTTGATCCCCATTTATGTTAAATAAAGTATTTTTAATGTAATATATGTGTAGTTTCGTTTATTCATAAACG  
 5774 CTAGTTAGATATCTCCACCCACATTTTCTGGTATTTGTAATAAAAATTGAGCCAGGCGAAAGAAAGTCAGTAA

## SacI

5848 GTCGCCAGCCAGACTTCGGGTATGGCCACCGATGACTGTACGTCTCCAATAATGCAGCTGGGAGC  
 1▶ MetAlaThrAspAspCysThrSerProThrAsnAlaAlaGlySer  
 5914 TCAACAACCAACAATAACGGTCTCGCTCCAGAAGGGATATCGGATATAACTACTACCCTCATT  
 16▶ SerThrThrAsnAsnAsnGlyLeuAlaProGluGlyIleSerAspIleThrLeuProSerPhe  
 5977 ACTGTGAGGAAGTCTCGGGATCGAGGACTGGATGTATCGCATGTGTGTACACGGCAACTAAA  
 37▶ ThrValArgAsnCysSerGlySerArgThrGlyCysIleAlaCysValTyrThrAlaThrLys  
 6040 GCGTTATGTTATATAGGGGTCCAATCTGGAATTTTAAACAGCATCGATCGCTCTCATTGCTC  
 58▶ AlaLeuCysTyrIleGlyValGlnSerGlyIleLeuThrAlaSerIleAlaLeuIleTrpLeu  
 6103 CTAACACGTACAACAACATATGCAGCCGGAATCCTTATATTTATAAGTCTAATATCCACAATG  
 79▶ LeuThrArgThrThrThrTyrAlaAlaGlyIleLeuIlePheIleSerLeuIleSerThrMet  
 6166 AGGCTCTCTATGGTAAAAACTGAACGTATCACAACATATGCCGCTTTACTCAGACCCTCTGT  
 100▶ ArgLeuSerMetValLysThrGluArgIleThrThrIleCysArgPheThrGlnThrLeuCys  
 6229 GTGGCCATAGCGGCAGTTGGATGGGCGTGTGATGATTTGTTACAACCAGTTGGATTTACCCCT  
 121▶ ValAlaIleAlaAlaValGlyTrpAlaCysAspAspLeuLeuGlnProValGlyPheThrPro  
 6292 CTTCTACTCCTATGTCTAGCAGGAATCGCTGTATGTGCTGCGATCATAACATGTGTTTTACTTC  
 142▶ LeuLeuLeuLeuCysLeuAlaGlyIleAlaValCysAlaAlaIleIleHisValPheTyrPhe  
 6355 ATCTGCACAGCCAATGGATCGGGAACACATTTTCGTATGGCCATCGTTACCATGACCCTCGGT  
 163▶ IleCysThrAlaAsnGlySerGlyThrHisPheArgMetAlaIleValThrMetThrLeuGly  
 6418 GCGCTGTTGGGAGTATCGAGTATCGCCGTGACTGTGAAATCTGAAATTCTCATCGGCCCTCGGT  
 184▶ AlaLeuLeuGlyValSerSerIleAlaValThrValLysSerGluIleLeuIleGlyLeuGly  
 6481 ATTGCATGCTCGATTATTGTCTCCAGCGAGACTTTGGAATGATACTTAGAGACACATGTCAT  
 205▶ IleAlaCysSerIleIleValSerGlnArgAspPheGlyMetIleLeuArgAspThrCysHis  
 6544 TACAGATTAGGTCGTTATTCGTTAATGCGCACTTTTACGGATTTGGGGCGTGGTGCTAACCAT  
 226▶ TyrArgLeuGlyArgTyrSerLeuMetArgThrPheThrAspLeuGlyArgGlyAlaAsnHis

## Sall

6607 AATCCAGTCGACTTTATCGTACCCAACATCGAGGATGTCTACGAGGACAAGATTAGCAGCGTT  
 247▶ AsnProValAspPheIleValProAsnIleGluAspValTyrGluAspLysIleSerSerVal  
 6670 AAAATTTTTCGAGAACACCCCACTTTGATTATGGCCCCGTTGATAGGGCTAACCCCTCACCCCT  
 268▶ LysIlePheArgGluHisProThrLeuIleMetAlaProLeuIleGlyLeuThrLeuThrPro

Figure 1



8547 CCACGGGACGGGATATCCTTGATGTGGAAAATTGGTAACTACCATCTACCAAAGCAATGAGT  
 367▶ **ProArgAspGlyIleSerLeuMetTrpLysIleGlyAsnTyrHisLeuProLysAlaMetSer**

8610 GCTGATATACTGATCACAGGTCCGTGTATAGAACGTCCAGGTTTGGTCAACATTCAGAGTATG  
 388▶ **AlaAspIleLeuIleThrGlyProCysIleGluArgProGlyLeuValAsnIleGlnSerMet**

8673 TGTGATATATCAGAAACGGATGGACCCGTGAGTTATACCTGTCAGACCATCGGATACCCACCA  
 409▶ **CysAspIleSerGluThrAspGlyProValSerTyrThrCysGlnThrIleGlyTyrProPro**

8736 ATTCTACCGGGATTTTACGACACACAAGTCTACGACGCGTCCCCTGAAATCGTCAGTGAATCA  
 430▶ **IleLeuProGlyPheTyrAspThrGlnValTyrAspAlaSerProGluIleValSerGluSer**

8799 ATGTTGGTTAGTGTCTGTTGCTGTAATACTAGGAGCTGTTCTCATCACAGTCTTTATCTTTATT  
 451▶ **MetLeuValSerValValAlaValIleLeuGlyAlaValLeuIleThrValPheIlePheIle**

8862 ACGGCATTATGTTTATATTATTCTCATCCCCGGCGATTATAACTCTTATAGTTCGTATAAATTACTT  
 472▶ **ThrAlaLeuCysLeuTyrTyrSerHisProArgArgLeu...**

8929 ATCATAACCGTGTTCAGCGGTTATATTTTATAACAGTTAATTGTTTACTAATAGTTTACAAAGTCCATCGTT  
 9003 TATAAAAAACAAGCCCAGTGGTATTATAATCATTTCGTATGGATATAAACCGACTCCAATCCGTGATCTTTGGTA

SpeI

9077 ACCCGCGACGTAATTACTCTCACACATTTAACTAGTCTACGATCACCCAGATATAATAAAAAGATTTCGCGTGG  
 9151 ACATGCAAGGTATGAGGTCTACGTCACAGCCGTTGGTTCGAGATACCACTGGTAGATATGGAACC  
 1▶ **MetGlnGlyMetArgSerThrSerGlnProLeuValGluIleProLeuValAspMetGluPr**

9215 ACAGCCATCTATACTCCAACGAGCCTAACCACCGAATAAAATGTTGACGACAGCTATTTTC  
 21▶ **oGlnProSerIleHisSerAsnGluProAsnProProAsnLysMetLeuThrThrAlaIleSe**

9278 ATCGCGTAGGAGTGGAAATTTTTTTTATTTTCTCTGGGTATGTTTTTTTTTCGGAGTTATCCTAAC  
 42▶ **rSerArgArgSerGlyIlePheLeuPheSerLeuGlyMetPhePhePheGlyValIleLeuTh**

9341 AGCTACTATTATAGTATGTACATTCATATTTACAATACCAGTGGATATGCTCCAGATGCCACG  
 63▶ **rAlaThrIleIleValCysThrPheIlePheThrIleProValAspMetLeuGlnMetProAr**

9404 CTGCCCTGAGGAAACGGTGGGTATCAAAAACCTGTTGTATCCGACCGATTAGACGCCATGTTAA  
 84▶ **gCysProGluGluThrValGlyIleLysAsnCysCysIleArgProIleArgArgHisValLy**

9467 ATCACACCAAGATCTAGTTGCCACATGTGCCGAATACATGGAACAACCCGCCACCGCATCTGC  
 105▶ **sSerHisGlnAspLeuValAlaThrCysAlaGluTyrMetGluGlnProAlaThrAlaSerAl**

9530 TGTTGGAGCGCTTATAACCATTATTGGACATCTTCAATGGAGATGGGATATCTACAAACGACTC  
 126▶ **aValGlyAlaLeuIleProLeuLeuAspIlePheAsnGlyAspGlyIleSerThrAsnAspSe**

9593 TCTTTACGATTGTATTCTCTCTGATGAAAAAAATCGTGTAATACATCAATGGCCGTATGTCA  
 147▶ **rLeuTyrAspCysIleLeuSerAspGluLysLysSerCysAsnThrSerMetAlaValCysGl**

9656 ATCAACATATCTTCAAATCCCCTAAGTGACTTTATTATGCGCGTTAGGCAGATATTTTCTGG  
 168▶ **nSerThrTyrLeuProAsnProLeuSerAspPheIleMetArgValArgGlnIlePheSerGl**

9719 AATCCTAAATCATTAAATCCATTTACTAAATAAATAACAATACCGTTTAGGTAATTAACATGATTCTAGT  
 189▶ **yIleLeuAsnHis...**

9790 GTTTATTGTCGTATGTACGGGCGATGGGTGGATAACAACCTCGACAATGATCAATTATATTGATTAACCTTGTA  
 9864 TAAATTCGTCCGATTATTGGATATATCGAGATGATATCACATTATTTTCTAATAGCGTGTGTTTGAAAG  
 299▶ **...LysArgIleAlaHisThrGlnPheA**

SpeI

9933 TCCACCCTACTAGTGCCATGTGCGCGTTTGATCGAAGAGGCATTTAATGTTGCCAGAGTTTCA  
 289▶ **spValArgSerThrGlyHisAlaArgLysIleSerSerAlaAsnLeuThrAlaLeuThrGluI**

9996 ATTCCGTATGTATCGTCGAGTAATCTAGACCGTGGGCGAAATCTTTCTACTACTTCTTCAATC  
 268▶ **leGlyTyrThrAspAspLeuLeuArgSerArgProArgPheArgGluValValGluGluIleG**

10059 CCAGGCGAGGATGATCGTCTGCGTGGGAGGTTTTTCTTTACATCACCATTCGTTATATAAT  
 247▶ **lyProSerSerSerArgArgArgProLeuAsnLysLysValAspGlyCysGluAsnTyrLeuG**

SmaI

10122 TCGGGATAATCACCTTTAGGTCCCCCGGGCTTGGAACATTGACACTTTTTTATGACAAATCGGT  
 226▶ **luProTyrAspGlyLysProGlyGlyProLysSerCysGlnCysLysLysHisCysIleProT**

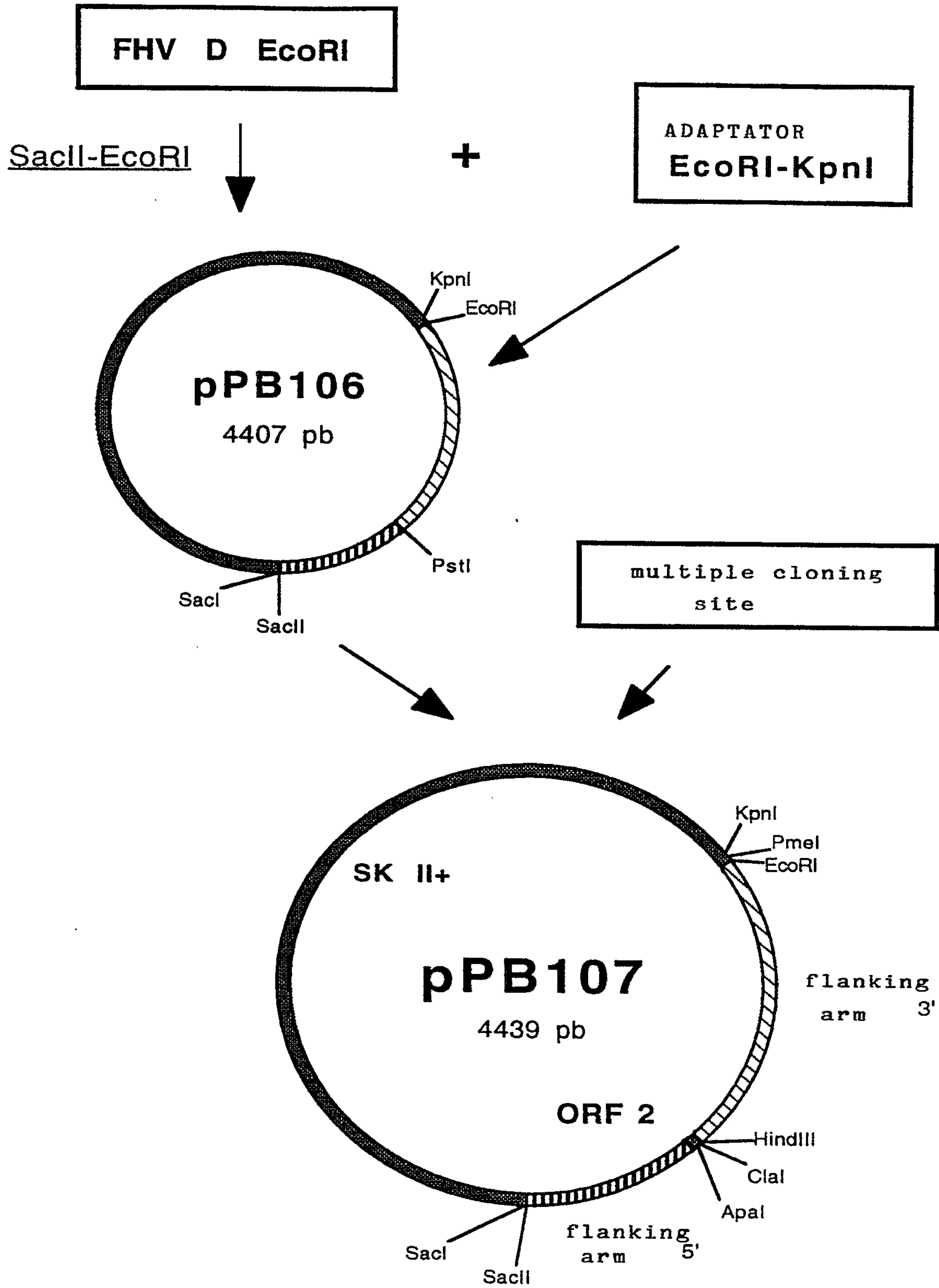
10185 GTCTGGTAATGCTCCGTATATTGGAGCTGTGAGGTAGTTCCAGACGCGGACGATCCTCTGGAC  
 205▶ **hrGlnTyrHisGluThrTyrGlnLeuGlnSerThrThrGlySerAlaSerSerGlyArgSerG**

XhoI

10248 TGCGCGGTATCTTCAGGGGAAATACAACGAGGGTGTGGTAATGAGTCTGGTATGCATCTCGA  
 184▶ **lnAlaThrAspGluProSerIleCysArgProHisGlnTyrHisThrGlnTyrAlaAspArgP**

Figure 1

10311 GGTTTCATCTCCATTACTGAGATTCGAGGAATTAAAAGTTTCAGTGAGACCGTAGGACGGATTA  
 163 ← roGluAspGlyAsnSerLeuAsnSerSerAsnPheThrGluThrLeuGlyTyrSerProAsnA  
 10374 TTAATATGATCTTCCGACTCTTCGGGTCGGATGTCATCTAAACTGGTATAGGGTGTTCCGTCA  
 142 ← snIleHisAspGluSerGluGluProArgIleAspAspLeuSerThrTyrProThrGlyAspC  
 10437 CAGTCCGAGGAATCAAACGATCATCGAGTTGTTTTGTGCGCGCATCCGATCTCAAGGGCGTT  
 121 ← ysAspSerSerAspPheArgAspAspLeuGlnLysThrArgAlaAspSerArgLeuProThra  
 10500 CTATGGAAGCACCCCTCTACCCCGTCTGGGGTATTAGAAGGGTGGTCTCCAAGACCTGGGGAG  
 100 ← rgHisPheCysGlyGluValGlyAspProThrAsnSerProHisAspGlyLeuGlyProSers  
 10563 GATATATCCCGAGGGGTTAGTGGGGAGGCTAAGAGTGATGCCATACCCATATATGGGTTTGGG  
 79 ← erIleAspArgProThrLeuProSerAlaLeuLeuSerAlaMetGlyMetTyrProAsnProP  
 10626 GGGGTGATGACAGCTGGTGGGTAGGTAACATCATGATGAGCGTGTGGAGTGGGTGGGGATGGT  
 58 ← roThrIleValAlaProProTyrThrValAspHisHisAlaHisProThrProProSerProL  
 10689 AGTGGGAGGCTCTGCCGATCTATGTGTGTCATCATCTGTGATACACACCGCCTCTCAGTTTTC  
 37 ← euProLeuSerGlnArgAspIleHisThrMetMetGlnSerValCysArgArgGluThrLysA  
EcoRI  
 10752 GCCCTCTCCCGGGTGGATCTCCGTCTTCCACGTTCTATCGAACCAAGAATTC  
 16 ← laArgGluArgThrSerArgArgArgGlyArgGluIleSerGlyLeuIle



**Figure 2**

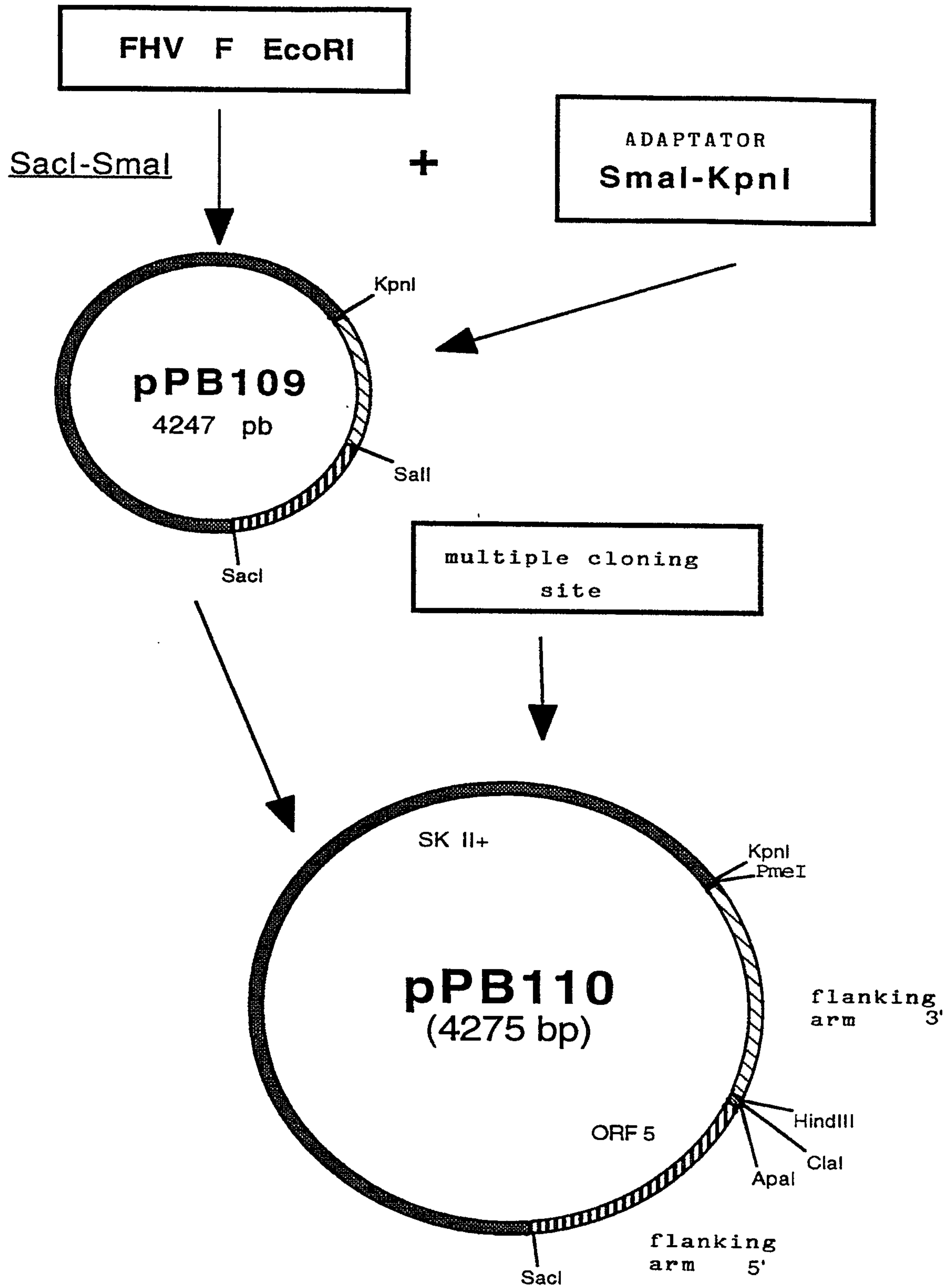


Figure 3

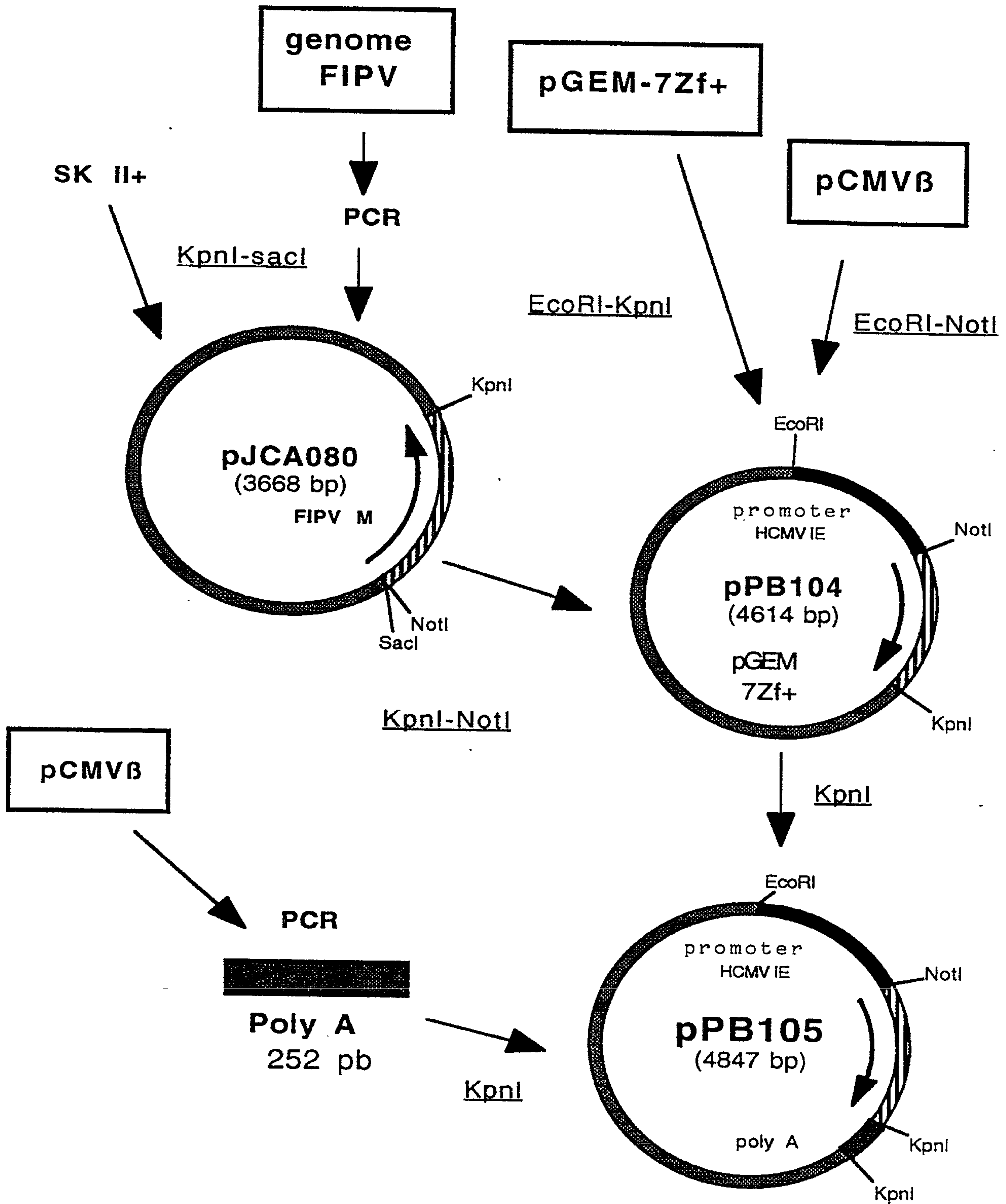


Figure 4

11 / 22

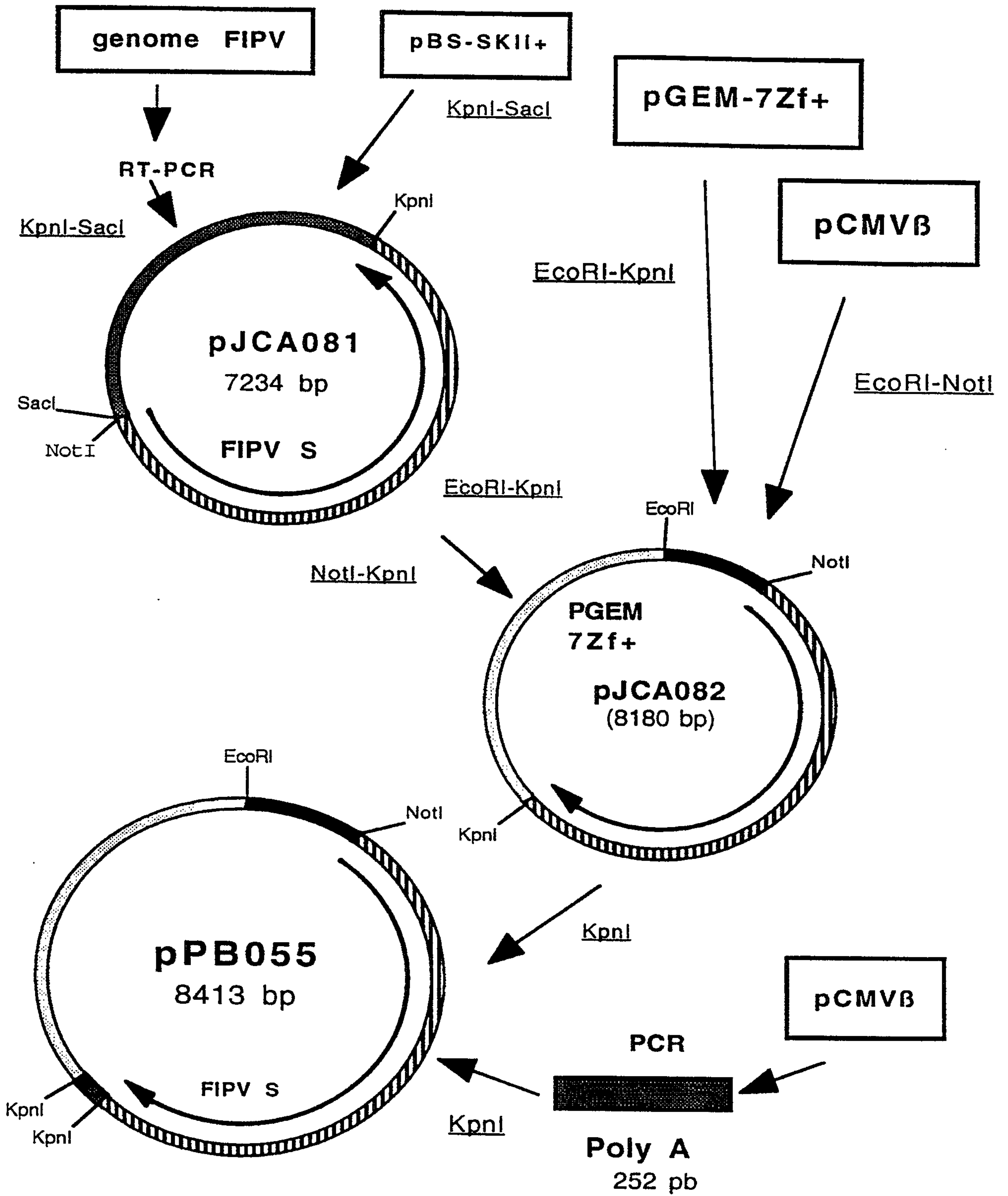


Figure 5

12 / 22

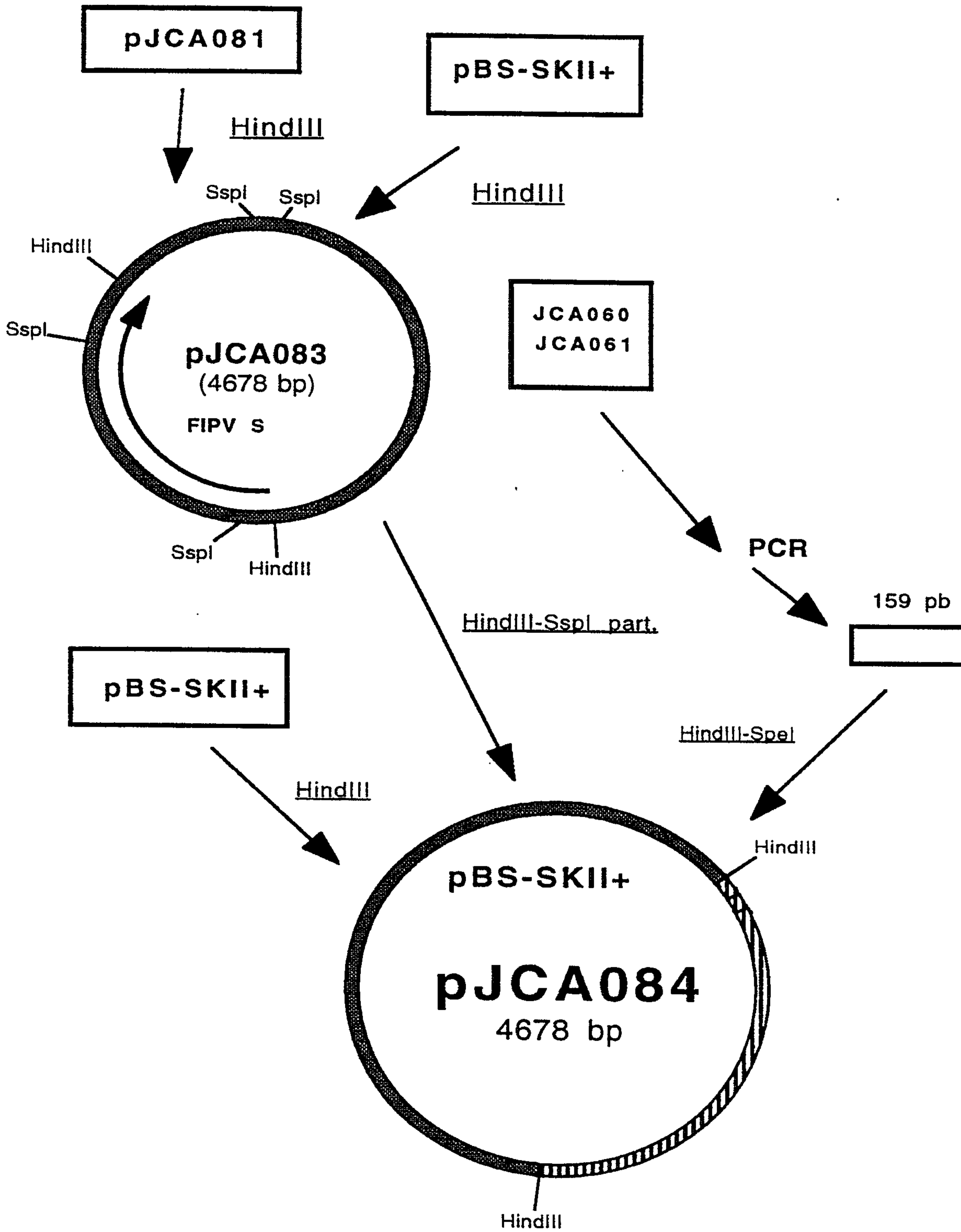


Figure 6

13 / 22

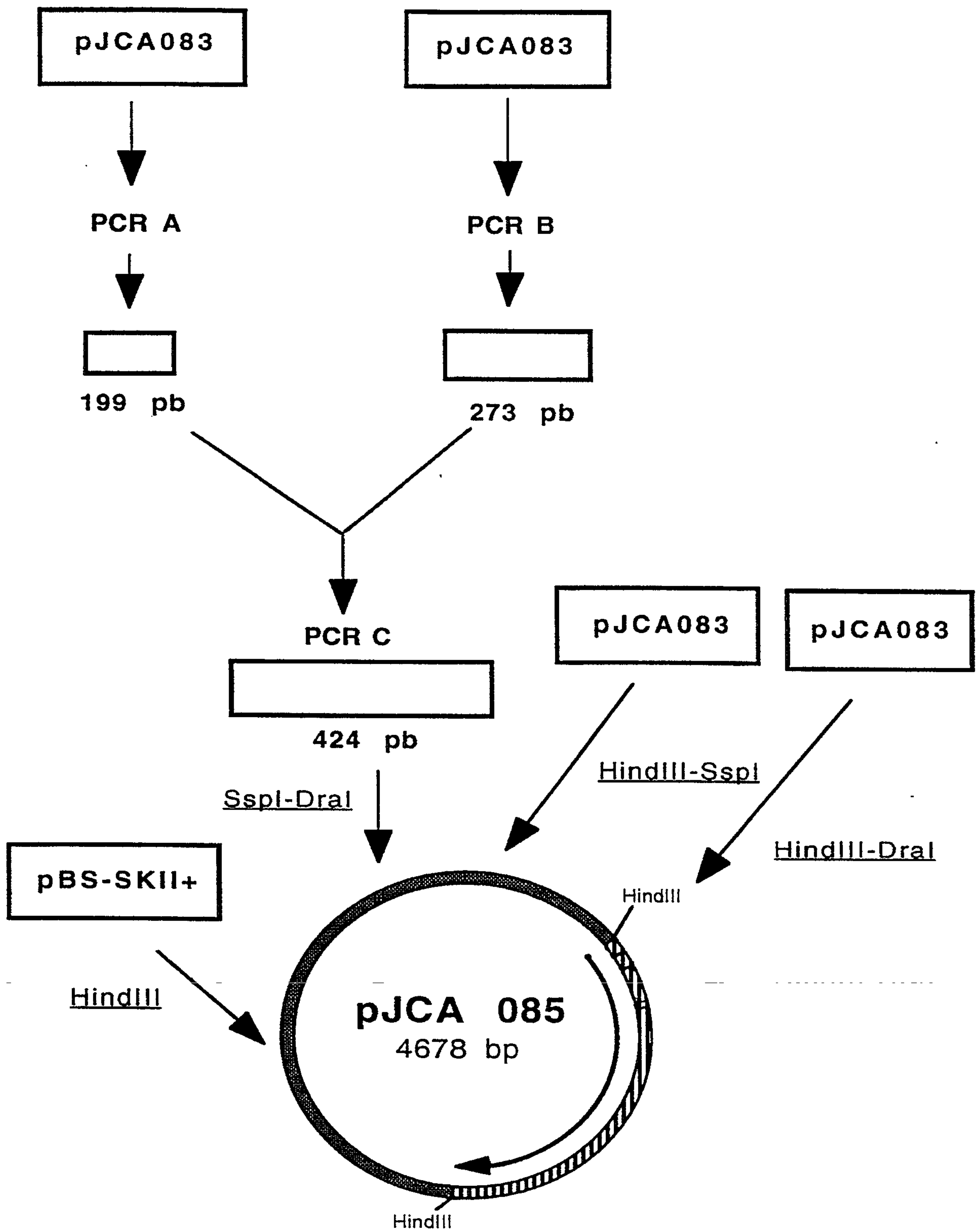
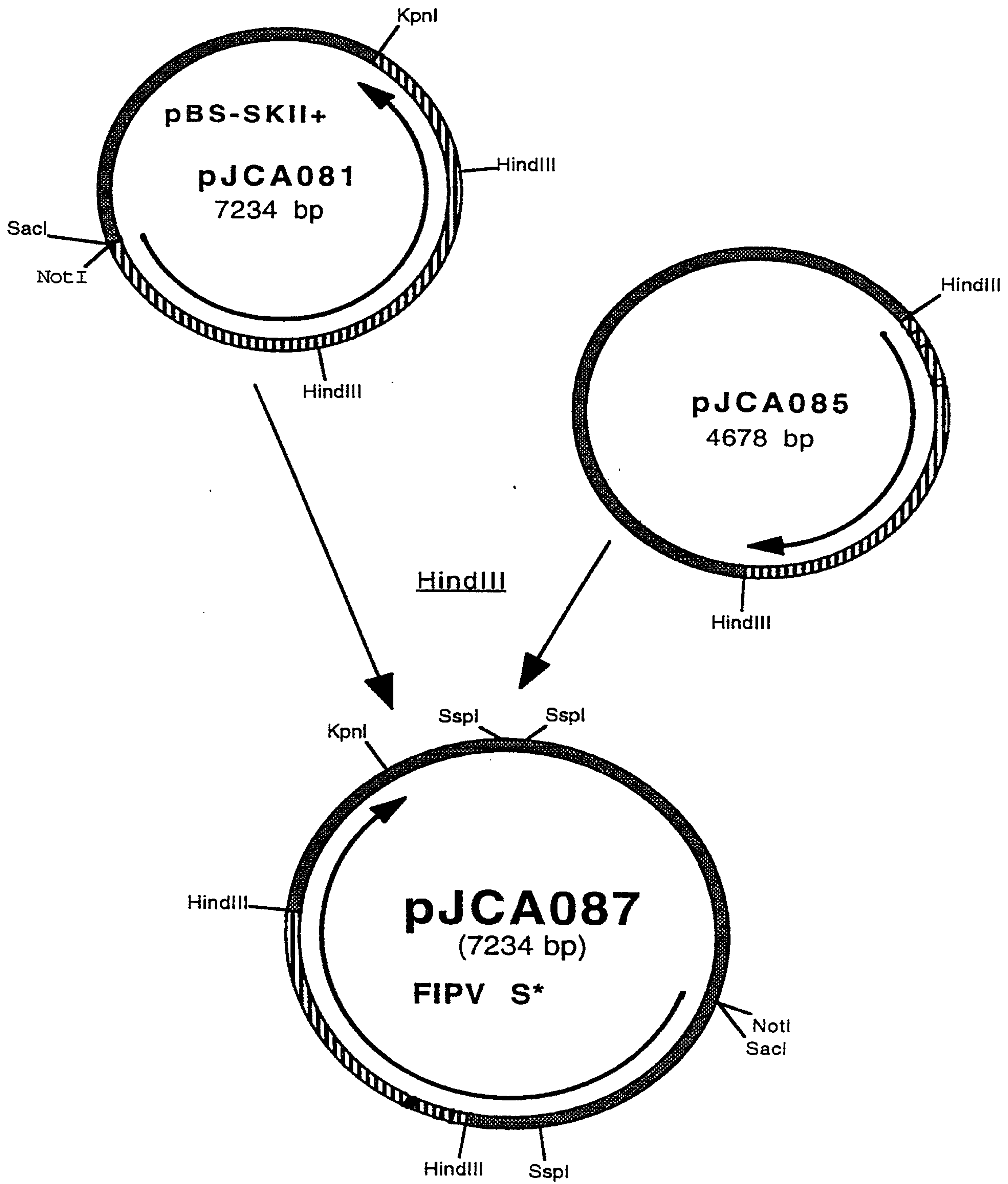


Figure 7



**Figure 8**

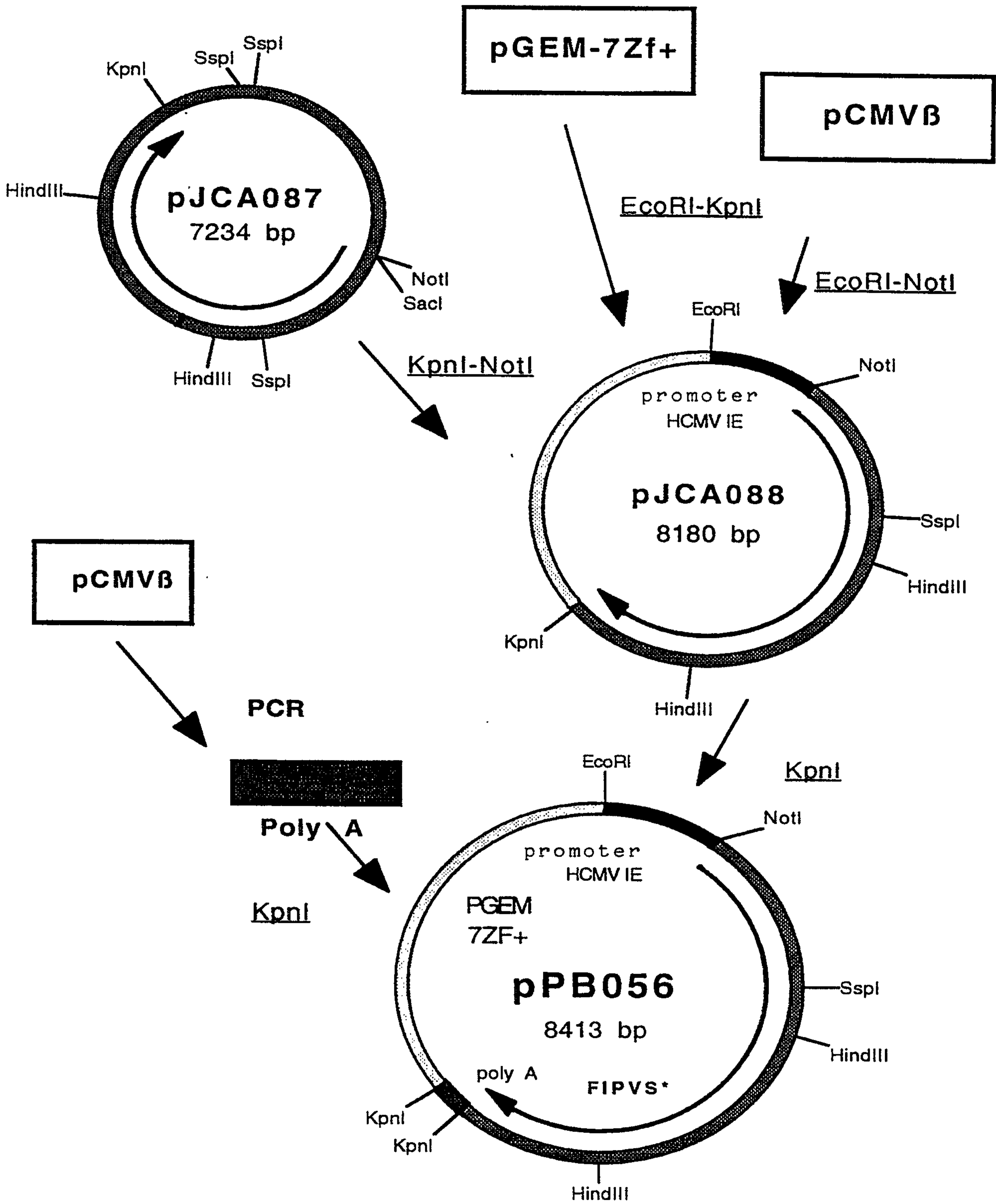
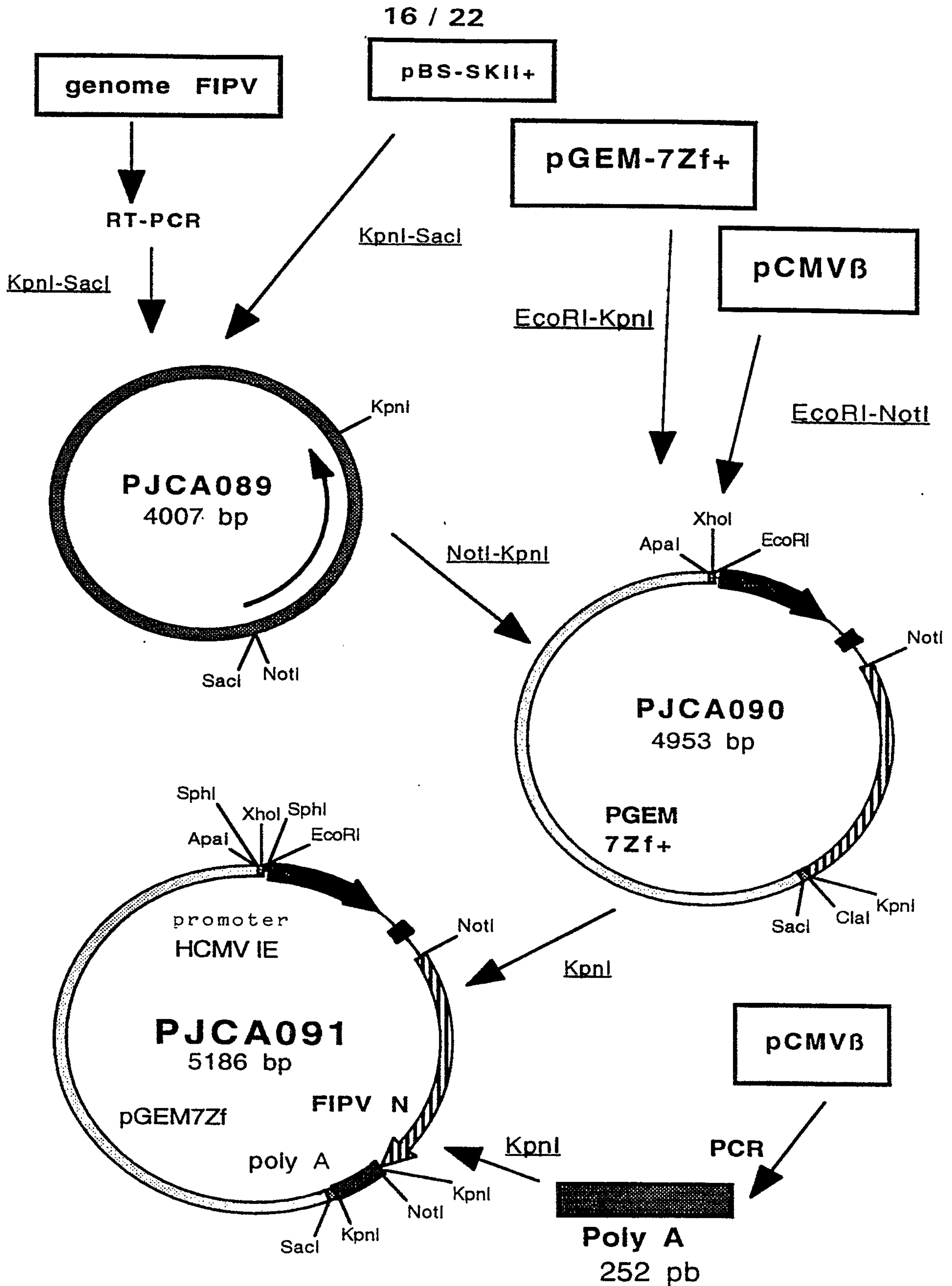
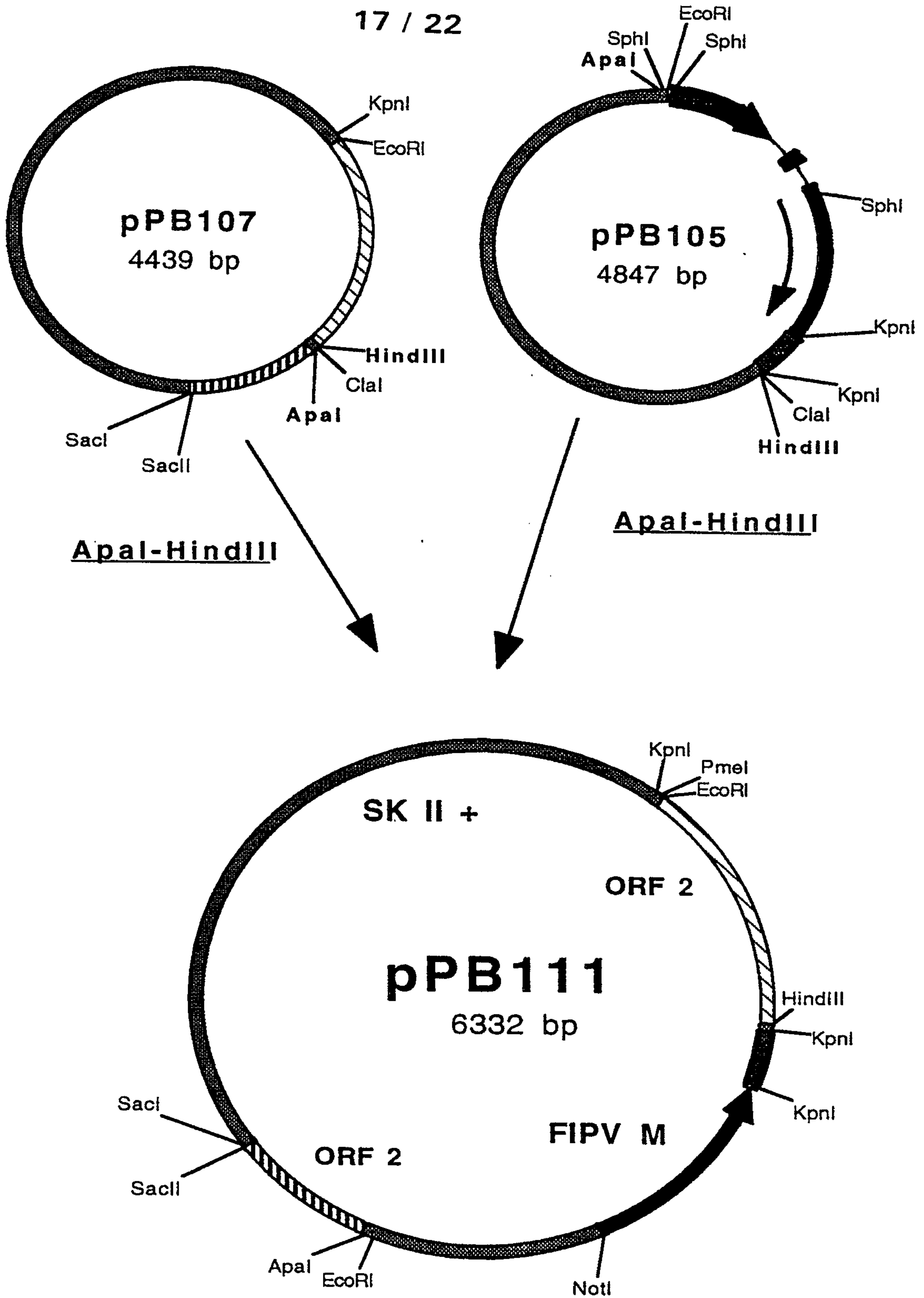


Figure 9



**Figure 10**



**Figure 11**

18 / 22

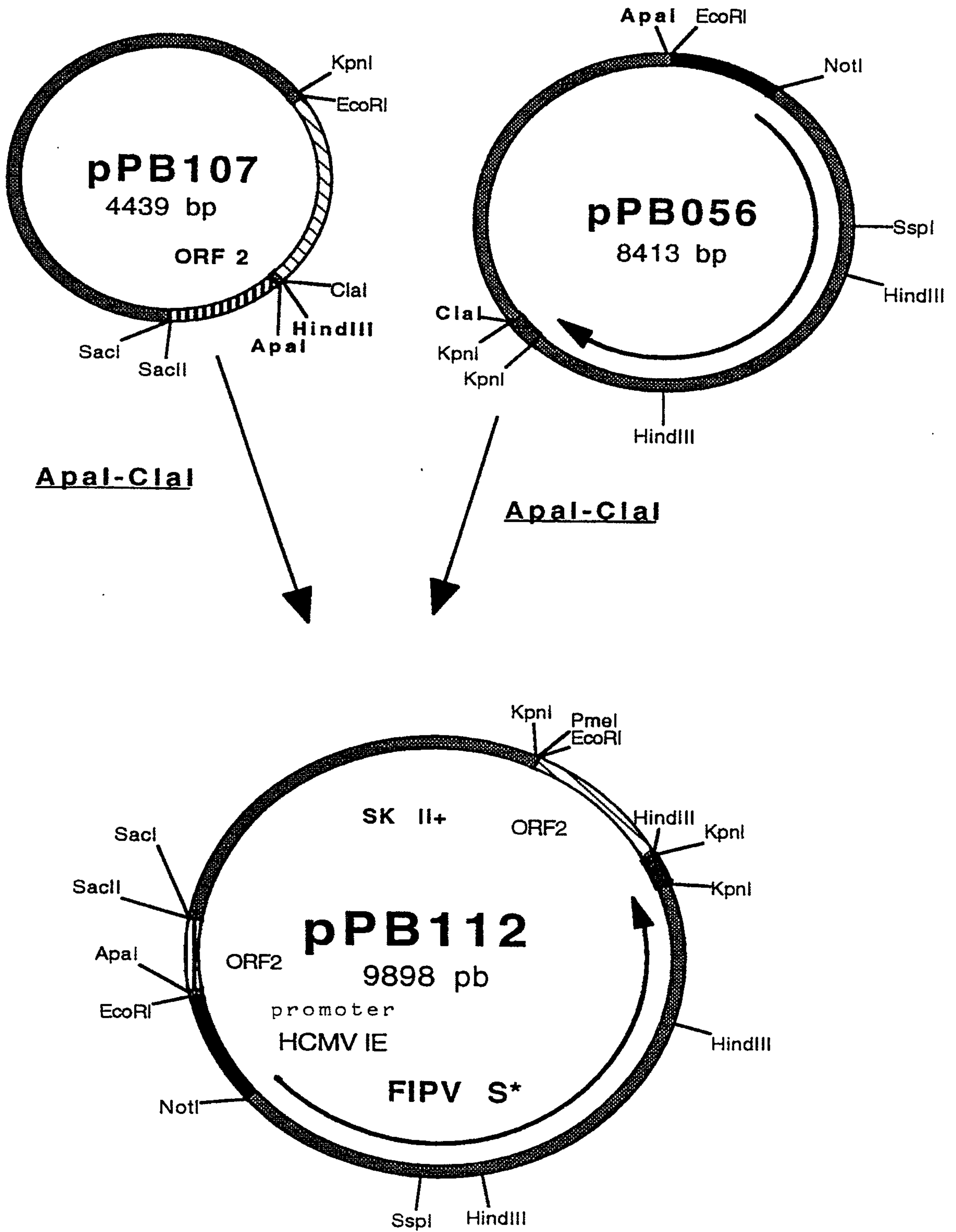


Figure 12

19 / 22

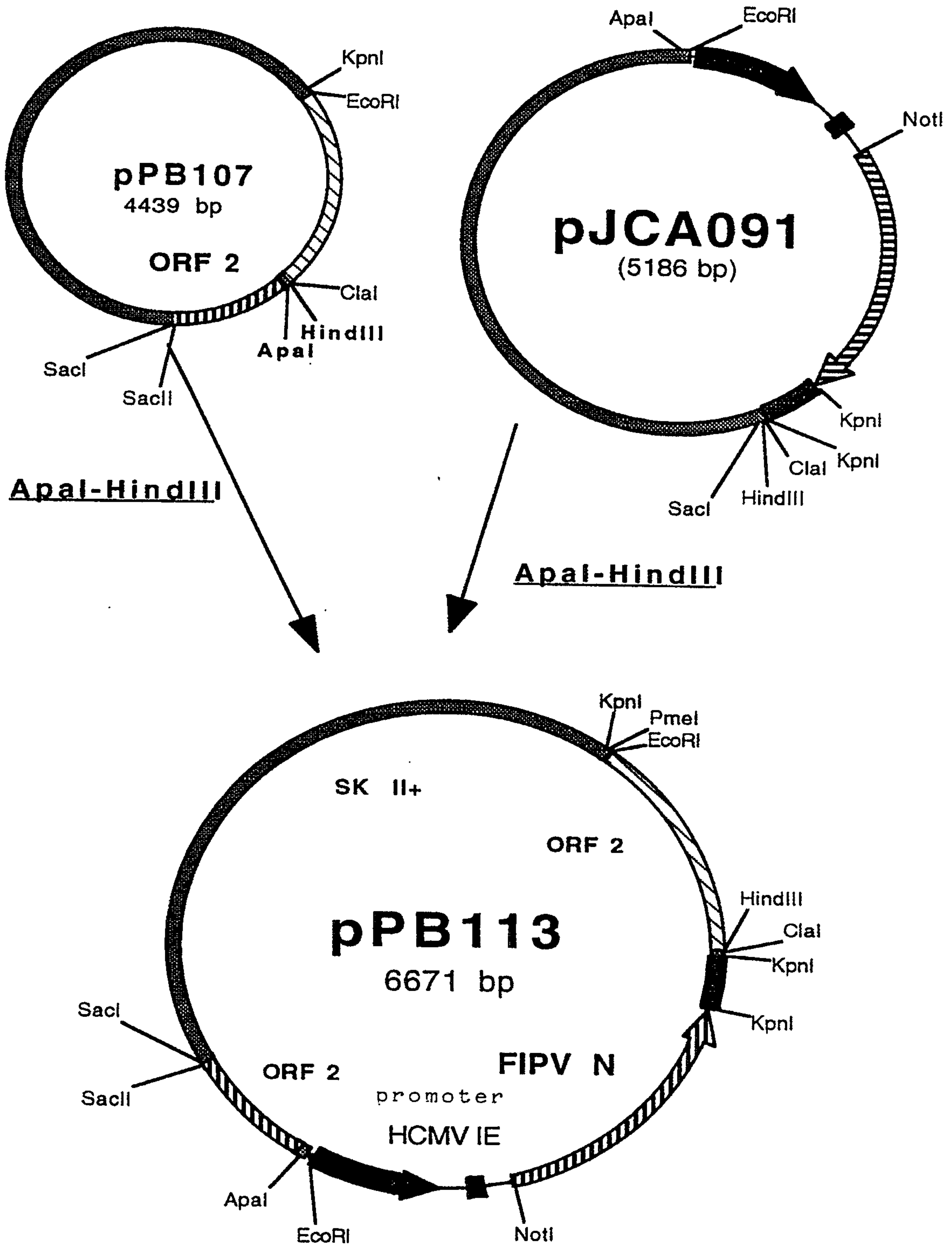


Figure 13

20 / 22

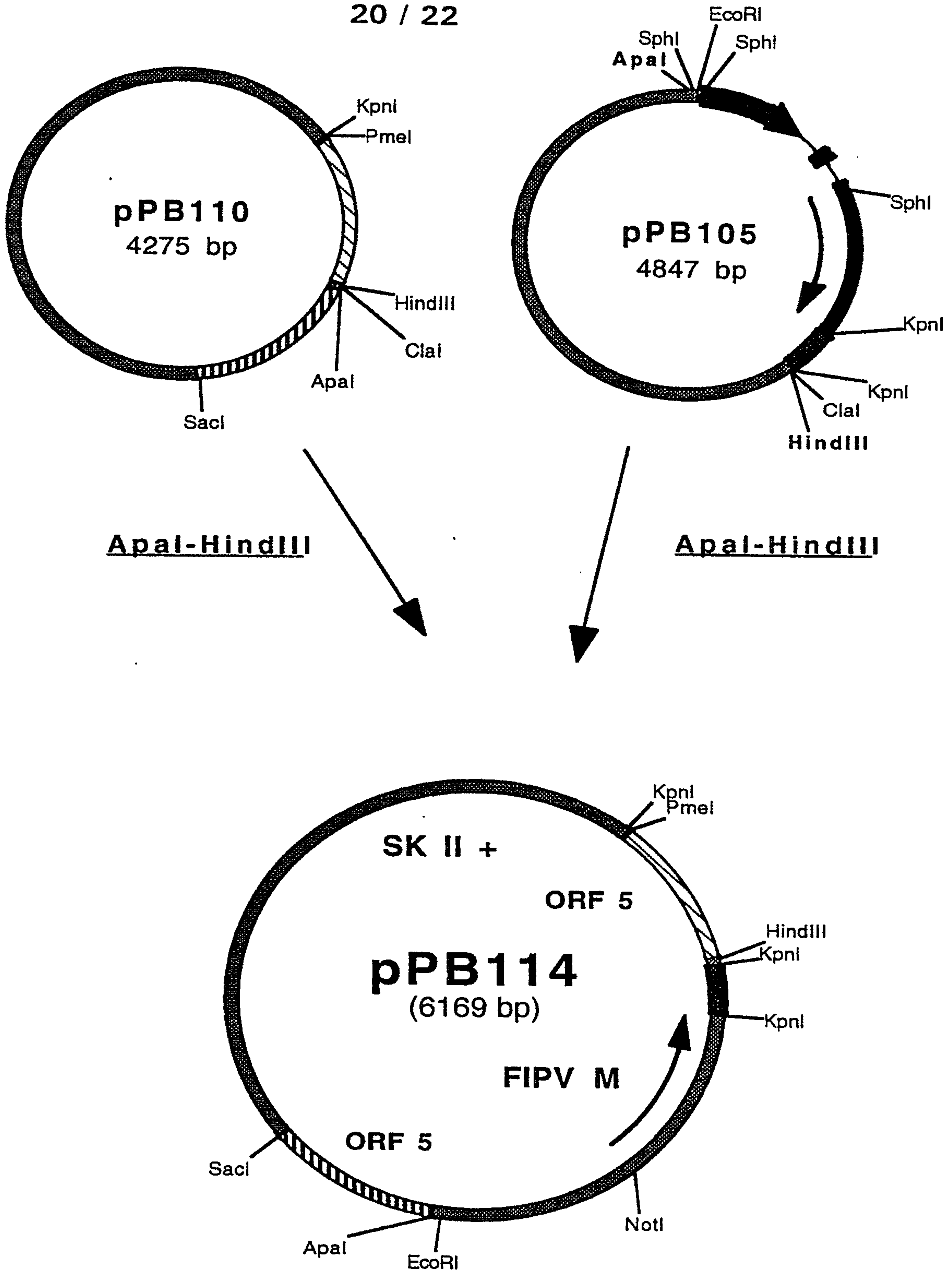


Figure 14

21 / 22

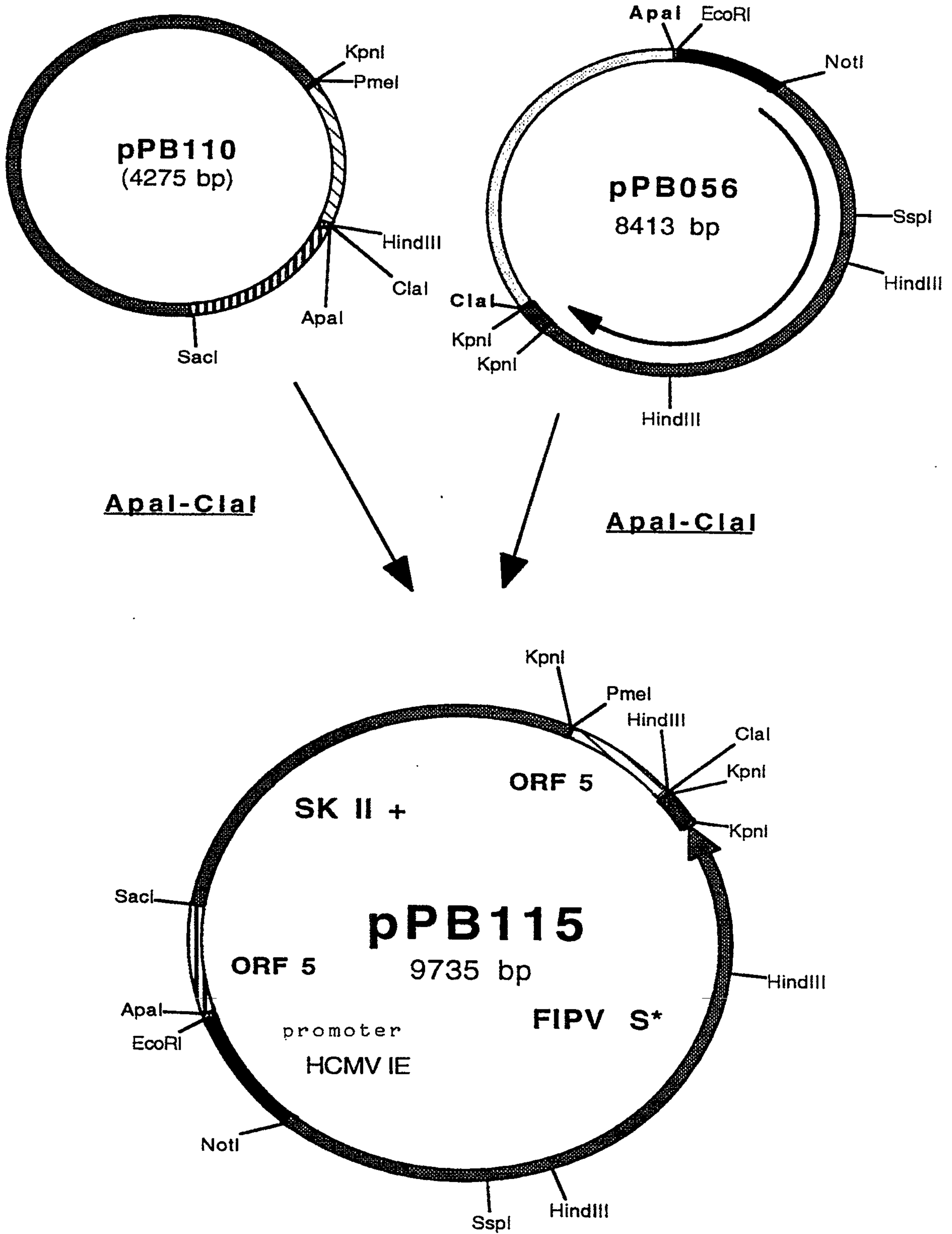


Figure 15

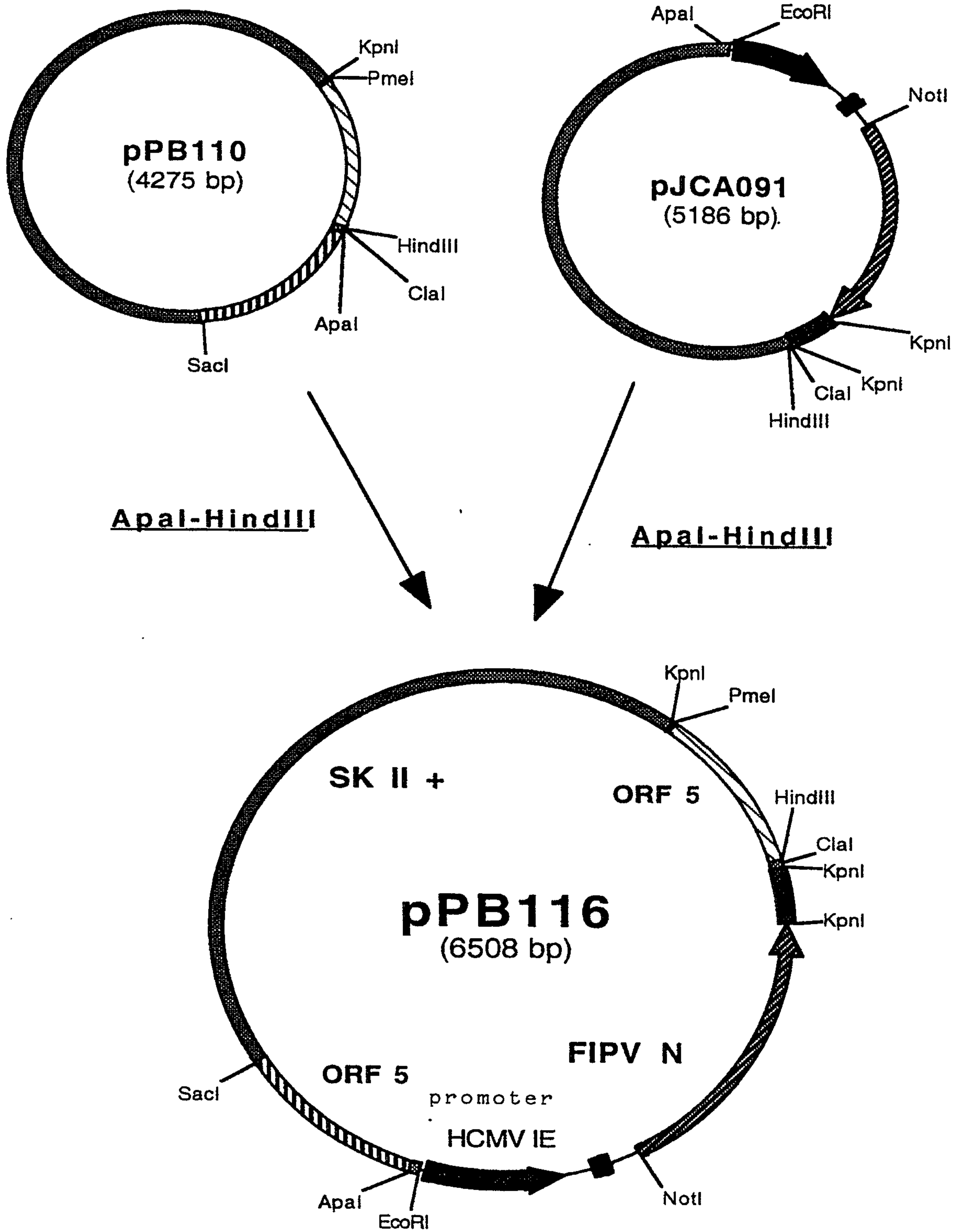


Figure 16