



MINISTRE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1004212A5

NUMERO DE DEPOT : 9000259

Classif. Internat.: C12N C12Q A61K

Date de délivrance : 13 Octobre 1992

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d' invention, notamment l' article 22;

Vu l' arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d' invention, notamment l' article 28;

Vu le procès verbal dressé le 08 Mars 1990 à 14h15
à l' Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : HEALTH RESEARCH INCORPORATED
Empire State Plaza Tower, Albany, NEW YORK(ETATS-UNIS D'AMERIQUE)

représenté(e)(s) par : DE PALMENAER Roger, BUREAU VANDER HAEGHEN, Rue Colonel Bourg
108A,- B 1040 BRUXELLES.

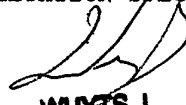
un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : SYSTEME DE SELECTION DU DOMAINE DE REPLICATION DANS UN HOTE DU POXVIRUS RECOMBINANT.

INVENTEUR(S) : Paoletti Enzo, Rutland Street 31, Albany, New York (US)

Priorité(s) 08.03.89 US USA 320471 14.02.90 US USA 478179

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l' invention, sans garantie du mérite de l' invention ou de l' exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeur(s).

Bruxelles, le 13 Octobre 1992
PAR DELEGATION SPECIALE :


W. L. L.
Directeur.

Systeme de selection du domaine de replication dans un hôte du poxvirus recombinant

La présente invention concerne des virus re-combinants modifiés, des procédés pour exprimer des produits de gène dans un hôte en utilisant de tels virus recombinants modifiés et des vaccins comprenant de tels virus recombinants modifiés.

La présente invention a également pour objet un poxvirus modifié, particulièrement un virus de la vaccine modifié, et des procédés pour préparer et choisir celui-ci. Plus particulièrement, l'invention est relative à un système de sélection pour le clonage et l'expression d'un cadre de lecture ouvert dans un poxvirus recombinant, particulièrement un poxvirus recombinant de la vaccine.

On se réfère dans la présente description à plusieurs publications en utilisant, pour les désigner, des nombres en chiffres arabes placés entre parenthèse. La référence complète de ces publications se trouve à la fin de la description immédiatement avant les revendications. Ces publications antérieures décrivent l'état de la technique à laquelle appartient l'invention.

Le virus de la vaccine et plus récemment d'autres poxvirus ont été utilisés pour l'insertion et l'expression de gènes étrangers. La technique de base pour insérer des gènes étrangers dans des poxvirus infectieux vivants implique la recombinaison entre des séquences de l'ADN de la vaccine qui est sur le flanc d'un élément génétique étranger dans un plasmide donneur et des séquences homologues présentes dans le poxvirus de sauvetage (32).

En fait, les poxvirus recombinants sont construits en deux étapes connues dans la technique et analogues à celles de la construction de recombinants synthétiques du virus de la vaccine décrites dans le brevet des Etats-Unis n°4.603.112, dont la description est incorporée par référence dans la présente demande.

Tout d'abord la séquence des gènes de l'ADN à insérer dans le virus, particulièrement un cadre de lecture

ouvert en provenance d'une source autre que la vaccine (non
pox) est placée dans une construction de plasmide de l'E.
Coli dans laquelle de l'ADN homologue à une section d'ADN
non essentiel du poxvirus a été inséré. Séparément, la
5 séquence du gène de l'ADN à insérer est liée à un promoteur.
La liaison promoteur-gène est placée dans la structure de
plasmide de sorte que la liaison promoteur-gène soit flan-
quée à ses deux extrémités par un ADN homologue à une
séquence d'ADN qui flanque une région non essentielle de
10 l'ADN de la vaccine (du pox). La structure de plasmide
résultante est ensuite amplifiée par croissance ou culture à
l'intérieur de la bactérie E. Coli (4) et isolée (5, 22).

Ensuite, le plasmide isolé contenant la séquence
de gène d'ADN à insérer est transféré par injection aux fins
15 d'altération dans une culture de cellules par exemple de
fibroblastes d'embryons de poulets, en même temps que le
poxvirus. La recombinaison entre l'ADN de la vaccine (pox)
homologue dans le plasmide et le génome viral donne respec-
tivement un poxvirus modifié par la présence, dans une
20 région non essentielle de son génome, de séquences d'ADN
étranger. L'expression ADN "étranger" désigne un ADN exo-
gène, en particulier de l'ADN provenant d'une source qui
n'est pas de la vaccine (source non pox), qui code les
produits de gène qui ne sont ordinairement pas produits par
25 le génome dans lequel l'ADN exogène est placé.

La recombinaison génétique est en général l'échan-
ge de sections homologues d'ADN entre deux brins d'ADN. Dans
certains virus, l'ARN peut remplacer l'ADN. Des sections
homologues d'acide nucléique sont des sections d'acide
30 nucléique (ADN ou ARN) qui ont la même séquence de bases de
nucléotide.

La recombinaison génétique peut avoir lieu d'une
manière naturelle pendant la réplication ou la fabrication
de génomes viraux nouveaux dans la cellule hôte infectée.
35 Ainsi, la recombinaison génétique entre des gènes viraux

peut se réaliser pendant le cycle de réplication virale qui se produit dans la cellule hôte qui est co-infectée par deux ou plusieurs virus différents ou autres structures génétiques. Une section d'ADN d'un premier génome est utilisée de
5 manière interchangeable pour construire la section du génome d'un second virus co-infectant dans lequel l'ADN est homologue à celui du premier génome viral.

Cependant, la recombinaison peut également se produire entre des sections d'ADN dans des génomes différents
10 qui ne sont pas parfaitement homologues. Si une première section de ce type provient d'un premier génome homologue à une section d'un autre génome à part la présence dans la première section de, par exemple, un marqueur génétique ou un gène qui code pour un déterminant antigénique inséré dans
15 une portion de l'ADN homologue, la recombinaison peut encore se produire et les produits de cette recombinaison sont alors détectables par la présence de ce marqueur génétique ou gène dans le génome viral recombinant.

Le succès de l'expression, par le virus infectieux
20 modifié, de la séquence génétique d'ADN insérée exige deux conditions. La première condition est que l'insertion doit être effectuée dans une région non essentielle du virus afin que le virus modifié demeure viable. La seconde condition pour l'expression de l'ADN inséré est la présence d'un
25 promoteur dans une relation convenable par rapport à l'ADN inséré. Le promoteur doit être placé de sorte qu'il soit disposé en amont de la séquence de l'ADN qui doit être exprimée.

Une recombinaison non perturbée et réussie se
30 produit à une fréquence d'environ 0,1 %.

Une stratégie de triage de base pour récupérer ces virus modifiés par une recombinaison qui a abouti implique l'hybridation in situ des recombinants sur des filtres de
réplication avec un marqueur ou sonde marqué par un élément
35 radio-actif et qui est homologue aux séquences insérées (26,

28). Un certain nombre de modifications sont connues pour augmenter l'efficacité de la recombinaison elle-même ou pour faciliter l'identification des produits recombinés. Parmi ces modifications, on peut citer : l'utilisation d'un
5 ADN donneur à un seul brin (38), l'identification de recombinants exprimant des fonctions enzymatiques uniques, par exemple l'incorporation de ¹²⁵Iododéoxycytidine dans l'ADN par l'expression de la thymidine kinase du virus de l'Herpès simplex (28) ; les substrats chromogéniques pour la
10 (co)expression de gènes étrangers en même temps que la B galactosidase (3, 29) ; la sélection pour l'expression de la thymidine kinase (20, 28) ; des réactions basées sur des anticorps pour visualiser des plaques recombinantes (21) ; l'utilisation de ts lethal conditionnel ou de mutants de
15 drogues (9, 18) ; la sélection de recombinants utilisant le gène de résistance à la néomycine à partir du Tn5 et de l'antibiotique G418 (11) ; ou la sélection de pressions avec de l'acide mycophénolique et le gène gPt de l'E. Coli (2, 8).

20 D'une manière désavantageuse, ces procédés connus pour identifier ou choisir des poxvirus recombinants impliquent tous une identification des recombinants en plusieurs étapes, qui est fastidieuse, l'introduction de produits chimiques radio-actifs, des substrats chromogéniques, des
25 produits chimiques biologiques utilisés pour la sélection, tels que l'acide mycophénolique et la bromodéoxyuridine, qui peuvent être nuisibles (mutagéniques) pour le génome viral lui-même, l'utilisation de réactifs sérologiques qui peuvent introduire des contaminants, et typiquement la présence d'un
30 gène exogène dans le recombinant final en plus de l'élément génétique étranger intéressant.

On peut ainsi apprécier que la mise au point d'un procédé pour fabriquer et sélectionner des recombinants de poxvirus, particulièrement des recombinants de la vaccine,
35 procédé qui éviterait d'avoir à résoudre les problèmes

discutés ci-dessus, constituerait une avance technique hautement désirable comparativement à l'état actuel de la technique.

Des procédés ont été développés dans la technique antérieure qui permettent la création de virus de vaccine recombinants et d'avipoxvirus par l'insertion d'ADN de toute source (par exemple virale, prokariotique, eukariotique, synthétique) dans une région non essentielle du génome de la vaccine ou de l'avipox, y compris des séquences d'ADN qui codent les déterminants anti-génétiques d'un organisme pathogène. Les virus de la vaccine recombinants créés par ces procédés ont été utilisés pour induire une immunité spécifique chez les mammifères vis-à-vis d'une grande variété d'agents pathogènes des mammifères, comme décrit dans le brevet des Etats-Unis n°4.603.112, incorporé dans la présente demande par référence. Des avipoxvirus recombinants créés par ces procédés ont été utilisés pour induire l'immunité spécifique chez des espèces aviaires (41) et des espèces non-aviaires.

Le virus de la vaccine non modifiée a une longue histoire d'utilisation relativement sans danger et efficace pour réaliser une inoculation contre la petite vérole. Cependant, avant l'éradication de la petite vérole, lorsque la vaccine non modifiée était administrée largement, il y avait un risque faible, mais réel, de complications sous la forme d'une infection généralisée par la vaccine, particulièrement chez les personnes souffrant d'exzéma ou d'immuno-suppression. Une autre complication rare, mais possible, pouvant résulter de l'inoculation de vaccine est l'encéphalite après vaccination. La plupart de ces réactions résultaient de l'inoculation d'individus ayant des maladies de la peau, telles que l'exzéma, ou des systèmes immunitaires déficients, ou bien d'individus qui cohabitaient avec d'autres qui avaient de l'exzéma ou des réponses immunologiques diminuées. La vaccine est un virus vivant qui

est normalement dépourvu de danger pour un individu en bonne santé. Cependant, ce virus peut être transmis entre individus pendant plusieurs semaines après l'innoculation. Si un individu avec une réponse immunitaire diminuée par rapport à la normale est infecté soit par inoculation soit par transmission contagieuse à partir d'un individu récemment inoculé, les conséquences peuvent être sérieuses.

Des mutants de virus convenablement modifiés portant des gènes exogènes qui sont exprimés chez un hôte en tant que déterminant antigénique provoquant la production par l'hôte d'anticorps vis-à-vis d'un agent pathogène hôte, avec réplication limitée du virus chez l'hôte, représentent des vaccins nouveaux qui évitent les inconvénients des vaccins classiques utilisant des organismes tués ou des organismes vivants atténués. Ainsi, par exemple, la production de vaccins à partir d'organismes tués exige la culture de grandes quantités d'organismes suivie par un traitement qui détruit sélectivement leur pouvoir d'infection sans affecter leur pouvoir antigène. D'un autre côté, des vaccins contenant des organismes vivants atténués présentent la possibilité d'une réversion de l'organisme atténué qui retourne à l'état pathogène. Contrairement à ceci, lorsqu'un poxvirus recombinant, qui a été modifié d'une manière convenable, est utilisé comme vaccin, la possibilité de reversion pour retourner à un organisme pathogène est évitée étant donné que le poxvirus contient seulement le gène qui code le déterminant antigène de l'organisme qui produit la maladie et non pas ces portions génétiques de l'organisme qui sont responsables de la réplication de l'organisme pathogène.

Ainsi, on peut se rendre compte qu'un procédé qui confère, par rapport à la technique connue, les avantages de l'innoculation de virus vivants, mais qui réduit ou élimine les problèmes discutés ci-dessus constituerait une avance hautement désirable par rapport à l'état actuel de la tech-

- nique. Ceci est même plus important aujourd'hui avec l'apparition de la maladie appelée syndrome acquis de déficience immunitaire (SIDA). Les victimes de cette maladie souffrent d'un dysfonctionnement immunologique sévère et pourraient
- 5 facilement être rendus malades par une préparation de virus vivants, qui serait normalement sans danger pour d'autres personnes, s'ils venaient en contact avec un tel virus soit directement, soit par contact avec une personne récemment immunisée avec un vaccin comprenant de tels virus vivants.
- 10 C'est pourquoi l'invention a pour objet :
- un vaccin pour induire une réponse immunologique chez un hôte, qui présente les avantages d'un vaccin à virus vivants, mais qui ne manifeste qu'un petit nombre ou aucun des inconvénients d'un vaccin à virus vivants ou d'un vaccin
 - 15 à virus tués, tels qu'énumérés ci-dessus ;
 - des virus recombinants modifiés destinés à être utilisés dans de tels vaccins ;
 - un procédé pour exprimer un produit de gène chez un hôte par inoculation de l'hôte au moyen d'un virus recombinant modifié qui code et exprime le produit de
 - 20 gène chez l'hôte avec une répllication limitée du virus chez l'hôte ;
 - un procédé pour exprimer un produit de gène dans une cellule cultivée in vitro par introduction dans la cellule d'un virus recombinant modifié contenant de
 - 25 l'ADN qui code et exprime le produit de gène avec une répllication restreinte du virus dans la cellule ;
 - des virus recombinants modifiés qui expriment des produits de gène chez un hôte, avec une répllication restreinte des virus chez l'hôte, et un procédé pour
 - 30 produire de tels virus recombinants modifiés ;
 - une identification rapide en une seule étape de virus recombinants et un tri rapide pour l'expression de cadres de lecture ouverts étrangers chez les recombi-
 - 35 nants ;

- un procédé pour préparer et sélectionner un poxvirus recombinant, particulièrement un virus de la vaccine recombinant, et préparer des séquences d'ADN produites ou impliquées comme intermédiaires dans ce procédé ;
- 5 - un système de sélection pour le clonage et l'expression d'un cadre de lecture ouvert dans un poxvirus recombinant, particulièrement un virus de la vaccine recombinant, dans lequel le virus recombinant ne contient pas de gène étranger autre que le cadre de lecture ouvert
- 10 intéressant.

Ces objets et avantages, ainsi que d'autres objets et avantages, de la présente invention apparaîtront clairement après lecture de ce qui suit :

Suivant un aspect, la présente invention est relative à un virus recombinant modifié dont les gènes qui sont inclus dans le domaine de replication chez l'hôte, c'est-à-dire qui se répliquent chez l'hôte, ont été enlevés de sorte que le virus manifeste une réplication limitée chez l'hôte, le virus recombinant modifié contenant de l'ADN qui

15

20

code et exprime un produit de gène chez l'hôte avec une réplication limitée du virus chez l'hôte. Le virus selon la présente invention est avantageusement un poxvirus, particulièrement un virus de la vaccine.

Suivant un autre aspect, la présente invention est relative à un procédé pour exprimer un produit de gène chez un hôte en inoculant l'hôte avec un virus recombinant modifié dont les gènes qui se répliquent chez l'hôte ont été supprimés de sorte que le virus possède un pouvoir de réplication limité chez l'hôte. Le virus recombinant modifié

25

30

contient de l'ADN qui code et exprime le produit de gène chez l'hôte même avec une réplication limitée du virus chez l'hôte. Le virus utilisé dans le procédé selon la présente invention est avantageusement un poxvirus, particulièrement un virus de la vaccine. Le produit de gène exprimé chez

35

l'hôte est avantageusement un antigène. Plus particulière-

ment, l'hôte est un vertébré et l'antigène induit une réponse immunologique chez le vertébré.

Suivant encore un autre aspect, la présente invention concerne un vaccin pour induire une réponse immuno-
5 logique chez un hôte inoculé au moyen du vaccin, ce vaccin comprenant un véhicule et un virus recombinant modifié dont les gènes qui se répliquent chez l'hôte ont été éliminés de sorte que le virus manifeste une réplication limitée chez l'hôte. Le virus recombinant modifié contient de l'ADN qui
10 code et exprime un produit de gène chez l'hôte même avec une réplication limitée du virus chez l'hôte. Le virus utilisé dans le vaccin selon la présente invention est avantageusement un poxvirus, particulièrement un virus de la vaccine.

L'invention, suivant un autre aspect, concerne un
15 procédé pour sélectionner un poxvirus recombinant chez un hôte en combinant de l'ADN donneur et un poxvirus modifié pour former un poxvirus recombinant et pour identifier le poxvirus recombinant par sa capacité de se répliquer chez l'hôte.

20 Un autre aspect de l'invention concerne un procédé pour le clonage et l'expression d'un cadre de lecture ouvert chez un poxvirus recombinant dans un hôte par combinaison d'ADN donneur et d'un poxvirus modifié pour former un poxvirus recombinant, pour la réplication du poxvirus recombi-
25 nant chez l'hôte et pour l'expression du cadre de lecture ouvert. Conformément à la présente invention, le poxvirus modifié a été débarrassé des gènes qui se répliquent chez l'hôte de manière que le poxvirus modifié ne se réplique pas chez l'hôte et l'ADN donneur contient un cadre de lecture
30 ouvert provenant d'une source qui est du type non pox et le gène qui se réplique chez l'hôte pour permettre au poxvirus recombinant de se répliquer chez l'hôte.

Suivant un autre aspect encore, l'invention concerne un plasmide donneur pour préparer le poxvirus
35 recombinant du système de sélection. Le plasmide donneur

contient un cadre de lecture provenant d'une source du type non pox et un gène qui se réplique chez l'hôte pour permettre au poxvirus recombinant de se répliquer chez l'hôte. Avantageusement, le plasmide donneur peut également
5 contenir un promoteur en amont du gène qui se réplique chez l'hôte du poxvirus, un codon d'amorçage ou commencement de traduction ou transcription en aval du promoteur suivi par des sites de restriction multiple de type unique, des séquences de signal de fin de traduction et une séquence de
10 signal de fin de transcription précoce.

La présente invention sera mieux comprise en se référant à la description détaillée qui suit et aux dessins annexés sur lesquels :

La Figure 1A représente schématiquement un procédé
15 pour la préparation du virus de la vaccine de suppression/recombinaison vP293 ;

La Figure 1B est une carte de l'extrémité gauche du virus de la vaccine de sauvetage, VTK-79 au moyen de HindIII K ;

20 La Figure 1C est une carte de l'extrémité gauche du virus de la vaccine suppression/recombinant vP293 au moyen de HindIII K ;

La Figure 2A montre schématiquement un procédé pour cloner le gène qui se réplique chez l'hôte, K1L dans le
25 plasmide pMP528L et son insertion dans le vP293 pour engendrer le virus de la vaccine vP457 ;

La Figure 2B est une carte de l'extrémité gauche de vP293 par HindIII K ;

La Figure 2C est une carte de l'extrémité gauche
30 de vP457 par HindIII K ;

La Figure 3A représente schématiquement un procédé pour la préparation des plasmides pMP528HRH et pHES1-4 ;

La Figure 3B illustre la séquence d'ADN du promoteur H6 synthétique et les sites de restriction en aval
35 présents dans le pMP528HRH ;

La Figure 3C montre la séquence d'ADN (avec les sites de restriction, les codons d'arrêt et le signal de fin de transcription précoce) qui remplace la séquence entre crochets de la Figure 3B dans le plasmide pHES1 ;

5 La Figure 3D illustre la séquence d'ADN (avec les sites de restriction, les codons d'arrêt et le signal de fin de transcription précoce), qui remplace la séquence entre crochets de la Figure 3B dans le plasmide pHES2 ;

10 La Figure 3E illustre la séquence d'ADN (avec les sites de restriction, les codons d'arrêt et le signal de fin de transcription précoce) qui remplace la séquence entre crochets de la Figure 3B dans le plasmide pHES3 ;

15 La Figure 3F illustre la séquence d'ADN (avec les sites de restriction, les codons d'arrêt et le signal de fin de transcription précoce) qui remplace la séquence entre crochets de la Figure 3B dans le plasmide pHES4 ;

La Figure 4A illustre schématiquement un procédé pour la préparation des plasmides pHES31-34 ;

20 La Figure 4B illustre les séquences d'ADN des oligonucléotides synthétiques HRL15-22' ;

La Figure 5 illustre la séquence d'ADN du promoteur u de la vaccine présent dans les plasmides pHES31-34 ; de plus, la Figure 5 montre, en une séquence entre crochets, les sites de restriction, les codons d'arrêt et les signaux de fin de transcription précoce présents dans pHES31-34 et les codons d'amorçage présents dans pHES31-33 ;

25

La Figure 6A illustre schématiquement un procédé pour la préparation des plasmides pHES61-64 ;

30 La Figure 6B illustre les séquences d'ADN des oligonucléotides synthétiques HRL33-34 ;

La Figure 7 illustre la séquence d'ADN du promoteur ATI synthétique présent dans les plasmides pHES61-64 ; en outre la Figure 7 illustre, en une séquence entre crochets, les sites de restriction, les codons d'arrêt et les signaux de fin de transcription précoce présents dans

35

pHES61-64 et les codons d'amorçage présents dans pHES61-63 ;

La Figure 8 illustre la séquence d'ADN (avec des sites de restriction) de 15.537 bp située au voisinage de l'extrémité gauche de la souche Copenhagen (Copenhague) de la vaccine ;

La Figure 9 illustre schématiquement un procédé pour la préparation des recombinants VP548 et VP661 ;

La Figure 10 est une carte de l'extrémité gauche du génome du virus de la vaccine ;

La Figure 11 illustre schématiquement un procédé de test des gènes potentiels qui se répliquent chez l'hôte la vaccine dans le système vP293 ;

La Figure 12 illustre schématiquement un procédé pour la préparation des recombinants vP665, vP683, vP706 et vP716 ;

La Figure 13 illustre schématiquement un procédé pour la préparation des plasmides pCP3 et pCP5 et pour tester le gène potentiel qui se réplique chez l'hôte du cowpox (vaccine de vache) dans le système de la vaccine ;

La Figure 14 illustre schématiquement un procédé pour la préparation des recombinants vP664 et vP668 ;

La Figure 15 illustre schématiquement un procédé pour la préparation d'une série de plasmides dérivés du pMPCTK1 Δ ;

La Figure 16 illustre les séquences d'ADN des oligonucléotides synthétiques MPSYN238, MPSYN239, MPSYN250-255 et MPSYN271-274 ;

La Figure 17 illustre la séquence d'ADN synthétique contenant des sites de restriction, des codons d'arrêt et des signaux de fin de transcription précoce présents dans les plasmides pPMCS-1 et pMPCS-4 ; en outre, la Figure 17 illustre la région du promoteur H6 synthétique présent dans pCOPCS-3H et pCOPCS-5H à pCOPCS-10H ; en outre également, la Figure 17 illustre, en une séquence entre crochets, les sites de restriction, les codons d'arrêt et les signaux de

fin de transcription précoce présents dans pCOPCS-3H et pCOPCS-5H à pCOPCS-10H et les codons d'amorçage présents dans pCOPCS-6H à pCOPCS-10H ;

La Figure 18 illustre schématiquement un procédé pour la préparation des plasmides pMLEND Δ et pMPREND Δ ;

La Figure 19 illustre la séquence d'ADN de 13.978 bp, produite par HindIII C, du génome de Copenhagen du virus de la vaccine, y compris les séquences de codage disposées à gauche de la séquence représentée sur la Figure 8 ;

La Figure 20 illustre la séquence complète d'ADN pour HindIII F disposée immédiatement à gauche de HindIII K sur la Figure 8 ;

La Figure 21, enfin, illustre la séquence d'ADN contenue dans HindIII B au voisinage de la terminaison de droite du génome du virus de la vaccine.

L'invention concerne des virus recombinants modifiés dont on a éliminé les gènes qui se répliquent chez l'hôte de manière que le virus présente une réplication limitée chez l'hôte et qui contiennent de l'ADN qui code et exprime un produit de gène chez l'hôte avec une réplication limitée du virus chez l'hôte. L'invention concerne également un système de sélection pour des poxvirus recombinants, particulièrement pour des vaccines recombinantes, et pour le clonage et l'expression d'un cadre de lecture ouvert chez le poxvirus, particulièrement le virus de la vaccine, en utilisant un mutant, qui se réplique chez l'hôte, du poxvirus, mutant qui est mortel d'une manière conditionnelle.

Les mutants qui se répliquent chez l'hôte du poxvirus du lapin (24, 13) et du virus de la vaccine (6, 7, 12, 17, 23, 36) sont connus.

Les mutants, qui se répliquent chez l'hôte, du poxvirus du lapin manquent, semble-t-il, d'une fonction de contrôle exigée pour la réplication du virus (10). L'analyse génomique ultérieure de ces mutants du poxvirus du lapin ont démontré des suppressions terminales importantes (jusqu'à 30

kb) d'ADN (19, 25).

La mutagénèse sous l'effet de l'acide nitrique de la souche Copenhagen du virus de la vaccine a permis à Drillien et autres (6) d'isoler un mutant qui se réplique
5 chez l'hôte, déficient au point de vue répllication dans la plupart des cellules humaines. L'analyse génomique de ce mutant a révélé une suppression importante d'environ 18 kb vers l'extrémité gauche (6). L'analyse additionnelle par des études de transfert de marqueur ont permis d'établir la
10 carte de la fonction génétique responsable du domaine d'hôte, au point de vue de la possibilité de répllication, vis-à-vis d'un fragment d'EcoRi de 5,2 kb (14) et finalement d'un cadre de lecture ouvert de 855 bp chevauchant les fragments de HindIII M/K (15).

15 Le gène répllicable chez l'hôte de la souche WR du virus de la vaccine (27, 30) est situé entre 24 et 25,2 kb depuis l'extrémité gauche du génome de la vaccine. Ce gène répllicable chez l'hôte, transcrit vers la gauche de HindIII K en HindIII M, est décrit ici comme le gène K1L suivant la
20 nomenclature recommandée par Rosel et autres (33).

Un mutant de suppression du gène, répllicable chez l'hôte, de la souche WR de la vaccine a été engendré par insertion du gène de résistance à la néomycine du transposon Tn5 et sélection avec l'antibiotique G418. Ce virus de
25 suppression/recombinant VP293 est déficient d'environ 21,7 kb d'ADN commençant 3,8 kb à partir de l'extrémité gauche du génome. VP293 est capable de former des plaques sur des fibroblastes d'embryons de poulets primaires (CEF), deux lignées de cellules de singe (BSC-40 ou VERO) mais est
30 déficient au point de vue répllication dans la lignée de cellules humaines MRC-5.

L'insertion du gène répllicable chez l'hôte, K1L, dans vP293 restaure la capacité de croissance sur des cellules MRC-5.

35 On a préparé une série de plasmides qui, en plus

du gène répliquable chez l'hôte, K1L, contiennent un promoteur de la vaccine précoce/tardif, à savoir H6, suivi de préférence par des sites de restriction de multiclona-
5 des codons d'amorçage et de fin de transcription et un signal de fin de transcription précoce. Ces plasmides pMP528HRH et pHES1-4 permettent en une seule étape rapide le clonage et l'expression de tout cadre de lecture ouvert en cas de recombinaison avec vP293 et marquage pour culture ou
10 croissance sur des cellules MRC-5.

L'insertion d'un cadre de lecture ouvert étranger dans ces plasmides suivie par la recombinaison avec vP293 restaure simultanément la fonction de répliquabilité chez
15 l'hôte (gène K1L) et introduit le cadre de lecture ouvert étranger dans le virus de sauvetage vP293. Les virus recombinants sont identifiés par leur capacité de former des plaques sur des cellules MRC-5.

Les avantages de ce système comprennent l'absence de tout gène exogène qui n'est pas du type vaccine dans le
20 recombinant final, autre que l'élément génétique intéressant, l'absence de réversion génétique du virus, étant donné que vP293 est un mutant de suppression de K1L, et l'identification rapide en une seule étape des recombinants. Cette étape unique peut également être utilisée pour un tri rapide de
25 l'expression du gène étranger, par exemple pour réaliser une carte épitope.

On a préparé des plasmides supplémentaires contenant le gène répliquable chez l'hôte, K1L, dans lesquels le promoteur précoce/tardif H6 a été remplacé par un promoteur
30 de la vaccine soit strictement précoce, soit strictement tardif. Avec de tels plasmides additionnels, les subtilités de la régulation temporelle de l'expression d'éléments génétiques étrangers peuvent être étudiées.

Les systèmes restrictifs de répliquabilité chez
35 l'hôte de la présente invention sont utilisés avantageuse-

ment pour des vaccins destinés à induire des réponses immunologiques chez un hôte inoculé avec le vaccin. A cet égard, le vaccin comprend un véhicule et un virus recombinant modifié. Le virus recombinant modifié a été débarrassé
5 de ses gènes qui se répliquent chez l'hôte de sorte que le virus a une capacité de réplication restreinte chez l'hôte. En outre, le virus recombinant modifié contient de l'ADN qui code et exprime un produit de gène chez l'hôte avec une réplication limitée du virus chez l'hôte. On a préparé des
10 virus recombinants modifiés qui expriment des produits de gène, particulièrement des antigènes, avec une réplication restreinte du virus du fait de la suppression, dans les virus, des gènes répliquables chez l'hôte. Dans un mode de réalisation, l'hôte est un vertébré et l'antigène induit une
15 réponse immunologique chez le vertébré. Dans un autre mode de réalisation, l'hôte est une cellule cultivée in vitro.

On peut se rendre facilement compte que des virus et des espèces supplémentaires, en plus de ceux cités dans la présente demande, peuvent être utilisés pour la restric-
20 tion de la répliquabilité chez l'hôte. En outre, on peut facilement réaliser que des "gènes répliquables chez l'hôte," supplémentaires, existent chez le poxvirus. De plus, on peut facilement se rendre compte qu'un grand nombre de gènes étrangers peuvent être utilisés dans ces mutants répliquables
25 chez l'hôte.

Une meilleure compréhension de l'invention et de ses avantages peut se déduire des exemples ci-après donnés à titre d'illustration et qui ne sont pas limitatifs.

Dans certains de ces exemples, la souche WR du
30 virus de la vaccine a été utilisée. Son origine et ses conditions de culture ont été décrites précédemment (27). Dans certains des exemples, la souche Copenhagen du virus de la vaccine a été utilisée. Son origine et ses conditions de culture ont été décrites précédemment (50). Des fibroblastes
35 d'embryons de poulets primaires (CEF), des lignées de cellu-

les de singe (VERO [ATCC n° CCL81] et BSC40) et une lignée de cellules humaines MRC-5 (ATCC n° CCL171) ont été cultivées dans le milieu essentiel minimal d'Eagle (MEM) contenant 5 % (VERO et BSC40) ou 10 % (MRC-5, CEF) de sérum fétal de bovin (FBS).

Les plasmides ont été préparés, triés et cultivés par les procédures standard (22, 31, 32).

Exemple 1 - PREPARATION DU PLSMIDE pMP528PiN
et PRODUCTION de vP293

En se référant à la Figure 1A, on a isolé un fragment EcoRI/SalI comprenant la terminaison de gauche à 3,8 kb de l'ADN de la vaccine à partir de pAGR (30) et on l'a inséré dans pUC13, coupé précédemment au moyen de EcoRI et de SalI. Le plasmide résultant, pMPS, a été digéré avec HindIII et SalI et joint avec un fragment de HindIII/SalI de 3,8 kb contenant les séquences de la vaccine correspondant à l'extrémité droite du fragment K de HindIII de la vaccine. Le plasmide résultant, pMP528, contient, ainsi les 3,8 kb de l'extrémité gauche du génome de la vaccine et 3,8 kb de l'extrémité droite du fragment K de HindIII, en supprimant la partie intermédiaire de 21,7 kb entre les sites de SalI à 3,8 et 25,5 kb de l'extrémité gauche du génome. Le site unique de SalI dans pMP528 a été changé en un site SmaI par addition d'agents de liaison ou linkers synthétiques (mis sur le marché par Collaborative Research Inc. de Bedford, Mass.) en produisant pMP528L. Un fragment de 1,4 kb de SmaI contenant le gène pour la néomycine phosphotransférase en provenance du transposon ou élément transposable Tn5 (1) a été isolé de pSV2-neo (35, ATCC n° 37149) et placé sous le contrôle d'un promoteur de vaccine précoce (désigné ici comme Pi).

Le promoteur Pi, de la région AvaI H de la vaccine, a été décrit (37). Plus particulièrement, ce promoteur dérive du fragment AvaI H (XhoI G) de la souche de vaccine WR variante L, dans lequel le promoteur conduit la

transcription de la droite vers la gauche. L'emplacement sur la carte du promoteur est approximativement à 1,3 kb à partir de l'extrémité gauche de AvaI H, approximativement à 12,5 kb à partir de l'extrémité gauche du génome de la vaccine et environ 8,5 kb à gauche de la jonction IncIII C/N. Ce promoteur a été localisé par une analyse de carte transcriptionnelle standard. La séquence de l'ADN Pi correspond à la région en amont d'un cadre de lecture ouvert codant une protéine riche en glycine de 5KDa récemment décrite (40). On a démontré que cet élément promoteur exprime des gènes étrangers dans les recombinants de la vaccine très peu de temps après infection (37).

La cassette promoteur Pi terminée par SmaI/néogène a été liée au site SmaI du pMP528L en produisant pMP528PiN. pMP528PiN contient 0,4 kb de séquences de vaccine dérivée d'un sous-clone Sau3A de AvaI H contenant la région du promoteur Pi suivie par 1 kb de séquences Tn5 des sites BglII à SmaI (1).

pMP528PiN a été transfecté, altéré après infection, en CEF primaire et co-infecté avec le virus de la vaccine de sauvetage VTK-79 par des procédures classiques (28). Le virus recombinant a été choisi et cultivé sur du CEF primaire en présence de 300 µg/ml de G418 (1, 11, 35).

Les configurations génomiques de la vaccine recombinante vP293 ont été confirmées par analyse d'hybridation par taches de Southern (Southern blot). La vaccine recombinante vP293 a été débarassée de 21,7 kb de vaccine comme prédit et contenait le gène étranger codant néo^r. Les cartes de restriction de l'extrémité gauche du virus de sauvetage VTK-79 et du virus recombinant VP292 exprimant le gène néo^r et choisi sur le CED primaire en présence de G418 sont représentées sur les Figures 1B et 1C.

En l'absence de l'antibiotique G418, le vP293 a produit de larges plaques sur le CEF primaire et de bonnes

plaques sur les cellules BSC40 ou VERO, bien que les plaques de vP293 étaient, d'une manière détectable, plus petites que le parent VTK-79 sur des cellules VERO. D'une manière significative, vP293 n'a pas donné de répllication mesurable et n'a pas formé des plaques sur la lignée de cellules humaines MRC-5.

Exemple 2 - RECONSTRUCTION DE vP293 AVEC
LE GENE REPLICABLE CHEZ L'HOTE, K1L

Pour démontrer que le gène répllicable chez l'hôte, K1L, lorsqu'il est reconstitué dans le mutant de suppression vP292 de la souche WR de la vaccine, permet au virus de se répliquer sur les cellules humaines, le gène répllicable chez l'hôte, K1L, a été cloné dans le plasmide pPR528L et inséré dans vP293.

En se référant maintenant à la Figure 2A, la séquence d'ADN de la vaccine composant le bras droit de pMP528L (Figures 1A et 2A) a été raccourcie pour éliminer les sites de restriction non désirés et pour faciliter les opérations futures de clonage. pMP528L a été coupé par EcoRV/IncIII, ses extrémités ont été rendues franches avec le fragment de Klenow de la E. Coli polymérase et auto-lié. De cette manière, le bras droit du plasmide résultant pMP528E a été réduit en longueur à 0,4 kb d'ADN.

Un fragment BglII (partiel)/ HpaI de vaccine de 891 bp contenant la totalité de la séquence de codage et le promoteur du gène répllicable chez l'hôte de K1L (15) a été préparé à partir de pSD452VC, un sous-clone de la souche Copenhagen de la vaccine contenant des séquence de HindIII M et K. Le fragment contenant K1L a été cloné dans la région de polyliaison, c'est-à-dire du polylinker, de pUC8 dans le seul but de flanquer le gène avec les sites de restriction convenables. Le plasmide résultant pUC8HR a été digéré avec HindIII et SmaI pour isoler le fragment contenant K1L. L'extrémité HindIII a été remplie avec le fragment de l'ADN polymérase de E. Coli et le fragment cloné au site SmaI de

pMP528E. Un plasmide pMP528HR avec l'orientation du gène répliquable chez l'hôte, K1L, lu de la gauche comme représenté sur la Figure 2A, a été isolé par des procédés classiques.

5 Les procédés pour la recombinaison et l'hybridisation sur des filtres en nitrocellulose ont été mis en oeuvre comme connu de l'homme de l'art et comme décrit précédemment (28) avec les modifications ci-après.

10 Le plasmide donneur pMP528HR a été introduit par électroporation dans des cellules de VERO ou de MRC-5, chacune co-infectée avec vP293. Des monocouches subconfluentes de cellules VERO ou MRC-5 ont été infectées avec un virus de sauvetage pendant 1 heure. Ces cellules ont été recueillies avec de la trypsine, lavées avec une solution saline tamponnée de Hepes (HeBS) (16) et électroporées en présence de 25 µg de plasmide ADN dans HeBS. Les cellules infectées de virus ont été électroporées en utilisant un pulseur du type "Bio-Rad Gene Pulser" équipé d'un extenseur de capacité du type "Bio-Rad-Gene Pulser Capacitance
15 ,Extender". La suspension de cellules (0,8 ml) a été placée sur de la glace pendant 10 minutes dans une cuvette de pulseur "Bio-Rad Gene", puis pulsée à 200 volts (capacitance de 960 µF) et placée sur de la glace pendant une autre période de 10 minutes. Les cellules ont été ensuite diluées dans 8 ml de MEM + 5 % de FBS, type "Bio-Rad-Gene Pulser
20 Capacitance Extender", soumis à la procédure de formation de plaques dans des boîtes de 60 mm contenant des mono-couches de cellules de VERO ou MRC-5 (4 ml par boîte) et incubées à 37°C pendant la nuit.

30 La progéniture a été récoltée et soumise à l'essai de formation de plaques sur des cellules VERO ou MRC-5. Le nombre des plaques obtenues sur des cellules de VERO était de 10 à 100 fois plus grand que le nombre des plaques obtenues sur des cellules de MRC-5. Des plaques isolées (de dimensions uniformes) ont été prélevées sur les cultures de
35 cellules de MRC-5 et de VERO (à la fois des plaques de

grande dimension et de petite dimension). Ces isolats de plaques ont été soumises à l'essai de formation de plaques sur des cellules de VERO et après trois jours les plaques résultantes ont été prélevées sur des disques filtrants en nitrocellulose et préparées pour hybridation in situ. Toutes les plaques provenant des cellules de MRC-5 et toutes les grandes plaques, mais non les petites plaques, provenant des cellules de VERO ont donné des signaux d'hybridation positifs lorsqu'elles ont été essayées avec une sonde marquée au ^{32}P pour les séquences de codage de K1L. Cette donnée est consistante avec la restauration des fonctions de capacité de replication chez l'hôte contenues dans la séquence de codage de K1L.

Un isolat obtenu à partir des cellules de MRC-5 a été purifié d'une manière plus poussée et désigné vP457. Dans vP457, le gène K1L a été restauré et a été situé à l'intérieur d'une suppression dans son orientation native lue de la droite vers la gauche. Les séquences de K1L ont remplacé la cassette promoteur Pi/gène de néomycine phosphotransférase présente dans vP293 comme illustré sur les Figures 2B et 2C. Comparé au génome de la vaccine variante L (30, 27), vP457 contient une suppression de 291 bp à droite du gène K1L et une suppression de 20,2 kb à gauche du gène K1L.

25 Exemple 3 - PREPARATION DES PLASMIDES pM528HRH ET pHES1-4

Pour démontrer que la mutation lethale conditionnelle dans vP293 peut être exploitée pour préparer des plasmides donneurs dans lesquels des cadres de lecture ouverts supplémentaires peuvent être clonés, une série de plasmides à savoir pMP528HRH et pHES1-4 ont été préparés. La recombinaison de cadres de lectures ouverts exogènes présents dans un plasmide contenant le gène replicable chez l'hôte, K1L, en vP293 fournit un procédé simple pour engendrer des recombinants de vaccine en vertu d'une restriction dans le domaine de replicabilité chez l'hôte.

Un promoteur de vaccine, à savoir H6, a été ajouté en amont du gène K1L dans pMP528HR. Ce promoteur précoce/tardif a été identifié précédemment par la construction d'une carte transcriptionnelle classique et une analyse de séquence d'ADN. Il comprend la séquence (positions -125 à +3)

ATTCTTTATTCTATACTTAAAAAATGGAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGAGGGT
TGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATTATTTTCATTATCGCGATATCGGTTAA
GTTTGTATCGTAATG. La séquence est celle décrite comme étant
10 en amont du cadre de lecture ouvert H6 par Rosel et autres
(33).

En se référant maintenant à la Figure 3, l'ADN correspondant aux positions -124 à -1 (avec la position -102 changée de A à G en vue d'empêcher l'introduction de tous
15 codons d'amorçage potentiel) et suivi de sites de restriction XhoI, KpnI, et SmaI, a été synthétisé chimiquement (Figure 3B) et cloné au site SmaI de pMP528HR en produisant pM528HRH (Figure 3A). Ainsi pMP528HRH contient le promoteur H6 en amont du gène K1L qui est exprimé sous le contrôle du
20 promoteur endogène K1L. Les deux se trouvent dans une orientation de droite à gauche par rapport aux bras de la vaccine (génome). Le promoteur H6 dans pMP528HRH se trouve immédiatement en amont des sites de restrictions uniques XhoI, KpnI et SmaI.

25 Pour accroître davantage l'utilité du système, on a dérivé une série de plasmides pHES1-4 à partir de pMP528HRH. On a préparé pHES1 par la procédure suivante : pMP525HRH a été coupé avec XhoI et XmaI et les oligonucléotides des HRL1

30 5' (TCGACCATGGGATCCCCGGGTACCGAGCTCTCGAGTAAATAAATAATTTTAT) 3'
et HRL2

5' (CCGGATAAAAATTATTTTACTCGAGAGCTCGGTACCCGGGGATCCCATGG) 3'
ont été clonés en ce site. pHES2, pHES3 et pHES4 ont été préparés d'une manière similaire. pHES2 a été préparé avec
35 les oligonucléotides HRL3

5' (TCGACCATGGGGATCCCCGGGTACCGAGCTCTCGAGTAAATAAATAATTTTTAT) 3'
et HRL4

5' (CCGGATAAAAAATTATTTATTTACTCGAGAGCTCGGTACCCGGGGATCCCCATGG) 3'
pHES3 a été préparé avec les oligonucléotides HRL5

5 5' (TCGACCATGGGGATCCCCGGGTACCGAGCTCTCGAGTAAATAAATAATTTTTAT)
3' et HRL6

5' (CCGGATAAAAAATTATTTATTTACTCGAGAGCTCGGTACCCGGGGATCCCCAT-
GG) 3'

et pHES4 a été préparé avec les oligonucléotides HRL7,

10 5' (TCGAGGATCCCGGGTACCGAGCTCTAAATAAATAATTTTTAT) 3' et HRL8
5' (CCGGATAAAAAATTATTTATTTAGAGCTCGGTACCCGGGATCC) 3'.

Les éléments de la séquence d'ADN pertinents, les sites de restriction et les signaux de transcription et de traduction de pM28HRH et de pHES1-4 sont les suivants.

15 La séquence du promoteur H6 synthétique (positions -124 à -1 avec la base altérée en position -102 soulignée) et les sites de restriction en aval présents dans pMP528HRH sont illustrés sur la Figure 3B.

20 La séquence entre crochets est remplacée dans les plasmides pHES1-4 avec des sites de restriction, des codons d'arrêt et un signal de fin de transcription précoce comme indiqué, ainsi que cela est illustré sur la Figure 3C pour pHES1, la Figure 3D pour pHES2, la Figure 3E pour pHES3 et la Figure 3F pour pHES4.

25 En plus des éléments contenus dans pMP528HRH, chaque plasmide, pHES1-3, contient un codon d'amorçage de traduction en aval du promoteur H6 suivi par des sites de restriction multiples de type unique, des séquences de signal de fin de traduction et une succession de signaux de
30 fin de transcription précoce de vaccine spécifique (39). Chaque plasmide, pHES1-3, contient un codon d'amorçage de traduction dans l'un des trois cadres de lecture. C'est pourquoi toute séquence d'ADN qui contient un cadre de lecture ouvert peut être exprimée lorsqu'elle est clonée
35 dans l'un de ces plasmides et recombinée en un virus de

vaccine.

Le quatrième plasmide, à savoir pHES4, ne contient pas de codon d'amorçage de traduction mais contient des sites de restriction multiple de type unique, des séquences de fin de traduction et une séquence de signal de fin de transcription précoce. Une séquence d'ADN qui contient un cadre de lecture ouvert et un codon d'amorçage peut être exprimée lorsqu'elle est clonée en pHES4 et recombinaison en virus de la vaccine.

10 Exemple 4 - INCORPORATION DE GENE LACZ BACTERIEN DANS LE VIRUS DE LA VACCINE ET SELECTION DES VIRUS RECOMBINANTS SUR LA BASE DE LA RESTRICTION DU DOMAINE DE REPLICABILITE CHEZ L'HOTE

Pour démontrer l'utilité du système de sélection du domaine de répliquabilité chez l'hôte, pHES1-4/vP293, un virus de la vaccine recombinant contenant le gène lacZ de l'E. Coli codant la B galactosidase a été construit.

Un fragment BamHI contenant des codons de 8 jusqu'à la fin du gène lacZ a été obtenu à partir de pMC1871 (34). Ce fragment de BamHI lacZ a été cloné au site BamHI unique des plasmides pHES1-4.

La recombinaison entre les plasmides résultant pHESLZ1-4 transfectés individuellement dans les cellules VERO co-infectées avec le mutant répliquable chez l'hôte vP293 a été réalisée.

24 heures après l'infection, le virus constituant la progéniture a été recueilli par 3 cycles de congélation/décongélation et soumis au test de formation de plaques soit sur des cellules VERO (Tableau 1A), soit sur des cellules MRC-5 (Tableaux 1B et 1C).

Des mono-couches de VERO et de MRC-5 (Tableaux 1A et 1B) tachées de rouge neutre ont été soulevées après 3 jours sur des filtres en nitrocellulose et préparées pour l'hybridation in situ (26) en utilisant des sondes de gènes lacZ marquées au ³²P. Les mono-couches de VERO (chiffres non

indiqués) et MRC-5 (Tableau 1C) ont été exposées à X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactopyranocide de Boehringer Mannheim) et le développement de couleur bleue a été noté après 8 heures.

5 Lorsque la progéniture a été soumise au test de formation des plaques sur des cellules de VERO et l'expression de B galactosidase testée en présence de X-gal ; on n'a pas observé de plaques bleues dans les cellules transfectées avec pHESLZ1, 2 ou 4. D'une manière significative, approxi-
10 mativement 20 % des plaques engendrées avec le plasmide pHESLZ3 ont donné des plaques bleues en présence de X-gal (chiffres non indiqués).

 Lorsque la progéniture a été soumise au test de l'essai de plaques sur des cellules de VERO et des virus
15 recombinants triés par hybridation in situ, 12 à 22 % des plaques ont donné des signaux d'hybridation positive au lacZ (Tableau 1A). Lorsqu'analysée par hybridation d'ADN in situ (26) chaque plaque sur MRC-5 a montré la présence du gène lacZ (Tableau 1B). L'activité de B galactosidase a cependant
20 été seulement constatée dans les plaques sur MRC-5 qui ont été dérivées de pHESLZ3 (Tableau 1C). Seule la structure de plasmide pHESLZ3 avait le gène lacZ en concordance avec le codon d'amorçage transitionnel.

25

30

35

TABLEAU 1

Analyse de lacZ recombinant/virus de la vaccine
engendrés avec les plasmides pHESLZ1-4 et vP293
du virus de la vaccine

		<u>Plasmide donneur</u>			
		<u>pHESLZ1</u>	<u>pHESLZ2</u>	<u>pHESLZ3</u>	<u>pHESLZ4</u>
5	A. Plaques totales	1056	637	793	1344
	Hybridation				
10	positive	153	141	95	269
	% positif	14,5	22	12	20
15	B. Plaques totales	60	56	ND	71
	Hybridation				
15	positive	60	56	ND	71
	% positif	100	100		100
20	C. Plaques totales	60	55	59	70
	X-gal positif	0	0	59	0
	% positif	0	0	100	0

Exemple 5 - CONSTRUCTION DES PLASMIDES pHES31-34
et pHES61-64

25 Pour démontrer que la mutation lethale condition-
 nelle de vP293 peut être exploitée pour construire d'autres
 plasmides donneurs et pour étendre le système de sélection
 du domaine de répliquabilité chez l'hôte basé sur la vaccine
 WR vP293, la série de plasmides pHES (Exemple 3) a été
 30 étendue en remplaçant le promoteur de vaccine précoce/tardif
 H6 par d'autres promoteurs réglés temporellement. Les plas-
 mides pHES31-34 et la série de plasmides pHES61-64 ont été
 engendrés pour régler l'expression de gènes étrangers, pré-
 coces ou tardifs respectivement.

35 La localisation et la séquence du gène pour une

protéine de 38 kDa dans le poxvirus de la vache (cowpox virus) exigé pour la formation de pustules rouges hémorragiques sur une membrane chorioallantoïque de poulet (CAM) a déjà été rapportée (43). Ce gène, à savoir u, est hautement exprimé promptement après l'infection. Le gène u constitue sur la carte un fragment NcoI-HaeIII de 1465 bp.

La région du génome du virus de la vaccine souche Copenhagen contenant l'équivalent du gène u du cowpox a été déterminée par l'analyse des taches de Southern (44) en utilisant de l'ADN de cowpox cloné comme sonde. L'équivalent Copenhagen du gène u du cowpox est localisé sur la carte en HindIII B et correspond à l'emplacement du gène u dans le virus de la vaccine souche WR récemment rapporté (45).

Dans le cowpox, la région du promoteur u est disposée en aval d'un site NcoI à -294 (43). De l'ADN contenant le gène u Copenhagen équivalent et le promoteur ont été séquencés (46). Le gène u Copenhagen équivalent n'est pas fonctionnel et provoque la formation d'une pustule blanche pour le virus de la vaccine Copenhagen cultivé sur CAM du fait des mutations de la structure ou cadre dans la région de codage. La région en amont est hautement homologue à la région du promoteur de cowpox et est fonctionnelle. La vaccine recombinante contenant la beta-galactosidase d'E. Coli exprimée sous le contrôle du promoteur u de la vaccine Copenhagen forme des plaques bleues en présence d'un substrat chromogène de type X-gal. Comme pour le cowpox, le génome Copenhagen contient le site NcoI en amont de la région du promoteur u.

Pour déplacer la région du promoteur u Copenhagen au système PHES, un site HindIII a été ajouté au site NcoI en amont du promoteur u par liaison avec l'oligonucléotide HEL14 (5' CATGGAAGCTTC 3' ; site HindIII souligné) auto-recuit ou auto-hybridé. Un fragment HindIII-ClaI de 299 bp contenant la région du promoteur u depuis le site NcoI jusqu'au site ClaI en -6 a été isolé. Le promoteur H6 a été

enlevé de pHES1 (Exemple 3) par digestion partielle au moyen de HindIII, suivie par digestion au moyen de KpnI. En se référant maintenant à la Figure 4, le fragment de vecteur HindIII-KpnI de 7,8 kb a été isolé d'un gel d'agarose (Figure 4A). Pour remplacer les séquences de promoteur en aval du site ClaI et des séquences de l'agent de polyliaison ou polylinker jusqu'au site KpnI, huit oligonucléotides, à savoir HRL15 à HRL22, ont été synthétisés (Figure 4B). Des paires d'oligonucléotides ont été recuites (hybridées) et
5 liées avec un fragment de vecteur HindIII-KpnI de 7,8 kb de pHES1 et le fragment de promoteur HindIII-ClaI en engendrant des plasmides pHES31-34 (Figure 4A).

En se référant maintenant à la Figure 5, les plasmides résultants pHES31 à pHES34 contiennent des régions de polyliaisons ou polylinker en aval de la région du promoteur Copenhagen (Figure 5). La séquence d'ADN de 0,3 kb spécifiant le promoteur Copenhagen est indiquée sur la Figure 5
15 seulement pour le plasmide pHES31. La séquence identique est présente dans les plasmides pHES32 à pHES34. La séquence entre crochets qui suit la région du promoteur dans pHES31 est remplacée par les séquences indiquées entre crochets pour pHES32 à pHES34. Les sites de restriction sont indiqués. Dans pHES31 à pHES33, la région de polyliaison ou polylinker est située en aval de l'ATG d'amorçage dans les
20 trois cadres de lecture différents. Le plasmide pHES34 ne contient pas d'ATG d'amorçage. Dans tous les membres de la série pHES31 à pHES34, la région de polyliaison est suivie par des codons d'arrêt de traduction dans les trois cadres de lecture, soulignés, suivie par la séquence TTTTAT, surlignée, qui a été illustrée pour spécifier la fin de la
30 transcription pour les gènes précoces dans la vaccine (39).

Comme avec la série de pHES1 à pHES4 de plasmides (Exemple 3), la série pHES31 à pHES34 permet l'expression de séquences de codage étrangères insérées dans la région de
35 polyliaison. Les séquences de codage étrangères contenant un

codon d'amorçage ont été exprimées sous le contrôle du promoteur u de la vaccine par insertion dans pHES34. Des séquences de codage étrangères privées d'un codon dit d'amorçage sont exprimées dans le cadre de lecture approprié par insertion dans pHES31, pHES32 ou pHES33. Comme dans le cas des séries pHES originales, pHES31 à pHES34 contiennent le gène répliquable chez l'hôte humain K1L (15). La recombinaison entre le mutant de suppression de la vaccine VP293 (Exemple 1) et tous les dérivés plasmidiques de la série pHES engendrent des virus de la vaccine recombinants qui sont choisis suivant leur capacité à se développer sur des cellules humaines.

Pour mieux adapter le système plasmidique pHES à l'expression des gènes étrangers dans la vaccine recombinante à une époque tardive après l'infection, le promoteur pour le gène ATI de 160 kDa du cowpox a été choisi (47). La région de 533 bp immédiatement en amont du gène ATI du cowpox, lorsqu'il est inséré dans le virus de la vaccine, produit de hauts niveaux d'expression de gènes étrangers à une période tardive après l'infection comme cela a été montré (48). La région de l'ADN du cowpox 663 bp s'étendant depuis l'amont du site BglII jusqu'au codon d'amorçage est suffisante pour agir comme promoteur pour l'expression de gènes étrangers dans la vaccine. L'ADN spécifiant cette région de promoteur a été synthétisé et inséré dans le système pHES comme détaillé ci-après.

Le promoteur H6 a été éliminé de pHES1 (Exemple 3) par digestion partielle au moyen d'HindIII, suivie par digestion au moyen de BamHI. En se référant maintenant à la Figure 6, le fragment de vecteur HindIII-BamHI de 7,8 kb a été isolé à partir d'un gel d'agarose (Figure 6A). Pour remplacer les séquences de promoteur H6 avec les séquences de promoteur ATI du cowpox et la liaison BamHI aux séquences de polyliaison, on a synthétisé huit oligonucléotides, à savoir HRL33 à HRL40 (Figure 6B). Des paires

d'oligonucléotides ont été recuites (hybridées) et liées avec un fragment de vecteur HindIII-BamHI de 7,8 kb en provenance de plasmides pHES 61-64 engendrant pHES1. Chaque paire recuite d'oligonucléotide contient la région de promoteur ATI de cowpox synthétique de 63 bp flanquée par des sites de restrictions HindIII et BamHI, comme indiqué.

En se référant maintenant à la Figure 7, les plasmides résultants pHES61 à pHES64 contiennent les régions de polyliaison ou polylinker en aval de la région de promoteur tardif ATI du cowpox (Figure 7). La séquence identique pour le promoteur ATI de cowpox, qui est présente dans pHES61 à pHES64, est indiquée seulement pour pHES61. La séquence entre crochets qui suit la région de promoteur dans pHES61 est remplacée par les séquences indiquées entre crochets pour pHES62 à pHES64. Les sites de restriction sont indiqués. Dans pHES61 à pHES63, la région de polyliaison est située en aval du codon d'amorçage ATG dans les trois cadres de lecture différents. Le plasmide pHES64 ne contient pas de codon d'amorçage ATG.

Comme dans les séries de plasmides pHES contenant d'autres promoteurs, tous les membres de la série de plasmides pHES61 à pHES64 contiennent des régions de polyliaison suivies par des signaux de fin de traduction (soulignés) ou de transcription (surlignés). Etant donné que des dérivés de la série pHES61 à pHES64 contiennent le gène répliquable chez l'hôte humain K1L de la vaccine, les virus progénitures de la vaccine recombinante engendré par la recombinaison de ces plasmides avec VP293 sont choisis en fonction de leurs capacité de croissance sur des cellules humaines.

Exemple 6 - CONSTRUCTION DES RECOMBINANTS VP548 ET VP661

La séquence de 15 537 bp d'ADN située au voisinage de l'extrémité gauche du génome Copenhagen est illustrée de la gauche vers la droite sur la Figure 8. Cette séquence comprend 7218 bp entre le site SalI le plus à droite dans HindIII et la jonction HindIII C/N et s'étend à travers la

]]

totalité des séquences pour HindIII N (1544 bp ; positions 7219 - 8762), HindIII M (2219 bp ; positions 87863 - 10981) et HindIII K (4551 bp ; positions 10 982 - 15 532). Aux fins de clarté, les séquences de codage et les sites de restriction sont désignés par les positions de base comme indiqué sur la Figure 8. Selon la nomenclature classique, les cadres de lecture ouverts de la vaccine (ORF) sont désignés en numérotant de la gauche vers la droite à l'intérieur de chaque fragment HindIII (33). Etant donné que les différentes souches de vaccine comportent des différences significatives vers l'extrémité de gauche de HindIII C (le terminus de gauche du génome de vaccine), les ORF disposés à l'intérieur du fragment HindIII C de la vaccine sont désignés ici en numérotant de la droite vers la gauche en commençant à la jonction HindIII C/N. Dans cette nomenclature, ORF C1L est l'ORF le plus à droite commençant dans le fragment HindIII de l'ADN de la vaccine Copenhagen (voir Figure 8).

En se référant maintenant à la Figure 9, des plasmides ont été préparés pour supprimer le gène répliquable chez l'hôte humain K1L (15) à partir du virus Copenhagen dans l'idée que l'élimination du gène K1L produirait l'absence de possibilité pour le virus résultant de se répliquer sur les cellules humaines. Le fragment D de KpnI Copenhagen, qui comprend environ 2,5 kb d'ADN à gauche de la séquence représentée sur la Figure 8 et s'étend vers la droite jusqu'à la position 12 998, a été cloné dans le site KpnI de pUC18, en donnant pSD435 (Figure 9) (Sur la Figure 9, les plasmides de la série pSD contenant des insertions Copenhagen de la vaccine apparaissent avec la désignation "VC" optionnelle. Ainsi pSD435 est équivalent à pSD435VC. La désignation "VC" est omise sur la Figure 10). Le fragment KpnD contient le gène K1L (positions 11 030 - 10 179). Pour faciliter la manipulation du gène K1L et sa région de flanc, pSD452, on a préparé (Figure 9) un sous-clone de pSD435 qui

comprend des séquences entre le site SphI (position 9478) dans HindIII M et le site ClaI dans HindIII K (position 11 731). Le gène K1L est indiqué par un bloc hachuré, la direction de transcription étant indiquée par une flèche.

5 pSD452 qui contient deux sites HpaI (positions 9561 et 10 1555) a été linéarisé par digestion partielle par HpaI et des linkers ou agents de liaison BglII ont été liés sur le site HpaI (position 10 155) immédiatement en aval du gène K1L. Le plasmide résultant a été coupé au moyen de BglII et

10 auto-lié, en engendrant pSD453. Dans pSD453, le gène K1L et son promoteur sont supprimés. Le site de suppression est indiqué par un triangle (Figure 9).

Un fragment contenant les séquences de codage de la beta-galactosidase (bloc marqué en pointillés, la direction du gène étant indiquée par une flèche) sous le

15 contrôle du promoteur tardif de la vaccine de 11 kDa (flèche sombre) (49) a été inséré dans le site BglII de pSD453 en engendrant pSD453BG (Figure 9). pSD453BG a été utilisé comme plasmide donneur pour la recombinaison avec

20 vP410, un dérivé moins de la thymidine kinase du virus de la vaccine souche Copenhagen (50). Le virus constituant la progéniture a été testé en présence de X-gal. Des plaques bleues ont été prélevées et purifiées par croissance sur des cellules de VERO. Comme on s'y attendait, le recombinant qui

25 en résulte, à savoir vP548, ne comportait pas, comme on l'a montré, de gène K1L lorsqu'on l'a testé avec des séquences de K1L marquées au ³²P. D'une manière surprenante, vP548 formait des plaques sur des cellules de MRC-5.

L'essai pour détecter la présence du gène pour la

30 B-galactosidase dans vP548 était très significatif du fait de sa capacité à former des plaques sur des cellules de MRC-5 ; la cassette de 11 KDa/B-galactosidase a été enlevée de vP548 par recombinaison avec le plasmide donneur pSD453. Le recombinant de suppression de vaccine résultant, à savoir

35 vP661, forme également des plaques sur des cellules de

MRC-5.

Exemple 7 - IDENTIFICATION DU GENE REPLICABLE CHEZ L'HOTE
C7L A PARTIR DE LA SOUCHE COPENHAGEN DU VIRUS
DE LA VACCINE

5 Les résultats décrits dans l'Exemple 6 suggèrent
que K1L n'est pas le seul gène de la vaccine répliquable chez
l'hôte, capable de conférer la croissance sur des cellules
humaines. On a investigué la possibilité que les régions
supprimées du virus de la vaccine vP293 (Exemple 3) et du
10 virus de la vaccine mutant de suppression de 18kb du domaine
de répliquabilité chez l'hôte (14) étaient supprimées pour un
autre gène, qui comme K1L, confère la possibilité de se
développer sur des cellules humaines. La Figure 10 représen-
te la carte de restrictions de l'extrémité gauche du génome
15 du virus de la vaccine montrant les emplacements des gènes
répliquables chez l'hôte potentiels. Les cartes de HindIII et
EcoRI de l'extrémité gauche du génome du virus de la vaccine
sont illustrées à la partie supérieure. On a indiqué seule-
ment les sites de EcoRI qui ont de l'importance ici. L'éten-
20 due des suppressions dans le domaine de la répliquabilité
chez l'hôte dans les mutants de vP293 de suppression du
virus de la vaccine (Exemple 3) et la suppression du domaine
de répliquabilité chez l'hôte de 18 kb (14), aussi bien que
la région supprimée commune aux deux mutants de suppression
25 sont représentées par des traits épais. La région séquencée
de 15 537 bp (Figure 8) depuis le site SalI le plus à droite
jusqu'au fragment HindIII K a été dilatée. On n'a indiqué
que les sites de restrictions qui présentent un intérêt ici.
Les emplacements des gènes discutés ici sont indiqués dans
30 des boîtes ouvertes. Les emplacements des fragments utilisés
pour tester les gènes pour leur capacité de répliquabilité
chez l'hôte ont été indiqués au-dessus d'auges. Les empla-
cements des insertions de vaccine dans les plasmides
décrits ici, en même temps que les sites de restriction qui
35 présentent de l'intérêt ici ont été aussi indiqués. On a

utilisé les désignations abrégées suivantes : S = SalI; E = EcoRI; H = HindIII; Bg = BglII; Kp = KpnI; B = BamHI; Sp = SphI; C = ClaI; Hp = HpaI.

Comme indiqué sur la Figure 10, la région de suppression commune à la suppression du domaine de répliquabilité chez l'hôte de 18kb et la suppression dans vP293 s'étend depuis un point non déterminé dans EcoRI C jusqu'au site SalI dans HindIII K (position 11 412). On a déterminé qu'une fonction de répliquabilité chez l'hôte s'appliquait comme carte sur le fragment d'EcoRI K (positions 7550-12 875) (14) et un gène répliquable chez l'hôte K1L (positions 11 030 - 10 179) a été identifié dans un fragment BglII D de 846 bp (positions 10 271 - 11 116) de l'intérieur de l'EcoRI K (15). Le fragment PqlII A (positions 8645 - 10 270) de l'EcoRI K n'a pas restauré la croissance sur des cellules humaines. Cependant, dans ces analyses, des gènes éventuels répliquables chez l'hôte dans le fragment d'EcoRI K qui sont situés entre EcoRI (position 7749) et BglII (position 8644), ou entre sites BglII (position 11 116) et ClaI (position 11 731), auraient été ignorés. Egalement des gènes qui croisent les sites EcoRI (position 7779), BglII (position 8644) ou ClaI (position 11 731) de EcoRI K, ou la jonction EcoRI (position 1295) entre EcoRI C et J auraient été ignorés.

L'analyse de la traduction d'acides-amino de la séquence de 15,5 kb décrite ici révèle quatre gènes potentiels qui n'auraient pas été testés précédemment (14, 15). Tous les quatre cadres de lecture ouverts sont orientés de la droite vers la gauche. Les positions de ces quatre ORF, C7L (positions 1314 - 863), N2L (positions 7943 - 7416), M1L (positions 9329 - 7985) et K2L (positions 12 367 - 11 258) ont été indiquées sur la Figure 10. Le premier ATG sur le M1L ORF est disposé dans la position 9403. Etant donné que cet emplacement est en amont (à droite) des emplacements publiés pour les sites d'amorçage de la transcription pour

M1L (51) et à l'intérieur des séquences de codage pour le gène M2L, on peut interpréter l'ATG en position 9329 comme le commencement véritable de la traduction du gène M1L.

Des quatre gènes potentiels, le M1L semblait
5 initialement le candidat le plus vraisemblable comme gène du domaine de répliquabilité chez l'hôte. Une sonde d'ADN marquée par ^{32}P pour K1L interagit faiblement avec les séquences de M1L sur une tache de Southern (44) (valeurs non indiquées).

La séquence du gène M1L dans la souche Copenhagen
10 de la vaccine décrite ici diffère, à l'extrémité amino, de la séquence du M1L publiée dans la souche WR de la vaccine (51). L'insertion de deux bases (positions 9307, 9312) dans la présente séquence par rapport à la séquence publiée provoque des mutations de déplacement de cadres (de lecture), c'est-à-dire que le cadre de lecture normal est
15 décalé. Dans la séquence décrite ici, la traduction commence au ATG dans la position 9329. Dans la séquence rapportée (51) la traduction potentielle à partir de cet ATG serait terminée par un codon d'arrêt de cadre en position
20 9278 et la traduction de M1L commencerait en position 9247. Dans la séquence décrite ici, la traduction depuis la position 9329 est continue jusqu'au codon d'arrêt de M1L rapportée précédemment (position 7987). Le résultat net est que le gène M1L décrit ici contient 27 acides aminés
25 supplémentaires au terminal amino aussi bien que deux substitutions d'acide aminés comparativement au gène M1L rapporté (51). La séquence pour le gène WR N2L a été également publiée (51). Le gène N2L Copenhagen décrit ici possède quatre substitutions d'acides aminés relativement à
30 la séquence publiée.

L'analyse par ordinateur de la protéine codée par le virus de la vaccine Copenhagen M1L ORF décrit ici révèle un niveau supérieur de similarité avec la protéine K1L du virus de la vaccine Copenhagen (15) qu'avec toute autre
.. protéine dans les bases de données PIR ou Swiss-Prot
35

(valeurs non indiquées). Ce fait couplé aux valeurs dérivées par l'analyse des tâches de Southern suggère que le produit de gène M1L pourrait remplir une fonction similaire relative au domaine de répliquabilité chez l'hôte que le produit de gène K1L.

5 C'est pourquoi, parmi les quatre gènes potentiels répliquables chez l'hôte humain, le gène M1L a été testé d'abord dans le système de sélection du domaine de répliquabilité chez l'hôte du virus de la vaccine vP293 pour tester sa capacité à permettre la croissance du virus de la
10 vaccine sur des cellules humaines. Pour recombiner le gène pour M1L et les gènes subséquents dans le système de sélection de vP293, on a utilisé comme plasmides vecteurs pMP528 (Exemple 1) et son dérivé pMP528E (Exemple 2). pMP528 est le plasmide de suppression de vaccine original à partir duquel
15 le recombinant de vaccine vP293 a été déduit. pMP528 contient un site SalI à la jonction de suppression entre les bras de flancs de la vaccine dérivés des régions d'ADN de la vaccine HindIII C / HindIII K. Dans pMP528E, le bras de flanc droit qui dérive de l'ADN HindIII K de la vaccine a
20 été raccourci et ainsi le site SmaI a été substitué au site SalI original à la jonction de suppression HindIII C / HindIII K.

L'essai des gènes potentiels répliquables chez l'hôte de la vaccine dans le système vP293 est représenté
25 schématiquement sur la Figure 11. La carte de HindIII à l'extrémité gauche du génome du virus de la vaccine est donnée sur la ligne supérieure. Les emplacements des gènes sont indiqués à l'intérieur de boîtes, la direction de transcription étant indiquée par des flèches. L'emplacement
30 des fragments de vaccine utilisés pour tester l'activité de répliquabilité chez l'hôte des gènes est indiqué par des auges.

Un fragment d'ADN s'étendant de l'extrémité 3' de M2L (position 9384, 55 bases en amont à partir du codon
35 d'amorçage de M1L) jusqu'au site ScaI (position 7906) en

aval de M1L a été lié dans pMP528E coupé au moyen de SmaI (Figure 11). Le plasmide résultant, à savoir pMP528M, a été utilisé comme plasmide donneur pour recombinaison avec le virus de la vaccine vP293. Bien que l'analyse avec une sonde d'ADN marquée au ^{32}p du gène M1L ait révélé que les séquences du M1L étaient insérées dans la vaccine, le virus de progéniture ne forme pas de plaques sur des cellules de MRC-5.

Etant donné que la dimension de la région de promoteur nécessaire pour l'amorçage de la transcription du gène M1L est inconnue, il est possible que les 55 bases en amont des séquences de codage de M1L dans le plasmide pMP528 n'étaient pas suffisantes pour spécifier la transcription du gène M1L. C'est pourquoi un plus grand fragment d'ADN du virus de la vaccine souche Copenhagen contenant tous les gènes pour M2L, M1L et N2L a été essayé. Un fragment de HpaI de 2849 bp (positions 7307 -10 155) a été obtenu par digestion partielle avec HpaI de pSD420, un clone SalI de l'ADN du virus de la vaccine Copenhagen (positions 1 - 10 477). Ce fragment de HpaI contient tous les gènes pour M2L (positions 10 043 - 0381), M1L (positions 9329 - 7985) et N2L (positions 7943 - 7416). Le fragment de HpaI a été cloné en pMP528E coupé au moyen de SmaI (Figure 11). Le plasmide résultant, désigné pMPm12n2 sur la Figure 3 a été utilisé comme plasmide donneur pour recombinaison avec vP293. Bien que l'analyse avec des sondes d'ADN marquées au ^{32}p ait indiqué que les trois gènes ont été insérés dans la vaccine, la progéniture virale recombinante n'a pas formé de plaques sur des cellules de MRC-5. Ceci indiquait que M1L et N2L n'étaient pas les gènes ou le gène présomptifs répliquables chez l'hôte. On ne s'attendait pas à ce que le M2L soit le gène répliquable chez l'hôte étant donné que le gène pour M2L est entièrement contenu dans le fragment de BglII A de EcoRI K testé précédemment (15).

Les autres gènes éventuellement répliquables chez

l'hôte humain du virus de la vaccine étaient K2L, qui manque dans le mutant répliquable chez l'hôte de 18 kb et est tronqué dans VP293, et C7L, un ORF dans HindIII C qui couvre la jonction EcoRI C/J et présente la capacité de codage pour une protéine de 18 kDa.

Le gène K2L décrit ici correspond au "ORF K1L" rapporté précédemment (52) pour la vaccine souche WR, mais diffère par deux substitutions d'acides aminés. Le mutant de suppression du virus de la vaccine, VP293, contient la masse des séquences de codage pour K2L immédiatement à droite de la jonction de suppression dans HindIII K (équivalent au site SalI en position 11 412). Pour tester le gène K2L (positions 12 367 - 11 258) en ce qui concerne sa capacité de permettre la croissance virale de la vaccine sur des cellules humaines, l'extrémité 3' du gène K2L de la vaccine a été restaurée sur le plasmide pMP528. Des polylinkers ou agents de polyliations synthétiques MPSYN52 (5'ATTATTTTATAAGCTTGGATCCCTCGAGGGTACCCCCGGGAGCTCGAATTCT3') et MPSYN53 (5'AGAATTCGAGCTCCCCGGGGGTACCCTCGAGGGATCCAAGCTTATAAAAATAAT3') ont été recuits (hybridés) et liés dans le site SspI (position 11 177) en aval du gène K2L dans un sous-clone plasmidique de HindIII K Copenhagen, et un fragment XhoI/SalI contenant l'extrémité 3' du gène K2L a été isolé. Le plasmide pMP528 a été coupé au moyen de SalI et le fragment XhoI/SalI contenant l'extrémité 3' du gène K2L a été inséré suivant l'orientation correcte (Figure 11). Le plasmide résultant, à savoir pMP528K2, a été utilisé comme plasmide donneur pour recombinaison avec le virus de la vaccine VP293. Une fois encore, la progéniture virale de la vaccine recombinante a été incapable de former des plaques sur des cellules de MRC-5, ce qui indique que K2L n'était pas le gène répliquable chez l'hôte humain.

Le gène CL7 de la vaccine Copenhagen décrit ici correspond exactement, en ce qui concerne les acides aminés

au gène WR de 18 kDa précédemment rapporté (40). Pour tester le gène C7L (positions 1314 - 863) pour sa capacité de répliquabilité chez l'hôte, le plasmide pSD420 a été coupé au moyen de BamHI et BglII et un fragment de 1040 bp s'étendant du site BamHI, en position 724, au site BglII, en position 1764, a été isolé. Ce fragment BglII/BamHI, qui contient la totalité du gène pour C7L a été lié en pMP528K2 qui a été coupé au moyen de BamHI (Figure 11). Lorsque le plasmide résultant, à savoir pMP528C7L, a été utilisé comme plasmide donneur pour recombinaison avec le virus de vaccine vP293, une progéniture virale a été produite qui forme des plaques sur les cellules de MRC-5. Ceci indiquait que C7L, comme K1L, était un gène répliquable chez l'hôte capable de spécifier la croissance sur des cellules humaines. Etant donné que le gène C7L recouvre la jonction EcoRI C/J, il n'avait pas été testé précédemment (14).

Exemple 8 - SUPPRESSION DU GENE C7L DE LA SOUCHE COPEN-
HAGEN DU VIRUS DE LA VACCINE

Etant donné que, de même que le K1L, le gène C7L du virus de la vaccine est capable de restaurer la capacité du mutant de suppression vP293 de la vaccine, souche WR, de former des plaques sur des cellules humaines, l'effet de la suppression du gène C7L de la souche Copenhagen de la vaccine, à la fois comme une seule suppression et comme une double suppression, a été investigué avec l'autre gène répliquable chez l'hôte, à savoir K1L.

La préparation ou construction de plasmides pour la suppression du gène pour C7L et la production de recombinants de la vaccine supprimés pour C7L ont été représentés schématiquement sur la Figure 12. Une carte de HindIII de l'extrémité de gauche du génome de la vaccine est représentée sur la ligne supérieure. Le gène C7L est indiqué par une boîte avec des bandes, la direction de transcription étant indiquée par une flèche. Les extrémités du fragment de DNA de BamHI-BglII (positions 725 - 1764) dérivé du plasmide pSD420

ont été rendues franches au moyen d'un fragment de Klenow de l'E. Coli polymérase et le fragment a été lié en pUC18 qui a été coupé au moyen de PvuII, en produisant le plasmide pMP420BB (Figure 12). pMP420BB a été linéarisé au moyen d'EcoRV, qui coupe à l'intérieur des séquences de codage pour C7L, et on a inséré un fragment d'ADN terminé par SmaI de 3,2 kb, consistant en une cassette du promoteur de 11 kDa de la vaccine (flèche foncée)/B-galactosidase (boîte avec des pointillés foncés, la direction du gène étant indiquée par une flèche). Le plasmide résultant, à savoir pMPC7LKBG, contient la cassette promoteur de 11 kDa/B-galactosidase dans une orientation de gauche à droite par rapport aux séquences de la vaccine. On a réalisé une recombinaison en utilisant le plasmide donneur pMPC7LKBG et un virus de la vaccine Copenhagen de sauvetage, à savoir vP410, ce qui a produit de la vaccine recombinante, à savoir vP665, qui a été identifiée comme une plaque bleue en présence de X-gal.

Pour supprimer le gène C7L de pMP420BB, le plasmide a été linéarisé par coupure au site unique SacI (position 999) dans le gène CL7, suivi par la digestion avec l'exonucléase Bal 31. La mutagenèse (53) a été réalisée sur le patron ou gabarit à double brin en utilisant un oligonucléotide synthétique 46-mer MPSPYN234 (5' TGTCATTTAACACTA TACTCATATACTGAATGGATGAACGAATACC 3'). Dans le plasmide résultant, à savoir pMPC7 Δ , le gène C7L est supprimé (le site de suppression étant indiqué par un triangle, Figure 12), en laissant des bras de vaccine sur le flanc de 140 bp à gauche et 400 bp à droite. On a utilisé pMC7 Δ comme plasmide donneur pour éliminer les séquences gène CL7 interrompu/promoteur de 11 kDa/galactosidase du vP665, en engendrant le vP706, qui a été identifié en tant que plaque incolore en présence de X-gal. vP665 et vP706 croissant tous deux sur des cellules de MRC-5. Ceci était attendu étant donné que ces recombinants contiennent encore le gène répliquable chez l'hôte K1L.

Pour créer un virus privé des gènes à la fois pour K1L et C7L, on a utilisé pMPC7LKBG comme plasmide donneur pour recombinaison avec le virus recombinant vP661 de la vaccine avec suppression de K1L. Le virus résultant vP683 a été choisi en tant que plaque bleue en présence de X-gal. Le gène C7L a été supprimé du virus recombinant de la vaccine vP683 par recombinaison avec le plasmide donneur pMPC7. Le virus de la vaccine recombinant à double suppression qui en résulte a été choisi comme plaque incolore en présence de X-gal. vP683 et vP716 ne forment ni l'un ni l'autre de plaques sur les cellules de MRC-5, ce qui indique que la suppression des deux gènes K1L et C7L est suffisante pour empêcher la croissance du virus de la vaccine sur des cellules humaines.

Le Tableau 2 compare la capacité des gènes des virus de la vaccine à restaurer les fonctions de répliquabilité chez l'hôte au mutant de suppression du virus de la vaccine, à savoir vP293. Ce que l'on compare est la capacité relative de se répliquer sur des cellules humaines ou de singe après que les gènes indiqués ont été réintroduits dans le virus de la vaccine vP293 par recombinaison.

TABLEAU 2

Virus	Gènes insérés	Titre (pfu/ml)	
		VERO	MRC-5
VP293	M1L	$1,7 \times 10^5$	0
VP293	K2L	$2,5 \times 10^5$	0
VP293	M2L, M1L, N2L	$1,5 \times 10^5$	0
VP293	K1L	$1,7 \times 10^5$	$4,7 \times 10^3$
VP293	C7L	$1,4 \times 10^5$	$5,9 \times 10^3$

Exemple 9 - GENE DU COWPOX CODANT UN PRODUIT DE 77 kDA

Contrairement au virus de la vaccine, le virus du cowpox (virus de la variole de la vache) est capable de se développer sur des cellules

d'ovaire d'hamster chinois (CHO). Une région du génome du cowpox qui permet la réplication du virus de la vaccine sur des cellules de CHO a été identifiée (54). Le gène du cowpox et le promoteur ont la carte d'un fragment de HpaI de 2,3 kb. Le gène code un produit de traduction prévu de 77 kDa. Le gène de cowpox n'a pas d'homologie significative au niveau de l'ADN ou de la protéine, avec aucun des deux gènes répliquables chez l'hôte humain du virus de la vaccine, à savoir K1L (54), C7L décrits ici.

En se référant maintenant à la Figure 13, comme préliminaire à l'expression du gène de cowpox de 77 kDa dans les systèmes de vaccine présents, on a digéré l'ADN de cowpox au moyen de HpaI, et le fragment de 2,3 kb contenant le gène et son promoteur a été isolé à partir d'un gel d'agarose. Pour flanquer le gène au moyen d'agents de polyliaison (polylinkers), le fragment HpaI de cowpox a été lié en pIBI25, digéré par SmaI (International Biotechnologies, Inc., New Haven, CT), en engendrant pCP3 (Figure 13). Pour insertion dans la vaccine, le gène de cowpox a été cloné dans la région de suppression d'ATI du plasmide vecteur Copenhagen PSD494VC comme décrit ci-dessus.

L'équivalent de la vaccine de la région du gène ATI de cowpox dans la souche WR de vaccine a été localisé en faisant la séquence des clones appropriés de la vaccine WR en utilisant des initiateurs ou promoteurs de départ synthétisés en conformité avec la séquence d'ADN publiée à l'extrémité 5' de la séquence de codage ATI du cowpox (47). Contrairement au cowpox, dont le gène ATI code une protéine de 160 kDa, le gène de contrepartie de la vaccine WR code une protéine de 94 kDa (voir également 48). Contrairement à la souche WR, la souche Copenhagen du virus de la vaccine contient une suppression de 4,1 kb englobant l'extrémité 5' du gène équivalent de l'ATI et l'extrémité 3' du gène qui le précède immédiatement. Les parties restantes des deux ORF sont jointes en une structure ou cadre pour reproduire un

ORF hybride de 966 bp. Le plasmide vecteur Copenhagen pSD494VC est un sous-clone plasmidique XbaI/BglII du HindIII A Copenhagen dans lequel l'ORD hybride formé par la fusion du gène de contrepartie de l'ATI de cowpox dans la souche Copenhagen et son voisin amont sont remplacés par la région de polyliaison. La région de polyliaison consiste en la séquence

5' AGATCTCCCGGAAGCTTGGATCCGAGCTCCTCGAGGAATTCGTTAAC 3' spécifiant les sites de restriction BglII, SmaI, HindIII, BamHI, SstI, XhoI, EcoRI et HpaI. pSD494VC contient 0,7 kb d'ADN de vaccine de flanc à gauche de la région de polyliaisons et 1,3 kb d'ADN de vaccine de flanc à droite de la région de polyliaisons.

Le fragment EcoRI-BamHI de 2,3 kb contenant le gène de 77 kDa de cowpox et son promoteur ont été isolés à partir de pCP3. Ce fragment a été lié dans la région de polyliaison de pSD494VC, coupé au moyen d'EcoRI et de BamHI, en engendrant le plasmide pCP5 (Figure 13). Comme attendu, la recombinaison entre pCP5 contenant le gène de cowpox de 77 kDa et le virus vP410 de vaccine Copenhagen a produit un virus recombinant, à savoir vP695, qui a été capable de former des plaques sur des cellules de CHO.

Le test pour savoir si le gène répliquable chez l'hôte CHO de cowpox de 77 kDa est également capable de spécifier la croissance du virus de vaccine sur des cellules humaines, une recombinaison a été réalisée entre la plasmide pCP5 contenant le gène de cowpox de 77 kDa et vP293, le mutant de suppression, répliquable chez l'hôte, de la vaccine WR qui ne forme pas de plaques sur des cellules humaines. Le virus progéniture recombinant vP698, formait des plaques sur des cellules de MRC-5. Ceci indique que, en plus d'être un gène du domaine de répliquabilité chez l'hôte CHO, le gène de cowpox de 77 kDa, comme les gènes de vaccine K1L et C7L, est également un gène répliquable chez l'hôte humain (Figure 13).

A la lumière de l'observation que le gène du virus

de cowpox de 77 kDa est capable de spécifier la croissance du virus de la vaccine à la fois sur CHO ET les cellules humaines MRC-5, il était intéressant de déterminer les rôles de C7L et K1L, les deux gènes répliquables chez l'hôte humain de la vaccine, sur la capacité du virus de la vaccine de se répliquer in vitro sur des cellules dérivées d'autres espèces. Egaleme^{nt}, il était intéressant de déterminer si d'autres gènes codés pour la vaccine étaient exigés d'une manière spécifique pour la croissance de la vaccine sur des cellules d'autres espèces. Initialement, les séries de mutants de suppression C7L et K1L du virus de la vaccine Copenhagen ont été essayés en ce qui concerne leur capacité de former des plaques sur des cellules de LLC-PK1, une lignée de cellules dérivées du rein de porc.

Des monocouches confluentes de cellules de VERO, MRC-5 et LLC-PK1 ont été infectées, dans des boîtes de 60 mm, au moyen de dilutions en série de 10 fois du virus dans 200 µl en volume de MEM Eagles + 2 % de sérum de veau nouveau né. Après une période d'absorption de 1 heure, l'inoculum a été enlevé et les monocouches ont été surmontées d'une couche de 5 ml de MEM Eagles contenant 0,7 % de Seakem Le Agarose et 10 % de sérum de veau nouveau-né. Les boîtes ont été incubées à 37°C. Quatre jours après l'infection, les monocouches ont été tachées par addition d'une couche supplémentaire consistant en 5 ml d'agarose à 0,6 % contenant 0,04 % de couche neutre. Des plaques ont été observées 6 heures après la souillure.

Comme illustré sur le Tableau 3A, les mutants de suppression Copenhagen montrent des capacités identiques de formation de plaques sur des cellules LLC-PK1 de rein de porc en comparaison avec les cellules MRC-5 humaines. Des virus recombinants qui ont subi une suppression soit pour K1L (vP661), soit pour C7L (vP706), tout en retenant l'autre gène répliquable chez l'hôte humain, ont formé des plaques à la fois sur des cellules de MRC-5 et des cellules de LLC-

PK1. Le virus recombinant ayant subi des suppressions à la fois pour K1L et C7L (vP716) n'a pas formé de plaques ni sur les cellules de MRC-5, ni sur les cellules de LLC-PK1. Ainsi, sur la base du critère de la capacité de former des plaques in vitro sur la lignée de cellules LLC-PK1, les deux gènes K1L et C7L, répliquables chez l'hôte humain, de la vaccine sont également des gènes répliquables chez l'hôte porcin. Comme observé avec la lignée de cellules humaines MRC-5, la présence soit de K1L soit de C7L dans le génome de la vaccine est suffisante pour permettre la formation de plaques du virus de la vaccine Copenhagen sur des cellules LLC-PK1 de rein de porc. Comme dans le cas des gènes répliquables chez l'hôte humain de la vaccine, K1L et C7L sont les seuls gènes répliquables chez l'hôte porcin de la vaccine codés dans la souche Copenhagen du virus de la vaccine, étant donné que le virus vP716 (K1L⁻; C7L⁻) de la vaccine recombinante ne forme pas de plaques sur des cellules LLC-PK1.

Ces résultats ont été confirmés en utilisant du virus recombinant de la vaccine contenant les gènes répliquables chez l'hôte insérés dans le mutant vP293 de suppression de la vaccine WR (Tableau 3B). Comme attendu, vP293, qui comporte une grande suppression qui va de la région C7L à la région K1L, ne présente pas la capacité de former des plaques sur des cellules de LLC-PK1. L'insertion du gène pour K1L dans vP293 est suffisante pour permettre la croissance de la vaccine recombinante résultante (vP457) sur des cellules de LLC-PK1. Cependant, comme on l'a vu avec des cellules humaines de MRC-5, l'insertion du gène M1L dans le mutant de suppression WR, à savoir vP293, n'est pas suffisante pour permettre la formation de plaques du virus résultant (vP596) sur des cellules de LLC-PK1 (Tableau 3B).

Lorsque soit le gène CL7 ou K1L du virus de la vaccine, soit le gène du virus de cowpox de 77 kDa est inséré dans le mutant de suppression WR, à savoir vP293, la

capacité de former des plaques sur des cellules humaines MRC-5 est restaurée (Tableau 3B). De mêmes les virus recombinants de la vaccine basés sur vP293, qui contiennent soit C7L (vP638) soit le gène de cowpox de 77 kDa (vP698), forment des plaques sur des cellules de LLC-PK1. Ainsi, le gène de cowpox de 77 kDa, en plus d'être un gène répliquable chez l'hôte pour l'ovaire d'hamster chinois (54) et les cellules humaines, est également un gène répliquable chez l'hôte pour les cellules porcines.

10 TABLEAU 3

<u>A. Mutants de suppression à base de Copenhagen</u>					
Virus	Suppression	VERO	MRC-5	LLC-PK1	CHO
15 vP410		+	+	+	-
vP661	K1L	+	+	+	-
vP706	C7L	+	+	+	-
vP716	K1L, C7L	+	-	-	-
vP668	(C7L - K1L) +	+	-	-	-
<u>B. Mutants de suppression basés sur vP293 WR</u>					
Virus	Suppression	VERO	MRC-5	LLC-PK1	CHO
25 vP293		+	-	-	-
vP457	K1L	+	+	+	-
vP596	M1L	+	-	-	-
vP638	C7L	+	+	+	-
vP698	cowpox de 77dKa	+	+	+	+

30

Exemple 10 - CROISSANCE DE MUTANTS DE SUPPRESSION COPENHAGEN SUR DES LIGNEES DE CELLULES HUMAINES

35 Dans les conditions habituelles de croissance (3 jours, revêtement d'agar Noble Difco), le mutant de

suppression WR, à savoir vP293, n'a pas formé de plaques sur des monocouches de cellules MRC-5 humaines. Cependant, avec une durée accrue d'incubation ou une modification de la couche de revêtement d'agar, le vP203 peut former de petites
5 plaques sur des monocouches de cellules de MRC-5. D'une manière spécifique, l'utilisation de 0,6 % à 1 % d'agarose Seakem ou d'agarose à bas point de fusion pour constituer la couche de revêtement, à la place d'agar, favorise la formation de petites plaques du virus vP293 sur des cellules de
10 MRC-5. La progéniture de vaccine recombinante produite par recombinaison entre vP293 et des plasmides basés sur pHES contenant le gène K1L (Exemple 3) forme de larges plaques sur une monocouche de MRC-5, qui se distinguent clairement de l'arrière-plan au fond des petites plaques de vP293.
15 C'est pourquoi la capacité de vP293 et du jeu Copenhagen de mutants de suppression du domaine de répliquabilité chez l'hôte humain pour réaliser une infection limitée sur des cellules de MRC-5 et VERO sous une couche de revêtement liquide a été investiguée.

20 Des flasques T-75 en double exemplaire ont été ensemencées avec 5×10^6 cellules MRC-5 ou VERO comme indiqué. Après deux jours, des monocouches confluentes ont été infectées à un moi de 0,01 pfu par cellule (titre d'introduction 10^3 pfu par flasque) de virus de vaccine
25 comme indiqué dans le Tableau 3 dans un volume de 0,5 ml MEM + sérum de veau nouveau-né (NCS). Après une période d'adsorption d'une heure, 10 ml du milieu ont été ajoutés à chaque flasque. Une flasque de chaque jeu a été congelée immédiatement (échantillon de 1 hpi). Les flasques restantes ont
30 été incubées à 37° jusqu'à 96 hpi et ensuite congelées. Des virus de tous les échantillons ont été collectés par trois cycles de congélation et de décongélation et titrés sur des cellules de VERO.

Les cellules de MRC-5 et de VERO ont été infectées
35 à un moi de 0,01 pfu par cellule. Après une incubation de 96

heures (96 hpi), le virus a été récolté et titré sur des cellules de VERO. Des mutants Copenhagen comportant des suppressions d'un des gènes répliquables chez l'hôte humain vP661 (C7L⁺, K1L⁻) et vP706 (C7L⁻, K1L⁺) ont montré une multiplication sensiblement égale (3 à 4 log₁₀) tant sur les cellules de MRC-5 que sur les cellules de VERO, ce qui est équivalent au contrôle par vP410 (C7L⁺, K1L⁺). Les mutants Copenhagen supprimés des deux gènes répliquables chez l'hôte humain vP716 (C7L⁻, K1L⁻) et vP668 ([C7L à K1L]⁻) aussi bien que le mutant de suppression WR, à savoir vP293 (suppression de 21,7 kb) ont montré une multiplication sur les cellules de VERO approximativement équivalente à vP410, vP661 et vP706. La multiplication des virus de mutants de suppression vP716, vP668 et vP293 a été nettement positive sur les cellules humaines de MRC-5, bien que dramatiquement réduite si on la compare à la multiplication de ces virus sur des cellules de VERO. Dans les conditions utilisées ici, tous les trois virus de vaccin vP716, vP668 et vP293, qui ont subi une suppression pour les deux gènes, répliquables chez l'hôte humain, de la vaccine, K1L et C7L, sont capables de produire, mais d'une manière grandement restreinte, l'infection de cellules humaines de MRC-5 (une multiplication d'environ 10 fois pendant une infection de 96 h). Ces résultats, montrés sur le Tableau 4 concordent avec les rapports précédents d'une multiplication par 2,3 pendant une infection de 36 h (6).

30

35

TABLEAU 4
Croissance de mutants de suppression de la vaccine
sur des cellules de VERO et de MRC-5

5			Titre à 96 hpi ¹		Multiplication du Virus ²	
	Virus	Suppressions	VERO	MCR-5	VERO	MCR-5
10	VP410	-	$1,9 \times 10^7$	$1,0 \times 10^6$	5588	6250
	VP661	K1L	$3,8 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	9268	3335
	VP706	C7L	$2,3 \times 10^7$	$8,6 \times 10^6$	10000	3440
	VP716	C7L, K1L	$1,3 \times 10^7$	$3,4 \times 10^4$	4375	11
	VP668	(C7L - K1L)	$8,0 \times 10^6$	$6,4 \times 10^4$	2857	21
	VP293	(WR de 21,7 kb)	$6,9 \times 10^6$	$6,4 \times 10^3$	3833	7

- 15 -----
- 1 le titre initial est égal à 10^3
- 2 le rapport du titre à 96 hpi (heures après infection)
au titre à 1 hpi (fin de la période d'adsorption).

20 Pour déterminer si le virus de la vaccine
comportant une suppression pour les gènes répliquables chez
l'hôte humain, C7L et K1L, étaient capables d'une multipli-
cation limitée sur des lignées de cellules humaines autres
que MRC-5, la multiplication du mutant VP668 du virus de la
25 vaccine Copenhagen (suppression de CL7 à K1L) sur ces trois
lignées de cellules humaines supplémentaires comparées aux
cellules de MRC-5 et de VRO a été examinée (Tableau 5).

Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes
de 60 mm avec $1,5 \times 10^6$ cellules par boîte deux jours avant
30 l'infection. Le virus de la vaccine VP470 ou VP468 à un moi
de 0,01 pfu par cellule dans un volume de 0,5 ml de MEM +
5 % de sérum de veau nouveau-né (NCS) a été ajouté aux
boîtes en double contenant des monocouches de chaque lignée
cellulaire.

35 Après une période d'adsorption de 1 heure, 4 ml de

milieu ont été ajoutés à chaque boîte et la moitié des boîtes a été congelée (échantillon 1 hpi). Les boîtes restantes ont été soumises à une incubation à 37°C jusqu'à 96 hpi, ensuite congelées (échantillon de 96 hpi). Tous les échantillons ont été recueillis par trois cycles de congélation et décongélation et les virus titrés sur des cellules de VERO. Deux boîtes ont été infectées pour chaque instant ou point temporel et les titres ont été moyennés. La multiplication de chaque virus sur chaque lignée de cellules est exprimée en tant que rapport du titre obtenu à 96 hpi au titre à 1 hpi.

Tableau 5

Multiplication des virus vP410 et vP668 de la vaccine Copenhague sur des lignées¹ de cellules de singe et humaines

Lignée cellulaire	<u>Virus</u>		<u>rendement² en %</u>
	vP410	vP668	vP668/vP410

de singe			
VERO	70.212	13.103	18,6
humaine			
MRC-5	7.333	10	0,14
WISH	19.480	0,4	0,002
HeLa	50.000	0,4	0,0008
Détroit	9.660	2,8	0,03

1 Lignées de cellules utilisées : VERO ; ATCC CCL 81 de rein de singe ; MRC-5 : ATCC CCL 171 de poumon embryonnaire humain ; HeLa : col de l'utérus humain, ATCC CCL 2 de carcinome épithélioïde, WISH : amnion humain (marqueurs HeLa) ATCC CCL 25 ; Détroit : ATCC CCL 54 de prépuce humain.

2 Rendement en % vP668/vP410 pour chaque lignée cellulaire est le rapport de la multiplication de vP668 (96 hpi/1 hpi) divisée par la multiplication de vP410 (96 hpi/1 hpi) x 100.

Le virus vP668 manifeste une multiplication logarithmique de 1 sur des cellules de MRC-5 pendant une période d'incubation de 96 heures. Le rendement du virus vP668, 96 heures après l'infection (96 hpi) de la ligne cellulaire de Détroit (prépuce humain), est égale à 2,8 fois le titre qui suit l'absorption du virus (1 hpi). Pour les lignes cellulaires WISH (amnion humain) et HeLa (carcinome épithélioïde du col de l'utérus humain), les rendements du virus vP668 à 96 hpi était inférieur à celui observé après l'adsorption à 1 hpi, ce qui indique qu'il n'y a pas de réplication virale du mutant vP668 de suppression de la répliquabilité chez l'hôte de la vaccine Copenhagen sur ces lignes cellulaires. Toutes ces lignes cellulaires étaient permissives pour le virus de la vaccine, comme montré par la multiplication du virus de contrôle vP410. D'autres ont également trouvé des différences dans la capacité de différentes lignées cellulaires humaines de supporter la croissance de leur mutant de la répliquabilité chez l'hôte (6).

Exemple 11 - MUTANTS DE LA REPLICABILITE CHEZ L'HOTE DE VIRUS DE LA VACCINE EN TANT QUE VECTEURS DE VACCINE

Des mutants de la répliquabilité chez l'hôte du virus de vaccine seraient très avantageux en tant que vecteurs de vaccine recombinante. La réduction ou l'absence de réplication devrait accroître la perception de sécurité étant donné que le vecteur viral est défectueux en réplication chez l'espèce en cause, par exemple l'homme ou le porc comme décrit ci-dessus. Ceci réduirait avantageusement la possibilité d'une infection qui s'emballerait du fait de la vaccination chez l'individu vacciné et diminuerait également la transmission d'individu vacciné à individu non vacciné ou la contamination de l'environnement.

A cet effet, ces mutants de la répliquabilité chez l'hôte sont utiles comme vecteurs de vaccine. Le mutant de

suppression vP293 (Exemple 3) abrite un élément génétique étranger. En outre, à cette fin, des recombinants contenant des gènes de virus de la pseudo-rage (une vaccine de porc appropriée) et des recombinants exprimant la glycoprotéine du virus de la rage (qui est d'intérêt non seulement pour des applications vétérinaires, mais également pour des applications humaines) ont également été préparés et sont décrits ci-dessus. On peut facilement apprécier qu'une variété de gènes étrangers peut être utilisée dans ces mutants de la répliquabilité chez l'hôte. En outre, on peut se rendre facilement compte que des espèces supplémentaires, en plus de celles citées dans la présente demande peuvent être marquées pour la restriction du domaine de répliquabilité chez l'hôte de ces mutants de la vaccine par les procédés décrits ici.

En outre, on peut facilement se rendre compte que des gènes supplémentaires répliquables chez l'hôte existent dans le poxvirus. Par exemple, la souche de la vaccine MVA a été reconnue comme étant atténuée, particulièrement chez les animaux dont on a supprimé l'immunité. Récemment, on a rapporté que le gène répliquable chez l'hôte humain, K1L, est partiellement supprimé dans le MVA (55). La présente analyse du génome de MVA confirme la suppression rapportée dans le gène de K1L, mais indique que le second gène répliquable chez l'hôte humain, à savoir C7L, est présent dans MVA, même si le virus de la vaccine MVA ne forme pas de plaques sur les cellules humaines. La région de promoteur en amont du gène C7L dans MVA est identique à la région amont dans le Copenhagen présenté ici. La séquence d'acides aminés du produit de traduction C7L putatif pour MVA est identique à celui du Copenhagen. Ceci indique que le gène répliquable chez l'hôte humain C7L, qui tant dans le WR que dans le Copenhagen semble être fonctionnellement équivalent au gène répliquable chez l'hôte humain K1L, est incapable en lui-même de spécifier la croissance du virus de la vaccine MVA sur

des cellules humaines. En outre, le remplacement du gène K1L défectueux dans MVA par le gène K1L intact du Copenhagen ne confère pas au virus recombinant de la vaccine hybride la capacité de croître sur des cellules humaines.

5 Le virus de la vaccine MVA est également gène dans sa capacité de croître sur des cellules de singe, ce qui suggère l'existence d'autre(s) gène(s), répliquable(s) chez l'hôte, non encore identifié(s). En utilisant des approches
10 similaires à celles utilisées ici, il devrait être possible de définir les gènes nécessaires pour ces restrictions.

De plus, il est bien reconnu que d'autres poxvirus tels que l'avipox et le pox porcine sont restreints en ce qui concerne l'hôte au point de vue répliquabilité chez les espèces aviaire et porcine, respectivement. Ces restrictions en ce
15 qui concerne l'hôte suggèrent clairement l'existence d'un certain nombre de gènes répliquables chez l'hôte dans les poxvirus. La définition de ces gènes par les moyens définis ici peut accroître le répertoire ou gamme des vecteurs de poxvirus préparés pour la répliquabilité chez l'hôte.

20 Exemple 12 - INSERTION DE GENES GLYCOPROTEINIQUES DE LA RAGE DANS LE LOCUS DE SUPPRESSION TK DE DIFFERENTS MUTANTS DE SUPPRESSION DE LA VACCINE COPENHAGEN

La glycoprotéine de la rage a été choisie comme
25 antigène étranger type pour insertion dans différents mutants de suppression de la vaccine Copenhagen pour permettre l'analyse comparée des effets relatifs de ces suppressions. Le gène pour la glycoprotéine de la rage (18, 42) a été placé sous le contrôle du promoteur H6 de la vaccine
30 synthétique. Cette cassette d'expression a été insérée dans le plasmide vecteur pSD513VC de suppression TK Copenhagen. pSD5123VC est un sous-clone du fragment HindIII J de la vaccine Copenhagen dans lequel les séquences de codage pour le gène de thymidine kinase (TK) (56) sont remplacées par
35 une région de polyliaison ou polylinker. La région de

polyliaison consiste en la séquence 5' CCCGGGAGATCTCTC-
 GAGCTGCAGGGCGCCGGATCC 3' spécifiant les sites de restriction
SmaI, BglII, XhoI, PstI, NarI et BamHI. Le plasmide résultant
 contenant le gène glycoprotéinique de la rage a été
 5 désigné par pRW842. Dans pRW842, les séquences de codage
 pour le gène TK de la vaccine sont remplacées par la
 cassette promoteur H6/ gène glycoprotéine de la rage qui
 est orienté suivant une orientation de gauche à droite par
 rapport aux bras de flanc de la vaccine. La recombinaison
 10 entre pRW842 et tout virus de la vaccine donne un virus TK
 minus qui contient le gène glycoprotéine de la rage sous le
 contrôle du promoteur H6.

La combinaison a été réalisée entre pRW842 et le
 jeu de virus de la vaccine Copenhagen contenant des suppres-
 15 sions d'un ou des deux gènes répliquables chez l'hôte humain.
 Le jeu résultant de recombinants de la vaccine contenant le
 gène glycoprotéinique de la rage se trouve dans la liste du
 Tableau 6. Des cellules de singe (VERO) ont été infectées
 avec le jeu de recombinants de la vaccine contenant le gène
 20 de la rage. Des précipitations immunes ont été réalisés en
 utilisant un anticorps monoclonal spécifique pour la
 glycoprotéine de la rage (42). Tous les recombinants
 expriment le gène.

TABLEAU 6

25 Mutants de suppression du Copenhagen contenant
le gène glycoprotéine de la rage

	Virus	Plasmide	Virus	Expression de la glyco- Parent donneur recombinant Suppressions protéine de la rage

30	vP410	pRW842	vP744	TR +
	vP661	pRW842	vP745	TR, K1L +
	vP706	pRW842	vP746	TR, C7L +
	vP716	pRW842	vP750	TK, C7L, K1L +
	vP668	pRW842	vP752	TR, (C7L - K1L) +
35				-----

La vaccine recombinante vP750 contient le gène glycoprotéine de la rage sur un fond ou arrière-plan C7L⁻, K1L⁻. vP752 contient le gène de la rage dans un arrière plan de suppression (C7L à K1L). Etant donné que les deux gènes
5 répliquables chez l'hôte humain manquent dans ces deux recombinants de la vaccine, on ne doit pas s'attendre à une infection productrice des cellules humaines par ces recombinants. L'essai pour savoir si le gène de la rage peut être exprimé dans des cellules humaines en l'absence de
10 gènes répliquables chez l'hôte humain, des cellules de MRC-5 ont été infectées avec le jeu complet des recombinants de la rage, y compris vP750 et vP752. Dans tous les membres de la série ou jeu, l'immunofluorescence a été détectée à la surface des cellules infectées.

15 Exemple 13 - CLONAGE ET EXPRESSION DE GENES DE LA PSEUDO-RAGE (PRV) DANS UN ARRIERE-PLAN VP668

vp668, le mutant de suppression de la vaccine Copenhagen qui comporte une suppression recouvrant la région qui comprend les gènes répliquables chez les hôtes
20 humain et porcin (C7L à K1L) a été choisi comme vecteur de base. vp668 ne forme pas de plaques sur les cellules humaines de MRC-5 ou les cellules de rein de porc LLC-PK1 (voir Tableau 3). Les gènes de la pseudo-rage gII, gIII et gp50, qui contiennent des homologues aux gènes gB (57), gC (58) et
25 gD (59), respectivement, du virus de l'herpès simplex (HSV) ont été insérés dans le vecteur vp668 comme détaillé ci-après.

A. - Insertion du gène gII glycoprotéine PRV dans le locus de suppression HA du virus de vaccine Copenhagen

30 L'ADN PRC a été digéré avec BamHI et les fragments résultants ont été clonés en pBR322 coupé au moyen de BamHI. Le plasmide pPR9.25 contenant le fragment 1 de PRV BamHI (60) contient tout le gène pour la glycoprotéine PRV gII. Des portions de pPR9.25 contenant le gène pour gII (57) ont
35 été sous-clonés en pBR322, pUC18 et phage M13. La séquence

de nucléotides pour le gène gII a été déterminée (46).

Les séquences de codage pour le gène PRV gII ont été insérées dans le plasmide vecteur pTP15 de vaccine Copenhagen (50). Dans le plasmide résultant, pR18, le gène gII est localisé dans le locus de suppression de l'héماغلوتينine (HA) de la vaccine Copenhagen sous le contrôle du promoteur de vaccine H6. La recombinaison entre le plasmide pPR18 et le mutant de suppression vP668 de la vaccine Copenhagen a donné la vaccine recombinante vP726. Dans vP726, le gène PRV gII est inséré au locus de suppression HA sous le contrôle du promoteur précoce/tardif H6 de la vaccine. Tous le PRC DNA 5' et 3' étranger au gène a été éliminé. Une séquence spécifiant la fin de la transcription précoce de la vaccine (39) a été insérée en aval des séquences de codage de PRV gII.

B. - Insertion du gène PRV gp50 au locus de suppression ATI du virus du vaccin Copenhagen

L'ADN codant le gène pour la glycoprotéine PRV gp50 est localisé sur le fragment 7 de BamHI du génome PRV (61). Le plasmide pR7.1 contient le fragment de 7 PRV BamHI cloné au site BamHI de pBR322. Un sous-fragment par StuI/NdeI de pR7.1 contenant le gène entier pour PPRV gp50 a été sous-cloné dans le plasmide pPR22, en engendrant le pIBI25. La séquence de nucléotides pour le gène gp50 a été déterminée (46).

Les séquences de codage pour PRV gp50 ont été placées sous le contrôle du promoteur de vaccine précoce/intermédiaire équivalent aux séquences immédiatement à l'amont de I3L (62, 63). Cet élément promoteur a été utilisé précédemment pour exprimer des gènes étrangers dans les virus recombinants de la vaccine (31, 64). L'ADN correspondant aux séquences du promoteur en amont du cadre de lecture ouvert I3L (62) ont été synthétisés par une réaction en chaîne de polymérase (65) en utilisant des initiateurs oligonucléotides synthétiques P50PPBAM (5' ATCATCGGATCCCGG-

TGGTTTGCGATTCCG 3') et P50PPATG (5' GATTAAACCTAAATAATTG 3') et pMP1VC, un sous-clone du HindIII I Copenhagen, comme gabarit ou patron. Le fragment résultant a été digéré au moyen de BamHI pour engendrer une extrémité cohésive BamHI à l'extrémité 5' de la séquence du promoteur. L'extrémité 3' est restée avec une terminaison franche.

Les séquences de codage PRV gp50 ont été excisées du plasmide pPR22. Le plasmide pPR22 a été digéré avec NsiI, qui coupe 7 bp en amont de l'ATG et produit un surplomb en 3'. Le surplomb en 3' a été rendu franc à son extrémité par l'ADN polymérase T4 en présence de 2 mM dNTPs. L'ADN résultant a été digéré partiellement avec BglII et un fragment de 1,3 kb franc/BglII contenant le gène PRV gp50 a été isolé.

Le fragment de promoteur 126 bp I3L (BamHI/franc) et le gène gp50 de 1,3 kb contenant le fragment (franc/BglII) ont été liés en un plasmide pBS-SK (Stratagène, La Jolla, Californie), vecteur qui a été digéré au moyen de BamHI. Le plasmide résultant a été désigné pBSPRV50I3. La cassette d'expression contenant le promoteur I3L lié au gène PRV gp50 a été éliminée par digestion au moyen de BamHI suivie par digestion partielle au moyen de SmaI. Un fragment de 1,4 kbp contenant le gène promoteur I3L/PRVgp50 a été isolé et on a rendu franche son extrémité en utilisant le fragment de Klenow de l'E. Coli polymérase.

pSD541 est un plasmide de suppression Copenhagen dans lequel les bras de flanc pour la région de suppression ATI (voir pSD494VC) ont été engendrés par une réaction en chaîne de polymérase (PCR) (65) en utilisant des sous-clones de HindIII A Copenhagen en tant que gabarit ou patron. Des oligonucléotides synthétiques MPSYN267 (5'GGGCTGAAGCTTGCGGC-CGCTCATTAGACAAGCGAATGAGGGAC 3') et MPSYN268 (5'AGATCTCCCGGGCTCGAGTAATTAATTAATTTTATTACACCAGAAAAGACGGCTT-GAGATC 3') ont été utilisés comme initiateurs pour fabriquer un bras de vaccine de 420 bp à droite de la suppression. Les oligonucléotides MPSYN269 (5'TAATTACTCGAGCCCCGGGAGATCTAATTT-

AATTTAATTTATATAACTCATTTTTTGAATATACT 3') et MPSYN270
 (5' TATCTCGAATTCCCGCGGCTTTAAATGGACGGAAGTCTTTTCCC 3') ont été
 utilisés comme initiateurs pour fabriquer le bras de vaccine
 de 420 bp à gauche de la suppression. Les bras de vaccine de
 5 gauche et de droite engendrés ci-dessus ont été mélangés en-
 semble et étendus par une réaction en chaîne de polymérase
 supplémentaire pour engendrer un fragment d'ADN constitué
 par les bras de flanc gauche et droite de la vaccine séparés
 par des sites de restriction spécifiant la région de poly-
 10 liaison, à savoir BglII, SmaI et XhoI. Le fragment engendré
 par PCR a été coupé au moyen de HindIII et EcoRI pour obte-
 nir des extrémités collantes et lié en pUC8 coupé au moyen
 de HindIII et EcoRI. Le plasmide résultant est pSD541.

Le fragment a l'extrémité franche de 1,4 kb conte-
 15 nant le gène promoteur I3L/PRVgp50 a été inséré dans le
 plasmide vecteur Copenhagen pSD541 digéré au moyen de SmaI.
 Dans le plasmide résultant, à savoir pATIp50, le gène
 PRVgp50 est situé au locus de suppression ATI de la vaccine
 Copenhagen sous le contrôle de l'élément promoteur I3L de la
 20 vaccine de 126 bp. Dans pATIp50, tout le PRV ADN 3' étranger
 au gène a été enlevé. 7 bp de séquences de PRV étranger
 restent immédiatement en amont du PRVgp50 ATG. Une séquence
 de terminaison transcriptionnelle précoce de la vaccine (39)
 est située en aval des séquences de codage du PRVgp50. La
 25 recombinaison entre le plasmide pATIp50 et le mutant VP668
 de suppression de la vaccine Copenhagen a été réalisée.

C. - Insertion du gène gIII de glycoprotéine PRV au locus de
 suppression TK du virus de la vaccine Copenhagen

Les séquences de codage pour gIII glycoprotéine
 30 PRV correspondent en carte aux fragments 2 et 9 BamHI du
 génome du PRV (58). Les plasmides pPR9.9 et pPR7.35
 contiennent des fragments 2 et 9 de PRV BamHI respectivement
 clonés au site BamHI de pPR322. Un fragment SphI/BamHI
 contenant l'extrémité 5' du gène PRV gIII a été isolé de
 35 pPR9.9. Un fragment NcoI/BamHI contenant le restant du gène

gIII a été isolé de pPR7.35. La totalité du PRP gIII a été assemblée par liaison des deux fragments en pIBI25 en donnant le plasmide pPR17. La séquence de nucléotide pour le gène gIII a été déterminée (46).

5 Le gène PRV gIII a été placé sous le contrôle d'un élément promoteur u de la vaccine Copenhagen, ce qui a donné le plasmide pPR24 (la séquence du promoteur u de la vaccine est décrite dans l'Exemple 5, Figure 5). Une cassette d'expression contenant un élément promoteur u de la vaccine de 120 bp et le gène entier PRV gpIII a été excisé du plasmide pPR24 par digestion avec SnaBI (en position -120 en amont du codon d'amorçage) et avec DraI (en aval du gène PRV gIII). Le fragment à extrémité franche de 1,5 kb contenant le promoteur u/PRV gpIII a été isolé et lié au plasmide vecteur Copenhagen pSD513VC, digéré par SmaI, pour donner pPRVIIIICK. Dans pPRV000VCTK, les séquences de codage TK de la vaccine sont remplacées par le gène PRV gIII inséré en une orientation de la droite vers la gauche sous le contrôle de l'élément promoteur u de la vaccine Copenhagen de 120 bp. Toutes les séquences 5' et 3' de PRV étrangères au gène gIII ont été éliminées. La recombinaison entre le plasmide pPRVIIIICK et le mutant de suppression de la vaccine Copenhagen, à savoir vP668, a été réalisé.

25 D. - Expression de PRV gII dans la vaccine recombinante vP726

L'expression de PRV gII dans la vaccine Copenhagen recombinante vP726 a été essayée dans des cellules VERO, LLC-PK1 et MRC-5. vP726 contient PRV gII dans un arrière-plan ou fond de vP668 (suppression de C7L à K1L) et ainsi on ne s'attendrait pas à réaliser une infection productrice dans le LLC-PK1 du rein de porc et dans les cellules humaines MRC-5. Cependant, l'analyse immunofluorescente en utilisant un anticorps monoclonal spécifique au PRV gpII a démontré d'une manière surprenante l'expression du gène PRV gpII dans les cellules de porc, singe et de l'homme.

E. - PREPARATION DE RECOMBINANTS PRV DOUBLES ET TRIPLES
DANS L'ARRIERE-PLAN DE VIRUS DE LA VACCINE COPENHAGEN
vP668

On a réalisé une recombinaison pour préparer des
 5 recombinaisons de la vaccine contenant des gènes PRV multi-
 ples. Les recombinaisons ont été réalisées en utilisant des
 plasmides donneurs pATip50 (PRV gp50, locus de suppression
 ATI) et pPRV IIIIVCTK (PRV gIII, locus de suppression TK) et
 le virus de sauvetage vP726, la vaccine recombinante Copen-
 10 hagen qui contient PVR gII au locus de suppression HA dans
 un arrière-plan de suppression (C7L à K1L). Ces recombina-
 sons engendrent des vaccines recombinantes contenant des
 doubles insertions de gènes PRV gII + gp50 et gII + gIII respec-
 tivement. Un de ces recombinaisons PRV double de la vaccine a
 15 été utilisé comme virus de sauvetage pour recombinaison
 avec le plasmide approprié pour produire un recombinant
 triple contenant les gènes PRV , gII + gp50 + gIII.

Exemple 14 - PREPARATION D'UNE SOUCHE COPENHAGEN A DE
VIRUS DE LA VACCINE BASEE SUR UN SYSTEME
 20 DE SELECTION DE REPLICABILITE CHEZ L'HOTE

Pour préparer un virus de la vaccine Copenhagen
 sur la base d'un système de sélection de répliquabilité chez
 l'hôte (COPCS), on a préparé des plasmides pour supprimer
 l'ADN qui englobe la région codant les gènes de C7L à gauche
 25 jusqu'à K1L à droite (Figure 8). Des virus de la vaccine
 comportant cette suppression ne sont pas supposés croître
 sur des cellules humaines étant donné que les deux gènes
 répliquables chez l'hôte, à savoir C7L (Exemple 7) et K1L
 (15), ont été supprimés. On a également préparé des plasmi-
 30 des pour supprimer la région s'étendant entre C6L et K1L.
 Etant donné que la suppression de C6L à K1L n'élimine pas le
 gène répliquable chez l'hôte humain, à savoir C7L, les virus
 de la vaccine comportant cette suppression ne sont pas
 supposés croître sur des cellules humaines.

35 En se référant maintenant à la Figure 14, on a

préparé un plasmide pSD420 (Figure 14) contenant un clone SalI de l'ADN du virus de la vaccine Copenhagen (Figure 8, 10). Un fragment de la région HindIII C du virus de la vaccine, souche Copenhagen, a été dérivé de pSD420 par sectionnement au moyen de XbaI (position 685), suivi par la formation d'une terminaison franche au moyen d'un fragment de Klenow de la E. Coli polymérase et coupure au moyen de BglIII (position 1784). Le fragment résultant de 1079 bp a été isolé à partir d'un gel d'agarose. pSV4>51 (Figure 9, 14) est un plasmide contenant l'ADN de la vaccine Copenhagen entre le site SphI de HindIII M (position 9478) et le site KpnI dans HindIII K (position 12998). Un fragment de la région de HindIII K du virus de la vaccine, souche Copenhagen, a été dérivé de pSD451 par coupure au moyen de BglII (position 11116) et EcoRV (position 11834). Le fragment de restriction de 718 bp a été isolé à partir d'un gel d'agarose. Les deux fragments ont été liés en pUC8 qui a été coupé au moyen de HindIII, pourvu d'une terminaison franche au moyen d'un fragment de Klenow de E. Coli polymérase, et coupé avec SmaI (Figure 14). Le plasmide résultant a été appelé pMP581CK. pMP581CK (Figure 14) contient le gène C7L (bloc en noir, la direction de la transcription étant indiquée par une flèche). pMP581CK contient un site BglII unique flanqué par un bras de vaccine gauche (positions 685-1764) dérivé de HindIII C et par un bras de vaccine III (positions 11116-11834) dérivé de HindIII K. Le bras de vaccine gauche contient la totalité du gène pour C7L (séquences de codage: positions 1314-863). Par rapport au génome de la vaccine Copenhagen, les deux bras sont séparés par une suppression de 9351 bp (positions 1315-11115). Le site de suppression entre les séquences de HindIII C et les séquences de HindIII K est indiqué par un triangle sur la Figure 14.

Pour enlever l'excès d'ADN à la jonction de suppression, pMP581CK a été coupé par BglII et ensuite digéré

au moyen de l'exonucléase Bal 31. On a réalisé une mutagenèse (53) sur le patron à double brin en utilisant un oligonucléotide 49mer synthétique, à savoir MPSYN228 (5' TTTCTTAATAAATATTATTTTTATTTAAATTCGTAGCGATATATAAAAC 3').

5 Le plasmide résultant pMPCTK1 Δ retient le gène, répliquable chez l'hôte humain, de la vaccine, à savoir C7L. Il est supprimé entre positions 1513 et 11165 et il est supprimé pour 11 gènes C6L à K1L (Figure 8). La recombinaison entre plasmide pMPCTK1 Δ et vP458, un virus de la vaccine Copen-
10 hagen recombinant contenant le gène lacZ de E. Coli. au locus de suppression M2L, a engendré la vaccine recombinante vP664. Comme cela était attendu, vP664 est capable de former des plaques sur des cellules humaines, étant donné qu'il comporte un gène C7L intact.

15 Pour enlever les séquences codantes (positions 1314-863) pour C7L et l'excès d'ADN à la jonction de suppression, on a coupé pMP581CK par NcoI, opération suivie par digestion au moyen de l'exonucléase Bal31. On a réalisé la mutagenèse (53) sur le gabarit ou patron à double brin en
20 utilisant un oligonucléotide 44mer synthétique, à savoir MPSYN233 (5' TGTCATTTAACACTATACTCATATTAATAAAAAATAATATTTATT 3'). Le plasmide résultant, à savoir pMPCSK1 Δ , est supprimé entre les positions 862 et 11163 et il est supprimé pour 12 gènes C7L à K1L. La recombinaison entre le plasmide
25 pMPCSK1 Δ et vP451 a produit la vaccine recombinante vP668. Comme attendu, vP668 est incapable de former des plaques sur des cellules humaines étant donné que les deux gènes K1L et C7L répliquables chez l'hôte ont été supprimés.

Une série de plasmides a été dérivée de pMPCTK1
30 par addition d'un ADN polylinker (agent de liaisons multiples) synthétique à la jonction de suppression. La préparation de plasmides dans les séries COPCS est résumée sur les Figures 15 à 17. Les séquences d'ADN pour tous les oligonucléotides synthétiques utilisés dans la préparation
35 de ces plasmides sont représentées sur les Figures 15 à 17.

Le plasmide pMPCTK1 Δ (Figure 14) a été soumis à une digestion partielle par DraI et de l'ADN linéaire a été isolé à partir d'un gel d'agarose. Les oligonucléotides synthétiques MPSYN238/MPSYN239 ont été recuits (hybridés) et
 5 liés en pMPCTK1 Δ dans une orientation de la droite vers la gauche à la jonction de suppression, ce qui a donné le plasmide pMPCS-1 .

Pour ajouter un codon d'arrêt à un cadre de lecture ouvert, de petite dimension, entrant dans la région du
 10 polylinker depuis la gauche (ATG position 1485), on a coupé pMPCS-1 au moyen de PstI. La mutagénèse a été réalisée (53) en utilisant un oligonucléotide 72mer synthétique, à savoir MPSYN249 (5' GTTTGTTTTATATATCGCTACGAATTTAAATAAAAATTATTTA-TTT ATAGATCTAGAGTCGACCCGGGTACC 3'). Le plasmide résultant
 15 pCOPCS-4 (référencé sur la Figure 17 par son autre désignation pMPCS-4) ne comporte pas de cadre de lecture ouverts entrant ou quittant la région du polylinker.

Pour ajouter le promoteur H6 de vaccine à la région de polylinker, pMPCS-1 a été coupé par HindIII et
 20 Asp718. Un fragment d'ADN synthétique HindIII/Asp718 consistant en promoteur H6 modifié (Exemple 3) a été inséré, ce qui a donné le plasmide pCOPCS-3H (séquence du promoteur donnée sur la Figure 17). Tous les plasmides subséquents, pCOPCS-5H à les pCOPCS-10H dérivés de pCOPCS-3H contiennent
 25 la région du promoteur H6 qui est indiquée sur la Figure 17 pour pCOPCS-3H. La séquence entre crochets qui suit la région du promoteur dans le pCOPCS-3H est remplacée par les séquences entre crochets indiquées pour pCOPCS-5H à pCOPCS-10H. Les codons d'amorçage ATG pour les plasmides pCOPCS-6H
 30 à pCOPCS-10H ont été soulignés. Il est à noter que pCOPCS-3H et pCOPCS-5H ne contiennent pas de codon d'initiation ou d'amorçage de ATG en amont de la région de polylinker. Le cadre de traduction commençant à l'ATG des plasmides pCOPCS-6H à pCOPCS-10H est indiqué. Pour ajouter un codon d'arrêt
 35 au petit cadre de lecture ouvert à partir de pMPCS-1 men-

tionné ci-dessus, la mutagénèse équivalente utilisant MPSYN249 a été réalisée sur pCOPCS-3H ce qui a donné le plasmide pCOPCS-5H.

Pour ajouter un codon d'amorçage ATG sur le
5 plasmide pCOPCS-5H en aval du promoteur H6 dans tous les
cadres de lecture relatifs aux sites de restriction du
polylinker, pCOPCS-5H a été coupé au site NruI dans le
promoteur H6 et au site BglII dans la région du polylinker.
Le fragment vecteur a été isolé à partir d'un gel d'agarose.
10 Les oligonucléotides synthétiques MPSYN250/MPSYN251 ont été
recuits (hybridés) et insérés dans les vecteurs pCOPCS-5H,
ce qui a donné le plasmide pCOPCS-6H.

Les oligonucléotides synthétiques MPSYN252/MPSYN-
253 ont été recuits (hybridés) et insérés dans le vecteur
15 pCOPCS-5H, ce qui a donné le plasmide pCOPCS-8H.

pCOPCS-6H, pCOPCS-7H et pCOPCS-8H contiennent le
promoteur H6 avec le codon d'amorçage ATG suivi par des
sites de restriction dans les trois cadres de lecture diffé-
rents. Le premier et le second acides aminés codés dans ces
20 plasmides sont les suivants : pCOPCS-6H met/val; pCOPCS-7H
met/ gly et pCOPCS-8H met/gly. Etant donné que le motif
met/gly dans certains contextes (66) peut spécifier la
myristylation du polypeptide traduit, le plasmide pCOPCS-6H
a été modifié pour engendrer des plasmides contenant des
25 codons d'amorçage ATG dans les deux autres cadres de lectu-
res, qui, comme pCOPCS-6H, ne commencent pas la traduction
avec le motif met/gly. pCOPCS-6H a été coupé avec NruI et
Asp718 et le fragment vecteur a été isolé à partir d'un gel
d'agarose. Les oligonucléotides synthétiques MPSYN271/
30 MPSYN272 (hybridés) ont été recuits et insérés dans le
vecteur pCOPCS-6H, ce qui a donné le plasmide pCOPCS-9H.

Les oligonucléotides synthétiques MPSYN273/MPSYN
274 (hybridés) ont été recuits et insérés dans le vecteur
pCOPCS/6H, ce qui a donné le plasmide pCOPCS-10H. Les deux
35 premiers acides aminés codés dans ces plasmides sont les

suivants : pCOPCS-9H met/ser et pCOPCS-10H met/thr.

Dans les séries finales de cOPCS, l'ADN consistant en séquence de codage avec un promoteur est inséré pour l'expression en pCOPCS-4; des séquences de codage contenant un ATG sont insérées pour l'expression en pCOPCS-5H ; et les séquences de codage sans un codon d'amorçage ATG sont insérées pour l'expression dans le cadre de lecture approprié entre un ou plusieurs des éléments de la série pCOPCS-6H à pCOPCS-10H. Les plasmides résultants ont été recombinés en mutants vP668, de suppression du virus de la vaccine Copenhagen, ce qui restaure la capacité du virus de la vaccine de former des plaques sur des cellules humaines.

Exemple 15 - UTILITE DU SYSTEME COPCS POUR ANALYSER

LA VIGUEUR DU PROMOTEUR

La capacité de la progéniture de vaccine recombinante engendrée par la recombinaison en utilisant le système de sélection du domaine de réplication chez l'hôte du plasmide vP668/ COPCS du virus de la vaccine Copenhagen pour former des plaques sur des cellules humaines MRC-5 permet une identification rapide des recombinants. Le système vP668/COPCS est utilisé pour engendrer des vaccines recombinantes pour une variété de buts.

Le plasmide pCOPCS-4, un membre de la série des COPCS qui ne contient pas de promoteur en amont de sa région de polylinker a été coupé par BglII. Un fragment de BglII contenant la séquence de codage complète pour le gène glycoprotéine de la rage (18, 42) a été inséré dans pCOPCS-4 en une orientation de la droite vers la gauche, ce qui a donné le plasmide pCOPCS-RAB. Dans le pCOPCS-RAB, la région de polylinker est située en amont à partir du gène de la rage. Une variété de régions de promoteur synthétique et des promoteurs dérivés du virus de la vaccine et d'autres poxvirus ont été insérés dans la région de polylinker du pCOPCS-RAB en amont du gène glycoprotéine de la rage. Les plasmides résultants sont utilisés en recombinaison avec le mutant

vP668 de suppression du virus de la vaccine Copenhagen. Les divers membres de la progéniture recombinante sont sélectionnés selon leurs capacités à former des plaques sur des cellules de MRC-5. La vigueur relative du promoteur peut
5 être testée par l'expression quantitative du gène glycoprotéine de la rage dans le virus progéniture recombinant en utilisant un anticorps monoclonal. Les utilités supplémentaires sont comparables au système de sélection du domaine de réplication chez l'hôte vP293.

10 Exemple 16 - SUPPRESSION DES REPETITIONS TERMINALES
INVERSEES DU VIRUS DE LA VACCINE

De grandes quantités d'ADN peuvent être supprimées du virus de la vaccine sans détruire sa capacité de croître sur une culture de tissu^s. Pour augmenter la stabilité du
15 génome de la vaccine et enlever les gènes non essentiels qui peuvent être associés à la virulence, une suppression dans un seul virus recombinant de la vaccine de 32,7 kb d'ADN à partir du terminus de gauche et de 14,9 kb d'ADN à partir du terminus de droite ont été réalisées.

20 Le génome du virus de la vaccine est composé d'ADN à deux brins. A chaque terminus, l'ADN à deux brins complémentaires comporte une liaison croisée par un brin d'ADN qui forme une boucle terminale incomplète par mise en commun de bases par paires (67). Immédiatement à l'intérieur de la
25 boucle terminale, le génome contient des séries de répétitions en tandem. Une version clonée du génome WR a été décrite comme contenant 13 copies tandem d'une unité répétée de 70 bp au voisinage de chaque extrémité du génome séparé par 435 bp d'ADN non répétitif d'un bloc supplémentaire de
30 17 copies tandem de l'unité répétée de 70 bp (68). La boucle terminale et l'ADN répétitif forment les portions distales de la répétition terminale inversée de la vaccine. La répétition terminale inversée, qui a été estimée à 10 kb pour la version clonée de WR (69), contient un certain nombres de
35 gènes qui, étant donné qu'ils sont contenus à la fois dans

les copies de gauche et de droite de la répétition terminale inversée sont présents en deux copies dans le génome de la vaccine.

Lorsque l'ADN extrait du stock cloné sur plaque du virus de la vaccine Copenhagen (VC-2) utilisé ici est digéré avec des endonucléases de restriction et analysé sur un gel d'agarose, les fragments terminaux manifestent une hétérogénéité. Plutôt que de se présenter comme un brin unique, les fragments terminaux ont l'apparence d'une échelle, dont les échelons sont séparés en dimension par environ 1 kb. Environ 80 % des virus recombinants de la vaccine obtenus comme isolats de plaques à partir de VC-2 ou ses dérivés qui contiennent eux-mêmes des terminaisons hétérogènes, ont montré par analyse par restriction qu'ils contiennent des terminaisons hétérogènes. Dans les 20 % restants de la vaccine recombinante, l'hétérogénéité des terminaisons a été perdue, et les fragments de restriction de l'ADN terminale apparaissent sous forme de bandes discrètes. Lorsque de nouveaux recombinants sont obtenus à partir de virus avec des terminaisons discrètes, ces recombinants comportent toujours des terminaisons discrètes, d'après l'observation qui en a été faite.

Etant donné que les extrémités du virus VC-2 de base sont hétérogènes, on a choisi de cloner dans un plasmide le fragment terminal du virus recombinant vP452, qui dérive de VC-2 et qui contient des terminaisons discrètes. vP452 est soumis à une suppression pour les gènes TK (thymidine kinase) de la vaccine et HA (hémagglutinine) (50). L'ADN a été extrait de vP452 et digéré au moyen de XhoI et la bande terminale deux fois molaire d'approximativement 7 kb a été isolée à partir d'un gel d'agarose. Le fragment isolé a été soumis à une digestion limitée au moyen de l'exonucléase BAL-31, suivie par la formation d'une terminaison franche au moyen d'un fragment de Klenow d'E. Coli polymérase. Le fragment à terminaison franche a été cloné au site SmaI de pUC8

en produisant pSD522VC (Figure 18).

Le séquençement de l'ADN du pSD522VC révèle que, comme dans le cas de la vaccine WR, les terminaisons de la vaccine Copenhagen recombinante vP452 contiennent des unités
 5 répétées en tandem. En plus des blocs d'unités de répétition en tandem de 70 bp qui ont été rapportés pour l'isolat WR cloné sur plaque, les terminaisons de vP452, contrairement à l'isolat WR, contiennent des unités répétées en tandem composées de 54 bp et disposées à l'intérieur des unités
 10 répétées en tandem de 70 bp et au voisinage des séquences de codage. La Figure 19 donne la liste de la séquence d'une portion du génome Copenhagen en commençant avec la copie la plus interne de l'unité répétée en tandem de 54 bp (positions 1-54). La séquence de 13978 bp présentée sur la Figure
 15 19 a été déduite de pSD522VC et de différents clones d'ADN de Copenhagen VC-2 dans des plasmides à base de pUC. Elle comporte des séquences de codage dans HindIII C à droite du bloc final des unités répétées en tandem. La séquence présentée sur la Figure 19 finit au site SalI qui est le commencement de la séquence de l'ADN Copenhagen présentée sur
 20 la Figure 8.

Pour engendrer un plasmide contenant l'ADN répétitif de la vaccine dérivée du terminus de vP452, mais privée des séquences de codage de la vaccine, on a digéré
 25 pSD522VC avec ClaI et HindIII et on a isolé un fragment de 7 kb. Les oligonucléotides synthétiques MPSYN261 (5'CGATTTCAGACACAC GCTTTGAGTTTTGTTGAATCGAGATCTA 3') et MPSYN262 (5'AGCTTAGATCTCGATTCAACAAACTCAAAGCGTGTGTCTGAAT3') ont été recuits (hybridés) et liés dans le fragment vecteur
 30 pSD522VC, en engendrant pMVCEND. pMVCEND contient de l'ADN de la vaccine à partir de l'extrémité de pSD522VC (approximativement 50 bp à partir de l'extrémité du génome) à travers tous les blocs des unités répétées en tandem, finissant au site ClaI en position 338 sur la Figure 19. Un
 35 petit ORF (positions 292-336) qui croisait le site ClaI en

position 305 a été reconstruit dans les oligonucléotides synthétiques MPSYN261/MPSYN262, qui introduit également un site BglIII pour faciliter les étapes de clonage futures. pMPVCEND, qui ne contient pas d'ORF dérivant de l'ADN de
 5 vaccine interne vers le terminus, a été utilisé comme plasmide vecteur et bras externe pour la création de plasmides destinées à supprimer des gènes des terminus de gauche et de droite de la vaccine.

A côté du terminus gauche, tous les gènes jusqu'au
 10 gène codant la plus petite sous-unité de ribonucléotide réductase, qui réside dans HindIII F (70) ont été supprimés. On a déterminé la séquence pour le HindIII F Copenhagen et on l'a représentée sur la Figure 20. Le HindIII F de la vaccine se trouve immédiatement à droite de HindIII
 15 K. La séquence d'ADN présentée sur la Figure 20 est contiguë à la séquence représentée sur la Figure 8, qui comprend la séquence entière pour HindIII K. La petite sous-unité pour la ribonucléotide réductase est codée par ORF F4 (positions 3506-2547, Figure 20).

L'essai pour savoir si les 10 gènes (K2L à F4L) immédiatement à droite de la suppression vP668 (C7L à K1L) étaient non essentiels, on a préparé comme suit un plasmide, à savoir pMPCTFR Δ . pSD521VC est un sous-clone de HindIII F Copenhagen contenant des séquences de la jonction HindIII
 25 K/F (jonction de la Figure 8/Figure 10). Appendices A/C jusqu'à l'unique site BamHI de HindIII F (Figure 20, position 5663). Pour obtenir un bras de flanc à droite de F4, on a coupé pSD521VC avec ClaI en position 3576 en amont des séquences de codage F4 et avec BglII en position 2841, avec
 30 des séquences de codage F4L. Les oligonucléotides synthétiques MPSYN256

(5' CGATGTACAAAAATCCAAGTACAGGCATATAGATAACTGA 3') et MPSYN257 (5' GATCTCAGTTATCTATATGCCTGTACTTGGATTTTTGTACAT3') ont été recuits (hybridés) et liés en un vecteur plasmide
 35 pSD521VC entre les sites ClaI et BglII. Dans le plasmide

résultant, pMP256/257, la région de promoteur en amont de F4
 ORF est recréée, reliée à un site BglII. Pour obtenir un
 bras de flanc droit pour la vaccine, on a coupé pMP256/257
 avec bglII et EcoRI et un fragment de 2,3 kb contenant les
 5 séquences de la vaccine en amont du gène F4 a été isolé. Le
 bras de flanc gauche de la vaccine à partir de HindIII C a
 été obtenu à partir du plasmide pCOPCS-4 (Exemple 14) qui
 contient le gène pour C7L et un fragment supplémentaire de
 140 bp de l'ADN de la vaccine vers la gauche. pCOPCS-4 est
 10 coupé au moyen de BglII et EcoRI et le fragment vecteur de
 3,5 kb est lié au fragment de 2,3 kb contenant le bras droit
 de HindIII F. Le plasmide résultant, à savoir pMPCTFR Δ ,
 contient un bras gauche de vaccine de HindIII C et un bras
 droit de HindIII F qui flanque une suppression de 20 gènes
 15 [C6L F4L]. pMPCRTFR Δ a été utilisé comme plasmide donneur
 pour la recombinaison avec vp668 (Exemple 9) et le virus
 recombinant choisi par culture sur des cellules de MRC-5. On
 a récupéré la progéniture de vaccine viable vp749 (suppres-
 sion C6L - F4L) a été récupéré en prouvant que tous les
 20 gènes dans la région supprimée étaient non essentiels.

Pour supprimer tous les gènes de l'extrémité gau-
 che de la vaccine jusqu'à et y compris F4L, on a préparé le
 plasmide mMPLEND Δ (Figure 18) comme suit. Un bras de flanc
 droit de HindIII F a été obtenu par digestion de pMPCTFR Δ
 25 avec SmaI et BglII, puis isolation du fragment de 2,3 kb.
 pMPVCEND (Figure 18), qui contient des unités répétées en
 tandem d'ADN depuis le terminus de vp452 a été digéré au
 moyen de HindIII, opération suivie par la formation d'une
 terminaison franche avec un fragment de Klenow de E. Coli
 30 polymérase et coupure au moyen de BglII. Les deux fragments
 ont été liés ensemble, ce qui a donné pMPLEND Δ . Dans
 pMPLEND Δ , le bras gauche de la vaccine est composé d'uni-
 tés répétées en tandem et le bras droit de vaccine est com-
 posé d'ADN dérivé de HindIII F. Dans le plasmide pMPLEND Δ ,
 35 les 38 gènes les plus à gauche [C23L - F4L] du génome de

Copenhague sont supprimés, ce qui totalise 32 681 bp [de HINDIII C : Figure 19, position 340 jusqu'à la fin (13 638 bp supprimés) ; de HindIII C, M, N et K: toute la Figure 8 (15 537 bp) et de HindIII F : Figure 20, positions 1 à 5 3506].

Pour supprimer les gènes de l'extrémité droite du génome, on a préparé le plasmide pMPREND pour fournir des bras de vaccine de flanquage pour la suppression de la région hémorragique (u) de la vaccine (Exemple 5) et tous les gènes à droite de cette région. La séquence de HindIII B, le fragment le plus à droite de HindIII dans le génome, a été déterminée par le séquençement des clones variés à base de pUC de cette région (Figure 21). La comparaison des séquences dérivées des régions de gauche et de droite du génome révèle que la répétition terminale s'étend jusqu'à la position 8104 de la Figure 19. Ainsi, la répétition terminale inversée de la souche Copenhague du virus de la vaccine analysée ici est composée de 8,1 kb de région de codage en plus des blocs d'unités répétées en tandem. Les 9 ORF les plus à gauche de HindIII C, ORF C23L à C15L, correspondent aux 9 ORF les plus à droite dans le HindIIIB, ORF B29R à B21R. La Figure 21 illustre la séquence de HindIII B Copenhague commençant à la jonction HindIII A/B et continuant vers la droite à travers l'ORF le plus à droite qui commence dans les séquences d'ADN uniques (B20R). La copie de droite de la répétition terminale commence en position 17 132 de la Figure 21, 14 bp avant l'extrémité de B20R ORF.

pSD477VC est un sous-clone de NcoI/NruI basé sur pUC de l'HindIII B de la vaccine Copenhague (Figure 21, positions 9713-11 299) qui contient la région hémorragique (u) (ORF B13R et B14R). pSD478VC (Figure 18) est un dérivé de pSD477VC dans lequel la totalité de la région u (positions 10 024-11 014, Figure 21) est remplacée par une région de clonage multiple comprenant un site BglII. La paire d'oligonucléotides synthétiques qui sont recuits ou

hybridés à cet effet est constituée par SD41mer
 (5'CGATTACTAGATCTGAGCTCCCCGGGCTCGAGGGATCCGTT 3') et SD39mer
 (5' AACGGATCCCTCGAGCCCCGGGGAGCTCAGATCTAGTAAT 3'). Pour obtenir un bras de vaccine de flanc du côté gauche de la région u, on a coupé pSD478VC au moyen d'EcoRI à la jonction des séquences pUC/vaccine, on a réalisé une extrémité franche par le fragment de Klenow de l'E. Coli polymérase et on a coupé au moyen de BqlIII. Un fragment de 0,3 kb contenant la région de promoteur u de la vaccine et les séquences de flanc sur la gauche de la région u a été isolé. Ce fragment a été lié à un fragment de vecteur obtenu en coupant pMPVCEND au moyen HindIII, suivi de l'obtention d'une extrémité franche au moyen d'un fragment de Klenow de E. Coli polymérase et coupure au moyen de BqlIII. Le plasmide résultant, à savoir pMREND Δ , contient un bras de vaccine de gauche dérivé de l'ADN de HindIII B en amont de B13 ORF et comprenant la région de promoteur B13R (u). Le bras de vaccine de droite dans pMREND Δ est constitué de blocs d'unités répétées en tandem et il est identique au bras de vaccine de gauche présent dans le plasmide de suppression à l'extrémité gauche, à savoir le pMPLEND Δ . Les deux bras de pMREND Δ flanquent une suppression de 17 ORF [B13R - B29R]. La dimension totale de la suppression entre les bras de vaccine de flanc dans le plasmide de suppression à l'extrémité droite, à savoir pMREND Δ , est de 14 873 bp, le tout depuis HindIII B (séquence représentée sur la Figure 21, entre les positions 1024 et 17 145 ; avec continuation dans la répétition terminale inversée, avec une séquence supprimée équivalente à celle représentée sur la Figure 19, positions 8090 à 340). La stratégie pour la préparation des plasmides de suppression pMPLEND Δ et pMPREND Δ est représentée schématiquement sur la Figure 18. Les blocs pleins indiquent l'ADN de la vaccine Copenhagen consistant en des unités répétées en tandem dérivées du terminus de vP452 ; les blocs ouverts indiquent d'autres ADN de la vaccine

Copenhague. L'emplacement des suppressions dans les plasmides pMCTFR Δ , pSD478VC, pMPLEND Δ et pMPREND Δ est indiqué par des triangles.

Pour bénéficier de la pression sélective lors de la production de virus de vaccine recombinant dans lesquels on a supprimé une grande quantité d'ADN aux deux extrémités du génome, on a utilisé deux marqueurs sélectables. Le premier est le gène répliquable chez l'hôte humain C7L de la vaccine (Exemple 7) avec sélection de la progéniture du virus recombinant sur des cellules humaines MRC-5. Le second est le gène E. Coli codant le gène pour la guanine phosphoribozyle transférase (gène Ecogpt) avec sélection de la progéniture du virus de la vaccine recombinante en utilisant de l'acide mycophénolique (2,8).

Pour créer un fragment déplaçable contenant seulement le gène C7L de la vaccine et son promoteur, on a coupé pCOPCS-4 au moyen de NcoI au voisinage de l'extrémité 3' du gène C7L (position 870, Figure 8) et avec BamHI à 148 bp en aval des séquences de codage de C7L. L'extrémité du gène C7L a été reconstruite en utilisant des oligonucléotides synthétiques MPSYN258 (5' CATGGATTAATTAATTTTTTGG 3') et MPSYN259 (5' GATCCAAAAAATTAATTAATC 3') qui sont recuits et liés avec le fragment vecteur en produisant le plasmide pMP258/259. pMP258/259 a été coupé au moyen de BglII et BamHI et un fragment de 660 bp contenant le gène C7L et son promoteur a été isolé pour insertion dans les plasmides de suppression de l'extrémité gauche et de l'extrémité droite, à savoir pMPLEND Δ et pMPREND Δ , respectivement.

Un fragment BglII/BamHI de 670 bp contenant le gène Ecogpt a été dérivé à partir du plasmide pSV2gpt (ATCC n° 37 145) (71) par l'addition d'un agent de liaison (linker) BamHI au site AhaIII en aval des séquences de codage (72).

Les plasmides pMPLEND Δ et pMPREND Δ , comportant des suppressions de vaccine au voisinage des extrémités de

gauche et de droite du génome de la vaccine, respectivement, on été coupés au moyen de BglII. Des fragments BqmII/BamHI contenant le gène C7L et le gène Ecogpt ont été insérés dans les plasmides vecteurs en produisant au total quatre plasmides (Tableau 7). Il y a lieu de noter que le gène C7L est sous le contrôle de son propre promoteur tant dans pMPL Δ C7 que dans pMPR Δ C7. Le gène Ecogpt est sous le contrôle du promoteur F4L dans pMPLgpt et sous le contrôle de B13R (u) du promoteur dans pMPRgpt. La recombinaison a été réalisée entre ces plasmides et le virus de sauvetage comme indiqué dans le Tableau 7. La progéniture du virus de vaccine recombinant provenant de recombinaisons introduisant le gène C7L a été sélectionné en formant des plaques sur des cellules de mRC-5. Parmi la progéniture en provenance des recombinaisons introduisant le gène Ecogpt, on a sélectionné les membres sous l'effet de la croissance en présence d'acide mycophénolique. Il y a lieu de noter que la sélection pour le développement sur des cellules de MRC-5 est réalisée avantageusement en utilisant un virus de sauvetage tel que vP668, qui est supprimé tant pour C7L que pour K1L.

TABLEAU 7

A. <u>Construction de plasmides pour des suppressions</u> <u>au voisinage des terminus Copenhagen</u>			
Substrat de plasmide	Marqueur sélectable	Produit de plasmide	Suppression
pMPLEND Δ	C7L	pMPL Δ C7	C23L-F4L
pMPLEND Δ	<u>Ecogpt</u>	pMPLgpt	C23L-F4L
pMPREND Δ	C7L	pMPL Δ C7	B13R-B29R
pMPREND Δ	<u>Ecogpt</u>	pMPLgpt	B13R-B29R

B. Recombinaison in vivo en utilisant des plasmides
de suppression avec le virus de la vaccine Copenhagen

			Mutant de suppression de
5	Virus de sauvetage	Plasmide	la vaccine
	vP668(TK ⁻ , [C7L-K1L] ⁻)	pMPLΔC7([C23L-F4L] ⁻ , C7L ⁺)	vP789
	vP668(TK ⁻ , [C7L-K1L] ⁻)	pMPRΔC7([B13R-B29R] ⁻ , C7L ⁺)	vP774
	vP617(TK ⁻ , ATI ⁻ , HA ⁻)	pMPRGpt([B13R-B29R] ⁻ , <u>Ecogpt</u> ⁺)	vP759
	vP617(TK ⁻ , ATI ⁻ , HA ⁻)	pMPLgpt([C23L-F4L] ⁻ , <u>Ecogpt</u> ⁺)	vP791
10	vP723(TK ⁻ , ATI ⁻ , HA ⁻ , <u>u</u> ⁻)	pMPLgpt([C23L-F4L] ⁻ , <u>Ecogpt</u> ⁺)	vP796
	vP796(TK ⁻ , ATI ⁻ , HA ⁻ / [C23L-F4L] ⁻ , <u>Ecogpt</u> ⁺)	pMPRΔC7([B13R-B29R] ⁻ + C7L)	vP811

15 Le mutant de suppression du virus de la vaccine
recombinant vP796 a été engendré par recombinaison entre le
plasmide de suppression de l'extrémité gauche portant le
marqueur Ecogpt sélectable, à savoir pMPLgpt et le virus de
sauvetage vP723, qui a subi en outre une suppression des
20 gènes TK et HA, aussi bien que les régions équivalentes ATI
et u. Par l'indice de restriction de l'ADN, vP796 est sup-
primé pour la région C23L à F4L), aussi bien que les ré-
gions TK, HA, ATI et u. Etant donné que la suppression de
38 gènes au voisinage de l'extrémité gauche de vP796
25 comprend à la fois C7L et K1L, on a utilisé vP796 comme
virus de sauvetage pour la recombinaison avec pMPRΔC7, le
plasmide de suppression de l'extrémité droite contenant
C7L. Le recombinant de vaccine qui en résulte, comportant
des suppressions au voisinage des deux extrémités, à savoir
30 vP811, a été choisi par culture sur des cellules de MRC-5.

REFERENCES

1. Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B., and H. Schaller, *Gene* 19, 327-336 (1982).
2. Boyle, D.B. and B.E.H. Coupar, *Gene* 65, 123-128
5 (1988).
3. Chakrabarti, S., Brechling, K., and B. Moss, *Mol. Cell. Biol.* 5, 3403-3409 (1985).
4. Clewell, D.B., *J. Bacteriol.* 110, 667-676 (1972).
5. Clewell, D.B. and D.R. Helinski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62, 1159-1166 (1969).
10
6. Drillien, R., Koehren, F., and A. Kirn, *Virology* 111, 488-499 (1981).
7. Drillien, R., Spehner, D., and A. Kirn, *J. Virol.* 28, 843-850 (1978).
8. Falkner, F.G. and B. Moss, *J. Virol.* 62, 1849-1854
15 (1988).
9. Fathi, Z., Sridhar, P., Pacha, R.F., and R.C. Condit, *Virology* 155, 97-105 (1986).
10. Fenner, F. and J.F. Sambrook, *Virology* 28, 600-609
20 (1966).
11. Franke, C.A., Rice, C.M., Strauss, J.H., and D.E. Hruby, *Mol. Cell. Biol.* 5, 1918-1924 (1985).
12. Gangemi, J.D. and D.G. Sharp, *Virology* 85, 262-270 (1978).
13. Gemmell, A. and F. Fenner, *Virology* 11, 219-235
25 (1960).
14. Gillard, S., Spehner, D., and R. Drillien, *J. Virol.* 53, 316-318 (1985).
15. Gillard, S., Spehner, D., Drillien, R., and A. Kirn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5573-5577
30 (1986).
16. Graham, F.L. and A.J. Van der Eb, *Virology* 54, 536-539 (1973).
17. Hruby, D.E., Lynn, D.L., Condit, R., and J.R. Kates, *J. gen Virol.* 47, 485-488 (1980).
35
18. Kieny, M.P., Lathe, R., Drillien, R., Spehner, D., Skory, S., Schmitt, D., Wictor, T., Koprowski, H., and J.P. Lecocq, *Nature (London)* 312 163-166 (1984).

19. Lake, J.R. and P.D. Cooper, *J. gen Virol.* 48, 135-147 (1980).
20. Mackett, M., Smith, G.L. and B. Moss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7415-7419 (1982).
- 5 21. Mackett, M. and J.R. Arrand, *EMBO* 4, 3229-3235 (1985).
22. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory, New York) (1982).
- 10 23. Mayr, A., Hochstein-Mintzel, V., and H. Stickl, *Infection* 3, 6-14 (1975).
24. McClain, M.E., *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* 43, 31-44 (1965).
25. Moyer, R.W. and C.T. Rothe, *Virology* 102, 119-132 (1980).
- 15 26. Nakano, E., Panicali, D., and E. Paoletti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1593-1596 (1982).
27. Panicali, D., Davis, S.W., Mercer, S.R., and E. Paoletti, *J. Virol.* 37, 1000-1010 (1981).
- 20 28. Panicali, D. and E. Paoletti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4927-4931 (1982).
29. Panicali, D., Grzelecki, A., and C. Huang, *Gene* 47, 193-199 (1986).
30. Perkus, M.E., Panicali, D., Mercer, S., and E. Paoletti, *Virol.* 152, 285-297 (1986).
- 25 31. Perkus, M.E., Piccini, A., Lipinskas, B.R., and E. Paoletti, *Science* 229, 981-984 (1985).
32. Piccini, A., Perkus, M.E., and E. Paoletti, *In: Methods in Enzymology*, Vol. 153, ed. Wu, R. and L. Grossman (Academic Press), pp. 545-563 (1987).
- 30 33. Rosel, J.L., Earl, P.L., Weir, J.P., and B. Moss, *J. Virol.* 60 436-449 (1986).
34. Shapira, S.K., Chou, J., Richaud, F.V., and M.J. Casadaban, *Gene* 25, 71-82 (1983).
- 35 35. Southern, P.H. and P. Berg, *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 327-341 (1982).
36. Tagaya, I., Kitamura, T., and Y. Sano, *Nature (London)* 192, 381-382 (1961).

37. Wachsman, M., Aurelian, L., Smith, C.C.,
Lipinkas, B.R., Perkus, M.E., and E. Paoletti, J.
Inf. Dis. 155, 1188-1197 (1987).
- 5 38. Wilson, E.M., Hodges, W.M., and D.E. Hraby, Gene
49, 207-213 (1986).
39. Yuen, L. and B. Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA
84, 6417-6421 (1987).
40. Kotwal, G.J. and B. Moss, Virology 167, 524-537
(1988).
- 10 41. Taylor, J., Weinberg, R., Kawaoda, Y., Webster,
R.G., and E. Paoletti, Vaccine 6, 504-508 (1988).
42. Taylor, J., Weinberg, R., Languet, B., Desmettre,
P., and E. Paoletti, Vaccine 6, 497-503 (1988).
- 15 43. Pickup, D.J., Ink, B.S., Hu, W., Ray, C.A., and
W.K. Joklik, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7698-
7702 (1986).
44. Southern, E.M., J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975).
45. Kotwal, G.J. and B. Moss, J. Virol. 63, 600-606
(1989).
- 20 46. Tabor, S. and C.C. Richardson, Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 84, 4767-4771 (1987).
47. Patel, D.D. and D.J. Pickup, EMBO 6, 3787-3794
(1987).
- 25 48. Patel, D.D., Ray, C.A., Drucker, R.P., and D.J.
Pickup, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9431-9435
(1988).
49. Bertholet, C., Drillien, R., and R. Wittek, Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 82, 2096-2100 (1985).
- 30 50. Guo, P., Goebel, S., Davis, S., Perkus, M.E.,
Languet, B., Desmettre, P., Allen, G., and E.
Paoletti, J. Virol. 63, 4189-4198 (1989).
51. Tamin, A., Villarreal, E.C., Weinrich, S.L., and
D.E. Hraby, Virology 165, 141-150 (1988).
- 35 52. Bournsnel, M.E.G., Foulds, I.J., Campbell, J.I.,
and M.M. Binns, J. gen Virol. 69, 2995-3003
(1988).
53. Mandecki, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7177-
7181 (1986).

54. Spehner, D., Gillard, S., Drillien, R., and A. Kirn, J. Virol. 62, 1297-1304 (1988).
55. Altenburger, W., Suter, C.-P., and J. Altenburger, Arch. Virol. 105, 15-27 (1989).
- 5 56. Hruby, D.E., Maki, R.A., Miller, D.B., and L.A. Ball, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3411-3415 (1983).
57. Robbins, A.K., Dorney, D.J., Wathen, M.W., Whealy, M.E., Gold, C., Watson, R.J., Holland, L.E., Weed, S.D., Levine, M., Glorioso, J.C., and L.W. Enquist, J. Virol. 61, 2691-2701 (1987).
- 10 58. Robbins, A.K., Watson, R.J., Whealy, M.E., Hays, W.W., and L.W. Enquist, J. Virol. 58, 339-347 (1986).
- 15 59. Wathen, M.W. and L.M.K. Wathen, J. Virol. 51, 57-62 (1984).
60. Mettenleiter, T.C., Lukacs, N., Thiel, H.-J., Schreurs, C., and H.J. Rziha, Virology 152, 66-75 (1986).
61. Petrovskis, E.A., Timmins, J.G., Armentrout, M.A., Marchioli, C.C., Yancey, Jr., R.J., and L.E. Post, J. Virol. 59, 216-223 (1986).
- 20 62. Schmitt, J.F.C. and H.G. Stunnenberg, J. Virol. 62, 1889-1897 (1988).
63. Vos, J.C. and H.G. Stunnenberg, EMBO 7, 3487-3492 (1988).
- 25 64. Bucher, D., Popple, S., Baer, M., Mikhail, A., Gong, Y.-F., Whitaker, C., Paoletti, E., and A. Judd, J. Virol. 63, 3622-3633 (1989).
65. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and H.A. Erlich, Science 239, 487-491 (1988).
- 30 66. Kaplan, J.M., Mardon, G., Bishop, J.M., and H.E. Varmus, Mol. Cell. Biol. 8, 2435-2441 (1988).
67. Baroudy, B.M., Venkatesan, S., and B. Moss, Cell 28, 315-324 (1982).
- 35 68. Wittek, R. and B. Moss, Cell 21, 277-284 (1980).
69. Wittek, R., Muller, H.K., Menna, A., and R. Wyler, FEBS Letters 90, 41-46 (1978).

70. Slabaugh, M., Roseman, N., Davis, R., and C. Mathews, J. Virol. 62, 519-527 (1988).
71. Mulligan, R.C. and P. Berg., Science 209, 1422-1427 (1980).
- 5 72. Pratt, D. and S. Subramani, Nuc. Acids Res. 11, 8817-8823 (1983).

10

15

20

25

30

35

REVENDICATIONS-----

1. Un procédé pour sélectionner un virus de la vaccine recombinant chez un hôte , caractérisé en ce que

5 on combine par recombinaison un ADN donneur dans un plasmide et un virus de la vaccine modifié par co-transformation , transection ou infection du plasmide et du virus dans une cellule pour former un virus de la vaccine recombinant ,

10 ledit virus de la vaccine modifié ayant un gène répliquable chez l'hôte , de sorte que le virus de la vaccine modifié ne se reproduit pas chez l'hôte , et

15 ledit ADN donneur comprenant (a) un cadre de lecture ouvert à partir d'une source qui n'est pas de la vaccine, (b) le gène répliquable chez l'hôte pour permettre au virus de la vaccine recombinant de se reproduire chez l'hôte , (c) de l'ADN de flanc qui est homologue au virus de la vaccine modifié de sorte que l'on obtienne la recombinaison et (d) une séquence promotrice pour contrôler l'expression du cadre
20 de lecture ouvert ; et

on identifie le virus de la vaccine recombinant par sa capacité de se reproduire chez l'hôte .

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le cadre de lecture ouvert à partir de la source qui n'est pas de
25 la vaccine est un gène E. Coli lacZ codant pour β galactosidase .

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'hôte est une lignée de cellules humaines .

4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel la
30 lignée de cellules humaines est MRC-5 .

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le gène répliquable chez l'hôte est le gène K1L répliquable chez l'hôte de la vaccine .

6. Procédé pour cloner et exprimer un cadre de lecture ouvert dans un virus de la vaccine recombinant chez un hôte , caractérisé en ce que :

5 on combine de l'ADN donneur par recombinaison dans un plasmide et un virus de la vaccine modifié par co-transformation , transection ou infection du plasmide et du virus dans une cellule pour former un virus de la vaccine recombinant ,

10 ledit virus de la vaccine modifié ayant un gène répliquable chez l'hôte qui a été supprimé de sorte que le virus de la vaccine modifié ne se réplique pas chez l'hôte et

15 ledit ADN donneur comprend (a) un cadre de lecture ouvert à partir d'une source qui n'est pas de la vaccine , (b) le gène répliquable chez l'hôte pour permettre au virus recombinant de la vaccine de se reproduire chez l'hôte , (c) de l'ADN de flanc qui est homologue au virus de la vaccine modifié de manière à réaliser la recombinaison et (d) une séquence promotrice contrôlée d'expression du cadre de lecture ouvert ;

20 on réplique le virus de la vaccine recombinant chez l'hôte ; et

on exprime le cadre de lecture ouvert .

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le poxvirus est la vaccine .

25 8. Procédé selon la revendication 6 , caractérisé en ce que le cadre de lecture ouvert en provenance d'une source qui n'est pas du type pox est le gène E. Coli lacZ codant la B galactosidase.

30 9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'hôte est une lignée de cellules humaines .

10. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la lignée de cellules humaines est MRC-5 .

11. Virus de la vaccine recombinant modifié pour exprimer un produit de gène chez un hôte , ledit virus de la vaccine recombinant modifié ayant des gènes répliquables chez l'hôte qui en ont été supprimés de sorte que le virus présente une reproductibilité restreinte chez l'hôte et ledit virus de la vaccine recombinant modifié comprend de l'ADN qui code pour et exprime le produit de gène chez l'hôte avec une reproduction restreinte du virus chez l'hôte .

12. Virus selon la revendication 11 , caractérisé en ce que le produit de gène est un antigène .

13. Virus selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'hôte est un vertébré et en ce que l'antigène induit une réponse immunologique chez le vertébré .

14. Virus selon la revendication 13, caractérisé en ce que l'antigène est choisi dans le groupe constitué par l'antigène glycoprotéine de la rage et l'antigène glycoprotéinique de la pseudo rage .

15. Virus selon la revendication 11, caractérisé en ce que l'hôte est une cellule cultivée in vitro .

16. Procédé pour exprimer un produit de gène dans une cellule cultivée in vitro , caractérisé en ce qu'on introduit dans la cellule un virus de la vaccine recombinant modifié , ledit virus de la vaccine recombinant modifié ayant des gènes répliquables chez l'hôte qui en ont été supprimés de sorte que le virus présente une reproduction restreinte dans ladite cellule et que le virus de la vaccine recombiné modifié comprend de l'ADN qui code pour et exprime le produit de gène dans la cellule avec une répliquabilité restreinte du virus dans la cellule .

l'antigène glycoprotéine de la rage et l'antigène glycoprotéine de la pseudo-rage.

25. Virus selon l'une quelconque des revendications 19 à 24, caractérisé en ce que l'hôte est une cellule
5 cultivée in vitro.

26. Procédé pour exprimer un produit de gènes chez un hôte, caractérisé en ce qu'il consiste à inoculer l'hôte avec un virus recombinant modifié dont on a éliminé les gènes répliquables chez l'hôte de sorte que le virus manifeste une répllication restreinte chez l'hôte et le virus recombinant modifié comprend de l'ADN qui code et exprime le
10 produit de gène chez l'hôte avec une répllication limitée du virus chez l'hôte.

27. Procédé selon la revendication 26, caractérisé
15 en ce que le virus est un poxvirus.

28. Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que le poxvirus est la vaccine.

29. Procédé selon l'une quelconque des revendications 26 à 28, caractérisé en ce que le produit de gènes est
20 un antigène.

30. Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que l'hôte est un vertébré et l'antigène induit une réponse immunologique chez le vertébré.

31. Procédé selon la revendication 30, caractérisé
25 en ce que l'antigène est choisi dans le groupe constitué par l'antigène glycoprotéine de la rage et l'antigène glycoprotéine de la pseudo-rage.

32. Procédé pour exprimer un produit de gène dans une cellule cultivée in vitro, caractérisé en ce qu'il
30 consiste à introduire dans la cellule un virus recombinant modifié dont les gènes répliquables chez l'hôte ont été enlevés de sorte que le virus manifeste une répllication restreinte dans la cellule, et ledit virus recombinant modifié comprend de l'ADN qui code et exprime le produit de gènes
35 dans la cellule avec répllication restreinte du virus dans la

cellule.

33. Vaccin pour induire une réponse immunologique chez un hôte inoculé avec ledit vaccin, caractérisé en ce que le vaccin comprend un véhicule et un virus recombinant modifiés dont on a supprimé les gènes répliquables chez l'hôte de sorte que le virus manifeste une réplique res-
treinte chez l'hôte et le virus recombinant modifié comprend de l'ADN qui code et exprime le produit de gène chez l'hôte avec réplique restreinte du virus chez l'hôte.

10

15

20

25

30

35

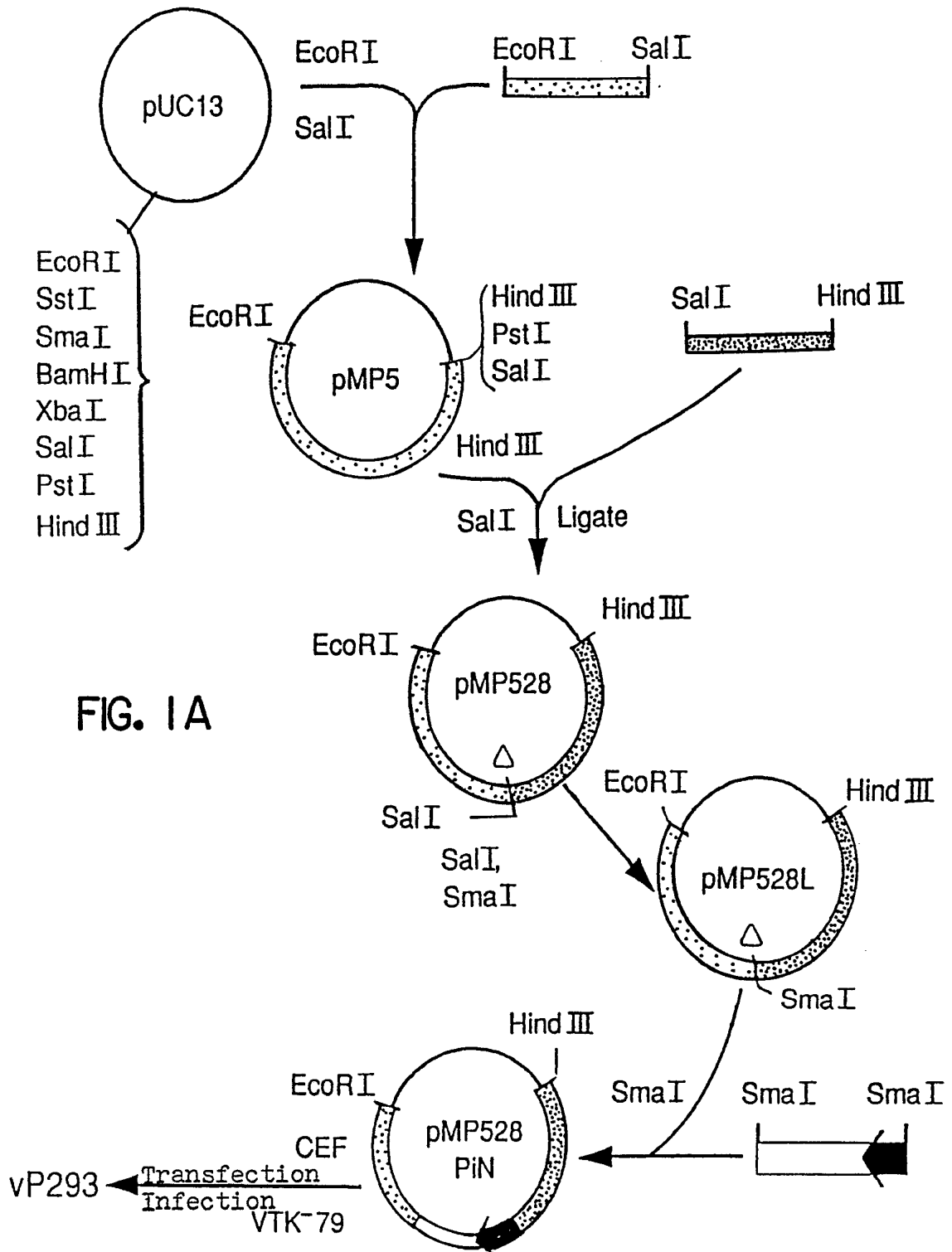
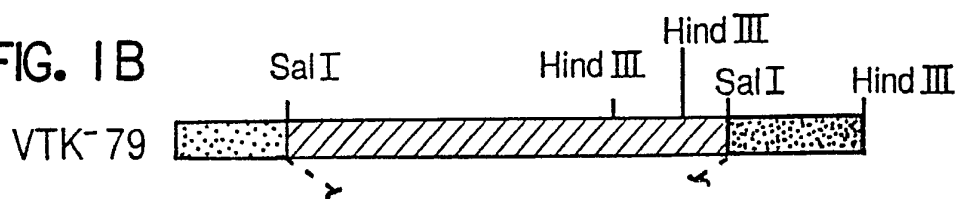


FIG. 1B

FIG. 1C
vP293

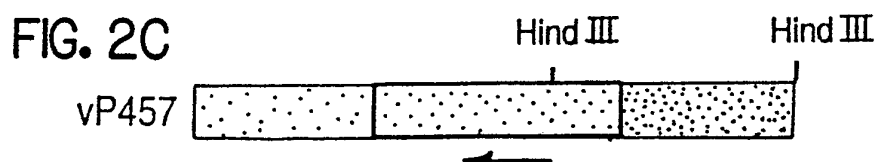
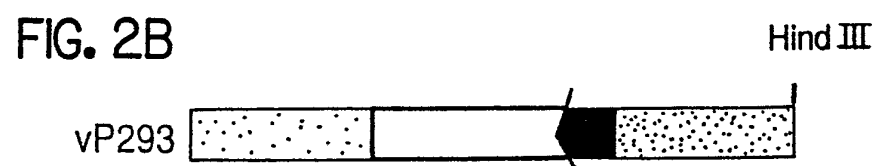
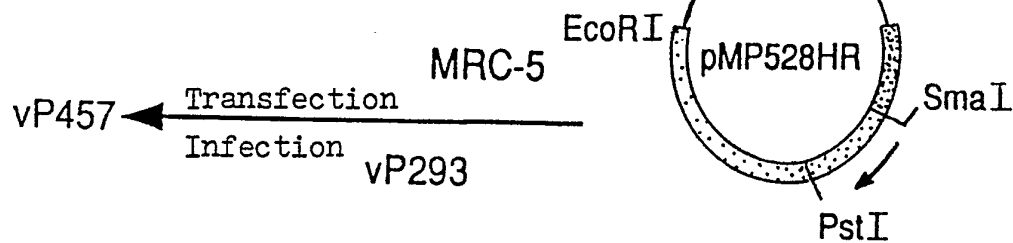
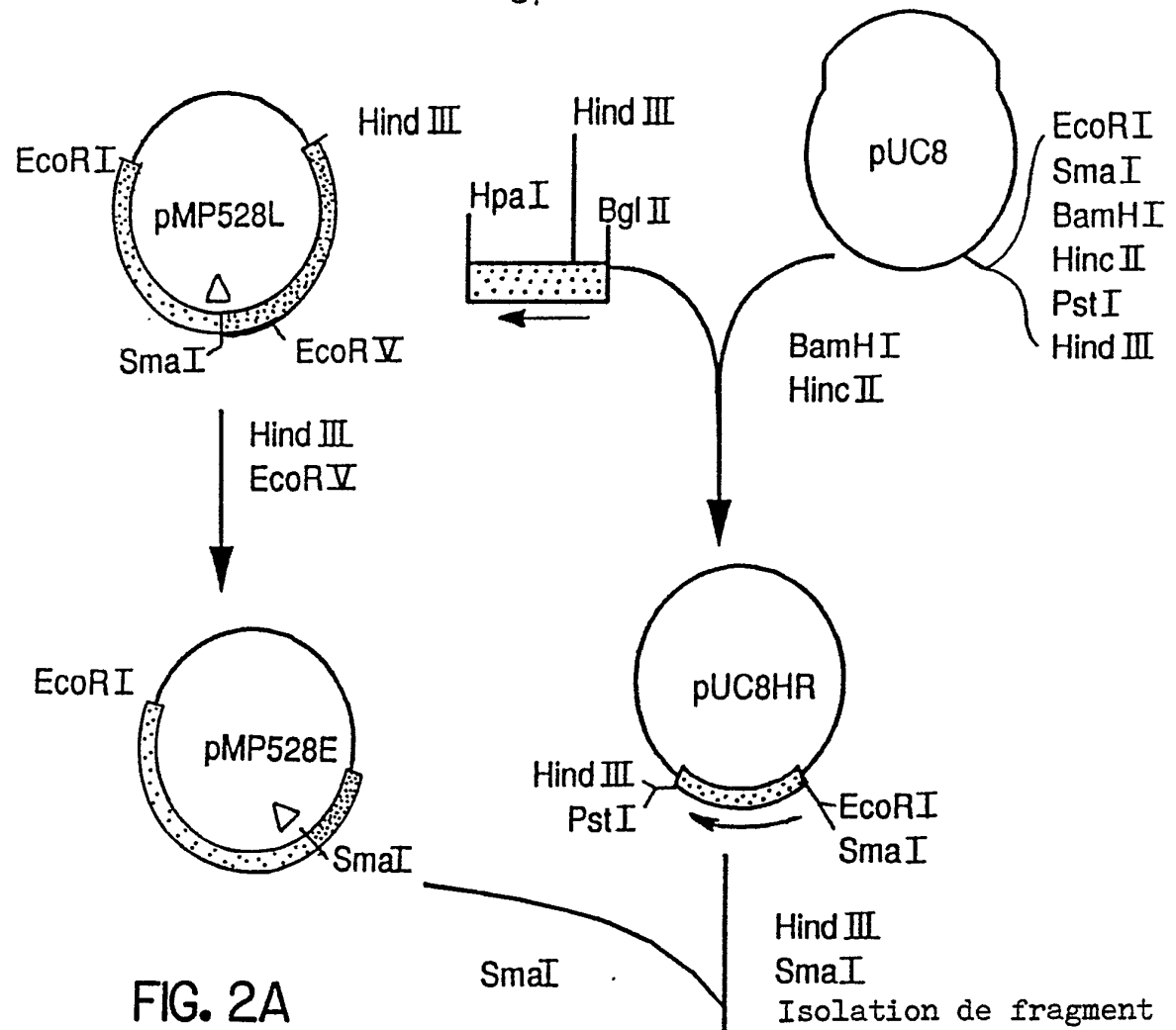
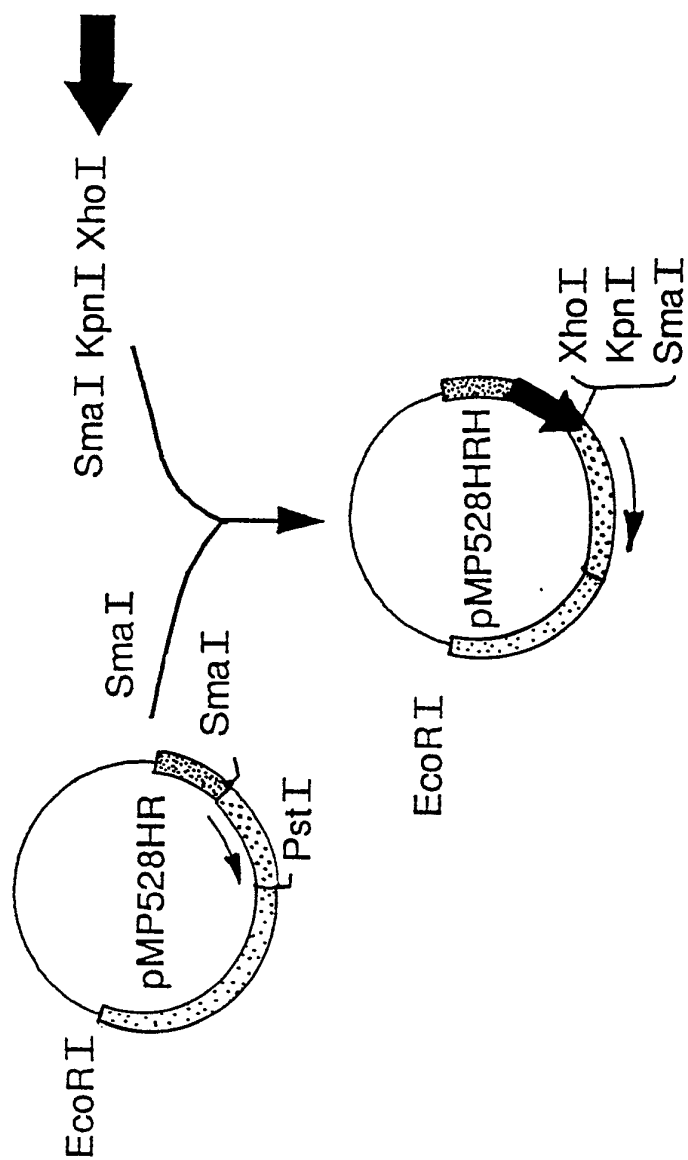


FIG. 3A



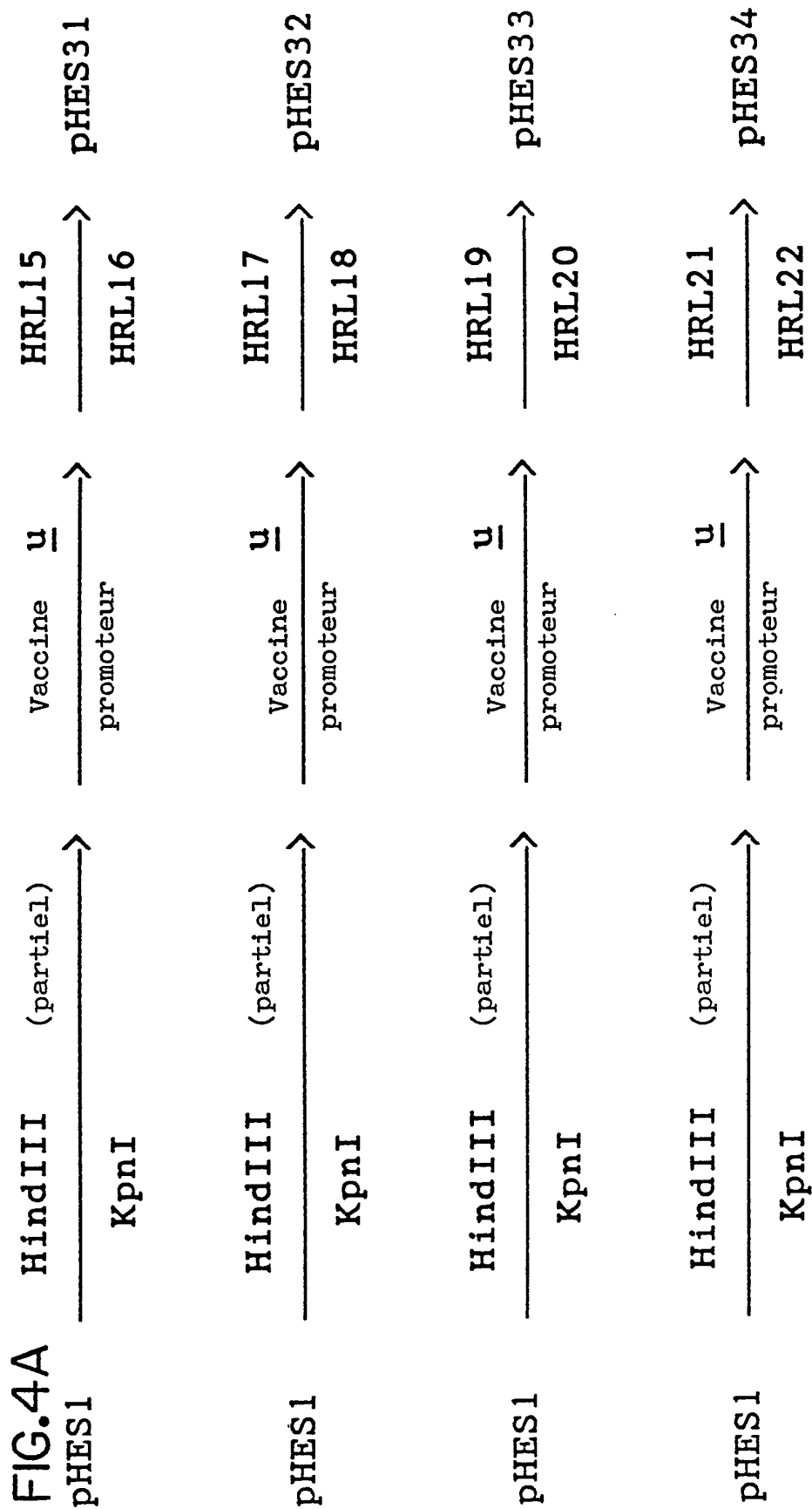


FIG.4B

<u>HRL15</u>	5'	<u>Clal</u>	<u>BamHI</u>	<u>KpnI</u>	3'
		CGATTACTATG	-GGA-TCC-CCG-GGT-AC		
<u>HRL16</u>	3'		TAATGATAC-CCT-AGG-GGC-C	<u>SmaI</u>	5'

<u>HRL17</u>	5'	<u>Clal</u>	<u>BamHI</u>	<u>KpnI</u>	3'
		CGATTACTATG	-GGG-ATC-CCC-GGG-TAC		
<u>HRL18</u>	3'		TAATGATAC-CCC-TAG-GGG-CC	<u>SmaI</u>	5'

<u>HRL19</u>	5'	<u>Clal</u>	<u>BamHI</u>	<u>KpnI</u>	3'
		CGATTACTATG	-GGG-GAT-CCC-CGG-GTA-C		
<u>HRL20</u>	3'		TAATGATAC-CCC-CTA-GGG-GCC	<u>SmaI</u>	5'

<u>HRL21</u>	5'	<u>Clal</u>	<u>BamHI</u>	<u>KpnI</u>	3'
		CGATTACTGGATCCCGGGTAC			
<u>HRL22</u>	3'		TAATGACCTAGGGGCC	<u>SmaI</u>	5'

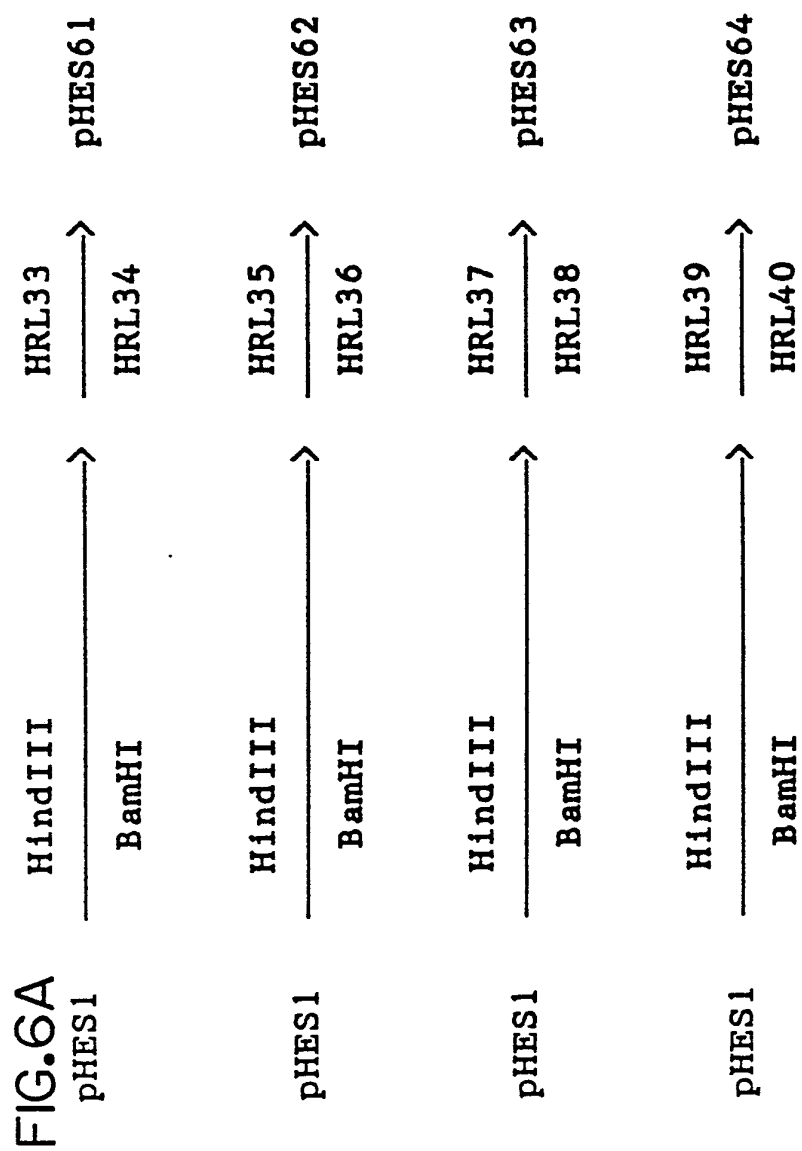


FIG.6B

<u>HLR33</u>	<u>HindIII</u>	5'	AGCTTAGATCTACGATCTTATAATTACACGATTGTAGTTAAGTTTGAATAAAATTTTTT
<u>HLR34</u>		3'	ATCTAGATGCTAGAAATATTAATGTGTCTAACATCAATTCAAACCTTATTTTAAAAAAA
	<u>BamHI</u>		
			ATAATAAATG-G 3' <u>HLR33</u>
			TATTATTTAC-CCT-AG 5' <u>HLR34</u>
<u>HLR35</u>	<u>HindIII</u>	5'	AGCTTAGATCTACGATCTTATAATTACACGATTGTAGTTTGAATAAAATTTTTT
<u>HLR36</u>		3'	ATCTAGATGCTAGAAATATTAATGTGTCTAACATCAATTCAAACCTTATTTTAAAAAAA
	<u>BamHI</u>		
			ATAATAAATG-GG 3' <u>HLR35</u>
			TATTATTTAC-CCC-TAG 5' <u>HLR36</u>
<u>HLR37</u>	<u>HindIII</u>	5'	AGCTTAGATCTACGATCTTATAATTACACGATTGTAGTTTGAATAAAATTTTTT
<u>HLR38</u>		3'	ATCTAGATGCTAGAAATATTAATGTGTCTAACATCAATTCAAACCTTATTTTAAAAAAA
	<u>BamHI</u>		
			ATAATAAATG-GGG 3' <u>HLR37</u>
			TATTATTTAC-CCC-CTA-G 5' <u>HLR38</u>
<u>HLR39</u>	<u>HindIII</u>	5'	AGCTTAGATCTACGATCTTATAATTACACGATTGTAGTTTGAATAAAATTTTTT
<u>HLR40</u>		3'	ATCTAGATGCTAGAAATATTAATGTGTCTAACATCAATTCAAACCTTATTTTAAAAAAA
	<u>BamHI</u>		
			ATAATAAG 3' <u>HLR39</u>
			TATTATTCCTAG 5' <u>HLR40</u>

pHES61 AAGCTTAGATCTACGATCTTATAATTACACGATTGTAAGTTTGAATAAAATTTTTTATAATAA

BamHI KpnI XhoI
[ATG-GGA-TCC-CCG-GGT-ACC-GAG-CTC-TCG-AGT-AAA-TAAATAATTTTAT]
SmaI SacI

95

pHES62

<u>BamHI</u>	<u>KpnI</u>	<u>XhoI</u>
[<u>ATG-GGG-ATC-CCC-GGG-TAC-CGA-GCT-CTC-GAG-TAAATAAATTTTAT</u>]		

pHES63

<u>BamHI</u>	<u>KpnI</u>	<u>XhoI</u>
[ATG-GGG-GAT-CCC-CGG-GTA-CCG-AGC-TCT-CGA-GTA-AAA-TAAATTTTAT]		

pHES64
[GGATCCCCGGTACCGAGCTCTCGAGTAAATAATTTTTAT]
BamHI KpnI XhoI
SmaI SacI

Sal1

FIG.8-1

1 TCGACTGACGACAATAACAAATCACAAATCGTTTTTGATATTATTATTTCTTGGTAACGTATGCCITTAATGGAGTTTCACCATCATACTCATATAATGGATTGCACCACTTCT
<X V S S L L L I V V D N K I N N K K T V Y A K L P T E G D Y E Y L P N A G S E 26

121 ATCAATGATTGTGCACCTGCTGGCATCGATGTTAAATGTTTTACAACTATCATAGAGTATCTTATCGTTAACCATGATTGGTTGTGATCGTATCGCATTTTTTGGTTCTTTCATTTCAG
<I L S Q A S S A D I N F T K C S D Y L I K D N V M <C9L 74.7kDa (fragment)

241 TTATGTATGGATTTAGCACGTTTGGGAAGCATGAGCTCATATGATTTTCAGTACTGTAGTGCAGTACTATTAGTTTCGATCAGATCAATGTCTAGATCTATAGATCAAAACACGATAGG
<N H I S K A R K P L M L E Y S K L V T T D T S N T E I L D I D L D I S D F C S L 145

361 TCAGAAGATAATGATCTGTACGCTTCTTTTGTACTGTAACTTCTCGTTTGTAGATGTTTGCATCGTCTTTAACATCAATGGTACAAATTTTATCCTCGCTTTGTGTATCATAT
<D S S L S Y R Y A E K Q V T V E R K T L H K C R A K V D I T C I K D E S Q T D Y 105

481 TCGTCCCTACTATAAAATTGTATATTTCAGATTATCATGATGTGATACGGTAAACGGGATCAATAAAGGAGCACACCATTTTAGTCATAACCGTAATCCAAAAATTTTAAAGTATATC
<E D R S Y F Q I N L N D H S T Y V S V T D I F P A C W K T M V T I W F N K F Y I 65

601 TTAACGAAGAAGTTGTATCAICGTTAGGATTGGTAAATCATTATCTACAGTGTATGGTACTAGATCCTCATAGTGATATATCTAGAGTAATGTTTAATTTATCAAAATGGTTGATAA
<K V F S T T D D N P N P L D N D V T Y P V L D E Y T Y I D L T I N L K D F P Q Y 25

721 TATGGATCCTCATGACAAATTCGGAAGATGGAATGAGATATAGACATGCAATAATCTAATCGAAGACATGGTTACTCCTTAAAAAATACGAATAATCACCTTGGCTATTAGTAGT
<Y P D E H C N G F I S I L Y L C A I F R I S S M <C8L 21.6kDa

841 GTCATTTAACACTATACTCATATTAATCCATGGACTCAATAATCTCTATACGGGATTAACGGATGTTCTATATACGGGATGAGTAGTTCTCTTTTAACTTTATACITTTTACTAATCA
<D H S E Y D R Y P I L P H E I Y P S S Y N E E K V K Y K K S I M 119

961 TATTTAGACTGATGGGTAATAGTGTTTGAAGAGCTCGTTCTCATCATCAGAAATAATCAATATCTCTGTTTTTTTGTATACAGATGTATTACAGCCTCATATATTACGTAATAGA
<N L S I Y P Y Y H K F L E N E D D S Y I L I E T K K N Y L H I V A E Y I V Y Y F 79

1081 ACGTGTCACTACCTTATTAACITTCACCGCATAGTTGTTGCAATACGGTTAATCCITTTGACCTCGTTCGATTTCCGACCAATCTGGGCGTATAATGAATCTAAACTTAAATTTCTTGT
<T D D V K N V K V A Y N N A F V T L G K V E D I E S W D P R I I F R F K L K K Y 39

1201 AATCATTCGAAATAATTTTTAGTTTGCATCGTAGTTATCCCTTTAIGTAACTGTAATTTCTCAACGCGATATCTCCATTAAATGAATGTCGAATTCGTGCTGTATACCCATACTGA
<D N S I I K L K C G Y N D G K H L Q L N R L A I D G N I I I D F E H Q I G M <C7L 18.0kDa

1321 ATGGATGAACGAATACCGACGGGTAAATAGTAATTTACTTTTTTCACTCTTTACATAATTTGGGTACTAGTTTTTACTATCATAGTTTTATAAATTCACANGCTACTATGGAAATAGCCCAACC

— 100022 —

97

FIG.8-3

2641 GATCCAAAGACGAACCTTTGGCGTCCCTCTATAATATCCCGAGAAAGATATTTTCGGTGTATTAGTTATCGAGATCTGATCTGTTTCATATACGSCATGATTGTACGGTACGTTATGATA
 <S G F V F E K A D E I I N G S F I N E H K L K D L D S R N M Y A M <C5L 24.5kDa

2761 ACCGCAATAAAATCCATTTTTCATTTTAAACCAATACTATTATTCATAATTGAGATTGATGTAATACTTTGTACTTTTGAACGTAAGACAGTACACGGATCCGTAICTCCCAACAGCA
 : <E Y N L N I Y Y K T V K F T F V T C P D T D G V L V 291

2881 CGTAGTAATCAAAATTTGGTGTGTTAAACTTCGCAATATTCATCAATTTAGATAGAACTTATCTCATCATCTGTGTTTAGGAATCCATGTATTATTACCACCTTCCAACTTATCATTAT
 <Y Y D F K T N H F K A I N H L K S L F K Y E D D T K P I W T N N G S E L K D N D 251

3001 CCCAGGCTAAGTTTCGICCATCATCGTTGGCGAGAGTGAATAATTTCTTTTGTATTCGGTAGTTCAAATATATGATCCATCGCATAGATCGGCAAGCTATTGTAGATGTGATTTTTCCTAA
 <W A I N R G D D N R L T F L E K T N P L E F I H D M C L D A F S N Y I H N K R F 211

3121 ATCTAATAIAAAACTCGTTTACIAGCAACACATTTCCCTGATTIATCGACCAGACACATATGGTTTCTAAATCTATCAAGTGGTGGGATCCATAGTTATGACGCAAGTAAACATATATTAT
 <R I Y F E N V L L C K G S K D V L V C I T E L D I L H H P D M T I V C Y C I N H 171

3241 TACATTCCTGACTGTCGTAATATCTAAATATTATTGTTATCGTATTGGATTCTGCATATAGATGGCTTGTTATGTCGAAGATATAGAACACATAACCAATTTTATAGTCGCGCTTTACAT
 <C E Q S D S I D L Y K N H D Y Q I R C I S P K Y T L S I S C M V L K Y D R K V N 131

3361 TCTCGAATCTAAGATTAGAGATTAGAAACATTATATCCTCGGATGATGTTATCACTGTTTCTGGAGTAGGATATATTAAAGTCTTTACAGATTTCGTCGATTCCAAATAAATCACTA
 <E F R F N L S K S F M I D E S S T I V T E P T P Y I L T K V S K T R N L Y I V L 91

481 AATAATATCCACATTATCATCTGTTAGAGTAGTATCAATTAATCTATTATATTTATGAAGATATATCACTGCTCAGCTCTATATTTTCGTACATTTTAAACTGTTTGTATAATATCT
 <Y Y G V N D D T L T T D N F R N Y K I F S I D S S V E I N R V N K F Q K Y L I E 51

3601 CTCGTACAAATCAGATATATCTATTGTGTCGGTAGAGGATACCGTTACATTGGAATTAATGGTGTTCATTTTACAACCTTTTACAAGTTTGACCAATTCATTCTTAATAGTATCAAACT
 <R I C D S I D I T D T S S V T V N S N I T N W K V V K L L N V L E N R I T D F E 11

3721 CTCATGATTAAATATTTAATAGTATCCATTTTATATCACTACGACACAAGTAGTGACATAAACCAATTGTATAATTTTATGTTTTTATTAGCGTACACATTTTGGAAAGTT
 <G H N F I K I T D M <C4L 37.2kDa <R V C K P L E 257

3841 CCGGCTTCCATGATTTCTCTGGAGAGCAAGTAGATGATGAGGAACAGATAGTTTATATCCGTACTTGCACCTAAAGTCTACATTGCTGTTGTATGAGTATGATCTTTTAAACCCGCTAG
 <P K W T N G P S C T S S S G S L K Y G Y K C K F D V N D N Y S Y S R K F G S S 217

3961 ACAAGTAICCGTTTGATATTGTAGCATTTTAAATCTGACACGTCGGTGGGATCGGACCATTTCTCCTCCIGAACACAGGACACCAGAGTTACCAGTACCAGCAATATCCACTAT
 <L Y G N S I T P H P C K V I Q C T P P D S W E G G S C L V G S N G I L S Y G S N 177

4081 TCAACTATAAGTTACAACGCTTCCATCGGTATAAAAATCCTCGTATCCGTTATGTCTTCCGTTGGATATAGATGGAGGGGATTGGCATTAAACAGATTTCACAAATAGGTGCCTCGGGAT
 <C S Y T V V S G D T Y F D E Y G H R G N S I S P P S Q C K V S E C I P A E P N 137

4201 TCCATACATAGATCCAGTAGATCCTAATTACAAATACGATTAGATTACCCGATCAAATGATATCCGTTATTACAAGAGTAGCTTATAGAGGCAAAAGTCTACTCCACCAATATCAA
 <W V H S G T S G L E C Y S K S E G I L H Y G S N C S Y T I S S G F D V G G I D L V 97

4321 GTTGGCCATTATCGATATCTCGAGGCGATGGGCATCTCCGTTAATACATTGATTAAAGAGTGTCCATCCAGTACCTGTACATTAGCATATATAGTCCCAATTTTTCCTTCTGTATC
 <Q Q H D I D R P S P C R R K I C Q H F L T W G T G T C K A Y I P G H K Q K R Y G 57

4441 CAGGTAGACATAGATATCTATAGTGTCTCCTATGTGTAAATTAGCATCAGTCTCCACACTATTCTTAAATTTTCATATTAAATGGTTCGTGACGGAATAGTACAGCATGATAGAA
 <P L C L Y E I T D G I N Y N A N A D T E V S N K F K H N I P R S P I T C C S L V 17

4561 CGCATCCTATTCCCAACAATGTCAGGAACGTCACGCTCTCCACCTTCATATTATTTATCCGTAAAAATGTTATCCCTGGACATCGTACAAATAATAAAAGCCCATATATGTTTCGCTATT
 <C G I G L L T L F T V S E V K H <C3L 28.6kDa <Q 512

FIG.8-4

4681 GTAGAAATTGTTTTACAGTTGCTCAAAAACGATGGCAGTGACTTATGAGTTACGTTACACTTTGGAGTCTCATCTTTAGTAAACAATATCATATAATTCGATATTACGAGTTGACATAT
 <L F Q K E C N S L F S P L S K H T V N C K P T E D K T F M D Y Y E I N R T S M D 472

4801 CGAACAATTCNAAGTATTGATAATTTGGATAATATTGTAATTTGTCATCTGCTAATAATTAGATATAATCACCAGCAAGAACACACGAACATCTTTCTACATGGTTAAAGTACATGTACA
 <F L N W T N S K P Y Y E Y K A D A I I L I Y D G C S C V F M K G V H N F Y M Y L 432

4921 ATTCTATCCATTGTCTTCCCTTAACIATATATTTGTATAGATAATTTACGAGTCTCGTGAGTAAITCCAGTAAATTACATAGATGTGCGCGTCTACTCTACAGCATAAACTATACIATGAT
 <E I W K D E K V I Y K Y L Y N R T E H T I G T I V Y I D G D Y E V A Y V I S H H 392

5041 GTCTAGGCATGGAGACITTTTTATCCAACGATTTTITAGTGAACATTCACACATCGTTTAAATACIACATATTTTTCATACGTGGTATAAACTCCACCCATTACATATATATCATCGTTTA
 <R P H P S K K I W R N K T F C E V D N L V V Y K E Y T T Y V G G H V Y I D D N V 352

5161 CGAATACCGACGCGCTGAATATCTAGGAGTAATTAAGTTTGGAAAGTCTTATCCATTTCGAAGTGGCGTGTTCAAATATTCTGCCACACCCGTTGAAATAGAAAATTCATACTCTCCTA
 <F V S A G S Y R P T I L N P L R I W K S T G H K L Y E A V G T S I S F E L G G I 312

5281 TIACATATAACTTCCATCGTTAACACAAAGTACTIACTCTGATTTTAAACGACGACATATTAGTAACCGTTTTTCCATTTTTTCCGTTTCAAGATCTACCCCGGATACGGAATAAACATGTC
 <V Y L K G D N V C T S V E S K L S S M N T V T K W K K T E L D V R S V S Y V H R 272

5401 TATTGTTAATATCCGCGCAATAATGATAGACAAATTATGTAACAATTTGTCATTATAGAAATTGTCTATCTGTATTACCGACTATCGTCCAATATTCTGTCTCCTAGGAGAGTAATGGGTTA
 <W N I H G G I I Y L C N H L V N A N Y F Q R D T N G V I T W Y E T R P S Y H T I 232

5521 TTGTGGATATATAATCAGAGTTTTTAATGACTACTATATATGTTTTATACCATTTTCGTGICACTGGCTTTGGATATAGTTAATCCCAACAATGATATAGCATTTGGCATAG
<T S I Y D S N K I V V I N H K I G N R T V P K T S K S I T L G L L S I A N R M T 192
5641 TATTAGTCATAAACTTGGGATGTAATAAGTTGATGATATCTACATCGTTTGGATTTTTATGTATCCACTTTAATAATAATCATAGCTGTAACATCCTCATGATTTACGTTAACGTCCTTCGT
<N T M F K P H L I N I I D V D N P N K H I W K L L I M A T V D E H N V N V D E H 152
5761 GGGATAAGATAGTTGTCAGTTCATCCTTTGATAAATTTCCAAATTCGGATCGGATGTCACCCGAGTAATATTGTTGATTATTTCTGACATCGAGCATATATAGTTTTTAATTCAT
<S L I T T L E D K S L K G F E P D S T V A T I N N I I E S M S A N Y L K K I G Y 112
5881 ATCTTTAGAAAAGTTAAACATCCTTAAACATTTGIGGAATTAATATTATGAATCATAGTTTTTACACATAGATCTACTACAGCGGGAACATCAATTATTACGGCAGCAACTAGTATCA
<R K : S F N F M R I C N T S N I N H I M T K V C L D V V P P V D I I V A A V L I M 72
6001 TTCTACATTTGTTAATGGTATGTTTAACTTCTTCCAGCGCATATAGTCTAATAGCGATTCAAAACGGTGATAGTTTATACCATTCATTAATATCGCTTCATCCTTTAGATGGTGATCCT
<E V N N I T I N I K K W R M Y D L L S E F A H Y N I G N L I I A E D K L H H D Q 32
6121 GAATGCGTTTTAAAAAATTATACGGAGACGCCGTAATAATTTCCCTATTGATATAATTTCCCATTTGATAGAAATATACGCTTTCCATTCTTGAAGTACTATAAGTAATTATAG
<I R K F F N Y P S A T I I E K N V Q I I E G N I S F I V S E M <C2L 59.2kDa
6241 TATAATGTAAAGGTTATATATTCATATTTTTTATAAAAAATCATTTTCGACATTAATTCCTTTTTAAATTTGCGTCTATCTATAGAAACATATCTATGAATTTATAAAATGCTT
<K S M L E K K K F K R R D D I S V Y E I F K Y F A K 200
6361 TTACGIGTCTATCGTAGCGGATAGAACCGCTAAAGCCATCGAATTTCTACAAAGAACTGTATATGGTATAGGAGAGTATAAAACATTAAATGTCGGTACTTATTAAGTATT
<V H G I T P S L V A L F G I S N R C F F R N Y P I P L T Y F M L H G Y K N F Y E 160
6481 CAGTAGCCCAATCCTAACICITTCGAATACITATTAAATGGCTCTGTTCTGACGAATCTATTTTTTGAACAACGGACCTAGTGGTATATCTTGTCTATGTAATAATAATGTCGTA
<T A L G L E K S Y K N I A R T R Y S D I K K F L P G L P I D Q E I Y R F Y H R V 120
601 CTAGATCGGTTAGTTTAATATCCTCAGTCATCTGTCTAGAAATGCAATCTAACTCGGGTTAGGCTTTAGTTTCTATATCTACATCTATGCTTTTATCTAACACCAAAAATA
<L D T L K I D E T H K D L I A F R V A P K P K L K T E I D V D I D K D L V L F I 80
6721 TAATAGCTAATATTTTATACAAATCATCCGGATATCTCTACGATCTCACTAACTAATGTTTCTTTGGTTATAGTATAGTCACTATCGGACAAATAAGAAATCAGATGATCGAT
<I A L I K N C D D P Y E E V I E S V L T E K T I S T Y D S D S L Y L F D S S R H 40
6841 GAATAATACATTTAAATTCATCATCTGTAAGATTTTGGAGATGCTCATTAAGAAATATTATTAGGTTAGTACTCATTCGCGAGCTATTACTTATTTTATTTTTCACCATAT
<I I C K F E D D T L N K L H R M L I N N P N T S M I M R C S N S I K N N K V M C1L 26.4kDa
<K E G Y 114

FIG.8-5

6961 AGATCAATCATTAGATCATCAAAAATATGTTTCAATCATCCTAAAGAGTATGGTAATGACTCTTCCCATCTAATTTCTGAACGTTCCACCAATGTCCTAGCCACTTTGGCACTAAATAGCG
 <L D I M L D D F Y T E I H R F L I T F S E E W R I E S R E G I D R A V K A S I A 74

7081 ATCATTCGCTTAGCGTCTCTATATTATTAACTGGTTGATTCAATCTATCTAGCAATGGACCGTCGGACAGCGTCATTCTCATGTTCTTAATCAATGTACATACATCGCGTCATCTACCG
 <I M R K A D E I N N V P Q N L R D L L P G D S L T M R M N K I L T C V D G D D V 34

7201 AATTCATCCAAACATCAAGCCTTTTAAATCATCATTAATAATAGGTTTGATCGTTGTCATTTCTCCAAAGAATATATCTAATAAGTAGAGTCCTCATGATTAGTTAACAACATATTTTT
 <L E D L L M L K K F D D N Y Y T Q D N D N R W L I Y R I L L T R M <N1L 14.0kDa

7321 ATGTTAAATCAATTAGTACACCGCTATGTTTAACTATTTCATATTTTAGTATTTTAGGATTGAGAAATCAATAACAAAAATTAATGCATCATTAAATTTAGAAATACCTTAGTTTCCACGTA
 <F Y K T E V Y 169

7441 GTTAATGAACATTTGAACCTCATCGTACAGGACGTTCTCGTACAGGACGTAACATATAACCGGTTTATATTTGTTCAAGATAGATACAAATCCGATAACITTTTTTACGAATTCCTACGGG
 <N I F C K F E D Y L V N E Y L V Y S Y V P K Y K N L I S V F G I V K K V F E V P 129

7561 ATCCACTTTAAAGTGTCATACGGGGTCTTTTATTTTTTAAACAGATCAATGGTGTGATGTTGATTAGGTCTTTTACGAATTTTGATATAGAAATAGCGTTTACATATTTCTCCATAATG
 <D V K F T D Y P T R K I K K F L D I T H H Q N P R K R I Q Y L I A N V Y E G Y H 89

7681 GTCAATCGCCATTTGTTGATGTATCAATAATCTTAAATATATGACACTGTGATTGTTTAGTTCATCCCTTGTTGTTAGGAATCTATTCAAAATGGCAATTTATACTAGAACTATA
 <D I A M Q E Y T M F E K I I H C Q T N N L E D K N M T L F R N L I A I I S S S Y 49

7801 GGTGCTGTATACACATATTGATGTGCTGTTTATACAATCCATGATATTTGGATCCATGCTACTACCTTCGGGTAATAATTTGTAGCATCATATACCATTTCTAGTACTTTIAGGTTTCATT
 <T R Q I C M N I H R N I C D M I N P D M S S G E P L I T A D Y V M E L V K P E N 9

7921 GTTATCCATTGCAGAGGACGTCATGATCGAATCATAAAAAATATATATTTTATGTTATTTTGTAAATAATCATCGAATACTTCGTAAGATACTCCTTCATGAACATAATCAAGTT
 <N D M A S S T M <N2L 20.8kDa

8041 ACAAACGTTTATATGAAGTAAAGTATCTACGATTTTACAAAAGTCCGGATGCATAGTACAAGTACGCGATAACCGGAATAATAATAGATTTTATCTAGTTTATCTTTTCTATAGCT
 <V F R K Y S T F Y R R N K C F D P H M L V F Y A I F P I I I S K D L K D K E I A 416

8161 TTCATAGTTAGATACATGGTCTCAGAAGTAGGATTATGTAACATCAGCTTCGATAAAATGACTGGGTTATTAGTCTTACACATTCGCTCATACATGATGACCGTTAACIACAGAGTCT
 <K M T L Y M T E S T P N H L M L K S L I V P N N L R V C E S M C T H G N V V S D 376

8281 ACACIAAATGATTGAACAATAGATAGTCTACCAATGTTTCGTAATTCAGATAGTACAGCGTAGTACATCTTCACAAAATTATATCATTTGTCTAATAGATATTTGACGCATCTTATG
 <V S F H N F L L Y D V M T E Y E S L V A Y Y M A D E C I I D N D L L Y K V C R I 336

8401 GATCCACTTCAACAGCCATCTTAAATCGGTAGATCATATTGCTTTCCTTTATCATTAATAATTTCTAGAACATCATCTCTATCATAAAGATACAAATATTAACTGTTTGATCGGTA
 FIG.8-7<S G V E V A M K F D T S D Y Q K G K D N I I E L V D D R D Y F I C I H V T Q D T 296

8521 ATAACATTGCTAGTCGATAGCAATTTGTTAATAAGATCGCTGGCTCAATGCTTAATAAGAGGTGAAGAGGACTATCTCCGAATTTGTTTGTATTAAACATCCGTTGATGGAAGT
 <I V N S T S L L K N I L H A P S L T K I L L T L P S D G F K N Q K N V D T S P L 256

8641 AAAAGATCTATAATGCTACATCTTGACTGTTTAGAGCATACAATATGGAGAGGTGTTATTCATCATGATCTGGTTTGGAGGACTAATTCCTAGTTTCATCATCCATGAGATTGTGA
 <L L D I I D V N K V T K S C V I H L P T N G D H D P K S P S I G L K M H W S I T 216

8761 GAAGCTTTGGATTGCTGACATAAGATGCTATGAATATGATTTTGGCCAAATTTATCCACTATCCTGGCTCGAATCCGATGGACATTATTTTTTAAACACTCTTTCTGAAGGATCT
 <S A K P N D S M L H R H I H N K G F K D V I R A E F G I S M I K K F V R E S P D 176

8881 GTACAGCCCAACACGACCATCTCTTCATCAACCGAGTTGTTAATCTGGCTCCATCTGTACCAATAAATTTATTCTCTCTATGACTCATCTGTTCCGAGAGATAATAT
 <T C A L L P G C G E E D V S N N I K A G Y Q V L L N I R E I V E D D T G S L Y Y 136

9001 AGAGGTGTTTTATTATGTTATCACACGCGTTTGGATCTGGCCGTCGTCAGCAGCATCGGACTATTCTATTATTAAATTTTAGAAGCTATATGCAATGGATAATTTCCATCATCA
 <L P T K N H K D C A N P D A G H T L L M A V I R N N N I K S A I H L P Y N G D D 96

9121 TCCGTCATTTGGAGAGTATCCTCTATGAAGAAGTTCTTCGACAAATCGTTTCATCTAGTCTTTAATCCACAATACGGATGTAGATGTGATAATTATTCAGAGGTTCCGATAGCT
 <D T E N P S Y G R H L L E E V F R E D L G K I G C Y A H L I H Y N N G S P E I A 56

9241 TGTAGCATATTCCTAAATACATCTAAATTTTACTATTATATTTGGCATAAAGAGATAGATAATCTCGGCCACATAATGTTGTCATTGTAGTATAAAAATTAATATTCTATTCTTA
 <Q L M N R F V D L N K S N Y K A Y L S L Y Y E A S M I N D M T T Y F N I N R N R 16

9361 TTCTGTATATTGGCAACAAITTTACTCTCTATAACAATAATCACTTAGTTCTTTTATGTCAAGAGGCACGTGGTTAGTTTCATCTATAAATGTACGCCATAACTACCGCATGCC
 <N R Y I Q L L K S E I V F I M <MIL 54.2kDa
 <E R Y C I D Y S L E K I D L L C Q N L E D I F T V G Y S G R M G 189

9481 ATACTCAGAATTATGATAAGATATTATCCTTGGGTGTAGGTAATGGGATTAAATCTTTGTTGGATCAGTCTCTAAGTTAACACATGCACACATGATCCATTATAGTTATATCACA
 <Y E S N H Y L Y K D K P H L Y H P N I K T P D T E L N V C T V C S G N I T I D C 149

9601 CGATGATGATTTATGAATTGATTCGGAGAGATCGCTATCGTATTTTGGTTCCACAATTCATTTCACATACATGTTATTGTCCACTAATATTATGATGAACCTTTATCTAGCGCTGAGT
 <S S S K H I S E P L D S D Y K T T T G C N M E M C T I T V S I N H H V K D L R Q T 109

9721 GGTAAACAACAGACAGATAGTTTATTATCTTTACCAACACCCTCAGCCGCTGCCACAATCTCTGATCCGTTATCGTATGTTTATTCTAGTCCGTCAGTCAACACTAT
 <T F L L V S L K N D K G V G E A A A V F R Q D T D M I T M N I E L G Y G T L V I 69

9841 GTTAGCATTCTGTCGATATAGCTTTTCACCTCATATGACACTCACCATAAATAGTAGAATTAATGTCGTAATTTACACCAATAGTAGTTCGCGCGCAAGTACCAATACCGGTAATCTTG
 <N A N R D I Y S E S M H C E G I I T S N I D Y N V G I T L E A A F Y W Y R Y D Q 29
 9961 TCGAGGAGACATATAGTATCTTGTTATCTACCGAATACCGGAGATCGGATACAAAAGAGCAAGACTAATTTGTAAACCATCTTACTCAAAATATGTAAACAATAGTACGATGCAATG
 <R P P C I T N K Y E V S Y G L S A I C F L L V L K Y V M <M2L 25.1kDa
 10081 AGTAAGACAATAGGAAATCTATCTATATACACATAAATTTCTATCAATTTTACCAATTAGTAGTGAATGTTAAACAAAATGTGGAGAAATCTAATTAGTTTTCTTTACACAATG
 <N K K V C N 278
 10201 ACGTACATGAGICTGAGTTCCTTGTTTTGCTAATTAATTCATCCAAATTTATTTCTTGACGATATCGAGATCTTTTGATAGGAGTCAGACTTGTATTCAACATGCTTTTCTATAATC
 <V Y M L R L E K N K S I I E D L K N N K V I D L D K T Y S D S K Y E V H K E I I 238
 21 ATCTTAGTATTTTCGGCATCATCCAAATAGTACATTTTCCAGATTACAGAGTAGATTAATGTGCTGTAATTTGAACAGAGCCGTGAACATCTCAATGTCTTTTATTATCTATAGCCAATTA
 <Q K T I E A D D L L V N E L N V S Y I N I D Y K F L A Q L M E I D K N D I A L K 198
 10441 ATGTCGGAATGAAGAGAGGGAATTAATGGTGTTGTCGACGTCTATATAGTCGAGCAAGAGAATCATCATATCCAGCTGTCCATTTTTATAGTGGTGAATACAACACTAAGGAGATA
 <I D P I F L L S N N T N T S T H Y D L L L I M H D V H G N K I T T H I C S L L I 158
 10561 GCCAGATCAAAAGTAGATGGTATTTCTGAAAGAAAGTATGATACAATACATTACATCAATTAAGCATGACGGCATGATAAAATGAAGTTTTCCATCCAGTTTTCCCATAGAACATCAGTCTC
 <A L D F T S P I E S L F Y S V I S V D N L M V A H Y F S T K W G T K G Y F M L R 118
 10681 CAATTTTCTTAAACAGTTTCACCGTTTGCAATGTTACCACTATCAACCGCATATAACAAATGCGGTGTTTCTTTGTCATCAAAATGTGAATCATCCACTGCAATAGCAAAATCTTT
 <M N K K F L K V T Q M N G S D V A Y Y L A T N G K D D F Q S D D M G S F L L I K 78
 10801 ACTATTTTGGTATCTCTAATGTGGCTGCCTGATGTAATGGAATTCATTCTCTAGAGATTTTCAATGCTCCAGCGTTCAACACGTCATACACTAGAGCGCAGTTATTATCAGCTATT
 <V I K T D E L T A A Q H L P F E N E L L N K L A G A N L L T C V L R V N N D A I 38
 10921 GCATAATACAAGGCACATGTCATGGACATCCGCCTAAATGTATCTTTACTAGAGAGAAAGCTTTTCAGCTGCTTAGACTTCCAGTATTAATTCGTGACAGATCCATGTCTGAAACG
 <A Y Y L A S H G H V D A K F T D K S S L F S K L Q K S K W T N I R S L D M <K1L 32.5kDa
 11041 AGACGCTAATAGTGTATATTTTTCATTTTTTATAATTTTGTGATATTGCACCAGAAATTAATATATCTCTAATAGATCTGATTAGTAGATACATGGCTATCGCAAAACAACATATACA

61 CATTTAATAAAAATAATTTTAAAGAAAATTCAGATTTCCAGTACCCATCAATATAAATAAATGATTCCTCCACCGTATCCATAAACAATATTAAGGAGATTCTACCTTACCC
 <P S E V K G 364

FIG.8-8

11281 ATAAACAATATAATCCAGTAATATCATGTCTAATGATGAACACAAATGGTGTATTAAATTCAGTGTTCAGGAGATGATCTCGCGTAGCTACCATGATAGTAGATGCCCTCTGCTACA
<Q F L I F G T I D H R I I F V F P T N F E L K E P S S R A T A V M I T S A E A V 324

11401 GTTCCTTGTTGTCGACATCTATCTTTGCAATCTCTGAACCAATTTTATAAATATATAATGGTCCCTAGTGCCTAGTGCATATGTTAAACGACGCATTTATCTGGATTAAACATAGGAGCCATCATT
<T G Q E D V D I K A N Q F M K Y I Y L P D R T M H K F S A N D P N F M S P A M M 284

11521 TCGGCTATCGACTTAATATCCCTCTTATTTTCGATAGAAAATTTAGGAGTTTAAGATTGTACACCTTTATCCCTAATTGAACGACCAATAGTCTAATTTTGCAGCCGTAATAGAACTCT
<E A I S K I D R K N E I S F K P L K L N Y V K N G L Q F S W Y D L K A A T I S D 244

11641 GTGAAATGGGTCAATATTATCACCTATTGCCAGGTACATACATACTAATAATTAGCATCCTTATACGGAAGGCGCACCATATCATATTTCTTCGTCATCGATTGTGATTGTATTTCCCTTGCAATTTA
<T F H T M N D G I A L Y M S I N A D K Y P L R V M D Y E E D I T I T N G Q L K 204

11761 GTAACCTACGTTTCATCATGGGAACCGTTTTCGTACCGTACITATTAGTAAACCTAGCATTTGGTGTGTTTAGTGATATCAACCGGATATTGCCCATGTACCTTTAAATATATAGTATTAAATG
<T V V N M M P V T K T G Y K N T F S A N R T K T I D F P Y Q W T G K F Y I T N I 164

11881 ATTGCCCATAGAGTATTATTGTCGAGCATATTAGAATCTACTACATACATACCGGATCTACGTTCTACTATAGAATTAATTTTAAACCGCATCTCGTCTAAAGTTTAACTATATAT
<I A W L T N N D L M N S D V V N S M G S R R E V I S N I K N V A D R R F M L R Y 124

12001 AGGCCGAATCTATGATTTGATAATAACAACGGTTTAAATGCACACAGTATTATCTACGAACCTTTTGATAAGTTAGATCAGTACGTATATTTAGATGTTTTCAGCTTAGCTAATCCT
<L G F R H Y Q Q Y Y L P K I C V T N D V F S Q Y T L D T Y T Y K S T K L K A L G 84

12121 GATATTAATTCGTAAATGCTGGACCCAGATCTCTTTTCTCAAAATCCATAGTCTTCAATAATTCATTCIAGTATTACCTGATGCAGGCAATAGCGACATAAACATAGAAAACGAATAA
<S I L E T F A P G L D R K R L D M T K L L E I R T N G S A P L L S M F M S F S Y 44

12241 CCAAACGGTGAGAGACAATATATCATCTTGAATATTTTATACGCTACTATACCGGCATTGGTAATTCCTTGACAGACGATAGGTAGACACTGAACACGTTAACGATAGTATCAATAAC
<G F P S F V I N D D Q I N K Y A V I G A N T F G Q L R Y T S V S C T L S L I L L 4

12361 GCAATCATGATTTTATGGTATTAATAATTAACCTTATTTTATGTTTCGGTATAAAAAATTATGATGCTACACATCCTTTTGTAAATTGACATCTATATATCCTTTTGTATAATCAACTCT
<A I M <K2L 42.3kDa
<Q H R C M R K Y N V D I Y G K T Y D V R 69

12481 AATCATTAACTTTTACAGTTTTCCTACCGATTATCCCTATATTCAACATATCTATCCATATGCACTCTTAACACTCTCTGCCAAGATAGCTTCAGAGTGAGGATAGTCAAAAAGATA
<I V K V K V T K G V L K D R Y E V Y R D M H M K V S E A L I A E S H P Y D F L Y 29

12601 AATGTATAGAGCATATCCTTCTCGTATACCTGCCCCCTTTATACATCGCCCGGATTGGCAACGAATAACAAATGCAAGCATCTTGTAAACGGGCTCGTAAATTGGGATAAAAAATTAT
<I Y L A Y D K E Y V R G K I V D G A N P L S Y C F A L M <K3L 10.5kDa

FIG.8-9

12721 GTTTTATATCTATTTTATTCAGAGAAATATTCAGGAATTCITTTTCGGTGTATCTCATCGCAGTATATATCATTTGTGATGTTTCAATATTTTAAIAGITTTACACCTTTTAGT
<E L S Y E P I E K E P Q I E D C Y I D N T C Q K M N K L L K C R K T 391
12841 AGGACTAGTATCGTACAAATTCATAGCTGTATTTGAATTCACGCAATAAAATATCTTCCAATTTGTTGACGAAGACCTAATCCATCATCCGGTGTAAATATTAATAGATGCTCCACA
<P S T D Y L E Y S Y K S N W D R M F I D E L Q Q R L G L G D D P T I N I S A G C 351
12961 TGTATCCGTAAAGTAATTTCCGTGCCAATTTGAGGTACCTATATAGGCGGTTTATCGGTTACCATATATTTGGCATGGTTTACCCTAGAAATACGGAAATGGGAGGATCAGCATCTGGTAC
<T D T F Y N G T W N S T G I Y A T K D T V M Y K A H N V R S Y P I P P D A D P V 311
13081 AATAAATAGCTTTACTTCTATCTATGTTTTTAGATTTTAGCATAGCGATAGATCTTAAAGTTTCTCATGATAACGAAGATCGTTGCCAGCAACTAATCAATAGCTTAACGGATAC
<I F L K V E I D I N K S K L M A I S R L F N R M I F S S R Q W C S I L L K V S V 271
13201 TTGTCGTCTATAGCGGATCTTCTTAATTCATCTCTATATAAGGCCAAACAAAATTTTACCCGCTTCGAATAAATAATAGGGATAAAGTTTCATAACAGATACATAAACGAATTTACT
<Q R D I A S R R L E D E I Y P W F L I K G A K S Y I I P I F N M V S V Y V F K S 231
13321 CGCATTTCTAATACATGACAATAAAGCGTTAAATCATTTGGTCTTTCCATAGTACATAGTTGTGGCGGTGCAGAAAGCAATAATACAGAGTGTGGAAACACCACCTTACGTTAATACTAAG
<A N R I C S L L A T L D N T R E M T C L Q Q P A S A I F V S H P V G S V N I S L 191
13441 AGGAIGATCTGTATTAATACGACGGATAAAGTTTTTCCAATTATATGGTAGTTGTTAACTCCAGATACCCAGTATACCTCAAAAATTTGAGTGAGATCCGCTGCCAAGTTCTCTATT
<P H D T N Y Y S P Y F N K W N Y P L N N V G L Y W Y V E F I Q T L D A A L N R N 151
13561 ATTGAAGATCGCAATACCCAATCTTTGACCTGAGTTAGTGATCTCCAATCCATGTTAGCGCTTCTTAATAATAATATGTGTATTATCAGATATCCAAAATTTTGTATGAAGAACTCCTCC
<N F' I A I G L E K V Q T L S R W D M N A S G L Y I H T N D S I W F K T H L V G G 111
13681 TAGGATATTTGTAATATCTATGATCTCAACTCCGGCCATTTGTAGTCTTTCAACATCCCTTAAATGGTTTGTAGATTTATTGACGGCTACTCTAACTCGTACTCCTCTTTTGGG
<L I N T I D I Y R V E V G A M Q L R E V D K L P K N S K N V A V R V R V G R K P 71
13801 TAATTGTACAATCGTTTAATATTATCGTGCGGAATTCGTAGCCACTTCATCCGATAAACTCCAATAAAAGATGATATCTAGTGTGTTTGTGGTATTGGATAGAAATTTCCCTCCA
<L Q V I E N L I I T G F N T G V E D S L S W Y F S S I D L T K T T N S L I E R W 31
13921 CATGTTAAATGTAGACAAAATATACTTTATCAAAATTCATACCTATAGGAATAGTCTCTGTAATCACTGCGATTGTATTATCCGGATTCATTTTATTGTTAAAGAAATAATCCTATATCA
<M N F T S L Y V K D F Q H G I P I T E T I V A I T N D P N M <K4L 48.9kDa
14041 CTTCACTCTATTAATAATCCAAGTTCTTCTTCACTGATTTTTTAACTTCATCCGTTTCCTTATGAAGATGATGTTTGGCACCTTCATAAAATTTTTTATTCTCTATTACAATT
<K E I V I 132

FIG.8-10

14161 TGCATGTTGCATGAATAATATGCACCTGAACATCACTAATCTCATTGTTTGTTCCTGGAGTATGAGAGTCGGGGGTGTTAATCTTGGAAATATATTTTCTAACCTTGTGGTAGCC
 <Q M N C S I I H V Q F H V L R H T Q E R S Y S L R P T N I K S I I K R V K N T A 92
 14281 TTCAAGACCTGACTAGCAATCCAGCCTTAATTTTTTCAATGATTGATTAAATGGTGTATTTTATATAACITTTATCCATAICITAGATACTGATTCGGACATAGCTTTCGACT
 <K L V Q S A F G A K I K E H N I L P D Y Q Y K Y V K D M D R S V S E P C L K Q V 52
 14401 GGCGCATTTGGTGTGATGGTTCCCATAGTTTGGCAGCTAGCAGATTGAGTCTTGAACAGCATCTGCATTAACTAGAGGAGACATTAGAAATCATCTGCTGTAAACAAGTTTGGATTATCG
 <P A N P T I T G H L K A A L L N L R S V A D A N V L P S M L I M A T F L N P N D 12

 14521 TAAGAGGCTAGTATAGAAATGTTCCTCCCATGGAATGACCCCAATAGTAGATTTAATAGTTTACCACGTGCTGTACCAAGTCATCAATCATCATTTTTTTCACCATTACTTCTCCATGT
 <Y S A L I S I T A G M <K5L 15.2kDa <Y N G R A T G F D D I M M K E G N S R G H 61
 14641 CCAATATGATCATGTGAGATACTAAATTCCTAACGATGATATGTTTTCAGCTAGTTTCGTCATAACGTCAGAAATGTTTACCAGCTCCAGCTTAAGAATCAATGCTTACGATAT
 <G I H D H S F V L I G L S S I H E A L E D Y R G S H K G A G H S I F V L A K P Y 21
 14761 GTAATAGTTTCCAATATATGTAAATCATTTGTCAGATTGAACATACAGTTTGCACCTCATGATTCACGTTATATACTAATATTAACAGTTTCGTTGATGATCATATATTTTATGT
 <T I P K W Y I Y D N D L N F M C N A S M <K6L 9.1kDa
 K7R> 17.5kDa H A T K L D Y E D A V F Y F>
 14881 TTTATTGATAATTGTAAACAATACAATTAATCAATATAGAGGAAGGAGCGGATACGTCTTTTGTGAGATAGTCATGGCGACTAAATTAGATTAGAGGATGCTTTTTTACITIG
 V D D O K I C S R D S I I D L I D E Y I T W R N H V I V F N K D I T S C G R L Y>
 15001 TGGATGATGATAAAATATGTAGTCGCGACTCCATCATCTAATAGATGAATATATTACGTGGAGAAATCATGTTATAGTGTAAACAAGATATTACCAGTTGTGGAAGACTGTACA
 <Y I F I N R P S I M N Y H K V F I N G T T S S Q V 40
 K E L M K F D D V A I R Y Y G I D K I N E I V E A M S E G D H Y I N F T K V H D>
 15121 AGGAATTGATGAAGTTCGATGTCGCTATACGCTACTATGTTATGATAAATTAATGAGATTGTGCGAAGCTATGAGCGAAGGAGAGACCACCTACATCAATTTTACAAAAGTCCATGATC
 <L F Q H L E I I D S Y P V I T N I F N I L N D F S H A F S V V D I K C F D M <K8L 7.5kDa
 Q E S L F A T I G I C A K I T E H W G Y K K I S E S R F Q S L G N I T D L M T D>
 15241 AGGAAAGTTTATTCGCTACCATAGGAATATGTCTAAATCACTGAACATTTGGGATACAAAAGATTTCAGAAATCTAGATTCCCATCATTTGGGAAACATTACAGATCTGATGACCGACG
 D N I N I L I L F L E K K L N>
 15361 ATAATAAACATCTTGATACITTTTCTAGAAAAAAATTTGAATTGATGATATAGGGGTCTTCATAAGCCATAATTATTACGTTAGCATCTATATCCGTGTTAAAAAAATATATCCTAT
 15481 CATGATTGAGAGTTTATATGAGCAACATGATAGCTGTGATGCCAATAAGCTT

FIG.8-11

FIG. 9-1

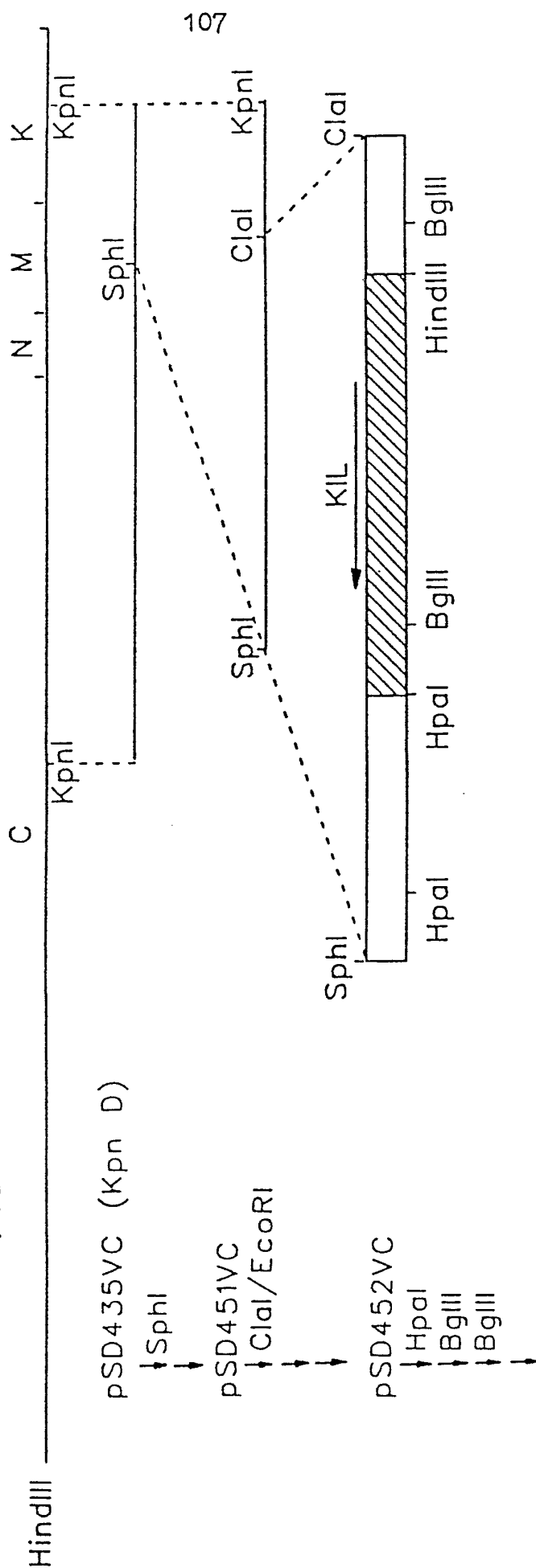


FIG. 9-2

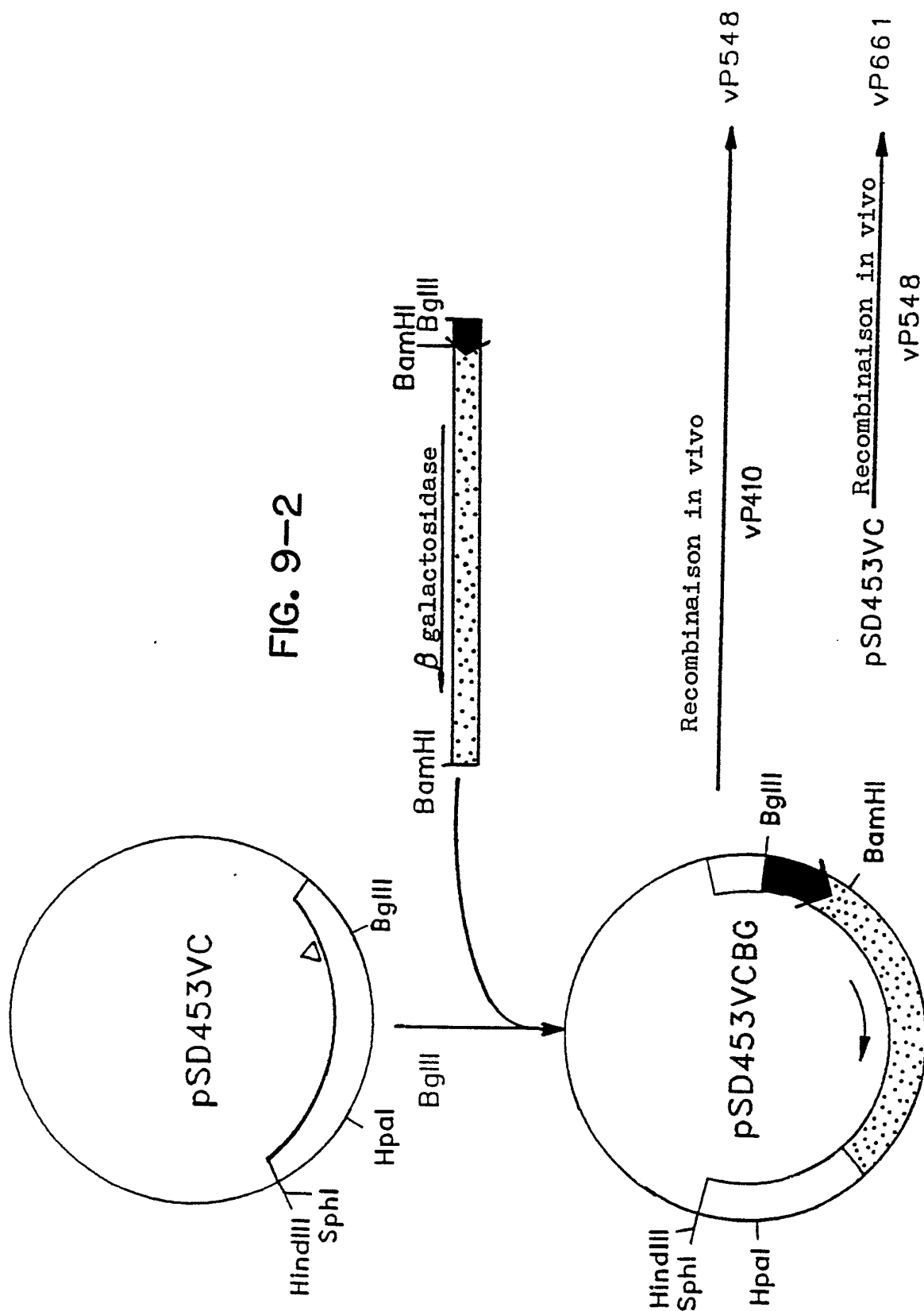


FIG. 10

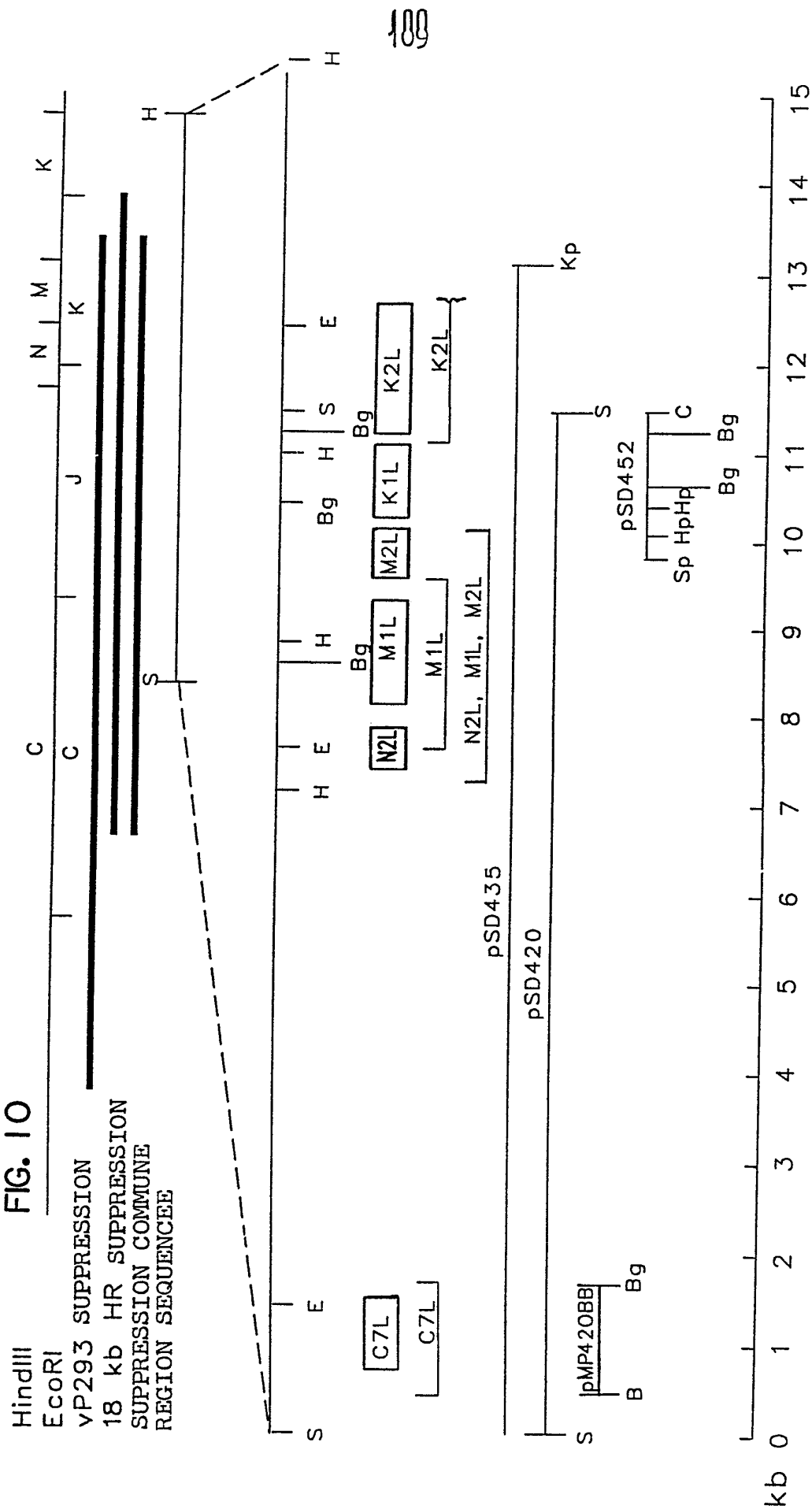
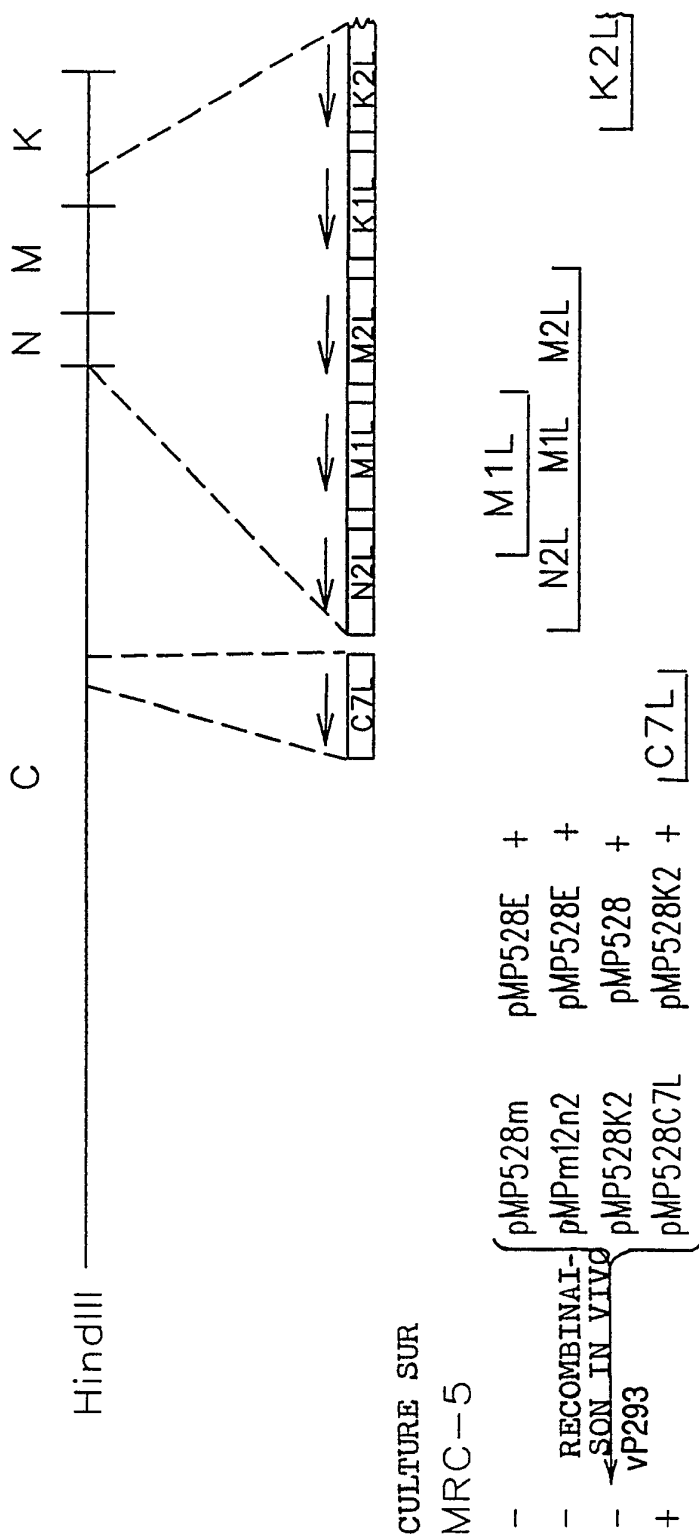


FIG. 11



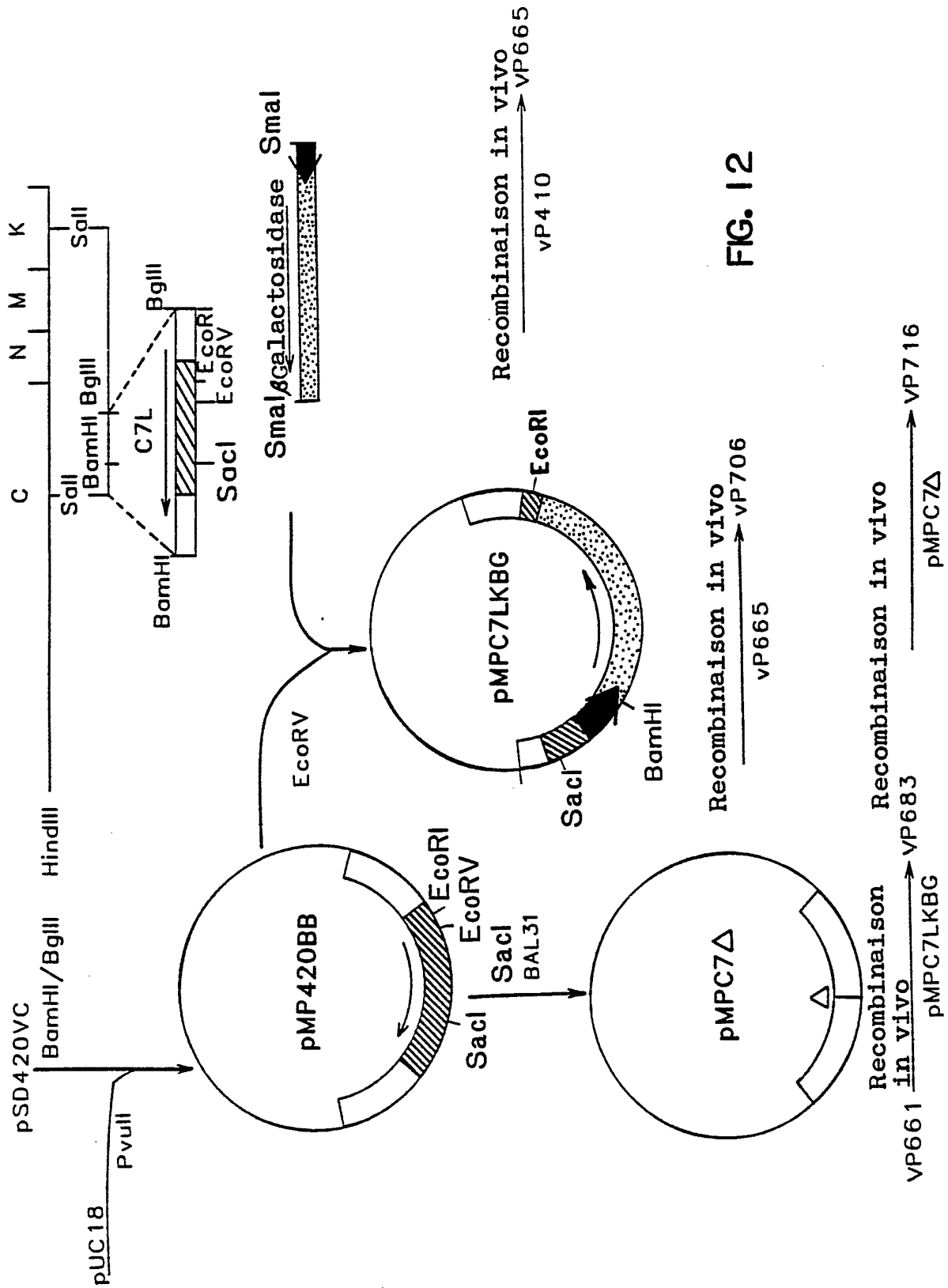
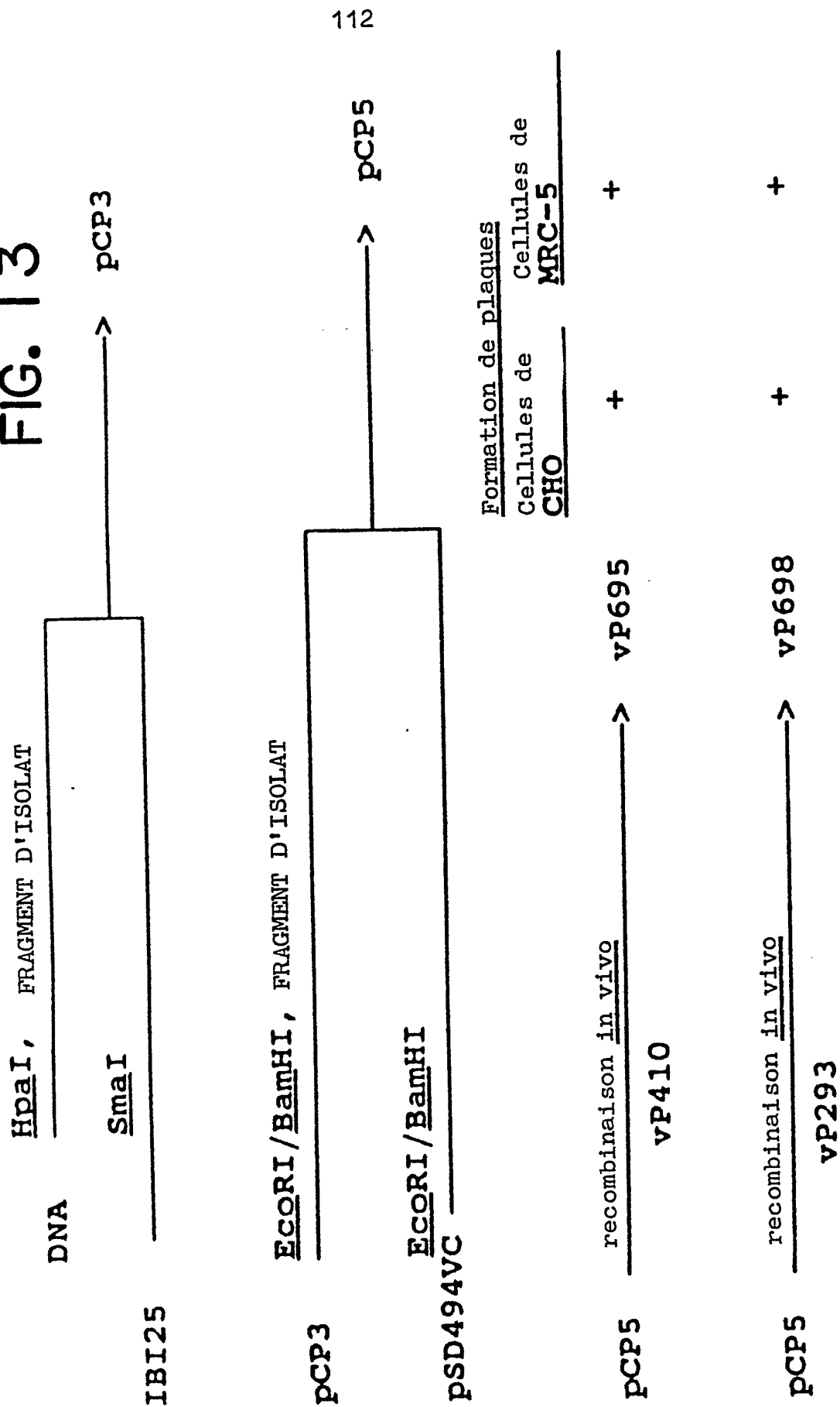


FIG. 12

FIG. 13



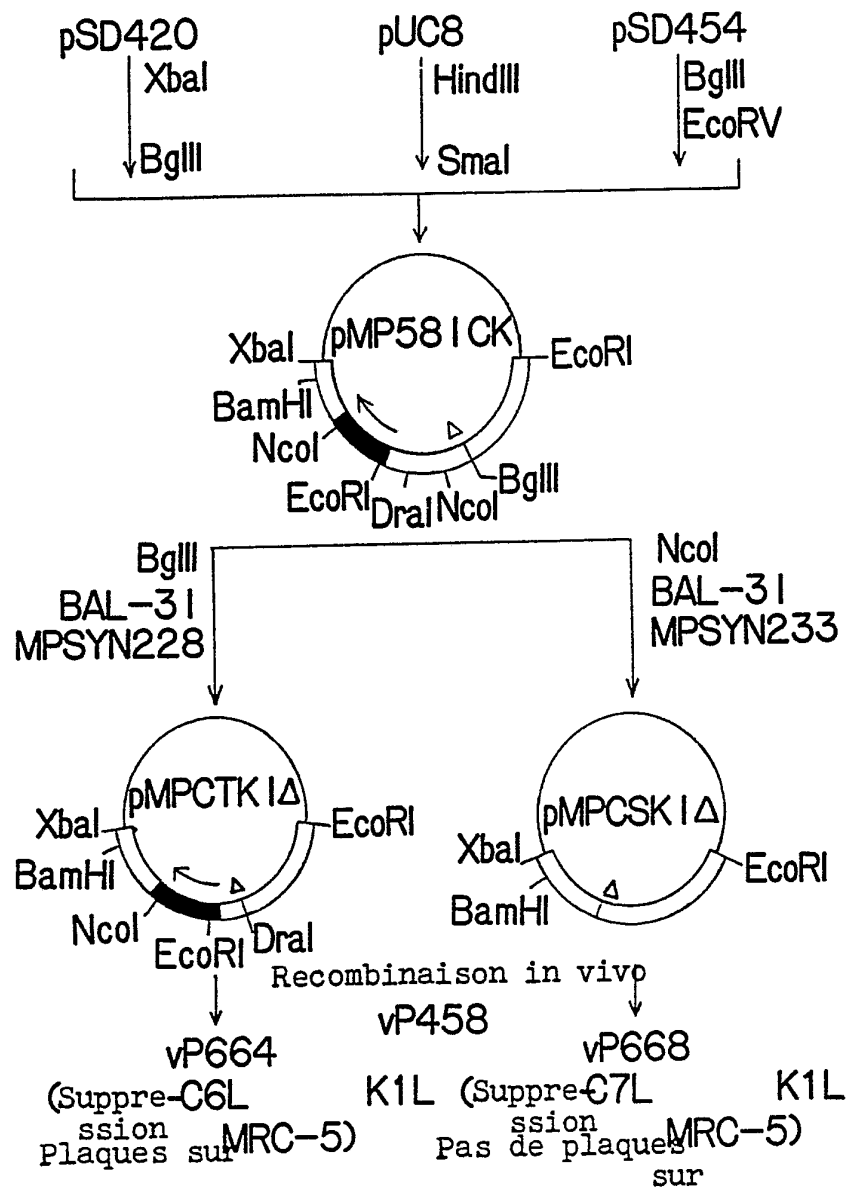


FIG. 14

FIG. 15

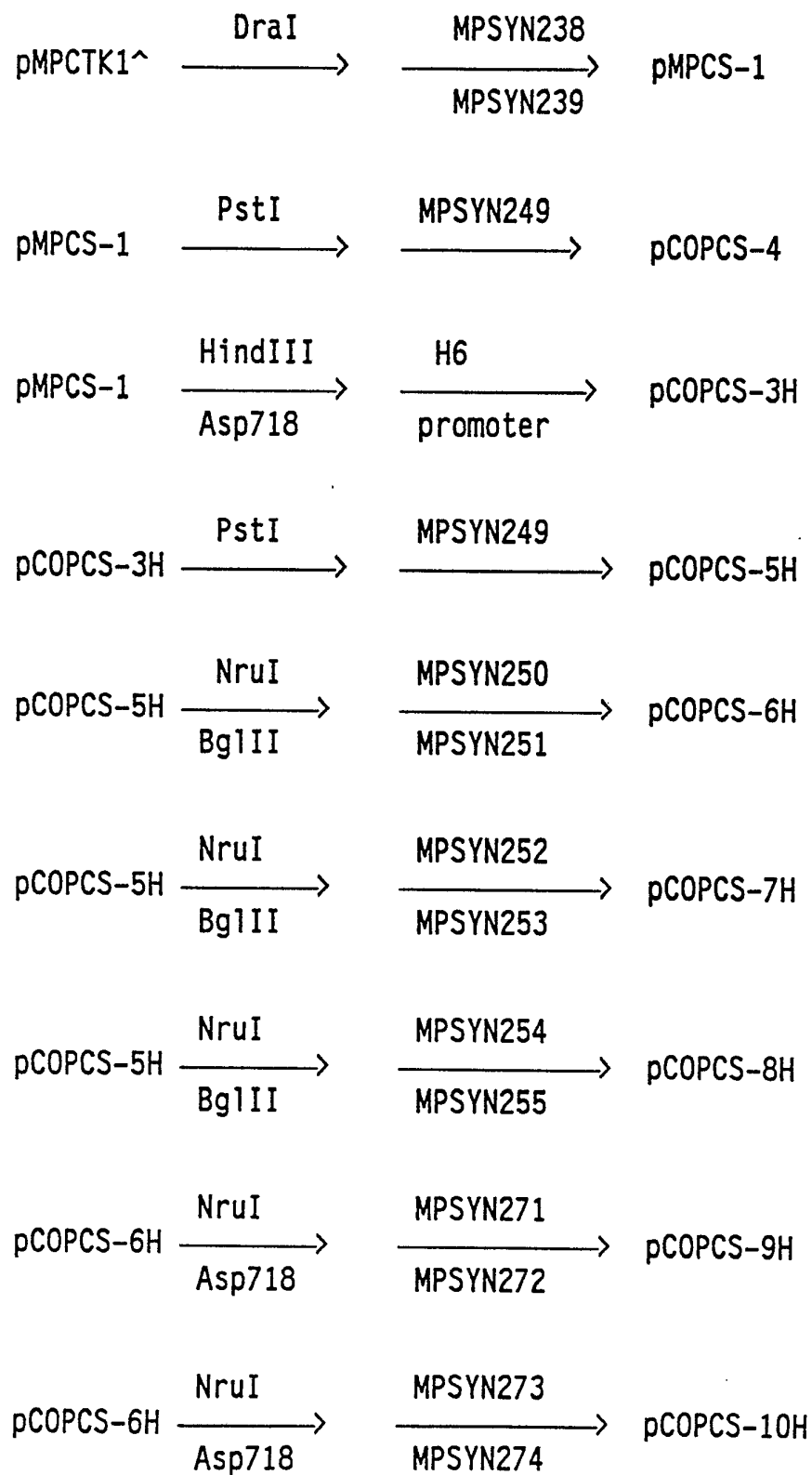


FIG. 16-1

	<u>HindIII</u>	<u>Asp718</u>	<u>SalI</u>	<u>BglII</u>	
MPSYN238	5'	AAAGCTTCTCGAGGTACCCGGTCTGACTCTAGATCTGACGTAAATAATTTTATT	3'		
MPSYN239	3'	TTTCGAAGAGCTCCATGGGCCAGCTGAGATCTAGACGTCATTATTATTAATAATAAA	5'		
	<u>XhoI</u>	<u>SmaI</u>	<u>XbaI</u>	<u>PstI</u>	

	<u>NruI</u>	<u>Asp718</u>	<u>PstI</u>
MPSYN250	5'	CGATATCCGTTAAGTTTGTAATG-GTA-CCC-TCG-AGC-TGC-AGC-CCG-GGG-	
MPSYN251	3'	GCTATAGGCAATTCAACATAGCATTAC-CAT-GGG-AGC-TCG-ACG-TCG-GGC-CCC-	<u>SmaI</u>

115

<u>SalI</u>	<u>BglII</u>
TCG-ACT-CTA-GAA	3'
AGC-TGA-GAT-CTT-CTA-G	5'
<u>XbaI</u>	<u>MPSYN250</u>
	<u>MPSYN251</u>

<u>NruI</u>	<u>Asp718</u>	<u>PstI</u>
MPSYN252	5'	CGATATCCGTTAAGTTTGTAATG-GGT-ACC-CTC-GAG-CTG-CAG-CCC-GGG-
MPSYN253	3'	GCTATAGGCAATTCAACATAGCATTAC-CCA-TGG-GAG-CTC-GAC-GTC-GGC-CCC-
	<u>XhoI</u>	<u>SmaI</u>

FIG. 16-2

<u>SalI</u>		<u>SstII</u>	
<u>GTC-GAC-TCT-AGA-CCG-CGG-A</u>	3'		MPSYN252
<u>CAG-CTG-AGA-TCT-GGC-GCC-TCT-AG</u>	5'		MPSYN253
<u>XbaI</u>		<u>BglII</u>	

<u>NruI</u>		<u>Asp718</u>	<u>PstI</u>
<u>CGATATCCGTTAAGTTGTATCGTAATG-GGG-TAC-CCT-CGA-GCT-GCA-GCC-CGG-</u>	5'		
<u>GCTATAGGCAATTCAAACATAGCATTAC-CCC-ATG-GGA-GCT-CGA-CGT-CGG-GCC-</u>	3'		
		<u>XhoI</u>	<u>SmaI</u>

<u>SalI</u>		<u>SnaBI</u>	
<u>GGT-CGA-CTC-TAG-ATA-CGT-AA</u>	3'		MPSYN254
<u>CCA-GCT-GAG-ATC-TAT-GCA-TTC-TAG</u>	5'		MPSYN255
<u>XbaI</u>		<u>BglII</u>	

<u>NruI</u>		<u>Asp718</u>	
<u>CGATATCCGTTAAGTTGTATCGTAATG-AGT-ACT-G</u>	3'		
<u>GCTATAGGCAATTCAAACATAGCATTAC-TCA-TGA-CCA-TG</u>	5'		
		<u>ScaI</u>	

<u>NruI</u>		<u>Asp718</u>	
<u>CGATATCCGTTAAGTTGTATCGTAATG-ACC-GCG-GG</u>	3'		
<u>GCTATAGGCAATTCAAACATAGCATTAC-TGG-CGC-CCC-ATG</u>	5'		
		<u>SstII</u>	

FIG. 17-2

PCOPCS-5H

Asp718 SalI BglII

[CTCGAGG TACCGG TCTAGAT CTATAA TAAATTTT]

XhoI SmaI XbaI

pCOPCS-6H
Asp718
 [ATG-GTA-CCC-TCG-AGC-TGC-AGC-CCG-GGG-TCG-ACT-CTA-GAA-GAT-CTA-TAA-
 Pst I Sal I Bgl II
 Xho I Sma I Xba I

ATAAAATAATTTTATT

pCOPCS-7H

	<u>Asp718</u>	<u>Pst I</u>	<u>Sal I</u>	<u>Sst II</u>
	[<u>ATG-GGT-ACC-CTC-GAG-CTG-CAG-CCC-GGG-GTC-GAC-TCT-AGA-CCG-CGG-</u>			
		<u>Xho I</u>	<u>Sma I</u>	<u>Xba I</u>

AGA-TCT-ATA-AAT-AAA-TAATTTTTATTT]
Bg111

FIG. 17-3
pCOPCS-8H

Asp718	PstI	SalI	SnaBI
[ATG-GGG-TAC-CCT-CGA-GCT-GCA-GCC-CGG-GGT-TAG-ATA-CGT-			
	XhoI	SmaI	XbaI

AAG-ATC-TAT-AAA-TAAATAATTTTATT
Bg111

pCOPCS-9H

<u>ATG-AGT-ACT-GGT-ACC-CTC-GAG-CTG-CAG-CCC-GGG-GTC-GAC-TCT-AGA-</u>	<u>Asp718</u>	<u>PstI</u>	<u>SalI</u>
		<u>XhoI</u>	<u>SmaI</u>
	<u>Scal</u>		<u>XbaI</u>

Sst II
CCG-CGG-AGA-TCT-ATA-AAT-AAA-TAATTTTATTT]

pCOPCS-10H

	<u>Asp718</u>	<u>Pst I</u>	<u>Sal I</u>
[<u>ATG-ACC-GCG-GGG-TAC-CCT-CGA-GCT-GCA-GCC-CGG-GGT-CGA-CTC-TAG-</u>			
	<u>Sst II</u>	<u>Xho I</u>	<u>Sma I</u>
			<u>Xba I</u>

SnaBI
ATA-CGT-AAG-ATC-TAT-AAA-TAAATAATTTTATTT]
BglII

FIG. 18

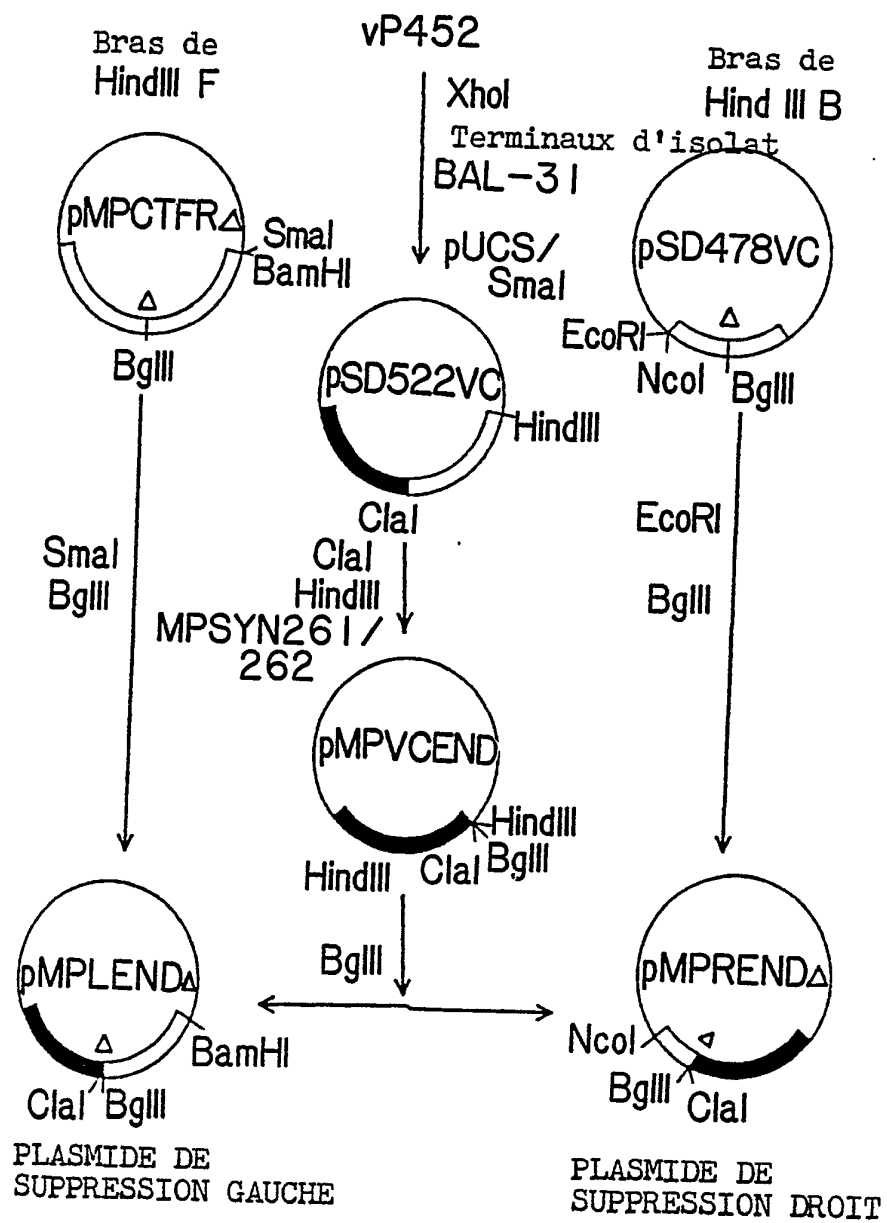


FIG. 19-1

1 CAAAGAGAGAAAGAGAATAAATAATTTTGTAAACTTTTTTATGAGACCATCAGAAAGAGGTTTAATAATTTTGTGATACCCTGAAAGGAAATAGGAAATAGGAATAGGATAGTGTC

121 ATAAATCGTATCACACTATTGAGACACAGAAAAGAAAGAAAGTAACGAGAGGTAACTTTTTGTGAATGTAGTTAAGAACATTTTGTGTTTGCAAACCGGAATATAGTGTCCGGTACACATTTTT

>Clb1

>Clb1

241 AATTCTGGTGTGCCTGAATCGTTCGATTACCCCTACTCATCCAATTTACAGATGAATAGAGTTATCGATTGACACACACGGCTTTGAGTTTGTGTAATCGATGAGTGAAGTATCATCGGT
 <V C A K L K T S D I L S T D D T
 < C23L

>Sal1

>Xba1

361 TGCACCTTCAGATGCCGATCCGTCGACATACTTGAATCCATCCTTGACCTCAAGTTCAGATGATTCCTTGACATGTCICCGATACGAACGGCTAAACTTAGATTCTTGACACATTTTGT
 <A G E S A S G D V Y K F G D K V E L E S S E K C H D G I R V S F E L N K V C K T
 < C23L

481 ATCGACGATCGTTGAACCGATGATATCTTCGTAACCTCAGCTTCTTATGAGAGATGTTAGACCCGAGTACTGGGCTTGATGTGCTGCTGCTTTCTTCTTCTGCTACATCIGATGTC
 M R D V R P E Y W M G L D V A V F L F A T S D V>
 <M L D P S T G W V L M S L S F S S L H L M S>
 <O V I T S G I I D E Y S V K K H S I N S G L V P H T K I D S D K E E S C R I D
 < C23L

601 GATAGACACCTCACAGTCTTTTGATCATAGCCAGAGCTTCTTCACGAGTGCATCGCGGGAGAGTCTTACCTTGCTCCTGGGACACGCTGGACAAATCTAGCATTCACTGTGTTCCATCAGC
 D R H L T V F D H S Q S F F T S D R G R V L T L S W G H A G Q S S I H C V S I S>
 <I D T S Q S L I I A R A S S R V I A G E S L P C P G D T L D N L A F T V F P S A>
 <I S V E C D K I H A L A E E R T I A P S D K G Q G P S V S S L R A N V T N G D A
 < C23L

721 GGATTCTGAGATGGATTTAATCTGAGGACATTTGGTGAATCCAAAGTTTCATTCTCAGACCTCCACCGATGATGGAGTAATAAGTGGTAGGAGGATCTACATCCTCGACTGATGTGGAATC
G F>

>
D S E M D L I>
ORF G>

<S E S I S K I Q P C K Y F G F N M R L G G G I I S Y Y T T P P D V D E V S T S D
C23L
<

>Clal

841 ATCTTCTGATTCACCTCGGATCTGGATCTGACTCGGACTCTGTAAATTCGGTTACGGATTGGCAAATCTTATCATTTGGTGGTGGTCTTGGCTTTGTGACTTTTGATATAACATC¹
<D E S E V E P D P D S E S E T I E T V S Q C I K D N T P T Q D Q K T V K I I V D N
C23L
<

961 GATTCCCATATGATGTTTGTCTTCTTCCGTACACGAGGAGGATGAGGATGATTGCTGAAGACTGGCAGGCACATGCATGCCAGGACGATATATTGTTTCATAATTGCTATTGAT
<I G M H H K N E E E T C S S S S S S S Q Q L S A P V H M
C23L
<

1081 TGAGTACTGTTCTTTATGATTCTACTTCCTTACCATGCAATAAATTAGAAATATATTTCTACTTTTACGAGAAATTAATTATTGTATTATTATTATTTATGGTGAAAACTTACTATATAAA

1201 AGCGGGTGGGTTTGGAAATTAGTGATCAGTTTATGTATATCGCAACTACCGGGCATATGGCTATCGACATCGAGAACATTACCCACATGATAAGAGATTGTATCAGTTTCGTAGTCTTGAG

FIG. 19-2

>Sal1
^

>Hpa1
^

FIG. 19-3

1321 TATTGGTATTACTATATAGATGTCGACGCTAGATATACAGTCTCCGAATCGGGCATGATACCGTCATCATCTTTTCGTTAACTGTTTGGAGGAAGAATCTTTTGTTATT

1441 GCATTTAATCTCGAAATTCAGAGTGCACACCTTTCTCCGTAAAGAAATCCTGAAGTCGCTACCTTATTAAAGACGGAGAAGTATCCATCACGGAATACGGGATTACAGTCTTTTAIGATTTC

>Cla1
^

1561 ATAGTAATAGTTAGTTCGACGCTTCAGATGGATTCACTCAGACCGGTAGTGGTCGTCGGAGTACACGACGTCGTTGACGGGATACAGATTAAATTTCCACATCGATATAGTTAAAGGTA

1681 TTTCTGGGTACGGGTTTCGCATTTATCTCGGAAAGAGACGGGTGTGAGAAATATGTTCCGAGACCACACGGAGAACAGATGACGCTCTCCGGATACTCCGTATCCTATTCACACATTTTGTITGG
<E V N Q K P¹
< C22L

1801 GAAACACATGCCITTCGATCCGGATGATCCITTGAGAGAGACAATAATATCCGGAGAGCATTCACAGATTCTATTGTGAGTAGTGTACACGATCGCGTCTTCCGTTACAACTTAGACAAG
<F V H R A D P H D K S F V I I I D P L A N V S E I T L L T V R D R R G N C S L C A
< C22L

>Kpn1
^

1921 CGGGTAAATGATTATTGCGAGATGTGAAGGTACCCGAAACCACACGGCGTACATTGTGTGTAGTCTTGTCTATCGCATAAATCTGGAAGCGTATGTTCCGGACACAAATATGCGGTTTGT
<P L H N R A D P H D K S F V I I I D P L A N V S E I T L L T V R D R R G N C S L C A
< C22L

2041 ATTCGTTGTCTTTACACTTTCCATCGGATGGTGCATCGCGTGTATATCTCTTCGTTTATTATTATACATGAGAGAAACAATATATACGAGTATAATACGGACTTCATAATTAATAAT
<E N D K C K G D S P A H P A I D R G N I I I C S L F L I Y S Y L V S K H
< C22L

2161 GTAGTAATCGTGTGCGGTGTCCTACTTCTCCAAATCATATAGATATTTTCTTCTATCATGGATAATATTTGTAATGGTTCITTTCCGTACAACATACTGTTTAGATGATATTGG
>Xba1 ^ >Sal1 ^ >Cla1 ^
2281 GCATAATTTCCGGAGGCAATACGATAGTCTAGATTGACCGATGGTAGACTCTAATTTATTGAGTGCTTTGTCCGACGAGTTTACTTTTACGGCTCCATCGATAGATGGCACIGTTCATGA
2401 GATCGTCGTACATGGGAAATGAAATGTGTCTGTGTCGGAATGTATGGCTTCAAGATAGCTGTGATACCGTATACAGGTCGGTGTCCGAGATTTCGAATCTCTTTTGAGGCGACITATGTCCAGGA
<T V I
<
2521 TGATGGAATCTATCTATCGAATGATATATTTTTCATATAATACACTTTTATAGTCCCTCGTTTAAACAGAAATTTACTATGTAGTTCGGCGAATGACTCGTCCCTTAAATAGGCAGTAGGCTA
<I S D I K D F S I N K M F V S K Y D E M L C F K S H L E A F S E D R L L C Y A L
C21L
2641 GATGTTTTTACGTAGTAAATCGTGTAGGAGAGAGAATTTCTGACATCTTTGTAGAACACGATTTAATCATAGGTAGAGATACCTTTTCAGTCTGTGGTGGATGATGTCATTCCACAACATCCG
<I K K V Y Y D D Y P S F E S M K Y F L S K I M P L S V K L R H I I D M V V D A
C21L
2761 CCTGTATATGATGTTTCIGTTTTCAAAACACCAANGTCGAATACCGTCTTTAGTCGGAAGGTGATGTCGTATCCGATGTATCAGGCAACATTTGTTTACAAATTTTGAAAGGCGGTATAT
<K Y I I N R N E F V L D F V T K L R F T S T T D S T H P L M
C21L
2881 GTATTCGTCTTTTCGAAATGTCGAACCTATCTAGTAGATACCGTAGTATATTTGAGAGTGTATCCTTGTATGTTTTATGAATAGATAAAGTAGATGTTGTCTTCTTCTTGTTCGGT
<Y E D K Q I D F R D L L Y R L I M L T Y G Q N H K I F L Y L L H Q G E E K Q E H
C20L

FIG. 19-5

>Xho1

3001 CCAATTGAGTAACATTATGAGAAATATGACCTGTGGCACAATCGTCCATGATGGGTGTACAAATCAAGATTATTACGTATCCTCGAGATAAAGAGCATACACACAGGAGGA<T Q

<W N L L M I 'L I H G T A C D N W S P H V I L I I V Y G R S L L A Y V V R P S H K

3121 GGATACCTGTTGAAGGTAAAGTGTGTAACCGGTTAAATGTTTGGTCCATAATCTATTCGGTAGAATGAATCGCTTCGGCTCGCATCTTAGTGTGACITTAACITTGTAATAAATTGCTTT
<Y V T S P L H T V A N I N A G Y D I I A Y I F R K E A R M K T H S L K Y Y N S K

<T Y Q Q L Y T H L R T L T Q E M

3241 TGTAGAACCTGGGATATGTTTACAGTAGTAATGAAGAGAAAGTGAATTCCTCGTGGGGCAATTAGGGTGGATCCTTTGTACAGACGTAGTAGTTTAAGCTCCCATTTCAATTTAT
<Y F T S I H K C Y Y H L S T L E D E D A C N P D S G K Y L V Y Y N L S G N F K Y

>Bgl2 >Cla1

3361 ATCTAAGATAACACAGCAATAGATCGGATGATTACTAAAGTCATCAATGGTGTCCGTTAGTATATCAAGAATCTTGTATCGATTGATAGTGAATGAATCAGATAGTGGTGTCCTTTT
<R L Y C L L L D S S K S F D D I T D T L I D F I K N D I S L S H I L Y H H G K E

3481 CATCCTTGCTATCAAAGTTACGCGATGCGGTGGTGAACAATATCTTTAATACAGATGGATTAAATCGTGTATTCATCGTATAGCAATGTAAATGGAGAGTTACCTCGTTTATTTCAAGATCGC
<D K S D F N R M G H L L I K L V S P N F R T M H T Y C H L P S M G R K N L D C

3601 AGTGTTTAATACTAGCTTAAACAGATGAGACGATGTATCCACATCAAGAAGCAAGTAAATACATATGACAAACATTGTTGACAGAAACGTGACCTTCATTCTTACCGTCGTC CATAAATA
M R R C I H I K E R K I H M T N I V D R N V T F I L T V V H K Y>
<H K I V L K F L H S S T D V D F F T F Y M H C V N N V S V H G E N K G D D H F V

3721 CGTTAGGTATGTACACATACACTGTGCGGAACGATGCTCACAATCTCGTCCATCTCGCCCATCTCATACATTTTCATCATTTACTTTTTCATATATTAGAGATGTACGAAGAAGAAAAA
 V R Y V P H T V A N D A H N L V H L A H L I H F I I Y F F I I R D V R K K K K K>
 <N P I Y W M S D R V I S V I E D M E G M E Y M E D N V K E Y N S I Y S L F L F L
 ORF F C19L

>Cla1
 ^

3841 GAAAAAGAAAAACAGAACATATATTTTTTAGTAATGTTTATGGGAGACATATAAAATAAACTCCGTGTTTATGATGCCGGTAAATGTTTTTATCATCTTGGACGGCATCGATTTTGTGA
 K K K N R T I Y F F S N V Y A R H I K>
 <F L F V S C Y I K K T T I N I R S M
 ORF F C19L

>Hco1
 ^

126

3961 ATAIGTCATGGAAACAAATGAACAGGACATTATCACATCCCATGATAAATTATTAATGGAGTAATAAGTAATCCCATGGTAAATTCGAAATCA/GTTATCGTCTGTATTAAATGTGTGTC

4081 CACTATGGAGTCGATCCCTCCTGTTCTTTACAGTTTCGTAAATGATGGACGTTAGTTCTTTTTGTACCATTTGATGCGGATTCITGGGATCICAGTCGTGGCGTTGCTTCGT

>Dra1
 ^

4201 TTAAATAATATATCAAACATGGAGACGCCCTGATAIGTAGGCATTCTTCATTCTATTATGCTACTCTATAGCGCTTAGTTCCTTATGATGCCGGCATATCATCTTACTTTAGAAAG
 <N R I I V P S I M S V K S P
 C18L

>Xba1
 ^

4321 GAAAAATCATCTAGGATTAAGGCGTATCTGATACAGGCGCAATAATGGTTCCAGGATATAGATAGCGGTATATCTCTATTAAATGGGTCAATCATAGTCTCTAGAGTGGGATGGTAGCTAA
 <F D D D L I L A Y R I C A F L P E P Y L Y R I D R N F A D I M T E L T P H Y S L
 C18L

FIG. 19-6

FIG. 19-7

4441 GYAATAAATCAACTATCCTCGTTTGTGTTTTCICITTTGGTAACCTGCTTTTCIGGATGGCCGTTATGATTATCGAGCGGTGATGTTGTAACACCTCGCTCCATATTCCTAATAACCGCTTTTGCAA
 <L L D V I R T K N E R Q Y S S K Q I A T N I I S R S T I V S A G Y E L L R K A F
 c18L

>clal
 ^

4561 ATTGTATATTGACATCGACCGGTAATATAGTAGAGTTTATTCTCATTATCGATCATATCTATATCATCCATGTACTTGCTTAGTATATCAAAATACATCTATAGTATGGTTTCAT
 <Q I N N V D V A Y Y L L T K N E N D I M D I D D M Y K S L I D F V D I L I T E Y
 c18L

4681 AACAGTGATACCGCAATTATTAAATCTCGATAATATCAGACCGTACATACATAGACGGCCATTGTTAGATATGTCATTACAGCGCGGTGCCATATTTCCACGATAAACCTTACGAC
 <C H Y G C N N F R S L I L G Y M
 c18L

127

4801 GTTACATCGACGAGATTATTAAACAAAGTAGTCGTGCAGAGGATAGTTGTTGTCCGTTATCTAACATGCATCGAAGCACCATATCGCCGTAATGTAAAGTAGTTTATCAACATGGCTT
 <C L L R A S S L Q Q G N D L M C R V V M D G Y H L Y N I L M A Q
 c17L

>clal
 ^

>Sal1
 ^

4921 GTACGATGGATTCACTCTGTTGCTAAATCCTTTAGAAATGTTATCGATGATGTTAGTGGTTATATCTCTGGAATCGTACGAAGTAATACTACGCAATACGTCGACAAGAGTATGACGTC
 <V I S E D Q Q R F R K L I N D I I Y H N Y E R S D Y S T I S R M V D V L T H R R
 c17L

5041 TCTCAATAAGAAGATTAAACGATTTCATGTCTACATTATATGGGTTACTCTAAATCGCTTGTGTTAGATAATAACGCCCTCTAATAGGGCTGACGTCGTATACTCTACACGTGTCCACAT
 <E I L L N V I E M D V N Y P T V R F R K N L Y Y A E L I P S V D Y V R C T D V D
 c17L

09000259

>Hco1

5161 CCTTTATTAAATAATTAACAATCTCTATATCTATGGTTGAGAAAGACGAGTAGTATGGATGGGTAAAGATCCTCCTCGTCTCTGCCATGGATGGGAACATTGTTATTGATCAAAAC
<K I L L L K V I E I D I T S F S W Y Y Q I P L S G G E D R G H I S V N N I L C
< c17L

5281 ATTTAATTACATCCTTGGATAGAGATTGAGATTCTCTATGAGACGATATAGTAATGAAGAGAGATTCTTACACATATCACTGTTGTACATACAGGTACGAAATACGTAACCGGTCIGT
<K I V D K S L S Q S E R H S S I Y Y H L S N K C M D S N Y M C T R F V Y G T S Y
< c17L

5401 AACATTCTGATTTAAGAAGCCATAGCAATACTTCTGGTCTCGGATTAGGCGTGGTTACGTATATATCCACCAATCCGAGACCAATTGATTGCATAATTCGTATTCTTGGACGGACGTATCC
<C E S K L L W L L V E P R P N P T T V Y I D V L G L G N I A Y N T N K S P R I R
< c17L

>EcoR1

5521 GTTTATCCACAATTAGGTATTTAGCAGACGTAAGTCGATATTATCCGAAGACAGATCGAAATCAATTTATATTCGACTTGAGTTCGTTAGAGGAATTCGAATAGCTGGATATCAGTAGAT
<K D V I L Y K L L R L D I N D S S L D F D N I N S K L E N S S S N S Y S S I L L H
< c17L

5641 GCACAACTCGAGATTTACGTATCTATGCTCTAGCGGAGTTAATCCTTGGTGTCTACAAAGTCTCTCGACTCCGAGAGAGAGTAACAGTCGAACAATCTTAATGT
<V I Q S K V Y R H K S Y A G L P T L G E N M R C L R E V G R S L L L R V I K I D
< c17L

5761 CTGTATCGCATTTATTGGAGACGTAACAATGTAGCGCATTTGTTCTCGTCTATCTATATGTTTGGATAAGTTGTGACACGTTTCAATCTCTAGTTTTTATTTTTTGTACGCACATCTT
<T D C K N S V Y C H L A M N G R R D I H K S L M H C T E I E L K I K K Y T V D E
< c17L

5881 CATCCAGTAGACGACATAGATAGTGCACCTCTACCAACAATAATCCATAGCTATTCTGGTGCTAATTATTCCTATTTCACGAAAAATGAAGGCAATCATCTTCATGAAGATGATAA
<D L L R C L I T C E R G C Y D M A I R T S I I G I E R F I I F A I M
< c17L

6001 AAAGTGTAGTGACGAGCATGAAGGAGATTAGTATTAGCAGTGGGATATGATCCAAGAGGGTGAGATAGTCGTTCTGTTCCAGAACTTTCCGACGATGAAGTAGTATGTCGATATAC
<Y K A T R I H D L L T L Y D N E N L I K R L M L L I D I Y
< c16L

FIG. 19-8

FIG. 19-9

6121 TATCGTTGAAGACTCTTCCAGAGACGATAGCTGATTGAGTACAAAGTCACGAAGTTCCTCGCGGGTTTTCAIGGAGTCATTTCTGATGAACATTTAATGATCTCCACG
 <K D N F V R G S V I A S Q T C L G I I A R L E E A T K M S D N R I F C K I I E V
 < C16L

>SacI
 ^

6241 CAATTGTCGATATTGTCCACGGGAAGTGAATCCTTCAACTCACCACCAAGAGCGTCCGTTGCATCAGTTCIGAAAGAGATGAGAAGCCTGTAGAGAGACCCCTGGCCTTCTCTATGGGTC
 <C N D I N D W P L S D K L E G G F L E T A D T R F S I L L R Y L S G A S E R H T
 < C16L

6361 CATCTATGAGAAACCCACAGGATGTATTGAGTCAGACAAATGCTGACGTGGGCCACGGTATTCAGGGAGTCCTTAGTAGCGTGGCAATGACAGGGTCTGAACCTGGGCACAAAGGAAGGCC
 <W R H S V W L I Y E T L C H R V D A V T N L S D K T A H C H C P R F Q A C P F A
 < C16L 129

6481 ATTGTAAAGGTAGACCCTGTAGCCGTTTATGCTAATAGAGGGCTTTAATTTCCATTTTTTAAATGGGTGIGGATGAGGAATGAGAGTGATATCATATTGAGATACGTAGTTAIGTAGAGG
 <M T F T S R Y G N I S I S P K L K W K K L P N H I L F S L S I M
 < C16L

6601 TGTATTCCCTATATTACTTTCGGTTTCATATTTTACCAACTCTTTAATAAATTTCTTTTCACGATGCACTTATTGAATGACGTTTTCTCATAAGTGGACATATAGATGCAGAAGT

>DraI ^ >XbaI
 ^

6721 AATGAAGAAAGTATTACCTCTATCATCTACATAAATTAGGGTCTGCTCCTTTTTTAAACAACTTATACAGTACGTAGTAGTTTATCGGTTTTAAATCAAGTCTAGATATATATAGTGG

6841 ATTAATATATTTTATATTAGCTAAAGCTATCTATACTATCAGAAAGCATATCATCTCAACTTCATCAIGAGTTAAATATTGIGTAATGGATGTCATGAACATTAACGTATTCATGA
 <I M T Y H I D H V N F T N H V
 < C15L

>Dra1

6961 CATACTCCTTTAATAGGTTTTTTTAAACACAGATGATTCAAATCCTTCATTCAATTAGATAACAGTGTACGGAGTCGTACCTTCTACTAGTTTGTGTTTATATCACAGCATTTCTACAAACAGTCT
<Y E K L L N K L V S S E F G E N M L Y C H L P T T G E V L K M I D C C E V F L R
< C15L

>Cla1

7081 TAAACAATAGAGAAGACGGACAGACTTTAAACGTATATAATGACACATGTTTATCGATATTCGTTGATGAATTATTAACGTAGTTATGATAAATGATTCTTAACGACATCTCTCGCTAGA
<F L L S S P C V K V Y L H C M N D I N T S S N M N F T T I I F S E L S M
< C15L

>Dra1

7201 GATAAAATCTAGTATCGTATCAITTAACATCTTTTGCAICATACACTCTTTTGCAICATACACTCGCATAGCATAGTTTTTCATATTAATACAATATTTAAAGACTTATTCGGAAAGTATTTTAAATACATGTATCATC
>Cla1

130

>Cla1

7321 GATGGAGATCCATATGAGGAGTCACTTGTAGTTCTTCAGTAGTAATAACAGTGGTATCAICGATAGTATTAATATATGTAGAAGGTTTATGTTGTTGTAATTGGAGTAACTGTTGGTA

7441 GTTCTTCGGTGGAAATCAATTAATATACTAACAGCAATAGTATAATTAATAATATGTTCGGTTGATATCACATAATTTAATGAACCTCATTTCTAACACCCCTCAGCTATATCTGTCCAAT

7561 TAAATGTAGCCAAACAATCTACTACGTTCTCTTTGATTGACTACTTGTACGGTAGCGAGGCTACACTATCTTTATTGTCTTCTACATGCTCCAATTGCAATGTCATGATACAACGCAGTTTT

7681 TCTTATGCATGTTTCATAACACACCGAACAATGTCGCAGTAAGATATATAGCCAGAGATAAATTTCTGTAAATTCATGATTGCCGGTCATAAACACAGCCCGTCAATAATTGTGGCTATATAT

7801 TCAGTTTATAGAGCAAAATTAATTAAGCACAATAGCGCTTAATCTCAAAATATGTTAIGTTTATTTTTTTCATATTAACATACTGGTTAAAAATCCTCTAAAGGCTGATCTTCATCTATAA

7921 ATCAAGATCATAATTACATTTAGACAGTGGTTTCATGTTTATAAAAATGTTCTTTTIGTGTGAATGAAGGAATATACATAATCAATAATCAACCATCGACCCCAATTACGATAGTATGCAGGC
<Y D V M S G M V I T H L C
< C14L

FIG. 19-10

30041 AACCCCCAATTAGACAGGTACGGTGTAAATCAGTCTCTCCAGTITTTTAAAGCATATTTTAAAGCATATCTCGAAATTTAT
 <G G N S L Y T Y D T E G T K T N K Y T M T V Y V A K L C D G R Y Y A M D P F K N
 C141

1947

3161 TAAATACTCGAGTCATTTACGCACGGTCAAAAAGTAAAGTAATGTCGACGACTTCCTTACATTCIATAGAAACACCTAGAAATACCTCTCTCAGAGCTCTGATT
 <F V R T M K R V T L F T L T S S K K C E I S V G L I S M
 C14L

8281 TGAACAATGCACGACCTATAGTAAACCGTGACCAATAAGTTATATTAGTCAATGGTATATATCCAAACCATCAGGTGTGGATAGTCCAGTCTTTGGTATCGATAGTGTAGTTATTGAAGTGA
 >Claf ^
 <T H I T W D K T D I T Y N H F Q
 C13L
 <

8401 GAAGTTACCGTATAGICTTTTTGGTCACTCTAACAAGCAAGCAACTAATACCTCTACACTATTGAACGATTATCTTCCGTAAITGGTGGACTAGCGAIGGAAGTCACGAAATATAACA
<S T V T Y D K Q D D R F L S V L V E V S N F S K D E T I P S A I S S T V F I L
C13L

8521 CAGGCTATTAAICCGTATATCATCTTTTGATATTACTTATAATAACGATTGGTTAAATTTTAGTGTATAGTAAATGATATTATTATTTTAAAGTATTATTATCAGCTTTA
 <C A I L G Y I N M
 < C13L

8641 GTTATACTATTACTATTTTGTAATATTTAGACATAGATAAACGGTGATAAAGGCTCTATTGGTTATATTTATTGGGGATAGCAGTATTTCCCTATAAAAGATATACGTCCTGTGGIGICIT
 <Q P Y C Y K G I F L I R G T T D K
 < C12L

8761 TAATCATGTACATGAATGGAIGGTTTATGTAGACCTTCGTACGATATACCAATCGAAGAAGTAAATCGTAAATACTCCCTGTAACGGCGGATGCTTCTGTATACTCTCATTAAACATCTATAA
 <I M Y H F P H N I Y V K T R Y V H S F N I T F V G T V A S A E T Y E E N V D I F
 C12L

1

8881 ACGTCGTATGTAGAAATTTTCTACAGTGATAGTTTCATTACACATCTTGGCTAAATCTGCATAATATCCGAATATATTAGTAGTCCTAAATTTCTAAATTCGGTACCAGATTATACG
 <T T H L F K E V T I T E N C H K S F D A Y Y G F I N T L G L N E L I P V L N Y P
 < C12L

>Draft

>Draft

9001 GTCTGTCATTTCCACITTTAAACTTTGGCATATACAAGTCTATACTTTTAGTAGATAACATACCACCACTTTTAACTTTTCTATGTTATATATACCTT
 <E T M E V K F K P M Y L D I S K T S L M G C W K K F K E D T I M K E I N Y I G E
 < C12L

1973

1000

9121 CTATGTCGTCGGTAGTATAATCACCACATACIAGAGTTTTCCCTCGTATGGAATATCGCATANTAGAGAAATCCTCCGAATAATTCATTATATGTACAYATTGCAAGTTATTCICGGTACCCA
 <I D D P L I I V M S S M G E Y P I O I I S F G G F L E N I H V Y Q L N M E T G V
 < C12L

>Dra1

9241 CCATCATATCAACACIGGTAATCTTAGAAAATATAAAAACCTGTCIGTATATGTAAGATGTTAGAAAAATGGATATTTCCACATGCTTTTAAAAATGGACGGCGCTAACAACTGTCA
 <H M D V S T V I N K S I Y F K D T Y T L H K S F P Y K W M A K F H V A S V V T H
 < C12L

9361 TACGAGTATTAATGGATAGCGGACTAGTCAATAAGGAATTAATTTTACCATTGGTCATTTGTCATTACCCCATTCGTTGATTAGTTCTTTGGTTAGCATTTAAAGTTTACAGTTT
 <R T N I S L P S T L L S N I K G N T M Y K V W E N I L E K T Q N A N N F N V T Q
 < C12L

FIG. 19-12

FIG. 19-13

9481 GAAATCGTCTTTTATTTTTGGTAGGAGGCGGTGGAACTCGATACCTATCGCTACCGTATATTTTATTTGCGGTAGCTAGTGTCCGACAAATACGGAATACTCTAGCTCAATGTCATTTAT
 <F D D K I K Q L F S A M F E I S D S G Y I K N A T A L T A C Y P I D V D M D N M
 < C12L

9601 TGTCATCGGGTGTATTCTCATTTCTATATATTTTGTATAGTTGTTACGCTGTAGAACCCAGCTGCTCCATGATTTAGAAATAGATAAAATAGAAACCTGGAGAAATCA
 <D P T N E N M N E I Y K S L Q E A T S G A A G H N L I S L T S L I S V P S I L
 < C12L

>Dra1 >Nco1
 9721 AAACATTTTTCATCAGGGTGTGTTTACGATTAGTTCTTTTAAAGATATCCATGGTATAGACCAACAATAACGATAATATATATATAAATAATGTTAAATTTTCAGTTTATGTTTG
 <V N E D P H K V I L E K F I D M
 < C12L

9841 TACCCCGTATTCATCTTAACAAATTTGGTATTGGGTACACAAATCAATATACATACCATTAAATGAAGCATAAAAATCGTTAGTAGATGTTTCTAAATATAGGTTCCGTAAGC
 133

9961 AAAGAAATAGAATGAAGCGGTAATGATAAAATCAATCGTTATCTAAATGATCATACTCATTTTATTTTCTTATTATTAACACATACATTTTTTAACAGCAACACATTCATATATTG

10081 TATTGTTATTTTATATTACACAATTAACAATATATTATTAGTTTATATTACTGAAATTAATAATATAAATTCCTTGTATTAAACACACACTGAGAAACAGCATAAACACA

10201 GAATCCATCAAAAATGTCGATGAATATCTGATGTTGTTGTCGCTGCTATGATAATCAGATCATTCGCGGATAGTGGTAACGCTATCGAAACGACATTTGCCAGAAATTACAAACGCTAC
 M S H K Y L M L L F A A M I I R S F A D S G N A I E T I L P E I T N A T
 < C11R (19K VGF)

10321 AACAGATATTTCCAGCTATCAGATTATGCGGTCCAGAGGGAGATGGATATTTGTTTACACGGTGACGTGATCCAGCTAGAGATATCGACGGTATGTATTGTAGATGCTCTCATGTTTATAC
 T D I P A I R L C G P E G D G Y C L H G D C I H A R D I D G M Y C R C S H G Y T
 < C11R (19K VGF)

10441 AGGCATTAGATGTCAGCATGTAGTATTAGTAGACTATCAAGTTTCAGAAACCCAAACACTACAACGTCATATATCCCATCTCCGGTATTATGCTTGTATTAGTAGGCATTATTATTAT
 G I R C Q H V V L V D Y Q R S E N P M T Y T S Y I P S P G I M L V L V G I I I I
 < C11R (19K VGF)

10561 TATTACGTTGTCCTATTATCTGTTATAGGTTCACTCGAAGAACTAATAAACTACCTCTACAAGATATGGTTGTCCTAATAATTTTTTAAATTTTTTTATGAGTATTTTTTACAAAAT
 I T C C L L S V Y R F T R R T M K L P L Q D M V V P >
 C11R (19K VGF) >

>Xba1
 ^

10681 GTATAAGTGATGCTTATGTATATTTATAAAAATGCTAAATATGCGATGTATCTATGTTATTTGTATTTATCTAAACAATACCTCTACCTCTAGATATTATACAAAATTTTTTTATTT
 <K
 <

10801 CAGCATATTAAAGTAAATCTAGTTACCTTGAAAATGAATACAGTGGGTTCCGTTATCACCAGTAAGAACATAAATAGTCGAATACAGTATCCGATTGAGATTTTGCATACAACTACTAG
 <L M N F Y F R T V K F I F V T P P E T D G T L V Y Y D F V T D S Q S K A Y L V L
 C10L (42K)
 <

134

>Xba1
 ^

10921 TCTAGAAAGAAATTTGTAAATCTCTGTGACGGGAGTCCATATATCTGTATCATCGTCTAGTTTATCAGTGTCCCATGCTATATTCCTGTTATCATGTTAATGAAATAACTC
 <R S L F K Y D D E T V P T W I D T D D L K D T D W A I N R M D D N T L S F L E
 C10L (42K)
 <

>Bgl2
 ^

11041 TCGTGTTCAGAAAAGTCAAAATTTGTATCCATACATATCTCCAAAACATCGCTTATACGTTTATCTTTAACGATACCTATACCTAGATGGTTATTTACTAACAGACATTTTCCAGA
 <R A E S F D F I T D M C V D G F S D S I R K D K V I G I G L M N M V L L C K G S
 C10L (42K)
 <

11161 TCTATTGACTATAACTCCTATAGTTTCCACATCAACCAAGTAATGATCATCTATTGTTATATAACAATAACATAAECTCTTTTCCGTTTTTATCAGTATGTATATCTATATTAACGTCGIC
 <R N V I V G I T E V D V L Y H D D I T I Y C Y C L E K G N K D T H I D I N V D D
 C10L (42K)
 <

FIG. 19-14

11881 TAAGACATATATTAGAGGTATATATTATATAAAAAGTTTTTIGATTACGATGTTATAAGAGGAAAGAGGACACATTAACTACATCATACATCAATTAACTACATTCTTATACATCGTAATC
 12001 AAAAGAAATTGCAATTTTGAIGTATAACAACCTGTCAATGGGTTATGGAATTGTATATTACATATTATACAGTATGTTGGTAACGACAAATACCGATCGGTAATTGTCTGCCGGTGTAAATAG
 12121 AATTATATATACTATCTATTACACCGGGCTGAGTACCTACACTATTATATGATTATAGTTTCTATTTTACAGTACCTTAAGCTAAAGTCTCTAGTCAAGAGCAATACIACCAACCTAC
 12241 ACTATTATATGATTATAGTTTCTATTTTATAGGAACGGGTACGAGGAAATCAAAATGTCTAAATTTCTAACGGTAGTGTGATAAAGGATTATCGTCAATGGATACCTCCTCTATCATGTC
 <L F A Y S F I L H R I E L P L T S L R N D D I S V E E I M D
 < C9L (77K) [SPLIT]
 12361 GTCIATTTTCTTACTTTTGTCTATTAACTTATTAGCATTATATATATTATTTGATTATAAACTTATATTGCTTATTAGCCCAATCTGTAAATATCGGATTATTAACTATCGTTTCTTTGT
 <Q I K K S Q E I L K N A N Y I I Q M Y F K Y Q K N A W D T F I P N M V Y R K K T
 < C9L (77K) [SPLIT]
 12481 AGGTTTATTTAACATGTACATCAGTGAAGCATGTCCGTACCATTTTATTTTAAATTTGACGGCATATCCGCAATTTCTTTTTCGCAGTCGGTTATAAATTTCTATATATGATGGATACATGCT
 <P K N L M Y M V T L M D T G N I K I Q R M D A I E K E C D T I F E I Y S P Y M S
 < C9L (77K) [SPLIT]
 12601 ACATGTGTACTTATAATCGACTAATATGAAGTACTTGATACATATTTTCAGTAACGATTATTATTACCACCTATGAATAGTACCTGIGATCGTCTAGGTAATCAACTGTTTCTTAAAT
 <C T Y K Y D V L I F Y K I C I K L L S K N M G G I F L Y R H D D L Y D V T K K I
 < C9L (77K) [SPLIT]
 12721 ACATTCGATGGTTGGTAATTIACICAGAAATAATTTCCAAATACTTAAATATAATAATTTCTGCIATTTCTGGAAATATATTATCTGCCAGTATAACCAAAATAGTAATACATGTAACCCCAIA
 <C E I T P L K S L I I E L I K I Y L E A I E P I Y K D A L I V C I T I C T F G Y
 < C9L (77K) [SPLIT]

FIG. 19-16

FIG. 19-17

12841 IITTTGTTATTATTAATGTCCTGGCCATTATCTATTAAACCATTTCTACTAGGCTGACACTATGGCACTTAATACAAATGATAAAGTATAGTACATCCATGTTTATCTATTTTGTITTAATC
 <K T I I M I D A G M D I L W E V L S V S H S K I C H Y L I S C G H K D I K N I D
 C9L (77K) [SPLIT]

>clal
 ^

12961 ATCAATATACGGCTTACAAAGTTTITAGTATCGATAACACATCCAACTCAGCGCATAGAGAAGGTAGGGAATAATGGCATAATATTTATTAGGTTATCATCATTTGTCTATCTACAACTAA
 <D I Y P K C L K L I S L V D L E R M S F T P F L P M I N I L M D D N D V V L
 C9L (77K) [SPLIT]

>Dra1
 ^

13081 GTTTCCTATTTTAAATATACTCGACAACCTTTAGGATCTCTATTGGCAAAATTTTGTGAAATATTTATTTATATGCTTAAATCTATATAATGTTAGCTCTTCATCAATCATACATTAAAT
 <N G N K L I Y E V V K P D R N G F K Q F Y K M I H K F R Y L T A G E D I M C K I
 C9L (77K) [SPLIT]

>Bgl2
 ^

13201 AACATTGATGTATCTATGATAAGATACATATTTCTAACAATAGATCTTGTATAGAACTGTATATCTTTTAAAGAAATTTGGGATATTAGGATATTACGTAAACTATTACACAATTC
 <V N I Y V T H Y S V Y E L L L D Q I S V T Y R K L I T S I L I N W R L S N C L E
 C9L (77K) [SPLIT]

>clal
 ^

13321 TAAATATATAAAGCTATCACGGTCGAATAATAGTTGATCAACTATATAATTAATCGATTTTGTGATTTTCTTCCCTAAGCTGTTTACGTAAATAGTTAGATAGAAATATTCATTGATTCATG
 <L I Y F T D R D F L L Q D V I Y N D I K H N K K R F Q K R L Y N S L I N M L E H
 C9L (77K) [SPLIT]

13441 ACCACTATAGTTACTATCGAATAACGGGTCAAAATATTTCCCGTTTAATATCGCAATTTGTCACAGATAAATAGAGTGGGTATGTTCCAGGATAAATAGCGCATCTCTTTTGTG
 <G S Y N S D F L A D F I E R K I D C K D L Y Y Y L T T H E R Y T Y Y R M E K K H
 < C9L (77K) [SPLIT]

13561 TGAATAATAGTTTATTAGTCCAAAGATGTAGCATAACCATCTTTGTGACCTAGTAATAATATAATAGAGAACTGTTTACCCATTCTATCATCATATAATCAGTGGTGTAGTCGTA
 <S I L Y N I V D L S T A Y G D Q S R T I I Y Y Y L V T K G M R D D Y D T T Y D Y
 < C9L (77K) [SPLIT]

13681 ATCGTAATCGTCTAATTCATCATCCCAATTATAATATTCACCAGCAGGTCTAATCTGTTCTATTTTGATCTTGTATCCATAGTGTGCTACATGTAGGTATTCCTTTATCCAAATAA
 M L L H V G I P L S N H
 <D Y D D L E D D W N Y Y E G A R R I Q E I K I K Y G Y Q I N S C T P I G K D L L
 < C9L (77K) [SPLIT]

>Dra1
 ^

13801 TAGTTTAAACACATCTACATTGGGATTTGATGTTGTAGCGTATTTCTCTACAATAATTAATACCAATTTTGATACATATTATTTCTATACCTTTCCGAAATTAGTAATTTCAATAAGTCTAT
 S L N T S T L G F D V V A Y F S T I L I P F L I L F I S I P F E I S N F N K S I
 <L K F V D V N P N S T T A Y K E V I N I G N K I S N I E I G K S I L L K L L D I
 < C9L (77K) [SPLIT]

>Cla1
 ^

>Sal1
 ^

13921 ATCGATGTTATCAGAACATAGATATTCGAAATATATCAAAATCATTTGATATTTTATAG
 S M L S E H R Y S N I S K S L I F L
 <D I N D S C L Y E F I D F D N I N K Y
 < C9L (77K) [SPLIT]

FIG. 19-18

FIG.20-I

1 TAGATATTACGGCTGCTAGTGTAGGGATGGTATTATCTGGTGGTGAATGTCCGTTATATAATCTACAAAACAATCATCGCATATAGTATGCGTAGTAGAGTAAACATTTTATAGT
 <L Y E R T S T N P I T N D P P S I D T I Y D V F C D D C I T N S L L T F N K I T
 < F1L

121 TTTTACTGGATTACATACGCTCTACCCAATTCCGTTATAAATGAAATTGTCCGCAATCTTACCCCCAACCCCTTGTATCCATTAGTATAGTATTAACCTCGTTATTTATGTCATAAAC
 <K V P N M C R R G L E T I F S I T A L R V G L G K N D H L I T N V E N N I D Y V
 < F1L

241 TGTAAATGATTTTGTAGATGCCATATCATACATGATATTGATGTCCTATTATAATCATTACTAAGCTTTATCACAATATATGTTGATAATATCTATATATGATCTAGTCTTTGTTGGGCAA
 <T F S K T S A M D Y M I N M D R N Y D H S V K D C Y I N I I D I Y S R T K T P L
 < F1L

361 CTGTCTATACAAGTCGTCTAAACGTTGTTTACTCATATAGTATCGAACGCCATCATTACATGGTCCCGTCCGTTGATAGATAATCGAGTATGTTAGTGGACCTTGTCAAACTCATATAC
 <Q R Y L D D L R Q K S M Y Y R V A M H V N D R E T S L Y D L I N T S K D F R Y V
 < F1L

481 CATATTTTCTGGAAGTGGATATACATAGTCGTGATCAACATTATTGCTAGCCCTCATCTTCTATATCTGTACTATACCATTTCTATATCATCTACATAATCTACGATATTATTACACAT
 <H N E P L P Y V Y D N D V N M S A E D E I D Q V I G N D I D D V Y D V I N N C H
 < F1L

>Xba1
 ^

601 AAACATCGACAACATACTATTGTTTATTATCTAAGTCCTGTTGATCCAAACCCCTTGATCTCCTCTATTTGTACTATCTAGAGATTGTACTTCTCCAGTTCTGGATAATATATACGTTGA
 <F H S L M
 < F1L ISP

<R L G T S G F G Q D G R N T S D L S Q V E E L E P Y Y I R Q
 < F2L

721 TAGATTAGCTGAGCTATTCTATCTCCAGTATTTACATTAAAGTACATTTTCCATTATTAATAAGAATGACTCCTATGTTTCCCTATAATCTTGGTCTATTACACCACCTCTATATCA
 <Y I L Q A I R D G T N V N F T C K G N I L I V G I N G R Y D E D I V G G G I D
 < F2L

841 ATGCCCTTTTAGTGACAGACCAGACCTAGGAGCTATTCTACCATAGCAAACTTAGGCATGGACATACTAATATCTGTCTTAATTAAGTGTCTTCTCTGGAGGGATAGTATAATCGTAA
 <I G K L S L G S R P A I R G Y C I K P M S M S I D T K I L Q R E G P P I T Y D Y
 < F2L

961 GCGCTATACAAATCATATCCGGCAGCACCAGGCGGATTGCTAGTAGGAGATTAGCTCTGTTAGTTTCTTAACAAATCTAACTGGTGAGTTAATATTGATTTGCAACATAAACTAATA
 <A S Y L D Y G A A G P S Q R T P S K A R N T E K V F R V P S N I N H N F H
 < F2L

1081 TTTTATTTCAAATTTTACCATCCCATATATCCATGAATAAGTGTGATGATTGTACACTTCTATAGTATCTATATACGATCCAGATAAAATCCTCTATCAATAGCAGTTTATTAT
 <K G D W I N W S Y T H N Y V E I T D I Y S G R Y F G G I L L L K N D
 < F3L

1201 CCACTATGATCAATTCTGGATTATCCCTCGGATAAATAGGATCATCTATCAGAGTCCATGTTATGCTGGATTACAAATAAAATCCGCAATTTCTACCAACCAAGATAACCTTCTACCGA
 <V I I L E P N D R P Y I P D D I L T W T N S S E C Y F E A M R G V L F L R R G F
 < F3L

1321 ACACTAACGCCCATGATTTATAATGAGGATAAATAGTGGATGGTCCAACTGCCACTGATCATGATTGGGTAGCAAAATATYCTGAGTTGTATCAGTTTCAGAAATGCTCTCCCATACGT
 <V L A C S K Y N P Y T T S P G F Q W Q D H N P L L Y E T T T D T E S H G G M V Y
 < F3L

1441 ATATAACATTGTTTATGGATGCCACTGCTGGATTACATCTAGGTTTCAGAACACTCGGCATATTAAACCAAGCAGCATCCCCGTGGAACCAACGCTCAACAGATGTGGGATTTGGTAGAC
M D A T A G L H L G F R R L G I L T Q A A S P W N O R S T D V G F G R >
< I V N N I S A V A P N C R P K L L S P H N V W A A D G H F W R E V S T P N P L G
F3L

1561 CTCCTACTACGTATAATTTATTGTTAGCGGGTATCCCCGTAGCATACAGTCTGGGGCTATTTCATCGGAGGAATTGGAATCCAATTTGATATATAATTTACAGCTATAGCATTGTTAT
P P T T Y N L L L A G I P V A Y S L G L F I G G I G I Q L F D I >
< G V V Y L K N N A P I G T A Y L R P S N M P P I P I W N N S I Y N V A I A N N H
F3L

1681 GTATTTTCATTGTTTCATCCATCCACCGATGAGATATACTACTCTCCAAACATGAGTACTGTACACATATGGAATATATCTATAATTTGATCCATGTTTCATAGGACTCTATGAATGGAT
< I E N N M W G G I L Y V V E G V N T S T C M N F I D I I Q D M N M P Y E I F P Y
F3L

1801 ACTTGTATGATTTGCGTGGTGTGTTATCACAATGAAATATTTTGGTACAGTCTAGTATCCATTTTACATTATTTATACCTCTGGGAGAAAGATAATTTGACCTGATTACATTTTGTATAA
< K Y S K R P Q K D C H F I K T C D L I W K V N N I G R P S L Y N S R I V N K I L
F3L

>Xba1
^

1921 GGAGTAGCAGATTTCTAATTTATTTCTTCGCTTTATATACCCTTAATGACAAAATCAACTACATAATCCTCATCTGGAACATTAGTTTCATCGCTTTCTAGAATAAGTTTCATAGATA
< L L L N G L K N R R K I Y W K I V F D V V Y D E D P V N L E D S E L I L K M S L
F3L

2041 GATAATCAAAATTGTCTATGATGTCATCTTCAGTTCACAAAAGTGTGTCGCAATAAAGTTTGTAGTATGACATAAGAGATTGGATAGTCCGTATTCTATACCCATCATGTAACTCGA
< Y D F N D I I D D E L E L F H K A I F N K T N C L L N S L G Y E I G H M Y C E V
F3L

2161 CACAATATCTCTTCTAAAATCTCGTAAGATAAAGTTTATACAAGTGTAGATGATAAATTCTACAGAGGTTAATATAGAAGCACGTAATAAATTGACGACGTTATGACTATCTATATATA
< C Y E K R F D R L I F N I C T Y I I F E V S T L I S A R L L N V V N H S D I Y V
F3L

>Xba1
^

2281 CCTTCCAGTATACGAGTAAATAACTATAGAAGTTAACTGTGAATGTCAAGGTCTAGACAAACCTTGTAACTGGATCTTTATTTTTCGTGTATTTTGACGTAATGTGTGCGAAAGT
< K G T Y S Y I V I S T L S H I D L D L C V R T V P D K N K T Y K Q R L H T R F Y
F3L

2401 AAGGAGATAACTTTTCAATATCGTAGAATTGACTATTATATTGCCACCTATAGCATCAATAATGTTTTGAATTTCTTAGTCATAGACAATGCTAATATATTCTTACAGTACACAGTAT
< P S L K K L I T S N V I I N G G I A D I I T K F K K T H S L A L I N K C Y V T N
F3L

>Dra1
^

2521 TGACAAATATCGGCATTTATGTTTCTTTAAAAGTCAACATCTAAAGAAAAATGATTATCTTCTTGAGACATAACTCCCATTGTTTGGTATTACCCACACGTTTTTCGAAAAAATTAGTT
< V F I P M
F3L

>Dra1
^

2641 TTTCTTCCAATGATATATTTTCCATGAAATCAACGGATTGGTAACATTATAAATTTTAAATCCCAATTGAGAAATCAATCTATCCGCGACAAATCTATATATGTTTTCATCATT
< K G E L S I N E N F D F P N T V N Y I K K F G L E S I L R D A V F E I Y T K N H
F4L

>Bgl2
^

2761 TCACAATTCATTCTATAAGTTTAACTGGAAGAGCCGAGTAAGAAATTTCTGTTCAATGGATACTGCATCTGTTATAATAGATCTAACGGTTTCTTCACTCGGTGGATACAATAATGT
M D T A S V I I D L T V S S L G G Y N K >
< E C N H G I L K V P L A A T L F E Q E I S V A D T I I S R V T E E S P P Y L L N
F4L

FIG.20-3

>Dra1
 2881 TTAACATCAACATCCGAAGTCGAGTGCAGACCCCTCGTCTCTACTAATTAGTTCGTTGGAAAACGTGAGTCCGGGCATTAGGCCACGCTTTTAAAGCCAAAATATGGAAGCCAAATGAT
 L N I K H A K S G C R P S S L L I S S L E N V S P G I R P R F L S O N M E A N D >
 <K F M L C A F D C H L G E D R S I L E N S F T L G P M L G R K K L W F I S A F S
 F4L

>Pst1
 3001 CCGGAAAAGAAGATTCCCTTCTACTGCAGCAAGGCAATAAGTCTCTCTCCATAACCGGGCGGTGCATGTATCCACTTTTGAGCCCAATCGGCCCTTCTTTTACACAAGGCATTGTTTCT
 P E K K I P S T A A K A I S L S P >
 <G S F F I G E V A A F A I L R E G Y G A S D H I W K Q A W D A K K K V C P H T E
 F4L

>Cla1
 3121 ATGGCATTAAAGAGATAGTTTTTTCATTACTATCTTTAACATAAGTATCGATCAAAAGACTATACATTTCCGAATGAATGTTTCAATGGCCATCTGAAATCCGTAGAACATCTAGCC
 Y G I K E I V F F I T I F N I S I D Q K T I H F R M N V F N G H L K S V E T S S >
 <I A N F L Y N K E N S D K V Y T D I L L S Y M E S H I N E I A M Q F G Y F C R A
 F4L

3241 TCGGTAATCTGTACTTCTGTACAAAATCGTTCGCCAAATTTTCATTCACTATTCGGTCACTGGCTGCAAAAAACGCCAATACATGTTTATATAAATATTTTCGTCTGGTGTAGTTTA
 L G N L Y F C T K S F R Q I F I H Y S V T G C K K R Q Y M F Y K I F F V W C >
 <E T I Q V E T C F R E A L N E N V I G D S A A F F A L V H K I F Y K E D P T L K
 F4L

3361 TTCCAATCATTGATATCTTTAGATATATCTACTTCTCCACTGTCCAAAATGATGCCTCTGCCTTTTATACATGTTCCAGATGTCATAATATTGGATTGGGAAAATAACAATCTATT
 <M W D N I D K S I D V E E V T W F S A E A K K Y M N W I D Y Y Q I P F I V F R N
 F4L

>Cla1
 3481 GGATTTGGTGCAAGCATGGGTTCCATAACTAAATTAACAATATCAATAAATTTTTTTCAGTTATCTATATGCCTGTACTTGGATTTTTGTACATCGATATCGCCGCAATCACTACAAT
 <P N P A L I P E H
 F4L
 <M D I H R Y K S K K Y M S I A A I V V I
 F5L

3601 AATTACAAGTATTATTGATAGCATTGTTATTAGTACTATCATAATTAATATCGACATTGATGGGTGCTGAATAATCGTTATTATCATCATTATCATTTTGTAAATTGTGACATCACT
 <I V L I I S L M T I L V I M I L N D V N M P A S Y D N M D D N D N Q L S M H S
 F5L

3721 AGATAAATCGTTTGGGAGATTGTTGTGGGAAGCGGGCATGGAGGATGCATTATCATTATTATTTAAGCGCTTCCATTCCGATTACAAAATATGGCGCGGTTCAACATTTTATGGAAC
 <S L D N A L N N H S A P M S S A N D N N L A K W E S E C I H R A N L M K H F S
 F5L

3841 ATAATTTTGTGAAAACAGATAACAAGAAAACCTCGTCATCGTTCAATTTTAAAGGATAGTAACCGATTAAACGTCGAGCTAATTTCTAACGCTAGCGACTCTGTTGGATATGGGTTTC
 <Y N Q S F L Y C S F E D D N L N K V I T F R N F T S S I E L A L S E T P Y P N G
 F5L

3961 AGATATATATCTTTTCAGTTCCTTACGTATCTATAATCATCTGTAGGAAATGGAAGATATTTCCATTATCTACTGTTCCCTAATATCATATGCTGGTGTAGTAGAACCATTAGCGG
 <S I Y R K L E G V Y R Y D D T P F P L Y K W K D V T G L I M N P P T I S G N L A
 F5L

4081 GAAAGATGTTATTTCCGATCGTATTTTAACTTCGCAATAATTTCTGGTTAGATAACGCACTCTACAGTCAAGTCAATGATATTAGCCTTTACAGATATTCATAGTAGTCGTAACGAT
 <F S T I E C R I K V E C Y N R T L Y R V G T L D I I N A K V S I N M T T T V I
 F5L

[illegible]

5761 CCGCATACGCATTACAGTTCTTTCTAGCTTGGATACCGCACTAGGTACATCGTCTAGATCTATTCTCTCAGCGATAGCTCTTCTATCTCTTTCCGGAAGCAATGAAATCACTT
 <A Y A N C N K E L K S V A S P V D D L D I G I E E A I A R R D K E P L L S I V E
 < F9L

5881 CAATAAATGATTCAACCATGAGTGTGAAACTAAGTCTAGAATTACTCATGCATTTGTTAGTTATTCCGAGCGCGCAATTTTAACTGTCTATAACCTCTCTATATGAATAGCACAAG
 <I F S E V M L T F S L R S H S H C K N T I R L A C N K F Q G I V E G I H I A C T
 < F9L

6001 TGACATTAGTAGGGATAGAAATGTTGAGCTAATTTTGTAAATAACTATCTATAAAAGATTATACAAAGTTTAACTCTTAGTTCCGCCATTATCCAGTCTGAGAAATGTCTCTC
 <V N T P I S H Q A L K Q L Y S D I F L N Y L T K F E K T E A H
 < F9L <N G G N I W D S F I D R
 < F10L

6121 ATAATAAATTTTCCAAGAACTAATTCGGTGAAGAAATGGAACCTTTAATCTATATTTATCAGCTCTGTTTTGGTACACATGATGAATTCCTCAATGCCGTACTAATTCGATATCT
 <M I F K E L F S I P H L I S V K L R Y K D C D T K T C H I F E E L A T S F E I D
 < F10L

6241 TTTTCGATTTCTGGATATGTTTTAATAAAGTATGAACAAAGAAATGGAATCGTAATACCAAGTTATGTTAACTTTGAAATGTTTTTTTCTTGTAAATGATCCAGCCACTTGG
 <K E I E P Y T K L L T H V F F H F D Y Y W N H K V K F N N K I K K N I I G A V Q
 < F10L

6361 GAAAAGTCAAAGTCGTTTAATGCCGATTTAATACGTTCAATAAAAAACAACTTTTATCCTTTAGATGAATTATTGTTGTTTCATTGGAATCAAAAAGTAAAGATATTACGGGTTTAAAG
 <S F D F D N L A S K I R E N F V F K K D K L H I I I P E N S D F L L I N D P K L
 < F10L

6481 TCTCGGTGAAAAAGTTGTCGACCATGGTAGTTCGTAGATTTTAATGTATAACAGAGCCATCTGTAAAAAGATAAACTTTATGTATTGTACCAAGATTTAAATCCTAATTTGATAGCT
 <D A H L F N D C C P L E Y I K I Y L L A M Q L F I F K J Y Q V L S K F G L K I A
 < F10L

6601 AACTCGGTATCTACTTTATCTGCCGAATACAGTCTAGGGGAAAAATTATAATGTTTCTCTTTTCATATTCGTAGTGTCTCTTTTCATGTTTCGAAAAGTGAACATCGGGTTAAAA
 <L E T D V K D A S Y L A L P F I I I N G R E Y E Y N T R K E N E F F H F M R N F
 < F10L

6721 TAGTTTATAACATTAATATTACTGTTAATAACTGCCGGTAAAAAGTGGGATAGTAATTCACGAATTTGATCTGTCTTTCTCTCGTTAAACGCCCTTACAAAACTTTAGAAGAATAT
 <Y N I V N I N S N I V A P Y F H S L L K V F K I S D K R E N F A K L F V K S S Y
 < F10L

6841 CTCAATGAGAGTTCCTGACCATCCATAGTTTGTATCAATAATAGCAACATATGAAGAACACGTTTATACAGAGTATGTAAAAATGTTAATTTATAGTTTAACTCCCATGGCCACGCACAC
 <R L S L E Q G D M T Q I L L L L M H L V R K Y L T N L F T L K Y N L G N A W A C
 < F10L

6961 ACGATTAAATTTTTTTCATCTCCCTTTAGATTGTTGTATAGAAATTTGGGTACTGTGAACCTCCGCGTAGTTTCCATGGGACTATATAATTTGTGGCTCGAATACAAATTTTACTACA
 <V I L K K E D G K L N N Y L F K P V T F E A T T E M P S Y L K T A E F V F K V V
 < F10L

7081 TAGTTATCTATCTTAAAACTATACCATATCCTCCTGTAGATATGTGATAAAATCGTCGTTTATAGGATAAAATCGTTTATCCTTTTGTGGAAAAATGATGAATTAATGTAATCATTC
 <Y N D I K F V I G Y G G T S I N Y F D D N I P Y F R K D K Q Q F F S S N I Y D N
 <_____F10L_____>

7201 TCTTCTATCTTTAGTAGTGTTCCTATTAAATCTTAAATAATTTAACAATCTAACTGACGGAGCCCAATTTGGTGTAATCTAATTGGCAGATTATGTTGTTAAATATAAACAG
 <E E I K L L T E R N F N K F Y N L L R V S P A W N Q H L D L Q S M I N N F Y L C
 <_____F10L_____>

7321 TCTCCTAATAACAGTATCTGATAATCTATGGGAGACATCCATTGATATTGAGGGATGAATCATTGGCAACACCCATTTATTGTACAAAAGCCCCAATTTACAAACGAAAGTCCAG
 M N H W Q H P F I V Q K A P I Y K R K S R
 <D G L I V T D S L R H P S H W Q Y E P S S D N A V G H
 <_____F10L_____> <L R F D L
 <_____F11L_____>

7441 GTTTGATAGAGACAACTATTAATCTATTTGTCTCTGTTTTAACACCTCCACAGTTTTTAATTTCTTTGGTAATGAAATTATTCACAATATCAGTATCTCTTTATCTACCAGAGATTT
 F D R D K L L T I L S L F L T P P Q F L I S L V M K L F T I S V S S L S T R D F
 <N S L S L S N V I K D R N K V G G C N K I E K T I F N N V I D T D E K D V L S K
 <_____F11L_____>

7561 TACTAATTCGATAACCTTGGCTGTCTCATTCAATAGGGTAGTAATTTGTATGTGTGATATTGATATCTTTTGAATTGTTTCTTTTGAAGTGATTCTTTGATGGTGTGAGCATACGA
 T N L I T L A V S F N R V V I F V C V I L I S F
 <V L K I V K A T E N L L T T I N T H T I N I D K Q I T E K L L S E K I T D A Y S
 <_____F11L_____>

>Hpa1
 ^

7681 ATTACAATAATGCAGAACTCGGTTAACATGCAGGAATTATAGTAAGCCAATTCGAATTTGGCTGTGTGTATTAGAGTGTCAATATGAGCAATGGTGTCTTGGCTTCTCTGATAG
 <N C Y H L F E T L H C S N Y Y A L E L Q Q R N Q I L T D I H A I T D K R K E S L
 <_____F11L_____>

7801 AATGCCAGCAGCGATTTTGGCGTTATCATTGACGATATTTCTGGAATGACGAATCCTGTTTCTACTAATCTTTTGGTAGGACAAAGTGAACCAATCAAGAAGATAGCTTCTCTCTCTAT
 <I R A A I K A N D N S S I E P I V F G T E V L K K T P C L S V I L F I A E G G I
 <_____F11L_____>

>Xba1
 ^

7921 TTGTGGAAGAAATTGAATCCTCTAGATGATCTACTGACGATAGTATCTCCTTGACAGATATTGGACCGAATTACAGAAGTACCTGGAATGTAAGCCCTGAACCCCTCATTTTTTAA
 <Q P L F Q V G R S S R S V I T D G Q C I N S R I V S T G P I Y L G S V G E N K L
 <_____F11L_____>

>Sac1
 ^

8041 GCAGATTGTTGCCGTAATCCTGCACTGTGACCAAGATAGAGAGCTCCTTTGGTGAATCCATCTCTATGTTTCAGTTTAACCAAGAAACAGTCAGTGGTCTAAAATTTCCATCTCTATC
 <C I T A T F G A S H G L Y L A G K T F G D R N K L K V L F C D A P R F N G D R D
 <_____F11L_____>

8161 TAATACAGCATCTAATCTGATGTCAGGAATATGACCGGTTAATGTTATATGTAACATTGAGTAAATCCTTAAGTTCATAATCATCACTGTCTCAGTTATGTAGGATCCAAACATGT
 <L V A D L K I D P V I V P K I N Y T V N L L D K L E Y D D S D D T I Y S G F L T
 <_____F11L_____>

>Dra1
 ^

8281 TTCTACCGGCATAGTGGATACGAAGATGCTATCCATCAGAATGTTTCCCTGATTAGTATTTCTATATAGCTATTCTTCTTTAAACGATTTTCCAAATCAGTAATGTTTCTTTT
 <E V P M T S V F I S D M L I N G Q N T N E I Y S N K K L R N E L D T V I N M K K
 <_____F11L_____>

>Xba1
 ^

8401 AGGAGTAGGACCGCTAGCCAGTATGCAAGAGGATTTCTAGATCCTCTCTTCAACATCTTTGATCTCAATGGAATGCAAAACCCCATAGTGAAACACCCACGATAAAATAATATTGTT
 <P T P R R A L I S S S K R S G R K L M K S R L P I C F G M
 <_____F11L_____>

FIG.20-7

8521 TTTCACCTTTTATAATTTTACCATCTGACTCATGGATTCATTAAATATCTTTATAAGAGCTACTAAGTATAATCTTTATAACTGAAGTACAGATATATACACCGGATCTATGGTTTCCAT
 <L K V M Q S H S E N I D K Y S S S V Y L E K Y S F Q S I Y V P D I T E M
 < F12L

8641 AATTGAGTAAATGAATGCTCGGCAATAACTAATGGCAATGTATAGAACAACGAAATTATACTAGAGTTGTTAAAGTTAATATTTTCTATGAGCTGTTCCAATAAATTATTTGTTGTGAC
 <I S Y I F A R C Y S I A F T Y F L S I I S S N N F N I N E I L Q E L L N N T T V
 < F12L

8761 TGGCTTCAAGTCATAATCATCTTGATACTATCCAGTAAACCGTTTTTAAGTTCTGGAATATTATTATCCATTGTAAAGCCCCAATTTCGACTATCGAATATCCTGCTCTGATAGCAGT
 <A N L D Y I M K I S D L L G N K L E P I N H D W Q L A G L E V I S Y G A R I A T
 < F12L

8881 TTCAATATCGACGGACGTCAATACTGTAAATAAGGTGGTAGTATTGTGCATCATCGTGATAAACTACTGGAATATGGTCGTTAGTAGGTACGGTAACCTTTACACAACGGCATATATACTT
 <E I D V S T L V T I F T T T N D D D H Y V V P I N D N T P V T V K C L A I Y L K
 < F12L

>Pst1
 9001 TCCTTTTGTACCATTTTAAACGTAGTTGGGACGTCCTGCAGGGTATTGTTTTGAAGAAATGATATCGAGAACAGATTTGATACGATATTTGTTGGATTCTGATTATTACTATAATATA
 <G K T G N K V Y N P R G A P Y Q K S S I I D L V S K I R Y K N S E Q H N V I I Y
 < F12L

>Xba1
 9121 ATCTAGACAGTAGATGATTCGATAAATAGAGAAGGTATATCGTTGGTAGGATAATACATCCCCATTCCAGTATTCTCGGATACTCTTAAATGACACTAGTTAAGAACATGTCTCTAT
 M T L V K N H S S I
 < L C I S S E I F L S P I D N T P Y Y M G H G T N E S V R N I V S T L F H D E I
 < F12L

>Xba1
 9241 TCTAGAAAACGAAACATCCTACATGGACTCATTAAACCTCTAACGCTCCTGATTGTGTCTCGAATGCCTCGTACAAGGATTTCAGGATGCCATAGATTCTTTGACCACCGATTAGA
 L E N E N I L N G L I K T S N A P D C V S N A S Y K D F K D A I D S L T N D L E
 < R S F S F H R C P S H L V E L A G S Q T E F A E Y L S K L S A M S E K V L S K S
 < F12L

9361 ATTGCGTTTAGCATCTGATTTTTTATTAAATCGAATGGTCGGCTCTCTGGTTTGGCTACCCCAATGATAACAATAGTCTTGTAAAGATAAAACCGCAAGAAATTTATACGCATCCATCCA
 L R L A S D F F I K S N G R L S G L L P Q
 < H R K A D S K K I L D F P R S E P K S G W N Y C Y D Q L S L G C S F K Y A D H W
 < F12L

9481 AATAACCCTAGCACCATCGGATGATTAATGTATTATTATAGATTTCCATCCACAATTATTGGGCCAGTACTGTTAGCAACGGTATATCGAATAGATTACTCATGTAACCTACTAG
 <I V R A G D S S I L T N N Y I K W G C N N P M Y V T L L P I D F L N S H Y G V L
 < F12L

>Dra1 >Hpa1
 9601 AATGATAGTTCGTGTACTAGTCATAATATCTTTAATCCAATCTAAGAAATTTAAATTTAGATTTTACACTGTTAAAGTTAACAAGGTATTACCCGGGTACGTGGATATCATATATGG
 <I I T R T S T H I D K I W D L F N L I L N K V S N F N V F T N G P Y T S I N Y P
 < F12L

>Xba1
 9721 TATTGGTCCATTATCAGTAATAGCTCCATAAACTGATACGGCGATGGTTTTTATATGTGTTTGATCTAACGAGGAAGAAATTCGACCCACAATTCATCTAGATATGTATTAAATATC
 <I P G N D T I A G Y V S V A I T K I N T Q D L S S S I R V W L E D R S I Y K I D
 < F12L

9841 AAACGGTAACACATCAATTCGGGACCGGTATATGTTTCTAAATTTTAAATCCAATATAATGATGACCTATATGCCCTATTATCATACTGTCAACTATAGTACACCTAGAGAAGTACG
 <F P L V D I E P R T Y T E L N K I W I Y N H G I N G I I M S D Y I T C R S F K R
 < F12L

9961 ATACATCTGTTTCCTATAATCGTAAATTTACAAATCTAIAACATGCTAAACCTTTGACGACAACCCATTCATTAAATTTCTGATATGCAATCTGTAATTCGATACCGTATTGTTCTAAC
<Y M Q K R Y D N F K V F R Y C A L G K S S L W E N I E S I S D T N E I G Y Q E L
< F12L

>ClaI >XbaI
10081 AGCCAGTCTATATCTCCCTGTTTCGTGGGAACGCTTCGTATAATATCGATCAACGGATAATCTGAAGTTTTTGGAGAATAATATGACTCATGATCTATTTTCGTCCATAAACAATCTAGA
<A L A I D G Q E H S R K R I I D I L P Y D S T K P S Y Y S E N D I E D M F L R S
< F12L

10201 CATAGGAATTTGGAGCGGATGATCTTAATTTTGTGCAATGAGTCGTCAATCTATAACTTCTAATCTTGTAAATTTTCATCATCGACATAATACTATCTATGTTATCATCGTATATTAGTAT
<H P I P P S S R L K T C H T T L G I V E L R T I N M M S M I S D I N D D Y I L I
< F12L

10321 ACCATGACCTTCTTCATTTTCGTGCCAAAATGATATACAGTCTTAAATAGTTACGCAATATCTCAATAGTTTCATAATTGTTAGCTGTTTTTCATCAAGATTGTTACCCCTGTTTAAACATGAT
<G N G E E N R A L I I Y L R L Y N R L I E I T E Y N N A T K H L I Q V R N L H
< F12L

>DraI >DraI
10441 GCGGTTCTATACGTTTCTATTTTCTATTTTAAATTTTTAAATTTTTTAAAGGATTACTGTGGCTAGATACCCAATCTCTCTCAATATTTTTTAGCCTCGCTTACAAGCTGTTTATCT
<I K L S K S H S S V M D R E F I K K A E S V L Q K D
< F13L

>SalI
10561 ATACTATTAAAACTGACGAATCCGTGATTTTGGTAATGGGTTCCGTGCAAAATTTGCCGAAGTGATATGAACATATTCTGTCGTGACTATCAACAATTTTGTATTATCTGAATAGTGAA
<I S N F S V F G H N Q Y N T G D F N A S T I N V Y E D D V I L L K T N N Q I T F
< F13L

>XbaI
10681 ACCTTCACAGATAGATCATTTTGAACACACACCGCTCTAGACTTCTGGCGGTTGCCATAGAATATACGTCGTTCTTATCCCAATTACCAACTAGAAGTCTGATCTTAACCTCTTATTA
<V K V S L D N Q V C L A D L S R A T A M S Y V D N K D W N G V L L R I K V G R N
< F13L

>SalI
10801 ATGGCTGCTTCTATAATGGAGTTGTAATATCGGGCCAATAGTAGCTATTACCGTCGACACGTTAGTGCGGAACATGGCCAAATGTTCAATATCTATACTAGTCTTAGCTGACCTGAGT
<I A A E I I S N Y I D P W Y Y S N G D V R T T P V I A L N E I D I S T K A S R L
< F13L

>BglII >XbaI >XbaI
10921 TTATCAATAACTACATCGGTATCTAGATCTCTAGAATATCCCAATAGGTTTCCGGAGAATCAGTAAGAACAACCTCCACCTATAGGATCTTAAATATGATACGCGAGTGCTAACTGGCAGA
<K D I V V D T D L D R S Y G L L H E P S D T F F V G G I P N K I N Y A T S V P L
< F13L

>DraI >BglII
11041 CAACAAGCCGACAGCATAAATTCACCATGAATTTTTTCCGCTATTAAAGGCTTTAAAGATATCAATCTTCTACGAAGATCTGTGCCAGCGGGGATAATCAGAAATATACACCTAAC
<C C A A S C L N L W S N K A S N F A K F T D F R R R L D T A L P P Y D S Y V G L
< F13L

11161 GTTTTAATCGTATGTATAGATCCTCCAGTAAATGAGCGGTTTCTACATAACATCTTTCATCATCTGACACCCAAAAACAACCGAGTAGTAGTCCACATTATTTTTTTATCTATATTA
<T K I T H I S G G T F S A N G V Y C R E D D S V W F C G L L L G V N N K K D I N
< F13L

11281 ACCGTTATAAAATTTATATCCGGCAGTGACTTTGTAGCTCTCCAGATTTCCTTCCCTCGTTTCATCTAGCAAACTATTATTTTAATCCCTTTTCAGATGCCTCTTTAGTTTATCA
<V T I F N I D P C N S Q L E G L N R K G R E D L L V I I K I G K E S A E K L K D
< F13L

11401 AAAATAAGCGCTCCCTAGTCGTACTCAGAGGATTACAACAAAAGATGCTATGTATATATTTCTTAGCTAGAGTGATAATTCGTTAAAACATTCAAATGTTGTTAAATGATCGGAT
< F I L A G R T T S L P N C C F S A I Y I Y K K A L T I I E N F C E F T T L H D S
F13L

>Kpn1 >Hpa1 >Xba1

11521 CTAAAAATCCATATTTTCTGGTAGTGTCTACCGACCTACATTTTCTCCCGCAGGTACCGATGCAAAATGGCCACATTAGTTAACATAAAAACTTATACATCTGTCTATCAACGATT
< R F D M N E P L T E V L R C K A G A P V S A F P W M
F13L < V D Q E I L S E
F14L

>Sal1

11641 CTAGAATATCATCGGCTATATCGCTAAAATTTTCATCAAAGTCGACATCACAACCTAACTCAGTCAATATATTAAGAAGTTCATGATGTCACTTCGTCTATTTCTATATCCGTATCCA
< L I D D A I D S F N E D F D V D C G L E T L I N L L E M I D D E D I E I D T D M
F14L

>Dra1

11761 TTGTAGATTGTTGACCGATTACGAGTTTAAATCATTACTAATACTCAATCCTTCAGAATACAATCTGTATTTTCATTGTAATTTATAGCGGTGTATTTAAGTTGGTAGATTTTCAATT
< T S Q Q G I I S M L D N S I S L G E S Y L R Y K M
F14L

11881 ATGTATCAATATAGCAACAGTAGTCTTGCTCCTCCTTGATTCTAGCATCCTCTTCATTATTTTCTTCTACGTACATAAACATGTCCAATACGTTAGACAACACACCGCAGTGGCGGCC

>Dra1 >Cla1

12001 GCCACAGACACGAATATGACTAGACCGATGACCATTAAAAACCCCTCTCTAGCTTTCACCTAAAGTGTATCGATCATTCTTTTAGCACATGTATAATATAAAAAACATTATTCATTT
M Y N I K K H Y S I >
F ORF FR < E I E
F15L

12121 CGAATTTAGGCTCCAAAAATTTTTCATCCGTAACCGGATAATAATATATATAGACTTGTTAATAGTCGGAATAAATAGATTAATGCTTAACTATCATCTCCACGATTAGAGATAC
S N L G F Q K F F I R K P I I I Y I D L L I V G I N R L M L K L S S S P R L E I >
F ORF FR
< F K P K W F N K M R L G I I I Y I S K N I T P I F L N I S L S D D D G R N S I C
F15L

12241 AATATTTACATTCTTTTGTCTGTTTCGAACTTTATCAATACCGTTAATACAAACCCAGGAAGGAGATATTGAAACTGAGGCTGTTGAAAAATGAAACGGTGAATACAATAATTCAGATA
Q Y L N S F C C F E T L S I H V M T N P G R R Y >
F ORF FR
< Y K C E K Q Q K S V K D I C T L V F G P L L Y Q F Q P Q Q F H F P S Y L L E S L
F15L

>Cla1

12361 ATGTAAAAATCATGATCCGATTTCTGATGATATTAGAAGTCTAATGGATGTCGATGGTATGTATCTAGGAGTATCTATTTTAACAAAGCATCGATTGCTAATATACAATTATCATTTT
< T F D N N R I R I I N S S S I S T S P I Y R P T D I K V F C R N A L I C N D N Q
F15L

12481 GATTAATTTGTTATTTTATTCATATTCCTAAAGGTTTCATATTTATCAATCTCTACATTAAAAATTTCCATTTTAAATTTATGTAGCCCCGAATACCTCTCATTACGTTTCATTTT
< N I T I K N M N K F P K M N I L E E V N F I E N K L K N L G A I S R M
F15L < K K
F15L

>Hpa1

12601 TGTCTATAATATCCATTTTGTTCATCTCGGTACATAGATTATCCAATTGAGAAGCGCATTTAGTAGTTTGTACATTTTAAGTTTATTGACCAATCGTGGAACTAGTTATAGTTAACA
< D I I D M K N M E T C L N D L Q S A C K T T K Y N K L K N V F R R F S T I T L M
F16L

FIG.20-10

```

12721 TTTTATTATTGATACCTGATTAATACCCCTGCCGTTACTATTATTATACTGATGAACCCAGTAACATTGGAATTAACCTATCGATCGACGCTTCCAAATTTGT
<K N N S V R I N I G R G N S N M I V S T V W T V N S N V I S L L A D V S G F N D
^
>ClaI
F16L

12841 CTATTATAAATCACCAGATAATTTTTTATTACATGTTTTCATATTATAGGATTATCAATCTTTAATCTTACTACGATTGTATGCGTTGATATTACAGACGTCATTCTAAAGACG
<I I F E G I I K K N C T K M N M L I I L D K I K S R N Y A M I N C S T M R F S P
^
>F16L
F16L

12961 GAGGATTTCCATCAATGCCAGACAATCAAGTACATGGAATAGGTTTTGTCTATTGCGCATCATAGATTTCATATAGAACCCCGTAGAAATACTAATTTGTTTACTCTAT
<P N G D F A L C D R V F Y M S I P K T R N R M M S E Y L V G T S I S I Q K V R Y
^
>F16L
F16L

13081 AAAATACTAATGCACTATTTCATCGTTTGTATAACGCTTTCCAAAGTGTCAAATTCCAAATTTTTCATTGATAGTACCAGAAATTTCTATCTCTTTAACTACTTGCATAGTAGGT
<F V L A D I E D N Q I V D K W T D F E L N K E M I T G F E E I E K V V Q M S L Y
^
>F16L
F16L

13201 AATTACAGTGACCTACATGCCGTTTTTTGAAACTGAATAGATCGCTCTAGAGCGATCGYACGCTAGTCACCAATCACCACCTTTTCATATTAGAATATATGTATGTAAGAAATATAGTAG
<M C H H R C A T K Q F Q I S A D L L S R V S T V I V V K M
^
>F16L
F16L

13321 AATTTCATTTTGTCTATGCTATAAATCAATTCCTCATTTTGCATCTGCTCATCTCCGTTTATATCAATACCAAGAGGAAGATATCTGGTTCTAAAGCCGTTAAAGTATGC
^
>EcoRI

13441 GATGTTAGAACTGTAGAATGCCAAGGAAGTAAAGCTT
^
>Hind3
^
>Hind3_F-E

```

FIG.21-1

>Hind3
^

1 AAGCTTCGTTGTAGAAACACTGAAGCTAACCATGAGATTTCATCGTCGGTGATATTGGCAAAACGGGATATGGATGAGGCCAACGAAGCAGGTCTATTTCGACACTATTATTATTCGAAGAT

121 GATGTGAATTTAGCATATAGTAAGTTAATTCAGATACTACAGGACCGTATTAGAATGTATTTTAACACCTAATTAAGACCTTAAGACITTAACAACTTGATAATTAAATAATAAATACATCGTTTT

>Dra1
^

241 TATAIGTGGCTATTTCAACGCTCTAATGTATTAGTTAAATATTAAACCTTACCACGTAACAACTTAAATTTTAAATGATATTTTCATTGACAGATAGATCACACATTATGAACCTTTCAAGGA
M H F Q G>

149

B1R ^

>Hpa1
^

361 CTGTGTAACTGACAATTGCCAAAATCAATGGGTCTGTGGACCATTAATAGGAAAGGTGGATTGTTGGTAGTATTTTACTACTAATGACAATAATTATGTAGTAAATAAGAGCCCAAA
L V L T D M C K N Q W V V G P L I G K G G F G S I Y T T N D N Y V V K I E P K>

B1R

481 GCTAACGGATCATTATTTACCGAACACAGGCATTTTATCTAGAGTACTTAAACCATCCGTTATCGAAGAATGGAAAAATCTCACAAATATAAAGCAGTAGGTCTTATCAGGTGCAAGGCA
A N G S L F T E Q A F Y T R V L K P S V I E E W K K S H N I K H V G L I T C K A>

B1R

09000259

>Xba1
 ^
 >Bgl2
 ^
 601 TTGGTCTATACAAATCCATTAAATGTGGAATATAGATTCTTGGTAATTAATAGATTAGGTGATCAGAGCCCAATAATAATAGATTACCAAAAAGGTCGGTGATG
 F G L Y K S I N V E Y R F L V I N R L G V D L D A V I R A N N M R L P K R S V H>
 B1R

721 TTGATCGGAATCGAAATCTTAATACCATACAATTTATGCACGAGCAAGGATATTCTCAGCGAGATATTAAAGCGAGTAATATAGTCTTGGATCAAAATAGATAAGAATAAATTATATCTA
 L I G I E I L N T I Q F M H E Q G Y S H G D I K A S N I V L D Q I D K N K L Y L>
 B1R

>Xba1
 ^
 841 GGGATTACGGGATTGGTTTCTAAATTCATGTCTAATGGCGAACATGTTCCATTATAAGAAATCCAAATAAATGGATAACGGTACTCTAGAAATTTACACCTATAGATTGCGCATAAAGGA
 V D Y G L V S K F H S M G E H V P F I R N P N K M D N G T L E F T P I D S H K G>
 B1R
 <P N T E L N H D L P S C T G N I L F G F L I S L P V R S M V G I S E C L P
 ORF A

>Xba1
 ^
 >Bgl2
 ^
 961 TACGTTGTATCTAGACGTGGAGATCTAGAAACACTTGGATATTGTATGATTAGATTGGTGGAGGTATCTTGCCATGGACTAAGATATCTGAACAACAAGAAATTTGTGCATTAGTAAGTGCC
 Y V V S R R G D L E T L G Y C M I R W L G G I L P W T K I S E T K N C A L V S A>
 B1R
 <Y T T D L R P S R S V S P Y Q I I L H N P P I K G H V L I D S V F F Q A N T L A
 ORF A

FIG.21-2

>Hpa1

>Nco1

FIG.21-3

1081 ACAAACAGAAATATGTTAACAATACTCGACCTTTGGTAAATGACCACTTTGGCAATATGCACCTAGAGAATTGCTGCAATATATTACCATGGTAACCTCTTTGACATATTTTGAGGAACCC
T K Q K Y V N M T A T L L M T S L Q Y A P R E L L Q Y I T M V N S L T Y F E E P >
B1R
<V F C F Y T L L V A V K N I V L K C Y A G L S M S C Y I V M
< ORF A

1201 AATTACGACGAGTTTCGGCACATATTAAATGCAGGGGTATATTAAAGTGGGTGGTTCATGCGCTTTCCTGGAATATCATGCACTGTTGCCAATGATGTGAGGAATATTCTG
N Y D E F R H I L M Q G V Y Y >
B1R
< ORF B

1321 TGTGTACAACCGAAATCATGGCGATGTTTACGCACACGCTCTCGGTGGGTACGACGACAATCTTCATGCCCTTTCCTGGAATATCATGCACTGTTGCCAATGATGTGAGGAATATTCTG
M A M F Y A H A L G G Y D E N L H A F P G I S S T V A M D V R K Y S >
B2R

1441 TTGTGTCAGTTTATAACAAGTATGACATTGTAAAGACAATATATGTGGTGTACAGTCAGGTGAACAAGACATATATTGGAGCACTGCTGCCCTAATGTTGAGTGCAATGAATATC
V V S V Y N N K Y D I V K D K Y M W C Y S Q V M K R Y I G A L L P M F E C N E Y >
B2R

>Xba1

1561 TACAAATTGGAGATCCGATCCATGATCAAGAAGGAAATCAAAATCTCTATCATCATATCGGCACAAAACACTACTATGCTCTAAGCGGGAATCGGGTACGAGAGTCTAGACTTGTGTTGG
L Q I G D P I H D Q E G M Q I S I I T Y R H K M Y Y A L S G I G Y E S L D L C L >
B2R
<V Q T Q
<

1681 AAGGAGTAGGGATTTCATCAGTACCTTGAACAGGAAACGCTGTATATGGAAAGTTCAACATGATTATTCTACTATCAAGAGAGAGCCAAAGAAATGAGTACACTTAGTCCAGGAC
E G V G I H H V L E T G N A V Y G K V Q H D Y S T I K E K A K E M S T L S P G >
B2R
<F S Y P N M M V Y K F C S V S Y I S F N L M I I R S D F L L G F F H T C K T W S
< ORF B

1801 CTATAATTGATACCGTCTGGATAGGAGATTGTATCTGTCAGGTACTGCTGIGGACGTACATGGAAGGAAATTATGAGAAATGAGATTCAAAAAGGGTGGGTGCTTCGGATCCCAA
 P I I D Y H V W I G D C I C Q V T A V D V H G K E I M R M R F K K G A V L P I P>
 <R Y N I V V D P Y S I T D T L M S S H V Y M
 < ORF B B2R >
 <T V A T S T C P F S I I L I L M L F P A T S G I G F
 < ORF C >
 1921 ATCTGGTAAAGTTAAACITGGGAGAATGATACAGAAAATCTTTCTTCTACTATATCGGGGCCACCATCGAGGTAACCACCTCTCTGGAAGACAGCGTGAATAATGTACTCATGAAACG
 M L V K V K L G E N D T E N L S S T I S A A P S R>
 <R T F T L S P S F S V S F R E E V I D A A G D L Y G G R Q F V A H I I Y E H F T
 < ORF C >
 2041 TTGGAAACTATACGCCATATGGTCTGTTGTATATGATCATTTTGATATTGTGAATGGTAAAGAATGCTGTTAIGTGCATACGCATTCACTAATCAAAATCCTATACCGAGTACTGT
 L E T I R H M W S V V Y D H F D I V N G K E C C Y V H T H S S N Q M P I P S T V>
 <Q F S Y A M H P R N Y I I M K I N H I T F F A T I H M R M
 < ORF C B2R B3R >
 >NcoI >XbaI
 2161 AAAAAAATTGTACATGAAGACTATGGGATCATGCATTCATCAAAATGGATTCCATGGAACTCTAGAGTATCTTAGCGAACTGAAGGAATCAGGTGGATGGAGTCCCGAGACCAGAAATGCA
 K T N L Y M K T M G S C I Q M D S M E A L E Y L S E L K E S G G W S P R P E M Q>
 < ORF C B3R >
 2281 GGAATTTGAATATCCAGATGGAGTGGAAACACACTGAATCAATTCAGAGATGGTAGAGGAGTCTTCAATAGATCAGAACTTCAGGCTGGTAAATTAGTCAAAATTTGGTAATTTCTATTAA
 E F E Y P D G V E D T E S I E R L V E E F F M R S E L Q A G K L V K F G N S I N>
 < ORF C B3R >

FIG.21-4

FIG.21-5

```

2401 TTGTTAAACATACATCTGTGTTTCAGCTAAGCAACTAAGAACACACGTATACGGGCAGCAGCTTCCTTTATACTCTCATCTTTTACCAACAAAGGGTGGATATTTGTTTCATTGGAGTTGATAA
C>
_____>

2521 TAATACACACAAAGTATTTGGATTACCGGTGGGTTACGACTACCTCAGACTGGTAGAAGATGATATAGAAAAGCATATCAAAAGACTTTTGTTGTGGCAATTTCTGIGAGAAAGAAAGAGGA

2641 CATCAAGTACGGGTGTCGATTTCATCAAGGTATATAAACCCTGGGGATGAGGCTACCTCGACATACGTGTGGCTATCAAAAGTGGAAAGATGCTGTGTTGCTGIGTTTGCAGATTGGCCAGA

2761 ATCATGGTATATGGATACTAATGGTATCAAGAAGTATTCTCCAGATGAATGGGTGTCACATATAAAATTTTAATTAATGTAACATATAGAGAACAAATAATAGGTTGTAAATATCATATAGA

2881 CAATAACTAACAAATTAATTAGTAAACIGTTATCTCTTTTTTAACTAACCAACTAACTATATACCTATTAATACATCGTAAATATAGTTCTTAACATCTATTAAATCATTGATTGCGTTCCTT

3001 AATTTTTTATAAACTAACATTTGTTAAATTGAAAAGGGATAACAATGTTACAGAAATATAAATATATATATGGAATTTTTTTTAAAAAGGAAATACTTGACTGGAGTGATATTTATCTCTTCATTA
153
M D F F K K E I L D W S V Y L S L H Y
B4R

3121 TATAGCAGCGGTGTGTTCCAAATTCCTCCACATCCCATATAATACAGGATTATAAICATTCGAAACATACGAGAAAGTGGATAAAACAATAGTTGATTTTTTTATCTAGGTTGCCAAATTT
I A R V C S N S S T S H I I Q D Y N L I R T Y E K V D K T I V D F L S R L P N L
B4R

3241 ATCCCATATTTTAGAATATGGGGAATATTTCTACATATTTTCTATGGATGATGCTAATACGAATATTATAATTTTTTTCTAGATAGAGTATTAAATATTAAAGACGGTCAAT
F H I L E Y G E N I L H I Y S M D D A N T M I I I F F L D R V L N I N K N G S F
B4R

3361 TATACACAATCTCAGGTTATCATCCATTAAATATAAAAGAATATGTATCAATTAGTTAAATGATCATCCAGATAATAGGATAAGACTAATGCTTGAAAAATGGACGTAGAACAAAG
I H N L R L S S I N I K E Y V Y Q L V M N D H P D N R I R L M L E N G R R T R
B4R

```

3481 ACATTTTTTGGCTATATACAGATACAGTTAAATCTATATATGATTTTAAATAATCATGGATTTTATATAGATGCCGAAGACAGTTACGGTTGTACATTATTACATAGATGTATATA
 H F L S Y I S D T V N I Y I C I L I N H G F Y I D A E D S Y G C T L L H R C I Y>
 B4R

3601 TCACTATAAGAAATCAGAATCAGAAATCATACAATGAATTAATTAAGATATTGTTAAATAATGGATCAGATGTAGATAAAAAAGATACGTACGGAACACACCTTTTATCTATTATGTAA
 H Y K K S E S E S Y N E L I K I L L N M G S D V D K K D T Y G N T P F I L L C K>
 B4R

3721 ACACGATATCAACAACGTGGAAATGTTTGAGATATGTTTAGAGAAATGCTAATATAGACTCTGTAGACTTTTAATAGATATACACCTCTTCATTATGTCTCATGTGCGTAATAATATGATTT
 H D I N N V E L F E I C L E N A M I D S V D F N R Y T P L H Y V S C R N K Y D F>
 B4R

3841 TGTAAGTTAATTTCTAAAGGAGCAAAATGTTAATGCGCGTAATAAAATTCGGAAGTACTCCATTTTATTTGTGGAATTATACACGGTATCTCGCTTATATAAACTATATTTTGGAAATCAGA
 V K L L I S K G A N V N A R N K F G T T P F Y C G I I H G I S L I K L Y L E S D>
 B4R

3961 CACAGAGTTAGAAATAGATAATGAACATATAGTTCGTCATTTAATAATTTTGGATGCTGTTGAATCTTTAGATTATCTATTATCCAGAGGAGTTATTGATATTAACTATCGTACTATATA
 T E L E I D N E H I V R H L I I F D A V E S L D Y L L S R G V I D I N Y R T I Y>
 B4R

4081 CAACGAAACATCTATTACGACGCGTCAGTTATAATGCGTATAANTACGTTGGICTATCTATTAAACAGAAATGGTGATTTTIGAGACGATTACTACTAGTGGATGTACATGTATTTTCGGA
 N E T S I Y D A V S Y N A Y N T L V Y L L N R N G D F E T I T T S G C T C I S E>
 B4R

4201 AGCAGTCGCAACAACAACAAATAATGGAAGTACTATTGTCTAAACGACCCTCTTTGAAAAATTATGATACAGTCTATGATAGCAATTACTAAAAATAAACAATAATGCAGATTT
 A V A N N N K I I M E V L L S K R P S L K I M I Q S M I A I T K N K Q H N A D L>
 B4R

FIG.21-6

FIG.-21-7

>Dra1
^

4321 ATTGAAAAATGTTGATATAAAATATACTGGGTGATGACCGATTATGATACTCTTATAGATGTACAGTCGCTACAGCAATATAAATGGTATATTTTAAAAATGTTTCGATGAAATAGATATCAI
L K M C I K Y T A C M T D Y D T L I D V Q S L Q Q Y K W Y I L K C C F D E I D I M>
B4R

4441 GAAGAGATGTTATATAAAATATAAACTGTATTCCAAATTAGTTTTTTGTATCAAAAGACATTATACCTTTAATCAGATACGGTAAACATCCTTCTTTTCGTTGAAGTGCACCTAGCTCCTCGA
K R C Y I K N K T V F Q L V F C I K D I M T L M R Y G K H P S F V K C T S L D V>
B4R

4561 ATACGGAGTCGTGACGTAATATCATAGCATCTATTAGATATCGTCAGAGATTAAATTAGTCTATTATCCAAAGAGCTGGATCGGGGAGATAAATGGTCGTGTTTTCCTAACGAAATAAA
Y G S R V R N I I A S I R Y R Q R L I S L L S K K L D A G D K W S C F P H E I K>
B4R

4681 ATATAAAATATTGGAAAACITTTAACGATAACGAACGTGTCACATATCTAAAAATCTTATAAAACACTATTAAAAATATAAAATCTAAGTAGGATAAAATCACACTACATCATGTTTCC
Y K I L E N F N D N E L S T Y L K I L>
B4R

155

4801 TAGTGCTCGACAGTGTATACTATTTTAAACACTCATAAATATAAAATGAAAACGATTTCCGTTGTTACGTTGTTATGCGTACTACCTGCTGTTGTTTATTC AACATGTACTGTACCCA
M K T I S V V T L L C V L P A V V Y S T C T V P T>
B5R

>BamH1
^

4921 TGAATAACGCTAATTAACGCTACCGAAACATCGTTTAAATAAACCAGAAAGTTACGTTTACATGTGATCAGGGATATCATTTCTGGGATCCAAATGCTGTCTCGGAAACAGATATAAT
M N N A K L T S T E T S F N N N Q K V T F T C D Q G Y H S S D P N A V C E T D K>
B5R

>EcoRI

5041 GGAATACGAAATCCATGCAAAAAATGTGCACAGTTTCTGATTACATCTCTGACIATATAAACCCTATACGAAGTGAATTCACCATGACACTAAGTTGCAACGGCGAAACAA
W K Y E N P C K K H C T V S D Y I S E L Y N K P L Y E V N S T M T L S C N G E T>
BSR

5161 AATATTTTCGTTGGGAAGAAAAATGGAAATACCTTCTTGGAAATGATCTGTACGTGTCCTAATGCGGAATGTCAACCTCTTCAATTAGAACCGGATCGTGTCAACCCAGTTAAAGAA
K Y F R C E E K N G N T S W N D T V T C P N A E C Q P L Q L E H G S C Q P V K E>
BSR

5281 AATACTCATTTGGGGAATATATGACTATCAACTGTGATGTTGGATATGAGTTAATGGTGTCTGTACATAAGTTGTACAGCTAATTTCTTGGAAATGTTATCCATCATGTCAACAAAAAT
K Y S F G E Y M T I N C D V G Y E V I G A S Y I S C T A N S W N V I P S C Q Q K>
BSR

5401 GTGATATACCGTCTCTATCTAAATGGATTAAATTCGGGATCTACATTTTCTATCGGTGGGTATACATCTTAGTTGTAAAGTGGTTTATATACTAACGGGATCTCCATCATCCACATGTA
C D I P S L S N G L I S G S T F S I G G V I H L S C K S G F I L T G S P S S T C>
BSR 156

5521 TCGACGGTAAATGGAATCCCGTACTCCCAATATGIGTACGAACTAACGAAGAATTTTGATCCAGTGGATGGTCCCGCAGATGAGACAGATTTCGAGCAAACTCTCGAAACAGGTTGTAC
I D G K W N P V L P I C V R T N E E F D P V D D G P D D E T D L S K L S K D V V>
BSR

>HpaI

5641 AATATGAACAAGAAATAGAATCGTTAGAAGCAACTTATCATATAATCATAGTGGGTAAACAATTAATGGCGTCATATTTTAAATCTCCGTTATAGTATTAGTTTGTCTGTGACAAAA
Q Y E Q E I E S L E A T Y H I I I V A L T I M G V I F L I S V I V L V C S C D K>
BSR

5761 ATAATGACCAATATTAAGTTCCATAAATTGCTACCGTAATATAAATCCGTTAAATAATTAATAATTAATAACGAACAAGTATCAAAAGATTAAAGACTTATAGCT
N M D Q Y K F H K L L P>
BSR

FIG.2 I-8

FIG.21-9

5881 AGAATCAATTGACATGCTCTTCTCAGIGCATGTTGATATCTACGATGCCGTTAGAGCATTTTACTCAGGCACCTATTATAACAAGAGATTATTTGTTGTAATGGAAGAAGTAACGCCATAT
M S S S V D V D I Y D A V R A F L L R H Y Y M K R F I V Y G R S M A I L>
B64
<L L L M I T Y P L L L A M N
< ORF D

6001 ACATAATATACAGGCTATTTACAAGATGCGCGTTATACCGTTGCGATGATATAGTACTATGCCAAATGAATCAGGTGTTAAACAATGGGTGATGGATACACITTAATGGTATAAT
H M I Y R L F T R C A V I P F D D I V R T M P N E S R V K Q W V H D T L M G I M>
B64
<C L I Y L S N V L H A T I G M S S I T R V I G F S D R T L C H T I S V S L P I I
< ORF D

6121 GATGAATGAACGCGATGTTTCTGTGAAGCGTTGGCACCGGAATACTATTTCATGGAAATGTTTTTCGATTACAATAAAATAGTATCAACAATCAACTAATGTATGATATAATTAATAGCGT
M M E R D V S V S V G T G I L F M E M F F D Y N K N S I N M Q L M Y D I I M S V>
B64
<I F S R S T E T L T P V P I S M M
< ORF D

6241 ATCTATAATTCTAGCTAATGAGAGATATAGAAGCGCTTTTAAACGACGATGGTATATACATCCGTAGAAATATGATTAAACAAGTTGTACGGATACGCATCTCTAACTACTATTGGCACCAT
S I I L A M E R Y R S A F N D D G I Y I R R M M I M K L Y G Y A S L T T I G T I>
B64
>Dra1
^

6361 CGCTGGAGGTGTTTGTATTATCTGTTGATGCTAGTCTAGTTAGTTTGTATAAATAATTATTTCATATATACTAGTTAAATTTTAAGATTTTAAATGTATAAAAACTAATAACGTTTTTAT
A G G V C Y Y L L M H L V S L Y K>
B64
M Y K K L I T F L>
B7R

6481 TTGTAATAGGIGCATTCCTATTCGAATAATGAGTACACCTCCGTTTAAATAACCTGAGTGTAAACTCTATATAGTGGAGTAGATAATAGAAAAATTCATATACATGATGATAATA
F V I G A L A S Y S N M E Y T P F N K L S V K L Y I D G V D N I E N S Y T D D N>
B7R

>Dra1
^

6601 ATGAATTGGTGTAAATTTTAAAGAGGTACACAAATTTCTATTATTACAGAGTCATGCGAGGTCCGGATTTGATTCATAGATATAGATGTTATAAAGGACTATATAAATTTGATATGTATA
N E L V L N F K E Y T I S I I T E S C D V G F D S I D I D V I N D Y K I I D H Y>
B7R

6721 CCAATTGACTCGTCTACTATTCAACGCGAGGGTCACACGGTGTAGAATAATCTACCAAAATTATCATGCCAATTATGATAAGTACCCCTTATATTCCAAAATATGATGGTGATGAGCGACAATATT
T I D S S T I Q R R G H T C R I S T K L S C H Y D K Y P Y I H K Y D G D E R Q Y>
B7R

>Pst1
^

6841 CTATTACTGCAGAGGGAAATGCTATAAGGAATAAAATATGAAATAAGTATGATCAACGATGATCTATTGAGAAACATACCTCTTAAATTTGGATCTACTTATATATTGATCGTC
S I T A E G K C Y K G I K Y E I S H I N D D T L L R K H T L K I G S T Y I F D R>
B7R

158

>Dra1 >Dra1
^ ^

6961 ATGGACATAGTAATACATATTATTCAAATAATATGATTTTATAAAATTTTAAATATATTATCATCTCAGTGACAGTAGTCAAAATAACAAACACCATGAGATATATTATAATTCTCGCAG
H G H S N T Y Y S K Y D F>
B7R

M R Y I I I I L A>
B8R

7081 TTTTGTTCATTATAGTATACACGGCTAAATAAATAAGTTTGAATCCGGTCAATTTTGATTCCAAATTTGAATGGACTGGGATGGTCTATACAATATATCCCTTAAAAATTTATG
V L F I N S I H A K I T S Y K F E S V N F D S K I E W T G D G L Y N I S L K N Y>
B8R

7201 GCATCAAGACGTGGCAACAATGTATACAAATGTACCAGAGGAACATACGACATATCCGCAATTTCCAAAGAATGATTTCGGTATCTTTCTGGGTAAATTTGAACAAGGCCGATTATAAAG
G I K T W Q T M Y T N V P E G T Y D I S A F P K N D F V S F W V K F E Q G D Y K>
B8R

FIG.2 I-10

~~~~~

**>claf**

**>HCO1**

1. История

7921 ACAC TGGTAA CGCCCTTATAGGCCTCAACCAATTTCAAGATGAGGTCCCTGATTATAGTCTTCTGTTCCTCTATCATCTACTCTCATCTGCTATTAGACGATGTGAGAAAGACTCAAGA  
M R S L I I V L L F P S I I Y S H S I R R C E K T E >  
898 >



[illegible]

FIG. 21-13

8761 AGATACAGATACAGATACAGATACAGATGTTCACAATGTAGAAGATATCATAAATGAAUATAGATAGACAGAGAAGAGAATACTAAAAAATGTAGAAAATTGAATAATAAAAACTTTAA  
D T D T D T D T D V T N V E D I I N E I D R E K E E I L K M V E I E M W I N >  
B11R

8881 CAAGAAATCATCCAAGTGGATATATTAGAGAAGCACTCGTTATTAAATACAAAGTAGTAATAGTGCATTCACATGATAAAGAAGTTATAGAAATGTATCAGTCACCGATGTAGGAAATATAGCAATCAT  
K N H P S G Y I R E A L V I N T S S N S D S I D K E V I E C I S H D V G I >  
B11R >

9001 ATCTACTAATTTTATAATCAATACAAAACATAAAAAACAACACTCGTTATTACATAGCAGGCATGGGAATCCTTCAAGTATTGTTTTGATAACGATGGCAAGAAATGGATTATCGGA\_\_AATAC  
H E S F K Y C F D N D G K K W I I G N T>  
B12R >

9121 TTTATATTCTGGTAATTCAATCTACTCTATAAGGTCAGAAAAAATTTCACTAGTTCGTTCTACAAATAGCGTAATGAAGATAGATCACAATCACAAGCCATTGTTGTCTGAAATA\_CGATT  
L Y S G M S I L Y K V R K N F T S S F Y N Y V M K I D H K S H K P L L S E I R F > ^  
B12R 161

**>BamH1**

>Bg12

9241 C T A T A T A T C T G T A T T G G A T C C T T T G G C T A T T T G G C T A T T G G A A A C C G A T G A T J A T A T G T T C T T C G T  
Y I S V L D P L T I D N W T R E R G I K Y L A I P D L Y G I G E T D D Y H F F V >  
812R

>Xho1

look

9361 TATAAAGAATTTGGGAAGAGTATTCGCCCCAAAGGATACTCAATCAGTCTTCGAAAGCATGTGTCACTATGATATAACACACGTTAGAGTTTATACACTCTCGAGGATTTACCCATGCA\_AAAAT  
I K N L G R V F A P K D T E S V F E A C V T M I N T L E F I H S R G F T H G K I>  
B12R 2

>Xba1

9481 AGAACCGAGGAATATACTGATTAGAAATAAACGCTTTTCACTAATTGACTATTCTAGAACTAACAACTATACAAGAGTGGAACTCACATATAGATTACAACGAGGACATGATACTTC  
E P R N I L I R N K R L S L I D Y S R T N K L Y K S G N S H I D Y M E D H I T S>  
B12R

>Nco1

9601 AGGAAATATCAATTATATGTGTGTAGACAATCATCTTGGAGCAACAGTTTCAAGACGAGGAGATTAGAAATGTTGGATATTGCATGATAGAAATGGTTCGGTGGCAAACTTCCATGGAA  
G N I M Y M C V D N H L G A T V S R R G D L E M L G Y C M I E W F G G K L P W K>  
B12R

9721 AAACGAAAGTAGTATAAAAGTAATAAAACAAAAAAGAATAATAAAAAATTTATAGCTACTTTTCTTGAGGACTGTTTTCCTGAAGGAATGAACCTCTGGANTTAGTTAGATATATAGA  
N E S S I K V I K Q K K E Y K K F I A T F F E D C F P E G N E P L E L V R Y I E>  
B12R

9841 ATTAGTATACACGTTAGATTATTTCTCAACICCTTAATTATGACAGACTACGTAGACTGTTTATACAGATTGAAATTTATTTCTTTTTTATAGAGTGGTGTAGTGTACGGATATCTAA  
L V Y T L D Y S Q T P M Y D R L R L F I Q D>  
B12R

>Cla1

9961 TATTAAATTAGACTATCTCTATCGCGCTACACGACCAATAATCGATTACTATGAATATCTTCTATGAAGGAGAGAAATGTATTCTTTCTCCAGCGTCAATCTCGTCAGTATTGACAATA  
M K G E N V F I S P A S I S S V L T I>  
B13R

>BamH1

10081 CTGTATTATGGAGCTAATGGATCCACTGCTGAACAGCTATCAAAATATGTAGAAACGGAGGAGAACACACGGGATAAGGTTAGCGCTCAGAAATATCTCATTTCAAATCCATAAAATAAAGTATAT  
L Y Y G A N G S T A E Q L S K Y V E T E E N T D K V S A Q N I S F K S I N K V Y>  
B13R

FIG. 21-14

>Ora1  
^

FIG. 21-15

10201 GGGCGATAATCTGCCGTTTAAAGATTCTTTTGGGAAAAAATTGGCGATAAGTTTCAAACGTGTGACTTCACCTGATTGTCGCACTATAGATGCAATCAACAAGTGTGTAGATATCTTT  
G R Y S A V F K D F F L G K I G D K F Q T V D F T D C R T I D A I N K C V D I F>  
B13R

>Dra1  
^

10321 ACTAGGGGAAAAATCAATCCACTATTGGAATGCAACCATTTGTCCTAGCAATTAGTCCGTATACCTTAAAGCAAAATGGTTGACGCCATTTCGAAAAGCAATTTACCAGIGATTATCCCTT  
T E G K I N P L L D E P L S P S N>  
B13R M N H C L L A I S A V Y F K A K W L T P F E K E F T S D Y P F>  
B14R

10441 TTACGTATCACCAACGGAATGGTAGTGAAGTATGATGTCIATGTACGGCGAGCTATTTAATCAGCATCTGTAAAGGAATCATTCGGCAACTTTTCAATCATAGAACTGCCATATGT  
Y V S P T E M V D V S M S M Y G E L F N H A S V K E S F G N F S I I E L P Y V>  
B14R 163

10561 TGGAGATACTAGTATGGTCATTCTCCAGACAAGATTGATGGATTAGAAATCCATAGAACAAAATCTAACAGATACAAATTTTAAGAAATGGTGTAACTCTCTGGATGCTATGTTTAT  
G D T S M M V I L P D K I D G L E S I E Q N L T D T N F K K W C N S L D A M F I>  
B14R

10681 AGATGTTACATTCCCAAGTTTAAGGTAACAGGCCTCGTATAATCTGGTGGATACTCTAGTAAAGTCAGGACTGACAGAGGTGTTCGGTTCAACTGGAGATTATAGCAATATGTGTAATTT  
D V H I P K F K V T G S Y N L V D T L V K S G L T E V F G S T G D Y S N M C M L>  
B14R

>Sal1  
^

>Pst1  
^

10801 AGATGTGAGTGTGCGCGCTATGATCCACAAAACGTATATAGATGTCAATGAAGAGTATACAGAAAGCAGCTGCAGCAACTTGTGCACTGGTGTGACACTGTGCATCAACAATTACAAATGA  
D V S V D A M I H K T Y I D V N E E Y T E A A A A T C A L V S D C A S T I T N E>  
B14R

[illegible]

11041 AAAACATGIGGTATTAGTGCAGGTCGTTGTTCTTCCAAATTCGAATGGTAAGATGACACGCCAACTTTAGTACCCAGCTCTTTTACCACACAGCACTGTGGATGTGACAGACTGACCAGTA  
M T A W F S T H V F S P Q H C G C D R L T S>  
B15R

11161 TTGATGACGTCAAACAATGTTTGACIGATATATTTATTGGTGGTCTATGCATACCGCAACAGGCAATGGCTGGACAGTTGTATTCCACACTCCTCTCTCTTTAGAGATGATGCGGAAT  
I D D V K Q C L T E Y I Y W S S Y A Y R W R Q C A G Q L Y S T L L S F R D D A E>  
B15R

1000

11281 TAGTGTTCATCGACATTCCGCGAGCTGGTAAATAATATGCCCGTGGGATCATGTCAAAGATTGTACAGAAATCATCCGTTGTTATATACCGGATGAGCAAAAAAECATCAGACAGAGATTTCGGG

<H E D V N A L Q Y F I H R P I I D F I T C F D D T T I Y R I L L F G D S L W R  
 B15R  
 ORF E

11401 CCATCATCGGACTTTGTGCATATGCTGCTACTTACIGGGGGAGGTGAAGACCAICCCACTAGTAACAGAGCAGICGAGCGCATTTGTGATGCTTGAGATGCTCAATTACGTGGATTATACCA  
A I I G L C A Y A A T Y W G G E D H P T S M S L N A L F V M L E M L N Y V D Y N>  
B15R  
<G D D S K T C I S S S V P S S T F V M G S T V T Q V C Q K H H K L H E I V H I I V  
QRF E

[illegible]

FIG. 21-16

# FIG. 21-17

11641 GTTATAATTCCTATAATTTTTTTTATTCCTCAGACTTTTAAACGGGCTCTGAATGATCGACAAAGGGTAAATAT...TGCATCATTCATGGAGTTAGAAAACGAGCCAGTAATC  
M E L E N E P V I >  
B16R

11761 TTACCAATGCTCACAATAAATACCGTATCATCCGGATATAATATATAGATAATTTATGGGAAAACGAGGACCGGATAATGATAGAAATATACCGATAGATAATGGTAGCAATATGCTA  
L P C P Q I N T L S S G Y N I L D I L W E K R G A D M D R I I P I D N G S N M L >  
B16R

11881 ATTCTGAACCCGACACAAATCAGACTCTGGTATTATATATATGCAATACCAACGAAACCTACTGTGACATGATGTCGTTAAATTTGACAAATCGTGTCTCAGAAATCAAATATAGAT  
I L N P T Q S D S G I Y I C I T T N E T Y C D M M S L N L T I V S V S E S N I D >  
B16R  
<Q S M I D N F K V I T D T E S D F I S  
< ORF F

>Bg12

165

12001 TTTATCTCGTATCCACAATAATAGTAAATGAGAGATCTACTGCGGAAATGGTATGICCCCAATATTAAATGCAATTTATGCTAGTAACGTAACGCGCAGATATTATATGAGCGGACATCGACGCC  
F I S Y P Q I V N E R S T G E M V C P N I N A F I A S M V N A D I I W S G H R R >  
B16R  
<K I E Y G C I T F S L D V P S I T H G L I L A N I A L L T F A S I I H L P C R R  
< ORF F

12121 CTTAGAAATAGAGACTTAACAACGGACACCTGGAATTATTACCATAGAGATGTTAGAAAATGATGCTGGTTATTATACATGTTGTTTAGAATATATATACGGTGGCAAAACATAT  
L R N K R L K Q R T P G I I T I E D V R K N D A G Y Y T C V L E Y I Y G G K T Y >  
B16R  
<R L F L L S L C R V G P I I V M  
< ORF F

12241 AACGTAACCAGAAATTGTAAAATTAGAGGTACGGGATAAAATATACATCCTACTATGCAATACCAGAGGGTGTGTGAACCTCAATAGGTAGTAATTTGACTATTTCGGTGTAGAGTATCG  
N V T R I V K L E V R D K I I H P T M Q L P E G V V T S I G S H L T I A C R V S >  
B16R

09000259

12361 TTGAGACCTCCCAACGGATGCCAGACGCTCTTTTGGATAAGTAATGGTAATGATGGGGACGGACGGTAGAATAAGTGTAGCAAAATAAACTATATGACCGAT  
 L R P P T T D A D V F W I S M G M Y Y E E D D G D G D G R I S V A N K I Y M T D >  
 B16R >

12481 AAGAGACGTGTATTACATCCCGGTTAAACATTAAATCCTGTCAAGGAAGAAGATGCTACAAACGTTTACGTGTATGGCGTTTACTATTCTTAGCATCAGCAAAACAGTTACTGTITAGTATA  
 K R R V I T S R L N I N P V K E E D A T T T F T C M A F T I P S I S K T V T V S I >  
 B16R >

12601 ACGTGAATGTATGTTGTACATTTCCATGTCAATTGAGTTTATAGAATTTTATACATTATCTTCCAACAAGCAATTGACGACGTAATTGCTATGATTAACTCCACGATACATATGCAT  
 T >  
 < V N D E L L C N V F T N S H N V G V I S H M  
 < B17L >

12721 ATTATTAATCACTTGCAGACTATACCTAGAGCTATTTTGACATACCTCGTGTCTTGTGTAATTCAGTATCTATATTATTAAAGTACGTAATCTAGCTATAGTTTATTATTAA  
 < N I M L K C V I G L A I K V Y E H E Q T I A T D I N M F Y T F R A I T K N M L  
 < B17L >

12841 TTTTAGATAATATACCGTCTCCTTATTTTAAATAATGCCACATCCCTTTTAAATCATGAATGGGAATTTCTATGTCATCGTTAGTATATTGTGAACAACAAGACGATATCTATAGG  
 < K L Y Y V T E K M K F I A V D K I L D H I P I E I D D N T Y Q S C C S C I D I P  
 < B17L >

12961 AAAGGGTGGATCGGATACATTGATCTATGTAGTATTTTAAACACACCGCAAACTTTGAAGAATTATATAAATCATTCATTCGATACATCCTTCTATGTTGACATGTATATCCAGGAAT  
 < F P I R Y M S R H L K L V C A F K S S N I Y I M G D I C G E I N V H I Y G P I  
 < B17L >

>DraI  
 >EcoRI  
 >ClaI

FIG. 21-18

# FIG. 21-19

13081 ICITTTTAAATGTCAGGAAATGTATAAAGTAAACATTCGCCGGAAGCGGAGCTTCTACCGGAGTTATATCCGTTCTTAACCTTACAAAATGTAACCAATACCTTTGCATGACTTGTTTT  
 <R K N I D P F T Y V L V N G P L P A E V P T I D T R L K C F T V L V K A H S T K  
 < B17L

>Dra1  
 ^

13201 GTTCGGCAACGTTAGTTTAAACTTGACGAATGGATTAAATTACAATAGCATGATCCGCGCATCTATTAAAGTTTTTACITTAACGCCCTTGATGTTTTTACAGAGACITTAICTAAAT  
 <M P L T L K F K V F P M I V I A H D A C R N L K K V K V G K Y T K V S V K D L M  
 < B17L

13321 TCIAGTACTTGTTATATAAATATAACGGGATATAGAACCGGAATCACCTACCTTAGATACCCAAATTACATTTTATCAGATCCAGATAATAAACAAATTTTGTGCCCTAACAATTG  
 <R T S T H T I F I V P Y L V S D G V K S V W N C K I L D L Y Y V F K T A R V L E  
 < B17L

13441 TATATTGTTATATATTTACAAATTGGTTATGATATCATGTAATAACTTGGAACTCAAGGCACATCGTCGTCAGTTTACACAAATTGGATTTAGTGTAGTATATCTACACATGTATTTTC  
 <I M N Y I K C N T I I D H L L K S D L A C R R V N V C N H N L T T Y R C H Y K E  
 < B17L 167

>Xba1  
 ^

13561 CGGCTATAGTATTCTGGACTAGTGATAAAACTATCGTTATATCTGTCTTCAATGAAGTATCGAGATATTGCTCTCTGTCATATTTCATACACCTGCATAAACITTTCTAGACATCTTACA  
 <A S Y Y E P S T I F S D N Y R D E I F E D L Y Q E R D Y E Y V Q M F K R S H  
 < B17L

13681 ATCCGIGTTATTTAGGATCATATTTACATATTTACTGGTATAAAGATGTTAGATTAGTTAATGGGAATCGTCTATATAATAATGAATATTAAACAATTATATGAGGACTTTTACCACAAAG

>Dra1  
 ^

13801 CATCATAAAATGAGTCGTCGTTATGTTTTAAATATCAACCGCAATCAACTCATAAATACAAGAGAAATGAATATATACATATTTTAGTCATTGGCAATATAGACCATCTTC  
 M S R R L I Y V L N I N R K S T H K I Q E N E I Y T Y F S H C N I D H T S  
 < B18R



13921 TACAGAACTTGATTTTGTAGTTAAACAACTATGATCTAAACAGACGACAAACATGTAACTGGGTATACTGCACCTACACCTGCTATTTGTATAATAATTACTTTACAAACGATGTAAGAT  
T E L D F V V K N Y D L N R R Q H V T G Y T A L H C Y L Y N W Y F T N D V L K I >  
B18R >

14041 ATTATTAAATCATGACGTAATGTAAACGATGAAACCCAGTAGCGGACGTATGCCTGTTTATATATTTGCTTACTAGATGTTGTAATATTTCCACATGATGTAGTATGATATAGATAGACAA  
L L N H D V N V T M K T S S G R M P V Y I L L T R C C N I S H D V V I D M I D K >  
B18R >

14161 AGATAAAACCACTTATCGCATAGAGACTATTCCAACCTACTAGAGTATATAAAATCTCGTTACATGTTATTGAAGGAAGGATATCGCATGAGAACATAGTATCAACTTTATTAGA  
D K N H L S H R D Y S N L L L E Y I K S R Y M L L K E E D I D E N I V S T L L D >  
B18R >

>Clal  
^

>ClaI  
^

168

14281 TAAGGGAATCGATCCTAACTTTAAACAGACGCGATATACAGCGTTACATTATTATTATTGIGTCTCGCACACGTTTATAAACCCAGGTGAGTGTAGAAJACCGATACCGATAAAAAAGGC  
K G I D P N F K Q D G Y T A L H Y Y Y L C L A H V Y K P G E C R K P I T I K K A >  
B18R >

14401 CAAGCGAATTATTTCTTTTGTATACAACATGGAGCTAATCTAAACGCGTTAGATAAATTTGGTAAATACACCATTCCTTTGTATCTTAGTATTGAAATGTGTAAATATTTCTATATGAC  
K C I I S L F I C N S A N L N A L D N C G M T P F M L Y L S I E M C N M I H M I >  
B18R >

14521 TAAAAIGCTGTGACTTTTAAATCCGAATTTCAAAAATATGTAAATATGTAATATGATGATTACCGCTATACIAIGTTATATAACTTCGACTACATACAAACCGATATTCTTGTATGTTAATACA  
K M L L T F M P N F K I C M N H G L T P I L C Y I T S D Y I Q H D I L V M L I H >  
B18R >

FIG. 21-20

>Pst1  
^

FIG. 21-21

14641 TCACIATGAAACAAATGTIGGAGAAATGCCGATAGATGAGCGTCGTATCGTATTCGAGTTTATCAAAACATAATTCACACGTCCTGCAGATTCGATAACTTATTGATGAATAGGTT  
H Y E T N V G E M P I D E R R H I V F E F I K T Y S T R P A D S I T Y L M N R F >  
B18R

>Dra1  
^

14761 TAAAAATATAAATATTTATACCCGCTATGAAGGAAAGACATTATTACACGTAGCATGTGAATATAATAACACAAGTAATAGATTATCTTATACGTATCAACGGAGATATAAATCGGTT  
K N I N I Y T R Y E G K T L L H V A C E Y N M T Q V I D Y L I R I N G D I M A L >  
B18R

>Hpa1  
^

14881 AACCGACAATAACAAACACCGCTACACAACCTCATTATAGATAACAAAGAAATTCGCCATATACCATTAATTTGTTTACTGTATATACTTAGATATATTTAGATAAAGATGTGATAAGATC  
T D N M K H A T Q L I I D N K E N S P Y T I M C L L Y I L R Y I V D K N V I R S >  
B18R

>Nru1  
^

15001 GTTGTGGATCAACTTCCATCTCTACCTATCTTCGATATAAAATCATTTGAGAAATTCATCTACTGTATACCTTTTAGATGACACATTTTAGCATAGGCACGTTAAGAAATCGCGATTC  
L V D Q L P S L P I F D I K S F E K F I S Y C I L L D D T F Y D R H V K N R D S >  
B18R

159

>Cla1  
^

>Xba1  
^

15121 TAAAACGTATCGATACGGCATTTTCAAAATACATGTCGTTCGATAAATACGATGGTATAATAACTAAATGTCACGACGAAACAATGTTACTCAAACGTGCCACTGTCTAGACACTACACT  
K T Y R Y A F S K Y M S F D K Y D G I I T K C H D E T M L L K L S T V L D T T L >  
B18R

>Dra1  
^

15241 ATATGCAGTTTTAAGATGTGCATAATTCGAGAAAGTTAAGAAGATACCTCACCGAGTTAAAAAATAATAACGATAAGTCCCTTTAAATAATATTCTAATATTGAATGAGAGATACCT  
Y A V L R C H N S R K L R R Y L T E L K K Y N M D K S F K I Y S N I M E R Y L >  
B18R

UJ000LJ

15361 TAATGTATATTATAAGATATGTACGTGTCAAAGGTATATGATAAATACTATTTCCCTGTTTTTCACAGATAAAAAATTGCTCTACTAACATTACTACCTTCAGAAATTATATACGAAATATTATA  
 N V Y Y K D M Y V S K V Y D K L F P V F T D K N C L L T L L P S E I I Y E I L Y >  
 B18R

15481 CATGCTGACAAATTAACGATCTTTTATAATATATCGTATCCACCTACCAAAGTATAGTTGTATTTTTCTCATCGCATGTGTGTAAAAAAAAGCTGATATTATATAAAATATTTTAGTGCCGTATA  
 M L T I N D L Y N I S Y P P T K V>  
 B18R

15601 ATAAAGATGACGATGAAAAATGATGGTACATATATATTTTCGTATCATATTATGTTATTGCTATTCACAGTTACGCCATAGACATCGAAATGAAATCAGAGATTCTTCAATAAA  
 M T H K M M V H I Y F V S L S L L L L L L F H S Y A I D I E M E I T E F F N K>  
 B19R

>EcoR1  
 ^

15721 ATGAGAGATACCTACCAGCTAAAGACTCTAAATGGTTGAATCCAGCATGTATGTTCCGGAGGCACAAATGAATGATATGGCCACTCTAGGAGAGCCATTGAGTGCAGAAAGTGCTCCTTATT  
 H R D T L P A K D S K W L N P A C H F G G T M N D M A T L G E P F S A K C P I>  
 B19R

170

15841 GAAGACAGCTTTTTATCGCACAGATATAAGACTATGTGGTTAAATGGGAGAGGCTAGAAAGAATAGACGGCGACAGGTTTCTAATAAACGTGTTAAACATGGTGATTATGGATAGCC  
 E D S L L S H R Y K D Y V V K W E R L E K H R R R Q V S N K R V K H G D L W I A>  
 B19R

>Bgl2  
 ^

15961 AACTATACATCTAAATTCAGTAACCGTAGGTATTTGTGACCGTAACACTACAAAGATGGTGACTGTGTTCAGGGTATAGTTAGATCTCATATTAAAAAACCTTCCTTCATGCGATTCCAAAA  
 N Y T S K F S N R R Y L C T V T K N G D C V Q G I V R S H I K K P P S C I P K>  
 B19R

FIG. 21-22

>EcoR1  
^  
FIG. 21-23

16081 ACATAIGAACTAGGTACTCATGATAAGTATGGCATAGACTTATACTGTGGAACTCTTTACGGCAAAACATTATAATAAATTAAGGAAATTAATATCGACGAC  
T Y E L G T H D K Y G I D L Y C G I L Y A K H Y N N I T W Y K D N K E I N I D D>  
B19R

16201 ATTAAGTATTCAACAAACGGGAAAGGAATTAATTATTCATAATCCAGAGTTAGAAGATAGCGGGAAGATACGACTGTACGTTACGTTACGACGACGTTAGAAATCAAGAATGATATCGTAGTA  
I K Y S Q T G K E L I I H N P E L E D S G R Y D C Y V H Y D D V R I K N D I V V>  
B19R

>DraI  
^

171

16321 TCAAGATGTAAAATACCTACGGTTATACCGTCACAAGACCACAGGTTTAACTAATACTAGATCCGAAATCAACGTAACGATAGGAGAACCTGCCAATAATAACATGCCACTGCTGTGTCA  
S R C K I L T V I P S Q D H R F K L I L D P K I N V T I G E P A M I T C T A V S>  
B19R

16441 ACGTCATTATTGACGATGTACTGATTGAATGGGAAATCCATCCGGATGGCTTATAGGATTCGATTTTGTATAGTACTCTGTCTTTAACTAGTAGAGCGGTATCACCAGGCGGACC  
T S L L I D D V L I E W E N P S G W L I G F D F D V Y S V L T S R G G I T E A T>  
B19R

16561 TTGTACTTTGAAATGTTACTGAAGAATATATAGGTAATACATATATAATGTCGTGGACACA/ACTATTATTTTGAAAAAACCCCTTACAACIACAGTAGTATTGGAGTAAATATACAATGCA  
 L Y F E N V T E E Y I G N T Y K C R G H N Y Y F E K T L T T T V V L E>  
 B19R

16681 TTTTATATACATTACTGAATTATTATTACTGAATTATTATTACTGAATTATTATTATATATCGTATTTGTGCTATAGAATGGATGAAGATACGCGACTATCTAGGTATTTGTATCTC  
 M D E D T R L S R Y L Y L>  
 B20R

16801 ACCGATAGAGAACATATAAATGTAGACTCTATTAAACAGTTGTGTAAATATCAGATCCTAATGCATGTTATAGATGTGGATGTACGGCTTTACATGAGIACITTTTATAATTATAGATCA  
 T D R E H I N V D S I K Q L C K I S D P N A C Y R C G C T A L H E Y F Y H Y R S>  
 B20R

16921 GTCAACGGAAATACAAGTATAGATACAACGGTTACTATCAATATTATTCACTACCGATTATGAAATTTATAATGAATATTATTATGATTATGATAGAACCTGGTATGAACACGGAG  
 V N G K Y K Y R Y N G Y Y Q Y Y S S S D Y E N Y N E Y Y D D Y D R T G M H S E>  
 B20R

>EcoRI  
 ^

17041 AGCGATAGTGAGGTGATATATATCAATCAAAACACAGAATATGAGATGAATTTCTATGATGAACACAGAATCAAAAGTACACAACACATGACTTATAA  
 S D S E S D N I S I K T E Y E N E Y E F Y D E T Q D Q S T Q H N D L>  
 B20R

FIG. 21-24



Office européen  
des brevets

**RAPPORT DE RECHERCHE**  
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2  
de la loi belge sur les brevets d'invention  
du 28 mars 1984

Numero de la demande  
nationale

BE 9000259

B0 2526

Page 1

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                         |                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Catégorie                                                                                                                                                                                                                                                                | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes                                                                                                                                                                                                     | Revendication concernée | CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)                           |
| P,X                                                                                                                                                                                                                                                                      | WO-A-8 912 103 (APPLIED BIOTECHNOLOGY)<br>* revendications *<br>---                                                                                                                                                                                                                 | 1-4,7                   | C12N15/39<br>C12N15/86<br>C12Q1/70<br>A61K39/285<br>A61K39/205 |
| P,X                                                                                                                                                                                                                                                                      | VIROLOGY<br>vol. 179, no. 1, Novembre 1990,<br>pages 276 - 286;<br>PERKUS, M.E. ET AL.: 'Vaccinia virus host range genes'<br>* le document en entier *<br>---                                                                                                                       | 1-33                    |                                                                |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                        | MICROBIAL PATHOGENESIS<br>vol. 6, no. 3, Mars 1989, ABERDEEN, UK<br>pages 219 - 226;<br>LAI, A. C. K. & POGO, B. G. T.: 'Attenuated deletion mutants of vaccinia virus lacking the vaccinia growth factor are defective in replication in vivo'<br>* le document en entier *<br>--- | 8,9,15,<br>19-21        |                                                                |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                        | ---                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 1-33                    |                                                                |
| P,Y                                                                                                                                                                                                                                                                      | VIROLOGY<br>vol. 179, no. 1, Novembre 1990,<br>pages 247 - 266;<br>GOEBEL, S.J. ET AL.: 'The complete DNA sequence of Vaccinia Virus'<br>* page 252 - page 255; figure 4; tableau 1 *<br>---                                                                                        | 1-33                    | DOMAINES TECHNIQUES<br>RECHERCHES (Int. Cl.5)                  |
| D,Y                                                                                                                                                                                                                                                                      | PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,<br>vol. 83, 1986, WASHINGTON US<br>pages 5573 - 5577;<br>GILLARD, S. ET AL.: 'Localization and sequence of a vaccinia virus gene required for multiplication in human cells'<br>---<br>-/--                                 | 1-33                    | C12N<br>C07K                                                   |
| Date d'achèvement de la recherche                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Examineur               |                                                                |
| LA HAYE                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                     | CHAMBONNET F.J.         |                                                                |
| 05 MARS 1992                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                         |                                                                |
| <b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b>                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                         |                                                                |
| X : particulièrement pertinent à lui seul<br>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie<br>A : arrière-plan technologique<br>O : divulgation non-écrite<br>P : document intercalaire                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                         |                                                                |
| T : théorie ou principe à la base de l'invention<br>E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date<br>D : cité dans la demande<br>L : cité pour d'autres raisons<br>.....<br>& : membre de la même famille, document correspondant |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                         |                                                                |



établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2  
de la loi belge sur les brevets d'invention  
du 28 mars 1984

**Numero de la demande nationale**

Page 2

| Catégorie                                                                                                                                                                                                                           | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes                                                                                                                                                    | Revendication concernée                                                                                                                                                                                                                                         | CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| P, Y                                                                                                                                                                                                                                | ARCHIVES OF VIROLOGY<br>vol. 105, Avril 1989, WIEN, AU<br>pages 15 - 27;<br>ALTENBURGER, W. ET AL.: 'Partial deletion of the human host range gene in the attenuated vaccinia virus MVA'<br>* le document en entier *<br><br>----- | 1-33                                                                                                                                                                                                                                                            | DOMAINES TECHNIQUES<br>RECHERCHES (Int. Cl.5) |
| LA HAYE                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                    | 05 MARS 1992                                                                                                                                                                                                                                                    | CHAM BONNET F. J.                             |
| CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                               |
| X : particulièrement pertinent à lui seul<br>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie<br>A : arrière-plan technologique<br>O : divulgation non-écrite<br>P : document intercalaire |                                                                                                                                                                                                                                    | T : théorie ou principe à la base de l'invention<br>E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date<br>D : cité dans la demande<br>L : cité pour d'autres raisons<br>& : membre de la même famille, document correspondant |                                               |

BE 9000259  
BO 2526

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

05/03/92

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|-------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| WO-A-8912103                                    | 14-12-89               | AU-A- 3776689<br>EP-A- 0422072          | 05-01-90<br>17-04-91   |
| -----                                           |                        |                                         |                        |